

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

BADJI MOKHTAR-ANNABA UNIVERSITY  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA



جامعة باجي مختار – عنابة

Année 2021

Faculté des Sciences

Département de Chimie

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT

THÈME

**Etude ethnobotanique, phytochimique et  
pharmacologique d'une plante médicinale Algérienne**

Option

Chimie organique fine

Par

M<sup>elle</sup> CHOHRA Djawhara

Devant le jury:

Présidente:	Mme HATTAB Zhour	Prof.	U. Badji Mokhtar-Annaba
Directrice de thèse:	Mme FERCHICHI Loubna	MCA.	U. Badji Mokhtar-Annaba
Examineurs:	Mme SMARA Ouanissa	MCA.	U. Kasdi Merbeh-Ouargla
	Mme ALI RACHEDI Fahima	MCA.	U. Mohamed Cherif Messaidia- Souk Ahras
	Mer LEGSEIR Belgacem	Prof.	U. Badji Mokhtar-Annaba

La plante dont l'étude a été réalisée est une plante de la famille des Ranunculaceae :  
*Clematis cirrhosa* L.



*Clematis cirrhosa* L.

## *Dédicaces*

*Avant tout je remercie mon **DIEU** tout puissant, qui m'a donné la volonté, le courage, la patience et qui a guidé mes pas vers le droit chemin durant mes années d'études*

*A mes chers parents merci de m'avoir toujours tout donné, de m'avoir accordé votre confiance et de m'avoir toujours soutenue*

*A mes chères sœurs (Nawel, Mouna, Meriem et Boutheyra)*

*A mes chers deux frères (Walid et Mohammed Badr EL Islem)*

*A toute ma famille*

*Enfin le mérite de ce travail revient à toutes les personnes qui ont participé à sa réalisation et auxquelles j'exprime ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements.*

## *Remerciements*

*Tout d'abord je remercie Dieu le tout puissant et le miséricordieux qui m'a donné le courage, la force et la patience pour mener à terme ce travail de recherche.*

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Synthèse et Biocatalyse Organique (LSBO), au sein de l'équipe de Phytochimie à l'université Badji Mokhtar-Annaba, et au niveau du Laboratoire de Biotechnologie et Biologie Moléculaire de l'université d'Aksaray-Turquie, dans le cadre d'une thèse de Doctorat 3ème cycle en chimie organique fine.*

*J'adresse mes plus vifs remerciements à ma directrice de thèse Madame **FERCHICHI Loubna**, MCA à l'Université Badji Mokhtar-Annaba pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, je la remercie pour la confiance qu'elle m'a accordé, sa gentillesse, sa disponibilité permanente et pour les nombreux conseils et encouragements qu'elle m'a prodigué et qui m'ont guidé tout au long de l'accomplissement de ce travail. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma haute considération et de mon profond respect.*

*Je tiens à remercier les membres du jury pour leur présence et d'avoir accepté d'évaluer ma thèse.*

*Mes sincères remerciements s'adressent à Madame **HATTAB Zhou**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar-Annaba, pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse.*

*Je tiens à remercier profondément Monsieur **LEGSIER Belgacem** Professeur à l'Université Badji Mokhtar-Annaba, qui ma fait l'honneur d'examiner ce travail.*

*Ma gratitude d'adresse à Madame **SMARA Ouannisa**, MCA. Université Kasdi Merbeh-Ouargla, pour avoir accepté de faire partie du jury et de juger ce travail.*

*Ma gratitude d'adresse également à Madame **ALI RACHEDI Fahima**, MCA. Université Mohamed Cherif Messaidia-Souk Ahras, qui ma fait l'honneur d'examiner ce travail.*

*J'exprime ma gratitude à Monsieur **DJEROUROU Abdelhafid**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de recherche.*

*Je veux faire part aussi de toute ma gratitude à Monsieur **ÇAKMAK Yavuz Selim**, Professeur à l'Université d'Aksaray (Turquie) et membre du laboratoire de biotechnologie et biologie moléculaire, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de recherche. Je remercie, également, l'étudiante de master **MOHAMMED ELSHEIKH Sarah** (Iraq) qui m'a beaucoup aidé.*

*Je remercie aussi Madame **MELLOUK Karima**, MCB à l'Université Badji Mokhtar-Annaba, pour toute l'aide qu'elle m'a apportée, je la remercie aussi pour son soutien, ses conseils, sa sympathie et sa grande générosité.*

*La personne qui m'a motivé, encouragé et poussé pour terminer ce travail quand c'était nécessaire, ma collègue, **BENTOUMI Houria**, trouve ici l'expression de ma reconnaissance.*

*Un immense merci pour mes amies et collègues : **LACHTER Zohra**, **BENAMARA Nour-Elhouda**, **RAZI Samra**.*

*Enfin, je remercie toutes celles, et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

## Résumé

Dans le cadre de la valorisation de la flore Algérienne, nous nous sommes intéressés à une espèce de la famille des Ranunculaceae, espèce qui se trouve en Algérie, région de Souk Ahras : *Clematis cirrhosa* L. Le choix de cette plante a été basé sur son utilisation en médecine traditionnelle comme un agent diurétique, pour soulager les douleurs rhumatismales pour soigner et pour traiter le nerf sciatique.

Les résultats de l'enquête ethnobotanique nous ont mené à travaillé sur les parties aériennes à savoir les deux extraits (méthanolique et hydrométhanolique) et sur l'huile essentielle. Dans la première partie nous avons fait un criblage phytochimique des parties aériennes, qui a révélé plusieurs métabolites secondaires, notamment les flavonoïdes, les tanins, les saponosides et les phénols totaux. Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux des extraits méthanoliques et hydrométhanoliques (7/3) ont été évaluées à l'aide de méthodes colorimétriques. Cette analyse quantitative révèle que l'extrait méthanolique est le plus riche en polyphénols et flavonoïdes totaux ( $84.05 \pm 0.8$  mg EAG/g) ( $114.60 \pm 2.42$  mg EQ/g) respectivement.

La deuxième partie de ce travail a été consacré à une étude chromatographique à savoir la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC/DAD) et la chromatographie en phase gazeuse (GC/MS) des extraits des parties aériennes et des huiles essentielles respectivement.

L'analyse (HPLC/DAD) a révélé que les extraits étudiés étaient riches en (9) acide benzoïque, (5) acide hydroxybenzoïque, (2) catéchine, (4) acide caféique et (6) épicatechine. Alors que l'analyse (GC/MS) de l'huile essentielle a révélé la présence de 12 composés dont les trois composés prédominants sont (21) phytol (30.1%), (22) acide palmitique (29%), (17) juniper camphor (14.5%).

Une étude biologique a été réalisée dans la troisième partie du travail, pour les extraits méthanolique et hydrométhanolique et pour l'huile essentielle à savoir l'activité antioxydante qui a été évaluée par plusieurs méthodes (TAC, DPPH<sup>·</sup>, ABTS<sup>+</sup>, FRAP et CUPRAC), tandis que l'activité inhibitrice d'enzymes des quatre enzymes ( $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, cholinestérase, tyrosinase) n'a été évaluée que pour les deux extraits (méthanolique et hydrométhanolique).

Les résultats de l'étude biologique ont montré que l'extrait méthanolique avait la capacité antioxydante la plus élevée et que les deux extraits avaient une activité inhibitrice d'enzyme notable.

**Mots clés:** *Clematis*, Renonculacées, Polyphénols, Huile essentielle, Antioxydant, Inhibition enzymatique, HPLC / DAD.

## *Abstract*

As part of the enhancement of the Algerian flora, we were interested in a species of the Ranunculaceae family, a species found in Algeria, Souk Ahras region: *Clematis cirrhosa* L.. The choice of this plant was based on its use in traditional medicine as a diuretic agent, to relieve rheumatic pain to heal and to treat the sciatic nerve.

The results of the ethnobotanical investigation led us to work on the aerial parts, namely the two extracts (methanolic and hydromethanolic) and on the essential oil. In the first part we did a phytochemical screening of the aerial parts, which revealed several secondary metabolites, including flavonoids, tannins, saponins and total phenols. The contents of total polyphenols and total flavonoids in the methanolic and hydromethanolic extracts (7/3) were evaluated using colorimetric methods. This quantitative analysis reveals that the methanolic extract is the richest in total polyphenols and flavonoids ( $84.05 \pm 0.8$  mg GAE / g) ( $114.60 \pm 2.42$  mg QE / g) respectively.

The second part of this work was devoted to a chromatographic study namely high performance liquid chromatography (HPLC/DAD) and gas chromatography (GC/MS) of extracts of aerial parts and essential oils respectively.

Analysis (HPLC/DAD) revealed that the extracts studied were rich in (9) benzoic acid, (5) hydroxybenzoic acid, (2) catechin, (4) caffeic acid and (6) epicatechin. While, the analysis (GC/MS) of the essential oil revealed the presence of 12 compounds of which, the three predominant compounds are (21) phytol (30.1%), (22) palmitic acid (29%) and (17) juniper camphor (14.5%).

A biological study was carried out in the third part of the work, for the methanolic and hydromethanolic extracts and for the essential oil, namely the antioxidant activity which was evaluated by several methods (TAC, DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>, FRAP and CUPRAC), while the enzyme inhibitory activity of the four enzymes ( $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, cholinesterase, tyrosinase) was only evaluated for the two extracts (methanolic and hydromethanolic).

The results of the biological study showed that the methanolic extract had the highest antioxidant capacity and that both extracts had a notable enzyme inhibitor activity.

**Keywords:** *Clematis*, Ranunculaceae, Polyphenols, Essential oil, Antioxidant, Enzymatic inhibition, HPLC/DAD.

## ملخص

في إطار تثمين النباتات الجزائرية، اهتمنا في عملنا هذا بصنف من عائلة Ranunculaceae ، *Clematis cirrhosa* وهو صنف موجود في الجزائر، منطقة سوق أهراس. لقد تم اختيار هذا النبات اعتمادا على استخدامه في الطب التقليدي كعامل مدر للبول ، لتخفيف الآلام الروماتيزمية ولعلاج العصب الوركي.

لقد وجهتنا نتائج التحقيق العرقي النباتي إلى العمل على الأجزاء الهوائية ، أي المستخلصين (الميثانولي والهيدروميثانول) وعلى الزيت العطري. في الجزء الأول ، أجرينا فحصًا كيميائيًا نباتيًا للأجزاء الهوائية ، والذي كشف عن العديد من المستقلبات الثانوية ، بما في ذلك مركبات الفلافونويد والعفص والصابونين والفينولات الكلية. ولقد تم تقييم محتويات البوليفينول الكلي والفلافونويد الكلي في المستخلصات الميثانولية والهيدروميثانولية (3/7) باستخدام طرق القياس اللوني. كشف هذا التحليل الكمي أن المستخلص الميثانولي هو الأغنى في إجمالي البوليفينول والفلافونويد ( $0.8 \pm 84.05$  g/EAG mg) و ( $2.42 \pm 114.60$  g/EQ mg) على التوالي.

خصص الجزء الثاني من هذا العمل لدراسة كروماتوجرافية وهي تحليل كروماتوجرافي سائل عالي الدقة (HPLC/DAD) وكروماتوجرافيا الغاز (GC/MS) لمستخلصات الأجزاء الهوائية والزيوت الأساسية على التوالي.

أظهر التحليل (HPLC/DAD) أن المستخلصات المدروسة كانت غنية بـ (9) حمض البنزويك ، (5) حمض الهيدروكسي بنزويك ، (2) الكاتشين ، (4) حامض الكافيين و (6) الأبيكاتشين. في حين أن تحليل (GC/MS) للزيت العطري أظهر وجود 12 مركبًا منها ثلاث مركبات سائدة وهي (21) فيتول (30.1%) ، (22) حمض البالميتيك (29%) ، (17) كافور العرعر (14.5%).

في الجزء الثالث من العمل تم إجراء دراسة بيولوجية للمستخلصات الميثانولية والهيدروميثانولية والزيوت الأساسية ، ويتمثل ذلك في نشاط مضادات الأكسدة التي تم تقييمها بعدة طرق (TAC و DPPH\* و ABTS\*+ و FRAP و CUPRAC) ، بينما تم تقييم النشاط المثبط للإنزيم للأنزيمات الأربعة ( $\alpha$ -amylase و  $\alpha$ -glucosidase و tyrosinase و cholinesterase) فقط للمستخلصين (الميثانولي والهيدروميثانولية).

أظهرت نتائج الدراسة البيولوجية أن المستخلص الميثانولي لديه أعلى قدرة مضادة للأكسدة وأن كلا المستخلصين لهما نشاط ملحوظ لتثبيط الإنزيمات.

**الكلمات المفتاحية:** Ranunculaceae, *Clematis* ، بوليفينول ، زيت عطري ، مضاد للأكسدة ، تثبيط إنزيمي ،

HPLC/DAD.



## Liste des abréviations

<b>ABTS<sup>+</sup></b>	2,2'-azinobis (acide 3-éthylbenzothiazoline 6-sulfonique)
<b>ACh</b>	Acétylcholine
<b>AChE</b>	Enzyme acétylcholinestérase
<b>ADCO</b>	Enzyme amorpha-4,11-diène C-12 oxydase
<b>ADMO</b>	Enzyme amorpha-4,11-diène mono-oxygénase
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADS</b>	Enzyme Amorpha-4,11-diène synthase
<b>ATPase</b>	Enzyme adénosine-triphosphate
<b>BAS</b>	Beta-amyrin synthèse
<b>BHT</b>	2,6-di-tert-butyl-4-méthoxyphénol
<b>BHA</b>	Hydroxyanisole butylé
<b>BChE</b>	Enzyme butyrylcholinestérase
<b>BTCL</b>	butyrylthiocholine
<b>CAT</b>	Enzyme catalase
<b>CHI</b>	Enzyme la chalcone isomérase
<b>CHS</b>	Enzyme chalcone synthase
<b>CUPRAC</b>	pouvoir antioxydant réducteur des ions cuivriques
<b>C4H</b>	Enzyme acide cinnamique-4-hydroxylase
<b>4CL</b>	la 4-coumarate /CoA ligase
<b>DA</b>	dopamine
<b>DMAPP</b>	diphosphate diméthylallyl
<b>DOPA</b>	3,4-dihydroxy-phénylalanine
<b>DPPH</b>	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
<b>DXR</b>	Enzyme 1-deoxy-D-xylose-5-phosphate reducto-isomérase
<b>DXS</b>	Enzyme 1-deoxy-D-xylose-5-phosphate synthase
<b>DTNB</b>	5,5' dithio-bis 2-nitrobenzoate
<b>EAA</b>	Equivalents d'acide Ascorbique
<b>EAG</b>	Equivalent d'acide Gallique
<b>EQ</b>	Equivalent quercétine
<b>ERA</b>	Espèces réactives des azotes
<b>ERO</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>FDS</b>	Enzyme farnesyl diphosphate synthase

<b>FLS</b>	Enzyme flavonol synthase
<b>FRAP</b>	Pouvoir antioxydant réducteur ferrique
<b>FT</b>	Flavonoïdes totaux
<b>F3H</b>	Enzyme flavanone 3-hydroxylase
<b>F3'H</b>	Enzyme flavonoïde 3'-hydroxylase
<b>F3'5'H</b>	Enzyme flavonoïde 3'5'-hydroxylase
<b>GP<sub>x</sub></b>	Enzyme La glutathion peroxydase
<b>GC/MS</b>	chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectrophotomètre de masse
<b>HD</b>	l'hydrodistillation
<b>HE</b>	Huile essentielle
<b>HMGR</b>	Enzyme hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase
<b>HPLC/DAD</b>	chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes
<b>IATC</b>	Iodure d'acétylthiocholine
<b>IPP</b>	Enzyme diphosphate d'isopentényle
<b>IPP Isomérase</b>	Enzyme Isopentyl diphosphate isomérase
<b>ir</b>	Indice de rétention
<b>LVis</b>	Lumière visible
<b>MA</b>	Maladie d'Alzheimer
<b>MP</b>	Maladie de Parkinson
<b>NAD(P)H</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>ORAC</b>	Capacité d'absorption des radicaux oxygène
<b>PAL</b>	Enzyme phénylalanine-ammonium-lyase
<b>PT</b>	Polyphénols totaux
<b>SET</b>	Transfert d'un seul électron
<b>TAH</b>	Transfert d'atome d'hydrogène
<b>SQC</b>	Enzyme sesquiterpène cyclase
<b>SQS</b>	Enzyme squalène synthase
<b>SOD</b>	Enzyme superoxyde dismutase
<b>TEAC</b>	Capacité antioxydante équivalente du trolox
<b>TNB</b>	Thio-2-N-nitro-Benzoate
<b>TPTZ</b>	Tripyridyltriazine

<b>TRAP</b>	Paramètre antioxydant de piégeage des radicaux totaux
<b>TRP-1</b>	Protéine 1 liée à la tyrosinase
<b>TRP-2</b>	Protéine 2 liée à la tyrosinase

## SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	1
Références bibliographiques .....	5

### Partie 1 : Synthèse Bibliographique

#### Chapitre I : Etude Botanique et Ethnobotanique

<b>I-1 Etude botanique .....</b>	<b>7</b>
I-1.1 La Famille Ranunculaceae.....	7
I-1.1.1 Position systématique .....	7
I-1.1.2 Caractéristiques botaniques .....	7
I-1.1.3 Distribution géographique .....	7
I-1.2 Le genre <i>Clematis</i> .....	8
I-1.2.1 Position systématique .....	8
I-1.2.2 Caractéristiques botaniques .....	8
I-1.2.3 Distribution géographique .....	8
I-1.3 L'espèce <i>Clematis cirrhosa</i> L.....	9
I-1.3.1 Description botanique.....	9
I-1.3.2 Classification botanique .....	10
I-1.3.3 Distribution géographique .....	10
<b>I-2 Etude ethnobotanique.....</b>	<b>11</b>
I-2.1 Utilisation des Ranunculaceae en médecine traditionnelle .....	11
I-2.2 Utilisation du genre <i>Clematis</i> en médecine traditionnelle.....	12
I-2.3 Utilisation de l'espèce <i>Clematis cirrhosa</i> L. en médecine traditionnelle.....	14
<b>I-3 Enquête ethnobotanique.....</b>	<b>14</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>15</b>

#### Chapitre II : Métabolites secondaires des plantes

<b>II-1 Généralité .....</b>	<b>20</b>
<b>II-2 Classification des métabolites secondaires .....</b>	<b>21</b>
<b>II-2.1 Les composés phénoliques .....</b>	<b>21</b>
II-2.1.1 Définition des composés phénoliques .....	21
II-2.1.2 Classification des composés phénoliques.....	22
II-2.1.2.1 Les phénols simples .....	22

II-2.1.2.2 Les acides phénoliques .....	23
II-2.1.2.2.1 Les acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque .....	23
II-2.1.2.2.2 Les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique .....	24
II-2.1.2.3 Les tanins .....	25
II-2.1.2.3.1 Les tannins hydrolysables .....	25
II-2.1.2.3.2 Les tanins condensés .....	26
II-2.1.2.4 Les coumarines .....	26
II-2.1.2.5 Les flavonoïdes .....	28
II-2.1.2.5.1 Les flavones .....	29
II-2.1.2.5.2 Les isoflavones.....	29
II-2.1.2.5.3 Les flavonols.....	30
II-2.1.2.5.4 Les flavanones .....	30
II-2.1.2.5.5 Les flavan-3-ols.....	31
II-2.1.2.5.6 Les flavan-3,4-diols.....	31
II-2.1.2.5.7 Les chalcones .....	32
II-2.1.2.5.8 Les aures .....	33
II-2.1.2.5.9 Les anthocyanes .....	33
II-2.1.2.6 Les xanthes .....	34
II-2.1.2.6.1 Les xanthes oxygénées simples.....	35
II-2.1.2.6.2 Les xanthe glycosylées .....	35
II-2.1.2.6.3 Les xanthes prénylées .....	36
II-2.1.2.6.4 Les xanthonolignoïdes.....	36
II-2.1.2.6.5 Les bisxanthes .....	37
II-2.1.2.6.6 Les miscellaneous .....	38
II-2.1.2.7 Les stilbènes.....	38
II-2.1.2.8 Les lignanes .....	39
II-2.1.3 Biosynthèse des polyphénols.....	41
II-2.1.4 Effets biologiques des polyphénols .....	44
<b>II-2.2 Les terpènes .....</b>	<b>47</b>
II-2.2.1 Définitions des terpènes .....	47
II-2.2.2 Classification des terpènes .....	47
II-2.2.2.1 Les hémiterpène .....	48
II-2.2.2.2 Les monoterpènes .....	48
II-2.2.2.3 Les sesquiterpènes.....	49

II-2.2.2.4 Les diterpènes .....	49
II-2.2.2.5 Les sesterterpènes .....	49
II-2.2.2.6 Les triterpènes.....	50
II-2.2.2.7 Les tétraterpénoïde.....	51
II-2.2.3 Biosynthèse des terpènes.....	51
II-2.2.4 Effets biologiques des terpènes .....	53
<b>II-2.3 Les alcaloïdes .....</b>	<b>54</b>
II-2.3.1 Définitions des alcaloïdes.....	54
II-2.3.2 Classification des alcaloïdes.....	55
II-2.3.2.1 Les vrais alcaloïdes .....	55
II-2.3.2.2 Les protoalcaloïdes.....	55
II-2.3.2.3 Les pseudoalcaloïdes.....	55
II-2.3.3 Biosynthèse des alcaloïdes .....	55
II-2.3.4 Effets biologiques des alcaloïdes.....	56
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>59</b>

### Chapitre III : Etudes phytochimiques antérieures

<b>III-1 Etudes phytochimiques antérieures sur le genre <i>Clematis</i> .....</b>	<b>71</b>
III-1.1 Saponines .....	71
III-1.2 Flavonoïdes .....	75
III-1.3 Alcaloïdes.....	79
III-1.4 Coumarines .....	80
III-1.5 Lignanes .....	81
III-1.6 Stéroïdes.....	83
<b>III-2 Etudes phytochimiques antérieures sur le genre <i>Clematis cirrhosa L.</i>.....</b>	<b>84</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>87</b>

### Chapitre IV : Activité biologique

<b>IV-1 Activité antioxydante .....</b>	<b>90</b>
IV-1.1 Les radicaux libres.....	90
IV-1.1.1 Les espèces réactives de l'oxygène .....	91
IV-1.1.1.1 Le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ).....	91
IV-1.1.1.2 Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).....	91
IV-1.1.1.3 Radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ).....	92

IV-1.1.1.4 L'oxygène singulet .....	92
IV-1.1.1.5 Autres formes radicalaires .....	93
IV-1.1.2 Les espèces réactives de l'azote .....	93
IV-1.2 Sources des espèces réactives de l'oxygène .....	94
IV-1.2.1 Sources endogènes des espèces réactives de l'oxygène .....	94
IV-1.2.2 Sources exogènes des espèces réactives de l'oxygène .....	94
IV-1.2.3 Action des radicaux libres .....	95
IV-1.3 Le stress oxydatif .....	95
IV-1.4 Principales cibles des radicaux libres .....	96
IV-1.4.1 Oxydation des composés lipidiques .....	96
IV-1.4.2 Oxydation des composés protéiques .....	97
IV-1.4.3 Oxydation de l'ADN .....	98
IV-1.4.4 Oxydation des glucides .....	98
IV-1.5 Maladies liées au stress oxydatif .....	99
IV-1.6 Les antioxydants .....	100
IV-1.6.1 Les systèmes de défense antioxydants enzymatiques .....	101
IV-1.6.1.1 La superoxyde dismutase (SOD) .....	101
IV-1.6.1.2 La catalase (CAT) .....	101
IV-1.6.1.3 La glutathion peroxydase (GPX) .....	102
IV-1.6.2 Les systèmes de défense antioxydants non-enzymatiques .....	102
IV-1.6.2.1 Antioxydants endogènes .....	102
IV-1.6.2.1.1 Le glutathion .....	102
IV-1.6.2.1.2 L'acide urique .....	103
IV-1.6.2.2 Systèmes antioxydants exogènes .....	103
IV-1.6.2.2.1 La vitamine C (l'acide ascorbique) .....	104
IV-1.6.2.2.2 Vitamine E .....	104
IV-1.6.2.2.3 Les caroténoïdes .....	105
IV-1.6.2.2.4 Les composés phénoliques .....	105
IV-1.6.2.3 Antioxydants synthétiques .....	106
IV-1.7 Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante in vitro .....	107
<b>IV-2 Activité inhibitrice d'enzymes .....</b>	<b>108</b>
IV-2.1 Les enzymes .....	108
IV-2.2 Les inhibiteurs d'enzyme .....	108
IV-2.3 Enzymes et santé humaine .....	108

IV-2.4 Effet des inhibiteurs naturels sur les maladies issues du stress oxydatif.....	109
IV-2.4.1 Les maladies neurodégénératives.....	109
IV-2.4.2 Le diabète de type II.....	110
IV-2.4.3 L'hyperpigmentation cutané.....	111
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>113</b>

## **Partie 2 : Travaux personnels**

### **Chapitre V : Matériels et méthodes d'analyses**

<b>V-1 Matériels végétaux.....</b>	<b>119</b>
<b>V-2 Enquête ethnobotanique.....</b>	<b>119</b>
V-2.1 Fiche d'enquête.....	119
<b>V-3 Extraction.....</b>	<b>119</b>
V-3.1 Extraction de la matière végétale par ultrason.....	119
V-3.1.1 Principe.....	119
V-3.1.2 Mise en œuvre pratique.....	120
V-3.2 Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.....	121
V-3.2.1 Principe.....	121
V-3.2.2 Mise en œuvre pratique.....	122
V-4 Screening phytochimique.....	122
V-4.1 Analyse qualitative sur Chromatographie sur couche mince (CCM).....	123
V-4.1.1 Révélation des phénols totaux.....	123
V-4.1.2 Révélation des flavonoïdes.....	123
V-4.1.3 Révélation des tanins.....	123
V-4.1.4 Révélation des alcaloïdes.....	123
V-4.1.5 Caractérisation des saponosides.....	123
V-4.2 Analyses quantitatives des composés phénoliques.....	124
V-4.2.1 Dosage des polyphénols totaux.....	124
V-4.2.1.1 Principe.....	124
V-4.2.1.2 Mise en œuvre pratique.....	124
V-4.2.2 Dosage des flavonoïdes totaux.....	125
V-4.2.2.1 Principe.....	125
V-4.2.2.2 Mise en œuvre pratique.....	125
<b>V-5 Analyses chromatographiques.....</b>	<b>125</b>



V-5.1	Analyse des extraits par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC/DAD).....	125
V-5.1.1	Principe .....	125
V-5.1.2	Mise en œuvre pratique.....	126
V-5.2	Analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectrophotomètre de masse (GC/MS) .....	127
V-5.2.1	Principe .....	127
V-5.2.2	Mise en œuvre pratique.....	128
<b>V-6</b>	<b>Etude biologique in vitro de l'espèce <i>Clematis cirrhosa</i> L.....</b>	<b>129</b>
V-6.1	Activité antioxydante.....	129
V-6.1.1	Capacité antioxydante totale (CAT) .....	129
V-6.1.1.1	Principe .....	129
V-6.1.1.2	Mise en œuvre pratique.....	129
V-6.1.2	Le pouvoir réducteur du fer (Test FRAP) .....	130
V-6.1.2.1	Principe .....	130
V-6.1.2.2	Mise en œuvre pratique.....	131
V-6.1.3	Capacité de réduction du cuivre (Test CUPRAC).....	131
V-6.1.3.1	Principe .....	131
V-6.1.3.2	Mise en œuvre pratique.....	132
V-6.1.4	Capacité de piégeage des radicaux libres ABTS <sup>+</sup> .....	132
V-6.1.4.1	Principe .....	132
V-6.1.4.2	Mise en œuvre pratique.....	132
V-6.1.5	Capacité de piégeage des radicaux libres DPPH <sup>*</sup> .....	133
V-6.1.5.1	Principe .....	133
V-6.1.5.2	Mise en œuvre pratique.....	134
V-6.2	Activités enzymatiques .....	134
V-6.2.1	Activité inhibitrice de cholinestérase.....	134
V-6.2.1.1	Principe .....	134
V-6.2.1.2	Mise en œuvre pratique.....	135
V-6.2.	Activité Inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase.....	135
V-6.2.2.1	Principe .....	135
V-6.2.2.2	Mise en œuvre pratique.....	136
V-6.2.3	Activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase .....	136
V-6.2.3.1	Principe .....	136

V-6.2.3.2 Mise en œuvre pratique .....	137
V-6.2.4 Activité inhibitrice de la tyrosinase .....	137
V-6.2.4.1 Principe .....	137
V-6.2.4.2 Mise en œuvre pratique .....	138
<b>V-7 Evaluation statistique .....</b>	<b>138</b>
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>139</b>

## Chapitre VI : Résultats et discussion

<b>VI-1 Enquête ethnobotanique .....</b>	<b>144</b>
VI-1.1 Utilisation de <i>Clematis cirrhosa</i> L. selon le sexe .....	145
VI-1.2 Utilisation de <i>Clematis cirrhosa</i> L. selon l'âge .....	146
VI-1.3 Utilisation de <i>Clematis cirrhosa</i> L. le niveau d'étude.....	146
VI-1.4 Utilisation de <i>Clematis cirrhosa</i> L. selon le mode d'utilisation et la maladie traitée .....	147
VI-1.5 Utilisation de <i>Clematis cirrhosa</i> L. selon la partie utilisée .....	148
<b>VI-2 Résultats de l'extraction.....</b>	<b>148</b>
VI-2.1 Extraction de la matière végétale par l'ultrason.....	148
VI-2.2 Extraction des huiles essentielles des parties aériennes .....	151
<b>VI-3 Screening phytochimique.....</b>	<b>151</b>
VI-3.1 Analyse qualitative sur Chromatographie sur couche mince (CCM).....	151
VI-3.2 Résultats d'analyses quantitatives des composés phénoliques .....	152
VI-3.2.1 Dosage des polyphénols totaux.....	152
VI-3.2.2 Dosage des flavonoïdes totaux.....	152
<b>VI-4 Analyses chromatographiques.....</b>	<b>154</b>
VI-4.1 Identification de la composition phénolique par chromatographie liquide à haute performance couplée d'un détecteur à barrette de diodes (HPLC/DAD) .....	154
VI-4.2 Identification des constituants des huiles essentielles par chromatographie en (GC/MS).....	158
<b>VI-5 Activités biologiques.....</b>	<b>162</b>
VI-5.1 Activité antioxydante.....	162
VI-5.1.1 Capacité antioxydante totale (TAC).....	163
VI-5.1.2 Le pouvoir réducteur du fer (Test FRAP).....	164
VI-5.1.3 Capacité de réduction du cuivre (Test CUPRAC).....	167

VI-5.1.4 Capacité de piégeage des radicaux libres ABTS <sup>+</sup> .....	168
VI-5.1.5 Capacité de piégeage des radicaux libres DPPH <sup>•</sup> .....	169
VI-5.2 Activités inhibitrice d'enzymes.....	171
VI-5.2.1 Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase .....	171
VI-5.2.2 Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase.....	173
VI-5.2.3 Activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase et l' $\alpha$ -amylase.....	173
VI-5.2.4 Activité inhibitrice de tyrosinase.....	175
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>177</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>185</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>188</b>

## Liste des figures

### Partie 1 : Revue Bibliographique

#### Chapitre I : Etude Botanique et Ethnobotanique

<b>Figure I-1</b> : Espèce <i>Clematis cirrhosa</i> L. ....	9
<b>Figure I-2</b> : Distribution géographique de <i>Clematis Cirrhosa</i> L. ....	11

#### Chapitre II : Métabolites secondaires des plantes

<b>Figure II-1</b> : Structure de base de phénol .....	21
<b>Figure II-2</b> : Structure de quelques phénols simples.....	23
<b>Figure II-3</b> : Structures de quelques acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque ....	24
<b>Figure II-4</b> : Structures de quelques Acide phénoliques dérivés de l'acide cinnamique ...	24
<b>Figure II-5</b> : Structure de tannin hydrolysable.....	26
<b>Figure II-1</b> : Formule chimique de la coumarine.....	27
<b>Figure II-7</b> : Structures de quelques coumarines .....	28
<b>Figure II-8</b> : Structure de base des flavonoïdes .....	28
<b>Figure II-2</b> : Structure d'Apéginine, Lutéoline, Tricine.....	29
<b>Figure II-10</b> : Structure de quelques flavonols .....	30
<b>Figure II-11</b> : Structure de quelques flavanones.....	31
<b>Figure II-12</b> : Structure de quelques flavan-3ols .....	31
<b>Figure II-13</b> : Structure de Leucorobinétinidine .....	32
<b>Figure II-14</b> : Structure de base des chalcones .....	32
<b>Figure II-15</b> : Structure de quelques chalcones .....	33
<b>Figure II-16</b> : Structure de quelques aurones .....	33
<b>Figure II-17</b> : Structure de quelques anthocyanes .....	34
<b>Figure II-18</b> : Structure de base des xanthones.....	35
<b>Figure II-19</b> : Structure de quelques xanthones oxygénées simples .....	35
<b>Figure II-20</b> : Structure de xanthone glycosylées .....	36
<b>Figure II-21</b> : Structure de quelques xanthones prénylées .....	36
<b>Figure II-22</b> : Structure de quelques xanthonolignoides .....	37
<b>Figure II-23</b> : Structure de quelques bisxanthones .....	37
<b>Figure II-24</b> : Structure de base des stilbènes (E, Z).....	38

<b>Figure II-25</b> : Structure de quelques stilbènes .....	38
<b>Figure II-26</b> : Structure de base des lignanes .....	39
<b>Figure II-27</b> : Structure de différentes classes des lignanes .....	40
<b>Figure II-28</b> : Biosynthèse des flavonoïdes partition d'acide shikimique .....	41
<b>Figure II-29</b> : Biosynthèse des flavonoïdes partition dephénylpropanoïde.....	42
<b>Figure II-30</b> : Biosynthèse des flavonoïdes partition du flavonoïde.....	44
<b>Figure II-31</b> : Structure de la molécule d'isoprène .....	47
<b>Figure II-32</b> : Structure de quelques hémiterpènes .....	48
<b>Figure II-33</b> : Structure de quelques monoterpène .....	48
<b>Figure II-34</b> : Structure de quelques sesquiterpènes .....	49
<b>Figure II-35</b> : Structure d'un diterpène isolé du café .....	49
<b>Figure II-36</b> : Structure d' $\alpha$ -Santalol (Sesterterpène) .....	50
<b>Figure II-37</b> : Structure des triterpènes .....	50
<b>Figure II-38</b> : Structure de quelques tétraterpenoïdes.....	51
<b>Figure II-39</b> : Biosynthèse des terpènes .....	52

## **Chapitre IV : Activités biologiques**

<b>Figure IV-1</b> : Schéma de production des radicaux libres .....	94
<b>Figure IV-2</b> : Oxydation des composés lipidiques.....	97
<b>Figure IV-3</b> : Effets des radicaux libres sur les tissus ciblés .....	99
<b>Figure IV-4</b> : Oxydation d'acide urique .....	103
<b>Figure IV-5</b> : Oxydation d'acide ascorbique .....	104
<b>Figure IV-6</b> : Structure des Tocophérols.....	105
<b>Figure IV-7</b> : Structure chimique de Trolox, BHA et BHT .....	107

## **Partie 2 : Travaux Personnels**

### **Chapitre V : Matériels et méthodes d'analyses**

<b>Figure V-1</b> : Appareil à ultrason .....	120
<b>Figure V-2</b> : Hydrodistillateur de type Clevenger.....	122
<b>Figure V-3</b> : Appareil GC/MS Agilent 7890 .....	129
<b>Figure V-4</b> : Réduction du complexe d'ions ferriques Fe(III)-TPTZ .....	130

<b>Figure V-5</b> : Réduction du cation bis (néocuproïne) cuivre (II) .....	131
<b>Figure V-6</b> : Réduction de radical ABTS <sup>•+</sup> .....	132
<b>Figure V-7</b> : Réaction de piégeage de DPPH <sup>•</sup> .....	133
<b>Figure V-8</b> : Réaction catalysée par l'enzyme $\alpha$ -glucosidase .....	137

## Chapitre VI : Résultats et discussion

<b>Figure VI-1</b> : Pourcentage d'utilisation de <i>Clematis cirrhosa</i> L. selon le sexe.....	145
<b>Figure VI-2</b> : Pourcentage d'utilisation de <i>Clematis cirrhosa</i> L. selon l'âge.....	146
<b>Figure VI-3</b> : pourcentage d'utilisation de <i>Clematis cirrhosa</i> L. selon le niveau d'étude .	146
<b>Figure VI-4</b> : pourcentage d'utilisation de <i>Clematis cirrhosa</i> L. selon le mode d'utilisation et la maladie traitée .....	147
<b>Figure VI-5</b> : pourcentage d'utilisation de <i>Clematis cirrhosa</i> L. selon la partie utilisée ...	148
<b>Figure VI-6</b> : Protocole de l'extraction de la matière végétale par le solvant : méthanol..	149
<b>Figure VI-7</b> : Protocole de l'extraction de la matière végétale par le solvant : méthanol/H <sub>2</sub> O v/v (70%) .....	150
<b>Figure VI-8</b> : Huile essentielle de <i>Clematis cirrhosa</i> L. ....	151
<b>Figure VI-9</b> : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	152
<b>Figure VI-10</b> : Courbe d'étalonnage de la quercétine .....	153
<b>Figure VI-11</b> : Distribution des composants de l'huile essentielle de <i>Clematis cirrhosa</i> L.....	160
<b>Figure VI-12</b> : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique en utilisant le test TAC .....	163
<b>Figure VI-13</b> : Courbe de Trolox de l'acide ascorbique en utilisant le test FRAP .....	165
<b>Figure VI-14</b> : Courbes représentant l'activité antioxydante des extraits et de l'huile essentielle de <i>Clematis cirrhosa</i> L., BHA et BHT en utilisant le test CUPRAC .....	167
<b>Figure VI-15</b> : Courbe de Trolox utilisé en test ABT .....	168
<b>Figure VI-16</b> : Résultats sur microplaque montrant la coloration en test anti-cholinestérase .....	172
<b>Figure VI-17</b> : Résultats sur microplaque montrant la coloration en test d'inhibition d' $\alpha$ -glucosidase et $\alpha$ -amylase .....	174
<b>Figure VI-18</b> : Résultats sur microplaque montrant la coloration en test antityrosinase ...	176

## Liste des Tableaux

### Partie 1 : Revue Bibliographique

#### Chapitre II: Métabolites secondaires des plantes

<b>Tableau II-1</b> : Effets biologiques des polyphénols .....	45
<b>Tableau II-2</b> : Effets biologiques des terpènes .....	53
<b>Tableau II-3</b> : Effets biologiques des alcaloïdes.....	56

### Partie 02 : Travaux personnels

#### Chapitre V: Matériels et méthodes d'analyse

<b>Tableau V-1</b> : Conditions expérimentales d'HPLC/DAD.....	126
--	-----

#### Chapitre VI: Résultats et discussions

<b>Tableau VI-1</b> : Utilisation de la plante <i>Clematis cirrhosa</i> L. par les habitants de Souk Ahras.....	144
<b>Tableau VI-2</b> : Utilisation de la plante <i>Clematis cirrhosa</i> L. par les habitants d'Annaba .	145
<b>Tableau VI-3</b> : Screening phytochimique de la partie aérienne de la plante <i>Clematis cirrhosa</i> L.....	151
<b>Tableau VI-4</b> : Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des deux extraits de <i>Clematis cirrhosa</i> L. ....	153
<b>Tableau VI-5</b> : Temps de rétention et structure chimique des standards phénoliques utilisés .....	155
<b>Tableau VI-6</b> : Profil, temps de rétention et concentration des composés phénoliques des extraits de <i>Clematis cirrhosa</i> L. ....	157
<b>Tableau VI-7</b> : Analyse quantitative et qualitative de l'huile essentielle de <i>Clematis cirrhosa</i> L.....	159
<b>Tableau VI-8</b> : Activité antioxydante des deux extraits et d'huile essentielle de <i>Clematis. cirrhosa</i> L.....	164
<b>Tableau VI-9</b> : Activités inhibitrice d'enzyme des deux extraits de la plante <i>Clematis cirrhosa</i> L. ....	172

# ***INTRODUCTION***



*PARTIE 01*

*SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE*

***PARTIE 01***

***CHAPITRE I***

***Etude Botanique et Ethnobotanique***

## I-1 Etude botanique

### I-1.1 La Famille Ranunculaceae

#### I-1.1.1 Position systématique

La famille des plantes Ranunculaceae (eudicot Ranunculales), compte environ 60 genres et 2200 espèces, composées principalement d'herbes dont certaines sont de petits arbustes ou des vignes ligneuses [1]. **Tamura (1993)** a divisé les renonculacées en cinq sous-familles (Hydrastidoideae, Thalictroideae, Isopyroideae, Ranunculoideae et Helleboroideae), principalement basé sur les caractéristiques chromosomiques et florales [2, 3].

#### I-1.1.2 Caractéristiques botaniques

Les Ranunculaceae sont des herbes ou des sous-arbrisseaux sarmenteux ; leurs racines sont le plus souvent composées de fibres épaisses ou de tubercules disposés en faisceau ; leurs feuilles sont alternés ou opposées, toujours simples et dépourvues de stipules, tantôt entières et découpées, fréquemment élargies à leur base en forme de gaine [4]. Leurs fleurs hermaphrodites, régulières ou irrégulières, solitaires ou disposées en grappe ou en panicule. Calice à 3-15 sépales, le plus souvent 5, libres, quelquefois colorés. Corolle à 3-15 pétales, ordinairement 5, parfois en forme de cornet ou en tube. Les étamines sont nombreuses, libre, à anthères tournées en dehors (anthères extrorses), ou tournées dedans (anthères introrses). Les étamines sont nombreuses, disposées en spirale. Les staminodes sont absents (sauf dans *Aquilegia* et *Clematis*). Le pistil est composé de carpelles presque toujours libres, souvent nombreux [5].

Les fruits sont ou de petits akènes comprimés disposés en capitules; ou bien des capsules agrégées, distinctes ou soudées, quelques fois solitaires, uniloculaires, polyspermes, s'ouvrant par leur bord ou face interne. Les graines ont leur embryon renfermé dans la base d'un endosperme charnu ou corné [6].

#### I-1.1.3 Distribution géographique

La famille Ranunculaceae est répartie dans les régions plus froides et tempérées du monde, en particulier à haute altitude dans les montagnes. Les plantes de cette famille sont abondantes dans les zones tempérées du nord et ne sont pas rares dans les régions tempérées

du sud des globes. Plusieurs genres ont également été trouvés dans les régions tropicales et subtropicales du monde. Quelques membres de la famille se trouvent également dans les régions arctiques et alpines. En Inde, des membres de la famille se trouvent dans les plaines, les régions sous-cutanées et à des altitudes plus élevées dans l'Himalaya Oriental et Nord-Ouest et les collines du Nilgiri [7].

## **I-1.2 Le genre *Clematis***

### **I-1.2.1 Position systématique**

*Clematis* est l'un des trois genres de Ranunculaceae les plus répandus (les deux autres étant *Anemone* et *Ranunculus*), avec environ 300 espèces. La taxonomie de la clématite a attiré beaucoup d'attention, en raison de sa grande valeur horticole [8]. La Clématite est classée dans la subdivision Angiospermae, classe des Dicotylédones de l'ordre des Ranunculales, famille des Ranunculaceae [9].

### **I-1.2.2 Caractéristiques botaniques**

Ce sont des plantes grimpantes ligneuses, ou des plantes herbacées à feuilles pétiolées à sessiles, opposées à la tige et principalement composées pennées ou bipennées avec trois à cinq folioles. Les tiges sont des ficelles comme une vrille (vrille pétiolée) et sont chargées de soutenir la plante [10].

Les fleurs sont actinomorphes, solitaires ou en panicules de quelques à nombreuses fleurs, peu visibles à voyantes, avec quatre à cinq sépales ressemblant à des pétales (pas de vrais pétales), séparés à légèrement joints à la base, minces à coriaces, blanches ou de différentes couleurs, pétaloïdes, valvées en bouton, s'étalant en forme de coupe [11]. Les étamines sont nombreuses, les staminodiales externes ou toutes modifiées en staminodes chez les fleurs pistillées des espèces dioïques. Les pistils sont nombreux, mûrissant en akènes, les styles sont persistants, souvent longs et pubescents à plumeux ou parfois presque nus [12].

### **I-1.2.3 Distribution géographique**

Les espèces de clématites indigènes peuvent être trouvées dans le monde entier, des Amériques, de l'Australie, de l'Afrique, de l'Inde et de l'Europe, à la Chine, au Japon, à la

Sibérie et à la Mongolie, également aux pays méditerranéens et à l'est de la Syrie. C'est vraiment une plante internationale [13].

### I-1.3 L'espèce *Clematis cirrhosa* L.

#### I-1.3.1 Description botanique

L'espèce *Clematis cirrhosa* L. (Figure I-1) est un arbuste grimpant atteignant 2-3 mètres de hauteur, à feuilles fasciculées, simples, trifides ou tripartites à bords entiers, lobés ou incisés dentés. Elle possède des fleurs blanches pendantes en cloche, assez grandes (2, 5-3 cm), solitaires ou ternées sur un calice régulier formé de 4-5 sépales pétaloïdes, les pétales sont petits ou nuls. Les étamines sont nombreuses, les Carpelles en tête et le Style accrescent et terminé par une arête plumeuse [14, 15].



Figure I-1: Espèce *Clematis cirrhosa* L.

#### Noms vernaculaires utilisés:

##### Synonyms:

*Clematis balearica* Rich., 1779 [16]

*Clematis laeta* Salisb., 1796 [17]

*Atragene cirrhosa* (L.) Pers., 1806 [18]

**Noms communs :**

**En Anglais :** Virgin's bower [19]

**En Français :** La Clématite à vrilles [20]

**En Espagnol :** Plumajes andaluces [21]

**En Italien :** Clematide cirrosa. [22]

**En Algérie :** elle est connue par les noms vernaculaires « Zenzou », « Cheham el Atrous » [15] et Nár barda [23].

### I-1.3.2 Classification botanique

Classification botanique de *Clematis cirrhosa* L. selon Cronquist (1981): [24]

**Règne:** Plantae

**Sous-règne:** Tracheobionta

**Division :** Magnoliophyta (Angiospermes)

**Classe :** Magnoliopsida (Dicotylédones)

**Sous-classe :** Magnoliidae

**Ordre :** Ranunculales

**Famille :** Ranunculaceae

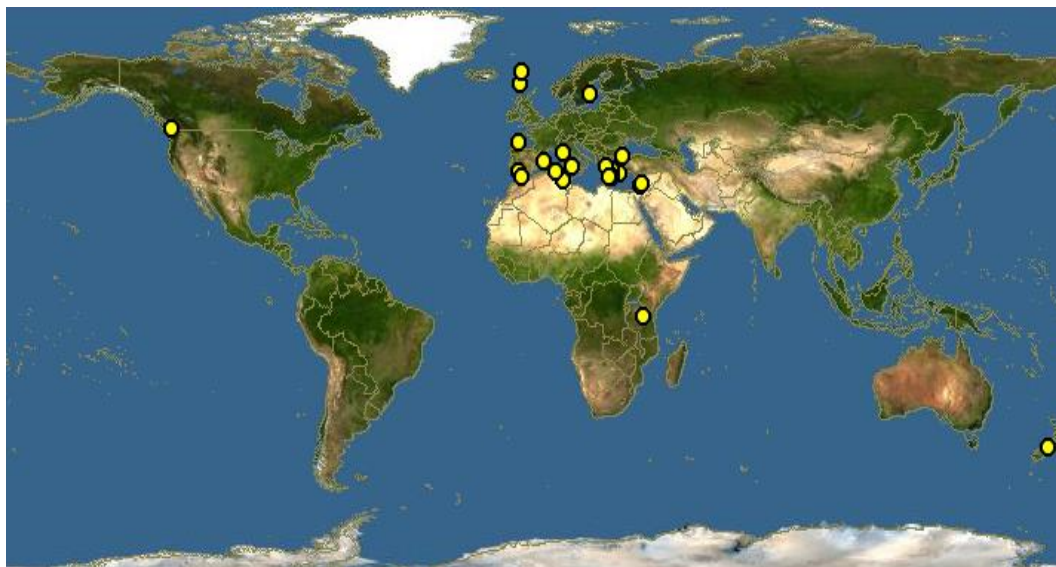
**Genre :** *Clematis*

**Espèce :** *Clematis cirrhosa* L.

### I-1.3.2 Distribution géographique

L'espèce *Clematis cirrhosa* L. est originaire du Sud de l'Europe et du Nord de l'Afrique [1], elle se trouve très largement dans toute la zone bien arrosée du littoral méditerranéenne dans les Broussailles et les forêts [15].

Dans l'Algérie elle pousse dans toutes les zones côtières et humides (Béjaia, Jijel, El Kala, Souk Ahras) [25, 26].



**Figure I-2 :** Distribution géographique de *Clematis cirrhosa* L.

## I-2 Etude ethnobotanique

### I-2.1 Utilisation des Ranunculaceae en médecine traditionnelle

Les renonculacées sont une famille économiquement moyennement importante. Les espèces disponibles dans le commerce sont presque toutes ornementales. Certains genres sont importants comme plantes vénéneuses. Les propriétés toxiques de l'*Aconitum* et du *Delphinium* sont bien connus, en particulier pour ceux qui sont impliqués dans le bétail beaucoup, peut-être la plupart, d'autres genres contiennent des espèces vénéneuses [27].

En phytothérapie chinoise, les tubercules et les racines des plantes du genre *Aconitum* sont généralement préférés pour le traitement de diverses maladies, telles que l'effondrement, la syncope, le rhumatisme articulaire aigu, les articulations douloureuses, la gastro-entérite, la diarrhée, l'œdème, l'asthme bronchique, diverses tumeurs et certains troubles endocriniens comme les menstruations irrégulières [28].

Les indiens Cherokees avaient découvert les vertus médicinales de la plante *Hydrastis canadensis*, qu'ils utilisaient comme antiseptique pour traiter les blessures de flèche. Ils en machaient la racine pour soulager les lésions buccales [29].

Les graines de *Nigella sativa* L. ou nigelle cultivée, sont largement utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement et la prévention de nombreuses maladies. En

Algérie, la nigelle cultivée est employée en cas de fièvre, d'algies dentaires, de maux de tête, de rhumes de cerveau, comme diurétique et emménagogue. En infusion, elle est indiquée dans les nausées, les gastralgies, les vomissements et les coliques. Ecrasées dans l'huile, les graines sont employées comme liniment contre les rhumatismes, écrasées et prises dans l'eau, elles seraient efficaces contre la constipation et les céphalées [30].

Les parties aériennes du *Clematis terniflora* DC. sont utilisées depuis longtemps dans la médecine populaire Chinoise pour le traitement des symptômes inflammatoires des systèmes respiratoire et urinaire, particulièrement les maladies de pharyngite chronique et de prostatite. En outre, elle est utilisée au Japon comme plante de substitution pour *Radix clematidis*, qui a pour efficacité de soulager la douleur de la polyarthrite rhumatoïde [31].

### I-2.2 Utilisation du genre *Clematis* en médecine traditionnelle

Les plantes du genre *Clematis* font l'objet de multiples usages thérapeutiques traditionnels. Les parties aériennes de diverses espèces de *Clematis*, sont particulièrement utilisées en Europe et en Asie de l'Est comme diurétique, antipaludéen, antidote dans les morsures de serpents, l'antidysenterie et pour le traitement des rhumatismes, fièvre, infections oculaires, symptômes gonorrhéiques, maladies osseuses, troubles cutanés chroniques, goutte et varicosité [32, 33].

En Inde, les feuilles de *Clematis montana* sont utilisées pour traiter les maladies de la peau et les graines ont des propriétés purgatives [34], et la pâte de feuilles de *Clematis gouriana* Roxb. ex DC. est utilisée pour soigner les brûlures cutanées [35].

*Clematis arandii* et *Clematis montana*, sont utilisés comme un agent diurétique en médecine traditionnelle chinoise. Dans la province du Hunan, la médecine traditionnelle chinoise prescrivent l'espèce *Clematis arandii* comme agent diurétique dans toutes les cliniques hospitalières [36]. Elles sont également utilisées pour réduire la fièvre, induire la miction, stimuler les pertes menstruelles et favoriser la lactation [37].

Dans la médecine Coréenne traditionnelle *Clematis manshurica* est utilisée pour traiter la goutte, l'arthrite et le tétanos. *Clematis apiifolia*, *Clematis florida* Thunb. et *Clematis heracleifolia* DC. ont été utilisées comme analgésiques, diurétiques, antitumoraux et anti-inflammatoires [33].



*Clematis glycinoidesa* est utilisée par des guérisseurs, autochtones, australiens dans le traitement de conditions inflammatoires telles que la douleur, les rhumatismes et les infections. L'inhalation des vapeurs émises par les feuilles fraîchement broyées de cette espèce a été utilisée pour guérir le rhume et les maux de tête [38].

En Europe *Clematis erecta* L. est utilisée en médecine homéopathique pour les ulcères cancéreux et nauséabonds. Elle est utilisée par voie orale pour soulager les douleurs rhumatismales, les varices, la goutte et comme diurétique [39], et localement et intérieurement, pour traiter les maladies vénériennes tels que les ulcères syphilitiques [40].

Cette espèce est utilisée aussi, comme un remède de diverses maladies telles que, l'insomnie, les céphalées les névralgiques et les troubles de la mémoire [41], et comme un complément pour la gonorrhée [42].

*Clematis vitalba* L. a été utilisé comme antimycotique et antibactérien [43, 44], et ses jeunes tissus sont consommés en toute sécurité en tant qu'aliments en Italie, après avoir été brièvement bouillis [45].

Les feuilles *Clematis brachiata* Thunb. sont utilisées en Afrique du Sud contre la toux, les douleurs thoraciques et les troubles abdominaux. La décoction des feuilles, des tiges et des racines est également utilisée séparément pour soulager le rhume, le paludisme, les infections des sinus et l'asthme [46-48].

Les parties aériennes ou les feuilles de *Clematis flammula* sont employées pour fournir le soulagement provisoire des douleurs communes, ces parties sont appliquées à l'état frais et moulues sur l'inflammation pendant environ 15-30 minutes [49]. La médecine traditionnelle marocaine fait encore appel à cette plante pour soigner le buzelum (une sorte de sciatique) par application de cataplasmes, pour traiter des affections du foie et de la rate, elle est aussi utilisée dans le traitement des ulcères phagédéniques [50].

En médecine traditionnelle Algérienne ; les tradipraticiens ont utilisé l'infusion de *Clematis flammula* comme un traitement de l'arthrite et des brûlures mineures [51].

### I-2.3 Utilisation de l'espèce *Clematis cirrhosa* L. en médecine traditionnelle

La plante *Clematis cirrhosa* L. fait l'objet de multiples usages thérapeutiques traditionnels en Algérie; les feuilles en décoction sont utilisées pour soulager les douleurs rhumatismales [52], tandis que l'infusion est utilisée comme un agent diurétique [53]. Les racines, en cataplasme, sont vulnérinaires et utilisées pour soigner les brûlures. La plante fraîche est utilisée pour traiter la maladie dite búzelum. Elle est également indiquée dans les refroidissements, les maladies du foie et de la rate [54, 55].

**Références bibliographiques**

- [1] Da-Cheng, H. A. O., Pei-Gen, X. I. A. O., Hong-Ying, M. A., Yong, P. E. N. G., & Chun-Nian, H. E. (2015). Mining chemodiversity from biodiversity: pharmacophylogeny of medicinal plants of Ranunculaceae. *Chinese journal of natural medicines*, 13(7), 507-520.
- [2] TAMURA, M. (1993). New species and combinations in the Ranunculaceae. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, 44(1), 27-28.
- [3] Rohwer, J. G., & Bittrich, V. (1990). *The families and genera of vascular plants* (Vol. 1). K. Kubitzki (Ed.). Berlin: Springer.
- [4] de Lamarck, J. B. D. M. (1815). *Flore française ou descriptions succinctes de toutes les plantes qui croissent naturellement en France disposées selon une nouvelle méthode d'analyse; et précédées par un exposé des principes élémentaires de la botanique*. Desray.
- [5] Xu, Z., & Deng, M. (2017). Ranunculaceae. In *Identification and Control of Common Weeds: (Vol 2)* Springer, Dordrecht, 375-404.
- [6] Richard, A. (1823). *Botanique médicale* (Vol. 2).
- [7] Ziman, S. N., & Keener, C. S. (1989). A geographical analysis of the family Ranunculaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 1012-1049.
- [8] Zhai, W., Duan, X., Zhang, R., Guo, C., Li, L., Xu, G., Shan, H., Kong, H., Ren, Y. (2019). Chloroplast genomic data provide new and robust insights into the phylogeny and evolution of the Ranunculaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 135, 12-21.
- [9] Wen-Tsai, W. A. N. G., & Liang-Qian, L. I. (2005). A new system of classification of the genus *Clematis* (Ranunculaceae). *Journal of Systematics and Evolution*, 43(5), 431.
- [10] Saber, A. H. (1954). *Practical Pharmacognosy: With a General Study of Plant Organs*. MISR SAE.
- [11] Quezel, P., & Santa, S. (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales* (No. 581.965 Q8).

- [12] Chaudhary, S. A. (2001). Flora of the Kingdom of Saudi Arabia. Ministry of Agriculture and Water. *Riyadh*, 2, 342-354.
- [13] Lindgren, D. T. (2007). Clematis. In *Flower Breeding and Genetics* (pp. 781-799). Springer, Dordrecht.
- [14] Moore, T., & Jackman, G. (1872). *The Clematis as a Garden Flower*. Рипол Классик.
- [15] Quézel, P., & Santa, S. (1962). Nouvelle flore d l'Algérie et des régions désertiques méridionales.
- [16] Société botanique de Genève. (1889). *Bulletin des travaux de la Société Botanique de Genève* (Vol. 5). B. Soullier.
- [17] Hooker, J. D. (1895). *Index Kewensis plantarum phanerogamarum: nomina et synonyma omnium generum et specierum a Linnaeo usque ad annum 1885*. (Vol. 4). Clarendoniano.
- [18] Don, G. (1834). *A General System of Gardening and Botany: Founded Upon Miller's Gardener's Dictionary, and Arranged According to the Natural System* (Vol. 3). CJG and F. Rivington.
- [19] Green, T. (1820). *The Universal Herbal; Or, Botanical, Medical, and Agricultural Dictionary Containing an Account of All the Known Plants in the World Arranged According to the Linnæan System, Etc.[With Plates.]* (Vol. 2).
- [20] Hoefler, F. (1850). *Dictionnaire de botanique pratique*. Librairie de Firmin Didot Frères.
- [21] Quer, P. F., & Davit, S. (1993). *Plantas medicinales: el Dioscórides renovado* (No. CIDAB-: RS164-F6p). Labor.
- [22] Rameau, J. C., Mansion, D., & Dumé, G. (2008). *Flore forestière française: guide écologique illustré. Région méditerranéenne* (Vol. 3). Forêt privée française.
- [23] Ennabili, A., Gharnit, N., & El Hamdouni, E. M. (2000). Inventory and social interest of medicinal, aromatic and honey-plants from Mokrisset region (NW of Morocco).
- [24] Gurcharan, S. (2004). Plant systematics: an integrated approach. *Plant systematics: an integrated approach*.

- [25] BENHAMICHE-HANIFI, S., & MOULAÏ, R. (2012). Analyse des phytocénoses des systèmes insulaires des régions de Béjaia et de Jijel (Algérie) en présence du Goéland leucopée (*Larus michahellis*). *Revue d'écologie*.
- [26] Ouelmouhoub, S., & Benhouhou, S. S. (2007). Évolution floristique des subéraies incendiées dans la région d'El Kala (Nord-est Algérie). *Ecologia mediterranea*, 33(1), 85-94.
- [27] Da-Cheng, H. A. O., Pei-Gen, X. I. A. O., Hong-Ying, M. A., Yong, P. E. N. G., & Chun-Nian, H. E. (2015). Mining chemodiversity from biodiversity: pharmacophylogeny of medicinal plants of Ranunculaceae. *Chinese journal of natural medicines*, 13(7), 507-520.
- [28] Gajalakshmi, S., Jeyanthi, P., Vijayalakshmi, S., & Devi Rajeswari, V. (2011). Phytochemical constituent of *Aconitum* species-a review. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 2(4), 121-127.
- [29] Vigan, M. (Ed.). (2012). *Progrès en dermato-allergologie: Besançon 2012* (Vol. 18). John Libbey Eurotext.
- [30] Hammiche, V. (2015). Traitement de la toux à travers la pharmacopée traditionnelle kabyle. *Phytothérapie*, 13(6), 358-372.
- [31] Li, W.-T., Yang, B.-X., Zhu, W., Gong, M.-H., Xu, X.-D., Lu, X.-H., Sun, L.-L., Tian, J.-K., Zhang, L. (2013). A new indole alkaloidal glucoside from the aerial parts of *Clematis terniflora* DC. *Natural product research*, 27(24), 2333-2337.
- [32] Gruenwald, J., Brendler, T., & Jaenicke, C. (2000). PDDR for herbal medicines medicinal economics company montvale. *New Jersey*.
- [33] Chawla, R., Kumar, S., & Sharma, A. (2012). The genus *Clematis* (Ranunculaceae): Chemical and pharmacological perspectives. *Journal of ethnopharmacology*, 143(1), 116-150.
- [34] Chen, Y., Liu, J., Davidson, R. S., & Howarth, O. W. (1993). Isolation and structure of clematine, a new flavanone glycoside from *Clematis arandii* Franch. *Tetrahedron*, 49(23), 5169-5176.

- [35] Kshirsagar, R. D., & Singh, N. P. (2001). Some less known ethnomedicinal uses from Mysore and Coorg districts, Karnataka state, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 75(2-3), 231-238.
- [36] Dennis, W. M., & Bierner, M. W. (1980). Distribution of flavonoids and their systematic significance in Clematis subsection Viornae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 8(1), 65-67.
- [37] Zhang, J., Chen, D. C., Lin, H. R., & Zhang, W. G. (1990). The pharmaceutical dictionary of China. *Guangzhou: Guangdong Sciences & Technology Publishing House*.
- [38] Low, T. (1990). *Bush medicine: a pharmacopoeia of natural remedies*. Angus & Robertson.
- [39] Chawla, R., Kumar, S., & Sharma, A. (2012). The genus Clematis (Ranunculaceae): Chemical and pharmacological perspectives. *Journal of ethnopharmacology*, 143(1), 116-150.
- [40] Sadtler, S. P., LaWall, C. H., Kraemer, H., & Anderson, J. F. (1918). *The dispensatory of the United States of America* (pp. 2010-p). J. P. Remington, & H. C. Wood (Eds.). Philadelphia: Lippincott.
- [41] Boericke, W. (1927). Materia medica with repertory. In *Materia medica with repertory* (pp. 1049-1049).
- [42] Petersen, F. J. (1905). *Materia medica and clinical therapeutics*. The author.
- [43] Ali-Shtayeh, M. S., & Abu Ghdeib, S. I. (1999). Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *mycoses*, 42(11-12), 665-672.
- [44] Khan, M. R., Kihara, M., & Omoloso, A. D. (2001). Antimicrobial activity of Clematis papuasica and Nauclea obversifolia. *Fitoterapia*, 72(5), 575-578.
- [45] Pieroni, A., Nebel, S., Quave, C., Münz, H., & Heinrich, M. (2002). Ethnopharmacology of liakra: traditional weedy vegetables of the Arbëreshë of the Vulture area in southern Italy. *Journal of ethnopharmacology*, 81(2), 165-185.

- [46] Chhabra, S. C., & Mahunnah, R. L. A. (1994). Plants used in traditional medicine by Hayas of the Kagera region, Tanzania. *Economic Botany*, 48(2), 121-129.
- [47] Koch, A., Tamez, P., Pezzuto, J., & Soejarto, D. (2005). Evaluation of plants used for antimalarial treatment by the Maasai of Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1-3), 95-99.
- [48] Pendota, S. C., Grierson, D. S., & Afolayan, A. J. (2008). An ethnobotanical study of plants used for the treatment of eye infections in the Eastern Cape Province, South Africa. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 11(16), 2051-2053.
- [49] Yesilada, E., & Küpeli, E. (2007). Clematis vitalba L. aerial part exhibits potent anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(3), 504-515.
- [50] Benkhniq, O., Zidane, L., Fadli, M., Elyacoubi, H., Rochdi, A., & Douira, A. (2010). Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Botanica Barcinonensia*, 191-216.
- [51] Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., N., Debbache & Atmani, D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 112(2), 303-309.
- [52] Miara, M. D., Bendif, H., Rebbas, K., Rabah, B., Hammou, M. A., & Maggi, F. (2019). Medicinal plants and their traditional uses in the highland region of Bordj Bou Arreridj (Northeast Algeria). *Journal of Herbal Medicine*, 16, 100262.
- [53] Hamel, T., Sadou, S., Seridi, R., Boukhdar, S., & Boulemtafes, A. (2018). Pratique traditionnelle d'utilisation des plantes médicinales dans la population de la péninsule de l'edough (nord-est algérien). *Ethnopharmacologia*, 59, 75-81.
- [54] Cheriti, A., Rouissat, A., Sekkoum, K., & Balansard, G. (1995). Plantes de la pharmacopée traditionnelle dans la région d'El-Bayadh (Algérie). *Fitoterapia (Milano)*, 66(6), 525-538.

[55] Alaoui, A., & Laaribya, S. (2017). Etude ethnobotanique et floristique dans les communes rurales Sehoul et Sidi-Abderrazak (cas de la Maamora-Maroc Septentrional). *Nature & Technology*, (17).



# ***PARTIE 01***

## ***CHAPITRE II***

### ***Métabolites secondaires des plantes***

## II-1 Généralité

De très nombreuses plantes médicinales, tinctoriales ou aromatiques produisent un large éventail de substances chimiques de structures variées. Parmi elles, on distingue classiquement les métabolites primaires et les métabolites secondaires.

Les métabolites primaires proviennent du métabolisme primaire qui représente tous les processus de bases, comme la croissance ou la respiration, qui sont vitaux pour la plante. Les métabolites primaires proviennent de ces réactions et sont les composés essentiels de la machinerie moléculaire de la cellule (acides nucléiques, protéines, lipides et des carbohydrates) [1].

Contrairement aux métabolites primaires, les métabolites secondaires ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais sont synthétisés à partir des métabolites primaires et résultent de réactions chimiques ultérieures. Les métabolites secondaires ne sont pas nécessaires à la vie de la plante, mais jouent un rôle dans l'interaction de la plante avec son environnement, assurant la pérennité de la plante dans ses écosystèmes.

La formation de métabolites secondaires est généralement spécifique aux organes, tissus et cellules et ce sont des composés de faible poids moléculaire. Ces composés diffèrent souvent entre les individus d'une même population de plantes en ce qui concerne leur quantité et leur type. Ils protègent les plantes contre les stress, à la fois biotiques (bactéries, champignons, nématodes, insectes ou pâturage par les animaux) et abiotiques (température et humidité plus élevées, ombrage, blessures ou présence de métaux lourds) [2]. Il a été démontré que les métabolites secondaires ont divers effets biologiques, qui fournissent la base scientifique de l'utilisation des herbes en médecine traditionnelle dans de nombreuses communautés anciennes. Ils ont été décrits comme des antibiotiques, des antifongiques et des antiviraux et sont donc en mesure de protéger les plantes contre les agents pathogènes.

De plus, ce sont d'importants composés absorbant les UV, évitant ainsi de graves dommages aux feuilles dus à la lumière. Il a été noté que certaines herbes telles que les herbes fourragères comme le trèfle ou la luzerne peuvent exprimer des propriétés œstrogéniques et interagir avec la fertilité animale [3].

Ces métabolites secondaires constituent, aujourd'hui, un des leviers d'une possible intensification écologique de l'agriculture, en substituant notamment l'usage d'intrants chimiques par des mécanismes de défense naturelle des plantes. D'un point de vue

pharmacologique, les métabolites secondaires constituent la fraction la plus active des composés chimiques présents chez les végétaux et on estime aujourd'hui qu'environ un tiers des médicaments actuellement sur le marché contiennent au moins une telle substance végétale [4].

## II.2 Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires des plantes sont un groupe très large de composés chimiques, qui sont généralement classés selon leurs voies de biosynthèse. Trois grandes familles de molécules sont généralement considérées : les composés polyphénoliques, les terpènes et les stéroïdes et les composés azotés ou alcaloïdes [5, 6].

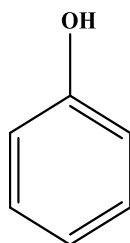
Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine [7].

### II.2.1 Les composés phénoliques

#### II.2.1.1 Définition des composés phénoliques

Les composés phénoliques constituent l'une des plus grandes familles de molécules largement répandues dans le règne végétal, ils sont présents dans toutes les parties de la plante [8].

Ces composés ont un élément structural fondamental (Figure II-1), qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins à un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside [7].



**Figure II-1:** Structure de base du Phénol

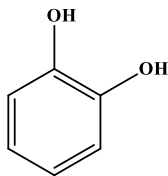
### II-2.1.2 Classification des composés phénoliques

Il existe à ce jour plus de 8 000 composés polyphénoliques différents. C'est pourquoi la terminologie et la classification des polyphénols sont complexes et déroutantes. Bien que tous les polyphénols aient des structures chimiques similaires [9]. Les composés phénoliques végétaux peuvent être classés en grandes catégories en fonction du nombre d'atomes de carbone et de l'arrangement des squelettes carbonés dans leur structure. Ils peuvent être classés en [10]:

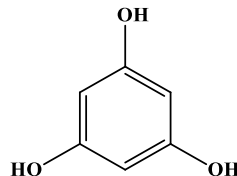
- Phénols simples
- Acides phénoliques.
- Tanins.
- Coumarines.
- Flavonoïdes.
- Chromones et xanthones.
- Stilbènes.
- Lignanes.

