



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mustapha Benboulaïd – Batna 2
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de **Biologie des Organismes**

N°...../SNV/2024

THESE

Présentée par

CHAIRA Safa

Pour l'obtention du Diplôme de **Doctorat en Sciences**

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Moléculaire

Intitulée:

Etude chimique et pharmacologique de deux plantes *Veronica rosea* et *Cytisus purgans*

Soutenu le
Devant le jury :

Président	SENATOR Abderrahmene	Professeur Université Batna 2
Rapporteur	HARKAT Hassina	Professeur Université Batna 2
Examineurs	AMEDDAH Souad	Professeur Université Constantine 1
	SOBHI Widad	Professeur CRBT
	CHAFAI Nadjib	MCA Université sétif 1
	HANFER Mourad	MCA Université Batna2

Année Universitaire : 2023/2024

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance envers mon directeur de thèse, le **Professeur HARKAT Hassina**, qui m'a apporté un soutien inestimable tout au long de mes recherches. Son savoir, ses commentaires constructifs et ses suggestions éclairées ont grandement enrichi mon travail. Son accompagnement attentif, ses conseils précieux, son encouragement constant, sa disponibilité, sa bienveillance, sa bonté et son humanisme ainsi que sa supervision efficace ont été des atouts précieux qui m'ont guidé durant cette période de recherche et de rédaction des résultats. J'espère qu'elle ressentira, à travers ces lignes, la sincérité de mon profond respect et de ma reconnaissance éternelle.

Je tiens à exprimer mon immense gratitude envers **Professeur SENATOR Abderrahmane**, Professeur à l'Université de Batna 2, pour l'honneur qu'il m'a accordé en acceptant de présider le jury de cette thèse.

Je souhaite adresser mes sincères remerciements au **Professeur AMEDDAH Souad** de l'Université de Constantine pour avoir accepté de contribuer à l'évaluation de ma thèse, ce geste représente pour moi un honneur immense.

Mes vifs remerciements au **Professeur SOBHI Widad** du Centre de recherche et biotechnologie – Constantine- pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de faire partie du jury.

Mes chaleureux remerciements au **Docteur CHAFAI Nadjib**, de l'Université Ferhat Abbas de Sétif 1, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de faire partie du jury et d'évaluer ce travail. Je lui adresse ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens particulièrement à remercier le **Docteur HANFER Mourad** pour avoir accepté d'examiner ma thèse et pour m'avoir apporté de l'aide lorsque j'en avais besoin. Je vous adresse mes remerciements les plus sincères et distingués.

Ma reconnaissance va aussi à **Pr PALE Patrick** de l'université de Strasbourg ainsi que l'équipe du **LASYROC** pour l'accueil qu'ils m'ont accordé dans le laboratoire pour accomplir ce travail, qu'ils trouvent ici toute la sympathie et le respect que je leurs porte.

Je voudrais exprimer ma gratitude spéciale envers **Professeur BEN MOUSSA Mohammed Tahar**, Professeur en Pharmacognosie au département de pharmacie de Batna, qui m'a soutenu tout au long de ma thèse avec ses connaissances et ses suggestions constructives, son aide, son encouragement constant et sa disponibilité.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à **Pr ARAAR Chafik** , vice recteur chargé de la formation supérieure de troisième cycle , l'habilitation universitaire , la recherche scientifique et la formation supérieure de post-graduation pour son aide inestimable afin de bien mener ce travail .

