

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



Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbès
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de l'environnement

Thèse

Pour l'obtention du diplôme de

Doctorat 3^{ème} Cycle

En Sciences de l'Environnement

Option : Gestion, Valorisation des Ressources Naturelles et Développement Durable

THÈME

***Contribution à l'étude phytochimique et valorisation de l'espèce
Agave americana L. dans l'Ouest Algérien***

Présenté Par :

Melle RAHMANI Hannane

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président : Mr MOUEDDENE Kada

Pr, UDL de Sidi Bel Abbès

Directeur de thèse : Mme Koudache Fatiha

Pr, UDL de Sidi Bel Abbès

Co- directeur : Mme TOUMI BENALI Fawzia

Pr, UDL de Sidi Bel Abbès

Examineurs : Mr BENSATLA TALET Lotfi

MC-A, Université d'Oran

Mr BOUZIDI Mohamed Ali

MC-A, UDL de Sidi Bel Abbès

Année universitaire : 2016 -2017

Remerciements

« À Dieu qui nous a nantis de la formidable faculté de raisonnement et qui nous a donné le courage et la volonté, pour mener à terme ce modeste travail »

*Alhamed li Allah le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux,
L'Omniscient Et Le Généreux.*

*Nous tenons à remercier sincèrement **Madame Toumi Fouzia**, Professeur à l'université Djillali Liabes qui, en tant que responsable de spécialité et Co-encadreur de la thèse, s'est toujours montrée à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de cette thèse, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer.*

*Nous tenons à remercier sincèrement Mme **Koudache Fatima**, professeur à l'université Djillali Liabes d'avoir accepté de diriger mes travaux de thèse, durant ces années, en me faisant bénéficier de votre expérience, vos conseils et vos encouragements.*

*Nous remercions vivement Professeur **K. Moueddene** d'avoir accepté de présider le jury de l'évaluation de ce modeste travail.*

*Notre gratitude va également à Dr **L. Bensahla Talet**, maître de conférences à l'Université d'Oran, pour juger et critiquer ce travail. Je suis particulièrement reconnaissante et honorée par sa participation au jury de cette thèse.*

*Nous remercions également Dr **M. A. Bouzidi**, d'avoir ménagé son temps pour juger ce modeste travail, et qu'il trouve ici toutes mes expressions respectueuses.*

*Nous tenons à remercier, Pr **M. Benyahya** doyen de notre faculté pour toutes les facilités dans notre parcours d'apprentissage et de recherche.*

*Nos sincères remerciements vont également à toutes les personnes qui travaillent au laboratoire de centre de mesure ; Mme **N. Nouredine** et Mme*

***B.Boutouizgaa** qui nous ont aidé dans l'expérimentation et dans l'utilisation du matériel de laboratoire.*

*Nous tenons à remercier Madame **Dr Benchohera Hadria Amel** qui nous a encourager avec les moyennes physiques et morale dans ce travail et surtout dans l'identifications et la caractérisation des flavonoïdes.*

Nos sincères remerciements vont également à tous personnes qui travaillent à la station d'expérimentation de l'Université Mustapha stamboli de Mascara qui nous ont aidés dans l'étude in vivo.

*Nous tenons à remercier notre frère **Mr Bouazza Sofiane** qui nous ont aidés dans les analyses statistique*

*Nos sincères remerciements vont également à tous les ingénieurs du laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie ; Mr **N. Makhfi** , Mme **F. Hadade**, Mr **Y. Bennaïssa Keddar**, Melle **F. Difallah** qui nous ont aidé dans l'expérimentation et dans l'utilisation du matériel de laboratoire.*

« Mes remerciements les plus sincères à toutes et à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail ».

Cordialement

Dédicace

À ma mère et à mon père, que Dieu les garde pour moi, pour leur contribution, leur soutien leur amour et leur patience. Pour tous les bons moments dont ils m'ont agrémenté tout au long de ma vie.

À tous mes professeurs que je respecte énormément,

*À mes frères **Mohammed et Abd el hafid***

*A ma sœur **Djamila**, vous être la plus belle fratrie du monde que je n'avais jamais espéré avoir.*

*Aux merveilleuses filles du monde, que Dieu m'a permis de connaître et qui m'ont beaucoup aidé pendant la réalisation de ce travail,
Faiza M, Hanane S, Khadidja B et Amina S, Majda BA, Mokhtar D, Safia B*

*Aux meilleurs amis du monde, **Abd elKrim B, Abd elfetah B, Mustapha D, Abbes D, Amine S, Mohammed R, Boubakar S, Mounir C.***



Résumé

L'objectif de notre recherche est d'évaluer les activités biologiques des extraits de l'*Agave americana* L en provenance de la région de Kristel et Tessala.

Le screening phytochimique effectué sur les différents extraits de l'*Agave americana* révèle la présence de : phénols, flavonoïdes, tanins, terpènes ainsi que les saponines.

L'étude phytochimique a révélé que l'extrait de décoction des feuilles de la région de Kristel renferme les teneurs les plus élevées en phénols totaux ($62,44 \pm 0.48$ mg AGE/g MS), de flavonoïdes (8.385 ± 0.01 mg EC/g MS) et de tanins condensés (3.63 ± 0.27 mg EC/g MS). Tandis que, les extraits hydro-alcooliques enregistrent les valeurs les plus notables en composés phénoliques pour les racines.

La fraction de chloroforme des deux régions enregistre la quantité la plus importante en phénols totaux avec une teneur de (162.82 ± 14.30 mg AGE/100g MS – 141 ± 8.19 mg AGE/100g MS). Tandis que, les valeurs les plus élevées en flavonoïdes ont été obtenu pour l'extrait de chloroforme et acétate d'éthyle de Kristel ($34,32 \pm 3,31$ mg EC / 100g Ms ; $31,17 \pm 3,05$ mg EC/ 100g Ms).

L'évaluation de l'activité antioxydant par le test DPPH, montre que tous les extraits possèdent une activité anti-radicalaire importante. La fraction d'acétate d'éthyle et la décoction de la région de Kristel renferme le pouvoir antioxydant le plus remarquable avec respectivement une concentration d'inhibition IC_{50} de 1.30 mg/ml et 2.23 mg/ml.

L'étude in vivo de l'induction de l'œdème par la carragénine, chez les rats Wistar des extraits hydro-éthanolique (EEAA) et de décoction (EDAA) , en comparaison avec l'indométacine et le piroxicam montre que les deux extraits possèdent un effet anti-inflammatoire très intéressant et ils agissent dès la première heure.

L'EEAA renferme un effet anti-inflammatoire plus puissant que l'EDAA, donc l'effet anti-inflammatoire dépend de la nature chimique des molécules bioactives présentent dans les extraits.

La caractérisation du profil chimique des différentes fractions des deux régions, par la technique de chromatographie liquide à haute performance a identifié cinq composés flavonoïdiques, dont cinq pour la région de Kristel (Naringine, Taxifoline, Catéchine, Apéginine, Fiestine), et une dans la fraction d'acétate d'éthyle (Naringine) pour la région de Tessala.

Mots clés : l'*agave americana* L, Ouest algérien, profil biochimique, pouvoir antioxydant, effet anti-inflammatoire.

Abstract

The objective of our research is to evaluate the biological activities of the extracts of *Agave americana* L., from the region of Kristel and Tessala.

The phytochemical screening carried out on the various extracts of *Agave americana* reveals the presence of: phenols, flavonoids, tannins, terpenes as well as saponins and the absence of alkaloids.

The phytochemical study revealed that the decoction extract from the Kristel region contained the highest total phenols (62.44 ± 0.48 mg GAE / g MS), flavonoids (8.385 ± 0.01 mg CE / g MS) and condensed tannins (3.63 ± 0.27). While, hydro-alcoholic extracts record the most notable values of phenolic compounds for roots.

The chloroform fraction of the two regions recorded the most remarkable amount of total phenols with a content of (162.82 ± 14.30 mg GAE / 100 g MS - 141 ± 8.19 mg GAE / 100 g MS). Whereas, the highest flavonoid values were obtained for Kristel's chloroform and ethyl acetate extract (34.32 ± 3.31 mg CE / 100 g Ms, 31.17 ± 3.05 mg CE / 100g Ms).

Evaluation of the antioxidant activity by the DPPH test shows that all the extracts possess a remarkable anti-radical activity. The ethyl acetate fraction and decoction of the Kristel region contained the most remarkable antioxidant power with an IC_{50} inhibition concentration of 1.30 mg / ml and 2.23 mg / ml, respectively.

The in vivo study of carrageenan edema in Wistar rats of the hydroethanolic extracts (EEAA) and decoction extracts (EDAA) in comparison with indomethacin and piroxicam shows that both extracts have a very remarkable anti-inflammatory effect and they act from the first hour.

EEAA has a stronger anti-inflammatory effect than EDAA, so the anti-inflammatory effect depends on the chemical nature of the bioactive molecules present in the extracts.

The characterization of the chemical profile of the different fractions of the two regions by the high-performance liquid chromatography technique identified five flavonoid compounds, including five for the Kristel region (Naringine, Taxifoline, Catechin, apeginine, Fiestine) and one in the Fraction of ethyl acetate (Naringine) for the Tessala region.

Keywords: *Agave americana* L, Western Algerian, biochemical profile, antioxidant power, anti-inflammatory effect

ملخص

المستخلصات الطبيعية من النباتات تحتوي على مجموعة متنوعة من المركبات الفينولية التي تم تعيينها كمصدر للأنشطة البيولوجية المختلفة، و البوليفينول هي موضوع دراسات مختلفة فهي ثروة تم استغلالها على نطاق واسع في الصناعات الغذائية مستحضرات التجميل و الادوية.

كجزء من تقييم الموارد الطبيعية، يركز عملنا هذا على دراسة مستخلصات الصبار الأمريكي (*agave americana* L) وتقييم الأنشطة البيولوجية لمستخلصات هذه النبتة.

Agave americana L المعروف باسم الصبار ينتمي الى عائلة Agavaceae تعتمد النباتات الطبية المستخدمة على نطاق واسع في الطب التقليدي لخصائصه البيولوجية المتعددة : مضاد للالتهابات ،مضاد للجراثيم، و كمدّر للبول.

الفحص الكيميائي النباتي لمختلف مستخلصات *agave americana* L اظهر وجود كل من الفينولات، فلافونويد، والتانات والتربين وصابونين هذه المركبات الثانوية لديها امكانيات واسعة من الأنشطة الدوائية ربما تكون أصل هذه الخصائص العلاجية.

الدراسة الكيميائية تشمل استخراج وتقييم كمية الفينولات الكلية الفلافونويدات الكلية تانات عن طريق كاشف Folin-ciocalteu، بواسطة ثلاثي كلوريد الالمنيوم واختبار الفانيلين على التوالي.

وقد أثبتت النتائج ان مستخلص décoction من منطقة كريستل يحتوي على اعلى مستويات من مركبات الفينول (0.48 ± 62.44 ملغ/EAG) فلافونويدات (0.01 ± 8.385 ملغ/CE) والتانات (0.27 ± 3.63 ملغ/CE). في حين سجلت المستخلصات الكحولية اعلى مستويات المركبات الفينولية.

سجل مستخلص الكلوروفورم من المنطقتين أعلى كمية من الفينولات الكلية بمضمون (14.30 ± 162.82 ملغ / 100 غ - 141 ± 8.19 ملغ/AGE 100 غ). في حين تم الحصول على أعلى القيم فلافونويد من مستخلص الكلوروفورم وأسيئات إيثيل لمنطقة كريستل (3.31 ± 34.32 ملغ /CE 100 غ)

تقييم النشاط المضاد للاكسدة عن طريق DPPH يبين ان جميع مستخلصات لها خصائص مضادة للاكسدة. مستخلص خلات الايتيل و décoction يعتبر كافضل مضاد للاكسدة بتركيز 1.23 ملغ /مل و 2.23 ملغ /مل على التوالي.

الدراسة الحية للتحريض وذمة عن طريق الكاراجينين عند فئران من فصيلة ويستار لكل من EDAA و EEAA مقارنة مع الاندوميثاسين و بيروكسيكام تبين ان كلا المستخلصين يمتلكان تأثير فعال كمضاد للالتهابات.

من ناحية اخرى، EEAA يحتوي على تأثير مضاد للالتهاب أكثر فعالية من EDAA لذلك يمكننا القول ان هذا التأثير يعتمد على الطبيعة الكيميائية للجزيئات الحيوية النشطة الموجودة في المستخلصات.

لإتمام بحثنا حول تقييم نوع الصبار قمنا بتحديد خصائص مستخلصات هذا الاخير عن طريق تقنية الكروماتوغرافيا السائلة العالية الاداء (HPLC). هذه الاخيرة سمحت لنا بتحديد خمسة مركبات فلافونويدية ابيجينين، نارنجين، تاكسيفونين، فيسيتين وكاتيشين.

كلمات البحث: *Agave americana* L، الغرب الجزائري، المركبات الفينولية، مضاد الاكسدة، مضاد الالتهاب

Table des matières

Remerciement

Dédicace

Résumé

Abstract

مُلَخَّصٌ

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale 01

1^{ère} partie : Synthèse bibliographique

Chapitre I : les plantes médicinales et la phytothérapie 03

I-1-1-Les plantes médicinales 03

I-1-1-1 Le pouvoir des plantes médicinales 04

I-1-1- 2Les différentes méthodes de préparation des plantes médicinales 04

I-2- La phytothérapie 06

I-2-2- 1-Aperçu sur l’histoire de la Phytothérapie 06

I-2-2-2- Définition de la phytothérapie 07

I-2-2- 3-Types de phytothérapie 07

I-2-2- 4L’intérêts de la phytothérapie 08

Chapitre II: Généralité sur les métabolites secondaires 09

II-1 Généralité sur les métabolites 09

II-2-Généralité 10

II-3 -classe des métabolites secondaires 10

II-3-1- Les composées phénoliques 10

II-3-2-Les flavonoïdes 12

II-3-3- Les acides phénoliques 16

II-3-4- Les tanins 17

II-3-5 -Coumarines 18

II-3-6 -Les Anthocyanes 19

II-3-7 -Les quinones 19

II-3-8 -Les lignines 19

II-3-9- Les xanthones 20

II-4-Les terpènes 21

II-4-1- Les saponines 21

II-5 -Les alcaloïdes 22

II-6 -Intérêt des métabolites secondaires 23

Chapitre III : Stress oxydant et inflammation 28

III-1- Stress oxydant et inflammation 28

III-2- Stress oxydant et radicaux libres 28

III-2-1- stress oxydant 29

III-2-3- Radicaux libres	29
III-3-Généralités sur les antioxydants	29
III-3-1-Les principales sources d'antioxydants	30
III-4- Méthodes de tests des antioxydants	32
III-4-1- Méthodes de piégeage des radicaux libres oxygénés	33
III-4-1-1-Piégeage du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂ scavenging activity)	33
III-4-1-2-Piégeage du radical peroxy (ROO●) : Test d'ORAC	34
III-4-2- Méthodes de piégeage des radicaux stables et évaluation de leur capacité de réduction	34
III-4-2-1- Test de réduction du radical 1,1-diphényl 1-2-picrylhydrazyle	35
III-4-2-2- Piégeage du ABTS (2,2'-azynobis- [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)	35
III-4-2-3- Réduction de fer: FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)	36
III-4-2-4- Test mesurant l'activité antioxydante au moyen de caroténoïdes	36
III-5-Inflammation	38
III-5-1- Causes de l'inflammation	38
III-5-2-Types de l'inflammation	39
III-5-2-1- Inflammation aiguë	39
III-5-2-2- Inflammation chronique	40
III-5-3- Cellules impliquées dans la réaction inflammatoire	41
III-5-3-1- Les polynucléaires neutrophiles	41
III-5-3-2- Les polynucléaires basophiles	41
III-5-3-3- Les polynucléaires éosinophiles	41
III-5-3-4- Les mastocytes	41
III-5-3-5- Les monocytes	42
III-5-3-6- Les lymphocytes	42
III-5-4-Médiateurs de l'inflammation	42
III-5-4-1- Les médiateurs cellulaires	42
III-5-4-2- Les médiateurs plasmatiques circulants	43
III-5-5- Anti-inflammatoires	44
III-5-5-1- Anti-inflammatoire non stéroïdiens	44
III-5-5-2- Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)	44
Chapitre IV : Généralité sur l'espèce agave americana L	46
IV-1- généralité sur le genre Agave	46
IV-2-répartition géographique du genre agave.	46

IV-3-L'espèce <i>agave americana</i> L.	47
IV-3-2-Description botanique de la plante	48
IV-3-2-1-Les feuilles	48
IV-3-2-2-La tige	48
IV-3-2-3-Les fleurs	48
IV-3-2-4-Fruit	49
IV-3-2-5-Graine	49
IV-3-3-Origine et répartition biogéographique	50
IV-3-4-Utilisation traditionnelles de l'espèce <i>agave americana</i> L.	49
IV-3-2-5-Composition chimique	51
IV-3-2-1-Les saponines	52
IV-3-4-2-Composés phénolique	53
IV-3-5-Activités biologiques du genre <i>agave</i>	54
IV-3-5-1-Activité anti-inflammatoire	54
IV-3-5-2-Activité antioxydante	54
IV-3-5-3-Activité antimicrobienne	54
IV-3-5-4-Activité anticancéreuse	55
IV-3-5-6-Activité antidiabétique	55
2^{ème} partie : Etude expérimentale	
<u>Chapitre V: Matériels et méthodes</u>	56
V-1 cadre d'étude	56
V-2 Etude phytochimique	56
V-2-1-Matériel végétal	56
V-2-1-1- Présentation des stations d'échantillonnage	57
V-2-1-1-1-Station 1 (monts du Tessala)	57
V-2-1-1-2- Station 2 : région de Kristel	59
V-2-2-Choix des animaux	63
V-2-3-Appareils et instruments de laboratoires	63
V-2-4-Réactifs chimiques	64
V-3- Méthodes d'extraction	64
V-3-2- Criblage phytochimique	65
V-3-3- Analyse quantitative des composées phénoliques	66
V-4-Evaluation de l'activité antioxydante	68
V-4-1- Méthode de piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil)	68

V-5- Extraction liquide-liquide des flavonoïdes des feuilles	70
V-6- Évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vivo	72
V-7- Analyse qualitative des composés par HPLC	75
V-7- Etude statistique	76
Chapitre VI: Résultats et discussion	77
VI-2- résultats et discussion de l'étude phytochimique	78
VI-2-2 criblage phytochimique	78
VI-2-2- teneurs en composés phénoliques des différents extraits	79
VI-2-2-1-teneurs en composées phénoliques (Feuilles).	79
a) Teneurs en phénols totaux	79
b) Teneurs en flavonoïdes totaux	81
c) Teneurs en tanins condensés	82
VI-2-2-2- teneurs en composés phénoliques (Racines)	84
a) Teneurs en phénols totaux	84
b) Teneurs en flavonoïdes totaux	84
c) Teneurs en tanins condensés	85
VI-2-2- Résultats de l'extraction liquide- liquide	87
VI-2-2-Résultats de l'étude quantitative	89
a) Teneurs en phénols totaux	89
b) Teneurs en flavonoïdes totaux	92
VI-3-évaluation <i>in vitro</i> du pouvoir antioxydant.	93
VI-3-1- évaluation du pouvoir antioxydant des feuilles d'A. americana par différents méthodes d'extraction	93
VI-3-1- évaluation du pouvoir antioxydant des racines d'A. americana par différents méthodes d'extraction	95
VI-3-3- évaluation du pouvoir antioxydant des feuilles d'A. americana par différents solvants	96
VI-4-activité in vivo des extraits décoctés et hydro-éthanolique des feuilles A.americana	98
VI-3-1- L'indentification des molécules par Chromatographie à haute performance en phase liquide (HPLC)	103
Conclusion générale	112
Références bibliographiques	115
Annexes	136

Liste des abréviations

°C : degré Celsius

% : pourcent

AlCl₃: trichlore d'aluminium

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

AIS : Anti-inflammatoire stéroïdien

CLHP : chromatographie liquide haute performance

CO₂ : dioxyde de Carbone

COX : Cyclo-oxygénase

COX-1 : Cyclo-oxygénase 1

COX-2 : Cyclo-oxygénase 2

EEAA : extrait hydro-éthanolique de l'agave americana

EDAA : extrait de décoction de l'agave americana

Fe Cl₃: Trichloride de Fer

FRAP: Ferric Reducing Ability of Plasma

IC₅₀ : concentration en antioxydant nécessaire pour réduire 50%

IL : Interleukine.

IL-6 : Interleukine 6.

IL-1-β : Interleukin-1 beta.

NF-κappaB : Nuclear Factor-kappa B

mm: Millimètre

ml: Millilitre

mg EC/g MS : milligramme équivalent de la catéchine par un gramme de matière sèche

mg EAG/g MS : milligramme équivalent d'acide gallique par un gramme matière sèche

mg: Milligramme

min : minute

ml: Millilitre

mm : Millimètre

NaNO₂ : nitrite de sodium

Na₂SO₄: sulfate de sodium

Na Cl : chlorure de sodium

O₂ : Dioxygène

O₂⁻ : Anion superoxyde

OH⁻ : Ion hydroxyde

OH[°] : Radical hydroxyle

PGE : Prostaglandine

PGI₂ : prostacycline

RL : Radicaux libres

RO[°] : Radical alkoxyde

ROH : Alcool

ROO[°] : Radical peroxyde

ROOH : Hydroperoxyde

ROS : Espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species)

TNF- α : TumorNecrosis Factor α

UV : Ultraviolet.

Liste des figures

Figure 1 : Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate	12
Figure 2 : Structure de base des flavonoïdes.	13
Figure 3 : Squelette de base des sous classes de flavonoïdes.	14
Figure 4 : Schéma général de la voie de biosynthèse des flavonoïdes	15
Figure 5 : Acides hydroxybenzoïques	16
Figure 6 : Acides hydroxycinnamiques « phénylpropanoïdes »	17
Figure 7 : Structure des tanins hydrolysables et les acides associés	18
Figure 8 : Structure des tanins condensés et leur monomère	19
Figure 9 : Structure de base des coumarines	19
Figure 10 : Structure de base des anthocyanidines.	20
Figure 11 : Structure des saponines du ginseng	22
Figure 12 : Structure d'alcaloïdes	23
Figure 13 : structures de quelques pseudo-alcaloïdes	24
Figure 14 : structures de quelques proto-alcaloïdes	24
Figure 15 : acide ascorbique	31
Figure 16 : Les principales étapes de la réaction inflammatoire	38
Figure 16 : Les principales étapes de la réaction inflammatoire	39
Figure 18 : schéma représentatif de la plante <i>agave americana</i>	47
Figure 19 : l'inflorescence d' <i>agave americana</i> L.	48
Figure 20 : les fleurs d' <i>agave americana</i> L	49
Figure 21 : fruit et graines d' <i>agave americana</i> L.	49
Figure 22 : carte de répartition géographique de l' <i>Agave americana</i> L	50
Figure 23 : Structures chimiques des saponines rapportées du genre <i>Agave</i>	52
Figure 24 : structure chimique de quelque flavonoïde isolé d' <i>agave</i> spp.	53
Figure 25 : matériel végétale broyé en poudre	57
Figure 26 : Localisation de la zone d'étude	58
Figure 27 : Localisation géographique des monts de Tessala	59
Figure 28 : Localisation de la station de prélèvement Tessala	59
Figure 29 : situation des grands secteurs biogéographiques en Oranie	61
Figure 30 : localisation de la deuxième station de prélèvement (Kristel)	62
Figure 31 : Principaux sols de la Région d'Oran	63
Figure 32 : souche des rat Wistar et leurs aliments	64
Figure 33 : diagramme des étapes d'extraction des fractions flavonoidiques.	72
Figure 34 : les étapes de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire	75
Figure 35 : teneurs en phénols totaux des différents extraits pour les deux régions	80
Figure 36 : teneur des flavonoïdes dans les différents extraits des deux régions.	82
Figure 37 : teneurs des tanins condensées dans les différents extraits des deux régions	83
Figure 38 : teneurs en phénols totaux des racines d' <i>A.americana</i>	84
Figure 39 : teneurs en flavonoides totaux des racines d' <i>A.americana</i>	85
Figure 40 : teneur en tanins condensés des racines d' <i>A. americana</i> .	86
Figure 41 : rendement des extraits de l'agave de la région de Tessala	88
Figure 42 : rendement des extraits de l'agave de la région de Kristel	88
Figure 43 : teneurs des polyphenols des différents extraits d' <i>Agave americana</i>	90
Figure 44 : teneurs des flavonoïdes des différents extraits d' <i>Agave americana</i> .	92
Figure 45 : pouvoir antioxydant des feuilles d' <i>A.americana</i> évalué par le test DPPH des différentes méthodes des deux régions	94

Figure 46: pouvoir antioxydant des racines d' <i>A.americana</i> évalué par le test DPPH des différentes méthodes des deux régions	95
Figure 47 : Variation des taux d'inhibitions selon les solvants et les zones d'étude	96
Figure 48: Effet des extraits hydro-éthanolique et décocté sur l'épaisseur de l'œdème induit par la carragénine (mm).	100
Figure49 : poucentage d'inhibtion de l'inflammation induit par la carragénine	101
Figure 50: chromatogrames d'HPLC des standards à 280 nm	104
Figure 51: chromatogrammes d'HPLC des extraits des feuilles d' <i>A.americana</i> de la région de Kristel à 280 nm	106
Figure 52: chromatogrames d'HPLC des extraits des feuilles d' <i>A.americana</i> de la région de Tessala à 280 nm.	108
Figure 53: structure de base des flavonoïdes identifiés dans les feuilles d' <i>agave americana</i> .	110

Liste des tableaux

Tableau 1 : squelettes structurels de composés phénoliques et polyphénoliques (groupes hydroxyle non présentées).	11
Tableau 2: Classification taxonomique des Agavacées selon (Takhtajan 1997).	46
Tableau 3: Liste du principal matériel utilisé lors de la réalisation des expérimentations.	65
Tableau 4 : résultats du criblage phytochimiques réalisé sur les feuilles et les racines d' <i>Agave americana</i> L.	78
Tableau 5 : Aspect et couleur des différents extraits d' <i>Agave americana</i> L.	87
Tableau 6: les rendements de différents extraits d' <i>A.americana</i> L. après l'extraction et l'évaporation de 100 g des feuilles sèches.	87
Tableau 7: La teneur globale phénols totaux dans les extraits d' <i>Agave americana</i> L.	89
Tableau 8: La teneur globale des flavonoïdes totaux dans les extraits d' <i>Agave americana</i> L.	92
Tableau 9: effet des extraits d' <i>A. americana</i> et du médicament sur l'épaisseur de l'œdème (mm) en fonction du temps	98
Tableau 10: composés identifiés dans les différentes fractions flavonoïques d' <i>A. americana</i> par HPLC	109

Introduction

Introduction générale

A travers le temps, l'homme a pu compter sur la nature pour assurer ses besoins de base : nourriture, abris, vêtement et également pour ses besoin médicaux. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies est très ancienne et elle évolue avec l'histoire de l'humanité (kalla, 2012).

Jusqu'à aujourd'hui, l'usage populaire des plantes demeure important. D'après les données fournies par l'organisation mondiale de la santé (OMS) 80% de la population mondiale traitent leurs problèmes de santé avec des remèdes traditionnels, d'une part parce qu'elles n'ont souvent pas accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne et, d'autre part, parce que ces plantes ont souvent une réelle efficacité (Novais et *al.*, 2004).

Les plantes médicinales constituent un véritable réservoir de substances naturelles bioactives. En effet, les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses études *in vivo* comme *in vitro*, notamment dans la recherche des nouveaux composés naturels tels que les composés phénoliques.

Au cours de ces dernières années, les résultats des recherches conduites par des spécialistes concourent à démontrer les valeurs de ces plantes pour valider ces vertus médicinales mais aussi pour étudier et identifier les molécules responsables de ces activités, pour cela, des techniques d'extraction, de purification et de caractérisation ont été adoptées.

Les études portant sur le métabolisme de ces composés ont montré que les polyphénols sont faiblement absorbés au niveau de l'estomac ou de l'intestin grêle et qu'ils sont présents en grande quantité dans la lumière du côlon où ils pourraient exercer des effets antioxydants et anti-inflammatoires (Ghalem, 2014).

Les radicaux libres (RL) en général et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) en particulier sont impliqués dans plusieurs pathologies humaines allant d'une simple inflammation au cancer tout en passant par les maladies cardio-vasculaires, l'arthrite rhumatoïde, le diabète et le processus d'apoptose ; en plus de leur action directe en réagissant avec la plupart des macromolécules.

Les espèces réactives de l'oxygène sont des dérivés de l'oxygène hautement réactifs et instables, participant au vieillissement des protéines, à la peroxydation lipidique, et à l'altération de l'ADN. Longtemps considérés comme des agents toxiques responsables de dysfonctions et de la mort cellulaire, il est actuellement admis que les ERO sont de véritables

seconds messagers impliqués dans l'expression des gènes, et la régulation des fonctions de prolifération. De plus, ils sont des médiateurs inflammatoires impliqués dans diverses pathologies (Dhalla, 2000).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre recherche portant sur l'effet des extraits végétaux sur le stress oxydant et l'inflammation d'une plante médicinale très commune en Algérie, et qui n'y a fait l'objet d'aucune étude phytochimique et toxicologique. Il s'agit de l'espèce dite l'*Agave americana* L., appelée localement « sabar ».

L'*Agave americana*, est une plante médicinale de la famille des Agavaceae, souvent confondue avec l'*Aloe vera*, elle possède les mêmes propriétés biologiques que cette dernière mais elles ne sont pas de la même famille.

L'*Agave américain*, est considéré parmi les 500 plantes médicinales largement utilisées en médecine traditionnelle pour ces propriétés biologiques importantes, diurétiques, emménagogues, laxatives et anti-inflammatoires

Notre thèse est composée de trois parties : la première est une synthèse bibliographique structurée en quatre chapitres.

La première, traite des généralités sur la phytothérapie et les plantes médicinales, le deuxième aborde les différents types de métabolites secondaires ainsi que leurs structures, origine et intérêts, le troisième aborde la relation entre le stress antioxydant et l'inflammation et le quatrième est consacré à l'espèce étudiée à savoir l'*Agave americana* L notamment sa description botanique, son origine biogéographique, son aire de répartition, et son intérêt thérapeutique.

La deuxième partie de ce travail consacré au travail personnel, est composée de deux chapitres, le premier décrit les sites d'échantillonnage (Kristal et les monts de Tassala) et le matériel utilisé, mais aussi les différentes méthodes d'extractions et de quantification des composés phénoliques de la plante étudiée ainsi qu'une évaluation du pouvoir antioxydant et anti- inflammatoire avec la caractérisation de quelques molécules flavonoïques par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

La deuxième rapporte les résultats sous forme de tableaux et graphes et leurs discussions

En fin, une conclusion générale résumant l'intérêt thérapeutique de notre plante ainsi que les perspectives de sa valorisation clôturera ce travail de recherche.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les plantes médicinales et la phytothérapie

I-1 les plantes médicinales et la phytothérapie

Depuis la nuit des temps, les hommes ont su développer les extraordinaires vertus médicinales que recèlent les plantes, dont la connaissance et l'utilisation thérapeutique basées sur l'analyse et l'observation s'appellent la phytothérapie (Ali-Delille, 2010).

Pour calmer ces maux l'homme s'est depuis toujours servi des plantes. Il leur a attribué des pouvoirs magiques, puis a appris peu à peu à discerner leurs propriétés. Les plantes médicinales constituent un véritable trésor de santé, de dynamique et de beauté pour l'organisme et l'être humain (Sassi, 2008). Près de la moitié des médicaments que nous utilisons à l'époque actuelle ont une composition d'origine végétale, et le quart renferme des extraits de plantes ou des molécules actives provenant directement des plantes.

I-1-1-Les plantes médicinales

L'utilisation des plantes médicinales comme sources des remèdes pour se soigner ou prévenir des maladies est originaire des millénaires jusqu'à la récente civilisation chinoise, indienne et du Proche-Orient (Mebarki, 2010) parce qu'elles contiennent des composants de valeurs thérapeutiques (Mohammedi, 2006., Jaiganesh, 2011). Elles sont de première importance pour la santé des individus et des communautés et les valeurs médicinales de ces espèces de plantes économiquement importantes sont dues à la présence de certains métabolites secondaires (Thayumanavan *et al.*, 2014). En particulier, ces composés sont importants dans le traitement de conditions potentiellement mortelles (Grabley & Thiericke, 1999).

Une plante médicinale est une plante utilisée pour ses propriétés particulières bénéfiques pour la santé humaine ou animale. Elle est utilisée de différentes manières (décoction, macération, infusion...) et une ou plusieurs de ses parties peuvent être utilisées (racine, rhizome, feuilles, fleurs...) (Dutertre, 2011). Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains (Zeghad, 2009).

Les plantes médicinales et leurs extraits sont utilisés dans les traitements traditionnels de diverses maladies. De nombreux rapports de recherche confirment que les extraits de plantes médicinales ont une activité anti-inflammatoire ; cela est principalement dû à l'enrichissement des extraits avec de nombreuses molécules bioactives (Kacem, 2011). Elles sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme des agents thérapeutiques, mais

aussi comme matière première pour la synthèse des médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs (Decaux, 2002).

I-1-1-1 Le pouvoir des plantes médicinales

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes. Depuis le XVIII^e siècle, au cours duquel des savants ont commencé à extraire et à isoler les substances chimiques qu'elles contiennent, on considère les plantes et leurs effets en fonction de leurs principes actifs. La recherche de ces derniers, extraits des plantes est d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de médicaments essentiels (Iserin, 2001).

Selon le même auteur, Aujourd'hui, les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique. Il est difficile d'imaginer le monde sans la quinine (dérivée du genre *Cinchona*), qui est employée contre la malaria, sans la digoxine (du genre *Digitalis*), qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine (du genre *Ephedra*), que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes.

I-1-1-2- Les différentes méthodes de préparation des plantes médicinales

Diverses méthodes sont utilisées pour la préparation des plantes médicinales, elles dépendent des maladies traitées, des principes actifs ou selon l'organe de la plante utilisée.

Parmi ces méthodes nous avons :

L'infusion

C'est une méthode utilisée pour les herbes fraîches ou sèches, les feuilles, les fleurs mais aussi les racines ou l'écorce sous forme de poudre (Vernex_Lozet, 2011). Elle consiste à verser l'eau bouillante sur les plantes au moment précis, couvrir le récipient et laisser infuser de dix minutes à une heure selon les plantes (Lacoste, 2009).

La décoction

Ce procédé est utilisé pour les parties les plus dures de la plante telles que les racines, le bois ou l'écorce. Elle consiste à maintenir la drogue à ébullition, pendant quinze à trente minutes (Séragé, 2014).

La macération

Les plantes sont laissées à tremper dans un liquide : eau, alcool, huile, miel, vin, vinaigre, etc. Pendant une période d'au moins 15 jours. Les préparations obtenues sont un peu plus compliquées mais se gardent plus longtemps. On peut donc toujours en avoir sous-main (Lacoste, 2011).

 Les teintures :

C'est la méthode la plus utilisée pour obtenir une action immédiate des principes actifs de la plante sur les organes affectés (Ali-Delille, 2010). Elle est fabriquée par extraction des composants actifs de la plante en utilisant de l'alcool. La teinture peut ensuite être conservée sous forme alcoolisée ou glycinée où l'alcool est évaporé et remplacé par de la glycérine (Vernex_Lozet, 2011). Les composants de la plante doivent être absorbés au travers de la muqueuse de la bouche (Ali-Delille, 2010).

 Le suc

Il suffit de réduire la plante en purée. Il est préférable de le faire avec des plantes fraîches mais parfois- quand la plante est trop épaisse ou donne peu de jus – il est nécessaire de la cuire dans un peu d'eau. Une fois la purée de pulpe obtenue, filtrée on peut boire le suc dilué dans un peu d'eau ou l'utiliser en compresse. Cette méthode est rarement employée, car le produit obtenu est souvent très amer et ne se conserve pas (Lacoste, 2011).

 Les cataplasmes

C'est une préparation de plantes fraîches appliquée sur la peau. On l'utilise généralement en traitement d'affection musculaire ou osseuse (claquages, entorses et fractures), ou pour extraire quelque chose de la peau (enlever une écharde ou faire mûrir un furoncle, par exemple). La plante peut être broyée, hachée à chaud ou à froid ou mélangée à de la farine de lin pour obtenir la bonne consistance (Benhamza, 2008).

 Les compresses

Une compresse est un tissu imbibé d'infusion (ou de teinture diluée) que l'on applique sur la peau. Les compresses sont employées pour calmer les maux de tête et les douleurs, désinfecter les plaies et soulager la fatigue oculaire.

I-2-2- La phytothérapie

I-2-2- 1-Aperçu sur l'histoire de la Phytothérapie

L'histoire de la phytothérapie est liée à celle de l'humanité, car dans toutes les cultures, les hommes ont toujours compté sur les valeurs curatives des plantes pour se soigner. Une tablette sumérienne de Nippur, datant du troisième millénaire avant notre ère semble être la plus vieille trace de l'utilisation des plantes par les hommes. Elle comporte la liste des drogues utilisées à cette époque, parmi lesquelles figurent déjà l'opium et la jusquiame.

On retrouve ensuite le Pen-Ts'ao King, écrit par l'empereur chinois Shen Nong vers 2800 avant notre ère, qui a longtemps été considéré comme la plus ancienne pharmacopée du monde. C'est en Grèce vers l'an 400 av. J.-C. que naît vraiment la médecine occidentale sous l'impulsion d'Hippocrate, à la fois médecin et pharmacien. Son œuvre médicale domine toute l'Antiquité car ses connaissances s'étendaient aux drogues de l'occident, mais aussi de l'orient que les Grecs avaient héritées des Perses. Son œuvre est élargie quelques siècles plus tard par Dioscoride qui inventorie plus de cinq cents drogues dans un livre écrit en 77 après J.C., puis traduit en latin et largement diffusé au XVIe sous le titre de *De Materia medica*. Ce traité, qui répertorie toutes les drogues connues du monde antique, vaut à son auteur d'être considéré comme le père de la pharmacognosie. C'est ensuite à la Renaissance que la navigation au long cours permit la découverte des Amériques et de la route maritime des Indes qui engendrèrent de nouveaux progrès : drogues exotiques et épices convergent en Europe. La Renaissance est également l'ère des idées nouvelles. Un éminent médecin suisse, Paracelse, a un rôle déterminant sur l'orientation de la thérapeutique. Il estime que chaque plante possède des vertus spécifiques correspondant à un mal particulier. Pour reconnaître cette propriété, il suffit de savoir « lire la nature », car chaque plante signe par une particularité quelconque son action. À vrai dire, cette théorie des signatures était déjà en honneur en Chine dans l'Antiquité, et on en trouve l'expression empirique dans toutes les sociétés primitives. Par la suite, les connaissances en botanique progressent rapidement avec Césalpin (médecin italien) au XVIe siècle, Tournefort (botaniste français) au XVIIe, puis Linné (médecin et naturaliste suédois) au XVIIIe siècle.

Le XIXe siècle s'ouvre par la loi du 21 germinal an XI (1803) qui organise la pharmacie moderne et confirme aux pharmaciens leur monopole. Plusieurs principes actifs d'origine végétale sont isolés : le sel d'opium découvert par M. Derosne (pharmacien parisien) en 1803, puis la quinine, extraite de l'écorce de quinquina en 1820. En 1875, ce fut la découverte des premiers alcaloïdes de l'ergot de seigle par un pharmacien à Troyens (Charles Tanret). Par la

suite, la notion de médicament s'est dégagée peu à peu de la notion plus vaste de drogue. En effet, les progrès de la chimie organique ont fait naître une catégorie d'actifs entièrement nouvelle formant les substances de synthèse. Au cours du XX^{ème} siècle, les propriétés traditionnellement prêtées aux plantes de la pharmacopée ont fait l'objet d'une recherche scientifique qui a enrichi les connaissances des plantes de la pharmacopée. En 1986, cette science a permis à la phytothérapie d'être officiellement reconnue par le ministère de la santé comme une médecine à part entière. De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales est encore sous forme de médecine la plus répandue à travers le monde (Bureau, 2008).

I-2-2-2 Définition de la phytothérapie

Le mot "phytothérapie" se compose étymologiquement de deux racines grecques : *phuton* et *therapeia* qui signifient respectivement "plante" et "traitement" (Chabrier, 2010). Autrement dit, contrairement à l'allopathie qui utilise majoritairement des principes actifs de synthèse, la phytothérapie emploie les plantes, donc des principes actifs végétaux (Olivier, 2014).

Elle peut donc se définir comme étant une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes ou de préparations à base de plantes (Wichtl, 2003), elle fait partie des médecines parallèles ou des médecines douces (Zeghad, 2010). Par ailleurs la phytothérapie requiert une connaissance parfaite de substances chimiques contenues dans un organe végétal et une bonne connaissance de mode d'emploi (Ramli, 2013).

I-2-2- 3-Types de phytothérapie

On distingue cinq types de phytothérapie

- **Aromathérapie** : est une thérapie qui utilise des huiles essentielles pures extraites des plantes et les essences des plantes (bérengère et al., 2008), ces huiles sont des produits complexes à utiliser souvent à travers la peau.
- **Gemmothérapie** : se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les radicelles.
- **Herboristerie** : correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. L'herboristerie se sert de la plante fraîche ou sèche ; elle utilise soit la plante entière, soit une partie de celle-ci (écorce, fruits, fleurs). La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion,

macération. Ces préparations existent aussi sous forme plus moderne de gélule de poudre de plante sèche que le sujet avale.

- **Homéopathie** : a recours aux plantes d'une façon prépondérante, mais non exclusive ; les trois quarts des souches sont d'origine végétale, le reste étant d'origine animale et minérale.
- **Phytothérapie pharmaceutique** : utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présentés sous forme de sirop, de gouttes, de gélules, de lyophilisats... (Strang, 2006).

I-2-2-4- L'intérêts de la phytothérapie

Tout d'abord, la phytothérapie est une indication de premier plan, c'est-à-dire qu'elle peut représenter un mode thérapeutique à elle seule. On retrouve par exemple cela avec le millepertuis dans la dépression légère, l'aubépine dans les troubles mineurs du rythme cardiaque, le ginkgo et la vigne rouge dans l'insuffisance veineuse, ou encore les plantes à mucilages ou à dérivés anthracéniques dans la constipation. La phytothérapie est aussi utilisée en thérapeutique de second plan, comme adjuvant en complément d'un traitement plus puissant. Par exemple, dans le cas d'une hypertension artérielle mineure, on peut employer une préparation à base des feuilles d'olivier en plus d'un traitement antihypertenseur. Enfin, la phytothérapie est utilisée en traitement de troisième plan, en traitement de terrain. Elle permet alors de prendre en charge une maladie dans sa globalité, et également en prévention. C'est le cas par exemple de l'utilisation des plantes immunostimulantes (comme l'échinacée), ou encore des plantes riches en vitamines et oligoéléments (Duriez, 2000).

Le grand intérêt de la phytothérapie est la bonne tolérance des plantes, lorsque celles-ci sont utilisées aux bonnes posologies. De plus, l'utilisation des plantes en tant que médicaments est souvent basée sur des observations empiriques et des traditions qui datent parfois de milliers d'années. Les effets secondaires, le plus souvent peu marqués, sont donc généralement mieux connus que pour les molécules de synthèse (Arnal-Schnebel, 2004).

Chapitre II: Généralité sur les métabolites secondaires

II- 1-Généralité sur les métabolites

Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes. Elles renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme. On distingue ainsi deux groupes de métabolites : les métabolites primaires et les métabolites secondaires (Muanda, 2010).

Les métabolites primaires sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ils sont classés en quatre grandes catégories : les glucides, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques (Kone, 2009).

Les métabolites secondaires sont des molécules indirectement essentielles pour la survie de la plante. Ils jouent un rôle important dans la défense contre les agressions extérieures. Les produits du métabolisme secondaire qui sont émis en très faible quantité, sont d'une grande variété structurale (plus de 200000 structures définies). Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique.

II-2-les métabolites secondaires

Dès la fin du 19ème siècle, le botaniste allemand Julius Von Sachs reconnaît l'existence de molécules produites en dehors des voies métaboliques strictement nécessaires à la survie de la plante (Hartmann, 2007). Par la suite, ces composés sont nommés « métabolites secondaires », par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides (Fortin, 2012).

