



République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

N° d'ordre :41/DS/2020
Série :01/Bic/2020

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences
Spécialité: Biochimie appliquée

Par : DEMMAK Rym Gouta

**Evaluation phytochimique et biologique des substances
naturelles de deux plantes du Sahara Algérien :
Solenostemma argel Hayne et *Myrtus nivellei* Batt et Trab**

Soutenue publiquement le : 09/07/2020

Devant le jury :

Président : CHIKHI A.

Encadreur : BENSEGUENI A.

Co-encadreur : SAHPAZ S.

Examineurs :

ZELLAGUI A.

CHIBANI S.

SOBHI W.

Pr. Univ. F. Mentouri /Constantine 1.

Pr. Univ. F. Mentouri/ Constantine 1.

Pr.Univ. Droit et Santé/ Lille 2.

Pr. Univ. L. Ben Mhidi/Oum El Bouaghi.

M.C.A Univ.F.Mentouri/Constantine 1.

M.C.A Univ. Ferhat abbas /Setif.

Année universitaire : 2019 – 2020

ACRONYMES ET SYMBOLES

Å : Angstrom
ACh : acétylcholine
AChE : acétylcholinesterase
ADN : adénosine désoxyribonucléique
ARN :acide ribonucléique
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
APGIII : angiospermsphylogeny Group
AcOEt : extrait acétate d'éthyle
AcOH : acide acétique
ACN : acétonitrile
ATCI :acétylthiocholine iodide
AS : anisaldéhyde sulfurique
BH : brain heart cystéiné
BuOH : butanol
BChE :butyrylcholinesterase
CC : chromatographie liquide sur colonne ouverte
CPC : chromatographie de partage centrifuge
CLHP : chromatographie liquide haute performance
CLHP-DAD : chromatographie liquide à haute performance- diode-array detector
CLHP/SM : chromatographie liquide haute performance- Spectrométrie de masse
CLHP/UV-VIS : chromatographie liquide à haute performance/ultra violet-visible
CCM : chromatographie sur couche mince
CHCl₃ : chloroforme
CMI : concentration minimale inhibitrice
CI₅₀ : concentration inhibitrice à 50%
COSY :*Correlated Spectroscopy*
CD₃OD : méthanol deutéré
D : doublet
Dd : doublet de doublets
DMSO :diméthylsulfoxyde
DO : densité optique
DAD : *Diode Array Detector*
EB : extrait brut
E.EP. : Extrait éther de pétrole
E. CH₂Cl₂ : Extrait dichlorométhane
E. MeOH : Extrait méthanolique
E. EtOH/H₂O : Extrait ethanolique/eau
EAG : équivalent en acide gallique
ES : extrait sec
ESI :*Electrospray Ionization*
FPP :farnésylpyrophosphate
GPP :géranylphosphate
H₃PW₁₂O₄₀ :acidephospho-tungstique
H₃PMo₁₂O₄₀ : acide phosphomolybdique
HIV : *humanimmunodeficiency virus*
H₂SO₄ : acide sulfurique
Hex : hexane
Hep : heptane

HRMS :*High-resolution Mass Spectrometry*
HSQC :*heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy*
HMBC :*heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy*
Hz : Hertz
INT : para-iodonitrotétrazolium
IR : infra-rouge
J (Hz) : constante de couplage exprimée en Hertz
kcal/ mole : kilos calorie/mole
LC/MS-ESI : liquid chromatography/ mass spectrometry-Electrospray ionization
MeOH : methanol
MEP : méthyl-érythritol-4-phosphate
MHA :Mueller Hinton agar
MHz : Megahertz
MH : bouillon muellerhinton
MtBE : méthyl *tert*-butyl
m/z : masse/charge d'un ion
MA : maladie d'Alzheimer
M. nivellei : *Myrtus nivellei*
Na₂CO₃ : carbonate de sodium
nm : nanomètre
NOESY : *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*
ORL : oto-rhino-laryngologie
PEG : polyéthylène glycol
PDB : protein data bank
PDA : Potato Dextrose Agar
Ppm : partie par million
ROS :*reactiveoxygenspecies*
RMN : résonance magnétique nucléaire
Rf : rapport frontal
RC : ringer cystéine
RMN : résonance magnétique nucléaire
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
S.argel : *Solenostemma argel*
S.S. : système de solvant
Tr : Temps de rétention
TMS : tétraméthylsilane
UFC : unité formant colonie
δ : déplacement chimique

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Schéma d'une synapse et mécanismes de neurotransmission cholinergique
- Figure 2**: Structures chimiques de quelques inhibiteurs de l'AChE
- Figure 3** : Aire de répartition du genre *Solenostemma*
- Figure 4** : Aspect botanique de *Solenostemmaargel*
- Figure 5**: Distribution actuelle des Myrtaceae
- Figure 6**: les différentes parties de *Myrtusnivellei*
- Figure 7** : Formules générales des dérivés de l'acide benzoïques
- Figure 8**: Formule générale des dérivés de l'acide cinnamique
- Figure 9**: Structure de base des flavonoïdes
- Figure 10**: Structure des différentes classes des flavonoïdes
- Figure 11**: Structure des flavonols
- Figure 12**: Structure de la catéchine
- Figure 13**: Exemples de flavones naturelles
- Figure 14**: Structure des anthocyanes
- Figure 15** : Structure des chalcones
- Figure 16**: Structure du 8-Prénylnaringinine
- Figure 17**: Schéma de biosynthèse des prégnanes
- Figure 18**: Schéma d'obtention des différents extraits de *Solenostemmaargel*
- Figure 19** : réaction colorimétrique au Fast Blue B salt
- Figure 20** : Réaction colorimétrique d'Ellman
- Figure 21** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique
- Figure 22**: Composition en polyphénols des extraits de *Solenostemmaargel*
- Figure 23**: Bioautographie des extraits de *S. argel*
- Figure 24** : Profil chromatographique de l'extrait chloroformique en CLHP analytique et en CCM révélée à l'anisaldéhyde sulfurique
- Figure 25** : Résultats du fractionnement sur colonne de l'extrait CHCl_3 . **(a)** : suivi sur CCM des 23 fractions ; **(b)** : suivi de l'activité anti-AChE des 23 fractions par bioautographie
- Figure 26** : Profil CLHP (254 nm) et CCM (révélée à 254 nm et à l'AS) des produits purs isolés à partir des fractions 10 (A), 13 (B) et 19 (C)
- Figure 27**: Profil CLHP et CCM (révélée à 254 nm et à l'AS) des produits purs isolés à partir des sous fractions 10 et 16
- Figure 28** : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **1**
- Figure 29** : Spectre du RMN ^1H du composé **1** (500MHz, CD_3OD)
- Figure 30**: Spectre RMN ^{13}C du composé **1** (500MHz, CD_3OD)
- Figure 31** : Spectre HSQC du composé **1** (500MHz, CD_3OD)
- Figure 32**: Structure du composé **1**
- Figure 33** : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **2**
- Figure 34** : Spectre RMN ^1H et ^{13}C du composé **2** (500MHz, CD_3OD)
- Figure 35** : Corrélation HMBC du composé **2** (500MHz, CD_3OD)
- Figure 36** : Structure du composé **2**
- Figure 37** : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **3**
- Figure 38** : Spectres des RMN ^1H (a) et ^{13}C (b) du composé **3** (500MHz, CD_3OD)
- Figure 39** : Spectre HMBC du composé **3** (500MHz, CD_3OD)
- Figure 40** : Structure du composé **3**
- Figure 41** : Spectre du ^1H et ^{13}C du composé **4** (500MHz, CD_3OD)
- Figure 42** : Spectres HSQC et COSY du composé **4**
- Figure 43** : Corrélation HMBC du composé **4**
- Figure 44**: Structure du composé **4**

Figure 45 : Spectre RMN¹H du composé **5** (500MHz, CD₃OD)
Figure 46 : Spectre HMBC du composé **5** (500MHz, CD₃OD)
Figure 47 : Structure du composé **5**
Figure 48 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **6**
Figure 49 : Spectres des RMN ¹H et ¹³C du composé **6** (500MHz, CD₃OD)
Figure 50 : Corrélation HMBC du composé **6** (500MHz, CD₃OD)
Figure 51 : Structure du composé **6**
Figure 52 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **7**
Figure 53 : Spectre du RMN ¹H du composé **7** (500MHz, CD₃OD)
Figure 54 : Spectre du ¹³C du composé **7** (500MHz, CD₃OD)
Figure 55 : Spectre HSQC du composé **7** (500MHz, CD₃OD)
Figure 56 : Corrélation HMBC du composé **7** (500MHz, CD₃OD)
Figure 57 : Structure du composé **7**
Figure 58 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **1**
Figure 59 : Spectre des RMN ¹H et RMN¹³C du composé **8** (500MHz, CD₃OD)
Figure 60 : Corrélation HMBC entre le proton anomérique et le C-15 du composé **8**
Figure 61 : Spectre COSY du composé **8** (500MHz, CD₃OD)
Figure 62 : Structure du composé **8**
Figure 63: Bioautographie des composés purs
Figure 64 : Représentation 3D montrant le mode de positionnement de la galanthamine (a) et du kaempférol (b) dans les sites (CAS) (bleu) et PAS (rouge) de la cavité catalytique de l'AChE
Figure 65 : Représentation 3D montrant les différents types d'interactions de la galanthamine (a) et du kaempférol (b) dans les sites (CAS) (bleu) et PAS (rouge) de la cavité catalytique de l'AChE
Figure 66 : Représentation 3D montrant le mode de positionnement de la galanthamine (a) et du kaempférol (b) dans les sites (CAS) (bleu) et PAS (rouge) de la cavité catalytique de la BChE
Figure 67 : Représentation 3D montrant les différents types d'interactions de la galanthamine (a) et du kaempférol (b) dans les sites (CAS) (bleu) et PAS (rouge) de la cavité catalytique de la BChE
Figure 68: Protocole d'extraction de *Myrtusnivelei*
Figure 69: préparation des boîtes de pétri à différentes concentrations
Figure 70: Remplissage des puits de la plaque de l'ensemencement par les souches
Figure 71: Préparation de la suspension gélose-bactérie
Figure 72: Développement des deux phases sur plaque CCM
Figure 73: Composition en polyphénols des extraits de *Myrtusnivelei*
Figure 74 : Profil chromatographique de l'extrait CH₂Cl₂
Figure 75: Schéma de purification de 2 g de l'extrait CH₂Cl₂

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1 :** Structure chimique des huiles essentielles du genre *Solenostemma*
- Tableau 2:** Structure des différents flavonoïdes rencontrés dans le genre *Solenostemma*
- Tableau 3:** Structures des prégnanes recensés dans le genre *Solenostemma*
- Tableau 4 :** Structures des dérivés phénoliques rencontrés dans le genre *Solenostemma*
- Tableau 5 :** Structures chimiques des huiles essentielles du genre *Myrtus*
- Tableau 6 :** Structure des différents flavonoïdes rencontrés dans le genre *Myrtus*
- Tableau 7 :** Structure des phloroglucinols rencontrés dans le genre *Myrtus*
- Tableau 8:** Mode de révélation des substances naturelles de *S. argel*
- Tableau 9 :** gradient d'éluion utilisé pour déterminer le profil chromatographique de l'extrait chloroformique
- Tableau 10 :** Screening des extraits de *S. argel* sur plaque CCM
- Tableau 11 :** CI_{50} de l'activité anticholinestérasique de *S. argel*
- Tableau 12 :** Mode d'éluion utilisé pour le fractionnement des produits à analyser
- Tableau 13 :** données quantitatives et chromatographiques des produits isolés
- Tableau 14 :** caractéristiques quantitatives et chromatographiques des produits purifiés à partir des sous-fractions 10 et 16
- Tableau 15:** Déplacements chimiques en RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (500 MHz) du composé **1** dans CD_3OD
- Tableau 16 :** Déplacements chimiques en RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (500 MHz) du composé **2** dans CD_3OD
- Tableau 17 :** Les différentes attributions du ^{13}C et 1H du composé **3**
- Tableau 18 :** Déplacements chimiques du spectre RMN 1H et ^{13}C du composé **4** dans CD_3OD
- Tableau 19 :** Déplacements chimiques du spectre RMN 1H et ^{13}C du composé **5** dans CD_3OD
- Tableau 20 :** Déplacements chimiques du spectre RMN 1H et ^{13}C du composé **6** dans CD_3OD
- Tableau 21 :** Déplacements chimiques du spectre RMN 1H et ^{13}C du composé **7** dans CD_3OD
- Tableau 22:** Déplacements chimiques du spectre RMN 1H et ^{13}C du composé **8** dans CD_3OD
- Tableau 23 :** Pourcentage d'inhibition des produits purs à l'égard de l'AChE et BChE à $10^{-4}M$
- Tableau 24 :** prédiction des propriétés physico-chimiques des produits bioactifs par les règles de Lipinski et Veber
- Tableau 25 :** prédiction des propriétés pharmacocinétiques
- Tableau 26 :** prédiction de la toxicité potentielle des produits bioactifs
- Tableau 27 :** Energies d'interaction du kaempférol et de la galanthamine avec l'AChE et la BChE
- Tableau 28 :** comparaison des interactions mises en jeu par le kaempférol avec l'AChE et BChE
- Tableau 29:** compositions de différents systèmes Arizona analysés
- Tableau 30 :** CMI des trois extraits de *M. nivellei*
- Tableau 31 :** CCM (révélée à 254 nm et à l'anisaldéhyde sulfurique) et bioautographie d'immersion des extraits CH_2Cl_2 , MeOH et EtOH/ H_2O à l'égard des quatre bactéries

TABLES DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

PARTIE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Aperçu sur les maladies traitées.....	4
1.1. La maladie d'Alzheimer.....	4
1.1.1. Facteurs de risque.....	5
1.1.2. Molécules anticholinesterasiques.....	5
1.1.2.1. Les composés thérapeutiques.....	5
1.1.2.2. Action des composés phénoliques sur l'AChE.....	7
1.2. Les maladies infectieuses.....	8
1.2.1. La résistance aux antibiotiques.....	8
1.2.1.1. La résistance naturelle.....	9
1.2.1.2. La résistance acquise.....	10
1.2.2. Les composés antimicrobiens des plantes.....	10
2. Aperçu bibliographique sur les plantes étudiées.....	11
2.1. La famille des <i>Apocynaceae</i>	11
2.1.1. Taxonomie et classification.....	11
2.1.2. Intérêt économique, pharmacologique et nutritionnel.....	12
2.1.3. L'espèce <i>Solenostemmaargel</i>	12
2.1.3.1. Origine et répartition géographique.....	12
2.1.3.2. Description botanique.....	13
2.1.3.3. Utilisation en médecine traditionnelle.....	13
2.1.3.4. Composition chimique du genre <i>Solenostemma</i>	14
2.2. La famille des <i>Myrtaceae</i>	21
2.2.1. Taxonomie et classification.....	22
2.2.2. Intérêt économique, pharmacologique et nutritionnel.....	22

2.2.3. L'espèce <i>Myrtus nivellei</i>	22
2.2.3.1. Origine et répartition géographique.....	22
2.2.3.2. Description botanique.....	23
2.2.3.3. Utilisation en médecine traditionnelle	24
2.2.3.4. Composition chimique du genre <i>Myrtus</i>	24
3. Aperçu bibliographique sur les métabolites secondaires.....	31
3.1. Généralités.....	32
3.2. Les composés phénoliques.....	32
3.2.1. Les acides phénoliques.....	32
3.2.2. Flavonoïdes.....	33
3.2.2.1. Distribution des flavonoïdes dans le règne végétal.....	34
3.2.2.2. Classification.....	34
3.2.2.3. Propriétés biologiques des flavonoïdes.....	38
3.3. Prégénanes.....	44
3.3.1. Biosynthèse.....	41
3.3.2. Activités biologiques.....	42

PARTIE 2: ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DE L'ESPECE

SOLNESTOMMA ARGEL

Chapitre I. Matériel et méthodes.....	43
1. Etude phytochimique de <i>S. argel</i>	43
1.1. Récolte et identification du matériel végétal.....	43
1.2. Protocole d'extraction des substances bioactives.....	43
1.3. Screening phytochimique par chromatographie sur couche mince.....	43
1.4. Dosage des polyphénolstotaux.....	46
2. Analyses biologiques.....	47
2.1. Méthode autobioautographique par CCM.....	47
2.2. Méthode d'Ellman sur microplaques.....	48
3. Séparation et purification des molécules bioactives.....	50
3.1. Analyse par CCM.....	50
3.2. Analyse par CLHP analytique.....	50
3.3. Chromatographie sur colonne de gel de silice.....	51
3.4. CLHP préparative.....	52
4. Analyses structurales.....	52

4.1.Spectrométrie de masse (SM).....	52
4.2.Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	52
4.2.1. RMN monodimensionnelle	53
4.2.2. RMN bidimensionnelle.....	53
5. Simulation moléculaire.....	54
5.1.Filtrage ADMET.....	54
5.1.1. Propriétés physico-chimiques.....	54
5.1.2. Propriétés pharmaco-cinétiques.....	55
5.1.3. Toxicité potentielle.....	55
5.2.Arrimage « docking » moléculaire	56
5.2.1. Préparation des enzymes.....	56
5.2.2. Préparation des inhibiteurs.....	56
5.2.3. Protocole de docking moléculaire par Glide.....	57

Chapitre II : Résultats et discussion

1. Analyse phytochimique.....	59
1.1. Investigation phytochimique.....	59
1.2.Teneur en polyphénols totaux.....	60
2. Effets des extraits de <i>S. argel</i> sur l'activité de la cholinestérase	61
2.1. Analyse colorimétrique au Fast Blue B Salt.....	61
2.2. Analyse colorimétrique d'Ellman.....	62
3. Fractionnement bioguidé de l'extrait chloroformique.....	62
3.1.Profils chromatographiques et fractionnement de l'extrait.....	62
3.2. Analyse bioautographique des fractions de colonne.....	63
3.3. Mode de purification des fractions sélectionnées.....	65
3.3.1. Cas des fractions 10,13 et 19.....	65
3.3.2. Cas de la fraction 17.....	66
4. Identification structurale des produits isolés.....	68
4.1.Composés 1 : Kaempférol.....	68
4.2. Composé 2 : Astragaline.....	71
4.3. Composé 3 : kaempférol-3-O-β-D-glucopyranosyl(1→6)rhamnopyranose...75	
4.4.Composé 4 :déhydrovomifoliol.....	78
4.5.Composé 5 :acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque.....	82
4.6.Composé 6 :Solragine I.....	84
4.7.Composé 7 :14,15-dihydroxyprogestérone.....	89

4.8.Composé 8 :14,15-dihydroxy-pregn-4-ène-3,20-dione-15β-D-glucopyranoside.....	94
5. Evaluation de l'activité anticholinestérasique des produits identifiés.....	98
6. Analyse <i>in silico</i> des molécules bioactives.....	100
6.1.Filtrage ADMET.....	100
6.1.1. Propriétésphysico-chimiques.....	100
6.1.2. Propriétéspharmaco-cinétiques.....	102
6.1.3. Toxicitépotentielle.....	102
6.2. Docking moléculaire.....	103
6.2.1. Analyse visuelle des interactions avec l'AChE.....	104
6.2.2. Analyse visuelle des interactions avec la BChE.....	105
6.2.3. Analyse comparative des interactions avec l'AChE et la BChE.....	106

**PARTIE 3 : ANALYSE CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES METABOLITES
SECONDAIRES DE MYRTUS NIVELLEI**

Chapitre I : Matériel et méthodes.....	109
1. Etude phytochimique.....	109
1.1.Matériel végétal.....	109
1.2.Extraction des métabolites secondaires.....	109
1.3. Dosage des polyphénols totaux.....	110
2. Etude de l'activité antimicrobienne.....	110
2.1. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	110
2.2.Analyse bioautographique.....	112
3. Isolement des métabolites secondaires.....	113
3.1.Chromatographie de partage centrifuge.....	113
3.2.Choix du système de solvants Arizona.....	113
3.3.Fractionnement bioguidé.....	114
Chapitre II : Résultats et discussion	
1. Dosage des polyphénols totaux.....	116
2. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	116
2.1. La CMI.....	116
2.2.Choix de l'extrait optimum pour l'isolement des molécules bioactives....	119
3. Isolement des molécules bioactives.....	121
CONCLUSIN GENERALE ET PERSPECTIVES	123
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

Remerciements

Cette thèse a été réalisée entre le Laboratoire de Biochimie Appliquée, Université des Frères Mentouri, Constantine 1 sous la direction du Professeur Bensegueni Abderrahmane et le Laboratoire de Pharmacognosie, Université Droit et Santé, Lille 2 sous la direction du Professeur Sahpaz Sevser.

Je remercie très sincèrement Monsieur le Professeur Bensegueni Abderrahmane pour la confiance qu'il m'a accordé, sa disponibilité, sa rigueur scientifique et ses encouragements tout au long de la réalisation de ce travail, qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance et mes sincères remerciements à Madame la Professeur Sahpaz Sevser pour son accueil au sein du Laboratoire de Pharmacognosie et de m'avoir consacré tous les moyens nécessaires pour la réalisation de ce travail. La qualité de ses conseils scientifiques, sa générosité et sa gentillesse m'ont été d'une grande aide.

Mes remerciements vont également aux membres du jury : je remercie très sincèrement Monsieur Chikhi Abdelouahab, Professeur à l'université des Frères Mentouri, Constantine 1 d'avoir accepté de présider le jury. Je remercie Monsieur ZELLAGUI Amar, Professeur à l'université Larbi Ben Mhidi, Oum El Bouaghi ; Madame Sobhi Wided, Maître de conférence à l'université Ferhat Abbas, Setif 1 et Monsieur Chibani Salih, Maître de conférence à l'université des Frères Mentouri Constantine 1 qui ont accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie Dr Bazri K, Maître de conférences à l'université des Frères Mentouri Constantine 1 pour l'identification structurale des plantes.

Mes sincères remerciements vont à Dr Christel Neut, directrice du laboratoire de bactériologie de la Faculté de Pharmacie de Lille de m'avoir permis de travailler la partie antibactérienne au sein de son laboratoire.

Je remercie très profondément Madame Boutaghane Naima, Maître de conférences à l'université des Frères Mentouri Constantine 1 pour son aide et ses conseils dans l'interprétation spectrale.

Je remercie également mes collègues et amis Mokrani Elhassen et Teniou Soumia pour m'avoir aidé dans la réalisation de la partie Docking moléculaire.

Sans oublier les membres du laboratoire de Pharmacognosie Simon Bordage, Thierry Hennebelle, Céline, Vincent, Jennifer ainsi que mes amis Laetitia, Ameni, Ramla, Moussa et mon amie de longue date Besma.

Tous les mots existants ne sauront exprimer ma profonde gratitude à mes chers parents, mes sœurs et mon frère, qui m'ont toujours soutenu et encouragé tout au long de la préparation de cette thèse.

Enfin, mes remerciements s'adressent à mon cher et tendre mari pour son soutien, sa générosité et disponibilité.

A ma petite princesse Sofia

Introduction

Depuis l'antiquité, l'Homme n'a cessé d'utiliser diverses ressources naturelles afin de soigner et traiter toutes sortes de pathologies. Au fil des années, les connaissances empiriques accumulées ont permis aux différentes civilisations de développer les principes actifs issus des plantes en médicaments. En effet, plus de 120 composés provenant de plantes sont utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont utilisés selon leur usage traditionnel (Cragg et al., 1997; Cordell and Colvard, 2005). Toutefois, au cours de ces dernières décennies, plusieurs traitements médicamenteux ont été développés à base de molécules de synthèse qui, parfois présentent malheureusement des effets indésirables graves obligeant les instances officielles à les retirer du marché tels que le Fonzylane et le Médiator (Pulce and Saviuc, 2011; Bensadon et al., 2011). D'où le regain d'intérêt pour les plantes médicinales pour rechercher de nouvelles molécules bioactives naturelles capables de remplacer les médicaments synthétiques tout en répondant aux différents problèmes de santé publique

L'Algérie dispose d'un riche patrimoine de plantes médicinales composé de près de 3000 espèces appartenant à différentes familles botaniques dont 15 % sont endémiques (Quézel and Santa, 1963) utilisées traditionnellement comme remède contre diverses pathologies telles que le diabète, les troubles cardiovasculaires, les maladies infectieuses et bien d'autres maladies.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail sur deux espèces de notre choix vivant dans le Sahara Algérien : *Solenostemma argel* (*Apocynaceae*) et *Myrtus nivellei* (*Myrtaceae*).

Au-delà de l'objectif qui vise à valoriser davantage ce riche potentiel végétal Algérien, à ce jour encore très mal exploité, l'objectif principal de ce travail consiste à caractériser les molécules bioactives du métabolisme secondaire de ces deux plantes et à déterminer leurs propriétés biologiques.

Notre contribution à la connaissance phytochimique des deux espèces *Solenostemma argel* et *Myrtus nivellei* englobe trois aspects :

-Le premier aspect, d'ordre phytochimique consiste à isoler et à identifier les métabolites secondaires, quantitativement bien représentés, par des méthodes chromatographiques à l'échelle préparative et par des méthodes spectroscopiques telles que la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire.

-Le deuxième aspect est consacré à une évaluation des activités biologiques :

*anticholinestérasique, notamment dans le cas de la plante *Solenostemma argel* qui a montré une forte activité inhibitrice des cholinestérases, enzymes fortement impliquées dans la maladie d'Alzheimer.

* antimicrobienne à l'égard de différentes bactéries et champignons pouvant être pathogènes pour l'homme, notamment dans le cas de *Myrtus nivellei* pour laquelle aucune étude dans ce domaine n'a encore été réalisée

-Le troisième aspect consiste à prédire les propriétés pharmacologiques des molécules bioactives et leur mode d'interactions avec les enzymes cholinestérasiques, par des méthodes de simulation informatique.

La première partie de notre travail est consacrée à la description des données bibliographiques relatives à la maladie d'Alzheimer, à la résistance bactérienne, aux aspects botanique, médicinal et chimique des genres *Solenostemma* et *Myrtus*.

La deuxième partie se rapporte à l'étude phytochimique et biologique de l'espèce *Solenostemma argel* qui comprend deux chapitres :

- ✓ le premier illustre les différentes techniques d'extraction et de purification, d'analyses de structure et de l'activité biologique notamment anticholinestérasique mais aussi de simulation des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques et des interactions intermoléculaires.
- ✓ le deuxième compare et discute les résultats des différentes analyses phytochimique, structurale et biologique *in vitro* et *in silico* obtenues par des méthodes prédictives des propriétés ADMET et des interactions de type enzyme-inhibiteur.

La troisième partie correspond à l'analyse chimique et biologique des métabolites secondaires de l'espèce *Myrtus nivellei*. Elle est également divisée en deux chapitres :

- ✓ le premier décrit les travaux d'extraction, d'isolement des métabolites secondaires et d'évaluation de l'activité antimicrobienne
- ✓ le deuxième est consacré aux résultats et discussion relatifs au dosage des polyphénols de *Myrtus nivellei*, à son activité antimicrobienne en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI) des trois extraits, méthanol, éthanol/eau

et dichlorométhane et enfin à l'isolement des molécules bioactives à partir de ce dernier

Enfin, la dernière partie rassemble la conclusion générale et les perspectives de recherches.

Partie 1 :
Synthèse bibliographique

1. Aperçu sur les maladies traitées

1.1. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative du tissu cérébral qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales. C'est la principale cause de démence chez les personnes âgées, touchant environ 24 millions de malades à travers le monde (Ghnimi, 2015).

Cette maladie a été découverte au début du 20^{ème} siècle par le neuropsychiatre Allemand Aloïs Alzheimer (1864-1915). Il a étudié le cas d'une femme d'une cinquantaine d'années qui présentait des troubles de la mémoire et du comportement, des problèmes d'orientation, des hallucinations et des signes de paranoïa (trouble mental manifesté par des difficultés relationnelles et surtout un délire de la persécution). En générale, un patient atteint de MA présente des difficultés à se souvenir des noms, des faits récents, à trouver ses mots et à mettre en place ses idées. De plus, il rencontre des problèmes de motricité et d'orientation dans l'espace et dans le temps. A des stades avancés, le sujet finit par avoir des difficultés à accomplir les simples tâches de la vie quotidienne. Il présente aussi des troubles psycho-comportementaux tels que l'agressivité, l'anxiété, la dépression, les hallucinations ou paranoïa (Lanari et al., 2006).

A ce jour, la MA reste incurable. Cependant, l'une des approches les plus convoitées pour le traitement de cette maladie consiste à augmenter le niveau d'acétylcholine (figure 1) dans le cerveau en utilisant des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Ingkaninan et al., 2003). En effet, la plupart des médicaments anti-Alzheimer disponibles sur le marché tel que la donepezil, la rivastigmine et la galantamine agissent sur l'activité cholinergique en inhibant la dégradation de l'acétylcholine. L'acétylcholinestérase (AChE), est une enzyme qui catalyse spécifiquement l'hydrolyse de l'acétylcholine en acide acétique et choline. Elle régule ainsi la transmission de l'influx nerveux au niveau des synapses cholinergiques centrales et périphériques.

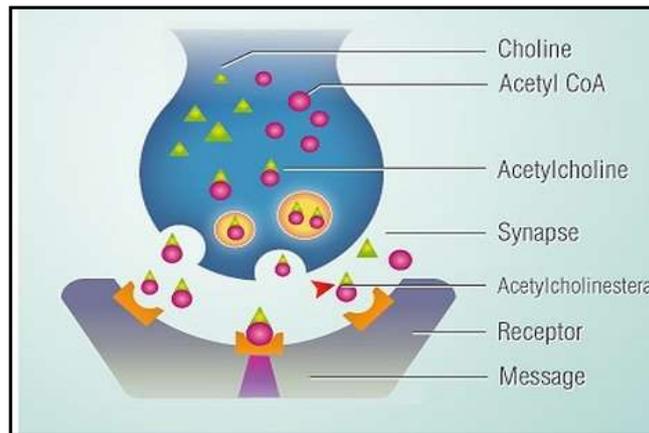


Figure 1 : Schéma d'une synapse et mécanismes de neurotransmission cholinergique

1.1.1. Facteurs de risques

Plusieurs travaux de recherche ont tenté de mettre en évidence les facteurs de risques favorisant la survenue de la maladie. Le facteur de risque majoritaire apparaissant dans la plupart des études est l'âge. Les autres facteurs de risque sont soit de type génétique soit environnementaux, pouvant même être associés. L'étude des facteurs de risque dans ces cas est délicate comme le montrent les résultats des études épidémiologiques souvent contradictoires jusqu'à maintenant (Ankri, 2009).

1.1.2. Molécules anti-cholinestérasique

L'acétylcholine (ACh) est un neurotransmetteur synaptique qui, en se fixant au récepteur cholinergique membranaire, permet la dépolarisation de la membrane et la transmission de l'influx au niveau des jonctions neuromusculaires. L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme jouant un rôle primordial dans la régulation de l'influx nerveux en assurant la libération de la fente synaptique, en vue d'une nouvelle transmission, par dégradation de l'acétylcholine résiduelle issue d'une neurotransmission. Chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer, le taux d'acétylcholine est particulièrement faible entraînant une diminution des activités neuronales et l'apparition de troubles cognitifs. Pour pallier ce déficit, plusieurs travaux de recherche se sont engagés dans la mise au point de molécules naturelles ou de synthèse capables d'augmenter le taux d'acétylcholine au niveau synaptique par inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase (Houghton et al., 2006).

1.1.2.1. Les composés thérapeutiques

En se basant sur l'hypothèse d'inhiber l'action de l'AChE pour mieux traiter la MA, il est apparu sur le marché plusieurs inhibiteurs de cette enzyme (Grossberg, 2003). Le premier inhibiteur qui a été testé sur l'AChE est un alcaloïde appelé physostigmine, issu de la plante *Physostigma venenosum* (figure 2).

Cette molécule présente une affinité pour l'AChE d'environ 10 000 fois supérieure à celle de l'acétylcholine, faisant de lui un parasympathomimétique très puissant pouvant induire une bradycardie, des vomissements et même une paralysie respiratoire (Bruneton, 1999). En revanche, des essais cliniques ont montré une action positive légère de la physostigmine sur la mémoire (Shu, 1998). Les recherches sur cette molécule ont été délaissées à cause de sa courte demi-vie et sa toxicité au profit d'analogues synthétiques (Iijima et al., 1993; Al-Jafari et al., 1998).

La tacrine (figure 2) est le premier inhibiteur commercialisé dans le cadre du traitement de la MA, en 1993, mais a été tout de suite abandonné à cause de ses nombreux effets secondaires tels que les nausées, les vomissements, la diarrhée, les maux de tête, les étourdissements ainsi que l'augmentation des niveaux de l'alanine aminotransférase indiquant une toxicité hépatique (Knapp et al., 1994). De plus, la tacrine est connue par sa demi-vie courte qui nécessite plusieurs prises par jour, ce qui est problématique pour des personnes souffrant de pertes de mémoire (Augry et al., 1997).

La donepezil, approuvée en 1997 (Nordberg and Svensson, 1998), a montré une meilleure spécificité pour le tissu cérébral que la tacrine (Small, 1998). Les essais cliniques ont montré qu'elle ne présente pas de toxicité hépatique et que sa demi-vie est plus longue, ce qui facilite la prise du traitement (Burns et al., 2000). Toutefois, certains effets secondaires ont été enregistrés tels que les nausées, les vomissements, les étourdissements, l'anorexie et la fatigue (Rogers et al., 1998).

La rivastigmine, approuvée en 1998, est un dérivé de la physostigmine utilisée dans le traitement symptomatique des formes légères à modérément sévères de la MA (Polinsky, 1998). Elle est connue par sa bonne sélectivité pour la cholinestérase cérébrale ainsi que son métabolisme indépendant du système enzymatique hépatique permettant une action ciblée. Néanmoins, quelques effets secondaires ont été observés tels que les nausées et les vomissements (Corey-Bloom et al., 1998).

En 2000, il est apparu sur le marché un alcaloïde naturel appelé galanthamine issu de l'espèce *Galanthus nivalis* L. appartenant à la famille des Amaryllidaceae. La galanthamine diffère des autres inhibiteurs par son mécanisme à double action car en plus d'inhiber l'AChE, elle provoque une modulation allostérique des récepteurs présynaptiques nicotiques, ce qui augmente la libération de neuromédiateurs (Maelicke et al., 2001). Plusieurs autres caractères tels que sa longue demi-vie et son action sélective, réversible et compétitive favorisent et classent la galanthamine comme meilleur inhibiteur actuel de l'AChE (Woodruff-Pak et al., 2001).

Sachant que la plupart des inhibiteurs connus de l'enzyme AChE soient des alcaloïdes, plusieurs études récentes ont été entreprises pour identifier d'autres molécules naturelles pouvant avoir une activité anti-AChE importante. En effet, les travaux de Houghton et al., (2006) ont montré que plusieurs composés, autres que les alcaloïdes, sont aussi capables d'inhiber efficacement l'enzyme AChE tels que les terpenoïdes, les isocoumarines, les phénols et les flavonoïdes. Ces derniers, de par leur diversité structurale à laquelle sont rattachées leurs activités biologiques potentielles, anti-cholinestérasique notamment, nous intéressent tout particulièrement dans le présent travail.

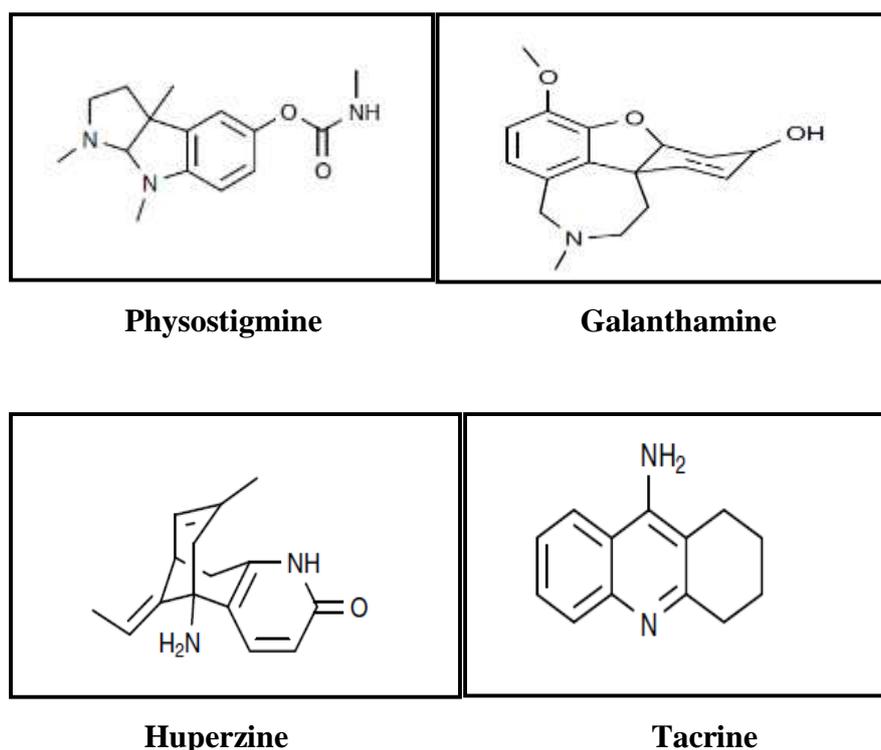


Figure 2: Structures chimiques de quelques inhibiteurs de l'AChE

1.1.2.2. Action des composés phénoliques sur l'AChE

Des travaux ont montré que l'hopeahainol, un phénol isolé de l'espèce *Hopea hainensis*, est un inhibiteur réversible de l'AChE (Ge et al., 2008). Des flavones tels que ; l'isoorientine et l'isovitexine extraits des fleurs et des rhizomes de *Iris pseudopumila* (Iridaceae) ont été décrits comme composés responsables de l'activité anti-AChE (Conforti et al., 2009). Une activité anti-AChE importante a été montrée pour différents flavanols tels que le sophoflavescenol, l'icaritine, le demethylanhydro-icaritine, le 8-clavandurylkaempferol et le kaempferol, isolés à partir de *Sophora flavescens* (Fabaceae) (Jung et al., 2011). D'autres

études ont aussi montré que des composés phénoliques simples tels que l'acide gallique et l'acide ellagique sont de bons inhibiteurs de l'AChE(Nag and De, 2011).

Trois autres flavonols appelés le 8-(1,1-diméthylallyl)-5'-(3-méthylbut-2-enyl)-3',4',5,7-tetrahydroxy-flavonol, le papyriflavonol et le brousoflavonol, isolé à partir des racines de l'espèce *Broussonetia papyrifera* ont montré un pouvoir inhibiteur de l'AChE important(Ryu et al., 2012).

Les composés phénoliques tels que la quercetin-3-*O*-rhamnoside, le kaempferol-3-*O*-rhamnoside, le protocatechualdehyde et l'acide *p*-hydroxybenzoïque isolé à partir des extraits des feuilles de *Croton penduliflorus* ont montré une forte activité inhibitrice de l'AChE (Aderogba et al., 2013).

Enfin, une étude réalisée sur plusieurs fougères originaires de chine, riches en flavonoïdes, a montré l'importance de l'activité de ces composés en tant qu'inhibiteurs de l'AChE (Xia et al., 2014).

1.2. Les maladies infectieuses

Les maladies infectieuses sont les maladies les plus fréquentes, plus de tiers des malades hospitalisés reçoivent au moins un antibiotique. On distingue les maladies bactériennes dues aux bactéries et les maladies virales dues aux virus. Les infections peuvent être également d'origine fongique ou parasitaire(Labayle, 2001).Les bactéries pathogènes pour l'homme sont à l'origine de multiples maladies infectieuses, qui en particulier dans les pays en voie de développement, font encore des ravages. En 1995, les maladies infectieuses ont été responsables d'un tiers (17 millions de personnes) des décès dans le monde(Mellaoui, 2014).

La découverte des antibiotiques était considérée au départ comme un véritable progrès en médecine qui a réalisé un réel tournant pour la thérapeutique des maladies infectieuses au cours du 20^{ème} siècle (Bonnet, 2014). Toutefois, leur utilisation excessive en médecine à conduit à l'apparition de bactéries résistantes à ces médicaments. Ces formes de résistances sont devenues au fil des années massive et préoccupante.

1.2.1. La résistance aux antibiotiques

La résistance aux agents antimicrobiens est devenue un sérieux problème de santé publique, formant l'un des plus importants défis sanitaires du 21^{ème} siècle. Elle représente près de 50% des causes de mortalités dans les pays en voie de développement.

Certaines souches sont multirésistantes, d'autres sont mêmes toto-résistantes, c'est-à-dire résistantes à tous les antibiotiques disponibles sur le marché. Ce dernier est heureusement rare, mais le phénomène est en perpétuelle accroissement, ce qui laisse les cliniciens dans une impasse totale puisqu'ils ne disposent d'aucun traitement pour lutter contre les pathologies. Certaines résistances posent plus spécifiquement problème en milieu hospitalier en provoquant des maladies dites nosocomiales, c'est le cas de *Staphylococcus aureus* devenu résistant à la benzylpénicilline, la méticilline et la vancomycine et *Pseudomonas aeruginosa* devenu résistant à un grand nombre d'antibiotiques à l'exception de la vancomycine (Iwu et al., 1999).

Acinetobacter baumannii est également redoutée à l'hôpital. Les maladies nosocomiales liées à cette bactérie résistante à l'imipénème sont passées de 2 ou 3% en 2008 à 11,1% en 2011. Le phénomène est d'autant plus préoccupant que la résistance de cette bactérie dans l'environnement est impressionnante et qu'elle se développe préférentiellement chez des malades immunodéprimés et vulnérables.

En dehors des hôpitaux, on rencontre d'autres problèmes comme celui du pneumocoque résistant à la pénicilline, retrouvé dans de nombreuses infections ORL. Cette résistance qui était quasi nulle il y a vingt ans, a atteint en 2010 un pic de 48%. Il existe deux types de résistances : résistance naturelle et résistance acquise (Landoulsi, 2016).

1.2.1.1. Résistance naturelle

La résistance bactérienne aux antibiotiques peut être une caractéristique intrinsèque de l'organisme ; par exemple les particularités structurales des parois cellulaires de certaines bactéries qui les rendent naturellement résistantes. La résistance naturelle peut également être obtenue au moyen d'une mutation dans son propre ADN chromosomique (Mayer et al., 1995).

Différentes formes de résistances naturelles existent tel que le manque d'un système de transport intrinsèque à un antibiotique, l'absence de récepteur pour un antibiotique donné ou comme dans le cas des bactéries Gram négatif, la paroi cellulaire est recouverte d'une membrane externe qui établit une barrière imperméable contre certains antibiotiques de poids moléculaires élevés comme les glycopeptides. La résistance peut être également due à des particularités métaboliques spécifiques de certaines bactéries comme le bacille de la

tuberculose dont le métabolisme original lui confère une insensibilité à la plupart des antibiotiques (Landoulsi, 2016).

1.2.1.2. Résistance acquise

Une résistance acquise se produit quand un microorganisme particulier acquiert une aptitude à résister contre un agent antimicrobien auquel il était déjà sensible auparavant. Elle peut provenir d'une mutation chromosomique de gènes impliqués dans les processus physiologiques normaux ou les structures cellulaires de la bactérie (Chopra et al., 2003), d'une acquisition de gènes de résistances étrangers à partir d'une autre source au moyen de plasmides, de bactériophages ou de transposons (Davies, 1996) ; ou d'une combinaison de ces deux mécanismes.

Contrairement à la résistance naturelle, la résistance acquise ne concerne que quelques souches ou sous populations d'une espèce bactérienne particulière.

Certaines résistances ne sont pas liées à une modification génétique, elles se traduisent par une augmentation de la concentration minimale inhibitrice d'un antibiotique donné ou une diminution de la vitesse de mort des bactéries, dans ce cas la résistance est dite adaptative. Elle est réversible à la disparition de l'antibiotique dans le milieu. On trouve par exemple ce type de résistance dans les cellules de biofilm (Landoulsi, 2016).

La problématique de l'émergence des bactéries résistantes aux antibiotiques, rappelle cependant l'obligation de trouver de nouveaux agents antimicrobiens. De nombreuses plantes utilisées dans le traitement de maladies d'origines antibactériennes ont montré leur efficacité, ce qui explique la consécration des chercheurs à trouver des composés antimicrobiens dans le règne végétale (Carr, 1988).

1.2.2. Les agents antimicrobiens des plantes

Un antibiotique est défini comme un composé chimique dérivé ou produit par des organismes vivants, capables à de faibles doses d'inhiber la croissance microbienne (Trease and Evans, 1983). Cette définition est limitée à des antibiotiques produits par des micro-organismes, mais celle-ci peut être étendue pour inclure des composés similaires présents dans les plantes supérieures. Les plantes ont de nombreuses façons de produire des substances antimicrobiennes pour les protéger contre les pathogènes (Kuč, 2007). Les surfaces végétales externes sont souvent protégées par des biopolymères tel que les cires, les esters d'acides gras

comme la subérine et la cutine. En outre, les tissus externes peuvent être riches en composés phénoliques, alcaloïdes, terpenoïdes et d'autres composés qui inhibent le développement des champignons et des bactéries (Kuc, 1985).

Depuis la découverte des antibiotiques dans les années 50, l'utilisation des métabolites de plantes comme agent antimicrobiens n'a cessé de diminuer, mais la nécessité de résoudre le problème de résistance a motivé l'initiation de nouvelles recherches dans le domaine.

Les dépenses dans le monde entier sur la recherche de nouveaux agents anti-infectieux ont augmenté de 60% à partir de 1993, et les sources végétales sont devenues spécialement l'objet de recherches scientifiques (Grayer et al., 1993; Abedini, 2013) d'où notre intérêt à rechercher des composés anti-infectieux à partir de l'espèce *Myrtus nivellei*.

2. Aperçu bibliographique sur les plantes étudiées

2.1. La famille des Apocynaceae

La famille des Apocynaceae comprend environ 155 genres et 2000 espèces, distribués principalement dans les régions tropicales à subtropicales, avec quelques rares espèces dans les régions tempérées (Woodson et al., 1970).

2.1.1. Taxonomie et classification

On peut définir la famille des Apocynaceae d'un point de vue botanique selon les divisions suivantes (Endress and Bruyns, 2000) :

Règne : Plantae

Sous-règne : Eucaryotae

Embranchement : Spermaphytæ

Sous-embranchement : Angiospermae

Classe : Dicotylédonae

Ordre : Gentianales

Famille : Apocynaceae

2.1.2. Intérêt économique, pharmacologique et nutritionnel

- Plusieurs genres de cette famille se caractérisent par la présence d'hétérosides cardiotoniques qui sont utilisées dans différents traitements médicamenteux,
- Les espèces *Hancornia speciosa*, *Funtumia elastic* et certaines espèces du genre *Landolphi* appartenant à cette même famille sont connues pour la production du caoutchouc de l'Inde.
- D'autres genres de cette famille tels que *Vinca* (Pervenches) sont également cultivés comme plantes ornementales.
- Certains taxons de cette famille ont une grande importance écologique, à l'exemple d'*Asclepias* qui fournit du nectar aux abeilles et beaucoup d'autres insectes, tels que le papillon Monarque nord-américain.
- Au Soudan, les parties aériennes en fleurs de certaines espèces de cette famille sont vendues sur les marchés locaux pour des usages médicaux (Heywood et al., 2007; Shayoub, 2003).

Parmi les différentes espèces de la famille des *Apocynaceae*, *Solenostemma argel* a été choisie pour son appartenance au Sahara Algérien et la richesse de son métabolisme secondaire dont les flavonoïdes qui nous intéressent.

2.1.3. L'espèce *Solenostemma argel*

2.1.3.1. Origine et répartition géographique

Elle se rencontre dans des endroits, sableux et rocaillieux secs ainsi que dans des oueds graveleux, avec une pluviométrie annuelle limitée car elle tolère la sécheresse et le gel. En Afrique tropicale, *Solenostemma argel* se rencontre dans les zones désertiques du Mali, du Niger, du Tchad et du Soudan. Elle est également largement répartie en Libye, en Egypte, en Arabie Saoudite et même en Algérie ; d'où notre intérêt pour cette plante.

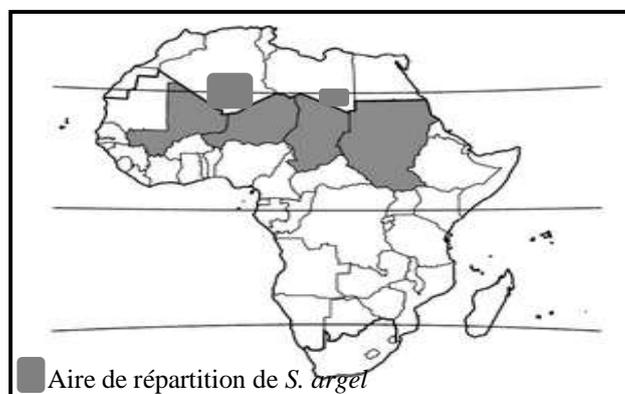


Figure 3 : Aire de répartition du genre *Solenostemma*

2.1.3.2. Description botanique

Arbuste fortement ramifiés, charnu, atteignant 60 cm de haut, à jus clair. Feuilles opposées décussées, simples et entières ; stipules absentes ; pétiole de 1-2 mm de long ; limbe lancéolé a oblong, de 2,5-3,7 cm x 7-15mm, apex aigu ou presque, base cunéiforme, pennatinervé avec la nervure médiane marquante au-dessous et les nervures latérales indistinctes. Fleurs bisexuées, régulières, blanches, parfumées ; pédicelle de 2-5 mm de long ; lobes de calice oblongs d'environ 3 mm de long, apex aigu ; tube de la corolle d'environ 1,5 mm de long, lobes étalés, étroitement oblongs, de 3,5-4,5 mm de long, apex obtus, infléchis. Fruit : follicule solitaire, dure, piriforme, atteignant environ 5 cm x 1,5-2 cm. Graines étroitement ovoïdes, rainurées, d'un côté, à verrues minuscules, brunes, avec une touffe de poils blanchâtres.



Figure 4 : Aspect botanique de *Solenostemma argel*

2.1.3.3. Utilisation en médecine traditionnelle

Dans toute son aire de répartition, mais notamment au Soudan, la décoction des parties aériennes amères ou des feuilles est très prisée comme purgatif pour traiter les coliques, les maux d'estomac, la constipation, la flatulence, les infections des voies urinaires, les douleurs rénales et la toux. Elle se prend également pour soulager les règles douloureuses, la menstruation irrégulière et la syphilis, et est consommée en amuse-gueule et digestif. La décoction des parties aériennes, mélangées aux parties aériennes de *Mentha spicata* L., et aux graines de *Trigonella foenum-graecum* L., est absorbée pour stopper les vomissements. L'infusion des parties aériennes est utilisée pour traiter le diabète, la jaunisse, purifier le sang et calmer les nerfs. Le jus de feuilles amer se boit pour traiter la toux et s'utilise aussi en

collyre pour traiter les troubles oculaires. La rougeole est traitée par inhalation de la fumée de la plante brûlée. Les feuilles fraîches ou séchées sont appliquées sur les plaies et les brûlures pour les désinfecter.

Au Tchad, en Libye et en Egypte, la décoction de feuilles se prend pour traiter la bronchite, la névralgie et la sciatique. Dans le Hoggar, les feuilles séchées réduites en poudre sont bouillies dans du lait, adouci avec des dattes ou du sucre, et la décoction se boit pour traiter le rhumatisme, la gonorrhée et l'hémoptysie. Au Liban, les feuilles séchées sont bouillies dans l'huile d'olive pour traiter le rhumatisme. Des branches feuillées sont jetées dans les ruisseaux et les étangs pour tuer les insectes et comme désinfectant (Schmelzer and Gurib-Fakim, 2013).