#### II-2.1.2.1 Les phénols simples

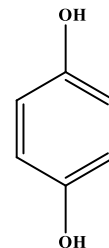
Les phénols simples englobent toutes, les molécules hydroxylées diversement substituées de noyau du phénol. Selon cette définition plusieurs phénols appartiennent à ce groupe, par exemple : catéchol, phloroglucinol, Hydroquinone Hydroquinone, ils sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae) [11].



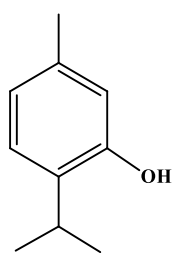
**Catéchol**



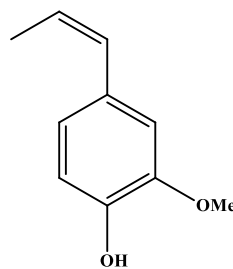
**Phloroglucinol**



**Hydroquinone**



Thymol



Eugenol

Figure II-2 : Structure de quelques phénols simples

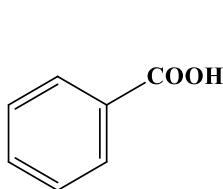
### II-2.1.2.2 Les acides phénoliques

Le terme d'acide phénolique peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique.

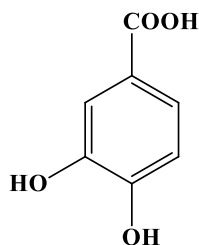
En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïques et cinnamiques (composés en  $C_6-C_1$ ) tels que l'acide gallique, l'élément constitutif des tanins hydrolysables ou de l'acide cinnamique (composés en  $C_6-C_3$ ) comme l'acide caféique qui sont souvent estérifiés.

#### II-2.1.2.2.1 Les acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque

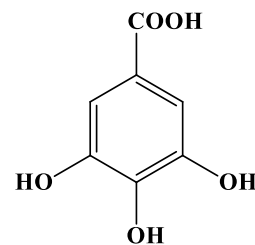
Les acides phénoliques en  $C_6-C_1$ , dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside. L'acide gallique et son dimère (l'acide hexahydroxydiphénique) sont les éléments constitutifs des tanins hydrolysables. D'autres aldéhydes correspondants à ces acides, comme la vanilline, sont très utilisés dans le secteur pharmaceutique [7].



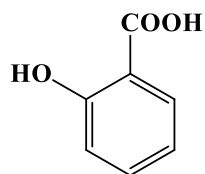
Acide benzoïque



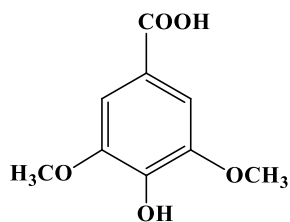
Acide protocatéchuque



Acide gallique



Acide salicylique

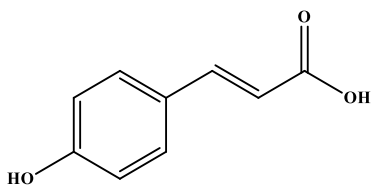
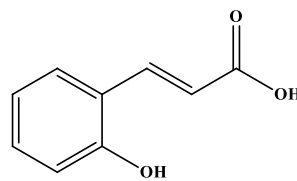
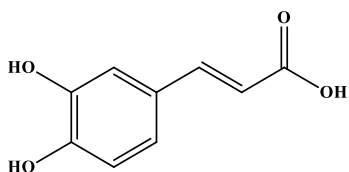


Acides syringique

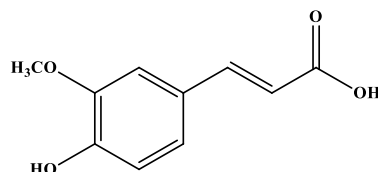
**Figure II-3 :** Structures de quelques acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque

#### II-2.1.2.2.2 Les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique

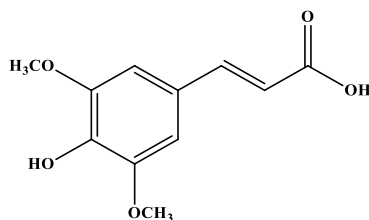
La plupart des acides phénoliques en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (acides *p*-coumarique, caféique, férulique, sinapique) (Figure II-4) ont une distribution très large ; les autres (acides *o*-coumarique, *o*-férulique) sont peu fréquents [7]. Les acides cinnamiques et caféiques sont des représentants communs du groupe de dérivés phénylpropaniques qui diffère par son degré d'hydroxylation et de méthylation [11].

Acide *p*-coumariqueAcide *o*-coumarique

Acide caféique



Acide férulique



Acide sinapique

**Figure II-4 :** Structures de quelques Acide phénoliques dérivés de l'acide cinnamique

[12]

### II-2.1.2.3 Les tanins

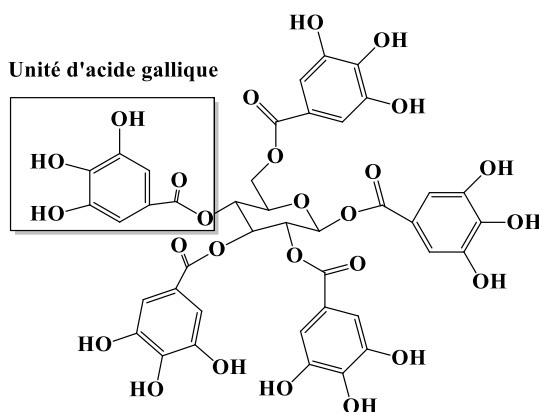
Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, les tanins ont la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines [11, 13]. Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines [14].

Les tanins se trouvent couramment dans les gymnospermes et les angiospermes. Ils ont été signalés dans 180 familles de dicotylédones et 44 familles de monocotylédones. Les familles les plus connues de toutes les espèces testées contenant des tanins sont : les Acéracées, les Actinidiacées, les Anacardiacees, Les Bixacées, les Burséracées, Les Combretacées, les Dipterocarpacees, les Ericacées, les Grossulariacées, les Myricacées pour les dicotylédones et les Najadacées et les Typhacées pour les monocotylédones [15].

Les tanins constituent un groupe chimique hétérogène, avec des structures moléculaires variées. Du point de vue structural, ils sont subdivisés en deux groupes distincts en fonction du type de l'acide phénolique et du type de liaisons qui déterminent la taille et la réactivité chimique de la molécule [16].

#### II-2.1.2.3.1 Les tannins hydrolysables

Sont des hétéropolymères formés à partir de plusieurs molécules d'acides phénoliques tels que l'acides gallique et l'acides ellagique, qui sont unis par des liaisons esters à une molécule centrale de glucose. Les deux principaux types de tanins hydrolysables sont les gallotanins et les ellagitanins, qui sont, respectivement, composés d'acide gallique et d'unités d'acide ellagique [17]. Comme leur nom l'indique, ces substances s'hydrolysent facilement en milieux acides et alcalins ou sous l'action d'enzymes (tels que la tannase), pour donner des glucides et des acides phénoliques [18].

1,2,3,4,6-pentagalloyl-*O*-*D*-glucose**Figure II-5** : Structure de tanin hydrolysable**II-2.1.2.3.2 Les tanins condensés**

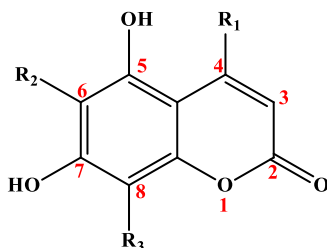
Les tanins condensés, ou proanthocyanidines, sont des oligomères ou polymères dont les structures sont basées sur des précurseurs de flavonoïdes, les flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone du type C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> ou C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> variant dans le type de liaisons entre les unités de flavonoïdes; modèles d'hydroxylation; stéréochimie des carbones 2, 3 et 4 du cycle pyranique et présence de substituants supplémentaires [19].

Les tanins condensés sont appelés proanthocyanidines parce que leur oxydation en milieu alcool-acide entraîne la formation de pigments anthocyaniques tels que les cyanidines (à partir de procyanidines) et les delphinidines (à partir de prodelphinidines). Les anthocyanidines sont responsables de la coloration variée des fleurs, des feuilles et des fruits en rose, rouge, mauve, violet et bleu. Leur présence dans les plantes est, de ce fait, détectable à l'œil nu [19, 20]

**II-2.1.2.4. Les coumarines**

Les coumarines sont des dérivés de la benzo- $\alpha$ -pyrone, la lactone de l'acide *O*-hydroxycinnamique (Figure II-6). La coumarine a été isolée pour la première fois à partir de *Coumarouna odorata* par Vogel en 1820, aujourd'hui, près de 1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et de micro-organismes [21]. Dans les plantes, elles sont rencontrées dans les Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Rutaceae et Solanaceae [22].

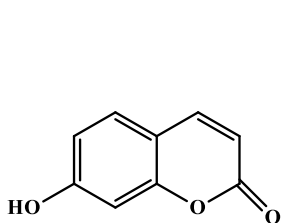




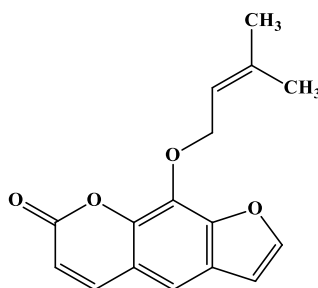
**Figure II-6 :** Structure de base de la coumarine

Les coumarines sont structurellement diverses et peuvent être classées en cinq grands groupes. Les coumarines simples sont celles qui ont des substituants dans le cycle benzénique. Ils peuvent être des dérivés hydroxylés, alkylés et alcoxylés du composé parent. Un exemple d'une simple coumarine est la 7-hydroxycoumarine. Le deuxième groupe est constitué par les furocoumarines, qui contiennent un cycle furanique à cinq chaînons attaché à la structure coumarinique avec l'oxygène furanique en position 7, comme représenté par l'impératorine (Figure II-7). Les furocoumarines peuvent être linéaires ou angulaires, en fonction de la position de la fixation de l'anneau de furane sur la structure de la coumarine.

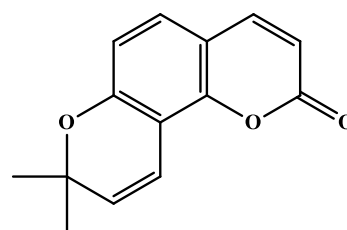
Un autre major groupe de coumarines est les pyranocoumarines qui ont un hétérocyclisme d'oxygène à six chaînons et peuvent exister sous des formes linéaires ou angulaires. Un exemple de pyranocoumarine est la séséline, dans laquelle l'oxygène en position 7 fait partie d'un système de cycle hétérocyclique à six chaînons fusionnés. Un autre groupe constitue par les coumarines qui sont substituées dans les positions 3 ou 4 de la pyronéringine, comme la 4-méthylcoumarine. Le dernier groupe est celui des dimères de coumarine, qui consistent généralement en deux unités de coumarine reliées entre elles [23].



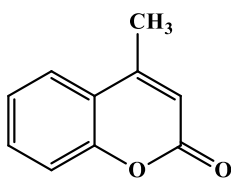
La 7-hydroxycoumarine



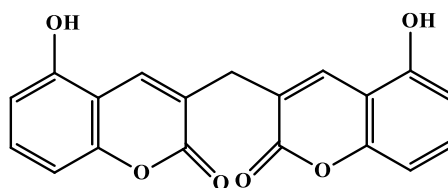
L'impératorine



La séséline



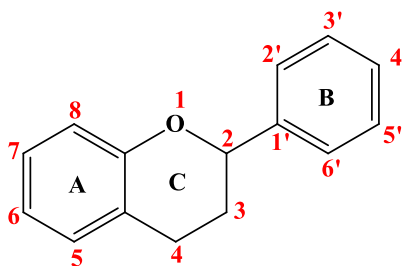
la 4-méthylcoumarine



Le Dicoumarol

**Figure II-7** : Structures de quelques coumarines**II-2.1.2.5 Les flavonoïdes**

Le terme flavonoïde vient du latin (flavus), signifiant « Jaune » ; les flavonoïdes donnent le pigment jaune orangé et bleu aux fleurs [24]. Les flavonoïdes font partie d'une classe des composés naturels largement répandue chez les végétaux. Ils sont très présents dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs de plantes [25]. Les flavonoïdes constituent une classe très large des composés polyphénoliques, ont en commun la structure du diphenyl propane C6-C3-C6 (Figure II-8); les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C. L'existence des différentes classes structurales des flavonoïdes serait fonction des modifications de l'hétérocycle C [26].

**Figure II-8** : Structure de base des flavonoïdes

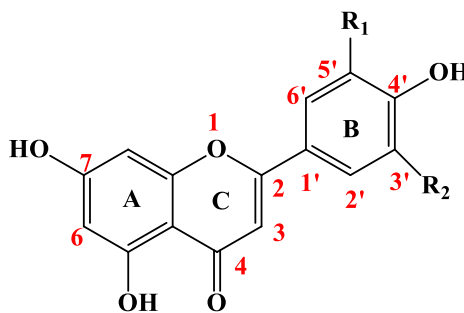
Les flavonoïdes sont caractérisés par la présence de 15 atomes de carbone dans leur squelette de base, disposés sous la forme C6-C3-C6, ce qui correspond à deux cycles aromatiques A et B liés par une unité de trois atomes de carbone, pouvant ou non donner lieu à un troisième anneau [27, 28]. Différentes classes de flavonoïdes existent selon la structure, le degré d'oxydation et d'insaturation du cycle C, ainsi que par la nature de ses connexions avec les cycles A et B. Ce qui permet de distinguer neuf classes: chalcones, aurones, flavones,

isoflavones, flavonols, flavanones, flavane-3-ols flavane-3,4-diols et anthocyanes. Au sein de chacune classe, les variations autour de la structure de base (flavane) portant principalement sur le nombre et la position des hydroxyles aromatiques, le degré de méthylation, et le niveau, les sites et la nature des glycosylations [1].

Dans les plantes, ils sont très souvent liés avec des sucres, on parle alors d'hétérosides constitués d'une partie phénolique aglycone ou génine associée à un sucre. D'une manière générale, l'ose est lié aux flavonoïdes par l'intermédiaire d'une liaison *O*-glycosidique. Dans quelques cas plus rares, la liaison est du type *C*-glycosidique. La nature de sucre se liant aux flavonoïdes est variée, allant de la plupart des oses (glucose, galactose, arabinose rhamnose) à des diholosides ou des formes plus complexes [29].

#### II-2.1.2.5.1 Les flavones

Les flavones sont l'un des groupes importants de flavonoïdes. Ils ont une double liaison entre les positions 2 et 3 et une cétone en position 4 du cycle C. La plupart des flavones isolées de légumes et de fruits ont un groupe hydroxyle en position 5 du cycle A, tandis que l'hydroxylation dans d'autres positions, pour la plupart en position 7 du cycle A ou 3' et 4' du cycle B [30].



$R_1 = R_2 = H$  : Apéginine

$R_1 = OH, R_2 = H$  : Lutéoline

$R_1 = R_2 = OCH_3$  : Tricine

**Figure II-9** : Structure d'Apéginine, Lutéoline, Tricine

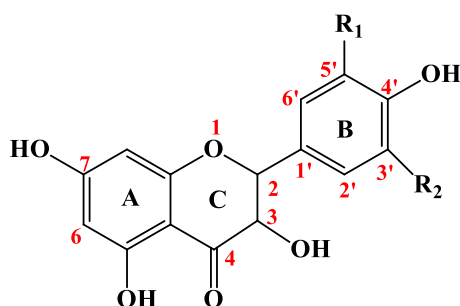
#### II-2.1.2.5.2 Les isoflavones

Les isoflavones sont une sous-classe des flavonoïdes les plus omniprésents, ils se distinguent des autres classes de flavonoïdes par leur plus grande variabilité structurelle, leur

présence fréquente dans les plantes sous leur forme libre, plutôt qu'en tant que glycoside, et par la plus grande fréquence de substitution isoprénoïde. Ils sont divisés en sous-classes en fonction du niveau d'oxydation du cycle pyranique central. Les isoflavones constituent une branche spécifique du métabolisme des flavonoïdes, se différenciant des autres flavonoïdes par la position de l'anneau phénolique B [31].

### II-2.1.2.5.3 Les flavonols

Les flavonols sont des flavonoïdes avec un groupe cétone. Ce sont des éléments constitutifs des proanthocyanines. Les flavonols sont présents en abondance dans une variété de fruits et légumes. Les flavonols les plus étudiés sont le kaempférol, la quercétine, la myricétine et la fisétine. Par rapport aux flavones, les flavonols ont un groupe hydroxyle en position 3 du cycle C, qui peut également être glycosylé. Comme les flavones, les flavonols sont également très divers dans les modèles de méthylation et d'hydroxylation et, compte tenu des différents modèles de glycosylation, ils sont peut-être le sous-groupe le plus courant et le plus important de flavonoïdes dans les fruits et légumes [32]. Exemple : **Kampférol, Quercitine, Isorhamnétine, Myrécétine**



$R_1 = R_2 = H$  : **Kampférol**

$R_1 = OH, R_2 = H$  : **Quercitine**

$R_1 = OCH_3, R_2 = H$  : **Isorhamnétine**

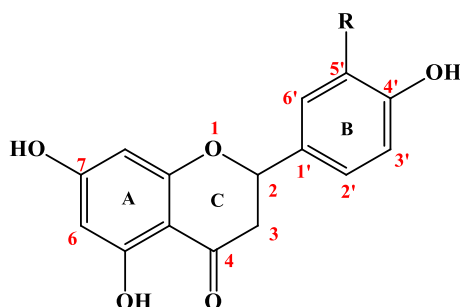
$R_1 = R_2 = OH$  : **Myrécétine**

**Figure II-10** : Structure de quelques flavonols

### II-2.1.2.5.4 Les flavanones

Sont également appelés dihydroflavones, ont le cycle C saturé; par conséquent, contrairement aux flavones, la double liaison entre les positions 2 et 3 est saturée et c'est la seule différence structurelle entre les deux sous-groupes de flavonoïde. Les flavanones sont une autre classe importante qui est généralement présente dans tous les agrumes tels que les

oranges, les citrons et les raisins. L'hespérite, la naringénine et l'ériodictyol sont des exemples de cette classe de flavonoïdes [32]. Exemple ; **Naréginine**, **Eriodictryl**.



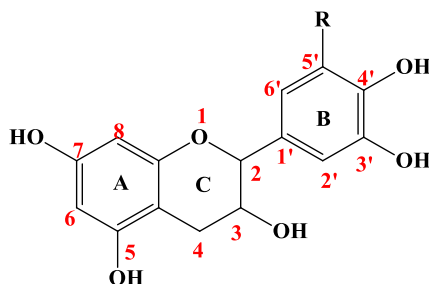
**R= H : Naréginine**

**R= OH: Eriodictryl**

**Figure II-11** : Structure de quelques flavanones

#### II-2.1.2.5.5 Les flavan-3-ols

Les flavanols, également appelés dihydroflavonols ou catéchines, sont les dérivés 3-hydroxy des flavanones. Il s'agit d'un sous-groupe très diversifié et multisubstitué. Les flavanols sont également appelés flavan-3-ols car le groupe hydroxyle est toujours lié à la position 3 du cycle C. Contrairement à de nombreux flavonoïdes, il n'y a pas de double liaison entre les positions 2 et 3. Les flavanols se trouvent en abondance dans les bananes, les pommes, les bleuets, les pêches et les poires [30]. Exemple: **Taxifoline**, **Ampéloptol**.



**R<sub>1</sub>= OH, R<sub>2</sub>= H : Taxifoline**

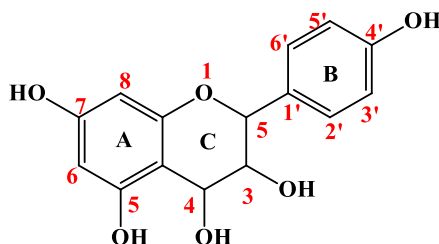
**R<sub>1</sub>= OH, R<sub>2</sub>= OH : Ampéloptol**

**Figure II-12** : Structure de quelques flavan-3-ols

#### II-2.1.2.5.6 Les flavan-3,4-diols

Les flavan-3,4-diols sont des composés qui sont dépourvus du groupe céto en C<sub>4</sub> et possèdent le fragment C<sub>3</sub> saturé, en les faisant "flavans" au lieu de flavones, ils sont

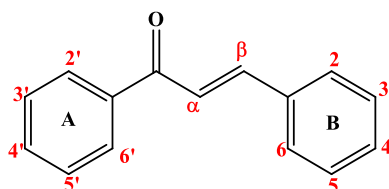
optiquement actifs (l'activité due à la nature asymétrique de C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub>). Exemple : **Leucorobinéтинidine**.



**Figure II-13** : Structure de Leucopélargonidine

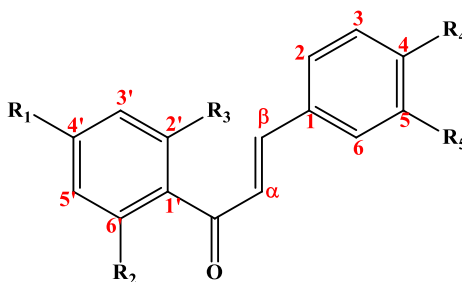
#### II-2.1.2.5.7 Les chalcones

Les chalcones ou 1,3-diaryl-2-propène-1-ones ; sont des flavonoïdes à chaîne ouverte dans lesquels les deux noyaux aromatiques sont joints par un système carbonyle à trois carbones  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturé. Le squelette de la chalcone et le système de numérotation montré sur (Figure II-14) [33]. Les principaux exemples de chalcones comprennent la phloridzine, l'arbutine, la phlorétine et la chalconaringénine. Les chalcones se trouvent en quantités importantes dans les tomates, les poires, les fraises, la busserole et certains produits du blé. Les chalcones et leurs dérivés ont reçu une attention considérable en raison de nombreux avantages nutritionnels et biologiques [34, 35].



**Figure II-14** : Structure de base des chalcones

Exemple de quelques chalcones : **Butéine**, **Cardamomin**



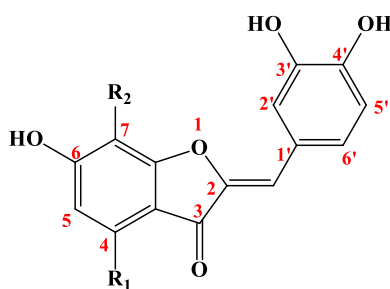
$R_1=R_3=R_4=R_5=OH, R_2=H$ : Butéine

$R_1=R_3= OH, R_2= OCH_3, R_4=R_5= H$ : Cardamomin

**Figure II-15** : Structure de quelques chalcones

#### II-2.1.2.5.8 Les aurones

Les aurones [2-benzylidènebenzofuran-3(2H)-ones] sont les métabolites secondaires des composés naturels appartenant à la famille des flavonoïdes, et structurellement sont les isomères des flavones. Les aurones possèdent un anneau de furane au lieu de l'anneau de pyranne des autres flavonoïdes, ils sont largement présents dans les fruits et les fleurs où ils jouent un rôle important dans la pigmentation de la partie de la plante dans laquelle ils se produisent [36]. Les aglycones connus sont principalement confinés aux familles avancées comme les Cyperacées et les Astéracées, et le composé le plus répandu est l'aureusidine [37].



$R_1= R_2=H$  : Sulphorétine

$R_1=OH, R_2=H$ : Aureusidine

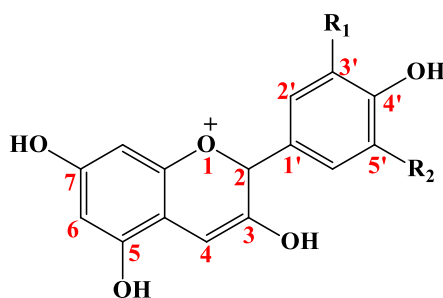
$R_1= H, R_2= OCH_3$  : Leptosidine

**Figure II-16** : Structure de quelques aurones

#### II-2.1.2.5.9 Les anthocyanes

Ce sont des pigments rouges en milieu acide, virant au bleu en milieu alcalin ; ils sont très répandus dans les fleurs et les fruits. 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. 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 [38]. Exemples de quelques anthocyanes.



$R_1 = R_2 = H$  : Pélargonidine

$R_1 = R_2 = OH$  : Délphinidine

$R_1 = OH, R_2 = H$  : Cyanidine

$R_1 = OH, R_2 = OCH_3$  : Prétunidine

$R_1 = OCH_3, R_2 = H$  : Péonidine

$R_1 = R_2 = OCH_3$  : Malvidine

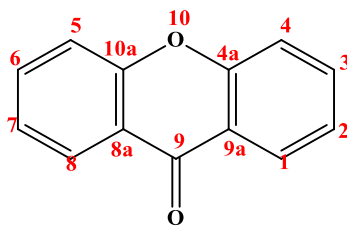
**Figure II-17** : Structure de quelques anthocyanes

#### II-2.1.2.6 Les xanthones

Les xanthones sont des métabolites secondaires qui se produisent couramment dans les familles de plantes supérieures, les champignons et les lichens [39]. Ils ont un squelette carboné  $C_6-C_1-C_6$ , qui se compose de deux cycles aromatiques liés à un O-hétérocyclique, leurs structures sont liées à celle des flavonoïdes et leurs comportements chromatographiques sont également similaires.

Les flavonoïdes sont fréquemment rencontrés dans la nature, tandis que les xanthones se trouvent dans un nombre limité de familles. Les xanthones sont toujours présentes dans les familles Gentianaceae, Guttiferae, Moraceae, Clusiaceae et Polygalaceae. Les xanthones sont parfois trouvées comme composés polyhydroxylés parents mais la plupart sont des éthers mono- ou polyméthyliques ou se trouvent sous forme de glycosides [40].



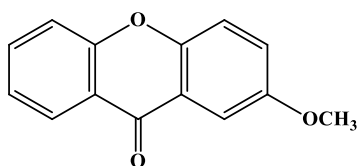


**Figure II-18** : Structure de base des xanthones

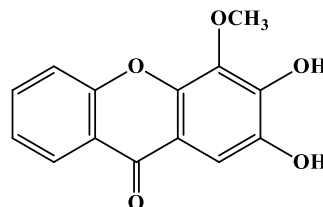
Les xanthones sont généralement classées selon la substitution sur le squelette de base de la xanthone pour donner 6 groupes principaux: les xanthones simples, les glycosides de xanthone, les xanthones prénylées, les xanthonolignoïdes, les bis-xanthones et les miscellaneus. Ces groupes principaux peuvent être subdivisés en fonction du degré d'oxygénation en xanthones non, mono, di, tri, tétra, penta, hexa et hepta-oxygénés [41].

#### II-2.1.2.6.1 Les xanthones oxygénées simples

Les xanthones oxygénées simples sont subdivisées selon le degré d'oxygénation en substance non, mono, di, tri, tétra, penta et hex-aoxygénées [41,42]. Dans ces xanthones, les substituants sont de simples groupes hydroxy, méthoxy ou méthyle.



**2-méthoxyxanthone**

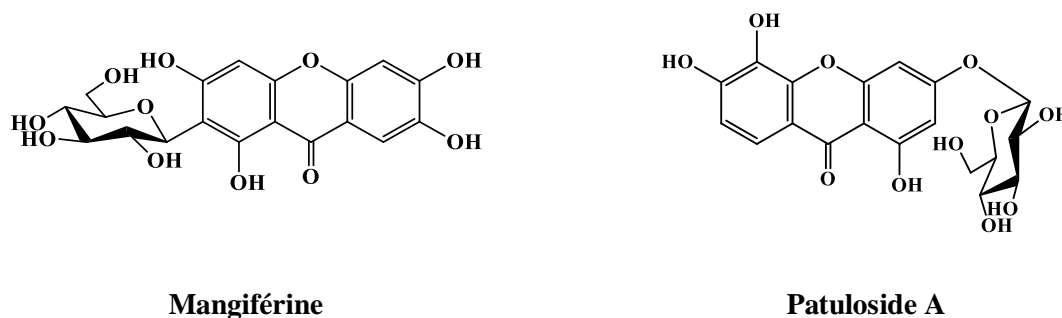


**3-hydroxy-2,4-diméthoxyxanthone**

**Figure II-19** : Structure de quelques xanthones oxygénées simples

#### II-2.1.2.6.2 Les xanthone glycosylées

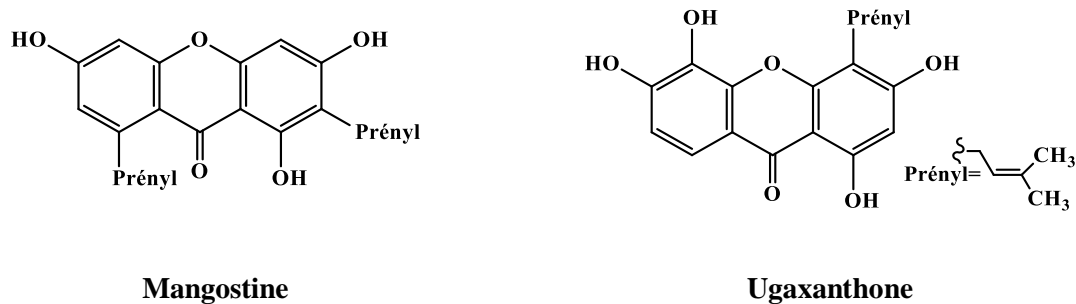
Les xanthones glycosylées naturelles ont été examinées et une distinction entre les C-glycosides et les O-glycosides a également été établie. Dans les C-glycosides, la liaison C-C relie la partie sucre au noyau xanthone est résistante à l'hydrolyse acide et enzymatique tandis que les O-glycosides ont une liaison glycosidique typique [40].



**Figure II-20** : Structure de xanthone glycosylées

### II-2.1.2.6.3 Les xanthones prénylées

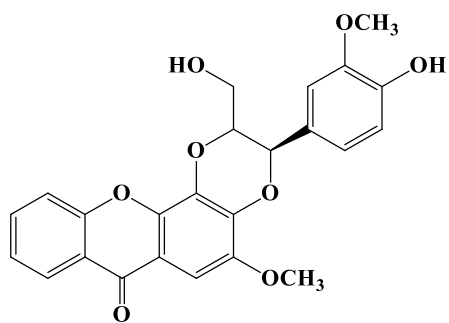
La présence de xanthones prénylées est limitée aux espèces végétales de la famille des Guttifères.



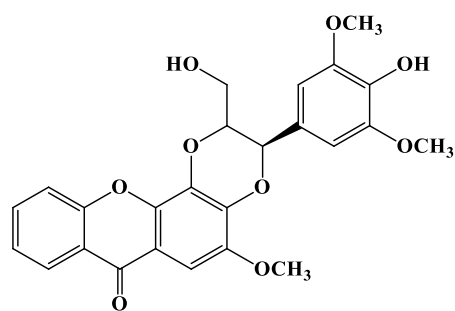
**Figure II-21** : Structure de quelques xanthones prénylées

### II-2.1.2.6.4 Les xanthonolignoïdes

Les xanthonolignoïdes d'origine naturelle sont rares, dont seuls cinq composés sont connus [43]. Ces composés sont constitués d'une association du noyau xanthone et d'une partie lignoïde. Un xanthonolignoïde Kielcorine a été obtenu à partir des espèces *Hypericum* [44]. La Kielcorine a également été isolée de *Vismia guaramirangae* [45], *Kielmeyera variabilis* L. [46] et *Hypericum canariensis* [47], tandis que la cadensine D a été isolée de *Vismia guaramirangae* et *Hypericum canariensis* [48].



Kielcorine

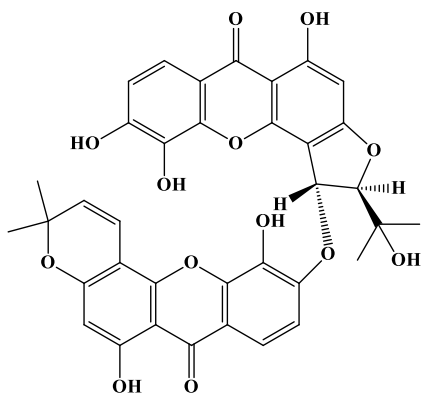


Cadensine D

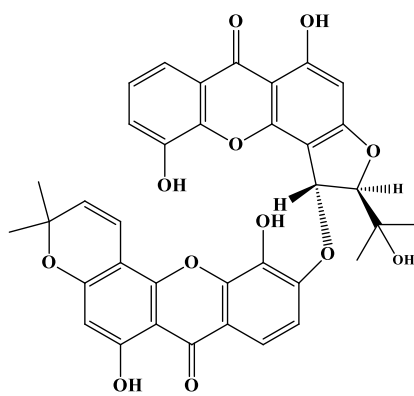
Figure II-22 : Structure de quelques xanthonolignoides

#### II-2.1.2.6.5 Les bisxanthonnes

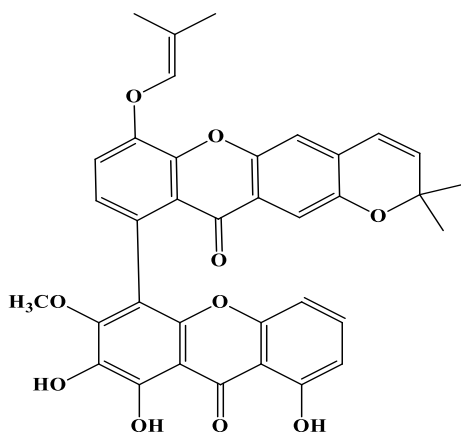
Un total de douze bisxanthonnes, cinq de plantes supérieures, un de lichen et six de champignons, ont été signalés à ce jour. Il s'agit notamment des jacarelhyperols A et B isolés des parties aériennes d'*Hypericum japonicum* [49], et du xanthone dimérique, globulixanthone E isolés des racines de *Symphonia globulifera* [50].



Jacarelhyperol A



Jacarelhyperol B



Globulixanthone E

Figure II-23 : Structure de quelques bisxanthonnes

#### II-2.1.2.6.6 Les miscellaneous

Ce groupe rassemble les xanthonnes chlorées ou sulfonées isolées de différentes sources végétales (y compris les lichens).

#### II-2.1.2.7 Les stilbènes

Plus de 30 stilbènes et glycosides de stilbènes sont présents naturellement dans le règne végétal. La structure chimique de base des stilbènes est composée de deux cycles aromatiques joints par un pont méthylène. Le resvératrol, le composé le plus connu, contient trois groupes hydroxyle dans la structure de base et est appelé 3,4, 5 trihydroxystilbène. Chez les plantes, le piceid, le glucoside du resvératrol, est le principal dérivé du resvératrol. Les stilbènes sont présents dans les plantes sous forme d'isomères *cis* ou *trans*. Les formes *trans* peuvent être isomérisées en formes *cis* par le rayonnement UV. Les deux formes isomères des stilbènes (*Cis* et *Trans*) ont des propriétés chimiques et biologiques différentes [51].

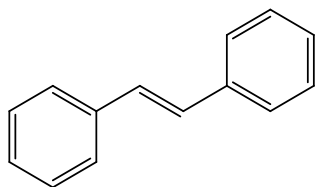
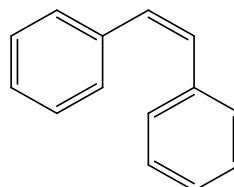
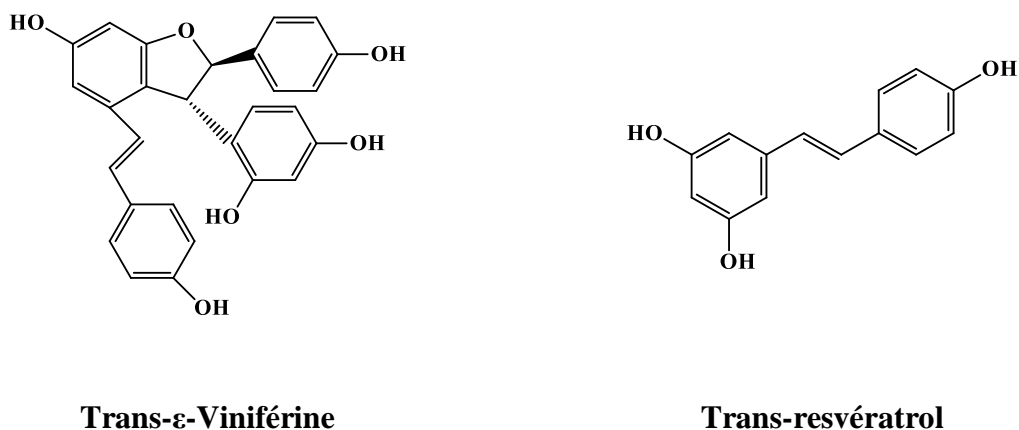
Stilbène Z (*Trans*)Stilbène E (*Cis*)

Figure II-24 : Structure de base des stilbènes (E, Z)

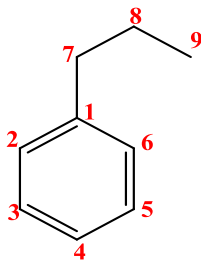
Les stilbènes sont caractérisés structurellement par la présence d'un noyau de 1,2-diphényléthylène, ils peuvent être divisés en deux catégories: les stilbènes monomères et oligomères. Les stilbénoides monomères sont en outre divisés en quatre sous-classes: les stilbènes, bibenzyles, bisbibenzyles et les phénanthrénoïde, alors que les stilbènes oligomères sont produits par couplage entre des stilbènes monomères homogènes et hétérogènes [52].



**Figure II-25 :** Structure de quelques stilbènes

#### II-2.1.2.8 Les lignanes

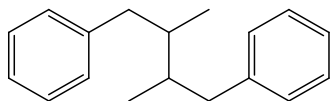
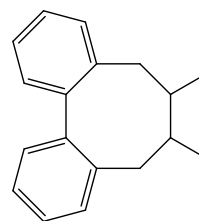
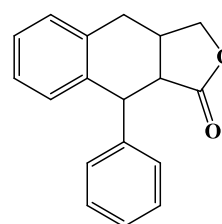
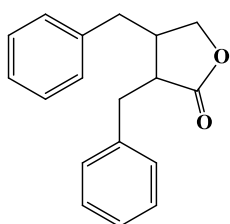
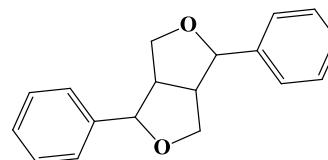
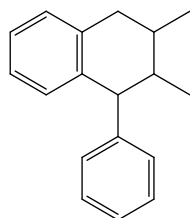
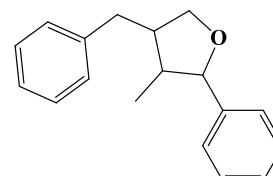
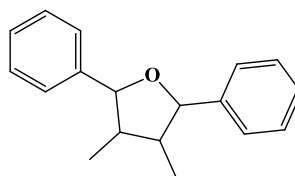
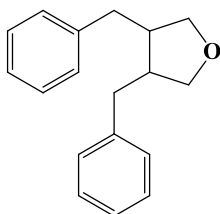
Les lignanes sont dérivées de la dimérisation oxydative de deux unités phénylpropanoïdes ou plus. Les lignanes ont été trouvées dans plus de 70 familles de plantes ils ont une gamme de localités étendue au sein des plantes, des racines aux feuilles, aux graines et aux fleurs [53].



**Figure II-26 :** Structure de base des lignanes

Les lignanes résultent de la condensation d'unités phénylpropaniques. Ils sont divisés en huit groupes. Dans chaque sous-groupe, l'oxydation du cycle aromatique et des fragments de chaîne latérale propyle conduit à une large variété structurelle. Quelques lignanes de furane le dibenzylbutane et le dibenzocyclooctadiène n'ont pas d'oxygène en C<sub>9</sub>. Alors que certains

lignanes ont des groupes hydroxyle supplémentaire en C<sub>7</sub> ou C<sub>8</sub>, des 4-hydroxyphényles et 3,4-dihydroxyphényl lignanes ont également été identifiés [52].

**Bibenzylbutanes****Dibenzocyclooctanes****Butyrolactones****Arylnaphtalènes****Lignanes furanofuraniques****Lignanes monofuraniques****Figure II-27 : Structure de différentes classes des lignanes**

### II-2.1.3 Biosynthèse des polyphénols

Les précurseurs des polyphénols émanent du métabolisme des glucides. La biosynthèse des polyphénols a été étudiée en détail [1], [54-59] et peut être divisée en trois partitions:

- Partition de l'acide shikimique: synthèse des acides aminés phénylalanines, tyrosine et tryptophane.
- Partition phénylpropanoïde: synthèse des acides hydroxycinnamiques et des précurseurs des flavonoïdes et des lignines.
- Partition flavonoïde: synthèse des flavonoïdes.

#### Partition d'acide shikimique

La biosynthèse shikimique des polyphénols est représentée par la Figure II-28, l'acide shikimique est formé de phosphoenol pyruvate et d'érythrose-4-phosphate. L'enzyme phénylalanine-ammonium-lyase (PAL) catalyse la formation d'acide trans-cinnamique à partir de la phénylalanine. L'ammoniac libéré lors de la conversion des deux acides aminés est probablement lié à la glutamine synthétase et ramené dans le cycle [137,60, 61].

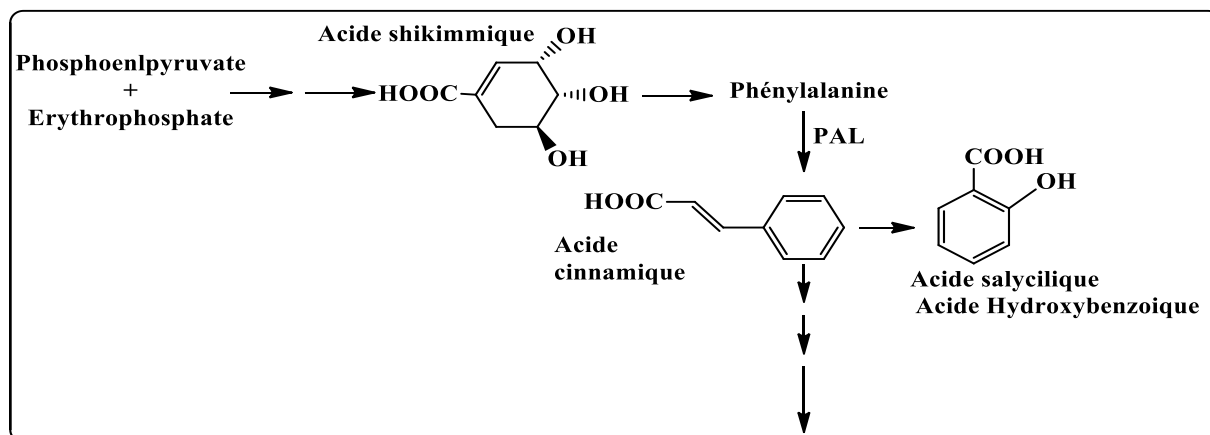
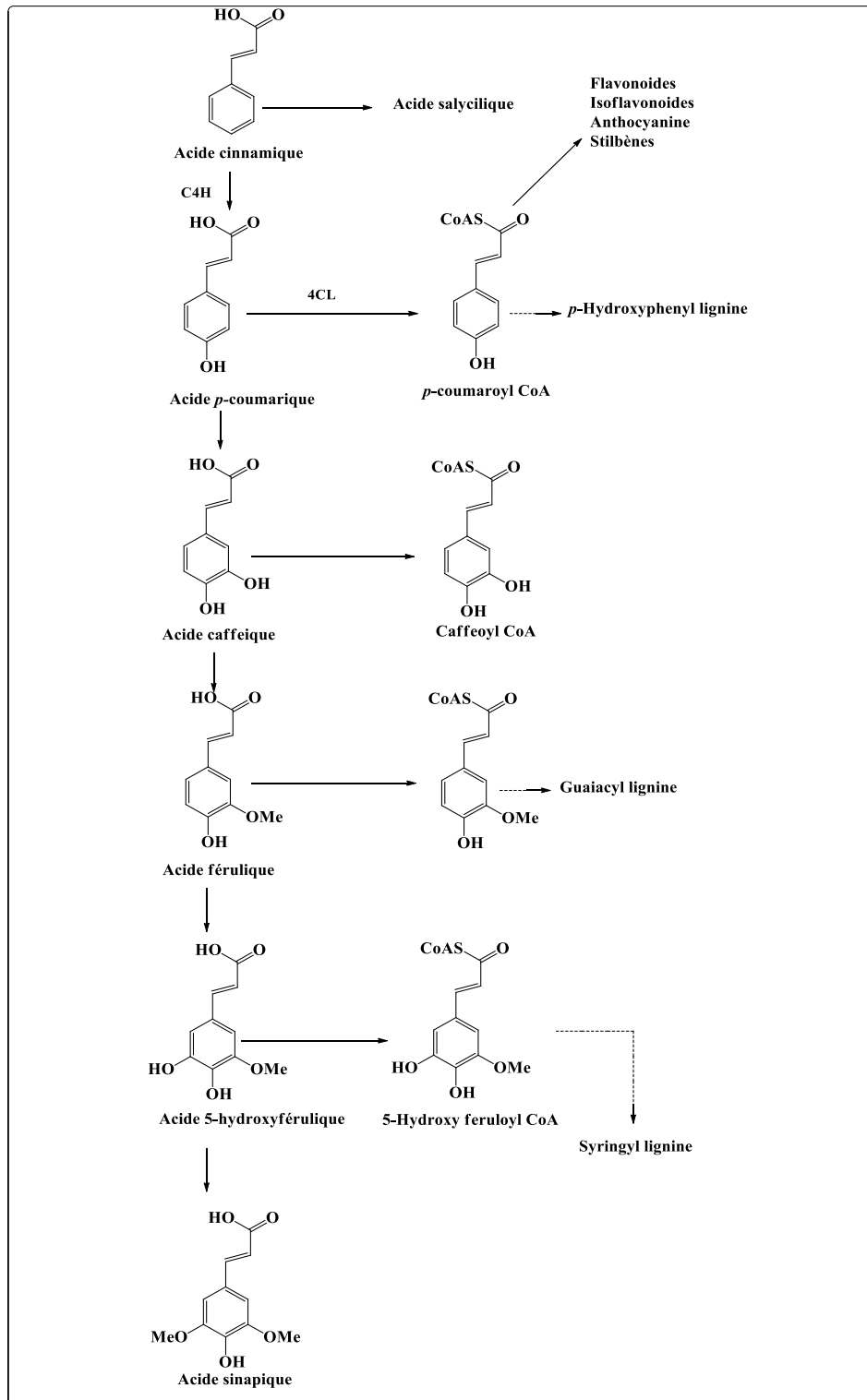


Figure II-28 : Biosynthèse des flavonoïdes partition d'acide shikimique

#### Partition phénylpropanoïde

La biosynthèse des phénylpropanes émane de l'acide trans-cinnamique est donc une réaction ultérieure de la partition de l'acide shikimique. L'enzyme acide cinnamique-4-hydroxylase (C4H, une monooxygénase P<sub>450</sub>) hydroxylise la structure benzénique en position para, ce qui conduit à l'acide *p*-coumarique. Une hydroxylation et une méthylation supplémentaires conduisent aux acides hydroxycinnamiques, l'acide caféique, l'acide férulique

et l'acide sinapique. La S-adénosylméthionine agit comme donneur de méthyle. L'élimination d'un fragment C2 conduit à la formation des acides benzoïques, tels que l'acide salicylique. Le 4-Coumaroyl-CoA est produit à partir d'acide *p*-coumarique par la 4-coumarate /CoA ligase (4CL) [62].



**Figure II-29** : Biosynthèse des flavonoïdes à partir de dérivés de l'acide cinnamique [63]



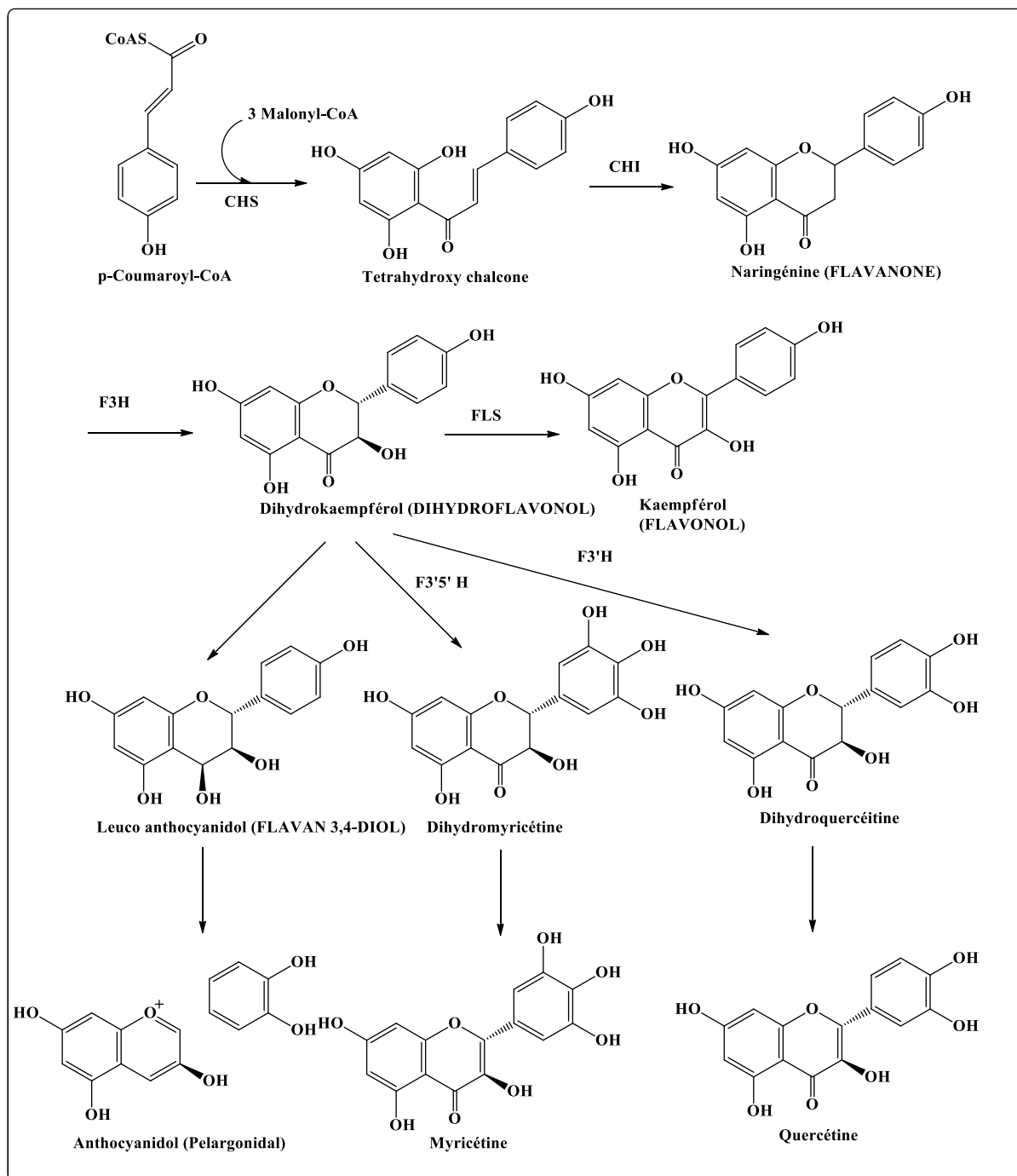
## Partition Flavonoïde

La biosynthèse des flavonoïdes part de la chalcone, cette dernière est formée de trois molécules malonyl-CoA et d'une molécule *p*-coumaroyl-CoA. L'enzyme chalcone synthase (CHS) catalyse la réaction, ce qui conduit initialement à la formation de tétrahydroxy chalcone et à l'élimination simultanée du CO<sub>2</sub>. Cette voie est également appelée voie malonate.

Le squelette C<sub>6</sub> – C<sub>3</sub> – C<sub>6</sub> de la tétrahydroxy chalcone est la base structurale de tous les flavonoïdes. Après la fermeture du cycle, catalysée par la chalcone isomérase (CHI), la naringénine se forme. Ce dernier est transformé en dihydrokaempférol par l'enzyme flavanone 3-hydroxylase (F3H). L'enzyme flavonol synthase (FLS) catalyse la formation d'une double liaison entre le C<sub>2</sub> et le C<sub>3</sub>, ce qui conduit à la formation de kaempférol (un flavonol).

D'autres dihydroflavonols peuvent être formés à partir du dihydrokaempférol par les activités du flavonoïde 3'-hydroxylase (F3'H) et du flavonoïde 3'5'-hydroxylase (F3'5'H), conduisant respectivement à la dihydroquercétine et à la dihydromyricétine [58]. Les dihydroflavonols résultants sont ensuite transformés en quercétine et myricétine au moyen du flavonol synthase (FLS) et ensuite glycosylés.

Les flavan-3,4-diols (également appelés leucoanthocyanidines) sont considérés comme des précurseurs transitoires des anthocyanes, des flavan-3-ols et des proanthocyanidines, ces dernières étant des flavan-3-ols polymérisés. La synthèse complète de ce composé n'est pas encore complètement révélée. L'interaction de plusieurs enzymes est probable et ces composés pourraient même être convertis à partir d'anthocyanidines par l'anthocyanidine réductase [54, 55, 64].



**Figure II-30:** Biosynthèse des flavonoïdes partition du flavonoïde

### II-2.1.4 Effets biologiques des polyphénols

Les composés phénoliques ont un rôle efficace, largement démontré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes [1], par conséquent, de nombreuses recherches récentes sur les composés phénoliques en général et les flavonoïdes en particulier sont très avancées pour expliquer leurs diverses propriétés physiologiques telles que les activités antiallergiques,

anti-arthérogènes, anti-inflammatoires, hépatoprotectrices, antimicrobiennes, antivirales, antibactériennes, anticarcinogènes, anti-thrombotiques, cardioprotectrices et vasodilatateur[65, 66]. Les polyphénols ont également un effet biochimique qui inhibe certaines enzymes telles que l'aldose réductase, la xanthine oxydase, la phosphodiesterase, l'ATPase, la lipoxygénase, la cyclooxygénase, etc., elles ont également un rôle régulateur sur différentes hormones comme les œstrogènes, les androgènes et l'hormone thyroïdienne [67].

**Tableau II-1** : Effets biologiques des polyphénols

Polyphénols	Effets Biologiques	Sources
➤ 2-(3, 4 dihydroxy - phenyl)-3, 5, 7 – trihydroxy- chromen-4one	Activité antibactérienne	<i>Trianthema decandra L.</i> [68]
➤ Luteolin-3-O-methyl-quercétine ➤ Quercétine	Activité anticancéreuse	<i>Achyrocline satureioides</i> [69]
➤ Gliricidin-7-O-hexoside ➤ Quercetin-7-Orutinoside	Activité antibactérienne, anti-oxydante, anticancéreuse	<i>Asplenium nidus</i> [70]
➤ Kurarinone, ➤ Kuraridin, ➤ Kurarinol, ➤ Norkurarinone, ➤ Isokurarinone, ➤ Kushenol A, ➤ Kushenol B	Activité antimicrobienne, Activité anti-inflammatoire, Activité antioxydante, Activité anticancéreuse, Activité antidiabetique	<i>Sophora flavescens Ait</i> [71]
➤ 8",9"-dihydrowelwitschin H, ➤ Uvarins B, ➤ Uvarins C; ➤ Welwitschin E, ➤ Dependensin.(Chalcone)	Activité antispasmodique	<i>Uvaria siamensis</i> [72]
➤ Litseaone A	Activité cytotoxique	<i>Litsea rubescens et Litsea</i>

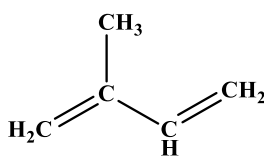
➤ Litseaone B		<i>pedunculata</i> [73]
➤ Catéchol	Activité antimicrobienne	<i>Diospyros kaki</i> <i>Thunb.</i> [74]
➤ 3-(8'(Z), 11'(Z)-pentadecadienyl) catéchol (SA-3C).	Activité anticancéreuse	<i>Semecarpus</i> <i>anacardium</i> [75]
➤ Thymol ➤ Carvacrol	Anti-inflammatoire	<i>Thymus vulgaris</i> L. [76]
➤ Acide <i>p</i> -Coumarique	Activité inhibitrice de la tyrosinase	<i>Panax ginseng</i> [77]
➤ Epicatéchine	Activité antimicrobienne	<i>Camellia sinensis</i> [78]
➤ Acide cinnamique	Activité antimicrobienne	<i>Scrophularia</i> <i>frutescens et</i> <i>Scrophularia</i> <i>sambucifolia</i> [79]
➤ Pyranocycloartobiloxanthone A	Activité antioxydante Activité antimicrobienne Activité inhibitrice de la tyrosinase	<i>Artocarpus</i> <i>obtusus F.M.</i> Jarrett [80]
➤ Pallidol, ➤ Kobophénol A	Activité antioxydante	<i>Carex folliculate</i> [81]
➤ Ellagitannin	Activité antimicrobienne	<i>Theobroma</i> <i>cacao</i> [82]
➤ Warfarine	Activité Antiallergique Activité antimicrobienne	<i>Hydrangeae</i> <i>dulcis folium</i> [83]

## II-2.2 Les terpènes

### II-2.2.1 Définitions des terpènes

Les terpènes sont une classe de produits naturels très répandus, principalement dans les plantes en tant que constituants des huiles essentielles. Leur élément constitutif est l'isoprène hydrocarboné. Les hydrocarbures terpéniques ont donc la formule moléculaire  $(C_5H_8)_n$  et ils sont classés en fonction du nombre d'unités isoprène [84].

La plupart des terpènes ont des structures multicycliques qui diffèrent les uns des autres par leurs groupes fonctionnels et leurs squelettes de carbone de base. Ces types de lipides naturels se retrouvent dans toutes les classes d'êtres vivants et sont donc considérés comme le plus grand groupe de produits naturels [85]. De nombreux terpénoïdes sont commercialement intéressants en raison de leur utilisation comme arômes et parfums dans les aliments et les cosmétiques, par exemple le menthol et le sclaréol, ou parce qu'ils sont importants pour la qualité des produits agricoles, tels que la saveur des fruits et le parfum des fleurs comme le linalool [86].



**Isoprène**

**Figure II-31** : Structure de la molécule d'isoprène

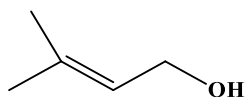
### II-2.2.2 Classification des terpènes

Les terpènes font partie des groupes de produits naturels les plus répandus et les plus divers chimiquement. Heureusement, malgré leur diversité structurelle, ils ont une caractéristique unificatrice simple par laquelle ils sont définis et par lesquels ils peuvent être facilement classés. Les terpènes sont un groupe unique de produits naturels à base d'hydrocarbures dont la structure peut être dérivée de l'isoprène, donnant naissance à des structures qui peuvent être divisées en unités isopentane (2-méthylbutane). Les terpènes sont ainsi classés par le nombre d'unités à 5 carbones qu'ils contiennent en : Hémiterpènes ( $C_5$ ),

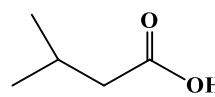
Monoterpène (C<sub>10</sub>), Sesquiterpène (C<sub>15</sub>), Diterpène (C<sub>20</sub>), Sesterterpène (C<sub>25</sub>) très rare, Triterpène (C<sub>30</sub>), Tétraterpènes (C<sub>40</sub>) [86].

### II-2.2.2.1 Les hémiterpène

Composé d'une seule unité d'isoprène. Le seul hémiterpène est l'isoprène lui-même, mais les dérivés contenant de l'oxygène de l'isoprène tel que l'acide isovalérique et le prénil l'alcool isoamylique, l'isovaléraldéhyde, l'acide tiglique, l'acide angélique et l'acide β-furoïque sont classés comme hémiterpénoïdes. Certains hémiterpènes végétaux communs sont illustrés par la Figure II-32 [87].



**Prenol**

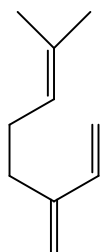


**Acide isovalérique**

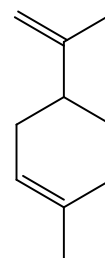
**Figure II-32 : Structure de quelques hémiterpènes [88]**

### II-2.2.2.2 Les monoterpènes

Les monoterpénoïdes sont le composant principal de nombreuses huiles essentielles et, en tant que tels, ont une importance économique en tant qu'arômes et parfums. Les exemples aliphatiques courants incluent le myrcène, le géraniol et le linalool. Les structures à chaîne ouverte comprennent de nombreux composés bien connus, notamment le menthol, le camphre, le pinène et le limonène [89]. Quelques monoterpènes communs sont présentés dans la Figure II-33.



**Myrcène**



**Limonène**

**Figure II-33 : Structure de quelques monoterpènes [90]**

### II-2.2.2.3 Les sesquiterpènes

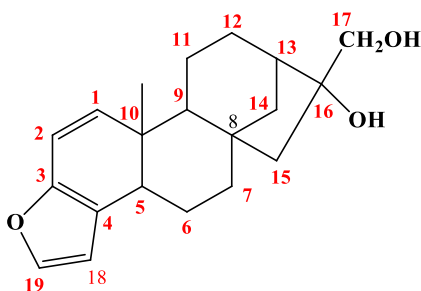
Les sesquiterpènes  $C_{15}$  sont des dérivés de trois unités d'isoprène, ils existent sous une grande variété de formes, y compris des cadres linéaires, bicycliques et tricycliques. Comme les monoterpènes, la plupart des sesquiterpènes sont considérés comme des huiles essentielles [91].



**Figure II-34** : Structure de quelques sesquiterpènes [90]

### II-2.2.2.4 Les diterpènes

Les diterpènes sont un groupe très varié de composés tous avec un squelette de carbone  $C_{20}$  basé sur quatre unités d'isoprène, dont la plupart sont de distribution limitée dans le règne végétal [91]. En raison de leurs points d'ébullition plus élevés, elles ne sont pas considérées comme des huiles essentielles. Au lieu de cela, ils sont classiquement considérés comme des résines [89].



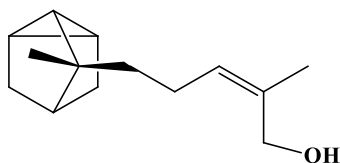
**Kahwéol**

**Figure II-35** : Structure d'un diterpène isolé du café

### II-2.2.2.5 Les sesterterpènes

Sont des terpènes ayant 25 atomes de carbone et cinq unités d'isoprène sont rares par rapport aux autres sous-classes (le préfixe sester signifie la moitié à trois). Un exemple de

sesterterpénoïde est le géranyl farnesol isolé à partir d'huile de graine de *Camellia sasanqua* (sasanqua) et *Camellia japonica* (camellia), famille des Theaceae [92].



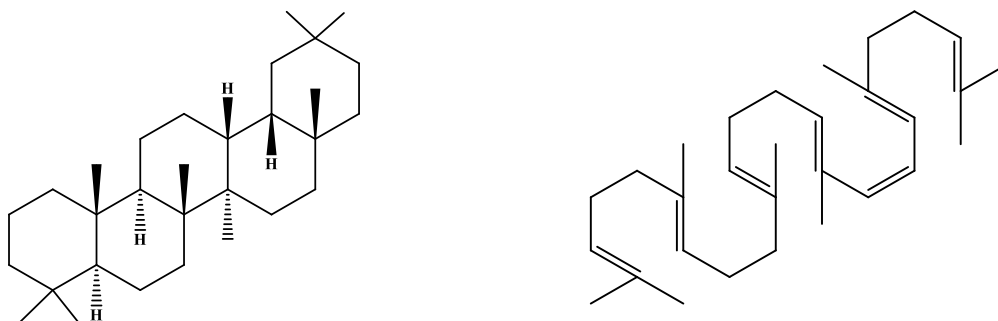
**$\alpha$ -Santalol**

**Figure II-36 :** Structure d' $\alpha$ -Santalol (Sesterterpène)

#### II-2.2.2.6 Les triterpènes

Les triterpènes sont des composés avec un squelette carboné basé sur six unités d'isoprène. Ils ont des structures cycliques relativement complexes. La plupart étaient soit des alcools, des aldéhydes ou des acides carboxyliques. Les triterpènes peuvent être divisés en au moins quatre groupes de composés: les vrais triterpènes, les stéroïdes, les saponines et les glycosides cardiaques [91].

Ces composés sont des précurseurs de stéroïdes dans les plantes et les animaux. Les triterpènes et les stéroïdes sont libres, sous forme de glycosides ou sous d'autres formes combinées. Les structures des triterpènes et des stéroïdes peuvent être subdivisées en environ 40 types principaux [93]. Ce sont souvent des solides incolores à point de fusion élevé et largement répandus parmi la résine végétale, le liège et la cutine [89].



**Oleanane**

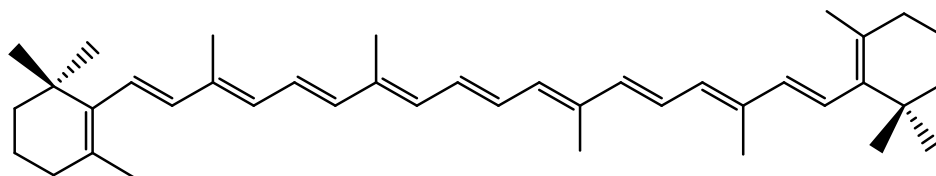
**Squalène**

**Figure II-37 :** Structure des triterpènes [88]

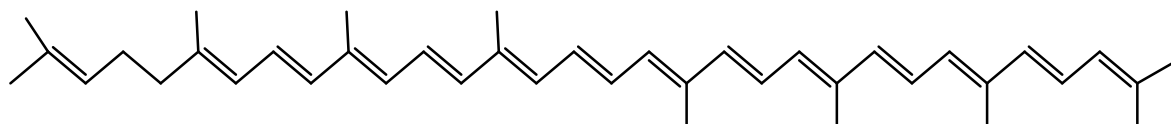


### II-2.2.2.7 Les tétraterpènes

Il contient huit unités d'isoprène qui peuvent être acycliques comme le lycopène, monocycliques comme le gamma-carotène et bicycliques comme les alpha et les bêta-carotènes [12].



**β-carotène**



**Lycopène**

**Figure II-38** : Structure de quelques tétraterpénoïdes

### II-2.2.3 Biosynthèse des terpènes

Les terpènes sont synthétisés à partir de métabolites primaires par au moins deux voies différentes: la voie mévalonate (joignant trois molécules d'acétyl-CoA) et la voie non mévalonate, qui produisent toutes les deux du diphosphate d'isopentényle (IPP) et du diphosphate diméthylallyl (DMAPP), respectivement, ces derniers étant les unités de base dans la synthèse des terpènes (Figure II-39). La source de base des terpènes et autres métabolites secondaires est directement liée au métabolisme primaire des plantes. Dans ce cas, la présence d'acétyl-CoA sur la voie de l'IPP et du pyruvate plus le glycéraldéhyde 3-phosphate, dans la voie du DMAPP, est essentielle pour la synthèse des terpénoïdes dans les plantes [94].

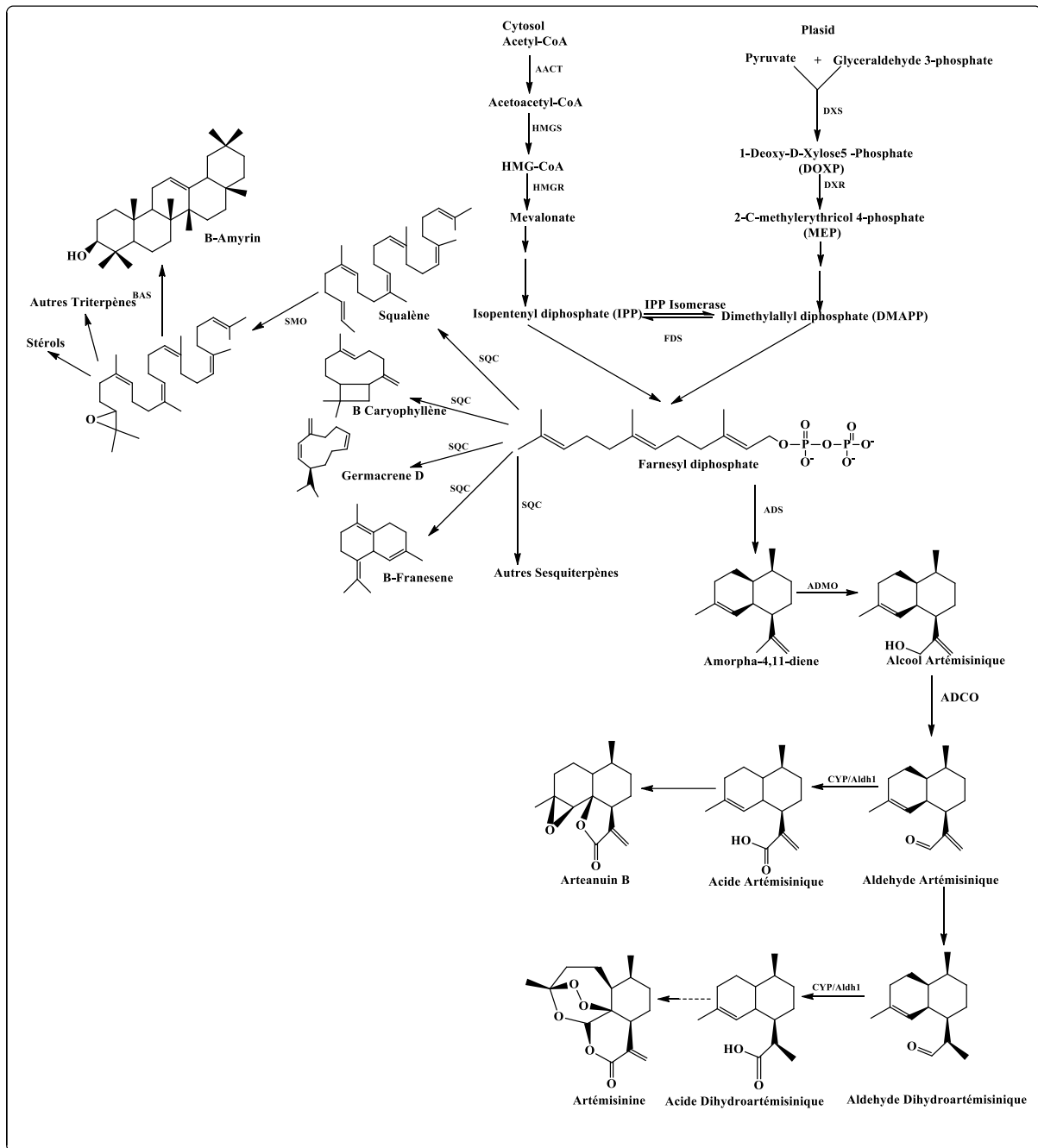


Figure II-39: Biosynthèse des terpènes

HMGR: HMG-CoA reductase, DXS : 1-deoxy-D-xylose-5-phosphate synthase,DXR: 1-deoxy-D-xylose-5-phosphate reductoisomérase, IPPisomérase : Isopentyl diphosphate isomérase, FDS : Farnesyl diphosphate synthase, ADS : Amorpha-4,11-diène synthase, ADMO : Amorpha-4,11-diène monoxygénase, ADCO : Amorpha-4,11-diène C-12 oxydase, SQC : Sesquiterpène cyclase, SQS : Squalene synthase, BAS : Beta-amyrin synthase.