On désigne par « métabolite secondaire » toute substance présente chez un organisme et qui ne participe pas directement aux processus de base de la cellule vivante (Bourgau, 2013), ils sont un groupe important et diversifié de molécules (Reed, 2006) qui ont un rôle clé dans la protection des plantes contre les herbivores et les infections microbiennes, pour attirer les pollinisateurs et les semences-dispersant, et comme un agents allélopathiques, UV protecteur et des molécules de signalisation dans la formation de fixation de l'azote dans les nodules des racines des légumineuses (Crozier *et al.*, 2006) . Ils ont une distribution très limitée que les métabolites primaires dans l'ensemble du règne végétal (Mazid, 2011), Cette distribution varie d'une plante à l'autre (Hamidi, 2013). Il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique (Bouhadjra, 2005).

Les métabolites secondaires constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour leurs propriétés anti oxydantes, anti microbiennes, anti-inflammatoires et anti carcinogènes ou mutagènes (Epifano et al., 2007).

II-3 -classe des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont classés en 3 classes majeures : les composées phénoliques, les terpènes, et les alcaloïdes

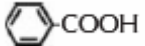
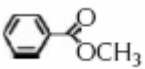
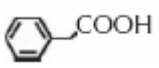
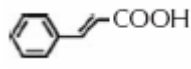
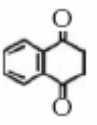
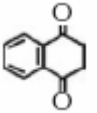
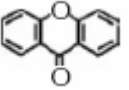
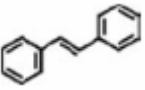
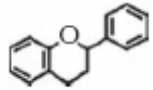
II-3-1- Les composées phénoliques

Les composés phénoliques sont une vaste classe de substances organiques cycliques très variées, d'origine secondaire (Attou, 2011), caractérisent par la présence d'un noyau benzénique, portant un groupement hydroxyle libre ou engagé dans une fonction ester, éther ou hétéroside (Fortin, 2012), ou sous forme de polymères naturels (tanins) (Attou, 2011), forment le groupe des composés phytochimiques le plus important de plantes (Beta *et al.*, 2005).

Les composées phénoliques divisés en plusieurs catégories : anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénols, xanthones et autres phloroglucinols où les flavonoïdes représentent le groupe le plus commun et largement distribué (Tableau1).

La grande diversité structurale des composés phénoliques rend difficile une présentation globale des méthodes qui permettent leur extraction et leur isolement, des processus mis en jeu au cours de leur biosynthèse, de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques (Bruneton, 1993). Toutes les classes de composés phénoliques comportent un grand nombre de structures différentes en fonction du nombre et de la position des groupements hydroxyles sur le squelette de base. Ces structures peuvent également être diversement substituées (glycosylées, estérifiées, acylées...) (Muanda, 2010).

Tableau 1 : squelettes structuraux de composés phénoliques et polyphénoliques (groupes hydroxyle non présentés).

Nombre de carbone	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C6-C1	Acide Phénolique	Acide gallique	
8	C6-C2	Acétophénonnes	Gallacetophenone	
8	C6-C2	phénylacétate acide	Acide p-hydroxyphenylacétique	
9	C6-C3	hydroxycinnamique acide	Acide p-coumarique	
9	C6-C3	Coumarines	Esculetin	
10	C6-C4	Naphtoquinones	Juglone	
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiferin	
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Resveratrol	
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes	Naringenine	

II-3-1-1- Biosynthèse des composés phénoliques

Les composées phénoliques des végétaux sont issues de deux voies d'aromagenèse (bruneton, 2009) : la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate/malonate.

➤ Voie de l'acide shikimique (Figure 1)

C'est la voie la plus courante, conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïques, acétophénonnes, lignanes et lignines, coumarines (Bruneton, 2009).

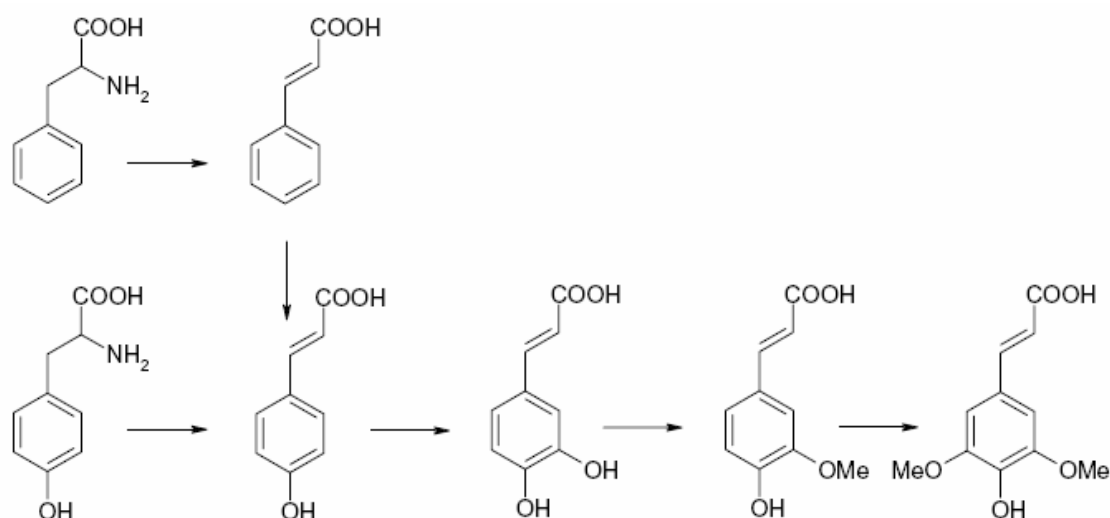


Figure 1 : Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate (Crozier *et al.*, 2006). PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase.

➤ Voie de l'acétate / malonate (Figure 2)

La glycolyse et la β -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (Akroum, 2010).

II-3-2-Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques comprenant quinze atomes de carbone, avec deux noyaux aromatiques reliés par un pont à trois de carbone (Crozier *et al.*, 2006), c'est le groupe le plus commun de composés polyphénoliques qui se trouvent ubiquitaire dans les plantes (Khatiwora *et al.*, 2010), largement distribués dans les feuilles, tissus fleuris et pièces ligneuses comme les tiges et l'écorce (Kähkönen *et al.*, 1999), et souvent responsable aux côtés des caroténoïdes et les chlorophylles de leur bleu, violet, jaune, orange et rouge (Khoddami *et al.*, 2013). Les flavonoïdes (plus de 3000) ont une origine biogénétique commune (Krief, 2004) et on peut distinguer cinq grands sous-groupes : les flavones, les flavonols, les flavanones, flavanols et anthocyanidines (Beenu et Modgil, 2012). Leur variation structurelle dans chaque sous-groupe est en partie due au degré et le mode d'hydroxylation, méthyloxylation, prénylation, ou glycosylation (Dai *et al.*, 2010).

II-3-2-1-Structure des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par une chaîne en C3. (bruneton, 1999)

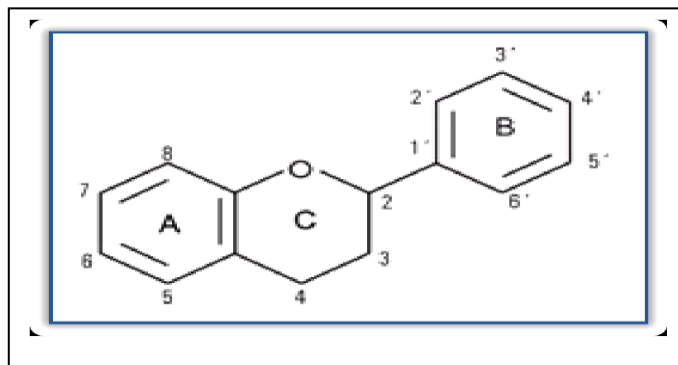


Figure 2 : Structure de base des flavonoïdes. (Di Carlo et *al.*, 1999).

II-3-2-2-Classification des flavonoïdes (Figure3)

Les flavonoïdes se différencient par le degré d'oxydation de l'hétérocycle C et par les modes d'hydroxylation des anneaux A et B. Dans toutes les classes de flavonoïdes mentionnées ci-dessous, la biosynthèse justifie la présence fréquente d'au moins trois hydroxyles phénoliques en C-5, C-7 et C-4' de la génine ; cependant, l'un d'entre eux peut être absent. Six grandes classes de flavonoïdes peuvent être mentionnées. Les flavones et les flavonols sont les composés flavonoïdiques les plus répandus, alors que les flavanones, les flavanols, les chalcones et les anthocyanidines sont considérés comme des flavonoïdes minoritaires en raison de leur distribution naturelle restreinte (Bruneton, 1999 ; Harborne et Williams, 2000 ; Havsteen, 2002 ; Dacosta, 2003).

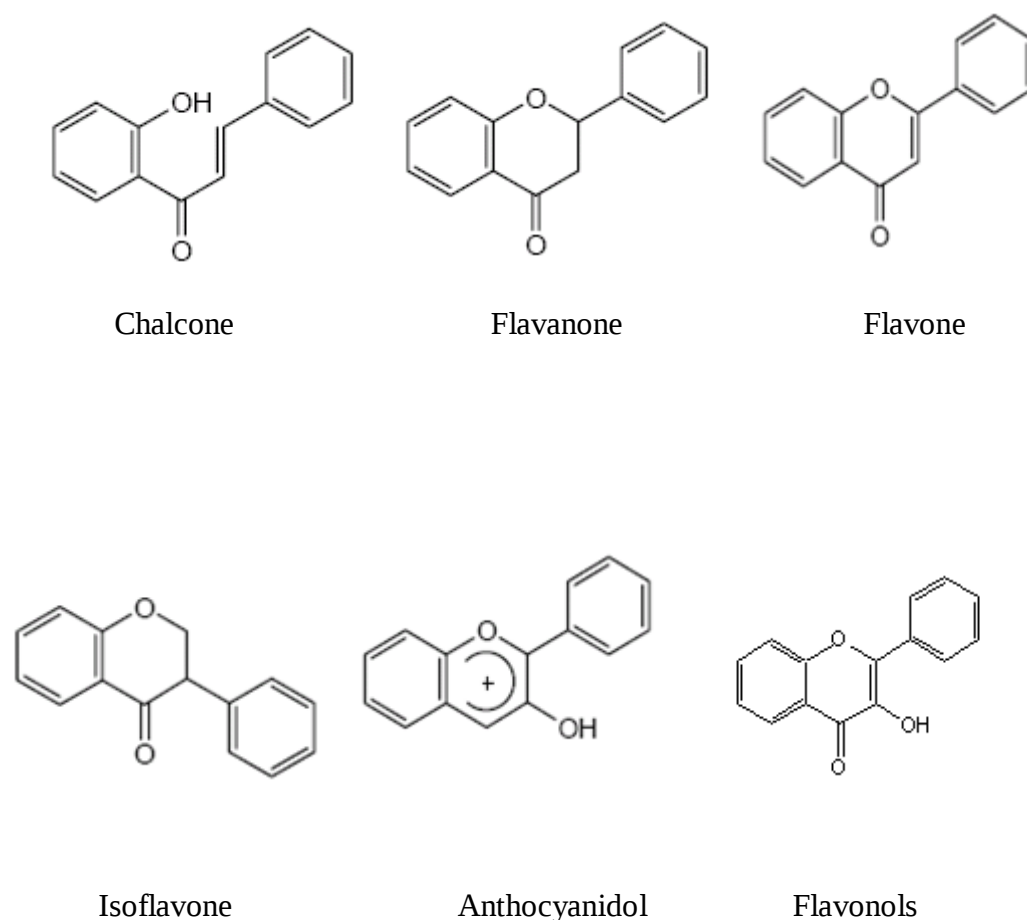


Figure 3 : Squelette de base des sous classes de flavonoïdes (Fiorucci, 2006)

II-3-2-3-Biosynthèse des flavonoïdes (Figure 4)

L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation de trois molécules de malonyl-CoA avec un ester du coenzyme A et d'un acide hydroxycinnamique, en règle générale le 4- coumaroyl-CoA, pour obtenir la 4, 2, 4', 6'-tetrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthase) (Bruneton, 1999). Pour la majorité des plantes, la chalcone ne s'accumule pas. Elle est métabolisée, via de multiples étapes enzymatiques, en différentes classes de flavonoïdes : les flavanones, les dihydroflavonols et finalement les anthocyanes. D'autres classes de flavonoïdes telles que les isoflavones, les flavones, les aurones, les pro- anthocyanidines et les flavonols sont issues de voies de biosynthèse latérales dont les précurseurs sont les intermédiaires de formation des anthocyanes (Schijlen et *al*, 2004).

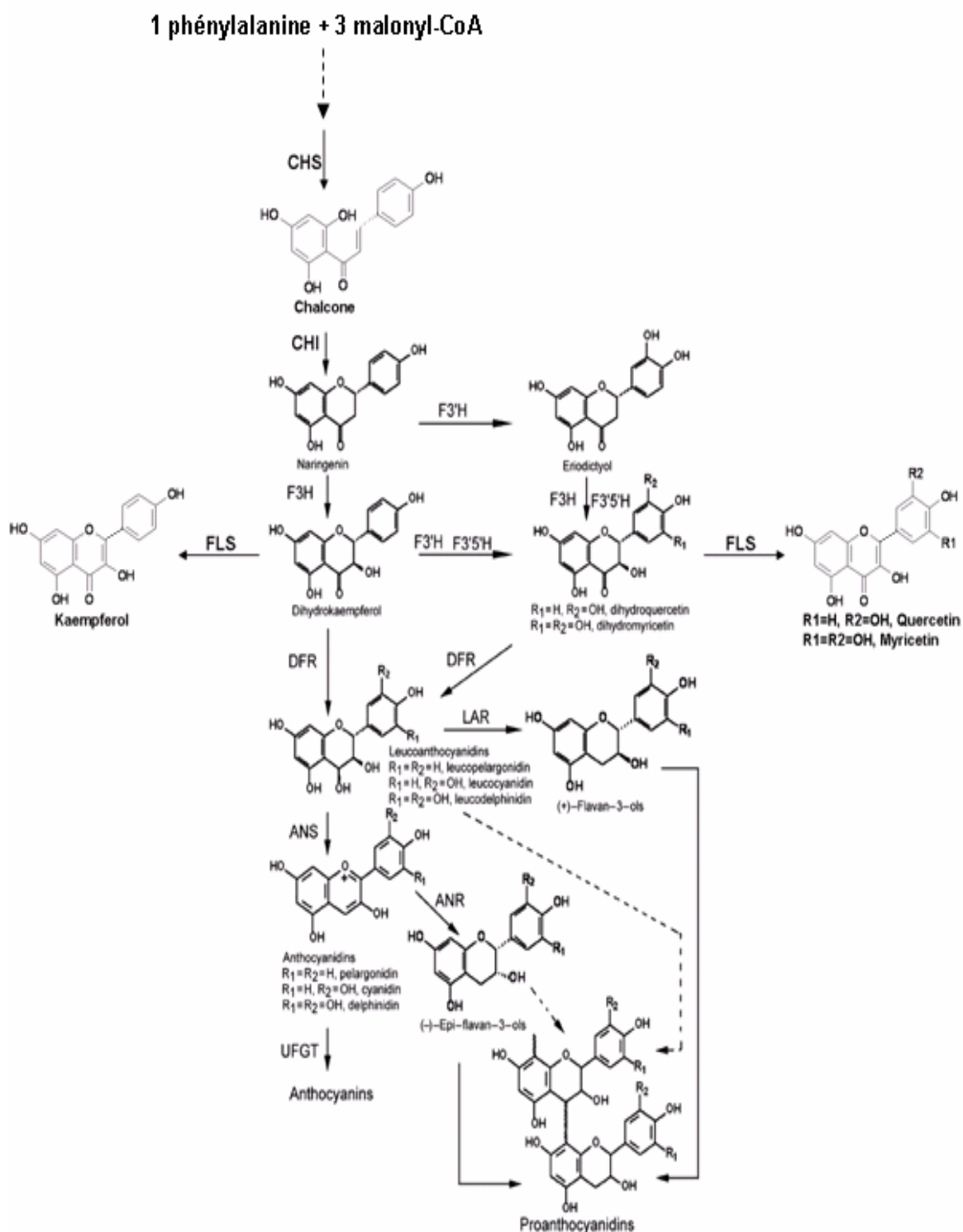


Figure 4 : Schéma général de la voie de biosynthèse des flavonoïdes

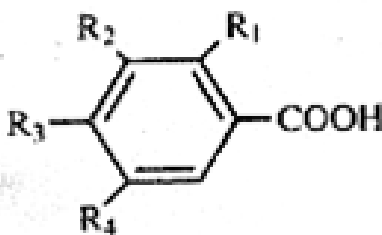
CHS, chalcone synthase ; CHI, chalcone isomérase ; F3H, flavanone-3-hydroxylase ; F3'H, flavonoïde 3'-hydroxylase ; F3'5'H, flavonoïde 3',5'-hydroxylase ; FLS, flavonol synthase ; DFR, dihydroflavonol réductase ; LAR, leucoanthocyanidine réductase ; ANS, anthocyanidine Synthase ; ANR, anthocyanidine réductase ; UFGT ou 3-GT, uridine diphosphate glucoseflavonoïde3-O glucosyl transférase.

II-3-3- Les acides phénoliques

On distingue deux principales classes d'acide phénolique ; les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. La concentration de l'acide hydroxybenzoïque est généralement très faible chez les végétaux comestibles. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine par contre ceux d'acides hydroxy cinnamiques sont très présents (Fleuriet *et al.*, 2005).

➤ Acides hydroxybenzoïques :

Les acides phénols en C6-C1, dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside. L'acide gallique et son dimère (l'acide hexahydroxydiphénique) sont les éléments constitutifs des tannins hydrolysables. D'autres aldéhydes correspondants à ces acides, comme la vanilline, est très utilisé dans le secteur pharmaceutique (Bruneton, 1993). Ils sont particulièrement représentés chez les gymnospermes et les angiospermes.

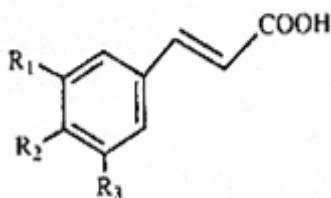


R1=R2=R3=R4=H	acide benzoïque (non phénolique)
R1=R2=R4=H, R3=OH	acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque
R1=R4=H, R2=R3=OH	acide protocatéchique
R1=R4=H, R2=OCH3, R3=OH	acide vanillique
R1=H, R2=R3=R4=OH	acide gallique
R1=H, R2=R4=OCH3, R3=OH	acide syringique
R1=OH, R2=R3=R4=H	acide salicylique
R1=R4=OH, R2=R3=H	acide gentisique

Figure 5 : Acides hydroxybenzoïques (Bellebcir, 2008)

➤ Acides hydroxycinnamiques :

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C6 – C3) dérive de celle de l'acide cinnamique grâce à des substitutions au niveau du cycle aromatique (Richeter, 1993 ; Guignard, 1974 ; Psotova *et al.*, 2003).



R1=R2=R3=H	acide cinnamique (non phénolique)
R1=R3=H, R2=OH	acide <i>p</i> -coumarique
R1=R2=OH, R3=H	acide caféique
R1= OCH3, R2=OH, R3=H	acide férulique
R1=R3=OCH3, R2=OH	acide sinapique

Figure 6 : Acides hydroxycinnamiques « phénylpropanoïdes » (Bellebcir, 2008)

II-3-4- Les tanins

Les Tanins sont des composés phénoliques de structures variées (Bouhadejera, 2005) constituées par un mélange de glucosides et d'acide gallique (Bellebcir, 2008), ayant une masse moléculaire compris entre 500 et 3000 (Haslam, 1996 ; Cowan, 1999). On les rencontre, en petite quantité, dans de très nombreuses plantes. (Verdrager, 1978). Les tanins sont composés en deux classes :

➤ Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables anciennement appelés tanins pyrogalliques, sont des polyesters de glucides et d'acide-phénols (Bouhadejera, 2005). Ils sont d'abord caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par l'hydrolyse chimique (enzymatique) (Bellebcir, 2008). Selon la nature de ces tanins, on distingue les tanins galliques dans le cas d'acide gallique et les tanins ellagiques dans le cas d'acide ellagique.

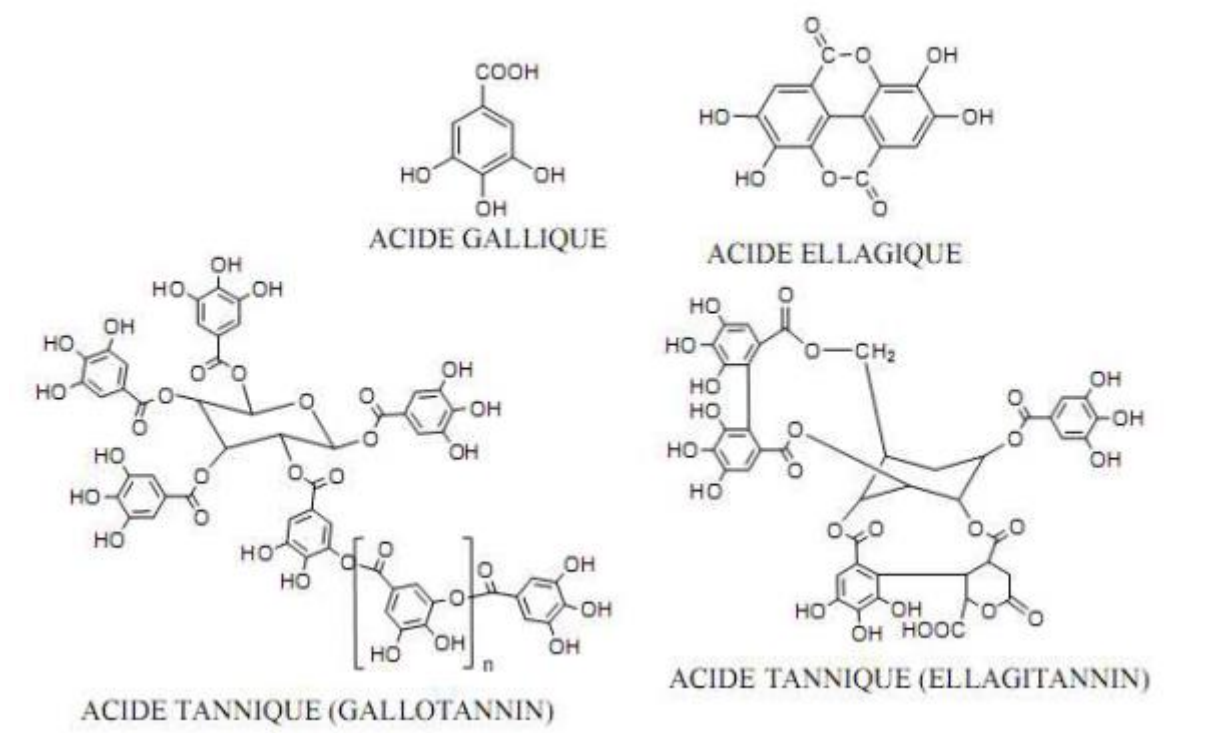


Figure 7 : Structure des tanins hydrolysables et les acides associés (Peronny, 2005).

➤ Tanins condensés

Les tanins condensés ou proanthocyanidols diffèrent fondamentalement, des tanins galliques et ellagiques (Bouhadejera, 2005), car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes (Belyagoubi, 2011). Ils sont formés de deux ou plusieurs molécules de flavan-3-ols, leur union se fait par des liaisons carbone-carbone, le plus souvent en position 4-8 ou 4-6, ce qui rend ces molécules difficilement hydrolysables (Bouhadejera, 2005). Ils ont la propriété de coaguler les protéines du derme, d'où leur utilisation dans le tannage des peaux (Guignard, 2000).

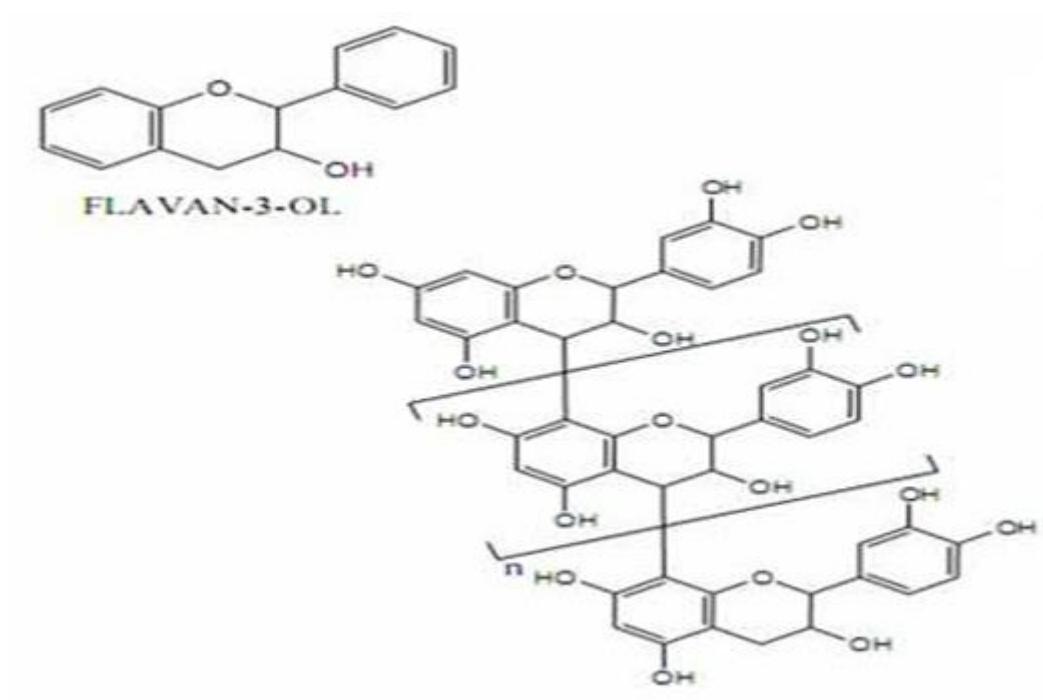


Figure 8 : Structure des tanins condensés et leur monomère (Peronny, 2005).

II-3-5 -Coumarines

Les coumarines qui sont aussi les dérivés de C6-C3, appartiennent au groupe des composés connus par des benzo- α -pyrone (OKennedy et Thornes, 1997), ils se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses (Bellebcir, 2008).

Les coumarines présentent des effets cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du coeur), hypotensives, elles sont aussi bénéfiques en cas de affections cutanées. (González-Gallego *et al.*, 2007).

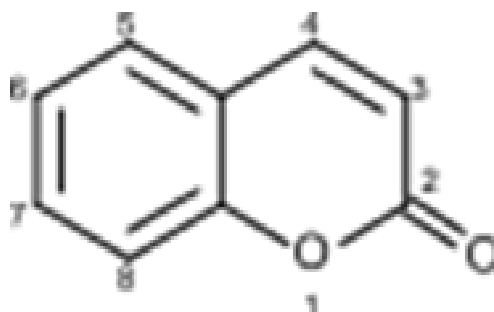


Figure 9 : Structure de base des coumarines

II-3-6 -Les Anthocyanes

Ce sont des pigments vacuolaires rouges, roses, mauves, pourpres, bleus ou violets de la plupart des fleurs et des fruits (Bruneton, 1993).

Les anthocyanes sont des dérivés du cation 2-phényl-1-benzopyrylium (flavylium) porteur de 3 cycles aromatiques conjugués d'où l'absorption de lumière visible (Brouillard, 1986).

Dans la nature, ces pigments n'existent pas sous forme aglycone, mais sous forme d'hétérosides. Les sucres sont liés au chromophore en position 3, mais aussi en position 5 et plus rarement en position 7 (Brouillard, 1986).

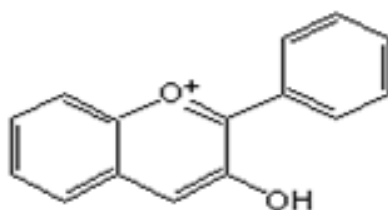


Figure 10 : Structure de base des anthocyanidines.

II-3-7 -Les quinones

Les quinones sont des noyaux aromatiques avec deux substitutions cétones. Ce sont des substances colorées et brillantes, en général rouges, jaunes ou oranges et possédant deux fonctions cétones. Elles sont responsables de la réaction de brunissement dans les fruits et végétaux coupés ou lésés. En plus de fournir une source de radicaux libres stables, les quinones sont connues pour se complexer de manière irréversible avec les nucléophiles des acides aminés dans les protéines. Par conséquent, les quinones inactivent les protéines et altèrent leur fonction (Arif *et al.*, 2009). On trouve les quinones dans les végétaux, les champignons et les bactéries. Les organismes animaux contiennent également des quinones, comme par exemple la vitamine K qui est impliquée dans la coagulation du sang. Les quinones sont utilisées dans les colorants, les médicaments et dans les fongicides (Kansole, 2009).

II-3-8 -Les lignines

Les lignines constituent une classe importante de produits naturels dans le règne végétal et seraient formés par polymérisation oxydative de monolignols (monomères) qui sont les alcools *p*-coumarique, coniferique et sinapique (Sakagami *et al.*, 2005).

II-3-9- Les xanthones

Ils constituent une famille de composés phénoliques généralement isolés dans les plantes supérieures et dans les microorganismes répondant à une structure de base C6-C1-C6 (Sakagami *et al.*, 2005).

II-4- Les terpènes

Dans le règne végétal, les terpènes sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires. Leur classification est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de base isoprène (à 5 atomes de carbone) (Harkati, 2011). Il a été répertorié plus de 30 000 composés dont la très grande majorité est spécifique du règne végétal et qui englobe les arômes et parfums, les antibiotiques, les hormones végétales et animales, les lipides des membranes (Singh, 1998). Ils sont formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta carbonées ramifiées dérivées du 2-méthyl butadiène, appelées unités isopréniques (C_5H_8) *n*. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des anneaux (Benayache, 2005). La dénomination des différentes classes de molécules terpéniques repose sur le nombre de motifs isoprènes constituant leur squelette (Ramli, 2013). Ainsi on rencontre :

- Monoterpènes qui comptent deux unités isoprènes soit 10 atomes de carbone
- Sesquiterpènes qui contiennent 3 unités isoprènes soit 15 atomes de carbone
- Diterpènes qui comportent 4 unités isoprènes soit 20 atomes de carbone
- Sesterpènes qui comptent 25 atomes de carbone
- Triterpènes qui comportent 30 atomes de carbone
- Tétraterpènes qui contiennent 40 atomes de carbone.

II-4-1- Les saponines

Les saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux (Azzi, 2013., Kougan, 2013), de masse moléculaire entre 600 à 2000 Daltons et de structure complexe (Amzal, 2010). Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensio-actives : ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes (Timite, 2012). Structuralement parlant, les saponines sont constituées d'un squelette stéroïdique ou triterpénique porteur d'une (monodesmoside) ou de plusieurs (bidesmoside, tridesmoside) sections sucres (Ghauthier, 2008). Le fragment de sucre est lié avec l'aglycone par un éther ou un ester glycoside le lien à un ou deux sites glycosylation (Yücekutlu *et al.*, 2008). Une large variété de plantes

appartenant à la famille des Liliaceae, Dioscoreaceae, Solanaceae, Sapindaceae et Agavaceae est la sources majeure de saponines (Negi et *al.*, 2013).

II-4-1-1-Structure des saponines

Ce n'est que dans les années 70 avec l'aide des techniques de dégradation chimiques que leurs structures furent déterminées (Amzal, 2010).

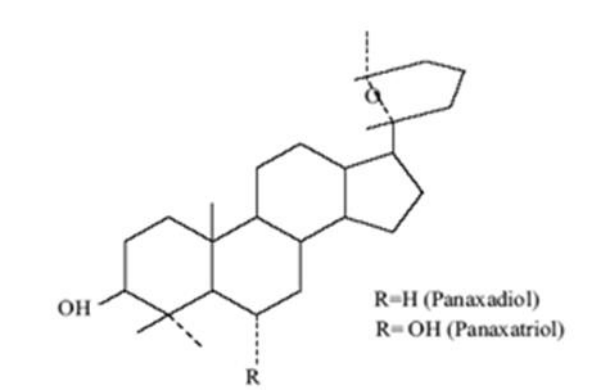


Figure 11 : Structure des saponines du ginseng (Packer, 2001)

II-4-1-2-Classe des saponines

Structuralement, les saponines peuvent être classés en deux groupes selon la nature de la génine : les saponines à génines triterpéniques, de loin les plus nombreux existant chez les angiospermes dicotylédones et chez certains animaux marins et celles à génines stéroïdiques, presque exclusivement présentes chez les angiospermes monocotylédones (Bruneton, 2009).

II-5 -Les alcaloïdes

Le mot alcaloïde dérive du mot *alcalin* qui était utilisé pour décrire les bases de Lewis contenant les hétérocycles azotés. Le terme alcaloïdes a été introduit par W.Meisner au début du XIX^e siècle pour désigner des substances réagissant comme des bases, comme des alcalins (de l'arbre al Kaly, la soudet du grec eidos, l'aspect). Il n'existe pas de définition précise des alcaloïdes et il est parfois difficile de situer les frontières qui séparent les alcaloïdes des autres métabolites azotés naturels (Bruneton, 2009), Bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques (comme la strychnine ou l'aconitine), certains sont employés dans la médecine pour leurs propriétés analgésiques (comme la morphine, la codéine), dans le cadre de protocoles de sédation (anesthésie, atropine) souvent accompagnés des hypnotiques, ou comme agents antipaludéens (quinine, chloroquinine) ou agents anticancéreux (taxol, vinblastine, vincristine) (Muanda, 2010).

Les alcaloïdes sont essentiellement présents chez les Angiospermes, environ 10 à 15%, d'entre elle synthétisent ce type de molécules, et plus particulièrement les dicotylédones (VU, 2008).

II-5-1-Structure des alcaloïdes

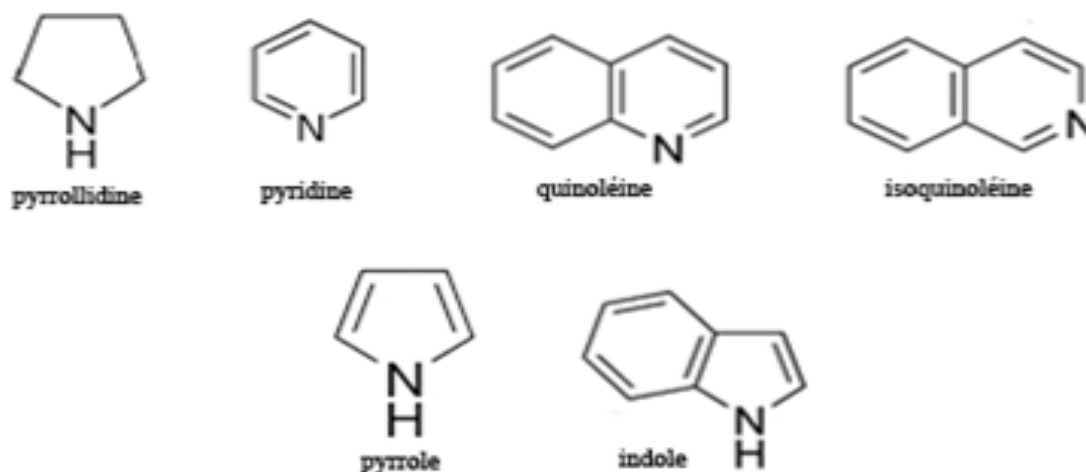


Figure 12 : Structure d'alcaloïdes (Maldonado, 2012)

II-5-2-Classe des alcaloïdes

On divise les alcaloïdes en trois classes : les alcaloïdes vrais, les proto-alcaloïdes et les pseudo-alcaloïdes.

✓ Les alcaloïdes vrais

Sont des substances d'origine naturelle et de distribution restreinte, de structure souvent complexe, azotée (atome d'azote inclus dans un hétérocycle) et de caractère basique (Maldonado, 2012). Ces substances sont douées d'une grande activité biologique, même à faible dose. Ils sont présents dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme de sel, soit comme N-oxyde (Badiaga, 2011).

✓ Les pseudo-alcaloïdes

Les pseudo-alcaloïdes présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés. Il s'agit dans la majorité des cas connus d'isoprénoides et l'on parle alors d'alcaloïdes terpéniques : alcaloïdes monoterpéniques (ex. : β -Skytanthine), sesquiterpéniques comme l'aconitine du tubercule d'aconit ou stéroïdiques

(ex. : paravallarine). On connaît également quelques substances azotées hétérocycliques issues du métabolisme de l'acétate : c'est le cas de la coniine, principe toxique de la ciguë.

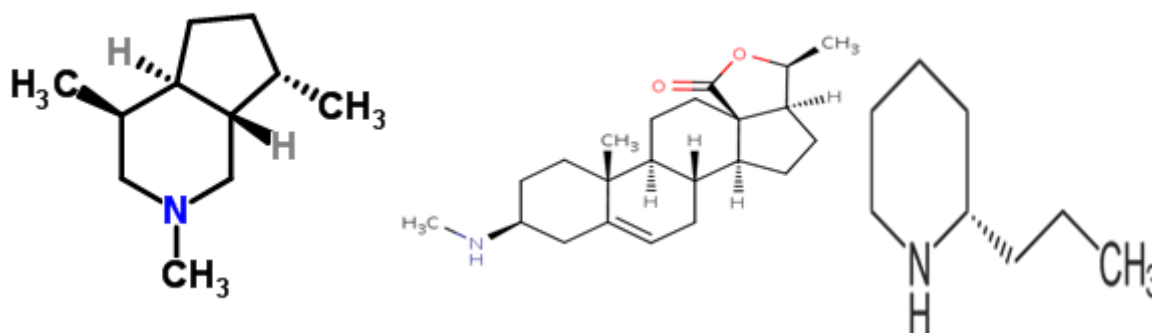


Figure 13 : structures de quelques pseudo-alcaloïdes

✓ Les proto-alcaloïdes

Les proto-alcaloïdes sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un hétérocycle, ils ont un caractère basique et sont élaborés *in vivo* à partir d'acide aminé. Diverses substances répondent à cette définition : des amines simples comme la sérotonine, la mescaline du pyolt ou la cathinone du thé des abyssins, mais aussi les bétaines (qui résultent de la quaternarisation de l'azote des acides aminés), certains auteurs incluent les bétalaïnes (parfois appelées chromo-alcaloïdes) dans ce groupe (ex. : betanine) (Bruneton, 2009).

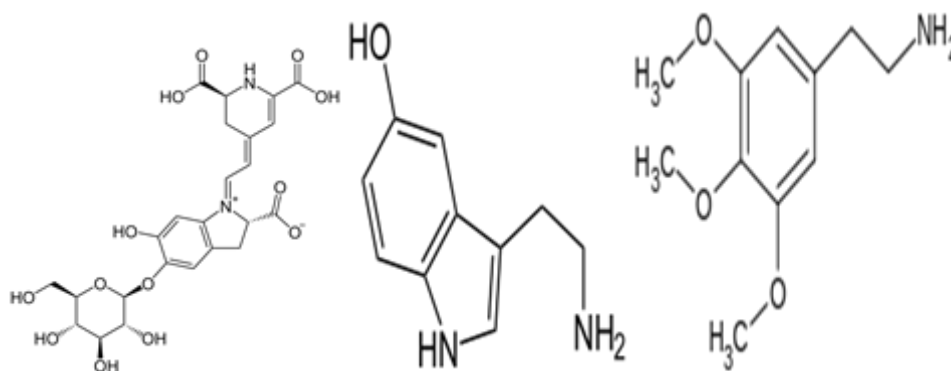


Figure 14 : structures de quelques proto-alcaloïdes

II-6 -Intérêt des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont reconnus par leurs activités biologiques. Beaucoup de métabolites se comportent comme signaux chimiques que la plante utilise pour s'adapter aux changements défavorables de l'environnement (Chadbury et al., 1985). D'autres ont pour rôle de défense contre les herbivores, les pathogènes, les parasites ou l'inhibition de la germination et la croissance des plantes concurrentes (Baskin et al., 1967 ; Hale et al., 2004). Certains assurent une protection contre les radiations solaires, lorsque d'autres favorisent la dispersion du pollen et des graines grâce à la couleur ou au parfum des fleurs (Vu, 2008).

Les composés phénoliques peuvent intervenir dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...), dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV); soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux; dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles...) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules...) et des produits qui en dérivent par la transformation; dans les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentées...) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini (Fleuriet, 2005).

Le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (Fleuriet, 2005).

Les flavonoïdes sont l'un des plus grands groupes de métabolites secondaires qui jouent un rôle important dans les plantes. Ils interviennent comme des composés de défense ainsi que dans la signalisation de la reproduction, de la pathogenèse et de la symbiose (Harkati, 2011).

Les flavonoïdes sont essentiellement connus pour leur action anti-oxydante. Ils participent à combattre les radicaux libres issus de l'oxygène et de l'azote (Mouffok, 2011). Aussi, ils ont d'autres activités : anti-bactérienne, antivirale, anti-tumoral, anti-inflammatoire, anti-allergique et anti-cancéreuse (Xu et al., 2007).

Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (Kebieche, 2009). 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,

quercétine et myricétine) inhibent la prolifération des lymphocytes T alors que la myricétine est active sur les lymphocytes B (Mookerjee et *al.*, 1986).

Les chalcones et les dihydrochalcones constituent une autre classe des flavonoïdes ont été étudiées pour leurs propriétés anticancéreuses (Anto et *al.*, 1995 ; Go et *al.*, 2005), antiinflammatoires (Go et *al.*, 2005 ; Nowakowska, 2006), antioxydantes (Anto et *al.*, 1995), antimicrobiennes et antiparasitaires (Nowakowska, 2006).

Les isoflavones sont des produits de défense naturelle, de puissants oestrogènes, insecticides, antitumoraux, réducteurs des manifestations de la ménopause (Ramli, 2013).

Les anthocyanes ont des propriétés pharmacologiques très proches de celle des flavonoïdes vu leurs structures très semblable. L'effet antioxydant des anthocyanes est expliqué en partie par piégeage des radicaux libres et la chélation des métaux. Les anthocyanes inhibent les enzymes protéolytiques de dégradation du collagène (élastase, collagénase), ce qui explique leurs propriétés vasoprotectrices et anti-oedémateuses. Il s'agit, en outre, de composés veino-actifs doués d'une propriété vitaminique P (Bruneton, 1999).

Les acides phénoliques connus pour ces propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques urinaire, antiradicalaires et hépatoprotecteurs (Bruneton, 1999).

Les coumarines ont des propriétés antipyrétique, analgésique, sédative, antioedémateuses et anti convulsivante. Ils sont probablement responsables de l'effet anticonvulsivante (Harkati, 2011). Les coumarines ont indiquées dans les cas de lymphoedème du membre supérieur après traitement radiochirurgical du cancer du sein. Concernant les dérivés coumariniques, certains d'entre-eux possèdent des activités pharmacologiques, principalement anticoagulantes. Les plus connus sont le dicoumarol et l'esculoside, tous deux veinotoniques et vasculoprotecteurs (Hostettmann, 1997).

Les applications médicales des plantes à tanins découlent de leur affinité pour les protéines : ils ont un effet antidiarrhéique, et par voie externe, ils imperméabilisent les couches superficielles de la peau, sont vasoconstricteurs et limitent la perte en fluides. Ces propriétés, ajoutées par ailleurs à leur effet antiseptique, en font des molécules intéressantes pour la régénération des tissus en cas de blessures superficielles ou de brûlures, et les rendent utilisables dans le traitement des diarrhées infectieuses (Okuda et *al.*, 1983 ; Bruneton, 1999).

Les terpénoïdes et les stéroïdes constituent probablement la plus large classe de composés secondaires (Krief, 2003). Ils sont connus par leurs activités cytostatiques, intesticides, anti-inflammatoire, molluscicides et analgésique (Bruneton, 1999).

Les saponines ont été intensivement étudiées au cours des dernières années, ils sont reconnus pour avoir un fort potentiel pharmacologique. La communauté scientifique a

démontré un intérêt marqué envers cette classe de métabolites secondaires afin d'accélérer le processus lié à leur développement biopharmaceutique (Francis *et al*, 2002). En effet, les saponines à génines stéroïdiques et triterpéniques exercent des activités biologiques très variées telles qu'hémolytique, hypocholestérolimique, immunostimulant, molluscicide, anti-inflammatoire, antifongique, antibactérienne, antiparasitaire, cytotoxique et anti-tumorale, pour ne nommer que celles-ci (Rao *et al*, 2000 ; Francis *et al*, 2002 ; Sparg *et al*, 2004). Bien que leurs fonctions à l'intérieur des plantes ne soient pas entièrement comprises, il a été démontré que les saponines jouent un rôle essentiel dans la protection des plantes contre les espèces pathogènes (Gauthier, 2008).