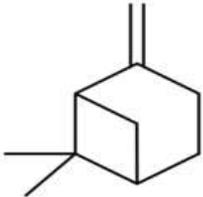
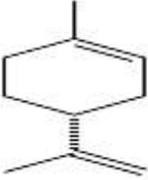
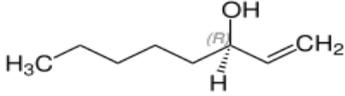
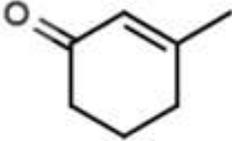
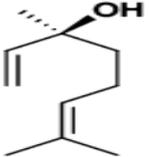
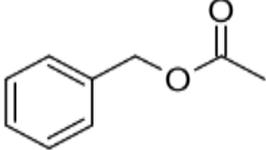
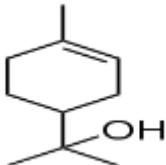
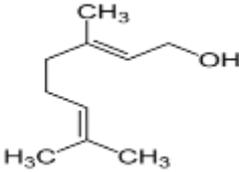
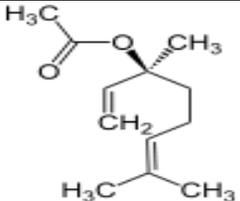
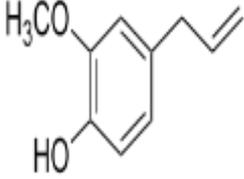
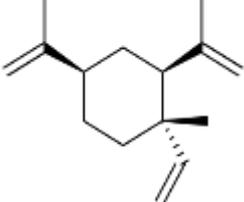
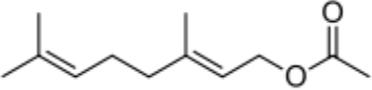
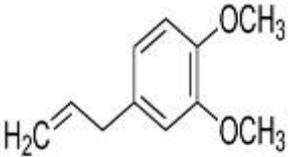
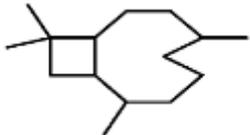
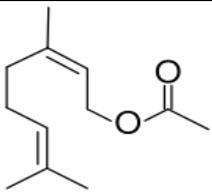
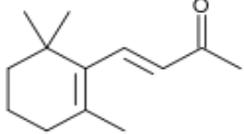
2.1.3.4. Composition chimique du genre *Solenostemma*

Le genre *Solenostemma* a fait l'objet de nombreuses études phytochimiques et biologiques. L'investigation phytochimique extensive, a révélé la présence de plusieurs composés bioactifs tels que les flavonoïdes, monoterpènes, stéroïdes, dérivés phénoliques et les prégnanes.

❖ Huiles essentielles

L'étude des huiles essentielles des feuilles de *S. argel* par GC-MS a montré la présence de 26 composés notamment : β -Pinene (1), Limonene (2), 1-Octen-3-ol (3), Seudenone (4), *trans*- β -Ocimene (5), 1-Octanol (6), Linalool (7), Benzyl acetate (8), α -Terpineol (9), Geraniol (10), Linalyl acetate (11), Eugenol (12), β -Elemene (13), Geranyl acetate (14), Methyl eugenol (15), β -Caryophyllene (16), Neryl acetone (17), β -Ionone (18), γ -Cadinene (19), Elemol (20), Caryophyllene oxide (21), T-Muurolol (22), β -Eudesmol acetate (23), Heptadecane (24), 6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone (25), Heneicosane (26) (tableau 1) (Ibrahim et al., 2015).

Tableau 1 : Structure chimique des huiles essentielles du genre *Solenostemma*

Composé N°	Structures	Composé N°	Structures
(1)		(2)	
(3)		(4)	
(5)		(6)	
(7)		(8)	
(9)		(10)	
(11)		(12)	
(13)		(14)	
(15)		(16)	
(17)		(18)	

(19)		(20)	
(21)		(22)	
(23)		(24)	
(25)		(26)	

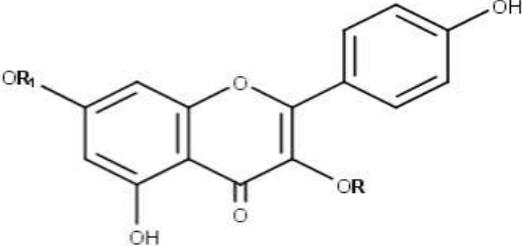
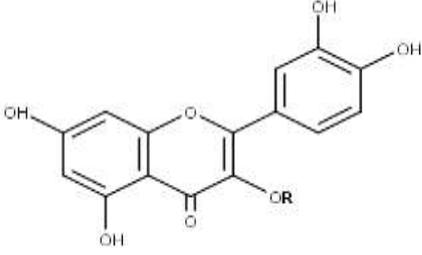
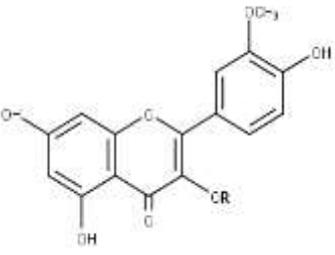
❖ Flavonoïdes

Les flavonoïdes suivants ont été identifiés dans l'espèce *S. argel*: kaempferol(27), kaempférol-3-O-glucoside(28), kaempférol 3-O-rutinoside(29), quercétine(30), rutine(31)(Khalid, 1974). D'autres flavonoïdes ont été découverts dans plusieurs espèces de la sous-famille des Asclepiadaceae, il en ressort l'identification de flavonols notamment quercétine 3-O-rhamnosyl(1→2)glucoside(32), quercétine-3-O-glucoside(33), kaempferol-3-O-rhamnosyl(1→2)glucoside (34), isorhamnetin 3-O-glucoside(35), isorhamnetin-3-O-dirhamnosyl-hexoside(36)(Heneidak et al., 2006).

Shafek et al., (2012) ont étudié la composition phytochimique de l'extrait éthanolique des tiges de *Solenostemma argel* et ils ont pu identifier en plus des composés connus : kaempferol-7- α -L-rhamnoside (37), kaempferol-7-O- α -L-arabinoside (38), kaempferol-3-O- β -D-xylopyranoside (39), kaempferol-3-O- β -D-galactopyranoside (40), deux nouveaux flavonoïdes nommés : kaempferol-3-O- α -L-arabinopyranosyl(1→2) β -D-galactopyranoside(41), kaempferol-3-O- β -D-glucopyranosyl(1→2) β -D-xylopyranoside (42) (tableau 2)(Shafek et al., 2012).

Tableau 2: Structure des différents flavonoïdes rencontrés dans le genre *Solenostemma*

Composés N°	Structures
-------------	------------

		
	R	R1
(27)	H	H
(28)	Glc	H
(29)	Rutine	H
(40)	Galactose	H
(39)	Xylose	H
(34)	rhamnosyl(1-2)glucoside	H
(41)	arabinopyranosyl(1-2) β-D-galactopyranoside	H
(42)	glucopyranosyl (1→2) β-D-xylopyranoside	H
(37)	H	Rhamnose
(38)	H	Arabinose
		
	R	R
(30)		(35) Glc
(31)	glucopyranosyl (1→2) β-rhamnopyranoside	(36) dirhamnosyl-hexoside
(32)	rhamnosyl(1-2)glucoside	
(33)	Glc	

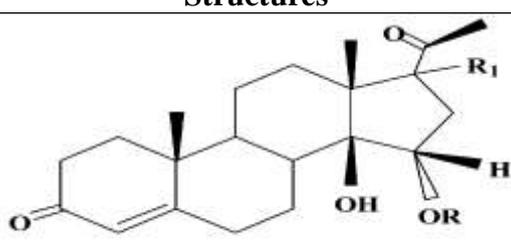
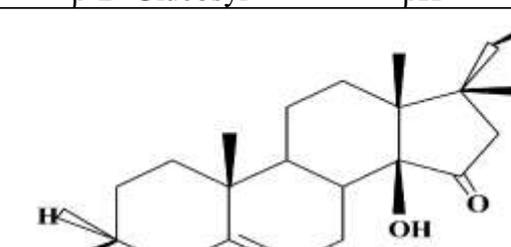
❖ Prégnanes

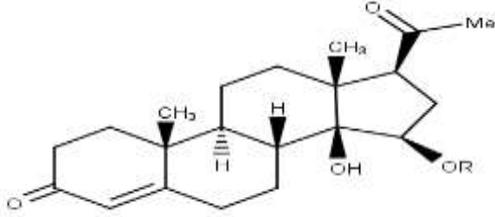
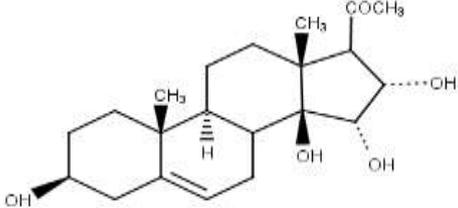
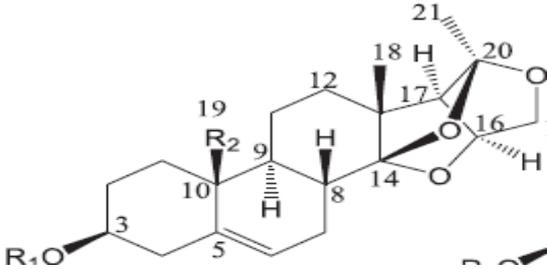
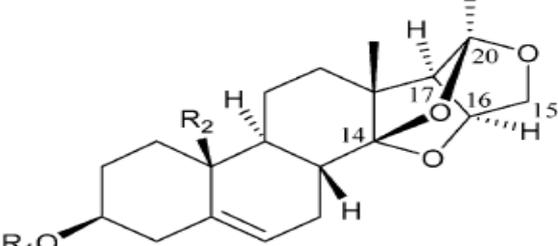
Les prégnanes sont des métabolites secondaires qui caractérisent le genre *Solenostemma* et dont les glycosides sont considérés comme des marqueurs chimiotaxonomiques du genre (tableau 3).

En effet, plusieurs travaux ont rapportés l'isolement et l'identification de prégnane simple et glycosylés nommés: stemmoside A(43), stemmoside B(44), stemmin C(45), 14b-15a-dihydroxy-4-pregnene-3,20 dione (46) et 3b-14b, 15a-16a hydroxy-20-oxo-5pregnene-tetraol(47) (Plaza et al., 2005a).

Récemment, Ounaissia et al., (2016) ont identifié à partir des parties aériennes de *S. argel*, trois nouveaux prégnanes ; 19-acetoxy 14,16-14,20-15,20 triepoxy-14,15 secopregn-5-en-3,19diol-3-O-β-D-oleandropyranosyl-(1→4)-β-D-canaropyranosyl-(1→4)-β-D-cymaropyranosyl-(1→4)-β-D-cymaropyranoside(48), 16β-acetoxy-3β-hydroxy-14Hβ-17Hβ-pregn-5-en-15-one-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-oleandropyranosyl-(1→4)-β-Dcanaropyranosyl-(1→4)-β-D-cymaropyranosyl-(1→4)-β-Dcymaropyranoside(49), 14β,15β-dihydroxy-pregn-4-ene-3,20-dione-15β-Dglucopyranoside(50). D'autres études ont décrit la présence de secopregnane nommés ; argelosides C (51), D (52), E (53), argelosides A (54) et B(55)(Plaza et al., 2005b).

Tableau 3: Structures des prégnanes recensés dans le genre *Solenostemma*

Composés	Structures	
		
(43)	β-D-Glucosyl	αH
(44)	β-D-Glucosyl	βH
		
(45)	R	H

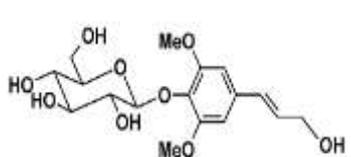
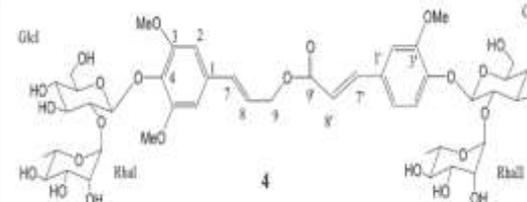
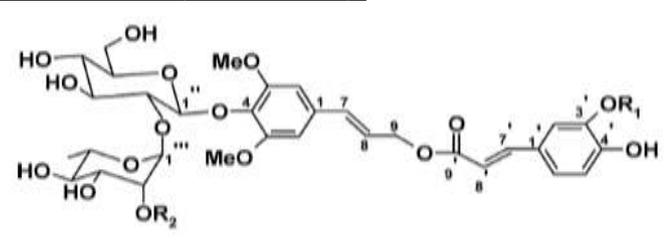
(46)	 <p style="text-align: center;">R</p>
	H
(50)	Glc
(47)	
(48)	 <p style="text-align: center;">R₁</p>
	oleandropyranosyl(1→4)βD-canaropyranosyl(1→4)β-D-cymaropyranosyl(1→4)-β-D-cymaropyranoside
(49)	glucopyranosyl-(1→4)-β-D-oleandropyranosyl-(1→4)βD-canaropyranosyl-(1→4)-β-D-cymaropyranosyl-(1→4)βD-cymaropyranoside
(51)	 <p style="text-align: center;">R₁ R₂</p>
	thetvetopyranosyl-(1→4) β D-oleandropyranosyl-(1/4)- β -D-Me cymaropyranosyl(1→4) β D-oleandropyranoside
(52)	thetvetopyranosyl-(1→4)-b-D-oleandropyranosyl-(1/4) CH ₂ OH - β -D-cymaropyranosyl-(1→4) β D-oleandropyranoside
(53)	thetvetopyranosyl-(1→4)- β -D-oleandropyranosyl-(1/4) CH ₂ OAc - β -D-cymaropyranosyl(1→4) β D-oleandropyranoside

(54)	glucopyranosyl-(1→4)- β -D-thevetopyranosyl-(1→4)- β -D-CH ₂ OAc oleandropyranosyl-(1→4)- β -D-cymaropyranosyl-(1→4) - β -D-canaropyranoside
(55)	D-glucopyranosyl(1→4) β D-oleandropyranosyl-(1→4)- β -D-CH ₂ OAc digitoxopyranosyl(1→4) β D-oleandropyranosyl-(1→4)- β -D-cymaropyranosyl(1→4) β D-cymaropyranoside

❖ Les dérivés phénoliques

L'investigation phytochimique a révélé la présence en plus du syringin (56), les composés phénoliques glycosylés suivants : di-O-[α-L-rhamnopyranosyl(1→2)βD-glucopyranosyl]-4,4'{sinapyl alcohol 9-O-feruloyl}ester (57) et solargin I-IV (58-61) (tableau 4)(Kamel, 2003).

Tableau 4 : Structures des dérivés phénoliques rencontrés dans le genre *Solenostemma*

Composé	Structure	Composé	Structure
(56)		(57)	
(58)			
(59)	Me	H	
(60)		H	
(61)		Me	Rha
(61)	H		Rha

➤ Activités biologiques

L'activité antispasmodique des diverses flavones isolées de *S. argel* a été étudié par Khalid, (1974) qui a établi l'important rôle pharmacologique de ces composés comme agents

antispasmodiques. El Tahir et al., (1987) ont étudié les activités pharmacologiques de *S. argel*, y compris des activités relaxantes spasmolytiques et utérines. Ils ont enquêté sur l'activité pharmacologique de l'extrait chloroformique/méthanolique de *S. argel*, et ont établi que cet extrait a un effet biphasique sur le jéjun du lapin, avec une inhibition réversible initiale qui n'était pas antagonisée par l'halopéridol, le propranolol ou la guanéthidine. En outre, cet extrait présentait une activité d'anesthésie locale lorsqu'il a été testé en utilisant le réflexe de retrait du pied de la grenouille. L'extrait chloroformique a stimulé l'utérus, et cet effet a été antagonisé par l'atropine ou la cyproheptadine. L'activité spasmolytique des flavonols a également été étudiée et il a été prouvé que cette activité est principalement dû à la d'autres travaux ont étudié le potentiel antimicrobien de *S. argel*. En outre, les parties aériennes de *S. argel*, extraites avec méthanol/eau ont été testées à l'égard de huit bactéries, parmi lesquelles ils ont enregistré une bonne activité inhibitrice vis-à-vis des espèces *Streptococcus* et une action modérée contre *Escherichia coli*, *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus vulgaris* (Tharib et al., 1986 ; Hady et al., 1994). Récemment Ibrahim et al., (2015) ont étudié les activités antioxydante et antiproliférative des extraits de *S. argel*. Parmi les trois extraits testés, l'extrait acetonique a révélé une bonne activité antioxydante et antiproliférative.

2.2. La famille des Myrtaceae

La famille des Myrtaceae est la neuvième plus grande famille des plantes à fleurs. Elle possède environ 140 genres et 3000 espèces qu'on retrouve surtout dans les pays chauds. La classification APGIII (2009) et les travaux de Soltis et al., (2011) classent la famille des Myrtaceae au sein des clades suivants : les Angiospermes, les Eudicotyledoneae, les Rosidae, les Malvidae et enfin l'ordre des Myrtales (Bremer et al., 2009; Soltis et al., 2011). Ce sont des végétaux ligneux (arbustes à grands arbres). Le feuillage est alterne, les feuilles sont simples à limbe entier et assez souvent coriaces (certaines feuilles sont recouvertes de cire). La similitude des espèces de la famille des Myrtaceae est élevée, et son histoire taxonomique et de nomenclature est complexe, entraînant des difficultés notoires dans l'identification de base, la compilation des inventaires et le traitement floristique (Quézel and Santa, 1963). Certaines plantes de cette famille sont traditionnellement utilisées pour la conservation des denrées post-récolte dans les pays en voie de développement (Migliore, 2011).

2.2.1. Taxonomie et classification

On peut définir la famille des Myrtacées d'un point de vue botanique selon les divisions suivantes :

Règne : Plantae

Sous-règne : Eucaryotae

Embranchement : Spermaphytae

Sous-embranchement : Angiospermae

Classe : Dicotylédonae

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtaceae (Migliore, 2011)

2.2.2. Intérêt économique, pharmacologique et nutritionnel

Beaucoup de plantes de cette famille sont utiles dans divers domaines: comme bois d'œuvre, certains fruits sont comestibles, certaines plantes sont aromatiques, avec une abondance en huile essentielle d'où l'usage condimentaire ou médicinal. Certaines plantes de cette famille sont traditionnellement utilisées pour la conservation des denrées post-récolte dans les pays en voie de développement. Dans les régions méditerranéennes, on fait fermenter et macérer les baies pour obtenir de la liqueur et du vin (Mimica-Dukić et al., 2010). L'espèce *Myrtus communis* est utilisée pour lutter contre les bronchites et les dilatations bronchiques, les catarrhes muco-purulentes des voies respiratoires et urinaires, la tuberculose pulmonaire (Battandier and Trabut, 1911). Chimiquement cette famille est riche en tanins et composés phénoliques notamment les flavonoïdes qui furent l'un des critères de choix de l'une des espèces de cette grande famille botanique vivant dans le Sud Algérien, à savoir *Myrtus nivellei*.

2.2.3. L'espèce *Myrtus nivellei*

2.2.3.1. Origine et répartition géographique

Le genre *Myrtus* comprend deux espèces ; *Myrtus communis* et *Myrtus nivellei*. La première, plus connue sous le nom de Myrte est la plus répandue.

Quant à l'espèce *Myrtus nivellei* Batt. & Trab., elle est endémique du Sahara central Algérien que l'on retrouve au sein des massifs du Hoggar, du Tassili n'Immidir (ou Mouydir), du Tassili n'Ajjer et du Tefedest (Quézel, 1954; Quézel and Martinez, 1958; Leredde, 1957; Quézel, 1965; Ozanda, 1991; Heywood et al., 2007).

Elle fut découverte au début du 20^{ème} siècle par le Lieutenant René Nivelles des chasseurs à pied de l'armée française. Elle fut décrite par Battandier et Trabut en 1911. Morphologiquement très proche de *M. communis*, le myrte de Nivelles est un arbuste généralement de 50 à 120 cm de hauteur, qui se caractérise par des feuilles linéaires et épaisses à une seule nervure, de 2 à 3 cm de long sur 3 mm de large, également très odorantes lorsqu'on les froisse, et par un pédoncule fructifère plus long (Quézel, 1954).

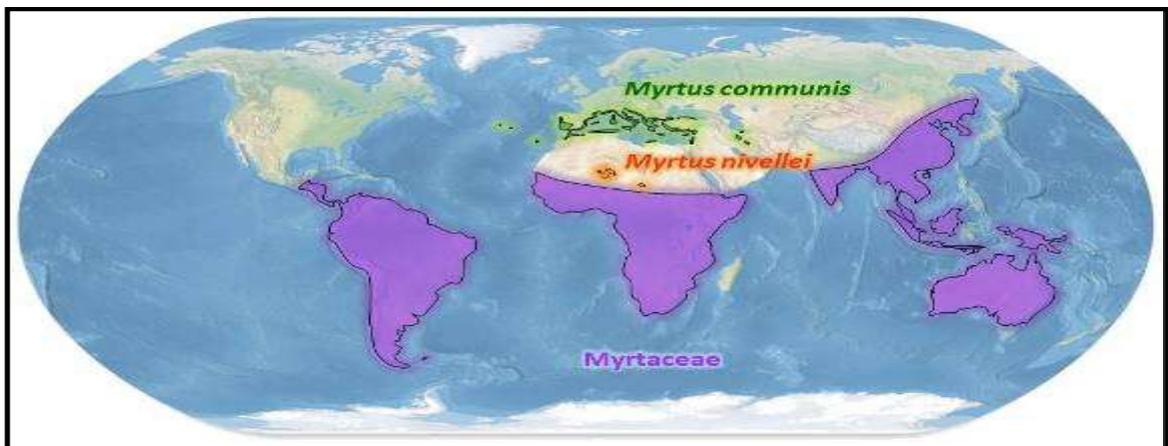


Figure 5: Distribution actuelle des Myrtaceae (Migliore, 2011)

2.2.3.2. Description botanique

Deux sous-espèces ont été décrites : *M. nivellei* subsp. *nivellei* Batt. & Trab. distribuée en Algérie et *M. nivellei* subsp. *tibesticus* exclusivement au Tchad (Quézel, 1965). Selon Quézel (1958), la sous-espèce *tibesticus* est localisée aux environs du Toussidé, en étant, semble-t-il, abondante dans les lits des oueds qui rayonnent autour du volcan entre 1 800 et 2 000 m. Elle diffère de la sous-espèce *nivellei* par son port en buisson très intriqué, par ses feuilles beaucoup plus petites 1,5-2 × 2-4 mm (et non 13-15 mm de diamètre), à pétales rosés ciliés sur les bords (et non blancs), présentant sur les marges seulement quelques poils dans la partie proximale, à ses sépales triangulaires obtus (et non aigus), brièvement pédonculés (6-8 et non 12-20 mm). Enfin, la plante du Tibesti est à peine odoriférante, les glandes à essence y étant beaucoup plus rares ; elles font en particulier défaut sur le calice ou au contraire elles sont très abondantes pour la sous-espèce *nivellei* (Quézel and Martinez, 1958).



Figure 6: Les différentes parties de *Myrtus nivellei*

2.2.3.3. Utilisation en médecine traditionnelle

Myrtus nivellei est connue sous le nom de «Tafaltasset» en Tamahaget "Raihane Essahara El Wousta" en Arabe, elle est très appréciée par la population touarègue qui l'utilise pour ses vertus médicinales notamment contre les infections respiratoires, le mal de gorge, les troubles gastro-intestinaux, les mycoses, la fièvre et le diabète (Bouzabata et al., 2013).

2.2.3.4. Composition chimique du genre *Myrtus*

➤ Travaux antérieurs

Le genre *Myrtus* comprend seulement deux espèces ; *Myrtus communis* et *Myrtus nivellei*. *Myrtus communis* est l'espèce la plus répandue et qui a fait l'objet de plusieurs études phytochimiques contrairement à *Myrtus nivellei* dont on peut dénombrer que très peu d'études très récentes (Bouzabata et al., 2013; Mansour et al., 2017; Touaibia et al., 2014; Touaibia and Chaouch, 2014; Touaibia and Chaouch, 2017).

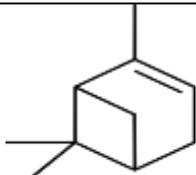
Les travaux phytochimiques réalisés sur le genre *Myrtus* ont montré sa richesse en métabolites secondaires tels que : les huiles essentielles, les composés phénoliques dont les flavonoïdes et les tanins, les phloroglucinols (tableau 5-7).

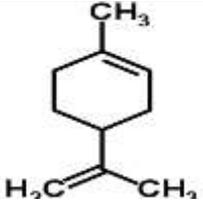
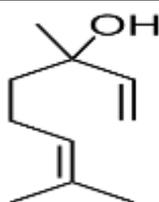
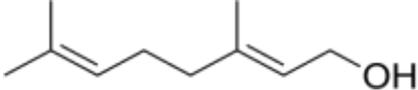
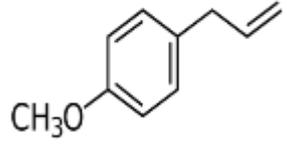
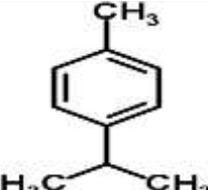
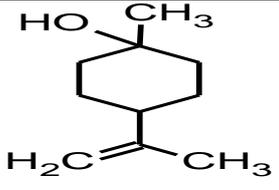
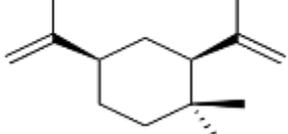
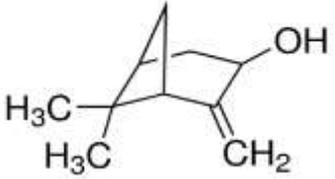
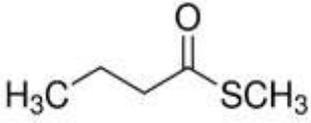
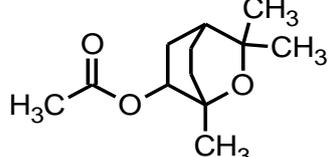
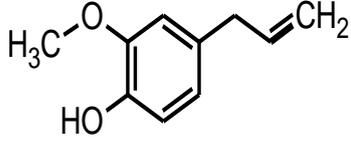
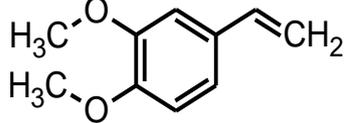
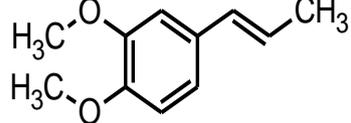
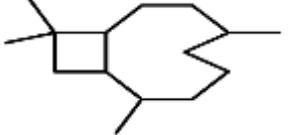
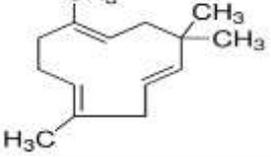
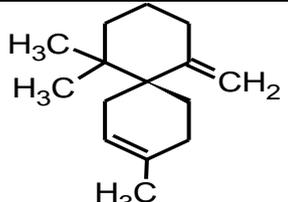
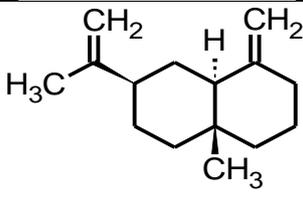
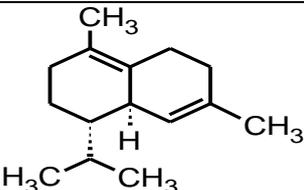
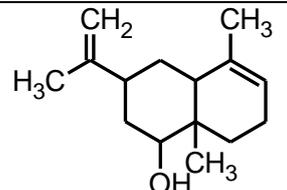
➤ **Huiles essentielles**

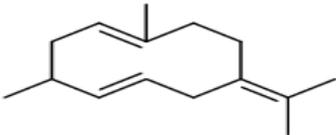
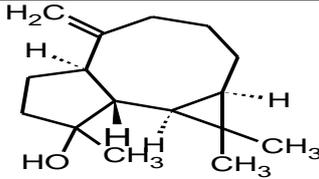
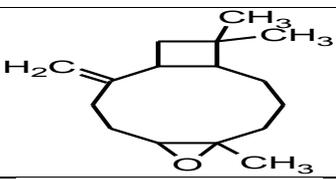
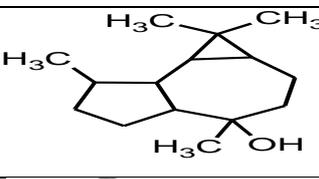
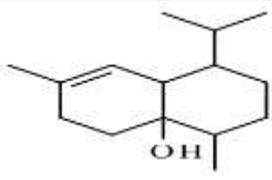
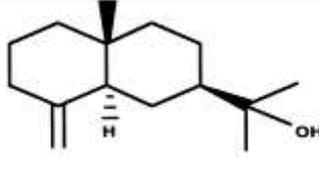
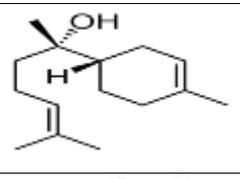
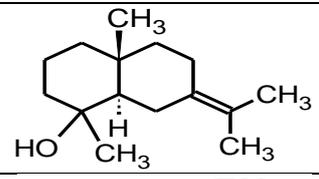
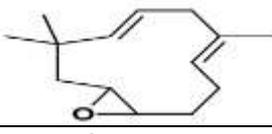
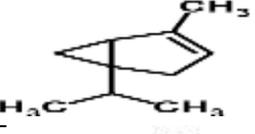
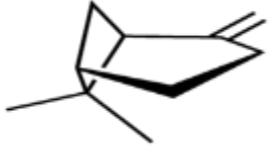
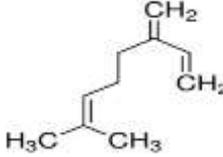
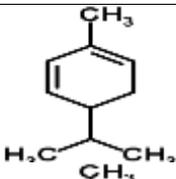
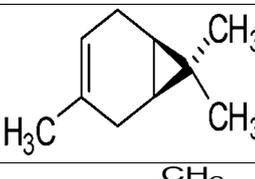
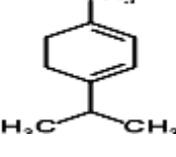
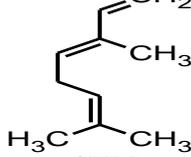
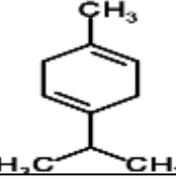
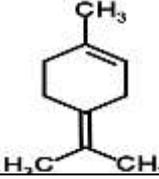
Plusieurs études ont rapporté la richesse du genre *Myrtus* en huiles essentielles. En effet, plusieurs chercheurs, à travers le monde, se sont intéressés à la composition en huiles essentielles de *Myrtus communis*, c'est pourquoi nous allons consacrer cette partie aux composés identifiés du Myrte récolté en Algérie. Dans ce contexte, plusieurs travaux convergent sur la richesse du Myrte Algérien en huiles essentielles type monoterpène avec une prédominance du α -Pinène(1), 1,8-cinéole(2), limonène (3) et linalool (4) suivie par cis-géranol(5), estragole(6), *p*-cymène(7), cis- β -terpineol(8), élémène(9), trans-pinocarvéol(10), bornéol(11), méthyl citronellate(12), exo-2-hydroxycinéole acétate(13), eugénol(14), éthyl eugénol(15), (E)-Méthyl isoeugénol(16), β -caryophyllène(17), α -humulène(18), β -chamigrène (19), β -sélinène(20), δ -cadinène(21), Selina-3,7(11)diène(22), germacrene B(23), spathulenol(24), caryophyllène oxide(25), globulol(26), cubenol(27), β -eudesmol(28), α -bisabolol(29), juniper camphor(30), humulène epoxide(31)(Bouzabata et al., 2016).

Une étude réalisée par Bouzabata et al., (2013) sur la composition chimique des huiles essentielles de *Myrtus nivellei* a révélé sa richesse en deux composés majeurs, cinéole et limonène. D'autres molécules ont été identifiées mais avec une abondance moindre telles que : α -thuyène (32), α -pinène, β -pinène (33), myrcène (34), α -phellandrene(35), δ -3-carene(36), α -terpinène(37), *p*-cymène, (Z)- β -ocimène(38), γ -terpinène(39), terpinolène(40), linalool, terpinen-4-ol, α -terpineol, géranol, linalyl acétate, α -terpinylacétate, neryl acétate, geranyl acétate, (E)- β -caryophyllène, α -humulène. Cette étude a permis d'identifier deux nouvelles molécules jamais rapportées par la bibliographie notamment : 1-hydroxy-1-(3-méthylbutoxy)-2-acétoxy-3,5,5-triméthyl-3-cyclopentène et 1-hydroxy-1-(3-méthyl-2-butenoxy)-2-acétoxy-3,5,5-triméthyl-3-cyclopentène (tableau 5).

Tableau 5 : Structures chimiques des huiles essentielles du genre *Myrtus*(Bouzabata et al., 2013;Bouzabata et al., 2016)

Composés N°	Structures	Composés N°	Structures
(1)		(2)	

(3)		(4)	
(5)		(6)	
(7)		(8)	
(9)		(10)	
(11)		(12)	
(13)		(14)	
(15)		(16)	
(17)		(18)	
(19)		(20)	
(21)		(22)	

(23)		(24)	
(25)		(26)	
(27)		(28)	
(29)		(30)	
(31)		(32)	
(33)		(34)	
(35)		(36)	
(37)		(38)	
(39)		(40)	

➤ **Les composés phénoliques**

Les premières études sur les composés phénoliques ont été réalisées en 1967 par El-Sissi et El-Ansary sur les feuilles de *Myrtus communis* et ont été identifiés à partir de l'extrait

methanolique, l'acide gallique(41), la myricitine(42), la myricitrine(43), l'acide ellagique (44) et 3,6-digalloyl glucose(El Sissi and El Ansary, 1967).

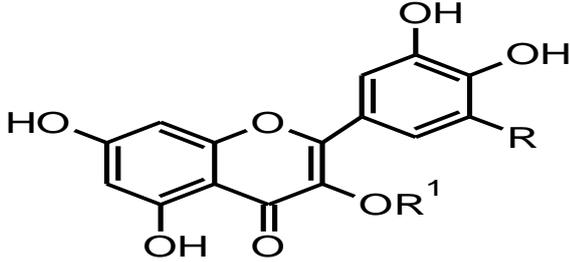
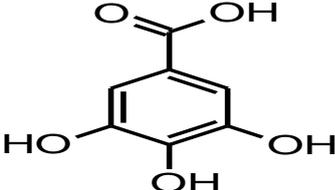
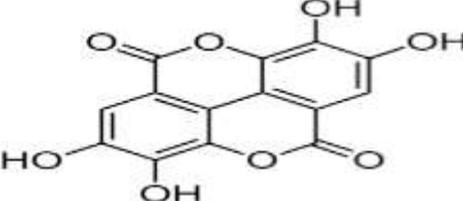
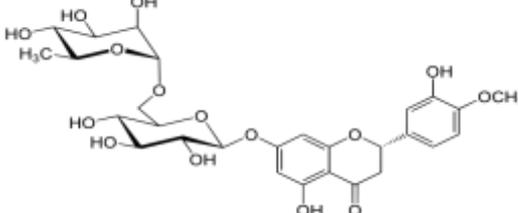
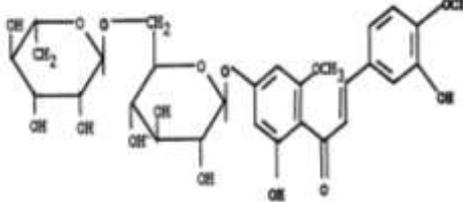
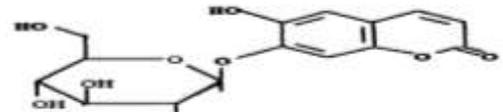
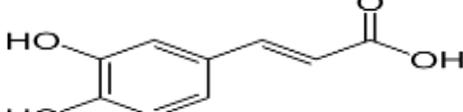
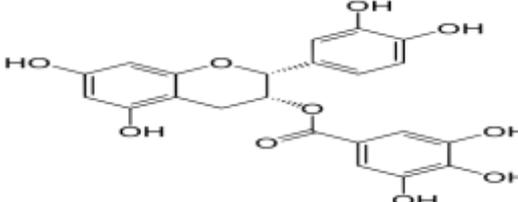
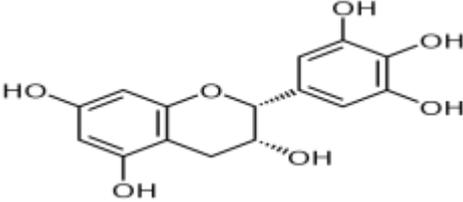
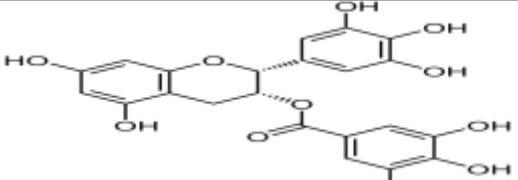
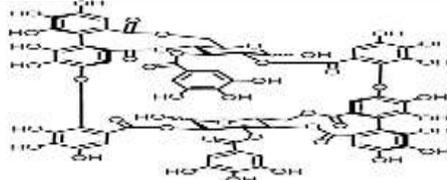
Plus récemment, les travaux sur les composés polyphénoliques du péricarpe du fruit du myrte indiquent une composition riche en myricétine, en hespéridine(45), hespétine-2'-*O*-methyl-chalcone-4'-*O*-rhamnoglucoside (46) et en esculine (47). Les composés ont été extraits par un mélange méthanol-eau (60/40) à température ambiante et séparés par chromatographie sur colonne ouverte. L'identification s'est faite par spectrométrie UV et par RMN du carbone-13 et du proton (Martín et al., 1999).

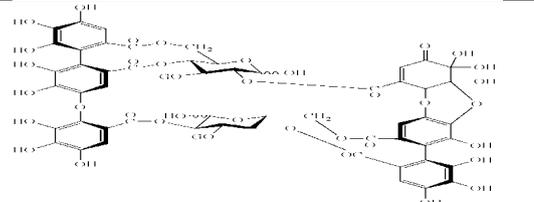
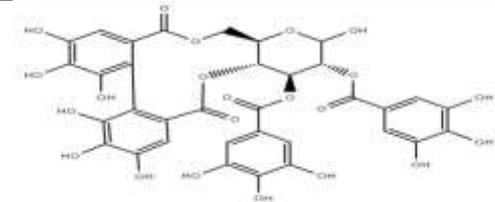
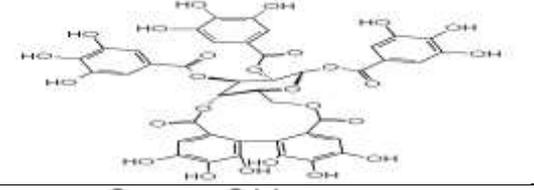
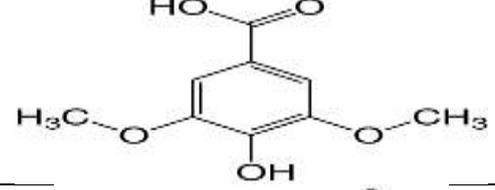
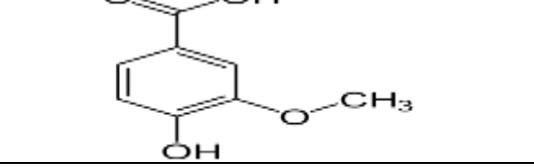
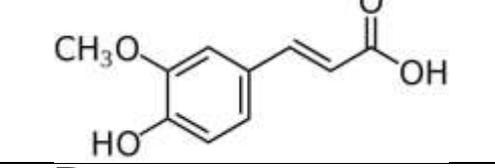
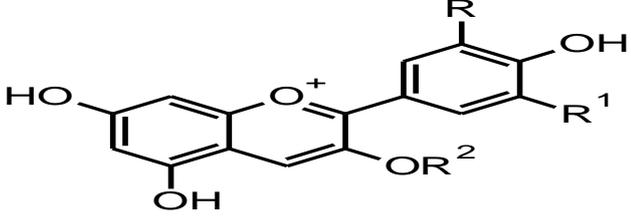
Romani et al., (1999) ont étudié la composition des polyphénols extraits au solvant (éthanol à 70%) à partir des feuilles du myrte. L'extrait est purifié puis les analyses qualitative et quantitative ont été faites par CLHP-DAD et CLHP/SM. Les principaux composés identifiés sont l'acide caféique (48), l'acide ellagique, la myricétine-3-*O*-galactoside (49), la myricétine-3-*O*-(6''-*O*-galloyl)galactoside(50), la quercétine-3-*O*-galactoside (51), la quercétine-3-*O*-rhamnoside (52), l'épicatéchine-3-*O*-gallate (53), l'épigallocatéchine (54) et l'épigallocatéchine-3-*O*-gallate (55).

D'autres chercheurs ont travaillé sur la stabilité et l'activité antioxydante des polyphénols extraits des baies du myrte pour la préparation des liqueurs en Sardaigne et en Italie. Ils ont dosé les flavonoïdes et les anthocyanes par CLHP-UV-VIS et l'identification par LC/MS-ESI (couplage de la chromatographie en phase liquide à la spectrométrie de masse en mode ionisation : Electrospray), en se plaçant à deux longueurs d'ondes caractéristiques de ces deux classes de composés polyphénoliques, à savoir 350 nm et 520 nm. La macération s'est déroulée en laissant les baies au contact de l'éthanol à 70% pendant 40 jours. Ils ont pu identifier 14 composés, parmi lesquels 8 anthocyanes nommés : délphinidine-3-*O*-glucose (56), cyanidine-3-*O*-glucose (57), pétunidine-3-*O*-glucose (58), péonidine-3-*O*-glucose (59), malvidine-3-*O*-glucose (60), delphinidine-3-*O*-arabinose (61), pétunidine-3-*O*-arabinose (62) et malvidine-3-*O*-arabinose (63) en plus de 6 flavonoïdes dont les majoritaires sont représentés dans le tableau 6 (Montoro et al., 2006).

Les travaux de Wannes et al., (2010) sur l'analyse des composés phénoliques du Myrte par CLHP ont permis d'identifier des composés phénoliques, parmi lesquels 4 tanins hydrolysables qui sont : oenothéin B(64), eugeniflorin D₂ (65), tellimagrandins I (66) et tellimagrandins II (67) ; 4 acides phénoliques : acide gallique, acide syringique (68), acide vanillique (69) et acide ferulique (70) et 4 myricétine glycosides : myricétine 3-*O*-β-D-xyloside(71), myricétine 3-*O*-β-D galactoside, myricétine 3-*O*-β-D-galactoside 6-*O*-gallate et myricétine 3-*O*-α-L-rhamnoside.

Tableau 6 : Structure des différents flavonoïdes rencontrés dans le genre *Myrtus*

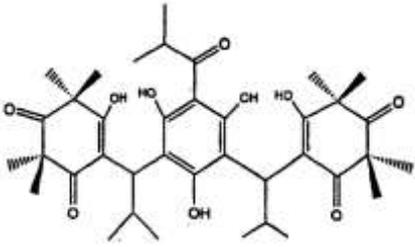
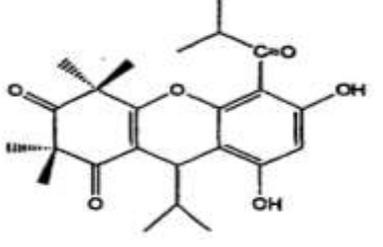
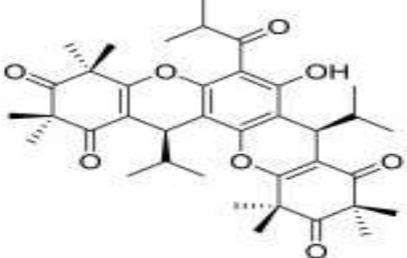
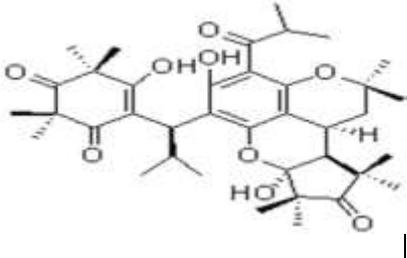
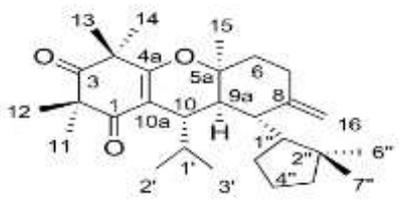
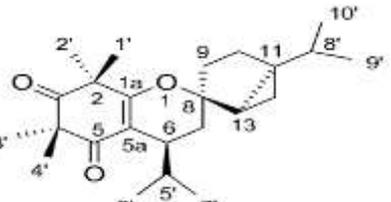
N°	Structure	
		
	R	R¹
(42)	OH	H
(43)	OH	Rhamnose
(49)	OH	Galactose
(50)	OH	6''-O-galloylgalactoside
(71)	OH	Xyloside
(51)	H	Galactose
(52)	H	Rhamnose
(41)		(44) 
(45)		(46) 
(47)		(48) 
(53)		(54) 
(55)		(64) 

(65)		(66)	
(67)		(68)	
(69)		(70)	
(56)			
	R	R¹	R²
(56)	OH	OH	Glucose
(57)	OH	H	Glucose
(58)	OH	OCH ₃	Glucose
(59)	OCH ₃	OH	Glucose
(60)	OCH ₃	OCH ₃	Glucose
(61)	OH	OH	Arabinose
(62)	OH	OCH ₃	Arabinose
(63)	OCH ₃	OCH ₃	Arabinose

➤ Phloroglucinol

D'un point de vue chimiotaxonomique, l'espèce *Myrtus communis* se caractérise par la présence d'un phloroglucinol nommé myrtucommulones A (72), B (73) et E (74). Récemment, (Cottiglia et al., 2012) ont découvert trois nouveaux phloroglucinols nommés myrtucommulones J (75), K (76) et L (77) dans l'extrait dichlorométhane du Myrte. Ces composés ont des fortes activités antimicrobienne, anti-inflammatoire, antioxydante et il a été récemment découvert que le Myrtucommulones possèdent une activité anti-cancéreuse (tableau 7) (Sumbul et al., 2011).

Tableau 7 : Structure des phloroglucinols rencontrés dans le genre *Myrtus*

Composé	Structures	Composé	Structure
(72)		(73)	
(74)		(75)	
(76)		(77)	

3. Aperçu bibliographique sur les métabolites secondaires

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces et, bien que leurs rôles biologiques soient encore mal connus, ils interviennent cependant dans la relation entre la plante et son environnement. Ils sont responsables de la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que les parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi les pollinisateurs et les disséminateurs. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires.

Ces métabolites secondaires sont classés en plusieurs grands groupes dont les composés phénoliques, les terpènes, les stéroïdes et les alcaloïdes. Chaque classe se caractérise par une grande richesse structurale leur conférant le plus souvent diverses activités biologiques. Ceci fut pour nous un critère de choix de ce métabolisme dont les composés phénoliques et les terpènes nous ont intéressés en particulier dans le présent travail.

3.1. Généralités

Les vertus médicinales attribuées aux différentes espèces des genres *Myrtus* et *Solenostemma*, seraient dues essentiellement aux huiles essentielles, les composés phénoliques et terpéniques présents dans ces plantes.

Les composés phénoliques constituent un groupe de substances qui sont largement abondants dans le règne végétal, ou plus de 8000 composés sont connus, avec des activités et structures chimiques différentes. Ils ont une large gamme d'actions incluant les activités antitumorale, anti-oxydante, antivirale, antibactérienne, cardioprotectrice et antimutagénique.

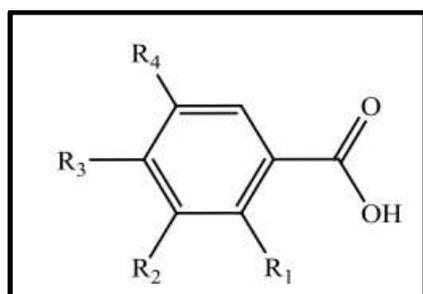
Ces composés sont abondants dans les fruits, les légumes, les noix, les noisettes, les cacahuètes, le thé, le vin rouge, les agrumes et bien d'autres sources alimentaires. La diversité structurale du métabolisme phénolique repose sur le nombre et la position des groupements hydroxyles sur le squelette de base ainsi que les différentes substitutions qui peuvent intervenir telles que la glycosylation, l'estérification ou encore l'acétylation. Les principales classes des composés phénoliques rencontrés dans l'alimentation sont les acides phénoliques, les lignanes, les stilbenes, les coumarines, les tanins et les flavonoïdes (Abedini, 2013).

3.2. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques possèdent un ou plusieurs hydroxyles phénoliques et pour certains au moins une fonction carboxylique. Ils sont classés en différentes familles en fonction du nombre de cycles phénoliques qu'ils contiennent et des éléments structurels qui les lient les uns aux autres (Collin and Crouzet, 2011).

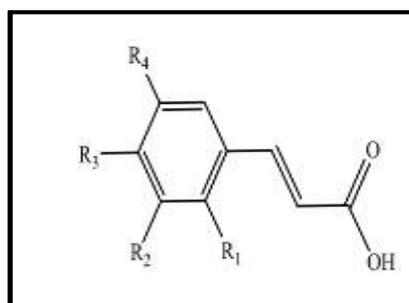
3.2.1. Les acides phénoliques

On distingue deux principales classes d'acide phénolique; les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique (figures 7-8). La concentration de l'acide hydroxybenzoïque est généralement très faible chez les végétaux comestibles. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine contrairement aux acides hydroxycinnamiques qu'on retrouve en abondance (Manach et al., 2004; Bassil, 2015).



Composés	R1	R2	R3	R4
Ac. benzoïque	H	H	H	H
Ac. salicylique	OH	H	H	H
Ac. <i>p</i> -hydroxybenzoïque	H	H	OH	H
Ac. gallique	H	OH	OH	OH
Ac. protocatéchique	H	OH	OH	H

Figure 7 : Formules générales des dérivés de l'acide benzoïques



Composés	R1	R2	R3	R4
Ac. cinnamique	H	H	H	H
Ac. <i>o</i> -Coumarique	OH	H	H	H
Ac. <i>m</i> -Coumarique	H	OH	H	H
Ac. <i>p</i> -coumarique	H	H	OH	H
Ac. caféique	H	OH	OH	H

Figure 8: Formule générale des dérivés de l'acide cinnamique

3.2.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes occupent une place majeure dans le groupe des polyphénols et sont considérés comme des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. Plus de 6000 flavonoïdes naturels ont été décrits. On estime que 2% environ du carbone organique photosynthétisé par les plantes, soit quelques 109 tonnes par an, sont convertis en flavonoïdes (Ferguson, 2001; Medjekane, 2017).

Flavonoïdes (de *flavus*, « jaune » en latin) est le terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 carbones, qui à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles appelés A et B, liés par une chaîne à trois carbones donnant une structure en C6-C3-C6. La chaîne en C3 peut éventuellement se cycliser pour former le cycle C (figure 9) (Boutaghane, 2013).