Table des matières	
Résumé	I
Abstract	II
المخلص	III
Liste des abbréviations	IV
Liste des figures	VII
Liste des tableaux	XV
Introduction	1
Recueil bibliographique	
Chapitre I. Biomolécules dérivées de plantes	
I.1. Introduction	4
I.2. Biomolécules dérivées de plantes	4
I.2.1. Métabolites primaires	4
I.2.2. Métabolites secondaires	5
I.2.2.1. Composés phénoliques	6
a. Composés phénoliques simples	6
b. Polyphénols	8
I.2.2.2. Terpènes	13
I.2.2.3. Composés azotés	14
I.2.2.4. Composés soufrés	16
I.3. Activités biologiques des biomolécules dérivées de plantes	16
I.3.1. Activité antioxydante	17
I.3.2. Activité neuroprotectrice	21
1.3.2.1. Substances phénoliques et la maladie d'Alzheimer	25
1.3.2.2. Terpenoides comme inhibiteurs des cholinestérases	26
1.3.2.3. Coumarines comme agents de neuroprotection	27
I.3.3. Potentiel des composés naturels comme agents de protection solaire	27
I.3.4. Potentiel anti inflammatoire des biomolécules dérivées de plantes	30
I.3.5. Phyto-molécules et inhibition de l'uréase	33
I.3.6. Activité hémostatique des biomolécules dérivés de plantes	35
Chapitre II. Processus et les techniques de développement de médicaments à partir des plantes	
II.1. Introduction	37
II.2. Principales phases du développement des médicaments à partir de biomolécules issues de plantes	37
II.2.1. Phase Pré-médicamenteuse (predrug stage)	37
II.2.1.1. Exploration et Collecte	38

II.2.1.2. Extraction et purification	39
II.2. 2. Phase Quasi-médicamenteuse (quasi drug stage)	41
II.2.2.1. Screening Biologique	41
II.2.2.2. Études de Relation Structure-Activité (SAR)	42
II.2.3. Phase Médicamenteuse Complète (full drug stage)	42
II.2.3.1. Essais Précliniques	42
II.2.3.2. Essais cliniques	43
CHAPITRE III les plantes étudiées	
III.1. <i>VERONICA ROSEA</i>	44
III.1.1. Position taxonomique de <i>Veronica rosea</i>	44
III.1.3. Description botanique des plantaginaceae	45
III.1.4. Genre <i>Veronica</i>	47
III.1.5. Distribution géographique du genre <i>Veronica</i>	48
III.1.6. Description botanique du genre <i>Veronica</i>	49
III.1.7. Description botanique de l'espèce <i>Veronica rosea Desf</i>	50
III.1.8. Répartition géographique de l'espèce <i>Veronica rosea Desf</i>	54
III.1.9. Propriétés pharmacologiques des espèces du genre <i>Veronica</i>	54
III.2. <i>CYTISUS PURGANS</i>	55
III.2.1. Position Taxonomique de l'espèce <i>cytisis purgans</i>	55
III.2.2. Fabaceae	55
III.2.3. Description botanique des Fabaceae	56
III.2.4. Genre <i>Cytisus</i>	60
III.2.5. Description botanique de <i>Cytisus purgans</i>	61
III.2.6. Répartition géographique du genre <i>Cytisus</i>	63
III.2.7. Propriétés pharmacologiques du genre <i>Cytisus</i>	64
Travaux Personnels	
Chapitre VI Matériel et Méthodes	
IV.1. Objectifs de l'étude	66
IV.2. Matériel végétal	66
IV.2.1. <i>Veronica rosea Desf</i>	
IV.2.2. <i>Cytisus purgans subsp. balansae</i> (Boiss.) Maire	67
IV.3. Analyses phytochimiques	68
IV.3.1. Préparation des extraits de plantes	68

IV.3.2. Calcul du rendement d'extraction	70
IV.3.3. Criblage phytochimique	70
IV.3.3.1. Test des Alcaloïdes	70
IV.3.3.2. Test des Flavonoïdes	71
IV.3.3.3. Test des Tanins	71
IV.3.3.4. Test des Saponines	72
IV.3.3.5. Test des Stéroïls et des terpènes	72
IV.3.3.6. Hétérosides cardiotoniques	73
IV.3.3.7. Coumarines	73
IV.3.4. Séparation chromatographique des fractions et identification structurale des produits purs	73
IV.3.4.1. Fraction acétate d'éthyle de <i>Veronica rosea</i>	73
IV.3.4.2. Fraction <i>n</i> -butanolique de <i>Cytisus purgans</i>	74
IV.3.5. Dosage des polyphénols totaux	75
IV.3.6. Dosage des flavonoïdes	76
IV.3.7. Dosage des tanins	76
IV.3.7.1. Tanins condensés	76
IV.3.7.2. Tanins hydrolysables	77
IV.3.8. Dosage des anthocyanes	77
IV.4. Activités biologiques des extraits des plantes étudiées	78
IV.4.1. Potentiel antioxydant	78
IV.4.1.1. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)	78
IV.4.1.2. Activité de piégeage des radicaux DPPH	80
IV.4.1.3. Capacité antioxydante totale (CAT)	82
IV.4.2. Activité photoprotectrice	83
IV.4.3. Test de stabilisation de la membrane des globules rouges	84
IV.4.3.1. Préparation de la suspension érythrocytaire	85
IV.4.3.2. Hémolyse induite par l'hypotonie	85
IV.4.3.3. Test d'hémolyse induite par la chaleur	85
IV.4.4. Activité hémostatique	86
IV.4.5. Activité inhibitrice des cholinestérases	87
IV.4.6. Activité inhibitrice de l'uréase	90
IV.5. Approche <i>in silico</i> et docking moléculaire	90
IV.5.1. Molécules à étudier	92