Les alcaloïdes constituent une classe de produits naturels présentant une grande diversité structurale. Leurs propriétés biologiques, aussi variées que leurs structures, continuent à être bénéfiques dans les traitements de différentes maladies ou des dysfonctionnements de l'organisme humain (Mauro, 2006).

Plusieurs alcaloïdes sont très toxiques et offrent, par conséquent, un arsenal chimique de défense des plantes contre l'attaque des herbivores et des micro-organismes. La nicotine empêche la croissance des larves du tabac. Le composé pur est également appliqué comme insecticide efficace dans des serres. En outre, des alcaloïdes protègent les plantes contre les dommages provoqués par la lumière UV. Ils constituent aussi une réserve de substances capables de fournir l'azote ou d'autres fragments nécessaires au développement de la plante. Parfois, ils n'ont pas de rôle précis et sont simplement des sous-produits du métabolisme végétal (Mauro, 2006 ; Badiaga, 2011).

Chapitre III : Stress oxydant et inflammation

III-1-Stress oxydant et inflammation

Nos cellules et tissus peuvent être soumis à une grande variété d'agression physique (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimique (acidose, toxines) et métabolique (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dû à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène (Walker *et al.*, 1982).

L'oxygène est indispensable à la vie de tous les organismes aérobies (Potamo, 2005), mais il peut être également une source d'agression pour ces organismes (Ekoumou, 2003).

L'application des antioxydants naturels dans le domaine cosmétique et même pharmaceutique est très prometteuse en plein développement (Penchev, 2010).

L'inflammation est un processus habituellement bénéfique : son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, par anomalies des régulations du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation. D'un autre côté, la surproduction des espèces réactives d'oxygènes au-delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydant qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies allant de l'artériosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, les ischémies et le processus du vieillissement. Cependant, l'utilisation de substances chimiques de synthèse anti-inflammatoires ou antioxydantes est accompagnée toujours d'effets secondaires indésirables, alors que l'utilisation de composés phytochimiques s'avère utile et sans effets secondaires (Ferradji, 2011).

III-2- Stress oxydant et Radicaux libres

III-2-1- Stress oxydant

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont générées par divers mécanismes physiologiques et elles sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. La génération des ERO est parfaitement maîtrisée par le système de défense de l'organisme (antioxydants) (Favier, 2003).

Le stress oxydant apparaît dans une cellule quand l'équilibre entre les espèces pro-oxydantes et anti-oxydantes est rompu en faveur de l'état pro-oxydant (Mohammedi, 2012),

qui a pour conséquence l'endommagement souvent irréversible des composants des cellules comme l'ADN, les lipides et les protéines (Hannebelle, 2006).

III-2-2- Origine du stress oxydatif

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/ prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé Stress oxydatif. Il est maintenant admis que le phénomène de stress oxydant est impliqué dans l'étiologie de nombreuses maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington), de désordres pathologiques (syndrome d'ischémie reperfusion), mais également dans les phénomènes de vieillissement (Favier, 2003).

III-2-3- Radicaux libres

Un radical est une molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur ses orbitales électroniques externes (Amzel, 2010). L'ensemble des radicaux libres et leurs précurseurs sont souvent appelés Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO ou ROS en anglais pour reactive oxygen species) (Tirichine, 2010).

L'appellation ROS inclut les radicaux libres de l'oxygène : anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Mohammedi, 2012).

A côté des ROS, il existe des ERN (espèces réactives nitrogénées). Ces dernières réactives oxygénées et azotées regroupent non seulement des radicaux libres mais également des dérivés non radicalaires mais ils sont très réactifs et peuvent être des précurseurs de radicaux libres, parmi ces espèces réactives non radicalaires : O_2 , H_2O_2 , HOCL, et le nitroperoxyde (ONOOH) (Favier, 2003).

III-3-Généralités sur les antioxydants

On nomme antioxydant, toute substance qui lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle d'un substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat. Le terme de substrat oxydable inclut toutes sortes de molécules *in vivo*. Lorsque des espèces réactives de l'oxygène sont produites *in vivo*, de nombreux antioxydants interviennent. Ce sont principalement des enzymes : la super oxydase

dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPO), la catalase et aussi des molécules de faible masse moléculaire comme le tripeptide glutathion ou l'acide urique (Cavin, 1999)

Les antioxydants jouent un rôle important dans le métabolisme humain. Les réactions biochimiques qui ont lieu dans notre organisme produisent des radicaux libres initiant des réactions d'oxydation en chaîne qui ont une action néfaste sur les cellules de notre corps, en les abîmant et en accélérant le processus de vieillissement. Normalement, le corps humain maintient l'équilibre entre les antioxydants et les radicaux libres en produisant simultanément les deux types de substances dans le processus métabolique. Le déséquilibre entre ces deux types de composés conduit à un phénomène appelé *stress oxydatif* (Yepez, 2008).

III-3-1-Les principales sources d'antioxydants

Il existe deux sources d'antioxydants l'une est médicamenteuse et l'autre alimentaire

III-3-1-1-Médicaments :

Actuellement, plusieurs agents thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les anti-hyperlipoprotéïnémiques, les α -bloquants et autres anti-hypertenseurs ont été évalués pour leurs propriétés antioxydantes (Keita, 2004 ; Niare, 2006)

➤ Le probucol

C'est un produit utilisé pour baisser le taux sanguin du cholestérol, prévenir l'athérogenèse en agissant comme antioxydant et en supprimant la modification oxydative des lipoprotéines de basse densité (LDL) (Cavin, 1999).

➤ N- Acétyl- Cystéine :

Il a un important intérêt dans les affections des poumons dues à des espèces réactives de l'oxygène. C'est un précurseur du glutathion. C'est un tripeptide composé de Cystéine, d'acide glutamique et de glycine, le glutathion est le transporteur d'hydrogène dans l'organisme (Patomo, 2006).

III-3-1-2- Aliments :

L'organisme utilise des substances naturelles (Keita, 2003), qui peuvent agir en tant qu'antioxydants (Svoboda et Hampson, 1999). Ils sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures. Ce sont des composés phénoliques (flavonoïdes, xanthones, coumarines, caroténoïdes, dérivés d'acide phénolique, tanins, anthocyanines,.....)

➤ **La vitamine C (acide ascorbique)**

C'est un puissant réducteur contenant une forme énediol qui produit la forme dicétonique par transferts successifs de ses deux atomes d'H. La forme énediol est régénérée par l'intervention d'enzyme superoxyde dismutase en présence d'une catalase (Muanda, 2010). Elle a été isolée et identifiée par Szent-györgyi au début du siècle. Le thé vert agent anti-oxydant de référence, contient une proportion importante de procyanidine (Weisburger, 1997).

On trouve la vitamine C dans les légumes, les choux, le poivron, le persil, les agrumes et le kiwi. Elle joue un rôle important dans la régénération du vit E (Bossokpy, 2002).

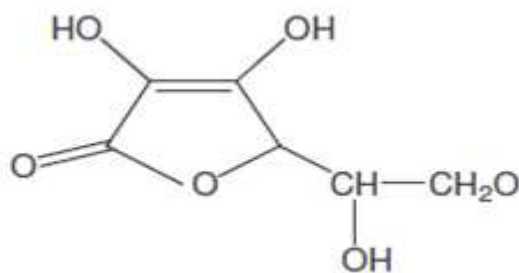


Figure 15 : acide ascorbique

➤ **La vitamine E ou tocophérol**

Elle est dite également vitamine de la reproduction, c'est le principal agent antioxydant membranaire (Patamo, 2005). Il prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux peroxy (cavin, 1999). Elle est rencontrée dans les fruits et légumes à feuilles vertes, le lait et les graines (Patamo, 2005).

➤ **Le β -carotène**

Il est parmi les photo-protecteurs actifs, le β -carotène apparaît comme un piègeur efficace (Muanda, 2010). Il est capable de réagir avec l'oxygène singulet et empêche ainsi l'oxydation des constituants biologiques (Niare, 2006), il se trouve dans les légumes verts, la salade, les carottes, les épinards, l'abricot, la papaye, le melon, le potiron et d'autres fruits jaunes (Tolo, 2002).

➤ **Le sélénium**

C'est un oligoélément qui ne possède pas d'activité antioxydante proprement dite (Pincemail et *al*, 1999). Les effets bénéfiques de cet oligo-élément sur l'organisme ne sont connus que depuis un quart de siècle (Athamina, 2009). Il est toutefois considéré comme tel

puisque'il participe à la constitution et à la régulation de la glutathion peroxydase, enzyme qui participe à la destruction des peroxydes lipidiques (Pincemail et *al*, 1999), diminue également la fréquence des maladies cardiaques, sans toutefois faire baisser la tension artérielle et a un effet positif sur le cholestérol (Keita, 2004). Il a été montré qu'un apport quotidien en sélénium de 200 microgrammes faisait baisser de moitié le risque du cancer de la prostate (Aouissa, 2002). On le retrouve dans la viande, le poisson, et les céréales (Keita, 2004).

➤ Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de métabolites très répandu dans les plantes. Ils se trouvent presque dans toutes les parties de la plante, à différentes concentrations où ils jouent un rôle déterminant dans le système de défense comme antioxydants (Potamo, 2005 ; keita, 2004). Ils sont associés à de nombreuses activités biologiques telles que anti-inflammatoires, antivirales, antithrombiques antihépatotoxiques, antitumorales, antihypertensives, antibactériennes, antiallergiques, et antioxydantes (Bossokpi, 2002).

Les flavonoïdes sont présents dans les fruits, les légumes, le thé et le vin et agissent soit comme chélateurs de métaux (quercétine, catéchine), soit comme capteurs de radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxydes, peroxydes (quercétine, rutine, kaempférol). (Keita, 2005)

➤ Les tanins

Les tanins sont des composants polyphénoliques qui contractent les tissus en liant les protéines et en les précipitant, d'où leur emploi pour « tanner » les peaux (Iserin, et coll., 2001), ils présentent des propriétés antioxydantes significatives.

III-4- Méthodes de tests des antioxydants

De nombreuses méthodes ont été développées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits naturels. Ces méthodes diffèrent entre elles en termes de mécanismes de réaction, substrat et antioxydant, états des réactions et la forme dont sont exprimés les résultats. Une meilleure compréhension de ces méthodes contribue à l'interprétation correcte des résultats (kholkhal, 2014 ; Chikhi, 2014).

De plus, de nos jours, les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante ne sont pas standardisées. De nombreux facteurs entre en jeux. En effet, la méthode choisie est fortement liée aux paramètres réactionnels : le solvant, le temps de réaction et le pH, etc. (Magalhaes et Coll., 2008).

La plupart des méthodes sont basées sur l'utilisation de systèmes générant des radicaux très variés. Ce sont principalement des méthodes dites "d'inhibition " dans lesquelles une espèce chimique capable de générer des radicaux libres est utilisée avec une substance capable de détecter ces espèces. L'échantillon dont on souhaite mesurer le pouvoir antioxydant est capable d'inhiber la génération des radicaux. Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. C'est pourquoi, on effectue différents tests de mesure de pouvoir antioxydant (Belkheiri, 2010).

Ces méthodes peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes : soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron (Sanchez-Moreno, 2002 ; Huang *et al.*, 2005).

Les techniques du premier groupe sont employées pour évaluer la peroxydation lipidique en utilisant un substrat lipidique ou lipoprotéique. La quantification de cette propriété est exprimée par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation (Sanchez-Moreno et Larrauri, 1998).

Alors, les méthodes du deuxième groupe sont celles qui interviennent dans la mesure de l'habilité du piégeage des radicaux libres. Elles comportent le balayage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de l'acide hypochloreux ($HOCl$), de l'hydroxyle (OH), des anions superoxyde (O_2^-), du peroxyde (ROO) et de l'oxyde nitrique (NO) (Sanchez-Moreno, 2002).

Afin de choisir la bonne méthode, il faut savoir ce que l'on va mesurer et évaluer. Par exemple, la quantité des hydroperoxydes accumulée doit être mesurée avant qu'ils ne commencent à diminuer ; après la décomposition des hydroperoxydes, le degré d'oxydation de l'échantillon doit être mesuré en se basant sur la formation des produits d'oxydation secondaire (El Kalamouni, 2010).

III-4-1- Méthodes de piégeage des radicaux libres oxygénés

III-4-1-1- Piègeage du radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

Cet essai évalue la capacité d'un produit à capturer un radical libre, l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Ce radical est généré *in vitro* par le système hypoxanthine/xanthine oxydase. Dans cette méthode, le radical réduit le NBT²⁺ (Nitro-Blue Tétrazolium) de couleur jaune, en bleu de formazan de couleur pourpre qui absorbe à 560 nm.

Ainsi un composé anti-oxydant capable de capturer l'anion superoxyde empêchera la formation du bleu de formazan et la solution restera jaune. Les absorbances obtenues

permettent de calculer un pourcentage d'inhibition de la réduction du NBT²⁺ par rapport à un témoin constitué du milieu réactionnel dépourvu de composé anti-oxydant. On peut ensuite tracer une courbe représentant le logarithme du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en composé testé, et déterminer l'IC₅₀ (concentration inhibant 50% de l'activité) du composé (Parejo *et al.*, 2002).

III-4-1-2-Piégeage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ scavenging activity)

Une des méthodes les plus communes pour évaluer la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène est basée sur l'absorption de cette molécule dans le domaine de l'UV. Comme la concentration de H₂O₂ diminue par les composés piègeurs, la valeur d'absorbance de ce dernier à 230nm diminue également. Néanmoins il est tout à fait normal que les échantillons absorbent également à cette longueur d'onde, exigeant ainsi l'exécution d'une mesure blanche (Malgalhaes *et al.*, 2008).

III-4-1-3-Piégeage du radical peroxyde (ROO•) : Test d'ORAC

Le test **ORAC** (Oxygen Radical Absorbance Capacity) est applicable aux solutions biologiques comme le plasma sanguin et des extraits de fruits et légumes (Prior *et al.*, 2003). Il permet de mesurer séparément, à partir d'une même solution biologique, la capacité antioxydante des composés hydrophiles et lipophiles qui la composent, après séparation par une extraction à l'hexane.

Le protocole ORAC est défini comme étant un test pour estimer le potentiel à réduire les radicaux peroxydes (ROO•-) (Crichton *et Coll.*, 2002). Initialement conçu avec la β -phycoerythrine (β -PE) comme fluorochrome, ensuite certaine modification a été introduite par le remplacement de la β -PE par de la fluorescéine, un indicateur non protéique et plus stable (MacDonald-Wicks *et Coll.*, 2006). Le procédé emploie, habituellement, la fluorescéine et AAPH (2,2'-azo-bis 2-amidinopropane) en tant que molécule cible (TM) et le peroxyde source de radical, respectivement. Le test est basé sur la décroissance de la fluorescence de la fluorescéine en présence d'un oxydant chimique l'AAPH. Le produit à tester peut-être capable de protéger la fluorescéine et réduire la vitesse de dégradation de la fluorescence. Il possède alors un pouvoir antioxydant (Girard-lalancette, 2009).

III-4-2- Méthodes de piégeage des radicaux stables et évaluation de leur capacité de réduction

III-4-2-1- Test de réduction du radical 1,1-diphényl 1-2-picrylhydrazyle

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α , α -diphényl- β - picrylhydrazyl) fut l'un des premiers radicaux libres les plus stables d'une couleur violette utilisé pour évaluer l'activité antioxydante. Par cette méthode on considère que l'activité antioxydante n'est autre que la capacité des antioxydants d'agir comme piègeur des radicaux libres. Ils agissent en transformant en atome d'hydrogène ce qui conduit à la disparition du DPPH au cours de la réaction et à un changement de coloration dans la solution initiale (Hellal, 2011).

Le rapport DPPH/antioxydant doit être adapté à la stœchiométrie du composé (nombre de radicaux réduits par molécule d'antioxydant) et le DPPH doit être en excès. Ce test, largement utilisé, est rapide et facile à réaliser ; il permet de comparer un grand nombre de composés. De plus, contrairement aux autres tests, les conditions utilisées (solvants organiques et faible température) évitent l'auto-oxydation des molécules testées. Les résultats peuvent être exprimés en pourcentage de réduction de DPPH, pour une concentration en antioxydant donnée et on a un temps donné. L' EC_{50} (concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale en DPPH) calculée pour chaque antioxydant permet de les classer entre eux. Plus l' EC_{50} est petite, plus la molécule est antioxydante (Portes, 2008).

Les activités anti radicalaires apparaissent sous forme de spots de couleur jaune-blanc sur fond violet (Cavin, 1999).

III-4-2-2- Piégeage du ABTS (2,2'-azynobis- [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid])

Cette méthode est basée sur la capacité des composés à réduire le radical-cation $ABTS^{+\bullet}$, acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), qui présente une bande d'absorption dans le visible avec trois maximas à 645, 734 et 815 nm. Le radical est formé par oxydation de l'ABTS incolore avec différents composés, comme le dioxyde de manganèse (MnO_2 , Miller *et al.*, 1996), la metmyoglobine (Miller *et al.*, 1993), le peroxyde d'oxygène (H_2O_2 ; Cano *et al.*, 2002) ou le persulfate de potassium (Re *et al.*, 1999). Le composé à tester est ajouté au radical préformé et, 1 minute après, l'absorbance résiduelle du radical $ABTS^{+\bullet}$ est mesurée à 734 nm. L'activité des composés est alors exprimée par la Capacité Antioxydante Equivalente Trolox (TEAC) qui correspond à la concentration de Trolox (analogue hydrophile de la vitamine E) donnant la même capacité antioxydante qu'une

concentration de 1 mM du composé testé. Ainsi, plus la valeur TEAC est élevée, plus l'antioxydant est efficace (Schlesier *et al.*, 2002).

III-4-2-3- Réduction de fer: FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)

La méthode de FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*), a été initialement développée pour mesurer la capacité antioxydante du plasma sanguin, ensuite le test a été généralisé aux études des pouvoirs antioxydants des extraits de plantes (chikhi, 2014). Elle est basée sur la réaction de réduction de fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}) par un antioxydant, la réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) à la couleur bleue - vert du fer ferreux (Fe^{2+}). L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm (Djahra, 2014).

III-4-2-4- Test mesurant l'activité antioxydante au moyen de caroténoïdes

Cette technique de spectrophotométrie dans l'ultraviolet a été décrite pour la première fois par Marco puis légèrement modifiée par Miller. Elle consiste à mesurer, à 470 nm, la décoloration du β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique.

La dispersion de l'acide linoléique et du β -carotène dans la phase aqueuse est assurée par du Tween. L'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur (50°C) de manière non spécifique. L'addition d'antioxydants purs (Von Gadow *et al.*, 1997) ou sous forme d'extraits végétaux (Moure *et al.*, 2000 ; Koleva *et al.*, 2001) induit un retard de la cinétique de décoloration du β -carotène. Cette méthode est sensible, rapide et simple s'agissant d'une mesure spectrophotométrique dans le visible. Elle présente également l'avantage de pouvoir être couplée à la chromatographie sur couche mince (Pratt et Miller, 1984). Après séparation chromatographique, un mélange de β -carotène et d'acide linoléique est pulvérisé sur la plaque, celle-ci étant alors exposée plusieurs heures à la lumière du jour ou aux UV jusqu'à décoloration du fond jaune. Les bandes où la couleur jaune persiste, indiquent la présence de substances antioxydantes (Kanoun, 2012).

Cependant, l'oxydation induite par voie thermique est non contrôlée et donc non spécifique, ce qui conduit bien souvent à une variabilité des résultats. Pour contourner ce problème, certains auteurs ont remplacé la chaleur par des agents oxydants conduisant à des résultats plus reproductibles, comme l'AAPH (Parejo *et al.*, 2003) ou la lipoxigénase de soja (Chaillou et Nazareno, 2006). Cette méthode est d'autre part sujette au parasitage de composés absorbants dans la fenêtre spectrale du β -carotène. Frankel (1998) a également

critiqué l'utilisation d'acides gras libres qui ne représentent pas des modèles lipidiques réalistes. Enfin, l'interprétation des données n'est pas aisée car le β -carotène est lui-même un antioxydant, sensible à l'oxygène de surcroît.

III-5-Inflammation

L'inflammation est un ensemble de phénomènes réactionnels se produisant au point irrité par un agent pathogène (Bossokpi., 2003). Elle se traduit ordinairement par quatre symptômes cardinaux : Rougeur, chaleur, douleur, et lésion fonctionnelle énoncés par Aulus Cornelius Celsus. (Schorderet et *al.*, 1998). L'inflammation est un processus habituellement bénéfique : son but est de mobiliser le système immunitaire afin d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, ou encore de régulations anormales du processus inflammatoire (Bouhini, 2016).

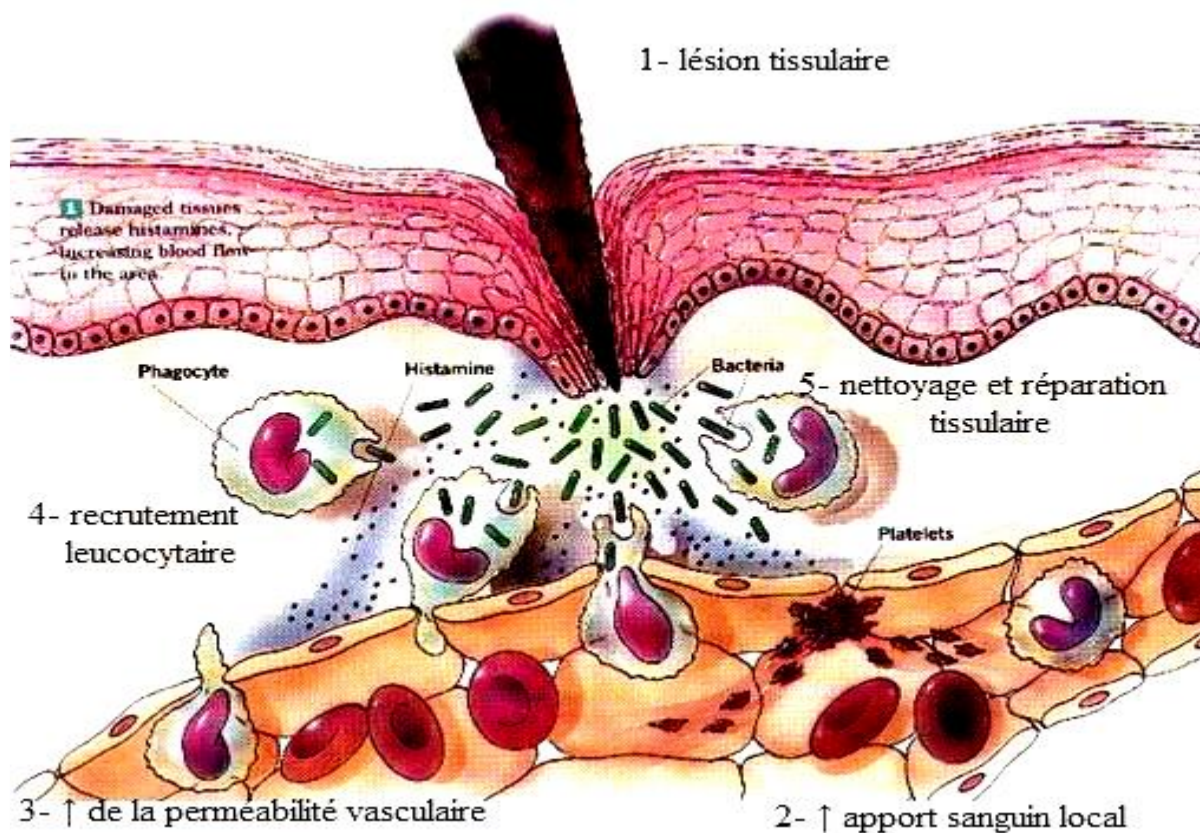


Figure 16 : Les principales étapes de la réaction inflammatoire (Bouhini, 2016)

III-3-1- Causes de l'inflammation

Les agressions sont de natures variées. Elles peuvent être traumatiques (coupure, écrasement, entorse, fracture...), chimiques ou physiques (brûlure, gelure, radiations ionisantes...), d'origine infectieuse (infections bactérienne, virale, fongique, parasitaire...), due à des éléments solides endogènes ou exogènes (cristaux d'urate, toxines...) ou encore d'origine allergique.

III-5-2-Types de l'inflammation

III-5-2-1- Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est la réponse immédiate de l'organisme à un agent agresseur, elle est caractérisée par des phénomènes vasculoexsudatifs intenses, par une forte présence des polymorphonucléaires au niveau du foyer inflammatoire (charle et *al.*, 2010). Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante. Les étapes de la réponse inflammatoire aiguë sont toujours les mêmes quelque soient le stimulus inflammatoire et le tissu enflammé (Dorward et *al.*, 2012). L'inflammation aigue peut-être divisée en trois grandes étapes ; une phase vasculaire immédiate (quelques minutes) caractérisée par des modifications de la microcirculation locale ; une phase cellulaire consécutive caractérisée par la mobilisation de nombreuses cellules immunitaires qui permettra l'élimination des microorganismes pathogènes et des tissus lésés, et une phase de résolution et de cicatrisation qui en quelques jours conduira à la restauration des tissus (Weill et *al.*, 2003)

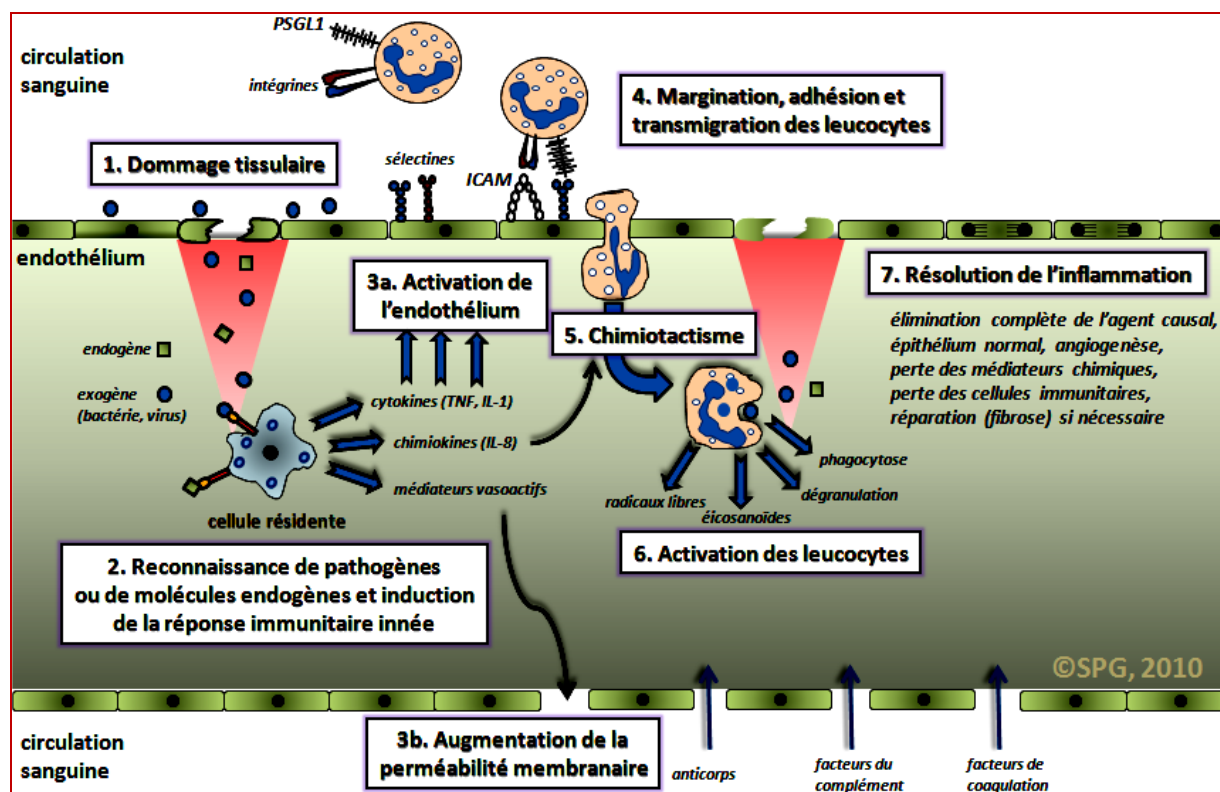


Figure 16 : Les principales étapes de la réaction inflammatoire (Gravel, 2010)

a) Phase vasculaire

Action sur la coagulation : le système sympathique crée une vasoconstriction, et les plaquettes sont activées pour colmater les « trous ». Ces dernières synthétisent le

thromboxane A2 qui entraîne une vasoconstriction et une agrégation plaquettaire aboutissant à un clou hémostatique. A la suite de ce mécanisme, le facteur XII produit de la fibrine qui renforce le clou hémostatique précédemment formé (Grandin, 2013).

b) Phase cellulaire

La migration extra vasculaire (diapédèse) des leucocytes et la libération de cytokines sont à l'origine de l'activation cellulaire et de la libération de médiateurs (Kidd et Urban, 2001). Dès lors une succession d'évènements au sein de la lésion inflammatoire entraîne : la phagocytose d'agents extérieurs, la captation et la présentation d'antigènes, la production de radicaux libres. Les cytokines en outre agissent au niveau systémique pour augmenter la défense de l'hôte sous forme de fièvre (Bounihi, 2016).

c) Phase de résolution

La phase de résolution, dite de réparation, dépend du degré des lésions tissulaires. En effet, dans les conditions les plus favorables, les agents agresseurs sont éliminés par les PMNs, et les produits de dégradation ainsi que les débris cellulaires sont phagocytés par les macrophages. Ces derniers vont alors sécréter des cytokines et des médiateurs qui vont induire la phase de cicatrisation et de régénération tissulaire. Le retour à un état physiologique consiste dans un premier temps en la réparation de l'endothélium par les cellules endothéliales elles-mêmes, ces cellules pouvant produire et remodeler les éléments de leur stroma (collagène de type I et III) ou de leur lame basale (collagène de type IV et V, laminine). Si l'atteinte est plus sérieuse et entraîne une destruction du tissu atteint, d'autres cellules vont intervenir pour réparer le nouveau tissu. Les macrophages vont participer à l'angiogenèse, mais ce sont surtout les fibrocytes puis les fibroblastes qui vont produire les protéines matricielles des tissus intercellulaires, comme le collagène, la fibronectine et la laminine pour permettre la reconstruction des tissus. Le système de l'angiogenèse est ainsi remis au repos et la réaction inflammatoire peut s'éteindre (Weill et al., 2003).

III-5-2-2- Inflammation chronique

L'inflammation chronique est une réponse prolongée qui intervient lorsque l'inflammation aiguë n'est pas résolue ni par la restitution intégrale ni par la cicatrisation. Elle peut être consécutive à une inflammation aiguë ou commencer plus tôt et évoluer à bas bruit : on parle d'inflammation de bas grade. On peut la retrouver lorsque l'agent pathogène est persistant, si les mécanismes de régulation et de terminaison de l'inflammation aiguë ne sont pas efficaces, ou si l'organisme n'est pas en mesure de répondre à cause de maladies intercurrentes.

Le macrophage est alors la cellule de l'inflammation chronique. Elle va produire des facteurs chimiotactiques permettant d'activer d'autres macrophages, la persistance de cellules mononuclées fait de ce mécanisme une inflammation dite cellulaire. Les lymphocytes B et T jouent également un rôle important. L'inflammation chronique ou cellulaire peut prendre différentes formes : l'inflammation diffuse ou granulomateuse (Kirassian, 2015).

III-5-3- Cellules impliquées dans la réaction inflammatoire

Beaucoup de types cellulaires interviennent dans la réaction inflammatoire :

III-5-3-1 Les polynucléaires neutrophiles

Ils libèrent des protéases, des protéines cationiques, et les eicosanoïdes. Ils présentent des récepteurs membranaires responsables de leurs propriétés d'adhérence, de chimiotactisme, de migration, endocytose et phagocytose. Ces polynucléaires neutrophiles sont phagocytés par le macrophage après leur mort sur le site (Meyer *et al.*, 1994).

III-5-3-2- Les polynucléaires basophiles

Les basophiles représentent moins de 1% des leucocytes circulants. Ils interviennent dans les tissus lors de réactions d'hypersensibilité ou lors de parasitisme (Kirassian, 2015). Elles présentent un cytoplasme qui contient de très nombreuses granulations riches en médiateurs pro-inflammatoires (Rankin, 2004). En effet, les basophiles sont une source majeure d'histamine et produisent des cytokines (TNF- α , IL-1, 3, 4, 5, 6, 8 et IFN γ). Une partie est libérée rapidement, alors qu'une autre partie est synthétisée lorsque la cellule est stimulée (Schwartz *et al.*, 2015).

III-5-3-3- Les polynucléaires éosinophiles

Les éosinophiles représentent 1 à 5% des leucocytes circulants. On les retrouve dans les tissus faisant barrière avec le milieu extérieur tels que les muqueuses (Kirassien, 2015). Ils libèrent différents médiateurs inflammatoires comme le Platelet Activating Factor (PAF) et les leucotriènes B₄ (LTB₄), une grande variété de cytokines pro-inflammatoires [IL-1, IL-6, Interféron- γ (IFN- γ), TNF- α] ainsi que des chimiokines comme l'IL-8. Au niveau pathologique, les éosinophiles étaient impliqués dans les lésions tissulaires liées à l'asthme allergique (Hellal, 2007).

III-5-3-4- Les mastocytes

Les mastocytes sont des cellules du tissu conjonctif qui ont des ressemblances fonctionnelles et histologiques aux basophiles et qui jouent un rôle important dans le déclenchement de la réaction inflammatoire (weill *et al.*, 2003; Caughey, 2011). Ils contiennent de nombreux granules renfermant des médiateurs chimiques comme l'histamine, la tryptase (Caughey, 2007), la sérotonine, des prostaglandines et des leucotriènes. Au contact

d'un allergène, ils peuvent dégranuler et entraîner plus tardivement la synthèse de cytokines (TNF- α) et de chémokines (Kirassian, 2015).

III-5-3-5- Les monocytes

Les monocytes proviennent de la moelle osseuse, ils ont des rôles d'adsorption et de lyse d'agents pathogènes. Ils assurent également la présentation des antigènes aux lymphocytes, la résorption de substances étrangères et de débris, ils sécrètent des cytokines, participent à l'agression tissulaire par la libération de métabolites de l'oxygène et de protéase. Enfin ils participent à la fibrinogénèse et au remodelage cellulaire par l'apport de collagénase (Timbo, 2003; Bounihi, 2016).

III-5-3-6- Les lymphocytes

Ils naissent dans la moelle osseuse et se retrouvent dans le sang et les tissus lymphoïdes (Bounihi, 2016). Il existe deux populations de lymphocytes (B et T) dont les rôles sont fondamentalement différents. Les lymphocytes B sont essentiellement impliqués dans la synthèse d'anticorps et dans l'immunité spécifique (Hellal, 2007).

III-5-4-Médiateurs de l'inflammation

Les médiateurs de l'inflammation sont des acteurs importants dans le processus inflammatoire. Ils augmentent la perméabilité vasculaire, attirent les leucocytes sur le lieu de l'inflammation, favorisent leur adhésion à l'endothélium, augmentent l'agrégation des plaquettes (Techer, 2013).

III-5-4-1 Les médiateurs cellulaires

➤ **Les amines vasoactives** : Il s'agit de :

✚ **La sérotonine**, stockée dans les plaquettes sanguines et dans les cellules chroma fines de la muqueuse intestinale, libérée, elle stimule les fibres lisses vasculaires disjonction des cellules endothéliales (Timbo, 2003).

✚ **L'histamine**, dont la première source est les mastocytes, elle est libérée par d'autres cellules comme les phagocytes (polynucléaires neutrophiles et basophiles, macrophage), et les cellules sanguines (plaquettes, hématies). Elle est retrouvée au niveau de l'épiderme de la muqueuse gastro-intestinale et du système nerveux. Dans toutes ces cellules l'histamine se trouve stockée sous forme de complexes protéiques inactifs car liée à l'héparine, elle est libérée lors de la dégranulation des cellules phagocytaires et a des propriétés chimiotactiques pour les phagocytes (Capron, 1998).

➤ **Les éicosanoïdes**

Ces médiateurs lipidiques, dérivés des acides gras membranaires, sont les produits terminaux du métabolisme de l'acide arachidonique. Selon la voie enzymatique, différents éicosanoïdes sont formés. La voie des cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) produit des prostanoïdes (prostaglandines, thromboxanes). La voie des lipoxygénases produit des leucotriènes. Le PAF (Facteur d'Activation Plaquettaire) fait également partie des éicosanoïdes (Techer, 2013).

➤ **Les cytokines**

Les cytokines sont des facteurs solubles peptidiques synthétisés et libérés par les lymphocytes et les macrophages nommées respectivement lymphokines et monokines. Ce sont des médiateurs de la communication intercellulaire, qui agissent à faible concentration, généralement localement par action autocrine et paracrine grâce à la fixation à des récepteurs membranaires de haute affinité. Certaines cytokines participent également aux effets systémiques de l'inflammation (Kirassien, 2012).

III-5-4-2- Les médiateurs plasmatiques circulants

Les médiateurs circulants ne sont actifs qu'à la suite d'une cascade de réactions qui permet d'en réguler la production (Heymonet, 2013).

➤ **Les kinines**

Ce sont des polypeptides plasmatiques. Elles sont vasodilatatrices et augmentent la perméabilité vasculaire. Elles favorisent la libération des prostaglandines. Les kinines dont la plus active est la bradykinine qui favorise une vasoconstriction à la base de la stase intracapillaire (Meyer et *al.*, 1994).

➤ **Le système du complément**

Il intervient dans le phénomène inflammatoire comme dans l'immunité par l'activation des deux voies (classique et alterne) et entraîne la fixation sur la particule cible de C3 responsable de l'opsonisation et de C5, C6, C7 et C8 responsable de la lyse avec libération de fragments peptidiques, les anaphylatoxines provoquant une inflammation locale ((Timbo, 2003).

➤ **Le système de coagulation**

L'activation du facteur XII par des éléments solides (cristaux), des composés biologiques (LPS bactérien) et immunologiques (complexes immuns) déclenche la coagulation et aboutit à la formation de fibrine à partir du fibrinogène. La fibrine ainsi formée vient consolider le clou hémostatique formé par l'agrégation des plaquettes. C'est aussi un puissant agent

chimiotactique des polynucléaires neutrophiles. La fibrine intervient aussi dans la perméabilité vasculaire en agissant sur le système des kinines (Weill *et al.*, 2003).

III-5-5- Anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont nombreux et appartiennent à des familles de médicaments différents puisqu'on y trouve des analgésiques, des corticoïdes, des antihistaminiques (Yvan, 1997). Ils sont une classe de médicaments regroupés en deux types stéroïdiens et non stéroïdiens.

III-5-5-1- Anti-inflammatoire non stéroïdiens

Les anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-pyrétique et antalgiques. Actuellement, il y a plus de 50 différents AINS sur le marché mondial. Le mécanisme d'action des AINS a été précisé par les travaux de Vane en 1971, il repose en grande partie sur l'inhibition compétitive, réversible ou non, de la cyclooxygénase, enzyme qui permet la production de prostaglandine à partir de l'acide arachidonique. Cette caractéristique commune à tous les AINS conduit à une diminution de la production des prostaglandines (notamment la PGE2 et la PGI2), importants médiateurs de l'inflammation (Bahi, 2015). Cependant, l'usage des AINS est associé à des nombreux effets indésirables avec une prévalence considérable de nouvelles maladies et de mortalité (bidauts-Russel, 2001). Les effets secondaires des AINS sont attribués à leur inhibition non selective des isoformes de la cyclooxygenase dont la COX-1 qui est présente de façon constitutive dans la plupart des tissus humains. Celle-ci a pour rôle la régulation d'un nombre de processus physiologiques tel que la maintenance de l'intégrité de la muqueuse gastrique, la fonction rénale, et l'agrégation plaquettaire (Vonkeman *et al.*, 2008).

III-5-5-2- Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Les anti-inflammatoires stéroïdiens sont des dérivés synthétiques de la cortisone qui sont de puissants anti-inflammatoires doués également de propriétés immunomodulatrices et antiallergiques (Heymonet, 2013). Ces corticoïdes agissent sur de nombreux métabolismes de l'organisme. Ils augmentent la production de la lipocortine, inhibant ainsi la phospholipase A2 donc la libération de l'acide arachidonique. Par contre ils diminuent fortement la migration des polynucléaires, monocytes-macrophages vers le site de l'inflammation et la production d'autres médiateurs comme l'histamine, la sérotonine, la bradykinine, les cytokines, les ions superoxydes (Bounihi, 2016).

L'usage des AIS est associé à de nombreux effets indésirables tels que les troubles gastro-intestinales, l'hypertension artérielle, la dérégulation de la synthèse des glucocorticoïdes à la fin du traitement, l'ostéoporose, les cataractes et la prise de poids (Henzen, 2003).

***Chapitre IV: Etat de connaissance sur
l'espèce Agave americana L.***

IV-1-Généralité sur le genre agave

Souvent confondus avec des cactus, les agaves appartiennent en réalité à la famille des Agavacées et à l'ordre des Liliales dans la taxonomie classique (Dahlgren et coll. 1985 ; Bogler et Simpson 1995). Le mot agave, en grec *agauê*, signifie l'admirable : Carlos Linneo, en 1753, est le premier chercheur à décrire le genre agave dans « Espèce *Agave americana* » (Valenzuela 2003)

Tableau 2 : Classification taxonomique des du genre agave selon (Takhtajan 1997).

Domaine	<i>Eucaryotae</i>
Règne :	<i>Plantae</i>
Sous-règne :	<i>Viridaeplantae</i>
Phylum:	<i>Tracheophyta</i>
Sous-phylum:	<i>Spermatophyta</i>
Infra-phylum:	<i>Angiospermae</i>
Classe :	<i>Liliopsida</i>
Sous- classe :	<i>Liliidae</i>
Sur-Ordre :	<i>Liliana</i>
Ordre :	<i>Amaryllidacées</i>
Famille :	<i>Agavacées</i>
Sous-famille :	<i>Agavoideae</i>
Genre :	<i>Agave</i>
Espèce :	<i>spp (divers espèces)</i>

IV-2- Répartition géographique du genre agave

Le Mexique est le territoire de la plus grande diversité des Agavacées (161 variétés). L'agave est une plante endémique sur le continent américain, elle est présente du Sud du Canada jusqu'au nord de l'Amérique du Sud et dans les îles Caraïbes. On la retrouve en particulier au Mexique et dans toute l'Amérique Centrale (García-Mendoza *et al.* 1995). L'amplitude de son rang écologique lui permet de se développer depuis le niveau de la mer, dans les dunes côtières, jusqu'aux bois localisés à 3300 m d'altitude, l'optimum étant situé entre 800 et 2500 m.

IV-3-L'espèce *agave americana* L.

IV-3-1-Classification botanique.

L'*agave americana* L., souvent connue sous le nom de l'aloès c'est une plante monocotylédone appartenant à la famille des Agavaceae, selon la classification taxonomique suivante :

Règne : Eucaryotae

Sous-règne : Plantae

Phylum (Division) :Spermatophyta

Sous-phylum : Angiospermae

Classe : Monocotylédones Ordre : Liliales

Famille : Amaryllidacées ou Agavacées

Genre : Agave

Espèce : Americana

IV-3-2-Description botanique de la plante

Agave americana L., est une plante herbacée avec une période de croissance et de maturation 10 à 18 ans après quoi il fleurit. La durée de la maturation dépend des conditions climatiques et pédologiques (Acosta, 1954).

La morphologie des agaves ressemble à celles des autres plantes appartenant au groupe des monocotylédones (aloès, nolinacea, broméliacea, xanthorrhoea, dracénea, sansevieria, etc) (Eguiarte 1995).