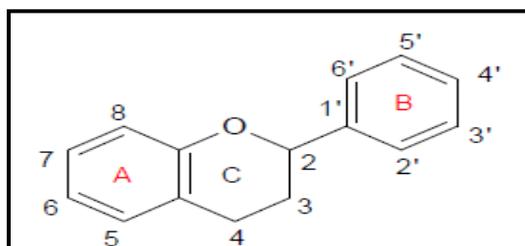


Figure 9: Structure de base des flavonoïdes

3.2.2.1. Distribution des flavonoïdes dans le règne végétal

A de rares exceptions près, seules les plantes ont la capacité de biosynthétiser des flavonoïdes. Ces derniers peuvent être présents dans les parties aériennes et souterraines de la plante (Bruneton, 1999). Les flavonoïdes sont présents le plus souvent sous forme glycosylée dans les plantes car la glycosylation a pour effet de les rendre moins réactifs et plus hydrosolubles favorisant ainsi leur stockage dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs, ou l'épiderme et le mésophylle des feuilles ou encore les parenchymes des tiges et racines. Les génines seules sont présentes dans les exsudats farineux de certaines plantes, dans les cuticules des feuilles, écorces et bourgeons ou sous forme de cristaux dans les cellules de certaines *Cactaceae* et plantes de régions arides (Iwashina, 2000; Merken and Beecher, 2000). La présence de composés flavonoïdiques a été rapportée chez les Bryophytes, les Ptéridophytes, les Gymnospermes et chez les Angiospermes (Markham, 1988). Cette distribution quasi ubiquitaire dans les plantes, alliée à leur relative stabilité, leur relative facilité d'identification et la forte tendance des plantes taxonomiquement proches à produire les mêmes types de flavonoïdes, ont fait des flavonoïdes des marqueurs chimiotaxonomiques de choix pour la classification végétale (Grayer et al., 1999).

3.2.2.2. Classification

Les flavonoïdes possèdent une origine biosynthétique commune, ont un squelette de base en C₁₅ de type (C₆-C₃-C₆). Selon le degré d'oxydation du noyau central, qui peut être ouvert ou fermé, les flavonoïdes peuvent être regroupés en neuf classes distinctes : chalcones, aurones, flavones, isoflavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavane et anthocyanes (fig. 10). Dans la plante, ils sont très souvent liés à des sucres, on parle alors d'hétérosides constitués d'une partie phénolique aglycone ou génine associée à un sucre (Michel, 2011). Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles peuvent être méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme C- ou O-glycosylés. Les O-glycosides qui sont de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les C-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine en C-6 et/ou en C-8. En effet, la formation de la liaison hétérosidique est sous la dépendance de transférases très spécifiques au substrat et à la position d'osylation (Bruneton, 1999).

Plus de 80 sucres différents ont été trouvés liés aux flavonoïdes des plantes. Parmi eux, le D-glucose est le monosaccharide le plus courant. D'autres hexoses tels que le D-

galactose et leD-mannose ainsi que le L-rhamnose (seul désoxyhexose) et des acides uroniques (le plus souvent l'acide D-glucuronique). On trouve également des pentoses tels que le D-xylose, le L-arabinose et le D-apiose ainsi que des disaccharides (une quarantaine dont les plus courants: le rutinose et le néohespéridose), des trisaccharides et quelques rarestétraccharides (Boutaghane, 2013;Hollman and Arts, 2000).

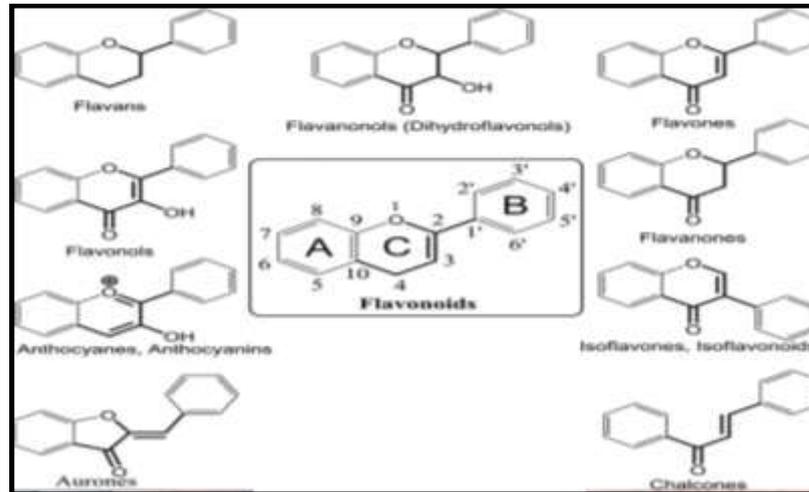


Figure 10: Structure des différentes classes des flavonoïdes

➤ **Les flavonols**

Les flavonols se caractérisent par une liaison insaturée entre les carbones 2 et 3 et une fonction hydroxyle en position 3 (3-hydroxyflavone) du cycle C (figure 11). Ils existent principalement sous forme glycosylée (glucose, xylose, arabinose, galactose, rhamnose). Ce sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal, leur couleur varie du blanc au jaune et sont essentiellement représentées par la quercétine et le kaempférol (Isorez, 2007).

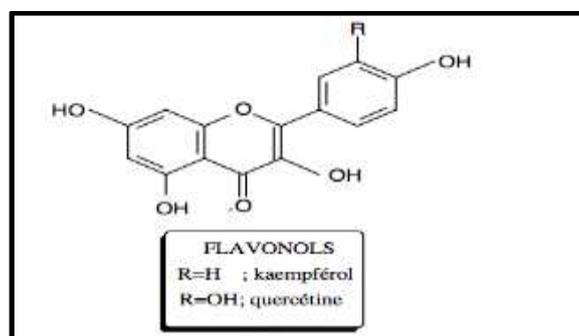


Figure 11: Structure des flavonols

➤ **Les flavanols**

Les flavanols sont des flavonoïdes qui se caractérisent par un cycle central C très peu substitué et l'absence de fonction cétone (fig.12). Par ailleurs, les flavan-3-ols sont à l'origine

des tanins condensés ou proanthocyanidols, qui correspondent à des oligomères ou des polymères de flavan-3-ols dérivés de la (+)-catéchine (Michel, 2011; Hvattum and Ekeberg, 2003).

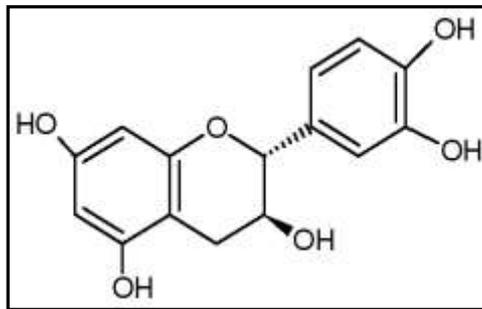


Figure 12: Structure de la (+)-catéchine

➤ Les flavones

Les flavones sont abondantes chez les plantes supérieures qu'on retrouve sous forme aglycone ou glycosylée. Certaines, comme la lutéoline (fig.13), sont en partie responsables de l'aspect blanc ou ivoire de certaines fleurs comme les roses et les œillets. Ce sont des molécules peu colorées, mais qui absorbent à des longueurs d'onde caractéristiques ($\lambda = 210-270$ nm, 310 nm). Par exemple, elles sont parfaitement discernables par les abeilles, dont la perception visuelle s'étend à une partie de l'ultra-violet.

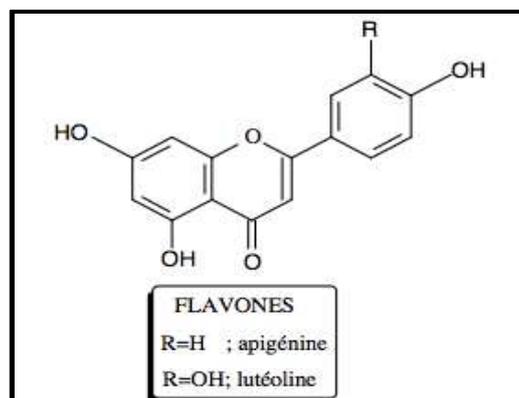
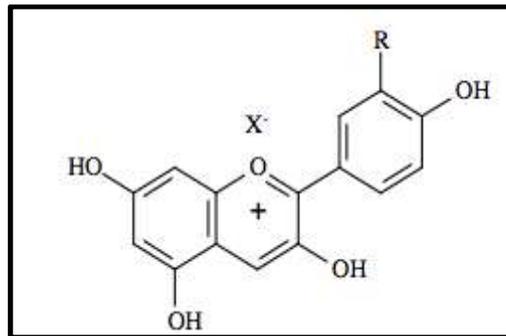


Figure 13: Exemples de flavones naturelles

➤ Les anthocyanes

Les anthocyanes ou anthocyanines (du grec anthos = fleur, kyáneos = pourpre) sont des pigments naturels solubles dans l'eau allant du rouge au bleu. Les anthocyanes apparaissent principalement dans les fruits mais aussi dans les feuilles et les racines des plantes. Elles sont principalement localisées dans les cellules des couches extérieures telles que l'épiderme.



R=H; pélagonidol

R=OH; cyanidol

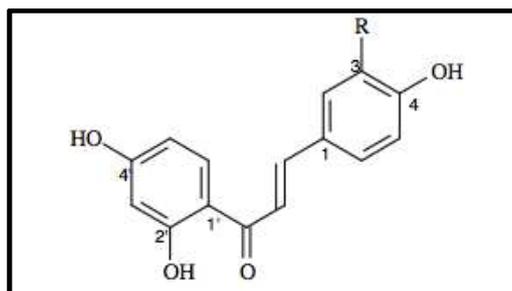
Figure 14: Structure des anthocyanes

En raison de leurs propriétés physicochimiques et de leur présence dans les fruits consommés par l'homme, les pigments anthocyaniques ont fait l'objet de nombreuses études et sont utilisés comme colorants alimentaires et alicaments. Une consommation régulière de ces flavonoïdes réduit le risque d'atteinte de plusieurs maladies comme les cancers, les maladies cardiovasculaires ou encore la maladie d'Alzheimer.

Plusieurs études sur le genre *Myrtus* ont rapportés la richesse de l'espèce *Myrtus communis* en composés anthocyaniques notamment la délphinidine, la malvidine, la péonidine, la cyanidine et la pétunidine-3-O-glucoside.

➤ Les chalcones

Un grand nombre de chalcones ont été décrites dans la littérature. Ces molécules naturelles sont toutes hydroxylées et / ou méthoxylées et diverses combinaisons de trois à six groupements peuvent fonctionnaliser les cycles A et B du squelette chalcone (fig.15). Elles ont, entre autres, un rôle de chromophore dans le règne végétal car elles se caractérisent par une couleur jaune vif (bande d'absorption empiétant dans le visible).



R=H ;isoliquiritigénine

R=OH; butéine

Figure 15 : Structure des chalcones.

➤ Flavanones

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2, 3 et par la présence d'un centre d'asymétrie en 2 (Fig. 16). Chez les flavanones naturelles, le carbone 2 est normalement de configuration S. Elles existent sous forme libre ou sous formes glycosylées. Sous forme libre, les carbones en position 5 et 7 sur le cycle A peuvent être hydroxylées ou méthoxylées. Le cycle B peut aussi être substitué en position 3', 4', 5' et 6'. Les dérivés C-alkylés sont relativement courants, surtout les dérivés C-géranylésouC-prénylés (Fig. 16). Les dérivés C-méthylés sont fréquemment rencontrés chez les *Myrtaceae*. Ce type de composé a déjà été isolé des racines de *Piper hostmannianum*(Isorez, 2007).

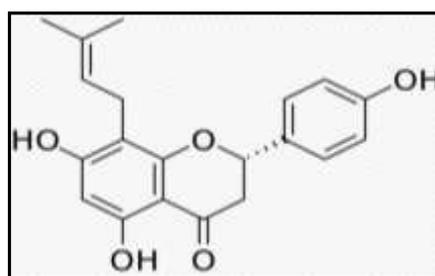


Figure 16: Structure du 8-Prénylnaringinine

3.2.2.3. Propriétés biologiques des flavonoïdes

La consommation de fruits et de légumes, qui par ailleurs est encouragée par les autorités sanitaires, a été depuis quelques années corrélée à un effet protecteur contre le cancer, les maladies cardio-vasculaires et également contre les maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Ces effets positifs sur la santé humaine

sont en partie dus à la présence, dans les végétaux consommés, de molécules bioactives et notamment les flavonoïdes qui sont connus pour avoir une forte activité antioxydante, en inhibant les enzymes favorisant la production de radicaux libres et en piégeant les radicaux libres formés. Une des premières étapes du développement des maladies neurodégénératives qui apparaissent souvent avec l'âge, est due à une diminution des défenses antioxydantes et à une augmentation mitochondriale de la production d'espèces radicalaires. Ainsi l'apport d'antioxydants naturels par la nourriture ne peut être que bénéfique pour la santé humaine (Kebieche, 2009).

➤ **Propriétés anti-inflammatoires et immunologiques**

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Hvattum and Ekeberg, 2003). Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (Emim et al., 1994; Middleton, 1996). Leur effet sur les lymphocytes B ou T peut être variable: en effet, les flavones (apigénine, lutéoline et 7,3',4' hydroxyflavone) et les flavonols (kaempférol et quercétine) inhibent la prolifération des lymphocytes T alors que la myricétine est active sur les lymphocytes B (Mookerjee et al., 1986; Namgoong et al., 1994). La quercétine a un effet anti inflammatoire en inhibant les enzymes telles que ; la cyclooxygénase et la lipoxygénase respectivement responsables de la formation des prostaglandines et des leucotriènes qui sont les principaux médiateurs de l'inflammation (Middleton Jr and Drzewiecki, 1984).

➤ **Propriétés antivirales et antibiotiques**

La stratégie de recherche d'un composé antiviral consiste à mesurer la réduction de l'infection virale de cellules en culture. Une substance peut agir à différents niveaux du cycle viral (Milane, 2004) :

- au niveau de la pénétration du virus dans la cellule hôte,
- au niveau de la réplication du virus et la synthèse des protéines virales,
- au niveau de l'assemblage et de la sortie du virus hors de la cellule hôte.

Des travaux réalisés sur des souris ont montré que les flavonoïdes sont capables d'agir au niveau de la synthèse des protéines virales suite à une administration journalière de 3-O-méthylquercétine à raison de 20 mg/kg pendant 9 jours assurant ainsi une bonne protection des souris vis-à-vis d'une infection virale (Vrijssen et al., 1987). D'autres chercheurs ont également montré une corrélation entre l'effet inhibiteur de certains flavonoïdes sur divers virus de l'herpès et leur capacité à augmenter les taux intracellulaires en AMPc dans des

cellules infectées (Mucsi and Pragai, 1985). Les travaux de Spedding et al., (1989) ont mis en évidence un impact des flavonoïdes sur le rétrovirus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Certains travaux de recherche (Mahmood et al., 1993) ont montré que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV (la gp120), en empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte. Enfin, les flavonoïdes seraient susceptibles d'inhiber l'intégrase rétrovirale du virus HIV-1 qui assure l'intégration du génome viral à celui de la cellule hôte (Mahmood et al., 1993; Fesen et al., 1994).

D'autres études ont montré l'effet bactéricide de différentes flavanones sur l'ADN gyrase de la bactérie *Staphylococcus aureus*. Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe (Ohemeng et al., 1993; Sato et al., 1995).

➤ **Propriétés antinéoplasiques**

Des études réalisées sur des souris ont mis en évidence les effets protecteurs des flavonoïdes vis-à-vis des promoteurs de tumeurs. La quercétine, par exemple, est l'un des composés phénoliques capables de diminuer, chez le rat, l'incidence des tumeurs mammaires (Verma et al., 1988).

Les flavonoïdes peuvent également interférer avec le métabolisme des xénobiotiques notamment, en stimulant les systèmes de détoxification (Wattenberg, 1983; Bu-Abbas et al., 1995). En administrant à des rats ou à des souris une alimentation riche en flavone ou quercétine, des chercheurs ont observé des effets chimiopréventifs à divers niveaux en particulier au niveau du foie (Nijhoff et al., 1995).

➤ **Propriétés antiradicalaires**

La surproduction des radicaux seraient responsables d'altérations des acides nucléiques et des processus de cancérisation ou de dégradation cellulaire liés à leur réactivité avec les phospholipides membranaires (phénomènes de peroxydation). Ces dommages oxydatifs peuvent être impliqués dans de nombreuses affections : cancers, inflammations chroniques, athéroscléroses...

Ainsi, la propriété des flavonoïdes en tant que piègeurs de radicaux libres les implique dans la prévention des dommages oxydatifs causés par les réactives oxygénées (ROS) sur les molécules cellulaires. De nombreuses études *in vitro* ont montré des activités des flavonoïdes contre les processus inflammatoires et, de ce fait, contre les maladies inflammatoires chroniques et l'arthrose. En empêchant les ROS d'altérer l'ADN, les flavonoïdes limitent les mutations et les processus de carcinogénèses. De ce fait, ils sembleraient également intervenir

dans la prévention de cancers, démences, athérosclérose, hypertension et maladies cardiovasculaires.

Outre leur pouvoir antioxydant, certaines classes possèdent des potentialités oestrogéniques (isoflavones) et, plus généralement, les flavonoïdes sont utilisés pour toute une gamme d'activités pharmacologiques : pour préserver l'intégrité vasculaire, pour leurs propriétés immunomodulatrices, anti-hépatotoxiques, anti-ostéoporotiques, pour leur actions antimicrobiennes et contre les allergies; les flavonoïdes sont aussi connus pour leur action sur le tractus gastro-intestinal en tant qu'agents antiulcéreux, antispasmodiques, anti-sécréteurs et antidiarrhéiques (Boutaghane, 2013).

3.3. Prégnanes

La classe des métabolites secondaires qui caractérise la sous-famille des Asclépiadoïdées ou figure le genre étudié *Solenostemma* est celle des prégnanes. Ces composés présentent de grandes variétés structurales et un large éventail d'activités biologiques.

3.3.1. Biosynthèse

Les prégnanes sont des composés stéroïdiques composés de 21 carbones et proviennent d'une transformation des stérols. Leur biogenèse est en effet liée à la voie de biosynthèse des terpènes qui sont des produits de polymérisation de l'unité isoprène (Wattenberg, 1983).

L'isoprène, qui est la base commune de tous les terpènes, est issu soit de la voie du mévalonate dans le cytoplasme, soit par la voie du MEP (Méthyl-érythritol-4-phosphate) dans les plastides (Bruneton, n.d.). La condensation de deux unités isopréniques (5 carbones) conduit à la formation d'une unité géranylphosphate (GPP à 10 carbones) dont la condensation avec une autre unité isoprénique conduira à la formation du farnésylpyrophosphate (FPP à 15 carbones). La condensation de deux unités FPP génère la squalène (à 30 carbones). Suite à l'oxydation en 2,3 époxysqualène, la structure est cyclisée par la 2,3 époxysqualène cyclase et génère un stérol tétracyclique (figure 17). La transformation en noyau prégnane aura lieu majoritairement à partir du cholestérol ou secondairement du stigmastérol (Tsoukalas, 2015).

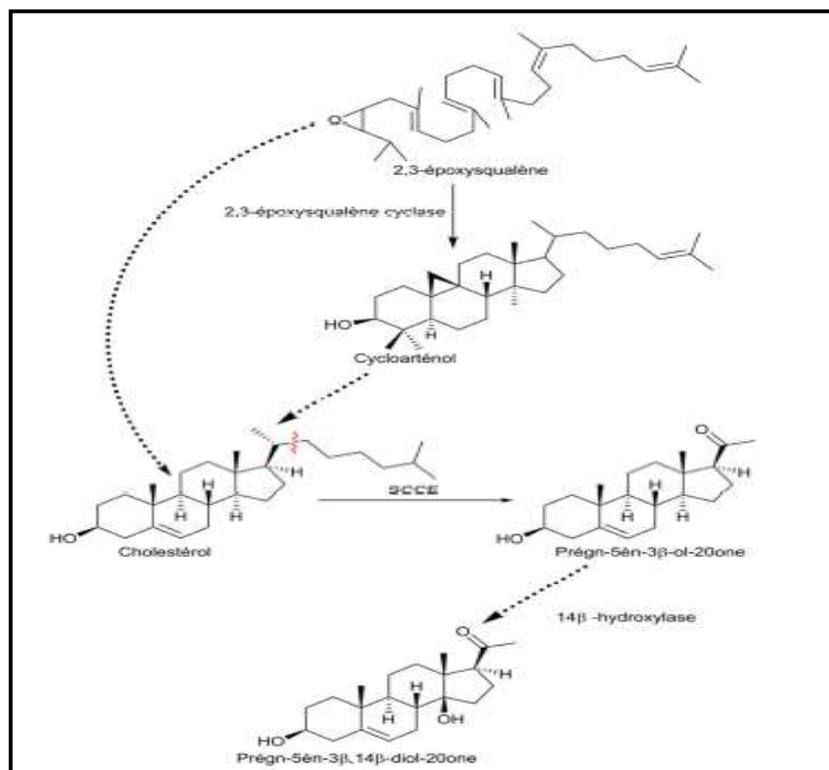


Figure 17 : Schéma de biosynthèse des prégnanes

3.3.2. Activités biologiques

Les glycosides prégnaniques présentent un large spectre d'activités biologiques :

- Effets antiviraux et antifongiques(Yoon et al., 2011),
- Effets inhibiteurs de l'acétylcholinestérase,
- Effets anti-dépresseurs(Yang et al., 2011),
- Effets immuno-modulateur(Ma et al., 2011),
- Effets cytotoxiques, prop-apoptotiques et anti-tumoraux (Ma et al., 2011;Peng et al., 2008;Peng et al., 2011).

Partie 2:
Etude Phytochimique et Biologique
de l'espèce *Solenostemmaargel*

Chapitre I : Matériel et méthodes

1. Etude phytochimique

1.1. Récolte et identification du matériel végétal

La récolte du matériel végétal a été réalisée sur une seule station de notre choix située dans la wilaya de Djanet (Sud-Est Algérien) en mars 2013. Le prélèvement s'est fait tous pieds confondus jusqu'à l'obtention d'un vrac de l'importance de un kilogramme de matière sèche.

L'identification botanique a été réalisée par Dr. Bazri Maitre de conférence au département de Biologie et Ecologie Végétale, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université des Frères Mentouri, Constantine1.

L'échantillon est préalablement stocké et séché après la récolte dans un endroit sec à température ambiante.

1.2. Protocoles d'extractions des substances bioactives

Les parties aériennes (500g) sont séchées à l'abri de la lumière puis broyées à l'aide d'un mixeur. Elles sont ensuite soumises à une macération hydro-alcoolique (Méthanol/Eau ; 80:20 V/V) à température ambiante. L'opération est répétée 3 fois (3x24h) avec récupération à chaque fois de l'extrait brut suivie d'une filtration et renouvellement du solvant. Les différents filtrats sont rassemblés puis concentrés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait brut ainsi obtenu est fractionné par une extraction liquide-liquide en utilisant des solvants à polarité croissante tels que l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol selon le protocole décrit dans la figure 18.

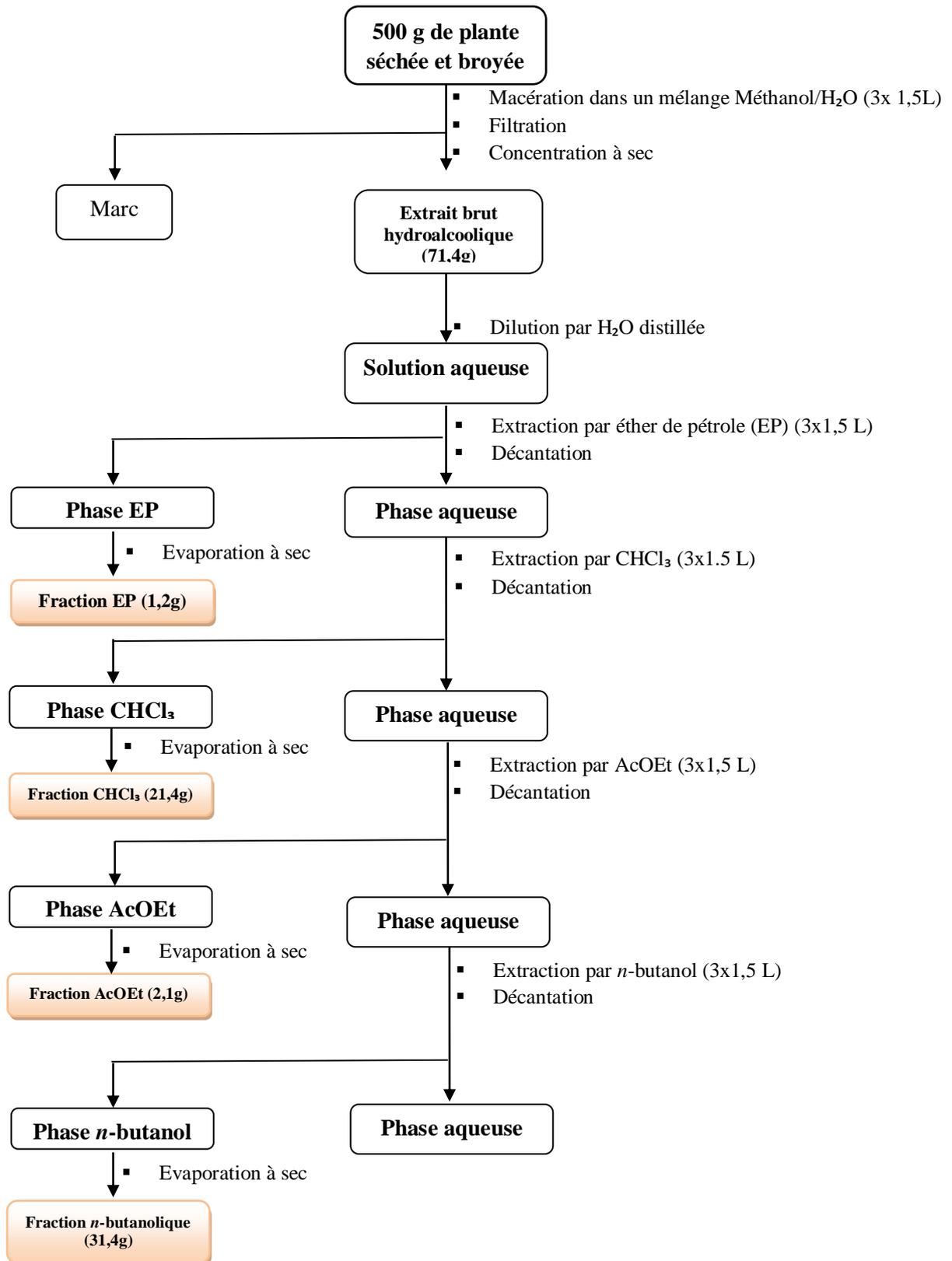


Figure 18: Schéma d'obtention des différents extraits de *Solenostemma argel*

1.3. Screening phytochimique par chromatographie sur couche mince (CCM)

Une investigation par CCM a été réalisée pour déterminer les familles chimiques susceptibles d'exister dans les différents extraits : brut, éther de pétrole, chloroformique et acétate d'éthyle de la plante *S. argel*.

Ce type de chromatographie est réalisé sur plaques de gel de silice dont les propriétés d'adsorption permettent de contracter de liaisons hydrogène avec les produits de l'extrait analysé. Le degré d'adsorption de ces produits dépend du nombre de liaisons formées avec le support. Ainsi, l'élution des produits dépend de l'aptitude du solvant à former des liaisons plus fortes que celles formées par le gel de silice.

Du point de vue pratique, l'opération consiste à déposer, au moyen d'un capillaire, 10 µL de chaque extrait sur une plaque de silicagel prête à l'emploi (60 F₂₅₄, Merck). La plaque est ensuite introduite dans une cuve en verre contenant la phase mobile constituée du système de solvants suivant : CHCl₃/MeOH/H₂O (90:10:1).

La progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque, provoque la migration des produits qui dépend des interactions existantes entre le soluté, la phase mobile et la phase stationnaire.

La révélation des spots, par pulvérisation sur la plaque de réactifs spécifiques, permet de nous renseigner sur les types de familles chimiques renfermées dans la plante (tableau 8).

Tableau 8: Mode de révélation des substances naturelles de *S. argel* (Abedini, 2013)

Réactifs	Substances révélées	Mode d'utilisation
Anisaldéhyde sulfurique	Réactif polyvalent	Préparer une solution de <i>p</i> -anisaldéhyde à 0,5% dans un mélange CH ₃ OH/AcOH/H ₂ SO ₄ (85:10:5) Pulvérisé sur la plaque. Après chauffage intense, les composés organiques apparaissent sous forme de tâches colorées en lumière du jour.
Neu	Flavonoïdes, acides phénoliques	Préparer une solution de diphénylborate d'éthanolamine à 1% dans le méthanol et ajouter 5% de PEG 4000. Vaporiser sur la plaque. Les flavonoïdes apparaissent sous forme de tâches

		fluorescentes orange, jaune, bleue et verte à 365 nm.
Folin-Ciocalteu	Polyphénols	Préparer une solution d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PM_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PW_{12}O_{40}$). Vaporiser sur la plaque et chauffer, les polyphénols apparaissent sous forme de tâches bleues dans le visible
FeCl₃	Tanins	Préparer une solution aqueuse de chlorure de fer à 10%. Vaporiser sans chauffer. Les tanins apparaissent sous forme de tâches noires, vertes et noires.
Dragendorff	Alcaloïdes	Solution A : 0,85 gde nitrate basique de bismuth + 10 g d'acide tartrique + 40 mL d'H ₂ O distillée. Solution B : 16 g de d'iodure de potassium (KI) dissout dans 40 ml d'H ₂ O. Mélanger 5 mL de chaque solution + 100 mL d'H ₂ O + 20 g d'acide tartrique. Vaporiser sans chauffer, les alcaloïdes apparaissent sous formes de tâches oranges dans le visible.

1.4. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé en utilisant la méthode décrite par Liu et al., (2009). Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phospho-tungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) qui sera réduit, lors de l'oxydation des phénols (transformés en phénolates par l'action du carbonate de sodium), en un complexe stable d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène qui absorbe fortement à 760 nm. L'intensité de la couleur produite est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés, donc à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait. Le phénol standard utilisé dans cette étude est l'acide gallique (Liu et al., 2009).

La première étape consiste à préparer une gamme de dilution à 50 ; 25 et 10 mg/L d'acide gallique dans l'eau distillée à partir d'une solution mère de 100 mg/L.

Dans différents tubes à essai, sont introduits 0,5 mL de chaque concentration auxquels sont rajoutés 2,5 mL du réactif Folin-ciocalteu dilué au 1/10^e. Après une pause de 2 min, on ajoute à chaque solution, 2 mL de carbonate de sodium (Na₂CO₃ à 145 g/L) préalablement agité au vortex puis plongé dans un bain-marie à 50°C pendant 5 min. Chaque mélange est ensuite refroidi dans un bain de glace avant de mesurer son absorbance au spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 760$ nm. L'eau distillée est utilisée comme blanc.

Dans la deuxième étape, une série de dilutions au 1/10^e est réalisée à partir des solutions mères des cinq extraits de *S. argel* préalablement préparées à une concentration de 12,5 mg/mL. Dans chaque tube à essai sont introduit 0,5 mL de chaque dilution et 2,5 mL du réactif Folin-ciocalteu dilué au 1/10^e. Le mélange est laissé à température ambiante pendant 2 min puis sont rajoutés 2 mL d'une solution de Na₂CO₃. Après agitation au vortex, le mélange est plongé dans un bain-marie à 50°C pendant 5 min puis refroidi dans un bain de glace avant de mesurer son absorbance à 760 nm contre un blanc où l'extrait est remplacé par de l'eau distillée. Pour chaque solution, la mesure de l'absorbance est répétée 3 fois.

A partir de la droite étalon, la concentration en polyphénols totaux est calculée en reportant la DO lue pour chaque échantillon et en tenant compte de la dilution réalisée. Les valeurs sont exprimées en grammes d'équivalent d'acide gallique (Liu et al., 2009).

2. Analyses biologiques

Plusieurs tests biologiques simples, peu coûteux, rapides et sensibles ont été réalisés à partir des différents extraits de *S. argel* afin de déceler les types d'activités que recèle la plante et d'orienter le processus de fractionnement et d'isolement des substances bioactives. Il s'agit notamment des tests anticholinestérasiques et antimicrobiens.

Seule l'activité anticholinestérasique que nous avons analysé par bioautographie et sur microplaques a donné des résultats positifs.

2.1. Méthode bioautographique par CCM

Le test anticholinestérasique par bioautographie est une méthode colorimétrique basée sur le clivage de l'acétate de naphthyle par les acetylcholinestérase (AChE) en acide acétique et α -naphthol. Ce dernier réagit à son tour avec le sel de Fast Blue B pour conduire à la formation d'un autre composé de couleur pourpre absorbant la lumière à une longueur d'onde de 600 nm (figure 19).

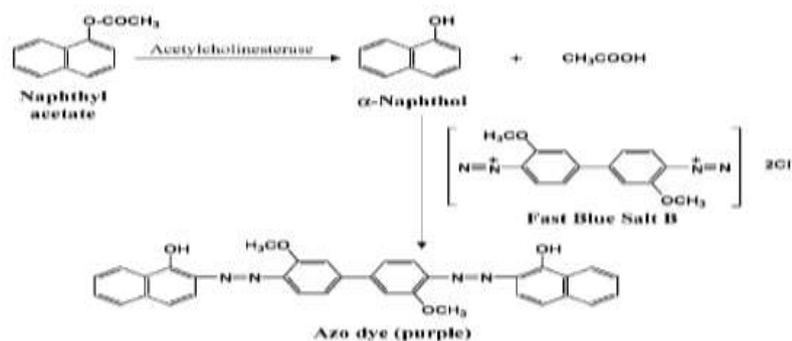


Figure 19 : réaction colorimétrique au Fast Blue B salt

La méthode consiste à dissoudre 500 U d'acétylcholinestérase dans 500 mL du tampon Tris (0,05 mol/L, pH=7,8) et d'ajouter 500 mg de sérum albumine bovine pour stabiliser l'enzyme, la solution est conservée à 4°C. Le substrat est préparé à partir de 150 mg de naphthyl acétate dissout dans 40 mL d'éthanol puis dilué dans 60 mL d'eau distillée. Nous avons déposé 10 μL de chaque extrait (ou produit) sur une plaque CCM pour subir une migration dans un système de solvants approprié : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (90:10:1). Après migration, la plaque CCM est pulvérisée par le substrat suivi de l'enzyme. Le surplus de solvant est délicatement évaporé à l'aide d'un sèche-cheveux à froid. La plaque CCM est ensuite placée dans une enceinte en plastique fermée contenant un peu d'eau afin d'y maintenir l'humidité sans toutefois que la plaque CCM ne soit mise en contact avec l'eau. Après incubation à l'étuve pendant 20 min à 37°C, la plaque CCM est enfin pulvérisée par une solution de Fast Blue B Salt fraîchement préparée en y mettant 50 mg dans 100 mL d'eau distillée. L'apparition d'un spot blanc sur fond violet est révélatrice d'une activité anticholinestérasique (Yang et al., 2009).

2.1. Méthode d'Ellman sur microplaque

L'étude de l'activité anti-AChE sur microplaque est menée selon la méthode développée par Ellman et al., 1961 modifiée par Di Giovanni et al., 2008. Il s'agit d'une méthode colorimétrique utilisée surtout pour quantifier l'inhibition de l'enzyme cholinestérase sous forme de CI_{50} , soit la concentration nécessaire de l'extrait ou du produit permettant de diminuer l'activité enzymatique de moitié. Le principe de la méthode est basé sur l'utilisation d'un analogue du substrat naturel des ChE, l'acétylthiocholine (ATC) dans le cas de l'AChE et la butyrylthiocholine (BTC) dans le cas de la BChE. L'hydrolyse de ces substrats libère une thiocholine qui va réagir à son tour avec le réactif d'Ellman ; le 5,5' dithiobisnitrobenzoate

(DTNB) pour former un anion de couleur jaune absorbant la lumière à une longueur d'onde maximale de 412 nm (figure 20).

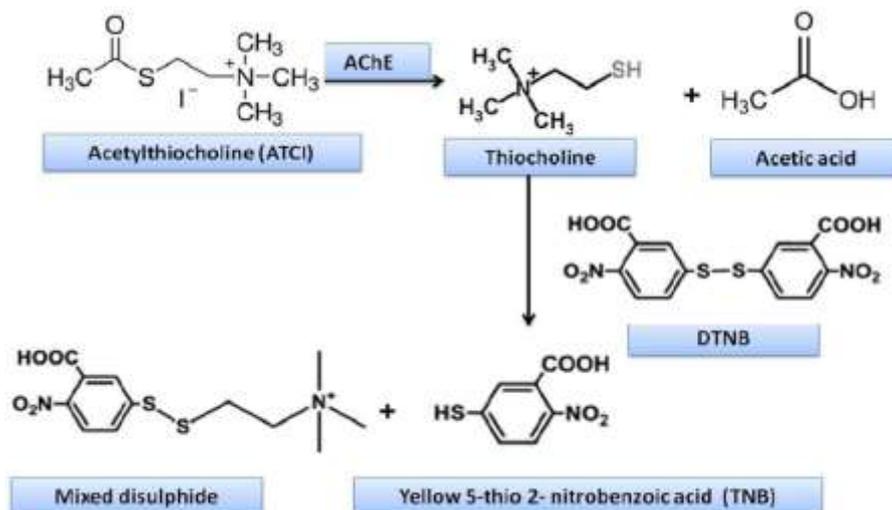


Figure 20 : Réaction colorimétrique d'Ellman

Dans chaque puits de la microplaque sont introduits successivement 227,3 μL du réactif d'Ellman (0,15 mM DTNB solubilisé dans du tampon phosphate à pH 7,4), 20 μL de l'enzyme (0,5 U/ml) préparée dans du tampon phosphate et 20 μL de l'extrait à analyser ou du témoin solubilisé à différentes concentrations (une série de dilution à partir d'une solution mère de 10^{-4} M) dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). La réaction est déclenchée par addition de 20 μL de la solution ATCI (0,22 mM d'acétylthiocholine iodide) préparée dans de l'eau ultra pure. Après homogénéisation, la microplaque est introduite dans un spectrophotomètre et agitée pendant 2 secondes. L'absorbance du mélange est déterminée à 412 nm. Le contrôle négatif est préparé de la même manière avec du DMSO à la place du produit à tester. Un autre test sur la deuxième enzyme cholinestérasique à savoir la butyrylcholinestérase a été réalisé dans les mêmes conditions opératoires avec cette fois-ci comme substrat la butyrylcholine iodide. La galantamine hydrobromide a été utilisée pour le contrôle positif car elle est actuellement considérée comme le meilleur inhibiteur des ChE. Le CI_{50} a été calculé en utilisant le logiciel GraphPad Prism 7, alors que le pourcentage d'inhibition (I) a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{I}\% = 100 * \frac{\text{Absorbance controle} - \text{Absorbance produit}}{\text{Absorbance Controle}}$$

3. Séparation et purification des molécules bioactives

Afin de déterminer la conduite à tenir pour une bonne séparation des molécules responsables de l'activité anticholinestérasique de l'extrait, ce dernier a été soumis à une analyse préliminaire par chromatographie sur couche mince (CCM) et par chromatographie liquide haute performance (CLHP) analytique pour mettre en évidence son profil chromatographique.

3.1. Analyse par CCM

L'utilisation de la CCM selon le protocole développé précédemment (paragraphe 1.3) permet de visualiser le chimisme de l'échantillon à analyser.

Après développement par les solvants appropriés, la plaque CCM est contrôlée sous lumière ultraviolette à 254 et 365 nm et révélée par l'anisaldéhyde sulfurique puis enregistrée par procédé photographique.

3.2. Analyse par CLHP analytique

La CLHP est une technique de séparation analytique d'un mélange de composés, basée sur polarité des molécules.

Dans notre cas, l'appareil utilisé est de marque Shimadzu composé de deux pompes LC-10AS, d'un détecteur de type Diode Array Detector (DAD SPD-M20A) et d'un module de contrôle SCL-10Avp. Le tout est piloté *via* le logiciel LC solutions.

La technique consiste à injecter, 20 µL de l'extrait à analyser, dans une colonne C18 de dimension égale à 250×4,6 mm. Le support est une silice greffée à haut degré de reproductibilité où des chaînes alkyles en C18 sont fixées sur les hydroxyles de la silice. Ainsi cette dernière se comporte beaucoup plus comme un absorbant puisque sa polarité est inversée et sera de ce fait considérée comme phase stationnaire moins polaire que la phase mobile, d'où le nom de chromatographie de phase-inverse. Dans ce cas, les composés les plus polaires présenteront des temps de rétention plus courts que les composés apolaires. L'élution est réalisée par une phase mobile formée d'un mélange de solvants binaire (A/B) utilisée sous forme de gradient où A correspond à une solution à 0,1% d'acide formique dans l'eau ultra pure et B correspond à l'acétonitrile (tableau 9).

Tableau 9 : gradient d'élution utilisé pour déterminer le profil chromatographique de l'extrait chloroformique

Temps (min)	H ₂ O+0,1%acide formique (A)	ACN(B)
0-15	85-70	15-30
15-30	70-55	30-45
30-45	55-40	45-60
45-50	40-0	60-100
50-60	0	100

L'opération se déroule avec un débit de 0,8 mL/min, l'absorbance mesurée se traduit par un signal électrique qui sera visualisé et enregistré sous forme de pic sur le chromatogramme.

A la lumière des résultats de cette analyse chromatographique, un fractionnement bioguidé de l'extrait chloroformique a été essentiellement réalisé par des méthodes chromatographiques. Il s'agit notamment de :

- La chromatographie liquide sur colonne ouverte,
- La CLHP préparative

3.3.Chromatographie sur colonne de gel de silice

Le but de cette étape est de parfaire la définition du chimisme de l'échantillon en réalisant une première séparation des substances bioactives.

Le gel de silice, constitue l'un des meilleurs supports de colonne pour séparer les produits présents dans l'extrait étudié. En effet, les solvants associés à cette chromatographie entraînent les composés en fonction de leur structure chimique par ordre de polarité croissante.

Pour réaliser un bon fractionnement, nous avons utilisé une colonne de gel de silice (Type 60, 240-300 mesh,Merck) de 32 cm de hauteur et de 3cm de diamètre , montée dans le toluène.

Avant son introduction dans la colonne, l'extrait d'un poids de 19 g est d'abord solubilisé dans un volume minimum de méthanol puis mélangé à une petite quantité de gel de silice. Après évaporation à sec, la poudre résultante est broyée dans un mortier puis délicatement déposé en haut de la colonne. En bas de la colonne, le verre fritté a servit de filtre pour éviter les pertes de phase stationnaire.

L'élution est réalisée par un gradient de solvants de type toluène/acétate d'éthyle commençant par du toluène pur (100%) et se terminant par de l'acétate d'éthyle pur (100%). La

progression d'élution des substances, suivie en lumière UV détermine les changements de polarité du mélange éluant. Afin d'assurer une bonne séparation des produits présents dans l'extrait analysé, le fractionnement a été poursuivi par l'utilisation d'un deuxième gradient d'élution du type acétate d'éthyle/méthanol (0 à 100 % de méthanol).

Des fractions de 100 mL ont été collectées en sortie de colonne puis analysées par CCM sous UV à 254 et 365nm et révélées par l'anisaldehyde sulfurique. Ce contrôle chromatographique permet de réunir les fractions selon la ressemblance des spots sur les plaques CCM. Un total de 23 fractions a été obtenu.

3.4.CLHP préparative

Cette méthode de purification permet de traiter de faibles quantités de produits. Elle est très utilisée au laboratoire, notamment dans l'analyse de fractions encore hétérogènes issues de la colonne.

L'analyse a été réalisée selon la même technique que la CLHP analytique (paragraphe 3.2) en utilisant toutefois une autre colonne inverse C18 de dimensions égale à 250 mm x 22 mm et un débit de 12 mL/min.

4. Analyse structurale

4.1.Spectrométrie de masse (SM)

La SM est une méthode ultrasensible permettant de fournir des renseignements structuraux très précis à partir de faibles quantités de produits.

La technique consiste à obtenir, par bombardement électronique en phase gazeuse d'une molécule inconnue. Pour avoir une bonne fragmentation il faut que le produit à analyser soit volatil ou ionisable.

Les différents fragments provenant de l'ionisation sont signalés sur un graphe sous forme de pics d'intensité variable et classés suivant leur poids moléculaire par unité de charge (m/z).

Dans notre analyse tous les spectres de masse ont été réalisés en mode positif et négatif à l'aide d'un spectromètre API 3000 (Perkin-Elmer Sciex) équipé d'une source d'ionisation electrospray (ESI) et d'un analyseur quadripôle à temps de vol.

Toutes les analyses de spectrométrie de masse de haute résolution(HRMS) ont été effectuées en collaboration avec le Laboratoire d'Application de Spectrométrie de Masse de l'Université de Lille Nord de France.

4.2.Résonance magnétique nucléaire (RMN)

La Résonance Magnétique Nucléaire ou RMN est une technique d'analyse spectroscopique non destructive permettant d'accéder à la structure des molécules. Elle

exploite les propriétés magnétiques des atomes en les soumettant à de forts champs magnétiques (Abedini, 2013). L'absorption d'énergie obtenue est enregistrée, intégrée et transformée en un signal de résonance puis en spectre de RMN.

Les particules atomiques doivent avoir un spin nucléaire non nul pour pouvoir être observées en RMN. Lorsqu'elles sont placées dans un champ magnétique, elles peuvent prendre plusieurs orientations. En phytochimie, les deux atomes les plus étudiés sont l'hydrogène (^1H) et le carbone 13 (^{13}C). Nous allons rappeler ici les caractéristiques essentielles des techniques utilisées.

4.2.1. RMN monodimensionnelle

➤ RMN ^1H

La réalisation d'un spectre de RMN du ^1H est une étape fondamentale dans la détermination structurale d'une molécule. Cette méthode permet de connaître le nombre et la nature des protons présents dans la molécule. De plus, elle ne nécessite que quelques minutes, depuis l'avènement de la RMN à transformée de Fourier. En RMN du ^1H , trois informations sont importantes :

- Le déplacement chimique (δ) : la position des signaux dans le spectre, exprimée en Hertz (Hz) ou en parties par million (ppm) nous renseigne sur le type de proton correspondant à ce signal.
- L'intégration : l'aire sous la courbe d'un pic est proportionnelle au nombre de protons qui résonnent à cet endroit.
- La multiplicité du signal : indique le nombre de protons avoisinants le proton considéré.

➤ RMN du ^{13}C

L'isotope ^{13}C ne représente qu'1% des atomes de carbone existant. La faible sensibilité de cette expérience contraint le manipulateur à multiplier le nombre d'expériences (*scans*) sur plusieurs heures afin d'obtenir un spectre de bonne qualité. Ceci est particulièrement handicapant pour les substances naturelles qui sont souvent isolées en faible quantité par rapport aux produits de la chimie de synthèse. En revanche, la résolution obtenue est nettement supérieure à celle des spectres de RMN du ^1H . Pour un même appareil : les déplacements chimiques s'échelonnent généralement sur plus de 200 ppm, contre 10 ou 15 ppm pour le proton (Abedini, 2013).

4.2.2. RMN bidimensionnelle

Certaines techniques permettent la visualisation, sous forme de carte, des corrélations existantes entre différents signaux. Des tâches correspondant en fait à une vue « de dessus », apparaissent sous forme de courbes de niveau ou de pics de corrélation,

matérialisant ainsi l'existence d'un lien entre deux atomes (liaison chimique, proximité dans l'espace...). Parmi ces techniques on distingue :

- **COSY (COrrelation Spectroscopy)** : visualisation du voisinage immédiat des atomes d'hydrogène, par interactions scalaires (à travers les liaisons chimiques).
- **HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)** : indique quel proton est directement lié à quel carbone.
- **HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)** : montre la corrélation entre un atome de carbone et un proton situé à plusieurs liaisons de distance (typiquement trois). Cette technique complète très bien le COSY pour l'établissement de l'enchaînement des atomes d'une molécule.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire mono et bidimensionnelle ont été enregistrés à 500 MHz à l'aide d'un appareil BRUKER AVANCE 500 équipé d'une cryoplateforme. Les microprogrammes BRUKER et le logiciel de traitement des données Topspin 3.5 ont été appliqués pour une meilleure exploitation des résultats.

Les échantillons ont été solubilisés dans le méthanol deutéré dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en parties par million (ppm) par rapport au tétraméthylsilane (TMS) et les constantes de couplage sont exprimées en Hertz (Hz). L'interprétation structurale des produits étudiés, a été effectuée à partir des spectres monodimensionnels et bidimensionnels.

5. Simulation moléculaire

5.1. Filtrage ADMET

Plusieurs molécules bioactives n'atteignent pas les phases cliniques à cause de leurs propriétés pharmacologiques défavorables. Pour devenir un médicament, une molécule doit se conformer à diverses propriétés fondamentales de base dont la solubilité, la stabilité, l'accessibilité à la synthèse mais surtout aux propriétés pharmacologiques d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicité (ADMET). A ce titre, la littérature propose de nombreux programmes de simulation de ces différentes propriétés, disponibles gratuitement via le web, dont nous nous sommes servis pour réaliser cette partie du travail.

Le serveur Swissadme (<http://www.swissadme.ch/>) a été utilisé pour le calcul des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques et le serveur PreADMET (<https://preadmet.bmdrc.kr/adme/>) pour les tests de toxicité.

5.1.1. Propriétés physicochimiques

La règle de Lipinski permet de prédire la biodisponibilité d'un composé par voie orale en déterminant ses caractéristiques physico-chimiques à partir de sa structure bidimensionnelle.

D'après cette règle, tout composé ne validant pas au moins trois des critères suivants est susceptible de poser des problèmes d'administration par voie orale.

- Un poids moléculaire (PM) maximum de 500g/mol
- Un maximum de 5 liaisons H-donneurs (OH ou NH)
- Un maximum de 10 liaisons H-accepteurs (O ou N)
- nombre de liaisons retables ≤ 15
- Un coefficient de partition octanol / eau "logP" ou une lipophilie ≤ 5 .

5.1.2. Propriétés pharmacocinétiques

Pour atteindre sa cible dans l'organisme, une molécule médicamenteuse doit franchir plusieurs barrières biologiques à différents niveaux. On peut citer à titre d'exemple les barrières gastriques, intestinale, hématoencéphalique etc...

Le serveur SuissADME nous aide justement à prédire la capacité d'un composé à surmonter de tels obstacles par différents descripteurs.

➤ Barrière gastro-intestinale (GI)

Ce descripteur nous renseigne sur l'aptitude d'un composé à traverser la barrière gastro-intestinale pour arriver à la circulation sanguine et atteindre les organes et tissus cibles, en faisant face à l'acidité du milieu gastrique et la sécrétion continue de mucus qui protège le tractus gastro-intestinal.

➤ Inhibition du cytochrome P450

La prédiction de l'effet inhibiteur d'une molécule à l'égard des cytochromes P450 est une étape essentielle pour son devenir un futur médicament. Les enzymes du cytochrome P450 jouent un rôle primordial dans la détoxification et l'élimination des produits du métabolisme d'une substance médicamenteuse. Leur inhibition provoquerait l'accumulation de substances toxiques dangereuse pour l'organisme.

5.1.3. Toxicité potentielle

Les effets indésirables majeurs de la toxicité des composés sont des causes fréquentes d'échecs dans le développement d'un candidat en médicament. Ce dernier doit présenter un profil de sécurité acceptable dans les différentes études toxicologiques requises. A ce titre, des modèles de prédiction préconisés par le serveur PreADMET permettent de déterminer le profil de sécurité d'un composé en simulant son degré de toxicité à travers différents tests dont deux ont été retenus dans cette étude.

➤ **Cancérogénicité**

Le potentiel cancérigène d'un composé est évalué par des études de cancérogenèses réalisées presque exclusivement sur des rats et des souris, presque tous les agents cancérogènes connus chez l'homme le sont également chez ces rongeurs.

➤ **Inhibition de hERG**

Le gène hERG (Human Ether-à-go-go-Related Gene) code pour un canal potassique voltage-dépendant jouant un rôle clé dans la sortie du potassium et la formation du potentiel d'action cardiaque. Le blocage de ce canal peut provoquer un arrêt cardiaque. La simulation du pouvoir inhibiteur d'un composé sur le canal hERG sert à dévoiler ses effets proarythmiques sur le cœur.