### II-2.2.4 Effets biologiques des terpènes

Une large gamme des propriétés biologiques des terpènes est décrite, y compris les effets chimio-préventifs du cancer, les activités antimicrobiennes, antifongiques, antivirales, anti hyperglycémiques, anti-inflammatoires et antiparasitaires. Les terpènes sont également considérés comme des agents améliorant la pénétration cutanée et des agents impliqués dans la prévention et le traitement de plusieurs maladies inflammatoires [95].

En raison de leur comportement antioxydant, les terpènes peuvent offrir une protection appropriée dans des conditions de stress oxydatif dans différentes maladies, notamment les maladies hépatiques, rénales, neurodégénératives et cardiovasculaires, le cancer, le diabète et le vieillissement [96].

**Tableau II-2 :** Effets biologiques des terpènes

Terpènes	Effets Biologiques	Sources
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Amarantholidols A,</li> <li>➤ Amarantholidols B,</li> <li>➤ Amarantholidols C,</li> <li>➤ Amarantholidols D</li> </ul>	Activité antioxydante	<i>Amaranthus retroflexus</i> L. [97]
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Trans-Sabinene hydrate méthyl ether,</li> <li>➤ Cis-Sabinene hydrate méthyl ether,</li> <li>➤ 1,2-Epoxy-menth-4-ène,</li> <li>➤ 1,2-Epoxy-menth-4(8)-ène</li> </ul>	Activité antioxydante	<i>Nigella sativa</i> L. [98]
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Acide 3<math>\beta</math>-Hydroxyolean-12-en-28-oïque</li> </ul>	Activité cytotoxique	<i>Mayodendron igneum</i> Kurz [99]
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ (4E, 8Z)-3,3a,6,7-tetrahydro-3,9-diméthyl-5-(6-méthylheptan-2-yl)cycloocta[b]furan-2(9aH)-one,</li> <li>➤ (35E)-1,2,3,5,6,6-icosahydro-4,4,8b,10,14,17,20,20-</li> </ul>	Activité Antioxydante Activité anti-inflammatoire	<i>Rhizophora mucronata</i> [100]

octamethylpicen-3-yl-34,35-dimethyloct-31-enoate		
➤ Artémisoïde	Anti-inflammatoire	<i>Artemisia asiatica</i> [101]
➤ Huperzine A	Traiter la maladie d'Alzheimer	<i>Huperzia serrata</i> [102]
➤ Endoperoxide yingzhaosu A	Activité antimalariale	<i>Artabotrys uncinatus</i> [103]
➤ $\alpha$ -Onocerin	Diurétique, Activité antiseptique, Activité antimicrobienne	<i>Ononis spinosa</i> L. [104]

## II-2.3 Les alcaloïdes

### II-2.3.1 Définitions des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un grand groupe avec plus de 15 000 substances, trouvées dans environ 20% des espèces vasculaires. Ces composés sont généralement caractérisés par la présence d'un atome d'azote à l'état oxydant dans un cycle hétérocyclique [94]. Les alcaloïdes sont des composés de faible poids moléculaire et, ils sont généralement alcalins en raison de la présence d'un cycle hétérocyclique contenant un atome d'azote [105].

Les alcaloïdes sont produits par une grande variété d'organismes, tels que les bactéries, les champignons et les animaux, mais surtout par les plantes comme métabolites secondaires. La plupart sont toxiques pour d'autres organismes et peuvent être extraits par une base acide. La distinction entre les alcaloïdes et d'autres composés naturels contenant de l'azote n'est pas tracée [106].

Les composés comme les acides aminés, les protéines, les peptides, les nucléotides, les acides nucléiques et les amines ne sont généralement pas appelés alcaloïdes. Par rapport à la plupart des autres classes de métabolites secondaires, les alcaloïdes se caractérisent par une grande diversité structurale et n'ont pas de classification uniforme [107].

### II-2.3.2 Classification des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont généralement classés en fonction de leurs précurseurs moléculaires communs dans la biosynthèse, ainsi les alcaloïdes sont répartis selon leurs formes et leur origine en trois principaux types d'alcaloïdes: les alcaloïdes vrais, les proto-alcaloïdes et les pseudo-alcaloïdes. Les vrais alcaloïdes et proto-alcaloïdes sont dérivés des acides aminés, tandis que les pseudo-alcaloïdes ne sont pas dérivés de ces composés [108].

#### II-2.3.2.1 Les vrais alcaloïdes

Les vrais alcaloïdes sont bio synthétiquement dérivés des acides aminés et ils partagent un cycle hétérocyclique avec l'azote. Ces alcaloïdes sont des substances hautement réactives avec une activité biologique même à faibles doses. Tous les vrais alcaloïdes ont un goût amer et apparaissent comme un solide blanc, à l'exception de la nicotine qui est un liquide brun. Les vrais alcaloïdes peuvent apparaître dans les plantes à l'état libre, sous forme de sels et sous forme de N-oxydes [108].

#### II-2.3.2.2 Les protoalcaloïdes

Les protoalcaloïdes sont des composés dans lesquels l'atome N dérivé d'un acide aminé ne fait pas partie de l'hétérocycle. Ces types d'alcaloïdes comprennent des composés dérivés de la l-tyrosine et du l-tryptophane [109].

#### II-2.3.2.3 Les pseudoalcaloïdes

Les pseudoalcaloïdes sont des composés alcaloïdiques qui ne dérivent pas d'acides aminés. Il s'agit généralement d'isoprènoïdes, et des dérivés de l'acétate [109].

### II-2.3.3 Biosynthèse des alcaloïdes

Biosynthétiquement, les alcaloïdes proviennent de la réaction du produit de la décarboxylation de l'acide aminé (phényl éthylamine, tyramine) ou de l'un de ses homologues (dopamine) avec une autre molécule qui est, le plus souvent, une (molécule d'acide aminé sous sa forme désaminé (aldéhyde ou équivalent, c'est-à-dire un  $\alpha$ -céto-acide) plus rarement, une unité isoprénique peut intervenir dans le processus biosynthétique : c'est en particulier les cas chez les Rubiaceae [109].

### II-2.3.4 Effets biologiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes exercent généralement une activité pharmacologique particulièrement chez l'homme. Aujourd'hui, plusieurs médicaments sont des alcaloïdes naturels alors que des nouveaux médicaments alcaloïdes sont toujours en cours de développement pour une utilisation clinique, par exemple taxol de *Taxus baccata* [110].

La plupart des alcaloïdes ayant une activité biologique chez l'homme affectent le système nerveux, en particulier l'action des transmetteurs chimiques, par exemple acétylcholine, apinéphrine, norépinéphrine, gama aminobutyrioacide, dopamine et sérotonine. Les activités antibiotiques sont courantes pour les alcaloïdes ainsi certains sont même utilisés comme antiseptiques en médecine [111].

**Tableau II-4 :** Effets biologiques des alcaloïdes

Alcaloïdes	Effets Biologiques	Sources
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ vinblastine,</li> <li>➤ vincristine</li> </ul>	Activité anticancéreuse	<i>Vinca rosea</i> [112]
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Lycorine</li> </ul>	Activité antitumorale, Activité antiviral, Activité antimalariale Activité anti-inflammatoire	Espèces du genre <i>Lycoris</i> [113]
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Tomatidine</li> <li>➤ solasodine</li> </ul>	Activité anticancéreuse	<i>Solanum aculeastrum</i> [114]
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Berbérine</li> </ul>	Activité anti-inflammatoire, Activité anticancéreuse, Activité antibactérienne, Activité antidiabétique,	<i>Rhizoma Coptidis</i> [115]

---

	Activité anti-ulcéreuse	
	Protection des lésions d'ischémie-reperfusion myocardique,	
	Expansion des vaisseaux sanguins,	
	Inhibition de l'agrégation plaquettaire,	
	Effet hépatoprotecteur et neuroprotecteur	
<hr/>		
➤ Evodiamine	Activité anti-anxiétique, Activité anti-nociceptive, Activité anti-inflammatoire, Activité antiallergique, Activité anticancéreuse, Activité anti-obésité	<i>Evodia rutaecarpa</i> [116]
<hr/>		
➤ Matrine	Activité antibactérienne, Activité antivirale, Activité anti-inflammatoire, Activité antiasthmatique, Activité antiarythmique, Activité anti-obésité, Activité anticancéreuse, Agent diurétique et cholérétique, Activité hépatoprotecteur, Agent néphroprotecteur et cardioprotecteur	<i>Sophora flavescens</i> Ait L. [117]

---

---

➤ Piperine	Activité antioxydante,	<i>Piper nigrum</i> et <i>Piper longum</i> [116], [118]
	Activité anti-inflammatoire,	
	Activité anticonvulsante,	
	Activité antimutagénique,	
	Hypolipidémique,	
	Activité antitumorale et favorise la sécrétion de la bile	
<hr/>		
➤ Sanguinarine	Activité antibactérienne,	<i>Sanguinaria canadensis</i> L. et <i>Chelidonium majus</i> L. [116], [119-121]
	Activité antifongique,	
	Activité antischistosomale,	
	Activité antiplaquettaire	
	Activité anti-inflammatoire	
<hr/>		
➤ Tetrandrine	Activité immunomodulatrice,	Racine de <i>Stephania tetrandra</i> [116]
	Activité anti-inflammatoire,	
	Activité antiarythmique et portale	
	Activité anticancéreuse	
	Activité neuroprotectrice	

---



**Références bibliographique**

- [1] Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR presses polytechniques.
- [2] Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., & Bansal, Y. K. (2015). Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9(3), 293-304.
- [3] Bennetts, H. W., Uuderwood, E. J., & Shier, F. L. (1946). A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Australian veterinary journal*, 22(1), 2-12.
- [4] Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75(3), 311-335.
- [5] Guignard, L., Cossen, L., & Henry, M. (1985). *Abrégé de phytochimie*, édition Masson. Paris.
- [6] Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales*. Technique et documentation Lavoisier, Paris.
- [7] Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Technique et documentation Lavoisier, Paris.
- [8] Beta, T., Nam, S., Dexter, J. E., & Sapirstein, H. D. (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal chemistry*, 82(4), 390-393.
- [9] Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (2012). *Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology*. Springer Science & Business Media.
- [10] Hussein, R. A., & El-Anssary, A. A. (2018). Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. *Herbal Medicine*. 1,13.
- [11] Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.

- [12] Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry*, 66(4), 401-436.
- [13] Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of natural products*, 59(2), 205-215.
- [14] Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12), 3875-3883.
- [15] Mole, S. (1993). The systematic distribution of tannins in the leaves of angiosperms: a tool for ecological studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21(8), 833-846.
- [16] Khanbabae, K., & Van Ree, T. (2001). Tannins: classification and definition. *Natural product reports*, 18(6), 641-649.
- [17] Catarino, M. D., Silva, A. M., Cruz, M. T., & Cardoso, S. M. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Geranium robertianum* L. decoctions. *Food & function*, 8(9), 3355-3365.
- [18] Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F. J., & Mantecón, Á. R. (2004). Tannins in Ruminant feed stuff. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2 (2), 191-202.
- [19] Goenka, P., Sarawgi, A., Karun, V., Nigam, A. G., Dutta, S., & Marwah, N. (2013). *Camellia sinensis* (Tea): Implications and role in preventing dental decay. *Pharmacognosy reviews*, 7(14), 152.
- [20] Hedqvist, H. (2004). *Metabolism of soluble proteins by rumen microorganisms and the influence of condensed tannins on nitrogen solubility and degradation*.
- [21] Smyth, T., Ramachandran, V. N., & Smyth, W. F. (2009). A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *International journal of antimicrobial agents*, 33(5), 421-426.
- [22] Weinmann, I. (1997). *History of the development and applications of coumarin and coumarin-related compounds. Coumarins: biology, applications and mode of action*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.

- [23] Keating, G. J., & O'kenedy, R. (1997). *The chemistry and occurrence of coumarins. Coumarins: biology, applications and mode of action*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
- [24] Verbois, S. (2015). *La phytothérapie: Une synthèse de référence illustrée pour découvrir les vertus et profiter des bienfaits des plantes*. Editions Eyrolles.
- [25] Lugasi, A. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta biologica szegediensis*, 47(1-4), 119-125.
- [26] Wollgast, J., & Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33(6), 423-447.
- [27] Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S., & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in plant science*, 3, 222.
- [28] Rampe, H. L., Siahaan, R., Rorong, J. A., & Rumondor, M. J. (2019). Flavonoid content as antibiotic resistance of peanut plants (*arachis hypogaea* l) induced elicitor of *amaranthus spinosus* l and *imperata cylindrica* l extracts. in *proceedings The 4th International Conference on Basic Sciences 2018: The Development of Sciences and Technology in Improving Natural and Cultural Resources*. Faculty of Mathematics and Natural Sciences Universitas Pattimura Ambon.
- [29] De Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C. and Brinkman, U.A.T. (2006) Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 31-63.
- [30] Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, 1- 15.
- [31] Albulescu, M., & Popovici, M. (2007). Isoflavones-biochemistry, pharmacology and therapeutic use. *Rev Roum Chim*, 52(6), 537-50.
- [32] Iwashina, T. (2013). Flavonoid properties of five families newly incorporated into the order Caryophyllales. *Bull Natl Mus Nat Sci*, 39, 25-51.

- [33] Rozmer, Z., & Perjési, P. (2016). Naturally occurring chalcones and their biological activities. *Phytochemistry reviews*, 15(1), 87-120.
- [34] Hertog, M. G., Hollman, P. C., & Van de Putte, B. (1993). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *Journal of agricultural and food chemistry*, 41(8), 1242-1246.
- [35] López-Lázaro, M. (2009). Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 9(1), 31-59.
- [36] Boumendjel, A. (2003). [General Articles] Aurones: A Subclass of Flavones with Promising Biological Potential. *Current medicinal chemistry*, 10(23), 2621-2630.
- [37] Daniel, M. (2006). *Medicinal plants: chemistry and properties*. Science publishers.
- [38] Pan, X., Niu, G., & Liu, H. (2003). Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 42(2), 129-133.
- [39] Cardona, M. L., Fernández, I., Pedro, J. R., & Serrano, A. (1990). Xanthones from *Hypericum reflexum*. *Phytochemistry*, 29(9), 3003-3006.
- [40] Hostettmann, K., & Miura, I. (1977). A New Xanthone Diglucoside from *Swertia perennis*L. *Helvetica Chimica Acta*, 60(1), 262-264.
- [41] Vieira, L. M. M., & Kijjoa, A. (2005). Naturally-occurring xanthones: recent developments. *Current medicinal chemistry*, 12(21), 2413-2446.123.
- [42] Sultanbawa, M. U. S. (1980). Xanthonoids of tropical plants. *Tetrahedron*, 36(11), 1465-1506.
- [43] Castelão Jr, J. F., Gottlieb, O. R., De Lima, R. A., Mesquita, A. A., Gottlieb, H. E., & Wenkert, E. (1977). Xanthonolignoids from *Kielmeyera* and *Caraipa* species-13C NMR spectroscopy of xanthones. *Phytochemistry*, 16(6), 735-740.
- [44] Nielsen, H., & Arends, P. (1978). Structure of the xanthonolignoid kielcorin (drug plants). *Phytochemistry*, 17, 2040–2041.

- [45] Delle Monache, F., Mac-Quhae, M. M., Delle Monache, G., Bettolo, G. M., & De Lima, R. A. (1983). Xanthonés, xanthonolignoids and other constituents of the roots of *Vismia guaramirangae*. *Phytochemistry*, 22(1), 227-232.
- [46] Pinheiro, L., Nakamura, C. V., Dias Filho, B. P., Ferreira, A. G., Young, M. C. M., & Cortez, A. G. (2003). Antibacterial xanthonés from *Kielmeyera variabilis* mart.(Clusiaceae). *Memórias do instituto Oswaldo cruz*, 98(4), 549-552.
- [47] Cardona, M. L., Fernández, M. I., Pedro, J. R., Seoane, E., & Vidal, R. (1986). Additional new xanthonés and xanthonolignoids from *Hypericum canariensis*. *Journal of natural products*, 49(1), 95-100.
- [48] Nikolaeva, G. G., Glyzin, V. I., Mladentseva, M. S., Sheichenko, V. I., & Patudin, A. V. (1983). Xanthonés of *Gentiana lutea*. *Chemistry of Natural Compounds*, 19(1), 106-107.
- [49] Ishiguro, K., Nagata, S., Oku, H., & Yamaki, M. (2002). Bisxanthonés from *Hypericum japonicum*: inhibitors of PAF-induced hypotension. *Planta medica*, 68(03), 258-261.
- [50] Nkengfack, A. E., Mkounga, P., Meyer, M., Fomum, Z. T., & Bodo, B. (2002). Globulixanthonés C, D and E: three prenylated xanthonés with antimicrobial properties from the root bark of *Symphonia globulifera*. *Phytochemistry*, 61(2), 181-187.
- [51] Lamuela-Raventos, R. M., Romero-Perez, A. I., Waterhouse, A. L., & De La Torre-Boronat, M. C. (1995). Direct HPLC analysis of cis-and trans-resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(2), 281-283.
- [52] Kuete, V. (Ed.). (2013). *Medicinal plant research in Africa: pharmacology and chemistry*. Newnes.
- [53] Barker, D. (2019). Lignans. *Molecules Basel, Switzerland*, 24(7).
- [54] Harborne, J. B., & Mabry, T. J. (2013). *The flavonoids: advances in research*. Springer.
- [55] Forkmann, G. (1993) *Biosynthesis of flavonoids*. In: Scalbert A (ed) Polyphenolic phenomena. INRA Editions, Paris.

- [56] Heldt, H. W. (1999). Pflanzenbiochemie, Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg, Germany.
- [57] Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant physiology*, 126(2), 485-493.
- [58] Jeong, S. T., Goto-Yamamoto, N., Hashizume, K., & Esaka, M. J. P. S. (2006). Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3', 5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*). *Plant Science*, 170(1), 61-69.
- [59] Davies, K. M., & Schwinn, K. E. (2006). Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*, 143-218.
- [60] Wen, P. F., Chen, J. Y., Kong, W. F., Pan, Q. H., Wan, S. B., & Huang, W. D. (2005). Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. *Plant Science*, 169(5), 928-934.
- [61] Chen, J. Y., Wen, P. F., Kong, W. F., Pan, Q. H., Zhan, J. C., Li, J. M., Wan, S.B & Huang, W. D. (2006). Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. *Postharvest Biology and Technology*, 40(1), 64-72.
- [62] Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2009). Amino Acids and Biogenic Amines. *Wine Chemistry and Biochemistry*, 163-189.
- [63] Hoffmann, L., Besseau, S., Geoffroy, P., Ritzenthaler, C., Meyer, D., Lapierre, C., Legrand, M. (2004). Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell*, 16(6), 1446-1465.
- [64] Li, Q., He, F., Zhu, B. Q., Liu, B., Sun, R. Z., Duan, C. Q., & Wang, J. (2014). Comparison of distinct transcriptional expression patterns of flavonoid biosynthesis in Cabernet Sauvignon grapes from east and west China. *Plant physiology and biochemistry*, 84, 45-56.
- [65] Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., & Abdelly, C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(3-4), 244-249.

- [66] Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.
- [67] Jain, C., Khatana, S., & Vijayvergia, R. (2019). Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. *Int. J. Pharm. Sci*, 10, 494-404.
- [68] Geethalakshmi, R., & Sarada, V. D. (2018). In vitro and in silico antimicrobial activity of sterol and flavonoid isolated from *Trianthema decandra* L. *Microbial pathogenesis*, 121, 77-86.
- [69] De Souza, P. O., Bianchi, S. E., Figueiró, F., Heimfarth, L., Moresco, K. S., Gonçalves, R. M., Hope, J.B., Klein, C.P., Salbego, C.G., Gelain, D.P., Bassani, V.L., Zanotto Filho, A., Moreira, J.C.F, & Bassani, V. L. (2018). Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. *Toxicology in Vitro*, 51, 23-33.
- [70] Jarial, R., Thakur, S., Sakinah, M., Zularisam, A. W., Sharad, A., Kanwar, S. S., & Singh, L. (2018). Potent anticancer, antioxidant and antibacterial activities of isolated flavonoids from *Asplenium nidus*. *Journal of King Saud University-Science*, 30(2), 185-192.
- [71] Li, J. J., Zhang, X., Shen, X. C., Xu, C. Y., Tan, C. J., & Lin, Y. (2020). Phytochemistry and biological properties of isoprenoid flavonoids from *Sophora flavescens* Ait. *Fitoterapia*, 104556.
- [72] Salae, A. W., Chairerk, O., Sukkoet, P., Chairat, T., Prawat, U., Tuntiwachwuttikul, P., ... & Ruchirawat, S. (2017). Antiplasmodial dimeric chalcone derivatives from the roots of *Uvaria siamensis*. *Phytochemistry*, 135, 135-143.
- [73] Li, L., Zhao, X. T., Luo, Y. P., Zhao, J. F., Yang, X. D., & Zhang, H. B. (2011). Novel cytotoxic chalcones from *Litsea rubescens* and *Litsea pedunculata*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 21(24), 7431-7433.
- [74] Jeong, E. Y., Jeon, J. H., Lee, C. H., & Lee, H. S. (2009). Antimicrobial activity of catechol isolated from *Diospyros kaki* Thunb. roots and its derivatives toward intestinal bacteria. *Food chemistry*, 115(3), 1006-1010.

- [75] Nair, P. R., Melnick, S. J., Wnuk, S. F., Rapp, M., Escalon, E., & Ramachandran, C. (2009). Isolation and characterization of an anticancer catechol compound from *Semecarpus anacardium*. *Journal of ethnopharmacology*, 122(3), 450-456.
- [76] Fachini-Queiroz, F. C., Kummer, R., Estevão-Silva, C. F., Carvalho, M. D. de B., Cunha, J. M., Grespan, R., Bersani-Amado, C.A., Cuman, R. K. N. (2012). Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1–10.
- [77] Lim, J. Y., Ishiguro, K., & Kubo, I. (1999). Tyrosinase inhibitory p-Coumaric acid from Ginseng leaves. *Phytotherapy Research*, 13(5), 371-375.
- [78] Toda, M., Okubo, S., Ikigai, H., Suzuki, T., Suzuki, Y., Hara, Y., & Shimamura, T. (1992). The protective activity of tea catechins against experimental infection by *Vibrio cholerae* O1. *Microbiology and immunology*, 36(9), 999-1001.
- [79] Fernandez, M. A., Garcia, M. D., & Saenz, M. T. (1996). Antibacterial activity of the phenolic acids fractions of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. *Journal of ethnopharmacology*, 53(1), 11-14.
- [80] Hashim, N. M., Rahmani, M., Ee, G. C. L., Sukari, M. A., Yahayu, M., Amin, M. A. M., Ali, A.M., & Go, R. (2012). Antioxidant, antimicrobial and tyrosinase inhibitory activities of xanthenes isolated from *Artocarpus obtusus* FM Jarrett. *Molecules*, 17(5), 6071-6082.
- [81] Li, L., Henry, G. E., & Seeram, N. P. (2009). Identification and bioactivities of resveratrol oligomers and flavonoids from *Carex folliculata* seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(16), 7282-7287.
- [82] Brownlee, H. E., McEuen, A. R., Hedger, J., & Scott, I. M. (1990). Anti-fungal effects of cocoa tannin on the witches' broom pathogen *Crinipellis perniciosus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 36(1), 39-48.
- [83] Yoshikawa, M., Harada, E., Naitoh, Y., Inoue, K., Matsuda, H., Shimoda, H., Yamahara, J., & Murakami, N. (1994). Development of bioactive functions in *Hydrangeae Dulcis* Folium. III. On the antiallergic and antimicrobial principles of *Hydrangeae Dulcis* Folium (1). Thunberginols A, B, and F. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 42(11), 2225-2230.



- [84] Langenheim, J. H. (1994). Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of chemical ecology*, 20(6), 1223-1280.
- [85] Elbein, A. D., & Molyneux, R. J. (1999). Alkaloid glycosidase inhibitors. *Comprehensive natural products chemistry*, 129.
- [86] Harborne, J. B. (1991). Recent advances in the ecological chemistry of plant terpenoids. *Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids*.
- [87] Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D., & Gupta, A. (2013). Phytochemistry of medicinal plants. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, 1(6).
- [88] Alamgir, A. N. M. (2018). *Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts*:. Springer International PU.
- [89] Cseke, L. J., Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Warber, S., Duke, J. A., & Brielmann, H. L. (2016). *Natural products from plants*. CRC press.
- [90] Bouloc, P. (2006). *Le chanvre industriel: production et utilisations*. France Agricole Editions.
- [91] Harborne, A. J. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Springer Science & Business Media.
- [92] Akihisa, T., Koike, K., Kimura, Y., Sashida, N., Matsumoto, T., Ukiya, M., & Nikaido, T. (1999). Acyclic and incompletely cyclized triterpene alcohols in the seed oils of theaceae and gramineae. *Lipids*, 34(11), 1151-1157.
- [93] Seigler, D. S. (1998). *Plant Secondary Metabolites*. New York: Springer Science & Business Media.
- [94] Olivoto, T., Nardino, M., Carvalho, I. R., Follmann, D. N., Szarecki, V. I. J., Ferrari, M., de Pelegrin, A.J., & de Souza, V. Q. O. (2017). Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors: A review. *African Journal of Agricultural Research*, 12(2), 71-84.

- [95] Paduch, R., Kandefor-Szerszeń, M., Trytek, M., & Fiedurek, J. (2007). Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, 55(5), 315.
- [96] Gonzalez-Burgos, E., & Gómez-Serranillos, M. P. (2012). Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Current medicinal chemistry*, 19(31), 5319-5341.
- [97] Pacifico, S., D'Abrosca, B., Golino, A., Mastellone, C., Piccolella, S., Fiorentino, A., & Monaco, P. (2008). Antioxidant evaluation of polyhydroxylated nerolidols from redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) leaves. *LWT-Food Science and Technology*, 41(9), 1665-1671.
- [98] Bourgou, S., Pichette, A., Lavoie, S., Marzouk, B., & Legault, J. (2012). Terpenoids isolated from Tunisian *Nigella sativa* L. essential oil with antioxidant activity and the ability to inhibit nitric oxide production. *Flavour and fragrance journal*, 27(1), 69-74.
- [99] Hashem, F. A., Sengab, A. E., Shabana, M. H., & Khaled, S. (2012). Antioxidant activity of *Mayodendron igneum* Kurz and the cytotoxicity of the isolated terpenoids. *Journal of Medicinally Active Plants*, 1(3), 88-97.
- [100] Raola, V. K., & Chakraborty, K. (2017). Two rare antioxidative prenylated terpenoids from loop-root Asiatic mangrove *Rhizophora mucronata* (Family Rhizophoraceae) and their activity against pro-inflammatory cyclooxygenases and lipoxidase. *Natural product research*, 31(4), 418-427.
- [101] Reddy, A. M., Lee, J. Y., Seo, J. H., Kim, B. H., Chung, E. Y., Ryu, S. Y., ... & Kim, Y. (2006). Artemisolide from *Artemisia asiatica*: Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) inhibitor suppressing prostaglandin E 2 and nitric oxide production in macrophages. *Archives of pharmacal research*, 29(7), 591-597.
- [102] Wang, R., & Tang, X. C. (2005). Neuroprotective effects of huperzine A. *Neurosignals*, 14(1-2), 71-82.
- [103] Zhou, W. S., & Xu, X. X. (1994). Total synthesis of the antimalarial sesquiterpene peroxide qinghaosu and yingzhaosu A. *Accounts of chemical research*, 27(7), 211-216.

- [104] Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K., & Georgiev, M. I. (2017). Terpenoids: Pharmacognosy. *Elsevier*, 233-266.
- [105] Matsuura, H. N., & Fett-Neto, A. G. (2015). Plant alkaloids: main features, toxicity, and mechanisms of action. *Plant toxins*, 1-15.
- [106] Giweli, A. A., Džamić, A. M., Soković, M., Ristić, M. S., Janačković, P., & Marin, P. D. (2013). The chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Salvia fruticosa* growing wild in Libya. *Archives of Biological Sciences*, 65(1), 321-329.
- [107] Verpoorte, R. (1998). Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today*, 3(5), 232-238.
- [108] Aniszewski, T. (2007). *Alkaloids-Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*. Elsevier.
- [109] Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4e éd.) Lavoisier.
- [110] Bartoli, M. H., Boitard, M., Fessi, H., Beriel, H., Devissaguet, J. P., Picot, F., & Puisieux, F. (1990). In vitro and in vivo antitumoral activity of free and encapsulated taxol. *Journal of microencapsulation*, 7(2), 191-197.
- [111] Roberts, M. F. (Ed.). (2013). *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications*. Springer Science & Business Media.
- [112] Zakariya, I., Moutaouakkil, Y., Nchinech, N., Maghous, A., Fettah, H., Nejari, R., & El Guessabi, L. (2017). Les Alcaloïdes Anticancéreux De La Perwenche De Madagascar The Alkaloids Anticancer Of Madagascar Periwinkle Plant. *Journal Marocain des Sciences Médicales*, 21(1).
- [113] Habartova, K., Cahlikova, L., Řezáčová, M., & Havelek, R. (2016). The biological activity of alkaloids from the Amaryllidaceae: from cholinesterases inhibition to anticancer activity. *Natural Product Communications*, 11(10), 1587-1594.

- [114] Koduru, S., Grierson, D. S., Van de Venter, M., & Afolayan, A. J. (2007). Anticancer activity of steroid alkaloids isolated from *Solanum aculeastrum*. *Pharmaceutical biology*, 45(8), 613-618.
- [115] Lu, J. J., Bao, J. L., Chen, X. P., Huang, M., & Wang, Y. T. (2012). Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents. *Evidence-based complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- [116] Ko, H. C., Wang, Y. H., Liou, K. T., Chen, C. M., Chen, C. H., Wang, W. Y., Chang, S., Hou, Y.C., Shen, C.F., & Shen, Y. C. (2007). Anti-inflammatory effects and mechanisms of the ethanol extract of *Evodia rutaecarpa* and its bioactive components on neutrophils and microglial cells. *European journal of pharmacology*, 555(2-3), 211-217.
- [117] Zhang, L., Wang, T., Wen, X., Wei, Y., Peng, X., Li, H., & Wei, L. (2007). Effect of matrine on HeLa cell adhesion and migration. *European journal of pharmacology*, 563(1-3), 69-76.
- [118] Bae, G. S., Kim, M. S., Jung, W. S., Seo, S. W., Yun, S. W., Kim, S. G., ... & Park, S. J. (2010). Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by piperine. *European journal of pharmacology*, 642(1-3), 154-162.
- [119] Mahady, G. B., & Beecher, C. W. W. (1994). Quercetin-induced benzophenanthridine alkaloid production in suspension cell cultures of *Sanguinaria canadensis*. *Planta medica*, 60(06), 553-557.
- [201] Vavrečková, C., Gawlik, I., & Müller, K. (1996). Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*; I. Inhibition of 5- and 12-lipoxygenase by a non-redox mechanism. *Planta medica*, 62(05), 397-401.
- [121] Lenfeld, J., Kroutil, M., Maršálek, E., Slavík, J., Preininger, V., & Šimánek, V. (1981). Antiinflammatory activity of quaternary benzophenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus*. *Planta medica*, 43(10), 161-165.

***PARTIE 01***

***CHAPITRE III***

***Etudes phytochimiques antérieures***

### III-1 Etudes phytochimiques antérieures sur le genre *Clematis*

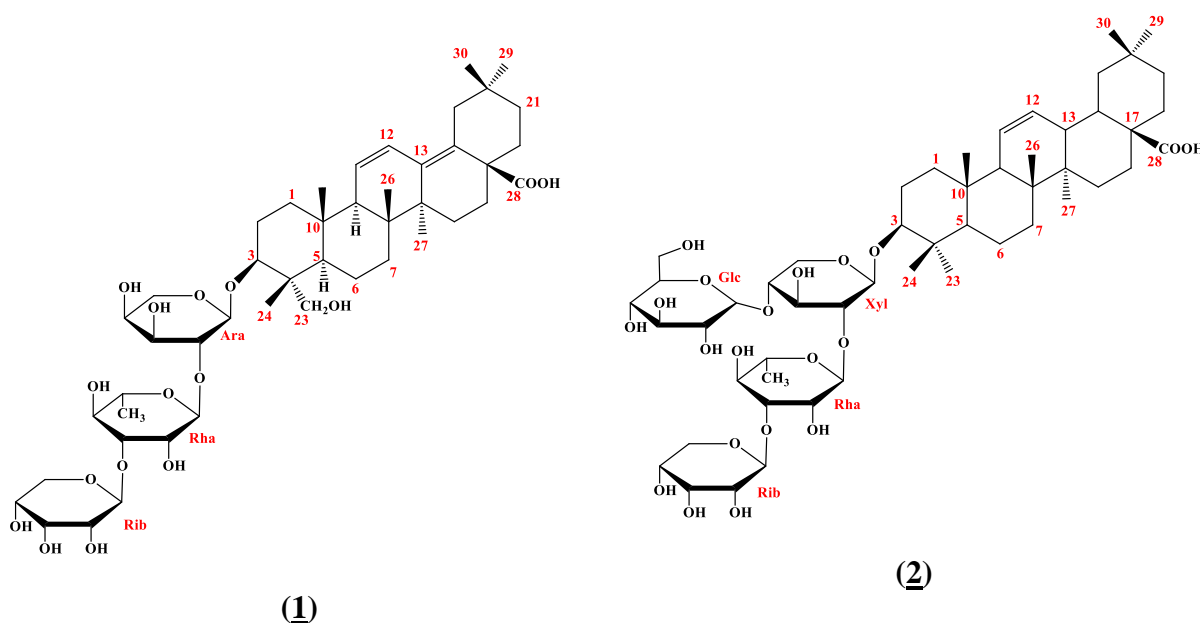
Différents types de métabolites, notamment des saponines, des flavonoïdes, des alcaloïdes, des coumarines et des anthocyanes, ont été signalés chez des plantes du genre *Clematis* [1].

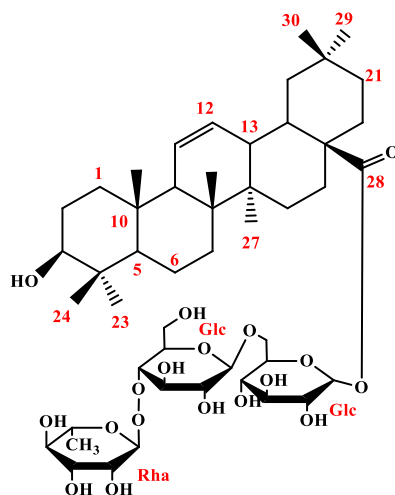
La clématite contient également des lignanes, des stéroïdes, des composés macrocycliques, des glycosides phénoliques et des huiles volatiles [2, 3]. Les aglycones communes appartiennent au triterpène pentacyclique comme l'acide oléanolique, l'hédéragénine et l'épihédéragénine [1].

#### III-1.1 Les saponines

Les saponines triterpénoïdes des espèces de clématites sont principalement de type oléanolique et de type hédéragénine, dont la plupart sont des saponines bidesmosidiques, substituées par des chaînes d'oligosaccharides en C<sub>3</sub> et C<sub>28</sub>, et certaines sont remplacées dans les chaînes d'oligosaccharides par les groupements : acétyl, cafféoyl, isoféruloyl, *p*-méthoxy cinnamyle et les groupes 3,4-diméthoxy cinnamyle [2].

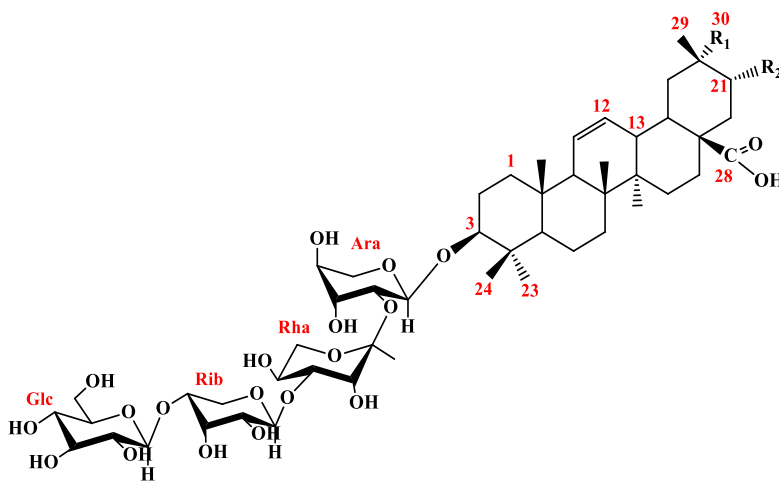
L'étude phytochimique portant sur l'extrait n-Butanol des racines de *Clematis argenticulida* a conduit à l'isolement de trois triterpénoïdes.  $3\beta$ -O- $[\beta$ -D-ribofuranosyl-(1→3)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl] hederagenin-11,13-diène-28-oïque acide (**1**),  $3\beta$ -O- $[\beta$ -D-ribofuranosyl-(1→3)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- $[\beta$ -D-glucopyranosyl-(1→4)]- $\beta$ -D-xylofuranosyl} acid oléanolique (**2**) et le cussonsoside B (**3**) [4].

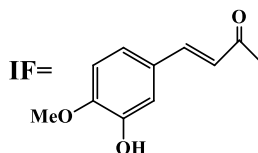
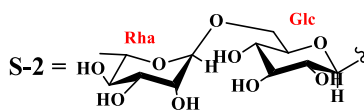
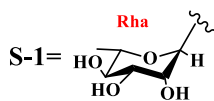
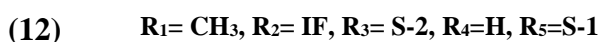
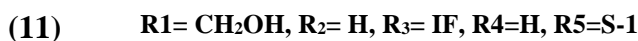
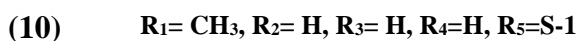
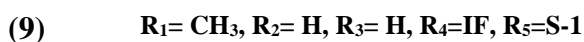
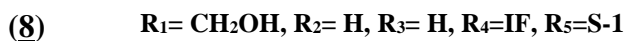
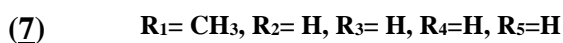
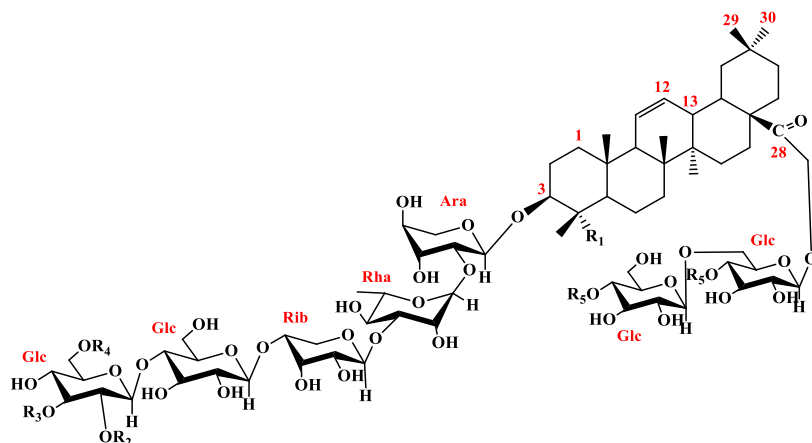




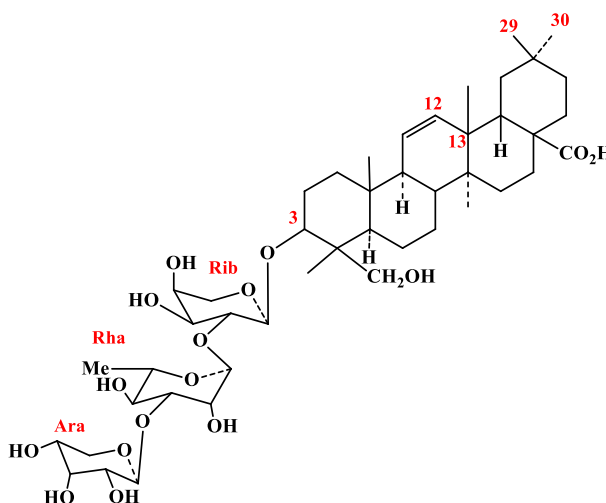
(3)

Neuf saponines triterpéniques ont été isolées des racines et des rhizomes de *Clematis mandshurica* [5]. Il s'agit de : mandshunoside (F-I) (4-7), clematochinenoside E (8), clematochinenoside F (9), clematomandshurica saponine C (10), clematernoside B (11), and clematernoside D (12).

(4)  $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ ,  $R_2 = \text{H}$ (5)  $R_1 = \text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{OH}$



Une étude, effectuée sur les racines de l'espèce *Clematis grata* [6], a permis l'identification d'une saponoside triterpénique le clematoside- S (13).

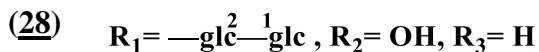
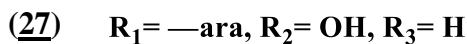
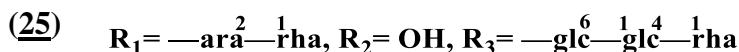


(13)

Une étude phytochimique des parties aériennes de *Clematis akebioides* (Maximowicz) Veitch a conduit à l'isolement de quinze saponines triterpénoïdes (14–28) [7]. Il s'agit de : la



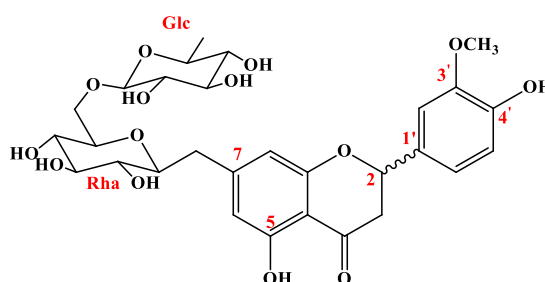




### III-1.2 Les flavonoïdes

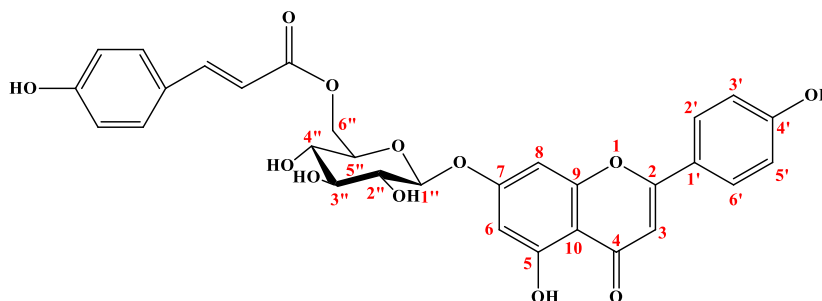
Les flavonoïdes des espèces de clématites sont principalement des flavonols, des flavones, des isoflavones, des flavanones, des xanthones et leurs glucosides (les fragments de sucre sont liés à l'aglycone par l'oxygène ou les atomes de carbone), dont les aglycones sont principalement l'apigénine, le kaempférol, la lutéoline et la quercétine [8].

Une étude sur l'extrait méthanolique de la plante *Clematis arandii* a permis l'isolement d'une flavanone glycoside la clematine (29) [9].



(29)

Un flavonoïde glycoside a été isolé des parties aériennes de *Clematis tangutica* [10]. Il s'agit de : Apigénin-7-*O*- $\beta$ -D-(6''-*p*-coumaroyl) glucopyranoside (APG) (30).

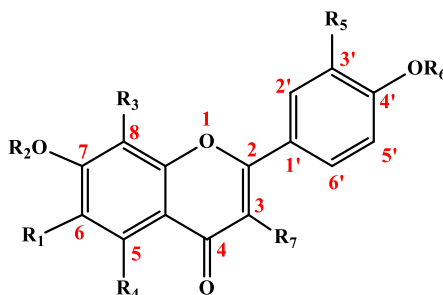


(30)

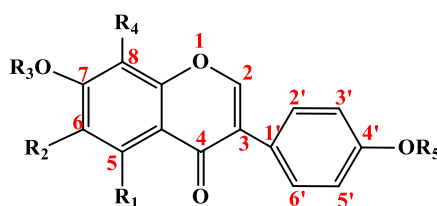
L'espèce *Clematis hexapetala* s'est révélée riche en flavonoïdes. En effet, l'investigation chimique sur les racines et les rhizomes de l'espèce citée, a permis d'en isoler

15[11]: Linarin (**31**), Kaempferol-3-O-glucoside (**32**), 3,4,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (**33**), Nobiletin (**34**), Tangeritin (**35**), Hesperetin (**36**), Liquiritigenin (**37**), Liquiritigenin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**38**), Naringenin (**39**), Daidzein (**40**), Formononetin (**41**), Genistein (**42**), 6-hydroxybiochain A (**43**), Tectoridin (**44**), Puerarin (**45**).

Le composé (**39**) a été isolé aussi à partir de l'espèce *Clematis trichotoma* [12].



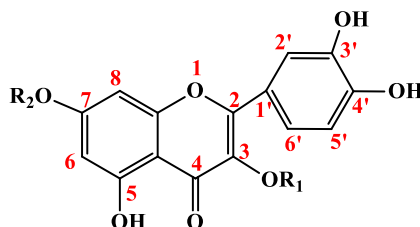
- (**31**) R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= Rha(1→6)-Glc, R<sub>3</sub>= H, R<sub>4</sub>= CH<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>= H, R<sub>6</sub>= Me, R<sub>7</sub>= H  
 (**32**) R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= H, R<sub>3</sub>= H, R<sub>4</sub>= OH, R<sub>5</sub>= H, R<sub>6</sub>= H, R<sub>7</sub>= O-Glc  
 (**33**) R<sub>1</sub>= OMe, R<sub>2</sub>= OMe, R<sub>3</sub>= OMe, R<sub>4</sub>= OMe, R<sub>5</sub>= OMe, R<sub>6</sub>= Me, R<sub>7</sub>= OMe  
 (**34**) R<sub>1</sub>= OMe, R<sub>2</sub>= OMe, R<sub>3</sub>= OMe, R<sub>4</sub>= OMe, R<sub>5</sub>= Me, R<sub>6</sub>= OMe, R<sub>7</sub>= H  
 (**35**) R<sub>1</sub>= OMe, R<sub>2</sub>= OMe, R<sub>3</sub>= OMe, R<sub>4</sub>= OMe, R<sub>5</sub>= H, R<sub>6</sub>= Me, R<sub>7</sub>= H  
 (**36**) R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= H, R<sub>3</sub>= H, R<sub>4</sub>= OH, R<sub>5</sub>= OH, R<sub>6</sub>= Me, R<sub>7</sub>= H  
 (**37**) R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= H, R<sub>3</sub>= H, R<sub>4</sub>= H, R<sub>5</sub>= H, R<sub>6</sub>= H, R<sub>7</sub>= H  
 (**38**) R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= Glc, R<sub>3</sub>= H, R<sub>4</sub>= H, R<sub>5</sub>= Glc, R<sub>6</sub>= H, R<sub>7</sub>= H  
 (**39**) R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= H, R<sub>3</sub>= H, R<sub>4</sub>= OH, R<sub>5</sub>= H, R<sub>6</sub>= H, R<sub>7</sub>= H



- (**40**) R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= H, R<sub>3</sub>= H, R<sub>4</sub>= H, R<sub>5</sub>= H  
 (**41**) R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= H, R<sub>3</sub>= H, R<sub>4</sub>= H, R<sub>5</sub>= Me  
 (**42**) R<sub>1</sub>= OH, R<sub>2</sub>= H, R<sub>3</sub>= H, R<sub>4</sub>= H, R<sub>5</sub>= H  
 (**43**) R<sub>1</sub>= OH, R<sub>2</sub>= OMe, R<sub>3</sub>= Glc, R<sub>4</sub>= H, R<sub>5</sub>= Me  
 (**44**) R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= H, R<sub>3</sub>= Glc, R<sub>4</sub>= H, R<sub>5</sub>= H

(45)  $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H, R_4 = Glc, R_5 = H$

Deux flavonoïdes, la quercétrine (46) et l'isoquercétine (47) ont été isolés à partir de *Clematis purpurea* [13], la quercétrine a été isolé aussi de la plante *Clematis intricata* [2].



(46)  $R_1 = H, R_2 = H$

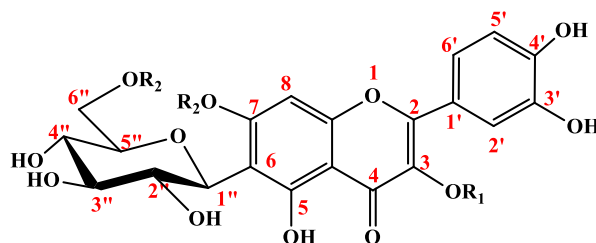
(47)  $R_1 = Glc, R_2 = H$

(48)  $R_1 = \beta\text{-D-glucopyranosyl}, R_2 = H$

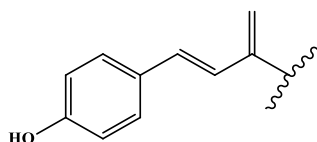
(49)  $R_1 = Rha(1 \rightarrow 6)\text{-Glc}, R_2 = H$

Une étude, effectuée sur l'espèce *Clematis stans* [14], a permis l'identification de trois flavonoïdes : Isoquercétine (47), 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl quercétine (48), Rutine (49). Leurs structures ont été déterminées par les méthodes chimiques et spectroscopiques d'analyse.

Le composé 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl quercétine (48), l'isovitexine 6''-*O*-*E*-*p*-coumarate (50) et (51) ont été aussi isolés à partir d'un extrait d'éthanol des parties aériennes de *Clematis rehderiana* [15].

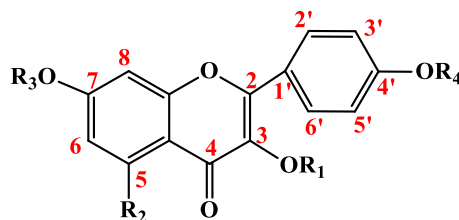


(50)  $R_1 = H, R_2 = E\text{-}p\text{-coumaryl}$



(51)  $R_1 = OH, R_2 = H$

Cinq flavonols glycosidés : terniflonoside A (**52**), kaempférol-3-*O*-glucoside (**53**), kaempférol-3-*O*-rutinoside (**54**), kaempférol-3,7-*O*-dirhamnoside (**55**), et rutine (**49**) ont été isolés de la plante entière de *Clematis terniflora* [16].



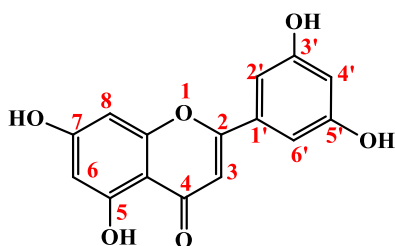
(**52**)  $R_1 = H$ ,  $R_2 = OH$ ,  $R_3 =$  ,  $R_4 = H$

(**53**)  $R_1 = \text{Glc}$ ,  $R_2 = OH$ ,  $R_3 = H$ ,  $R_4 = H$

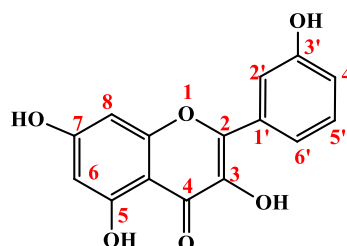
(**54**)  $R_1 = \text{Rha}(1 \rightarrow 6)\text{-Glc}$ ,  $R_2 = OH$ ,  $R_3 = H$ ,  $R_4 = H$

(**55**)  $R_1 = \text{Rha}$ ,  $R_2 = OH$ ,  $R_3 = \text{Rha}$ ,  $R_4 = H$

Deux autres flavonoïdes ont été isolés de l'espèce *Clematis terniflora* [17]. Il s'agit du 5,7,3',5' tétrahydroxy dihydroflavone (**56**), et du 3,5,7,3' tétrahydroxy flavone (**57**).

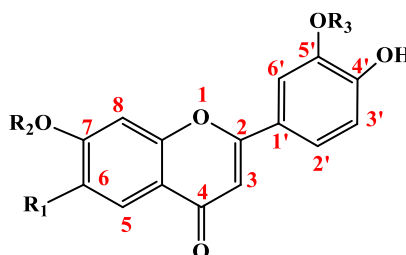


(**56**)



(**57**)

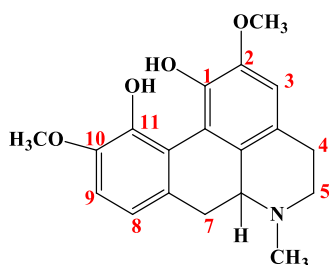
Une étude phytochimique menée sur l'espèce *Clematis viornae* a permis d'isolés les flavonoïdes suivants [18]: lutéoline (**58**), lutéoline-6-*C*-glucoside (**59**), lutéoline-7-*O*-glucoside (**60**), lutéoline-7-*O*- $\beta$ -*D*-glucuronide (**61**), 3'-*O*-methyllutéoline (**62**).



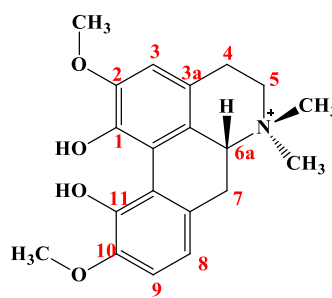
- (58)  $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H$   
 (59)  $R_1 = Glc, R_2 = H, R_3 = H$   
 (60)  $R_1 = H, R_2 = Glc, R_3 = H$   
 (61)  $R_1 = H, R_2 = Glu, R_3 = H$   
 (62)  $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = Me$

### III-1.3 Les alcaloïdes

Deux alcaloïdes, corytuberine (63) et  $\beta$ -magnoflorine (64) ; ont été isolés à partir des racines de l'espèce *Clematis recta* L. [19].

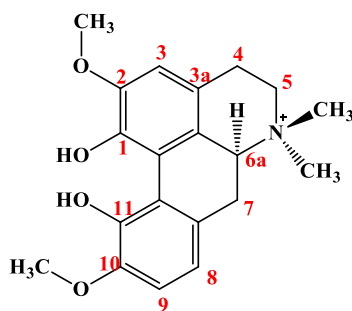


(63)



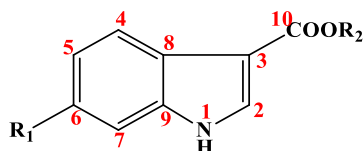
(64)

$\beta$ -magnoflorine (64) a été aussi isolé des parties aériennes de *Clematis parviloba* associé à un autre ;  $\alpha$ -magnoflorine (65) [20].



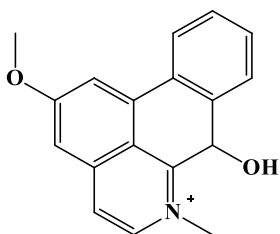
(65)

Des racines de *Clematis manshurica* Rupr. [21], quatre alcaloïdes ont été isolés: methyl 7-methoxyl 3-indolecarbonate (66), methyl 7-ethoxy-3-indolecarbonate (67), methyl 7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl 3-indolecarbonate (68),  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl 3-indolecarbonate (69).

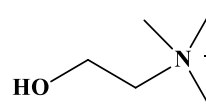


- (66)  $R_1 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 = \text{CH}_3$   
 (67)  $R_1 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{CH}_3$   
 (68)  $R_1 = \alpha\text{-L-Rha (1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Glu-O}$ ,  $R_2 = \text{CH}_3$   
 (69)  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \alpha\text{-L-Rha (1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Glu-O}$

Deux alcaloïdes ont été isolés de l'espèce *Clematis purpurea* [13], il s'agit de la Clemaine (70) et la Choline (71).

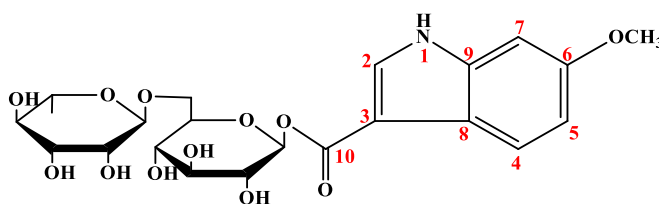


(70)



(71)

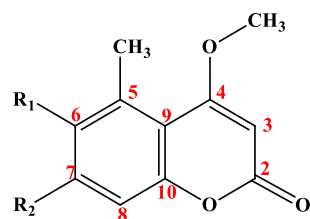
Une étude phytochimique réalisée sur les racines de la plante *Clematis florida var. plena*. [22]. a permis de mettre en évidence quatre alcaloïdes. Un nouvel alcaloïde de type indole,  $\alpha\text{-L-rhamnopyranosyl-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-glucopyranosyl 6-méthoxy-3-indolécarbonate}$  (72), et trois alcaloïdes connus (66), (68) et (69).



(72)

### III-1.4 Les coumarines

Des coumarines, la 4,7-diméthoxy-5-méthylcoumarine (73), 4,6,7-triméthoxy-5-méthylcoumarine (74) et la 7-hydroxy-4,6-diméthoxy-5-méthylcoumarine (75), ont été isolées des parties aériennes de *Clematis delavayi var. spinescens* [23].

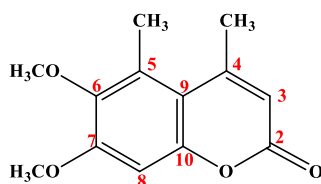


**(73)** R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= OCH<sub>3</sub>

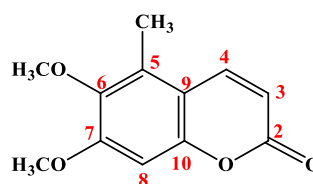
**(74)** R<sub>1</sub>= OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>= OCH<sub>3</sub>

**(75)** R<sub>1</sub>= OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>= OH

La sidérine **(76)** a été isolée d'espèce *Clematis ligusticifolia* [37], et la scopolétine **(77)** a été isolée d'espèce *Clematis intricata* [25].



**(76)**



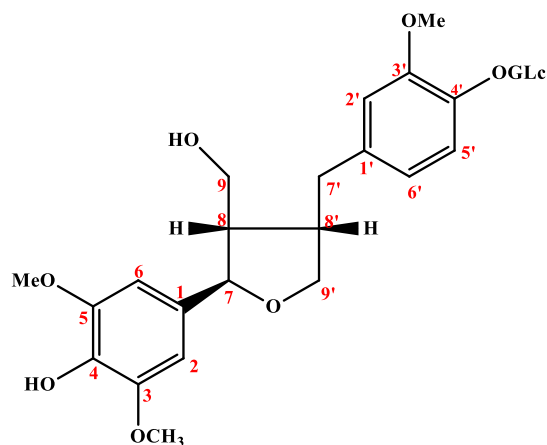
**(77)**

### II-1.5 Les lignanes

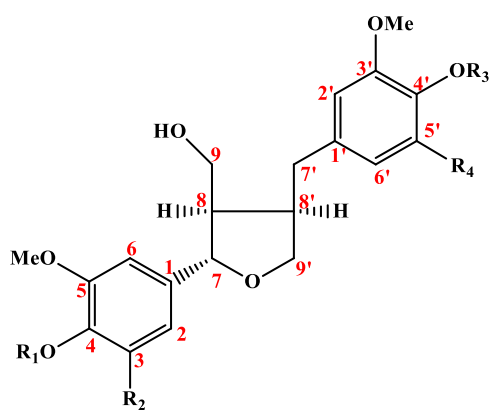
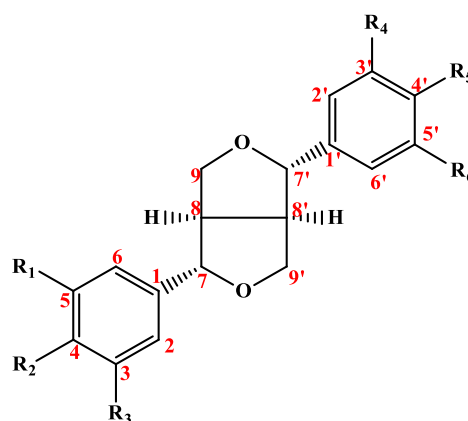
Les lignanes du genre *Clematis* sont principalement des lignanes d'eupomatène, des cyclo-lignanes, des monoépoxy-lignanes, des bisépoxy-lignanes et des lignanolides [2].

les études phytochimiques portant sur l'espèce *Clematis armandii* [26], ont abouti à l'isolement de neuf lignanes: armandiside **(78)**, (+) lariciresinol-4-*O*-β-*D*-glucopyranoside **(79)**, (+) lariciresinol-4'-*O*-β-*D*-glucopyranoside **(80)**, (+) lariciresinol-4',4'-*O*-bis-β-*D*-glucopyranoside **(81)**, salvadoraside **(82)**, liriodendrine **(83)**, (+) pinoresinol-4'-*O*-β-*D*-glucopyranoside **(84)**, (+) pinoresinol-4,4'-*O*-β-*bis-D*-glucopyranoside **(85)**, (+) syringaresinol-4'-*O*-β-*D*-glucopyranoside **(86)**.

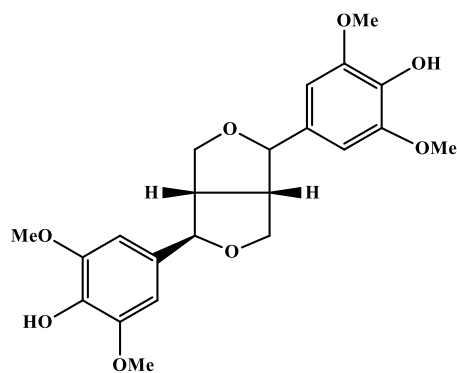




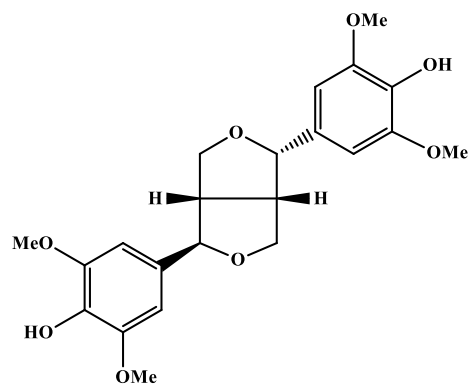
(78)

(79) R<sub>1</sub>= Glc, R<sub>2</sub>= H, R<sub>3</sub>= H, R<sub>4</sub>= H(80) R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= H, R<sub>3</sub>= Glc, R<sub>4</sub>= H(81) R<sub>1</sub>= Glc, R<sub>2</sub>= H, R<sub>3</sub>= Glc, R<sub>4</sub>= H(82) R<sub>1</sub>= Glc, R<sub>2</sub>= OMe, R<sub>3</sub>= Glc, R<sub>4</sub>= OMe(83) R<sub>1</sub>= OMe, R<sub>2</sub>= OGlc, R<sub>3</sub>= OMe, R<sub>4</sub>= OMe, R<sub>5</sub>= OGlc, R<sub>6</sub>= OMe(84) R<sub>1</sub>= OMe, R<sub>2</sub>= OH, R<sub>3</sub>= H, R<sub>4</sub>= OMe, R<sub>5</sub>= OGlc, R<sub>6</sub>= H(85) R<sub>1</sub>= OMe, R<sub>2</sub>= OGlc, R<sub>3</sub>= H, R<sub>4</sub>= OMe, R<sub>5</sub>= OGlc, R<sub>6</sub>= H(86) R<sub>1</sub>= OMe, R<sub>2</sub>= OH, R<sub>3</sub>= OMe, R<sub>4</sub>= OMe, R<sub>5</sub>= OGlc, R<sub>6</sub>= OMe

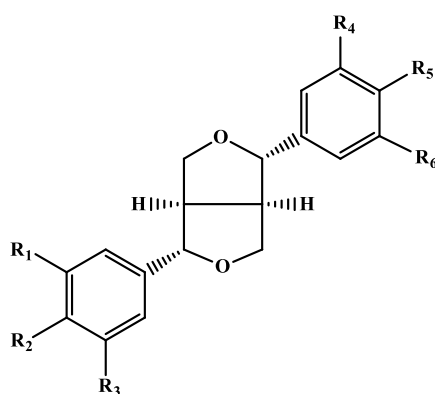
Les composés (79), (80), (81), (84), (85), (86) ont été isolés aussi à partir des tiges de la plante *Clematis parviloba* avec d'autres composés [27]: (-) syringaresinol (87), (-) episyngaresinol (88), (+) medioresinol-4'-O-β-D-glucopyranoside (89), (+) pinoresinol (90).



(87)

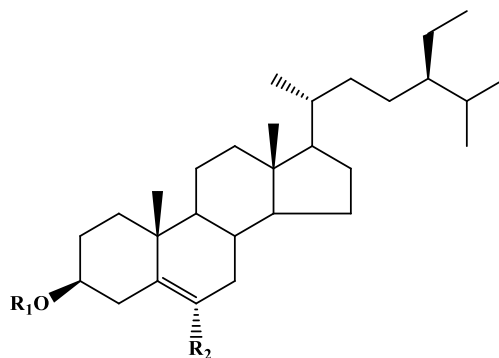


(88)

(89) R<sub>1</sub>= OMe, R<sub>2</sub>= OH, R<sub>3</sub>= H, R<sub>4</sub>= OMe, R<sub>5</sub>= OH, R<sub>6</sub>= H(90) R<sub>1</sub>= OMe, R<sub>2</sub>= OH, R<sub>3</sub>= H, R<sub>4</sub>= OMe, R<sub>5</sub>= OGlc, R<sub>6</sub>= H

### III-1.6 Les stéroïdes

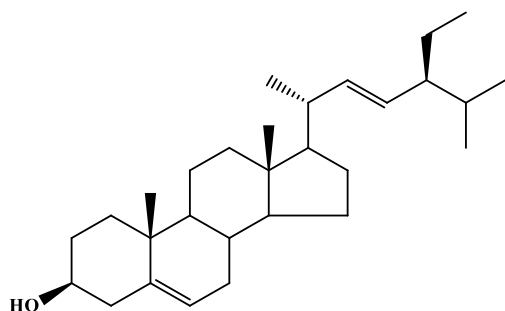
Cinq stéroïdes ont été isolées à partir d'espèce *Clematis arandii* [2]: stigmastérol (91), 5- $\alpha$ -stigmastane-3- $\beta$ -6- $\alpha$ -diol (92), stigmastérol-3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside (93), 3- $\beta$ -hydroxy-stigmast-5,22 diène-7-one (94), daucostérol (95).



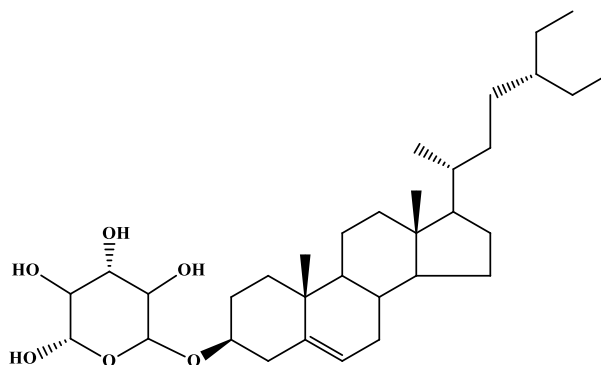
(91)  $R_1 = H, R_2 = H$

(92)  $R_1 = H, R_2 = OH$

(93)  $R_1 = \beta\text{-D-glucopyranoside}, R_2 = H$



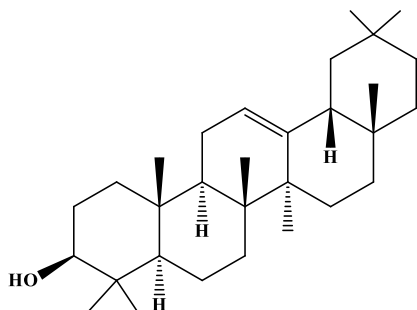
(94)



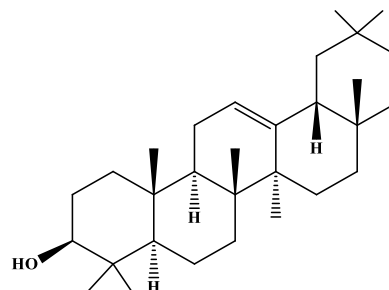
(95)

Le Daucostérol a été isolé (95) aussi à partir des espèces *Clematis hexapetala* [11], *Clematis delavayi* var. *spinescens* [23], *Clematis chinensis* [28].