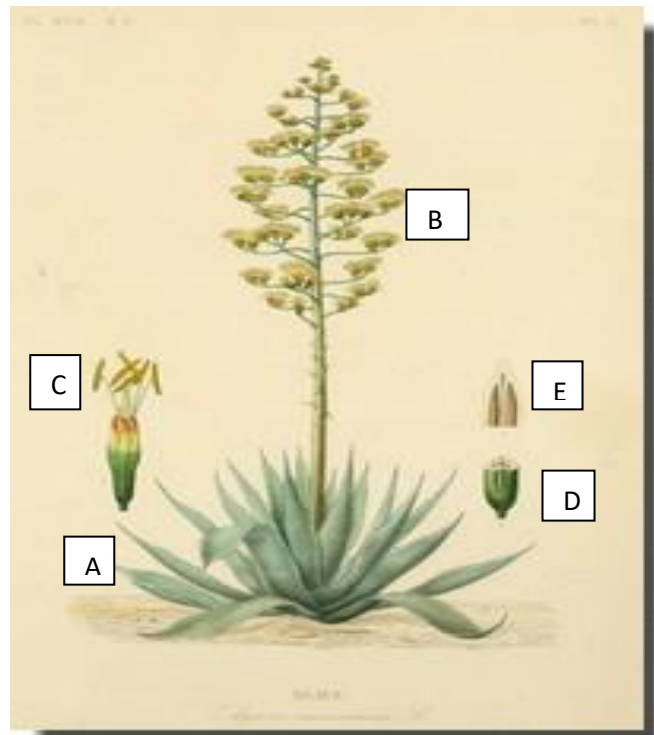


Figure 18: schéma représentatif de la plante *agave americana*
A ; les feuilles, B ; inflorescence, C ; Fleur, D ; fruit avant maturation E: fruit mature

IV-3-2-1-Les feuilles

Sont déposées au tour de la tige forment une rosette, de couleur gris-vert sont souvent bleuâtre, radicales, nombreuse de 25 à 67, elles sont épaisses et charnus, elles mesurent 1.5 à 2 m, lancéolées sans pétiole sont d'une largeur de 30 cm, sont légèrement concave vers le haut et vers l'intérieur qui se termine par une épine terminale de couleur brune de cinq cm.

IV-3-2-2-La tige

Une hampe florale cylindrique, épaisse, rameuse a sont sommet, chargée d'un grand nombre de fleurs (Figure 19), généralement cachés par des feuilles dans avant le stade de maturation qui pousse de à 7 à 8 m de hauteur (Bautista, 2008).

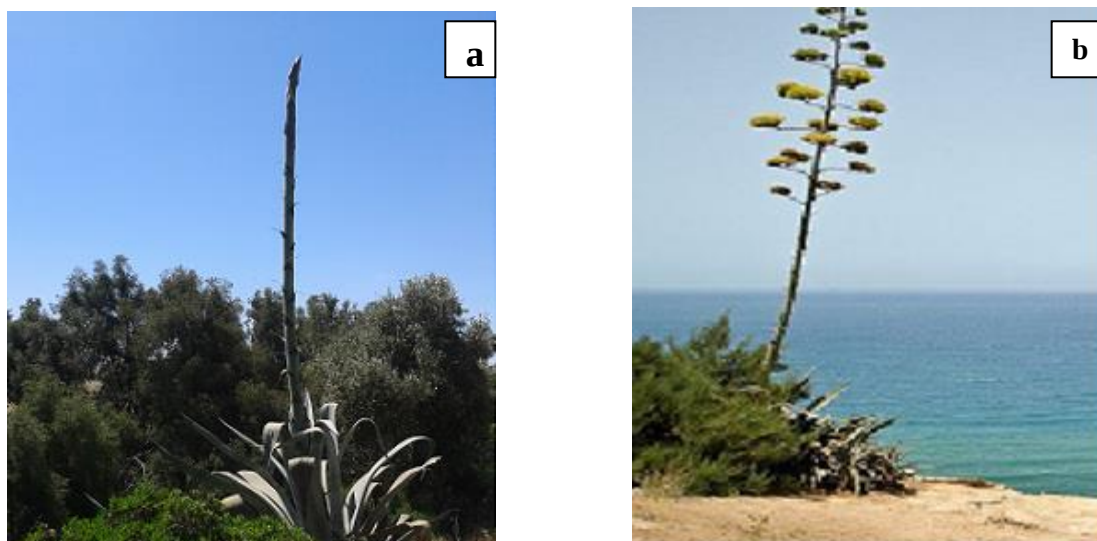


Figure 19 : l'inflorescence d'*agave americana* L. (cliché rahamni, 2015).

a : avant la floraison ; **b**: après la floraison.

IV-3-2-3-Les fleurs

Ce sont de couleur jaune-vert et ont la morphométrie suivante Caractéristiques, avec la longueur moyenne de chaque partie entre parenthèses : longueur florale (11 cm) ; longueur de la corolle (3,5 cm); Diamètre de la corolle (6 cm); Longueur des ovaires (3 cm); Longueur du tube (0,7 Cm) et le diamètre du tube (2 cm) (Silva-Montellano & Eguiarte, 2003). La corolle fait référence aux pétales de la fleur, qui forment typiquement un verticille à l'intérieur des sépales (à la base du Fleur), enfermant les organes reproducteurs. Chaque fleur a six porteurs de pollen, environ 9 Cm de long, montant 5,5 cm au-dessus de la corolle et cinq pétales (Silva- Montellano & Eguiarte, 2003). Les fleurs produisent un nectar abondant avec lequel elles attirent selon l'espèce concernée, soit des colibris soit des chauves-souris (Figure 20), ou encore des insectes, qui vont ainsi participer à la dissémination du pollen (Arrizaga *et al.* 2000)

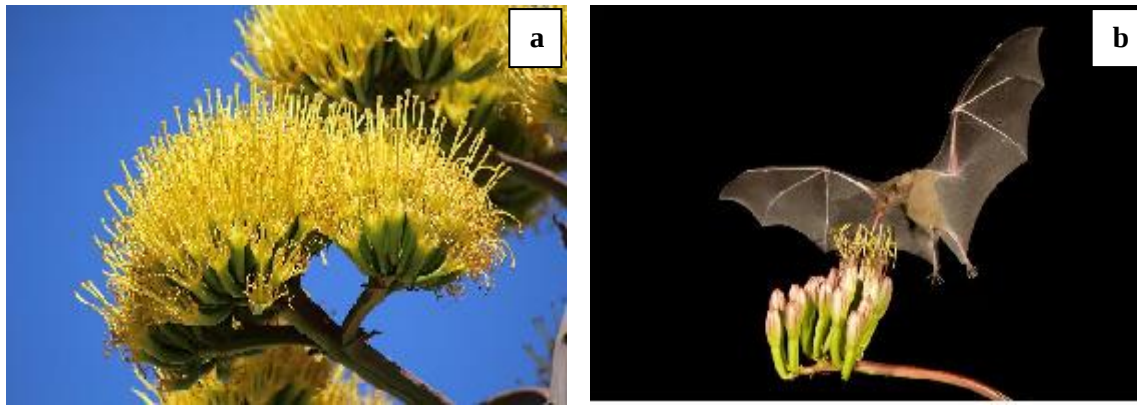


Figure 20: les fleurs d'*agave americana* L. (Webmaster1)

a: fleurs d'*A. americana* ; **b:** polinisation des fleurs par des chauves-souris.

IV-3-2-4-Fruit

Sous forme d'une capsule triangulaire, prismatique oblongue, 4 cm de long et qui contient des graines (Bautista, 2008)

IV-3-2-5-Graines

Elles sont plates de couleur noir, mesurant environ 6 à 8 mm (Figure21), germent dans les tiges et les fruits, ils sont rapidement remplacés par les talles, appelés bulbilles, qui sont des graines végétales ou végétales avec une miniature quelques feuilles, tige courte et radicelles qui tombent sur le sol et commence la vie d'une plante. La plante meurt après la fructification (Alvarado, 1969; Padro, 2002).



Figure 21 : fruit et graines d'*agave americana* L. (Escobar et *al.*, 2008)

IV-3-3-Origin et répartition biogéographique

Agave americana, originaire d'Amérique du Nord, elle se trouve principalement au Mexique, en Amérique centrale, en Espagne, Amérique du nord-ouest, Amérique du sud, et l'île des caraïbes, Cerne (El Salvador).

La plante d'agave, était introduite en Europe et en Afrique par les espagnoles au 16^{ème} siècle, et il pousse maintenant naturellement dans les climats arides des pays méditerranéennes, l'Inde et le Pakistan (Msahli et *al.*, 2007)

En Algérie, l'*agave americana* est commun sur tout le Tell (Quézel et Santa., 1962). Et elle se trouve à l'état sub-spontané au littorale (Cubb, 1939).



Figure 22 : carte de répartition géographique de l'*Agave americana* L. (web master2)

IV-3-4-Utilisation traditionnelles de l'espèce *agave americana* L.

Agave americana L., plante médicinale très répandue dans le monde, elle est connue pour ces vertus médicinales variées. Pour cela elle est classée parmi les 500 plantes les plus utilisées en médecine traditionnelle. Dans cette partie on va donner un résumé englobe l'usage traditionnelle de cette espèce par la population locale dans quelque pays, les maladies traités, les organes utilisés ainsi que les méthodes de traitement.

En Algérie

Le jus d'agave a un effet apaisant sur les troubles digestifs, Ulcères d'estomac et l'inflammation des intestins.

En application externe, sous forme de gel ou crème, l'agave traite les infections, inflammations, lésions cutanée légère, brûlures, engelure et peau sèche (Adouane, 2016).

En Tunisie

La jeune feuille, en décoction dans un litre d'eau est prise oralement à raison d'un verre par jour est utilisé contre le diabète.

Au Maroc

La tige et les feuilles en cataplasme ou cuit est utilisées pour traiter les maladies dermatologiques ou les maladies digestifs (Slimani et *al.*, 2016).

En Afrique du Sud

Infusion des feuilles d'agave est utilisés pour le traitement de l'hypertension (Semenya et *al.*, 2012)

Au Liban

Le jus des feuilles d'agave est utilisé comme remèdes antirhumatismaux (El Beyrouthy et *al.*, 2008)

Au Cambodge

La tige est utilisée contre les maladies infectieuses et surtout pour les plaies, et furoncle (cheng et *al.*, 2007).

IV-3-2-5-Composition chimique

Les métabolites primaires et secondaires ont été signalés dans les différentes espèces d'Agave. Les principaux métabolites comprennent les carbohydrates (Soto et *al.*, 2013 ; Mellado-Mojica & Lopez, 2015) et les sirops d'agave traités sont de plus en plus reconnus comme Édulcorants naturels, aliments fonctionnels et pré biotiques (Avila- Fernandez et *al.*, 2011 ; Nava- Cruz et *al.*, 2014 ; Mellado-Mojica & Lopez, 2015).

La composition chimique et les propriétés fonctionnelles des feuilles d'*Agave americana* ont été déterminées par Bouaziz et *al.*, (2014), ces derniers ont trouvé que la poudre d'agave possède des teneurs plus élevés en fibres alimentaires (38,40%), les sucres totaux (45,83%) et les protéines (35,33%), avec une teneur relativement faible en cendres (5,94%) et lipides (2,03%).

Les éléments minéraux déterminé par le meme auteur, montre la prédominance de potassium (1.096mg/100g d'AA), calcium (0.762 mg/100g d'AA), et un faible taux de sodium (0.092mg/100g d'AA), et de magnésium (0.045mg/100gd'AA), ces résultats sont relativement similaires de l'Aloe vera.

IV-3-2-1-Les saponines

Les espèces du genre agave sont une source importante des saponines, ces derniers sont des dérivés glycosylés de stéroïdes végétaux tels que la tigogenine, la smila-genine, la gitogénine, la chlorogénine, l'hécogénine, la sarsapogénine, la néo-tigogénine et la hongguanggénine.

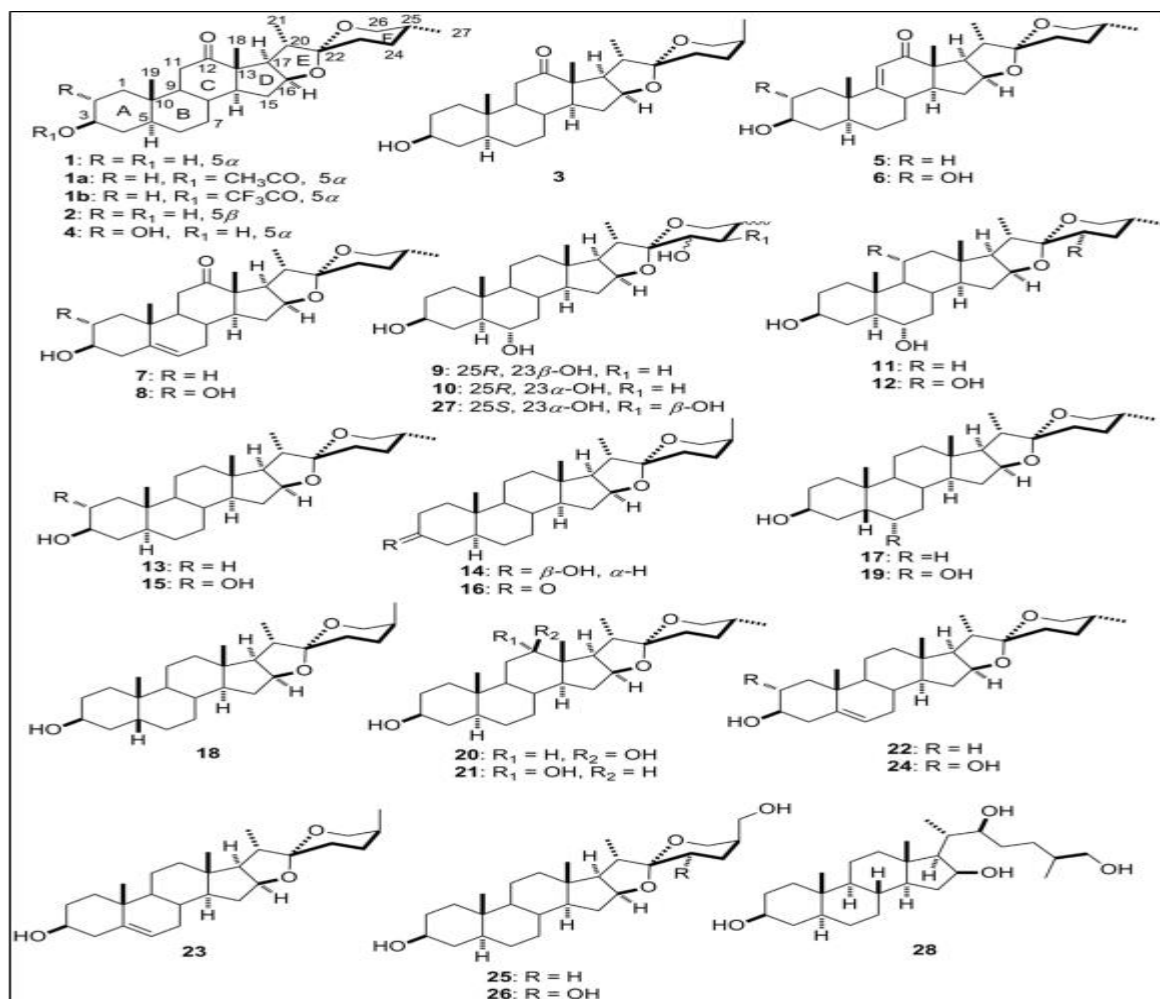
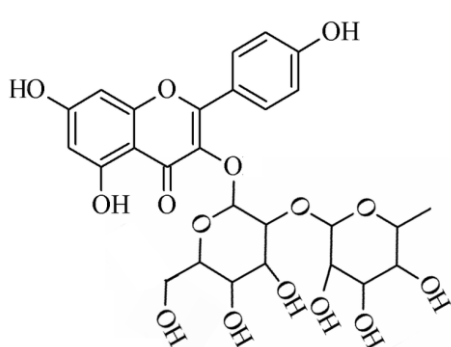


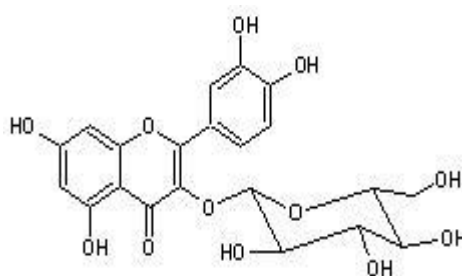
Figure 23 : Structures chimiques des saponines rapportées du genre *Agave* (Sidana et al., 2016)

IV-3-4-2-Composés phénolique

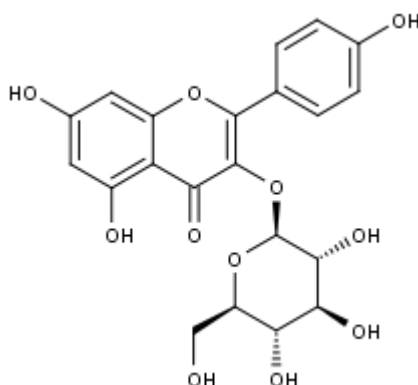
Il y a très peu de recherche concernant l'isolement de nouveaux composés phénoliques des espèces d'agave. *Agave americana* L., est la première espèce étudiée par Subramanien et Nair, (1992), qui ont rapporté la présence de deux glycosides de flavonol (kaempférol-3-O-glucoside et kaempférol-3-O-rutinoside) dans les fleurs. Par la suite, pamar et al, (2005), ont isolé un complexe flavanone (5,7-dihydroxy-6,5'-dimethoxy-3 ',4'-methylenedioxyflavanone) dans les tissus somatiques de la même espèce. Dans le cas d'*Agave duranguensis*, différents Kaempférol glycosides ont été trouvés (Almaraz-abarca et al., 2009). Chen et al, (2009) ont isolés un groupe de Flavones et homoisoflavones d'*agave sisalana*.



Quercétine -3-O-rutinoside



kaempférol-3-O-rutinoside



Kaempférol-3-O-glucoside

Figure 24 : structure chimique de quelque flavonoïde isolé d'agave spp.

IV-3-5-Activités biologiques du genre agave

En plus de leurs utilisations traditionnelles, les espèces d'agave possèdent de nombreuses activités biologiques, ces dernières sont attribuées à leurs compositions chimiques.

IV-3-5-1-Activité anti-inflammatoire

L'extrait d'*A. americana* a montré une activité de 81% d'inhibition de l'œdème auriculaire à une dose de 6 mg /oreille. La cantalasaponine-1 purifiée à partir de l'extrait d'*A. americana* est testé pour son effet anti-inflammatoire a montré une inhibition de 90% de l'œdème de l'oreille à une Dose de 2,0 mg par oreille (Monterrosas-Brisson et *al.*, 2013). L'hécogénine saponine isolée de la même espèce ont également montré une activité anti-inflammatoire de l'oedeme induit par la carragénine (Peana et *al.*, 1997).

Garcia et *al.*, (2000) ont montré que l'extrait d'*agave intermixta* possède un effet anti-inflammatoire avec 50% de réduction de l'œdème que le groupe témoin.

IV-3-5-2Activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant par différent méthodes a été rapporté pour les espèces du genre agave. Dans une étude faite par Benhamissa et *al.*, (2012) le pouvoir antioxydant l'extrait méthanolique des feuilles d'*A.americana* a testé par le DPPH, les résultats obtenus ont montré que l'extrait méthanolique possède une activité antioxydante élevée. Cependant Rizwan et *al.*, (2012) ont signalé des Activités antiradicalaires (de 61,41% à 73,97% d'inhibition DPPH), Les potentiels d'inhibition de la peroxydation lipidique (De 50,12% à 70,35%) pour l'*A.attentua*.

IV-3-5-3Activité antimicrobienne

Les espèces d'agave ont été historiquement connues pour leurs propriétés antimicrobiennes. L'étude de Babu et *al.*, (2015), porté sur l'activité antibactérienne des fractions d'*A.americana* obtenue par différents solvants contre deux grams positifs (*Bacillus subtilis* NCIM 2439, *Staphylococcus aureus* NCIM 2079) et deux organismes Gram négatifs (*Escherichia Coli* NCIM 2065, *Pseudomonus aeruginosa* NCIM 2200) a approuvé l'activité antibactériennes des extraits testés. Selon l'auteur, cette activité est due à la présence d'une saponine stéroïde.

L'activité antibactérienne des espèces d'Agave a été associée avec la présence de tanins, d'alcaloïdes, de flavonoïdes et de saponines (Ade-Ajayi et *al.*, 2011; Hammuel et *al.*, 2011; Vaghasiya et *al.*, Chanda, 2007).

L'efficacité antifongique des plantes d'agave a également été évaluée Contre les pathogènes fongiques des cultures. L'extrait méthanolique des feuilles d'*A. americana* a montré une activité antifongique contre *Alternaria brassicae* et inhibé la germination

conidienne du champignon (Guleria et Kumar, 2009). De même, les extraits aqueux d'*A. Lechuguilla* inhibé *Fusarium oxysporum*, un pathogène fongique de la tomate (de Rodriguez et al., 2006).

IV-3-5- 4-Activité anticancéreuse

Les extraits méthanoliques des feuilles d'*A.americana* obtenu par reflux ont diminué la viabilité des cellules du cancer du sein humain (MCF-7). Un IC_{50} De 545,9 g/ mL a été rapportée en mesurant la teneur totale en protéines par SRB. Un seuil de cytotoxicité plus élevé a été obtenu lors de l'utilisation de l'essai MTT, avec un IC_{50} De 826,1 g / mL. Sur la lignée cellulaire non cancéreuse Vero, avec IC_{50} quatre fois plus élevé (Anajwala et al., 2012).

En outre, Ketan et al, (2011), ont évalué l'activité anti cancéreuse des extraits éthanolique d'*agave americana* par trois méthodes in vivo et in vitro, et ils ont révélé que l'extrait éthanolique d'*A. americana* possède une activité cytotoxique et antitumorale très importante.

IV-3-5-6-Activité antidiabétique

Dans l'étude *in vivo* menée par Garcia et al. (2009) un groupe des rats non diabétiques et des rats diabétiques induits par streptozotocine a été alimenté pendant six semaines, avec 4 doses différentes (0,0, 0,5, 2,0 et 5,0 g / kg de poids corporel) Sirop agave haute teneur en fructose (salmiana Agave Otto ex Salm-Dick). Les deux groupes étaient évalués glucose, de cholestérol et de triglycérides plasmatiques, l'hémoglobine glyquée dans le sang, albumine urinaire et la créatinine et la stéatose hépatique. Une diminution a été observée dans la glycémie et un effet protecteur sur la stéatose hépatique chez les rats diabétiques, cet effet est en corrélation avec l'action du fructose, du métabolisme des lipides et des glucides.

Partie expérimentale

Chapitre V : Matériels et Méthodes

V-1 cadre d'étude

Cette étude a pour objectif, la valorisation de l'*agave americana*. A cet égard, des études phytochimiques ont été entreprises pour quantifier, extraire, et caractériser les métabolites secondaires de cette plante ainsi que l'évaluation de ces activités biologiques.

L'identification botanique de l'espèce a été déterminée au laboratoire de taxonomie végétale de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Sidi Bel Abbès, en utilisant la clé de détermination intitulée « la Nouvelle flore de l'Algérie » de Quezel et Santa (1962).

La méthodologie adoptée pour ce travail de thèse est divisée en trois axes dont le premier était consacré à l'étude phytochimique consistant en une extraction par différents méthodes et associée à une quantification des composées phénoliques par la méthode spectrophotométrique. Une extraction liquide-liquide des feuilles d'*Agave americana*. Par différents solvants de polarité décroissante (chloroforme, acétate d'éthyle, n-butanol) et une évaluation, *in vitro*, de l'activité antioxydante des différents extraits ont été de même réalisée.

Par ailleurs, le deuxième axe a été réalisé dans l'optique d'évaluer *in vivo* l'activité anti-inflammatoire des extraits hydro-éthanolique et décocté respectivement ainsi que l'identification des flavonoïdes par la technique HPLC, pour déterminer le profile phytochimique de ces molécules.

V-2 Etude phytochimique

V-2-1-Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué par les feuilles et les racines de l'*agave americana*. Les échantillons ont été récoltés au mois de mars 2014 dans deux régions différentes, une montagneuse (monts de Tessala) et l'autre côtière (Kristel).

Les feuilles et les racines ont été par la suite séchés à l'air libre et à l'abri de la lumière à une température ambiante pendant 20 jours. Après séchage, le matériel végétal a été broyé jusqu'à obtention d'une poudre fine (figure 25).

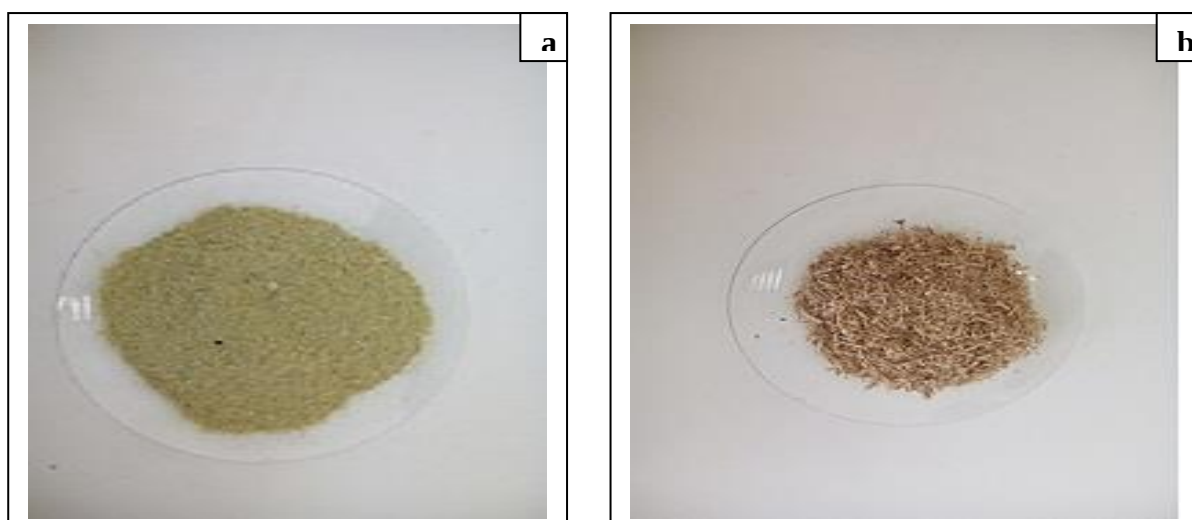


Figure 25 : matériel végétale broyé en poudre

a : poudre des feuilles ; b : poudre des racines

V-2-1-1- Présentation des stations d'échantillonnage

V-2-1-1-1-Station 1 (monts du Tessala)

Les monts de Tassala, prenant leur nom de la commune de Tessala qui fait partie d'un ensemble de communes montagneuses à cheval entre trois wilayas (Sidi Bel Abbés, Oran et Ain Temouchent). Elle couvre une superficie de 11.824 ha (Figure 26). Elle s'éloigne du chef-lieu de la wilaya d'environ 10 Km et est traversée par l'axe routier RN 95 reliant Sidi Bel Abbés à Temouchent. Elle porte coordonnées géographiques suivantes :

$$X1= 35^{\circ}17'20.34'', Y1= 0^{\circ}51'54.67''$$

$$X2= 35^{\circ}20'31.04'', Y2= 0^{\circ}42'54.96''$$

Cette commune est délimitée au Nord par la commune de Sidi Boumediene et Oued Sebbah (wilaya de Ain Temouchent), à l'Ouest par la commune de Sehala, à l'Est par la commune de Ain Trid et au Sud par la commune de Sidi Lahcen (Ferka-Zazou, 2006).

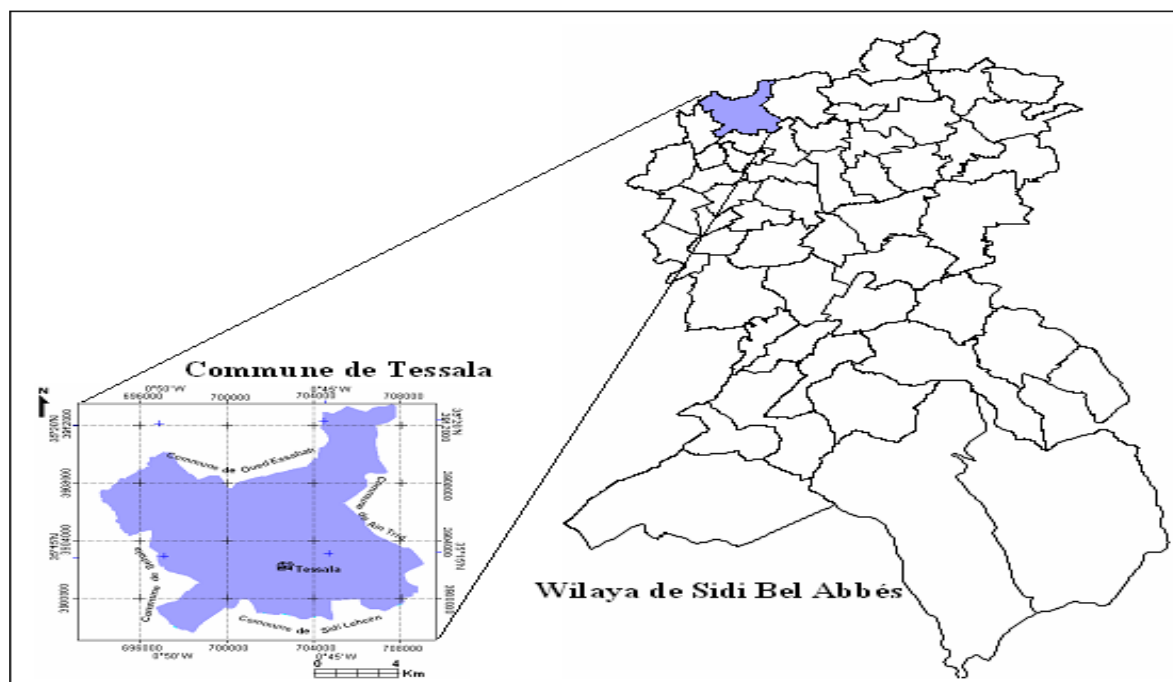


Figure 26 : Localisation de la commune de Tessala (Ferka-zazou,2006)

a) La zone montagneuse de Tessala

Les monts de Tessala présentent un secteur de grande diversité biologique liée à leur localisation géographique et orographique. Ils sont caractérisés par des sommets atteignant des altitudes moyennes de 600 m. Ils sont limités au Nord par la plaine Mléta avec laquelle ils se réunissent progressivement en allant vers le Nord dans la direction de la mer et la Sebkh d'Oran ; à l'Est par les monts de Béni Chougrane et à l'Ouest par la plaine de Sidi Bel Abbès (Figure 27). Le djebel Tessala culmine à 1061m avec une localisation de 15 km au Nord-Ouest de la ville de Sidi Bel Abbès (Algérie occidentale).

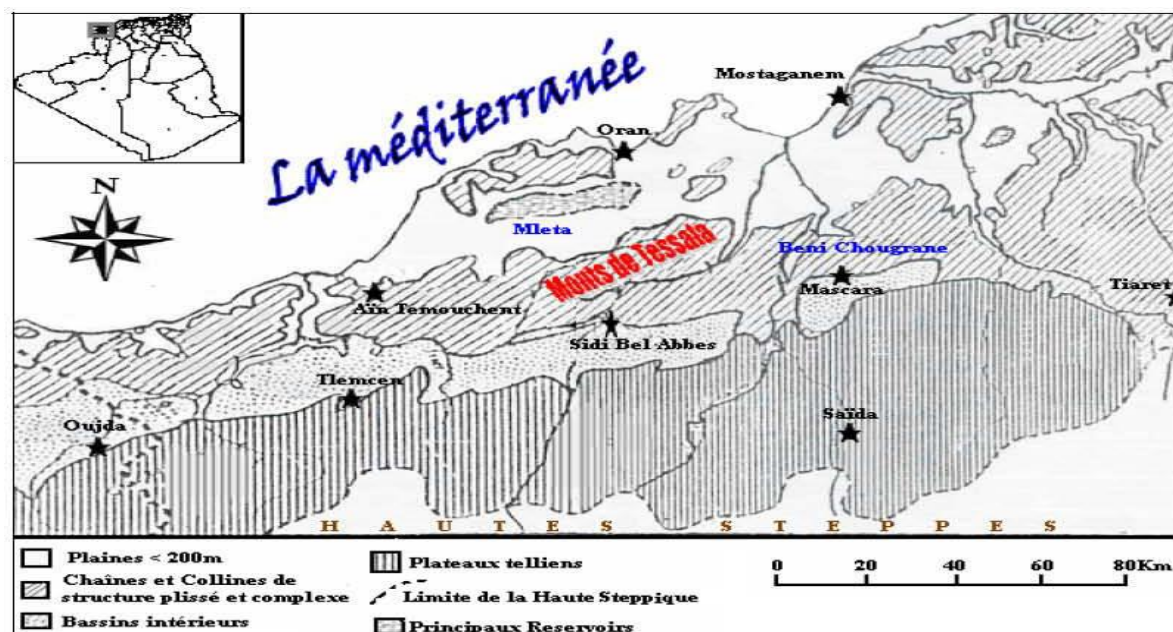


Figure 27 : Localisation géographique des monts de Tessala (Bouzidi et *al.*, 2009)

Notre station d'étude (figure 28), fait partie des Monts de Tessala, elle se situe à une latitude de $35^{\circ} 16' 11.9''$ N et une longitude $0^{\circ} 46' 47.6''$ W à une altitude de 815m.



Figure 28 : Localisation de la station de prélèvement Tessala (Google earth)

➤ **Pédologie**

Les différents types du sol qui constituent ces zones montagneuses sont pauvres à affleurement rocheux, de faible profondeur, de texture fine, tandis que les lithosols et les régosols se localisent sur les versants pointus.

➤ **Caractéristiques climatiques**

La région de Tessala est caractérisée par un climat de type méditerranéen définie par :

- Une concentration de pluies pendant la période froide (automne et hiver).
- Une sécheresse apparente pendant les mois les plus chauds (Eté).

La région sud appartient globalement à l'étage bioclimatique semi-aride caractérisé par :

- Un hiver pluvieux et assez froid.
- Un été chaud avec une période de sécheresse de l'ordre de 6 mois.

La durée de la saison sèche est en moyenne de 6 mois, elle couvre la dernière semaine du mois d'avril jusqu'au début de la deuxième décade du mois d'octobre. L'indice d'aridité de la région est estimé à 12.73 et détermine un régime semi-aride.

L'utilisation du quotient pluviothermique d'Emberger dont l'application est propre aux régions méditerranéennes permet de classer la commune de Tessala dans l'étage bioclimatique semi-aride inférieur à hiver frais (Ferka zazou, 2006)

V-2-1-1-2- Station 2 : région de Kristel

Vu dans son ensemble, le tell oranais comprend d'Ouest en Est le massif des Traras, Sahel d'Oran, Sahel d'Arzew, Plateau d'Oran ainsi que les plateaux de Mostaganem et enfin à l'Est les monts de Dahra s'élevant à 1342 m d'altitude (Ainad Tabet ,1988).

Le djebel Murdjadjo qui appartient au Sahel d'Oran, domine la ville de sidi M'sabih avec 100 Km de long, 25 Km de large et 580 m d'altitude. À l'Est de la ville d'Oran, le djebel Khar (appelé aussi montagne des lions) (figure 29) et le Sahel d'Arzew prolongent le plateau d'Oran vers la plaine de l'Habra-Macta. La montagne des lions s'élève subitement au-dessus de la mer atteignant une altitude estimée à 611 m (Ainad Tabet ,1988).

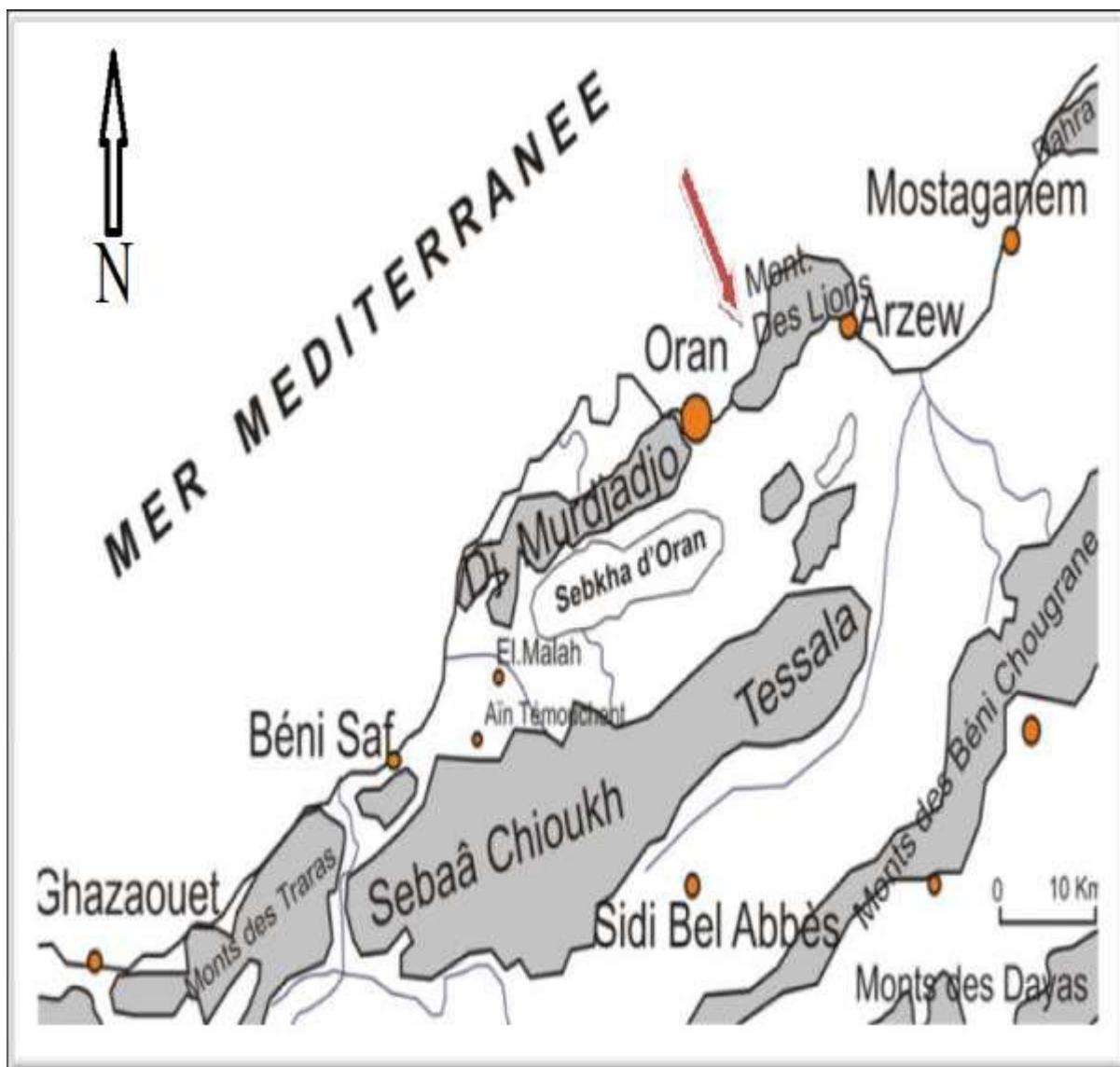


Figure 29 : situation des grands secteurs biogéographiques en Oranie (Mansouri, 2012).

Notre station d'étude (figure 30) fait partie de la montagne des lions, elle est comprise entre les longitudes $0^{\circ} 29' 58''$ W / $0^{\circ} 30' 01''$ W et les deux latitudes $35^{\circ} 47' 11''$ N / $0^{\circ} 47' 23''$ N. avec une altitude de 163 m.

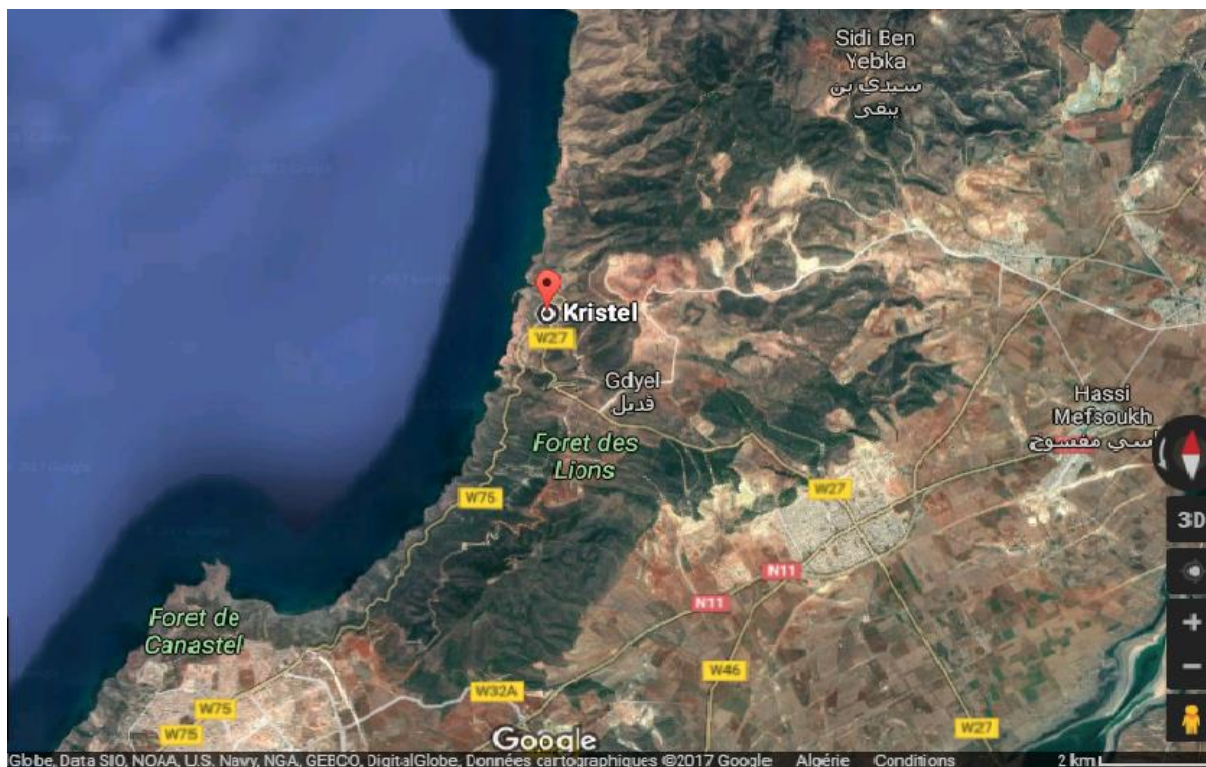


Figure 30 : localisation de la deuxième station de prélèvement (Kristel) (Google Earth)

➤ Géologie

Sur le plan géologique, la partie littorale de l'Algérie est la plus récente, la plus instable et la plus diversifiée en substrats géologiques. La région oranaise est donc d'une grande diversité avec strates géologiques appartenant aux quatre ères.

La région de notre étude s'intègre dans la terminaison occidentale de la chaîne alpine tellienne (ou atlas tellien). Les formations géologiques qui la constituent sont de natures et d'âges variés. L'orogénèse alpine a permis la structure de cet atlas tellien en un empilement d'unités structurales charriées et imbriquées entre-elles. Ceci a favorisé la mise à nu des roches anciennes telles que les schistes qui forment l'assise du massif des Traras et de la montagne des Lions (Djebel Khar).

Les différentes formations géologiques de cette région s'étendent depuis l'âge primaire jusqu'au quaternaire. Les schistes, d'âge primaire, constituent le substratum du massif des Traras. Ce sont des schistes gris-noirs se débitant en plaquettes. Leur altération donne des produits argileux (sols) de couleur brun-rouge. Les calcaires, d'âge secondaire sont assez bien représentés dans l'Oranie, ils forment le plus souvent des reliefs assez escarpés ainsi que dans la partie méridionale du Murdjadjo (Fenet, 1975 et Guardia, 1975).

➤ **Pédologie**

Les sols auxquels nous nous sommes intéressés sont majoritairement salins, si on exclu les plaines et les montagnes (grés, schistes, calcaire, argile). Au Nord-est, le sahel d'Arzew, fait face à la mer par des reliefs calcaires ou schisteux d'accès difficile et aux abruptes marqués. Sur le versant sud-est considérablement aplani, le sahel d'Arzew donne naissance aux régions fertiles de Gdyel (Bahi, 2012).

En se référant à la carte des sols de l'Algérie (feuille d'Oran) de Durand (1954), les sols de notre zone (montagne des lions) sont de nature insaturée sur les hautes altitudes et calcaire sur les basses altitudes (figure 31).