5.2. Arrimage « docking » moléculaire

Avec le développement de l'outil informatique, l'arrimage moléculaire plus connu sous le terme anglosaxon « docking moléculaire » est devenu un outil incontournable dans la recherche en biologie. A ce titre, cette méthode est couramment utilisée en pharmacochimie pour la découverte et la mise au point de nouveaux médicaments.

Le docking moléculaire est une méthode qui permet de prédire l'affinité et le mode d'interaction entre deux molécules dont l'une est une macromolécule ou récepteur (cible) le plus souvent de nature protéique et l'autre est une petite molécule jouant le rôle de ligand qui établit des liaisons non covalentes ou faibles de type hydrogène, ionique, van der Waals et hydrophobes.

Dans notre cas, cette méthode nous aidera à mieux comprendre les mécanismes d'interactions mis en jeu par les produits isolés et identifiés à partir de la plante *S. argel* pour inhiber les deux enzymes clés impliquées dans la maladie d'Alzheimer, à savoir l'AChE et la BChE.

Le docking moléculaire se déroule en deux étapes complémentaires. La première consiste à sélectionner les poses les plus favorables du ligand qui de par sa flexibilité va adopter dans le site actif de la protéine différentes conformations, positions et orientations. La deuxième consiste à classer les meilleures poses grâce à une évaluation par un score qui s'exprime, selon les programmes, soit par une affinité soit par une énergie d'interaction.

Le docking moléculaire a été réalisé en mettant en œuvre trois éléments essentiels : l'enzyme (cible), le ligand et le programme ou le logiciel de docking.

5.2.1. Préparation des enzymes

Les structures tridimensionnelles (3D) de l'AChE et la BChE humaine, objet de notre étude, proviennent de la Protein Data Bank (PDB) d'accès gratuit (<https://www.rcsb.org/>). Les deux enzymes existant sous forme de complexes avec un inhibiteur sont téléchargés au format pdb

sous les codes respectifs 4MOE et 2XQI. La faible valeur de résolution de ces structures (2Å et 2,1 Å) témoigne de leur bonne qualité car on peut distinguer tous les atomes y compris les hydrogènes.

Contrairement à la BChE qui existe sous forme monomérique dans la PDB, l'AChE se trouve sous forme homodimérique avec deux chaînes A et B identiques. Pour un bon déroulement du protocole de docking, nous avons procédé à une préparation préalable de ces deux enzymes en éliminant les molécules d'eau, l'inhibiteur et tous les autres éléments ayant servis à leur détermination cristallographique ainsi que la chaîne B de l'AChE. L'opération a été réalisée en faisant appel au programme de préparation des protéines « Protein PrepWizard » de Schrödinger (Schrödinger Suite, 2009) et au programme VMD (Humphrey et al., 1996). Le premier sert à contrôler l'état de protonation des résidus d'acides aminés du site de liaison en ajoutant des atomes d'hydrogènes si nécessaire mais aussi d'ajouter les orientations des résidus de la triade catalytique (Chaput et al., 2016). Quant au deuxième programme, il sert à définir l'environnement du site de liaison des enzymes en sélectionnant tous les résidus d'acides aminés, se trouvant au voisinage du ligand de la structure cristalline de départ, proches d'une distance de 6 Å (Humphrey et al., 1996).

Les enzymes ainsi préparées sont ensuite optimisées par minimisation de leur énergie interne et leurs fichiers enregistrés au format mol2 requis pour le docking.

5.2.2. Préparations des inhibiteurs

Les composés de la plante *S. argel* identifiés et sélectionnés pour un docking moléculaire ont, dans un premier temps, été dessinés et optimisés par le programme de construction moléculaire 3D « ChemDraw ». Les fichiers obtenus sont enregistrés sous le format mol2 pour être traités dans un deuxième temps, par le programme « LigPrep 2.8.0 » de Schrödinger, qui sert à générer les énantiomères, des états de protonation à pH 7,4 et les tautomères de chaque composé (Chaput et al., 2016).

5.2.3. Protocole de docking moléculaire par Glide

L'étude de modélisation par docking moléculaire des interactions entre les produits naturels de *S. argel* et les deux enzymes AChE et BChE a été réalisée par le programme Glide version 6,3 (Cheung et al., 2013). Ce dernier tient compte de la flexibilité du ligand mais considère la protéine comme rigide. Le programme Glide fonctionne en créant une grille par défaut dont la taille correspond à la forme de la cavité catalytique de l'enzyme. Les calculs de docking sont réalisés avec des paramètres par défaut du sous programme « Standard Precision ». Les résultats des poses sont classés en fonction de leur énergie d'interaction appelé GlideScore (Kcal/mole). Enfin l'analyse visuelle entre le ligand et l'enzyme est réalisée grâce à

l'interface graphique des programmes de visualisations VMD et Maestro (Schrödinger Release, 2015 ; Humphrey et al., 1996).

Chapitre II : Résultats et discussion

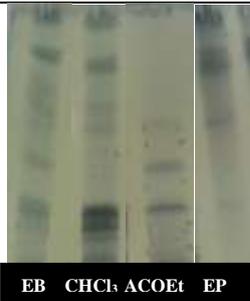
1. Analyse phytochimique

1.1. Investigation phytochimique

Les parties aériennes de *S. argel* ont été séparées, séchées à l'air libre puis réduites en poudre pour subir des extractions par macération à température ambiante dans des solvants à polarité croissante afin de séparer les composés en fonction de leur polarité. Après macération, nous avons utilisé par fractionnement liquide-liquide les solvants : éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol respectivement.

Le screening phytochimique sur plaque CCM est une méthode rapide d'évaluation qualitative des métabolites secondaires présents dans chaque extrait de la plante *S. argel*. Les résultats des principaux réactifs sont représentés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Screening des extraits de *S. argel* sur plaque CCM

Réactifs	Plaques CCM	Interprétation
Folin-Ciocalteu	 EB CHCl ₃ AcOEt EP	Apparition de spots bleus indiquant la présence de polyphénols dans les quatre extraits
FeCl₃	 EB CHCl ₃ AcOEt EP	Absence de spots bleu, vert ou noir dans les extraits, indiquant l'absence de tanins
Dragendorff	 EB CHCl ₃ AcOEt EP	Absence de taches orange, vertes ou noires dans les extraits, indiquant l'absence d'alcaloïdes

EB : extrait brut ; CHCl₃ : extrait chloroformique ; AcEtO : extrait acétate d'éthyle ; EP : Extrait éther de pétrole.

Ce tableau montre que conformément aux travaux de Shafek et al., (2012), la plante *S.argel* est riche en polyphénols de type flavonoïdes et pauvre en tanins et alcaloïdes.

1.2. Teneur en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols des différents extraits de *S. argela* été évaluée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Les résultats du dosage des polyphénols totaux obtenus à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (figure 21) sont exprimés en g d'équivalent en acide gallique (EAG) par rapport à 100 g d'extrait.

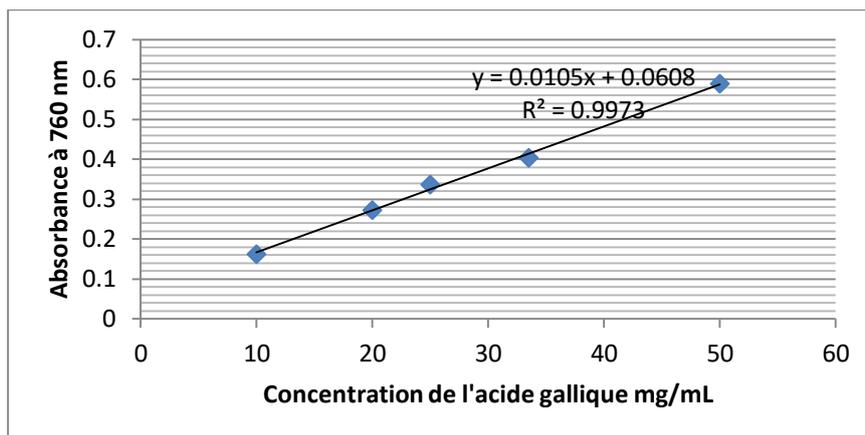


Figure 21 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Nous avons considéré un extrait comme étant riche en polyphénols, lorsque la teneur en ces composés est supérieure à 5 g EAG/100 g d'extrait (Liu et al., 2009) (figure 22).

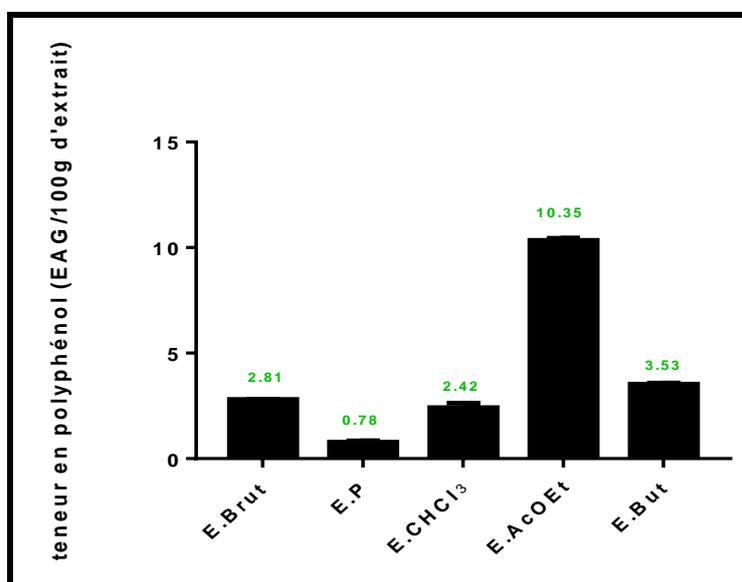


Figure 22: Composition en polyphénols des extraits de *Solenostemma argel*

Il ressort de cette figure que l'extraction des polyphénols dépend de la polarité des solvants utilisés (Medini et al., 2014). L'utilisation de l'éther de pétrole (EP) comme premier solvant n'a permis que l'extraction d'une quantité négligeable de polyphénols (0,78 g EAG/100 g d'extrait) en raison de sa très faible polarité. L'extraction d'une quantité légèrement plus

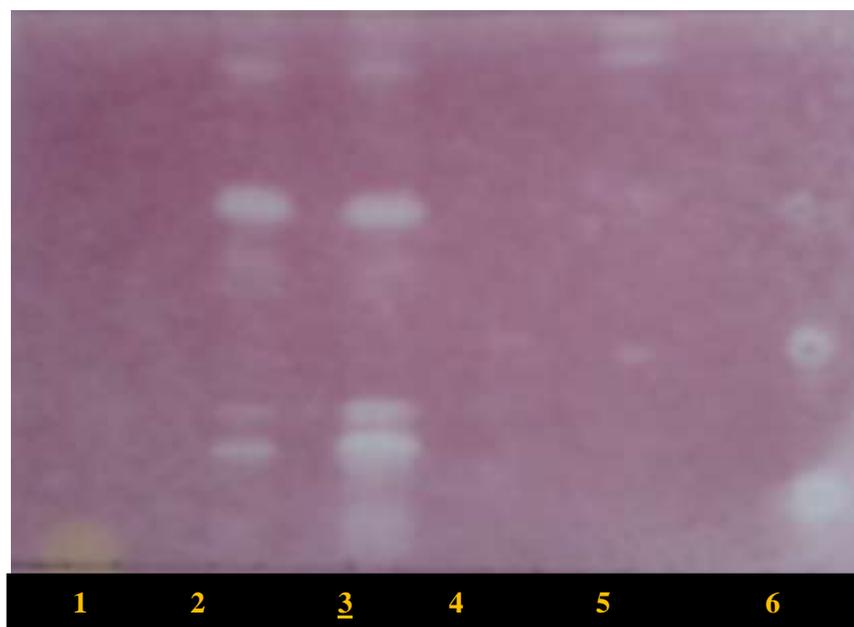
élevée (2,42 g EAG/100 g d'extrait) est observée avec le chloroforme (CHCl₃) dont la polarité est relativement plus élevée que le premier solvant. En revanche, l'acétate d'éthyle (AcOEt) bien que moyennement polaire ; dispose d'une polarité nettement supérieure aux deux premiers, ce qui a permis l'extraction d'une quantité maximale de polyphénols (10,35 g EAG/100 g d'extrait). La faible quantité de polyphénols qu'on retrouve à la fin dans le butanol (But) (3,53g EAG/100 g d'extrait) dont la polarité est la plus élevée, correspond probablement à la partie résiduelle de polyphénols non extraite par le solvant précédent.

Il ressort de ces résultats que les polyphénols, de par l'existence d'hydroxyles phénoliques sur leurs structures sont des composés très polaires dont l'extraction va crescendo avec la polarité des différents solvants utilisés dans ce travail.

2. Effets des extraits de *S. argel* sur l'activité de la cholinestérase

2.1. Analyse colorimétrique au Fast Blue B Salt

Afin de tester l'activité anticholinestérasique des différents extraits de *S. argel*, nous avons utilisé la méthode bioautographique au Fast Blue B Salt sur plaque CCM. L'apparition sur la plaque de spots blancs sur un fond violet est révélatrice du potentiel anticholinestérasique des extraits (figure 23).



1 : extrait butanolique, 2 : extrait brut, 3 : extrait chloroformique, 4 : extrait acétate d'éthyle, 5 : extrait éther de pétrole, 6 : galanthamine déposé sur la plaque sans migration (du haut vers le bas : 0,01, 0,1, 1µg)

Figure 23: Bioautographie des extraits de *S. argel*

La figure montre que parmi les 5 extraits testés, les extraits butanolique (1) et acétate d'éthyle (4), du fait de l'absence de spots blancs, ne présentent aucune activité anticholinestérasique. En revanche, les extraits brut (2), chloroformique (3) et éther de pétrole (5) révèlent des spots

blancs à différents Rf sur le chromatogramme témoignant ainsi de la présence de substances anticholinestérasiques dans ces extraits. En effet, on observe quatre spots qui apparaissent aux mêmes Rf pour les extraits **2** et **3** et trois autres spots pour l'extrait **5**.

2.2. Analyse colorimétrique d'Ellman

Afin de confirmer le potentiel anticholinestérasique des extraits brut (**2**), chloroformique (**3**) et éther de pétrole (**5**) de l'espèce *S. argel*, nous avons réalisé des tests *in vitro* sur microplaques pour calculer la concentration d'inhibition de 50 % des molécules (CI₅₀) de ces derniers sur deux enzymes différentes : l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase. Les résultats obtenus sur microplaque sont représentés dans le tableau 11.

Tableau 11 : CI₅₀ de l'activité anticholinestérasique de *S. argel*

Extraits	CI ₅₀ ^a	
	AChE	BChE
Extrait brut	0,134± 0,025 ^b	0,309± 0,98 ^b
Extrait chloroformique	0,019± 0,13 ^b	0,063± 1,37 ^b
Éther de pétrole	0.176±0.03 ^b	0.223±0.06 ^b
Gаланthamine	1,479± 0,08 ^c	10,964± 0,14 ^c

^aValeurs de CI₅₀ (moyenne± S.D.) ont été obtenues d'un triplacate, ^bCI₅₀ en mg/mL, ^cCI₅₀ en M

Le tableau ci dessus montre que le potentiel inhibiteur de l'extrait chloroformique est nettement plus élevé que celui des extraits brut et éther de pétrole et ce à l'égard des deux enzymes étudiées (tableau 11). De plus, les résultats de l'extrait chloroformique se situent dans le même intervalle que ceux rapportés par la littérature scientifique concernant l'inhibition de ces deux enzymes par d'autres extraits de plante et s'avèrent plus élevés que les résultats rapportés sur l'activité anti-AChE de l'espèce *Vinca minor* L appartenant à la même famille botanique que *S. argel* (Fadaeinasab et al., 2013).

Les résultats obtenus par bioautographie et sur microplaques montrent que la plante *S. argel* renferme des inhibiteurs potentiels de l'AChE et de la BChE tel en témoigne l'extrait chloroformique, que nous avons retenu pour un fractionnement bioguidé.

2. Fractionnement bioguidé de l'extrait chloroformique

2.1. Profils chromatographiques et fractionnement de l'extrait

Avant son fractionnement, l'extrait chloroformique a été soumis à une analyse préalable par CLHP analytique et CCM pour déterminer son profil chromatographique et la conduite à tenir pour une meilleure séparation des composés (figure 24).

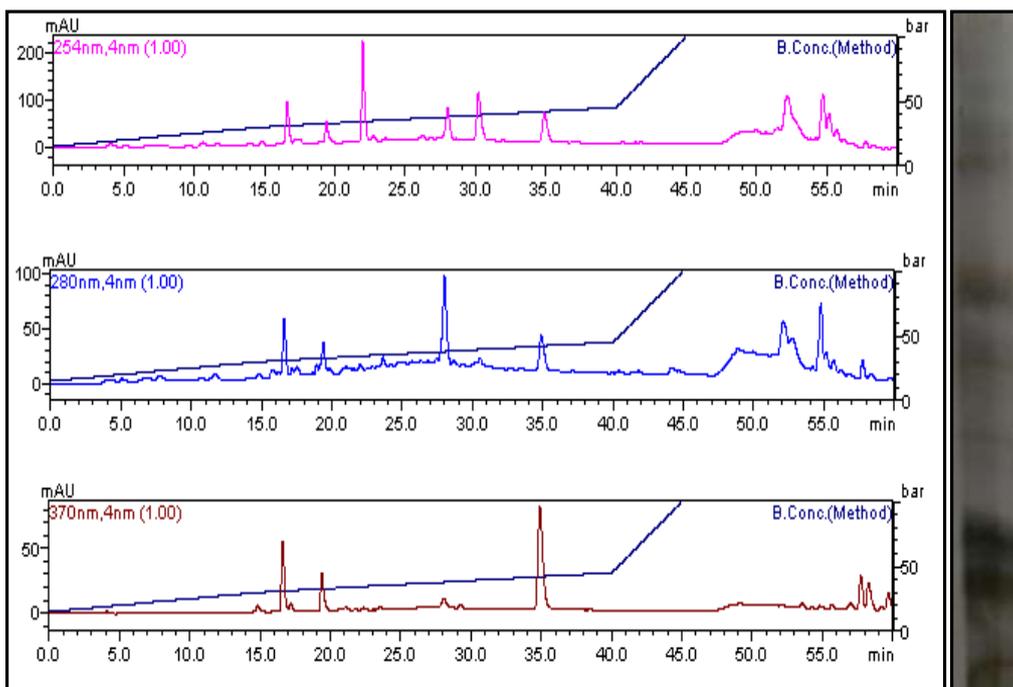


Figure 24 : Profil chromatographique de l'extrait chloroformique en CLHP analytique et en CCM révélée à l'anisaldéhyde sulfurique

Il ressort de ces chromatogrammes la complexité et la diversité structurale des produits de l'extrait chloroformique qui nous ont conduit à réaliser leur fractionnement selon leur polarité, par chromatographie sur colonne ouverte. Des essais préliminaires, nous ont permis de déterminer les systèmes d'élution à utiliser pour cette colonne en gradient de polarité. Il s'agit des mélanges toluène/acétate d'éthyle et acétate d'éthyle/méthanol. Cette technique a permis de recueillir 23 fractions de la colonne.

3.2.1. Analyse bioautographique des fractions de colonne

Les 23 fractions de colonne de l'extrait chloroformique ont été traités par bioautographie afin d'analyser leur activité anti-AChE (figure 25).

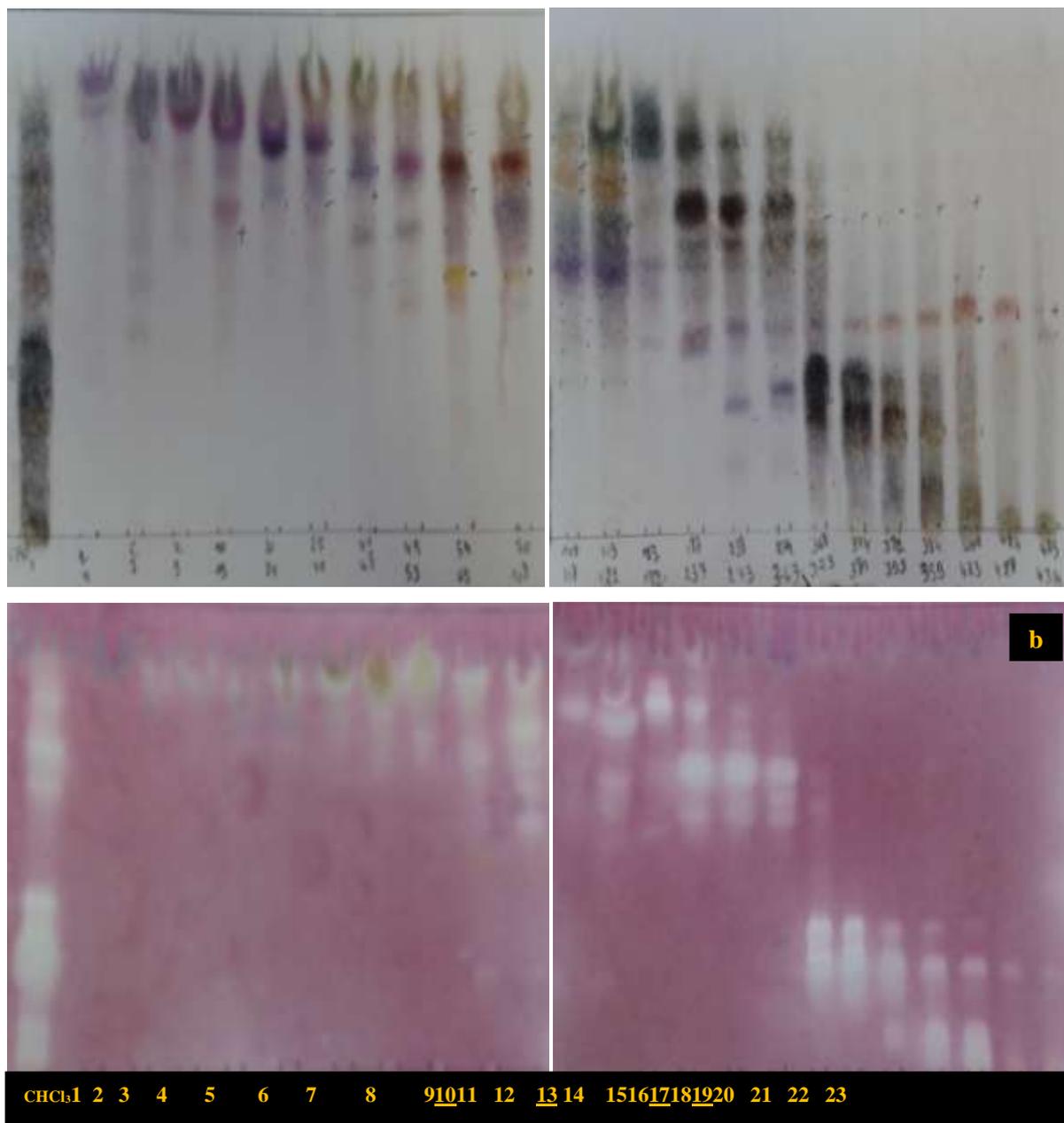


Figure 25 : Résultats du fractionnement sur colonne de l'extrait CHCl_3 . (a) : suivi sur CCM des 23 fractions ; (b) : suivi de l'activité anti-AChE des 23 fractions par bioautographie

La figure montre que les 23 fractions de l'extrait chloroformique présentent chacune un ou plusieurs spots blancs caractéristiques d'une activité anticholinestérasique. Cependant, il faut souligner que les 9 premières fractions de cet extrait du fait de leur haute migration avec le front du solvant sont donc apolaires et par conséquent les spots blancs qui leur sont associés peuvent être considérés comme de faux positifs. Ainsi les fractions 10, 13, 17 et 19 ont été sélectionnées pour des purifications ultérieures car en plus du nombre de spots blancs qu'elles présentent, le facteur masse a également été un critère de choix très important.

3.3. Mode de purification des fractions sélectionnées

3.3.1. Cas des fractions 10, 13 et 19

Une analyse préliminaire par CCM et CLHP analytique a d'abord permis de décrire les profils chromatographiques de trois fractions 10,13 et 19 (figure 26).

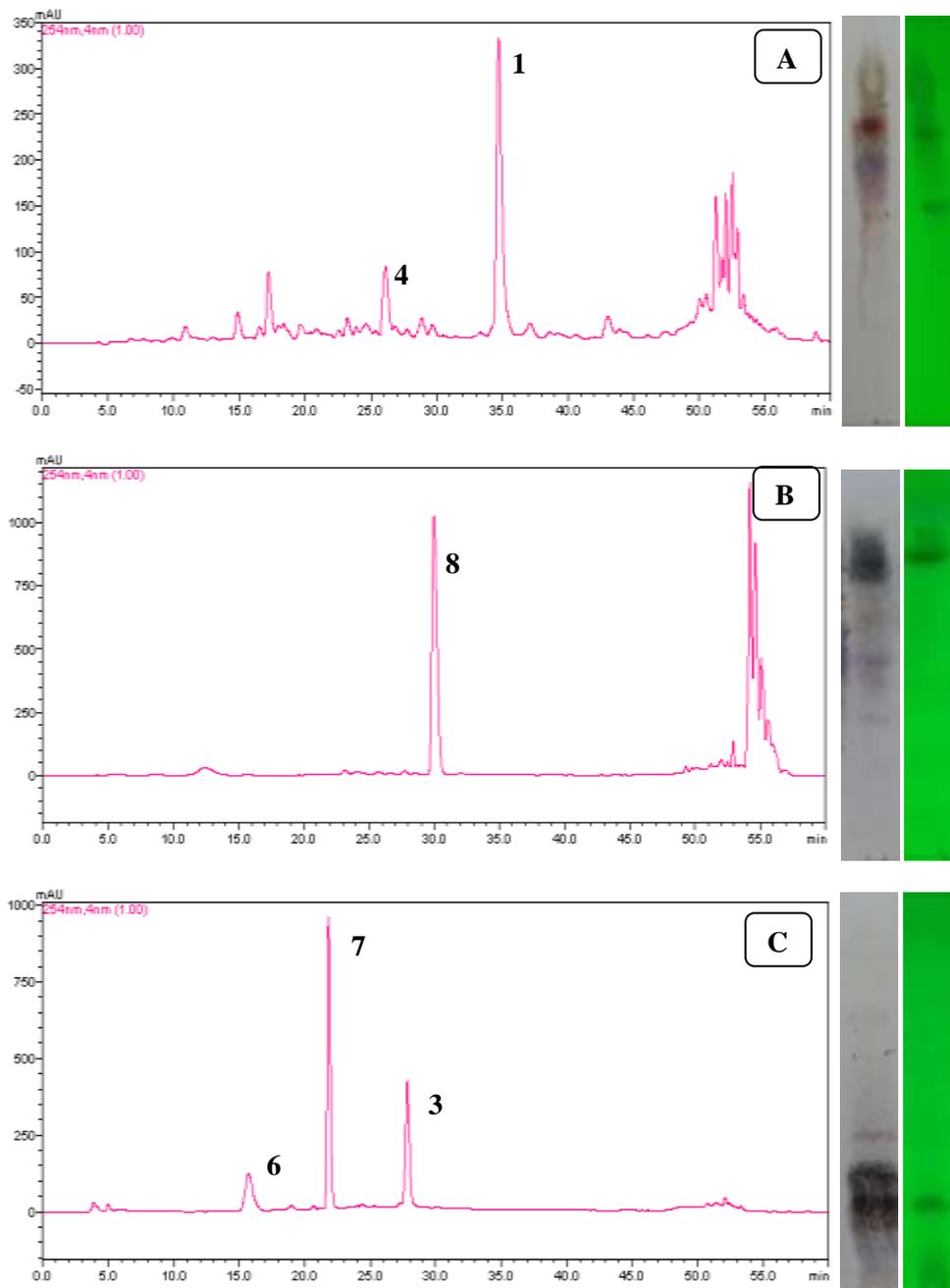


Figure 26 :Profil CLHP (254 nm) et CCM (révélée à 254 nm et à l'AS) des produits purs isolés à partir des fractions 10 (A),13 (B) et 19 (C)

Les produits majoritaires de ces fractions ont été isolés par CLHP préparative élué par un système de solvants binaire (A/B) de type H₂O+ acide formique 0,1% (A) et acétonitrile (B) (tableau 12).

Tableau 12 : Mode d'élution utilisé pour le fractionnement des produits à analyser

Temps (min)	H ₂ O+acide formique à 0,1% (A)	Acétonitrile (B)
0-10	85-70	15-30
10-20	70-55	30-45
20-25	55-40	45-60
25-30	40-0	60-100
30-40	0	100

Les caractéristiques chromatographiques et le poids des fractions de colonne et des produits isolés sont représentés dans le tableau 13.

Tableau 13 : données quantitatives et chromatographiques des produits isolés

Fractions	Poids (mg)	Produits isolés	Poids isolés/mg	Temps de rétention (min)
10	390	4	1,8	26
		1	5,7	35
13	420	8	16	30
19	520	7	4,9	15,5
		6	7,1	22
		3	4,7	28

Tr : les données sont obtenues à partir de la CLHP analytique

3.3.2. Cas de la fraction 17

En raison de son activité anti-AChE et de sa quantité relativement plus importante (4,57g), une partie de la fraction 17 (3g) a subi une nouvelle séparation sur colonne ouverte de gel de silice éluee par deux systèmes de solvants binaires de polarité croissante dont le premier correspond au mélange heptane/acétate d'éthyle et le second correspond au mélange acétate d'éthyle/méthanol. Après contrôle par CCM dans le système de solvant habituel, les sous fractions identiques ont été rassemblés donnant lieu à dix huit sous fractions différentes. L'analyse de leurs profils chromatographiques et activité anti-AChE par CCM a permis de sélectionner, pour les mêmes raisons que précédemment de poids et d'activité biologique, les sous fractions 10 et 16 dont les profils chromatographiques sont obtenus par CLHP analytique et CCM (figure 27).

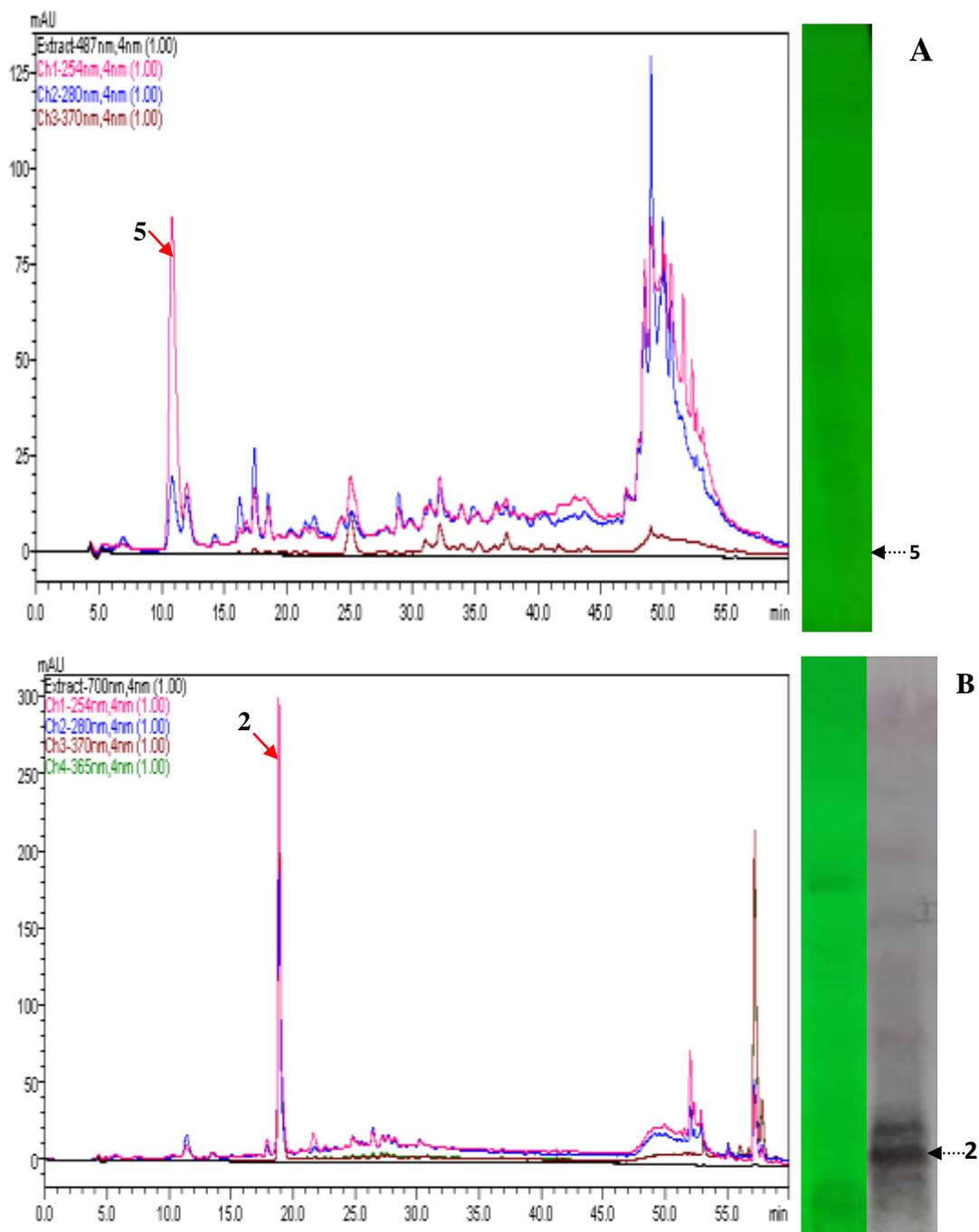


Figure 27: Profil CLHP et CCM (révélée à 254 nm et à l'AS) des produits purs isolés à partir des sous fractions 10 (A) et 16 (B)

La purification de ces sous fractions par CLHP préparative est effectuée par un système de solvant binaire (A/B) qui a conduit à quatre composés dont les principales caractéristiques sont représentées dans le tableau 14.

Tableau 14 : caractéristiques quantitatives et chromatographiques des produits purifiés à partir des sous-fractions 10 et 16

N° des sous fractions	Poids (mg)	Produits isolés	Poids (mg)	Temps de rétention (Tr en min)
10	100	5	3,4	10,5
16	32	2	2,7	19

Tr : les données sont obtenues à partir de la CLHP analytique

3. Identification structurale des produits isolés

Rappelons que le fractionnement bioguidé de l'extrait chloroformique de l'espèce *S. argel* nous a permis de purifier 11 produits dont la structure n'a, pour des raisons pratiques, pu être élucidée que pour seulement 8 d'entre eux.

L'identification structurale de ces 8 composés a été réalisée grâce aux techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton ^1H et du carbone ^{13}C à une dimension, et à séquences multi-impulsionnelles à deux dimensions homonucléaires ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H NOESY et hétéronucléaires ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, ainsi que par spectrométrie de masse haute résolution (HR-MS) et par comparaison avec les données de la littérature.

3.1. Composé 1 : kaempférol

Le composé 1 se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. En présence du réactif de Neu, ce composé est séparé par CCM et révèle une fluorescence verte sous UV à 365nm caractéristique d'un flavonoïde.

L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en mode ESI négatif de ce composé a généré un ion $[\text{M}-\text{H}]^-$ d'une masse m/z 285,0406 correspondant à une composition élémentaire de $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_6$ (figure 28).

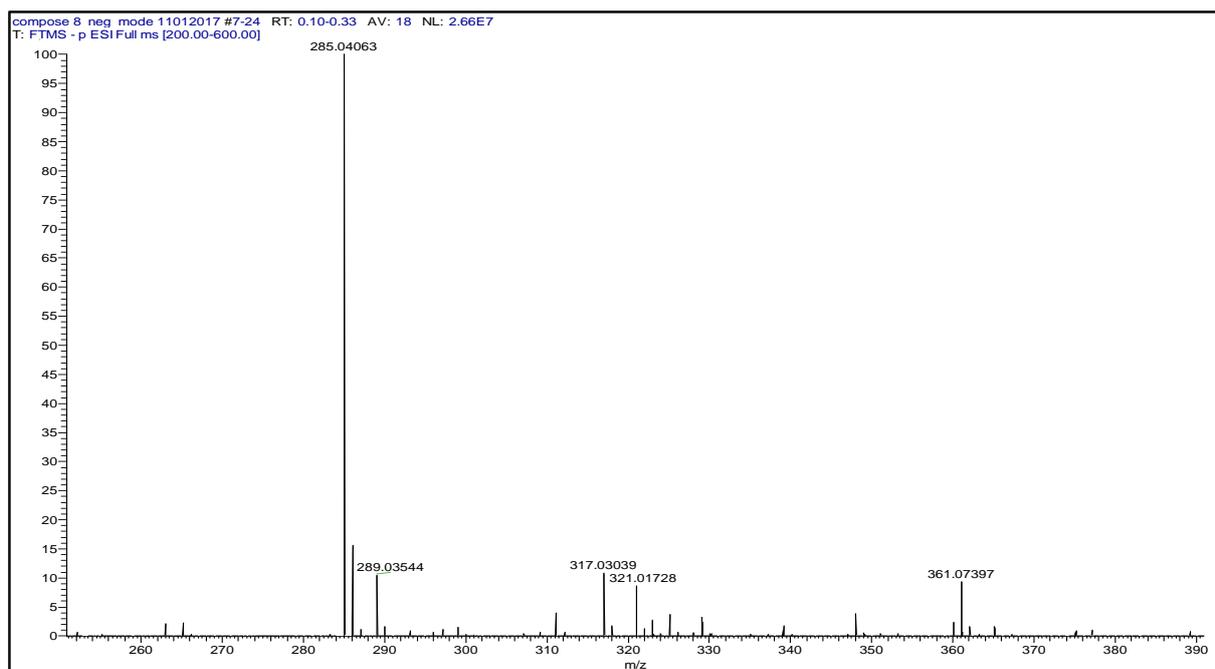


Figure 28 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **1**

Le résultat de la SM a été complété par l'analyse du spectre RMN¹H du composé **1** qui révèle dans la zone afférente aux protons aromatiques ; 4 signaux dont 2 doublets et 2 singulets, tous caractéristiques de la génine kaempférol (figure 29).

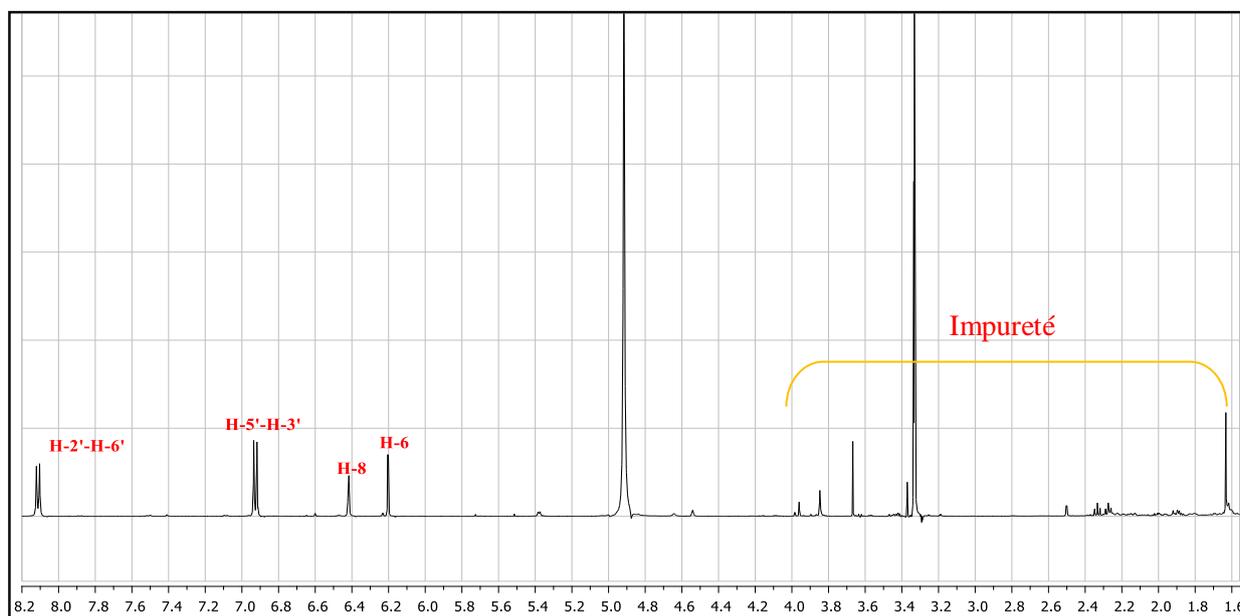


Figure 29 : Spectre du RMN ¹H du composé **1** (500MHz, CD₃OD)

En effet, les deux singulets du spectre RMN ¹H correspondant aux déplacements chimiques à 6,20 et 6,41 ppm témoignent d'un couplage métra des deux protons H-6 et H-8 sur le cycle A de la génine et d'une disubstitution par des hydroxyles en C-5 et C-7. Par ailleurs, l'apparition sur le même spectre de deux doublets respectivement à δH 8,11 (d, $J = 8,92$ Hz) et à δH 6,92 (d, $J = 8,77$ Hz) est caractéristique d'un couplage en ortho, des protons H2' et H6' et des

protons H-3' et H-5', sur le noyau B de la génine. Une telle répartition des protons sur le noyau B dite en système 2H AA', 2H XX' est significative d'une substitution par un hydroxyle en position C-4'. Les hypothèses formulées grâce à la CCM et la SM sont ici confirmées quant à une structure flavonol du composé **1** correspondant à la génine kaempférol.

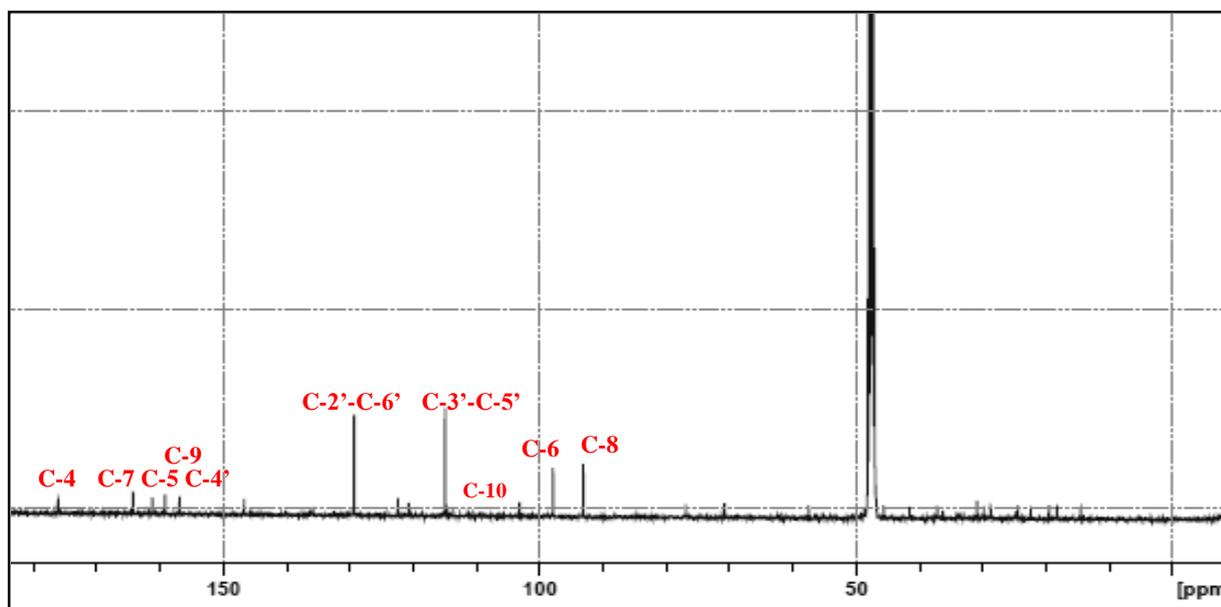


Figure 30: Spectre RMN ^{13}C du composé **1** (500MHz, CD_3OD)

Le spectre RMN ^{13}C révèle la présence de 12 pics (figure 30) dont les attributions ont été réalisées grâce au spectre HSQC qui montre clairement les tâches de corrélation des protons analysés par la RMN ^1H avec leurs carbones respectifs (figure 31).

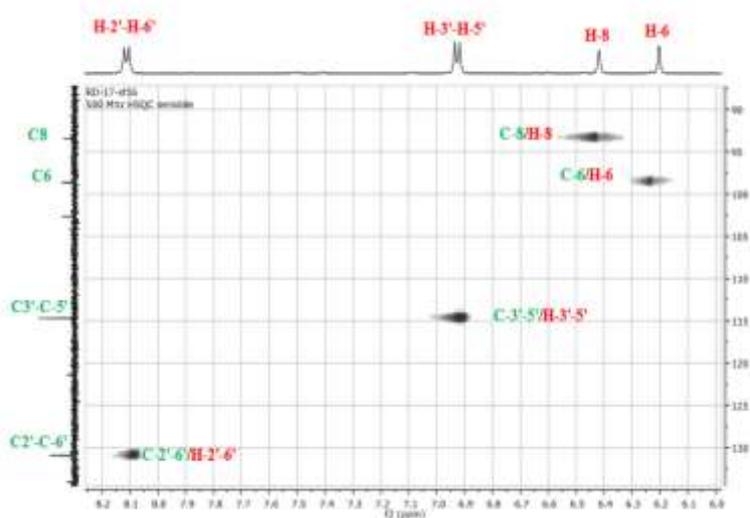


Figure 31 : Spectre HSQC du composé **1** (500MHz, CD_3OD)

Le tableau 15 récapitule les résultats des déplacements chimiques des spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C . Ces données sont en accord avec celles rapportées dans la littérature pour le kaempférol (figure 32).

Tableau 15: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (500 MHz) du Composé 1 dans CD_3OD

Positions	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, J en Hz)
2	157	-
3	130	-
4	175,9	-
5	164,4	-
6	98	6,2
7	161	-
8	93	6,41
9	164	-
10	105	-
2'	130	8,11, d (8,92)
3'	115	6,92, d (8,77)
4'	160	-
5'	115	6,92, d (8,77)
6'	130	8,11,d (8,92)

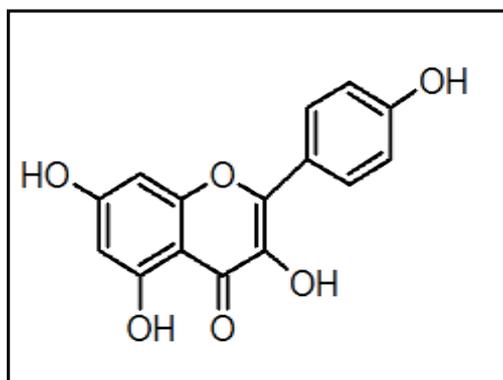


Figure 32: Structure du composé 1

4.2. Composé 2 : Astragaline

Ce composé se présente également sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol et apparaît sous forme d'une tache jaune après révélation à l'anisaldéhyde sulfurique et une tache noire sous UV à 254 nm, caractéristique d'un flavonoïde.

Le spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS (figure 33) montre un pic d'ion $[\text{M}-\text{H}]^-$ pseudo-moléculaire à m/z 447,09430 répondant à une formule brute $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}$ correspondant probablement à un flavonoïde monoglycosylé

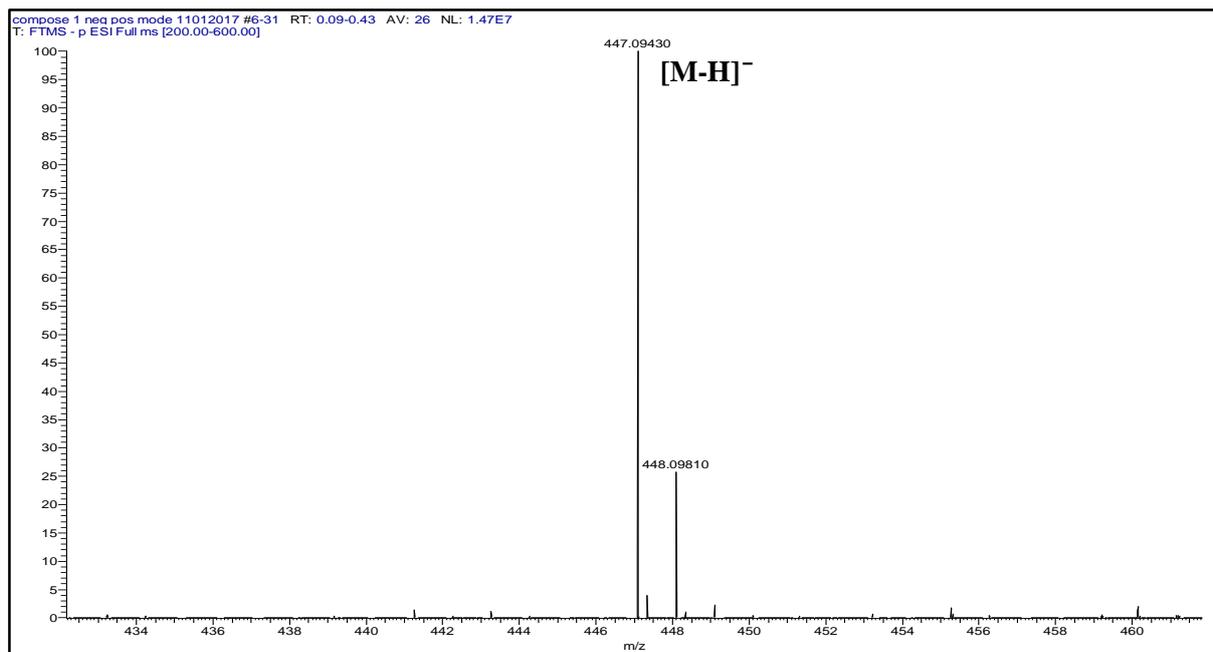
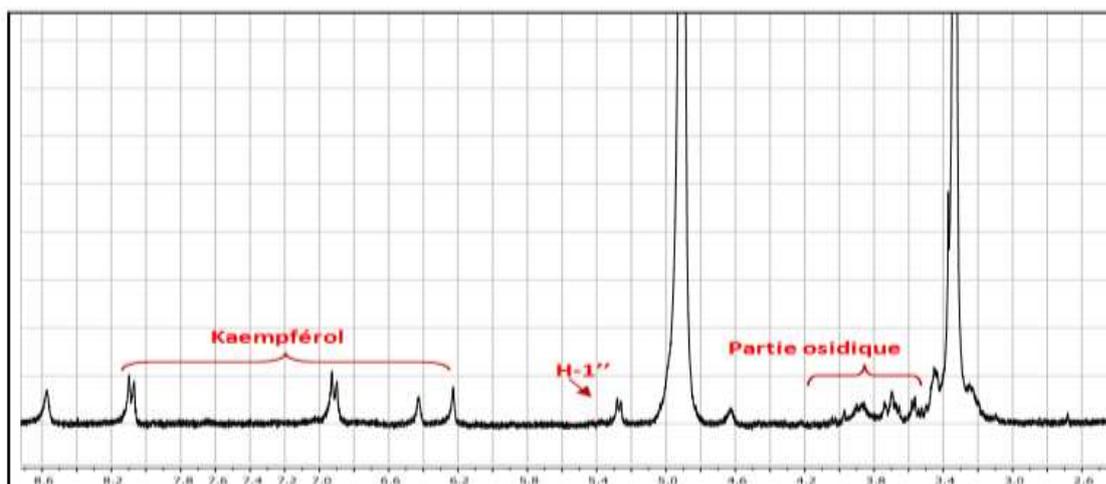


Figure 33 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **2**

Le spectre de RMN ^1H du composé **2** est très proche de celui du composé **1** (figure 34). On y retrouve tous les signaux caractéristiques du composé **1** notamment les deux singulets et les deux doublets correspondant respectivement aux couplages des protons H-6, H-8 en méta sur le cycle A, et des protons H-3', H-5' et H-2', H-6' en ortho sur le noyau B du Kaempférol. Le spectre de RMN ^1H montre également le signal d'un proton anomérique qui suggère la présence d'une unité osidique sur le kaempférol. Les déplacements chimiques des protons osidiques et du proton anomérique δH 5,27 ppm ainsi que sa constante de couplage (d , $J = 7$ Hz) laissent suggérer qu'il s'agit du glucose (tableau 16).