Le  $\beta$ -Amyrine et le  $\alpha$ -Amyrine ont été isolés d'espèce *Clematis purpurea* [64].



(96)



(97)

### III-2 Etudes phytochimiques antérieures sur le genre *Clematis cirrhosa* L.

Sur la base des informations obtenues grâce à des recherches documentaires exhaustives réalisées, nous avons constaté que l'espèce *Clematis cirrhosa* L. n'a fait l'objet d'aucune étude chimique ou biologique. Ce manque d'étude sur cette plante, chimiquement et biologiquement, ne signifie pas que cette dernière n'a pas beaucoup d'importance dans ce domaine, mais à notre avis cela semble être quelque peu lié à la rareté et l'existence de cette espèce dans des zones peu fréquentées. Face à cette observation, il nous a paru motivant

d'apporter notre contribution à l'étude chimique et à quelques tests biologiques de cette plante, sachant que le genre *Clematis* contient des composés chimiques de grand intérêt, comme les saponosides et les flavonoïdes dits majoritaires constituants du genre et de la famille des Ranunculaceae.

**Références bibliographiques**

- [1] Hao, D., Gu, X., Xiao, P., & Peng, Y. (2013). Chemical and biological research of Clematis medicinal resources. *Chinese Science Bulletin*, 58(10), 1120-1129.
- [2] Chawla, R., Kumar, S., & Sharma, A. (2012). The genus Clematis (Ranunculaceae): Chemical and pharmacological perspectives. *Journal of ethnopharmacology*, 143(1), 116-150.
- [3] Hu, X., Wang, M., Yan, G. R., Yu, M. H., Wang, H. Y., & Hou, A. J. (2012). 2-Arylbenzofuran and tyrosinase inhibitory constituents of *Morus notabilis*. *Journal of Asian natural products research*, 14(12), 1103-1108.
- [4] Hai, W., Cheng, H., Zhao, M., Wang, Y., Hong, L., Tang, H., & Tian, X. (2012). Two new cytotoxic triterpenoid saponins from the roots of *Clematis argentea*. *Fitoterapia*, 83(4), 759-764.
- [5] Qiang, F. U., Min, Y. A. N. G., Yu, M. A., Jiang, C. H. E. N., & Hai-Mei, Y. U. A. N. (2018). Novel triterpene saponins isolated from *Clematis mandshurica* and their inhibitory activities on NO production. *Chinese journal of natural medicines*, 16(2), 131-138.
- [6] Sati, O. P., Uniyal, S. K., Bahuguna, S., & Kikuchi, T. (1990). Clematoside-S, a triterpenoid saponin from the roots of *Clematis grata*. *Phytochemistry*, 29(11), 3676-3678.
- [7] Zhang, Y. M., Zhong, G. Y., & Zhang, P. Z. (2019). Chemical constituents isolated from *Clematis akebioides* (Maximowicz) Veitch. *Biochemical Systematics and Ecology*, 83, 13-16.
- [8] Khan, M. R., Kihara, M., & Omoloso, A. D. (2001). Antimicrobial activity of *Clematis papuasica* and *Nauclea obversifolia*. *Fitoterapia*, 72(5), 575-578.
- [9] Chen, Y., Liu, J., Davidson, R. S., & Howarth, O. W. (1993). Isolation and structure of clematine, a new flavanone glycoside from *Clematis armandii* Franch. *Tetrahedron*, 49(23), 5169-5176.
- [10] Zhu, Y., Di, S., Hu, W., Feng, Y., Zhou, Q., Gong, B., Tang, X., Liu, J., Zhang, Xi, M., Jiang, L. (2017). A new flavonoid glycoside (APG) isolated from *Clematis tangutica* attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via activating PKCε signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1863(3), 701-711.

- [11] Dong, C. X., Shi, S. P., Wu, K. S., & Tu, P. F. (2006). Studies on chemical constituents from root of *Clematis hexapetala*. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica*, 31(20), 1696-1699.
- [12] Hung, T. M., Thuong, P. T., & Bae, K. H. (2005). Antioxidant effect of flavonoids isolated from the root of *Clematis trichotoma* Nakai. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 13(5), 227-232.
- [13] Sayed, H. M., El-Moghazy, S. A., & Kamel, M. S. (1995). Chemical constituents of stems and leaves of *Clematis purpurea* var. *hybrida* cultivated in Egypt. *Indian journal of chemistry. Sect. B: Organic chemistry, including medical chemistry*, 34(12), 1111-1113.
- [14] Kizu, H., Shimana, H., & Tomimori, T. (1995). Studies on the constituents of *Clematis* species. VI. The constituents of *Clematis stans* Sieb. et Zucc. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 43(12), 2187-2194.
- [15] Du, Z. Z., Yang, X. W., Han, H., Cai, X. H., & Luo, X. D. (2010). A new flavone C-glycoside from *Clematis rehderiana*. *Molecules*, 15(2), 672-679.
- [16] Zhang, L., Luo, X., & Tian, J. (2007). Chemical constituents from *Clematis terniflora*. *Chemistry of Natural compounds*, 43(2), 128-131.
- [17] Sun, F., Zhang, L., & Tian, J. (2007). Studies on chemical constituents of *Clematis terniflora*. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 42(2), 102.
- [18] Dennis, W. M., & Bierner, M. W. (1980). Distribution of flavonoids and their systematic significance in *Clematis* subsection *Viornae*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 8(1), 65-67.
- [19] Slavík, J., & Slavíková, L. (1995). Quaternary isoquinoline alkaloids and some diterpenoid alkaloids in plants of the Czech Republic. *Collection of Czechoslovak chemical communications*, 60(6), 1034-1041.
- [20] Chen, J. H., Du, Z. Z., Shen, Y. M., & Yang, Y. P. (2009). Aporphine alkaloids from *Clematis parviloba* and their antifungal activity. *Archives of pharmacal research*, 32(1), 3-5.
- [21] Shi, S. P., Tu, P. F., Dong, C. X., & Jiang, D. (2006). Alkaloids from *Clematis manshurica* Rupr. *Journal of Asian natural products research*, 8(1-2), 73-78.

- [22] Sun, K. H., Ma, X. H., Zeng, X. M., Lin, Z. Y., Cai, Y. M., Zhang, H. T., ... & Zhang, Y. H. (2019). A new indole-type alkaloid from the roots of *Clematis florida* var. *plena*. *Natural product research*, 33(20), 2925-2931.
- [23] Li, Y., Wang, S. F., Zhao, Y. L., Liu, K. C., Wang, X. M., Yang, Y. P., & Li, X. L. (2009). Chemical Constituents from *Clematis delavayi* var. *spinescens*. *Molecules*, 14(11), 4433-4439.
- [24] Zhihong, S., Yuying, Z., Jingli, D., & Xuan, W. (1995). Studies on the chemical constituents of *Clematis intricata* Bunge. *Zhongguo Zhong yao za zh (Zhongguo Zhongyao Zazhi) China Journal of Chinese Materia Medica*, 20(10), 613-614.
- [25] Shi, Y. (1997). Studies on the chemical constituents of intricate *Clematis* (*Clematis intricata*). *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 28, 329-330.
- [26] Haung, W.W., Kong, D.Y., Yang, P.M., 2003. Studies on lignin constituents of *Clematis armandii* Franch. *Chinese Journal of Natural Medicine* 1 (4), 199–203.
- [27] Yan, L. H., Xu, L. Z., Lin, J., Zou, Z. M., Zhao, B. H., & Yang, S. L. (2008). Studies on lignan constituents of *Clematis parviloba*. *Zhongguo Zhong yao za zhi (Zhongguo zhongyao zazhi) China journal of Chinese materia medica*, 33(15), 1839
- [28] He, M., Zhang, J. H., & Hu, C. Q. (2001). Studies on the chemical components of *Clematis chinensis*. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica*, 36(4), 278-280.

***PARTIE 01***

***CHAPITRE IV***

***Activités biologiques***



## IV-1 Activité antioxydante

Actuellement, plusieurs études mettent en évidence le rôle tragique du processus oxydatif incontrôlable induit par les radicaux libres. Les radicaux libres, à la fois les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives des azotes (ERA), sont la cause directe de diverses conditions pathologies chroniques associées au vieillissement telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire. Quoi qu'il soit, le risque est aggravé par l'accumulation de ces molécules dans l'organisme, conduisant à une chaîne de réaction radicalaire qui dégrade les molécules biologiques vitales, à savoir l'ADN, les lipides, les protéines et les glucides [1].

### IV-1.1 Les radicaux libres

Un radical libre est une molécule chimiquement réactive qui a un électron non apparié. Ils sont produits dans les systèmes vivants à la suite d'activités métaboliques normales. Telles que l'auto-oxydation, l'oxydation enzymatique ou la respiration [2].

Lorsqu'une liaison covalente entre deux atomes ou molécules est rompue, les atomes nouvellement formés restent avec un électron non apparié, ce qui en fait des radicaux libres. Les radicaux libres transforment une molécule environnante en un nouveau radical libre en captant un électron. Ensuite, ce radical nouvellement formé tente de revenir à son état fondamental en captant des électrons aux structures ou molécules cellulaires. Cela conduit à des réactions en chaîne des radicaux libres [3].

Les radicaux libres sont des substances chimiques très instables, de durée de vie très courte ( $10^{-9}$  et  $10^{-6}$ s) et très réactives par rapport à leur électron célibataire qui va chercher à se réapparaitre. [4].

Dans les phénomènes de stress oxydatif prenant place dans les milieux biologiques, les radicaux libres qui interviennent, partagent pour caractéristique celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène ou d'azote. Ceci leur confère la dénomination d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou de l'azote (ERA) [5].

L'existence des radicaux libres en biologie est intimement liée à l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ), molécule indispensable à la respiration cellulaire et à toute vie aérobie. L'oxygène moléculaire, ou dioxygène, est un diradical car il est formé par deux atomes d'oxygène qui ont mis en commun leur électron célibataire. Bien que ce soit un di-radical, l'oxygène moléculaire est une molécule stable, puisque les électrons sont tous appariés sous forme de

doublet au sein de sa structure. C'est un composé peu réactif par lui-même, mais qui peut en revanche facilement modifier sa conformation électronique. L'oxygène peut en effet facilement capter un électron et générer à partir de cette réduction tout un ensemble de radicaux libres regroupés sous le terme d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). L'oxygène peut également subir un gain d'énergie et produire de l'oxygène singulet, qui n'est pas véritablement un radical libre, mais que l'on apparente néanmoins aux ERO. En parallèle, l'oxygène moléculaire participe également, mais de manière plus indirecte, à la formation d'une autre catégorie de radicaux libres : les espèces réactives de l'azote (ERA) [6].

#### IV-1.1.1 Les espèces réactives de l'oxygène

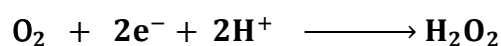
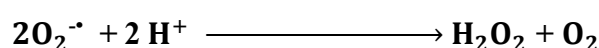
##### IV-1.1.1.1 Le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ )

L'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) est un ERO primaire, résultant de l'apport d'un électron supplémentaire à la structure initiale de l'oxygène, Il a une faible réactivité parmi les radicaux libres du stress oxydatif. Cependant, la toxicité du superoxyde est principalement attribuée à la formation d'autres métabolites réactifs, tels que le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle ou l'oxygène singulet. Le superoxyde est considéré comme le déclencheur de réactions toxiques de l'oxygène. Il peut réagir avec certains autres radicaux, par exemple avec le  $NO^{\cdot}$ , Conduisant à la formation d'une molécule plus toxique le peroxyde d'azote ( $ONOO^{\cdot}$ ) [7].

La charge électrique de l'anion superoxyde le rend incapable de diffuser à travers les membranes biologiques, mais Il est cependant hautement réactif avec certains métaux de transition comme le cuivre, le fer et le manganèse qui sont de puissants agents oxydants capables d'endommager, par voie oxydative, les biomolécules ou peuvent oxyder la dopamine, l'adrénaline ou l'ascorbate, conduisant à la formation de peroxyde d'hydrogène [8].

##### IV-1.1.1.2 Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )

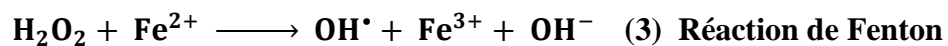
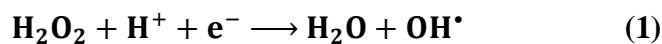
Le peroxyde d'hydrogène est produit par la dismutation spontanée ou induite de l'anion superoxyde, ou par la réduction bivalente de l'oxygène selon les réactions suivantes: [9]



Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) n'est pas un radical libre à proprement parler puisqu'il ne possède pas d'électron célibataire. Cependant il est considéré comme un dérivé activé de l'oxygène, de par sa position essentielle au sein des réactions radicalaires. Par ailleurs, le peroxyde d'hydrogène a la propriété de traverser les membranes biologiques propriété que ne possède pas l'anion superoxyde. Le peroxyde d'hydrogène possède un fort pouvoir oxydant, participant indirectement à la toxicité de l'oxygène. Ainsi, en présence de métaux de transition, il est capable de générer le radical hydroxyle, l'oxydant le plus puissant produit par les organismes vivants [9].

#### IV-1.1.1.3 Radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>)

Il est généré dans les cellules soit : par clivage réducteur du peroxyde d'hydrogène (1), une coupure homolytique du peroxyde d'hydrogène, sous l'influence de rayons ionisants (2), et décomposition du peroxyde d'hydrogène, catalysée par des métaux, en particulier le fer ou le cuivre (Réaction de Fenton) (3) [7].



Le radical hydroxyle possède une très grande réactivité dans les milieux biologiques, il est capable de réagir avec presque tous les composants cellulaires, par échange d'électrons, addition sur les doubles liaisons ou arrachement d'un atome d'hydrogène. Le radical hydroxyle est donc un oxydant très puissant, constituant certainement le radical libre le plus toxique en biologie, et serait à l'origine de la production des radicaux libres secondaires, suite à sa réaction avec différents composés cellulaires [9].

#### IV-1.1.14 L'oxygène singulet

L'oxygène singulet issu non pas d'une réduction de l'oxygène, mais de l'excitation de l'oxygène. Un gain d'énergie de type chaleur, rayonnement ultraviolet ou rayonnement gamma, va exciter la molécule d'oxygène qui va modifier sa conformation électronique et former l'oxygène singulet. Ce n'est pas un radical libre proprement parler mais il est apparenté aux ERO par son origine, sa durée de vie très courte et sa grande réactivité vis-à-vis des structures qu'il rencontre et en particulier les lipides, les protéines et l'ADN [6].

L'oxygène peut également intervenir dans des réactions radicalaires. Ainsi, le gain d'un électron entraîne la formation du radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) [9].

#### IV-1.1.1.5 Autres formes radicalaires

D'autres formes radicalaires dites secondaires peuvent être retrouvées dans les milieux biologiques. Il s'agit en particulier des radicaux alkyle ( $R^{\cdot}$ ), alkoxy ( $RO^{\cdot}$ ) et alkoperoxy ( $ROO^{\cdot}$ ), générés à la suite de l'action oxydante de radicaux libres oxygénés primaires (superoxyde, hydroxyle) sur les chaînes d'acides gras polyinsaturés, les glucides, les protéines ou acides aminés. Ces radicaux secondaires sont moins réactifs mais plus sélectifs que les radicaux hydroxyles. Ils sont à l'origine des processus de réactions radicalaires en chaîne et, en particulier, les réactions participant à la lipoperoxydation des membranes cellulaires [10].

#### IV-1.1.2 Les espèces réactives de l'azote

En parallèle des ERO et de l'oxygène singulet, l'organisme produit, à partir d'enzyme intracellulaire présente dans la majorité des cellules, une catégorie de radicaux libres regroupée sous le terme d'espèces réactives d'azote (ERA). Il s'agit du monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ ) et du peroxyde d'azote ( $ONOO^{\cdot-}$ ) [6]. Le monoxyde d'azote ou ( $NO^{\cdot}$ ) est produit de manière endogène lors du métabolisme de l'arginine par les oxyde nitrique synthases (NOS), enzymes possédant un large éventail d'activités physiologiques et physiopathologiques [11].

Le monoxyde d'azote est une molécule radicalaire non chargée, dont l'électron libre est porté par l'azote. De par ses propriétés lipophiles et hydrophiles et sa demi-vie relativement longue, le ( $NO^{\cdot}$ ) est capable de se diffuser dans l'environnement cellulaire. Le ( $NO^{\cdot}$ ) peut interagir rapidement avec l'anion superoxyde et produire du peroxyde d'azote ( $ONOO^{\cdot-}$ ) beaucoup plus réactif et délétère que ses précurseurs [12], ce dernier peut ensuite se protoner en acide peroxyde d'azote, composé très instable qui se décompose, soit pour former des nitrites par réarrangement intramoléculaire, soit se décomposer en radical hydroxyle et en dioxyde d'azote par fission homolytique [9].

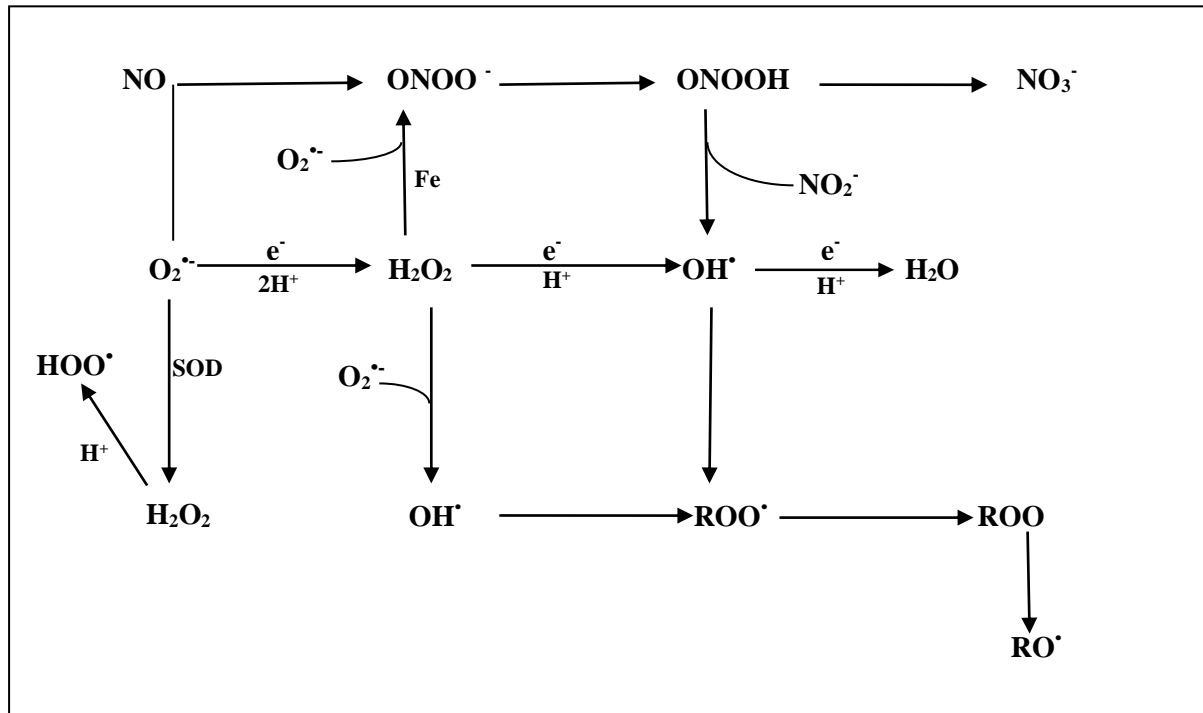


Figure IV-1: Schéma de production des radicaux libres

## IV-1.2 Sources des espèces réactives de l'oxygène

### IV-1.2.1 Sources endogènes des espèces réactives de l'oxygène

La production des ERO dans les cellules est essentiellement d'origine enzymatique et découle de plusieurs sources possibles. Il s'agit principalement de la NAD(P)H oxydase membranaire et du complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire, mais d'autres sources, cytosoliques ou présentes au sein de différents organites cellulaires peuvent également jouer un rôle dans la modulation de la signalisation intracellulaire: xanthine oxydase, enzymes de la voie de l'acide arachidonique (lipo-oxygénases, cyclo-oxygénases), enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochrome  $P_{450}$ ) et peroxysomes. Les NOS sont à l'origine de la synthèse du radical  $NO^{\cdot}$  mais qui peuvent aussi être produire des  $O_2^{\cdot-}$  dans certaines conditions (faible concentration en L-arginine) [13].

### IV-1.2.2 Sources exogènes des espèces réactives de l'oxygène

Les sources exogènes sont majoritairement des pro-oxydants environnementaux tels que les pesticides, les métaux lourds, la fumée de cigarettes, les polluants, la poussière, la prise de certains médicaments, par le rayonnement électromagnétique (radiation ionisante, lumière ultraviolette), ou lors d'exposition prolongée au soleil [14].

### IV-1.2.3 Action des radicaux libres

Les radicaux libres d'oxygène ou, plus généralement, les espèces réactives d'oxygène (ERO), ainsi que les espèces réactives de l'azote (ERA), sont bien connues pour jouer un double rôle en tant qu'espèces délétères et bénéfiques, car elles peuvent être nocives ou bénéfiques pour les systèmes vivants [15]. Les effets bénéfiques des ERO se produisent à des concentrations faibles/modérées et impliquent des rôles physiologiques. Ils jouent des messagers secondaires capables, notamment, de participer dans la défense antibactérienne au cours des réactions de cytotoxicité face aux agents pathogènes, la destruction par apoptose des cellules tumorales, la transduction de signaux cellulaires, la régulation des gènes par un phénomène appelé contrôle redox des gènes, la modulation du métabolisme cellulaire par interaction ligand-récepteur [16]. Ils modulent encore l'expression de gènes de structure codant pour les enzymes antioxydantes [17].

L'effet nocif des radicaux libres, causant des dommages biologiques potentiels, est appelé stress oxydatif [18-20]. Cela se produit dans les systèmes biologiques lorsqu'il y a une surproduction de ERO/ERA d'un côté et une efficacité des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques de l'autre [15].

En excès dans l'organisme, les radicaux libres vont être capables, d'une part d'oxyder les molécules biologiques qu'ils rencontrent (lipides, protéines, ADN, glucides) et, d'autre part, de générer au sein de ces molécules des lésions oxydatives qui pourront être à l'origine d'altérations cellulaires plus ou moins importantes pouvant évoluer vers la mort des cellules. En parallèle, l'oxydation de certaines molécules par les radicaux libres peut engendrer la formation de métabolites anormaux dont certains sont cytotoxiques, mutagènes, cancérigènes, athérogènes ou encore capables de stimuler la production d'anticorps à l'origine du processus d'auto-immunité. Enfin les radicaux libres en excès dans l'organisme sont également capables de dérégler toutes les fonctions biologiques REDOX-dépendantes, c'est-à-dire nécessitant de faibles doses des radicaux libres pour être fonctionnelles [16].

### IV-1.3 Le stress oxydatif

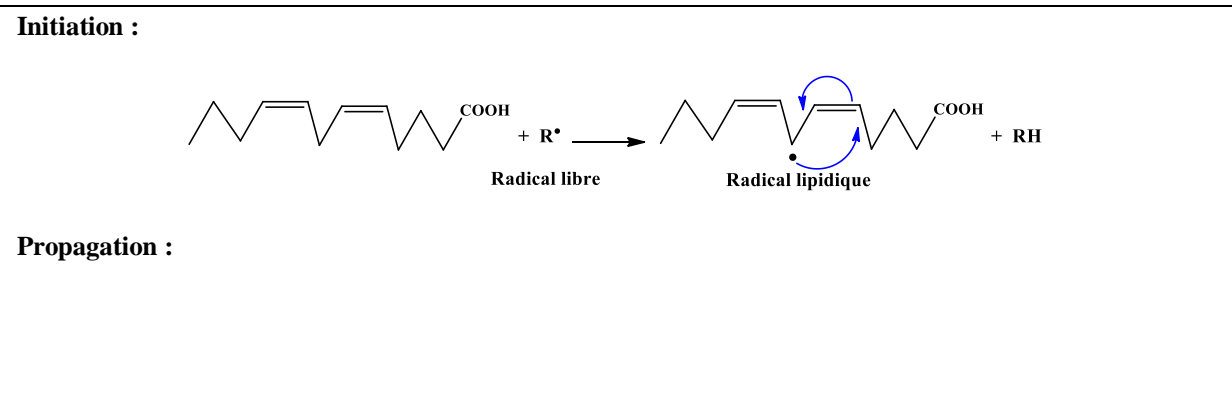
Les radicaux libres sont présents dans la cellule à des doses raisonnables : leur concentration est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants [21]. Ainsi, à l'état quiescent, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants (balance redox) est en équilibre. Cependant cette

homéostasie rédox peut être rompue, soit par une production excessive des radicaux libres (comme dans le vieillissement ou l'athérosclérose), soit par une diminution des capacités antioxydantes (comme chez les personnes souffrant d'obésité et les fumeurs). On parle alors de stress oxydatif. Un tel déséquilibre peut être provoqué de façon régulée par l'activation de systèmes de production des radicaux libres. La réponse antioxydante est alors efficace pour compenser cette production et le déséquilibre est transitoire. En revanche, dans certaines situations pathologiques, la production des radicaux libres est plus importante et prolongée, et la réponse antioxydante est insuffisante, le déséquilibre est durable. Cette rupture de l'homéostasie rédox peut avoir plusieurs origines : stress d'origine exogène (agents environnementaux pro-oxydants), intoxication aux métaux lourds, irradiations, carence en antioxydant qui s'apporte par l'alimentation ou anomalies génétiques [22].

#### IV-1.4. Principales cibles des radicaux libres

##### IV-1.4.1 Oxydation des composés lipidiques

Les lipides et principalement les acides gras polyinsaturés ainsi que les phospholipides membranaires sont les cibles privilégiées des attaques oxydatives. Les membranes sont plus particulièrement visées par le radical hydroxyle [6]. Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés (AGPI) pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction de peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (Figure IV-2). Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. Les peroxydes générés peuvent continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes (malondialdéhyde, 4-hydroxynonéнал) et en alcanes dont les activités pro-athérogènes sont bien connues [16].



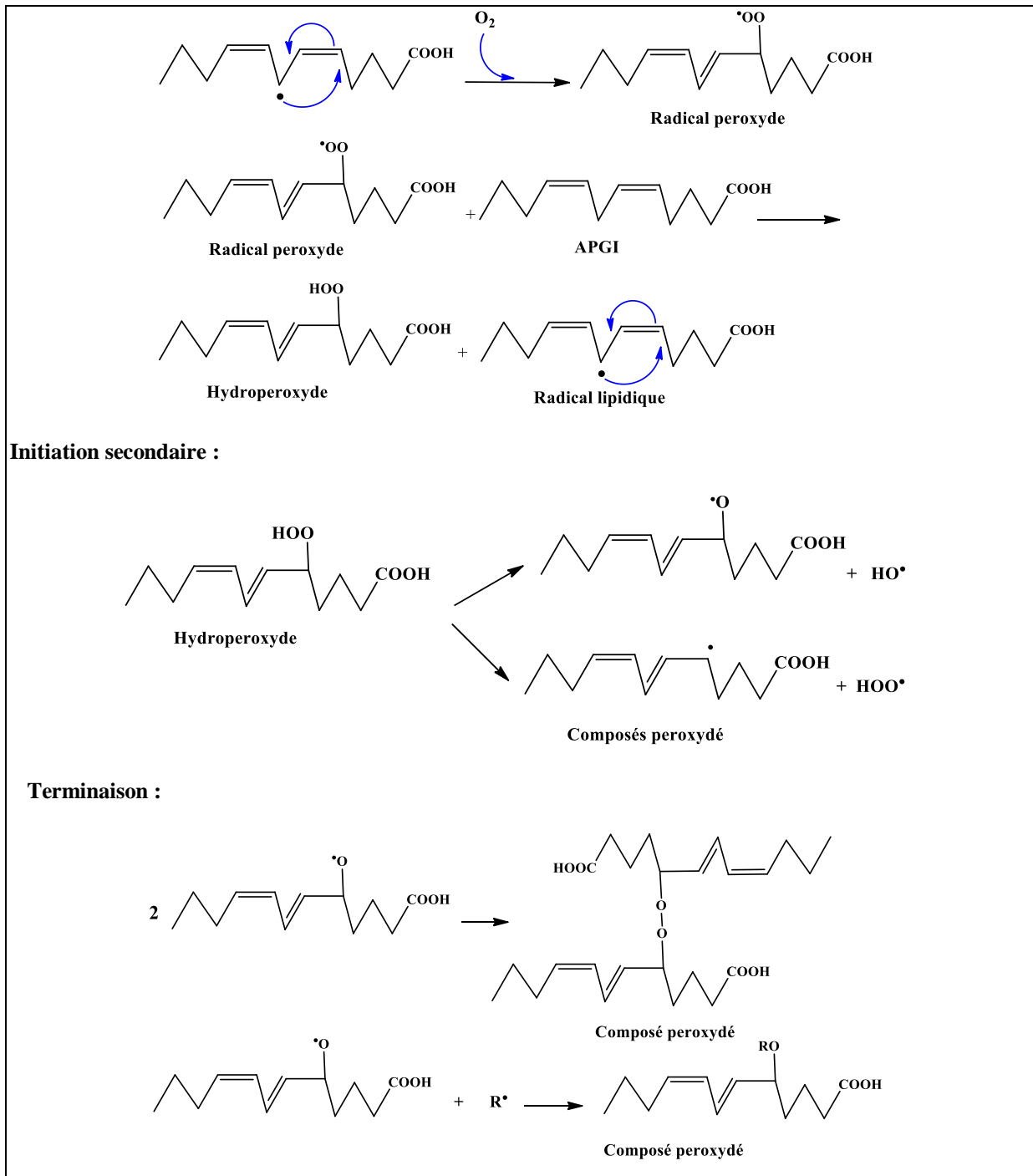


Figure IV-2 : Oxydation des composés lipidiques

#### IV-1.4.2 Oxydation des composés protéiques

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des radicaux libres. Les plus réactifs les acides aminés soufrés (cystéine, méthionine) et aromatiques (tryptophane, histidine) à cause de leur sensibilité à ces attaques due à l'abondance de groupements sulfhydryles (SH) dans leurs structures. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de



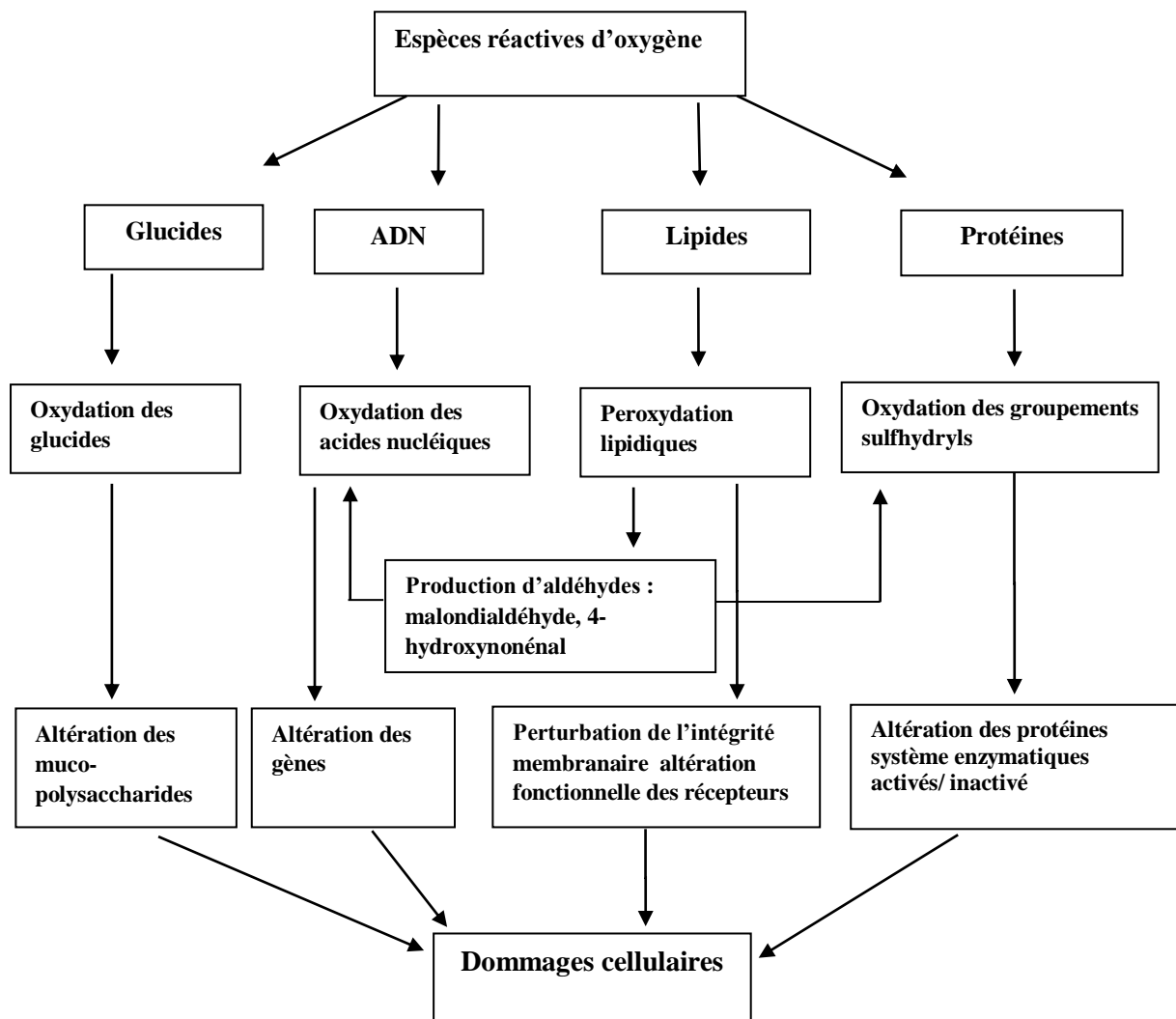
groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes telles que : une non-reconnaissance d'un récepteur par un ligand, une perte d'activité enzymatique, une perturbation métabolique [16].

#### IV-1.4.3 Oxydation de l'ADN

Les acides nucléiques sont particulièrement sensibles à l'action des radicaux libres. Les sites radicalaires créés au sein de la molécule de l'ADN peuvent entraîner des ruptures de ce brin et des mutations ponctuelles, qui peuvent avoir de graves conséquences sur la synthèse des protéines [9]. Une des altérations fréquentes de l'ADN est observée au niveau de l'oxydation de la guanine, qui peut réagir avec  $\text{OH}^\bullet$  pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera à l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétiques impliquées dans le déclenchement du cancer et du vieillissement [15].

#### IV-1.4.4 Oxydation des glucides

S'il y a beaucoup moins d'études chimiques sur l'attaque des radicaux libres des polysaccharides par rapport à d'autres macromolécules, alors le fait demeure que l'ERO attaque les mucopolysaccharides, en particulier les protéoglycanes du cartilage. De plus, le glucose peut être oxydé dans des conditions physiologiques en présence de traces de métaux, libérant du cétoaldéhyde,  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{OH}^\bullet$ , ce qui provoquera un clivage ou une glycation des protéines à travers le cétoaldéhyde fixe pour former des produits de glycation avancée. Ce phénomène d'oxydation du sucre est très important chez les patients diabétiques et conduit à la fragilité des parois vasculaires et de la rétine [14].



**Figure IV-3 :** Effets des radicaux libres sur les tissus ciblés

#### IV-1.5 Maladies liées au stress oxydatif

Le stress oxydatif peut entraîner des changements importants dans la structure des acides nucléiques, des protéines et des lipides, altérant leurs fonctions avec un impact conséquent sur le métabolisme cellulaire. Ces changements créent des conditions favorables à l'apparition de différentes maladies.

La modification permanente du matériel génétique résultant d'incidents de dommages oxydatifs représente la première étape impliquée dans la mutagenèse, la cancérogenèse et le vieillissement. La mutation de l'ADN est une étape critique de la cancérogenèse et des

niveaux élevés de lésions oxydantes de l'ADN a été notée dans diverses tumeurs, impliquant fortement de tels dommages dans l'étiologie du cancer [17].

Le stress oxydatif induit par les ERO joue un rôle dans l'oxydation des lipides et celle de l'ADN sont impliquées dans le développement de maladies cardiovasculaires diverses telles que l'athérosclérose, les cardiopathies ischémiques, l'hypertension, les cardiomyopathies, l'hypertrophie cardiaque et l'insuffisance cardiaque congestive [23]. Le rôle du stress oxydatif dans la relation syndrome métabolique « diabète de type II » maladies cardiovasculaires est de plus en plus établi [24].

En outre, les dommages dus aux radicaux libres ont également été impliqués dans différents types de désordres neurologiques. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une grande susceptibilité du système nerveux central au stress oxydatif, du fait de certaines caractéristiques biochimiques, physiologiques et anatomiques. Ainsi, la maladie Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique ainsi que d'autres maladies neurodégénératives ont été associées à un phénomène oxydatif [9].

Le stress oxydatif est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tels que l'Arthrose, la polyarthrite rhumatoïde, le vieillissement accéléré [25], et l'inflammation [26].

#### IV-1.6 Les antioxydants

L'exposition aux radicaux libres de diverses sources a conduit les organismes à développer un puissant système de défense, comprenant des systèmes enzymatiques, essentiellement intracellulaires, et des systèmes non enzymatiques [27]. Les molécules contrôlant ces systèmes de défense sont désignées par le terme d'antioxydants et désignent toutes substances qui, présentes à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat [28, 29].

In vivo un composé est considéré comme un antioxydant efficace lorsqu'il répond aux exigences suivantes:

- il doit réagir avec des métabolites réactifs biologiquement efficaces.
- le produit résultant de la réaction pro-oxydant et l'antioxydant ne doit pas être plus toxique pour l'organisme que le pro-oxydant éliminé.
- l'antioxydant potentiel doit être présent dans l'organisme à une concentration suffisante.

- la demi-vie de l'antioxydant doit être suffisamment longue pour réagir avec l'oxydant [28].

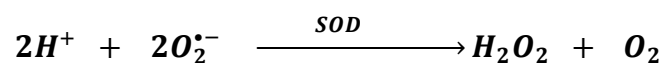
Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation d'ions des métaux de transition ce qui a pour effet de ralentir les réactions de Fenton [30].

#### IV-1.6.1 Les systèmes de défense antioxydants enzymatiques

Il y a plusieurs systèmes d'enzymes qui catalysent des réactions pour neutraliser des radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène. Ces enzymes comprennent :

##### IV-1.6.1.1 La superoxyde dismutase (SOD)

Constitue le premier maillon de la chaîne de défense enzymatique. Elle assure en effet la transformation de l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ) en  $H_2O_2$  par une réaction de dismutation. Elle permette ainsi l'élimination d' $O_2^{\bullet -}$  dès sa formation, et évite son accumulation ou sa réaction avec le  $NO^{\bullet}$  produit en parallèle dans les cellules. Les SOD sont métalloprotéines dont l'activité est catalysée par un métal situé au cœur de l'enzyme. La nature de métal permet de distinguer les SOD à fer et à manganèse (Fe, MnSOD), localisées dans les mitochondries et les SOD à cuivre et zinc (Cu, ZnSOD), localisées dans le cytosol cellulaire et dans le plasma. Le mode d'action des ces métalloprotéines est identique. En effet, le métal du site actif est oxydé ou réduit en fonction de sa rencontre avec l' $O_2^{\bullet -}$ . Il oscille, pour le manganèse et le fer, de l'état bivalent à l'état trivalent, et pour le cuivre, de l'état monovalent à l'état bivalent [6, 31].

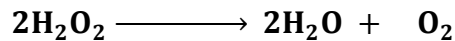
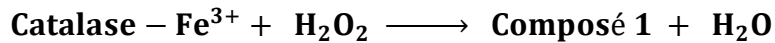


L'activité antioxydante de la SOD doit être complétée par l'action d'autres enzymes dont le rôle est de détruire le  $H_2O_2$  qui est l'un des processus du radical OH. Les principales enzymes qui peuvent neutraliser le  $H_2O_2$  sont la catalase et la glutathion peroxydase, qui peuvent convertir le  $H_2O_2$  en un produit inerte, l'eau.

##### IV-1.6.1.2 La catalase (CAT)

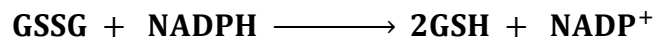
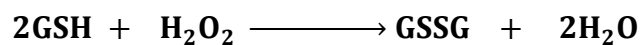
La catalase est une enzyme héminique capable de réduire le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  en libérant l'eau et l'oxygène. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes et

dans les érythrocytes. La CAT humaine est formée de quatre sous-unités, chaque sous-unité comporte un groupement ferriprotoporphyrine dans son site actif avec un atome de fer à l'état  $\text{Fe}^{3+}$  [13].



#### IV-1.6.1.3 La glutathion peroxydase (GP<sub>x</sub>)

Les enzymes de cette famille sont Sélénium (Se)-dépendante. La glutathion peroxydase (GP<sub>x</sub>) est présente dans le cytoplasme où elle joue un rôle majeur dans la régulation de l'état redox physiologique intracellulaire des cellules vasculaires. Elle possède une forte affinité pour le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidiques et par conséquent, elle catalyse l'élimination de  $\text{H}_2\text{O}_2$  même présent à de très faibles concentrations en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène [32].



#### IV-1.6.2 Les systèmes de défense antioxydants non-enzymatiques

Divers piègeurs des radicaux libres non enzymatiques, peuvent prendre en charge la détoxification d'un grand nombre de radicaux libres et interrompre la chaîne de réaction radicalaire [33].

##### IV-1.6.2.1 Antioxydants endogènes

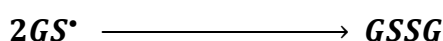
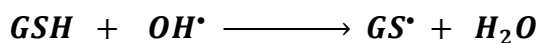
Parmi les Antioxydants endogènes non enzymatiques essentiels, il faut citer :

###### IV-1.6.2.1.1 Le glutathion

Le tripeptide glutathion (GSH) (acide glutamique-cystéine-glycine). Avec son groupement sulfhydryle joue un rôle important dans la protection de l'organisme contre les dommages oxydatifs; il est un cofacteur de certaines enzymes participant aux mécanismes de détoxification du stress oxydatif comme la glutathion peroxydase, il joue le rôle d'un piègeur

direct du radical  $\text{OH}^\bullet$  et de  $1^\circ\text{O}_2^\bullet$ , et il détoxifie le  $\text{H}_2\text{O}_2$  et les lipoperoxydes lors de l'action catalytique de la glutathion peroxydase [34].

Le glutathion joue un rôle important en tant qu'antioxydant dans l'espace intracellulaire et affecte indirectement le statut antioxydant également dans l'espace extracellulaire et les membranes où, en coopération avec l' $\alpha$ -tocophérol, il peut inhiber la lipoperoxydation [7].



#### IV-1.6.2.1.2 L'acide urique

C'est un puissant piègeur de radicaux  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{ROO}^\bullet$  et  $\text{NOO}^\bullet$ , l'ion urate ( $\text{UrH}_2^-$ ) réagit avec ces radicaux en produisant le radical d'urate ( $\text{UrH}^{\bullet-}$ ), qui est relativement stable en raison de la délocalisation des électrons dans le noyau purine [9].

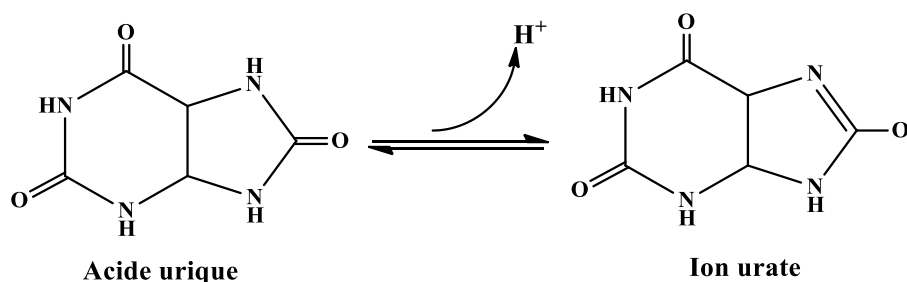
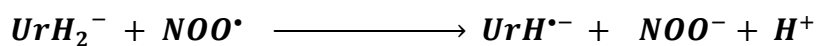
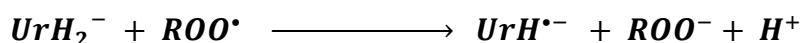
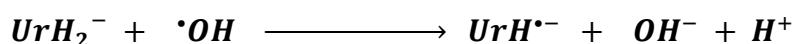


Figure IV-4 : Oxydation d'acide urique



#### IV-1.6.2.2 Systèmes antioxydants exogènes

Les antioxydants chimiques exogènes comprennent majoritairement les vitamines C et E, les caroténoïdes et des composés phénoliques [35].

#### IV-1.6.2.2.1 La vitamine C (l'acide ascorbique)

L'acide L-ascorbique ou vitamine C est présent le plus couramment sous forme d'ascorbate, il est considéré comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires. Il est hydrosoluble et agit comme un donneur d'électrons et/ou donneur d'atomes d'hydrogène; cette caractéristique en fait un puissant antioxydant, il réduit rapidement les radicaux superoxydes et nitro-oxydes et élimine les radicaux hydroxyles, alcoxyles et peroxydes, il réagit également avec l'oxygène singulet et le produit formé étant le radical ascorbyle. En piégeant les radicaux peroxydes dans la phase aqueuse avant qu'ils initient la peroxydation lipidique, la vitamine C protège les biomembranes et les lipoprotéines. Une autre caractéristique intéressante de l'action antioxydante de la vitamine C est son interaction synergique avec la vitamine E dans l'inhibition de l'oxydation [36].

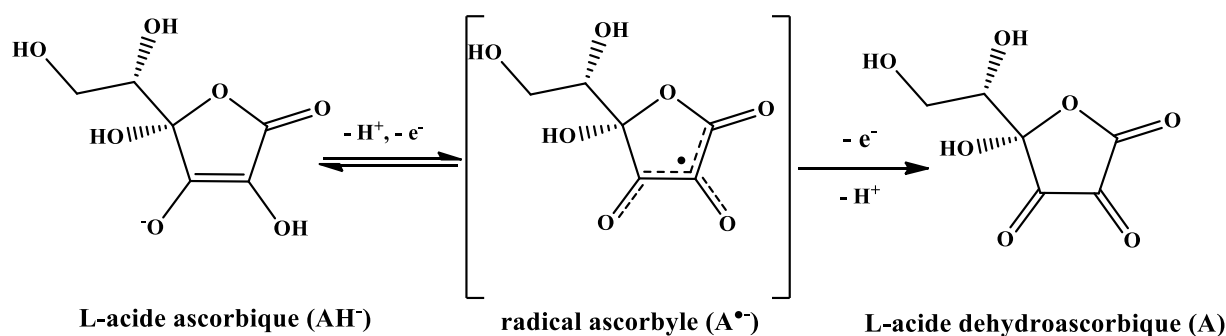


Figure IV-5: Oxydation d'acide ascorbique [37]

#### IV-1.6.2.2.2 Vitamine E

La vitamine E est un terme utilisé pour désigner un groupe de composés constitué du mélange de huit dérivés exerçant l'activité de l' $\alpha$ -tocophérol. Le rôle principal de la vitamine E est sa capacité antioxydante. Elle est capable de rompre les réactions en chaîne radicalaires ou de piéger directement les radicaux oxygène. Au cours de ces réactions, un radical tocophéryle (vitamine E<sup>•</sup>) se forme. Ce radical peut être généré par l'extraction de l'atome d'hydrogène à divers endroits du noyau chromane (de la position 5, 7, 9) ou plus souvent du groupe (OH) en position 6. Le radical tocophéryle peut être réduit par l'ascorbate, le glutathion en  $\alpha$ -tocophérol actif [7].

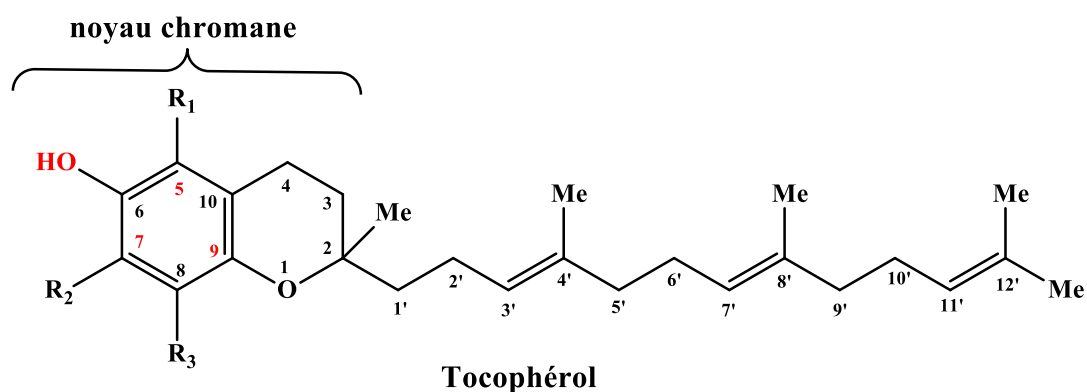
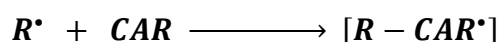
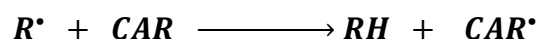
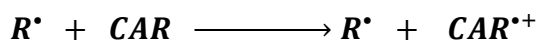


Figure IV-6 : Structure des Tocophérols

#### IV-1.6.2.2.3 Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments d'origine végétale, ou microbienne. À l'heure actuelle, environ 600 dérivés de caroténoïdes sont connus, on les trouve dans les fruits, les carottes, les légumes rouges et verts. Tous possèdent une forte activité antioxydante, notamment la  $\beta$ -carotène [7]. Les caroténoïdes sont capables de piéger les ERO/ERA et d'inhiber la formation d'espèces oxydantes, soit par le transfert d'un seul électron, le transfert d'atomes d'hydrogène ou l'addition de radicaux [38].



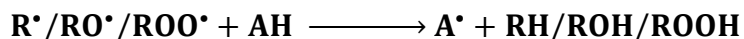
#### IV-1.6.2.2.4 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont classés comme antioxydants primaires, qui sont principalement des piègeurs de radicaux libres qui retardent ou inhibent l'étape d'initiation, ou interrompent l'étape de propagation de l'oxydation des lipides, diminuant ainsi la formation de produits de décomposition volatils (par exemple, les aldéhydes et les cétones) qui provoquent le rancissement [39].

Le potentiel antioxydant des composés phénoliques dépend du nombre et de la position des groupes hydroxyle, liés au cycle aromatique, du site de liaison et de la position mutuelle des groupes hydroxyle dans le cycle aromatique et du type de substituant [40].



Les antioxydants phénoliques (AH) peuvent donner des atomes d'hydrogène aux radicaux lipidiques et produire des dérivés lipidiques et des radicaux antioxydants, qui sont plus stables et moins facilement disponibles pour favoriser l'auto-oxydation. Le radical libre d'antioxydant peut interférer davantage avec les réactions de propagation en chaîne ( $R^{\text{ct}}$  6 et 7) [41].

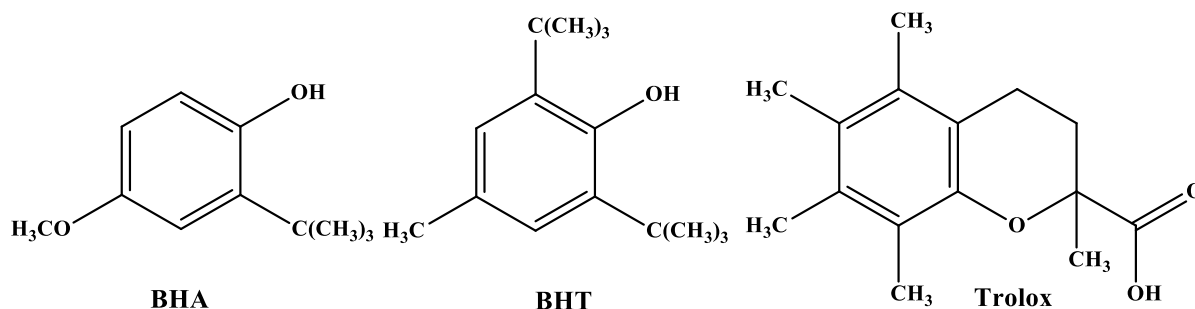


#### IV-1.6.2.3 Les antioxydants synthétiques

Les antioxydants synthétiques sont d'une utilisation potentielle en chimie, dans l'industrie alimentaire et en médecine, certains de ces composés conservent un groupement chimique fonctionnel, analogue à celui des antioxydants naturels et introduisent de nouveaux groupements chimiques, qui améliorent leur gamme d'action cellulaire ou les rendent disponibles sur des sites cellulaires visés.

Alternativement, certains antioxydants synthétiques ne portent aucun analogue structurel avec les antioxydants naturels et présentent une réactivité élevée envers les espèces réactives de l'oxygène et / ou affichent une protection sélective dans certains tissus [36].

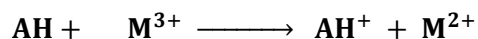
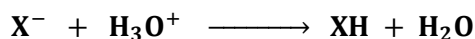
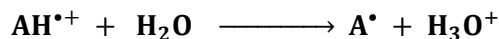
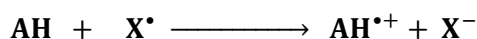
La plupart des antioxydants synthétiques sont des composés phénoliques. Parmi les molécules les plus couramment utilisées, nous pouvons mentionner dans un premier temps le Trolox<sup>®</sup> ou acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2-carboxylique, est un analogue de la vitamine E dont la structure est représentée en Figure IV-7. Il possède un fort potentiel antioxydant et sert souvent d'antioxydant de référence lors des tests biologiques [42]. Le 2,6-di-tert-butyl-4-méthoxyphénol et l'hydroxyanisole butylé, plus connu sous le nom de BHT et le BHA (Figure IV-7) sont des antioxydants utilisés comme conservateurs dans l'industrie agro-alimentaire [43].



**Figure IV-7:** Structure chimique de Trolox, BHA et BHT

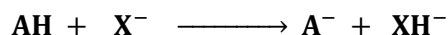
#### IV-1.7 Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante in vitro

Il existe de nombreuses méthodes pour mesurer l'activité antioxydante; ceux-ci peuvent être classés selon le mécanisme de désactivation des radicaux en deux catégories : les tests basés sur la réaction SET et les tests basés sur la réaction TAH. Le résultat final est le même, quel que soit le mécanisme, mais la cinétique et le potentiel de réactions secondaires sont différents [30]. Les méthodes basées sur SET détectent la capacité d'un antioxydant potentiel à transférer un électron pour réduire l'oxydant, le mécanisme SET est mis en évidence par un changement de couleur indiquant la réduction de l'antioxydant. La capacité antioxydante équivalente du trolox (TEAC), le pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP), le pouvoir antioxydant réducteur des ions cuivriques  $\text{Cu}^{2+}$  (CUPRAC), test d'acide 2,2-azinobis 3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique ( $\text{ABTS}^+$ ), et le test de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) représentent les tests d'évaluation d'activité antioxydants basées sur le mécanisme SET et détectent la capacité d'un antioxydant à transférer un électron pour réduire tout composé, y compris les métaux, les groupes carbonyle et les radicaux [44, 30] :



Les méthodes basées sur la HAT mesurent la capacité d'un antioxydant à neutraliser les radicaux libres par don d'hydrogène. Les réactions de la TAH sont indépendantes du solvant et du pH et sont généralement assez rapides, terminées en quelques secondes à quelques

minutes [45]. Les principales méthodes de mesure de la TAH sont la capacité d'absorption des radicaux oxygène (ORAC), le paramètre antioxydant de piégeage des radicaux totaux (TRAP), test d'acide 2,2-azinobis 3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique (ABTS<sup>•+</sup>) et les tests de blanchiment à la  $\beta$  carotène [39].



## IV-2 Activité inhibitrice d'enzymes

### IV-2.1 Les enzymes

Les enzymes sont des biocatalyseurs; des molécules synthétiques par des organismes vivants qui ont pour rôle d'accélérer la vitesse d'une réaction, sans modifier l'équilibre final de la réaction. Ces substances agissent à faible dose et se retrouvent intactes en fin de réaction, disponibles pour participer à une nouvelle réaction. La nature des enzymes est essentiellement protéique mais elles peuvent être associées à d'autres composés non protéiques (cofacteurs) [46]. Les enzymes se lient à leurs substrats grâce à leurs sites de liaison (sites actifs), ce sont des sites catalytiques qui permettent la transformation du substrat en produit ainsi, ils contrôlent la spécificité de la réaction enzymatique [47].

### IV-2.2 Les inhibiteurs d'enzyme

Un inhibiteur d'enzyme est une substance qui se lie à l'enzyme et diminue l'activité catalytique de l'enzyme. En se liant sur une enzyme, un inhibiteur peut empêcher la fixation de la substance sur le site actif. Elle peut aussi provoquer une déformation de l'enzyme qui rend celle-ci inactive. L'inhibition peut être définie comme le processus qui diminue l'activité catalytique de l'enzyme, elle joue un rôle important dans le contrôle des mécanismes biologiques, donc les inhibiteurs d'enzymes sont un agent pharmaceutique très important [48].

### IV-2.3 Enzymes et santé humaine

De nombreuses maladies humaines telles que celles d'origine cardiovasculaire, oncologique, inflammatoire, immunologique, neurologique et infectieuse sont causées par la régulation aberrante des enzymes à l'intérieur des cellules. Les maladies peuvent être résolues avec succès en interrompant une voie enzymatique étroitement associée à la physiopathologie exprimée [49].

Les enzymes occupent une place prééminente dans la santé en raison de l'essentialité de leur activité dans de nombreux processus pathologiques et parce que les déterminants structurels de la catalyse enzymatique se prêtent bien à l'inhibition par des molécules de faible poids moléculaire, de type médicament. Actuellement les inhibiteurs d'enzymes représentent près de la moitié des médicaments utilisés en clinique [50].

Les inhibiteurs d'enzymes médicinales sont souvent intervenus par leur spécificité et son efficacité qui désignent l'absorption souhaitable pour inhiber l'enzyme. Une grande spécificité et une grande puissance confirment qu'un médicament aura peu d'effets secondaires et possédera une faible toxicité. Par conséquent, le développement d'inhibiteurs moins toxiques offre des produits alternatifs issus des produits naturels [49].

De nombreux produits naturels sont des inhibiteurs d'enzymes; la découverte et le développement de ces produits considérés comme un domaine dynamique de la pharmacologie et de la biochimie. Se sont impliqués dans la ligne directrice de la plupart des procédures métaboliques [51].

#### **IV-2.4 Effet des inhibiteurs naturels sur les maladies issues du stress oxydatif**

##### **IV-2.4.1 Les maladies neurodégénératives**

La maladie neurodégénérative est un terme appliqué à une variété d'affections résultant d'une dégradation chronique et d'une détérioration des neurones, en particulier ceux du système nerveux central.

Les deux principales maladies neurodégénératives : La maladie d'Alzheimer (MA) et la maladie de Parkinson (MP) sont caractérisées par de faibles taux dans le cerveau des neurotransmetteurs acétylcholine (ACh) et dopamine (DA), respectivement [52].

Par conséquent, l'une des stratégies thérapeutiques potentielles de ces deux affections, consiste à augmenter les taux cholinergique en inhibant l'activité biologique de l'acétylcholinestérase (AChE). Les inhibiteurs de l'AChE sont utilisés pour limiter la dégradation de l'ACh. Les inhibiteurs de l'AChE sont capables d'augmenter la fonction des cellules neurales en augmentant la concentration d'ACh [53].

L'acétylcholinestérase est une enzyme clé qui assure l'hydrolyse rapide de l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques centrales et périphériques; régulant la transmission des influx nerveux. Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase sont utilisés pour le

traitement symptomatique de plusieurs maladies neurologiques : la démence sénile, l'ataxie, la myasthénie grave, la maladie de Parkinson et d'Alzheimer [54].

La butyrylcholinestérase (BChE) est une enzyme cholinestérase similaire à l'acétylcholinestérase et fonctionne comme un régulateur de la neurotransmission cholinergique en hydrolysant acétylcholine. Ainsi, l'inhibition de la butyrylcholinestérase peut offrir un bon effet sur les thérapies cholinergiques, en particulier les tentatives de caractérisation des maladies d'Alzheimer [55].

L'abondance de plantes dans la nature constitue une source potentielle d'inhibiteurs de l'AChE et de la BChE, et les produits naturels continuent de fournir des médicaments et des modèles utiles pour le développement d'autres composés. Plusieurs plantes sont étudiées pour leurs activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase qui peuvent donc être utilisées pour soigner des maladies neurodégénératives [56].

L'utilisation d'extrait de plante comme inhibiteurs de cholinestérase est une thématique de recherche en développement, comme en témoigne le nombre annuel croissant de publications dans les revues internationales sur ce sujet.

#### IV-2.4.2 Le diabète de type II

Il existe principalement deux types de diabète, à savoir le diabète de type 1 et le diabète de type 2, ce dernier représente plus de 90% de tous.

Le diabète sucré ou diabète de type 2 c'est une maladie chronique cliniquement marquée par une hyperglycémie postprandiale, causés par une déficience en sécrétion ou en action de l'insuline endogène. Il est associé à des complications majeures, telles que la neuropathie diabétique, la rétinopathie et les maladies cardiovasculaires [57].

Plusieurs stratégies sont utilisées pour traiter le diabète, y compris le processus qui retarde l'absorption du glucose. Ceci est assuré par l'intervention d'inhibiteurs des enzymes  $\alpha$ -glucosidase et  $\alpha$ -amylase, qui jouent un rôle important dans l'hydrolyse des glucides [58].

$\alpha$ -glucosidase et  $\alpha$ -amylase, présent dans la petite bordure de la brosse intestinale se sont des enzymes responsables de la décomposition des oligosaccharides et des disaccharides en monosaccharides adaptés à l'absorption. Les inhibiteurs de ces enzymes, comme l'acarbose, retardent la digestion des glucides et prolongent le temps global de digestion des glucides, provoquant une réduction du taux d'absorption du glucose et par conséquent atténuant l'augmentation du glucose plasmatique postprandiale [59].

Ces dernières années, de nombreux efforts ont été déployés pour identifier les inhibiteurs efficaces des  $\alpha$ -glucosidase et  $\alpha$ -amylase à partir de sources naturelles telles que les plantes, afin de développer un aliment fonctionnel physiologique ou des composés à utiliser contre le diabète. De nombreux inhibiteurs de  $\alpha$ -glucosidase qui sont des phytoconstituants, tels que les flavonoïdes, les alcaloïdes, les terpénoïdes, les anthocyanes, les glycosides, les composés phénoliques [60, 61].

#### IV-2.4.3 L'hyperpigmentation cutané

Le stress oxydatif est un élément intégral qui influence une variété de réactions biochimiques, dans tout le corps et est connu pour jouer un rôle notable dans la mélanogénèse.

Les déclencheurs exogènes du stress oxydatif, tels que les rayons ultraviolets (UV) et la lumière visible (LVis), conduisent à la formation de pigment par des voies quelque peu différentes, mais les deux partagent un point final commun: le potentiel de générer une hyperpigmentation cosmétiquement indésirable [62].

Une bonne compréhension des voies impliquées dans la mélanogénèse peut aider à déterminer des mécanismes efficaces pour empêcher la formation de pigments.

La mélanogénèse, est le processus de synthèse de la mélanine dans les mélanocytes, qui se produit à partir de la tyrosine via une voie complexe impliquant une combinaison de réactions catalysées enzymatiques et chimiques. Parmi ceux-ci, la tyrosinase, la protéine 1 et 2 liée à la tyrosinase (TRP-1 et TRP-2) qui jouent un rôle majeur dans la transformation de la tyrosine en mélanine [63].

La tyrosinase, une glycoprotéine contenant du cuivre, est une enzyme clé de la biosynthèse de la mélanine dans les organites spécialisés appelés mélanosomes qui ne sont produits que par les cellules mélanocytaires [64].

La tyrosinase est une enzyme contenant du cuivre impliquée dans la biosynthèse de la mélanine par la catalyse de deux processus clés; hydroxylation de la tyrosine en 3,4-dihydroxy-phénylalanine (DOPA) et oxydation de DOPA en DOPA quinone [65]. Ces composés réactifs peuvent polymériser spontanément pour former de la mélanine [66].

Une synthèse ou une distribution irrégulière de mélanine peut induire une hyperpigmentation locale ou des taches. Ainsi, Les inhibiteurs de l'activité tyrosinase ont longtemps été recherchés comme moyen thérapeutique pour traiter les troubles

hyperpigmentaires cutanés. Il existe de multiples approches potentielles permettant de contrôler la pigmentation via la régulation de l'activité tyrosinase [64].

Un certain nombre de chercheurs se sont consacrés à l'identification des inhibiteurs des métabolites végétaux, fongiques et des algues marines et à la détermination de leur relation structure-activité. Les inhibiteurs de la tyrosinase de sources naturelles attirent généralement plus d'attention que les composés synthétisés chimiquement en raison de la demande cosmétique due à d'autres paramètres, tels que la cytotoxicité, la solubilité, l'absorption cutanée efficace [67].

**Références bibliographiques**

- [1] Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry*, 30(1), 11-26.
- [2] Freeman, B. A., & Crapo, J. D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 47(5), 412.
- [3] Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1985). The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Molecular aspects of medicine*, 8(2), 89-193.
- [4] Jacob, R. A. (1995). The integrated antioxidant system. *Nutrition research*, 15(5), 755-766.
- [5] Sertheyn, D., Mouithys-Mickalad, A., Franck, T., Grulke, S., Lamy, M., Deby, C., & Deby-Dupont, G. (2002). La nature chimique et la réactivité de l'oxygène. In *Annales de médecine vétérinaire*. Université de Liège, Faculté de médecine vétérinaire.
- [6] Bigard, A. X., & Guezennec, C. Y. (2017). *Nutrition du sportif*. Elsevier Health Sciences.
- [7] D'uracková, Z. (2014). Free radicals and antioxidants for non-experts. *Systems biology of free radicals and antioxidants*, 1, 3-38.
- [8] Abreu, I. A., & Cabelli, D. E. (2010). Superoxide dismutases—a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(2), 263-274.
- [9] Lacolley, P., Babuty, D., Boulanger, C., Ghaleh, B., Loirand, G., Pinet, F., & Samuel, J. (2008). Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux.
- [10] Emerit, J., Fechner, J., Galli, A., Clavel, J. P., & Congy, F. (1986). Les radicaux libres dérivés de l'oxygène et la peroxydation lipidique. Rôle en biologie cellulaire et en physiopathologie. *La Presse médicale (1983)*, 15(16), 751-754.
- [11] Rao, C. V. (2004). Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 555(1-2), 107-119.
- [12] Murphy, M. P., Packer, M. A., Scarlett, J. L., & Martin, S. W. (1998). Peroxynitrite: a biologically significant oxidant. *General Pharmacology: The Vascular System*, 31(2), 179-186.



- [13] Delattre, J., Beaudeau, J. L., & Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène. Radicaux libres et stress oxydant, Aspects biologiques et pathologique. Edt Tec Doc. Paris: Lavoisier, 45-80.
- [14] Favier, A. (2003). Le stress oxydant, Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.
- [15] Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40.
- [16] Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.
- [17] Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- [18] Kovacic, P., Pozos, R. S., Somanathan, R., Shangari, N., & O'Brien, P. J. (2005). Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *Current medicinal chemistry*, 12(22), 2601-2623.
- [19] Ridnour, L. A., Isenberg, J. S., Espey, M. G., Thomas, D. D., Roberts, D. D., & Wink, D. A. (2005). Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(37), 13147-13152.
- [20] Valko, M., Morris, H., Mazúr, M., Rapta, P., & Bilton, R. F. (2001). Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: do the semiquinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1527(3), 161-166.
- [21] Halliwell, B. E. (1989). Lipid peroxidation: a radical chain reaction. *Free radicals in biology and medicine*.
- [22] Migdal, C., & Serres, M. (2011). Reactive oxygen species and oxidative stress. *Medicine sciences: M/S*, 27(4), 405-412.

- [23] Kukreja, R. C., & Hess, M. L. (1992). The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovascular research*, 26(7), 641-655.
- [24] Kusano, C., & Ferrari, B. (2008). Total antioxidant capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *Journal of cell and molecular biology*, 7(1), 1-15.
- [25] Henrotin, Y., Kurz, B., & Aigner, T. (2005). Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes?. *Osteoarthritis and cartilage*, 13(8), 643-654
- [26] Zafrilla, P., Ferreres, F., & Tomás-Barberán, F. A. (2001). Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(8), 3651-3655
- [27] Cadenas, E. (1997). Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*, 6(4), 391-397.
- [28] Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*, 142(2), 231-255.
- [29] Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (2010). Antioxidants: molecules, medicines, and myths. *Biochemical and biophysical research communications*, 393(4), 561-564.
- [30] Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 1-65.
- [31] Jadot, G. (1994). *Antioxydants et vieillissement*. John Libbey Eurotext.
- [32] Goudable, J., & Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11(2), 115-120.
- [33] Cadenas, E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual review of biochemistry*, 58(1), 79-110.
- [34] Couto, N., Malys, N., Gaskell, S. J., & Barber, J. (2013). Partition and turnover of glutathione reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: a proteomic approach. *Journal of Proteome Research*, 12(6), 2885-2894.
- [35] McCall, M. R., & Frei, B. (1999). Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(7-8), 1034-1053.
- [36] Packer, L. (1997). *Vitamin C in health and disease* (Vol. 4). CRC Press.