IV.5.2. Outils <i>in silico</i>	92
IV.5.3. Méthode du docking moléculaire	94
IV.5.3.1. Étape I - préparation de la protéine	94
IV.5.3.2. Étape II - prédiction du site actif	95
IV.5.3.3. Étape III - préparation du ligand	99
IV.5.3.4. Étape IV - Docking :	100
a. Préparation du fichier de ligands	100
b. Préparation du fichier des paramètres de Grid	100
c. Préparation du fichier des paramètres d'Autodock	101
Chapitre V Résultats et Discussion	
V.1. Introduction	102
V.2. Résultats de l'investigation chimique	102
V.2.1. Rendements des extractions	102
V.2.2. Criblage phytochimique	103
V.2.3. Investigation chimique des espèces étudiées	105
V.2.3.1. Investigation chimique de l'espèce <i>Veronica rosea</i>	105
- Elucidation structurale du composé VAc 1	106
- Elucidation structurale du composé VAc 2	108
- Elucidation structurale du composé VAc 3	110
- Elucidation structurale du composé VAc 4	113
- Elucidation structurale du composé VAc 5	117
- Elucidation structurale du composé VAc 6	119
- Elucidation structurale du composé VAc 7	122
- Elucidation structurale du composé VAc 8	124
V.2.3.2. Investigation chimique de l'espèce <i>Cytisus purgans</i>	129
- Elucidation structurale du produit CPB 1	130
- Elucidation structurale du produit CPB2	132
- Elucidation structurale du produit CPB 3	135
- Elucidation structurale du produit CPB 4	137
- Elucidation structurale du produit CPB 5	140
- Elucidation structurale du produit CPB 6	142
- Elucidation structurale du produit CPB 7	144
V.3. Dosage des polyphénols totaux	148
V.4. Dosage des flavonoïdes totaux	149

V.5. Dosage des tanins hydrolysables et condensés	151
V.6. Dosage des anthocyanes	152
V.7. Résultats de l'investigation pharmacobiologique	152
V.7.1. Pouvoir antioxydant de <i>Veronica rosea</i> et <i>Cytisus purgans</i>	152
V.7.1.1. Pouvoir réducteur du fer	153
V.7.1.2. Test de piégeage du radical DPPH	154
V.7.1.3. Capacité antioxydante totale	157
V.7.2. Activité dermoprotectrice et photoprotectrice	158
V.7.3. Test de stabilisation de la membrane des globules rouges	163
V.7.4. Activité hémostatiques	170
V.7.5. Activités enzymatiques	172
V.7.5.1. Activité neuroprotectrice et anti-alzheimer	173
V.7.5.2. Activité anti uréase	180
V.8. Résultats du docking moléculaire	182
V.8.1. Résultats obtenus du site PubChem	183
V.8.2. Résultats obtenu à partir de site Molinspiration, PubChem et SwissADME	185
V.8.3. Bioactivité à partir de molinspiration	186
V.8.4. Biodisponibilité des biomolécules	187
V.8.5. Résultats obtenus à partir de site Admet-SAR	191
V.8.6. Résultats de la Prédiction de l'activité biologique obtenu de site Way2drug	196
V.8.7. Résultats du docking moléculaire	200
V.8.7.1. Résultats des principaux ligands obtenus du site Pharmmapper	200
V.7.8.2. Prédiction du site actif par pockDrug	202
V.4.8.3. Résultats de l'analyse d'AUTODOCK	202
CONCLUSION	206

Résumé

Abstract

الملخص

Résumé

Cette étude approfondie se concentre sur deux plantes spécifiques : *Veronica rosea*, une plante endémique d'Algérie de la famille des Plantaginaceae, et *Cytisus purgans*, une plante méditerranéenne de la famille des Fabaceae.