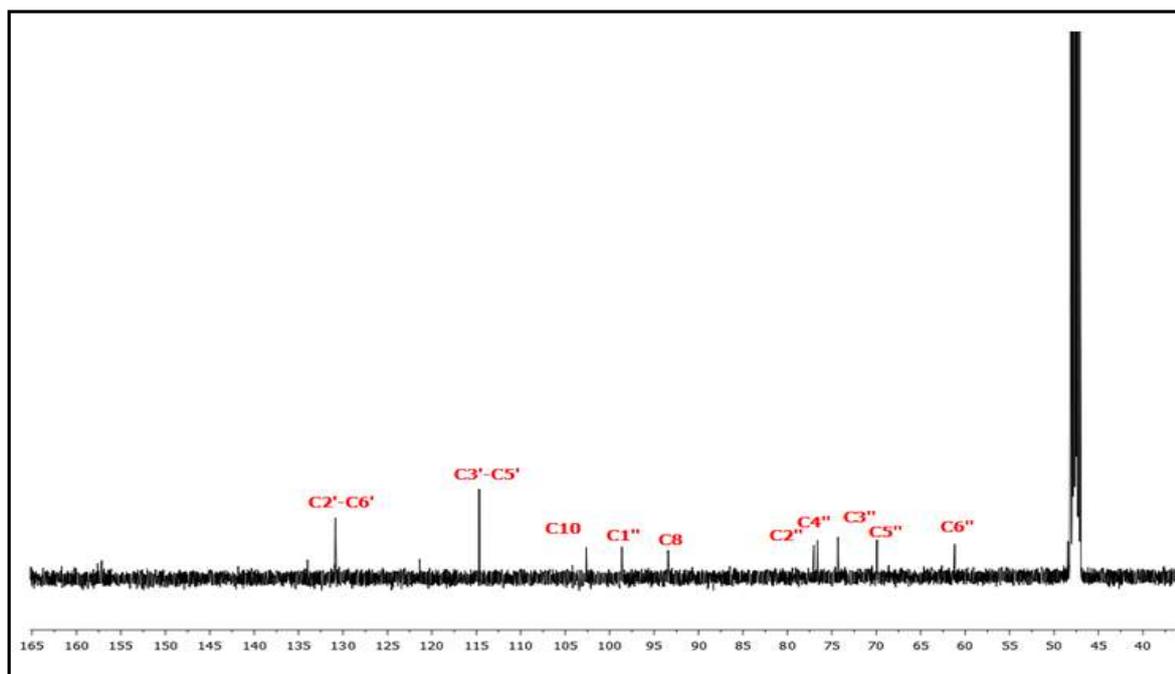


Figure 34 : Spectre RMN ^{13}C et ^1H du composé 2 (500MHz, CD_3OD)

Tableau 16 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (500 MHz) du composé 2 dans CD_3OD

Positions	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, J en Hz)
2	157,2	-
3	133,3	-
4	179,3	-
5	164,8	-
6	98,5	6,20 (d,2,05)
7	165	-
8	98,5	6,93 (d,2,05)
9	157,2	-
10	104,8	-
1'	121,8	-
2'-6'	130,3	8,07 (d,9)
3'-5'	114,3	6,91 (d, 9,03)
4'	159,9	-
1''	102	5,27 (d, 7)
2''	78,69	3,65
3''	74,0	3,43
4''	76,1	3,35
5''	70,38	3,29
6''	61,23	3,52-3,77

Le spectre HMBC (fig. 35) révèle des corrélations importantes entre des carbones avec les protons du composé :

-le C anomérique ($\text{C}1''$) avec les protons $\text{H}3'$ - $\text{H}5'$ de la génine,

- le C10 avec le H6 du cycle A,
- le C8 avec le H6 du même cycle A,
- le C2 du cycle C avec les protons H2'-6' du cycle B,
- le C4 du cycle C avec les protons H2'-6' du cycle B,

Le déblindage du carbone 3 (133,3 ppm) du composé **2**, par rapport au carbone 3 du composé **1** (130 ppm) ainsi que la corrélation entre le C anomérique (C1'') avec les protons H3'-H5' de la génine indique que le glucose est lié à l'hydroxyle en position 3. Cette supposition a été confirmée par comparaison des résultats avec la littérature (Abedini, 2013). Ces observations nous permettent d'établir la structure du composé **2** comme étant celle du kaempférol-3-O- β -D-glucopyranoside (astragaline) (fig. 36).

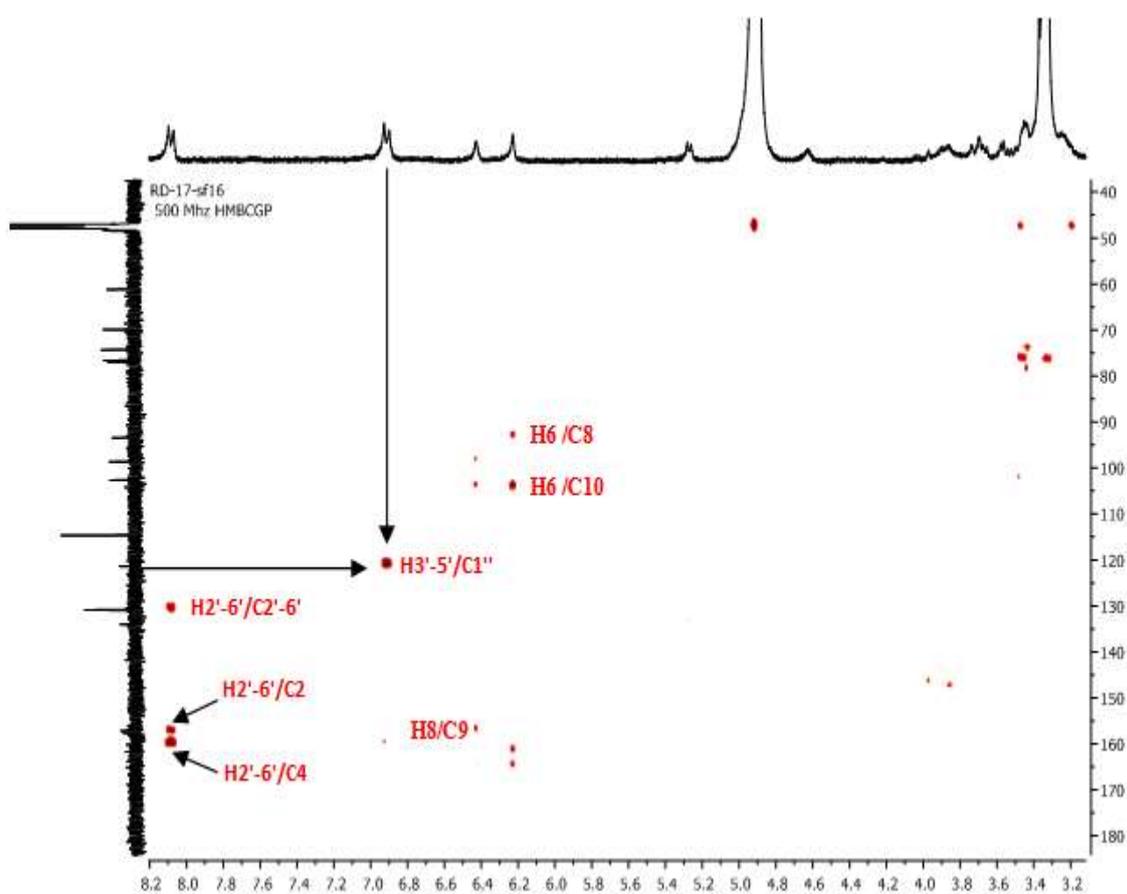


Figure 35 : Corrélation HMBC du composé **2** (500MHz, CD₃OD)

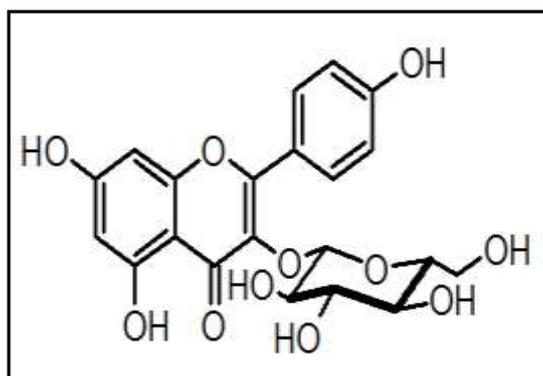


Figure 36 : Structure du composé 2

4.3.Composé 3 : kaempférol-3-O-β-D-glucopyranosyl(1→6)rhamnopyranose

Le composé 3 se présente sous forme d'une poudre jaunâtre. L'élution de ce composé par CCM dans le mélange de solvants $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (90:10:1) donne un R_f proche de 0 caractéristique d'une structure très polaire renfermant probablement un ou plusieurs sucres. Sous UV à 254 nm et à l'anisaldéhyde sulfurique, le composé 3 apparaît respectivement sous forme d'une tâche noire et jaunâtre typique d'un hétéroside ou flavonoïde de type glycoside. avec les valeurs des déplacements chimiques. L'analyse de ce composé par spectrométrie de masse haute résolution en mode négatif révèle un ion moléculaire $[\text{M}-\text{H}]^-$ à m/z 593,15127 correspondant à une formule brute $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$ d'un flavonoïde de type diglycoside (figure 37).

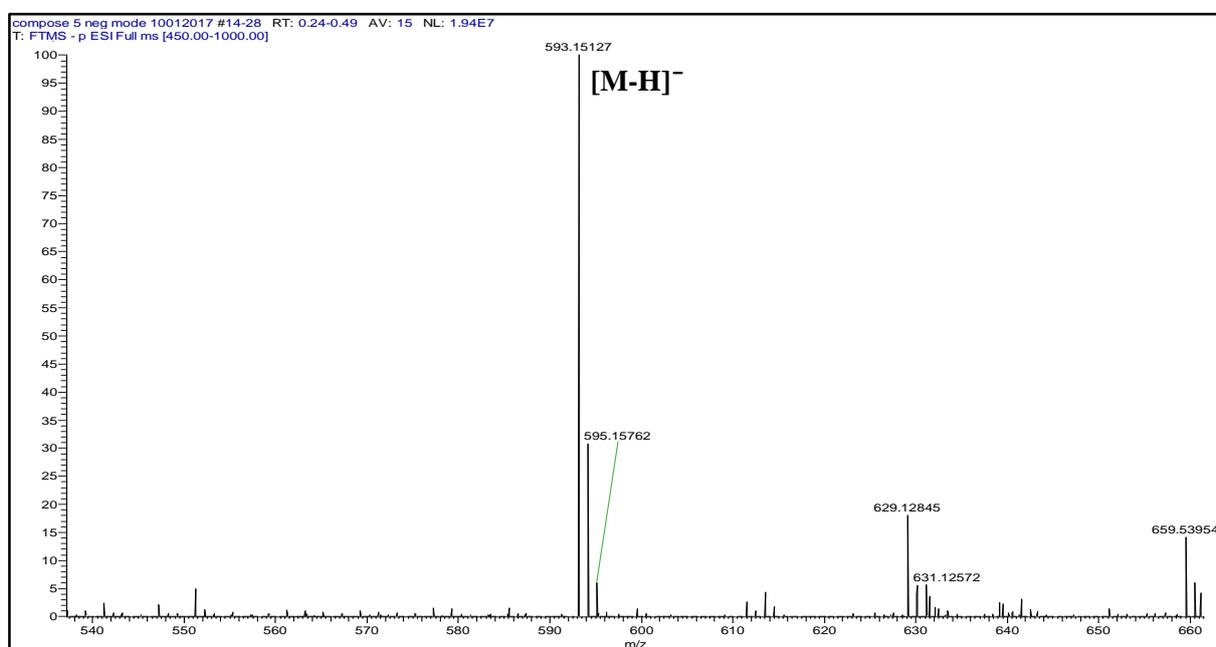


Figure 37 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé 3

L'analyse par RMN-¹H du composé **3**(figure 38)montre, dans la zone des protons aromatiques, un profil spectral similaire au composé **2** témoignant d'une structure Kaempférol. Les mêmes signaux caractéristiques du glucose, sont également observés dans la zone des protons osidiques. Par ailleurs, l'apparition sur ce même spectre d'un signal au voisinage immédiat du proton anomérique du glucose, témoigne d'un autre proton anomérique appartenant à un deuxième ose présent sur la génine Kaempférol.

Le premier ose est identifié comme étant le glucose, lié au kaempférol par l'atome d'oxygène en 3. Concernant le deuxième ose, le déplacement chimique et la faible constante de couplage, ainsi que l'observation très caractéristique d'un doublet à champs fort δ 0,99 ppm ($J= 6,20$ Hz) intégrant pour trois protons caractéristiques d'un groupement méthyle, laisse envisager l'hypothèse du rhamnose (figure 38).

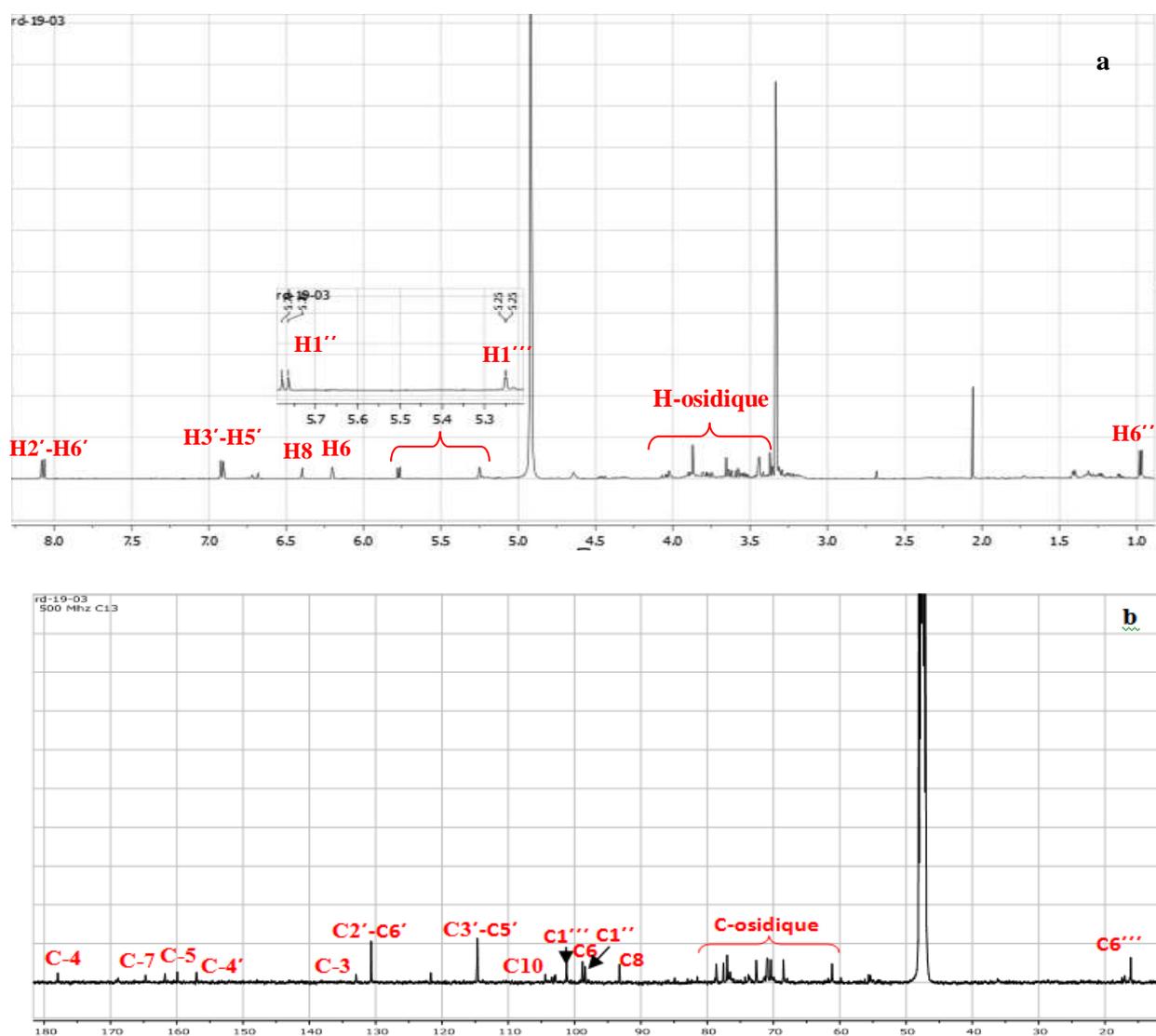


Figure 38 : Spectres des RMN ¹H (a) et ¹³C (b) du composé **3** (500MHz, CD₃OD)

Les attributions et les valeurs des déplacements chimiques des signaux des spectres du proton et du carbone de ce composé sont représentés dans le tableau 17

Tableau 17 : Les différentes attributions du ^{13}C et ^1H du composé **3**

Positions	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, J en Hz)
2	157,2	-
3	133,3	-
4	179,3	-
5	164,8	-
6	99,4	6,20 (d,2,05)
7	165	-
8	93,2	6,93 (d,2,05)
9	157,2	-
10	104,8	-
1'	121,8	-
2'-6'	130,3	8,07 (d,9)
3'-5'	114,3	6,91 (d, 9,03)
4'	159,9	-
1''	99,4	5,78 (d, 7)
2''	78,69	3,65
3''	71,0	3,43
4''	76,1	3,35
5''	70,38	3,29
6''	61,23	3,52-3,77
1'''	101,23	5,25
2'''	70,6	4,01
3'''	77,5	3,58
4'''	72,6	3,35
5'''	68,9	3,44 (m) ou 4,05
6'''	16,2	0,99 (d,6,20)

Le spectre HMBC montre une corrélation H-C entre le carbone C-6''' du glucose et le proton H-1''' du rhamnose mettant en évidence la liaison glucopyranosyl(1→6)rhamnopyranose(figure 39).

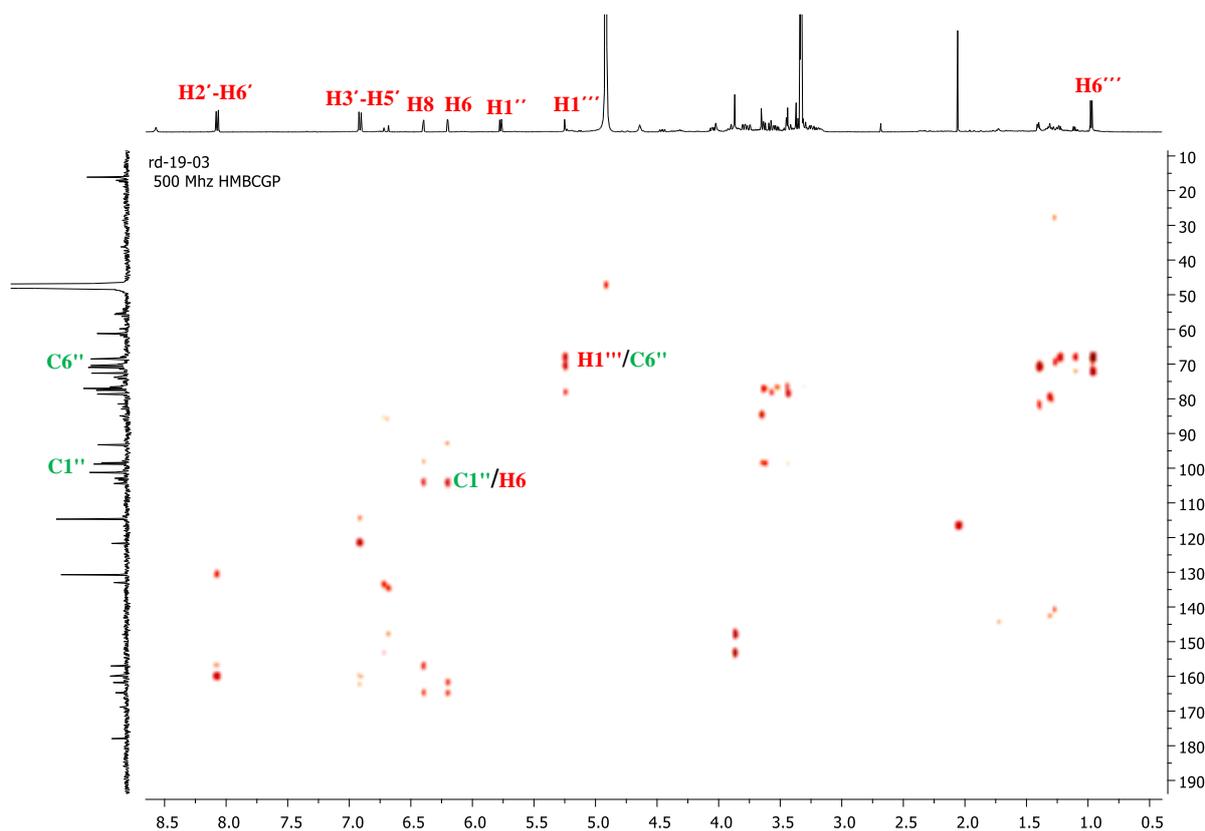


Figure 39 : Spectre HMBC du composé **3** (500MHz, CD₃OD)

L'ensemble de ces données ainsi que la comparaison avec la littérature (Budzianowski, 1990), nous a permis d'identifier le composé **3** comme étant lekaempférol-3-O-β-D-glucopyranosyl(1→6)rhamnopyranose (figure 40) :

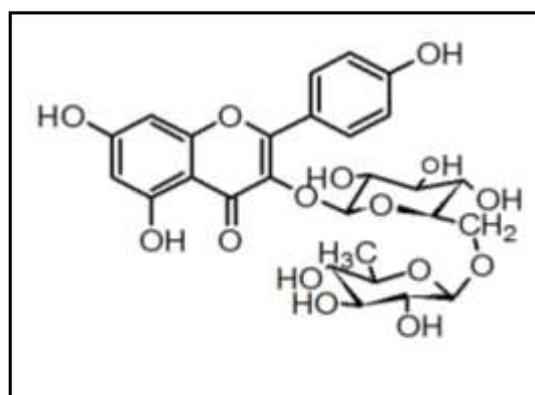


Figure 40 : Structure du composé **3**

4.4. Composé 4 : déhydrovomifoliol

Ce composé se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. En présence du réactif de Neu et sous UV à 254 nm, ce composé apparaît sous forme d'une tâche fluorescente blanche qui vire au jaune marron après révélation à l'anisaldéhyde sulfurique, ce qui laisse supposer que ce composé renferme un noyau aromatique.

Le spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS mode négatif montre un pic d'ion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 221,4141 correspondant à une formule brute $C_{13}H_{17}O_3$.

Le spectre de RMN¹³C révèle la présence de 13 carbones dont deux carbonyles δ C 199ppm (C3) et 199,3 ppm (C 9), tandis que le spectre RMN¹H (figure 41) révèle clairement la présence de :

- quatre signaux singulets, dans la région blindée entre 1,03 et 2,33 ppm, intégrant chacun pour trois protons, correspondant à des groupements méthyles résonant à δ H 2,33 ppm (H-10), 1,03ppm (H-11), 1,08ppm (H-12) et 1,92ppm (H-13),
- deux doublets résonants entre 6,46 et 7,03 ppm correspondant à des alcènes conjugués (tableau 18).

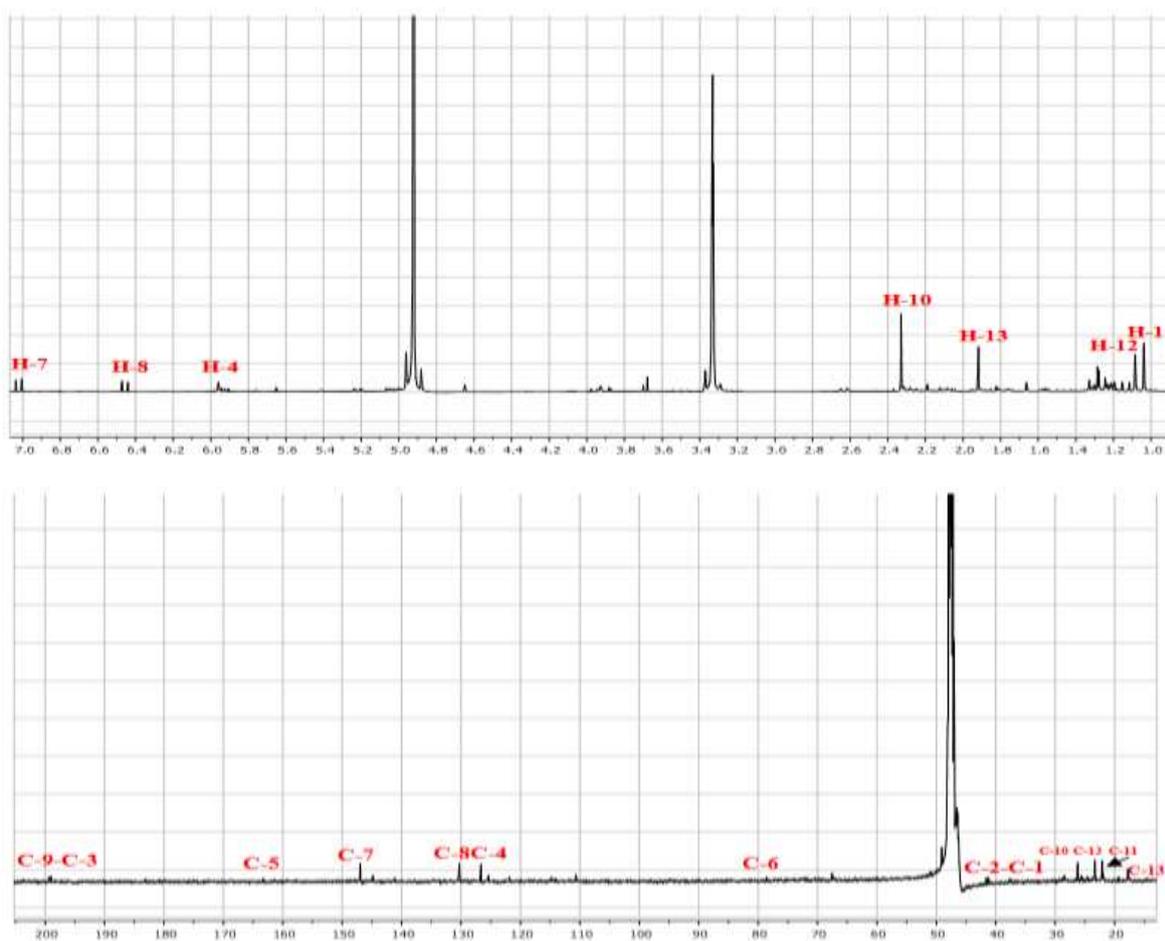


Figure 41 : Spectre du ¹H et ¹³C du composé 4 (500MHz, CD₃OD)

Tableau 18: Déplacements chimiques du spectre RMN ^1H et ^{13}C du composé **4** dans CD_3OD

Positions	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, J Hz)
1	41,68	-
2	49,14	2,63(d, 17.83)
3	199	-
4	126,7	5,96(m)
5	163,3	1,04
6	78,53	-
7	146,97	7,03 (d, 15,92)
8	130,4	6,46 (d,15,92)
9	199,3	-
10	26,21	2,33(s)
11	22,13	1,03 (s)
12	23,34	1,08 (s)
13	17,74	1,92 (d, 1.41 Hz)

Les analyses spectrales hétéronucléaires HSQC, COSY et HMBC ont révélé les corrélations suivantes :

- H4 corrèle avec H13 (fig 42),
- C6 corrèle avec H7 et H8 de la liaison éthylénique,
- C8 corrèle avec H7 et C7 corrèle avec H 8,
- C9 de la fonction cétonique corrèle avec H7 et H8 de la liaison éthylénique (fig 43),

L'ensemble de ces données spectrales et la comparaison avec la littérature scientifique (Schievano et al., 2012), nous permettent d'émettre l'hypothèse qu'il s'agit de la structure du déhydrovomifoliol (Figure 44). A notre connaissance, il s'agit de première citation pour l'espèce *Solenostemma argel* et pour la famille des Apocynaceae.

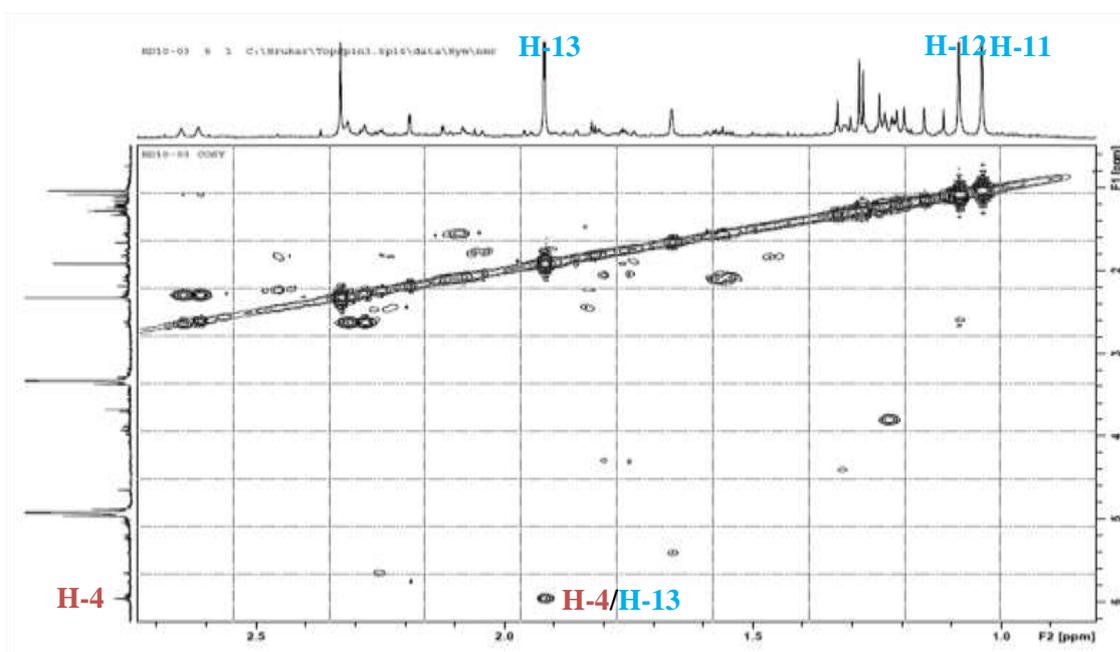
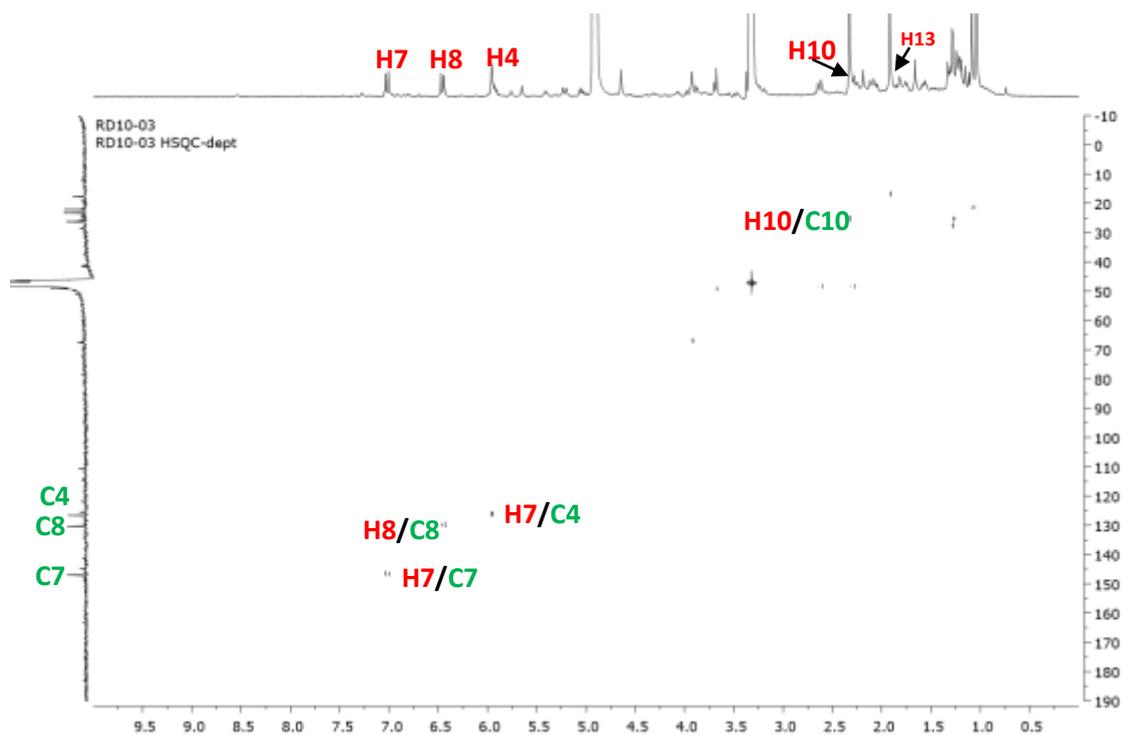


Figure 42 : Spectres HSQC et COSY du composé 4

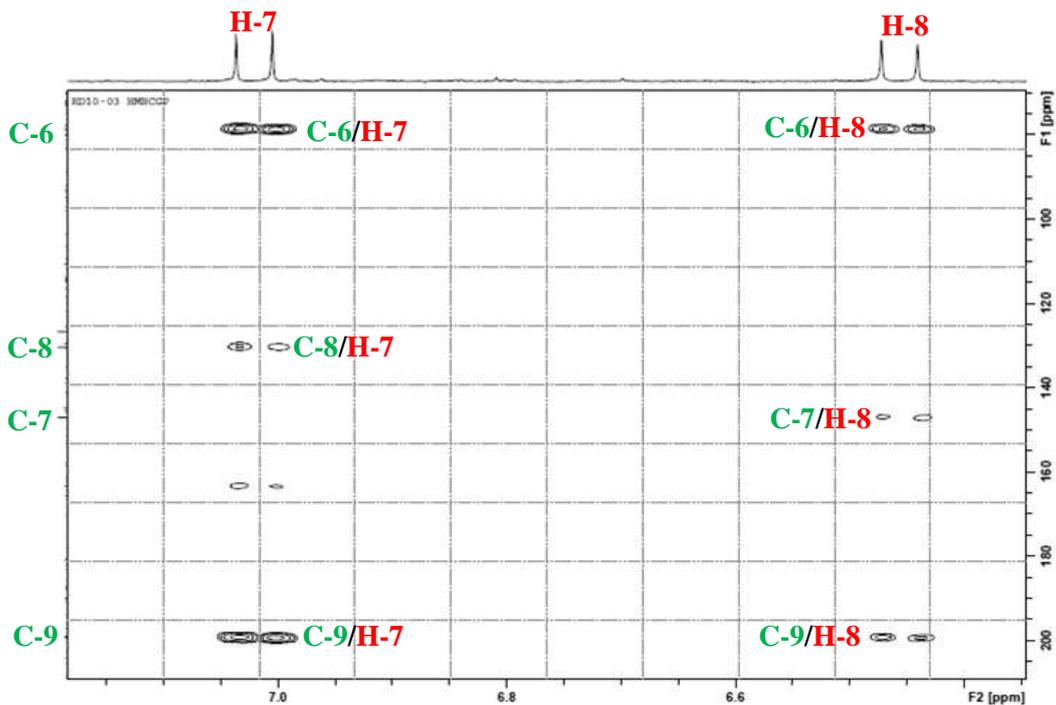


Figure 43 : Corrélation HMBC du composé **4**

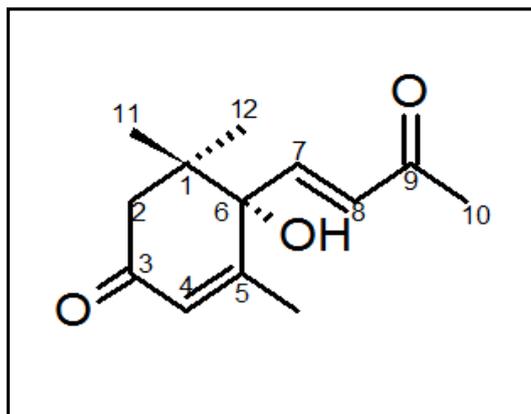


Figure 44: Structure du composé **4**

4.5. Composé **5** : acide *p*-hydroxbenzoïque

Le composé **5** a été isolé sous forme d'une poudre jaune. En CCM, il possède un rapport frontal de 0,45 caractéristique d'un composé très polaire. Le composé apparaît sous forme d'une tache noire à 254 nm et n'est pas visible à 365 nm.

Le spectre de masse haute résolution obtenu en mode ESI négatif a généré un ion $[M-H]^-$ m/z 137,17544 compatible avec une composition élémentaire $C_7H_5O_3$ comportant une mono-insaturation.

Le spectre RMN du ^1H révèle, dans la région des protons aromatiques, deux doublets à δ 7,88 (d, $J=8,47$ Hz, H-2 et H-6) et δ 6,79 (d, $J=8,45$ Hz, H-3 et H-5) correspondant à un cycle phényle 1,4-disubstitués(Figure 45).

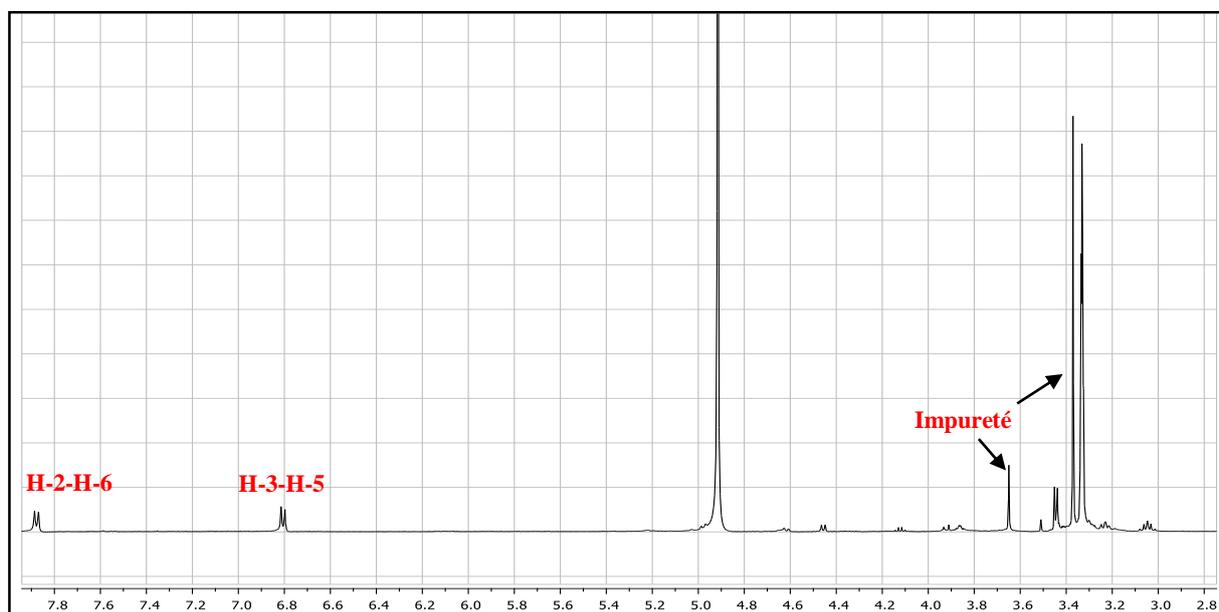


Figure 45 : Spectre RMN ^1H du composé **5** (500MHz, CD_3OD)

Les déplacements chimiques des spectres RMN ^1H et ^{13}C sont regroupés dans le tableau 19.

Tableau 19 : Déplacements chimiques du spectre RMN ^1H et ^{13}C du composé **5** dans CD_3OD

Positions	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, J Hz)
1	123,8	-
2-6	131,4	7,88 (2H, d, 8,47)
3-5	114,4	6,79 (2H, d, 8,47)
4	161,16	-
7	171,6	-

Ces informations ont été complétées par l'analyse de spectre de corrélation hétéronucléaire HMBC pour déterminer l'ensemble des positions des carbones et leurs protons associés (Figure 46). Il en ressort les corrélations suivantes :

- C-3 corrélé avec H-2,
- C-4 corrélé avec H2 et H6,
- C-7 corrélé avec H2 et H6,
- C-1 corrélé avec H3 et H5,
- C-4 corrélé avec H3 et H5.

L'absence de corrélation entre la partie aromatique et les signaux apparaissant à 3,62 et 3,39 ppm nous confirme qu'il s'agit d'impuretés dues aux traces du solvant.

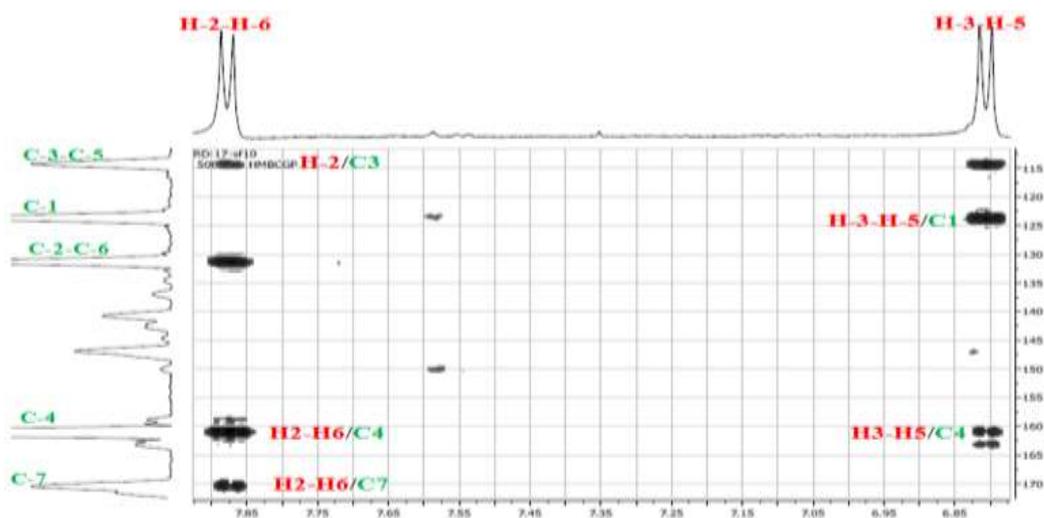


Figure 46 : Spectre HMBC du composé **5** (500MHz, CD₃OD)

Ces résultats comparés à ceux de littérature (Cho et al., 1998) permettent d'identifier le composé **5** comme étant l'acide *p*-hydroxybenzoïque (figure 47), cette structure est décrite pour la première fois pour l'espèce *S. argel* et la famille des Apocynaceae.

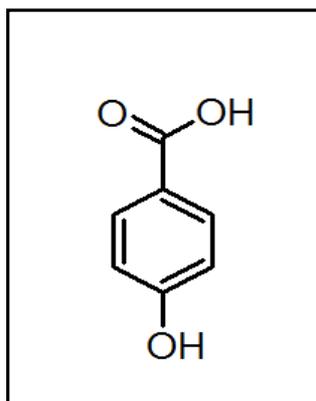


Figure 47 : Structure du composé **5**

4.6. Composé **6** : Solargine I

Ce composé se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Ce dernier apparaît par CCM sous UV à 254 nm et sous forme d'une tache noire qui vire au bleu après révélation à l'anisaldéhyde sulfurique.

Le spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS mode négatif, montre un pic d'ion pseudo-moléculaire [M-H]⁻ à *m/z* 693,24048 correspondant à une formule brute en C₃₃H₄₁O₁₆ (figure 48).

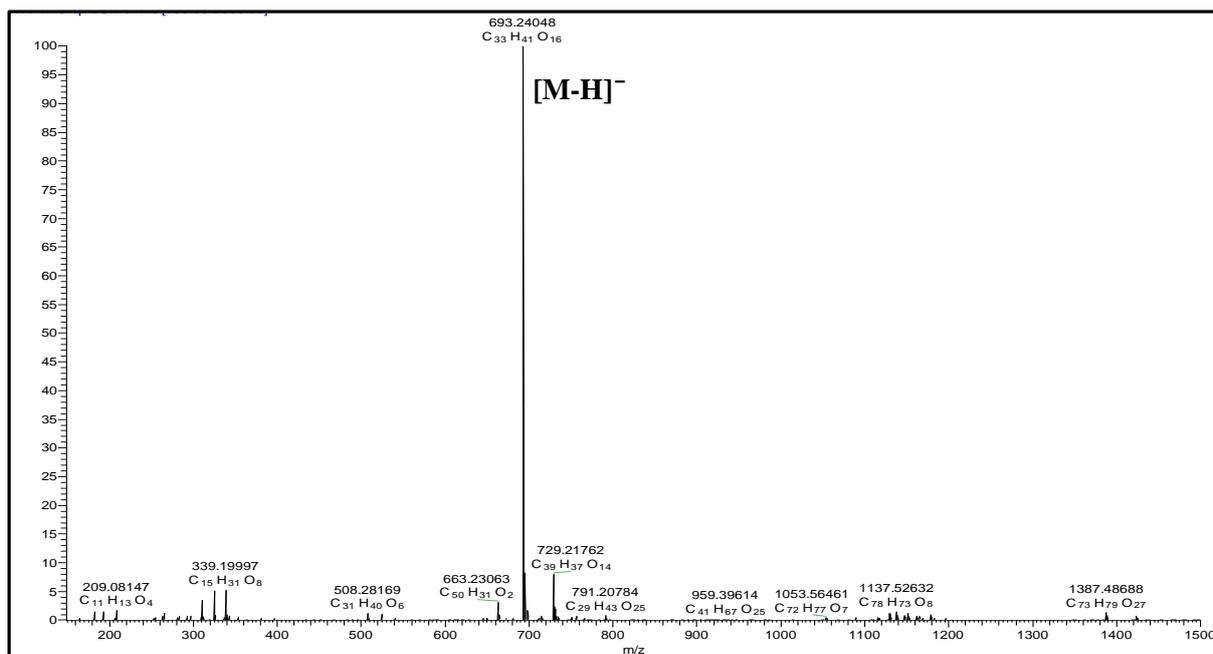


Figure 48 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **6**

Le spectre de RMN ¹H (figure 49) révèle :

- Des signaux caractéristiques de deux unités osidiques dont les protons anomériques résonnent à 5,17 ppm (d, $J=7,71$ Hz) et 5,23 ppm (d, $J=1,75$ Hz),
- un massif de protons résonant entre 3,35 ppm et 3,74 ppm correspondant aux groupements -CH et -CH₂ dessus, en plus d'un proton résonant à 1,11 ppm attribuable probablement au groupement méthyle du rhamnose (H-6'''),
- un signal déblindé sous forme d'un singulet à 6,78 ppm intégrant pour les deux protons H-2 et H-6 d'un cycle phényle,
- deux systèmes ABX résonant à 7,22 ppm (d, $J=2,02$ Hz), 6,83 ppm (d, $J=8,03$ Hz), 7,11 ppm (Dd, $J=2,02$ Hz ; 8,03Hz) et 6,69 ppm (d, 15,85Hz), 6,37 ppm (Dd, 6,15Hz, 15,85 Hz) et un système AB résonant à 7,68 ppm (d,15,45Hz) et 6,43 ppm (d, 15,45 Hz) (tableau 20).

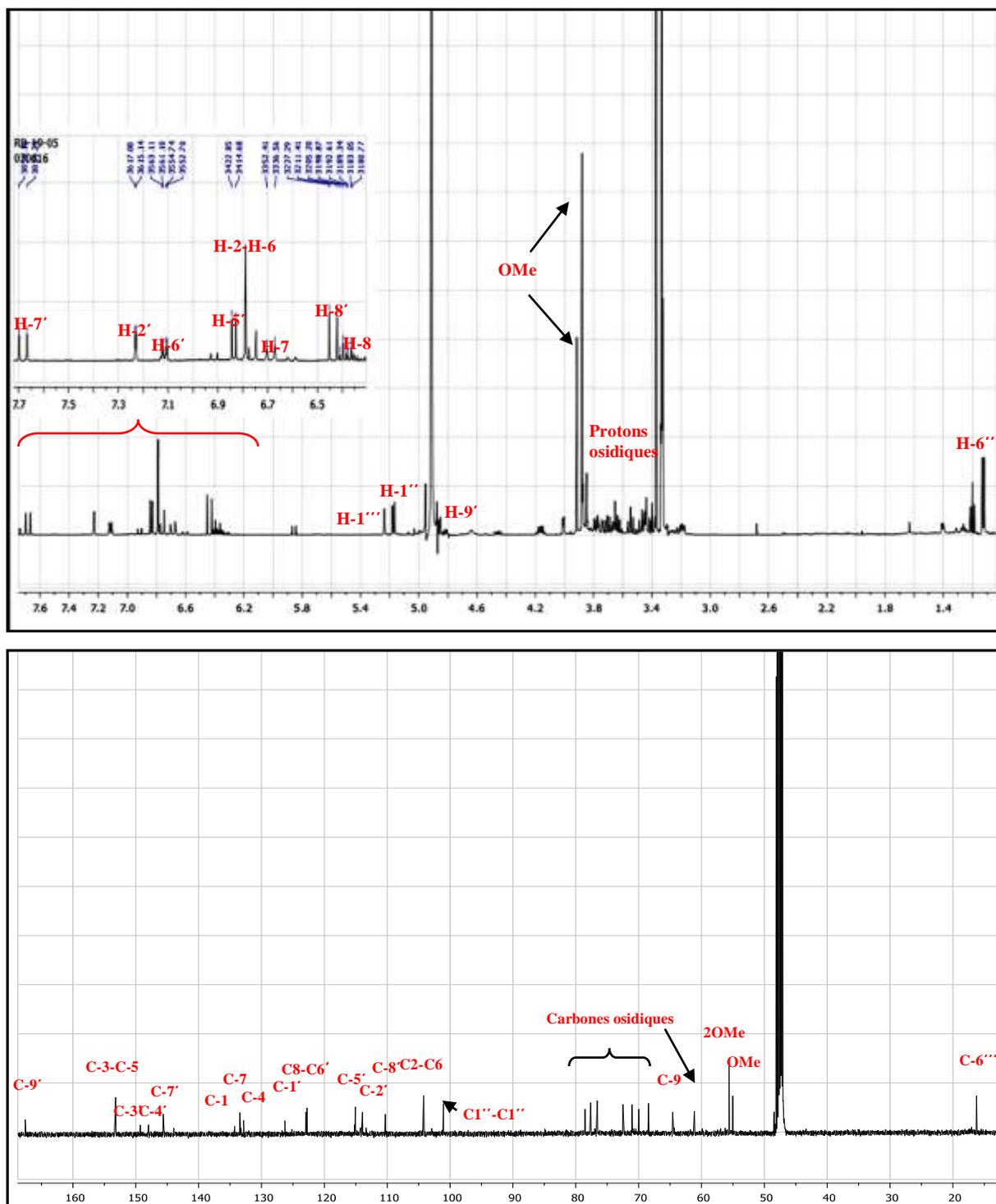


Figure 49 : Spectres des RMN ¹H et ¹³C du composé 6 (500MHz, CD₃OD)

Le spectre de RMN ¹³C (figure 49) indique la présence de 33 carbones dont 21 sont attribués à la génine et 12 aux sucres. On distingue quelques carbones caractéristiques :

- un carbone méthylénique résonant à 16,23 ppm,
- trois carbones sous forme de groupements méthoxyles à 55,5 ppm et 55,6 ppm,

- deux carbones anomériques à 101,13 ppm dont l'un correspond au C1'' d'un premier sucre et l'autre au C1''' du deuxième sucre qui est rhamnose,
- deux carbones à δ^C 64,64 et 61,1 ppm indiquant des méthylènes oxydés (CH₂OH) dont un appartenant à un hexose,
- sept carbones de méthynes oxydés dont 6 appartiennent aux sucres.