- [37] Bendich, A., Machlin, L. J., Scandurra, O., Burton, G. W., & Wayner, D. D. M. (1986). The antioxidant role of vitamin C. *Advances in Free Radical Biology & Medicine*, 2(2), 419-444.
- [38] Saura-Calixto, F., & Pérez-Jiménez, J. (Eds.). (2018). *Non-extractable Polyphenols and Carotenoids* (Vol. 5). Royal Society of Chemistry.
- [39] Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of functional foods*, 18, 820-897.
- [40] Sang, S., Lapsley, K., Jeong, W. S., Lachance, P. A., Ho, C. T., & Rosen, R. T. (2002). Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus* Batsch). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2459-2463.
- [41] Kiokias, S., Varzakas, T., & Oreopoulou, V. (2008). In vitro activity of vitamins, flavonoids, and natural phenolic antioxidants against the oxidative deterioration of oil-based systems. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(1), 78-93.
- [42] Vacaresse, N., Vieira, O., Robbesyn, F., Jürgens, G., Salvayre, R., & Negre-Salvayre, A. (2001). Phenolic antioxidants trolox and caffeic acid modulate the oxidized LDL-induced EGF-receptor activation. *British journal of pharmacology*, 132(8), 1777-1788.
- [43] Yehye, W. A., Rahman, N. A., Ariffin, A., Hamid, S. B. A., Alhadi, A. A., Kadir, F. A., & Yaeghoobi, M. (2015). Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *European journal of medicinal chemistry*, 101, 295-312.
- [44] Shahidi, F., & Ho, C. T. (Eds.). (2007). *Antioxidant measurement and applications*. American Chemical Society.
- [45] Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- [46] Vargel, M. (2010). *Mémo-fiches Concours kiné Biologie*. Elsevier Health Sciences.
- [47] Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S. M., Vasson, M. P., Hasselmann, M., & Lerverve, X. (Eds.). (2006). *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. Springer Science & Business Media.
- [48] Fursule, R. A. (2008). *Biochemistry Basics And Applied*. Pragati Books Pvt. Ltd.

- [49] Shen, Y., Hu, Y., Chen, B., & Yao, S. (2010). Screening of enzyme inhibitors from traditional Chinese medicine. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 13(10), 885-899.
- [50] Copeland, R. A. (2013). *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists*. John Wiley & Sons
- [51] Rauf, A., & Jehan, N. (2017). Natural products as a potential enzyme inhibitors from medicinal plants. In *Enzyme Inhibitors and Activators* (pp. 165-177). InTech, Rijeka.
- [52] Houghton, P. J., & Howes, M. J. (2005). Natural products and derivatives affecting neurotransmission relevant to Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neurosignals*, 14(1-2), 6-22.
- [53] Sharma, K. (2019). Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics. *Molecular medicine reports*, 20(2), 1479-1487.
- [54] Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M., & Houghton, P. J. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14(4), 289-300.
- [55] Mesulam, M. M., Guillozet, A., Shaw, P., Levey, A., Duysen, E. G., & Lockridge, O. (2002). Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *neuroscience*, 110(4), 627-639.
- [56] Adewusi, E. A., Moodley, N., & Steenkamp, V. (2010). Medicinal plants with cholinesterase inhibitory activity: a review. *African Journal of Biotechnology*, 9(49), 8257-8276.
- [57] Day, R., & Lal, S. S. (2012). Supplementation effects of vitamin C and vitamin E on oxidative stress in post menopausal diabetic women. *International Journal of Current Biomedical and Pharmaceutical Research*, 2(2), 269-271.
- [58] Bhandari, M. R., Jong-Anurakkun, N., Hong, G., & Kawabata, J. (2008).  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.). *Food Chemistry*, 106(1), 247-252.
- [59] Sales, P. M., Souza, P. M., Simeoni, L. A., Magalhães, P. O., & Silveira, D. (2012).  $\alpha$ -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 141-183.

- [60] Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., & Prakash, O. (2011).  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy reviews*, 5(9), 19.
- [61] Xiao, J., Ni, X., Kai, G., & Chen, X. (2013). A review on structure–activity relationship of dietary polyphenols inhibiting  $\alpha$ -amylase. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(5), 497-506.
- [62] Nahhas, A. F., Abdel-Malek, Z. A., Kohli, I., Braunberger, T. L., Lim, H. W., & Hamzavi, I. H. (2019). The potential role of antioxidants in mitigating skin hyperpigmentation resulting from ultraviolet and visible light-induced oxidative stress. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 35(6), 420-428.
- [63] Sim, M. O., Ham, J. R., & Lee, M. K. (2017). Young leaves of reed (*Phragmites communis*) suppress melanogenesis and oxidative stress in B16F10 melanoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 165-171.
- [64] Ando, H., Kondoh, H., Ichihashi, M., & Hearing, V. J. (2007). Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(4), 751-761.
- [65] Özer, Ö., Mutlu, B. A. S. A. K., & Kivçak, B. (2007). Antityrosinase activity of some plant extracts and formulations containing ellagic acid. *Pharmaceutical Biology*, 45(6), 519-524.
- [66] Perez Gutierrez, R. M., Flores Cotera, L. B., & Gonzalez, A. M. N. (2012). Evaluation of the antioxidant and anti-glycation effects of the hexane extract from *Piper auritum* leaves in vitro and beneficial activity on oxidative stress and advanced glycation end-product-mediated renal injury in streptozotocin-treated diabetic rats. *Molecules*, 17(10), 11897-11919.
- [67] Lee, S. Y., Baek, N., & Nam, T. G. (2016). Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(1), 1-13.

## ***PARTIE 02***

# ***TRAVAUX PERSONNELS***

## *PARTIE 02*

### *CHAPITRE V*

#### *Matériels et méthodes d'analyse*

## V-1 Matériels végétales

*Clematis cirrhosa* L. a été collecté en décembre 2017 pendant la période de floraison dans la région de Souk Ahras (extrême Nord-Est de l'Algérie). La plante a été identifiée, au sein du Département de biologie, Université Badji Mokhtar -Annaba- Algérie, par Dr Tarek HAMEL. Le numéro de voucher de *Clematis cirrhosa* L. est le **ph012\_03**. Les parties aériennes de la plante récoltées ont été lavées, découpées en petit morceaux puis séchées à l'abri de la lumière à température ambiante puis broyées en poudre fine à l'aide d'un broyeur.

## V-2 Enquête ethnobotanique

L'enquête ethnobotanique sur la plante *Clematis cirrhosa* L. a été réalisée durant l'année 2018 à l'aide des fiches questionnaires dans la région de Souk Ahras et Annaba, justifiant l'utilisation en médecine traditionnelle par la population de la région.

On a suivis trois méthodes d'enquête qui sont les plus utilisées : enquête auprès de la population rurale, enquête auprès des herboristes, enquête auprès des tradipraticiens, où nous avons remplis 200 fiches d'enquêtes avec les gens qui ont la connaissance sur l'usage thérapeutiques de la plante *Clematis cirrhosa* L..

### V-2.1 Fiche questionnaire

L'outil de notre enquête est un formulaire constitue de deux parties, la première est basée sur la personne enquêtée (le sexe, l'âge et le niveau d'étude). La deuxième partie collecte des renseignements concernant la plante étudiée, ces informations permettent d'évaluer la connaissance de la plante, l'utilisation, la prescription et le mode de préparation préconisé de chacun des personnes interrogées (**Annexe-1**).

## V-3 Extraction

### V-3.1 Extraction de la matière végétale par ultrason

#### V-3.1.1 Principe

Une demande progressive vers un processus d'extraction efficace, économique et propre pour les composés bioactifs des plantes a conduit à explorer un nombre substantiel de nouvelles techniques d'extraction (extraction verte), qui se concentrent sur une réduction considérable de coût et d'énergie, une protection assurée de l'environnement, une plus grande



pureté et préservation de la bioactivité des composés séparés. Parmi les techniques d'extraction vertes les plus récentes, l'extraction assistée par ultrasons. Cette technique a été intensément exploitée ces jours-ci. C'est une technique efficace et donc largement utilisée pour extraire une large gamme des phytoconstituants, avec un temps d'extraction plus court, plus important et à des températures plus basses [1].

L'extraction assistée par ultrason est un processus, qui utilise de l'énergie sonore et des solvants pour extraire les composés cibles de différentes matrices végétales. Il s'agit d'améliorer l'efficacité des solvants d'extraction à l'aide d'ultrasons qui propagent des ondes de pression ultrasonores et des phénomènes de cavitation qui en résultent, où les bulles de cavitation et la température très locale s'effondrent. Il brise les parois cellulaires et libère le contenu cellulaire dans le milieu d'extraction [2].



**Figure V-1 :** Appareil à ultrason (40MHz)

### V-3.1.2 Mise en œuvre pratique

Procédure de l'extraction : l'extraction se fait avec un gradient de température croissant allant de 25°C jusqu'à 60°C. 15g de la poudre de la plante est mise dans deux solvants différents, méthanol (100%) et le méthanol/H<sub>2</sub>O (70%), dans un ultrason pendant 10 min à une température de 25°C, après un repos de 10 min, cette même solution est remise pendant 10 min à une température de 40°C, et après un autre repos de 10 min cette même solution, est remise une autre fois pendant 10 min à une température de 60°C. les extraits obtenus sont filtrés et évaporés sous pression réduite et à une température comprise entre 40 et 60°C pour obtenir des extraits secs.

## V-3.2 Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

### V-3.2.1 Principe

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de composés volatils, présents dans une grande variété d'herbes aromatiques et sont très importantes dans la physiologie et l'écologie des plantes. Ils proviennent du métabolisme secondaire de la plante et sont responsables de leur arôme caractéristique [3].

Ils peuvent être classés en deux groupes principaux: les hydrocarbures et les composés oxygénés. Les hydrocarbures comprennent les terpènes, les sesquiterpènes et les diterpènes, et les composés oxygénés comprennent les esters, les aldéhydes, les cétones, les alcools, les phénols, les oxydes, les acides et les lactones [4].

Les principales techniques d'obtention des huiles essentielles (HE) à partir des herbes médicinales sont l'hydrodistillation (HD), entraînement à la vapeur, la macération, l'expression. Parmi ces techniques, la HD a été la méthode la plus courante pour extraire les huiles essentielles des plantes [5]. Le plus souvent, elle est réalisée à l'aide d'un appareil en verre de type Clevenger ou Deryng. Les deux appareils sont des appareils de pharmacopée recommandés pour déterminer la teneur en huile essentielle, le premier est décrit par la Pharmacopée Européenne, et le second par la Pharmacopée Polonaise [6].

Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales.

Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical (colonne de rectification) puis dans la colonne de refroidissement où aura lieu la condensation, le distillat est récupéré dans une ampoule à décanter pour la séparation du mélange par différence de densité. Le temps d'extraction est mesuré à partir de la chute de la première goutte dans l'ampoule et La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter [7].

L'huile récupérée est séchée par un desséchant ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) pour éliminer toute trace d'eau, finalement l'huile essentielle extraite est conservée dans des flacons en verre opaque

fermés hermétiquement au réfrigérateur à une température voisine de 4°C, pour les préserver de l'air, de la lumière et des variations de température [8].

### V-3.2.2 Mise en œuvre pratique

Pour l'extraction des huiles essentielles, 600 g de plante en poudre sont soumise à une distillation en utilisant un appareil Clevenger (Figure V-2) pendant 6 heures. A l'issue de cette période, l'huile essentielle obtenue est diluée avec de l'hexane. Ensuite, l'échantillon d'huile essentielle a été séché avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre et filtré avec un filtre à seringue en PTFE de 0,45 µm. Le rendement en huile essentielle est mesuré à la fin du procédé et les résultats ont été exprimés en% (v/m). L'huile essentielle est collecté et conservé à (+4 °C) jusqu'à l'analyse



Figure V-2 : Hydrodistillateur de type Clevenger

## V-4 Screening phytochimique

Le Screening phytochimique est une série de tests qui détermine la présence ou l'absence de certaines substances chimiques, présentes dans une plante. La recherche des groupes de composés chimiques chez les extraits bruts a été effectuée en utilisant des procédures standards suivant la méthodologie décrites par Dohou et *al.* [9].

#### **V-4.1 Analyse qualitative sur Chromatographique sur couche mince (CCM)**

Pour la recherche des polyphénols, des flavonoïdes, des tanins galliques ou catéchiques et des alcaloïdes, on a réalisé des chromatogrammes sur couche mince sur des plaques de gel de silice (Silica gel 60 F<sub>254</sub>). Le système d'éluion est composé de chloroforme/méthanol/eau dans les proportions (65 : 35 : 5).

##### **V-4.1.1 Révélation des phénols totaux**

La révélation des phénols totaux a été réalisée par une pulvérisation du réactif de Folin-Ciocalteu sur les plaques (CCM) obtenues et après un chauffage de 10 min. L'observation des spots bleus dans le visible indique la présence des polyphénols.

##### **V-4.1.2 Révélation des flavonoïdes**

La révélation des flavonoïdes a été réalisée par une pulvérisation d'une solution éthanolique à 5% de chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) sur les plaques (CCM) obtenues. L'observation des spots jaunes dans le visible ou jaune-vert sous UV à 365 nm indique la présence de flavonoïdes [10].

##### **V-4.1.3 Révélation des tanins**

La révélation des tanins a été réalisée par une pulvérisation d'une solution de chlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>) à 10% sur les plaques (CCM) obtenues. Des spots bleu-noir dans le visible indiquent la présence des tanins galliques et la coloration vert ou vert foncé montre des tanins condensés [11].

##### **V-4.1.4 Révélation des alcaloïdes**

La révélation des alcaloïdes a été réalisée par une pulvérisation du réactif de Dragendorff sur les plaques (CCM) obtenues. Des spots orangés dans le visible indiquent la présence des alcaloïdes.

##### **V-4.1.5 Caractérisation des saponosides**

Dans un tube à essai, 10 ml d'extraits ont été agités énergétiquement pendant 15 secondes puis laissées au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides.

## V-4.2 Analyses quantitatives des composés phénoliques

L'analyse quantitative des composés phénoliques, contenus dans les extraits végétaux est mesurée par des méthodes colorimétriques basées sur l'utilisation du spectrophotomètre UV-visible qui va mesurer l'absorbance des extraits à une longueur d'onde donnée.

Dans cette analyse une lumière monochromatique incidente d'intensité  $I_0$ , dont la longueur d'onde est définie, va traverser une cuve contenant les extraits étudiés. La lumière monochromatique est transmise avec une intensité  $I_1$  et la valeur affichée par le spectrophotomètre est l'absorbance d'extrait étudiée, et la concentration des composés phénoliques est calculée à partir de cette absorbance.

### V-4.2.1 Dosage des polyphénols totaux

#### V-4.2.1.1 Principe

La teneur en polyphénols totaux (PT) des extraits de plante est généralement déterminée par une méthode colorimétrique utilisant le réactif Folin Ciocalteu. Ce réactif est un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) (état de valence du métal +6) qui peut être réduit par les phénols formant un complexe phosphotungstique-phosphomolybdique, un chromophore bleu qui a une absorption maximale dans la région comprise entre 725 et 760 nm. Pour réaliser les courbes de calibration l'acide gallique et la catéchine sont souvent pris comme références [12, 13].

#### V-4.2.1.2 Mise en œuvre pratique

La teneur des phénols totaux contenue dans l'extrait méthanolique et hydrométhanolique (7/3) de la plante étudiée est évaluée selon la méthode de Slinkard et Singleton (méthode F-C), en y apportant quelques modifications [14]. Tout d'abord, un mélange de trois solutions a été préparé avec 1,5 ml d'eau distillée, 500  $\mu$ l de carbonate de sodium à 7% ( $Na_2CO_3$ ) et 200  $\mu$ l de solution d'extrait. Après 3 min, on ajoute 1 ml de réactif F-C. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif, l'étalon est préparé à différentes concentrations (100, 50, 25, 12,5  $\mu$ g/ml), toutes les préparations sont laissées à température ambiante dans l'obscurité. Au bout de 2 heures, ou après avoir terminé l'oxydation des composés phénoliques, un changement de couleur du jaune au bleu est observé, la lecture des

absorbances en spectrophotomètre est faite à 760 nm contre un blanc. La concentration des polyphénols totaux est donnée en équivalent d'acide gallique (mg EAG/g d'extrait).

#### **V-4.2.2 Dosage des flavonoïdes totaux**

##### **V-4.2.2.1 Principe**

La quantification des flavonoïdes est effectuée par une méthode basée sur la formation d'un complexe très stable, entre le chlorure d'aluminium et les flavonoïdes ce complexe se caractérise par une absorbance maximale dans le visible à 415 nm.

##### **V-4.2.2.2 Mise en œuvre pratique**

Utilisant la méthode adaptée par d'Arvouet-Grand et *al.* [15], la teneur en flavonoïdes totaux (FT) des extraits est mesurée par spectrophotométrie à 415 nm. De manière concise, les solutions d'échantillons sont préparées en mélangeant 1 ml d'extrait de plante et 1 ml de chlorure d'aluminium à 2% (AlCl<sub>3</sub>). Une solution de blanc est également préparée avec 1 ml d'extrait et 1 ml du méthanol. Après un repos de 10 min à 25 °C, les absorbances des solutions préparées sont prises contre le blanc à 415 nm et la teneur en flavonoïdes est rapportée en équivalent quercétine (mg EQ/ g d'extrait).

### **V-5 Analyses chromatographiques**

#### **V-5.1 Analyse des extraits par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC/DAD)**

##### **V-5.1.1 Principe**

La chromatographie liquide à haute performance est la technique la plus utilisée pour la séparation et la caractérisation des polyphénols. La HPLC est un instrument polyvalent et adaptable avec divers avantages tels que la haute sélectivité, sensibilité, résolution, précision et la conservation des échantillons, elle est conçue pour séparer les composés des mélanges complexes en fonction de leurs polarités, de leurs solubilités et de leurs propriétés granulométriques [12].

Les colonnes en phase inverse peuvent séparer presque tous les composés polyphénoliques. Des systèmes binaires d'élution sont préconisés : le solvant A est un milieu

aqueux acidifié (acide acétique, acide phosphorique ou acide formique) et l'éluant B est un milieu organique moins polaire (méthanol, acétonitrile), éventuellement acidifié [13].

La combinaison de la chromatographie liquide à haute pression avec un détecteur à barrette de photodiodes (HPLC/DAD) peut fournir des informations détaillées sur les structures de polyphénols [16]. Le détecteur de photodiode DAD peut collecter des données spectrales UV/visible lors de la séparation des composés ainsi, lorsqu'un pic d'un composé est concordé au temps de rétention et au spectre UV/Vis d'un standard, ce composé peut être provisoirement identifié. La détermination quantitative consiste à analyser une série d'étalons couvrant la plage de concentration d'intérêt, et les concentrations des composés séparés sont quantifiées sur la base des courbes d'étalonnage pour chaque étalon [12].

### V-5.1.2 Mise en œuvre pratique

L'analyse de la composition phénolique des extraits de la plante étudiée, est réalisée selon la méthode décrite par Capino et *al.* [17] avec légères modifications. Les profils phénoliques des extraits sont déterminés à l'aide d'une HPLC (HP-Agilent 1292 infinity) équipée d'une colonne C<sub>18</sub> (25 cm x 4.6 mm, 5µm) et couplée à un détecteur à barrette de diode (DAD). Les échantillons sont préparés dans le méthanol à une concentration de 20 mg/ml et les volumes d'injection sont de 20 µl. La phase mobile utilisée est un mélange entre 3% d'acide acétique dans l'eau (A) et le méthanol (B), les volumes d'injection sont de 10 µl et le gradient d'élution est appliqué à un débit de 0,8 ml/min (Tableau V-1). Après chaque cycle, le système est reconditionné pendant 15 min avant une nouvelle analyse.

Les éluants sont détectés à 278 nm et les étalons phénoliques utilisés sont l'acide gallique, la catéchine, l'acide chlorogénique, l'acide caféine, l'acide hydroxybenzoïque, l'épicatéchine, l'acide syringique, l'acide coumarique, l'acide trans-ferrulique, l'acide sinapique, l'acide benzoïque, l'hespéridine, l'acide rosmarinique, l'acide cinnamique et la quercétine. L'identification des composés phénoliques contenus dans les extraits, et leurs analyses quantitatives sont effectuées par la comparaison de leurs spectres et leurs temps de rétention avec ceux des standards. La quantité de chaque composé est déterminée en utilisant des courbes d'étalonnage externes, qui sont obtenues pour chaque standard. Les valeurs des composés phénoliques détectés sont exprimées en (µg/g d'extrait).

**Tableau V-1** : Conditions expérimentales d'HPLC/DAD

<b>Le temps (min)</b>	<b>Acide acétique (A%)</b>	<b>Méthanol (B%)</b>
<b>0</b>	93	7
<b>20</b>	72	28
<b>28</b>	75	25
<b>35</b>	70	30
<b>45</b>	67	33
<b>47</b>	58	42
<b>55</b>	50	50
<b>58</b>	30	70
<b>60</b>	20	80
<b>65</b>	0	100

## V-5.2 Analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectrophotomètre de masse (GC/MS)

### V-5.2.1 Principe

La chromatographie en phase gazeuse (CPG ou GC) est une technique de séparation réservée à l'analyse de composés relativement volatiles et thermiquement stables, appelées analytes. Les molécules à séparer sont volatilisées et mélangées à un gaz inerte dit gaz vecteur qui constitue la phase mobile, il transporte les analytes à l'intérieur d'une colonne analytique dont la paroi interne est couverte d'un film chimique (ou phase stationnaire). La séparation des analytes repose sur la différence d'affinité des analytes pour la phase mobile et pour la phase stationnaire [18]. Les molécules sont retenues par la colonne puis élues (se détachent) de la colonne à des moments différents (appelés temps de rétention), ce qui permet au spectromètre de masse en aval de capturer, ioniser, accélérer, dévier et détecter les molécules



ionisées séparément. Le spectromètre de masse le fait en cassant chaque molécule en fragments ionisés et en détectant les fragments [19].

L'analyse chimique des huiles essentielles est généralement réalisée par GC (analyse quantitative) et GC/MS (analyse qualitative) [20]. L'identification des principaux composants est effectuée par la comparaison des temps de rétention obtenus par GC et les données MS des échantillons avec ceux des étalons [21].

### V-5-2.2 Mise en œuvre pratique

L'analyse GC/MS est effectuée en utilisant un système GC/MS Agilent 7890 (Figure V-3). Une colonne HP-INNOWAX (la longueur 60 m, le diamètre intérieur 0,25 mm et l'épaisseur de film 0,25  $\mu\text{m}$ ) en utilisant Hélium (He) comme le gaz vecteur. La température est appliquée à la colonne très lentement et la température initiale est maintenue à 60°C pendant 10 minutes. On augmente la température de 4°C par minute pour atteindre 220°C, et après avoir été maintenue à cette température pendant 10 minutes, elle est augmentée de 1 °C par minute jusqu'à 240°C. Au dernier cycle, l'analyse est complétée en maintenant à cette température pendant 30 minutes. Ainsi, la durée totale d'analyse est de 110 minutes. La température du bloc d'injecteur est réglée à 240°C et les spectres de masse sont enregistrés à 70 eV.

L'identification des composés des HE a été réalisée sur la base de l'indice de rétention (IR) déterminé par co-injection en référence à une série homologue de n-alcane ( $\text{C}_8\text{--}\text{C}_{30}$ ), dans les mêmes conditions expérimentales. Une identification plus poussée a été réalisée par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux de Wiley Registry, 8th Edition/NIST 2005 Mass Spectral Library construite à partir de substances pures et de constituants d'huiles essentielles connues, ainsi que par comparaison de leurs indices de rétention avec les valeurs de la littérature [22].

Formule d'indice de rétention de Kovats:

$$ir = 100(n) + 100(m - n) \frac{tri - trn}{trm - trn}$$

i : constituant de l'huile essentielle analysée

ir : indice de rétention de « i »

n : nombre de carbones de l'alcane élué avant « i »

m : nombre de carbones de l'alcane élué après « i »

tri : temps de rétention de « i »

trn : temps de rétention de l'alcane élué avant « i »

trm : temps de rétention de l'alcane élué après « i »



**Figure V-3 :** Appareil GC/MS Agilent 7890

## **V-6 Etude biologique in vitro de l'espèce *Clematis cirrhosa* L.**

### **V-6.1 Activité antioxydante**

L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique (100%) et hydrométhanolique (70%) est réalisée sur des échantillons préparés en méthanol à une concentration de 2 mg/ml pour les extraits et en éthanol à une concentration de 5 mg/ml pour l'huile essentielle.

#### **V-6.1.1 Capacité antioxydante totale (CAT)**

##### **V-6.1.1.1 Principe**

Le dosage de la capacité antioxydante totale est une méthode spectroscopique utilisée pour la détermination quantitative de la capacité antioxydante. Le dosage est basé sur la réduction de Mo(VI) en Mo(V) par l'échantillon à analyser et la formation ultérieure d'un complexe de phosphomolybdène à pH acide [23].

### V-6.1.1.2 Mise en œuvre pratique

La capacité antioxydante totale des extraits est évaluée par le dosage du phosphomolybdène selon la méthode de Prieto et *al.* [24]. Tout d'abord, un mélange constitué de trois solutions est préparé on mélange: le phosphate de sodium (28 mM), molybdate d'ammonium (4 mM) et acide sulfurique (6 M). Après on ajoute 3 ml de ce mélange à 100  $\mu$ l d'extrait de la plante.

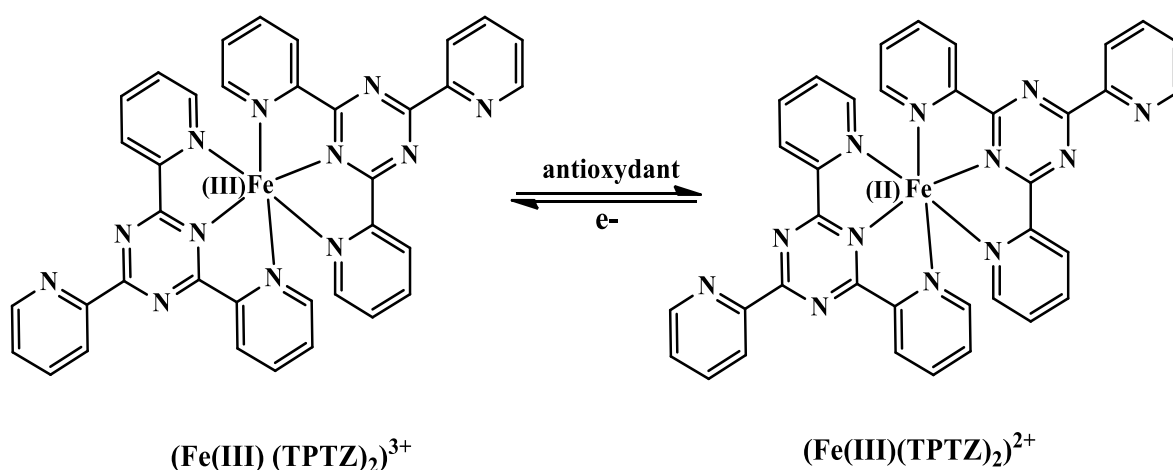
Une courbe d'étalonnage est établie avec des solutions d'acide ascorbique (vitamine C) préparées à différentes concentrations (1, 0.5, 0.250, 0.125 mg/ml). Pour le blanc, seulement 300  $\mu$ l de méthanol ont été utilisés.

Toutes les solutions préparées sont incubée à 95°C pendant 90 min dans l'obscurité, l'absorbance est lue contre un blanc à 695 nm et les résultats sont exprimées en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EAA /g d'extrait).

### V-6.1.2 Le pouvoir réducteur du fer (Test FRAP)

#### V-6.1.2.1 Principe

Cette méthode consiste à mesurer le pouvoir antioxydant réducteur d'ion ferrique, qui utilise un complexe d'ions ferriques de tripyridyltriazine (TPTZ) comme réactifs. Ce test repose sur la réduction du complexe d'ions ferriques Fe(III)-TPTZ en complexe d'ions ferreux Fe (II)-TPTZ par des antioxydants. Cette réduction est contrôlée en mesurant la variation d'absorption à 593 nm [23].



**Figure V-4 :** Réduction du complexe d'ions ferriques Fe(III)-TPTZ

### V-6.1.2.2 Mise en œuvre pratique

Avec de légère modification apportée à la méthode d'Apak et *al.* [25], la capacité de réduction des ions ferriques des extraits de plantes sont évaluée. Trois solutions de réactifs sont préparées: 31,2 mg de 2,4,6-Tris (2-pyridyl) -s-triazine (TPTZ) dissous dans 50  $\mu\text{l}$  d'acide chlorhydrique (HCl) et 10 ml d'eau distillée ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 22 mg de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) dissous dans 10 ml d'eau distillée, tampon acétate (0.3 M, pH 3.6). Après, les solutions pré-préparées sont mélangées avec les proportions suivantes (tampon acétate/TPTZ/ $\text{FeCl}_3$ , 10/1/1).

Des solutions standard de Trolox sont préparées dans le méthanol à différentes concentrations (25, 50, 75, 100, 150, 200 mg / ml). Les absorbances de tous les échantillons sont mesurées par un spectrophotomètre à 593 nm, après 30 minutes d'incubation à 30°C.

### V-6.1.3 Capacité de réduction du cuivre (Test CUPRAC)

#### V-6.1.3.1 Principe

La méthode CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) est un test de capacité antioxydante simple et polyvalent, utile pour une grande variété de matrices contenant à la fois des antioxydants lipophiles et hydrophiles. Ce test est basé sur la réduction de  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  par l'action combinée de tous les antioxydants. Le réactif oxydant chromogène utilisé pour le test CUPRAC est le cation bis (néocuproïne) cuivre (II) ( $\text{Cu(II)-Nc}$ ), et le chromophore issu de la réduction de ce réactif par les antioxydants qui agissent dans ce test comme un agent transfert d'électron à pH 7. L'absorbance du complexe de  $\text{Cu(I)}$  formé est mesurée à 450 nm [26].

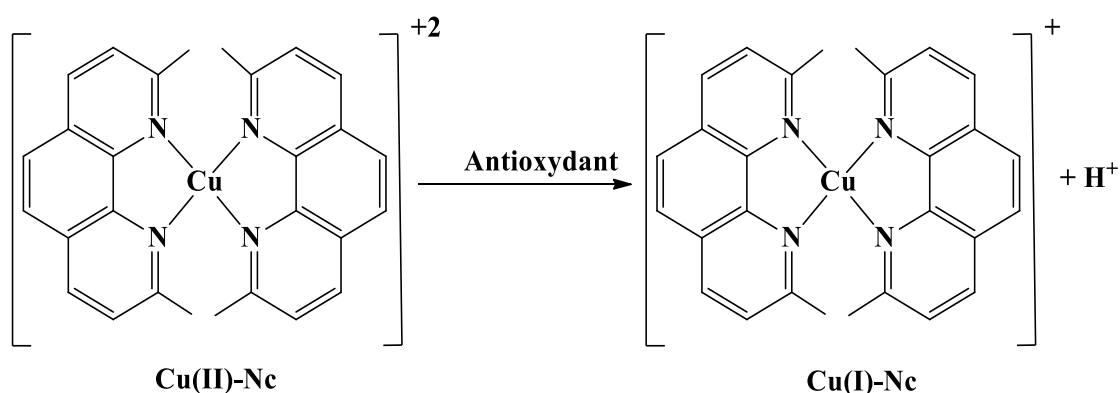


Figure V-5 : Réduction du cation bis (néocuproïne) cuivre (II)

### V-6.1.3.2 Mise en œuvre pratique

La capacité des extraits de la plante à réduire les ions cupriques est déterminée en utilisant la méthode d'Apak et *al.* [25] avec quelques modifications. Ainsi on prépare trois solutions : une solution de chlorure de cuivre (II) ( $10^{-2}$  M), un tampon d'acétate d'ammonium (PH=7), une solution de néocuproïne ( $7.5 \times 10^{-3}$  M). 1 ml de chaque solution préparée est mis dans un tube à essai, après on ajoute 1 ml d'extrait et 1 ml d'eau distillée à chaque tube.

Le contrôle positif est représenté par des solutions d'antioxydants standard (BHA) et (BHT) préparées à différentes concentrations (250, 125, 62.5, 31.25 mg/ml). Les mesures sont prises contre un blanc par spectrophotomètre à 450 nm après 30 min d'incubation à température ambiante.

### V-6.1.4 Capacité de piégeage des radicaux libres ABTS<sup>•+</sup>

#### V-6.1.4.1 Principe

Le test mesure la capacité des antioxydants à piéger le cation radicalaire stable ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azinobis (acide 3-éthylbenzothiazoline 6-sulfonique)), un chromophore bleu-vert avec une absorption maximale à 734 nm ; diminue son intensité dans la présence d'antioxydants [27, 28]. Dans cet essai, les antioxydants peuvent neutraliser le cation radicalaire ABTS<sup>•+</sup>, généré à partir de l'ABTS, soit par réduction directe via un donneur d'électrons, soit par désactivation radicalaire via un donneur d'atomes d'hydrogène, et l'équilibre de ces deux mécanismes est généralement déterminé par la structure antioxydante et le pH du milieu [27].

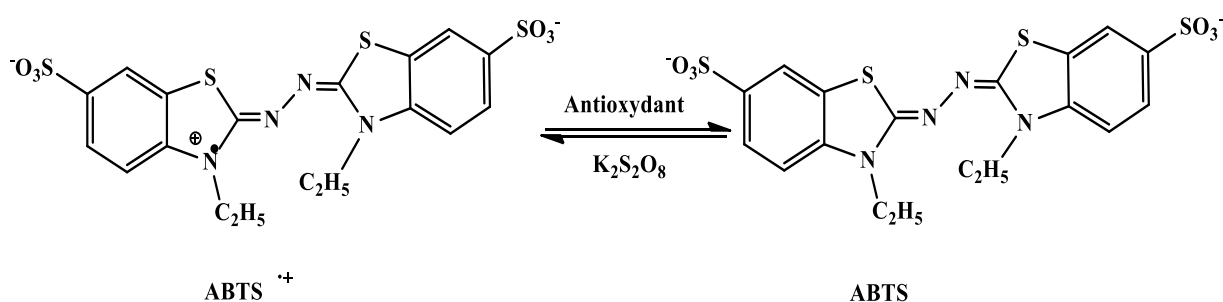


Figure V-6 : Réduction de radical ABTS<sup>•+</sup>

#### V-6.1.4.2 Mise en œuvre pratique

La capacité des extraits à piéger le radical ABTS<sup>•+</sup> est déterminée selon la méthode de Re et *al.* [29]. Tout d'abord, une solution ABTS (7 mM) est préparée et mélangée avec une

solution de sulfate de potassium (20,45 mM). Le mélange est maintenu pendant 12-16 min dans l'obscurité à 25°C. Avant de commencer le test, une dilution de la solution ABTS est affectée pour atteindre une absorbance de 0,700 à 734 nm. 1 ml de l'extrait est ajouté à 2 ml de la solution ABTS, après 30 min d'incubation dans l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 734 nm et la capacité de piégeage des radicaux ABTS<sup>•+</sup> est exprimée en équivalent de Trolox (TEAC).

### V-6.1.5 Capacité de piégeage des radicaux libres DPPH<sup>•</sup>

#### V-6.1.5.1 Principe

La méthode de piégeage des radicaux DPPH est un test simple, facile, économique, rapide et efficace couramment utile pour mesurer l'activité antioxydante et évaluer l'activité de piégeage des radicaux des antioxydants non enzymatiques. Le test de piégeage DPPH<sup>•</sup> est la méthode indirecte la plus fréquente et ancienne pour déterminer le potentiel antioxydant des composés phénoliques [30].

2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) est une espèce de radical azoté à longue durée de vie, en raison de son incapacité à subir une dimérisation grâce à la délocalisation de l'électron libre sur la molécule dans son ensemble, de sorte que la molécule ne se dimérise pas. Ainsi, la délocalisation des électrons donne naissance à la couleur violet foncé, caractérisée par une bande d'absorption en solution organique centrée à environ 517 nm [23].

Le test est basé sur la neutralisation du radical DPPH<sup>•</sup>, par un donneur d'électron (antioxydant), s'accompagne d'un changement de couleur mesuré à 517 nm; la décoloration constitue un indicateur de l'efficacité antioxydante et peut être rapportée comme CI<sub>50</sub>, qui est définie comme la concentration de l'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration initiale de DPPH de 50% [31].

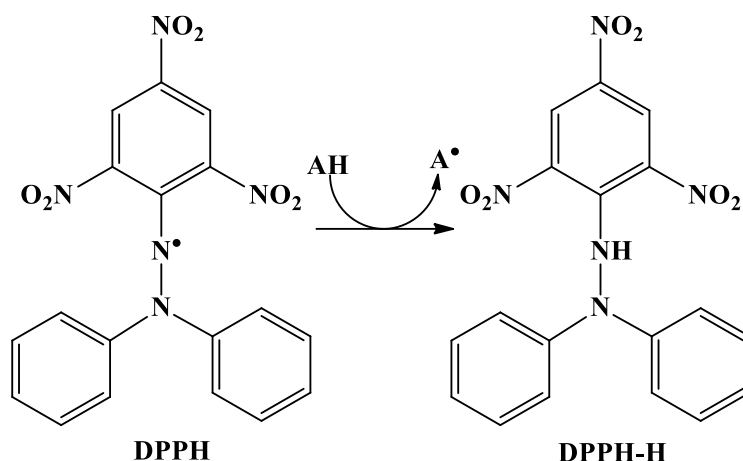


Figure V-7 : Réaction de piégeage de DPPH<sup>•</sup>

### V-6.1.5.2 Mise en œuvre pratique

Le test DPPH<sup>•</sup> est réalisé par la méthode décrite par Sarikurkcu et *al.* avec quelques modifications [32]. De manière concise, des solutions d'échantillons sont préparées avec 1 ml de solution de DPPH (0,4 mM), 1 ml de méthanol et 1 ml de l'extrait. Alors que le contrôle est préparé de même manière sans l'ajout de solution d'extrait. Toutes les préparations sont mises dans l'obscurité à température ambiante. Après 30 min, l'absorbance est lue contre le blanc et le contrôle à une longueur d'onde de 517 nm.

L'inhibition des radicaux DPPH (I%) des extraits a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$I\% = 100 \times (A_0 - A_1) / A_0(1)$$

$A_0$ : Absorbance du contrôle.

$A_1$ : Absorbance de l'extrait.

## V-6.2 Activités enzymatiques

### V-6.2.1 Activité inhibitrice de la cholinestérase

#### V-6.2.1.1 Principe

Une grande variété de méthodes a été développée au cours des dernières décennies pour la quantification de l'activité inhibitrice de l'AChE. Le test le plus courant est basé sur la méthode d'Ellman, utilisant l'iodure d'acétylcholine (IATC) comme substrat de cet enzyme dont le produit de la réaction est la thiocholine. L'activité de l'AChE est déterminée suivant la

méthode colorimétrique d'Ellman basée sur la réaction de la thiocholine avec le 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoate (DTNB) qui donne le Thio-2-N-nitro-Benzoate (TNB) un composé jaune qui absorbe à 470 nm. L'absorbance du TNB est mesurée à l'aide du spectrophotomètre est proportionnelle à l'activité enzymatique de l'Acétylcholinestérase [33].

### V-6.2.1.2 Mise en œuvre pratique

La capacité des extraits à inhiber l'enzyme cholinestérase (ChE) est testée par la méthode d'Ellman avec quelques modifications [34]. Un mélange de 50 µl de l'échantillon, 125 µl d'acide 5,5-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB) et 25 µl d'acétylcholinestérase (AChE) (ou de butyrylcholinestérase (BChE)) dans un tampon Tris-HCl (pH 8.0), est préparé dans une microplaque à 96 puits. Après 15 min d'incubation à 25 ° C, la réaction est débütée avec 25 µl d'iodure d'acétylthiocholine (IATC) ou de chlorure de butyrylthiocholine (BTCL). Un blanc est préparé sans addition de solution d'enzyme (AChE ou BChE) et le contrôle positif utilisé est le galantamine. L'absorbance de toutes les solutions préparées est prise à 405 nm après 10 min d'incubation à 25°C. La capacité inhibitrice du cholinestérase est calculée selon la formule de calcul d'inhibition :

$$\text{Activité d'inhibition (\%)} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

$A_0$ : Absorbance du contrôle.

$A_1$ : Absorbance de l'extrait/standard.

### V-6.2.2 Activité Inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase

#### V-6.2.2.1 Principe

Les  $\alpha$ -amylases sont des enzymes à action endo qui catalysent l'hydrolyse initiale de l'amidon en oligosaccharides plus courts par le clivage des liaisons internes  $\alpha$ -D-1,4-glycosidiques, donnant des oligosaccharides de longueur de chaîne variable, qui constituent un mélange de maltose, de maltotriose et d'oligosaccharides ramifiés de six à huit unités de glucose qui contiennent à la fois des liaisons  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6 [35]. Il existe plusieurs méthodes qui utilisent différentes techniques pour mesurer l'activité de  $\alpha$ -amylase, parmi lesquelles la méthode basée sur la spectroscopie utilisant l'amidon-iodé, qui évalue la quantité d'amidon consommée dans une réaction en quantifiant l'amidon n'ayant pas réagi dans le milieu d'essai.

La méthode iodométrique est largement utilisée pour déterminer l'activité de l' $\alpha$ -amylase [36]. Dans cette méthode, une combinaison de solution d'iode ( $I_2$ )-iodure de



potassium (KI) est utilisée pour former le complexe amidon-I<sub>2</sub> de couleur bleu foncé. La couleur bleu foncé résulte de l'inclusion du complexe I<sub>2</sub> et tri-iodure (I<sub>3</sub><sup>-</sup>) dans la structure de l'hélice d'amylose.

Lorsque l'amidon ou l'amylose est soumis à l'action des α-amylases, la taille de la chaîne amylose diminue, ce qui diminue par conséquent la taille du complexe amidon-I<sub>2</sub> et l'intensité bleue du complexe [37-36].

La procédure de recherche des concentrations d'inhibitrices de l'α-amylase dépend du degré d'activité de l'α-amylase résultant du pouvoir de coloration à l'iode en présence/absence d'un inhibiteur de l'action enzymatique, sur l'amidon soluble ou en utilisant un brun réactif alcalin dont les produits de réduction sont déterminés spectrophotométriquement [39].

#### V-6.2.2.2 Mise en œuvre pratique

L'activité inhibitrice de l'α-amylase a été déterminée selon la méthode Caraway-Somogyi iode/potassium iodide (IKI) décrite par Savran et *al.* [40]. Dans une microplaque à 96 puits; 25 µl de solution d'échantillon et 50 µl de solution d'α-amylase dans du tampon phosphate (pH 6,9 avec 6 mM de chlorure de sodium) sont mélangés. Le mélange est incubé pendant 10 min à 37 °C. Ensuite, 50 µl de solution d'amidon (0.05%) est ajouté pour démarrer la réaction. Une solution à blanc est préparée sans addition de solution d'α-amylase et le contrôle positif utilisé est l'acarbose. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, la réaction est stoppée avec 25 µl de HCl (1 M), après 100 µl de solution d'iodure de potassium iodide est ajoutée et l'absorbance de toutes les solutions préparées est prise à 630 nm. L'activité inhibitrice de l'α-amylase a été calculée en utilisant la formule :

$$\text{Activité d'inhibition (\%)} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

A<sub>0</sub>: Absorbance du contrôle.

A<sub>1</sub>: Absorbance de l'extrait/standard.

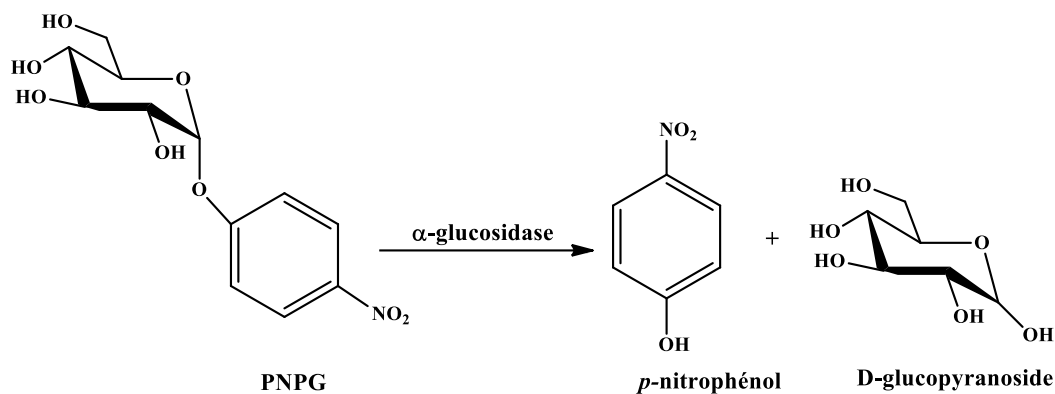
#### V-6.2.3 Activité inhibitrice de l'α-glucosidase

##### V-6.2.3.1 Principe

L'α-glucosidase est une enzyme liée à la membrane qui repose sur les cellules intestinales et catalyse la dernière étape de la digestion des carbohydrates pour libérer du glucose libre, provoquant une hyperglycémie postprandiale. Les inhibiteurs de l'α-glucosidase

peuvent être utilisés pour contrôler ce problème et pour traiter les patients qui souffrent d'obésité [41].

L'activité de la  $\alpha$ -glucosidase a été mesurée par la libération de *p*-nitrophénol à partir de  $\alpha$ -PNPG (4-nitrophényl  $\beta$ -D-glucopyranoside) (Figure V-8). Le *p*-nitrophénol jaune libéré a été lu à 400 nm dans un spectrophotomètre [42].



**Figure V-8** : Réaction catalysée par l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase

#### V-6.2.3.2 Mise en œuvre pratique

La capacité des extraits à inhiber l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase est évaluée selon la méthode décrite par Palanisamy et *al.* [43]. Dans une microplaque à 96 puits, 50  $\mu$ l de l'extrait sont mélangés avec 50  $\mu$ l de 4-nitrophényl  $\beta$ -D-glucopyranoside (PNPG), 50  $\mu$ l de solution d' $\alpha$ -glucosidase préparé dans un tampon phosphate (pH 6,8) et 50  $\mu$ l de glutathion. Le blanc est préparé sans ajout d'enzyme. Après incubation à 37°C pendant 10 min, on termine la réaction par l'addition de 50  $\mu$ l de carbonate de sodium. L'acarbose est utilisé contrôle positif et l'absorbance de toutes les solutions préparées est prise à 405 nm. L'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase est calculée selon la formule :

$$\text{Activité d'inhibition (\%)} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

$A_0$ : Absorbance du contrôle.

$A_1$ : Absorbance de l'extrait/standard.

#### V-6.2.4 Activité inhibitrice de la tyrosinase

##### V-6.2.4.1 Principe

La tyrosinase (polyphénoloxydase, E.C. 1.14.18.1) est une enzyme contenant du cuivre qui catalyse deux réactions distinctes, impliquant de l'oxygène moléculaire avec divers

substrats phénoliques: l'ortho-hydroxylation de la tyrosine (mono-phénol) en L-3,4-dihydroxyphénylalanine ou L-DOPA (*O*-diphénol) appelée activité monophénolase et l'oxydation du L-DOPA en dopaquinone (*O*-quinones) appelée activité diphénolase. Dans la biosynthèse l'*O*-dopaquinone qui est spontanément cyclé sous forme de leucodopachrome et rapidement converti en dopachrome, qui polymérise et forme de la mélanine [44].

En raison du rôle critique de la tyrosinase dans le processus de mélanogénèse et de brunissement, plusieurs études ont été rapportées pour l'identification de l'inhibiteur de la tyrosinase à partir de sources naturelles et synthétiques jusqu'à présent. De manière générale, les inhibiteurs de la tyrosinase sont examinés en présence d'un substrat monophénolique tel que la tyrosine ou un substrat diphénolique tel que la L-DOPA, et l'activité est évaluée sur la base de la formation de dopachrome qui donne un complexe rose détecté en spectrophotomètre à 492 nm [45].

#### V-6.2.4.2 Mise en œuvre pratique

La capacité des extraits à inhiber l'enzyme tyrosinase est déterminée selon la méthode du dopachrome en utilisant la L-DOPA comme substrat avec quelques modifications [34].

Dans une microplaque à 96 puits, 25 µl de l'extrait sont mélangés avec 40 µl de solution de tyrosinase et 100 µl de tampon phosphate (pH 6,8) sont mélangés. Après incubation pendant 15 min à 25°C. Ensuite, la réaction commence avec l'addition de 40 µl de L-DOPA. Le blanc est préparé sans addition de solution d'enzyme tyrosinase et l'acide kojique est utilisé comme contrôle positif. Après incubation à 25°C pendant 10 min, l'absorbance de toutes les solutions préparées est prise à 492 nm et l'activité inhibitrice de la tyrosinase est calculée selon la formule.

$$\text{Activité d'inhibition (\%)} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

$A_0$ : Absorbance du contrôle.

$A_1$ : Absorbance de l'extrait/standard.

#### V-7 Evaluation statistique

Les courbes sont tracées par le logiciel Microsoft Excel 2007. Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type,  $n = 3$ . Les valeurs de  $CI_{50}$  (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe (inhibition en fonction de la concentration  $I\% = f [C]$ ).

**Référence bibliographique**

- [1] Alzorqi, I., Ketabchi, M. R., Sudheer, S., & Manickam, S. (2016). Optimization of ultrasound induced emulsification on the formulation of palm-olein based nanoemulsions for the incorporation of antioxidant  $\beta$ -d-glucan polysaccharides. *Ultrasonics sonochemistry*, 31, 71-84.
- [2] Ebringerová, A., & Hromádková, Z. (2010). An overview on the application of ultrasound in extraction, separation and purification of plant polysaccharides. *Central European Journal of Chemistry*, 8(2), 243-257.
- [3] Chamorro, E. R., Zambón, S. N., Morales, W. G., Sequeira, A. F., & Velasco, G. A. (2012). Study of the chemical composition of essential oils by gas chromatography. *Gas chromatography in plant science, wine technology, toxicology and some specific applications*, 1, 307-324.
- [4] El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. A., Casabianca, H., ... & Elaissari, A. (2015). Essential oils: from extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, 483(1-2), 220-243.
- [5] Sourmaghi, M. H. S., Kiaee, G., Golfakhrabadi, F., Jamalifar, H., & Khanavi, M. (2015). Comparison of essential oil composition and antimicrobial activity of *Coriandrum sativum* L. extracted by hydrodistillation and microwave-assisted hydrodistillation. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 2452-2457.
- [6] Baj, T., Sieniawska, E., Kowalski, R., Wesolowski, M., & Ulewicz-Magulska, B. (2015). Effectiveness of the deryng and clevenger-type apparatus in isolation of various types of components of essential oil from the *Mutelina purpurea* Thell. flowers. *Acta Pol. Pharm*, 72, 507-515.
- [7] Bhardwaj, K., Islam, M. T., Jayasena, V., Sharma, B., Sharma, S., Sharma, P., ... & Bhardwaj, P. (2020). Review on essential oils, chemical composition, extraction, and utilization of some conifers in Northwestern Himalayas. *Phytotherapy Research*, 34(11), 2889-2910.
- [8] Bhardwaj, K., Islam, M. T., Jayasena, V., Sharma, B., Sharma, S., Sharma, P., ... & Bhardwaj, P. (2020). Review on essential oils, chemical composition, extraction, and utilization of some conifers in Northwestern Himalayas. *Phytotherapy Research*, 34(11), 2889-2910.

- [9] Dohou, R., Yamni, K., Tahrouch, S., Hassani, L. I., Badoc, A., & Gmira, N. (2003). Screening phytochimique d'une endémique iberomarocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bulletin-Société de Pharmacie de Bordeaux*, 142(1/4), 61-78.
- [10] Merck, E. (1980). Révélateurs pour la chromatographie en couches minces et sur papier. E. Merck.
- [11] N'Guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G., Traoré, D., & Aké-Assi, L. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 6(1).
- [12] Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry*, 126(4), 1821-1835 ;
- [13] Collin, S., & Crouzet, J. (2011). *Polyphénols et procédés: transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire*. Lavoisier.
- [14] Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture*, 28(1), 49-55.
- [15] Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Legret, P. (1994). Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *Journal de pharmacie de Belgique*, 49(6), 462-468.
- [16] Galanakis, C. M. (Ed.). (2018). Polyphenols: properties, recovery, and applications. *Wood head Publishing*.
- [17] Caponio, F., Alloggio, V., & Gomes, T. (1999). Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*, 64(2), 203-209.
- [18] Bouchonnet, S. (2009). *La spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse*. Lavoisier.
- [19] Lakshmi Hima Bindu, M.R., & Gopinath, C. (2013). A review on GC-MS and method development and validation. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, 4(03), 42-51.
- [20] Keravis, G. (1997). Spectrométrie de masse et chromatographie dans l'analyse des plantes aromatiques et huiles essentielles. *Proceedings of the Intern. Congr. Arom. Medicinal Plants & Essential Oils*, 379-384.

- [21] Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(6), 435-448.
- [22] Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry* (Vol. 456). Carol Stream, IL: Allured publishing corporation.
- [23] Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- [24] Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337-341.
- [25] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Esin Karademir, S., & Erçağ, E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International journal of food sciences and nutrition*, 57(5-6), 292-304.
- [26] Özyürek, M., Güçlü, K., Tütem, E., Başkan, K. S., Erçağ, E., Celik, S. E., ... & Apak, R. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical methods*, 3(11), 2439-2453.
- [27] Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302. ,
- [28] Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of toxicology*, 94(3), 651-715.
- [29] 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 radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- [30] Roginsky, V., & Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food chemistry*, 92(2), 235-254.
- [31] Zhong, Y., & Shahidi, F. (2015). Methods for the assessment of antioxidant activity in foods1. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, 287.

- [32] Sarikurkcü, C. (2011). Antioxidant activities of solvent extracts from endemic *Cyclamen mirabile* Hildebr. tubers and leaves. *African Journal of Biotechnology*, 10(5), 831-839.
- [33] Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Zaitoun, S. Y. A., & Qasem, I. B. (2014). In-vitro screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the treatment of Alzheimer's disease. *Functional Foods in Health and Disease*, 4(9), 381-400.
- [34] Mocan, A., Zengin, G., Simirgiotis, M., Schafberg, M., Mollica, A., Vodnar, D. C., Crişan, G. & Rohn, S. (2017). Functional constituents of wild and cultivated Goji (*L. barbarum* L.) leaves: phytochemical characterization, biological profile, and computational studies. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 32(1), 153-168.
- [35] Souza, P. M. D. (2010). Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry-A review. *Brazilian journal of microbiology*, 41(4), 850-861.
- [36] Visvanathan, R., Qader, M., Jayathilake, C., Jayawardana, B. C., Liyanage, R., & Sivakanesan, R. (2020). Critical review on conventional spectroscopic  $\alpha$ -amylase activity detection methods: merits, demerits, and future prospects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(7), 2836-2847.
- [37] Huggins, C., & Russell, P. S. (1948). Colorimetric determination of amylase. *Annals of surgery*, 128(4), 668,
- [38] Fuwa, H. (1954). A new method for microdetermination CF amylase activity by the use of amylose as the substrate. *The journal of Biochemistry*, 41(5), 583-603.
- [39] Shah, S. B., Sartaj, L., & Ali, F. (2018). Plant extracts are the potential inhibitors of  $\alpha$ -amylase: A review. *MOJ Bioequivalence & Bioavailability*, 5(5), 270-3.
- [40] Savran, A., Zengin, G., Aktumsek, A., Mocan, A., Glamočlija, J., Ćirić, A., & Soković, M. (2016). Phenolic compounds and biological effects of edible *Rumex scutatus* and *Pseudosempervivum sempervivum*: potential sources of natural agents with health benefits. *Food & function*, 7(7), 3252-3262.
- [41] Ata, A., Naz, S., & Elias, E. M. (2011). Naturally occurring enzyme inhibitors and their pharmaceutical applications. *Pure and Applied Chemistry*, 83(9), 1741-1749.
- [42] Christianty, F. M., Holidah, D., & Yasmin, Y. (2017). In vitro alfa-glucosidase inhibitory activity of various tea (*Camellia sinensis* L.) extracts. *UNEJ e-Proceeding*, 104-107.

- [43] Palanisamy, U., Manaharan, T., Teng, L. L., Radhakrishnan, A. K., Subramaniam, T., & Masilamani, T. (2011). Rambutan rind in the management of hyperglycemia. *Food Research International*, 44(7), 2278-2282.
- [44] Souza, P. M., Elias, S. T., Simeoni, L. A., de Paula, J. E., Gomes, S. M., Guerra, E. N. S., & Magalhaes, P. O. (2012). Plants from Brazilian Cerrado with potent tyrosinase inhibitory activity. *PLoS One*, 7(11).
- [45] Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M. T., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., & Saboury, A. A. (2019). A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 279-309.



## *PARTIE 02*

### *CHAPITRE VI*

#### *Résultats et discussion*

## VI-1 Enquête ethnobotanique

L'enquête ethnobotanique a été basée sur une série de questions à l'aide d'une fiche d'enquête (**Annexe-1**), remplis par interrogation orale soumise aux habitants de deux régions citées.

L'ensemble des résultats d'enquête est reportés dans les tableaux (**VI-1** et **VI-2**), selon le sexe et l'âge des personnes interrogées, les pratiques thérapeutiques et la partie utilisée de la plante.

**Tableau VI-1** : Utilisation de la plante *Clematis cirrhosa* L. par les habitants de Souk Ahras

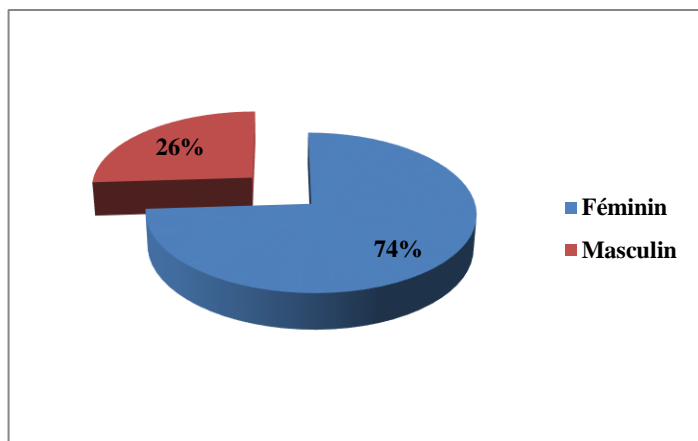
Région de Souk Ahras			
Sexe et âge	Utilisation des différents tissus de la plante		
	Feuille	Fleurs	Racine
Masculin (30-50 ans)	Rhumatisme-décoction	Rhumatisme-décoction	/
	Diurétique-infusion	Diurétique-infusion	
Masculin (50-60 ans)	Rhumatisme-décoction	Rhumatisme-décoction	/
Masculin (60-85ans)	Nerf sciatique-fraîche	Nerf sciatique-fraîche	Brûlure-cataplasme
	Rhumatisme-décoction	Rhumatisme-décoction	
Féminin (45-60 ans)	Nerf sciatique-fraîche	Nerf sciatique-fraîche	/
	Diurétique-infusion	Diurétique-infusion	
Féminin (60-85ans)	Nerf sciatique-fraîche	Nerf sciatique-fraîche	Brûlure-cataplasme
	Rhumatisme-décoction	Rhumatisme-décoction	
	Diurétique-infusion	Diurétique-infusion	

**Tableau VI-2 :** Utilisation de la plante *Clematis cirrhosa* L. par les habitants d'Annaba

Région d'Annaba			
Sexe et age	Utilisation des différents tissus de la plante		
	Feuille	Fleurs	Racine
Masculin (30-50 ans)	/	/	/
Masculin (50-60 ans)	Diurétique-infusion	Diurétique-infusion	/
	Nerf sciatique-fraîche	Nerf sciatique-fraîche	
Masculin (60-85ans)	Rhumatisme-décoction	Rhumatisme-décoction	/
	Diurétique-infusion	Diurétique-infusion	
	Rhumatisme-décoction	Rhumatisme-décoction	
Féminin (45-60 ans)	Nerf sciatique-fraîche	Nerf sciatique-fraîche	/
	Diurétique-infusion	Diurétique-infusion	
	Nerf sciatique-fraîche	Nerf sciatique-fraîche	
Féminin (60-85ans)	Rhumatisme-décoction	Rhumatisme-décoction	Brûlure-cataplasme
	Diurétique-infusion	Diurétique-infusion	

### VI-1.1 Utilisation de *Clematis cirrhosa* L. selon le sexe

Dans les deux régions étudiées, l'utilisation de la *Clematis cirrhosa* L. varie selon le sexe. Les réponses aux questionnaires montrent que la majorité des utilisateurs de notre plante sont des femmes avec un pourcentage de (74%). Alors que pour les hommes le pourcentage d'utilisation est de 26%, ce qui est en accord avec les travaux [1], qui ont montré que les femmes sont plus détenteuses de savoirs phytothérapeutiques traditionnels.

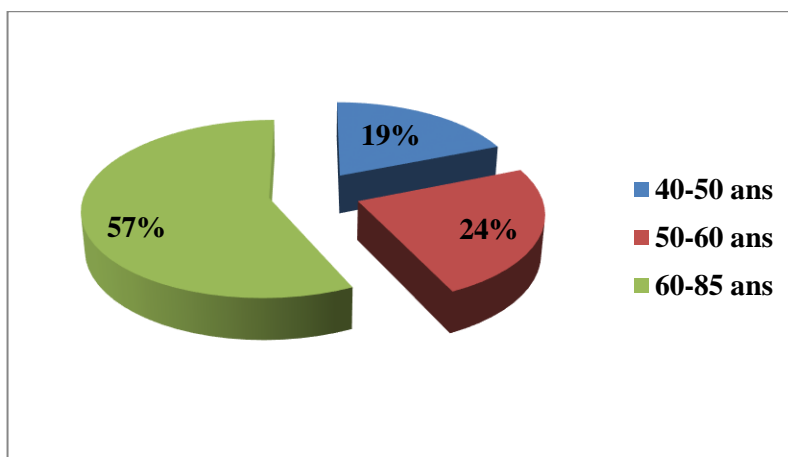


**Figure VI-1 :** Pourcentage d'utilisation de *Clematis cirrhosa* L. selon le sexe

### VI-1.2 Utilisation de *Clematis cirrhosa* L. selon l'âge

Les résultats montrent que quelque soit la tranche d'âge (40-50 ans, 50-60 ans, 60-85 ans) la *Clematis cirrhosa* L. présente l'intérêt des habitants des deux régions et elle est beaucoup plus utilisée par la tranche d'âge (60-85 ans) avec un pourcentage (57%).

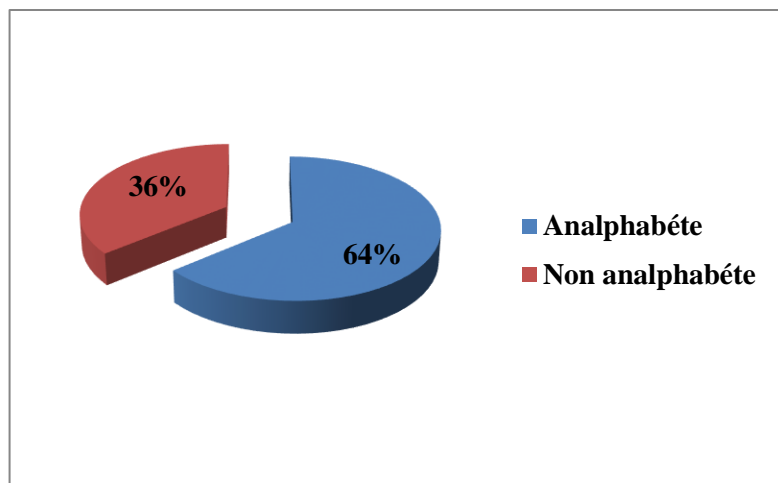
Dans notre enquête les habitants des deux régions ayant l'âge inférieur à 40 ans n'ont pas d'informations sur l'utilisation des plantes médicinales en particulier la *Clematis cirrhosa* L. Les gens inférieurs à 40 ans ne croient pas aux traitements par les plantes médicinales.



**Figure VI-2 :** Pourcentage d'utilisation de *Clematis cirrhosa* L. selon l'âge

### VI-1.3 Utilisation de *Clematis cirrhosa* L. le niveau d'étude

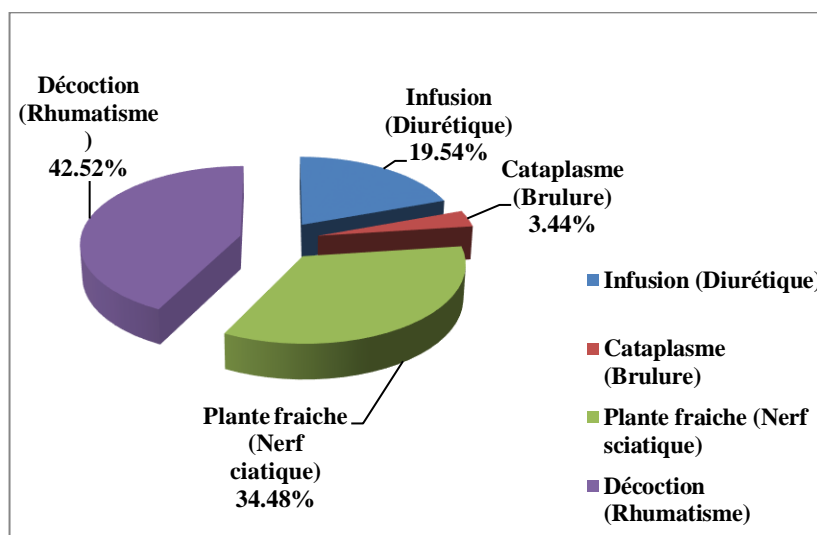
Dans les deux régions étudiées la grande majorité (64%) des utilisateurs de *Clematis cirrhosa* L. comme plante médicinale sont des analphabètes.



**Figure VI-3 :** Pourcentage d'utilisation de *Clematis cirrhosa* L. selon le niveau d'étude

#### VI-1.4 Utilisation de *Clematis cirrhosa* L. selon le mode d'utilisation et la maladie traitée

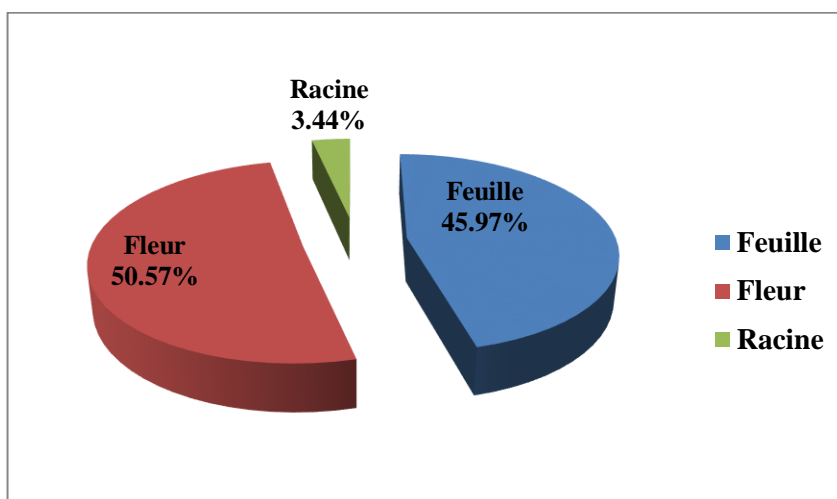
D'après les résultats obtenues nous pouvons déduire que (42.52%) de la population de deux régions utilise la *Clematis cirrhosa* L. en décoction pour le traitement des maladies rhumatismales, 34.48% de la population de deux régions utilise la plante *Clematis cirrhosa* L. fraîche pour le traitement du nerf sciatique, (19.54%) de la population de deux régions utilise la *Clematis cirrhosa* L. en infusion comme un agent diurétique, alors que (3.44%) de la population de deux régions utilise la *Clematis cirrhosa* L. en cataplasme pour le traitement des brûlures.



**Figure VI-4 :** Pourcentage d'utilisation de *Clematis cirrhosa* L. selon le mode d'utilisation et la maladie traitée

### VI-1.5 Utilisation de *Clematis cirrhosa* L. selon la partie utilisée

D'après les résultats obtenus (50.57%) utilisent les feuilles de la *Clematis cirrhosa* L. pour se soigner alors que (45.97%) utilisent les fleurs de la *Clematis cirrhosa* L. pour se soigner. Le pourcentage d'utilisation des racines pour se soigner est (3.44%). On peut conclure que l'utilisation des feuilles et des fleurs pour se soigner par la population des deux régions est à peu près le même.