Nous avons réalisé une analyse chimique approfondie en utilisant des techniques chromatographiques pour obtenir des produits purs, qui ont ensuite été identifiés par des techniques spectrales telles que la RMN et la spectroscopie de masse. Au total, nous avons identifié 10 flavonoïdes, 4 isoflavonoïdes et un phytostérol. Les extraits des deux plantes ont été évalués pour leur activité antioxydante à l'aide de trois méthodes différentes (DPPH, FRAP, capacité antioxydante totale). Les résultats ont montré une action antioxydante très intéressante, ainsi leur action photoprotectrice a été confirmée par le calcul du SPF selon la méthode de Mansur et al., indiquant un potentiel effet dermoprotecteur. Nous avons également testé leur action anti-inflammatoire *in vitro* en utilisant le modèle de stabilisation de la membrane des globules rouges, et leur effet hémostatique a été évalué en mesurant le temps de recalcification du plasma. Les résultats ont démontré un effet anti-inflammatoire significatif par rapport au diclofénac de sodium, ainsi qu'une diminution hautement significative du temps de recalcification de plasma.

En outre, nous avons évalué l'activité inhibitrice de l'uréase et des cholinestérases. Bien que l'activité antiurésique soit bonne, l'activité butyrylcholinestérasique était très encourageante. Par conséquent, nous avons envisagé un essai de docking moléculaire des phytoconstitués de *Cytisus purgans* avec la butyrylcholinestérase. Les résultats ont confirmé les essais *in vitro*, montrant que toutes les biomolécules extraites de *C. purgans* formaient des liaisons stables avec le site actif de la butyrylcholinestérase, par rapport à la galantamine, notre molécule de référence.

En somme, *Veronica rosea* et *Cytisus purgans* sont très riches en flavonoïdes, ce qui explique probablement leurs potentiels pharmacologiques. Par conséquent, elles peuvent être exploitées dans l'amélioration de certaines pathologies ainsi que dans la préparation de produits cosmétiques.

Mots clefs: *Cytisus purgans*, *Veronica rosea*, antioxydant, HRBC, activité hémostatique, acetyl/butyrylcholinestérase, docking moléculaire.

Abstract

This in-depth study focuses on two specific plants: *Veronica rosea*, an endemic plant from Algeria belonging to the Plantaginaceae family and *Cytisus purgans*, a Mediterranean plant from the Fabaceae family.

A thorough chemical analysis using chromatographic techniques was conducted to obtain pure products, which were then identified using spectral techniques such as NMR and mass spectrometry. In sum, we identified 10 flavonoids, 4 isoflavonoids, and a phytosterol. Extracts from both plants were evaluated for their antioxidant activity using three different methods (DPPH, FRAP, total antioxidant capacity). The results showed a very interesting antioxidant action. Thus, their photoprotective action was confirmed by calculating the SPF using the method of Mansur et al., indicating a potential dermoprotective effect. In vitro anti-inflammatory action was evaluated using the red blood cell membrane stabilization model, and even hemostatic effect was evaluated by measuring plasma recalcification time. The results demonstrated a significant anti-inflammatory effect compared to sodium diclofenac, as well as a highly significant reduction in recalcification time.

Furthermore, we evaluated the inhibitory activity of urease and cholinesterases. Although the anti-urease activity was good, the butyrylcholinesterase activity was very encouraging. Therefore, we considered a molecular docking assay of the phytochemicals from *Cytisus purgans* with butyrylcholinesterase. The results confirmed the *in vitro* assays, showing that all the biomolecules extracted from *C. purgans* formed stable bonds with the active site of butyrylcholinesterase, compared to galantamine, our reference molecule.

In conclusion, *Veronica rosea* and *Cytisus purgans* are rich in flavonoids, which probably explains their pharmacological potentials. Therefore, they can be exploited in improving certain pathologies as well as in the preparation of cosmetic products.