Les déplacements chimiques des spectres RMN¹H et ¹³C sont regroupés dans le tableau 20. Ces résultats préliminaires permettent de déduire que le composé **6** est une génine composé d'un acide férulique lié à un alcool synapilique lui même substitué par un diosides dont l'un est le rhamnose.

Tableau 20 : Déplacements chimiques des spectres RMN ¹H et ¹³C du composé **6** dans CD₃OD

position	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, J en Hz)
1	133,49	-
2	104,21	6,78 (s)
3	153,21	-
4	132,9	-
5	153,21	-
6	104,21	6,78 (s)
7	133,48	6,69 (d, 15,85)
8	122,79	6,37 (Dd, 6,15Hz, 15,85)
9	64,64	4,85
OMe	55,66	3,87
OMe	55,66	3,87
Ac.férulique		
1'	126,43	-
2'	110,4	7,22 (d,1,92)
3'	149,33	-
4'	148,12	-
5'	115,3	6,83 (d,8,03)
6'	122,79	7,11 (Dd,1,93, 8,03Hz)
7'	145,72	7,68 (d,15,80)
8'	113,99	6,43 (d, 15,80)
C=O	168,8	-
OMe	55,5	3,91 (s)
Glucose		
1''	101,13	5,17 (d, 7,33)
2''	78,6	3,70-3,53
3''	77,7	3,55
4''	70,1	3,46
5''	78,56	3,70
6''	61,1	3,74-3,62

Rhamnose		
1''	101,13	5,23 (d, 1,41)
2''	71,08	4,00
3''	78,49	3,69
4''	76,1	3,35
5''	68,43	3,47
6''	16,23	1,11 (d, 6,36)

Les données spectrales HSQC du composé **6** ont révélé des corrélations entre chaque carbone et ses protons attachés directement tandis que le spectre H-H COSY interprétait des couplages proton-proton de sucres dont les constantes de couplages ont permis de mettre en évidence la présence d'un β -D-glucopyranose relié a un rhamnopyranose.

L'analyse spectrale HMBC du composé **6** (figure 50) a confirmé les données mentionnées ci-dessus en révélant des corrélations importantes entre :

- H-9 de l'alcool synapilique avec C-9' du fragment férulique,
- H-1'' du l'unité glucopyranosyle avec C-4 de l'alcool synapilique,
- H-1''' de l'unité rhamnopyranosyle avec C-2'' de l'unité glucopyranosyle,
- H-8' avec C-1' de l'acide férulique.

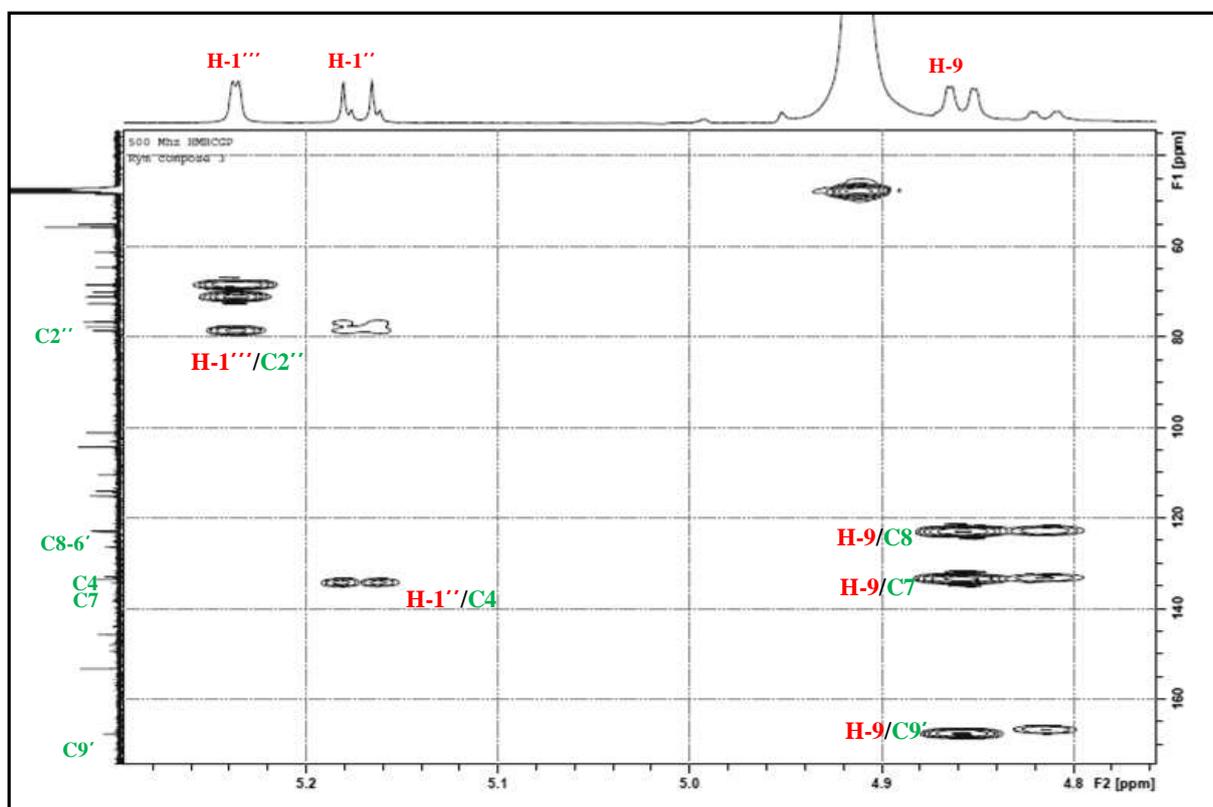
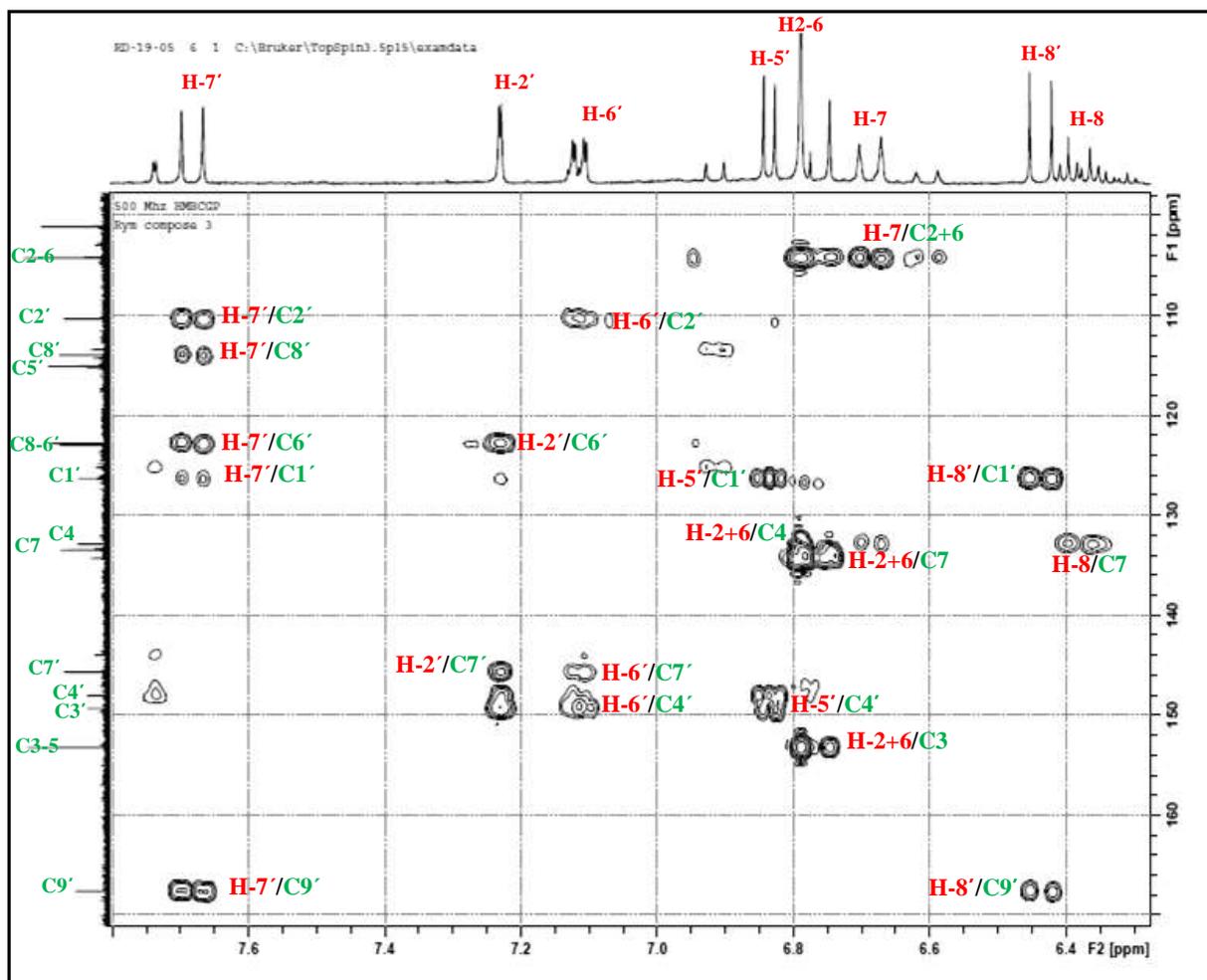


Figure 50 : Corrélation HMBC du composé 6 (500MHz, CD₃OD)

Les données spectrales permettent d'identifier le composé **6** comme étant la Solargine I (Kamel, 2003) (figure 51).

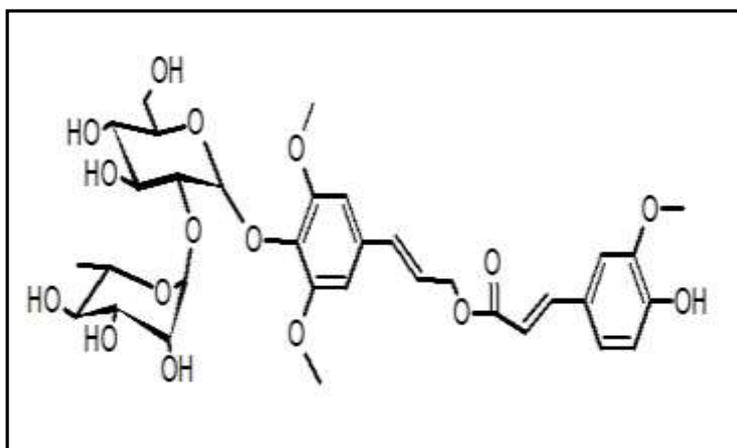


Figure 51 : Structure du composé **6**

4.7. Composé **7** : 14,15-dihydroxyprogestérone

Ce composé se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Le composé apparaît sous UV comme une tache noire qui vire au jaune marron après révélation à l'anisaldéhyde sulfurique.

Le spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS en mode positif montre un ion pseudo-moléculaire à m/z 369,20110 $[M+Na]^+$ correspondant à la formule brute $C_{21}H_{30}O_4Na$ et a une masse moléculaire réelle de 346.20110 (figure 52).

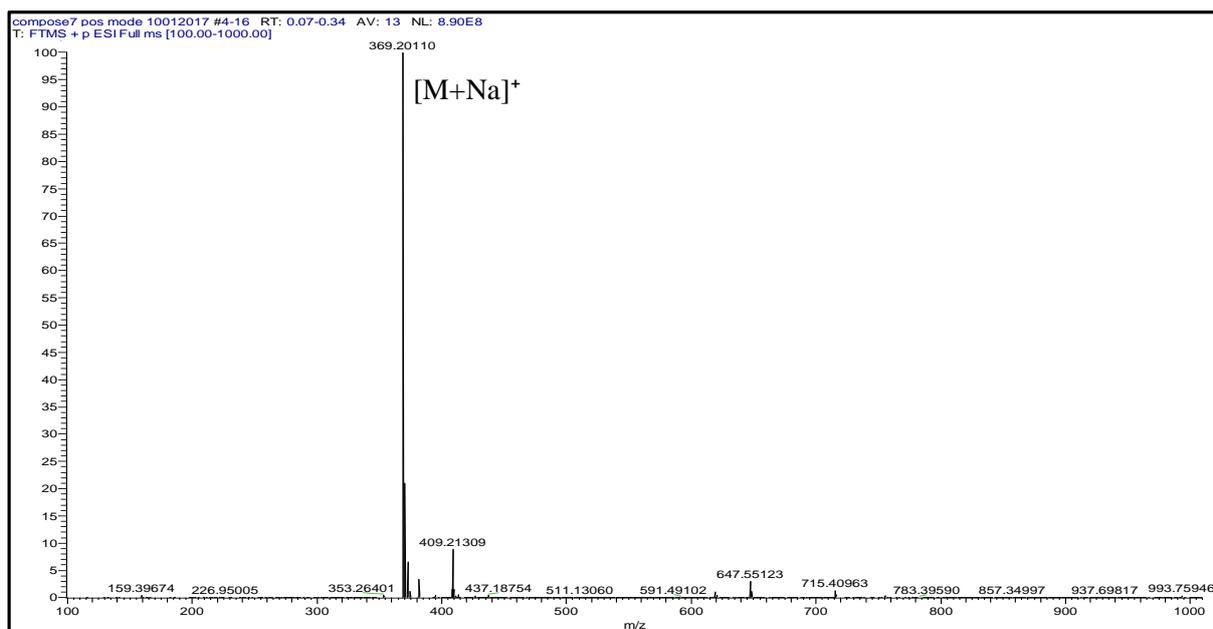


Figure 52 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **7**

Le spectre RMN ^1H (fig. 53) du composé **7** révèle la présence de :

- Deux singulets à 1,05 et 1,25 intégrant pour trois protons chacun, attribuables à deux groupes méthyles angulaires dans le noyau stéroïde à H-18 et H-19,
- Un singulet intégrant pour trois protons à 2,27 pour le groupe méthylcétone,
- Un singulet à 5,74 attribuable a un proton oléfinique (H-4).

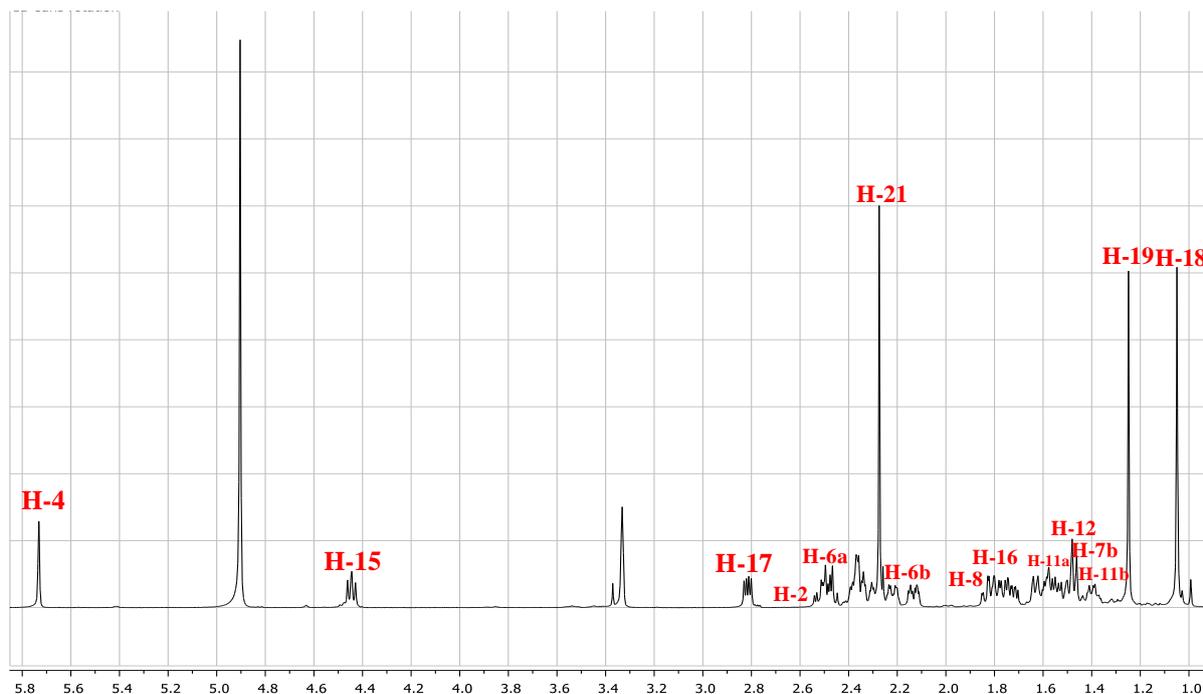


Figure 53 : Spectre du RMN ^1H du composé **7** (500MHz, CD_3OD)

Le spectre ^{13}C -RMN confirme les informations obtenues par le spectre du proton en révélant la présence de 21 carbones dans la structure du composé (figure 54).

- L'apparition de deux signaux à 200 et 217,6 ppm attribuable a des groupements cétone en C3 et C-20.

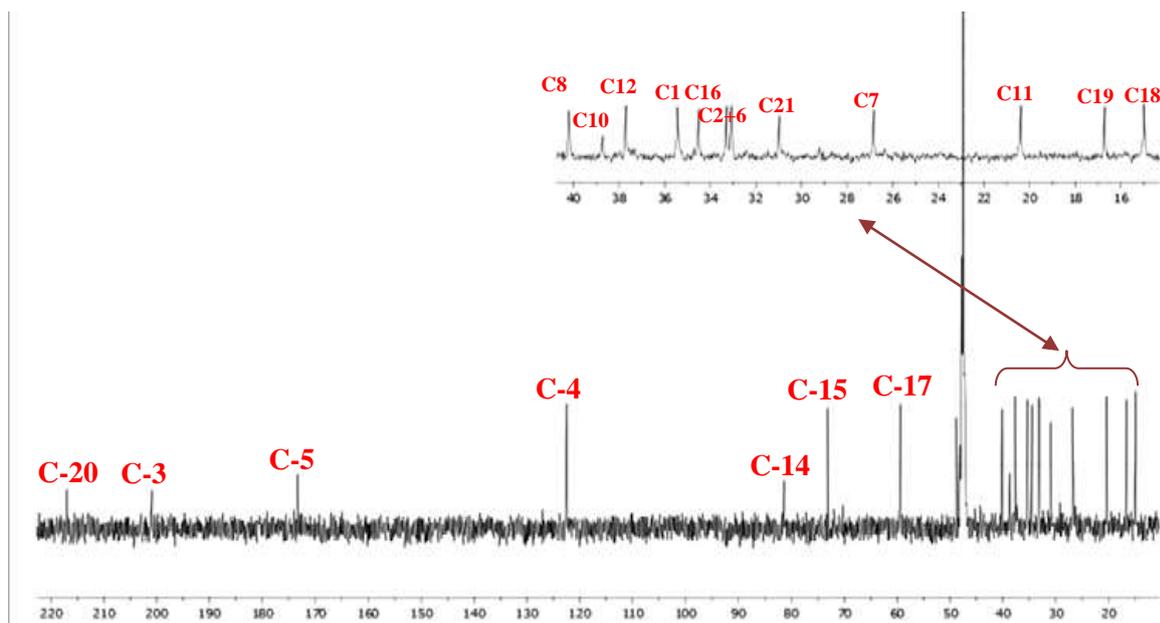


Figure 54 : Spectre du ^{13}C du composé **7** (500MHz, CD_3OD)

Les résultats des analyses spectrales de RMN ^1H et RMN ^{13}C sont regroupés dans le tableau 21.

Tableau 21 : Déplacements chimiques du spectre RMN ^1H et ^{13}C du composé **7** dans CD_3OD

position	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, J en Hz)
1	35,23	2,13/1,80
2	33,27	2,5
3	201,06	-
4	122,36	5,74
5	173,84	ND
6	33,27	2,29/2,34
7	26,59	2,2/1,5
8	40,93	1,8
9	49,4	1,46
10	39,01	-
11	20,59	1,48/1,58
12	38,35	1,5/1,6
13	ND	-
14	82,20	ND
15	73,8	4,45
16	35,1	1,7/2,42
17	59,68	2,81
18	15,6	1,05
19	17,3	1,25
20	217,6	-
21	31,6	2,27

L'examen spectral de l'HSQC a également révélé la présence de 3 méthyles, 7 méthylènes et 5 méthines (figure 55).

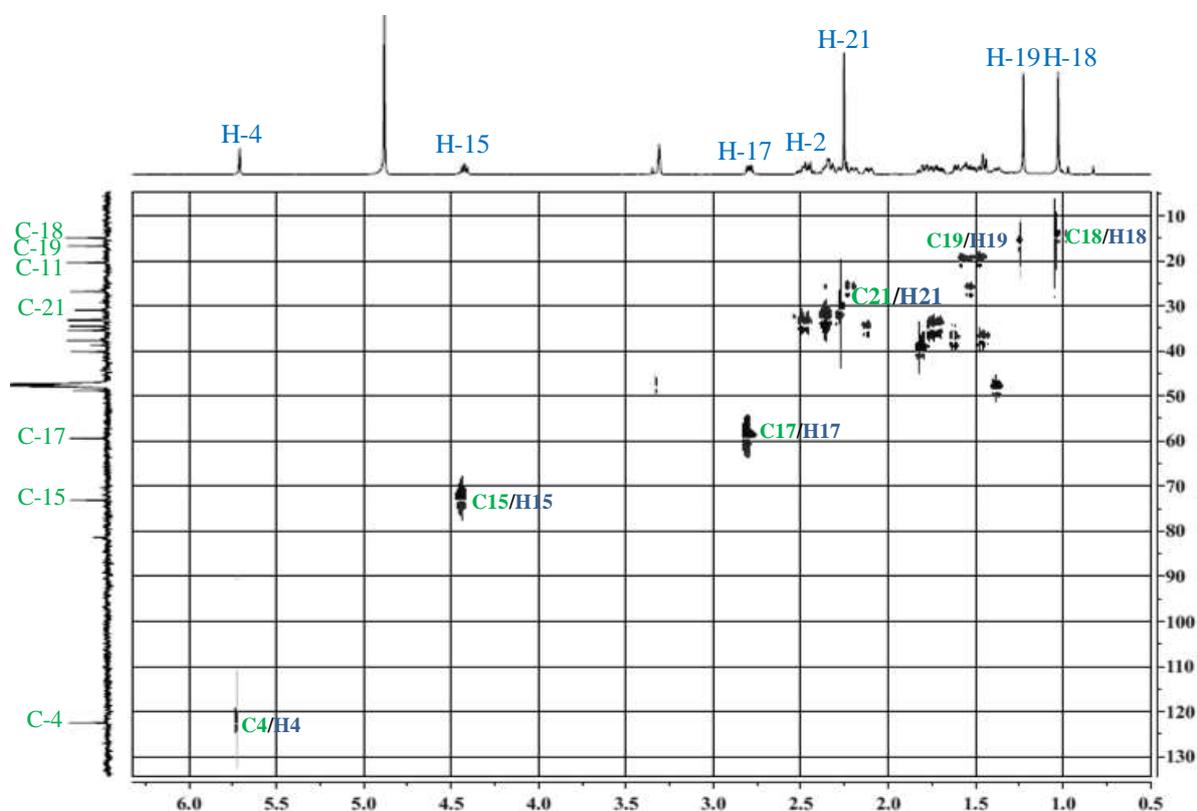


Figure 55 : Spectre HSQC du composé **7** (500MHz, CD₃OD)

L'analyse de la corrélation $2J_{H-C}$ et $3J_{H-C}$ sur le spectre HMBC permet de visualiser les couplages entre les protons et carbones distants de deux ou trois liaisons nous renseigne sur l'attribution des méthyles et les autres carbones de la génine (figure 56).

Dans cette expérience, les protons méthyléniques corréleront au maximum avec trois carbones constituant le socle de la base carbonée qui les porte. Ainsi le méthyle 19 corrélerait avec le C-10 (39,01 ppm), C-1 (35,23 ppm) et C-5 (173,84 ppm), ce qui justifie l'emplacement de ces deux méthyles sur le squelette de la molécule. Les deux carbones cétoniques C-3 et C-20 corréleront avec trois protons chacun et qui nous a permis de les localiser. Ceci étant dit, le C-3 corrélerait H-1, H-2 et H-6 par contre le C-20 corrélerait avec H-21, H-16 et H-17. D'autres corrélations ont été également observées ;

- C-1 corrélerait avec H-2 et H-19,
- C-2 et C-6 corréleraient avec H-4 et le C-6 corrélerait avec le H-8,
- C-5 corrélerait avec H-6, H-7 et H-19 ce qui explique l'emplacement du carbone oléfinique dans le premier cycle,

- C-8 corrèle avec H-15,
- C-10 corrèle avec H-4, H-8 et H-19,
- C-12 corrèle avec H-17 et H-18.

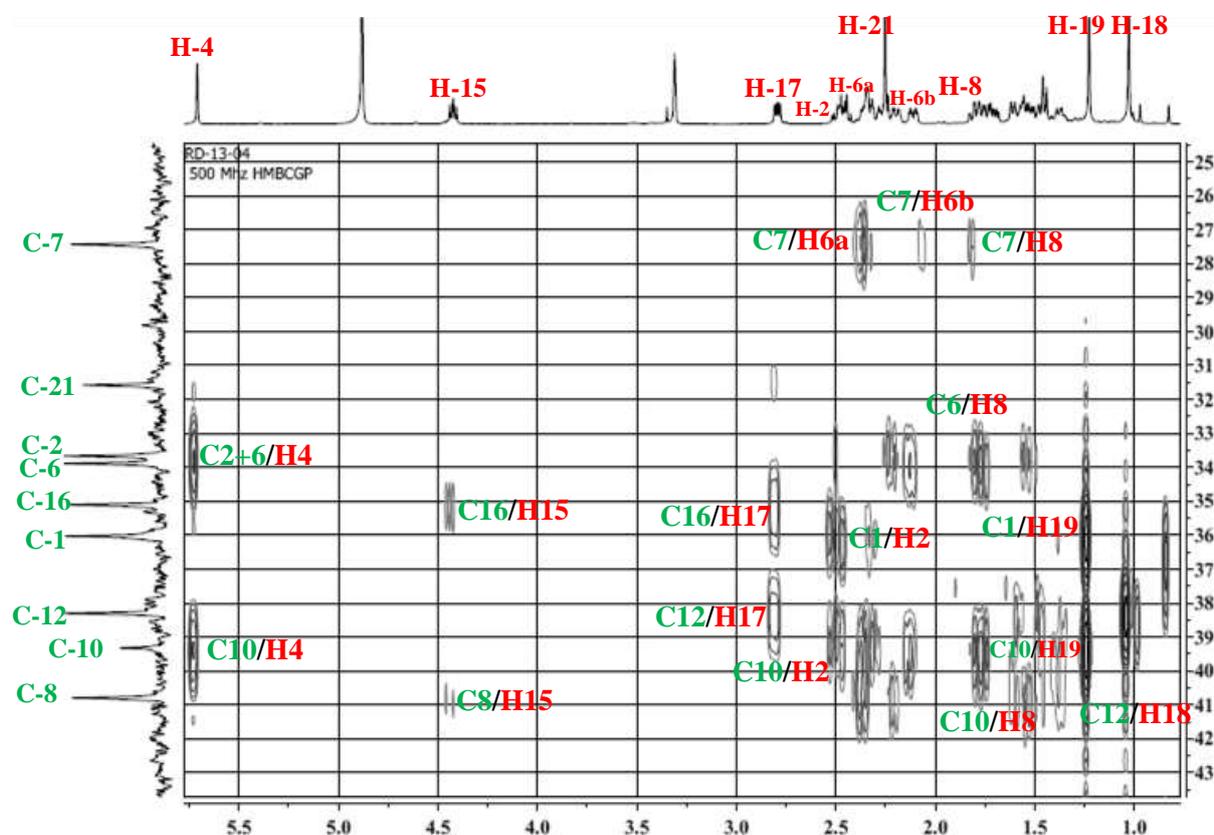


Figure 56 : Corrélation HMBC du composé **7** (500MHz, CD₃OD)

L'ensemble des données spectrales en comparaison avec les travaux de Ounaissia et al., 2016 ont permis de déterminer la structure du composé **7** comme étant 14,15dihydroxyprogestérone (figure 57).

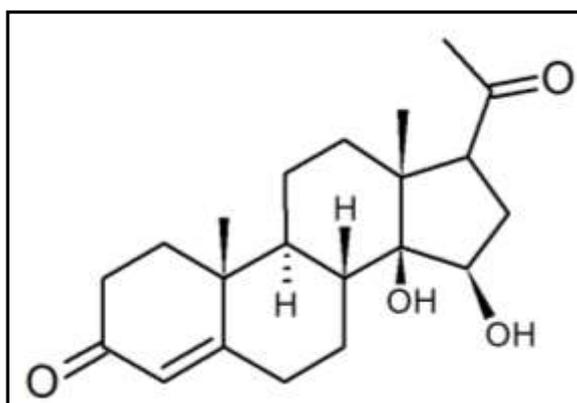


Figure 57 : Structure du composé **7**

4.8. Composé 8 : 14,15-dihydroxy-pregn-4-ène-3,20-dione-15β-D-glucopyranoside

Semblable au composé 7, ce produit se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Le composé apparaît à 254 nm sous forme d'une tache noire qui vire au jaune marron après révélation à l'anisaldéhyde sulfurique.

Le spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS en mode positif montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 531,25366 $[M+Na]^+$ correspondant à une formule brute en $C_{27}H_{40}O_9Na$ et a une masse moléculaire réelle de 508,25366 (figure 58).

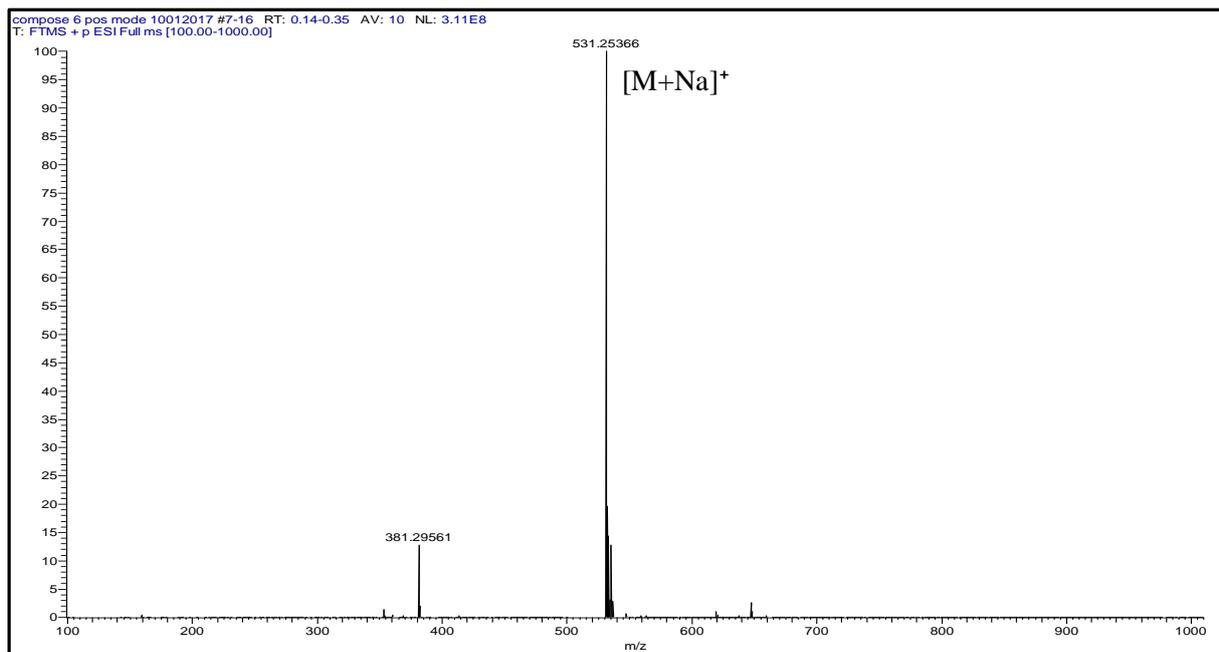


Figure 58 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé 1

Le spectre de RMN 1H du composé 8 (figure 59) est très proche de celui du composé 7. On retrouve tous les signaux caractéristiques du composé 7 tels que les signaux des groupements méthyles angulaires appartenant à 2 méthyles et une méthylacétone et le signal d'un proton oléfinique. On observe également la présence d'une unité osidique caractérisée par un proton anomérique à 4,30 ppm (d, $J=7,68$ Hz). Ces informations ont été complétées par d'autres spectres de corrélations homonucléaires scalaires tel que COSY $^1H-^1H$ et hétéronucléaires HSQC pour déterminer l'ensemble des positions des carbones et de leurs protons associés.

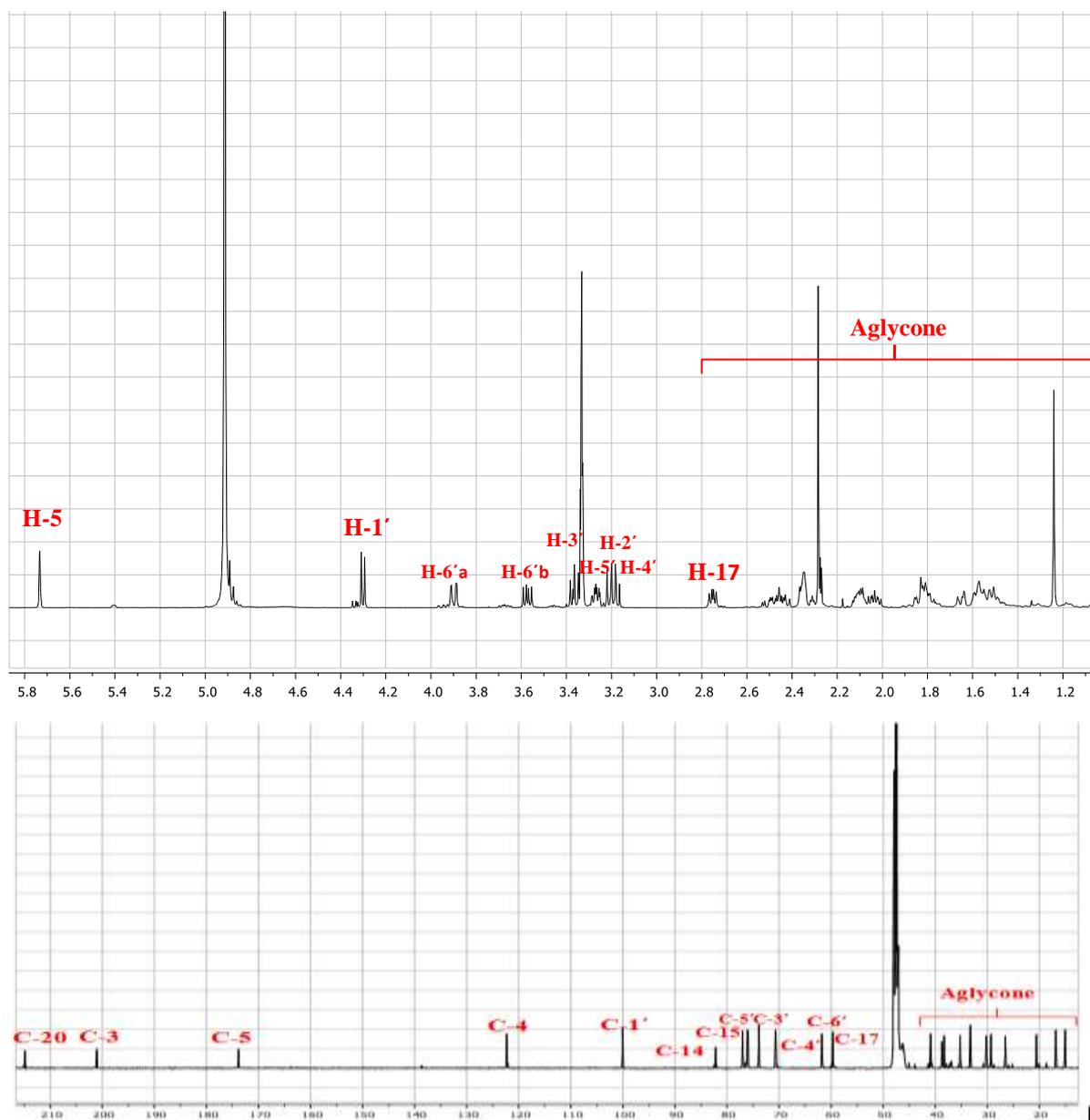


Figure 59 : Spectre des RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **8** (500MHz, CD_3OD)

Le déblindage du carbone C-15 de la génine à 79,12 ppm et la corrélation $^3\text{J}_{\text{H-C}}$ observée sur le spectre HMBC avec le proton anomérique H-1' de l'ose (figure 60) montre que ce sucre est attaché à l'hydroxyle en position 15. Ceci est confirmé par la comparaison des déplacements chimiques de ce composé avec ceux de la littérature scientifique (Ounaissia et al., 2016).

Les données spectrales de RMN ^1H et RMN ^{13}C sont récapitulées dans le tableau 22.

Tableau 22: Déplacements chimiques du spectre RMN ^1H et ^{13}C du composé **8** dans CD_3OD

position	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, J en Hz)
1	35,23	2,13/1,80
2	33,27	2,5
3	201,06	-
4	122,36	5,74

5	173,84	ND
6	33,27	2,29/2,34
7	26,59	2,2/1,5
8	40,93	1,8
9	49,4	1,46
10	38,77	-
11	20,59	1,48/1,58
12	38,35	1,5/1,6
13	ND	-
14	82,20	ND
15	79,12	4,90
16	35,1	1,7/2,42
17	60,78	2,79 Dd
18	15,1	1,05
19	16,87	1,25
20	214,86	-
21	30,21	2,27
1'	100,1	4,30 (d,7,68)
2'	73,92	3,19 (d,8,1)
3'	75,97	3,36 (d,8,1)
4'	70,69	3,20 (d,9)
5'	77,03	3,26 (m)
6'	61,86	3,55(q,6,96,11,62) 3,91(Dd,2,33,11,62)

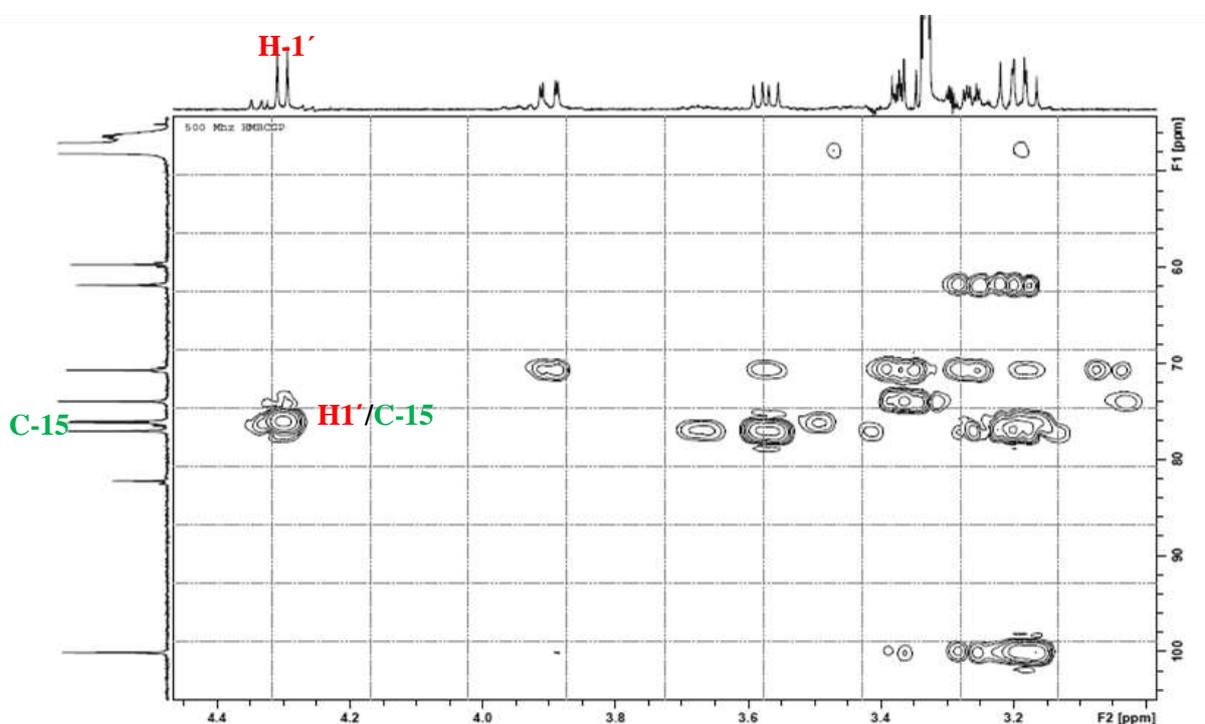


Figure 60 : Corrélation HMBC entre le proton anomérique et le C-15 du composé 8

A partir du proton anomérique à 4,30 ppm (d, $J=7,68$ Hz), l'expérience COSY (figure 61) permet de mettre en évidence la présence de sept protons d'un hexose. Les constantes de couplage vicinales, mesurées à partir du spectre de RMN ^1H , entre les protons H-1' et H-2' ($J=7,68$ Hz), H-2' et H-3' ($J=8,1$ Hz), H-3' et H-4' ($J=9$ Hz) sont toutes supérieures à 7 Hz, ce qui indique qu'ils sont tous trans-diaxiaux. Ceci est caractéristique d'un β -D-glucopyranose.

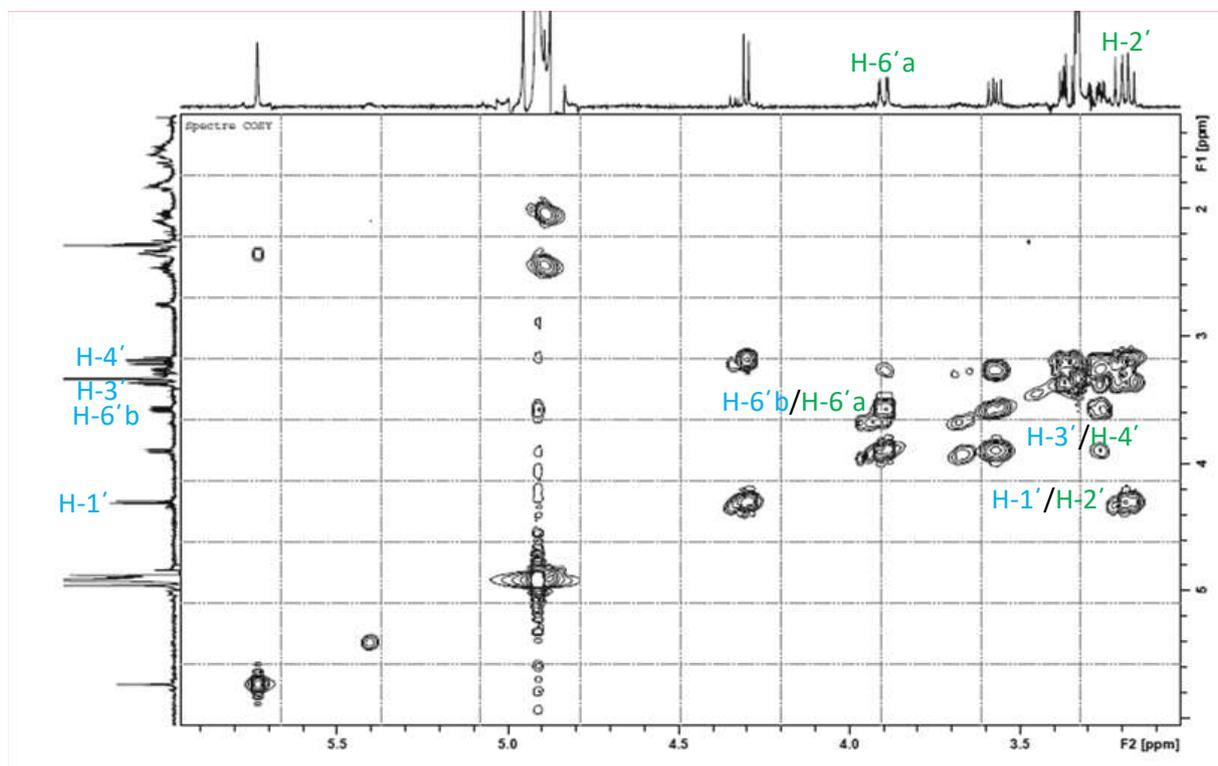


Figure 61 : Spectre COSY du composé **8** (500MHz, CD_3OD)

L'ensemble des données spectrales a permis de déterminer le composé **8** comme étant le 14,15-dihydroxy-pregn-4-ène-3,20-dione-15 β -D-glucopyranoside (Ounaissia et al., 2016) (figure 62).

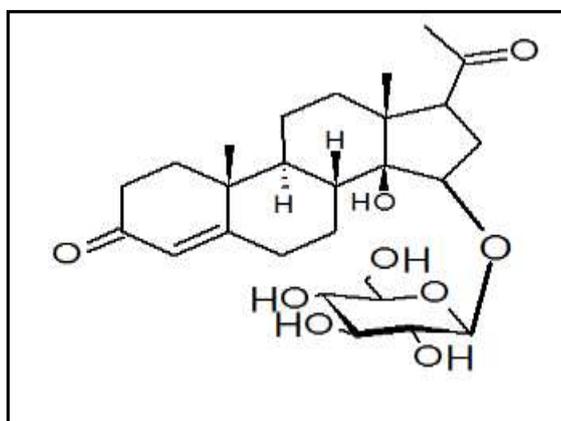


Figure 62 : Structure du composé **8**

Le fractionnement bioguidé de l'extrait chloroformique de l'espèce *S.argel*, nous a conduit à l'isolement de 11 composés dont 8 ont été identifiés comme suit :

- Trois flavonoïdes type flavonols, ces composés sont le kaempférol et ces dérivés mono et diglycosylé, ces trois composés ont déjà été rapportés dans *S.argel* par la littérature (Khalid, 1974;Kamel, 2003),
- Deux stéroïdes type prégnane, 14,15-dihydroxy-pregn-4-ène-3,20-dione et 14,15-dihydroxy-pregn-4-ène-3,20-dione-15 β -D-glucopyranoside. Ces deux composés ont été rapportés uniquement dans l'espèce *S.argel* et peuvent de ce fait être considérés comme des marqueurs chimiotaxonomiques de cette plante (Ounaissia et al., 2016;Hassan et al., 2001),
- Un acide phénolique (*p*-hydroxybenzoïque acide) et un norisoprénoïde volatile (déhydrovomifoliol). Ces deux composés sont décrits pour la première fois dans l'espèce *S.argel*.

5. Evaluation de l'activité anticholinestérasique des produits isolés

Afin d'évaluer l'activité anticholinestérasique des produits isolés et identifiés à partir de l'extrait chloroformique de *S. argel*, une étude préliminaire faisant appel à la méthode bioautographique par CCM a été réalisé sur l'acétylcholinestérase.

La révélation des chromatogrammes par le réactif Fast Blue B Salt laisse apparaître des spots blancs correspondant aux zones d'inhibition de l'AChE par les composés **1,2,4,6,7 et 8** (figure 63). Les composés 3 et 5 paraissent, dans ce cas, inactifs sur l'AChE.

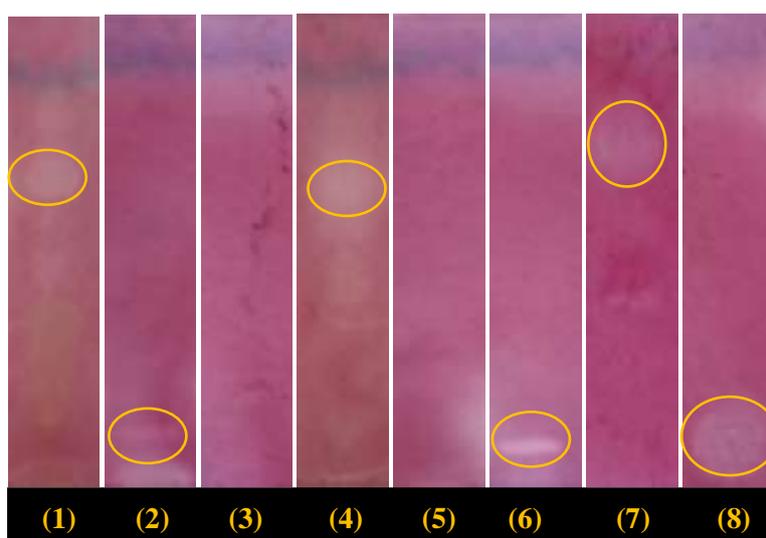


Figure 63: Bioautographie des composés purs

Une évaluation plus approfondie des produits isolés faisant appel à la méthode d'Ellman sur microplaques fut menée à la concentration 10^{-4} M sur les deux enzymes AChE et BChE en même temps. Les résultats obtenus montrent que l'activité anticholinestérasique, évaluée ici

par le pourcentage d'inhibition, varie d'un produit à l'autre et d'une enzyme à l'autre. L'exemple le plus frappant est illustré par le composé **6** (Solargine I) qui n'est actif que sur la BChE (tableau 23). Concernant les composés **4** et **5** correspondant respectivement au déhydrovomifoliol et à l'acide *para*-hydroxybenzoïque dont l'activité n'a pas pu être analysée par cette méthode, par manque de produits, s'avèrent de puissants inhibiteurs aussi bien de l'AChE que de la BChE comme le montrent les travaux réalisés sur des plantes marines par Jung et al., (2010) et Fang et al., (2010).

Tableau 23 : Pourcentage d'inhibition des produits purs à l'égard de l'AChE et BChE à 10^{-4} M

Composés	Pourcentage d'inhibition ^{a)}	
	AChE	BChE
1	34,28 ± 2,42	69,51 ± 2,90
2	19,63 ± 3,76	27,60 ± 1,80
3	8,34 ± 2,26	51,12 ± 1,52
4	n.t.	n.t.
5	n.t.	n.t.
6	n.a.	24 ± 1,78
7	21,57 ± 0,55	2,22 ± 3,05
8	25,38 ± 4,94	33,01 ± 7,61
Galanthamine	98,01 ± 0,84	87,68 ± 1,52

a), valeurs (moyenne ± écart type) ont été obtenues par des essais en triplicate utilisant 100 μ M de chaque composé testé; n.t.: non testé à cause de la quantité insuffisante, n.a.: non actif.

Il ressort également de ce tableau que dans le groupe des flavonols (composés **1**, **2** et **3**), le kaempférol présente la meilleure activité inhibitrice, après la galanthamine, utilisé ici comme référence, et ce à l'égard des deux enzymes AChE et BChE avec une nette avec une nette sélectivité pour cette dernière. De par sa petite taille et sa structure, le kaempférol est le composé qui réagit le mieux avec les sites catalytiques des deux enzymes ce qui se traduit sur ce tableau par de meilleurs taux d'inhibition par rapport aux autres composés.

Nos résultats sur l'activité du kaempférol sont corroborés par les travaux de Guo et al., (2010) qui montrent que le taux d'inhibition de l'AChE par les flavonols tels que la galangine, de structure très proche du Kaempféol, est voisin de 50%.

Par ailleurs, des études épidémiologiques menées par Mehta et al., (2012) ont observé l'importance des substances naturelles et des flavonoïdes en particulier dans le rétablissement de la mémoire chez des animaux atteints de la maladie d'Alzheimer.