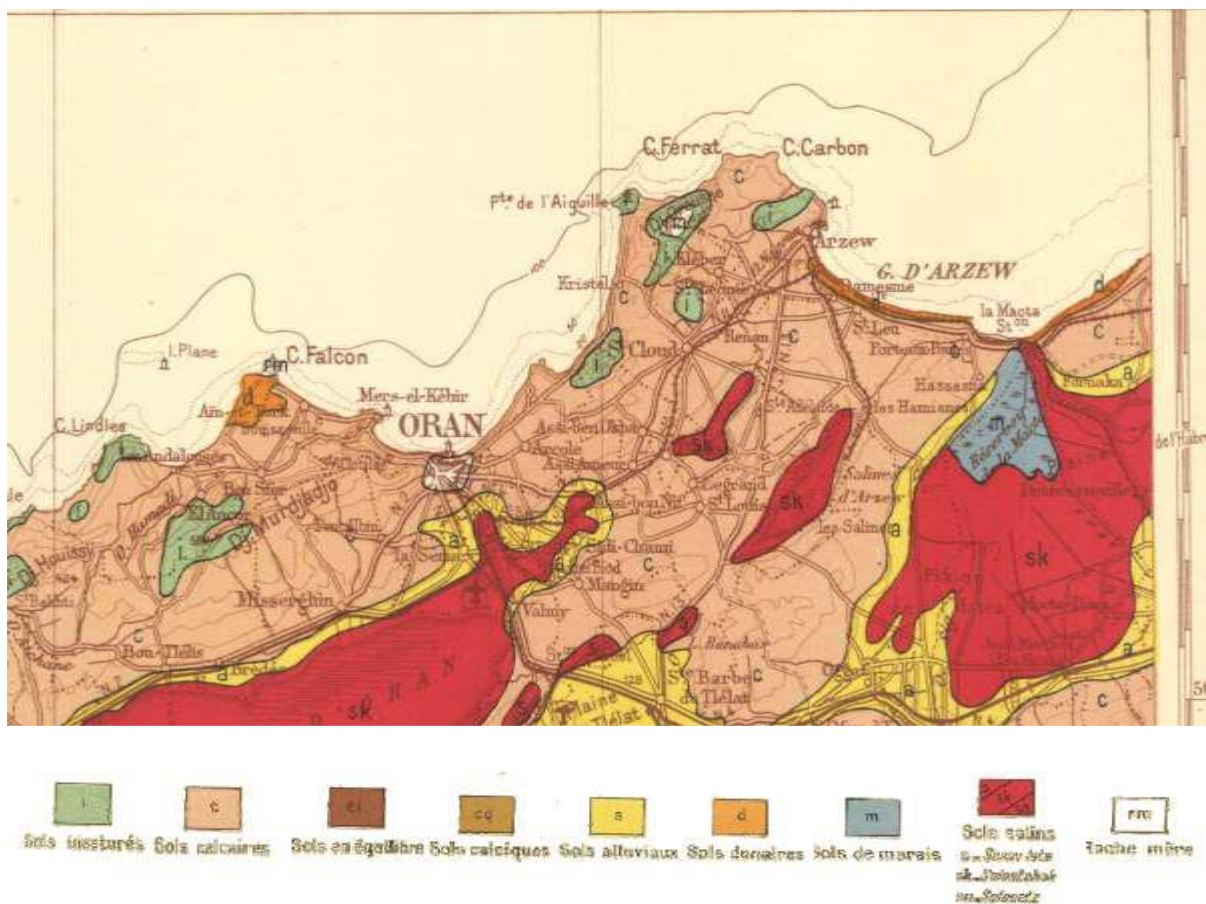


Figure31 : Principaux sols de la Région d’Oran (Durand, 1954).

➤ Caractéristiques Climatiques

Le climat nous n'a pas constitué un paramètre crucial à étudier ; bien que les données climatiques présentées soient tirées de quelques travaux antérieurs afin d'illustrer et définir quelques paramètres climatiques, à savoir la pluviométrie et la température.

Mansouri (2012) a signalé que la région de l'Oranie se situe dans le semi-aride à hiver chaud ; une région littorale particulièrement douce avec une température moyenne annuelle de 19°C et dont l'amplitude thermique ne dépasse que rarement les 30°C.

Selon le même auteur, la pluviométrie varie entre 348,44 mm/an à Oran, et 444.55 mm/an à Arzew. Le sahel côtier ; y compris les mont Arzew et la montagne des lions s'inscrivent dans le subhumide. Du fait de leur proximité de la mer, ces régions sont assez humides ce qui augmente le taux de précipitation et atténue l'effet des fortes températures estivales.

V-2-2-Choix des animaux

Des rats Albinos WISTAR des deux sexes dont le poids était compris entre 150 et 200 g ont été utilisés pour l'étude *in vivo* de l'activité anti-inflammatoire. Ces animaux ont été hébergés dans des cages de polypropylène munies d'un porte étiquette où est mentionné le nom du lot, le traitement subi et les dates des expérimentations. Les locaux sont dotés d'une climatisation dynamique avec une température de 20 à 24°C.



Figure 32 : souche des rat Wistar et leurs aliments. (Cliché Rahmani, 2015).

V-2-3-Appareils et instruments de laboratoires

Nos expérimentations ont été réalisées au niveau du laboratoire de phytochimie et biochimie végétale, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Djillali Liabes, Sidi Bel Abbès.

Tableau 2 : Liste du principal matériel utilisé lors de la réalisation des expérimentations.

Matériels	Référence
Balance de précision	RADWAG AS (220) C2 series
Broyeur	IKA. A11 Basic
Evaporateur rotatif	LABOROTA 4000
Lyophilisateur	Alpha 1-2 LDPLUS CHRIST
Spectrophotomètre	Thermo-spectronic UVB 111801
Système HPLC	AGILENT 1200

V-2-4-Réactifs chimiques

L'éthanol, Le méthanol, le chloroforme, l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle, le n-butanol, le 1, 1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH), le carbonate de sodium (Na_2CO_3), le trichlorure d'aluminium (AlCl_3), l'hydroxyde de sodium (NaOH) et Nitrite de sodium (NaNO_2) constituent les principaux réactifs que nous avons employés.

V-3- Méthodes d'extraction

V-3-1- Préparation des extraits

a) Macération

Une quantité de 2 g de la poudre des feuilles et des racines de la plante étudiée a été soumise à l'extraction par macération dans un volume de 20 ml d'éthanol et du méthanol pendant 24h. Après filtration, les extrais méthanoliques et éthanoïques ont été conservés à 4°C jusqu'à leur analyse.

b) Décoction

Dans cette expérience, deux (2) g de la poudre végétale sèche des deux organes traités et 20 ml d'eau distillée ont été porté à ébullition pendant 30 minutes puis filtrée.

c) Infusion

Vingt (20) ml d'eau distillée bouillante ont été ajoutés aux 2 g de la poudre végétale des deux organes traités pendant 20 minutes puis filtrée.

V-3-2- Criblage phytochimique

Les extraits obtenus ont servi à la réalisation d'un test préliminaire à fin d'indiquer la présence ou l'absence de certaines classes des métabolites secondaires via une série d'analyses qualitatives basées sur des réactions de coloration ou de précipitation.

➤ Caractérisation des poly-terpènes :

Pour ce fait, on met 5 ml de chaque extrait dans des tubes à essais et on ajoute 2 ml de chloroforme pure (CHCl_3) et 3 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 96% (goutte à goutte). Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration rouge marron (Abdul et *al.*, 2013).

➤ Caractérisation des phénols :

On traite un ml de chaque extrait avec quelques gouttes d'acide nitrique (HNO_3) diluée à 1%. La présence des phénols est mise en évidence par l'apparition d'une couleur jaune orangé (Ramakrishna et *al.*, 2013).

➤ Caractérisation des flavonoïdes :

Un (1) ml de chaque extrait est traité par quelques gouttes de soude (NaOH) dilué à 4%, puis la couleur virera au jaune intense en présence de flavonoïdes (Mohammad Amzad et *al.*, 2013).

➤ Caractérisation des tanins :

Afin de déterminer la présence des tanins dans un extrait, on ajoute à un 1 ml de chaque extrait, 2 ml d'eau distillée et 2 à 3 gouttes de trichlorure de fer (FeCl_3) à 1%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration : bleu noir, verte ou bleu verte et un précipité qui témoignent respectivement de la présence des tanins catéchique, gallique ou éllagique (Ramakrishna et *al.*, 2013).

➤ Caractérisation des saponines

Les extraits ont été dilués avec 20 ml d'eau distillée et secoués dans un cylindre gradué pendant 15 mn. La formation d'une couche de mousse de 1cm indique la présence des saponines (Prashant, et *al.*, 2011).

V-3-3- Analyse quantitative des composées phénoliques

a- Dosage des phénols totaux

L'estimation de la teneur en phénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode décrite par Singleton et *al.*, (1965) avec une légère modification. Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau-Gayon, 1968). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Boizot et charpentier, 2006).

- **Mode opératoire**

Un volume de 250 μ l de chaque extrait est introduit dans des tubes à essai, le mélange formé de 1ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois et 0,8 ml de carbonate de sodium à 7.5% leur est additionné. Les tubes sont agités et conservés durant 30 minutes à la température ambiante. L'absorbance est mesurée avec un spectrophotomètre dont la longueur d'onde est de 765 nm.

La teneur en phénols totaux a été déterminée en fonction d'une courbe d'étalonnage préparée dans les mêmes conditions que l'échantillon, en utilisant l'acide gallique comme référence.

- **Expression des résultats**

Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) de la matière sèche (mg AGE/ g MS).

b- Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes totaux par la méthode colorimétrique est réalisé selon la méthode adaptée par Zhishen et *al.*, (1999), en utilisant le trichlorure d'aluminium et la soude.

Le principe de cette méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium qui forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude qui donne un complexe de couleur rose absorbée dans le visible à 510.

- **Mode opératoire**

Une quantité de 500 µl de chaque extrait est ajoutée à 1500 µl de l'eau distillée. Au temps zéro, 150 µl de nitrite de sodium (NaNO_2) à 5 % sont ajoutés au mélange. Après 5 mm, 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) à 10 % (m/v) sont rajoutés. Après l'incubation de 6 mm à la température ambiante, 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1 M) sont additionnés. Puis, le mélange est agité à l'aide d'un vortex pendant 10 secondes. L'absorbance est déterminée à 510 nm contre un blanc. Une courbe d'étalonnage est tracée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme référence.

- **Expression des résultats**

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits est exprimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) de la matière sèche (EC)/g).

c- Dosage des tanins condensés

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode de la vanilline dans un milieu acide cité par Price et *al* (1978). La vanilline réagit avec les flavan 3-ols libres et les unités terminales des proanthocyanidines donnent une coloration rouge dont l'intensité est proportionnelle aux taux de flavanols présents dans le milieu et qui présente un maximum d'absorption à 500 nm de longueur d'onde (Daas Amiour, 2009).

- **Mode opératoire**

Un volume de 50 µl de chaque extrait est ajouté à 1500 µl de la solution vanilline/méthanol (4%, m/v). Ensuite, 750 µl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) sont additionnés. Le mélange obtenu est laissé réagir à une température ambiante pendant 20min. L'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc. La concentration des tanins condensés est déduite à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec la catéchine dans les mêmes conditions opératoires.

- **Expression des résultats**

Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent de catéchine par gramme de la matière sèche (mg EC/g).

V-4-Evaluation de l'activité antioxydante

V-4-1- Méthode de piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil)

Le Diphényle picryl-hydrazyle (DPPH), est un radical libre stable, violet en solution et présentant une absorbance caractéristique à 517 nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl-hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration (l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons) (Sanchez-Moreno, 2002).

- **Mode opératoire**

Un volume de 50 µl de différentes concentrations de chaque extrait exprimé en g/l est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanoïque du DPPH (0.025 g/l) fraîchement préparée. La mesure de la décoloration à 515 nm correspondant à la réduction des radicaux du DPPH dans le milieu réactionnel est faite à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée par un témoin positif (acide ascorbique) à différentes concentrations. La concentration minimale nécessaire pour l'inhibition de 50% du DPPH (IC₅₀), utilisée pour évaluer le pouvoir antioxydant des différents extraits a été calculée à partir des courbes de tendances linéaires.

- **Expression des résultats**

Calcul des pourcentages d'inhibitions :

Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = \frac{(\text{ABS blanc} - \text{ABS échantillon})}{\text{ABS blanc}} \times 100$$

ABS blanc : est l'absorbance de la réaction de control (solution DPPH)

ABS échantillon : est l'absorbance des extraits

➤ **Calcul des IC_{50} :**

L' IC_{50} ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC_{50} pour Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les IC_{50} sont calculées graphiquement en utilisant les graphes tracés des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

V-5- Extraction liquide-liquide des flavonoïdes des feuilles

Dans le but d'extraire des composés flavonoidiques, une extraction liquide-liquide par des solvants à une polarité croissante a été réalisée sur les feuilles d'agave (figure 33) en prenant en considération sa richesse en composées phénoliques, suivant le protocole ci-dessus :

Une quantité de 100 g de la poudre des feuilles d'agave a subi une macération par le mélange éthanol/eau (280/70 ml) pendant 72 h avec renouvellement du solvant chaque 24h. Les macérât sont réunis, puis filtrés à l'aide d'un papier filtre Whatman n °1.

L'extrait éthanolique est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide à 40 °C. Le résidu sec obtenu a été reconstitué dans 200 ml d'eau distillée bouillante, puis laissé se décanter pendant 24 heures et enfin filtré sur Büchner sous pression réduite. Le filtrat obtenu a subi trois lavages successifs avec l'éther de pétrole pour débraser les cires, la chlorophylle et les lipides à fin d'obtenir une phase organique polaire.

La phase aqueuse a été ensuite soumise à un affrontement avec le chloroforme pour obtenir une phase organique contenant les flavonoïdes aglycones et les aglycones méthoxylés. Cette dernière est mélangée avec l'acétate d'éthyle pour récupérer les monoglycosides puis un troisième affrontement avec le n-butanol pour récupérer les flavonoïdes di et triglycosides.

En fin, la phase aqueuse restante contient les flavonoïdes les plus polaires. Les quatre fractions organiques sont évaporées à 35°C puis lyophilisées. Les lyophilisats sont pesés pour calculer le rendement, exprimé en gramme par 100 gramme de matière sèche.

En outre, Les extraits lyophilisés ont été caractérisés quantitativement et qualitativement. Pour l'étude quantitative, les phénols totaux et les flavonoïdes totaux ont été dosés par spectrophotométrie, alors que l'étude qualitative porte sur l'identification par la méthode de chromatographie phase liquide haute performance (HPLC) de la composition des différents extraits.

L'évaluation de l'activité anti oxydante des fractions a été faite de la même manière que celle des extrais bruts citée ci- dessus.

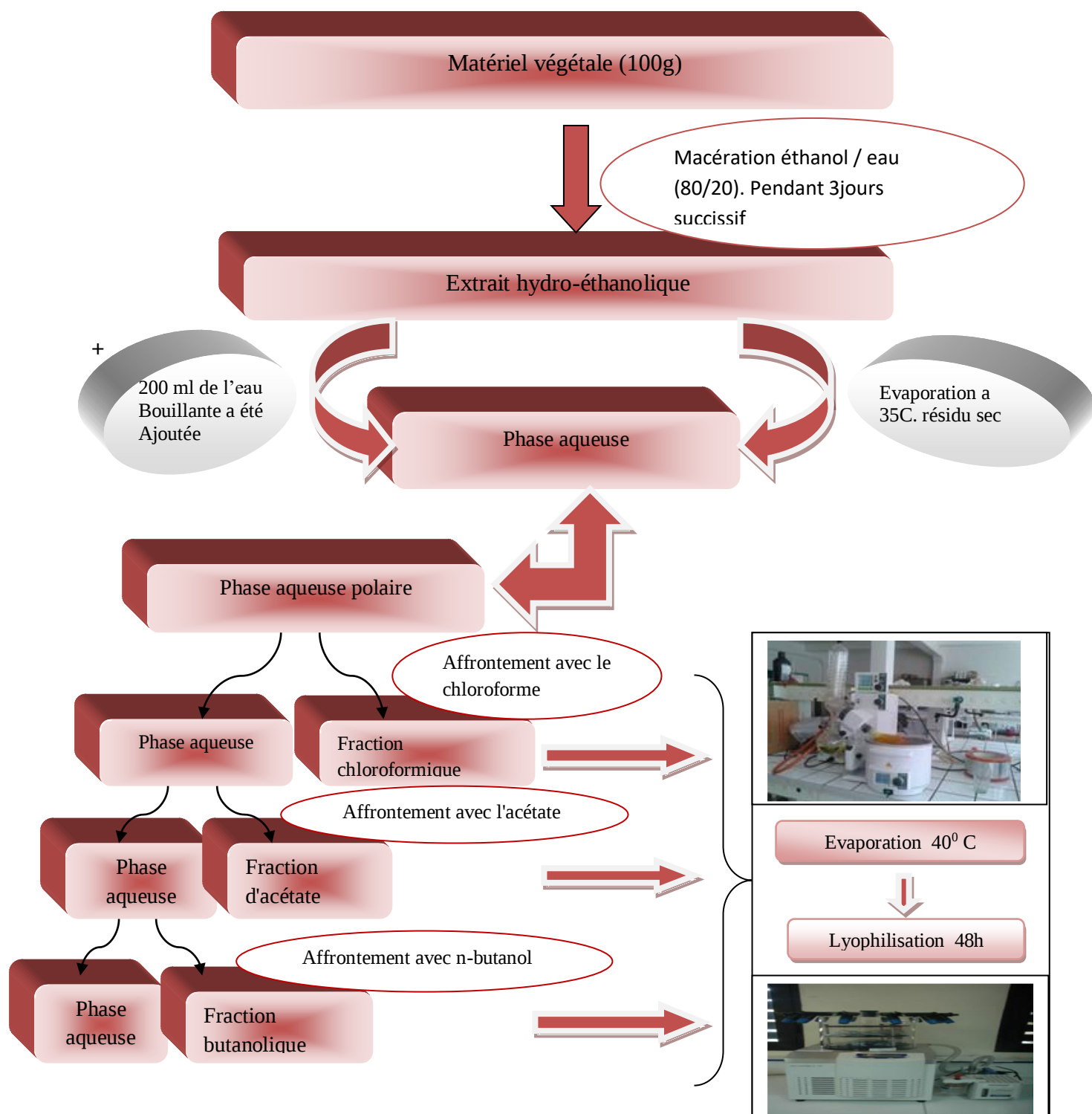


Figure 33 : diagramme des étapes d'extraction des fractions flavonoïdiques.

V-6- Évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vivo

L'évaluation de l'activité biologique a été réalisée à l'animalerie de la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Mustapha Stambouli de Mascara. L'effet anti-inflammatoire a été évalué selon la méthode décrite par Winter et al (1962). En mesurant l'œdème induit par la carragénine par l'utilisation d'un pied à coulisse digitale. Le test a porté sur 40 rats mâles et femelles regroupés en 5 lots homogènes. Les rats sont mis à jeun 16 heures avant l'expérimentation.

- **Principe**

L'injection de carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure du rat provoque un œdème qui peut être réduit par une substance douée de propriétés anti-inflammatoires.

Un lot témoin : ce lot était constitué de 5 rats recevant par voie orale 2.5ml/kg d'eau physiologique (NaCl à 0.9%). 30 minutes après, 0.2 ml de 2 % de la solution carragénine 2% a été injectée au niveau de l'aponévrose plantaire de la patte postérieure droite du rat.

Un lot de référence : il s'agit de deux groupes constitués chacun de 5 rats, dont le premier recevant le médicament de référence (indométacine 10mg/kg, VO) et le deuxième un médicament de référence (piroxicam 10mg/kg, VO)

Un lot traité : Deux autres groupes constitués de même de 5 rats pour chacun recevant un extrait éthanolique et un autre décocté avec une concentration de (200 mg/kg). 30 minutes après l'administration orale des extraits, 0,2 ml de 2% de carragénine a été injectée dans l'aponévrose plantaire de la patte arrière droite. La patte arrière gauche n'est pas traitée, mais considérée comme témoin. La différence entre le volume de la patte droite et gauche a été mesuré et pour exprimer le volume l'œdème à l'aide d'un pied à coulisse Digitale à 1h, 3h et 6h après induction de l'inflammation. Les différences moyennes des groupes traités ont été comparées avec les différences moyennes du groupe de contrôle. Les pourcentages d'augmentation de l'œdème et d'inhibition de l'inflammation sont calculés selon les formules suivantes :

$$\% \text{ de l'œdème} = (D_t - D_0)/D_0 * 100.$$

D_t: diamètre de la patte du rat à un temps donné après l'injection de la carragénine

D₀ : diamètre de la patte du rat à T₀

$$\% \text{ d'inhibition} = [(D_t - D_0) \text{ témoin} - (D_t - D_0) \text{ traité}] * 100 / (D_t - D_0) \text{ témoin}$$



Figure 34 : les étapes de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire.

a: séparation des cages ; **b:** gavage des extraits ; **c:** la pâte du rat avant l'injection **d:** injection de carragénine ; **e:** patte du rat après l'injection; **f:** mesure de l'enflamment par pied à coulisse digitale.

V-7- Analyse qualitative des composés par HPLC

➤ Principe de la méthode

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange afin de les identifier et quantifier. Le système HPLC contient essentiellement un réservoir d'une ou de plusieurs phases mobiles polaires ; une pompe qui assure le passage de cette phase à travers une colonne qui contient une phase stationnaire apolaire. À l'issue de la colonne, un détecteur couplé à un système d'enregistrement va permettre la détection et le traçage des pics suite à la traversée du détecteur par les molécules de l'échantillon, aboutissant à l'enregistrement d'un chromatogramme.

Les échantillons sont injectés dans la phase mobile par un injecteur, puis l'ensemble va traverser rapidement la phase stationnaire contenue dans la colonne grâce à la pression exercée par la pompe. Les constituants du mélange, selon leur polarité, vont traverser la phase stationnaire séparément à mesure que les molécules les plus polaires auront un temps de rétention plus court, et passent rapidement, alors les molécules les moins polaires ou apolaires seront retenues lors de la traversée de la colonne, et se déplacent toutes moins vite.

➤ Mode opératoire

L'analyse des fractions lyophilisées est effectuée par un système HPLC Agilent 1200, avec une colonne C18 (250 millimètres de $\times$ 4.6 millimètres, 5.0 μ m). Tous les solvants utilisés lors de la préparation des échantillons et des phases mobiles étaient grade HPLC.

La préparation des échantillons constitue une étape indispensable à l'analyse, au fur et à mesure qu'ils sont fortement dilués dans des solvants grade HPLC seulement, puis soigneusement filtrés avant l'injection à l'instrument. L'élution est faite suivant un gradient de pression de deux solutions constituant la phase mobile dans la colonne à un débit de 1 ml/min.

La première solution (a) est composée de l'eau distillée, l'acétonitrile acide formique à raison de (94.7+4.3+1 v/v) respectivement, alors que la deuxième solution (b) contient la même composition mais à des proportions différentes (49.5+49.5+1 v/v). La phase mobile commence à 90% (a) et 10% (b), suivie par une augmentation de la proportion de la solution (b) dans la phase mobile à 30% (b) pendant 10 min. Enfin, nous avons procédé à une augmentation linéaire de la proportion de la solution (b) jusqu'à 80% pendant 5 minutes.

V-7- Etude statistique

Les données collectées à partir de l'extraction expérimentale ont été centrée parallèlement par trois répétitions puis analysées par le logiciel (IBM. SPSS. Statistics. 22. 2013). Une analyse univariée reposant sur l'analyse de la variance à deux facteurs été utilisée, suivi si significatif par un test à posteriori de Tukey. Les différences été considérées comme statistiquement significative si $p < 0.05$, hautement significative si $p < 0.01$ ou fortement significative si $p < 0.001$.

Chapitre VI : Résultats et discussions

VI-1- résultats et discussion de l'étude phytochimique

VI-1-1 criblage phytochimique

Les tests préliminaires sur la composition phytochimique des différents organes de l'agave utilisés a permis de mettre en évidence la présence de quelques substances chimiques représentées dans le tableau 4

Tableau 4 : criblage phytochimique réalisé sur les feuilles et les racines d'*Agave americana* L

		Phénols	Flavonoïdes	Tanins	Terpènes	Saponines
Feuilles	Infusion	+	+	tr	+	+
	Décoction	+	+	tr	+	+
	Méthanol	+	+	+	+	-
	Ethanol	+	+	+	+	-
Racines	Infusion	+	+	-	tr	+
	Décoction	+	+	-	tr	+
	Méthanol	+	+	-	-	-
	Ethanol	+	+	-	-	-
		+ : présence - : absence tr : traces				

Les tests préliminaires effectués sur les différents extraits d'*Agave americana* révèlent la présence des phénols, flavonoïdes, tanins, terpènes et des saponines. Ces métabolites secondaires ont un large potentiel d'activités pharmacologiques, et sont probablement à l'origine des vertus thérapeutiques de notre plante.

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par Khalid et *al.*, en 2013, qui ont travaillé sur l'extrait éthanolique des feuilles de l'*agave americana* originaire d'Inde.

Les résultats des études réalisées sur l'extrait méthanolique de l'*Agave sisalana* (Hauad-marroquin, 2010) rejoignent ceux auxquels nous avons aboutis pour l'*Agave americana*.

Le criblage phytochimique réalisé sur les racines de notre plante, montre la présence des flavonoïdes, phénols, terpènes. Ceci vient confirmer les résultats trouvés par kadam et al, (2012) notamment la présence des flavonoïdes et des saponines ayant une valeur thérapeutique importante.

VI-1-2- Teneur en composés phénoliques des différents extraits

La décoction, l'infusion et la macération sont les méthodes de séparation les plus utilisées pour l'extraction globale des principes actifs

Les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins condensées sont mesurés par la méthode spectrophotométrique pour les deux organes feuilles et racines d'*A.americana*.

VI-1-2-1- Teneur en composés phénolique (feuilles)

a) Teneur en phénols totaux

Les phénols totaux ont été déterminés par la méthode Folin-Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard et l'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 765 nm.

Les polyphénols, classe des métabolites secondaires plutôt hydrolysables, sont majoritairement extraits par des solvants de moyenne à forte polarité. Parmi ces solvants, nous avons choisis Ceux qui présentent une polarité moyenne à savoir l'éthanol et le méthanol ainsi que l'eau dont la polarité est la plus élevée.

Les valeurs du TPC varient entre 37,42 et 62,44 mg AGE / g poids sec (PS), les résultats sont récapitulés dans le tableau1 (annexe B) et illustrés par la figure 35. La décoction présente la plus forte concentration de TPC ($62,44 \pm 0,48$ mg AGE / g PS) suivie de l'éthanol et d'infusion avec respectivement $59,93 \pm 1,08$ et $57,21 \pm 0,88$ mg AGE / g PS, alors que l'extrait méthanolique de la région de Tessala présente la plus faible quantité de TPC ($37,42 \pm 0,53$ Mg AGE /g PS). Il est à signalé qu'il y a une différence fortement significative entre les quatre méthodes ($p < 0,001$).

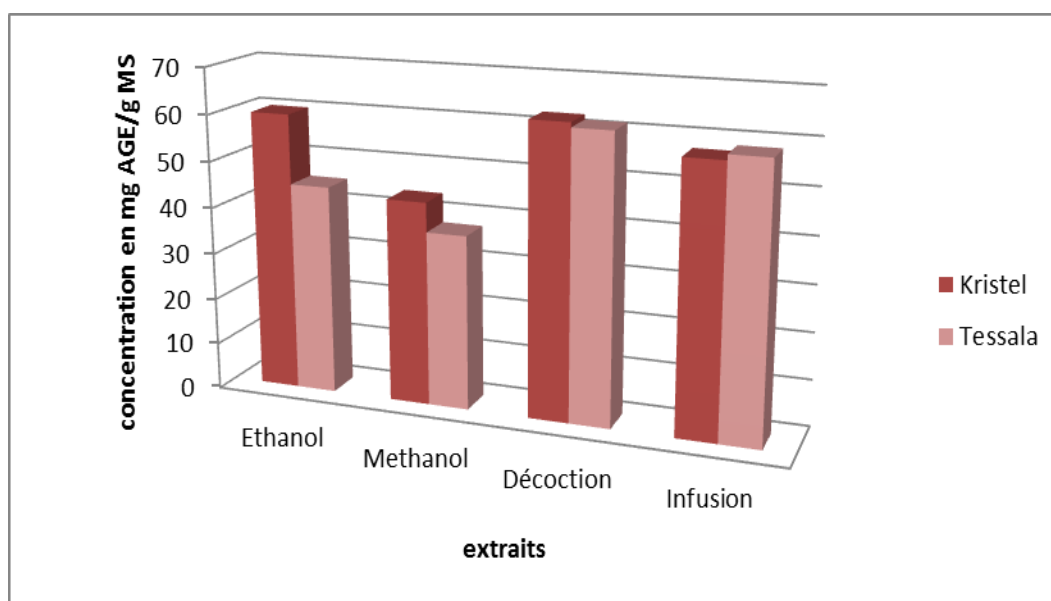


Figure 35 : teneurs en phénols totaux des différents extraits pour les deux régions.

Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix de solvant), ainsi que les conditions d'extraction (à chaud ou à froid), affectent le contenu total en phénols et en flavonoïdes, et par conséquent les activités biologiques assurées par ces métabolites (Lee et *al.*, 2003)

De nombreuses études ont discuté l'effet du solvant sur l'extraction des composés phénoliques. Les solvants, tels que le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle et leurs combinaisons, ont été utilisés pour l'extraction des composés phénoliques (Dai et *al.*, 2010).

Nos chiffres ($62,44 \pm 0,48$ mg AGE / g PS) ont montré que la décoction est la meilleure méthode pour l'extraction des composés phénoliques. Une teneur plus élevée de ces derniers a été obtenue avec une augmentation de la polarité du solvant utilisée pour leur extraction (Grujic et *al.*, 2012).

Des résultats similaires ont été de même obtenus pour l'extrait des feuilles de sorgho (Pascal et *al.*, 2012), celles de *Fagarea vesca* (Ivanov et *al.*, 2015) et celles des racines de *Terminalia sericia* (Anokwuru et *al.*, 2015). Les études précédentes ont révélé que les méthodes de décoction et d'extraction par l'eau donnent une teneur plus élevée en phénols totaux par rapport aux autres extraits. Do et *al.*, (2014) ont montré que la teneur totale en

phénols obtenue par l'extrait aqueux est significativement inférieure à celle obtenue avec l'éthanol, le méthanol et l'acétone.

On peut également observer que la concentration des TPC obtenue par l'extrait hydro-éthanolique ($59,93 \pm 1,08$ mg AGE / g PS) est légèrement inférieure à celle de la décoction ($62,44 \pm 0,48$ mg AGE / g Ps). Ceci est dû à la large gamme des phénols que le mélange d'éthanol et eau peut se dissoudre (Tomsone et *al.*, 2012). L'éthanol est connu comme un bon solvant pour l'extraction des polyphénols et il ne présente pas de risque pour la consommation humaine (Do et *al.*, 2014), en comparaison avec d'autres solvants tels que le méthanol et l'acétone (wendakoon et *al.*, 2012).

L'extrait hydro-méthanolique révèle la valeur la plus basse des TPC par rapport à l'éthanol, ce qui concorde avec les résultats rapportés par Kong et *al.*, (2013) qui ont trouvé que les valeurs de TPC et TFC des extraits méthanoliques du fruit de *Pouteria campechiana* étaient inférieures d'environ 23 à 45% par rapport aux extraits éthanoliques. Le méthanol, quant à lui, est le meilleur solvant pour extraire les TPC des feuilles de *Daphne gnidium* où il s'est avéré plus efficace que la décoction et l'infusion (Dif et *al.*, 2015).

b) Teneur en flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3). La quantification des flavonoïdes a été déterminée en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire réalisée à partir d'une solution étalon de catéchine à différentes concentrations (annexe A), le calcul de la teneur en flavonoïdes dans les différents échantillons est exprimé en mg équivalent de catéchine par gramme de poids sec (mg EC/g).

Les valeurs des TFC varient entre $4,718 \pm 0,08$ mg EC / g Ps (extrait méthanolique) et $8,385 \pm 0,01$ mg EC / g Ps (extrait de décoction). Les résultats sont récapitulés dans le tableau 2 de l'annexe C et illustrés par la figure 36.

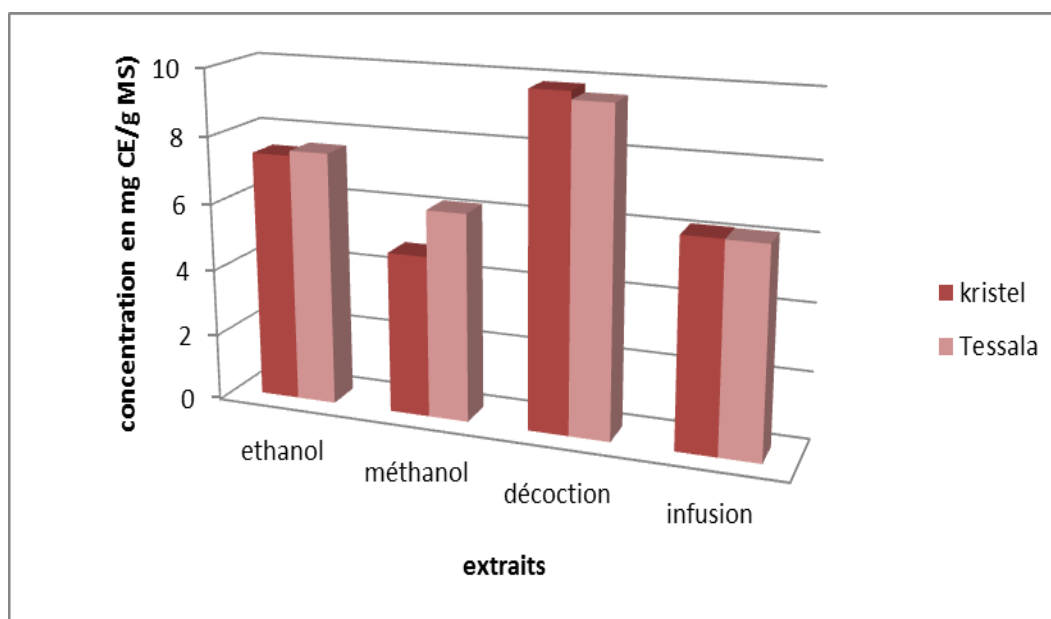


Figure 36 : teneur des flavonoïdes dans les différents extraits des deux régions.

Nos résultats montrent que la décoction est la meilleure méthode d'extraction des flavonoïdes. Dans ce même contexte, Yu-ling et *al*, (2011), indique que l'extraction par l'eau peut permettre plus de liaisons hydrogène avec les composées phénoliques que le méthanol. De plus, la supériorité du décocté par rapport au macérât aqueux suggère que la température jouerait un effet positif améliorant l'extraction (Bourgou et *al*., 2016)

La décoction donne une concentration de flavonoïdes plus élevée que d'autres extraits, ce qui est confirmé par les rapports de Martins et *al*, (2014) qui stipulent que l'extraction par décoction d'*Origanum vulgare* donne la plus grande concentration de flavonoïdes et de composés phénoliques totaux. De plus, Martins et *al*, (2015) ont rapporté que la décoction du thym cultivé présente la plus forte concentration de composés phénoliques (acides phénoliques ou flavonoïdes).

c) Teneur en tanins condensés

La quantification des tanins condensés a été effectuée par la méthode de la vanilline. Leur teneur a été obtenue à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec des concentrations croissantes de catéchine. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de catéchine par gramme d'extrait (mg EC/g PS).

Les teneurs en tanins condensés varient entre 0.15 ± 0.04 et 3.63 ± 0.27 mg EC/g (figure 37). La décoction réalisée avec des échantillons venant de la région de Tassala a présenté la teneur la plus élevée (3.63 ± 0.27 mg EC/g), suivie par l'infusion qui a donné 2.39 ± 0.03 mg EC/g, et vient ensuite la décoction et la macération avec de l'éthanol des échantillons de la

région de Kristel avec des valeurs respectives 2.9 ± 0.02 et 1.92 ± 0.34 mg EC/g. Par ailleurs, les extraits méthanolique et éthanolique présentatifs de la région de Tessala ont montré des teneurs de 0.89 ± 0.28 et 1.66 ± 0.61 mg EC/g, alors que la plus faible teneur a été notée dans les échantillons de la région de Kristel extraits par infusion (0.15 ± 0.04 mg EC/g).

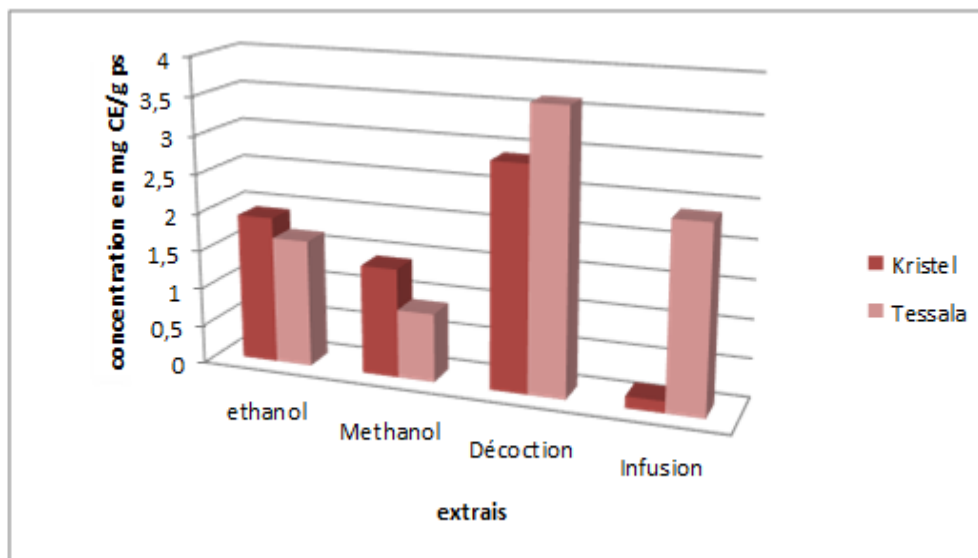


Figure 37 : teneurs en tanins condensés dans les différents extraits des deux régions.

Nos résultats corroborent ceux de Mahmoudi et *al*, (2012) qui indiquent que l'eau garantit l'obtention des concentrations très élevées des tanins condensés que l'éthanol et l'acétone pour la fleur d'artichaut. De même, Anokwuru et *al*, (2015) ont rapporté que le choix du solvant influence le taux des TC extraits à partir des organes de *Terminalia sericea*, ou ils sont enregistrés des taux plus élevés dans les extraits préparés avec de l'eau chaude que ceux faits par de l'eau froide, méthanol / acétone. De même, Dass-Amiour, (2009), indique que l'extraction des tanins est plus efficace avec l'eau et encore mieux avec l'eau chaude comparativement aux solvants organiques.

De nombreux autres chercheurs ont de même mis l'accent sur ce point en indiquant que l'eau est un bon solvant pour l'extraction de la plupart des tanins. Tatiya et *al*, (2011) ont signalé que la dilution des solvants organiques (l'acétone-eau et éthanol-eau) assure une meilleure extraction des tanins pour l'écorce de *Bridelia retusa*. Néanmoins, Dellal et *al*, (2016), ont indiqué que la teneur en TC est proportionnelle au degré de l'éthanol, en particulier au-delà de 60%.

VI-1-2-2- Teneur en composées phénolique (racines)

Les analyses quantitatives des phénols totaux sont déterminées à partir des équations linéaires de la courbe d'étalonnage (annexe B).

a) Teneur en phénols totaux

Les valeurs des phénols totaux varient de ($14,42 \pm 0.71$ à 17.78 ± 1.21 mg AGE/ g PS) pour la région de Kristel, et de ($12,98 \pm 0.22$ à 15.91 mg AGE/ g PS) pour la région de Tessala. (Figure 38)

L'infusion et l'extrait hydro-méthanolique des échantillons de la région de Kristel ont offert la quantité la plus élevée en phénols totaux (17.78 ± 1.21 ; 17.35 ± 0.12 mg AGE/ g PS), suivie par l'extrait hydro-méthanolique de la région de Tessala (15.91 ± 0.10 mg AGE/ g PS). D'autre part, la plus faible valeur a été obtenue par la décoction des échantillons récoltés au niveau de la région de Tessala (12.98 ± 0.22 mg AGE/ g PS)

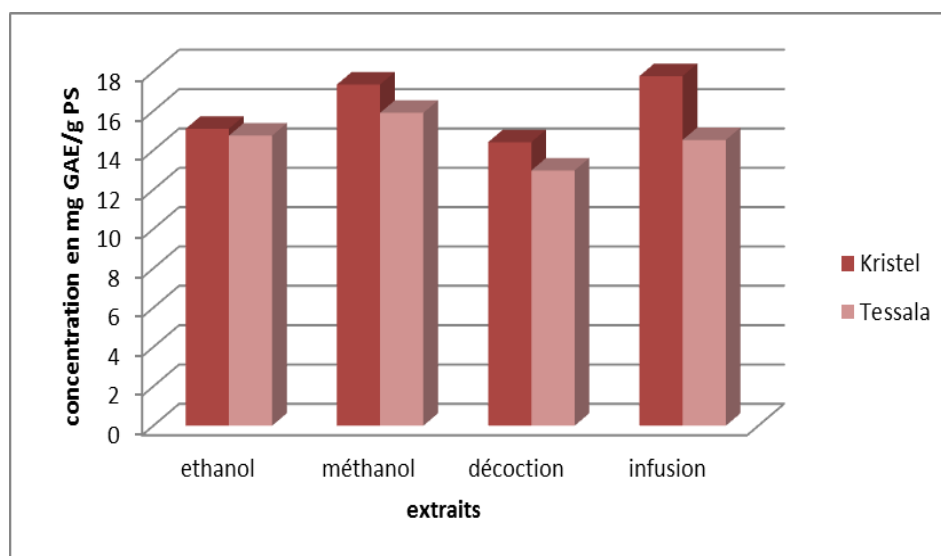


Figure 38 : teneurs en phénols totaux des racines d'*A.americana*

On remarque que la teneur des composés phénoliques varie d'une méthode à l'autre et d'une région à l'autre. De ce fait, l'accentuation de ces composés au niveau des plantes, est une réponse aux mécanismes d'évitement ou de tolérance des différents stress abiotiques, et biotiques. Les mécanismes d'évitement réduisent l'impact d'un stress bien qu'il soit présent dans l'environnement, tels que la sécheresse, les hautes températures, la salinité, le froid et le gel, ect...et favorisent entre autres, la synthèse de certains composés phytochimiques pour lutter contre ces stress (Mazliak, 1986).

b) Teneur en flavonoïdes totaux

Les teneurs en flavonoïdes totaux ont présenté des variations allant de 1.96 ± 0.09 à 5.71 ± 0.40 mg EC /g PS) (Figure 39). Les échantillons de la région de Kristel renferment les teneurs les plus élevée en flavonoïdes totaux suivant le mode d'extraction où des teneurs de (5.71 ± 0.40 mg EC /g PS), (4.25 ± 0.19 mg /g) et (3.46 ± 0.12 mg EC/g PS) ont été enregistré pour l'extrait hydro-éthanolique, hydro-méthanolique et d'infusion respectivement.

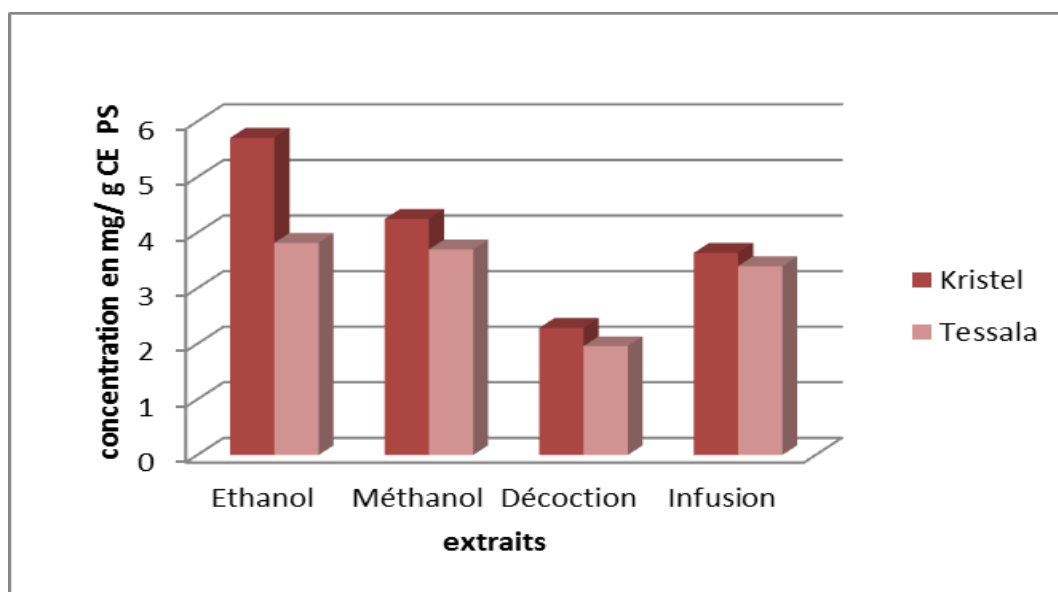


Figure 39 : teneurs en flavonoides totaux des racines d'*A.americana*

Nous constatons, que l'extrait hydro-éthanolique de la région de Kristel est l'extrait le plus riche en flavonoïdes totaux (5.71 ± 0.40 mg EC/g PS). Dans ce contexte, Do et *al.*, 2014, indiquent que, la combinaison de l'eau avec des solvants organiques tels que l'éthanol, l'acétone et le méthanol, peut faciliter l'extraction des substances chimiques qui sont solubles dans l'eau et / ou dans le solvant organique. En outre, l'addition de 30 % d'eau distillée à l'acétone ou à l'éthanol a augmenté de façon remarquable leurs pouvoirs extractants (Bourgou et *al.*, 2016).