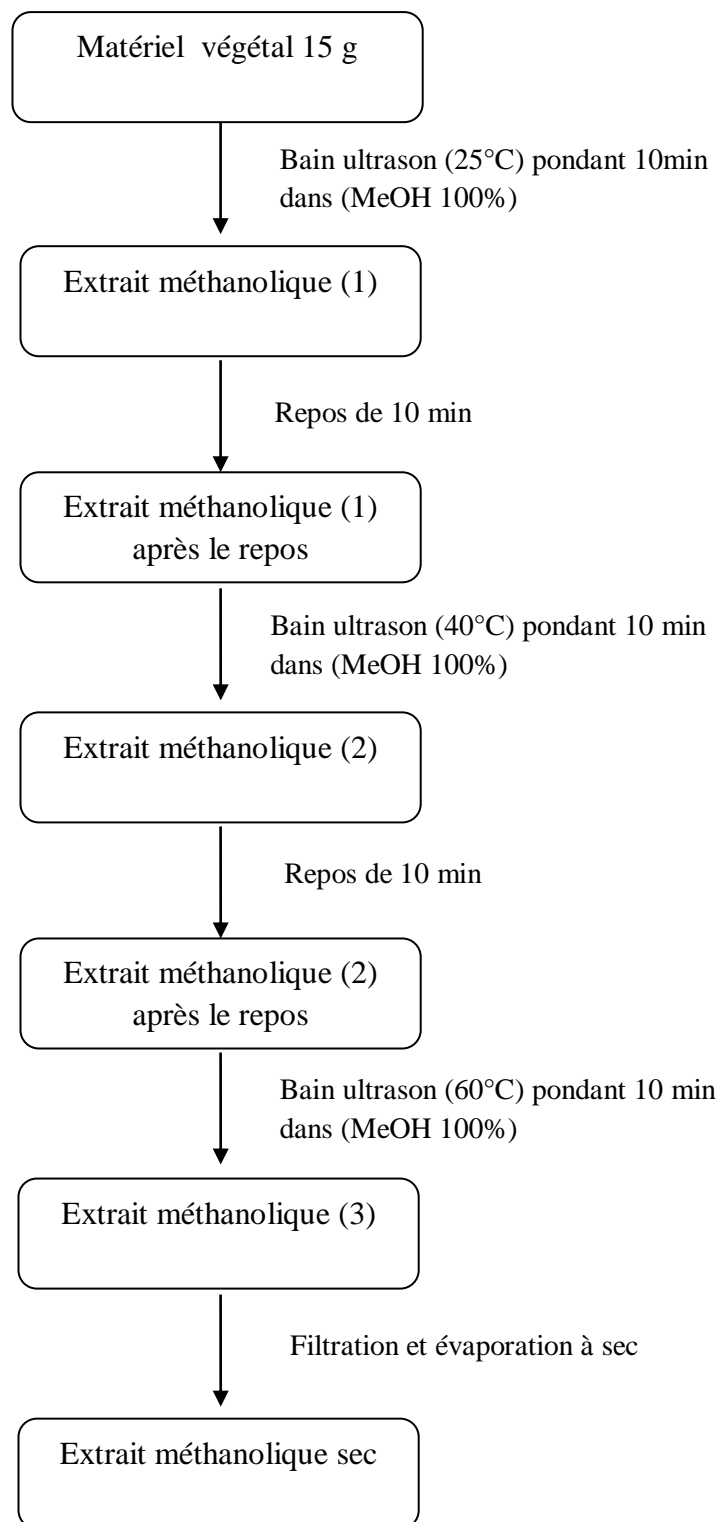
**Figure VI-5 :** Pourcentage d'utilisation de *Clematis cirrhosa* L. selon partie utilisée

L'étude ethnobotanique menée auprès de la population des deux régions nous oriente à travailler sur la partie aérienne entière de la plante.

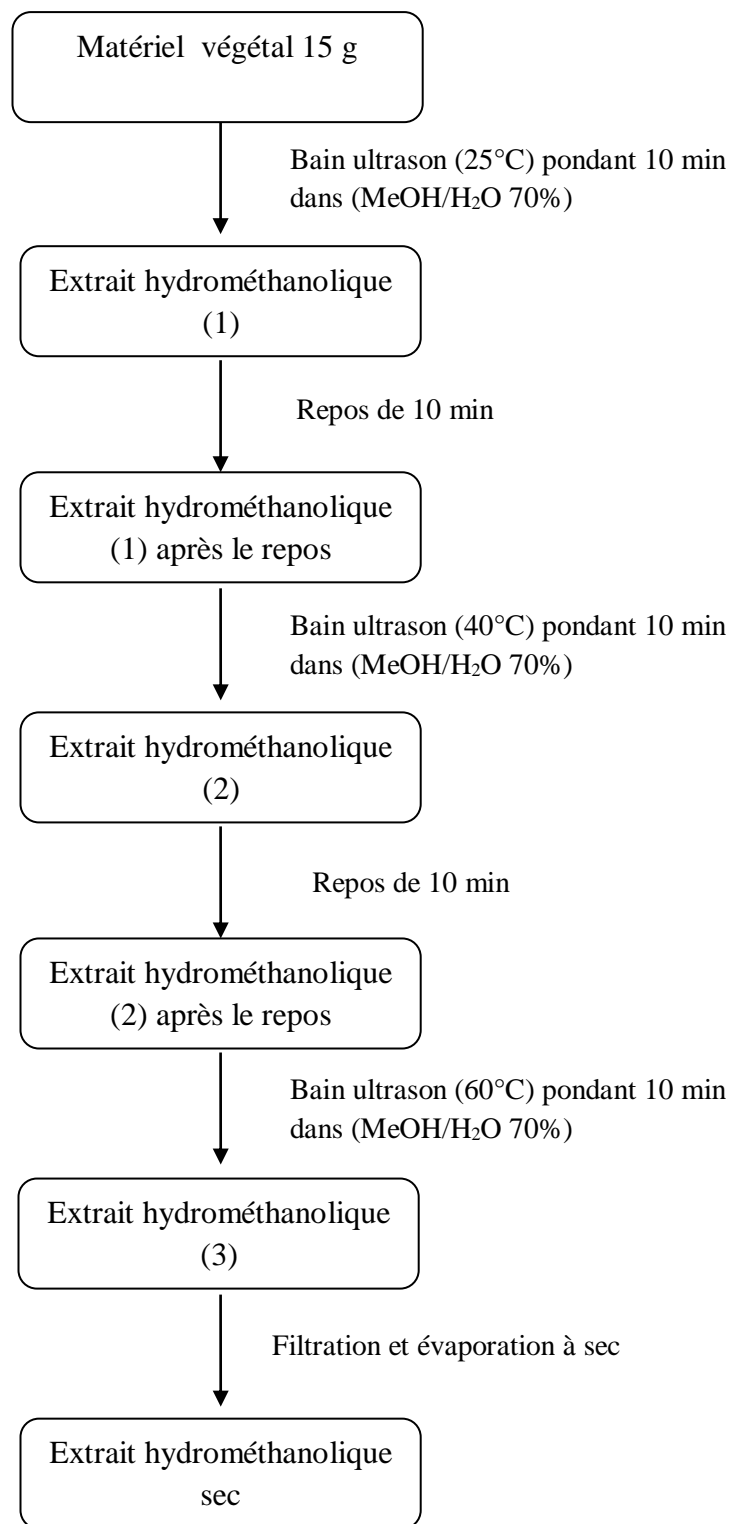
## VI-2 Résultats de l'extraction

### VI-2.1 Extraction de la matière végétale par l'ultrason

Une pesée de 15 g de la poudre de la plante a été mise, dans deux solvants différents : le méthanol (100%) et le méthanol/H<sub>2</sub>O v/v (70%), dans un bain à ultrason. La procédure de l'extraction a été réalisée en trois étapes intervalles par un repos de 10 min. et la température allant de 25°C jusqu'à 60°C, les extraits obtenus sont filtrés et évaporés sous pression réduite et à une température comprise entre 40 et 60°C, pour obtenir des extraits secs. Le protocole de l'extraction par les deux solvants est représenté par les Figures (VI-6) et (VI-7).



**Figure VI-6 :** Protocole de l'extraction de la matière végétale par le solvant : méthanol



**Figure VI.7 :** Protocole de l'extraction de la matière végétale par le solvant : méthanol/H<sub>2</sub>O v/v (70%)



## VI-2.2 Extraction des huiles essentielles des parties aériennes

Une pesée de 600g des parties aériennes de la plante *Clematis cirrhosa* L. a été mise dans un hydrodistillateur à donner 97.4 mg d'huile essentielle de couleur jaune et d'odeur piquante caractéristique Figure VI-8 dont le rendement est 0.016%



Figure VI-8 : Huile essentielle de *Clematis cirrhosa* L.

## VI-3 Screening phytochimique

### VI-3.1 Analyse qualitative par Chromatographie sur couche mince (CCM)

Le screening phytochimique est une analyse qualitative, qui nous permet de mettre en évidence les différentes classes de métabolites secondaires, que contiennent les extraits préparés à partir de la partie aérienne de *Clematis cirrhosa* L. La détection de ces composés chimiques est basée sur des tests chromatographiques qui donnent après révélation des couleurs spécifiques pour chaque groupe de métabolite secondaire. Les résultats sont récapitulés dans le Tableau VI-3.

Tableau VI.3 : Screening phytochimique de la partie aérienne de la plante *Clematis cirrhosa*L.

Groupe chimique	Alcaloïdes	Tannins	Flavonoïdes	Terpènes et stérols	Phénols totaux	Saponines
Partie aérienne de plante	-	+	+	+	+	-

- : non détecté, + : présence

Les résultats du criblage phytochimique montrent une forte présence des phénols totaux, des tanins, des flavonoïdes, des terpènes et stérols et notons l'absence totale des alcaloïdes. Ce qui est en accord avec les précédentes études phytochimiques effectuées sur les espèces du genre *Clematis* [2-5], où le criblage phytochimique préliminaire des extraits en gradient de feuilles de *Clematis longicauda* et *Clematis burgensis* a révélé la présence de saponines et de flavonoïdes et l'absence des alcaloïdes.

### VI-3.2 Résultats d'analyses quantitatives des composés phénoliques

#### VI-3.2.1 Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux, des deux extraits de la plante étudiée, a été évalué par la méthode Folin-Ciocalteu. Les teneurs en polyphénols totaux ont été calculées à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Figure VI-9), et les valeurs sont exprimées en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g ES).

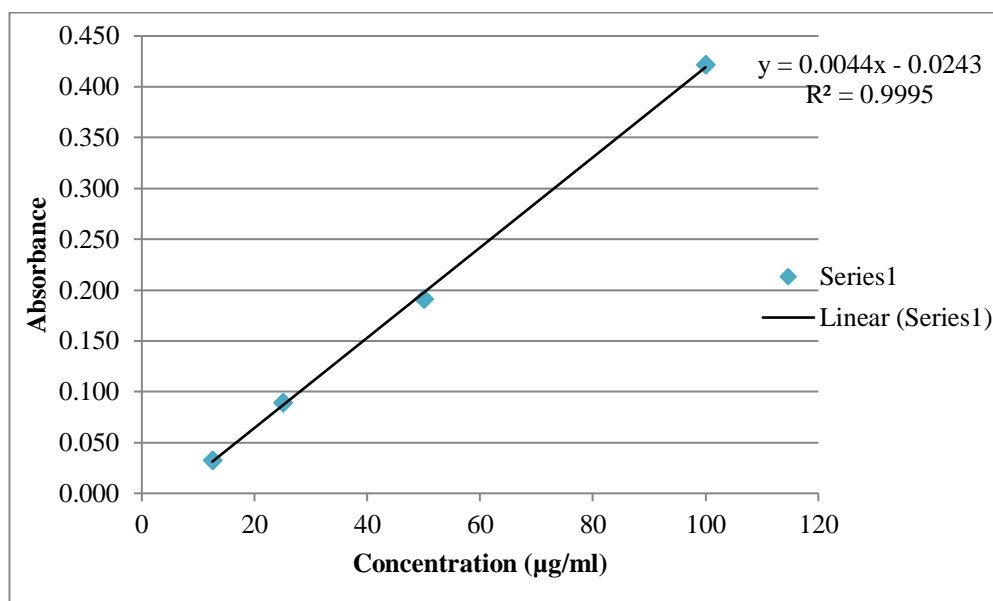


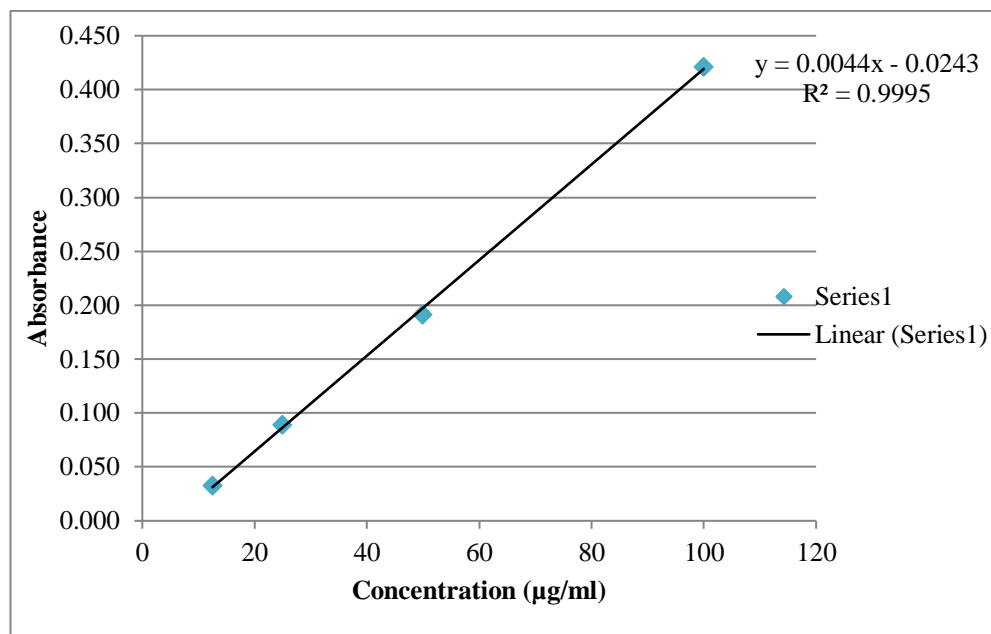
Figure VI-9 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les concentrations des polyphénols totaux des extraits étudiés sont rapportées dans le Tableau VI-4.

#### VI-3.2.2 Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ). L'addition du trichlorure d'aluminium aux extraits conduit à la formation

d'un complexe jaune verdâtre, l'intensité de cette coloration est en fonction de la concentration des flavonoïdes contenues dans les extraits. La quantité de flavonoïdes est déterminée à l'aide de l'équation de régression (Figure VI-10), et les valeurs sont indiquées en microgramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait sec ( $\mu\text{g EQ/g ES}$ ).



**Figure VI-10 :** Courbe d'étalonnage de la quercétine

Le tableau VI-4 regroupe les résultats des teneurs en poly phénols totaux et flavonoïdes totaux des deux extraits de *Clematis cirrhosa* L.

**Tableau VI-4 :** Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des deux extraits de *Clematis cirrhosa* L.

Extrait	PT (mg EAG/g ES)	FT ( $\mu\text{g EQ/g ES}$ )
<i>Clematis Cirrhosa</i> L. MeOH (100%)	$84.05 \pm 0.80$	$114.60 \pm 2.42$
<i>Clematis Cirrhosa</i> L. MeOH/H <sub>2</sub> O (70%)	$76.20 \pm 1.61$	$49.67 \pm 1.44$

**PT:** Polyphénols totaux, **FT:** Flavonoïdes totaux, **EAG:** Equivalent acide gallique

**EQ:** Equivalent quercétine, **ES:** Extrait sec

Les résultats révèlent que, les deux extraits sont riches en composés phénoliques où l'extrait méthanolique donne une teneur élevée de ( $84.05 \pm 0.80$  mg EAG/g ES) en comparaison avec l'extrait hydrométhanolique ( $76.20 \pm 1.61$  mg EAG/g ES).

D'après ces résultats, on peut constater que le méthanol est le solvant organique approprié pour extraire les polyphénols des parties aérienne de la plante *Clematis cirrhosa* L. ce qui est en bon conformité avec les études apportées par Mostafa et *al.* [6]; la teneur en polyphénols totaux de l'espèce *Clematis brachiata* est de : (135,11 mg/g, 178 mg/g et 64,88 mg/g d'équivalents d'acide gallique par gramme de matière sèche pour l'extrait de l'acétone, l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux respectivement. La teneur en polyphénols totaux la plus élevée a été enregistrée pour l'extrait méthanolique tandis que la teneur la plus faible a été trouvée pour l'extrait aqueux.

Les extraits bruts des plantes contiennent des mélanges complexes de certaines classes de phénols, qui sont sélectivement solubles dans les différents solvants. En ce sens, la polarité du solvant utilisé joue un rôle clé dans l'augmentation de la solubilité des polyphénols et par conséquent dans la concentration des polyphénols [7].

L'extraction des poly phénols à partir du matériel végétal est aussi influencée par la durée de l'extraction, le ratio du solvant à l'échantillon, la taille des particules de l'échantillon et les conditions de préparation de l'échantillon. Par conséquent, il est très difficile de développer un procédé d'extraction approprié pour l'extraction de tous les composés phénoliques de la plante [8, 9].

Les résultats obtenues montrent que, nos deux extraits contiennent des teneurs variables en flavonoïdes, aussi nous avons noté que la teneur la plus élevée des flavonoïdes est obtenue avec l'extrait méthanolique ( $114.60 \pm 2.42$   $\mu\text{g EQ/g ES}$ ). Ces résultats sont en conformité avec ceux obtenus par Morankar et *al.* [10], qui ont mis en évidence l'efficacité du méthanol dans l'extraction des flavonoïdes de la plante *Clematis heyneir* par rapport à l'acétate d'éthyle, le chloroforme et l'eau, les flavonoïdes totaux de l'extraits méthanolique et l'extrait aqueux ont montré les valeurs de teneur de 1.371 mg EQ/100 mg, 0.723 mg EQ/100 mg respectivement, alors que l'extrait de l'acétate d'éthyle et l'extrait de chloroforme n'ont pas de flavonoïdes totaux.

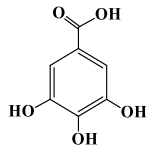
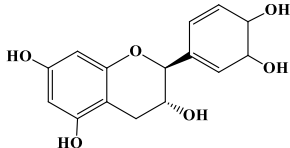
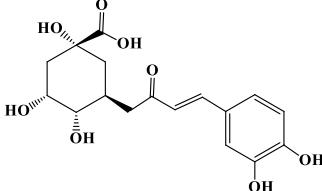
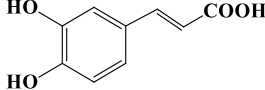
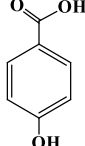
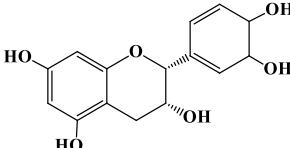
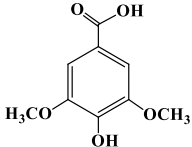
## VI-4 Analyses chromatographiques

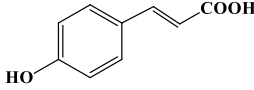
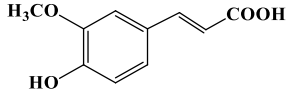
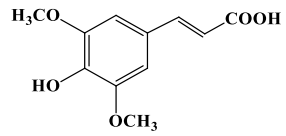
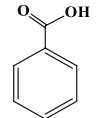
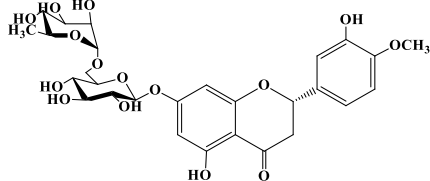
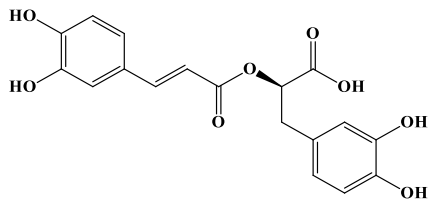
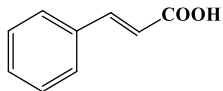
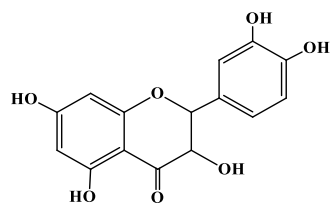
### VI-4.1 Identification de la composition phénolique par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC/DAD)

L'analyse qualitative et quantitative des composés phénoliques contenus dans les extraits de *Clematis cirrhosa* L. a été réalisée par la chromatographie liquide haute performance

couplée à un détecteur à barrette de diode (HPLC/DAD). Cette analyse a permis d'identifier des polyphénols représentant des teneurs différentes et qui correspondent pour la plupart aux standards injectés. En effet 15 standards phénoliques sont préparés avec quatre concentrations différentes. Toutes les courbes d'étalonnage sont linéaires avec un facteur de régression  $r^2 > 0,8867$ . L'identification des composés phénoliques présents dans les extraits est obtenue en comparant leurs spectres ultraviolets et leurs temps de rétentions (Tableau VI-5) avec ceux des composés correspondants.

**Tableau VI-5 :** Temps de rétention et structure chimique des standards phénoliques utilisés

Standards	Temps de rétention (min)	Structure chimique
Acide gallique	5.400	
Catéchine	12.430	
Acide Chlorogénique	15.745	
Acide Caféique	18.336	
Acide Hydroxybenzoïque	18.917	
Epicatechine	19.165	
Acide Syringique	21.250	

Acide Coumarique	26.385	
Acide Trans-Férulique	31.265	
Acide Sinapique	33.416	
Acide Benzoïque	38.571	
Hespéridine	54.719	
Acide Rosmarinique	59.326	
Acide Cinnamique	68.506	
Quercétine	71.045	

Les concentrations en composés phénoliques des extraits étudiés ont été calculées à partir des courbes d'étalonnage regroupées dans l'Annexe 2, et exprimées en  $\mu\text{g/g}$  d'extrait sec; les résultats sont résumés dans le Tableau VI-6.

**Tableau VI-6 :** Profil, temps de rétention et concentration des composés phénoliques des extraits de *Clematis cirrhosa* L.

N°	Composition phénolique	Concentration (µg/g ES)	
		Extrait méthanolique (100%)	Extrait Hydrométhanolique (70%)
(1)	Acide gallique	27.87	53.15
(2)	Catéchine	991.78	1194.77
(3)	Acide Chlorogénique	556.39	23.86
(4)	Acide Caféique	223.34	276.90
(5)	Acide Hydroxybenzoïque	1370.05	1348.06
(6)	Epicatéchine	164.71	243.88
(7)	Acide Syringique	23.53	43.30
/	Acide Coumarique	nd	nd
(8)	Acide Trans-Férulique	20.77	nd
/	Acide Sinapique	nd	nd
(9)	Acide Benzoïque	8867.73	8471.75
/	Hespéridine	nd	nd
/	Acide Rosmarinique	nd	nd
(10)	Acide Cinnamique	12.56	nd
/	Quercétine	nd	nd

**nd :** non détecté

Selon les résultats obtenus, on s'aperçoit que les deux extraits de *Clematis cirrhosa* L. ont la même composition phénolique, à l'exception de (8) acide trans-férulique et (10) acide

cinnamique qui ne sont détectés que dans l'extrait méthanolique, nous notons aussi une différence dans la teneur des composés détectés.

L'analyse de l'extrait méthanolique par HPLC/DAD a permis de mettre en évidence 10 composés phénoliques. Les principaux composés sont; **(9)** acide benzoïque (8867.73 µg/g ES), **(5)** acide hydroxybenzoïque (1370.05 µg/g ES), **(2)** catéchine (991.78 µg/g ES), **(3)** acide chlorogénique (556.39 µg/g ES) et **(4)** acide caféique (223.34 µg/g ES), tandis que **(6)** épicatechine, **(1)** acide gallique, **(7)** acide syringique, **(8)** acide trans-férulique et **(10)** acide cinnamique sont présents à faibles concentrations. Nous avons enregistré l'absence des composés suivants dans cet extrait, l'acide coumarique, l'acide sinapique, l'hespéridine, l'acide rosmarinique et la quercétine (Tableau **VI-6**).

Dans l'extrait hydrométhanolique, Nous avons enregistré la présence de 8 composés phénoliques où les composées majoritaires sont **(9)** acide benzoïque (8471.75µg/g ES), **(5)** acide hydroxybenzoïque (1370.05 µg/g ES), **(2)** catéchine (1194.77 µg/g ES), **(4)** acide caféique (276.90 µg/g ES) et **(6)** épicatechine (243.88 µg/g ES). Tandis que **(1)** acide gallique, **(7)** acide synergique et **(3)** acide chlorogénique sont présents à faible concentrations (Tableau **VI-6**).

De plus, on constate que les concentrations élevées en **(2)** catéchine, **(4)** acide caféique, **(6)** épicatechine, **(7)** acide syringique et **(1)** acide gallique sont obtenues à partir l'extrait hydrométhanolique, et les concentrations élevées en **(9)** acide benzoïque, **(5)** acide hydroxybenzoïque, acide **(3)** chlorogénique sont obtenues à partir l'extrait méthanolique.

En conséquence la quantité ainsi que la qualité des polyphénols des extraits dépendent de la polarité du solvant d'extraction utilisé, ces résultats sont confirmés par ceux obtenus par Karimi et *al.*[11], dans lesquels l'acide gallique a été obtenu à une quantité élevée dans la fraction d'hexane de *Clematis orientalis* (367 µg/g de matière sèche ) ainsi que dans la fraction acétate d'éthyle (373 µg/g de matière sèche ); et en faible quantité dans les extraits de chloroforme (144 et 225 µg/g matière sèche) respectivement. Alors que l'acide gallique n'a pas été détecté dans l'extrait de butanol de cette espèce.

#### **VI-4.2 Identification des constituants des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectrophotomètre de masse (GC/MS)**

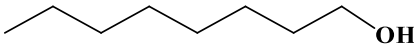
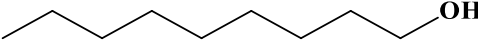
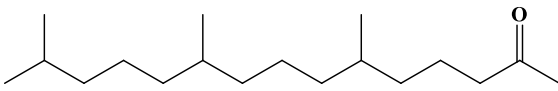
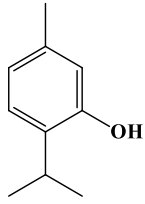
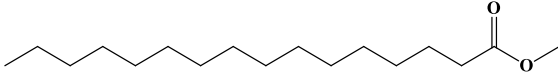
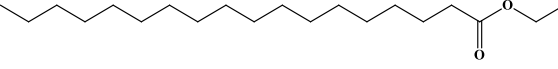
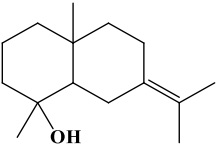
L'analyse de l'huile essentielle par GC et GC/MS nous a aboutis à identifier 12 composés : **(11)** octanol, **(12)** nonanol, **(13)** hexahydrofarnesyl acétone, **(14)** thymol, **(15)** ester

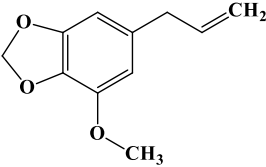
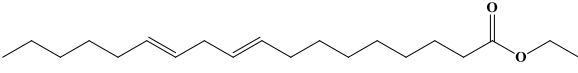
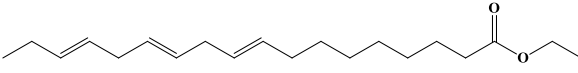
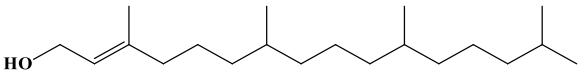
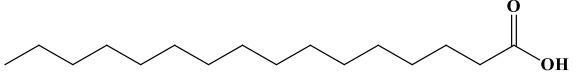


méthylque d'acide hexadecanoïque (ester méthylque d'acide palmitique), (16) ester éthylique d'acide hexadecanoïque (ester éthylique d'acide palmitique), (17) juniper camphor, (18) myristicine, (19) ester éthylique d'acide 9,12-octadecadienoïque (ester éthylique d'acide linoléique), (20) ester éthylique d'acide 9,12,15-octadecatrienoïque (ester éthylique d'acide linoléique), (21) phytol et (22) acide n-hexadecanoïque (acide palmitique) représentant 96.2% de cette essence.

Le Tableau VI-7 regroupe les composés identifiés, leurs structures chimiques, leurs indices de rétention (ir), et leurs abondances relatives en (%).

**Tableau VI-7 :** Analyse quantitative et qualitative de l'huile essentielle de *Clematis cirrhosa* L.

N°	Constituants	Structure chimique	ir*	(%)
(11)	Octanol		1556	2.6
(12)	Nonanol		1658	0.5
(13)	Hexahydrofarnesyl acétone		2134	8.1
(14)	Thymol		2196	2.7
(15)	Ester méthylque d'acide hexadecanoïque (Ester méthylque d'acide palmitique)		2222	0.9
(16)	Ester éthylique d'acide hexadecanoïque (Ester éthylique d'acide palmitique)		2256	1.4
(17)	Juniper Camphor		2260	14.5

(18)	Myristicine		2291	1.8
(19)	Ester éthylique d'acide 9,12-octadecadiénoïque (Ester méthylique d'acide linoléique)		2534	2.5
(20)	Ester éthylique d'acide 9,12,15-octadecatriénoïque (Ester éthylique d'acide linoléique)		2605	2.1
(21)	Phytol		2618	30.1
(22)	Acide n-hexadécanoïque (Acide palmitique)		2912	29.0
<b>Total</b>			<b>96.2</b>	

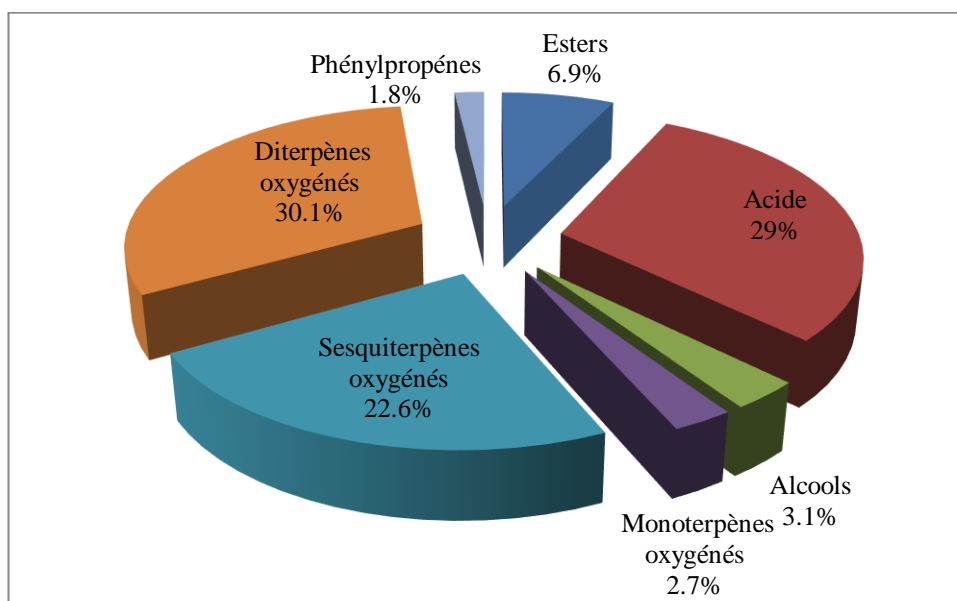
\* **Indice de Kovat:** (calculé sur la base des n-alcanes)

La composition chimique de notre huile essentielle extraite de la plante de *Clematis cirrhosa* L. est caractérisée par la présence de trois composés majoritaires : **(21)** phytol 30.1%, **(22)** acide palmitique 29%, **(17)** juniper camphor 14.5%), qui représentent 73.6% de la composition chimique de cette essence.

Le composé **(13)** hexahydrofarnesyl acétone a également été déterminé, comme constituant de l'huile, en quantité appréciable (8.1%). Les autres composés identifiés sont présents en teneur faible comme, **(14)** thymol (2.7%), **(11)** octanol (2.6%), **(19)** ester méthylique d'acide linoléique (2.5%), **(20)** ester éthylique d'acide linoléique (2.1%), **(18)** myristicine (1.8%), **(16)** ester éthylique d'acide palmitique (1.4%), **(15)** ester méthylique d'acide palmitique (0.9%) et **(12)** nonanol (0.5%).

Au vu de ces résultats, nous constatons que cette essence est constituée de (30.1%) de diterpènes oxygénés (**(21)** phytol), (29%) d'acide (**(22)** acide palmitique ), (22.6%) de sesquiterpènes oxygénés (**(17)** juniper camphor, **(13)** hexahydrofarnesyl acétone), (6.9%) d'esters (**(15)** ester méthylique d'acide palmitique, **(16)** ester éthylique d'acide palmitique, **(19)**

ester méthylique d'acide linoléique, (**20**) ester éthylique d'acide linoléique), (3.1%) d'alcools ((**11**) octanol, (**12**) nonanol) suivi par (2.7%) de monoterpènes oxygénés ((**14**) thymol), et enfin (1.8%) de phénylpropènes ((**18**) myristicine) (Figure VI-11).



**Figure VI-11** : Distribution des composants de l'huile essentielle de *Clematis cirrhosa* L.

L'étude antérieure menée par Tao et *al.* a identifié la composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *Clematis obscura*, et l'analyse GC/SM a mis en évidence la présence de 37 composés, parmi eux les principaux composés sont : l'acide hexadécanoïque (l'acide palmitique), l'ester méthylique d'acide 11,14,17-eicosatriénoïque, l'acide tétradécanoïque et l'ester méthylique hexadécanoïque (l'ester méthylique d'acide palmitique) [12].

Une étude effectuée sur l'huile essentielle de l'espèce *Clematis hexapetala*, a démontré que les principaux composants sont l'acide palmitique et le 3-hydroxy-4-méthoxyl benzaldéhyde [13].

La composition chimique de l'huile essentielle de *Clematis apiifolia* DC. est dominée par l'acide palmitique, l'acide octadécanoïque, phytol [14].

Zeng et *al.* ont réalisés une analyse comparative des composants volatils des espèces du genre *Clematis* poussant en Chine (*C. serratifolia* Rehder, *C. brevicaudata*, *C. fusca*, *C. hexapetala* Pall. et *C. Chinensis* Osbeck) ; les résultats ont bien montré que les aliphatiques étaient le principal groupe des constituants dans les cinq échantillons d'espèces de *Clematis* allant de 64.9 à 88.4%, qui étaient caractérisés par leurs teneurs élevée en acide n-hexadécanoïque (acide palmitique) et (Z,Z)-9,12-acide octadécadiénoïque, la quantité du premier variait de 26.3 à

39.5% et la seconde de 34.6 à 55.1%. La présence des monoterpènes étaient relativement faible, dont la quantité totale variaient de 0.3 à 6.0%, et ils représentaient 0.3 à 5.7% des monoterpènes oxygénés [15].

A notre connaissance l'extrait volatil de *Clematis cirrhosa* L. n'a fait l'objet d'aucune étude chimique préalable. Selon la littérature, les huiles essentielles des espèces du genre *Clematis* possèdent une grande variabilité en composition chimique.

Nos résultats s'accordent avec ceux décrits dans les travaux précédemment cités ci-dessus ; selon lesquels les espèces du genre *Clematis* renfermeraient en majorité l'acide palmitique comme un composant prédominant à l'exception du phytol qui a été trouvé en abondance (30.1%) dans l'huile essentielle de *Clematis cirrhosa* L.

La différence de composition dans de nombreux travaux est due probablement à diverses conditions notamment l'environnement, l'origine géographique, la période de récolte, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage et la méthode d'extraction

## VI-5 Activités biologiques

L'étude des activités biologiques des substances bioactives des plantes médicinales se trouve à la base des médecines dites alternatives, de nombreux procédés utilisés dans la conservation des produits alimentaires crus ou cuits, de substances actives exploitées dans les produits pharmaceutiques. La présente étude, s'intéresse particulièrement à l'activité antioxydante et l'activité inhibitrice d'enzymes de *Clematis cirrhosa* L.

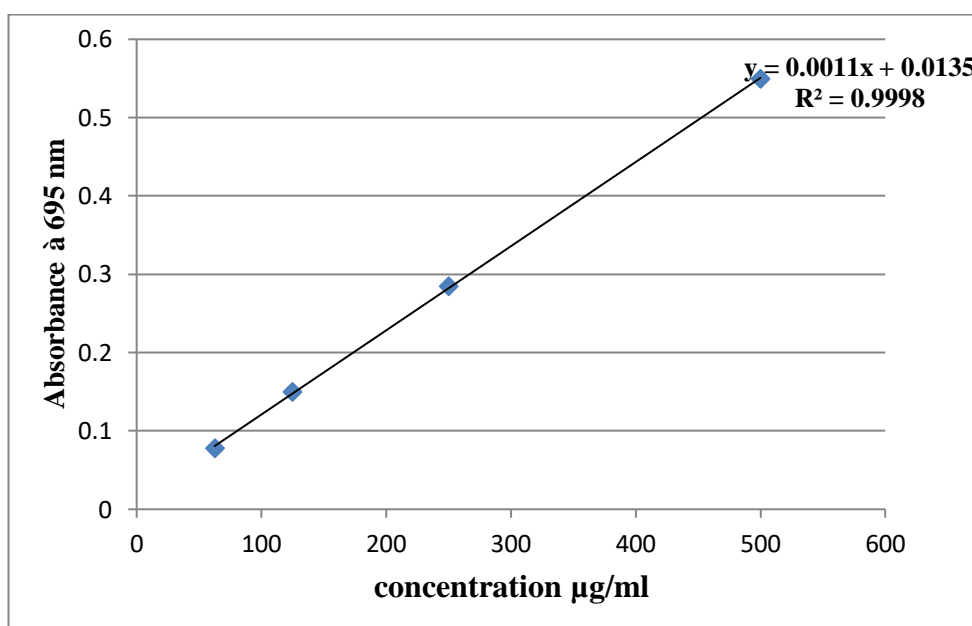
### VI-5.1 Activité antioxydante

L'activité et le mécanisme d'activité des composés antioxydants présents dans les extraits végétaux sont influencés par de nombreux facteurs ; précisément par la composition et les conditions du système d'essai. De nombreux auteurs ont souligné la nécessité de réaliser plus d'un type de mesure de l'activité antioxydante pour prendre en compte les différents mécanismes d'action antioxydante [16]. Par conséquent, divers tests sont effectués pour déterminer la capacité antioxydante *in vitro* des extraits et de l'huile essentielle de la plante *Clematis cirrhosa* L.

### VI-5.1.1 Capacité antioxydante totale (TAC)

La capacité antioxydante totale d'extrait méthanolique, hydrométhanolique 70%, et de l'huile essentielle est évaluée par la méthode de phosphomolybdène. Cette méthode est adoptée par un grand groupe de chercheurs, pour l'évaluation de la capacité antioxydante et est considérée comme l'une des méthodes les plus authentiques utilisées pour le TAC [17]. De plus c'est la méthode la plus simple et la moins coûteuse, qui permet d'évaluer à la fois les antioxydants hydro et liposolubles. Dans ce test et à pH acide, le molybdène Mo(VI) a été réduit par les antioxydants des extraits, pour donner un complexe vert de phosphate Mo(V) [18].

La capacité antioxydante de nos échantillons a été déterminée sur la base des valeurs d'absorbance des solutions en utilisant l'équation de régression de la courbe d'étalonnage d'acide ascorbique obtenue à différentes concentrations (50, 100, 200, 300, 400 et 500 µg/ml) (Figure VI-12).



**Figure VI-12 :** Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique en utilisant le test TAC.

Les valeurs de la capacité antioxydante sont exprimées en mg équivalents acide ascorbique par g d'extrait sec et les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau VI-12.

Ces résultats indiquent que la plante étudiée a une bonne capacité antioxydante totale; dont les valeurs varient entre  $138.64 \pm 1.29$  mg EAA/g ES pour l'extrait méthanolique,  $75.00 \pm$

2,57 mg EAA/g ES pour l'extrait hydrométhanolique et  $291.36 \pm 1.82$  mg EAA/g pour l'huile essentielle.

Il s'aperçoit clairement que l'huile essentielle a l'activité la plus élevée, tandis que l'extrait méthanolique a un effet TAC plus élevé par rapport à l'extrait hydrométhanolique. Nos résultats diffèrent de ceux décrits par Saidi et *al.* [19], selon lesquels l'extrait des feuilles méthanol/eau de l'espèce tunisienne *Clematis flammula* donne une meilleure capacité antioxydante totale avec une valeur de 642 mg d' $\alpha$ -tocophérol/g d'extrait et l'extraits méthanolique ainsi que l'extrait d'acétate d'éthyle révèlent une activité antioxydante totale comprise entre 175 mg d' $\alpha$ -tocophérol/g d'extrait de fleur et 239 mg d' $\alpha$ -tocophérol/g d'extrait des feuilles.

Plusieurs études attestent que, le pouvoir antioxydant des plantes médicinales est attribué à leur contenu à la fois en polyphénols et flavonoïdes [20-23]. Par conséquent, l'effet TAC élevé de l'extrait méthanolique de *Clematis. cirrhosa* L. par rapport à celui de l'extrait hydrométhanolique est évidemment dû à la quantité élevée de composés phénoliques et flavonoïdes totaux détectée dans ce dernier. Alors que l'activité des huiles essentielles est souvent attribuée à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Toutefois, les composés minoritaires pourraient agir de manière synergique [24].

**Tableau VI-8 :** Activité antioxydante des deux extraits et d'huile essentielle de *Clematis. cirrhosa* L.

Echantillons	TAC (mg EAA/g ES)	FRAP (mg ET/g ES)	ABTS ( $\mu$ g ET/mg ES)	DPPH IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)
Extrait MeOH (100%)	138.64 $\pm$ 1.29	212.42 $\pm$ 2.63	236.26 $\pm$ 0.56	1.98 $\pm$ 0.08
Extrait MeOH/H <sub>2</sub> O (70%)	75.00 $\pm$ 2.57	205.15 $\pm$ 3.22	237.80 $\pm$ 0.24	2.32 $\pm$ 0.29
Huile essentielle	291.36 $\pm$ 1.82	119.71 $\pm$ 2.24	128.91 $\pm$ 0.40	5.10 $\pm$ 0.14mg/ml

EAA: Equivalent d'acide ascorbique.

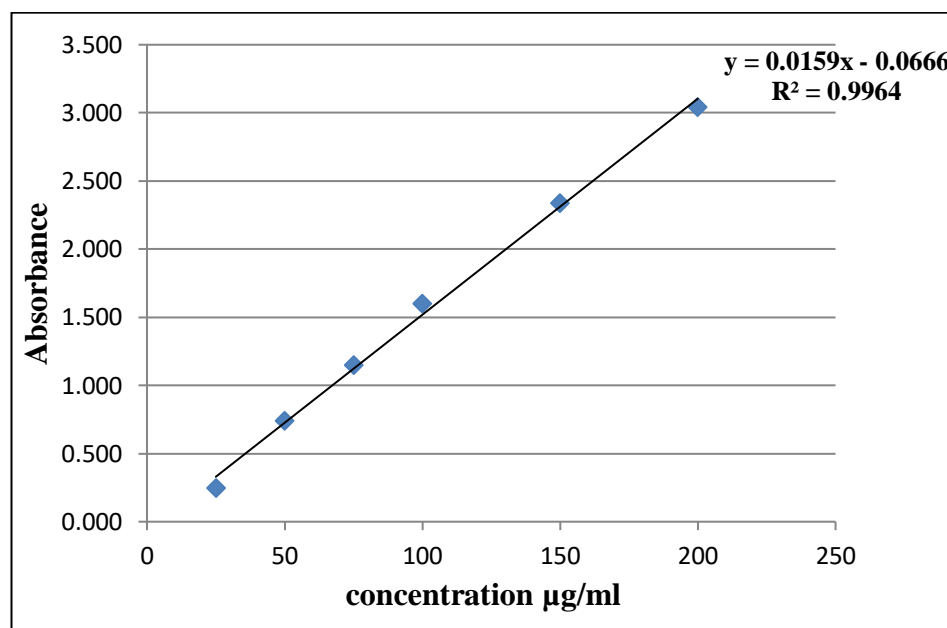
ET: Equivalent de Trolox.

ES : Extrait sec.

### VI-5.1.2 Le pouvoir réducteur du fer (Test FRAP)

Dans ce test, les antioxydants vont réduire le complexe d'ion ferrique (Fe (III))-TPTZ en complexe d'ion ferreux (Fe (II))-TPTZ, ce complexe a une couleur bleue concentrée et peut être contrôlé à 593 nm [25]. Par conséquent, la capacité des extraits et de l'huile essentielle de

*Clematis. Cirrhosa* L., à réduire l'ion ferrique, est déterminée par la mesure de l'absorbance et les valeurs sont calculées à partir de la courbe d'étalonnage de Trolox obtenue à différentes concentrations (25, 50, 150, 200 µg/ml), les résultats sont représentés par le Tableau VI-8.



**Figure VI-13** : Courbe de Trolox de l'acide ascorbique en utilisant le test FRAP.

Les résultats ont révélé que les échantillons exhibent un bon pouvoir réducteur de fer avec  $212.42 \pm 2.63$  mg ET/g ES pour l'extrait méthanolique,  $205.15 \pm 3.22$  mg ET/g ES pour hydrométhanolique et  $119.71 \pm 2.24$  mg ET/g ES

Par conséquent, l'activité observée dénote la présence de composés réducteurs dans les extraits, à savoir les donneurs d'hydrogène et les donneurs d'électrons [26], donc la différence d'activité est inévitablement due à la différence en composition chimique. La composition chimique de l'extrait méthanolique supporte sa capacité élevée à réduire l'ion ferrique, ceci lié principalement à sa teneur élevée en PPT et en FT.

Les études de corrélation entre les polyphénols totaux et le FRAP et l'antioxydant total ont également été menées par Qureshi et al. [27] sur les extraits de *Clematis connata*, ont révélé qu'il existait une forte corrélation entre les composés phénoliques et l'antioxydante des extraits, l'extrait qui contient plus de composés phénoliques a montré une bonne d'activité antioxydante.

Karimi et al. [11] ont testé l'activité antioxydante par la méthode FRAP de différentes fractions de parties aériennes de *Clematis orientalis* et *Clematis ispanica* la fraction d'acétate d'éthyle de *Clematis orientalis* a montré l'activité antioxydante la plus élevée avec une valeur

de 64.13% suivie des fractions butanol (58.5%), chloroforme (56.62), hexane (54.21) et eau (50.36). Cependant, le potentiel réducteur des extraits de *Clematis ispahanica* à une concentration de 300 µg/ml s'est avéré être dans l'ordre croissant: chloroforme > hexane > acétate d'éthyle > butanol > eau, avec des valeurs respectives de 62.5, 59.13, 55.66, 50.11 et 45.36%.

Les résultats sont bien corrélés avec la quantité de constituants phénoliques et flavonoïdes qui sont présents dans les extraits respectifs comme suit le chloroforme 11.37 mg EAG/g et 5,6 mg rutine/g MS suivi par la fraction hexane (9.04 et 4.67 mg/g) > fraction d'acétate d'éthyle (4.78 et 1.53 mg/g) > fraction de butanol (2.71 et 1.05 mg/g) > fraction d'eau (1.32 et 0.87 mg/g). Ces résultats sont en bon accord avec ceux trouvés par l'étude de Rana et al. [28], sur *Clematis gouriana* dans lesquels l'activité réductrice du fer de trois extraits (hydro-acétonique, hydrométhanolique, hydroéthanolique) ont été évaluées, dont les valeurs variaient de  $16.87 \pm 0.27$  à  $24.48 \pm 0.13$  mg de Trolox/g MS. La valeur TEAC maximale a été trouvée dans l'extrait hydro-acétonique qui a la plus forte concentration en polyphénols et en flavonoïdes comparant aux autres extraits.

Plusieurs études ont montré que les propriétés réductrices des polyphénols et leur capacité à former des complexes stables avec les métaux de transition, en particulier le fer et le cuivre, peuvent moduler divers processus d'importance biologique impliquant l'état redox de l'ion métallique. Les interactions des ions cuivre et fer avec les polyphénols, et plus particulièrement avec les flavonoïdes, sont souvent proposées comme l'un des mécanismes d'action antioxydante de ces produits naturels [29-32]. Considérant que l'action antioxydante des composés phénoliques résulte du piégeage des radicaux libres par le don d'un atome d'hydrogène aux radicaux, les activités antioxydantes de ces composés dépendent grandement du nombre et de la position des groupes hydroxyles dans le cycle aromatique [33].

En ce qui concerne l'activité d'huile essentielle de *Clematis cirrhosa* L., d'après le tableau VI-8 l'huile essentielle a une capacité réductrice de fer appréciable ( $119.71 \pm 2,24$  mg ET/g ES) ces résultats indiquent que certains composés d'huile essentielle de *Clematis cirrhosa* L. sont des donneurs d'électrons et pourraient réagir avec les radicaux libres pour les convertir en produits plus stables et pour mettre fin aux réactions radicalaires en chaîne. Comme nous l'avons mentionné précédemment que l'activité antioxydante des huiles essentielle est liée à leurs compositions chimiques telles que les composés majoritaires. Pourtant ce n'est pas uniquement ces dernières qui sont responsables de cette activité, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste

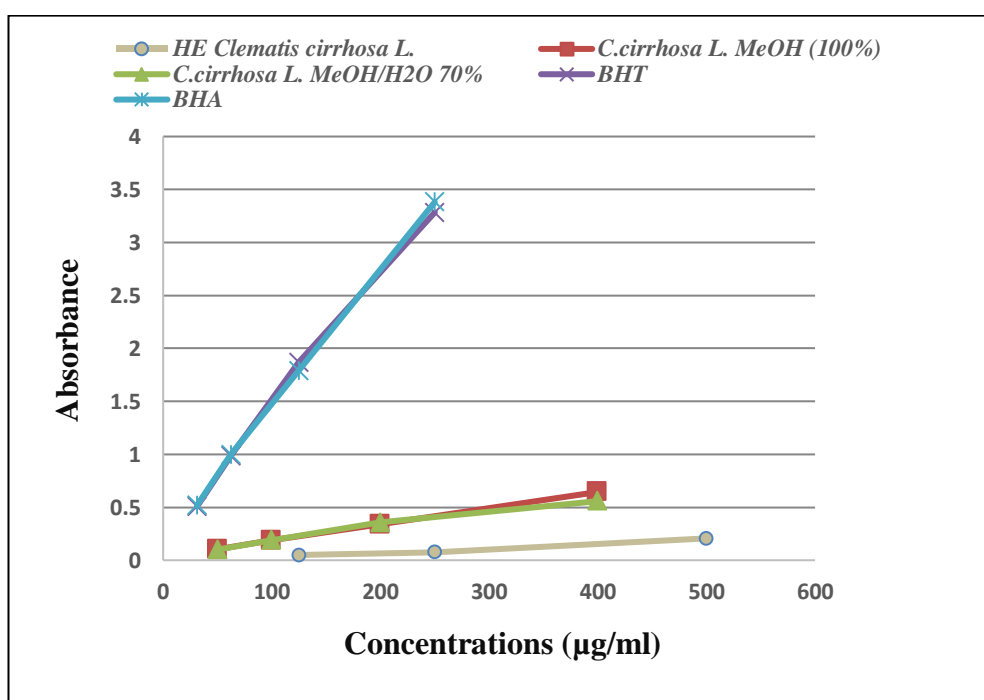


pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres [24], même pour ceux présents à de faibles quantités [34].

Les terpènes oxygénés sont considérés comme plus biologiquement actifs que les non oxygénés [35]. Dans la présente étude, la majorité des composés sont des terpènes oxygénés (55.3%), ce qui pourrait expliquer l'activité antioxydante de notre huile essentielle.

### VI-5.1.3 Capacité de réduction du cuivre (Test CUPRAC)

La néocuproïne de cuivre Cu(II) est utilisée comme réactif dans ce test. Lorsque l'antioxydant réduit la néocuproïne de cuivre Cu(II) en néocuproïne de cuivre Cu(I), un complexe jaune orangé est formé qui donne une absorption maximale à 450 nm, la concentration de ce complexe est proportionnelle à la capacité de l'antioxydant, présent dans l'extrait qui transfère les électrons vers le cuivre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) [36]. La Figure VI-14. montre les résultats de l'activité CUPRAC du *Clematis cirrhosa* L.



**Figure V-14 :** Courbes représentant l'activité antioxydante des extraits et de l'huile essentielle de *Clematis cirrhosa* L., BHA et BHT en utilisant le test CUPRAC.

D'après le graphe ci-dessus, il est évident qu'avec l'augmentation de la concentration des échantillons il y a une augmentation de l'absorbance, et par conséquent une augmentation de la capacité réductrice de cuivre, l'examen de ces résultats, montre aussi que les deux extraits de *Clematis cirrhosa* L. possèdent une capacité de réduction de cuivre significative; dont le

pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique est légèrement supérieur au pouvoir réducteur de l'extrait hydrométhanolique. Il ressort clairement de l'analyse des résultats qu'il existe une corrélation significative entre le test FRAP et le test CUPRAC, ce qui est en bonne conformité avec les résultats trouvés par [37]. Alors que l'huile essentielle a montré un faible pouvoir réducteur cuivrique.

Malgré l'activité réductrice enregistrée par les extraits et l'HE de *Clematis cirrhosa* L., elle reste loin d'être comparée à celles de BHA et BHT.

#### VI-5.1.4 Capacité de piégeage des radicaux libres ABTS<sup>•+</sup>

Dans ce test l'ABTS est oxydé, en cation radicalaire coloré ABTS<sup>•+</sup>, par une solution de persulfate de potassium, puis mélangé avec les extraits à tester. En présence d'antioxydant ou donneur de H<sup>•</sup>, le radical libre se réduit en ABTS<sup>•</sup>, ce qui entraîne la décoloration de la solution et la diminution de l'absorbance à 734 nm [37].

Les valeurs enregistrées par les deux extraits et l'huile essentielle ont été comparées avec l'équation linéaire du standard Trolox (25-200 µg/ml) et interprétées en terme Trolox équivalent (mg/g ES). Les résultats obtenus sont représentées par Tableau VI-8.

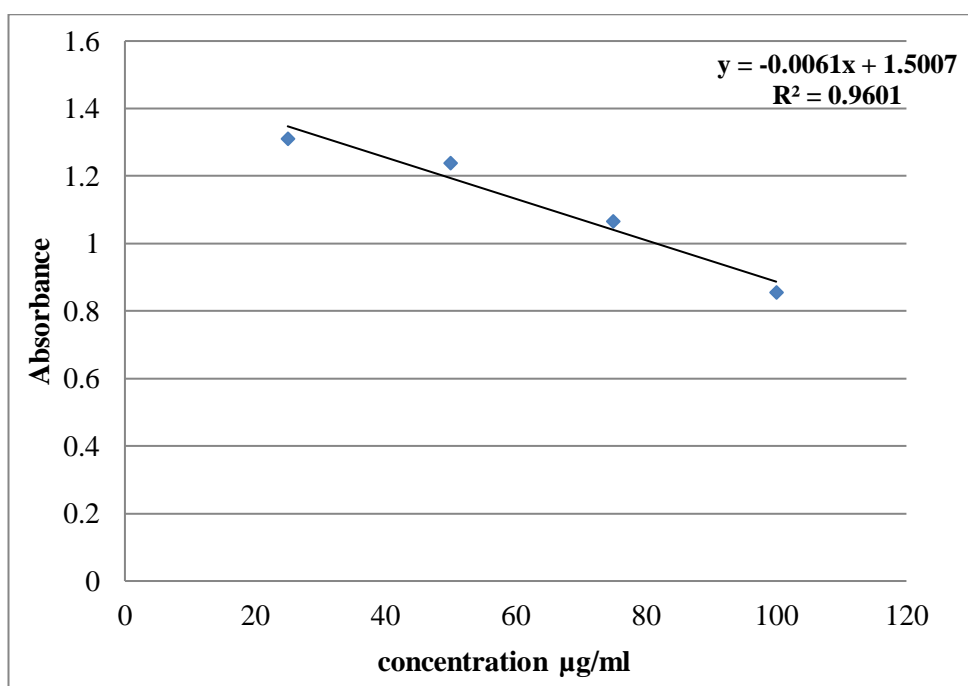


Figure VI-15 : Courbe de Trolox utilisé en test ABTS.

Les résultats ont révélé que les échantillons exhibent une bonne activité antiradicalaire avec  $236.26 \pm 0.56$  µg ET/mg ES pour l'extrait méthanolique,  $237.80 \pm 0.24$  µg ET/mg ES pour hydrométhanolique et  $128.91 \pm 0.40$  µg ET/mg ES pour l'huile essentielle.

Mostafa et al. [6] ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits de l'espèce *Clematis brachiata* les valeurs d'CI<sub>50</sub> étaient de 130 µg/ml, 60 µg/ml et 170 µg/ml respectivement pour l'extrait à l'acétone, l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux. L'extrait méthanolique a montré l'activité de piégeage d'ABTS la plus élevée à 60 µg/ml, une activité similaire à celle du composé de référence, le butyl hydroxytoluène (BHT).

Dans l'étude apportée par Rana et al. [28] sur les feuilles de la plante *Clematis gouriana*, l'extrait hydroacétonique qui possède une teneur élevée en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux dévoile une activité antiradicalaire plus élevée avec une valeur CI<sub>50</sub> de 25.35 mg/ml dans l'ABTS.

Athmouni et al. [38] ont rapporté que, l'extrait méthanolique de l'espèce Tunisienne *Clematis flammula* a donné une activité antioxydante élevée en test ABTS avec une valeur de  $13.84 \pm 2.14$  mg ET/g MS. D'après cette étude, l'activité antiradicalaire de cet extrait est attribuée à sa teneur en phénols.

L'activité antiradicalaire d'huile essentielle de *Clematis cirrhosa* L. par le test ABTS est estimée de  $128.91 \pm 0.40$  µg ET/mg ES, cette valeur est inférieure à celles obtenues par l'extrait méthanolique et l'extrait hydrométhanolique des parties aériennes de *Clematis cirrhosa* L. Néanmoins, elle reste appréciable et la composition d'huile essentielle, est caractérisée par l'abondance des sesquiterpènes oxygénés possédant dans leurs structure des groupes hydroxyle libres (Juniper camphor 14.5%), qui ont été documentés du fait de leurs rôle important dans l'augmentation des capacités antioxydantes en raison du don élevé d'atomes d'hydrogène [39-41].

Par ailleurs, Il a été démontré dans la littérature que, l'activité d'une huile essentielle résulte d'une interaction complexe entre ses différents constituants, susceptible de produire des effets synergiques ou antagonistes, même pour ceux présents à de faibles concentrations [34], dans le même contexte, on peut également lier l'activité antioxydante de notre huile essentielle à la présence de composants minoritaires, qui ont été avérés efficaces dans l'activité antioxydante, par exemple le phytol et thymol [42, 43].

#### VI-5.1.5 Capacité de piégeage des radicaux libres DPPH\*

Le test DPPH est principalement la méthode spectrophotométrique, la plus simple et la plus utilisée pour la détermination de la capacité des extraits des plantes à piéger les radicaux libres de DPPH. Dans ce test la diminution de l'absorbance à 517nm est due à la réduction des

radicaux libres DPPH', par les antioxydants présents dans les extraits de plantes, qui agissent comme donneurs d'hydrogène [44].

Dans ce travail la capacité de piégeage des radicaux libres DPPH' est évaluée par la détermination de la valeur de la concentration inhibitrice maximale (CI<sub>50</sub>) de l'extrait alors que, une CI<sub>50</sub> faible fait référence à une capacité antioxydante élevée. Les résultats de la capacité de piégeage des radicaux libres DPPH', des extraits et de l'huile essentielle de *Clematis cirrhosa* L. sont présentés dans le Tableau **VI-8**.

Comme le montre le Tableau **VI-8**, les deux extraits de *Clematis cirrhosa* L. ont une capacité de piégeage des radicaux libres DPPH' significative, l'extrait du méthanolique a une capacité antioxydante plus élevée que l'extrait hydrométhanolique (70/30) avec une CI<sub>50</sub> (198 ± 0.08 µg/ml). Alors que la valeur d'CI<sub>50</sub> obtenue par l'huile essentielle est 5.10 ± 0.14 mg/ml ; cette valeur élevée révèle une capacité de piégeage des radicaux libres DPPH' très faible.

Il est évident d'après nos résultats, que l'activité antioxydante des extraits de *Clematis cirrhosa* L. est due à leurs quantités élevées en polyphénols et en flavonoïdes; cela a été confirmé par les résultats obtenus par Karimi et *al.* sur les espèces *Clematis orientalis* et *Clematis ispahanica* [11].

Des résultats semblables aux nôtres ont été rapportés dans l'étude de Mostafa et *al.* [6] qui trouvent que Les valeurs de la CI<sub>50</sub> se sont révélées être respectivement de 300.04 µg/ml, 180.45 µg/ml et 480.25 µg/ml pour l'extrait à l'acétone, méthanolique et aqueux de la plante *Clematis brachiata* Thunb., parmi ces extraits, l'extrait méthanolique a montré l'activité de piégeage la plus élevée.

Alors que d'autres recherches, réalisées par Kirby et *al.*, Atmani et *al.* [45, 46] sur les espèces du genre *Clematis*, ont proclamé que *Clematis arandii* et *Clematis flammula* avaient des valeurs de CI<sub>50</sub> relativement élevées, ce qui implique une activité de piégeage modérée contre les radicaux DPPH'.

Les résultats ont montré que l'huile essentielle de *Clematis cirrhosa* L. a présenté une activité de piégeage des radicaux DPPH' très faible, cela est dû, selon notre estimation, à leur faible teneur en composés phénoliques.

Nos résultats diffèrent de ceux décrits dans la littérature par Mushtaq et *al.* [47], selon lesquels les huiles essentielles des feuilles et des tiges de *Clematis graveolens* montrent une bonne activité antiradicalaire avec une valeur de CI<sub>50</sub> de 31.93 ± 0.01 µg/ml pour les tiges, et une CI<sub>50</sub> de 15.83 ± 0.2 µg/ml pour les feuilles.

## VI-5.2 Activités inhibitrice d'enzymes

L'inhibition des enzymes est considérée comme une stratégie thérapeutique clé, pour la gestion des problèmes de santé mondiaux. Cette stratégie pourrait être valable pour le traitement de plusieurs maladies, en particulier avec l'utilisation de produits dérivés naturels, ces derniers sont suggérés à fin d'éviter, les effets secondaires et indésirables des inhibiteurs synthétiques. Dans ce scénario, des maladies telles que la maladie d'Alzheimer, le diabète et l'obésité sont devenues des problèmes de santé mondiaux avec une prévalence mondiale [48, 49]. Dans le présent travail, les activités inhibitrices, des extraits méthanolique et hydrométhanolique (70%) de la plante *Clematis cirrhosa* L., du cholinestérase (AChE et BChE), l' $\alpha$ -amylase, l' $\alpha$ -glucosidase et la tyrosinase ont été étudiées.

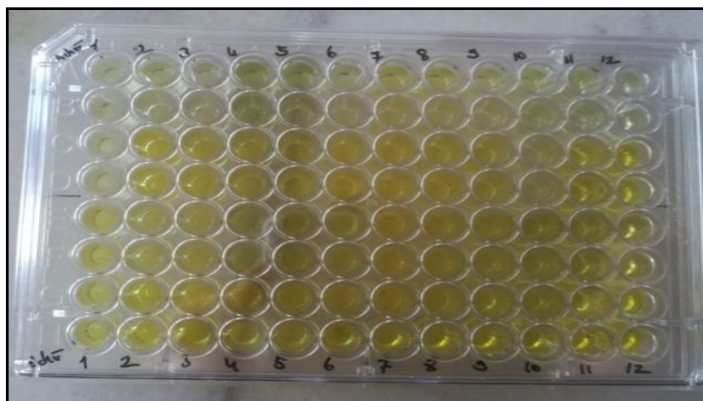
### VI-5.2.1 Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme clé; qui assure une hydrolyse rapide de l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques centrales et périphériques; qui régule la transmission des influx nerveux.

Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase sont utilisés pour un traitement symptomatique de plusieurs maladies neurologiques, la démence sénile, l'ataxie, la myasthénie grave, la maladie de Parkinson Alzheimer. La galantamine, un alcaloïde présent dans les espèces de *Galanthus*, est actuellement utilisée pour le traitement de la maladie d'Alzheimer de la légère à modérée, par inhibition de l'enzyme cholinestérase [50].

Plusieurs plantes sont étudiées pour leurs activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase qui peuvent donc être utilisées pour soigner les maladies neurodégénératives [51]. C'est pourquoi nous avons envisagé dans cette recherche d'étudier l'activité inhibitrice de l'enzyme acétylcholinestérase de l'extrait méthanolique et hydrométhanolique de *Clematis cirrhosa* L.

L'activité inhibitrice de l'enzyme acétylcholinestérase des deux extraits, de la plante étudiée est évaluée par une méthode calorimétrique utilisant la galantamine comme un contrôle positif (Figure VI-16). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition. Les résultats du test sont présentés dans le Tableau VI-9.



**Figure VI-16** : Résultats sur microplaque montrant la coloration en test anticholinestérase.

**Tableau VI-9** : Activités inhibitrice d'enzymes des deux extraits de la plante *Clematis cirrhosa* L.

Echantillons	AchE (%)	BchE (%)	Tyrosinase (%)	$\alpha$ -Amylase (%)	$\alpha$ -Glucosidase (%)
<b>Extrait MeOH (100%) (2 mg/ml)</b>	69.03±1.13	47.67±1.86	82.34±0.39	36.63±2.17	14.03±0.91
<b>Extrait MeOH/H<sub>2</sub>O (70%) (2 mg/ml)</b>	78.38±0.36	34.22±1.25	86.56±0.59	24.70±0.83	40.93±4.50
<b>Galatamine (5 µg/ml)</b>	97.07±0.28	66.96±0.54	nt	nt	nt
<b>Acide Kojique (1 mg/ml)</b>	nt	nt	82.38±0.41	nt	nt
<b>Acarbose (1 mg/ml)</b>	nt	nt	nt	73.81±1.55	11.14±2.38

AChE: acétylcholinestérase, BChE: butyrylcholinestérase, nt: non testé.

L'analyse des résultats indique, que les deux extraits testés ont une bonne activité inhibitrice de l'ACh, dont l'extrait hydrométhanolique possède une activité plus élevée que l'extrait méthanolique avec (78.38 ± 0.36%) et (69.03 ± 1.13%). Tandis que le galantamine donne une activité inhibitrice d'acétylcholinestérase de (97.07 ± 0.28%) à une concentration de 5µg/ml.

### VI-5.2.2 Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase

La butyrylcholinestérase (BChE) est une enzyme cholinestérase similaire à l'acétylcholinestérase et fonctionne comme un régulateur de la neurotransmission cholinergique en hydrolysant l'acétylcholine. Ainsi, l'inhibition de la butyrylcholinestérase peut offrir un bon effet sur les thérapies cholinergiques, en particulier les tentatives de caractérisation des maladies d'Alzheimer [52].

L'activité inhibitrice de l'enzyme butyrylcholinestérase des deux extraits, de la plante étudiée est évaluée par une méthode calorimétrique utilisant la galantamine comme un contrôle positif. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition. Les résultats du test sont présentés dans le Tableau VI-9.

Les résultats de ce test ont montré que le taux d'inhibition de la BChE de l'extrait méthanolique de la plante testée ( $47.67 \pm 1.66\%$ ) était supérieur à celui de l'extrait hydrométhanolique ( $34.22 \pm 1.25\%$ ). Comparer ces valeurs avec la valeur obtenue par le contrôle positif utilisé la galantamine ( $66.96 \pm 0.54\%$ ); il aperçoit que les deux extraits de *Clematis cirrhosa* L. ont une activité modérée contre BChE et l'extrait méthanolique est plus actif que l'extrait hydrométhanolique.

Nos résultats sont en accordance avec plusieurs études, qui ont montré que l'activité anticholinestérase est corrélée à la concentration de polyphénols et de flavonoïde présents dans les extraits des plantes [53-55].

### VI-5.2.3 Activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase et l' $\alpha$ -amylase

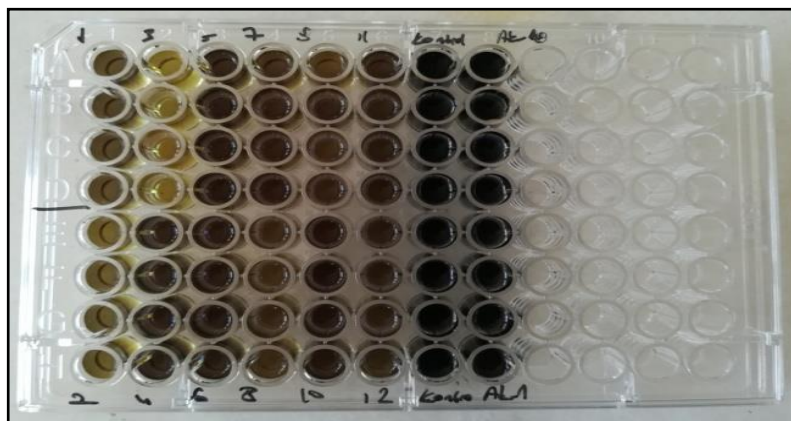
L' $\alpha$ -glucosidase et l' $\alpha$ -amylase sont des enzymes clés du système digestif qui hydrolysent les carbohydrates en glucose absorbable.

Chez les patients diabétiques la dégradation de l'amidon alimentaire entraîne une hyperglycémie postprandiale. Par conséquent, l'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase ou de l' $\alpha$ -amylase peut réduire et contrôler le pic de glycémie post prandiale, c'est une approche efficace pour traiter le diabète de type 2 [56, 57].

Actuellement, certains inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase et de l' $\alpha$ -amylase, par exemple l'acarbose et le voglibose, sont fréquemment utilisés en clinique pour contrôler la glycémie, retardant l'hydrolyse des glucides et supprimant l'hyperglycémie postprandiale. Bien qu'efficaces, des effets secondaires de ces inhibiteurs, tels que l'hypoglycémie, le cancer de la vessie, la prise de poids, l'ostéoporose et les complications cardiovasculaires et diarrhée, sont

également rapportés. Étant donné que les effets secondaires des médicaments commercialisés existent, une approche prometteuse consiste à découvrir de nouveaux inhibiteurs plus efficaces et plus sûrs à partir de produits naturels [56, 57].