Ces résultats sont confirmés par les travaux de Bahrani et al., (2014) qui montrent le rôle majeur joué par le kaempférol, dans l'amélioration de la mémoire chez la souris et considèrent

ce dernier comme l'un des meilleurs agents anti-cholinestérasique car malgré son activité modérée par rapport à la galanthamine est beaucoup moins toxique.

Dans le groupe des prégnanes, les composés **7** et **8** sont de presque équivalente activité en présence de l'AChE mais qui change totalement avec la BChE ou le composé **8** prédomine nettement. Bien que les prégnanes de *S. argel* analysés dans cette étude présentent de faibles pourcentages d'inhibition, en revanche, deux autres prégnanes glycosylés, isolés des racines de *Cynanchum atratum* de la famille des Asclepiadaceae, exhibant des CI_{50} de 6,4, 3,6 et 52,3 μ M témoignant qu'il s'agit de puissants inhibiteurs de l'AChE (Lee et al., 2003). D'autres travaux réalisés sur l'espèce *Sarcococca saligna* appartenant aux Bruxaceae ont montré l'importance de l'effet anticholinestérasique des prégnanes envers l'AChE et la BChE (Suganthi et al., 2009).

Ces résultats montrent que les produits analysés recèlent un potentiel anticholinestérasique bien que relativement faible par rapport à la galanthamine, mérite malgré tout d'être développé dans les travaux ultérieurs d'optimisation de leur structure par héli-synthèse. Dans cette perspective, il nous a semblé judicieux de procéder à notre niveau, à une analyse de leurs caractéristiques pharmacologiques et mécanismes d'interactions par des méthodes *in silico*.

6. Analyse *in silico* des molécules bioactives

Cette analyse a pour but de prédire les propriétés physicochimiques, pharmacocinétiques, la toxicité et les mécanismes d'interactions de ces molécules bioactives en vue de sélectionner celles susceptibles de subir des modifications structurales par la chimie pharmaceutique en vue d'améliorer leur pouvoir inhibiteur avec moins d'effets indésirables que la galanthamine (Hanafy et al., 2016).

6.1. Filtrage ADMET

6.1.1. Propriétés physico-chimiques

Beaucoup de substances naturelles ou de synthèses dotées d'activité biologique ont échoué dans les tests cliniques finaux en raison de la défaillance de leurs caractéristiques physico-chimiques. En effet, le passage à travers les barrières gastro-intestinale et hématoencéphalique est fortement lié aux propriétés physicochimiques des produits qui, dans notre cas, ont été déterminées en appliquant essentiellement la règle de Lipinski complétée par la règle de Veber (tableau 24).

Tableau 24 : prédiction des propriétés physico-chimiques des produits bioactifs par les règles de Lipinski et Veber

Propriétés	galantamine	1	2	3	6	7	8
Formule	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	C ₃₃ H ₄₂ O ₁₆	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	C ₂₇ H ₄₀ O ₉
PM (g/mol)	287.35	286.24	448.38	594.56	694.68	346.46	508.60
nLF	1	1	4	6	14	1	4
nON	4	6	11	14	16	4	9
nOHNH	1	4	7	9	7	2	5
Log P	1.91	1.58	-0.19	-0.96	0.48	2.37	0.55
TPSA Å²	41.93	111.13	190.28	236.06	232.52	74.6	153.75
Règle de Lipinski	conforme	conforme	Conforme (2 violations)	Non conforme (3 violations)	Non conforme (3 violations)	conforme	Conforme (une seule violation)
Règle de Veber	conforme	conforme	Non conforme	Non conforme	Non conforme	conforme	Non conforme
Solubilité dans l'eau	Moyenne	élevée	Moyenne	élevée	élevée	élevée	élevée
Accessibilité à la synthèse	4.57	3.14	5.29	6.37	6.87	5.14	6.67

Les composés **4** et **5** ont été exclus du calcul car leur activité anti-ChE n'a pas été évaluée

nLF : nombre de liaison flexible ; **nON** : nombre de liaison H-accepteur ; **nOHNH** : nombre de liaison H-donneur ; **Log P** : coefficient de partition octanol / eau ; **TPSA Å²** : surface polaire de la molécule

Ce tableau montre qu'il y a violation des règles de Lipinski et Veber par les composés **2**, **3**, **6** et **8**. Dans les cas des composés **3** et **6** on observe des valeurs anormalement élevées du poids moléculaire, du nombre de donneurs et d'accepteurs de liaison hydrogène ainsi que de la surface polaire. De plus, le composé **6** se distingue par un nombre de liaisons faibles non conforme à la règle de Veber qui fixe une valeur maximale de 10. Concernant le composé **2**, bien que présentant un nombre de donneurs et d'accepteurs de liaisons hydrogène élevé, reste malgré ces deux violations, conforme à la règle de Lipinski qui devient obsolète avec la règle de Veber ou la surface polaire dépasse la norme de 140 Å². Le composé **8** dont la surface polaire est également élevée est aussi non conforme.

De cette étude, il ressort que seuls les composés **1** et **7** répondent favorablement aux règles de Lipinski et Veber, contrairement aux composés **2**, **3**, **6** et **8** qui posent un risque majeur de biodisponibilité par voie orale.

6.1.2. Propriétés pharmacocinétiques

Cette analyse a pour but de compléter et de confirmer les résultats de l'étude précédente notamment en ce qui concerne l'absorption intestinale et l'inhibition du cytochrome P450 (tableau 25).

En effet, on observe une faible absorption gastro-intestinale des composés **2**, **3**, **6** et **8** et élevée des composés **1** et **7** qui confirment les résultats des propriétés physico-chimiques. Les résultats sont plus mitigés avec le test Caco-2 qui montre de faibles valeurs de perméabilité des composés **2**, **3** et **6**, ce qui est en accord avec les résultats précédents et une valeur paradoxalement élevée du composé **8**. L'autre paradoxe est observé avec le composé **1** qui montre une faible valeur du Caco-2, réduite de moitié par rapport à la galanthamine. En revanche, le composé **7** exhibe un Caco-2 équivalent à la galanthamine caractéristique de sa bonne perméabilité cellulaire.

Tableau 25 : prédiction des propriétés pharmacocinétiques

Propriétés	Galantamine	1	2	3	6	7	8
Absorption GI	élevée	Elevée	Faible	Faible	Faible	Elevée	Faible
Perméabilité Caco-2	20.9301	9.5774	11.1451	12.4777	16.3562	21.0017	17.2972
Inhibition CYP 450	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative

Concernant le cytochrome P 450, le tableau montre que tous les composés donnent une réponse négative de l'inhibition des enzymes de ce dernier, ce qui caractérise son bon fonctionnement en éliminant tous les produits toxiques de leur métabolisme.

6.1.3. Toxicité potentielle

La toxicité de nos produits a été simulée sur la base de deux critères : la cancérogénécité chez la souris et l'inhibition du canal hERG (tableau 26).

Tableau 26 : prédiction de la toxicité potentielle des produits bioactifs

Paramètres	Galantamine	1	2	3	6	7	8
Cancérogénécité pour les souris	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Positive	Positive
inhibition de hERG	Risque faible	Risque medium	Risque élevé	Risque élevé	Risque élevé	Risque faible	Ambigu

D'emblée, il ressort de ce tableau un risque modéré à faible de blocage du canal potassique hERG respectivement par les composés **1** et **7** contrairement au composés **2**, **3**, **6** et **8** qui peuvent être à l'origine de malaises cardiaques. Par ailleurs, le test de cancérogénicité positif chez la souris révèle une toxicité potentielle du composé **7** qu'il est également nécessaire d'éliminer.

6.2.Docking moléculaire

A la lumière des résultats des analyses précédentes, il ressort clairement que seul le composé **1** correspondant au kaempférol a passé avec succès les différents filtres cités plus haut. Par conséquent une étude de modélisation par docking moléculaire des interactions de ce composé avec les deux enzymes AChE et BChE s'est avérée nécessaire pour expliquer les raisons de sa faible affinité par rapport à la galanthamine en vue d'apporter dans des travaux ultérieurs de chimie de synthèse, les modifications nécessaires au développement de sa structure de base.

Le docking moléculaire du Kaempférol avec l'AChE et la BChE s'exprime par une énergie d'interaction qui traduit le degré de stabilité du complexe formé (tableau 27).

Tableau 27 : Energies d'interaction du kaempférol et de la galanthamine avec l'AChE et la BChE

Composés	Energie d'interaction (Kcal/mole)	
	AChE	BChE
Kaempférol	-9,869	-9,346
Galanthamine	-10,669	-10,702

Ces énergies de liaison se traduisent par la mise en place dans la cavité catalytique des deux enzymes de plusieurs liaisons par le composé **1** que nous révélera l'analyse visuelle.

6.2.1. Analyse visuelle des interactions avec l'AChE

Le tableau 27 montre une différence d'énergie de liaison entre la galanthamine et le kaempférol, liée à leur mode de positionnement différent dans la cavité catalytique de l'enzyme (figure 64 a et b). En effet, la galanthamine se distingue par une activité anticholinestérasique plus élevée en étant bien enfouie dans le site catalytique ou CAS (bleue) ou elle occupe une position privilégiée contrairement au kaempférol qui lui chevauche entre ce dernier et le site périphérique ou PAS (en rouge).

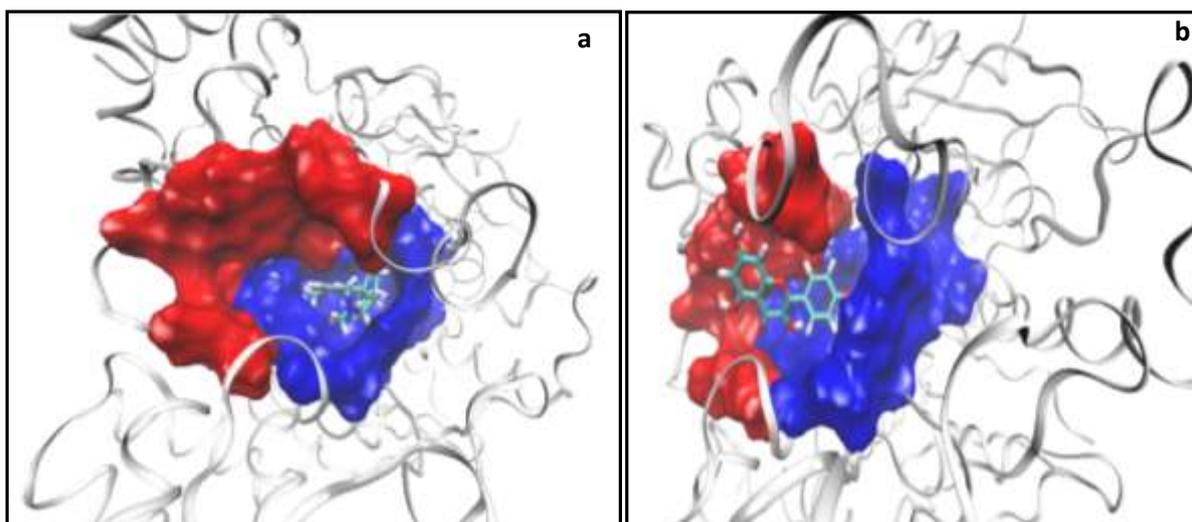


Figure 64 : Représentation 3D montrant le mode de positionnement de la galanthamine (a) et du kaempférol (b) dans les sites (CAS) (bleu) et PAS (rouge) de la cavité catalytique de l'AChE

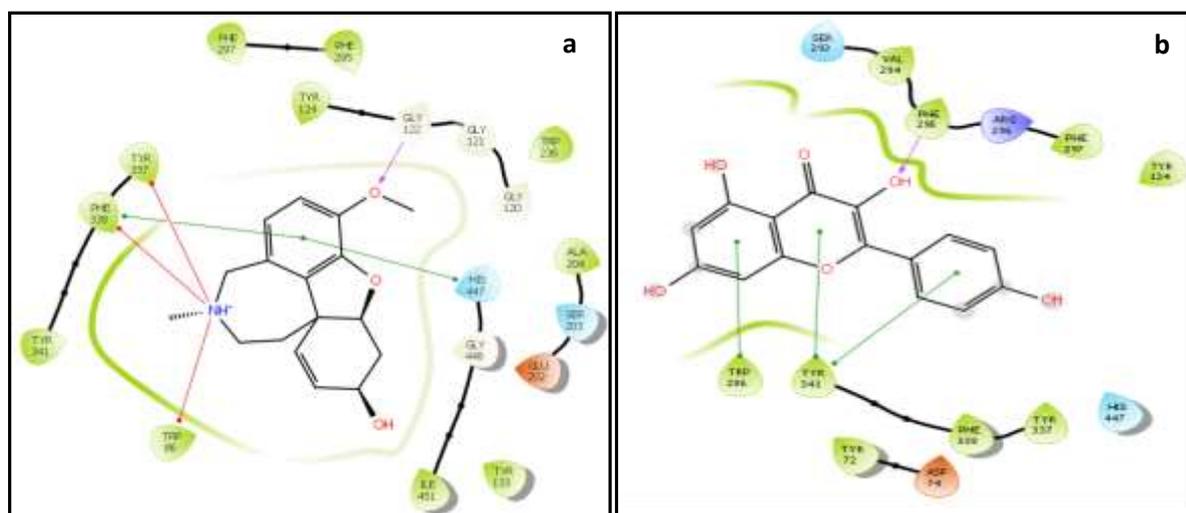


Figure 65 : Représentation 3D montrant les différents types d'interactions de la galanthamine (a) et du kaempférol (b) dans le site actif de l'AChE. Les lignes violettes représentent les liaisons hydrogène et les lignes vertes représentent les liaisons π - π .

Cette différence d'énergie ou d'activité peut encore être expliquée par le nombre et la nature des liaisons qu'implique chaque molécule dans la cavité catalytique de l'AChE (figure 65 a et b). En effet, la galanthamine établit 14 interactions dont une liaison hydrogène avec le résidu Gly 122, 3 liaisons de type P-cation avec 3 résidus du site CAS en l'occurrence Tyr 337, Phe 338 et Trp 86 et 2 liaisons π - π avec Phe 338 et His 447 qui est l'un des plus importants résidus de la triade catalytique de l'AChE. Enfin 8 interactions de type hydrophobique interviennent également dans la stabilité du complexe formé, en faisant appel aux résidus Phe 297, Phe 295, Tyr 124, Trp 216, Ala 204, Ile 451, Tyr 122 et Tyr 241.

Par contre le kaempférol n'engage que 10 interactions parmi lesquelles une liaison hydrogène avec Phe 295, 3 liaisons π - π dont l'une avec Trp 280 et les deux autres avec les résidus Tyr 341 du site PAS. Le kaempférol met également en jeu 6 interactions hydrophobiques avec les résidus Val 294, Phe 297, Tyr 124, Tyr 337, Phe 338 et Tyr 72.

Le positionnement d'une partie de la molécule dans le site PAS est responsable de sa faible activité avec l'AChE en l'éloignant considérablement de la triade catalytique His 447, Ser 203 et Glu 334 par des distances respectives de 6,49 Å, 8,04 Å et 9,93 Å.

6.2.2. Analyse visuelle des interactions avec la BChE

La figure 66 (a et b) nous révèle que le phénomène observé avec l'AChE se répète avec la BChE. En effet une partie du kaempférol est logé dans la CAS et l'autre dans la PAS qui l'empêche de réagir avec la triade catalytique formée des résidus His 438, Ser 198 et Glu 325. Par contre, la galanthamine n'est enfouie que dans le CAS qu'elle bloque totalement avec une bonne complémentarité stérique qui implique d'après la figure 67(a) de nombreuses interactions hydrophobiques, une liaison π -cation avec le résidu Trp 82 et une liaison H avec le résidu Glu 197 dont le rôle est très important dans la catalyse du substrat de cette enzyme (Wandhmmmer, 2012). Ceci confère au complexe formé une meilleure stabilité qui se traduit par une plus faible valeur de l'énergie d'interaction par rapport au kaempférol.

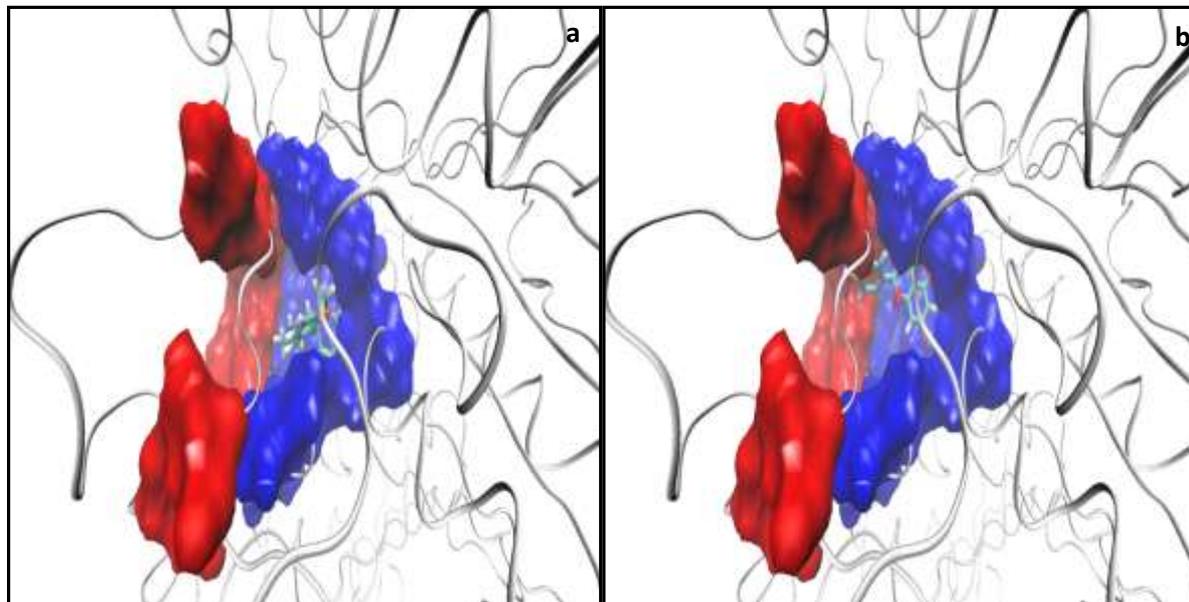


Figure 66 : Représentation 3D montrant le mode de positionnement de la galanthamine (a) et du kaempférol (b) dans les sites (CAS) (bleu) et PAS (rouge) de la cavité catalytique de la BChE

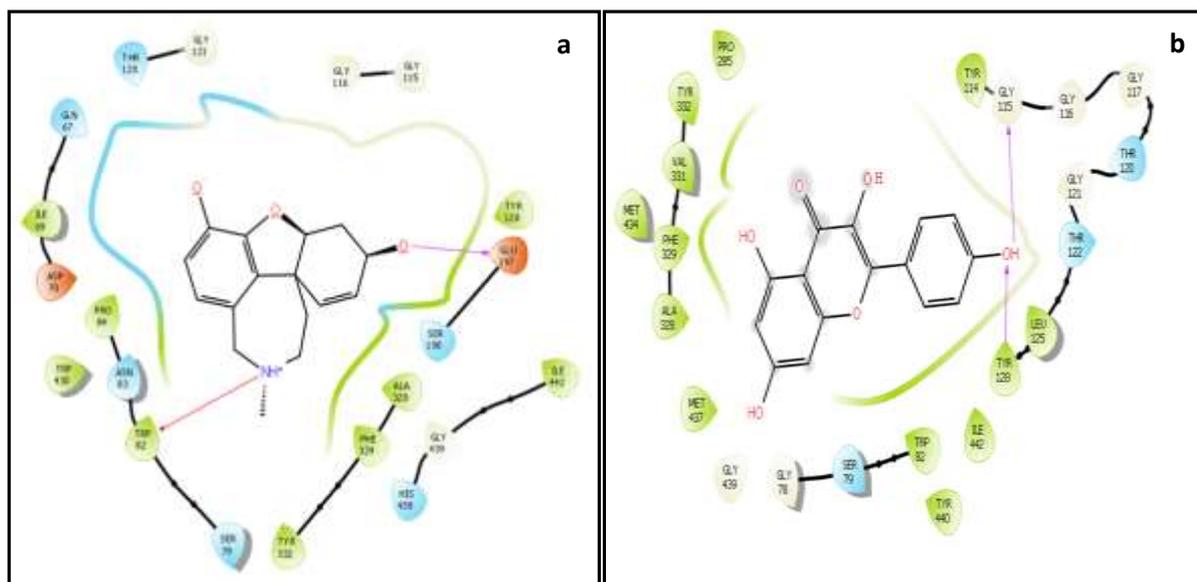


Figure 67 : Représentation 3D montrant les différents types d'interactions de la galanthamine (a) et du kaempférol (b) dans le site actif de la BChE. Les lignes violettes représentent les liaisons hydrogène et les lignes vertes représentent les liaisons π - π .

6.3.2. Analyse comparative des interactions avec l'AChE et BChE

Rappelons que d'après les résultats du tableau 23, la galanthamine présente le meilleur effet inhibiteur avec des taux d'inhibition atteignant 98% avec l'AChE et environ 88% avec la BChE. Ces valeurs élevées et le faible écart entre elles (10%) témoignent d'une haute affinité de presque égale importance de la galanthamine envers les deux enzymes. Il en va autrement avec le kaempférol dont l'activité diffère d'une enzyme à l'autre. En effet, le pouvoir inhibiteur du kaempférol est nettement plus élevé avec la BChE dont le taux avoisine 70% alors qu'il ne dépasse pas 35% dans le cas de l'AChE. Comme le montrent les figures 64 b et 66 b, le kaempférol réagit avec les deux enzymes en étant plus enfoui dans le CAS de la BChE que dans le CAS de l'AChE et implique différentes interactions dont les plus importantes sont, à titre comparatif, regroupées dans le tableau 28.

Tableau 28 : comparaison des interactions mises en jeu par le kaempférol avec l'AChE et BChE

Types d'interactions	AChE	BChE
π -cation	0	0
π - π	3	0
hydrophobiques	6	12
hydrogène	1	2
total	10	14

Comme le montre ce tableau, la forte activité qu'exerce le kaempférol en présence de la BChE s'explique, comparativement à l'AChE, par la mise en œuvre d'un nombre élevé de quatorze interactions dont douze sont de type hydrophobique et les deux autres de type hydrogène lesquelles sont, faut-il le rappeler, du point de vue énergétique les plus fortes parmi

les liaisons faibles. Dans le cas de l'AChE le kaempférol n'implique que dix interactions parmi lesquelles on compte six interactions hydrophobiques, trois interactions π - π de très faible énergie et une seule liaison hydrogène.

Le caractère hautement sélectif de la BChE pour le kaempférol mérite d'être développé davantage en mettant au point, par héli-synthèse, une nouvelle molécule dotée d'un pouvoir inhibiteur nettement plus fort que la galanthamine. Une telle opportunité est à saisir car jusqu'à l'heure actuelle, la littérature ne fait état d'aucune citation sur ce type de molécule combien indispensable en clinique pour diminuer l'activité de la BChE dont le niveau augmente considérablement, alors que celui de l'AChE diminue, dans les stades les plus avancés de la maladie d'Alzheimer (Darvesh, 2016).

Partie 3 :
Analyse Chimique et Biologique des
Métabolites Secondaires de
Myrtusnivellei

Chapitre I : Matériel et méthodes

1. Etude phytochimique

1.1. Matériel végétal

La récolte et l'identification de l'espèce *Myrtus nivellei* ont été réalisées dans les mêmes conditions que la plante *S. argel* (cf, paragraphe 1 P43).

1.2. Extraction des métabolites secondaires

Les parties aériennes de *Myrtus nivellei* d'une quantité de 500g ont été séchées et broyées puis soumises à une extraction par macérations successives dans le dichlorométhane (3x1L). La macération a eu lieu sous agitation magnétique, à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'ensemble des 3 macérations a été filtré puis concentré à sec par un évaporateur rotatif donnant un extrait sec de 75 g a été ainsi obtenu. Le marc issu de la filtration a subi une deuxième macération (3x24h) dans le méthanol (3x1L) donnant après évaporation à sec un autre extrait sec de 80,2 g. Enfin une dernière extraction réalisée selon le même protocole par le mélange de solvant éthanol/eau (1:1) a permis d'obtenir un extrait sec de 63g (figure 68).

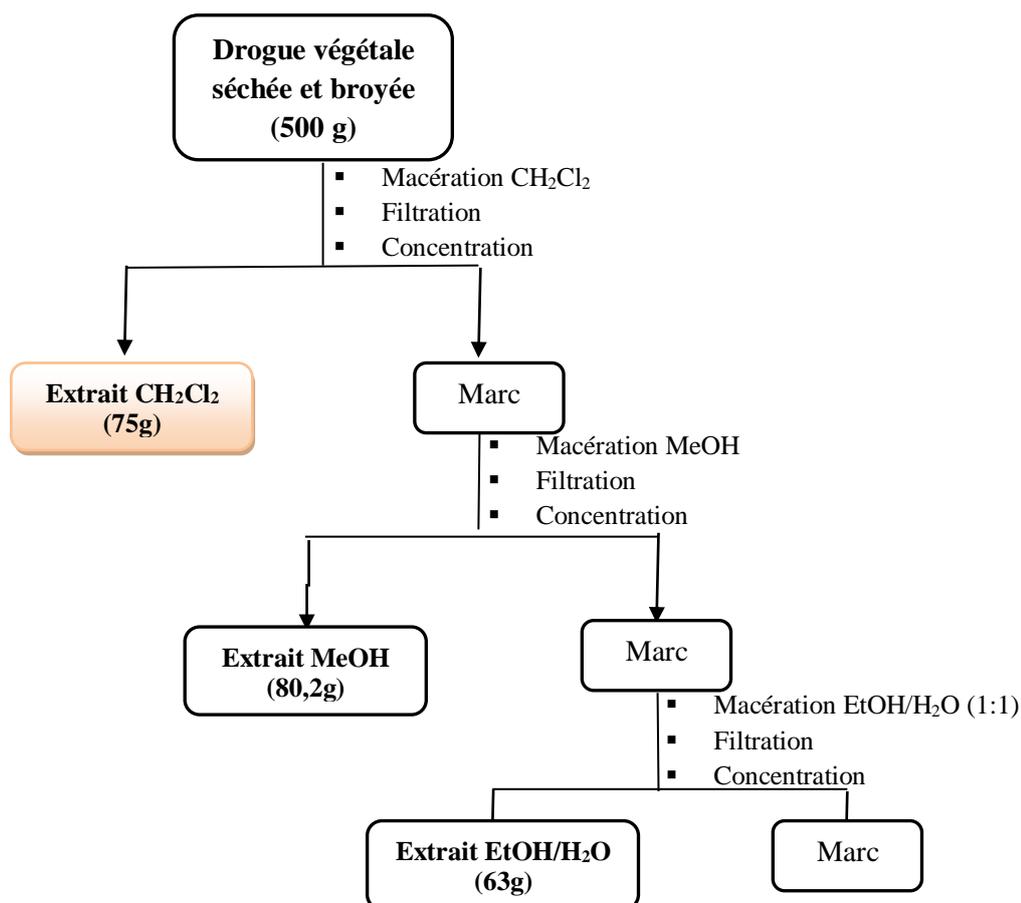


Figure 68: Protocole d'extraction de *Myrtus nivellei*

1.3. Dosage des polyphénols totaux

La même technique de dosage des polyphénols totaux de *S.argel* a été utilisée ici (Cf. paragraphe 1.4 p 46).

2. Analyse de l'activité antimicrobienne

2.1.Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est définie comme étant la concentration minimale d'un antibiotique capable d'inhiber toute croissance microbienne visible après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C.

La CMI a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu solide en utilisant la gélose de Mueller Hinton (MHA) coulée en boîtes de Pétri puisensemencée grâce à un inoculateur à têtes multiples (appareil de STEERS) permettant d'ensemencer au maximum 36 souches différentes par boîte.

Les valeurs de la CMI ont été relevées à la plus faible concentration de chaque extrait étudié ne montrant aucune croissance microbienne. L'absence de toxicité des solvants ayant servies pour la solubilisation des extraits a été vérifiée en utilisant des témoins contenant les solvants en question.

Les extraits à analyser sont préparés à différentes concentrations en pourcent 1,20 %, 0,60 %, 0,30 %, 0,15 %, 0,07%, 0,03 % et 0,015%. A partir d'une solution mère de 48 mg d'extrait solubilisés dans 2 mL de DMSO ou méthanol (selon la solubilité de l'extrait testé), nous avons réalisé une série de dilution au demi afin d'obtenir une gamme de dilution allant de 24 mg/mL à 0,3 mg/mL. La concentration à 1,20% est obtenue en introduisant 1 mL d'extrait de concentration 24 mg/mL dans une boîte de Pétri à laquelle on ajoute 19 mL de gélose de Mueller Hinton (MHA) préalablement liquifié au bain marie. Après homogénéisation, la boîte de Pétri est mise au repos pour permettre à la gélose de se solidifier. De même, pour la concentration de 0,6%, 1 mL d'extrait de concentration 12 mg/mL est mis dans une boîte de Pétri à laquelle sont ajoutés 19 mL de gélose. Le même procédé a été utilisé pour toutes les autres concentrations (Figure 69).

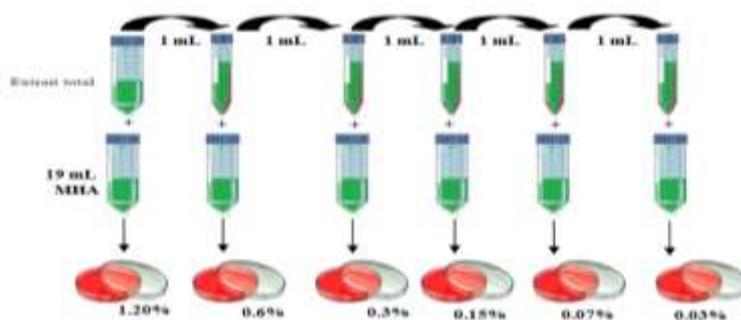


Figure 69: préparation des boîtes de pétri a différentes concentrations

L'étude de l'activité antimicrobienne de *M. nivellei* fut menée sur différentes bactéries, résistantes ou non aux antibiotiques, pouvant être impliquées dans les maladies opportunistes ou nosocomiales ainsi que dans toute autre maladie infectieuse.

Les tests antimicrobiens ont été réalisés en culture *in vitro* contre 36 souches microbiennes dont 23 bactéries Gram négatives, 12 bactéries Gram positives et une levure (*Candida albicans*) capables de se développer dans un milieu aérobie gélosé de Mueller Hinton (MHA) (Annexe).

Les souches en suspension dans un milieu liquide BH (Brain Heart cystéiné) sont prélevées et cultivées dans des tubes contenant un milieu MHA puis incubées pendant 24 heures dans une étuve à 37°C.

Après incubation, 10 mL de liquide RC (Ringer Cystéine) sont ajoutés dans les tubes MHA pour obtenir une suspension microbienne. Il est nécessaire de bien mélanger pour assurer une répartition homogène des micro-organismes dans chaque suspension à partir de laquelle est récupérée une goutte pour être ajoutée dans un tube contenant 10 mL de solution RC.

La culture dans les boîtes de Pétri est réalisée en prélevant 1 mL de chaque suspension qu'on verse dans les puits de la plaque de l'ensemencement automatique (Appareil de STEERS) (Figure 70). La surface de la gélose estensemencée avec un *inoculum* des différentes souches à étudier (l'inoculateur à têtes multiples de l'appareil de STEERS, permet d'ensemencer au maximum 36 souches différentes par boîte). Deux boîtes témoin "avant" et "après" l'ensemencement ont été réalisées pour vérifier la stabilité des concentrations des *inocula*. La culture des micro-organismes se fait par incubation des boîtes de Pétri pendant 24 heures, à 37 °C. Le dénombrement des colonies est réalisé visuellement pour connaître parmi les souchesensemencées, celles pouvant former une colonie (UFC).



Figure 70: Remplissage des puits de la plaque de l'ensemencement par les souches

Cette méthode ne tient compte que des micro-organismes viables qui peuvent se développer dans les conditions de croissance utilisées (Abedini, 2013).

2.2. Analyse par bioautographie

Il existe trois grandes techniques de bioautographie permettant de détecter l'activité antimicrobienne des substances naturelles d'origine végétale.

-La bioautographie directe : dans ce cas les micro-organismes poussent directement sur les plaques de chromatographie sur couche mince.

-La bioautographie de contact : où des plaques de CCM sont mises en contact avec le milieu de culture pendant un certain temps. Les composés antimicrobiens sont transférés de la plaque CCM vers le milieu de culture où des zones d'inhibition peuvent être observées (Rahalison et al., 1991).

-La bioautographie d'immersion : où une gélose ensemencée est appliquée sur la plaque CCM. Cette technique peut être considérée comme un hybride des bioautographies directe et de contact. C'est cette dernière technique que nous avons utilisée pour détecter les composés antimicrobiens de *Myrtus nivellei*.

Dans le but d'obtenir une concentration bactérienne de 10^4 bactéries/mL, chaque micro-organisme est cultivé dans un tube contenant un milieu MHA en pente. Après 24h, 10 mL de liquide RC (Ringer Cystéine) sont ajoutés au tube. Les dilutions sont réalisées suivant le protocole exposé dans la figure suivante :

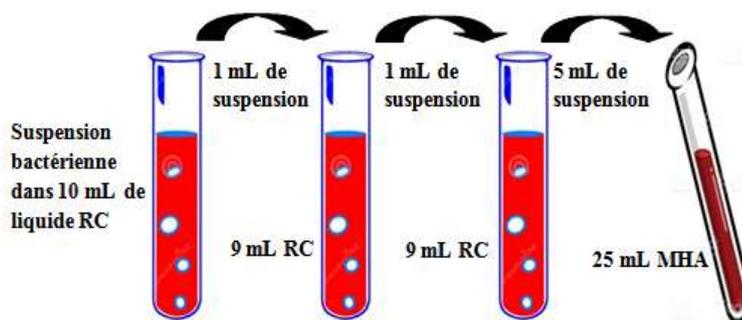


Figure 71: Préparation de la suspension gélose-bactérie

D'un autre côté, sur une même plaque CCM (silica gel 60 F 254, Merck) sont déposés les trois extraits dichlorométhane, méthanol et éthanol-eau de la plante *M. nivellei* et le développement réalisé dans le mélange de solvants AcOEt/MeOH/H₂O (100 :20 :10). La plaque CCM est ensuite stérilisée et introduite dans une boîte de culture carrée puis immergée par 30 mL de la suspension gélose-bactérie préalablement préparée avec une seule bactérie à la fois. Après incubation pendant 24h à 37°C, la boîte de pétri est vaporisée à sa surface par une solution de *p*-iodonitrotétrazolium (INT) à 2 mg/mL. La plaque est de nouveau incubée pendant 4 heures. L'INT vire alors vers la couleur violette et laisse apparaître des zones claires correspondant à l'inhibition de la croissance bactérienne.

3. Isolement des métabolites secondaires

3.1. Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

Il s'agit d'une nouvelle technique chromatographique de séparation des produits naturels par un système de solvants biphasique liquide-liquide sans phase stationnaire solide. La séparation des molécules s'effectue sur la base de leur coefficient de partage entre les deux phases liquides non miscibles. Les systèmes de solvants utilisés sont constitués d'un mélange de deux à cinq solvants de polarité différente tel que le système Arizona : heptane/AcOEt/MeOH/H₂O (Michel, 2011;Oka et al., 1991).

L'appareil utilisé dans ce travail (FastCPC, Kromaton, Angers) est constitué d'une colonne rotative de 200 mL. Lors de la mise en route, le dispositif crée un champ de centre centrifuge pour maintenir la phase liquide stationnaire au sein de la colonne que traversera la phase mobile liquide par pompage en mode ascendant ou descendant suivant le choix.

3.2. Choix du système de solvants Arizona

Afin de parvenir à une bonne séparation des produits de *M. nivellei* par CPC, il nous a semblé judicieux de définir au préalable le mélange de solvants qui convient le mieux à ce type de chromatographie. A ce titre, plusieurs systèmes de solvants Arizona dans différentes proportions ont été préparés pour être analysés par CCM (tableau 29).

Tableau 29: compositions de différents systèmes Arizona analysés

Arizona	Heptane	Acétate d'éthyle	Méthanol	Eau
P	6	5	6	5
R	2	1	2	1
T	3	1	3	1
U	4	1	4	1
W	6	1	6	1
X	9	1	9	1
Z	1	0	1	0

L'analyse par CCM a pour but de nous aider à déterminer le système Arizona dont le coefficient de partage se rapproche de 1. Pour ce faire une quantité de 10 mg de l'extrait à analyser est déposée dans différents tubes à hémolyse en présence de l'un des systèmes Arizona préalablement préparé. L'agitation au vortex, des mélanges obtenus, fait apparaître deux phases non miscibles à partir desquelles 10 μ L de chaque phase sont prélevés et déposés séparément sur une même plaque CCM (figure 72). Après migration dans le système de solvant suivant : AcOEt/MeOH/H₂O (100:20:10), la plaque est analysée à la lumière du jour aux deux longueurs d'onde (254 et 365 nm) puis après révélation à l'anisaldéhyde sulfurique.

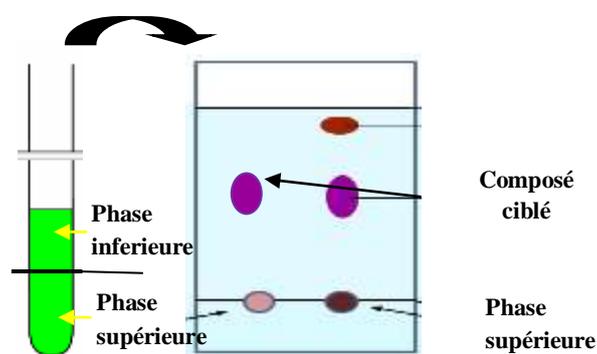


Figure 72: Développement des deux phases sur plaque CCM

3.3. Fractionnement bioguidé

Suite à l'analyse par bioautographie des trois extraits de *M. nivellei*, seul l'extrait ayant présenté une bonne activité antimicrobienne a été soumis à un fractionnement par CPC. Un litre du système Arizona déterminé précédemment par CCM a été préparé dans une ampoule à décanter. Après agitation et repos, les deux phases organiques et aqueuse sont récupérées séparément chacune dans un flacon. Une quantité de 2g de l'extrait de *M. nivellei* à analyser est solubilisée dans 5 mL de chaque phase puis filtrée. Les deux solutions sont injectées avec une vitesse du Run de 1600 rpm en utilisant le mode ascendant où la phase stationnaire correspond à la phase aqueuse et la phase mobile correspond à la phase organique qui sera

alors pompée à contre sens du champ de force centrifuge. Sept fractions ont été récupérées dans des tubes à essai de 20 mL grâce à un collecteur automatique puis séchées au mi-vac, ces fractions ont été contrôlées par CCM dans le système de solvants AcOEt/MeOH/H₂O (100:20:10) et par CLHP analytique en utilisant le même protocole que dans le cas de *S. argel* avec le même mélange de solvants A/B (A :H₂O/0,1% d'acide formique et B : acétonitrile) (tableau12).

A la lumière des résultats des analyses par CCM et CLHP analytique, seuls les fractions CPC 5 et 7 ont subi une purification par CLHP préparative en utilisant le gradient de 10% à 50% (B) pendant 20 min puis de 50% à 100% (B) pendant 5 min et enfin en isocratique à 100% B pendant 10 min. ce protocole a conduit à l'isolement de deux produits purs.

Chapitre II : Résultats et discussion

1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols des extraits de *Myrtus nivellei* a été évaluée par la méthode de Folin-Ciocalteu déjà utilisée dans le cas de *S.argel*. Rappelons que les résultats du dosage des polyphénols totaux sont exprimés en g d'équivalent en acide gallique (EAG) par rapport à 100 g d'extrait. Nous avons considéré un extrait comme étant riche en polyphénols, lorsque sa teneur est supérieure à 5 g EAG/100 g d'extrait(Liu et al., 2009). La figure 73 montre que la teneur en polyphénols des extraits polaires méthanolique et hydro-alcoolique évaluée respectivement à 34,16 g d'EAG/100 g et 33,50g d'EAG/100 g, est nettement élevée que celle de l'extrait dichlorométhane qui n'affiche que 0,80g EAG/100 g d'extrait.

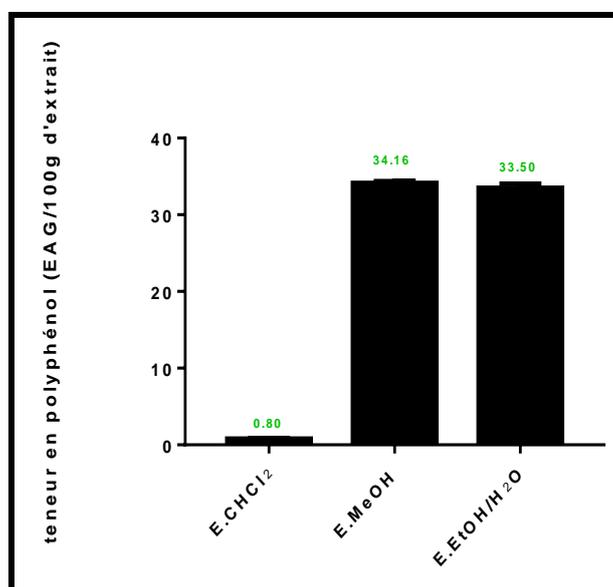


Figure 73:Composition en polyphénols des extraits de *Myrtus nivellei*

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Touaibia et al., (2014) qui montrent que les extraits polaires éthanolique et méthanolique sont très riches en polyphénols avec des teneurs respectives de 734 µg EAG/mg ES et 348 µg EAG/mg ES.

2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

2.1. La CMI

Notre choix d'étudier l'activité antimicrobienne de la plante *M. nivellei* revient en premier lieu à son utilisation en pharmacopée populaire comme remède contre diverses affections d'origine microbienne de la peau, du foie et gastro-intestinale. L'autre raison qui a guidé notre choix est l'absence ou les peu de travaux réalisés sur l'activité antimicrobienne de cette plante.

Notre étude consiste à déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de chacun des trois extraits dichlorométhane, méthanol et éthanol/eau sur une série de trente-six microorganismes dont certains sont résistants aux antibiotiques (annexe). Afin d'aboutir à des CMI les plus précises possibles, pour chaque extrait, nous avons utilisé une large gamme de concentration allant de 1,20 mg/mL à 0,03 mg/ml.

Les résultats du tableau 30 montrent que sur les trente-six souches microbiennes étudiées, chaque extrait de *M. nivellei* inhibe en moyenne une quinzaine de microorganismes dont neuf sont simultanément sensibles aux trois extraits mais avec des CMI différentes. A ce titre sont à citer les deux souches à gram négatifs (**18**) et (**19**) et les sept souches à gram positif (**25**), (**26**), (**27**), (**29**), (**32**), (**33**) et (**34**).

Il ressort également de ce tableau que les trois extraits dichlorométhane, méthanol et éthanol/eau sont beaucoup plus actifs sur les bactéries à gram négatif. Cette sensibilité se révèle plus marquée avec l'extrait dichlorométhane qui affiche les plus faibles CMI sauf dans le cas de la levure *Candida albicans* qui oppose une nette résistance. Ces valeurs augmentent en présence de l'extrait méthanolique qui s'avère relativement moins actif avec des CMI qui varient pour la plupart entre 0,3 et 0,6 mg/mL. Cependant cet extrait contrairement à l'extrait précédent, inhibe fortement la croissance de *candida albicans*.

Quant à l'extrait éthanol/eau, les résultats semblent mitigés avec l'inhibition de sept bactéries à gram positif *candida albicans* mais reste sans effet sur les cinq autres. Dans le cas des bactéries inhibées, les CMI sont très faibles allant de 0,07 à 0,6 mg/mL et sont nettement supérieures à 1,20 mg/mL dans le cas des souches résistantes telles que *Staphylococcus aureus* (souches **28**, **30** et **31**), *Mycobacterium smegmatis* (**34**) et *Streptococcus agalactiae* (**35**).

Pour revenir aux groupes de bactéries à gram négatif, le tableau montre que malgré la résistance de la plupart de ces souches à l'égard des trois extraits de *M. nivellei*, l'extrait hydroalcoolique se distingue par l'inhibition de huit bactéries dont certaines sont également sensibles à l'un ou l'autre extrait avec différentes CMI. A ce titre sont à citer les trois souches *Acinetobacter baumani* (**17**, **18** et **19**), les trois souches *Pseudomonas aeruginosa* (**14**, **15** et **21**), la souche *Stenotrophomonas maltophilia* (**20**) et enfin la souche *Yersinia pseudotuberculosis* (**1**). Seule l'espèce *Proteus mirabilis* (**13**) est uniquement sensible à l'extrait éthanol/eau.

Tableau 30 : CMI des trois extraits de *M. nivellei*

	N°	Micro-organismes	CMI (mg/mL)		
			Extrait CH ₂ Cl ₂	Extrait MeOH	Extrait EtOH/H ₂ O
Bactéries Gram-négatif	1	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> 2777	>1,20	0,15	0,15
	2	<i>Escherichia coli</i> 10269	>1,20	>1,20	>1,20
	3	<i>Escherichia coli</i> 0137	>1,20	>1,20	>1,20
	4	<i>Escherichia coli</i> ATCC	>1,20	>1,20	>1,20
	5	<i>Enterobacter aerogenes</i> 9004	>1,20	>1,20	>1,20
	6	<i>Enterobacter cloacae</i> 11050	>1,20	>1,20	>1,20
	7	<i>Serratia macrescens</i> 10267	>1,20	>1,20	>1,20
	8	<i>Citrobacter freundii</i> 11041	>1,20	>1,20	>1,20
	9	<i>Citrobacter freundii</i> 11042	>1,20	>1,20	>1,20
	10	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 11016	>1,20	>1,20	>1,20
	11	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 10272	>1,20	>1,20	>1,20
	12	<i>Salmonella</i> 11033	>1,20	>1,20	>1,20
	13	<i>Proteus mirabilis</i> 02116.4	>1,20	>1,20	1,20
	14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	>1,20	>1,20	0,6
	15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 10280	>1,20	>1,20	0,3
	16	<i>Salmonella typhimurium</i> 11037	>1,20	>1,20	>1,20
	17	<i>Acinetobacter baumannii</i> 09007	>1,20	0,3	0,15
	18	<i>Acinetobacter baumannii</i> 109010	0,15	0,3	0,15
	19	<i>Acinetobacter baumannii</i> 09011	0,6	0,15	0,07
	20	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 616	>1,20	1,20	0,07
	21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 09008	0,15	>1,20	>1,20
	22	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 10276	>1,20	>1,20	>1,20
	23	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 10278	>1,20	>1,20	>1,20
Bactéries Gram-positif	24	<i>Corynebacterium T25-17</i>	0,3	0,3	0,15
	25	<i>Streptococcus pyogenes</i> 16141	0,15	0,3	0,6
	26	<i>Staphylococcus aureus</i> 8240	0,15	0,6	0,3
	27	<i>Staphylococcus aureus</i> 8239	0,15	0,3	0,3
	28	<i>Staphylococcus aureus</i> 8143	0,15	>1,20	>1,20
	29	<i>Staphylococcus aureus</i> 8241	0,15	0,3	0,15
	30	<i>Staphylococcus aureus</i> 8147	0,15	0,6	>1,20
	31	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5001	0,3	1,20	>1,20
	32	<i>Staphylococcus lugdunensis</i> T26A3	0,07	0,15	0,15
	33	<i>Staphylococcus warneri</i> T12A12	0,15	0,30	0,6
	34	<i>Mycobacterium smegmatis</i> 5003	0,3	0,60	>1,20
	35	<i>Streptococcus agalactiae</i> T25-7.	0,3	0,60	>1,20
Levure	36	<i>Candida albicans</i> 10286	>1,20	0,15	0,07

Il s'agit ici probablement d'une première étude plus approfondie sur l'effet antimicrobien de différents extraits de *Myrtus nivellei* car à ce jour peu de travaux ont été réalisés dans ce contexte. Seule l'étude de Touaibia et al., 2014, menée sur 14 bactéries différentes a montré que l'extrait méthanolique ne pouvait inhiber que seulement 4 bactéries dont 2 à gram positif

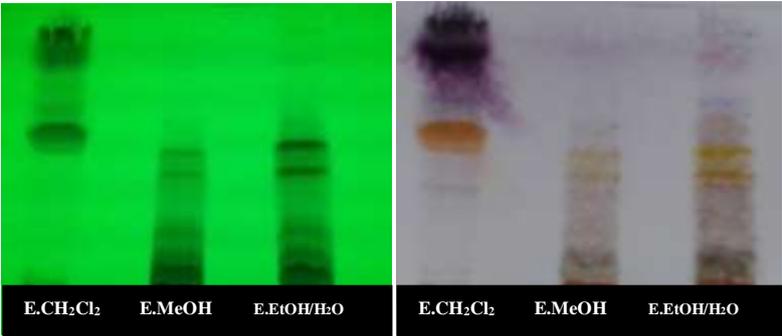
(*Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae*) et 2 autres à gram négatif (*Salmonella typhi* et *Shigella flexineri*).

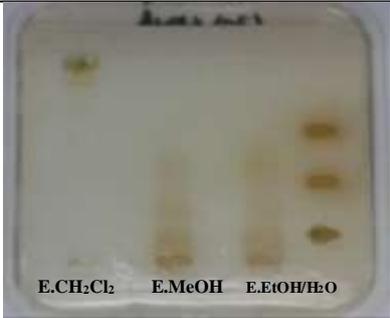
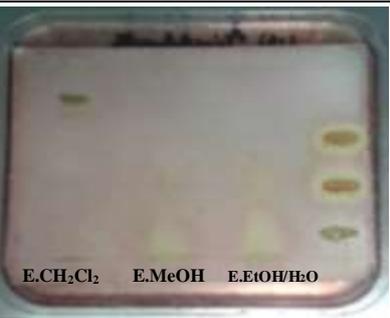
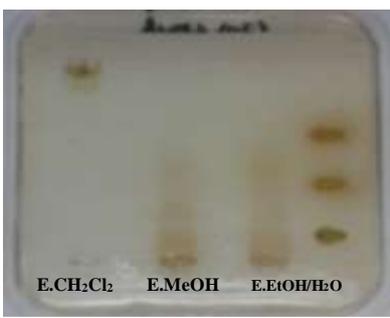
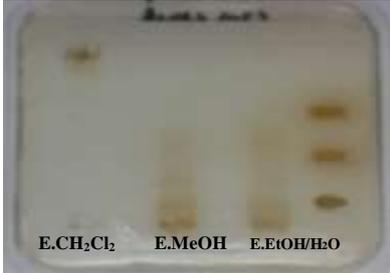
Selon les travaux de Cottiglia et al., (2012) et de Sumbul et al., (2011), l'activité antimicrobienne de *Myrtus communis* relève de sa richesse en polyphénols. La forte teneur de ces derniers, dans les différents extraits de la plante *Myrtus nivellei*, serait probablement responsable de l'inhibition de la croissance microbienne observée dans le tableau 30. Le mécanisme d'action des polyphénols serait lié à la présence sur leur structure de groupements hydroxyles libres capables de se fixer sur l'enveloppe bactérienne créant ainsi un déséquilibre de la perméabilité membranaire et un blocage de la chaîne respiratoire (Rhayour et al., 2003).