Selon Mohammedi et Atik (2011), les solvants mixtes sont très efficaces à extraire les composés phénoliques. La supériorité des solvants mixtes seraient dues à l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques dans les extraits obtenus par des solvants mixtes comparés à ceux obtenus par des solvants purs (Trabelsi et *al.*, 2010).

c) Teneur en tanins condensés

Les teneurs en tanins condensés sont exprimées en mg EC/g PS. La concentration des tanins condensés varie de 1.27 ± 0.32 à 1.93 ± 0.06 mg EC/ g PS. Les résultats montrent que les teneurs varient selon la méthode d'extraction. Il a été trouvé que les extraits hydro-alcooliques des deux régions (Kristel et Tessala) renferment les valeurs les plus élevées en tanins condensés (1.93 ± 0.06 mg EC/g PS) pour l'extrait hydro-éthanolique, et (1.88 ± 0.03 mg EC/g PS) pour l'extrait hydro-méthanolique ; tandis que l'infusé et le décocté ont montré les teneurs les plus faibles.

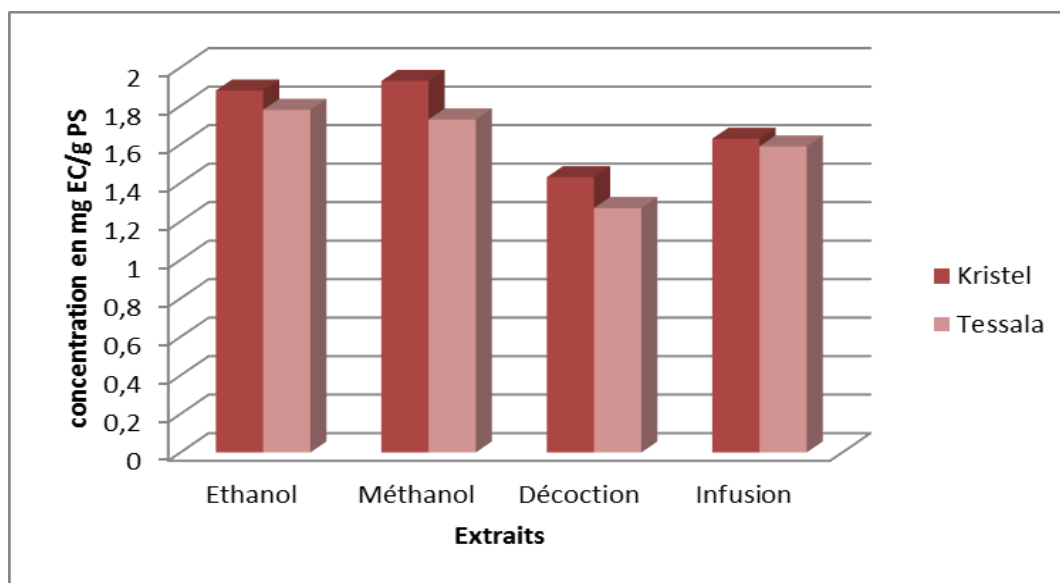


Figure 40 : teneur en tanins condensés des racines d'*A. americana*.

Les résultats illustrés par la figure 40 révèlent une influence significative du pouvoir d'extraction du solvant sur les teneurs en tanins condensés. Ce qui confirme que, le choix du solvant est l'un des facteurs qui influence l'estimation des tanins condensés, et il dépend habituellement du nombre des groupes hydroxylés présents sur la molécule (Salunkhe et *al.*, 1989).

VI-2-2- Résultats de l'extraction liquide- liquide

La préparation des extraits à partir des feuilles d'*Agave americana* a été effectuée par des solvants à polarité décroissante, il s'agit du chloroforme, d'acétate d'éthyle, et de n-butanol. Cette extraction nous a permis d'obtenir quatre fractions : fraction chloroformique, fraction d'acétate d'éthyle, fraction 1-butanol et fraction aqueuse. L'aspect et la couleur des extraits sont reportés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Aspect et couleur des différents extraits d'*Agave americana*.

Extrait	Aspect	Couleur
Chloroforme	Pâteux	Vert foncé
Acétate d'éthyle	Pâteux	Vert
n-butanol	Poudre	Couleur de miel
Aqueux	Pâte collante	Marron foncé

Les extraits aqueux, n-butanolique, chloroformique et d'acétate d'éthyle étaient préparés afin d'examiner le contenu phénolique totale, la concentration en flavonoïdes et l'activité antioxydante. Le rendement de l'extrait obtenu à partir de 100 g du matériel végétal sec a été mesuré pour chaque extrait (Tableau 6), et dont le plus élevé est celui de l'extrait aqueux de la région de Tassala (2.55 g), suivi par celui de la région de Kristel (2.22 g), et enfin l'extrait d'acétate d'éthyle de la région de Tassala avec le plus faible rendement (0.16 g). Il est signalé que les extraits obtenus sont de couleur et d'aspect différents.

Tableau 6 : rendements des différents extraits de 100 g des feuilles sèches d'*A. americana* après extraction et évaporation.

Extrait	Rendement %	
	Tessala	Kristel
Chloroforme	0.94	0.84
1-butanol	1.27	1.22
Acétate d'éthyle	0.16	0.41
Phase aqueuse	2.55	2.22

Au vu de ces résultats, nous remarquons que le rendement varie d'un solvant à l'autre. Selon hadj Salem (2009), les rendements d'extraction varient en fonction de la plante étudiée, la nature et des caractéristiques physico-chimique des solvants utilisés et notamment leur polarité (figure 41et 42).

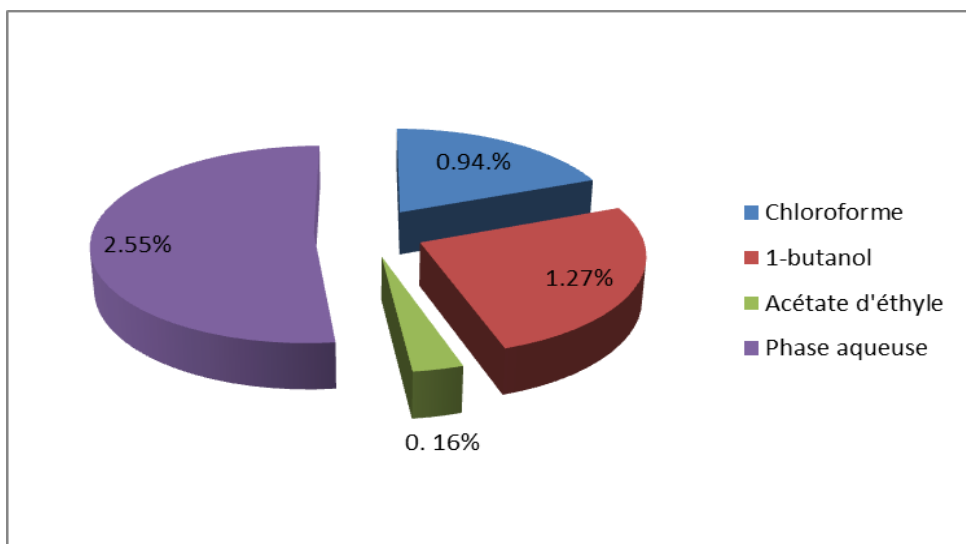


Figure 41 : rendement des extraits de l'agave de la région de Tessala

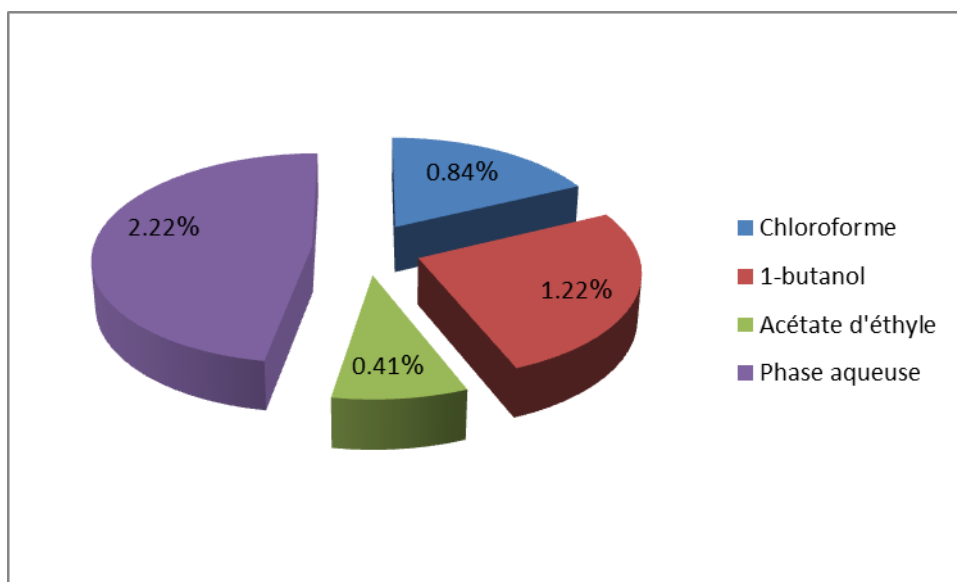


Figure42 : rendement des extraits de l'agave de la région de Kristel

VI-2-2-1-Résultats de l'étude quantitative

a) Teneur en phénols totaux

L'étude quantitative des fractions d'*Agave americana*, au moyen des dosages spectrophotométriques, permet la détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes.

Les résultats auxquels nous avons aboutis ont montré que la concentration des polyphénols totaux varie de 25.85 à 141.31mg AGE/100g Ms dans la région de kristel et de 24.33 à 162.82 mg AGE/100g Ms dans la région de Tessala.

L'extrait de chloroforme des deux régions (Kristel et Tessala) renferme le taux le plus élevé avec respectivement 162.82 ± 14.30 mg AGE/100g et 141 ± 8.19 mg AGE/100g, suivi par celui d'acétate d'éthyle de Kristel avec un taux de 102.62 mg AGE/100g, tandis que les teneurs les plus faibles sont enregistrées pour les extraits aqueux des deux régions Kristel et Tassala avec respectivement 25.85 ± 1.90 mg AGE/100g et 24.33 ± 0.66 mg AGE/100g (Tableau 7 et Figure 43).

Cette différence dans les teneurs peut s'expliquer par les conditions environnementales et climatiques, la période de collecte, les facteurs génétiques ainsi que les conditions expérimentales (Bouزيد, 2014).

Tableau 7 : moyenne et écart-type de la teneur globale des phénols totaux des extraits d'*Agave americana*.

Extrait	Teneur en phénols mg AGE /100g	
	Tessala	Kristel
Chloroforme	162.82 ± 14.30	141.31 ± 8.19
n-butanol	87.30 ± 2.89	68.89 ± 4.45
Acétate d'éthyle	44.17 ± 4.79	102.62 ± 8.53
	24.33 ± 0.66	25.85 ± 1.90

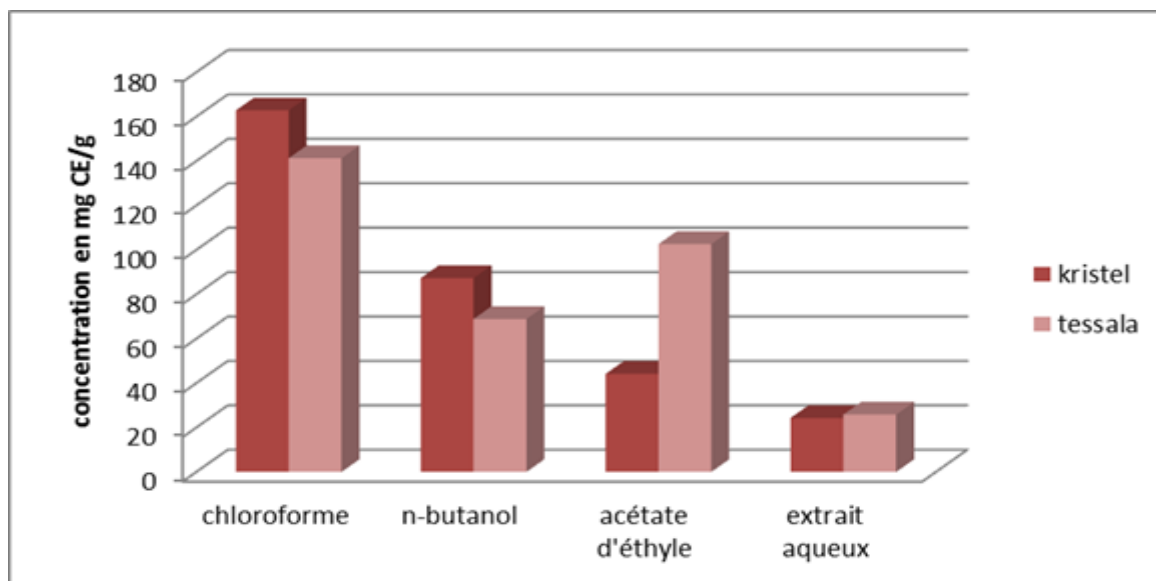


Figure 43 : teneurs en polyphénols des différents extraits d'*Agave americana*

Dans des études antérieures, le méthanol, l'éthanol, l'acétate d'éthyle, le chloroforme et le n-butanol ont été utilisés pour extraire les phénols à partir des produits frais (Tan et *al.*, 2012). La récupération des polyphénols à partir de la matière végétale est influencée par leur solubilité dans le solvant d'extraction, le type de solvant, le degré de polymérisation des composés phénoliques, et l'interaction des phénols avec d'autres constituants de la plante ainsi que la formation des complexes insolubles (Galvez et *al.*, 2005). En effet, les différences de polarité entre les solvants utilisés expliqueraient au moins d'une part les différences de rendement d'extraction et leur activité antioxydante.

Parallèlement, les études réalisées sur l'*Agave americana*, dans différentes régions du monde, ont indiqué que sa teneur en phénols totaux diffère de celle de l'*Agave americana* d'Algérie.

Dans le même contexte, Benhamissa et *al.*, (2012) ayant travaillé sur l'*Agave americana* de Tunisie ont noté des valeurs de 4.49 à 12.30 mg AGE/g PS pour les extraits méthanoliques. Ces résultats rejoignent ceux de Nasri et *al.*, (2012), avec des valeurs de 7.7 g AGE / kg PS pour les feuilles d'*Agave americana* de la même région.

Cependant, les résultats trouvés par Chrions et *al.* (2013) qui ont travaillé sur les feuilles D'*Agave americana* péruvienne indiquent une teneur de 9.9 ± 0.1 mg AGE/g PS.

Rizwan et *al.*, (2014), sur des feuilles d'*Agave attenuata* de provenance pakistanaise, ont révélé des teneurs de phénols totaux inférieures aux nôtres avec des valeurs comprises entre 10.65 ± 1.24 et 39.35 ± 0.69 mg AGE/100g Ms, ce qui renforce l'influence des conditions environnementales de la région sur ce paramètre.

Richter (1993) a signalé que la teneur et la composition chimique des différents métabolites secondaires varient en fonction d'un grand nombre de paramètres d'origine extrinsèque et intrinsèque et d'ordre technologique. Les facteurs extrinsèques sont particulièrement l'origine géographique et les conditions écologiques (climat et sol).

En outre, la polarité du solvant joue un rôle clé dans l'augmentation de la solubilité des composés phénolique (Naczki et Shahidi, 2006). Il est donc difficile de définir une procédure standard pour l'extraction des phénols des végétaux. Les solvants les moins polaires sont généralement considérés comme étant convenable pour l'extraction des phénols lipophiles et les solvants polaires sont utilisés pour des phénols hydrophiles (Alothman et *al.*, 2009).

b) Teneur en flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3), et la catéchine a été utilisée comme étalon. L'absorbance a été déterminée à une longueur d'onde de 510 nm. Les résultats obtenus sont représentés par une courbe d'étalonnage, dont l'équation est : $Y = 0,0108x + 0,258$ et $R^2 = 0,992$.

La quantité des flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de la catéchine par 100 gramme de matière sèche (mg EC/g Ms). À partir de la courbe d'étalonnage, les concentrations des flavonoïdes totaux calculées (TFC) varient entre $1,82 \pm 0,19$ et $34,32 \pm 3,31$ mg EC/ 100g Ms dans la région de Kristel et entre $1,24 \pm 0,07$ et $31,17 \pm 3,05$ mg EC /100g Ms dans la région de Tessala (tableau 8; figure 44).

Le rendement le plus élevé est obtenu dans l'extrait de chloroforme ($34,32 \pm 3,31$ mg EC / 100g Ms) de la région de Kristel, suivi par celui de l'acétate d'éthyle ($31,17 \pm 3,05$ mg EC / 100g Ms) de la même région, alors que la concentration la plus faible est obtenue pour la fraction aqueuse de la région de Tessala et Kristel avec respectivement $1,24 \pm 0,07$ et $1,82 \pm 0,19$ EC / 100g Ms)

Il existe une différence significative entre les méthodes d'extraction ($p < 0,001$), ce qui s'explique par la variabilité des solvants utilisés, notamment leurs effets sur la quantité extraite. Les résultats montrent que les valeurs les plus élevées sont enregistrées pour le chloroforme et l'acétate d'éthyle. Ce qui indique que l'extraction des flavonoïdes à l'aide d'un solvant modérément polaire est plus efficace qu'un solvant polaire (Bouazid et *al.*, 2014)

Des différences significatives des teneurs en flavonoïdes sont observées entre les différents endroits. Ceux-ci sont probablement dus aux divers facteurs tels que le type du sol, les conditions microclimatiques, la position géographique, le site, l'âge et le stade végétatif de la plante.

En comparant nos résultats avec ceux de Rizwan et *al*, (2015), qui ont travaillé sur les différentes fractions d'*Agave attenuata*, nous constatons que leurs valeurs sont très élevées par rapport aux nôtres avec des quantités allant de 75.8 ± 2.96 pour la fraction butanolique à 197.2 ± 4.96 pour la fraction d'acétate d'éthyle.

Tableau 8 : teneurs globales des flavonoïdes totaux des extraits d'*Agave americana* .

Extrait	Teneur en flavonoïdes mg EC/100g	
	Tessala	Kristel
Chloroforme	19.89±0.24	34.32±3.31
Acétate d'éthyle	31.17±3.05	30.04±2.27
n- butanol	10.36±1.40	15.42±8.53
Extrait aqueux	1.24±0.07	1.82±0.19

Chaque valeur est la moyenne de trois mesures $\pm$ écart-type.

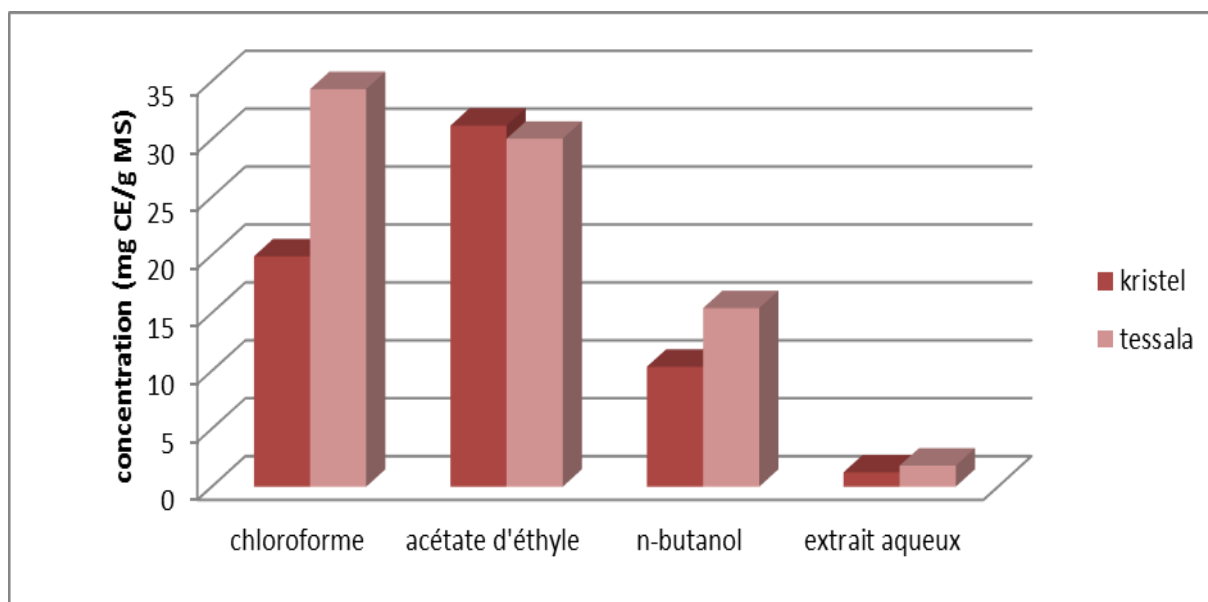


Figure 44 : teneurs des flavonoïdes des différents extraits d'*Agave americana*.

VI-3-Evaluation *in vitro* du pouvoir antioxydant

Dans la présente étude, le pouvoir antioxydants par le piégeage du radical libre DPPH est évalué pour les extraits obtenus par les différentes méthodes d'extraction (décoction, Infusion, macération a l'éthanol et méthanol) et ceux des différentes fractions obtenues à partir des solvants de polarité décroissante.

Le test DPPH est la méthode la plus ancienne pour évaluer l'activité antioxydante, basée sur la capacité du radical libre stable 2, 2-diphényl-1picrylhydrazyle à réagir avec des donneurs d'hydrogène comprenant des phénols. Pour cet effet, les extraits des végétaux sont utilisés pour le criblage des activités anti radicalaires (Yi et *al.* , 2008).

VI-3-1- évaluation du pouvoir antioxydant des feuilles d'*A. americana* par différentes méthodes d'extraction

L'activité de piégeage des radicaux libres DPPH de la décoction, d'infusion et des extraits hydro alcooliques est illustrée dans figure 45 à mesure qu'une valeur plus faible d'IC₅₀ indique une capacité antioxydante plus élevée.

La méthode du DPPH est basée sur la potentialité d'une molécule à céder ses atomes d'hydrogènes et/ou ses électrons au radical coloré 1,1-diphényl-2-picrylhydrazil. Lorsque ce dernier est réduit, son absorbance diminue, il passe en effet du violet ou jaune. La mesure de la disparition du radical se fait donc par spectrophotométrie à 515 nm (Laurençon, 2015).

Les résultats de ce test sont illustrés par la figure 45, qui montre que les IC₅₀ varient en fonction de la méthode d'extraction, du solvant et de la région étudiée.

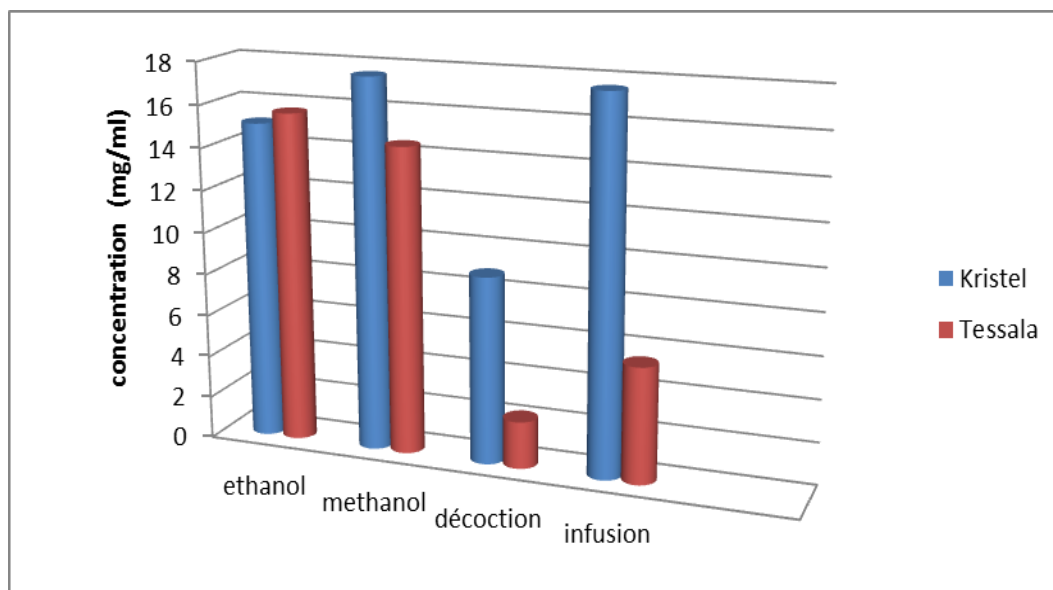


Figure 45 : pouvoir antioxydant des feuilles d'*A.americana* évalué par le test DPPH des différentes méthodes des deux régions.

La méthode de décoction a donné la plus faible valeur d'IC₅₀ (2.23 mg/ml.), suivie par l'infusion pour les échantillons en provenance de Tassala. Les valeurs les plus fortes d'IC₅₀ ont été enregistrées avec les macérats hydro-alcooliques (éthanol et méthanol pour les échantillons en provenance des deux régions d'étude). Dès lors, il s'est avéré possible de dire que la décoction assure un pouvoir antioxydant très important par rapport aux autres extraits, ce qui justifie d'ailleurs l'évaluation de l'effet anti-inflammatoire de ce dernier.

Nos résultats confirment ceux d'Albayrak et *al*, (2013), qui stipulent que la décoction est la méthode la plus efficace pour capter le radical libre DPPH par rapport aux extraits méthanoliques et d'infusion.

D'autre part, Dias et *al* (2013), qui ont travaillé sur *Achilia millefolium* ont indiqué que la décoction renferme le pouvoir antioxydant le plus élevé.

VI-3-2- évaluation du pouvoir antioxydant des racines d'*A. americana* par différentes méthodes d'extraction

Les résultats des IC_{50} obtenus des différents extraits méthanolique, éthanolique, de décoction et d'infusion sont très proches pour les quatre méthodes d'extraction (figure 46) ; en revanche, l'extrait hydro-méthanolique des deux régions renferme le pouvoir antioxydant le plus remarquable avec une concentration d'inhibition de (11.02 mg/ml ; 12.37 mg/ml), respectivement. Suivi par l'extrait hydro-éthanolique de la région de Kristel (14.4 mg/ml). Tandis que, la décoction faite par des échantillons de la région de Tessala a révélé le pouvoir antioxydant le plus faible (17.02 mg/ml).

La différence observée pour l'activité antioxydante des quatre extraits évalués des deux régions peut être attribuée à la différence de compositions chimique des composés bioactifs de la plante mais aussi à la teneur en ces derniers.

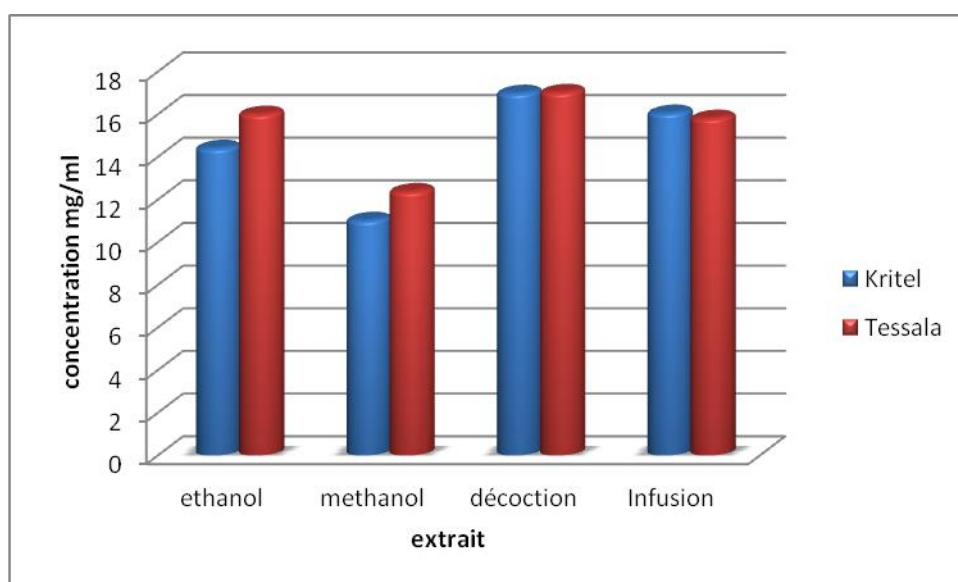


Figure 46: pouvoir antioxydant des racines d'*A.americana* évalué par le test DPPH des différentes méthodes des deux régions

VI-3-2- évaluation du pouvoir antioxydant des feuilles d'*A. americana* par différents solvants

Le pouvoir anti radicalaire des fractions vis-à-vis du radical DPPH est exprimé par la concentration inhibitrice à 50 % (IC_{50}) qui correspond à la concentration nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale du DPPH.

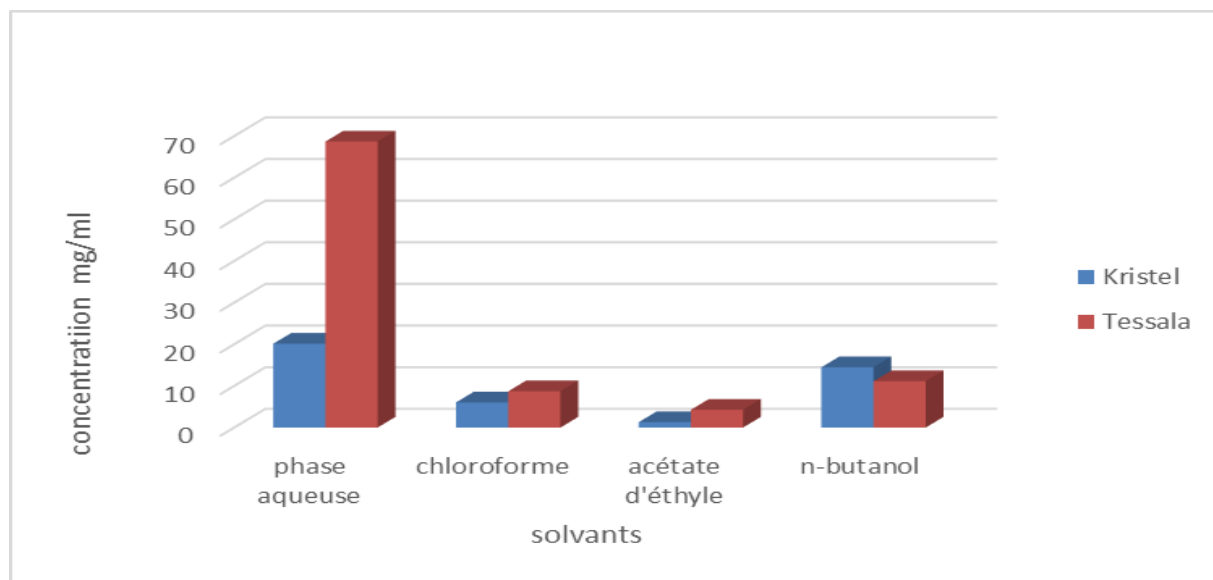


Figure 47 : Variation des concentrations d'inhibitions selon les solvants et les zones d'étude

Selon les résultats illustrés par la figure 47, les fractions obtenues des deux régions Kristel et Tessala renferment un pouvoir antioxydant remarquable mais plus faible par rapport aux standards de référence (acide ascorbique) avec une IC_{50} de 0.11 mg/ml.

Par contre, l'étude de l'effet antioxydant des fractions d'acétate d'éthyle, du n-butanol, du chloroforme et aqueuse, nous a permis de déduire que toutes ces fractions sont douées d'une activité anti-radicalaire importante à l'exception de la phase aqueuse.

La fraction d'acétate d'éthyle a montré la plus importante capacité à piéger le radical libre DPPH avec une $IC_{50}=1.30$ mg/ml, suivie par la fraction d'acétate d'éthyle de Tessala ($IC_{50}=4.28$ mg/ml).

La différence dans l'activité des extraits de la même espèce peut être due à la différence de teneur en composés phénolique, au profil chimique de ces substances bioactives, au solvant d'extraction ainsi qu'aux facteurs environnementaux.

D'autre part, la position de la double liaison dans le cycle C ainsi que le nombre ou la position des groupements hydroxyles (OH), sont les éléments les plus importants qui expliqueraient l'augmentation ou la diminution de l'activité anti-radicalaire (Marfak, 2003).

La forte activité anti radicalaire signalée pour toutes les fractions est attribués aux fortes teneurs en composés phénoliques, notamment les flavonoïdes représentés principalement par la fisétine, silybine, naringine, apéginine, la taxifoline et la catéchine.

Erol *et al.*, (2010), rapporte que les polyphénols sont des donneurs efficaces d'atome d'hydrogène au radical DPPH en raison de leurs structures chimiques idéales.

D'autres études montrent que les flavonoïdes sont aussi des bons inhibiteurs d'enzymes responsables de la production des radicaux libres (Landofli *et al.*, 1984 et Cos *et al.*, 1998).

VI-4-activité in vivo des extraits décoctés et hydro-éthanolique des feuilles *A.americana*

Dans l'optique d'évaluer l'effet anti-inflammatoire des deux extraits décoctés et hydro-éthanoliques, nous avons provoqué un œdème par une injection de la carragénine au niveau de la région sub-plantaire de la patte.

Les différences des épaisseurs de l'œdème entre la patte avant et après l'injection des animaux traités sont regroupées dans le tableau 9.

Tableau 9 : effets des extraits d'*A. americana* et du médicament sur l'épaisseur de l'œdème en fonction du temps

Traitement	Doses (mg/kg pc)	Evolution des épaisseurs de l'œdème (mm)						
		Avant traitemen t	1h	2h	3h	4h	5h	6h
Témoin (Nacl 0.9%)		3.052±	5.794	5.236	6.834	7.266	7.724	8.148
			±	±	±	±	±	±
	0.09		0.17	0.12	0.11	0.23	0.29	0.26
Indométacin e	10mg/kg	3.042±	4.144	4.996	5.236	4.14±	4.994	4.232
			±	±	±		±	±
	0.45		0.45	0.24	0.15	0.28	0.58	0.29
Piroxicam	10mg/kg	2.912±	5.124	5.474	4.952	4.748	4.542	3.81±
			±	±	±	±	±	
	0.08		0.16	0.30	0.37	0.45	0.47	0.45
EDAA	200mg/k	2.946±	4.516	3.754	3.66±	4.682	5.24±	5.888
	g		±	±		±		±
	0.22		0.41	0.45	0.32	0.33	0.44	0.26
EEAA	200mg/k	2.844±	3.952	3.212	3.844	3.452	3.774	4.44±
	g		±	±	±	±	±	
	0.12		0.29	0.21	0.47	0.23	0.56	0.18

Les épaisseurs de l'œdème induit par la carragénine augmentent en fonction du temps. Les résultats sont récapitulés dans le tableau 9.

La carragénine est un mucopolysaccharide sulfaté provenant d'une Rhodophyceae (Dirosa, 1972). L'injection de cette substance provoque la libération des médiateurs chimiques qui sont responsable du processus inflammatoire.

Le tableau 9 montre l'effet de l'indométacine, de piroxicam (anti-inflammatoires non stéroïdiens), et des deux extraits hydro-éthanolique et décocté sur l'évolution de l'œdème.

Après l'injection de la carragénine à 2% dans la patte arrière droite du rat, la circonférence de cette dernière passe de 3.052 ± 0.09 à 5.794 ± 0.17 après 1h et atteint son maximum au bout de la sixième heure avec une valeur de 8.148 ± 0.26 .

L'évaluation de l'effet anti-inflammatoire est réalisée par le test de la carragénine. Cet agent pathogène induit au niveau de la patte du rat un œdème considéré comme un signe caractéristique de l'inflammation et un paramètre très important dans l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de plusieurs composés (Morris, 2003). Cette technique a été utilisée en raison de sa simplicité d'exécution, de sa rapidité d'induction, des symptômes caractéristiques de l'inflammation (développement de l'œdème dans l'heure qui suit l'injection avec un effet maximal au bout de cinq heures) et également en raison de sa reproductibilité (Chatter et *al.*, 2012).

En effet, l'injection de la carragénine provoque la libération de plusieurs médiateurs chimiques qui sont responsables du processus inflammatoire (Mansour, 2012). Cette réponse inflammatoire est biphasique dont la phase initiale, qui dure environ une heure, est due à la libération de l'histamine et de la sérotonine, alors que la bradykinine est libérée au cours de la deuxième phase (1,5– 3 heures), et la biosynthèse des prostaglandines intervient au-delà de la troisième heure (Wantana et *al.*, 2009). Ces médiateurs augmentent la perméabilité des capillaires de la région. En conséquence, l'exsudat s'échappe de la circulation sanguine vers l'espace interstitiel. Cet exsudat est la cause de l'œdème localisé, qui à son tour, comprime les terminaisons nerveuses et détermine ainsi une sensation de douleur (Devulder et *al.*, 2002 et Rousselet et *al.*, 2005).

L'administration de l'indométacine ou du piroxicam à une dose de 10mg/kg induit une diminution remarquable du diamètre de la patte du rat. L'épaisseur de l'œdème passe de 4.144 mm à 4.232 pour l'indométacine, et de 5.132 mm à 3.81. Ces diminutions de l'œdème sont importantes en comparaison avec le groupe témoin (NaCl 0.9%).

Après ceci, l'administration de l'extrait décocté et hydro-éthanolique à une dose de 200g/kg PC par voie orale a induit une diminution significative de l'épaisseur de l'œdème après la première heure du traitement. Elle passe ensuite de 4.516 mm à 5.888 mm, et de 3.952 mm à 4.44 mm pour les deux extraits respectivement. Ces résultats sont fortement significatifs ($p < 0,0001$) par rapport au lot témoin (annexe C).

Si on procède à une comparaison entre les deux extraits de la plante étudié, on note que l'extrait hydro-éthanolique possède un effet anti-inflammatoire plus efficace que celui de la décoction indiquant ainsi, que les anti-inflammatoires présents dans les feuilles d'*Agave americana* ont un caractère modérément polaire.

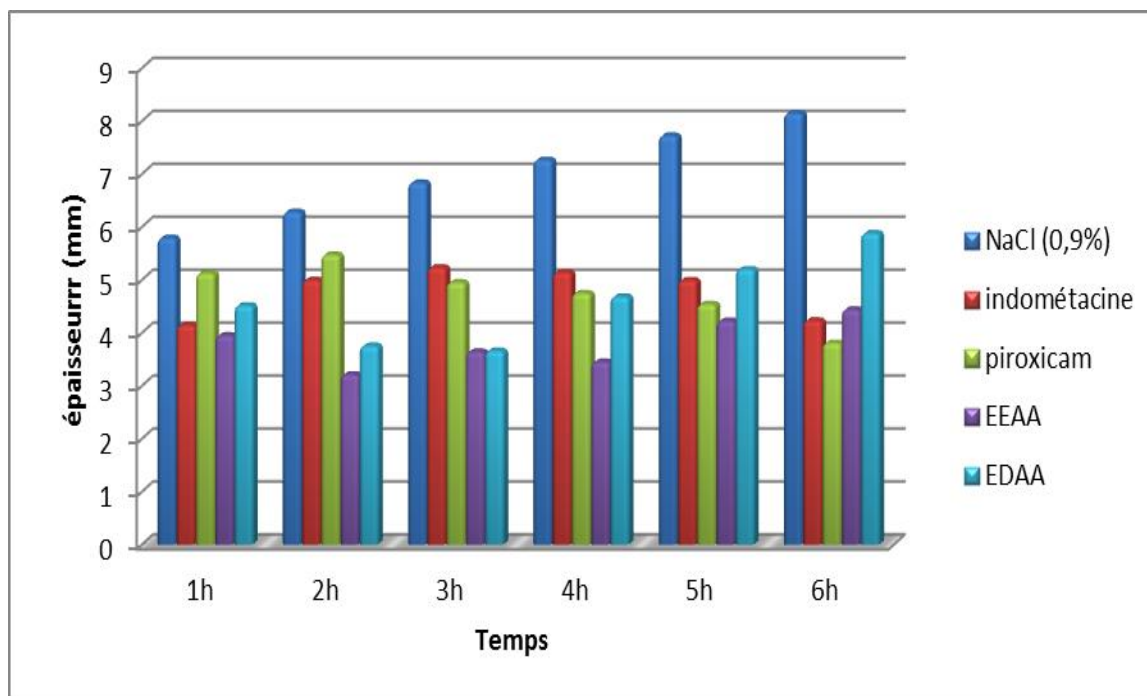


Figure 48 : Effet des extraits hydro-éthanolique et décocté sur l'épaisseur de l'œdème induit par la carragénine (mm).

Nos résultats, montre que l'injection de la carragénine entraîne une augmentation du volume de l'œdème de tous les lots traités. De plus, l'administration orale de piroxicam et de l'indométacine à une dose de (10mg/kg PC) entraîne une diminution significative de l'œdème au cours de la troisième, quatrième, cinquième et sixième heure avec un pourcentage d'inhibition de (46.06%, 56,23%, 65.11%, et 82.37%) pour le piroxicam et de (41,98%, 50.21%, 58.21%, et de 76.64%) pour l'indométacine.

En outre, les pourcentages d'inhibition de l'œdème des lots traités par les extraits hydro-éthanolique et décoctés des feuilles d'*A.americana* à une dose de (200mg/kg PC) montrent que ces extraits possèdent une activité anti-inflammatoire importante. A la première heure, l'extrait hydro-éthanolique et décocté montrent respectivement un pourcentage d'inhibition de (61.65%, et 42.65%). Par ailleurs, aucune inhibition n'a été constatée chez les rats ayant reçus uniquement l'eau physiologique.

De plus, l'extrait hydro-éthanolique s'est révélé plus actif que l'extrait décocté et des standards, et il agit entre la deuxième et la quatrième heure avec des pourcentages d'inhibition allant de 87 à 95%. L'inhibition est restée presque constante jusqu'à la quatrième heure (87%), puis l'effet inhibiteur a diminué à la sixième heure (50%). Ces résultats concordent ceux rapportés par peana et *al*, (1992), indiquent que, les extraits totaux de sapogenine d'*agave americana* ont montré une plus grande activité inhibitrice entre la première et la troisième heure du test, avec des pourcentages d'inhibition de 70 à 100%, en fonction des différentes doses, puis l'effet inhibiteur a diminué, montrant des valeurs comprises entre 32% et 52% à la cinquième heure.

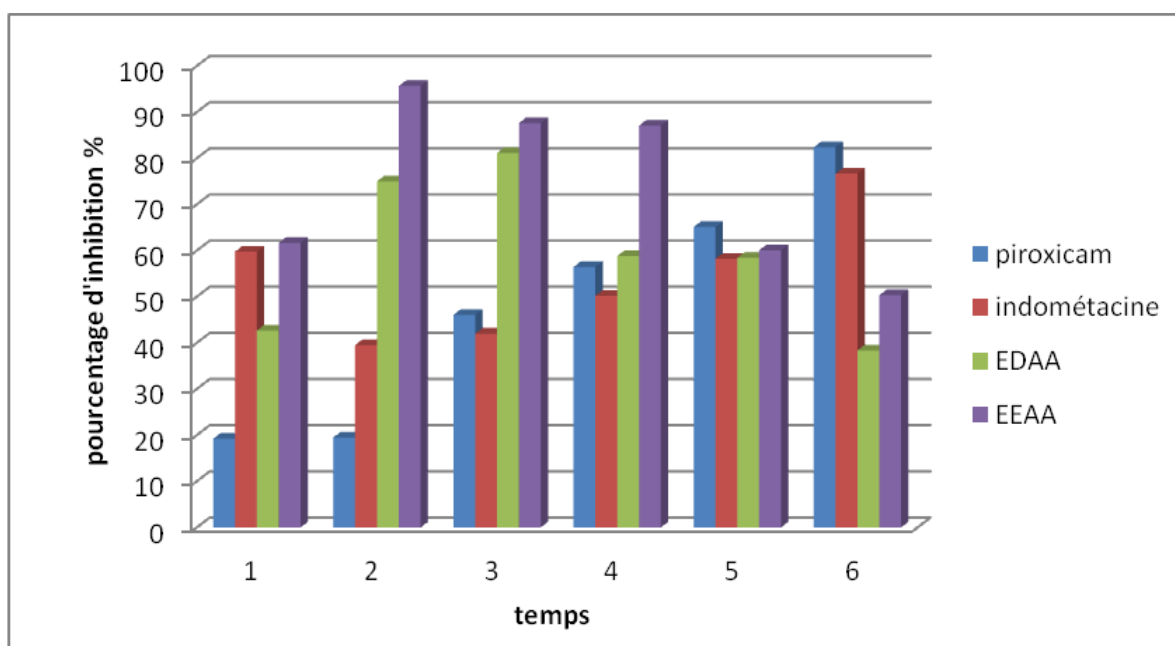


Figure49 : pourcentage d'inhibition de l'inflammation induit par la carragénine

Les plantes du genre *Agave* ont été utilisées pour traiter les douleurs et l'inflammation. Ces propriétés anti-inflammatoires sont attribuées aux saponines stéroïdiennes présentes comme principaux constituant dans les extraits de ces plantes. Dans ce même contexte, La cantalasaponine-1 purifiée à partir de l'extrait d'*A. americana* testé pour son effet anti-inflammatoire a montré une inhibition de 90% de l'œdème de l'oreille à une Dose de 2,0 mg par oreille (Monterrosas-Brisson et *al.*, 2013).