Dans cette étude, l'extrait méthanolique et hydrométhanolique de *Clematis cirrhosa* L. ont été testés pour une éventuelle activité inhibitrice des enzymes clés liées au diabète utilisant l'acarbose comme un contrôle positif, les résultats des tests d'inhibition l' $\alpha$ -glucosidase et l' $\alpha$ -amylase sont exprimées en pourcentage d'inhibition est récapitulées dans le Tableau VI-9.



**Figure VI-17 :** Résultats sur microplaque montrant la coloration en test d'inhibition d' $\alpha$ -glucosidase et  $\alpha$ -amylase.

Nos résultats montrent que l'extrait méthanolique, possède une activité inhibitrice d' $\alpha$ -amylase plus élevée ( $36.63 \pm 2.17\%$ ) par rapport à l'extrait hydrométhanolique ( $24.70 \pm 0.83\%$ ).

À l'inverse, le taux d'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase de l'extrait hydrométhanolique ( $40.93 \pm 4.50\%$ ) était significativement plus élevé que celui de l'extrait méthanolique ( $14.03 \pm 0.91\%$ ) les deux valeurs obtenues sont supérieures à celle obtenue par le standard utilisé ; l'acarbose qui donne à une concentration de 1 mg/ml une inhibition de ( $11.14 \pm 2.38\%$ ), ce qui est très intéressant dans le cas de notre plante.

Nos résultats corroborent avec ceux rapportés dans réalisé par Morankar et *al.* [51] sur l'espèce *Clematis Cheynei*, dans laquelle ils ont trouvé que l'extrait méthanolique a révélé une présence élevée de phénols et de flavonoïdes, par conséquent il a montré une activité antioxydante significative. Cet extrait a révélé également une meilleure activité inhibitrice enzymatique in vitro d' $\alpha$ -amylase qui intervient dans la régulation et l'absorption des glucides.

Les extraits aqueux d'*Ascophyllum nodosum* ont un bon potentiel inhibiteur sur les enzymes métabolisant les glucides, en particulier l' $\alpha$ -glucosidase. Ces activités inhibitrices ont



augmenté avec le contenu phénolique et le meilleur potentiel inhibiteur a été observé avec l'extrait aqueux à 80 ° C, qui contenait la plus grande quantité de composés phytochimiques phénoliques [59].

De même, des études antérieures menées sur un certain nombre de plantes ont prouvé que les extraits polyphénoliques étaient des inhibiteurs efficaces de l' $\alpha$ -glucosidase et de l' $\alpha$ -amylase [60]. En outre les polyphénols se sont avérés être des inhibiteurs efficaces des enzymes liées au syndrome métabolique, telles que l' $\alpha$ -glucosidase, l' $\alpha$ -amylase et la lipase pancréatique. Cette fonction a été attribuée à leur capacité à se lier aux protéines par liaison hydrogène [61].

Le potentiel d'inhibition pour les polyphénols et les flavonoïdes est corrélé par le nombre de groupements hydroxyles dans leur cycle B. Ces composés inhibent l' $\alpha$ -amylase par la formation de liaison hydrogènes, entre ses groupements hydroxyles et les résidus du site de fixation (actif) de cette enzyme. Le plus grand pouvoir inhibiteur pour les flavonoïdes est assuré par les flavonols et flavones [62].

#### VI-5.2.4 Activité inhibitrice de tyrosinase

La tyrosinase appartient au groupe des polyphénols oxydases qui interviennent dans le métabolisme de la tyrosine et conduit à la formation de dopachrome, un métabolite responsable de la biosynthèse des pigments de la mélanine [63], l'accumulation de la mélanine peut provoquer des troubles de la pigmentation de la peau tels que les taches de vieillissement et le mélasma. En raison des effets indésirables des agents anti-tyrosinase synthétiques déjà commercialisés, il est impérieux de rechercher des inhibiteurs de la tyrosinase d'origine naturelle [64].

Dans notre étude, l'extrait méthanolique et hydrométhanolique de la plante étudiée, ont également été criblés pour l'activité anti-tyrosinase, l'analyse colorimétrique est réalisée en utilisant l'acide kojique comme test positif. Les valeurs de l'activité inhibitrice de la tyrosinase sont exprimées en pourcentage d'inhibition et sont présentés par le Tableau VI-9.



**Figure V-18** : Résultats sur microplaque montrant la coloration en test antityrosinase

D'après l'analyse des résultats, Il est constaté que les extraits testés montrent une activité antityrosinase significative, et les résultats obtenus attestent que l'extrait méthanolique et le standard l'acide kojique ont la même activité antityrosinase avec un taux de (82%); cette valeur était légèrement inférieure à celle de l'extrait d'hydrométhanolique (86.56%). L'activité d'inhibition de la tyrosinase des extraits de *Clematis cirrhosa* L. peut être liée à leur contenu phénolique et à leurs activités antioxydantes.

L'inhibition de la tyrosinase d'extraits de plantes médicinales pourrait être attribuée à la présence d'acides hydroxycinnamiques et de flavonoïdes [65]. Cela correspond bien à nos résultats obtenus dans l'analyse HPLC/DAD, qui a montré que l'extrait méthanolique et l'extrait hydrométhanolique de *Clematis cirrhosa* L. ont une composition phénolique riche en acides hydroxycinnamiques tels que, l'acide gallique, l'acide férulique, l'acide caféique, l'acide cinnamique et l'acide syringique. Ainsi, cette analyse a détecté deux flavan-3-ols ; la catéchine et l'épicatéchine.

Il a été rapporté que l'acide kojique inhibait la tyrosinase en se liant à l'ion cuivre présent dans l'enzyme et de façon similaire la rutine inhibe également cette enzyme [66].

Dans nos recherches, les analyses de l'activité antioxydante ont prouvé que les extraits étudiés ont des capacités de réduction d'ions cuivriques élevées, qui leur confèrent une activité à inhiber la tyrosinase.

En outre Shukla et al [67], ont proclamé que les sites actifs de l'enzyme peuvent revenir inactifs sous l'effet de la liaison hydrogène, formée par ces sites actifs et les groupes hydroxyle des composés phénoliques. Ces liaisons hydrogène fournissent des modifications conformationnelles et un encombrement stérique, ce qui supprime l'activité enzymatique.

**Références bibliographiques**

- [1] Chohra, D., & Ferchichi, L. (2019). Ethnobotanical study of Belezma National Park (BNP) plants in Batna: East of Algeria. *Acta Scientifica Naturalis*, 6(2), 40-54.
- [2] Dennis, W. M., & Bierner, M. W. (1980). Distribution of flavonoids and their systematic significance in Clematis subsection Viornae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 8(1), 65-67.
- [3] Kizu, H., Shimana, H., & Tomimori, T. (1995). Studies on the constituents of Clematis species. VI. The constituents of Clematis stans Sieb. et Zucc. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 43(12), 2187-2194.
- [4] Kizu, H., & Tomimori, T. (1998). Studies on the constituents of Clematis species. VII. Triterpenoid saponins from the roots of Clematis terniflora DC. var. robusta Tamura. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 46(12), 1891-1900.
- [5] Kawata, Y., Kizu, H., Miyaichi, Y., & TOMIMORI, T. (2001). Studies on the Constituents of Clematis Species. VIII. 1) Triterpenoid Saponins from the Aerial Part of Clematis tibetana Kuntz2). *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 49(5), 635-638.
- [6] Mostafa, M., Ahmed, S., & Afolayan, A. J. (2018). Antioxidant activity of Clematis brachiata Thunb. leaf. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 53(3), 185-190.
- [7] Alothman, M., Bhat, R., & Karim, A. A. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*, 115(3), 785-788.
- [8] Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M., & Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian Quercus coccifera L. and Juniperus phoenicea L. fruit extracts. *Food chemistry*, 105(3), 1126-1134.
- [9] Yao, L., Jiang, Y., Datta, N., Singanusong, R., Liu, X., Duan, J., ... & Xu, Y. (2004). HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (Camellia sinensis) grown in Australia. *Food Chemistry*, 84(2), 253-263.

- [10] Morankar, P., & Jain, A. P. (2019). Extraction, Qualitative and Quantitative Determination of Secondary Metabolites of Aerial Parts of *Clematis heynei* and *Solanum virginianum*. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(1-s), 260-264.
- [11] Karimi, E., Ghorbani Nohooji, M., Habibi, M., Ebrahimi, M., Mehrafarin, A., & Khalighi-Sigaroodi, F. (2018). Antioxidant potential assessment of phenolic and flavonoid rich fractions of *Clematis orientalis* and *Clematis isphahanica* (Ranunculaceae). *Natural product research*, 32(16), 1991-1995.
- [12] Tao, X., YANG, Y. J., & WAN, D. G. (2005). Analysis of chemical components of volatile oil from *Clematis obscura* [J]. *Journal of Lanzhou Medical College*, 3.
- [13] Jiang, B., Liao, X., Jia, X., Ye, X., Ding, J., Yu, X., & Wu, Y. (1990). Studies and comparisons on chemical components of essential oils from *Clematis hexapetala* Pall. and *Inula nervosa* Wall. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica*, 15(8), 488-90.
- [14] Song, L., Zhang, W., Wu, J. R., & Zhou, X. J. (2006). Chemical constituents study of *Clematis apiifolia* DC. volatile oil. *Shanghai Zhongyiyao Daxue*, 20(4), 83-84.
- [15] Zeng, Y. X., Zhao, C. X., Liang, Y. Z., Yang, H., Fang, H. Z., Yi, L. Z., & Zeng, Z. D. (2007). Comparative analysis of volatile components from *Clematis* species growing in China. *Analytica chimica acta*, 595(1-2), 328-339.
- [16] Wong, S. P., Leong, L. P., & Koh, J. H. W. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food chemistry*, 99(4), 775-783
- [17] Chekroun-Bechlaghem, N., Belyagoubi-Benhammou, N., Belyagoubi, L., Gismondi, A., Nanni, V., Di Marco, G., ... & Atik Bekkara, F. (2019). Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Tamarix africana*, *Arthrocnemum macrostachyum* and *Suaeda fruticosa*, three halophyte species from Algeria. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 153(6), 843-852.
- [18] Dixit, D., & Reddy, C. R. K. (2017). Non-targeted secondary metabolite profile study for deciphering the cosmeceutical potential of red marine macro alga *Jania rubens*—An LCMS-based approach. *Cosmetics*, 4(4), 45.

- [19] Saidi, R., Chawech, R., Baccouch, N., & Jarraya, R. M. (2019). Study toward antioxidant activity of *Clematis flammula* extracts: Purification and identification of two flavonoids-glucoside and trisaccharide. *South African Journal of Botany*, *123*, 208-213.
- [20] Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry*, *66*(4), 401-436.
- [21] Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences*, *74*(17), 2157-2184.
- [22] Manoj, G. S., & Murugan, K. (2012). Phenolic profiles, antimicrobial and antioxidant potentiality of methanolic extract of a liverwort, *Plagiochila beddomei* Steph.
- [23] Wang, X., Wang, M., Cao, J., Wu, Y., Xiao, J., & Wang, Q. (2017). Analysis of flavonoids and antioxidants in extracts of ferns from Tianmu Mountain in Zhejiang Province (China). *Industrial Crops and Products*, *97*, 137-145.
- [24] Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, *18*(6), 435-448.
- [25] Berker, K. I., Güçlü, K., Tor, İ., & Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, *72*(3), 1157-1165.
- [26] Kumaran, A., & Karunakaran, R. J. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT-Food Science and Technology*, *40*(2), 344-352.
- [27] Qureshi, M. Z., Rana, F. A., Kausar, R., Shahwar, D., & Raza, M. A. (2011). In vitro antioxidant potential of aqueous and organic extracts of *Clematis connata*. *Asian Journal of Chemistry*, *23*(9), 4017.
- [28] Rana, S., Rawat, K., Mahendru, M., Padwad, Y., Pakade, Y. B., Lal, B., & Bhushan, S. (2015). Screening of bioconstituents and in vitro cytotoxicity of *Clematis gouriana* leaves. *Natural product research*, *29*(23), 2242-2246.

- [29] Van Acker, S. A., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J., & Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free radical Biology and medicine*, 20(3), 331-342.
- [30] Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(10), 572-584.
- [31] Moridani, M. Y., Pourahmad, J., Bui, H., Siraki, A., & O'Brien, P. J. (2003). Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(2), 243-253.
- [32] Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., & Boucherit, K. (2014). Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*, 12(6), 364-371.).
- [33] Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.
- [34] Xianfei, X., Xiaoqiang, C., Shunying, Z., & Guolin, Z. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China. *Food Chemistry*, 100(4), 1312-1315.
- [35] Dambolena, J. S., Zunino, M. P., Herrera, J. M., Pizzolitto, R. P., Areco, V. A., & Zygadlo, J. A. (2016). Terpenes: Natural products for controlling insects of importance to human health-A structure-activity relationship study. *Psyche*, 2016.
- [36] Özyürek, M., Güçlü, K., Tütem, E., Başkan, K. S., Erçağ, E., Celik, S. E., ... & Apak, R. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical methods*, 3(11), 2439-2453.
- [37] Öztürk, M., Aydoğmuş-Öztürk, F., Duru, M. E., & Topçu, G. (2007). Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food chemistry*, 103(2), 623-630.

- [38] Athmouni, K., Belghith, T., El Fek, A., & Ayadi, H. (2016). Phytochemical composition and antioxidant activity of extracts of some medicinal plants in Tunisia. *Int J Pharmacol Toxicol*, 4, 159-68.
- [39] Barbieri, N., Costamagna, M., Gilabert, M., Perotti, M., Schuff, C., Isla, M. I., & Benavente, A. (2016). Antioxidant activity and chemical composition of essential oils of three aromatic plants from La Rioja province. *Pharmaceutical biology*, 54(1), 168-173.
- [40] El-Gawad, A. A., Elshamy, A., El Gendy, A. E. N., Gaara, A., & Assaeed, A. (2019). Volatiles profiling, allelopathic activity, and antioxidant potentiality of *Xanthium strumarium* leaves essential oil from Egypt: Evidence from chemometrics analysis. *Molecules*, 24(3), 584.
- [41] Ruberto, G., Baratta, M. T., Deans, S. G., & Dorman, H. D. (2000). Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. *Planta medica*, 66(08), 687-693.
- [42] Islam, M. T., Ali, E. S., Uddin, S. J., Shaw, S., Islam, M. A., Ahmed, M. I., ... & Billah, M. M. (2018). Phytol: A review of biomedical activities. *Food and chemical toxicology*, 121, 82-94.
- [43] Gursul, S., Karabulut, I., & Durmaz, G. (2019). Antioxidant efficacy of thymol and carvacrol in microencapsulated walnut oil triacylglycerols. *Food chemistry*, 278, 805-810.
- [44] Parvez, S., Kang, M., Chung, H. S., Cho, C., Hong, M. C., Shin, M. K., & Bae, H. (2006). Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(11), 921-934.
- [45] Kirby, A. J., & Schmidt, R. J. (1997). The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs—I. *Journal of ethnopharmacology*, 56(2), 103-108.
- [46] Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., ... & Atmani, D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 112(2), 303-309.
- [47] Mushtaq, A., Rasool, N., Riaz, M., Tareen, R. B., Zubair, M., Rashid, U., ... & Taufiq-Yap, Y. H. (2013). Antioxidant, Antimicrobial studies and characterisation of essential oil, fixed oil of *Clematis graveolens* by GC-MS. *Oxidation Communications*, 36(4), 1067-1078.

- [48] Katanić, J., Ceylan, R., Matić, S., Boroja, T., Zengin, G., Aktumsek, A., ... & Stanić, S. (2017). Novel perspectives on two *Digitalis* species: Phenolic profile, bioactivity, enzyme inhibition, and toxicological evaluation. *South African Journal of Botany*, *109*, 50-57.,
- [49] Mahomoodally, M. F., Vlasisavljevic, S., Berezni, S., Abdallah, H. H., Zengin, G., Atanasov, A. G., Mollica, A., Lobine, D., & Aktumsek, A. (2018). *Lotus aegaeus* (Gris.) Boiss and *Iberis sempervirens* L.: Chemical fingerprints, antioxidant potential, and inhibition activities and docking on key enzymes linked to global health problems. *Industrial Crops and Products*, *120*, 271-278.
- [50] Zengin, G., Sieniawska, E., Senkardes, I., Picot-Allain, M. C. N., Sinan, K. I., & Mahomoodally, M. F. (2019). Antioxidant abilities, key enzyme inhibitory potential and phytochemical profile of *Tanacetum poteriifolium* Grierson. *Industrial Crops and Products*, *140*, 111629.
- [51] Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M., & Houghton, P. J. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, *14*(4), 289-300.
- [52] Mesulam, M. M., Guillozet, A., Shaw, P., Levey, A., Duysen, E. G., & Lockridge, O. (2002). Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *neuroscience*, *110*(4), 627-639.
- [53] Ademosun, A. O., Oboh, G., Bello, F., & Ayeni, P. O. (2016). Antioxidative properties and effect of quercetin and its glycosylated form (Rutin) on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, *21*(4), 11-17.
- [54] Katalinić, M., Rusak, G., Barović, J. D., Šinko, G., Jelić, D., Antolović, R., & Kovarik, Z. (2010). Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. *European journal of medicinal chemistry*, *45*(1), 186-192.
- [55] Khan, H., Amin, S., Kamal, M. A., & Patel, S. (2018). Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *101*, 860-870.
- [56] Hua, F., Zhou, P., Wu, H. Y., Chu, G. X., Xie, Z. W., & Bao, G. H. (2018). Inhibition of flavonoid glycosides from Lu'an GuaPian tea on  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase: Molecular docking and interaction mechanism. *Food Funct*, *9*, 4173-4183.



- [57] Sanni, O., Erukainure, O. L., Chukwuma, C. I., Koorbanally, N. A., Ibeji, C. U., & Islam, M. S. (2019). Azadirachta indica inhibits key enzyme linked to type 2 diabetes in vitro, abates oxidative hepatic injury and enhances muscle glucose uptake ex vivo. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 734-743.
- [58] Morankar, P., & Jain, A. P. (2019). Estimation of bioactive compound using RP-HPLC and antioxidant, antidiabetic activity of aerial parts of Clematis heynei and Solanum virginianum. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 3219-3223.
- [59] Apostolidis, E., & Lee, C. M. (2010). In vitro potential of Ascophyllum nodosum phenolic antioxidant-mediated  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibition. *Journal of food science*, 75(3), 97-102.
- [60] Matsui, T., Ueda, T., Oki, T., Sugita, K., Terahara, N., & Matsumoto, K. (2001).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 2.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition by isolated acylated anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1952-1956.
- [61] Zhang, X., Jia, Y., Ma, Y., Cheng, G., & Cai, S. (2018). Phenolic composition, antioxidant properties, and inhibition toward digestive enzymes with molecular docking analysis of different fractions from Prinsepia utilis royle fruits. *Molecules*, 23(12), 3373.
- [62] Sales, P. M., Souza, P. M., Simeoni, L. A., Magalhães, P. O., & Silveira, D. (2012).  $\alpha$ -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 141-183.
- [63] Seo, S. Y., Sharma, V. K., & Sharma, N. (2003). Mushroom tyrosinase: recent prospects. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(10), 2837-2853.
- [64] Sarikurkcu, C., Zengin, G., Oskay, M., Uysal, S., Ceylan, R., & Aktumsek, A. (2015). Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two Origanum vulgare subspecies (subsp. vulgare and subsp. hirtum) essential oils. *Industrial Crops and Products*, 70, 178-184.
- [65] Pavlič, B., Teslić, N., Zengin, G., Đurović, S., Rakić, D., Cvetanović, A., ... & Zeković, Z. (2020). Antioxidant and enzyme-inhibitory activity of peppermint extracts and essential oils obtained by conventional and emerging extraction techniques. *Food Chemistry*, 338, 127724.

[66] Tada, T., Tezuka, Y., Shimomura, K., ITO, S., HATTORI, H., & KADOTA, S. (2001). Effect of depigmentation for 3, 4-di-O-caffeoylquinic acid guided by tyrosinase inhibitory activity from *Conyza filaginoides*. *Journal of oleo science*, 50(4), 211-215.

[67] Shukla, S., Lee, J. S., Park, J., Hwang, D. J., Park, J. H., & Kim, M. (2016). Quantitative Analysis of Functional Components From *Nelumbo Nucifera* Root Fermented Broth with Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Effects. *Journal of Food Biochemistry*, 40(2), 248-259.

***CONCLUSION ET  
PERSPECTIVES***

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de la présente étude ayant pour objectif la valorisation d'une plante médicinale algérienne à intérêt thérapeutique, utilisée en médecine traditionnelle *Clematis cirrhosa* L. de la famille des Ranunculaceae, choisie sur la base de son utilisation en médecine traditionnelle locale, qui a été identifiée par l'étude ethnobotanique, et l'identification de sa composition chimique ainsi l'évaluation de ses activités antioxydantes et inhibitrices d'enzymes.

L'espèce *Clematis cirrhosa* L. n'a fait l'objet d'aucune investigation chimique ou biologique, le genre *Clematis* étant une source importante de saponines, de flavonoïdes, d'alcaloïdes, de coumarines et d'anthocyanes.

L'espèce *Clematis cirrhosa* L. a été soumise à deux études une étude qualitative et une étude quantitative.

L'étude qualitative se résume en un screening phytochimique à fin de mettre en évidence les différents phytoconstituants présents au sein de cette plante, ce screening a été réalisé sur les parties aériennes de la plante *Clematis cirrhosa* L. qui a permis de mettre en évidence la richesse de cette espèce en métabolites secondaires tels que les polyphénols, flavonoïdes, tannins, terpènes et stérols.

L'extraction assistée à l'ultrason a été réalisée en utilisant deux systèmes de solvant ; méthanol (100%) et méthanol/eau (70%), alors que l'huile essentielle a été obtenue par hydrodistillation avec un rendement de 0.016%.

L'étude quantitative se résume à la détermination de la teneur des polyphénols totaux et en flavonoïdes des deux extraits, l'ensemble des résultats ont révélé la richesse de ces extraits en polyphénols et en flavonoïdes. L'extrait méthanolique possède la teneur la plus élevée en polyphénols  $84.05 \pm 0.80$  mg EAG/g ES et en flavonoïdes  $114.60 \pm 2.42$  µg EQ/g ES.

La caractérisation par HPLC/DAD des composés phénoliques, contenus dans les deux extraits de *Clematis cirrhosa* L., a permis l'identification et la quantification de huit acides phénoliques ((1) acide gallique, (3) acide chlorogénique, (4) acide caféique, (5) acide hydroxybenzoïque, (7) acide syringique, (8) acide trans-férulique, (9) acide benzoïque, (10) acide cinnamique) et de deux flavonoïdes ((2) catéchine et (6) épicatechine)).

Les deux extraits ont la même composition phénolique, à l'exception de (8) acide trans-férulique et de (10) acide cinnamique qui ne sont détectés que dans l'extrait méthanolique.

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle des parties aériennes de plante *Clematis cirrhosa* L. par GC/MS a montré que cette huile est constituée de: (21) phytol 30.1%, (22) acide palmitique 29%, (17) juniper camphor 14.5%, (13) Hexahydrofarnesyl acétone 8.1%, (14) thymol 2.7%, (11) octanol 2.6%, (19) ester méthylique d'acide linoléique 2.5%, (20) Ester éthylique d'acide linoléique 2.1%, (18) myristicine 1.8%, (16) ester éthylique d'acide palmitique 1.4%, (15) ester méthylique d'acide palmitique 0.9%, (12) nonanol 0.5%

En comparant nos résultats obtenues avec ceux décrits dans la littérature sur les espèces appartenant au genre *Clematis*, on peut conclure qu'il ya des ressemblances et des différences.

La différence est due probablement à diverses conditions notamment l'environnement, l'origine géographique, la période de récolte, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage et la méthode d'extraction.

L'activité antioxydante des deux extraits et de l'huile essentielle de la plante *Clematis cirrhosa* L. a été évaluée par cinq méthodes différentes (TAC, DPPH, ABTS<sup>+</sup>, FRAP et CUPRAC). Les résultats obtenus pour les deux extraits étudiés ont montré une bonne activité antioxydante où l'extrait méthanolique possède l'activité antioxydante la plus élevée.

Une bonne corrélation a été établie entre activité antioxydante et la teneur en polyphénols et en flavonoïdes, démontrant que l'activité observée est due à l'effet antioxydant des polyphénols en particulier les flavonoïdes. Les résultats de l'activité antioxydante de l'huile essentielle ont montré une bonne activité obtenue par le test TAC ( $291.36 \pm 1.82$  mg EAA/g ES) et des activités modérés à faibles par les autres tests utilisés. Ceci est dû à la nature de la composition chimique de cette huile.

De plus nous avons évalué les activités inhibitrices d'enzyme du cholinestérase (AChE et BChE), de l' $\alpha$ -amylase, de l' $\alpha$ -glucosidase et de la tyrosinase, pour les extraits méthanolique et hydrométhanolique de la *Clematis cirrhosa* L. L'extrait méthanolique donne des activités inhibitrices élevées pour les enzymes BChE et  $\alpha$ -amylase dont les valeurs sont respectivement ( $47.67 \pm 1.86$  % ;  $36.63 \pm 2.17$  %), alors que l'extrait hydrométhanolique donne des activités inhibitrices élevées pour les enzymes : AChE, tyrosinase et  $\alpha$ -glucosidase ( $78.38 \pm 3.6$  % ;  $86.56 \pm 0.59$  ;  $40.93 \pm 4.50$  %) respectivement. A l'issue de ces résultats, les deux extraits montrent des activités inhibitrices d'enzymes très importantes.

À partir de ces résultats, on peut conclure que l'étude de la composition chimique et de l'activité biologique des extraits méthanolique et hydrométhanolique ainsi que de l'huile essentielle de *Clematis cirrhosa* L. Suggèrent que, cette plante représente une source naturelle

et prometteuse de molécules chimiques qui possède des activités biologiques très importantes, cette activité est différente d'un extrait à l'autre, selon le solvant d'extraction utilisé qui influe sur la nature des composés présents dans les deux extraits et leur efficacité sur l'activités biologiques.

Il convient de dire qu'en perspectives:

- Tester les activités biologiques des extraits étudiés *in vitro*.
- Tester d'autres activités biologiques *in vivo* et *in vitro* à savoir, l'activité anti bactérienne antifongique.
- Isoler et identifier en utilisant les méthodes spectroscopiques les principes actifs responsables à ces propriétés pharmacologiques, en particulier les polyphénols et tester *in vivo* leurs activités (antioxydante et inhibition enzymatique)
- Le présent travail n'est que le commencement d'une longue investigation ; l'étude des plantes médicinales en Algérie, en l'occurrence la plante étudiée ici devant se poursuivre pour identifier et caractériser de nouvelles molécules bioactives purs.

# *Annexe 1*

## Fiche d'enquête

### Partie I :

Date : .....

Commune : .....

### Personne interrogée :

Féminin

Masculin

Age : .....

### Niveau d'étude :

Analphabète

Non analphabète

### Partie II :

Nom local de la plante : .....

### Parties utilisées:

Feuille

Fleur

Racine

Autres : .....  .....

### Maladies traitées:

Nerf sciatique

Rhumatisme

Diurétique

Brûlure

Autres.....

### Modes de préparations:

Décoction

Infusion

Fumigation

Poudre

Cataplasme

Fraîche

Macération

Autres : .....



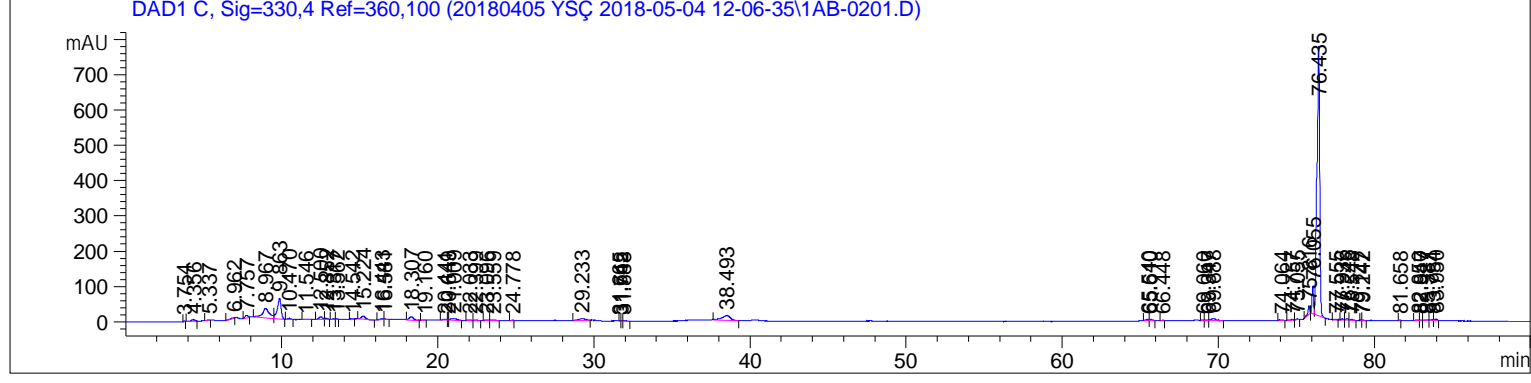
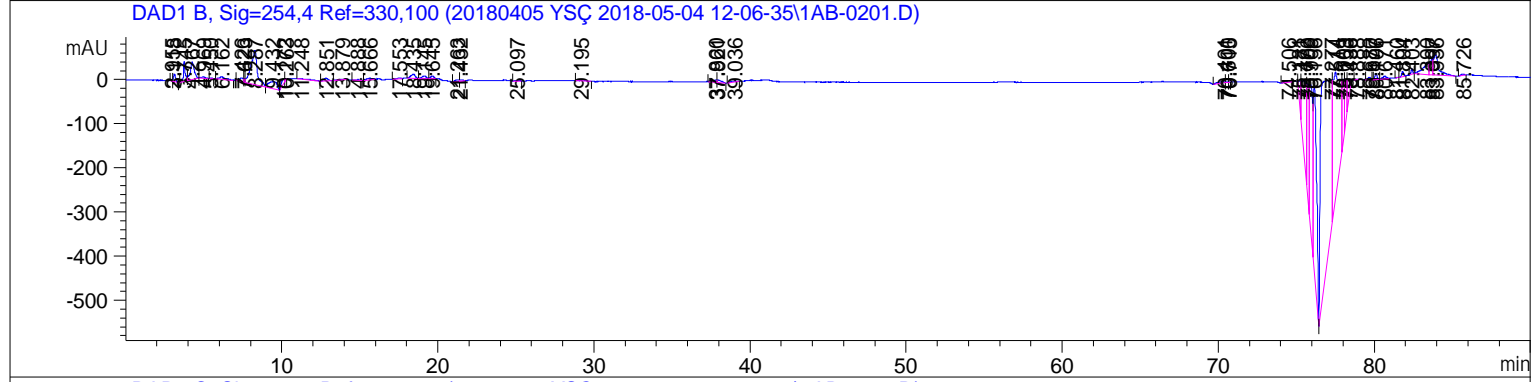
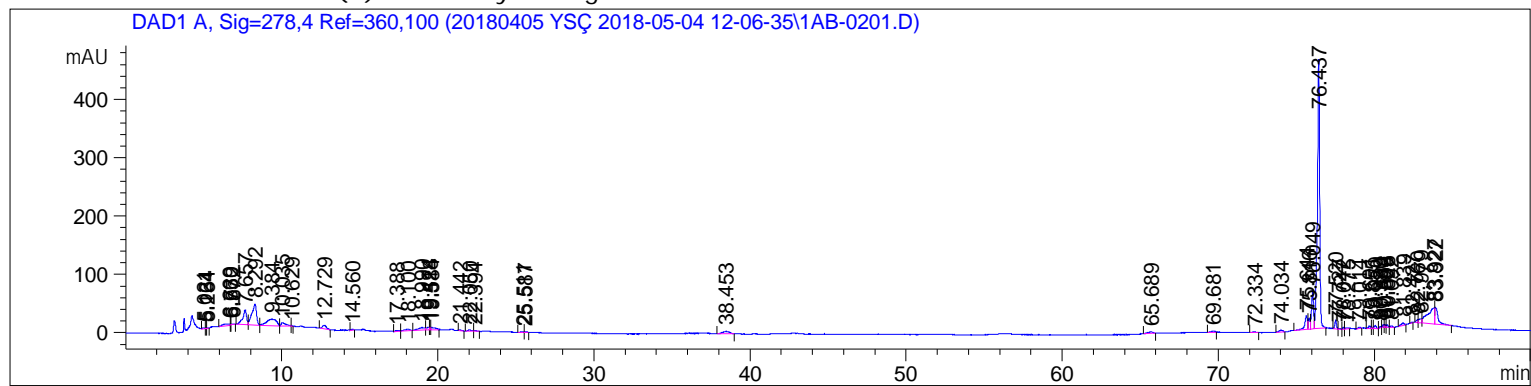
## *Annexe 2*

Sample Name: C-100

```

=====
Acq. Operator   : ADMIN                      Seq. Line   :    2
Acq. Instrument : UPLC                      Location    : P1-A-02
Injection Date  : 5/4/2018 1:38:26 PM       Inj         :    1
                                           Inj Volume  : 20.000 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\20180405 YŞÇ 2018-05-04 12-06-35\FENOLIK MADDE METOD.M
Last changed   : 8/1/2017 12:30:25 PM by ADMIN
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\Y1KAMA.M
Last changed   : 4/24/2017 5:31:54 PM by ADMIN
Additional Info : Peak(s) manually integrated
    
```



Sample Name: C-100

Signal 1: DAD1 A, Sig=278, 4 Ref=360, 100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.021	VV	0.1532	22.07341	1.82388	0.2127
2	5.164	VV	0.0805	7.32863	1.24863	0.0706
3	5.234	VB	0.0744	6.04781	1.13024	0.0583
4	6.669	BV	0.4931	85.38995	2.07941	0.8228
5	6.730	VV	0.0418	5.60441	1.82543	0.0540
6	6.872	VB	0.1451	15.87237	1.39093	0.1529
7	7.657	BV	0.2413	429.00476	25.11152	4.1336
8	8.292	VB	0.2929	727.97595	35.25480	7.0143
9	9.384	BB	0.5137	478.41364	11.12527	4.6097
10	10.035	BV	0.2987	132.48776	5.54531	1.2766
11	10.629	VV	0.0952	8.74296	1.28740	0.0842
12	12.729	BB	0.2293	106.99227	6.08064	1.0309
13	14.560	VV	0.1304	13.63401	1.36626	0.1314
14	17.388	BV	0.2082	22.00398	1.28233	0.2120
15	18.100	VB	0.3181	62.22143	2.32595	0.5995
16	18.990	BV	0.3252	120.29437	4.42412	1.1591
17	19.424	VV	0.1732	60.64375	4.38902	0.5843
18	19.518	VV	0.0805	23.55404	4.25896	0.2269
19	19.584	VB	0.2304	77.51353	4.02976	0.7469
20	21.442	VB	0.1595	14.85949	1.27973	0.1432
21	22.050	BV	0.2172	31.96843	1.81731	0.3080
22	22.394	VB	0.1575	13.68236	1.09698	0.1318
23	25.511	BV	0.1896	21.82470	1.41782	0.2103
24	25.587	VV	0.1285	13.68857	1.37091	0.1319
25	38.453	BV	0.3977	147.65421	4.39814	1.4227
26	65.689	VB	0.2989	61.71262	2.45841	0.5946
27	69.681	VV	0.2111	32.96324	1.93117	0.3176
28	72.334	BV	0.2049	19.79539	1.19729	0.1907
29	74.034	VB	0.1953	51.76085	3.33004	0.4987
30	75.644	BV	0.1760	292.08826	23.99564	2.8144
31	75.816	VV	0.1235	153.19754	18.33915	1.4761
32	76.049	VV	0.1399	617.88879	66.79528	5.9535
33	76.437	VB	0.1472	4649.46387	462.69440	44.7989
34	77.520	VV	0.1206	108.31599	14.26448	1.0437
35	77.727	VB	0.1057	11.97381	1.40094	0.1154
36	78.012	BV	0.0942	19.38404	3.13146	0.1868
37	78.275	VB	0.1610	19.30400	1.55288	0.1860
38	79.014	BB	0.1332	20.39399	2.03090	0.1965
39	79.691	BV	0.1521	41.54850	4.03652	0.4003
40	79.855	VV	0.0935	17.73326	2.42028	0.1709
41	80.050	VB	0.1402	44.98811	5.03583	0.4335
42	80.380	BB	0.0961	10.10391	1.73083	0.0974
43	80.582	BV	0.0969	30.01990	4.43742	0.2893
44	80.696	VV	0.1005	28.75404	4.06614	0.2771
45	80.828	VB	0.0975	24.41445	3.98278	0.2352
46	81.092	BB	0.1254	18.52296	2.05098	0.1785
47	81.839	BB	0.1771	50.83116	3.77566	0.4898
48	82.427	BV	0.0999	9.47318	1.38304	0.0913
49	82.760	BV	0.1023	33.87055	4.47279	0.3264
50	82.979	VV	0.1567	82.93630	6.77875	0.7991
51	83.827	VV	0.3856	873.49408	27.42417	8.4164

Sample Name: C-100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
52	83.922	VB	0.1809	404.11301	28.25300	3.8937

Totals : 1.03785e4 830.33094

Signal 2: DAD1 B, Sig=254, 4 Ref=330, 100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.955	BV	0.0809	6.90164	1.16936	0.0116
2	3.118	VB	0.1406	153.98961	17.17949	0.2578
3	3.745	BV	0.1056	359.07242	45.75019	0.6011
4	4.267	VB	0.2377	700.62842	39.34964	1.1729
5	4.969	BB	0.2235	44.81736	2.56941	0.0750
6	5.450	BB	0.1296	13.19675	1.54579	0.0221
7	6.162	VB	0.3159	154.08177	6.28756	0.2579
8	7.426	BV	0.2445	145.24712	7.75579	0.2432
9	7.623	VV	0.0535	30.46305	7.81279	0.0510
10	8.287	VV	0.3841	2224.32397	77.20575	3.7236
11	9.432	VB	0.4492	601.96881	16.36204	1.0077
12	10.172	BV	0.2319	164.06807	8.62763	0.2747
13	10.263	VB	0.0934	27.41445	3.65863	0.0459
14	11.248	BB	0.6454	118.31329	2.21423	0.1981
15	12.851	BB	0.2639	139.77339	6.52570	0.2340
16	13.879	BB	0.3254	52.79552	1.97770	0.0884
17	14.888	BB	0.2817	46.01986	1.96149	0.0770
18	15.666	BB	0.3195	90.20538	3.39996	0.1510
19	17.553	BB	0.2574	24.87299	1.22217	0.0416
20	18.435	BV	0.2672	183.18565	9.32602	0.3067
21	19.145	VV	0.2845	131.23164	6.26115	0.2197
22	19.645	VB	0.2114	98.35615	6.12197	0.1647
23	21.263	BV	0.2262	53.22918	2.92590	0.0891
24	21.432	VB	0.1318	24.41637	2.37769	0.0409
25	25.097	BV	0.2284	27.35604	1.54624	0.0458
26	29.195	BB	0.3946	71.05782	2.23701	0.1190
27	37.860	VV	0.2179	98.19334	5.50933	0.1644
28	37.921	VB	0.2260	105.55683	5.64952	0.1767
29	39.036	BV	0.3626	81.08517	2.69797	0.1357
30	70.401	BV	0.5175	123.95898	2.83869	0.2075
31	70.600	VV	0.1605	27.94296	2.13711	0.0468
32	70.715	VV	0.0835	8.30299	1.39376	0.0139
33	74.506	BV	0.3488	99.00881	3.38924	0.1657
34	75.181	BV	0.1642	564.59796	41.63148	0.9452
35	75.472	VV	0.2669	3470.23828	161.36313	5.8094
36	75.700	VV	0.1463	2513.38135	247.88425	4.2075
37	75.909	VV	0.2082	4737.77295	332.56158	7.9313
38	76.156	VB	0.2341	6876.63574	426.43353	11.5119
39	77.277	BV	0.7377	2.07900e4	334.22440	34.8036
40	77.514	VV	0.3831	8744.25098	288.95309	14.6384
41	78.009	VV	0.1420	1390.90430	139.87497	2.3285
42	78.153	VV	0.1417	1022.94690	101.37717	1.7125
43	78.436	VB	0.2894	602.04132	25.50358	1.0079

Sample Name: C-100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
44	78.888	BB	0.1497	15.73748	1.46084	0.0263
45	79.680	VV	0.1644	63.67529	5.69853	0.1066
46	79.877	VV	0.0738	8.36746	1.63360	0.0140
47	80.106	VB	0.1542	133.87491	13.91966	0.2241
48	80.671	BV	0.2327	113.76212	6.88776	0.1904
49	81.460	BB	0.1075	9.27403	1.32833	0.0155
50	81.804	BB	0.1242	103.60519	12.05903	0.1734
51	82.403	BB	0.1095	82.90217	11.58527	0.1388
52	83.390	BV	0.3294	684.96783	27.23787	1.1467
53	83.697	VV	0.1743	454.28506	34.79919	0.7605
54	83.936	VB	0.3272	1085.09692	45.02682	1.8165
55	85.726	BB	0.2766	35.81119	1.57882	0.0599

Totals : 5.97352e4 2570.00980

Signal 3: DAD1 C, Sig=330, 4 Ref=360, 100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.754	BB	0.0593	10.05195	2.59015	0.0692
2	4.356	BV	0.1933	77.28065	5.08544	0.5317
3	5.337	VV	0.1442	16.88704	1.58618	0.1162
4	6.962	BV	0.2382	31.69538	1.60643	0.2181
5	7.757	BV	0.1680	92.43085	6.91270	0.6360
6	8.967	VV	0.4161	854.47375	27.08261	5.8793
7	9.863	VB	0.2506	985.21655	57.87732	6.7789
8	10.470	BB	0.1829	42.05931	2.97515	0.2894
9	11.546	VB	0.2251	30.81072	1.68701	0.2120
10	12.500	VV	0.2282	133.97006	7.88606	0.9218
11	12.852	VB	0.1582	43.96396	3.60654	0.3025
12	13.317	BV	0.1699	17.15499	1.26714	0.1180
13	13.562	VV	0.1416	13.57332	1.22232	0.0934
14	14.542	VV	0.1436	12.72025	1.07885	0.0875
15	15.224	BB	0.2591	197.71690	9.98213	1.3604
16	16.443	VV	0.2196	47.70286	2.60520	0.3282
17	16.581	VB	0.1270	21.54488	2.14832	0.1482
18	18.307	VB	0.2651	176.16077	9.29516	1.2121
19	19.160	BV	0.1843	23.82245	1.61311	0.1639
20	20.441	BV	0.1964	33.78613	2.11411	0.2325
21	20.649	VV	0.0478	6.08359	1.69614	0.0419
22	21.009	VB	0.3487	144.73640	5.07593	0.9959
23	22.033	BB	0.1724	22.70354	1.78436	0.1562
24	22.399	BB	0.1881	16.65144	1.07839	0.1146
25	23.096	BV	0.2255	28.38038	1.55105	0.1953
26	23.559	VB	0.2571	52.28959	2.50976	0.3598
27	24.778	BV	0.1225	12.12442	1.30428	0.0834
28	29.233	BV	0.3950	151.94791	4.55753	1.0455
29	31.665	VV	0.0832	8.49429	1.43158	0.0584
30	31.742	VV	0.0902	10.30637	1.53739	0.0709
31	31.888	VV	0.2055	25.10266	1.46789	0.1727
32	38.493	VV	0.4752	524.26141	13.43546	3.6073

Sample Name: C-100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
33	65.540	BV	0.1570	48.04441	3.91933	0.3306
34	65.610	VB	0.1606	54.81340	4.19191	0.3772
35	66.448	BV	0.1350	10.86519	1.04718	0.0748
36	69.060	BV	0.0869	6.25225	1.00036	0.0430
37	69.347	VV	0.1371	21.47569	1.94001	0.1478
38	69.688	VB	0.2856	136.87459	5.88051	0.9418
39	74.064	VB	0.1827	27.92361	2.13326	0.1921
40	74.757	BV	0.1759	18.73426	1.28627	0.1289
41	75.055	VV	0.1287	22.56156	2.33581	0.1552
42	75.816	BB	0.1260	197.56683	24.02123	1.3594
43	76.055	BV	0.1144	564.13611	77.96196	3.8816
44	76.435	VB	0.1731	9260.14160	765.52783	63.7158
45	77.555	BB	0.1178	14.93772	1.67866	0.1028
46	77.936	BV	0.1173	25.12013	2.78264	0.1728
47	78.246	VV	0.1474	46.41681	4.12095	0.3194
48	78.548	VB	0.1942	35.81910	2.24378	0.2465
49	79.147	VV	0.0627	5.05336	1.11911	0.0348
50	79.242	VB	0.0924	9.66741	1.40223	0.0665
51	81.658	BV	0.0788	7.62373	1.25600	0.0525
52	82.850	BV	0.1784	23.20415	1.62704	0.1597
53	82.947	VB	0.0904	15.37213	2.17707	0.1058
54	83.387	BB	0.1810	25.78701	1.80128	0.1774
55	83.754	BV	0.1110	29.99607	3.53551	0.2064
56	83.950	VB	0.1742	59.02251	4.29722	0.4061

Total s : 1.45335e4 1106.93886

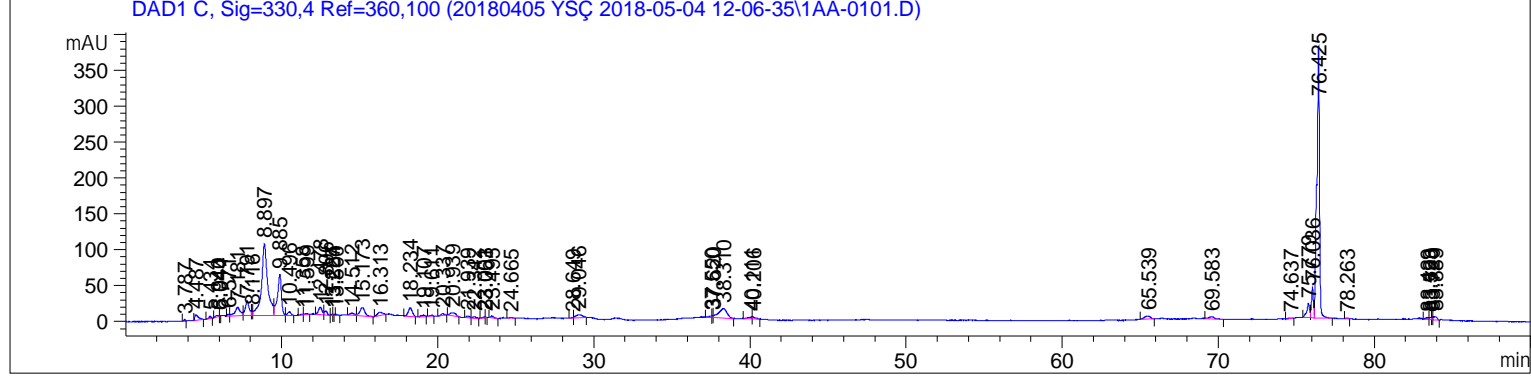
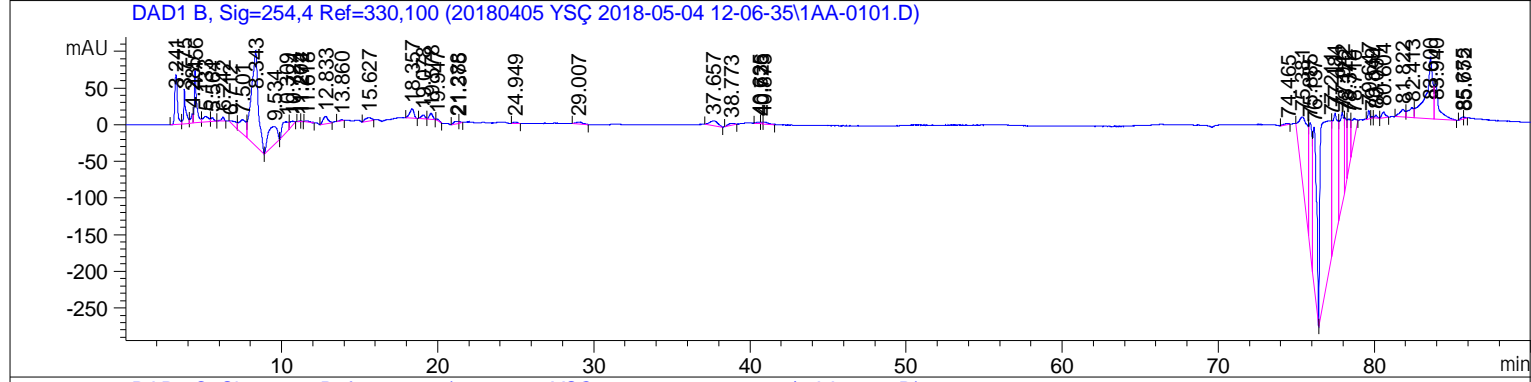
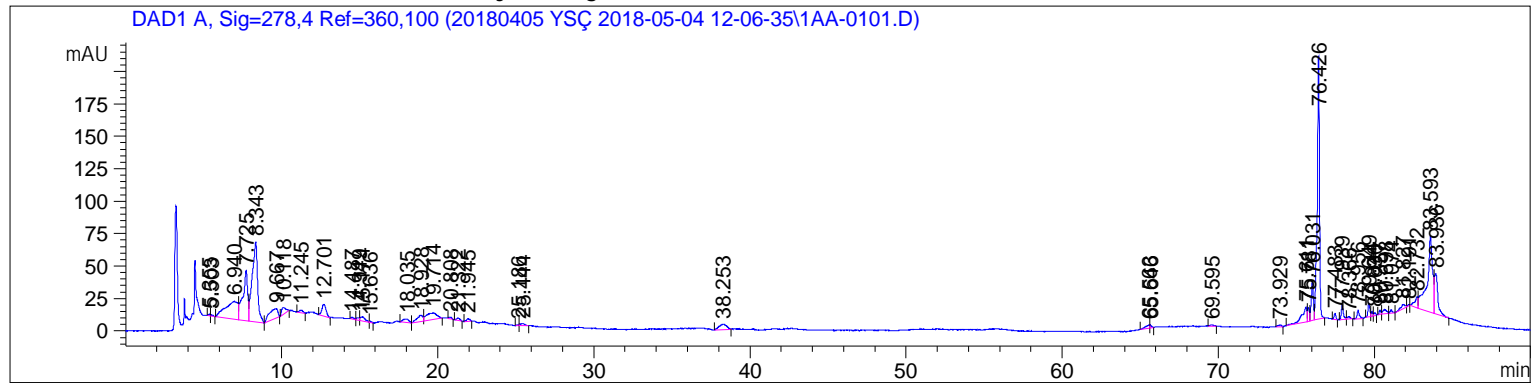
=====  
\*\*\* End of Report \*\*\*