2.2. Choix de l'extrait optimum pour l'isolement des molécules bioactifs

Afin de bioguider l'isolement des composés antimicrobiens les plus actifs, les extraits dichlorométhanolique, méthanolique et hydro-alcoolique ont été analysés par la méthode bioautographie d'immersion à l'égard de 4 bactéries sensibles à au moins deux extraits simultanément. Il s'agit de : *Acinetobacter baumannii* 09010, *Stenotrophomonas maltophilia* 616, *Yersinia pseudotuberculosis* 2777 et *Staphylococcus lugdunensis* T26A3. La lecture des plaques CCM a été réalisée sous UV à 254 nm et après révélation par l'anisaldéhyde sulfurique (tableau 31).

Tableau 31 : CCM (révélée à 254 nm et à l'anisaldéhyde sulfurique) et bioautographie d'immersion des extraits CH₂Cl₂, MeOH et EtOH/H₂O à l'égard des quatre bactéries

Souches bactériennes	Bioautographie	
	254 nm	Anisaldéhyde sulfurique
Plaques témoins		
	E.CH ₂ Cl ₂ E.MeOH E.EtOH/H ₂ O	E.CH ₂ Cl ₂ E.MeOH E.EtOH/H ₂ O

<i>Acinetobacter baumannii</i>	 <p>E.CH₂Cl₂ E.MeOH E.EtOH/H₂O</p>	 <p>E.CH₂Cl₂ E.MeOH E.EtOH/H₂O</p>
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	 <p>E.CH₂Cl₂ E.MeOH E.EtOH/H₂O</p>	 <p>E.CH₂Cl₂ E.MeOH E.EtOH/H₂O</p>
<i>Stenotrophomonas maltipholia</i>	 <p>E.CH₂Cl₂ E.MeOH E.EtOH/H₂O</p>	 <p>E.CH₂Cl₂ E.MeOH E.EtOH/H₂O</p>
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	 <p>E.CH₂Cl₂ E.MeOH E.EtOH/H₂O</p>	 <p>E.CH₂Cl₂ E.MeOH E.EtOH/H₂O</p>

Les chromatogrammes montrent que extraits méthanolique et hydro-alcoolique inhibent la croissance des quatre bactéries, tandis que l'extrait dichlorométhane inhibent la croissance de trois bactéries : *Acinetobacter baumannii* 09010, *Stenotrophomonas maltipholia* et *Staphylococcus lugdunensis*T26A3 (tableau 31). La très faible valeur de la CMI observé en présence de la bactérie *Staphylococcus lugdunensis*T26A3 (0,07 mg/mL) avec l'apparition de la plus importante zone d'inhibition furent pour nous les principaux critères de choix de l'extrait dichlorométhane pour l'isolement des produits responsables de cette activité.

3. Isolement des molécules bioactives

L'extrait dichlorométhane a été préalablement analysé par CCM et par CLHP analytique montrant la complexité structurale de cet extrait (figure 74) que nous avons tenté de purifier par CPC.

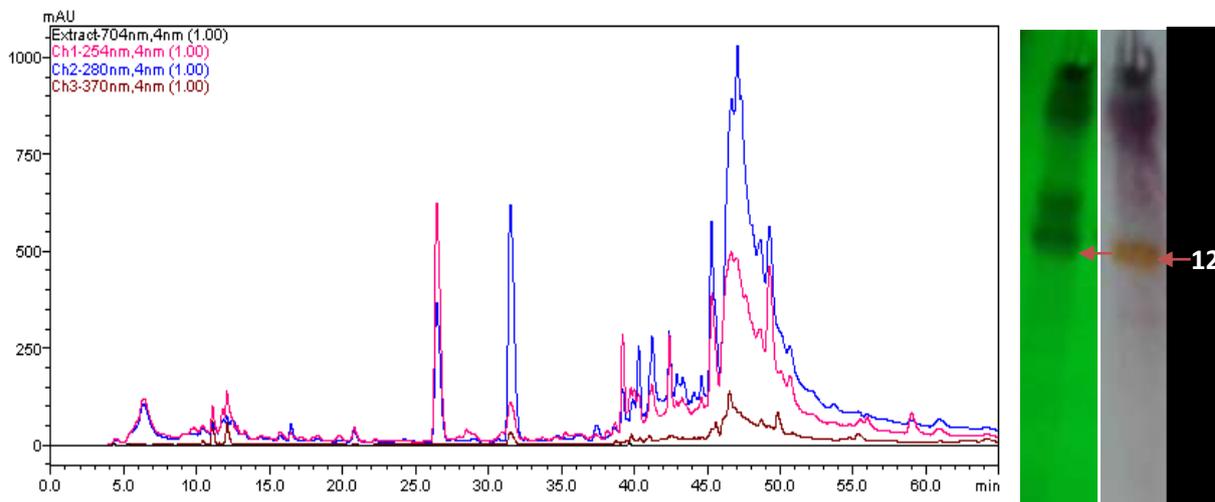


Figure 74 : Profil chromatographique de l'extrait CH₂Cl₂

Pour réaliser une bonne séparation par CPC des molécules présentes dans l'extrait dichlorométhane, il était important de déterminer au préalable le système de solvants biphasique de type Arizona dont le coefficient de partage (Kd) est le plus proche de 1. Parmi les différents systèmes Arizona que nous avons essayé (P, R, T, U, V, W, X, Z), nous avons choisi le système W dont le Kd déterminé par CLHP est égal à 0,97.

La phase aqueuse choisie comme phase stationnaire a été introduite en premier lieu dans la colonne. La phase organique a été employée comme phase mobile et a été introduite en second lieu en mode ascendant dans la colonne tout en respectant les conditions opératoires choisies (vitesse de rotation de 1600 rpm, débit 8 mL/min). L'élution a été réalisée pendant 40 min. Les produits majoritaires se retrouvent dans les fractions 5 et 7 dont la purification par CLHP préparative a permis d'obtenir les deux produits purs **12** (54 mg) et **13** (1,4 mg) (figure 75) qui sont en cours d'identification.

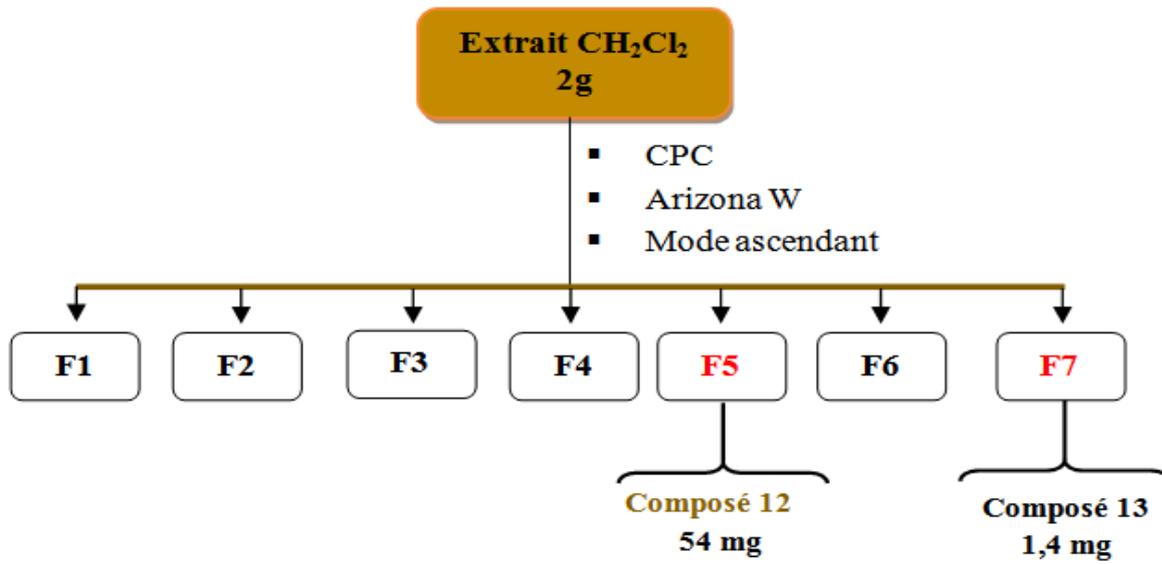


Figure 75: Schéma de purification de 2 g de l'extrait CH₂Cl₂

Conclusion générale et perspective

Le présent travail avait pour but de préciser l'intérêt des métabolites secondaires de deux plantes du Sahara Algérien très utilisées en pharmacopée populaire : l'Apocynacea *Solenostemma argel* et la Myrtaceae *Myrtus nivellei*

Dans ce contexte, nous avons mené une étude phytochimique des deux plantes accompagnée d'une étude de leur activité biologique notamment anticholinestérasique pour *Solenostemmaargel* et antimicrobienne pour *Myrtus nivellei*

Concernant l'espèce *Solenostemma argel*, une évaluation préliminaire de l'activité anticholinestérasique de ses trois extraits, brut, chloroformique et éther de pétrole à l'égard des deux enzymes AChE et BChE par les méthodes colorimétriques au Fast Blue B Salt et d'Ellman nous a conduit à un fractionnement bioguidé de l'extrait chloroformique. En faisant appel à des techniques de pointe telles que la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone, nous avons pu identifier la structure de huit molécules différentes dont :

- 5 composés phénoliques : 3 flavonoïdes, 1 acide phénolique (acide *p*-hydroxybenzoïque) et 1 phényléthanoïde
- 1 norisoprénoïde volatil (déhydrovomifoliol)
- 2 stéroïdes

Ces trois classes structurales mettent en évidence l'existence de trois voies métaboliques différentes, chacune d'elles reposant sur un squelette de base porteur de multiples substitutions résultant de diverses réactions enzymatiques responsables de la variabilité structurale.

D'un point de vue strictement phytochimique, cette identification structurale nous révèle que concernant le déhydrovomifoliol et l'acide *p*-hydroxybenzoïque, il s'agit de première citation à l'état naturel à l'égard de l'espèce *Solenostemmaargel*.

Il s'agit donc d'une contribution tout à fait originale pour l'espèce et pour la littérature phytochimique.

L'autre étude sur l'inhibition des deux enzymes AChE et BChE fut menée à partir des produits identifiés précédemment en faisant appel à la méthode d'Ellman sur microplaques. Les résultats montrent que parmi les huit composés identifiés, six d'entre eux sont actifs sur les deux enzymes à des degrés différents avec toutefois une nette distinction pour le

kaempférol. En effet cette molécule, dont l'activité demeure en deçà de celle de la galantamine utilisée ici comme référence, se distingue malgré tous des autres produits par un meilleur pouvoir inhibiteur à l'égard des deux enzymes tels en témoignent les taux d'inhibition qui atteignent près de 35 % dans le cas de l'AChE et près de 70 % dans le cas de la BChE. Ces valeurs nous renseignent également sur la différence de comportement du kaempférol qui se manifeste par une activité relativement plus forte à l'égard de la BChE. Ce caractère hautement sélectif a pu être élucidé par la technique de prédiction du mode de liaison et de modélisation des interactions par docking moléculaire avec Glide. L'analyse visuelle des interactions générées par ce programme révèle que contrairement à l'AChE, le kaempférol est mieux enfoui dans la cavité catalytique de la BChE et fait intervenir quatorze interactions différentes contre seulement dix dans le cas de l'AChE.

Il est important de souligner encore une fois l'originalité de ce travail qui décrit pour la première fois l'activité anticholinestérasique de la plante *S. argelet* de ses quatre produits suivants :

- 14,15-dihydroxyprogesterone
- 14,15-dihydroxyprogesterone-15- β -D-glucopyranoside
- kaempférol-3-glucopyranosyl (1 \rightarrow 6)rhamnopyranose
- solargine I.

Concernant l'espèce *Myrtus nivellei*, partant de son utilisation séculaire en médecine traditionnelle pour traiter les maladies infectieuses, des tests de mise en évidence et d'évaluation de son activité antimicrobienne ont été réalisés à partir de ses trois extraits, dichlorométhane, méthanol et éthanol/eau sur une gamme de 36 microorganismes reconnus pour leur pathogénicité chez l'homme. La CMI de chaque extrait a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu solide sur gélose de Muller Hinton (MHA). Les résultats montrent que chaque extrait présente une activité contre au moins une quinzaine de bactéries parmi lesquelles neuf d'entre elles sont inhibées par les trois extraits avec des CMI différentes. Par ailleurs, les bactéries à Gram négatif sont plus sensibles à ces trois extraits que les bactéries à Gram positif. Cette différence de sensibilité nous renseigne sur un éventuel effet membranaire exercé par les produits de ces extraits et qui devient plus prononcé en présence de l'extrait dichlorométhane qui affiche les plus faibles CMI mais reste sans effet sur la levure *Candida albicans*. L'analyse par bioautographie d'immersion en présence de quatre bactéries : *Acinetobacter baumannii* 09010, *Stenotrophomonas maltophilia* 616, *Yersinia*

pseudotuberculosis 2777 et *Staphylococcus lugdunensis* T26T3 a permis de confirmer la forte activité de l'extrait dichlorométhane dont le fractionnement bioguidé par CPC a conduit à l'isolement de deux produits purs qui sont toujours en cours d'identification.

Ce travail qui s'inscrit dans le cadre de la valorisation des deux plantes *Solenostemma argel* et *Myrtus nivellei* constitue une étape préliminaire ouvrant la voie à d'autres perspectives de recherche :

-Sur le plan phytochimique : il conviendrait d'identifier un plus grand nombre de métabolites secondaires qui caractérisent les deux plantes afin d'atteindre de nouvelles structures, notamment chez les flavonoïdes et les prégnanes ; notre étude ici n'étant qu'initiale.

-Sur le plan des activités biologiques: les résultats de ce travail ouvrent un large champ d'étude dans ce domaine pour les deux espèces *S. argel* et *M. nivellei* dont les activités anticholinestérasique et antimicrobienne n'ont fait l'objet d'aucune étude préalable

-Optimisation de la structure de base des molécules bioactives de *S. argel*, notamment le kaempférol, par hémi-synthèse à des fins thérapeutiques de la maladie d'Alzheimer.

-Etude des mécanismes d'action des molécules bioactives de *M. nivellei* sur les microorganismes tests et déterminer la relation structure-activité surtout contre les formes évolutives de résistances aux antibiotiques.

-Etude de la toxicité et de l'activité des métabolites bioactifs *in vivo*.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abedini, A., 2013. Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit.(Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes (PhD Thesis). Université du Droit et de la Santé-Lille II.
- Aderogba, M.A., Ndhala, A.R., Van Staden, J., 2013. Acetylcholinesterase inhibitory activity and mutagenic effects of *Croton penduliflorus* leaf extract constituents. *South Afr. J. Bot.* 87, 48–51.
- Al-Jafari, A.A., Kamal, M.A., Greig, N.H., Alhomida, A.S., Perry, E.R., 1998. Kinetics of human erythrocyte acetylcholinesterase inhibition by a novel derivative of physostigmine: phenserine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248, 180–185.
- Ankri, J., 2009. Prévalence, incidence et facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer. *Gérontologie Société* 32, 129–141.
- Arrault, A., 2007. Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma (PhD Thesis). Université d'Orléans.
- Augry, F., Darchy, A., de Rotrou, J., Guelfi, M.C., Forette, F., 1997. Réponse à la tacrine: bilan de deux ans de prescription. *J. Pharm. Clin.* 16, 183–8.
- Bahrani, H., Mohamad, J., Paydar, M.J., Rothan, H.A., 2014. Isolation and characterisation of acetylcholinesterase inhibitors from *Aquilaria subintegra* for the treatment of Alzheimer's disease (AD). *Curr Alzheimer Res* 11, 206–14.
- Bassil, S., 2015. Etude de la répartition structurale des acides féruliques et p-coumarique dans la chènevotte et la poudre organique de chanvre (*Cannabis sativa*). Exploration des voies de fractionnement pour l'obtention d'extraits à valeur ajoutée (PhD Thesis). Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- Battandier, M.J.-A., Trabut, L., 1911. Contribution à la flore du pays des Touaregs. *Bull. Société Bot. Fr.* 58, 623–629.
- Bensadon, A.-C., Marie, E., Morelle, A., 2011. Enquête sur le Mediator®. Rapp. Définitif.
- Bonnet, J., 2014. Utilisation raisonnée des antibiotiques en élevage porcin. Démarche d'accompagnement dans sept élevages (PhD Thesis).
- Boutaghane, N., 2013. Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales Algériennes *Genista ulicina* Spach (Fabaceae) et *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch. Bip.) Coss. & Kralik ex Batt (Asteraceae).
- Bouzabata, A., Bazzali, O., Cabral, C., Gonçalves, M.J., Cruz, M.T., Bighelli, A., Cavaleiro, C., Casanova, J., Salgueiro, L., Tomi, F., 2013. New compounds, chemical composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oil from *Myrtus nivellei* Batt. & Trab., an endemic species of Central Sahara. *J. Ethnopharmacol.* 149, 613–620.
- Bouzabata, A., Casanova, J., Bighelli, A., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., Tomi, F., 2016. The Genus *myrtus* L. in Algeria: composition and biological aspects of essential oils from *M. communis* and *M. nivellei*: a review. *Chem. Biodivers.* 13, 672–680.
- Bremer, B., Bremer, K. are, Chase, M., Fay, M., Reveal, J., Soltis, D., Soltis, P., Stevens, P., 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.*
- Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales. Technique et documentation Lavoisier.
- Bruneton, J., n.d. Pharmacognosie-Phytochimie, plantes médicinales, 4e éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc-Éditions médicales internationales, 2009, 1288 p. ISBN 978-2-7430-1188-8.

- Bu-Abbas, A., Clifford, M.N., Ioannides, C., Walker, R., 1995. Stimulation of rat hepatic UDP-glucuronosyl transferase activity following treatment with green tea. *Food Chem. Toxicol.* 33, 27–30.
- Budzianowski, J., 1990. Kaempferol glycosides from *Hosta ventricosa*. *Phytochemistry* 29, 3643–3647. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85292-N](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)85292-N)
- Burns, A., Gauthier, S., Perdomo, C., Pratt, R., 2000. Donepezil provides long-term clinical benefits for patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 247.
- Carr, J.D., 1988. Combretaceae in southern Africa. Tree Society of Southern Africa.
- Chaput, L., Martinez-Sanz, J., Quiniou, E., Rigolet, P., Saettel, N., Mouawad, L., 2016. vSDC: a method to improve early recognition in virtual screening when limited experimental resources are available. *J. Cheminformatics* 8, 1.
- Cheung, J., Gary, E.N., Shiomi, K., Rosenberry, T.L., 2013. Structures of human acetylcholinesterase bound to dihydrotanshinone I and territrem B show peripheral site flexibility. *ACS Med. Chem. Lett.* 4, 1091–1096.
- Cho, J.-Y., Moon, J.-H., Seong, K.-Y., Park, K.-H., 1998. Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 2273–2276.
- Chopra, I., O'Neill, A.J., Miller, K., 2003. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist. Updat.* 6, 137–145.
- Chowdhury, S., Shivani, Kumar, S., 2016. In vitro anti-acetylcholinesterase activity of an aqueous extract of *Unicaria tomentosa* and in silico study of its active constituents. *Bioinformatics* 12, 112–118. <https://doi.org/10.6026/97320630012112>
- Collin, S., Cruzet, J., 2011. Polyphénols et procédés: transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire. Lavoisier.
- Conforti, F., Rigano, D., Menichini, F., Loizzo, M.R., Senatore, F., 2009. Protection against neurodegenerative diseases of *Iris pseudopumila* extracts and their constituents. *Fitoterapia* 80, 62–67.
- Cordell, G.A., Colvard, M.D., 2005. Some thoughts on the future of ethnopharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 100, 5–14.
- Corey-Bloom, J., Anand, R., Veach, J. ft, 1998. A randomized trial evaluating the efficacy and safety of ENA 713(rivastigmine tartrate), a new acetylcholinesterase inhibitor, in patients with mild to moderately severe Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychopharmacol.* 1, 55–65.
- Cottiglia, F., Casu, L., Leonti, M., Caboni, P., Floris, C., Busonera, B., Farci, P., Ouhtit, A., Sanna, G., 2012. Cytotoxic phloroglucinols from the leaves of *Myrtus communis*. *J. Nat. Prod.* 75, 225–229.
- Cragg, G.M., Newman, D.J., Snader, K.M., 1997. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.* 60, 52–60.
- Darvesh, S., 2016. Butyrylcholinesterase as a diagnostic and therapeutic target for Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 13, 1173–1177.
- Davies, J.E., 1996. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants, in: *Ciba Foundation Symposium 207-Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread*. Wiley Online Library, pp. 15–35.
- Di Giovanni, S., Borloz, A., Urbain, A., Marston, A., Hostettmann, K., Carrupt, P.-A., Reist, M., 2008. In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: thin layer chromatography versus microplate methods. *Eur. J. Pharm. Sci.* 33, 109–119.
- Ding, X., Ouyang, M.-A., Liu, X., Wang, R.-Z., 2013. Acetylcholinesterase inhibitory activities of flavonoids from the leaves of *Ginkgo biloba* against brown planthopper. *J. Chem.* 2013.

- El Sissi, H.I., El Ansary, M.A.I., 1967. Tannins and polyphenolics of the leaves of *Myrtus communis*. *Planta Med.* 15, 41–51.
- El Tahir, K.E.H., Ageel, A.M., Mekkawi, A.G., Bashir, A.K., Mossa, J.S., Khaled, S.A., 1987. Pharmacological actions of the leaves of *Solenostemma argel* (Hayne): spasmolytic and uterine relaxant activities. *Int. J. Crude Drug Res.* 25, 57–63.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Emim, J.A.D.S., Oliveira, A.B., Lapa, A.J., 1994. Pharmacological Evaluation of the Anti-inflammatory Activity of a Citrus Bioflavonoid, Hesperidin, and the Isoflavonoids, Duartin and Claussequinone, in Rats and Mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 118–122.
- Endress, M.E., Bruyns, P.V., 2000. A revised classification of the Apocynaceae sl. *Bot. Rev.* 66, 1–56.
- Fadaeinasab, M., Hadi, A.H.A., Kia, Y., Basiri, A., Murugaiyah, V., 2013. Cholinesterase enzymes inhibitors from the leaves of *Rauvolfia reflexa* and their molecular docking study. *Molecules* 18, 3779–3788.
- Fang, Z., Jeong, S.Y., Jung, H.A., Choi, J.S., Min, B.S., Woo, M.H., 2010. Anticholinesterase and antioxidant constituents from *Gloiopeltis furcata*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 58, 1236–1239.
- Ferguson, L.R., 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 475, 89–111.
- Fesen, M.R., Pommier, Y., Leteurtre, F., Hiroguchi, S., Yung, J., Kohn, K.W., 1994. Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* 48, 595–608.
- Galani, B.R., Sahuc, M.-E., Njayou, F.N., Deloison, G., Mkounga, P., Feudjou, W.F., Brodin, P., Rouillé, Y., Nkengfack, A.E., Moundipa, P.F., 2015. Plant extracts from Cameroonian medicinal plants strongly inhibit hepatitis C virus infection in vitro. *Front. Microbiol.* 6, 488.
- Galeotti, F., Barile, E., Curir, P., Dolci, M., Lanzotti, V., 2008. Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Phytochem. Lett.* 1, 44–48.
- Ge, H.M., Zhu, C.H., Shi, D.H., Zhang, L.D., Xie, D.Q., Yang, J., Ng, S.W., Tan, R.X., 2008. Hopeahainol A: an acetylcholinesterase inhibitor from *Hopea hainanensis*. *Chem.-Eur. J.* 14, 376–381.
- Ghnimi, W., 2015. Étude phytochimique des extraits de deux Euphorbiaceae: *Ricinus communis* et *Jatropha curcas*. Évaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité de l'acétylcholinestérase (PhD Thesis). Université de Lorraine.
- Grayer, R.J., Chase, M.W., Simmonds, M.S., 1999. A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: an appreciation of Hegnauer's "Chemotaxonomie der Pflanzen." *Biochem. Syst. Ecol.* 27, 369–393.
- Grayer, R.J., Harborne, J.B., Kimmins, F.M., Stevenson, P.C., Wijayagunasekera, H.N.P., 1993. Phenolics in rice phloem sap as sucking deterrents to the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, in: *International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance* 381. pp. 691–694.
- Grosdidier, A., 2007. Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives (PhD Thesis). PhD thesis, Université Joseph Fourier Grenoble 1, France.
- Grossberg, G.T., 2003. Cholinesterase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease:: Getting On and Staying On. *Curr. Ther. Res.* 64, 216–235.

- Guo, A.J., Xie, H.Q., Choi, R.C., Zheng, K.Y., Bi, C.W., Xu, S.L., Dong, T.T., Tsim, K.W., 2010. Galangin, a flavonol derived from *Rhizoma Alpiniae Officinarum*, inhibits acetylcholinesterase activity in vitro. *Chem. Biol. Interact.* 187, 246–248.
- hady, A.E., الهادي, F.K. [فاتن ك.ع.], Hegazi, A.G., Ata, N., Enbaawy, M.L., 1994. Studies for determining antimicrobial activity of *Solenostemma Argel* (Del) Hayne. 1-Extraction with methanol/water in different proportions.
- Hassan, H.A., Hamed, A.I., El-Emary, N.A., Springuel, I.V., Mitome, H., Miyaoka, H., 2001. Pregnene derivatives from *Solenostemma argel* leaves. *Phytochemistry* 57, 507–511.
- Heneidak, S., Grayer, R.J., Kite, G.C., Simmonds, M.S., 2006. Flavonoid glycosides from Egyptian species of the tribe Asclepiadeae (Apocynaceae, subfamily Asclepiadoideae). *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 575–584.
- Heywood, V.H., Brummitt, R.K., Culham, A., Seberg, O., 2007. Flowering plant families of the world.
- Hollman, P.C.H., Arts, I.C.W., 2000. Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1081–1093. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1081::AID-JSFA566>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1081::AID-JSFA566>3.0.CO;2-G)
- Houghton, P.J., Ren, Y., Howes, M.-J., 2006. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat. Prod. Rep.* 23, 181–199.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., 1996. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14, 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Hvattum, E., Ekeberg, D., 2003. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 38, 43–49. <https://doi.org/10.1002/jms.398>
- Ibrahim, E.A., Gaafar, A.A., Salama, Z.A., El Baz, F.K., 2015. Anti-inflammatory and Antioxidant Activity of *Solenostemma argel* extract. *Int. J. Res. Pharmacol. Phytochem.* 7, 635–641.
- Iijima, S., Greig, N.H., Garofalo, P., Spangler, E.L., Heller, B., Brossi, A., Ingram, D.K., 1993. Phenserine: a physostigmine derivative that is a long-acting inhibitor of cholinesterase and demonstrates a wide dose range for attenuating a scopolamine-induced learning impairment of rats in a 14-unit T-maze. *Psychopharmacology (Berl.)* 112, 415–420.
- Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., Thongnoi, W., 2003. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *J. Ethnopharmacol.* 89, 261–264.
- Isorez, G., 2007. Contribution à la chimie des flavonoïdes: Accès à des analogues de pigments du vins rouges (PhD Thesis). Université Louis Pasteur (Strasbourg).
- Iwashina, T., 2000. The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. *J. Plant Res.* 113, 287–299. <https://doi.org/10.1007/PL00013940>
- Iwu, M.W., Duncan, A.R., Okunji, C.O., 1999. New antimicrobials of plant origin. *Perspect. New Crops New Uses ASHS Press Alex. VA* 457–462.
- Jung, H.A., Jin, S.E., Park, J.-S., Choi, J.S., 2011. Antidiabetic complications and anti-alzheimer activities of sophoflavescenol, a prenylated flavonol from *Sophora flavescens*, and its structure–activity relationship. *Phytother. Res.* 25, 709–715.
- Jung, H.A., Jung, Y.J., Hyun, S.K., Min, B.-S., Kim, D.-W., Jung, J.H., Choi, J.S., 2010. Selective cholinesterase inhibitory activities of a new monoterpene diglycoside and other constituents from *Nelumbo nucifera* stamens. *Biol. Pharm. Bull.* 33, 267–272.
- Kamel, M.S., 2003. Acylated phenolic glycosides from *Solenostemma argel*. *Phytochemistry* 62, 1247–1250.

- Kebieche, M., 2009. Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens* L.: effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. Biochim. These DeDoctorat Univ. Constantine.
- Khalid, S.A., 1974. Investigation on *peucedanum ostruthium* L. and *Solenostemma argel* (Del) Hayne (PhD Thesis). Doctorate thesis submitted to the University of Szeged, Hungary.
- Knapp, M.J., Knopman, D.S., Solomon, P.R., Pendlebury, W.W., Davis, C.S., Gracon, S.I., Apter, J.T., Lazarus, C.N., Baker, K.E., Barnett, M., 1994. A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. *Jama* 271, 985–991.
- Kuč, J., 2007. Compounds from plants that regulate or participate in disease resistance, in: *Ciba Foundation Symposium 154-Bioactive Compounds from Plants*. Wiley Online Library, pp. 213–230.
- Kuc, J., 1985. Increasing crop productivity and value by increasing disease resistance through non-genetic techniques, in: *Forests Potentials: Productivity and Value*, Tacoma, Wash.(USA), 20-24 Aug 1984. Weyerhaeuser Co.
- Labayle, D., 2001. 'Guide Pharmaco. Édition Lamare Paris 568.
- Lanari, A., Amenta, F., Silvestrelli, G., Tomassoni, D., Parnetti, L., 2006. Neurotransmitter deficits in behavioural and psychological symptoms of Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* 127, 158–165.
- Landoulsi, A., 2016. Etude chimiotaxonomique et activité biologique des métabolites secondaires des plantes du genre *Eryngium* (PhD Thesis). Lille 2.
- Lee, K.Y., Sung, S.H., Kim, Y.C., 2003. New Acetylcholinesterase-Inhibitory Pregnane Glycosides of *Cynanchum atratum* Roots. *Helv. Chim. Acta* 86, 474–483.
- Leredde, C., 1957. Etude écologique et phytogéographique du Tassili N'Ajjer.
- Liu, L., Sun, Y., Laura, T., Liang, X., Ye, H., Zeng, X., 2009. Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* CJ Tseng. *Food Chem.* 112, 35–41.
- Lozoya, X., Meckes, M., Abou-Zaid, M., Tortoriello, J., Nozzolillo, C., Arnason, J.T., 1994. Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmolytic principle. *Arch. Med. Res.* 25, 11–15.
- Ma, L.-F., Shan, W.-G., Zhan, Z.-J., 2011. Polyhydroxypregnane glycosides from the roots of *Cynanchum otophyllum*. *Helv. Chim. Acta* 94, 2272–2282.
- Maelicke, A., Samochocki, M., Jostock, R., Fehrenbacher, A., Ludwig, J., Albuquerque, E.X., Zerlin, M., 2001. Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* 49, 279–288.
- Mahmood, N., Pizza, C., Aquino, R., De Tommasi, N., Piacente, S., Colman, S., Burke, A., Hay, A.J., 1993. Inhibition of HIV infection by flavanoids. *Antiviral Res.* 22, 189–199.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727–747.
- Mansour, A., Celano, R., Mencherini, T., Picerno, P., Piccinelli, A.L., Foudil-Cherif, Y., Csupor, D., Rahili, G., Yahi, N., Nabavi, S.M., 2017. A new cineol derivative, polyphenols and norterpenoids from Saharan myrtle tea (*Myrtus nivellei*): Isolation, structure determination, quantitative determination and antioxidant activity. *Fitoterapia* 119, 32–39.
- Markham, K.R., 1988. Distribution of flavonoids in the lower plants and its evolutionary significance, in: *The Flavonoids*. Springer, pp. 427–468.
- Martín, T., Rubio, B., Villaescusa, L., Fernández, L., Díaz, A.M., 1999. Polyphenolic compounds from pericarps of *Myrtus communis*. *Pharm. Biol.* 37, 28–31.

- Mayer, K.H., Opal, S.M., Medeiros, A.A., 1995. Mechanisms of antibiotic resistance. *Princ. Pract. Infect. Dis.* 4a Ed. Nueva York Churchill Livingstone 212–224.
- Medini, F., Fellah, H., Ksouri, R., Abdelly, C., 2014. Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum*. *J. Taibah Univ. Sci.* 8, 216–224.
- MEDJEKANE, M., 2017. Prévalence de l'infection a *Helicobacter pylori* et son inhibition par des molécules bioactives (PhD Thesis). ALLEM RACHIDA.
- Mehta, M., Adem, A., Sabbagh, M., 2012. New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Int. J. Alzheimer's Dis.* 2012.
- Mellaoui, M., 2014. Analyse des relations structures propriétés pour des dérivés de la céphalosporine et de l'Oxazole (PhD Thesis). Université Mohamed Khider-Biskra.
- Merken, H.M., Beecher, G.R., 2000. Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *J. Agric. Food Chem.* 48, 577–599. <https://doi.org/10.1021/jf990872o>
- Michel, T., 2011. Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*) (PhD Thesis). Université d'Orléans.
- Middleton, E., 1996. Biological properties of plant flavonoids: an overview. *Int. J. Pharmacogn.* 34, 344–348.
- Middleton Jr, E., Drzewiecki, G., 1984. Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. *Biochem. Pharmacol.* 33, 3333–3338.
- Migliore, J., 2011. Empreintes des changements environnementaux sur la phylogéographie du genre *Myrtus* en Méditerranée et au Sahara (PhD Thesis). Aix Marseille 3.
- Milane, H., 2004. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques (PhD Thesis). Strasbourg 1.
- Mimica-Dukić, N., Bugarin, D., Grbović, S., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B., Orčić, D., Jovin, E., Couladis, M., 2010. Essential oil of *Myrtus communis* L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents. *Molecules* 15, 2759–2770.
- Montoro, P., Tuberoso, C.I., Piacente, S., Perrone, A., De Feo, V., Cabras, P., Pizza, C., 2006. Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 1614–1619.
- Mookerjee, B.K., Lee, T.P., Logue, G.P., Lippes, H.A., Middleton, E., 1986. The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses. *Prog. Clin. Biol. Res.* 213, 511–520.
- Mucsi, I., Pragai, B.M., 1985. Inhibition of virus multiplication and alteration of cyclic AMP level in cell cultures by flavonoids. *Experientia* 41, 930–931.
- Nag, G., De, B., 2011. Acetylcholinesterase inhibitory activity of *Terminalia chebula*, *Terminalia bellerica* and *Emblica officinalis* and some phenolic compounds. *Int J Pharm Pharm Sci* 3, 121–124.
- Namgoong, S.Y., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., Kim, H.P., 1994. Effects of naturally occurring flavonoids on mitogen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sci.* 54, 313–320.
- Nijhoff, W.A., Bosboom, M.A., Smidt, M.H., Peters, W.H., 1995. Enhancement of rat hepatic and gastrointestinal glutathione and glutathione S-transferases by α -angelicalactone and flavone. *Carcinogenesis* 16, 607–612.
- Nordberg, A., Svensson, A.-L., 1998. Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Saf.* 19, 465–480.
- Ohemeng, K.A., Schwender, C.F., Fu, K.P., Barrett, J.F., 1993. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3, 225–230.

- Oka, F., Oka, H., Ito, Y., 1991. Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 538, 99–108.
- Othman, W.N.N.W., Liew, S.Y., Khaw, K.Y., Murugaiyah, V., Litaudon, M., Awang, K., 2016. Cholinesterase inhibitory activity of isoquinoline alkaloids from three *Cryptocarya* species (Lauraceae). *Bioorg. Med. Chem.* 24, 4464–4469.
- Ounaissia, K., Pertuit, D., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Delemasure, S., Dutartre, P., Smati, D., Lacaille-Dubois, M.-A., 2016. New pregnane and phenolic glycosides from *Solenostemma argel*. *Fitoterapia* 114, 98–104.
- Ozanda, P., 1991. Flore et végétation du Sahara;(3^{ème} édition, augmentée). CNRS Paris 662.
- Peng, Y., Ding, Y., Wei, Y., Shu, B., Li, Y., Liu, X., 2011. Caudatin-2, 6-dideoxy-3-O-methy- β -d-cymaropyranoside 1 induced apoptosis through caspase 3-dependent pathway in human hepatoma cell line SMMC7721. *Phytother. Res.* 25, 631–637.
- Peng, Y., Li, Y., Liu, X., Zhang, J., Duan, J., 2008. Antitumor activity of C-21 steroidal glycosides from *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight. *Phytomedicine* 15, 1016–1020.
- Plaza, A., Perrone, A., Balestrieri, C., Balestrieri, M.L., Bifulco, G., Carbone, V., Hamed, A., Pizza, C., Piacente, S., 2005a. New antiproliferative 14, 15-secopregnane glycosides from *Solenostemma argel*. *Tetrahedron* 61, 7470–7480.
- Plaza, A., Piacente, S., Perrone, A., Hamed, A., Pizza, C., Bifulco, G., 2005b. Stemmosides C (Ia) and D (Ib), Two Novel Unusual Pregnane Glycosides from *Solenostemma argel*: Structural Elucidation and Configuration Study by a Combined NMR-Quantum Mechanical Strategy. *ChemInform* 36.
- Polinsky, R.J., 1998. Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Clin. Ther.* 20, 634–647.
- Pulce, C., Saviuc, P., 2011. Prise en compte des cas d'intoxication aiguë notifiés aux centres antipoison et de toxicovigilance dans l'évaluation du bénéfice/risque du buflomédil Taking into account acute poisonings reported to poison control centres in the risk-benefit evaluation of buflomedil. *Réanimation* 20, 442.
- Quézel, P., 1965. La végétation du Sahara, du Tchad à la Mauritanie.
- Quézel, P., 1954. Contribution à l'étude de la flore et de la végétation du Hoggar. Imp. Imbert.
- Quézel, P., Martinez, C., 1958. Etude palynologique de deux diatomites du Borkou (Territoire du Tchad AEF). *Bull. Société D'Histoire Nat. D'Afrique Nord* 49, 230–244.
- Quézel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.
- Rahalison, I L., Hamburger, M., Hostettmann, K., Monod, M., Frenk, E., 1991. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochem. Anal.* 2, 199–203.
- Rhayour, K., Bouchikhi, T., Tantaoui-Elaraki, A., Sendide, K., Remmal, A., 2003. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Essent. Oil Res.* 15, 286–292.
- Rogers, S.L., Farlow, M.R., Doody, R.S., Mohs, R., Friedhoff, L.T., 1998. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 50, 136–145.
- Romani, A., Pinelli, P., Mulinacci, N., Vincieri, F.F., Tattini, M., 1999. Identification and quantitation of polyphenols in leaves of *Myrtus communis* L. *Chromatographia* 49, 17–20.

- Ryu, H.W., Curtis-Long, M.J., Jung, S., Jeong, I.Y., Kim, D.S., Kang, K.Y., Park, K.H., 2012. Anticholinesterase potential of flavonols from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) and their kinetic studies. *Food Chem.* 132, 1244–1250.
- SARI MOHAMED, S., 2013. Etude de l'Interaction Protéine-Protéine par Modélisation Moléculaire. Application aux Processus Biologiques (PhD Thesis).
- Sato, M., Tsuchiya, H., Takase, I., Kureshiro, H., Tanigaki, S., Iinuma, M., 1995. Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics. *Phyther. Res.* 9, 509–512.
- Schievano, E., Stocchero, M., Morelato, E., Facchin, C., Mammi, S., 2012. An NMR-based metabolomic approach to identify the botanical origin of honey. *Metabolomics* 8, 679–690.
- Schmelzer, G.H., Gurib-Fakim, A., 2013. *Plantes médicinales 2. PROTA.*
- Schmid, E.F., Smith, D.A., 2005. Keynote review: is declining innovation in the pharmaceutical industry a myth? *Drug Discov. Today* 10, 1031–1039.
- Shafek, R.E., Shafik, N.H., Michael, H.N., 2012. Glycosides Isolated from *Solenostemma argel* Stem Extract. *Asian J. Plant Sci.* 11, 143–147.
- Shayoub, M.E., 2003. Design formulation and evaluation of *Solenostemma argel* tablets (ALHARGAL) (PhD Thesis). Thesis for doctor philosophy (Ph. D) degree. Faculty of pharmacy University of Khartoum. Sudan.
- Shu, Y.-Z., 1998. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.* 61, 1053–1071.
- Siah, A., Elbekali, A.Y., Ramdani, A., Reignault, P., Torriani, S.F.F., Brunner, P.C., Halama, P., 2014. QoI Resistance and Mitochondrial Genetic Structure of *Zymoseptoria tritici* in Morocco. *Plant Dis.* 98, 1138–1144. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-13-1057-RE>
- Small, G.W., 1998. Treatment of Alzheimer's disease: current approaches and promising developments. *Am. J. Med.* 104, 32S–38S.
- Soltan, M.M., Zaki, A.K., 2009. Antiviral screening of forty-two Egyptian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 126, 102–107.
- Soltis, D.E., Smith, S.A., Cellinese, N., Wurdack, K.J., Tank, D.C., Brockington, S.F., Refulio-Rodriguez, N.F., Walker, J.B., Moore, M.J., Carlswald, B.S., 2011. Angiosperm phylogeny: 17 genes, 640 taxa. *Am. J. Bot.* 98, 704–730.
- Spedding, G., Ratty, A., Middleton Jr, E., 1989. Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antiviral Res.* 12, 99–110.
- Suganthi, N., KARUTHA, P., PANDIMA, D., 2009. Cholinesterase Inhibitors from Plants: Possible Treatment Strategy for Neurological Disorders-A Review. *Int. J. Biomed. Pharm. Sci.* 3, 87–103.
- Sumbul, S., Ahmad, M.A., Asif, M., Akhtar, M., 2011. *Myrtus communis* Linn.-A review.
- Touaibia, M., Chaouch, F.Z., 2017. Propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de *Myrtus nivellei* Batt et Trab. obtenus in situ et in vitro. *Phytothérapie* 15, 16–22.
- Touaibia, M., Chaouch, F.Z., 2014. Evaluation de l'activité anti-oxydante des extraits aqueux, méthanolique et éthanolique de l'espèce saharo-endémique *Myrtus nivellei* Batt et Trab.(Myrtaceae)[Evaluation of the antioxidant activity of aqueous, methanolic and ethanolic extracts of the Sahara-endemic species *Myrtus nivellei* Batt and Trab.(Myrtaceae)]. *Int. J. Innov. Appl. Stud.* 6, 407.
- TOUAIBIA, M., CHAOUCH, F.Z., CHERIF, H., CHAOUIA, C., 2014. Caractérisation phytochimique de l'espèce saharo-endémique *Myrtus nivellei* Batt & Trab (Myrtaceae). *Algerian J. Nat. Prod.* 2, 27–34.
- Trease, G.E., Evans, W.C., 1983. *Textbook of Pharmacognosy*, London. BailliereTindall 12, 336.

- Tsoukalas, M., 2015. Recherche de sécrétagogues naturels du GLP-1: exploration du potentiel antidiabétique d'espèces du genre *Cynanchum* (Apocynaceae) (PhD Thesis). Strasbourg.
- Verma, A.K., Johnson, J.A., Gould, M.N., Tanner, M.A., 1988. Inhibition of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. *Cancer Res.* 48, 5754–5758.
- Vrijnsen, R., Everaert, L., Van Hoof, L.M., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., Boeye, A., 1987. The poliovirus-induced shut-off of cellular protein synthesis persists in the presence of 3-methylquercetin, a flavonoid which blocks viral protein and RNA synthesis. *Antiviral Res.* 7, 35–42.
- Wannes, W.A., Mhamdi, B., Sriti, J., Jemia, M.B., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., Kchouk, M.E., Marzouk, B., 2010. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food Chem. Toxicol.* 48, 1362–1370.
- Wattenberg, L., 1983. Anticarcinogenic effects of several minor dietary components, in: *Foods, Proc. Int. Conf.* pp. 157–66.
- Woodruff-Pak, D.S., Vogel, R.W., Wenk, G.L., 2001. Galantamine: effect on nicotinic receptor binding, acetylcholinesterase inhibition, and learning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 2089–2094.
- Woodson, R.E., Schery, R.W., Nowicke, J.W., 1970. Flora of Panama. Part VIII. Family 162. Apocynaceae. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 57, 59–130.
- Xia, X., Cao, J., Zheng, Y., Wang, Q., Xiao, J., 2014. Flavonoid concentrations and bioactivity of flavonoid extracts from 19 species of ferns from China. *Ind. Crops Prod.* 58, 91–98.
- Yang, Q.-X., Ge, Y.-C., Huang, X.-Y., Sun, Q.-Y., 2011. Cynanauriculoside C–E, three new antidepressant pregnane glycosides from *Cynanchum auriculatum*. *Phytochem. Lett.* 4, 170–175.
- Yang, Z., Zhang, X., Duan, D., Song, Z., Yang, M., Li, S., 2009. Modified TLC bioautographic method for screening acetylcholinesterase inhibitors from plant extracts. *J. Sep. Sci.* 32, 3257–3259.
- Yoon, M.-Y., Choi, N.H., Min, B.S., Choi, G.J., Choi, Y.H., Jang, K.S., Han, S.-S., Cha, B., Kim, J.-C., 2011. Potent in Vivo Antifungal Activity against Powdery Mildews of Pregnane Glycosides from the Roots of *Cynanchum wilfordii*. *J. Agric. Food Chem.* 59, 12210–12216. <https://doi.org/10.1021/jf2039185>
- Zain, M.E., Awaad, A.S., Al-Outhman, M.R., El-Meligy, R.M., 2012. Antimicrobial activities of Saudi Arabian desert plants. *Phytopharmacology* 2, 106–113.
- Zhang, J.-D., Cao, Y.-B., Xu, Z., Sun, H.-H., An, M.-M., Yan, L., Chen, H.-S., Gao, P.-H., Wang, Y., Jia, X.-M., 2005. In vitro and in vivo antifungal activities of the eight steroid saponins from *Tribulus terrestris* L. with potent activity against fluconazole-resistant fungal. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 2211–2215.

Résumé

Le présent travail porte sur l'étude phytochimique et biologique de deux plantes médicinales Algériennes ; une Apocynaceae (*Solenostemma argel*) et une Myrtaceae (*Myrtus nivellei*). Les screenings préliminaires ont révélé une capacité du genre *Solenostemma* à inhiber les enzymes cholinestérasiques et la capacité de *Myrtus nivellei* à inhiber plusieurs souches pathogènes.

Le fractionnement bioguidé de l'espèce *Solenostemma argel*, nous a permis d'identifier les spots actifs sur l'ACHé à partir de l'extrait chloroformique, ce qui nous a conduit à purifier 8 composés. Les structures moléculaires des composés isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de RMN 1D et 2D (¹H, ¹³C, COSY H-H, HSQC et HMBC), par la spectrométrie de masse haute résolution (HRESI-MS) et par comparaison avec les données de la littérature. Parmi les 8 composés testés sur microplaque, le composé **1** a présenté le meilleur pourcentage d'inhibition à l'égard de l'ACHé et BChE.

L'espèce *Myrtus nivellei* a présenté une très bonne activité antibactérienne à l'égard de la plupart des 36 souches. Le spot actif par bioautographie a été ciblé et purifié par CPC, ce composé est en cours d'identification.

Mots clés : *Solenostemma argel*, *Myrtus nivellei*, purification, activité biologique, fractionnement bioguidé.

Abstract

This work focuses on the phytochemical and biological study of two Algerian medicinal plants; an Apocynaceae (*Solenostemma argel*) and a Myrtaceae (*Myrtus nivellei*). Preliminary screening revealed an ability of the genus *Solenostemma* to inhibit cholinesterase enzymes and the ability of *Myrtus nivellei* to inhibit several pathogenic strains.

The bioguided fractionation of the *Solenostemma argel* species allowed us to identify active spots on AChE from the chloroformic extract, which led us to purify 8 compounds. The molecular structures of the isolated compounds were elucidated mainly by using 1D and 2D NMR techniques (¹H, ¹³C, COSY H-H, HSQC and HMBC), by high resolution mass spectrometry (HRESI-MS) and by comparison with literature data. Of the 8 compounds tested on microplate, compound **1** had the highest percentage of inhibition of AChE and BChE.

In the other hand, *Myrtus nivellei* showed a very good antibacterial activity against the most of the 36 strains. The active spot by bioautography has been targeted and purified by CPC, this compound is currently being identified.

Key words: *Solenostemma argel*, *Myrtus nivellei*, purification, biological activity, bioguided fractionation.

ملخص

يتعلق هذا العمل بالدراسة الفيتوكيميائية والبيولوجية لنبتتين طبيبتين من الجزائر. (Apocynaceae) و (Myrtaceae) و كشف الفحص الأولي قدرة *Solenostemma* من منع إنزيمات الكولينستراز و قدرة *Myrtus nivellei* من منع تكاثر العديد من السلالات المسببة للأمراض.

سمح لنا التجزؤ البيولوجي للنوع *Solenostemma argel* بتحديد البقع النشطة على AChE من مستخلص الكلوروفورم ، مما أدى بنا إلى تنقية 8 مركبات. تم توضيح الهياكل الجزيئية للمركبات المعزولة بشكل رئيسي باستخدام تقنيات D1 و 2 و (HRESI-MS) ، بواسطة مطياف الكتلة عالي الدقة (HSQC ، COZY HH ، 13C ، D NMR (1H و HMBC) ، وبالمقارنة مع بيانات من الأدب. من بين 8 مركبات تم اختبارها على صفيحة ميكروية ، كان للمركب 1 أفضل نسبة تثبيط فيما يتعلق بـ AChE و BChE.

أظهر *Myrtus nivellei* نشاطاً جيداً جداً مضاداً للبكتيريا ضد معظم السلالات الـ 36. تم استهداف البقعة النشطة بواسطة التصوير الحيوي وتنقيتها بواسطة CPC ، يتم تحديد هذا المركب.

الكلمات المفتاحية: *Solenostemma argel* ، *Myrtus nivellei* ، التنقية ، النشاط البيولوجي ، التجزيء البيولوجي.

Année universitaire:
2019 /2020

Présenté par: DEMMAK Rym Gouta

Evaluation phytochimique et biologique des substances naturelles de deux plantes du Sahara Algérien : *Solenostemma argel* Hayne et *Myrtus nivellei* Batt et Trab

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Doctorat es sciences en Biochimie Appliquée

Résumé

Le présent travail porte sur l'étude phytochimique et biologique de deux plantes médicinales Algériennes ; une Apocynaceae (*Solenostemma argel*) et une Myrtaceae (*Myrtus nivellei*). Les screening préliminaires ont révélé une capacité du genre *Solenostemma* à inhiber les enzymes cholinestérasiques et la capacité de *Myrtusnivellei* à inhiber plusieurs souches pathogènes.

Le fractionnement bioguidé de l'espèce *Solenostemma argel*, nous a permis d'identifier les spots actifs sur l'ACHé à partir de l'extrait chloroformique, ce qui nous a conduit à purifier 8 composés. Les structures moléculaires des composés isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de RMN 1D et 2D (1H, 13C, COSY H-H, HSQC et HMBC), par la spectrométrie de masse haute résolution (HRESI-MS) et par comparaison avec les données de la littérature. Parmi les 8 composés testés sur microplaque, le composé **3** a présenté le meilleur pourcentage d'inhibition à l'égard de l'ACHé et la BChE.

L'espèce *Myrtus nivellei* a présenté une très bonne activité antibactérienne à l'égard de 36 souches. Le spot actif par bioautographie a été ciblé et purifié par CPC, ce composé est en cours d'identification.

Mots clés : *Solenostemma argel*, *Myrtus nivellei*, purification, activité biologique, fractionnement bioguidé.

Jury

Président : Mr. Chikhi A
Encadreur : Mr. Bensegueni A
Co-encadreur : M^{me}Sahpaz S
Examineurs :
Lahoual M
Chibani S
Sobhi W

Pr. Univ.Mentouri /Constantine 1.
Pr. Univ.Mentouri/ Constantine 1.
Pr.Univ. Droit et Santé, Lille 2
Pr. Univ M. Seddik Ben Yahia/Jijel.
M.C. Univ.F.Mentouri/Constantine 1.
M.C Univ. Ferhat abbas /Setif1.

Date de la soutenance: 09/07/2020