D'autre part, L'efficacité remarquable de l'extrait hydro-éthanolique d'*agave americana* pourrait être liée au son profil chimique, particulièrement à la présence des composés phénoliques et des saponines. Parmi ces composés se trouvent les flavonoïdes qui sont capables d'inhiber les oxydants libérés par les leucocytes et d'autres phagocytes dans la zone inflammatoire entretenant ainsi l'inflammation.

Nombreuses études ont signalé que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (Gallego et *al.*, 2007), alors que d'autres flavonoïdes sont capables d'inhiber l'histamine (Kim et *al.*, 2004).

En effet, les flavones (apigénine, lutéoline et 7,3',4' hydroxyflavone) et les flavonols (kaempférol, quercétine et myricétine) inhibent la prolifération des lymphocytes T. En revanche, l'analyse de l'expression des gènes et de la sécrétion de plusieurs cytokines dans des mastocytes humains (cellules HMC-1) a révélé que la fisétine, la quercétine et la rutine diminuaient l'expression et la production du TNF- α , de l'IL-1- β , de l'IL-6 et de l'IL-8. La myricétine, quant à elle, a diminué celles du TNF- α et de l'IL-6 mais pas celles de l'IL-1- β ou de l'IL-8. Enfin la fisétine, la myricétine et la rutine ont supprimé l'activation de NF-kappaB (Park et *al.* 2008).

VI-3-1- L'indentification des molécules par Chromatographie à haute performance en phase liquide (HPLC)

En se basant sur les résultats obtenus, une analyse par HPLC a été effectuée pour définir le contenu qualitatif des acides phénoliques dans les fractions d'*A.americana*. Les Chromatogrammes d'HPLC des standards et de différents extraits sont illustrés par les figures (51 et 52). La Naringine, catéchine, apiginine, Fisetine, Taxifoline ont été identifiés dans les extraits étudiés en comparant les spectres avec ceux des standards (Figure 50).

Les résultats de l'analyse HPLC qualitative montrent que cinq molécules sont présentes. L'apiginine et la Taxifoline sont présentes dans l'extrait chloroformique, la catéchine et la fisetine sont présentes dans l'extrait du n-butanol de Kristel et la Naringine est identifiée dans l'extrait d'acétate de la région de Kristel et de Tessala. Tandis que, pour la fraction chloroformique et butanolique ces composées flavonoïdiques n'ont pas été détectées (Tableau10). Les pics 1, 2, 3, 4 et 5 ont été positivement identifiés comme respectivement naringine, catéchine, Apiginine, Fisetine et taxifoline, en comparant le temps de rétention, l'absorption et les spectres de masse avec celle des standards.

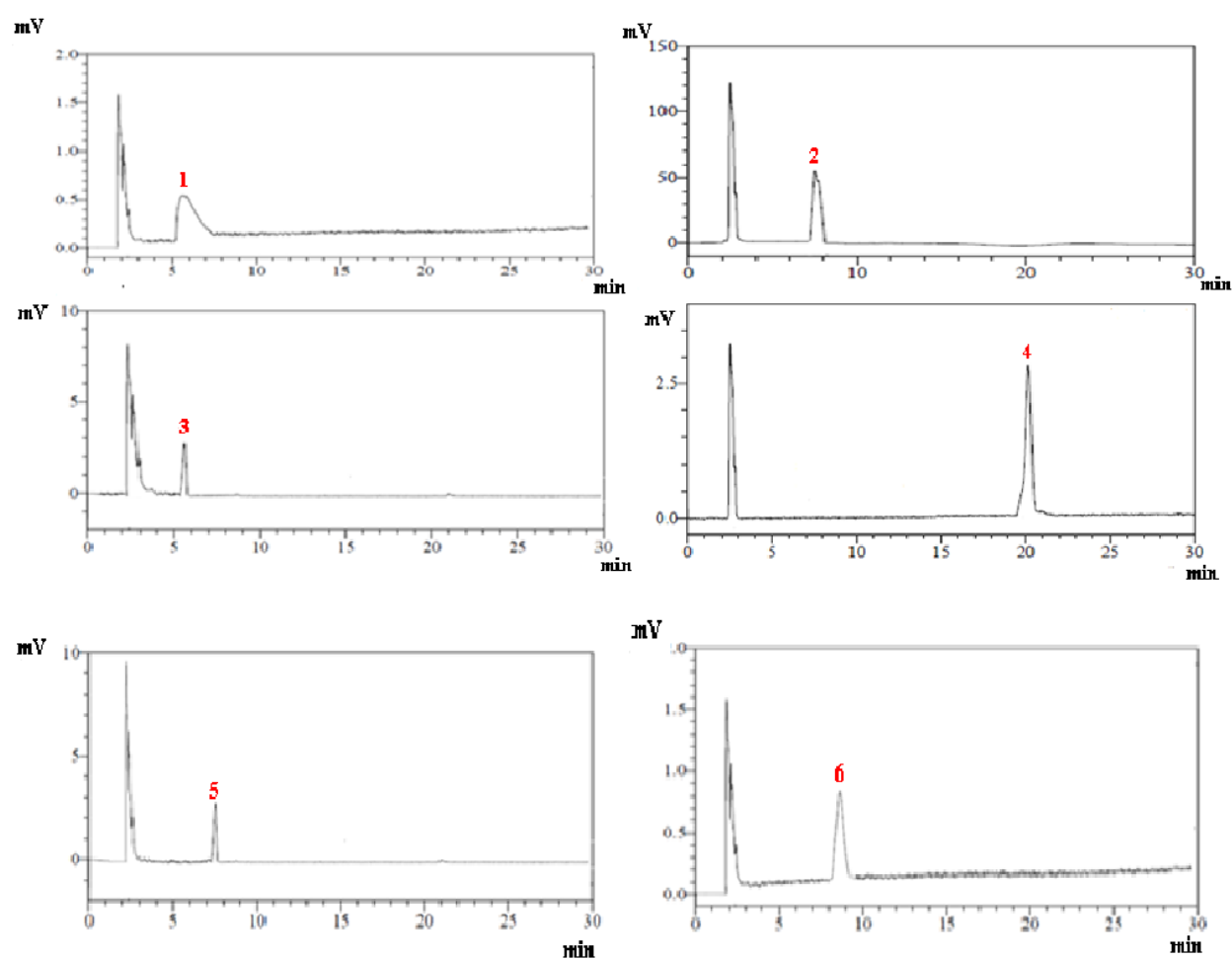
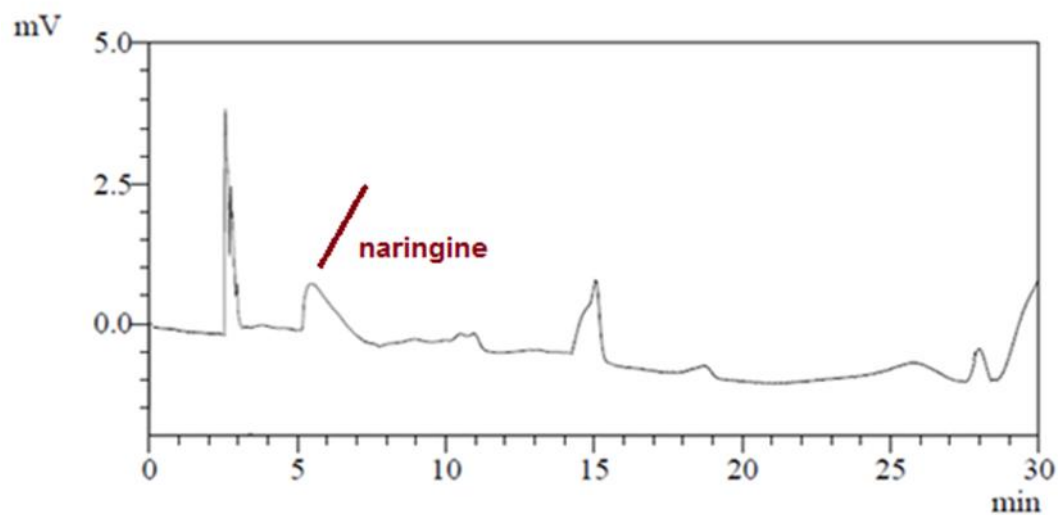
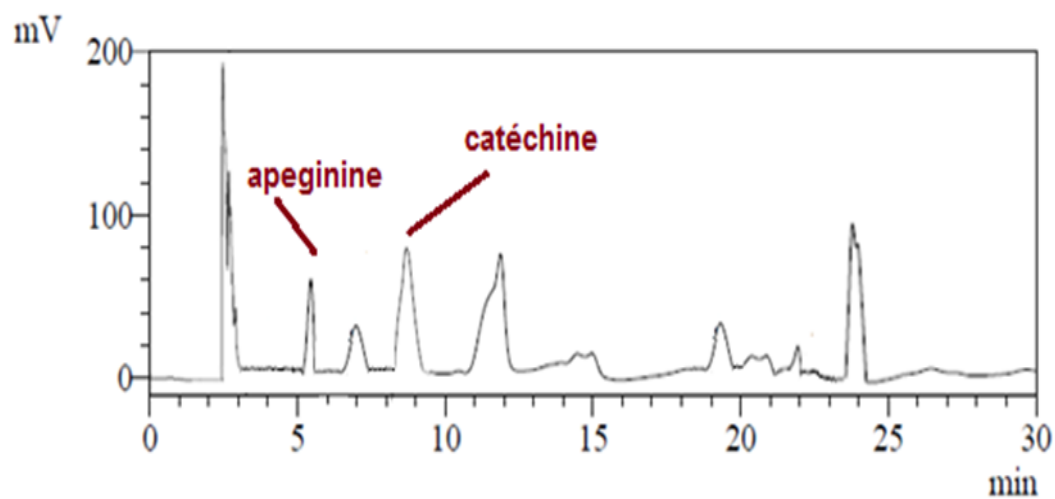


Figure 50: chromatogrames d'HPLC des standards à 280 nm
Piques: 1- Naringine; 2- Catéchine; 3- Apigénine; 4- Fisetine; 5- Taxifoline;
6- Silybine.



Fraction d'acétate d'éthyle



Fraction chloroforme

Fraction n-butanol

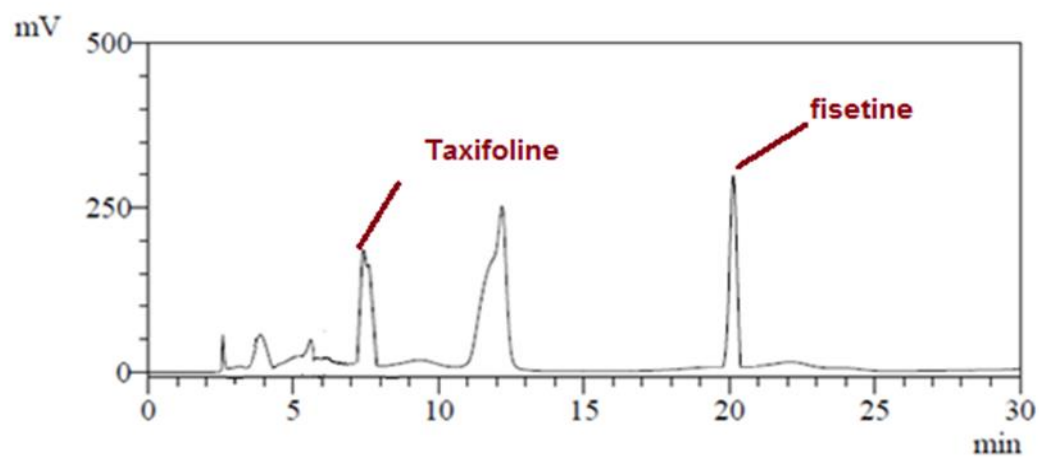
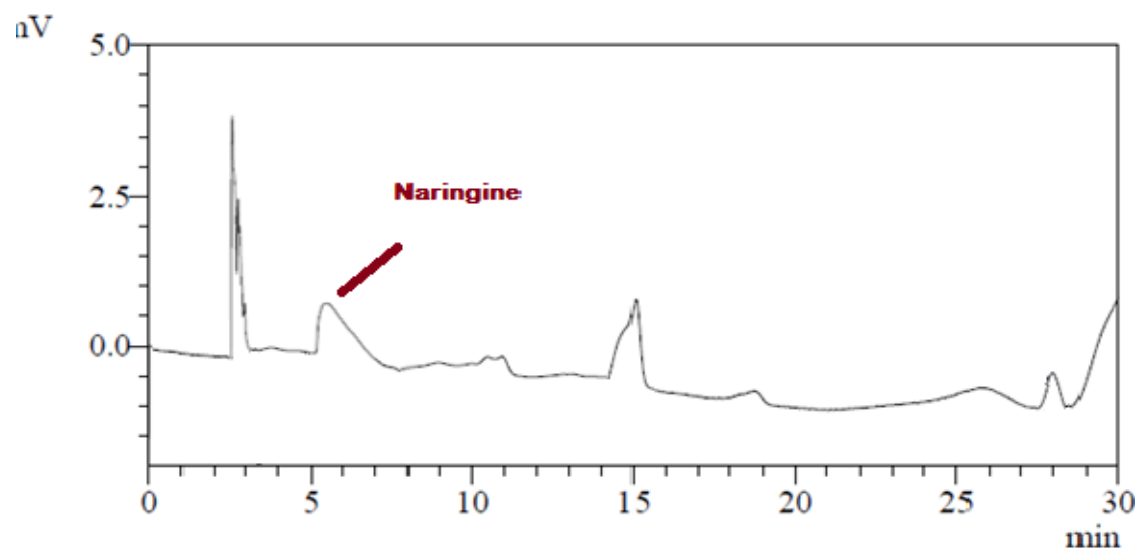
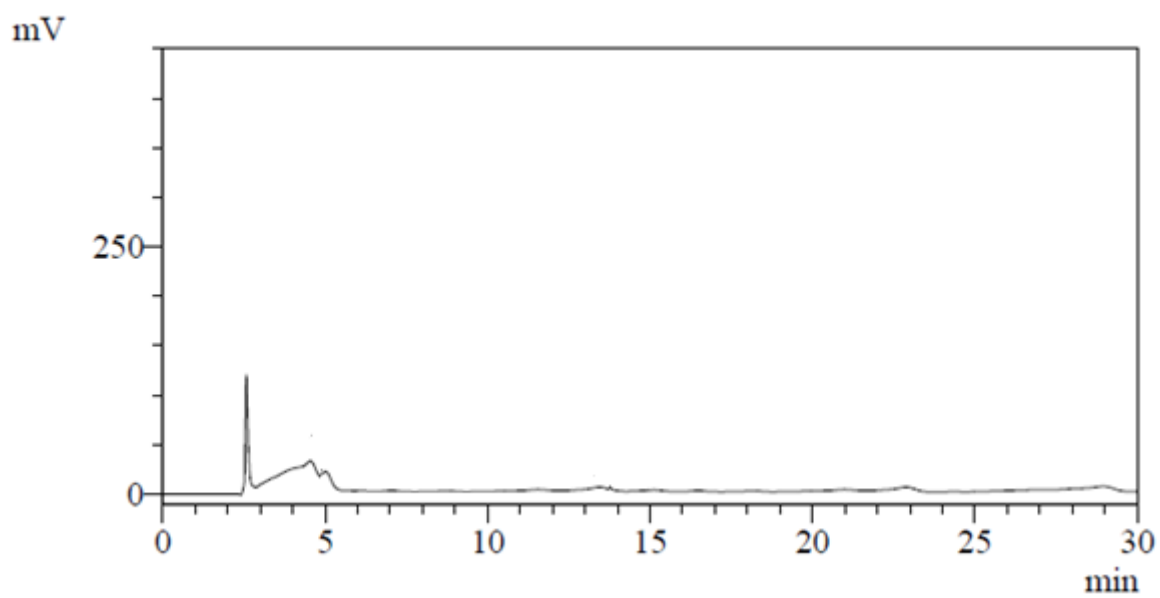


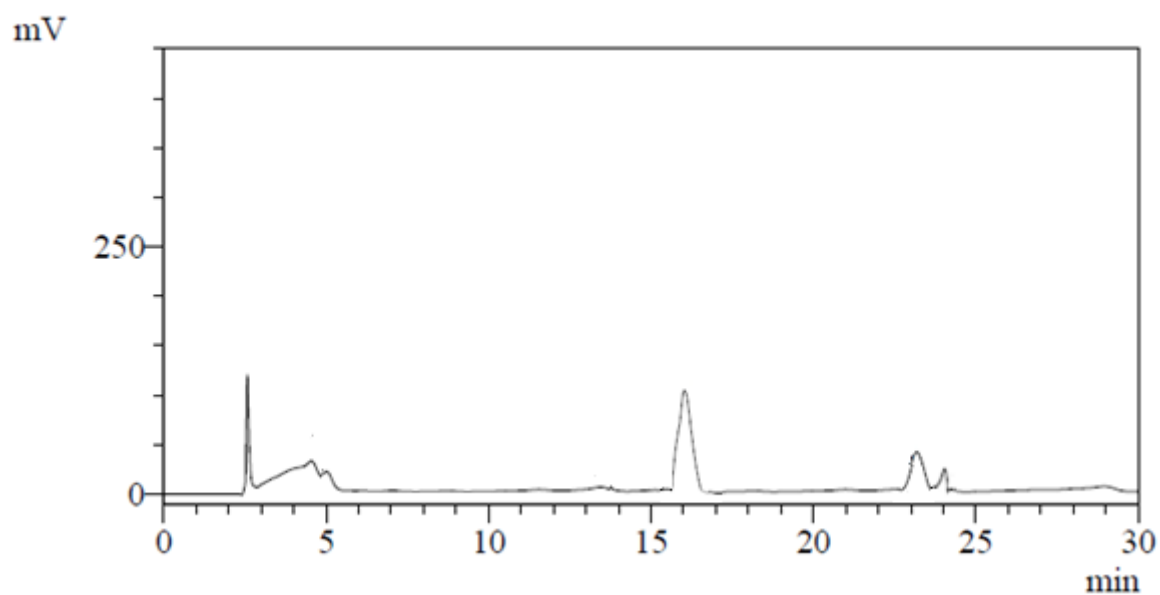
Figure 51: chromatogrammes d'HPLC des extraits des feuilles d'*A.americana* de la région de Kristel à 280 nm.



Fraction d'acétate d'éthyle



Fraction n- butanol

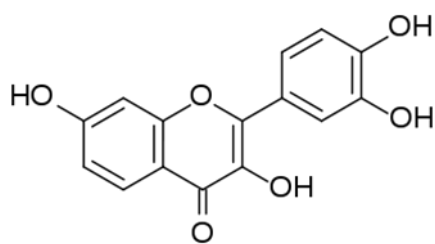
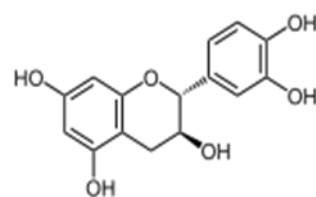
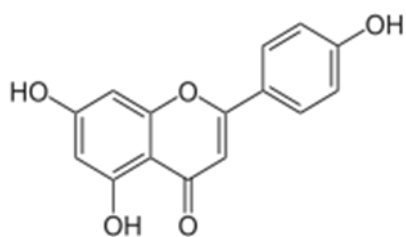
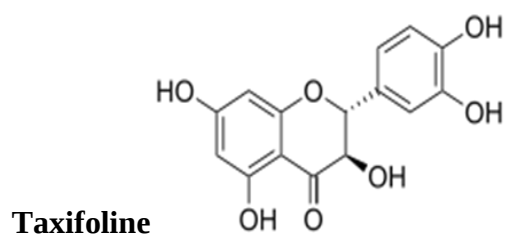
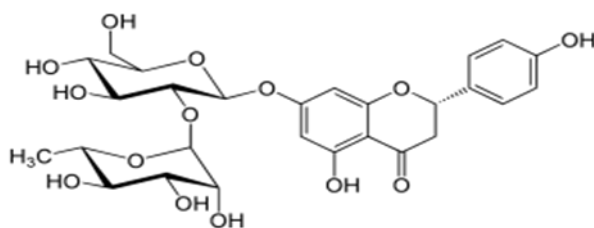


Fraction chloroforme

Figure 52: chromatogrames d'HPLC des extraits des feuilles d'*A.americana* de la région de Tessala à 280 nm.

Tableau 10 : composés des différentes fractions flavonoïques d'*A. americana* identifiés par HPLC

<i>Extrait</i>	Flavonoids	
	Kristel	Tessala
<i>Chloroforme</i>	Apéginine - catéchine	/
<i>N butanol</i>	Fisetine- Taxifoline	/
<i>Acetate d'éthyle</i>	Naringine	Naringine

**Fiséline****Catéchine****Apégénine****Taxifoline****Naringine****Figure 53 :** structure de base des flavonoïdes identifiés dans les feuilles d'*agave americana* .

De nombreuses études ont montré la présence des composés flavonoïdiques dans les tissus du genre *Agave*. Subramanian et al (1970), ont signalé la présence de deux flavonols (kaempferol-3-O-glucoside and kaempferol-3-O-rutinoside) dans les fleurs d'*Agave Americana*, et Pamar et al, (1992), ont indiqué la présence d'un complexe flavanone (5,7-dihydroxy-6,5'-dimethoxy-3', 4'-methylenedioxiflavanone) nommé agamanone.

D'autres études menée par Almaraz-Abarca et al, (2013), ont montré 24 phénols formant les profils chimique des deux espèces *A. striata* et *A. lechuguilla*, dont, Sept flavonols (majoritairement des quercétine-3-O-glycosides, mais également un kaempferol-3-O-glycoside), Outre une flavone; Sept dihydroflavonoïdes; et Cinq acides phénoliques ont été identifiés pour *A. lechuguilla*. De même, pour *A. striata*, 14 flavonols (étant aussi la quercétine- 3-O-glycosides, mais également un kaempferol-3-O-glycoside, et un herbacetine-3-O-glycoside).

Nous constatons que les composés identifiés dans les feuilles d'*Agave americana* originaire d'Algérie ne sont pas identiques à celles identifiés par d'autres chercheurs. Cette différence peut s'expliquer par l'origines géographiques, les méthodes d'extraction utilisées ou encore par la période de la récolte (Dif, 2014).

Conclusion

Conclusion générale

Notre étude a porté sur la recherche des nouvelles molécules bioactifs et l'évaluation des activités biologiques de l'agave americana L de l'Ouest algérien.

Nous avons traité les deux organes feuilles et racines pour le criblage phytochimique et le dosage des composées phénoliques.

Notre choix des organes étudiés a été basé sur l'usage traditionnel de ces deux parties de la plante à traiter les infections et surtout les plaies et l'inflammation.

Le screening phytochimique des deux organes traités a révélé la présence de diverses familles chimiques inclus : les terpènes, les saponines, les phénols simples, les tanins, et les flavonoïdes.

D'autre part, la quantification des composés phénoliques des différents extraits, a été effectué par les méthodes spectrophotométriques ; Le dosage des composés phénoliques a été réalisé par différent méthode ; macération, décoction et infusion. Les teneurs en phénols totaux estimé par le réactif de Folin-ciocalteu est comprise entre 43,86 à 62,44 mg AGE / g PS pour les feuilles et de 12.98 ± 0.22 à 17.78 ± 1.21 mg AGE / g PS pour les racines.

Le dosage des flavonoïdes a déterminé en utilisant le test de trichlorure d'aluminium, les teneurs des flavonoïdes exprimés en mg EC/g PS, varies de $4,718 \pm 0,08$ à $8,385 \pm 0,01$ pour les feuilles et de 1.99 ± 0.09 à 5.71 ± 0.40 pour les racines. En révélant que l'extrait de décoction des feuilles des deux régions Kristel et Tessala enregistre la valeur la plus élevé, suivie par l'extrait hydro-éthanolique de la région de Kristel. Tandis que l'extrait hydro-éthanolique de la région de Kristel renferme les teneurs les plus notables pour les racines.

Les tanins condensés sont estimés par la méthode de la vanilline dans un milieu acide, et les teneurs varient de 0.15 ± 0.04 à 3.63 ± 0.27 mg EC/g PS pour les feuilles. la décoction de la région de Tessala enregistre la teneur la plus élevé (3.63 ± 0.27 mg EC/g PS), suivie par l'infusion (2.39 ± 0.03 mg EC/g PS), puis par la décoction et l'éthanol de la région de Kristel avec des teneurs de (2.9 ± 0.02 ; 1.92 ± 0.34 mg EC/g PS) respectivement, suivie par le méthanol et l'éthanol de la région de Tessala avec des teneurs de (0.89 ± 0.28 ; 1.66 ± 0.61 mg EC/g PS), et en dernier, l'infusion de la région de Kristel referme les quantités les plus faible (0.15 ± 0.04 mg EC/g PS). Pour les racines, les valeurs des tanins condensées varies de 1.27 ± 0.32 à 1.93 ± 0.06 mg EC/g PS

Conclusion générale

On a conclu que la décoction est la meilleure méthode d'extraction des composés phénoliques pour les feuilles d'*agave americana*. Tandis que la macération par des solvants hydro-alcooliques est la meilleure méthode pour extraire les composés phénoliques des racines.

L'extraction liquide-liquide par des solvants a polarité décroissante, nous a permis d'obtenir quatre fractions (fraction chloroforme, fraction d'acétate d'éthyle, fraction butanolique et fraction aqueuse). Le rendement de chaque fraction a été calculé par rapport au poids sec de matière sèche utilisée en premier (100g). La fraction aqueuse enregistre le rendement le plus élevée suivie par fraction butanolique. Tandis que, la fraction d'acétate révèle le rendement le plus faible.

Le dosage quantitatif des phénols totaux et des flavonoïdes a été réalisé pour quantifier les composées phénoliques des quatre fractions obtenues. On a suivi la même procédure utilisée auparavant pour les extraits obtenus par différentes méthodes.

Les teneurs en phénols totaux varient de 25.85 à 141.31mg AGE/100g Ms dans la région de Kristel et de 24.33 à 162.82 mg AGE/100g Ms dans la région de Tessala. La fraction chloroformique des deux régions (Kristel et Tessala) renferme le taux le plus remarquable 162.82 ± 14.30 mg AGE/100g – 141 ± 8.19 mg AGE/100g respectivement. Suivi par fraction d'acétate d'éthyle de Kristel avec un taux de 102.62 mg AGE/100g, tandis que les teneurs les plus faible a été enregistrée pour les fractions aqueuse des deux régions Kristel et Tessala avec un taux de 25.85 ± 1.90 mg AGE/100g – 24.33 ± 0.66 mg AGE/100g, respectivement.

Les quantités des flavonoïdes ont été exprimées en milligramme d'équivalent de la catéchine par 100 gramme de matière sèche (mg EC/100g Ms). Le rendement le plus élevé a été obtenu par l'extrait de chloroforme ($34,32 \pm 3,31$ mg EC / 100g Ms) de la région de Kristel, suivi de l'acétate d'éthyle ($31,17 \pm 3,05$ mg EC/ 100g Ms) de la région de Kristel, alors que la concentration la plus basse a été obtenue par la fraction aqueuse ($1,24 \pm 0,07$; $1,82 \pm 0,19$ EC / 100g Ms) de la région de Tessala et Kristel respectivement.

D'autre part, après l'extraction et la quantification des composés phénoliques de l'*agave americana* L., nous avons testé le potentiel antioxydant des différents extraits obtenus, par le test DPPH.

Tous les extraits obtenus par différent méthodes (décoction, infusion, macération), ont révélé un pouvoir à piéger le radical libre DPPH, mais il est moins important par rapport à

l'acide ascorbique. La décoction dotée d'un pouvoir antioxydant très important par rapport aux autres extraits.

Le potentiel antioxydant évalué pour les quatre fractions obtenues par différents solvants, montre que tous les extraits ont révélé pouvoir de piégeage DPPH. En effet, la capacité antioxydante la plus importante est observée dans la fraction d'acétate d'éthyle de la région de Kristel avec une concentration d'inhibition de 1.30mg/ml. Cette capacité à piéger le radical libre est en corrélation avec la forte teneur en flavonoïdes.

L'effet anti-inflammatoire testé par l'œdème induit par la carragénine, des deux extraits décocté et hydro-éthanolique, montre que les deux extraits possèdent un effet anti-inflammatoire remarquable en comparaison avec les deux anti-inflammatoires indométacine et le piroxicam. En effet, l'extrait hydro-éthanolique a un pouvoir de diminuer l'œdème plus élevé que l'extrait décocté.

Malgré le potentiel médicinal d'agave, ces espèces n'ont pas auparavant étudiées. Ce travail apporte, donc, une contribution à la connaissance de ces espèces, et de ces principes actifs et permet ainsi de mettre en évidence ces activités biologiques des extraits de la plante étudiée. Il serait donc, très intéressant d'exploiter cette plante pour la recherche de nouveaux principes actifs responsables de ces activités biologiques.

Pour compléter cette étude phytochimique, nous avons privilégié l'utilisation de la chromatographie phase liquide à haute performance pour la caractérisation du profil chimique des fractions flavonoïdiques. Cette technique nous a permis d'identifier cinq composés : la Naringine, la Taxifoline, la Fisetine, la Catéchine et l'Apéginine.

En perspectives nous envisageons de :

Poursuivre l'étude phytochimique de l'espèce étudiée afin de caractériser d'autres métabolites secondaires.

Isoler et identifier les composés phénoliques des extraits par d'autres techniques d'analyse : LC/MS et GC/MS.

Évaluer d'autres activités *in vivo* et *in vitro* tels que : l'activité antidiabétique, analgésique et antibactérienne.

Références bibliographiques

-A-

Acosta, José de. [1590] 1954. Historia Natural y Moral de las Indias. Biblioteca de autores españoles (BDAE). Ediciones Atlas. Madrid.

Ade-Ajayi, A.F., Hammuel, C., Ezeayanso, C., Ogabiela, E.E., Udiba, U.U., Anyim, B., Olabanji, O., 2011. Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of Agave sisalana Perrine juice (waste). J. Environ. Chem. Ecotoxicol. 3, 180–183.

Ainad Tabet L., (1988). Étude d'un échantillon représentatif des pelouses d'Oranie en relation avec les conditions de sol .Mémoire de. Magister : Ecologie végétale. Oran : Université d'Oran, 180 p.

Akroum, S., 2011. Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturels, Département de biologie animale. Thèse de doctorat. Université Mentouri de Coustantine, Algérie, p. 125.

Anokwur,C.P., Isaiah, D.I ., Pascal, B, 2015.Phenolic ContentDistribution and antioxidant activities of *Terminalia sericea* Burch.Afr J Tradit Complement Altern Med. (2015) 12(4):21-27.<http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v12i4.4>

Almaraz-abarca, N.; Delgado-alvarado, E. A.; Hernández-vargas,V., Profiling of phenolic compounds of somatic and reproductivetissues of Agave durangensis Gentry (Agavaceae).American Jour-nal of Applied Sciences 2009, 6, 1076-1085.

Albayrak, S., Aksoy, A., Albayrak, S., Sagdic, O, 2013.In vitro antioxidant and antimicrobial activity of some Lamiaceae species. IJST. A1: 1-9.

Amzal H. étude de l'activité antioxydante des saponines du tourteau de l'arganier. Thèse de doctorat. Université Mohamed V. Rabat.Maroc.

Anajwala, C. C.; Patel, R. M.; Dakhara, S. L.; Jariwala, J. K., *In vitro* cytotoxicity study of Agave americana, Strychnos nux-vomica and Areca catechu extracts using MCF-7 cell line. Journal of Ad-vanced Pharmaceutical Technology and Research 2010,1(2), 245-252.

Aouissa I. W-R.(2002). Etude des activités biologiques et de la toxicité aigue de l'extrait aqueux des feuilles de *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae). Thèse Pharmacie. Université de Bamako.130p

Arnal-Schnebelen B.(2004).La place de la phytothérapie dans l'arsenal des traitements mis en œuvre par les médecins généralistes. Paris: Pierre Fabre.

Arif T, Bhosale JD, Kumar N, Mandal TK, Bendre RS, Lavekar S, Dabur R. Natural products- antifungal agents derived from plants. J Asian Nat Prod Res. 2009; 11, 7 : 626-638.

Arrizaga, S.; Ezcurra, E.; Peters, E.; Ramirez, D. A. F. and Vega, E. (2000). "Pollination ecology of agave macroacantha (agavaceae) in a mexican tropical desert. I. floral biology and pollination mechanisms." Am. J. Bot. 87(7): 1004-1010.

Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S. et Khebri, S., (2010). Activite anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L., Lebanese. Science Journal, Vol. 11, No. 1, 2010.

Attou A., (2011). Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (fidjel)de la région d'Ain Témouchent. Thèse de doctorat université Abou Bekr belkaid Tlemcen ,82p.

Avila-Fernandez, A., Galicia-Lagunas, N., Rodriguez-Alegria, M.E., Olvera, C., Lopez-Munguia, A., 2011. Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans. Food Chem. 129, 380e386.

Azzi R., (2013). Contribution à l'étude de plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète sucré dans l'Ouest algérien : enquête ethnopharmacologique; Analyse pharmaco-toxicologique de figuier (*Ficus carica*) et de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat Wistar. Thèse doctorat. Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen .175 P.

-B-

Badiaga, M. (2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de

Nauclea Latifolia Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat :phytochimie. Mali : université de Bamako, 209 p.

Bahi A. (2015). L'effet protecteur des antioxydants naturels dans l'intoxication du mercure chez le rat Albinos Wistar (Aspects biochimiques, immunologiques et histologiques).Thèse de doctorat. Université frère- mentouri de Constantine.127p.

Baskin, J., Ludlow CJ., Harris TM ., Wolf FT. (1967). Psoralen, an inhibitor in the seeds of Psoralea subacaulis (Leguminodae). Phytochemistry 6: 1209-1213.

Beenu Tanwar and Rajni Modgil, (2012). Flavonoids: Dietary occurrence and health benefits. Spatula DD ; 2(1): 59-68.

Belkheiri N, (2010). Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes. Thèse de doctorat.Université Toulouse III-Paul Sabatier.193p.

Bellebcir L, (2008). Etude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréales. Thèse de Magister de l'Université de Constantine.

Belyagoubi L, (2006). Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaid, 110p.

Benayache F, (2005). Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires d'espèces du Genre Genista (Fabaceae) : G. saharae, G. ferox. Thèse de Doctorat. Université Constantine.200p.

Ben Hamissa, A.M., Seffen, M., Aliakbarian, B., Casazza, A.A., Perego, P., Converti, A., (2012) . Phenolics extraction from Agave americana (L.) leaves using hightemperature, high-pressure reactor. Food Bioprod. Process. 90, 17–21.

Benhamza L., (2008) - effets biologiques de la petite centauree erythraea centaurium (l.). Thèse de doctorat d'état, univ. Mentouri, Constantine, 55 p.

Beta T., Nam S., Dexter J. E., Sapirstein H. D. (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. Cereal Chem. 82, 390–393. 10.1094/CC-82-0390.

Bidaut-Russell M (2001). Adverse gastrointestinal effects of nsaid: consequences and costs. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*.15, 739-753.

Bouhadjera K., (2005). Contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* r.br. Et *Aristida pungens* l. thèse Diplome de Doctorat d'état université abou bekr belkaid Algérie 149p.

Brouillard, R., (1986). The flavonoids Advances. In : research since 1993. Harborne J B, Chapman and Hall, London. 525-538 p.

Boizot N., and Charpentier. J.P, (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en Composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra*. PP 79-82

Bouhini A. (2016). Criblage phytochimique, Étude Toxicologique et Valorisation Pharmacologique de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* (Lamiacées). Thèse de Doctorat. Université Mohammed V-Rabat. 199p.

Bouزيد, K., B.F. Toumi, (2014). Geoclimatic influences on the constituents and antioxidant activity. *Phytothérapie*, 12: 229-233

Bouزيد, K., (2014). Contribution à l'étude des options de valorisation de l'espèce *Arbutus unedo* L. dans l'Ouest Algérien. Thèse de doctorat. Université Djilali Liabes Sidi Bel Abbes.

Bouزيد, M.A., A. Latrèche, I. Attaoui, Z. Mehdadi, M. Benyahia, (2009). Caractérisation des matorrals et des garrigues à Urgineapancration Phil. dans le Djebel Tessala (Algérie occidentale). *Physio-Géo - Géographie Physique et Environnement*, 3: 131-149.

Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales. 3ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.

-C-

Cavin, A. (1999). Investigations phytochimiques des trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires. *Tinospora crisp* (Menispermaceae), *Merremia emarginata* (Convolvulaceae) et *Orophea enneandra* (Annonaceae). Thèse de doctorat, Lausanne, 243p.

Capron F., (1998). Forme anatomo-clinique de l'inflammation, in trouble de la mortalité et de la sensibilité digestive. *Revue du praticien* 20, 2273-2276.

Caughey G.H. (2011). Mast cell proteases as protective and inflammatory mediators. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 716-212.

Chadhary S., Ceska O., Warrington P.J., ashwood-smith M.J. (1985). Increased furocoumarin content of celery during storage. *J.Agr.Food. Chem.*33(6):1153-1157.

Charles N Serhan, Peter A Ward and Derek W Gilroy (2010). *Fundamentals of Inflammation. Cambridge University Press*, 2-3.

Cheng, S. K., Chea, A., Hout, S., Bun, S. S., Jonville, M., Balansard, G., & Dumenil, G. (2007). Approche ethnopharmacologique de plantes utilisées en médecine traditionnelle au Cambodge dans le traitement des maladies infectieuses, des fièvres et du paludisme.

Chen, P. Y.; Kuo, Y. C.; Chen, C. H.; Kuo, Y. H.; Lee, C. K., (2009). Isolation and immunomodulatory effect of homoisoflavones and flavones from *Agave sisalana* Perrine ex Eng elm. *Molecules* ,14 (5), 1789-1795.

Chikhi I. (2014). Composition chimique et activités biologiques des extraits de cinq plantes aromatiques et médicinales de l'ouest D'Algérie. Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen.121p.

Cowan M, (1999). Plant products as microbial agents, *clin. Microbial. Rev*, 12: 564-582.

Crichton R., Wilmet S., Legssyer R., Ward R, (2002). Molecular and cellular mechanisms of Iron homeostasis and toxicity in Mammalia, *Cells.Journal of inorganic Biochemistry* , Vol 91,pp 9-18.

Crozier A, Clifford MN, Ashihara H, (2006). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Blackwell publishing.

-D-

- Dacosta, Y. (2003). *Les phytonutriments bioactifs* (éd. Yves Dacosta). Paris.
- Dai, J., R.J. Mumper, 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15: 7313-7352.
- Debuigne G, Couplan F, Debuigne G. *Petit Larousse des plantes qui guérissent : 500 plantes*. Paris : Larousse, 2006 :
- Dcaux I. (2002) Phytothérapie: mode d'emploi. Ed Le Bien Public :p 6-7
- Dellal, A.,ToumiBenali, F., Hamel, A., Dif, M.M., Bouazza, S., Douaoui, A., Rahmani, H, 2016.Optimization of the Extraction Conditions of Phenolic Compounds from (*ApiumGraveolens*) Seeds by Response Surface Methodology. *Advances in Environmental Biology*.ISSN-1995-0756
- Delille A.L.(2010). Les plantes médicinales d'Algérie. 2^{ème} edition. Berti Edition. 239p Doc., Paris.
- De Rodriguez, D.J., Angulo-Sanchez, J.L., Hernandez-Castillo, F.D., 2006. An overview of the antimicrobial properties of Mexican medicinal plants. In: Rai, M., Carpinella, M.C. (Eds.), *Naturally Occurring Bioactive Compounds*, Vol. 3. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 325e377.
- Dhalla N.S., Tamsah R.M. et Netticadan T. (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J. Hypertens.*, 18 : 655-73.
- Dias MI, Barros L, Duenas M, Pereira E, Carvalho AM, Alves R C, Oliveira MBPP, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR (2013). Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium*L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction. *Food Chem.* 41(4):4152-60.<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.018>
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., et Capasso F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life. Sci.* **65 (4)**: 337-53.

Dif, M.M., (2014). Etude écologique, phytochimique et valorisation des plantes médicinales des monts de Tessala (W. de Sidi Bel-Abbés, Algérie NW) : Cas de *Daphne gnidium* L. Université Djilali Liabes de Sidi Bel Abbes.

Dif, M.M., J.K. Benali-Toumi, M. Benyahia, F.A. Becheikhi,(2015). Survey phytotherapeutic use of 11 medicinal plants growing in Tessala mountain. *Phytothérapie*, 13(5): 295-297.

Djahra A-B .(2014).Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antithépatotoxique du Marrubee blanc ou *Marrubium vulgare* L. Thèse de Doctorat . Université de Annaba. 73p.

Do Q.D, Angkawijaya A.E, Phuong Lan T.N, el al. (2014) Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. *J Food drug anal* 22 (3): pp. 296 - 302

Donatien, K., (2008). Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes - extraction, identification d'alcaloïdes - caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante. Thèse de doctorat. Université de Bamako.

Duriez F.(2000). Dictionnaire des médicaments naturels.Paris: Seuil pratique.

Dutertre, J.M., (2011). Enquête prospective au sein de la population consultant dans les cabinets de médecine générale sur l'île de la Réunion : à propos des plantes médicinales, utilisation, effets, innocuité et lien avec le médecin généraliste. Thèse doctorat d'état, Univ. Bordeaux 2-Victor Segalen U.F.R des sciences médicales, France, 33 p.

-E-

El Beyrouthy, M., Marc, E. B., Arnold, N., Nelly, A., Delelis-Dusollier, A., Annick, D. D., & Frederic, D, (2008). Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. *Journal of ethnopharmacology*, 120(3), 315-334.

EL Kalamouni, C., (2010). Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.

Ekoumou C., (2003). Etudes phytochimiques et pharmacologiques de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires de la cystite. Thèse pharmacie. Université de Bamako. 145p.

Epifano F., Genovese S., Menghini L., Curini M., 2007. Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry* 68:939 - 953.

Escobar-Guzmán R. E., Hernández F. Z., Vega K. G. & Simpson J. (2008) Seed production and gametophyte formation in *Agave tequilana* and *Agave americana*. *Botany* 86 : 1343–1353.

-F-

Favier, A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 1, pp 108-115.

Ferradji A, (2011). Activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits alcooliques et aqueux des feuilles et des baies *Pistacia lentiscus*. Mémoire de Magistère. Université Ferhat Abbas. Sétif. Algérie. 56p.

Fleuriet, A., Jay-Allemand. C. Macheix. J.J., 2005. Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes pp 121- 216

Fiorucci S., (2006). Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat. Université Nice-Sophia Antipolis, 212 p.

Fortin G. (2012). Étude bibliographique des phénomènes d'automédication par les plantes et les produits minéraux chez l'animal. Thèse de doctorat vétérinaire, Créteil, 98p.

-G-

García, L.; Juárez, B.; Aguirre, J.; Pinos, J.; Martínez, J. y Santoyo, M. 2009. Effects of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick high fructose syrup on non-diabetic and streptozotocin diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3 (11): 932-940.

Caughey, George H., 2007, Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. *Immunological Reviews*. . Vol. 217, no. 1, p. 141–1547

Ghalem M, (2014). Effets antioxydants et anti-inflammatoires des extraits de *Zizyphus lotus* et *Anthyllis vulneraria*. Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen.113p.