Sample Name: C-70

```

=====
Acq. Operator   : ADMIN                      Seq. Line :    1
Acq. Instrument : UPLC                      Location  : P1-A-01
Injection Date  : 5/4/2018 12:07:24 PM      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 20.000 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\20180405 YŞÇ 2018-05-04 12-06-35\FENOLIK MADDE METOD.M
Last changed   : 8/1/2017 12:30:25 PM by ADMIN
Analysis Method: C:\CHEM32\1\METHODS\Y1KAMA.M
Last changed   : 4/24/2017 5:31:54 PM by ADMIN
Additional Info: Peak(s) manually integrated
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier    :      1.0000
Dilution      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Sample Name: C-70

Signal 1: DAD1 A, Sig=278, 4 Ref=360, 100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.355	BV	0.1152	10.10885	1.12123	0.1018
2	5.503	VB	0.1160	10.39441	1.12282	0.1047
3	6.940	BV	0.6705	770.52515	13.56977	7.7615
4	7.725	VV	0.2998	840.22687	38.62474	8.4636
5	8.343	VB	0.3318	1493.72668	61.84639	15.0463
6	9.667	BB	0.5157	309.87857	7.38255	3.1214
7	10.118	BB	0.2663	101.02906	5.25579	1.0177
8	11.245	BB	0.2109	32.83807	1.96598	0.3308
9	12.701	BB	0.2380	165.42966	9.02024	1.6664
10	14.487	VV	0.1854	20.54792	1.41504	0.2070
11	14.949	VV	0.1321	22.94541	2.12220	0.2311
12	15.174	VV	0.2655	71.43397	3.23603	0.7196
13	15.636	VB	0.1042	8.48034	1.07258	0.0854
14	18.035	BB	0.3091	67.84476	2.61123	0.6834
15	18.928	BV	0.3071	118.36260	4.55548	1.1923
16	19.714	VB	0.5884	250.60622	5.14399	2.5244
17	20.808	VB	0.1465	15.88987	1.35823	0.1601
18	21.322	BB	0.1993	27.34581	1.82022	0.2755
19	21.945	BB	0.1835	31.00489	2.10907	0.3123
20	25.186	BV	0.1110	11.06646	1.33102	0.1115
21	25.444	VB	0.2481	32.90261	1.62579	0.3314
22	38.253	BV	0.3965	143.22453	4.34608	1.4427
23	65.563	BV	0.2488	49.41085	2.54143	0.4977
24	65.646	VB	0.0876	13.65854	2.10848	0.1376
25	69.595	BB	0.2194	18.83389	1.02958	0.1897
26	73.929	BB	0.1852	20.18431	1.34374	0.2033
27	75.611	BV	0.2988	256.97250	11.23584	2.5885
28	75.781	VV	0.1357	97.19749	10.53130	0.9791
29	76.031	VV	0.1391	290.12946	31.02250	2.9225
30	76.426	VB	0.1441	2018.98010	202.81339	20.3372
31	77.483	BB	0.1223	37.52345	4.84962	0.3780
32	77.939	BV	0.1391	105.35098	11.27007	1.0612
33	78.366	VB	0.1664	25.43163	1.92222	0.2562
34	78.956	BB	0.1548	68.04266	6.57089	0.6854
35	79.649	BV	0.1219	86.51267	10.74757	0.8714
36	79.844	VV	0.1031	25.05242	3.43257	0.2524
37	80.030	VB	0.1134	18.91378	2.21904	0.1905
38	80.357	BV	0.1092	24.62750	3.37211	0.2481
39	80.698	VB	0.2273	58.23665	3.18536	0.5866
40	81.074	BB	0.1322	23.82500	2.52235	0.2400
41	81.827	BV	0.2399	64.11623	3.34136	0.6458
42	82.191	VB	0.1079	9.84079	1.22240	0.0991
43	82.732	BV	0.1842	123.38741	8.56079	1.2429
44	83.593	VV	0.3356	1452.66321	58.11302	14.6327
45	83.936	VB	0.2236	482.83826	31.02112	4.8636

Total s : 9927.54247 587.63319



Sample Name: C-70

Signal 2: DAD1 B, Sig=254, 4 Ref=330, 100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.241	BV	0.1873	802.81824	67.22975	1.7706
2	3.775	VV	0.1196	427.69757	47.23071	0.9433
3	4.285	VV	0.1447	132.69040	12.61594	0.2926
4	4.456	VV	0.1350	697.72363	72.02762	1.5388
5	5.133	VV	0.3264	199.16290	8.00236	0.4392
6	5.564	VB	0.2011	67.00284	4.91371	0.1478
7	6.242	BB	0.1661	56.24164	4.89419	0.1240
8	6.712	BV	0.9154	169.41763	2.17351	0.3736
9	7.501	VV	0.3737	576.41919	19.34066	1.2713
10	8.343	VB	0.3939	3887.04492	130.35432	8.5727
11	9.534	BB	0.5311	1096.79907	24.93707	2.4189
12	10.309	BV	0.3909	436.81998	13.81551	0.9634
13	10.724	VB	0.3365	125.16623	4.50061	0.2760
14	11.204	BV	0.1196	10.84386	1.26999	0.0239
15	11.272	VB	0.0662	5.75191	1.19357	0.0127
16	11.618	BB	0.2465	34.16741	1.65758	0.0754
17	12.833	BV	0.2919	228.57698	10.10674	0.5041
18	13.860	VB	0.2264	26.24100	1.40162	0.0579
19	15.627	BV	0.3413	130.62181	4.62766	0.2881
20	18.357	VB	0.2840	251.50685	12.75881	0.5547
21	19.078	BV	0.2145	85.33450	5.28055	0.1882
22	19.578	VB	0.2084	116.79128	7.81474	0.2576
23	19.947	BB	0.2230	22.28900	1.19851	0.0492
24	21.288	BV	0.2746	65.40001	2.90542	0.1442
25	21.375	VB	0.1036	18.60311	2.42232	0.0410
26	24.949	BB	0.2283	41.26400	2.26737	0.0910
27	29.007	VB	0.4077	81.30412	2.39721	0.1793
28	37.657	BB	0.4299	232.39857	6.42706	0.5125
29	38.773	BB	0.3009	65.25996	2.59926	0.1439
30	40.635	BV	0.1840	31.29739	2.12316	0.0690
31	40.726	VV	0.1239	21.93738	2.28658	0.0484
32	40.873	VB	0.2569	51.37751	2.42765	0.1133
33	74.465	BB	0.3272	35.31039	1.30693	0.0779
34	75.381	BV	0.5797	3831.61865	86.34262	8.4505
35	75.885	VV	0.2234	2682.38818	174.43562	5.9159
36	76.137	VB	0.2455	3705.82007	216.66920	8.1730
37	77.211	BV	0.6642	1.07800e4	193.42821	23.7748
38	77.484	VV	0.3232	4396.98486	173.77271	9.6974
39	77.942	VV	0.2613	2431.32666	123.72919	5.3622
40	78.122	VV	0.1485	1035.19360	97.04008	2.2831
41	78.372	VV	0.1997	1029.86511	67.59870	2.2713
42	78.710	VB	0.2940	707.81421	31.04446	1.5611
43	79.647	VV	0.1135	86.79618	11.56750	0.1914
44	79.849	VB	0.0933	15.98170	2.68982	0.0352
45	80.094	BB	0.1326	40.45778	4.04858	0.0892
46	80.604	BB	0.2161	126.50532	7.92961	0.2790
47	81.822	BV	0.2994	259.86685	10.85203	0.5731
48	82.413	VV	0.3021	338.88495	13.72254	0.7474
49	83.600	VV	0.4006	2564.47095	84.36538	5.6558
50	83.940	VB	0.2849	1029.69104	48.26021	2.2709
51	85.655	BV	0.1749	33.43684	2.33717	0.0737

Sample Name: C-70

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
52	85.772	VB	0.1005	13.69602	1.76590	0.0302

Totals : 4.53421e4 1838.10826

Signal 3: DAD1 C, Sig=330, 4 Ref=360, 100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.787	BV	0.0756	13.03920	2.47004	0.1054
2	4.487	BB	0.2130	125.38573	7.90839	1.0133
3	5.434	BB	0.1370	32.21173	3.26778	0.2603
4	5.940	BV	0.2255	31.79666	1.73757	0.2570
5	6.044	VV	0.0609	5.48578	1.16544	0.0443
6	6.571	BV	0.1178	17.86553	1.89799	0.1444
7	7.181	VV	0.3183	282.29901	11.83636	2.2814
8	7.791	VV	0.2498	375.84930	20.89922	3.0374
9	8.116	VV	0.0612	27.65836	6.29795	0.2235
10	8.897	VV	0.3836	2798.78394	100.28677	22.6185
11	9.885	VV	0.2615	1038.85144	57.29784	8.3955
12	10.496	VV	0.2026	87.70999	5.36869	0.7088
13	11.358	BV	0.1659	14.09923	1.02865	0.1139
14	11.599	VB	0.1678	23.04053	1.79404	0.1862
15	12.478	BV	0.2291	161.38698	10.28123	1.3043
16	12.806	VB	0.1646	65.19513	5.18989	0.5269
17	13.227	BV	0.0767	9.60999	1.78782	0.0777
18	13.284	VV	0.0779	9.92001	1.70537	0.0802
19	13.500	VB	0.1234	15.89895	1.58062	0.1285
20	14.512	BV	0.2516	60.91099	2.89286	0.4923
21	15.173	VB	0.2917	265.78848	11.75904	2.1480
22	16.313	BV	0.2940	108.83108	4.66843	0.8795
23	18.234	BV	0.2529	218.40862	11.96822	1.7651
24	19.107	VB	0.2043	35.27026	2.09639	0.2850
25	19.611	BB	0.1788	21.07231	1.42298	0.1703
26	20.337	BB	0.1968	46.76262	2.92083	0.3779
27	20.939	BB	0.3124	111.38265	4.29704	0.9001
28	21.939	BV	0.1786	33.84410	2.28707	0.2735
29	22.342	VB	0.2012	31.60279	1.94893	0.2554
30	23.001	BV	0.1146	13.42996	1.49770	0.1085
31	23.053	VV	0.0712	6.63172	1.30620	0.0536
32	23.495	BB	0.1880	30.93555	2.07421	0.2500
33	24.665	BB	0.1761	20.16798	1.45149	0.1630
34	28.649	BV	0.0882	8.07132	1.23650	0.0652
35	29.046	VB	0.3502	131.04883	4.44204	1.0591
36	37.550	BV	0.1684	32.84668	2.45032	0.2655
37	37.620	VV	0.0608	12.29441	2.93978	0.0994
38	38.310	VB	0.4460	500.85083	13.52717	4.0477
39	40.111	BV	0.2045	43.98608	2.61191	0.3555
40	40.206	VV	0.2111	43.62587	2.74914	0.3526
41	65.539	VV	0.3741	128.05986	4.21970	1.0349
42	69.583	BB	0.3046	74.81826	3.00390	0.6046
43	74.637	BB	0.1986	16.57876	1.00434	0.1340

Sample Name: C-70

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
44	75.779	BV	0.1792	250.61493	20.13627	2.0254
45	76.036	VV	0.1264	364.92261	43.25571	2.9491
46	76.425	VB	0.1653	4464.22461	379.37811	36.0778
47	78.263	VB	0.1355	14.69176	1.53781	0.1187
48	83.429	BV	0.1689	33.94096	2.52381	0.2743
49	83.593	VV	0.1293	29.83795	3.01870	0.2411
50	83.720	VV	0.0666	18.71539	3.72451	0.1512
51	83.889	VB	0.2037	63.61070	3.91209	0.5141

Totals :                                   1.23739e4   792.06490

=====  
\*\*\* End of Report \*\*\*

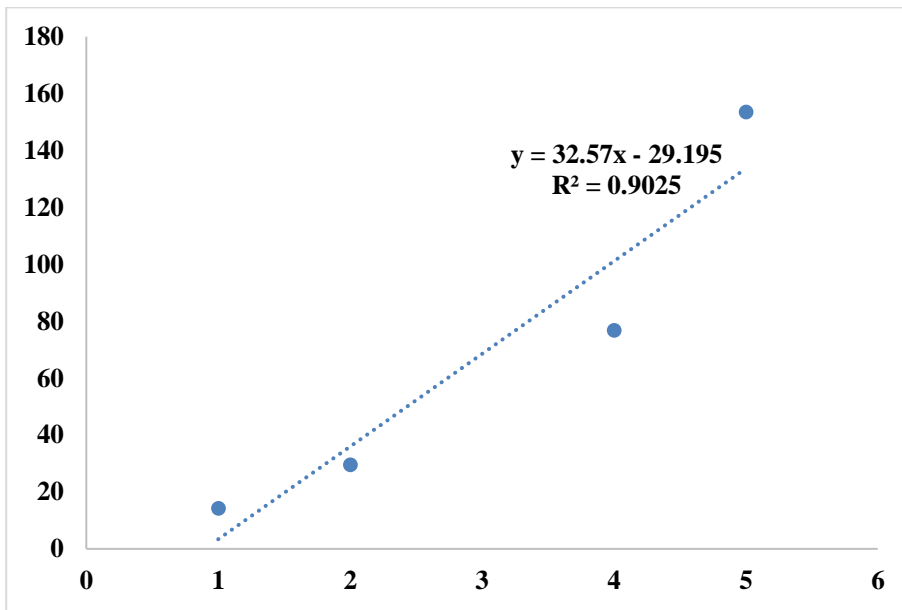


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de l'acide benzoïque

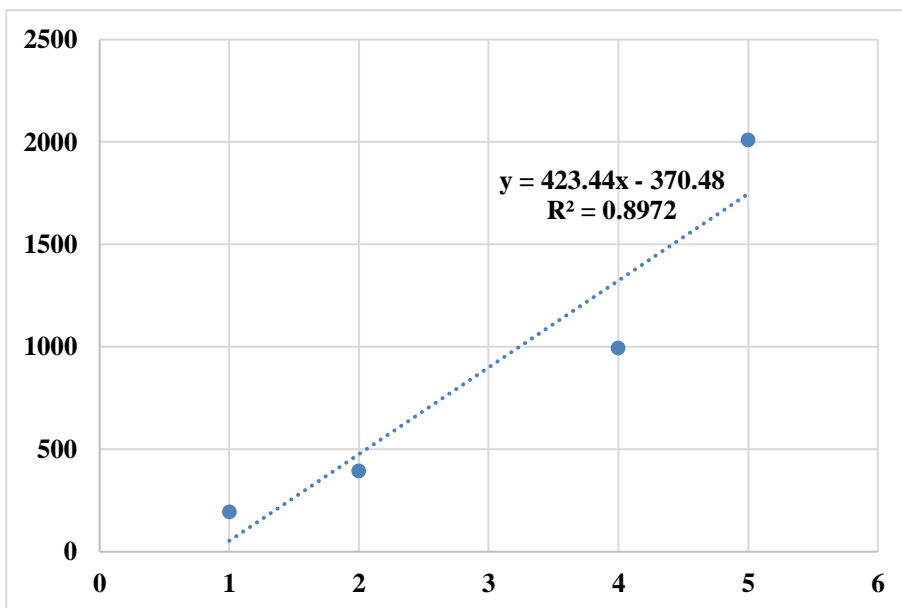


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de l'acide caféique

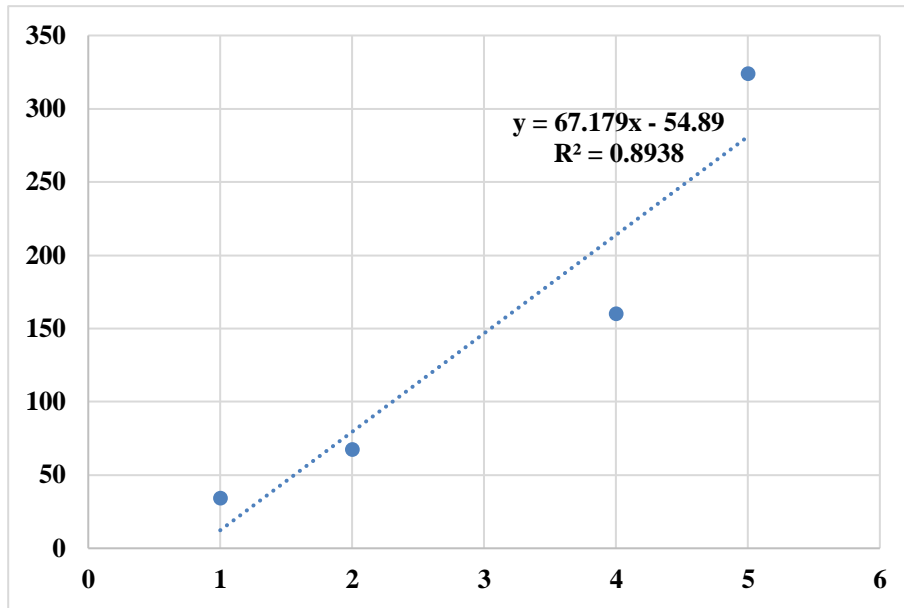


Figure 3 : Courbe d'étalonnage de catéchine

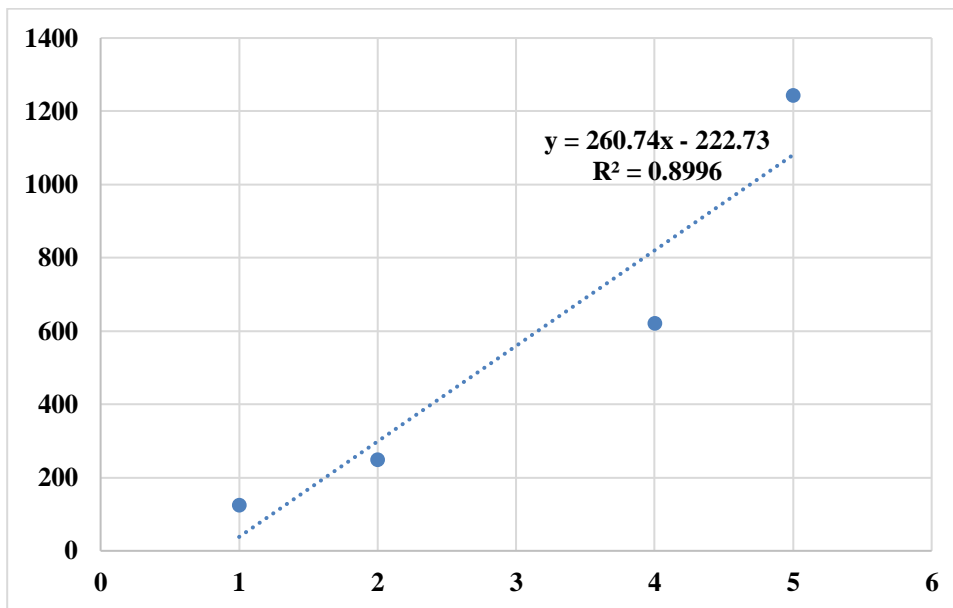


Figure 4 : Courbe d'étalonnage de l'acide cinnamique

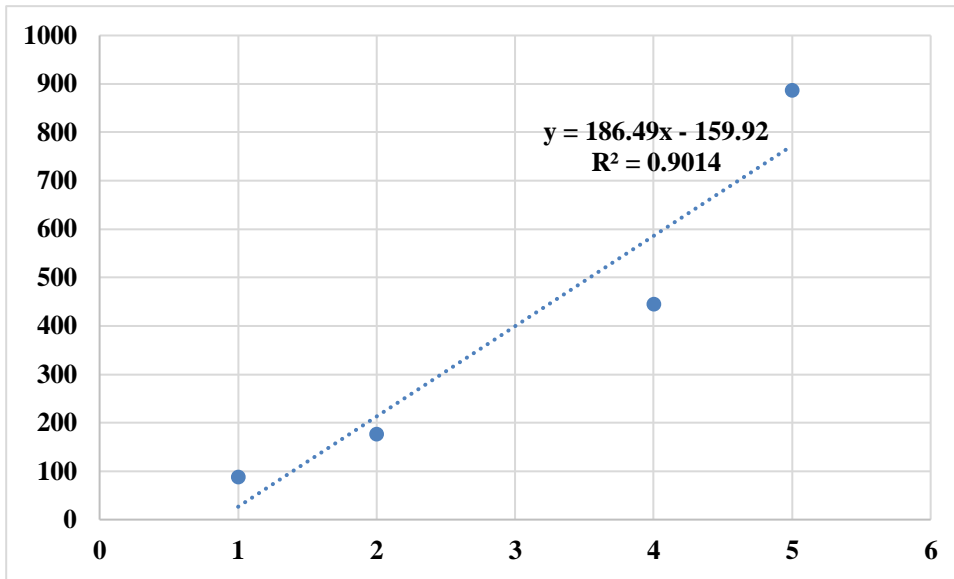


Figure 5 : Courbe d'étalonnage de l'acide chlorogénique

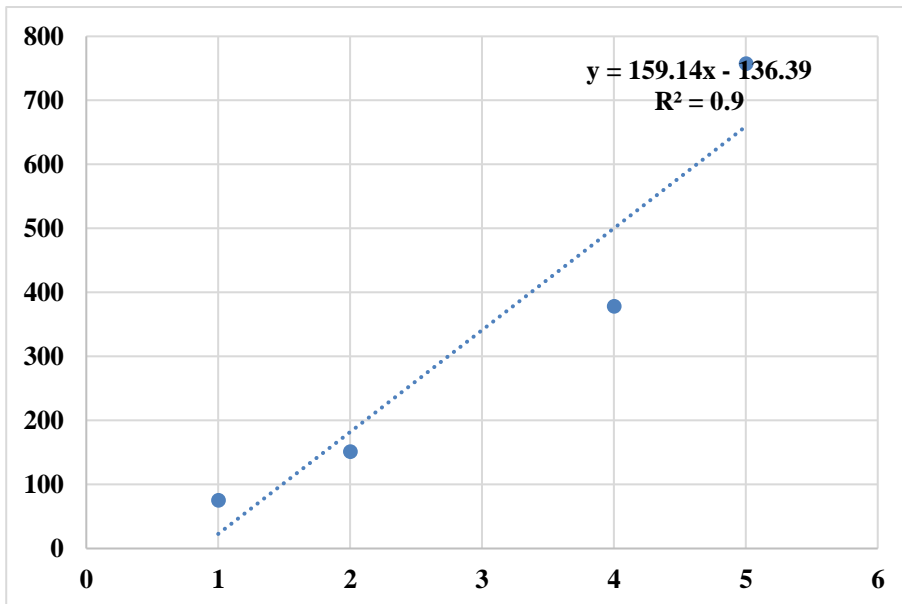


Figure 6 : Courbe d'étalonnage de l'acide coumarique

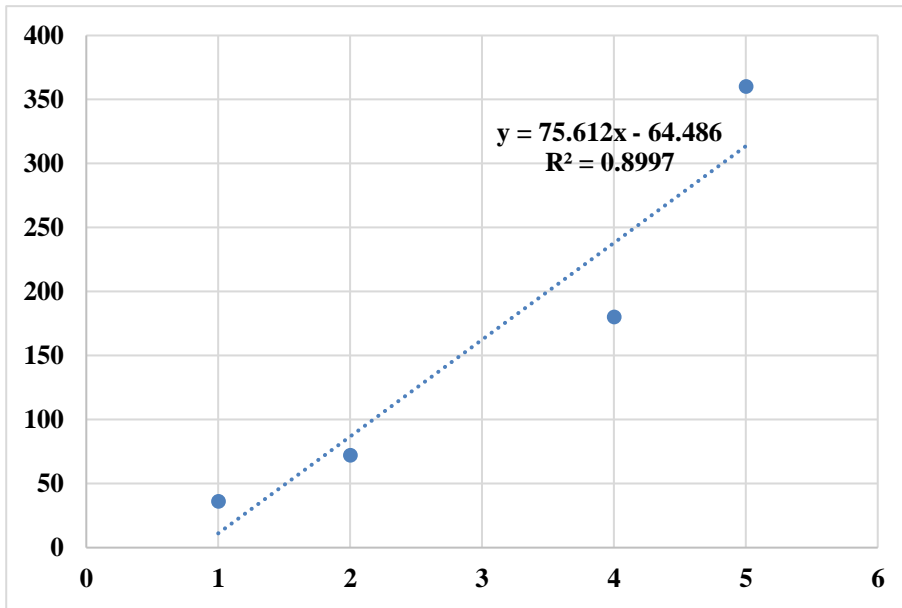


Figure 7 : Courbe d'étalonnage de l'épicatechine

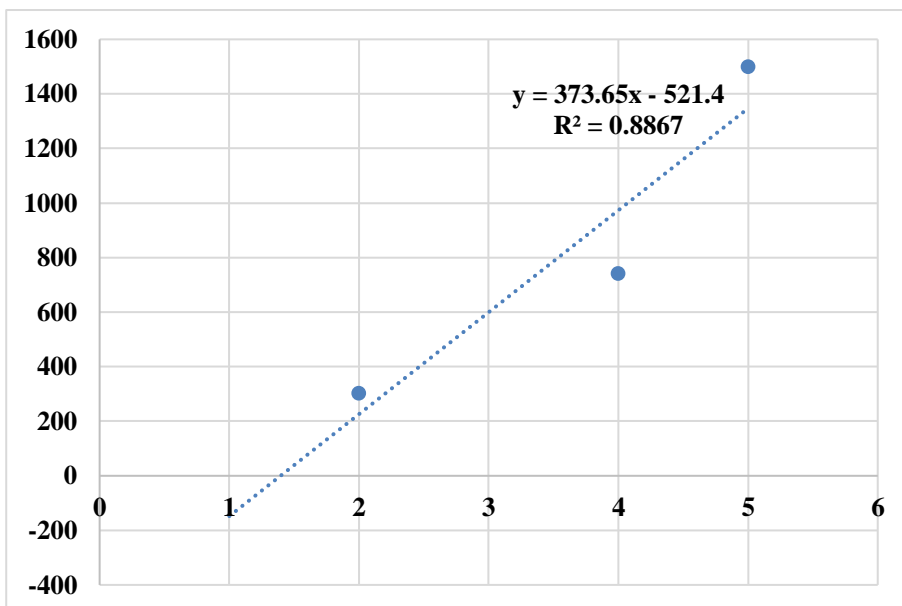


Figure 8 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

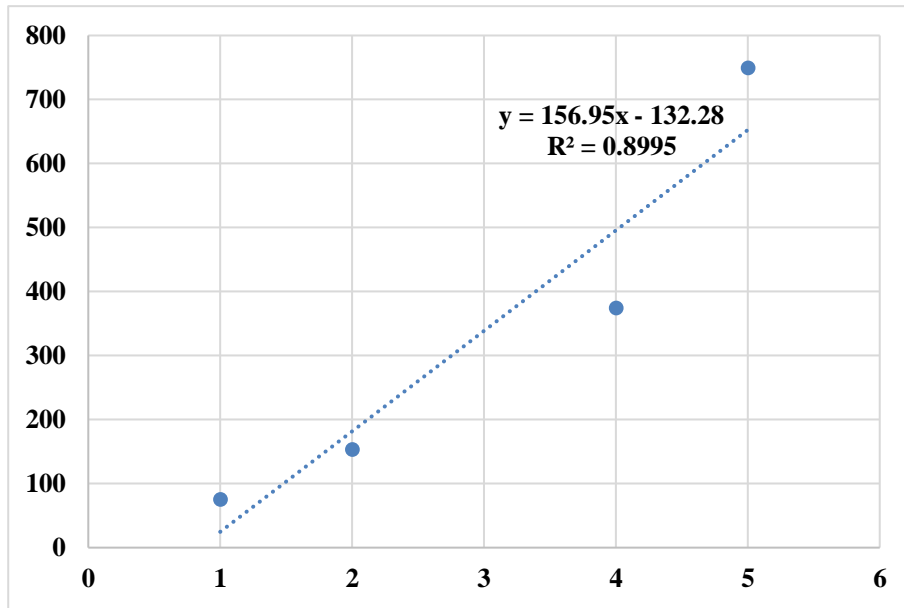


Figure 9 : Courbe d'étalonnage d'hésperidine

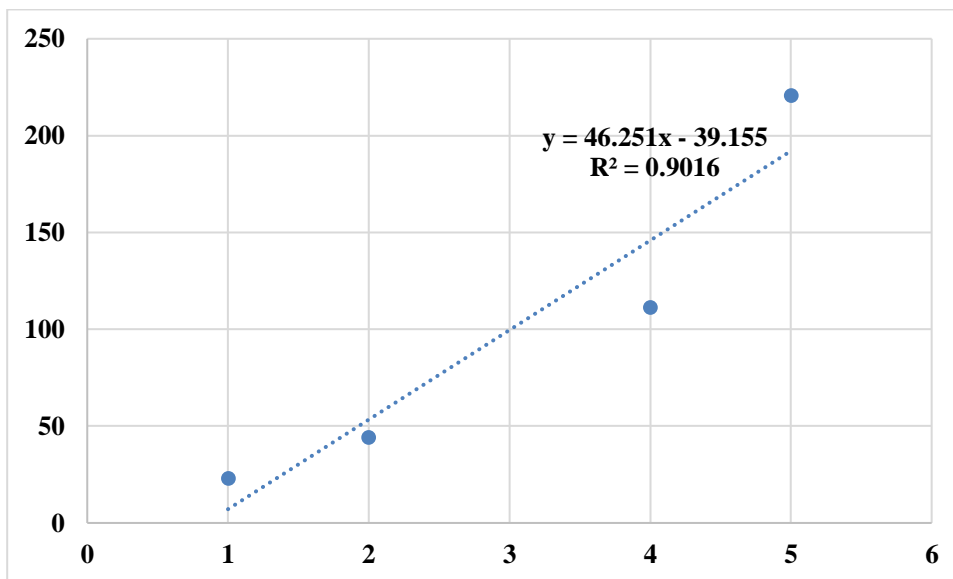


Figure 10 : Courbe d'étalonnage de l'acide hydroxybenzoïque



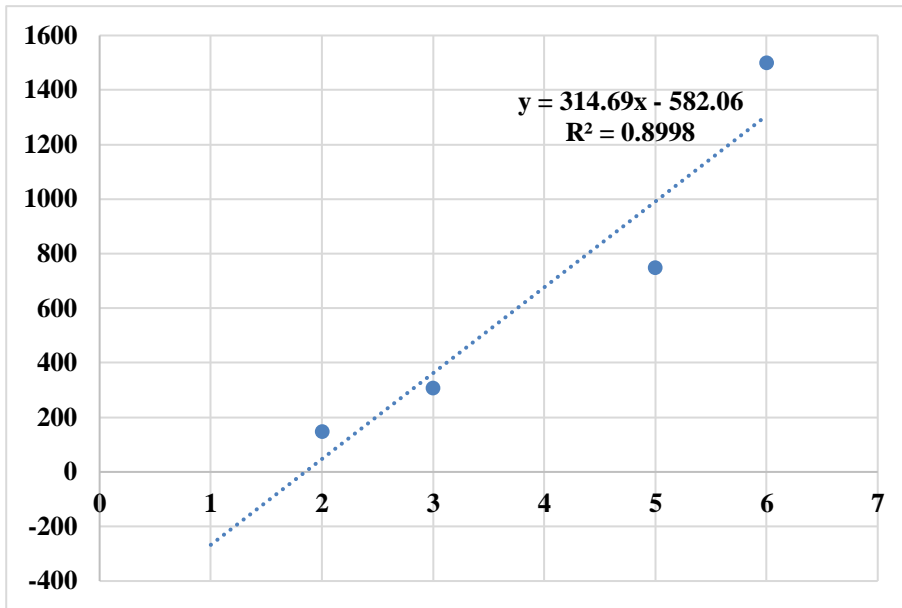


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de quercitine

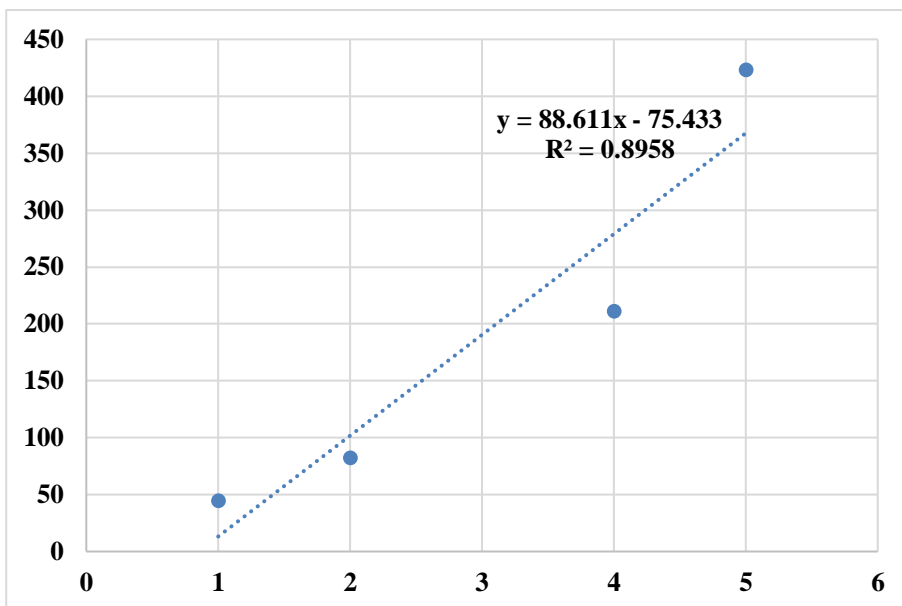


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de l'acide rosmarinique

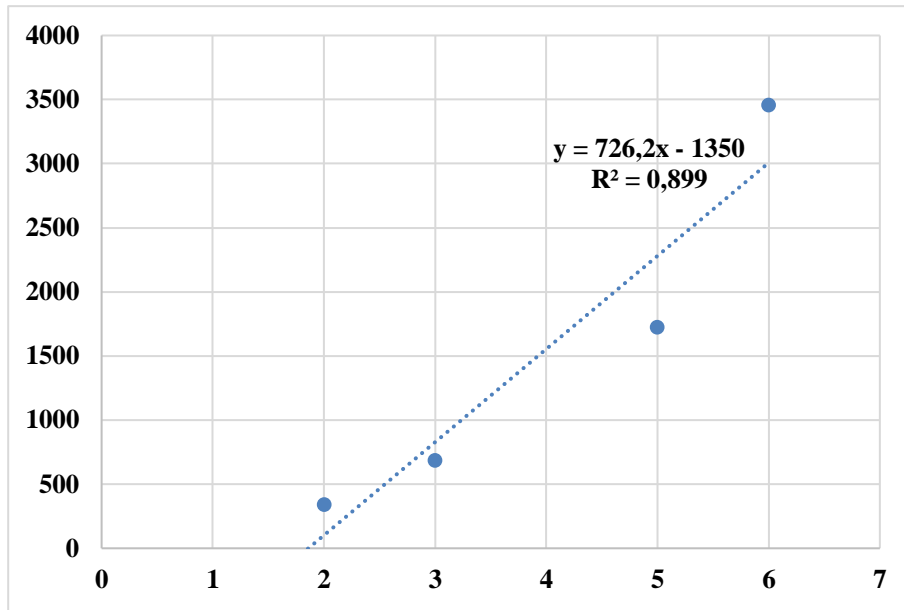


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de l'acide sinapique

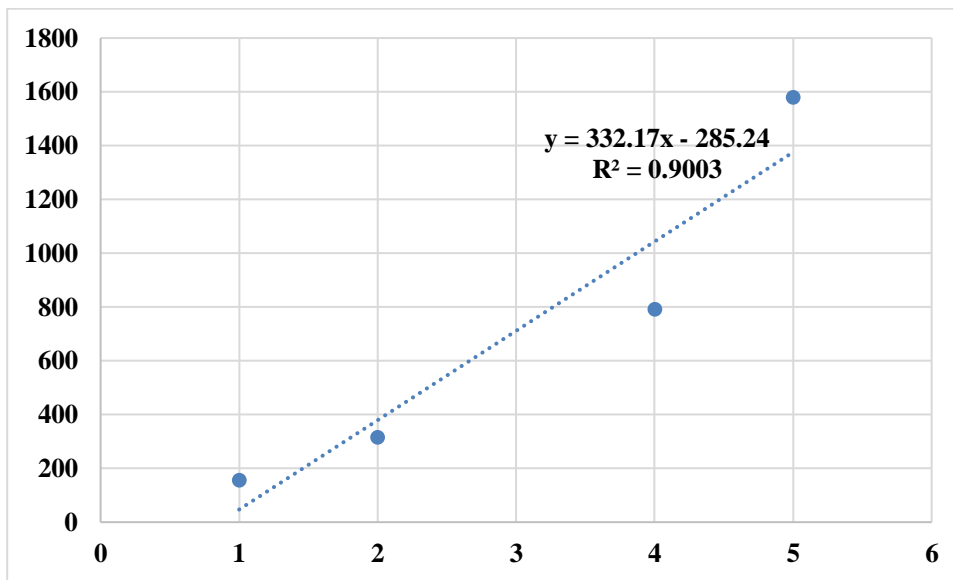


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de l'acide syringique

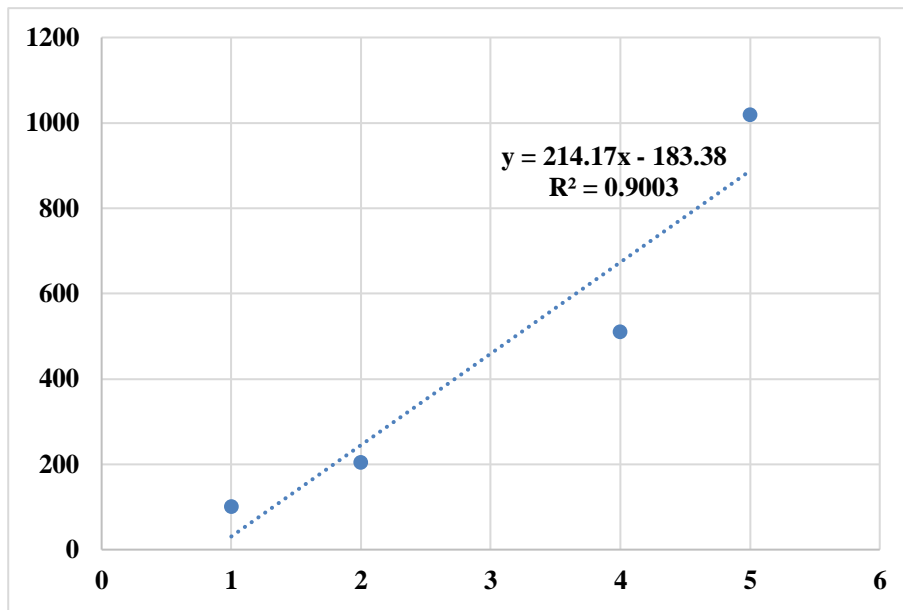


Figure 15 : Courbe d'étalonnage de l'acide férulique

TIC: UOJQJUB33.D\data.ms

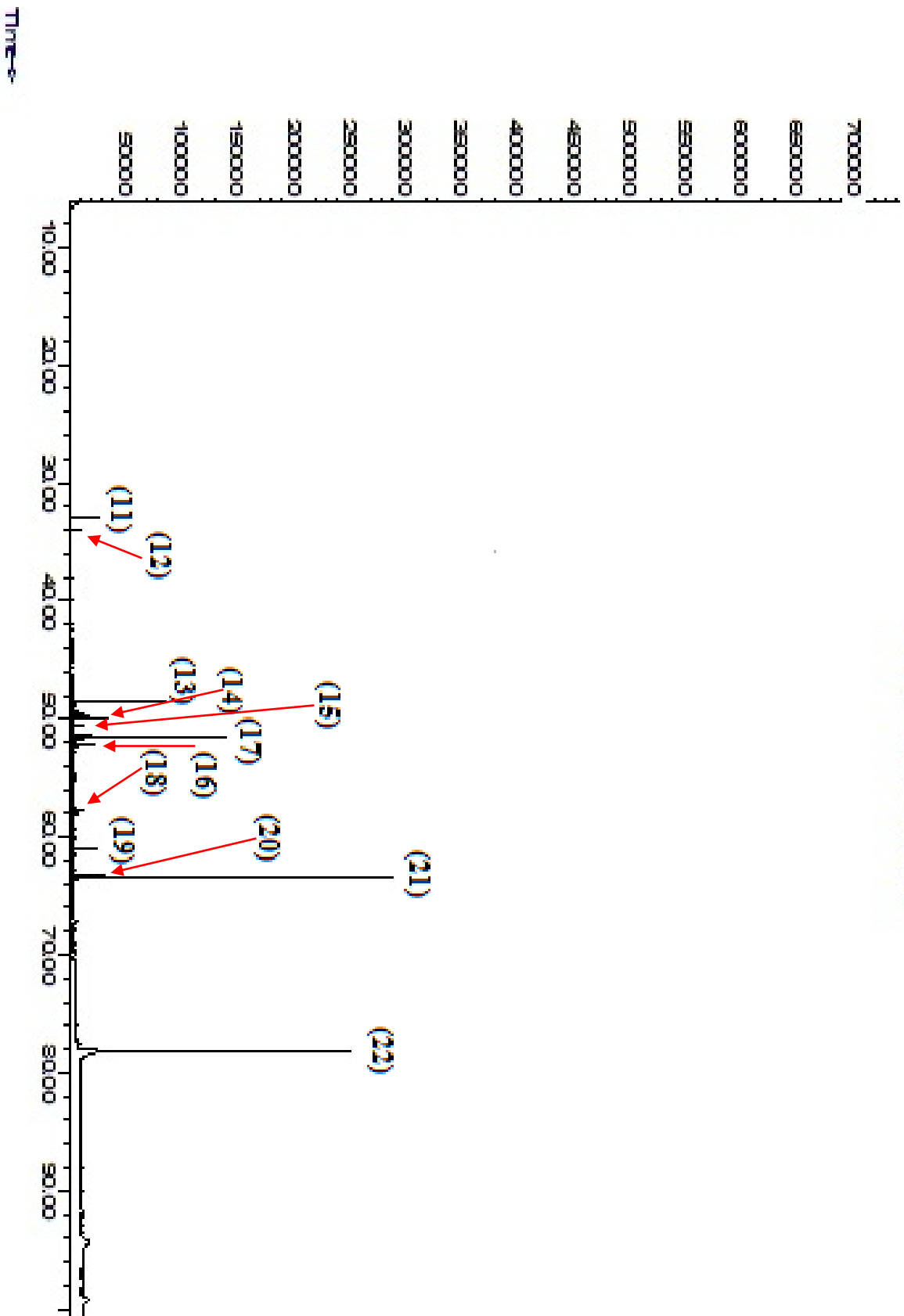


Figure 16 : Chromatogramme de GC d'huile essentielle de *Clematis cirrhosa* L.

# *Annexe Publication*



# Phenolic profiles, antioxidant activities and enzyme inhibitory effects of an Algerian medicinal plant (*Clematis cirrhosa* L.)

Djawhara Chohra<sup>a,\*</sup>, Loubna Ferchichi<sup>a</sup>, Yavuz Selim Cakmak<sup>b</sup>, Gokhan Zengin<sup>c</sup>, Sarah Mohammed Alsheikh<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Synthesis and Organic Biocatalysis, Department of Chemistry, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

<sup>b</sup> Department of Biotechnology and Molecular Biology, Aksaray, Turkey

<sup>c</sup> Department of Biology, Selcuk University, Konya, Turkey

## ARTICLE INFO

### Article History:

Received 29 January 2020

Revised 7 April 2020

Accepted 18 April 2020

Available online xxx

### Keywords:

Clematis  
Ranunculaceae  
Polyphenols  
Antioxidant  
Enzyme inhibition

## ABSTRACT

*Clematis cirrhosa* L. an Algerian medicinal plant widely distributed in the North of Algeria. It is used in traditional medicine for rheumatism pain and as diuretic agent. In this study methanol and hydromethanol extracts of *Clematis cirrhosa* were subjected to several tests in order to determine their phenolic compositions, antioxidant activities, and their enzyme inhibitory activities. The total polyphenols and total flavonoids contents were evaluated using colorimetric methods. The antioxidant activities were measured by various methods, namely free radical (DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup>) scavenging tests, and ion reducing capacity assays (FRAP and CUPRAC). The two extracts were examined for their inhibition activities of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, cholinesterase, tyrosinase enzymes. Also, the phenolic profiles of the studied extracts were determined by HPLC/DAD. The results showed that methanol extract had the highest antioxidant capacity with a highest amount of total phenol ( $84.05 \pm 0.8$  mg GAE/g) and total flavonoid ( $114.60 \pm 2.42$   $\mu$ g QE/g). The two extracts had noticeable enzyme inhibitory effects towards tyrosinase, AChE, BChE,  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase. HPLC/DAD analysis revealed that the studied extracts were rich on benzoic acid, hydroxybenzoic acid, catechin, caffeic acid, and epicatechin.

© 2020 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Plants therapeutic properties are known since centuries, and the development of more and more efficient analytical tools over the past decades has allowed a great advance in the identification of the secondary metabolites responsible for the observed therapeutic effects (Aumeeruddy and Mahomoodally, 2019). In these days bio-substances from plant sources are in great demand because of their numerous biological activities which have positive effects on health. These activities include antioxidant, anticancer, antiviral, antibacterial, antifungal, insecticide, antimalarial and enzyme inhibition activities (Aumeeruddy-Elalfi et al., 2018; Veiga et al., 2018).

Currently, several studies highlight the tragic role of the uncontrollable oxidative process induced by reactive oxygen species (ROS). These oxidants are the direct cause of various pathological conditions such as aging and cancer and indirect on the peroxidation of lipids in food. Whatever the case, the risk is compounded with the accumulation of these molecules in the body, leading to a radical reaction chain which degrades the biological vital molecules, namely DNA, lipids,

proteins and carbohydrates (Phaniendra et al., 2015). By pressing on this vision, a revival of phytotherapy towards this green wave which produces a host of antioxidants in order to counter and trap these oxidants.

Indeed, natural antioxidants are the subject of a lot of research and a new breath towards the exploitation of secondary metabolites generally and polyphenols particularly both in health and in industry food (Salehi et al., 2019). These compounds, which are represented by the flavonoid family, are widely sought after for their biological properties: antioxidants, anti-inflammatories, antiallergic and anticarcinogenic (Karak, 2019; Rengasamy et al., 2019).

*Clematis* is considered among the most representative genus of the Ranunculaceae family, this genus is endemic in the temperate region with approximately 350 species distributed in tropical areas (Zhang et al., 2014). It was reported that *Clematis* is a botanical source of different groups of secondary metabolites including triterpenes, steroids, lignans, flavonoids, coumarines, phenolic glycoside, macrocyclic compounds, volatile oils and fatty acids (Mushtaq et al., 2013; Yuan et al., 2012; Hao et al., 2013; Xiong et al., 2014). This reflects the biological activities of species belonged to this genus. From the available literature it is very obvious that *Clematis* species have biological effects principally anti-inflammatory, antinociceptive, antitumoral, and antibacterial and antioxidant (Yesilda and Küpeli, 2007; Hao

\* Corresponding author at: Department of Chemistry, University Badji Mokhtar - Annaba - B.P.12, Annaba, 23000 Algeria.

E-mail address: [djawharachohra123@yahoo.com](mailto:djawharachohra123@yahoo.com) (D. Chohra).

et al., 2015; Zhang et al., 2015; Zhao et al., 2016). In traditional phytotherapy, the aerial parts of several species of *Clematis* are served to treat diverse diseases, especially urinary, rheumatic and transmitted diseases, fever, eye infections and dermatological problems. Also used as antidote in snake bites and as an antimalarial agent (Chawla et al., 2012). In Algerian traditional medicine; people used the infusion of *Clematis flammula* as treatment of arthritis and minor burns (Atmani et al., 2009), and used leaves of *Clematis cirrhosa* for rheumatism pain (Miara et al., 2019) and as a diuretic agent (Hamel et al., 2018). Previous ethnobotanical research were conducted on the uses of *Clematis cirrhosa* in traditional medicine. However; there are no reported studies on the phytochemical composition and biological activities of this plant, therefore this study aimed to evaluate the antioxidant potentials and the enzyme inhibition effects of *Clematis cirrhosa* extracts *in vitro*, and also determine their phenolic profiles.

## 2. Material and method

### 2.1. Plant material

*Clematis cirrhosa* was collected in Souk Ahras region (extreme north east of Algeria) in December 2017 during the flowering period. The identification of the plant was carried out, within the Department of Biology, University Badji Mokhtar -Annaba- Algeria, by Dr. Tarek HAMEL. Voucher number of *C. cirrhosa*, in the herbarium of Dr. Gérard DE BELAIR, is ph012\_03.

### 2.2. Preparation of extracts

The aerial parts of *C. cirrhosa* were dried in the dark at room temperature, and then ground into powder using commercial blender. Then 15 g of powder was weighted and extracted by sonication with two different solvents methanol (100%) and methanol/ddH<sub>2</sub>O (70%). After finishing, the obtained extracts were filtered and evaporated under a reduced pressure and at a temperature ranged between 40–60 °C to obtain dry extracts.

### 2.3. Total phenolic content

The content of total phenolic (TPC) contained in the extracts was assessed according to Folin Ciocalteu Method (F-C method) with slight modifications (Slinkard and Singleton, 1977). Firstly a mixture of three solutions was prepared with 1.5 ml of distilled water, 500  $\mu$ l of sodium carbonate 7% (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), and 200  $\mu$ l of extract solution. After 3 min, 1 ml of F-C reagent was added. A standard of gallic acid was prepared at different concentrations (100,50,25,12.5  $\mu$ g/ml). In one test tube the phenolic blank was prepared by mixing 1 ml of F-C reagent, 500  $\mu$ l of methanol, 3.8 ml of distilled water, and 2 ml of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. All preparations were left at room temperature in the obscurity. After 2 h, or after finishing oxidation of phenolic compounds, the color changing from yellow to blue was observed, which could be read by a spectrophotometer against a blank sample at 760 nm. TPC was given as gallic acid equivalents (mg GAE/g extract).

### 2.4. Total flavonoid content

By the method of Arvouet-Grand et al. (1994), the total flavonoid content (TFC) of plant extracts was measured spectrophotometrically at 415 nm. Concisely, sample solutions were prepared by mixing 1 ml of plant extract and 1 ml of aluminium chloride 2% (AlCl<sub>3</sub>). Also a solution of 1 ml of extract and 1 ml of methanol was prepared as a blank solution. Leave for 10 min at 25 °C, and then the absorbance was reading against the blank at 415 nm. Total flavonoid content was reported as quercetin equivalents (mg QE/g extract).

## 2.5. Antioxidant activities

### 2.5.1. Total antioxidant capacity

The total antioxidant capacities (TAC) of the different extracts were assessed according to the phosphomolybdenum assay (Prieto et al., 1999). Firstly a mixture was prepared by mixing three solutions: sodium phosphate (28 mM), ammonium molybdate (4 mM) and acid sulfuric (6 M). 3 ml of this mixture were added to 100  $\mu$ l of plant extract. The standard of ascorbic acid (ASC) was prepared in methanol at different concentrations (1,0.5,0.250,0.125 mg/ml). For the blank sample, only 300  $\mu$ l of methanol was used. Then incubated in the dark at 95 °C for min, the absorbance was read at 695 nm against blank samples. The results were taken in equivalents of ascorbic acid (mg AAE/g of extract).

### 2.5.2. Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP)

FRAP test allowed to detect the ferric ion reducing power, with a slight modification brought to (Apak et al., 2006) method; the ferric ion reducing capacity of plant extracts was evaluated. Three reagent solutions were made: 31.2 mg of 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) dissolved in 50  $\mu$ l of hydrochloric (HCl) and 10 ml of distilled water, 22 mg of ferric chloride (FeCl<sub>3</sub>) dissolved in 10 ml of distilled water, 0.664 g of sodium acetate dissolved in 4.1 ml of acetic acid (80%) and then adjusted the volume to 250 ml (acetate buffer). After that the pre-prepared solutions were mixed in following proportions (acetate buffer/TPTZ/FeCl<sub>3</sub>, 10/1/1). This was used to prepare standard solutions of Trolox in methanol (25,50,75,100,150,200 mg/ml). After 30 min incubation at 30 °C, the absorbance was taken by spectrophotometer at 593 nm.

### 2.5.3. Cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC assay)

The CUPRAC test of the extracts was determined using the method of Apak et al. (2006) with slight modifications. Three reagents were prepared (ammonium acetate, copper (II) chloride dihydrate, and neocuproine) and blended with 1 ml of the extract. Solutions of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) were prepared in different concentrations (250,125,62.5,31.25 mg/ml). Then after, 1 ml of distilled water was added to each tube. Measurements were taken by spectrophotometer at 450 nm after 30 min of incubation, and compared against blank samples.

### 2.5.4. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical scavenging activity (DPPH assay)

The scavenging activity against DPPH free radical was assayed using the method described by Sarikurku. (2011) with some modifications. Concisely, sample solutions were prepared with 1 ml of DPPH solution (0.4 mM), 1 ml of methanol and 1 ml of extract solution. While control was prepared without extract solution, and sample blank was methanol only. All preparations were put in the obscurity at room temperature. After 30 min the absorbance was read against a blank sample and control at 517 nm, the DPPH scavenging ratio (%) of extract samples were calculated using the following formula:

$$I\% = 100 \times (A_0 - A_1) / A_0 \quad (1)$$

A<sub>0</sub>: absorbance of the control.

A<sub>1</sub>: absorbance of the extract.

IC<sub>50</sub> values which are the inhibition concentrations for 50% of DPPH radicals were also calculated.

### 2.5.5. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid free radical scavenging activity (ABTS assay)

With some modifications, the method of Re et al. (1999) was utilized to assess the scavenging activity against ABTS<sup>•+</sup>. Firstly a 7 mM ABTS solution was prepared and mixed with a solution of potassium

sulfate 20.45 mM. The mixture was kept for 12–16 min in the dark at 25 °C. Before starting the test a dilution of ABTS solution was affected to achieve an absorbance of 0.700 at 734 nm. 1 ml of extract sample was added to 2 ml of ABTS solution, after 30 min incubation in obscurity, the absorbance was measured at 734 nm. The ABTS<sup>+</sup> scavenging capacity was in equivalents of Trolox ( $\mu\text{g TE/mg}$ ).

## 2.6. Enzymatic inhibition activities

### 2.6.1. Cholinesterase inhibitory activity

The capacity of the extracts to inhibit the cholinesterase enzyme (ChE) was tested by the Ellman's method (Mocan et al., 2016) with slight modifications. A blend consists of  $\mu\text{l}$  50 sample solution, 125  $\mu\text{l}$  of 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), and 25  $\mu\text{l}$  of acetylcholinesterase (AChE) (or butyrylcholinesterase (BuChE)) in Tris-HCl buffer (pH 8.0), was prepared in a 96-well microplate. After 15 min of incubation at 25 °C, the reaction was initiated with 25  $\mu\text{l}$  of acetylthiocholine iodide (ATCI) or butyrylthiocholine chloride (BTCL). The blank solution was prepared without the addition of enzyme (AChE or BuChE) solution. The absorbance of all prepared solutions was taken at 405 nm after 10 min incubation at 25 °C. The cholinesterase inhibitory capacity was calculated according to the formula (2).

$$\text{Inhibition activity (\%)} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100 \quad (2)$$

$A_0$ : Absorbance of the control.

$A_1$ : Absorbance of the extract/standard.

### 2.6.2. $\alpha$ -Amylase inhibition

$\alpha$ -amylase inhibitory activity was determined according to the Caraway-Somogyi iodine/potassium iodine (IKI) method described by Savran et al. (2016). In a 96-well microplate; 25  $\mu\text{l}$  of sample solution and 50  $\mu\text{l}$  of  $\alpha$ -amylase solution in phosphate buffer (pH 6.9 with 6 mM sodium chloride) were mixed. The mixture was incubated for 10 min at 37 °C. Then after 50  $\mu\text{l}$  of starch solution (0.05%) was added to start the reaction. A blank solution was prepared without the addition of  $\alpha$ -amylase solution. After 10 min incubation at room temperature the reaction was ended with 25  $\mu\text{l}$  of HCl (1 M), after that 100  $\mu\text{l}$  of iodine-potassium iodide solution were added and the absorbance of all prepared solutions was taken at 630 nm. The  $\alpha$ -amylase inhibitory activity was calculated using the formula (2).

### 2.6.3. $\alpha$ -Glucosidase inhibition

The capacity of extracts to inhibit the  $\alpha$ -glucosidase enzyme was assessed according to Palanisamy et al. (2011) method. In a 96-well microplate 50  $\mu\text{l}$  of the sample solution were mixed with 50  $\mu\text{l}$  of 4-Nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (PNPG), 50  $\mu\text{l}$  of  $\alpha$ -glucosidase solution in phosphate buffer (pH 6.8), and 50  $\mu\text{l}$  of glutathione. The blank solution was prepared without the addition of enzyme. After incubation at 37 °C for 10 min the reaction was ended with the addition of 50  $\mu\text{l}$  of sodium carbonate. The absorbance of all prepared solutions was taken at 405 nm. The  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity was calculated according to the formula (2).

### 2.6.4. Tyrosinase inhibition

The capacity of extracts to inhibit the tyrosinase enzyme was determined according to dopachrome method using L-DOPA as substrate with some modifications (Mocan et al., 2017). In a 96-well microplate a 25  $\mu\text{l}$  of the sample solution, 40  $\mu\text{l}$  of tyrosinase solution, and 100  $\mu\text{l}$  of phosphate buffer (pH 6.8) were mixed. The mixture was incubated for 15 min at 25 °C. Then after, the reaction was started with the addition of 40  $\mu\text{l}$  of L-DOPA. Similarly, a blank was prepared without the addition of enzyme tyrosinase solution. After incubation at 25 °C for 10 min. The absorbance, of all prepared solutions, was taken at 492 nm and the tyrosinase inhibitory activity was calculated according to the formula (2).

## 2.7. Phenolic profile

The phenolic composition analyzes of different extracts were carried out according to Capino et al. (1999). With slight modifications, the phenolic profiles were determined using an HP-Agilent 1292 infinity HPLC equipped with a C18 column and coupled with a diode array detector (DAD) the samples were prepared in methanol with a concentration of 20 mg/ml and the injection volumes were 20  $\mu\text{l}$ . The mobile phase used was a mixture between 3% acetic acid in water (A) and methanol (B), the injection volumes were 10  $\mu\text{l}$  and the elution gradient is applied at a flow rate of 0.8 ml/min as follows: 93% of A-7% of B (0.1 min), 72% of A-28% B (20 min), 75% A-25% B (8 min), 70% A-30% B (7 min) and the same gradient for 15 min was 67% A-33% B (10 min), 58% A-42% B (2 min), 50% A-50% B (8 min), 30% A-70% B (3 min), 20% A-80% B (2 min) and 100% B in 5 min until the end of the run. The eluates were detected at 278 nm and the phenolic standards used were gallic acid, catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, hydroxybenzoic acid, epicatechin, syringic acid, coumaric acid, trans-ferrulic acid, sinapic acid, benzoic acid, hesperidin, rosmarinic acid, cinnamic acid, quercetin. The identification of the phenolic compounds contained in the extracts and their quantitative analyzes was carried out by a comparison with the standards. The quantity of each compound was determined using external calibration curves, which were obtained for each standard. The values were expressed in (mg/g).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Total phenolic and flavonoid contents

Polyphenolic and flavonoid contents of *C. cirrhosa* were evaluated according to colorimetric methods using gallic acid and quercetin as standards respectively. The concentrations of total polyphenolic and flavonoid components of the studied extracts are showed in Table 1. The results revealed that methanol extract of *C. cirrhosa* was found to have a higher content of both total polyphenolic compounds ( $84.05 \pm 0.80$  mg GAE/g) and flavonoid compounds ( $114.60 \pm 2.42$   $\mu\text{g QE/g}$ ). Findings indicate that methanol is the appropriate organic solvent for extracting polyphenol and flavonoid compounds of plants; this was in good correspondence with previous studies of Yao et al. (2004).

**Table 1**

Total phenolics, total flavonoid content, total antioxidant capacities, ABTS radical scavenging capacity and ferric ion reducing power activity of two extracts obtained from *Clematis cirrhosa*.

Extract	TPC (mg GAE/g)	TFC ( $\mu\text{g QE/g}$ )	TAC (mg AAE/g)	FRAP (mg TE/g)	ABTS ( $\mu\text{g TE/mg}$ )
<b>Methanol (100%)</b>	84.05 $\pm$ 0.80	114.60 $\pm$ 2.42	138.64 $\pm$ 1.29	212.42 $\pm$ 2.63	236.26 $\pm$ 0.56
<b>Methanol /H<sub>2</sub>O (70%)</b>	76.20 $\pm$ 1.61	49.67 $\pm$ 1.44	75.00 $\pm$ 2.57	205.15 $\pm$ 3.22	237.80 $\pm$ 0.24

All values are expressed mean  $\pm$  SD. GAE: Gallic acid equivalents, QE: Quercetin equivalents, AAE: Ascorbic acid equivalents, TE: Trolox equivalents.



### 3.2. Total antioxidant capacity (TAC)

The phosphomolybdenum method is the using methods to estimate the total antioxidant capacity. It is considered as the most simple and low cost method, furthermore TAC assay permitted to evaluate both hydro and lipo-soluble antioxidants, in this assay and at acid pH Mo(VI) was reduced by the antioxidants of the extract to give green phosphate Mo(V) complex (Dixit and Reddy, 2017). Results in Table 1 indicate that the plant studied has a good total antioxidant capacity; while the methanolic extract has a higher TAC effect compared with the hydromethanolic extract with  $(138.64 \pm 1.29 \text{ mg AAE/g})$  and  $(75.00 \pm 2.57 \text{ mg AAE/g})$  respectively. Several reports attest that the antioxidant power of medical herbs attributed to their content of both polyphenol and flavonoid compounds (Robards et al., 1999; Cai et al., 2004; Manoj and Murugan, 2012; Wang et al., 2017). Consequently the high TAC effect of methanolic extract of *C. cirrhosa* compared with that of hydromethanolic extract is obviously due to the high amount of total phenolic and flavonoids compounds detected in the methanolic extract.

### 3.3. Ferric reducing antioxidant power

Ferric reducing antioxidant power or FRAP test; is an assay to assess the reduction ability which a complex of ferric ion and tripyridyltriazine (TPTZ) is utilized as reagents. In this assay the antioxidants reduced the ferric ion (Fe(III))-TPTZ complex to ferrous ion (Fe(II))-TPTZ complex, this complex has a concentrated blue color and can be controlled at 593 nm (Berker et al., 2007). Therefore the capacity, of extracts of *C. cirrhosa*, to reduce ferric ion was determined by the measurement of the absorbance at 593 nm, the results are represented by Table 1. Results revealed a slight difference in the ferric ion reducing antioxidant power of the studied extracts, with  $(212.42 \pm 2.63)$  and  $(205.15 \pm 3.22) \text{ mg TE/g}$  of methanol and hydromethanol (70/30) extracts of *C. cirrhosa* respectively. Consequently, the activity observed denotes the presence of reductive compounds, namely hydrogen donors and electron donors (Kumaran and Karunakaran, 2007). Several studies have shown that the reducing properties of polyphenols and their ability to form stable complexes with transition metals, especially iron and copper, can modulate various processes of biological importance involving the redox state of metal ion. The interactions of copper and iron ions with polyphenols, and more particularly with flavonoids, are often proposed as one of the

antioxidant action mechanisms of these natural products (Van Acker et al., 1996; Heim et al., 2002; Moridani et al., 2003).

### 3.4. Cupric reducing antioxidant capacity

The copper (II) neocuproine is used as reagent in this assay. When antioxidant reduces copper (II) neocuproine to copper (I) neocuproine, an orange-yellow complex formed with maximum absorption at 450 nm, the concentration of this complex is proportional to the ability of antioxidant present in the extract to transfer electrons to copper (Ozyurek et al., 2011). Depending on the findings of this assay the two extracts of *C. cirrhosa* possess a significant cupric reducing capacity; however the reducing power of the methanolic extract is slightly higher than the reducing power of hydromethanolic extract as presented in Fig. 1. Additionally, there is significant correlation between the FRAP and CUPRAC reducing potent this is in good conformity with the results found by Ozturk et al. (2007).

### 3.5. ABTS free radical scavenging capacity

In the ABTS assay the ABTS is oxidized, to ABTS colored radical cation  $\text{ABTS}^+$ , by a potassium persulfate solution, and then mixed with sample extracts. Along with scavenging  $\text{ABTS}^+$  by antioxidant in extracts, the absorbance of  $\text{ABTS}^+$  decreased (Ozturk et al., 2007). The  $\text{ABTS}^+$  scavenging abilities of *C. cirrhosa* extracts are calculated from the decrease of absorbance at 734 nm with Trolox as a standard and results are expressed as Trolox equivalent in Table 1. The  $\text{ABTS}^+$  scavenging capacity of the hydromethanolic extract of *C. cirrhosa* is slightly higher than the methanolic extract capacity with  $(237.80 \pm 0.24 \mu\text{g/mg TE})$ .

### 3.6. DPPH free radical scavenging capacity

The determination of the antioxidant capacity of plant extracts is mostly used by the DPPH spectrophotometric method. A reducing in the absorbance at 517 nm is due to reduction of DPPH free radicals by the antioxidants present in plant extracts, which act as hydrogen donor (Perez Gutierrez et al., 2012). The scavenging activity on DPPH was evaluated by the determination of the half maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) value of the extract. A low  $\text{IC}_{50}$  refers to a high antioxidant capacity. The results of DPPH free radicals scavenging ability of the extracts are exposed in Table 2. In the present research

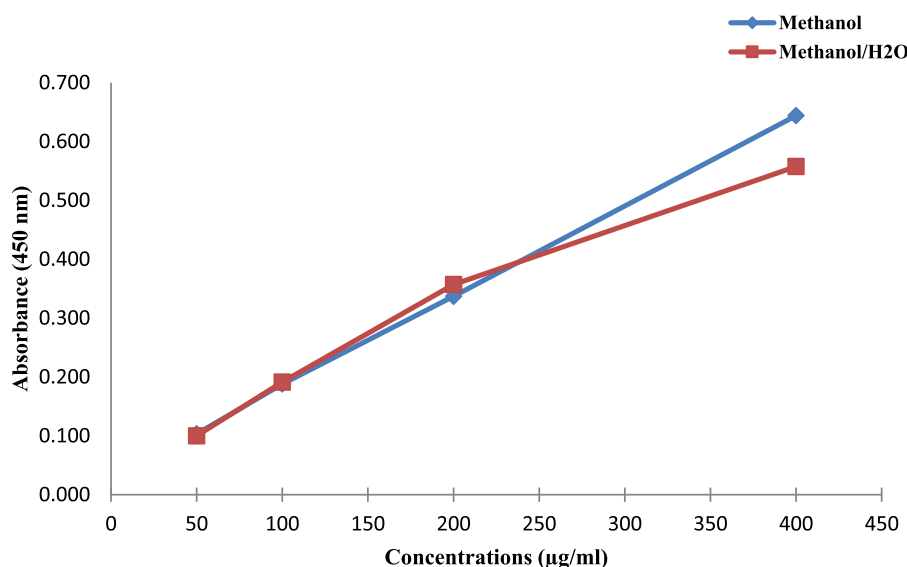


Fig. 1. Cupric ion reducing power activities of two extracts obtained from *Clematis cirrhosa*. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

**Table 2**

The results of DPPH free radical scavenging activities of extracts from *Clematis cirrhosa*.

Extract	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
<b>Methanol (100%)</b>	1.98 ± 0.08
<b>Methanol /H<sub>2</sub>O (70%)</b>	2.32 ± 0.29

All values are expressed mean ± SD.

the two extracts of *C. cirrhosa* have an excellent scavenging capacity on DPPH free radicals. Methanol extract of *C. cirrhosa* has a higher antioxidant capacity compared with the hydromethanolic (70/30) extract with an IC<sub>50</sub> (1.98 ± 0.08 mg/ml). It is evident from the findings that the antioxidant activity of *C. cirrhosa* extracts is due to their high amounts in polyphenol and flavonoid contents; this was affirmed by the results obtained by Karimi et al. (2017). Other investigations realized on *clematis* species by Kirby & Schmidt. (1997) and Atmani et al. (2009) proclaimed that *Clematis armandii* and *Clematis flammula* had relatively high values of IC<sub>50</sub> implying a moderate scavenging activity against DPPH.

### 3.7. Enzyme inhibition activities

Acetylcholinesterase is a key enzyme; that ensuring a rapid hydrolysis of acetylcholine at central and peripheral cholinergic synapses; which regulates the transmission of nerve impulses. Acetylcholinesterase inhibitors are used for a symptomatic treatment of several neurological diseases, senile dementia, ataxia, myasthenia Gravis, Parkinson Alzheimer. Several plants are studied for their acetylcholinesterase inhibitory activities which can therefore be used to cure neurodegenerative diseases (Mukherjee et al., 2007). The results of acetylcholinesterase inhibition of *C. cirrhosa* are provided in Table 3. The two extracts contained a high inhibitory activity against AChE. However the hydromethanolic extract of *C. cirrhosa* had a higher level compared with methanolic extract with (78.38 ± 0.36%) and (69.03 ± 1.13%).

Butyrylcholinesterase a cholinesterase enzyme similar to acetylcholinesterase and works as a regulator of cholinergic neurotransmission by hydrolyzing Ach. Thus the inhibition of butyrylcholinesterase may offer a good effect on cholinergic therapies, especially those attempts to treat Alzheimer diseases (Mesulam et al., 2002). Table 3 showed that the BChE inhibition rate of the methanolic extract, of plant tested (47.67 ± 1.66%), was higher than hydromethanolic extract (34.22 ± 1.25%). Comparing these values with the value obtained by the positive control used Galatamine (66.96 ± 0.54%); the two extracts of *C. cirrhosa* had lower activity against BChE.

Diabetes mellitus is a chronic ailment clinically marked by high levels of glucose in blood caused by deficiency of secretion or action of endogenous insulin. Diabetes is associated with many cardiovascular complications (Day and Lai, 2012). Several strategies are used to treat diabetes, including the process that delays the absorption of glucose. This is assured by the intervention of inhibitors of the enzymes  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitors play important

roles in the decrease of the postprandial hyperglycemia by retarding the absorption of glucose. This is one of the strategies of treating diabetes (Raj Bhandari et al., 2008). As demonstrated in Table 3, the methanol extract exhibited a higher  $\alpha$ -amylase inhibitory activity (36.63 ± 2.17%) compared with the hydromethanol extract (24.70 ± 0.83%). Conversely, the  $\alpha$ -glucosidase inhibition rate of the hydromethanol extract (40.93 ± 4.50%) was significantly higher than the methanolic extract (14.03% ± 0.91). Interestingly, the methanolic extract had the higher rate of phenolic and flavonoids compounds. Similarly, precedent studies carried out on a number of plants, proved that polyphenolic extracts were effective inhibitors of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase (Mastrui et al., 2001).

Tyrosinase is a copper-containing enzyme that implicated in the biosynthesis of melanin by the catalyze of two key processes; hydroxylation of tyrosine to 3,4-dihydroxy-phenylalanine (DOPA) and oxidation of DOPA to DOPA quinone (Özer et al., 2007). These reactive compounds can spontaneously polymerize to form melanin (Parvez et al., 2006). Irregular synthesis or distribution of melanin can induce local hyperpigmentation or spots. Thus, tyrosinase inhibition has immense importance in the cosmeceutical products in the prevention of hyperpigmentation and skin whitening (Özer et al., 2007). Table 3 summarized the inhibitory activity on tyrosinase of the extracts obtained from *C. cirrhosa*. The extracts tested demonstrate a significant antityrosinase activity, and the obtained results attested that the methanolic extract and the positive control kojic acid had the same antityrosinase activity with a rate of (82%); this value was slightly lower than of hydromethanol extract (86%). The tyrosinase inhibition activity of *C. cirrhosa* extracts may be related to their phenolic contents and antioxidant activities. Shukla et al. (2016) proclaimed that the active sites of enzyme can return inactive by the effect of hydrogen bond formed by these active sites and hydroxyl groups of phenolic compounds. These hydrogen bonds provide conformational modifications and steric hindrance thereby a suppression of enzymatic activity.

### 3.8. HPLC/DAD of phenolic compounds

In this study, we use the high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector to make qualitative and quantitative analysis of the phenolic compounds contained in the methanol and hydromethanol extracts of *C. cirrhosa*. 15 phenolic standards were prepared with four different concentrations. All calibration curves were linear with a regression factor  $r^2 > 0.8867$ . The identification of the phenolic compounds present in the extracts was obtained by comparing their ultraviolet spectra of HPLC/DAD and their retention time with those of corresponding standard compounds Table 4.

The concentrations of phenolic compounds contained in methanol and hydromethanol extracts of *C. cirrhosa* were calculated from the calibration curves and expressed in  $\mu\text{g/g}$  of extract; the results are summarized in Table 4. According to the obtained results, the methanol and hydromethanol (70/30) extracts of *C. cirrhosa* had the same composition of phenolic compounds; expect trans-ferulic acid and cinnamic acid which were detected only in the methanol extract. The main compounds were; benzoic acid (8867.73  $\mu\text{g/g}$ ), hydroxybenzoic acid (1370.05  $\mu\text{g/g}$ ) in methanol extract; and catechin (1194.77  $\mu\text{g/g}$ )

**Table 3**

Enzyme inhibitory activity of the extracts from *Clematis cirrhosa*.

Samples	AChE (%)	BChE (%)	Tyrosinase (%)	Amylase (%)	Glucosidase
<b>Methanol 100% (2 mg/ml)</b>	69.03 ± 1.13	47.67 ± 1.86	82.34 ± 0.39	36.63 ± 2.17	14.03 ± 0.91
<b>Methanol /H<sub>2</sub>O (70%) (2 mg/ml)</b>	78.38 ± 36	34.22 ± 1.25	86.56 ± 0.59	24.70 ± 0.83	40.93 ± 4.50
<b>Galatamine (5 <math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	97.07 ± 0.28	66.96 ± 0.54	nt	nt	nt
<b>Kojic acid (1 mg/ml)</b>	nt	nt	82.38 ± 0.41	nt	nt
<b>Acarbose (1 mg/ml)</b>	nt	nt	nt	73.81 ± 1.55	11.14 ± 2.38

All values are expressed mean ± SD. AChE: acetylcholinesterase, BChE: Butyrylcholinesterase, nt: not tested.

**Table 4**  
Profile retention time and concentration of phenolic compounds of *Clematis cirrhosa*.

Phenolic compounds	Retention time (min)	Concentration ( $\mu\text{g/g}$ ) Methanol extract (100%)	Hydromethanol extract (70%)
<b>Gallic Acid</b>	5400	27.87	53.15
<b>Catechin</b>	12,430	991.78	1194.77
<b>Chlorogenic acid</b>	15,745	556.39	23.86
<b>Caffeic Acid</b>	18,336	223.34	276.90
<b>Hydroxybenzoic acid</b>	18,917	1370.05	1348.06
<b>Epicatechin</b>	19,165	164.71	243.88
<b>Syringic acid</b>	21,250	23.53	43.30
<b>Coumaric acid</b>	26,385	nf	nf
<b>Trans-ferulic acid</b>	31,265	20.77	nf
<b>Sinapic acid</b>	33,416	nf	nf
<b>Benzoic acid</b>	38,571	8867.73	8471.75
<b>Hesperidin</b>	54,719	nf	nf
<b>Rosmarinic acid</b>	59,326	nf	nf
<b>Cinnamic acid</b>	68,506	12.56	nf
<b>Quercetin</b>	71,045	nf	nf

nf : not found.

in hydromethanol extract. The higher amount of chlorogenic acid (556.39  $\mu\text{g/g}$ ) was obtained from the methanol extract, however a higher amount of gallic acid (53.15  $\mu\text{g/g}$ ), caffeic acid (276.90  $\mu\text{g/g}$ ), epicatechin (243.88  $\mu\text{g/g}$ ), syringic acid (43.30  $\mu\text{g/g}$ ) was observed in hydromethanol extract. Accordingly quantity as well as the quality of the polyphenols extracted depends on the polarity of extraction solvent used, these results are affirmed by those obtained by Karimi et al. (2017), In which gallic acid were obtained with a high amount in hexane fraction of *Clematis orientalis* (367  $\mu\text{g/g}$  DW) as well in ethylacetate fraction (373  $\mu\text{g/g}$  DW); contrariwise the extracts of chloroform and water were exhibited a low amount of gallic acid 144 and 225  $\mu\text{g/g}$  DW respectively. While gallic acid was not detected in butanol extract of this species.

#### 4. Conclusion

This paper reports the species *C. cirrhosa* for the first time. This species is used in Algerian traditional medicine for rheumatism pain and as diuretic agent. The obtained results indicate that this species is rich in phenolic and flavonoid compounds. Moreover *C. cirrhosa* exhibit strong antioxidant and enzymatic inhibition activities. Further studies should be carried out to extract, isolate and identify the bioactive compounds of *C. cirrhosa*.

#### Acknowledgements

Declared none.

#### References

- Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S.E., Ercag, E., 2006. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 57, 292–304.
- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., Legret, P., 1994. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *J. Pharm. Belg.* 49, 462–468.
- Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N., Atmani, D., 2009. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chem.* 112, 303–309.
- Aumeeruddy-Elalfi, Z., Lall, N., Fibrich, B., Blom van Staden, A., Hosenally, M., Mahomoodally, M.F., 2018. Selected essential oils inhibit key physiological enzymes and possess intracellular and extracellular antimelanogenic properties in vitro. *J. Food Drug Anal.* 26, 232–243.
- Aumeeruddy, M.Z., Mahomoodally, M.F., 2019. Combating breast cancer using combination therapy with 3 phytochemicals: piperine, sulforaphane, and thymoquinone. *Cancer* 125, 1600–1611.
- Berker, K.I., Guclu, K., Tor, I., Apak, R., 2007. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta* 72, 1157–1165.
- Capino, F., Alloggio, V., Gomes, T., 1999. Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chem.* 64, 203–209.
- Cai, Y.Z., Luo, Q., Sun, M., Corke, H., 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 74, 2157–2184.
- Chawla, R., Kumar, S., Sharma, A., 2012. The genus *Clematis* (Ranunculaceae): chemical-land pharmacological perspectives. *J. Ethnopharmacol.* 143, 116–150.
- Day, R., Lai, S.S., 2012. Supplementation effects of vitamin C and vitamin E on oxidative stress in post menopausal diabetic women. *J. Appl. Res.* 12, 108–111.
- Dixit, D., Reddy, C.R.K., 2017. Non targeted secondary metabolites profile study for deciphering the cosmetceutical potential of red marine macro alga *Jania rubens* –LCMS- based approach. *CosmeticsJournal* 4, 1–17.
- Perez Gutierrez, R.M., Flores Cotera, L.B., Gonzalez, A.M., 2012. Evaluation of the antioxidant and anti-glycation effects of the hexane extract from *piper auritum* leaves in vitro and beneficial activity on oxidative stress and advanced glycation end-product mediated renal injury in streptozotocin-treated diabetic rats. *Molecules* 17, 11897–11919.
- Hamel, T., Sadou, S., Seridi, R., Boukhdir, S., Boulemtafes, A., 2018. Pratique traditionnelle d'utilisation des plantes médicinales dans la population de la péninsule de l'edough (nord-est algérien). *Ethnopharmacologia* 59, 75–81.
- Hao, D.C., GU, X., Xiao, P., Peng, Y., 2013. Chemical and biological research of clematis medicinal resources Chinese. *Sci. Bull.* 58, 1120–1129.
- Hao, D.C., Xiao, P., Ma, H.Y., PENG, Y., He, C.N., 2015. Mining chemodiversity from biodiversity: pharmacophylogeny of medicinal plants of Ranunculaceae. *Chin. J. Nat. Med.* 13, 507–520.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13, 572–584.
- Karak, P., 2019. Biological activities of flavonoids: an overview. *Int. J. Pharm. Sci. Res* 10, 1567–1574.
- Karimi, E., Nohooji, M.G., Habibi, M., Ebrahimi, M., Mehrafarin, A., Khalighi-Sigaroodi, F., 2017. Antioxidant potential assessment of phenolic and flavonoid rich fractions of *Clematis orientalis* and *Clematis isphahanica* (Ranunculaceae). *Nat. Prod. Res. Formerly Nat. Prod. Lett.* 32, 1991–1995.
- Kirby, A.J., Schmidt, R.J., 1997. The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs-I. *J. Ethnopharmacol.* 56, 103–108.
- Kumaran, A., Karunakaran, R.J., 2007. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT Food Sci. Technol.* 40, 344–352.
- Manoj, G.S., Murugan, K., 2012. Phenolic profiles, antimicrobial and antioxidant potentiality of methanol extract of a liverwort, *Plagiochila beddomei* Steph. *Indian J. Nat. Prod. Resour.* 3, 173–183.
- Matsui, T., Ueda, T., Oki, T., Sugita, K., Terahara, N., Matsumoto, K., 2001.  $\alpha$ -glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 2. A-glucosidase inhibition by isolated acylated anthocyanins. *J. Agric. Food Chem* 49, 1952–1956.
- Mesulam, M.M., Guillozet, A., Shaw, P., Levey, A., Duysen, E.G., Lockridge, O., 2002. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 110, 627–639.
- Miara, M.D., Bendif, M., Rebbas, K., Rabah, B., Ait Hammou, M., Maggi, F., 2019. Medicinal plants and their uses in the highland region of Bourdj Bou Arreridj (Northeast Algeria). *J. Herb. Med.* 16, 100262.
- Mocan, A., Zengin, G., Crişan, G., Mollica, A., 2016. Enzymatic assays and molecular modeling studies of *Schisandra chinensis* lignans and phenolics from fruit and leaf extracts. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 31, 200–210.
- Mocan, A., Zengin, G., Simirgiotis, M., Schafberg, M., Mollica, A., Vodnar, D.C., Crişan, G., Rohn, S., 2017. Functional constituents of wild and cultivated Goji (*L. barbarum* L.) leaves: phytochemical characterization, biological profile, and computational studies. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 32, 153–168.
- Moridani, M.Y., Pourahmad, J., Bui, H., Siraki, A., O'Brien, P.J., 2003. Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radical Biol. Med.* 34, 243–253.
- Mukherjee, P.K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P.J., 2007. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* 14, 289–300.

- Ozturk, M., Aydogmus Ozturk, F., Duru, M.E., Topcud, G., 2007. Antioxidant activity of stem and root extracts of rhubarb (*Rheum ribes*): an edible medicinal plant. *Food Chem.* 103, 623–630.
- Ozyurek, M., Guclu, K., Tutem, E., Sozgen Baskan, K., Ercag, E., Çelik, S.E., Baki, S., Yıldız, L., Karaman, S., Apak, R., 2011. A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Anal. Methods* 3, 2439–2453.
- Mushtaq, A., Rasool, N., Riaz, M., Tareen, R.B., Zubair, M., Rashid, U., Akmal Khan, M., Taufiq-Yap, Y.H., 2013. Antioxidant, antimicrobial studies and characterisation of essential oil, fixed oil of *Clematis graveolens* by GC–MS. *Oxidation Commun.* 36, 1067–1078.
- Özer, O., Mutlu, B., Kıvc, B., 2007. Antityrosinase activity of some plant extracts and formulations containing ellagic acid. *Pharm. Biol.* 45, 519–524.
- Palanisamy, U., Manaharanb, T., Tengb, L.L., Radhakrishnanc, A.K.C., Subramaniamd, T., Masilaman, T., 2011. Rambutan rind in the management of hyperglycemia. *Food Res. Int.* 44, 2278–2282.
- Parvez, S., Kang, M., Chung, H.S., Cho, C., Hong, M.C., Shin, M.K., Hyunsu Bae, H., 2006. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother. Res.* 20, 921–934.
- Phaniendra, A., Jestadi, D.B., Periyasamy, L., 2015. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* 30, 11–26.
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphor molybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* 269, 337–341.
- Raj Bhandari, M., Jong-Anurakkun, N., Hong, G., Kawabata, J., 2008.  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.). *Food Chem.* 106, 247–252.
- 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 Radical Biol. Med.* 26, 1231–1237.
- Rengasamy, K.R.R., Khan, H., Gowrishankar, S., Lagoa, R.J.L., Mahomoodally, F.M., Khan, Z., Suroowan, S., Tewari, D., Zengin, G., Hassan, S.T.S., Pandian, S.K., 2019. The role of flavonoids in autoimmune diseases: therapeutic updates. *Pharmacol. Therap.* 194, 107–131.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., 1999. Phenolic compounds and their roles in oxidative process in fruits. *Food Chem.* 66, 401–436.
- Salehi, B., Armstrong, L., Rescigno, A., Yeskaliyeva, B., Seitimova, G., Beyatli, A., Sharifi-Rad, J., 2019. Lamium plants—a comprehensive review on health benefits and biological activities. *Molecules* 24, 1913.
- Sarikurkcu, C., 2011. Antioxidant activities of solvent extracts from endemic *Cyclamen mirabile* hildebr. tubers and leaves. *Af. J. Biotechnol.* 10, 831–839.
- Savran, A., Zengin, G., Aktumsek, A., Mocan, A., Glamoclija, J., Ćirić, A., Soković, M., 2016. Phenolic compounds and biological effects of edible *Rumex scutatus* and *Pseudo-sempervivum sempervivum*: potential sources of natural agents with health benefits. *Food Funct.* 7, 3252–3262.
- Shukla, S., Park, J., Kim, D.H., Hong, S.Y., Lee, J.S., Myunghee Kim, M., 2016. Total phenolic content, antioxidant, tyrosinase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of water soluble extracts of noble starter culture Doenjang, a Korean fermented soybean sauce variety. *Food Control* 59, 854–861.
- Slinkard, K., Singleton, V.L., 1977. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Viticult* 28, 49–55.
- Van Acker, S.A., Van den Berg, D.J., Tromp, M.N., Griffioen, D.H., Van Bennekom, W.P., Van der Vijgh, W.J., Bast, A., 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radicals Biol. Med.* 20, 331–342.
- Veiga, M., Costa, E.M., Silva, S., Pintado, M., 2018. Impact of plant extracts upon human health: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 60, 873–886.
- Wang, X., Wang, M., Cao, J., Wu, Y., Xiao, J., Wang, Q., 2017. Analysis of flavonoids and antioxidants in extracts of ferns from Tianmu Mountain in Zhejiang province (China). *Ind. Crops Prod.* 97, 137–145.
- Xiong, J., Bui, V.H., Liu, X.H., Hong, Z.L., Yang, G.X., Hua, J.F., 2014. Lignans from the stems of *Clematis armandii* (“Chuan-Mu-Tong”) and their anti-neuroinflammatory activities. *J. Ethnopharmacol.* 153, 737–743.
- Yao, L., Jiang, Y., Datta, N., Singanusong, R., Liu, X., Duan, J., Raymont, K., Lisle, A., Xu, Y., 2004. HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. *Food Chem.* 84, 253–263.
- Yesilada, E., Küpeli, E., 2007. *Clematis vitalba* L. aerial part exhibits potent anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects. *J. Ethnopharmacol.* 110, 504–515.
- Yuan, L., Huang, W., Ma, Y., Du, Z., 2012. Two new phenolic constituents from *Clematis connata* DC. *Af. J. Pharm. Pharmacol.* 6, 1050–1055.
- Zhang, Z., Wang, X., Zhao, M., Qian, K., 2014. Optimization of polysaccharides extraction from *Clematis huchouensis tamura* and its antioxidant activity. *Carbohydr. Polym.* 111, 762–767.
- Zhang, L.J., Huang, H.T., Huang, S.Y., Lin, Z.H., Shen, C.C., Tsai, W.J., Kuo, Y.H., 2015. Antioxidant and anti-inflammatory phenolic glycosides from *Clematis tashiroi*. *J. Nat. Prod.* 78, 1586–1592.
- Zhao, M., Da-Wa, Z.M., Guo, D.L., Fang, D.M., Chen, X.Z., Xu, H.X., Gu, Y.C., Xia, B., Chen, L., Ding, L.S., Zhou, Y., 2016. Cytotoxic triterpenoid saponins from *Clematis tangutica*. *Phytochemistry* 130, 228–237.