Girard-Lalancette K., Pichette A., Legault J, (2009). Sensitive cell-based using DCFH oxidation for determination of pro-and antioxidant properties of compounds and mixtures : Analysis of fruit and vegetable juices. *Food chemistry*. Vol. 115, n 2, pp.720-726.

Grabley, S., and Thiericke, R. (1999) Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 64: 101–154

González-Gallego J., Sánchez-Campos S. et Tuñón M. J. 2007. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición hospitalaria* , 22 (3) : 287-293.

Grandin M, (2013). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, utilisation et conseils dans la pratique officinale quotidienne. Document étayé par une analyse d'ordonnances d'une pharmacie rurale. Thèse de doctorat. Université angers. 114p.

Guleria, S., Kumar, A., 2009. Antifungal activity of *Agave americana* leaf extract against *Alternaria brassicae*, causal agent of *Alternaria* blight of Indian mustard (*Brassica juncea*). *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 42, 370e375.

Guignard, J.L. 2000 *Biochimie végétal* 2ème edition Dunod. 188 p.

-H-

Hale A L., Meepagala KM., Olivia A., Aliotta G., Duke SO. (2004). Phytotoxins from the leaves of *Ruta graveolens*. *J.Agric.Food chem.* 52(11) : 3345-3349.

Haslam., E, (1996), Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59, 205-215.

Hamidi., A, (2013). Étude phytochimique et activité biologique de la plante *Limoniastrum guyonianum*, Mémoire de Magister. Ouargla : Université Kasdi Merbah, 86p.

Hammuel, C., Yebpella, G.G., Shallangwa, G.A., Magomya, A.M., Agbaji, A.S., 2011. Phytochemical and antimicrobial screening of methanol and aqueous extracts of *Agave sisalana*. *Acta Pol. Pharm. Drug Res.* 68, 535–539

Hannebelle, T., Sahpaz, S., Skaltsounis, A.L., Bailleul, F. (2007). Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 624-626.

Harborne JB, Williams CA (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504

Harkati B., 2011. Valorisation et identification structural des principes actifs de la plante de la famille des Asteraceae : *Scorzonera undulate*. Thèse de Doctorat . Université Mantouri de constantine. 128P.

Hartman, T., (2007). From waste products to ecochemicals : fifty years research of plant secondary metabolism, Review . *Phytochemistry* 68 2831-2846.

Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96, 67–202

Hellal, Z., (2011). Contribution à l'étude des propriétés anti bactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites de Citrus. Application sur la Sardine. Mémoire de Magister : biochimie appliquée et biotechnologie. Tizi Ouzou : Université Mouloud Mammeri, 78p.

Henzen, C., (2003). Traitement aux glucocorticoïdes ; risques et effets secondaires. *Forum médical suisse*, 19 :442-446.

Heymonet C. (2013). Les plantes à visée anti-inflammatoire utilisées en phytothérapie. Thèse de doctorat. Université de Lorraine. 188p.

Huang D.J., Lin C.D., Chen H.J., Lin Y.H. (2005). Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) Lam 'Tainong 57' constituents Bot.Bull. Acad.sin.45, 179-186.

-I-

Ivanov, I., Petkova, N., Denev, P., Pavlov, A., 2015. polyphenols content and antioxidant activities in infusion and decoction extracts obtained from *fragaria vesca* L. leaves. Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies, XIX. ISSN 2285-1364.

Iserin, P., (2001). Larousse Encyclopédie des plantes médicinales, Edition Larousse Paris. P.331.

-K-

Kadam, P. V., K. N. Yadav, R. S. Deoda, N. S. Narappanawar, R. S. Shivatare and M. J. Patel, "Pharmacognostic and Phytochemical Studies on Roots of *Agave americana* (Agavaceae)," International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, Vol. 4, No. 3, 2012, pp. 92-96.

Kahkonen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M. (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**:3954-3962

Khare C.P, Indian Medicinal Plants, 2008 Edition, Page No.654 Thakur Et.AL. OP.Ct. P-167 – 175.

Kalla ,A., (2012). Etude et valorisation des principes actifs de quelques plantes du sud algérien : *Pituranthos scoparius*, *Rantherium adpressum* et *Traganum nudatum*. Thèse de Doctorat. Université de Constantine. 127p.

Kanoun, K., (2014). Etude de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits végétaux bruts de *Punica granatum* vis-à-vis de certaines souches bactériennes résistantes aux antibiotiques et antifongiques. Thèse de doctorat. Université Djilali Liabés de Sidi Bel Abbès.

Kansole, M.M.R., (2009). Etude ethnobotanique, phytocuimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso : cas de *Leucas martinicansis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia oppossta vahi* et *Orthosiphon pallidus royle ex benth*. Mémoire pour obtenir un diplôme Diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.

Keita, A., Coppo, P., Aké, A.L., Diakité, C., Diallo, D., Diarra, N., Koné, N., Pisani, L., Tapo, M., Wallet, O.F. (1993). Plantes et remèdes du plateau Dogon. Ed. CRMT/PSMTM, Bandiagara, Pergia, Italie.156p.

Khatiwora, E., Adsul, V. B., Kulkarni, M. M., Deshpandel, N. R., Kashalkar,R., V., 2010: Spectroscopic determination of total phenol and flavonoid contents of *Ipomoea carnea*. International Journal of ChemTech Research 2, 1698–1701.

Khoddami, A., M.A. Wilkes, T.H. Roberts, 2013. Techniques for analysis of plantphenolic compounds. *Molecules*, 18: 2328-2375.

Kholkhal F. (2014). Etude phytochimique et activité antioxydante des extraits des composes phénoliques de *thymus cialiatu*s ssp *coloratus* et ssp *eucialiatu*s. Thèse de doctorat. Université de Tlemcen.164p

Kidd B.L. & Urban L.A. (2001). Mechanisms of inflammatory pain. *British Journal of Anaesthesia*, 87, (1), 3-11.

Kirassian C. (2015). LE CASSIS ET LA REINE DES PRES : DEUX PLANTES AUX PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES. Thèse de doctorat. Université de Lyon.168p.

Kone D.2009. Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes – extraction identification des alcaloïdes- caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante. Thèse de doctorat. Université de Bamako.

Kong, K.W., Khoo, H.E., Prasad, N.K., Chew, L.Y. and Amin, I., (2013) .Total Phenolics and Antioxidant Activities of *Pouteriacampechiana*Fruit Parts. *SainsMalaysiana*, 42, 123-127.

Krief, S., (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal. Thèse doctorat : muséum national d’histoire naturelle. France : université de Nice, 232p.

-M-

Magalhaes L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.,(2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties, *Analytica Chimica Acta*, Vol.613; pp01-19

Mahmoudi, S., Khali,M., Mahmoudi,N., (2012).Etude de l'extraction des composésphénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynarascolymus*L.).*Nature &Technologie*.9:35-40.

Manallah, A., (2012). Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Mémoire de magister : Biochimie Appliquée. Sétif : Université Ferhat Abbas, 87p.

Manssouri, S., (2012). Les pelouses de l'Oranie : flore et écologie. Mémoire de magister : écologie végétale. Oran : Université d'Oran, 180 p.

Martins, N.,Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I.C.F.R., 2014. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. *Food Chemistry* 158:73–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.099>

Martins, N.,Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I.C.F.R., 2015. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme:Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterisation. *Food Chemistry* 167 :131–137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.094>

Mebarki, N. (2010). Extraction de l'huile essentielle de *thymus fontanesii* dt application à la formulation d'une forme medicamenteuse- antimicrobienne. These magister. Université de Boumerdes. Pp 124.

Mellado-Mojica, E., Lopez, M.G., (2015). Identification, classification, and discrimination of agave syrups from natural sweeteners by infrared spectroscopy and HPAEC-PAD. *Food Chem.* 167, 349e357.

Meyer R.A., Campbell J.N. & Raja S.N. (1994). Peripheral neural mechanisms of nociception. Edinburgh, Chruchill-Livingstone.

Mohammad Amzad, H., Khulood Ahmed, S., Zawan Hamood, A. et Afaf Mohammed, W., (2013). Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 3, série 9, pp 705-710.

Mohammedi Z., (2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse magistère, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, 155p.

Mohammedi Z, Atik F., (2011). Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) karst. Inter J Pharma Bio Sci 2:609-615.

Mohammedi, Z., (2013). Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat en Biologie. Université Abou Belkaid Tlemcen.

Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H., Núñez, M. J., Parajo, J. C., (2001). Natural antioxidants from residual sources. Food Chem, 72: 145–171.

Muanda FN., (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine-Metz, Metz, 239 p.

-N-

Naczek, M. et Shahidi, F., (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. J. Pharm. Biomes. Anal. 41, 1523-1542.

Nasri, S., H.B. Salem., (2012). Effect of Oral Administration of Agave americana or Quillaja saponaria Extracts on Digestion and Growth of Barbarine Female Lamb. Live- stock Sciences, 147(3): 59-65.

Negi, J. S., Negi, P. S., Pant, G. J., Rawat, M. S. M and Negi, S. K., (2013) Natural Occurring Saponins: Chemistry and Biology. Journal of Poisonous and Medicinal Plant Research. 1(1): 001-006.

Niare A., (2006). Etude de la phytochimie et des activités pharmacologiques de *Syzygium guineense* Willd. (Myrtaceae). Thèse de doctorat. Université de de Bamako.88p.

Nauvais M., Santos I., Mendesa S., Pinto-Gomrs C., (2004). Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of ethnobotany*, 93: 183-195.

-O-

O’Kennedy R, Thorne RD., (1997). Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action. Wiley; Chichester: pp. 23–66.

Ozsoy, N., Can, A., Yanardag, R. et Akev, A., (2008). Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. *Food Chem* 110: 571–83

-P-

Packer L., (2001). Flavonoides and other polyphenols. Ed Academics Press, California, 483p.

Pardo, O. (2002). “Etnobotánica de algunas cactáceas y suculentas del Perú”. *Chloris Chilensis*. Año 5. N° 1.

Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Rosas-Romero A., Flerlage N., Burillo J., Codina C., 2002. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem*; 50: 6882-90.

Pascal, C., Agbangnan, D., Christine, T, Justine, D, Anna, C., Eric, F., Dominique, C.K., (2012). Optimization of the Extraction of Sorghum's Polyphenols for Industrial Production by Membrane Processes.*Res.J.Recent Sci*. 1(4), 1-8,ISSN 2277-2502

Penchev P.I., (2010). Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.218p.

Peronny, S., (2005). La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta). Thèse de doctorat. Muséum national d’histoire naturelle.

Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., & J.O., D., (1999). Méthodes d'évaluation du stress antioxydant chez l'homme : importance en matière de prévention (éd. Edition MEDI SPHERE).

Prashant, T., Bimlesh, K., Mandeep, K., Gurpreet, K. et Harleen, K., (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. Internationale pharmaceutica sciencia. Jan-March 2011, Vol. 1, Issue 1.

Price, M.L., S. Van Scoyoc, L.G. Butler., (1978). a critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. J Agric Food Chem, 26: 1214-1218. doi: 10.1021/jf60219a031

Prior, R.I., WU, X.L., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric Food Chem*, 53 (10): 4290-4302.

-Q-

Quezel, P. et Santa, S., (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales Tome I. Edition France Paris 1962.

-R-

Ramkrishna, U., Dinesh kumar, B., Narayan, S. et Ratna, P., (2013). Phytochemical screening and polyphenol estimation by HPLC of *Terminalia arjuna*. International journal of research in pharmacology and pharmacotherapeutics. 2. Série 3, pp 471-482.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice -Evans, C., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Biol. Med. 26, 1231–1237.

Rezaire, A., (2012). Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse de doctorat en Phytochimie. Université des Antilles et de la Guyane.

Rizwan, K., M. Zubair, N. Rasool, M. Riaz, M. Zia-UlHaq and V. de Feo, "Phytochemical and Biological Studies of *Agave attenuata*," International Journal of Molecular Sciences, Vol. 13, No. 5, 2012, pp. 6440-6451. doi:10.3390/ijms13056440

-S-

Sakagami, Y., Yamamoto, K., Sugiura, S., Inokuchi, K., Hayashi, T., Kato, N., 2005. Essential roles of Homer-1a in homeostatic regulation of pyramidal cell excitability: a possible link to clinical benefits of electroconvulsive shock. European Journal of Neuroscience 21, 3229–3239.

Sakagami H., Hashimoto K., Suzuki F., Ogiwara T., Satoh K., Ito H., Hatano T., Takashi Y. and Fujisawa S., (2005). Molecular requirements of lignincarbohydrate complexes for expression of unique biological activities. Phytochemistry, 66 (17): 2108-2120

Salunkhe D K, Chavan J K, Kadam S S. Dietary tannins : consequences and remedies. Boca Raton, Fla: CRC Press, Inc.; 1989.

Sanchez-Moreno C.,(2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. Food Science and Technology International, 8 (3):121-137.

Sassi, M., (2008). Les plantes médicinales. Dar el fikr . Tunis.

Schijlen EGW, de Vos CHR, van Tunen AJ, Bovy AG (2004) Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. Phytochemistry 65 : 2631-2648

Schorderet Michel, Dayer J-M. et coll. (1998). Physiopathologie de la fièvre, de la douleur et de l'inflammation; Analgésiques, antipyrétiques, anti-inflammatoires et immunosuppresseurs (in Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques). Slatkine, Paris-Génève, 569-606.

Semenya, S.S., Potgieter, M.J., Tshisikhawe, M.P., Shava, S. & Maroyi, A., (2012). Medicinal utilization of exotic plants by Bapedi traditional healers to treat human ailments in Limpopo province, South Africa. Journal of ethnopharmacology, 144: 646-655.

Séragé E. (2014). Approche officinale des principales infections ORL. D'étiologie bactérienne, chez l'enfant. Thèse de Doctorat. Université de Nantes. 85P.

Sidana, J., et al., (2016). Saponins of Agave : Chemistry and bioactivity, Phytochemistry, [http://dx.doi.org/ 10.1016/j.phytochem.2016.06.010](http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.06.010)

Sidibé, F. (2003). *Etude phytochimique et pharmacologique de Stereospermum kunthianum Cham. (Bignoniaceae)*. Thèse de Pharmacie. Université de Bamako.

Silva-Montellano, A., & Eguiarte, L.E., (2003). Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. I. Floral characteristics, visitors, and fecundity. American Journal of Botany, 90, 377-387.

Soto, J.L.M., Gonzalez, J.V., Nicanor, A.B., Ramirez, E.G.R., (2013). Enzymatic production of high fructose syrup from *Agave tequilana* fructans and its physicochemical characterization. Afr. J. Biotechnol. 10, 19137e19143.

Svoboda Hampson J.B., (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.

-T-

Techer S., (2013). Criblage d'activités biologiques de plantes endémiques ou indigènes de La Réunion - Recherche de molécules antivirales ciblant le virus du chikungunya. Thèse de Doctorat. Université de la Réunion : UFR des sciences et technologie. 224p.

Tichirine H.S., (2010). Etude ethnobotanique, activité antioxydante et analyse phytochimique de quelques cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) du Sud- Est algérien. Thèse de Magistère. Université Es Senia, Oran. 88 p.

Timbo B., (2003). Etude phytochimique et des activités biologiques de *Trichilia emetica* VAHL (*MELIACEAE*). Thèse de doctorat. Université de Bamako. 108p.

Timite G. (2012). Isolement et caractérisation des saponosides de plantes de la famille des Alliaceae, Caryophyllaceae et Polygalaceae et évaluation de leurs activités cytotoxiques sur cellules tumorales. Thèse de doctorat. Université de Bourgogne. 303 P.

Tolo A.D.(2002). Etude des activités biologiques de la toxicité des écorces de racine de *Securidaca longepedunculata* Fres (Polygalaceae). Thèse Pharmacie. Université de Bamako, 110p.

Tomsone, L.,Kruma, Z.,Galoburda, R., (2012). Comparison of Different Solvents and Extraction Methods for Isolation of Phenolic Compounds from Horseradish Roots. World Acad. Sci. Eng. Technol. 6(4): 903–908

Touitou Yvan., (1993). Pharmacologie Diplôme d'Etat d'Infirmier (e), 7eme édition Paris. 407 p.

Trabelsi N, Megdiche W, Ksouri R, Falleh H, Oueslati S, Bourgou S, Hajlaoui H, Abdelly C., 2010. Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. Food Sci Tech 43: 632-639.

-V-

Verastegui, A., Verde, J., Garcia, S., Heredia, N., Oranday, A., Rivas, C., 2008. Species of Agave with antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria and fungi. World J. Microbiol. Biotechnol. 24, 1249–1252.

Verdrager J. 1978. Les médicaments qui nous viennent des plantes. (ed.). Maloine.SA. Pp: 12.

Vernex - Lozet , Vernex-Lozet C., (2010). Les possibilités de la phytothérapie en gériatrie canine. Thèse Méd.Vét., Lyon ;2011: n°21.

Vonkman H.E., Laar M.A.V. (2008). Non-steroidal inflammatory Drugs: Adverse effects and their prevention. Seminars in arthritis and rheumatism 10:10-16.

Vu Thi Dao., (2008). Effet de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolites secondaires chez *Datura innoxia* Mill. Cultivé en conditions hors sol; impact des facteurs biotiques et abiotiques. Thèse de doctorat. Université de Lorraine.211 P.

-W-

Walker J.E.M., Saraste M.J., Runswick N.J. (1982). Disantly related sequences in the alpha-and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold.Embo J, 1(8):945-51.

Weill B, Batteux F and Dhainaut J (2003). Immunopathologie et reactions inflammatoires. Eds, De Boeck Université (Paris), 12-23.

Weisburger J.H., (1997). Tea and health: a historical perspective. Cancer Letters 114: 315-317.

Witchl, M et Anton R., (2003).Plants thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique, 2^{ème} éd.(tradition française de teedrogen and phytopharma, par Anton, R.et Bernard, M., XCVI-692p.,Tec&Doc-Editions médicinales internationales. ISBN 2—7430-0631-5.

-X-

Xu YC., Leung SW., Yeung D.K.Y., Hu L.H., Chen G.H., Che C.M., Man R.Y.K., (2007). Structure-activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. Phytochemistry.68:1179-1188.

-Y-

Yucekutlu A, Bildaci I., (2008). Determination of plant saponins and some Gypsophila species: a review of the literature. Hacettepe Journal of Biology and Chemistry. 36 :129-135.

Yu-Ling, H.O., S.S. HUANG, J.S. DENG, Y.H. LIN, Y.S. CHANG and G.J. HUANG, (2012). In vitro antioxidant properties and total phenolic contents of wetland medicinal plants in Taiwan Botanical Studies., 53: 55-66.

Yvan T., (1997). Pharmacologie 8ème Edit. Masson. Paris-Milan-Barcelone ; 388 p.

-Z-

Zeghad N., (2009). Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de magister : biotechnologie végétale. Constantine : université Mentouri, 96p.

Zhishen, J., Mengcheng, T. et Jianming, W., (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scanenging effects on superoxide radicals. Food Chem.,64, 555-559.

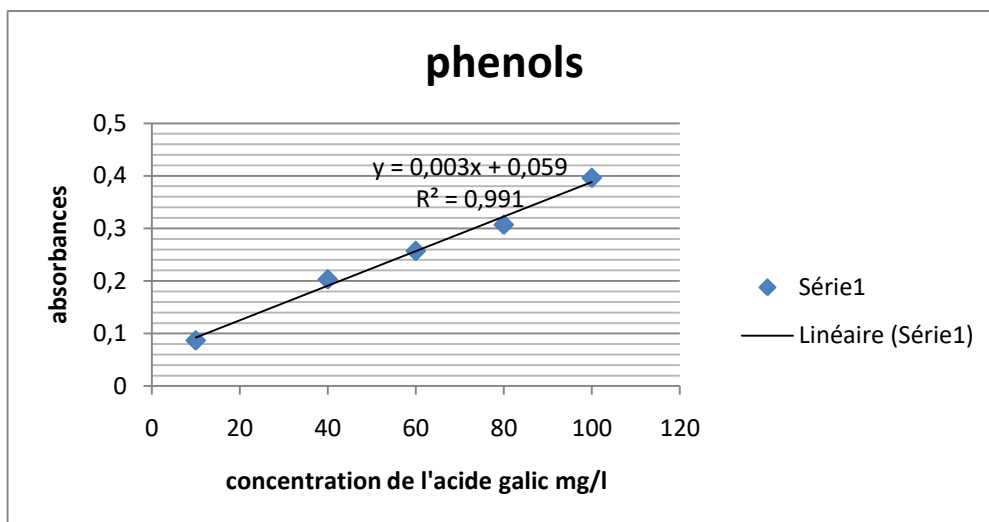
Biblio-net

Webmaster1: <https://agaveinarizona.wordpress.com/2014/03/30/agave-americana-flowers-and-pollinators/>

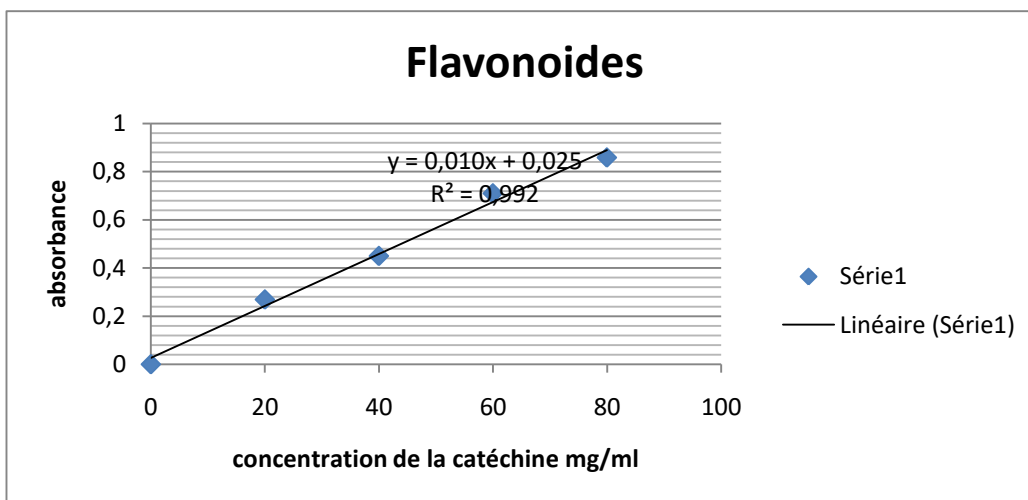
Webmaster 2: <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/welcome.html>

Annexes

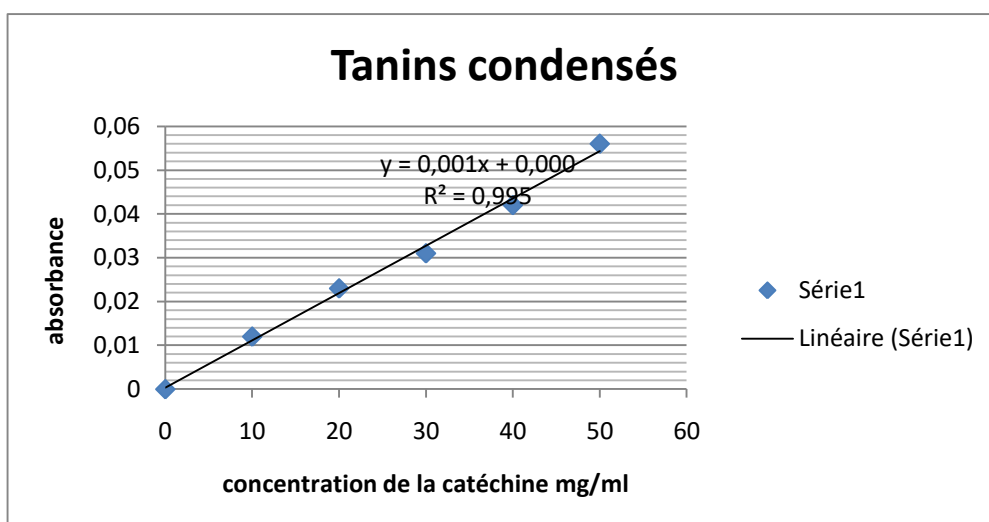
Annexe A : Les courbes étalonnages



Courbe d'étalonnage des polyphénols

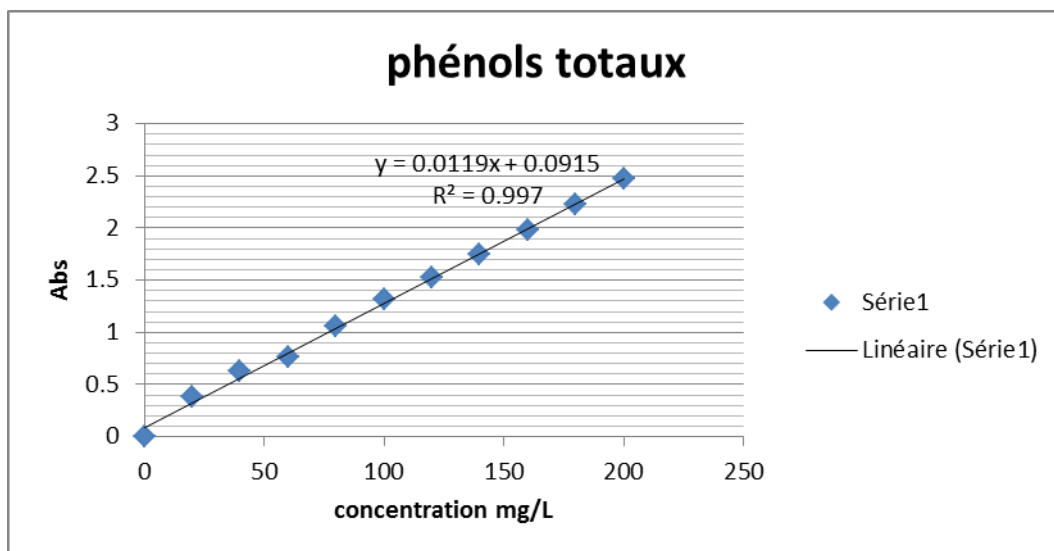


Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

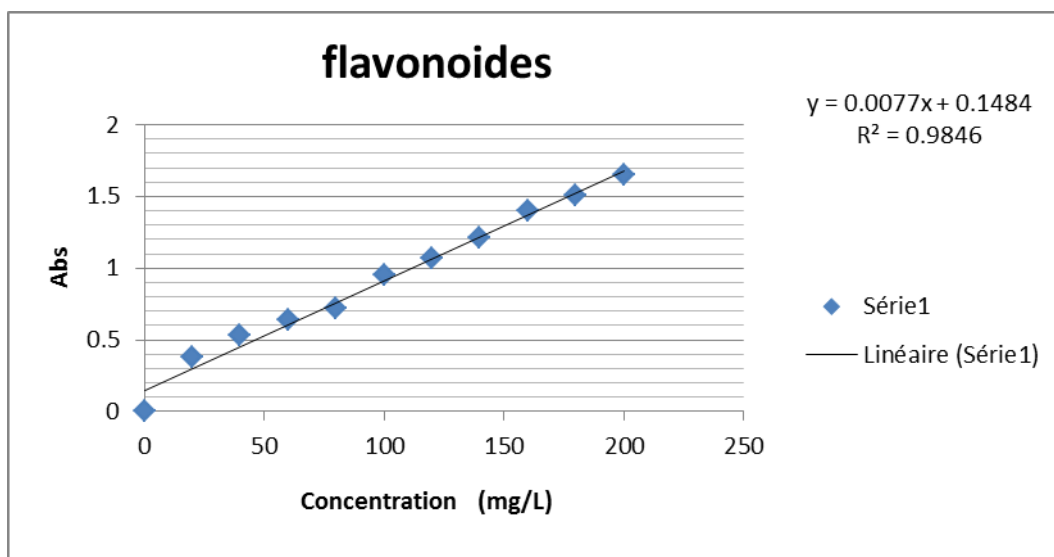


Courbe d'étalonnage des tanins

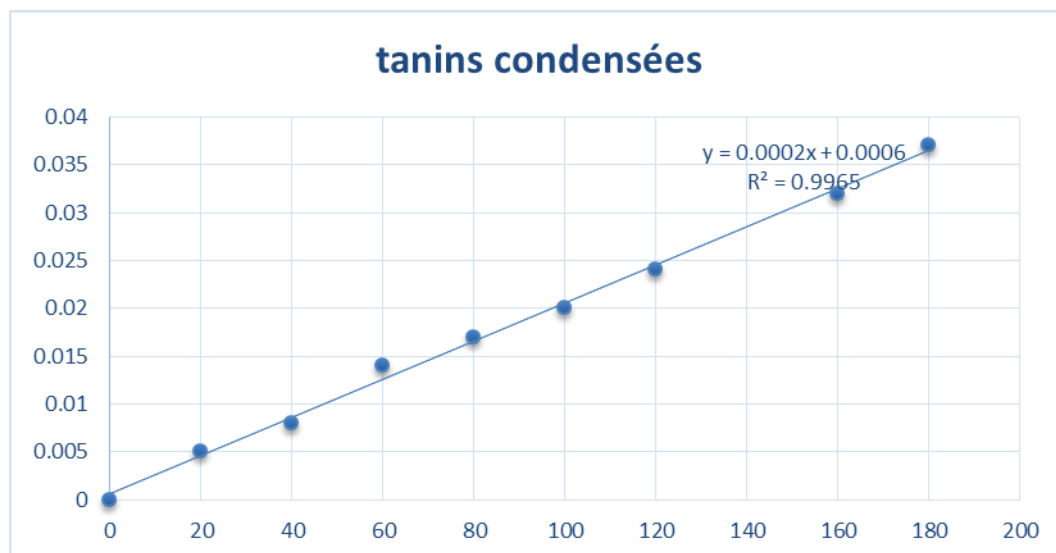
Annexe B : Les courbes étalonnages



Courbe d'étalonnage des polyphénols



Courbe d'étalonnage des polyphénols



Courbe d'étalonnage des tanins condensés

Annexe C : résultats des analyses statistiques

1- Résultats du dosage des composées phénolique obtenus par différent méthodes

Tableau 1: Effet des méthodes d'extraction sur les teneurs en composés phénoliques

Effect		Value	F		Hdf	Edf	p	PES
Intercept	Pillai's Trace	1.000	192903.693	^b	3	2.00	<0.001	1.000
	Wilks Lambda	0.000	192903.693	^b	3	2.00	<0.001	1.000
	Hotelling's Trace	289355.539	192903.693	^b	3	2.00	<0.001	1.000
	Roy's largest root	289355.539	192903.693	^b	3	2.00	<0.001	1.000
Methods	Pillai's Trace	2.642	9.843		9	12.00	<0.001	0.881
	Wilks Lambda	0.000	242.631		9	5.02	<0.001	0.993
	Hotelling's Trace	17253.003	1278.000		9	2.00	0.001	1.000
	Roy's largest root	17199.750	22933.000	^c	3	4.00	<0.001	1.000

^b: Exact statistic; ^c: The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level; **F**: Fisher value; **Hdf**: Hypothesis degree of freedom; **Edf**: Error degree of freedom; **p**: Significance; **PES**: Partial eta square.

Tableau 2: variation des composés phénolique selon la méthode d'extraction

Source	Compounds	SS	df	MS	F	p		PES		R ² _{adj}
Model	TFC	494.318	3	164.773	375.186	<0.001	***	0.996	^a	0.994
	TPC	17.048	3	5.683	1374.419	<0.001	***	0.999	^a	0.998
	CTC	5.167	3	1.722	37.175	0.002	**	0.965	^a	0.939
Intercept	TFC	21289.016	1	21289.016	48474.872	<0.001	***	1.000		
	TPC	329.877	1	329.877	79783.461	<0.001	***	1.000		
	CTC	13.440	1	13.440	290.097	<0.001	***	0.986		
Methods	TFC	494.318	3	164.773	375.186	<0.001	***	0.996		
	TPC	17.048	3	5.683	1374.419	<0.001	***	0.999		
	CTC	5.167	3	1.722	37.175	0.002	**	0.965		
Error	TFC	1.757	4	0.439						
	TPC	0.017	4	0.004						
	CTC	0.185	4	0.046						

CTC: condensed tannins compound; **CPT**: total phenols compound; **CFT**: total flavonoids compound; **R²**: R square; **R²_{adj}**: Adjusted R square; **SS**: Sum of squares; **df**: degree of freedom; **MS**: mean of squares; **F**: Fisher value; **P**: Significance; **ECP**: Partial eta square.

2- Résultats du dosage des composés phénoliques par différents solvants

Tableau 1: Analyse de la variance à deux facteurs représentant la variation des polyphénols selon les solvants et les zones d'étude.

Source	Compound	SS	df	MS	F	p	PES	R ² _{adj}
Model	TFC	3153.267	7	450.467	35.890	<0.001	***	0.940 ^a
	TPC	52654.267	7	7522.038	163.403	<0.001	***	0.986 ^a
Constant	TFC	7310.710	1	7310.710	582.473	<0.001	***	0.973
	TPC	161657.656	1	161657.656	3511.725	<0.001	***	0.995
Area	TFC	121.686	1	121.686	9.695	0.007	**	0.377
	TPC	115.981	1	115.981	2.519	0.132		0.136
Solvent	TFC	2915.797	3	971.932	77.438	<0.001	***	0.936
	TPC	45931.505	3	15310.502	332.593	<0.001	***	0.984
Area *	TFC	115.784	3	38.595	3.075	0.058		0.366
	TPC	6606.781	3	2202.260	47.840	<0.001	***	0.900
Error	TFC	200.819	16	12.551				
	TPC	736.539	16	46.034				

TPC: Total phenol compounds; **TFC:** Total flavonoid compounds; ^a: R square; **R²_{adj}:** Adjusted R square; **SC:** Somme square; **df:** Degree of freedom; **CM:** mean square; **F:** Fisher value; **p:** Significance; **PES:** Partial eta square.

Tableau 2 : Comparaison entre les polyphénols selon les solvants par le test Tukey à postériori

Compound	(I)	(J)	MD (I-J)	SE	p	IC 95%	IC 95%
TFC	Aqueous phase	Chloroform	-23.981	2.045	<0.001	-29.833	-18.129
		n-butanol	-11.250	2.045	<0.001	-17.102	-5.398
		Ethyl acetate	-27.993	2.045	<0.001	-33.845	-22.141
	Chloroform	Aqueous phase	23.981	2.045	<0.001	18.129	29.833
		n-butanol	12.731	2.045	<0.001	6.879	18.583
		Ethyl acetate	-4.012	2.045	0.243	-9.864	1.839
	n-butanol	Aqueous phase	11.250	2.045	<0.001	5.398	17.102
		Chloroform	-12.731	2.045	<0.001	-18.583	-6.879
		Ethyl acetate	-16.743	2.045	<0.001	-22.595	-10.891
TPC	Aqueous phase	Chloroform	-122.339	3.917	<0.001	-130.643	-114.035
		n-butanol	-50.859	3.917	<0.001	-59.163	-42.555
		Ethyl acetate	-46.128	3.917	<0.001	-54.433	-37.824
	Chloroform	Aqueous phase	122.339	3.917	<0.001	114.035	130.643
		n-butanol	71.480	3.917	<0.001	63.176	79.784
		Ethyl acetate	76.210	3.917	<0.001	67.906	84.514
	n-butanol	Aqueous phase	50.859	3.917	<0.001	42.555	59.163
		Chloroform	-71.480	3.917	<0.001	-79.784	-63.176
		Ethyl acetate	4.730	3.917	0.245	-3.574	13.035

TPC: Total phenol compounds; **TFC:** Total flavonoid compounds; **I:** Comparing solvent; **J:** solvent compared to; **MD:** mean difference; **SE:** Standard error; **p:** Significance; **IC:** confidence Interval.

3- Résultats de l'activité anti-inflammatoire

3-1- extrait hydro-ethanolique (EEAA).

Tukey Simultaneous Tests for Differences of Means

Difference of Levels	Difference of Means	SE of Difference	95% CI	T-Value	Adjusted P-Value
DOSE 1 - CONTROL	-1,278	0,256	(-2,013; -0,543)	-4,98	0,001
STAND indomé - CONTROL	-1,650	0,256	(-2,385; -0,915)	-6,43	0,000
STAND piroxi - CONTROL	-0,670	0,256	(-1,405; 0,065)	-2,61	0,080
STAND indomé - DOSE 1	-0,372	0,256	(-1,107; 0,363)	-1,45	0,488
STAND piroxi - DOSE 1	0,608	0,256	(-0,127; 1,343)	2,37	0,123
STAND piroxi - STAND indomé	0,980	0,256	(0,245; 1,715)	3,82	0,007

Individual confidence level = 98,87%

Tukey Simultaneous Tests for Differences of Means

Difference of Levels	Difference of Means	SE of Difference	95% CI	T-Value	Adjusted P-Value
DOSE 1 - CONTROL	-2,530	0,279	(-3,330; -1,730)	-9,06	0,000
STAND indomé - CONTROL	-1,288	0,279	(-2,088; -0,488)	-4,61	0,001
STAND piroxi - CONTROL	-0,810	0,279	(-1,610; -0,010)	-2,90	0,046
STAND indomé - DOSE 1	1,242	0,279	(0,442; 2,042)	4,45	0,002
STAND piroxi - DOSE 1	1,720	0,279	(0,920; 2,520)	6,16	0,000
STAND piroxi - STAND indomé	0,478	0,279	(-0,322; 1,278)	1,71	0,350

Individual confidence level = 98,87%

Tukey Simultaneous Tests for Differences of Means

Difference of Levels	Difference of Means	SE of Difference	95% CI	T-Value	Adjusted P-Value
DOSE 1 - CONTROL	-3,174	0,258	(-3,914; -2,434)	-12,28	0,000
STAND indomé - CONTROL	-1,598	0,258	(-2,338; -0,858)	-6,18	0,000
STAND piroxi - CONTROL	-1,882	0,258	(-2,622; -1,142)	-7,28	0,000
STAND indomé - DOSE 1	1,576	0,258	(0,836; 2,316)	6,10	0,000
STAND piroxi - DOSE 1	1,292	0,258	(0,552; 2,032)	5,00	0,001
STAND piroxi - STAND indomé	-0,284	0,258	(-1,024; 0,456)	-1,10	0,695

Individual confidence level = 98,87%

Tukey Simultaneous Tests for Differences of Means

Difference of Levels	Difference of Means	SE of Difference	95% CI	T-Value	Adjusted P-Value
DOSE 1 - CONTROL	-2,584	0,289	(-3,411; -1,757)	-8,95	0,000
STAND indomé - CONTROL	-2,126	0,289	(-2,953; -1,299)	-7,37	0,000
STAND piroxi - CONTROL	-2,518	0,289	(-3,345; -1,691)	-8,72	0,000
STAND indomé - DOSE 1	0,458	0,289	(-0,369; 1,285)	1,59	0,413
STAND piroxi - DOSE 1	0,066	0,289	(-0,761; 0,893)	0,23	0,996
STAND piroxi - STAND indomé	-0,392	0,289	(-1,219; 0,435)	-1,36	0,542

Individual confidence level = 98,87%

Tukey Simultaneous Tests for Differences of Means

Difference of Levels	Difference of Means	SE of Difference	95% CI	T-Value	Adjusted P-Value
DOSE 1 - CONTROL	-2,484	0,371	(-3,547; -1,421)	-6,69	0,000
STAND indomé - CONTROL	-2,730	0,371	(-3,793; -1,667)	-7,36	0,000
STAND piroxi - CONTROL	-3,182	0,371	(-4,245; -2,119)	-8,57	0,000
STAND indomé - DOSE 1	-0,246	0,371	(-1,309; 0,817)	-0,66	0,909
STAND piroxi - DOSE 1	-0,698	0,371	(-1,761; 0,365)	-1,88	0,275
STAND piroxi - STAND indomé	-0,452	0,371	(-1,515; 0,611)	-1,22	0,625

Individual confidence level = 98,87%

Tukey Simultaneous Tests for Differences of Means

Difference of Levels	Difference of Means	SE of Difference	95% CI	T-Value	Adjusted P-Value
DOSE 1 - CONTROL	-2,260	0,274	(-3,044; -1,476)	-8,25	0,000
STAND indomé - CONTROL	-3,916	0,274	(-4,700; -3,132)	-14,30	0,000
STAND piroxi - CONTROL	-4,338	0,274	(-5,122; -3,554)	-15,84	0,000
STAND indomé - DOSE 1	-1,656	0,274	(-2,440; -0,872)	-6,05	0,000
STAND piroxi - DOSE 1	-2,078	0,274	(-2,862; -1,294)	-7,59	0,000
STAND piroxi - STAND indomé	-0,422	0,274	(-1,206; 0,362)	-1,54	0,438

Individual confidence level = 98,87%

3-2- extrait de décoction (EDAA).

Tukey Simultaneous Tests for Differences of Means

Difference of Levels	Difference of Means	SE of Difference	95% CI	T-Value	Adjusted P-Value
DOSE 1 - CONTROL	-1,842	0,232	(-2,506; -1,178)	-7,94	0,000
STAND indomé - CONTROL	-1,650	0,232	(-2,314; -0,986)	-7,11	0,000
STAND piroxi - CONTROL	-0,670	0,232	(-1,334; 0,006)	-2,89	0,047
STAND indomé - DOSE 1	0,192	0,232	(-0,472; 0,856)	0,83	0,841
STAND piroxi - DOSE 1	1,172	0,232	(0,508; 1,836)	5,05	0,001
STAND piroxi - STAND indomé	0,980	0,232	(0,316; 1,644)	4,22	0,003

Individual confidence level = 98,87%

Tukey Simultaneous Tests for Differences of Means

Difference of Levels	Difference of Means	SE of Difference	95% CI	T-Value	Adjusted P-Value
DOSE 1 - CONTROL	-3,072	0,205	(-3,660; -2,484)	-14,97	0,000
STAND indomé - CONTROL	-1,288	0,205	(-1,876; -0,700)	-6,28	0,000
STAND piroxi - CONTROL	-0,810	0,205	(-1,398; -0,222)	-3,95	0,006
STAND indomé - DOSE 1	1,784	0,205	(1,196; 2,372)	8,70	0,000
STAND piroxi - DOSE 1	2,262	0,205	(1,674; 2,850)	11,03	0,000
STAND piroxi - STAND indomé	0,478	0,205	(-0,110; 1,066)	2,33	0,133

Individual confidence level = 98,87%

Tukey Simultaneous Tests for Differences of Means

Difference of Levels	Difference of Means	SE of Difference	95% CI	T-Value	Adjusted P-Value
DOSE 1 - CONTROL	-3,190	0,218	(-3,815; -2,565)	-14,62	0,000
STAND indomé - CONTROL	-1,598	0,218	(-2,223; -0,973)	-7,32	0,000
STAND piroxi - CONTROL	-1,882	0,218	(-2,507; -1,257)	-8,62	0,000
STAND indomé - DOSE 1	1,592	0,218	(0,967; 2,217)	7,30	0,000
STAND piroxi - DOSE 1	1,308	0,218	(0,683; 1,933)	5,99	0,000
STAND piroxi - STAND indomé	-0,284	0,218	(-0,909; 0,341)	-1,30	0,575

Individual confidence level = 98,87%

Tukey Simultaneous Tests for Differences of Means

Difference of Levels	Difference of Means	SE of Difference	95% CI	T-Value	Adjusted P-Value
DOSE 1 - CONTROL	-3,498	0,345	(-4,485; -2,511)	-10,15	0,000
STAND indomé - CONTROL	-2,730	0,345	(-3,717; -1,743)	-7,92	0,000
STAND piroxi - CONTROL	-3,182	0,345	(-4,169; -2,195)	-9,23	0,000
STAND indomé - DOSE 1	0,768	0,345	(-0,219; 1,755)	2,23	0,158
STAND piroxi - DOSE 1	0,316	0,345	(-0,671; 1,303)	0,92	0,796
STAND piroxi - STAND indomé	-0,452	0,345	(-1,439; 0,535)	-1,31	0,569

Individual confidence level = 98,87%

Tukey Simultaneous Tests for Differences of Means

Difference of Levels	Difference of Means	SE of Difference	95% CI	T-Value	Adjusted P-Value
DOSE 1 - CONTROL	-3,708	0,279	(-4,508; -2,908)	-13,27	0,000
STAND indomé - CONTROL	-3,916	0,279	(-4,716; -3,116)	-14,01	0,000
STAND piroxi - CONTROL	-4,338	0,279	(-5,138; -3,538)	-15,52	0,000
STAND indomé - DOSE 1	-0,208	0,279	(-1,008; 0,592)	-0,74	0,878
STAND piroxi - DOSE 1	-0,630	0,279	(-1,430; 0,170)	-2,25	0,151
STAND piroxi - STAND indomé	-0,422	0,279	(-1,222; 0,378)	-1,51	0,455

Individual confidence level = 98,87%