Keywords : *Cytisus purgans* , *Veronica rosea* , antioxidant , HRBC , hemostatic activity , acetyl/butyrylcholinesterase , molecular docking .

الملخص

تركز هذه الدراسة العميقة على نبتتين *Veronica rosea* ، وهي نبتة محلية في الجزائر تنتمي إلى عائلة Fabaceae، و *Cytisus purgans* ، وهو نبات من البحر الأبيض المتوسط من عائلة Plantaginaceae

أجرينا تحليلاً كيميائياً شاملاً باستخدام تقنيات الكروماتوغرافيا للحصول على منتجات نقية، ثم تم تحديدها باستخدام تقنيات الطيف مثل NMR والطيف الكتلي. بشكل إجمالي، حددنا 10 فلافونويدات و 4 إيزوفلافونويدات وفيتوستيرول واحد. تم تقييم مستخلصات النباتين لنشاطها المضاد للأكسدة باستخدام ثلاث طرق مختلفة DPPH و FRAP و القدرة الكلية على مكافحة الأكسدة. أظهرت النتائج تأثيراً مضاداً للأكسدة مهماً للغاية، وتم تأكيد تأثيرهما الواقي من الشمس من خلال حساب SPF، ما يدل على وظيفتهما المحتملة في حماية البشرة من أشعة الشمس. قمنا أيضاً بفحص تأثيرهما المضاد للالتهاب في المختبر باستخدام نموذج استقرار غشاء الخلايا الحمراء، وتم تقييم تأثيرها على عوامل تخثر الدم. أظهرت النتائج تأثيراً مضاداً للالتهاب ملحوظاً مقارنةً بالديكلوفيناك الصوديوم، بالإضافة إلى انخفاض ملحوظ للغاية في وقت تخثر الدم

علاوة على ذلك، قمنا بتقييم النشاط المثبط لأنزيم يوريزاز والكولينستيراز. على الرغم من أن النشاط المضاد لليوريزاز كان معتدلاً، إلا أن النشاط البوتيريلكولينستيراز كان مشجعاً للغاية. لذلك، قمنا بتنظيم تجربة توجيه جزيئي للمركبات المستخلصة من *Cytisus purgans* مع البوتيريلكولينستيراز التي توافق نتائجها نتائج التجارب المخبرية، حيث تمكنت جميع المركبات المستخلصة من *C. purgans* من تشكيل روابط هيدروجينية ثابتة مع الموقع النشط للأنزيم، مقارنةً بالجالانتامين، جزيئنا المرجعي.

ختاماً ، فإن نبتتي *Veronica rosea* و *Cytisus purgans* غنيتان بالفلافونويدات، مما يفسر على الأرجح قدراتهما الدوائية. لذلك، يمكن استغلالهما في علاج بعض الأمراض بالإضافة إلى إعداد بعض منتجات التجميل .

الكلمات المفتاحية: *Cytisus purgans* ، *Veronica rosea* ، مضادات الاكسدة ، مثبطات الكولينستيراز ، مثبطات البوتيريلكولينستيراز ، مضادات الالتهاب .

Liste des abréviations

γGCS	γ-glutamylcystéine synthétase
Aβ	Amyloidβ
ACh	Acétylcholine
AchE	Acétylcholinestérase
ADN	Acide désoxyribonuléique
(ARE)	Antioxidant response element
BBB	Blood-brain barrier
BchE	Butyrylcholinestérase
COX-2	Cyclooxygenase 2
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle
ERK	Extracellular signal-regulated kinase, protein-serine/threonine kinase
ERK1	Extracellular signal-regulated kinase 1, protein-serine/threonine kinase 1
ERK2	Extracellular signal-regulated kinase 2 protein-serine/threonine kinase 2
GCL	Glutamate cystéine ligase
GPX	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion
HHDP	Acide hexahydroxydiphenique
HO-1	Hème oxygénase-1
IL-1	Interleukin-1
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF-κB	Kappa B nuclear factor
NO	Oxyde nitrique
NOS	Oxyde nitrique synthétase
PERK	Kinase de la protéine
PGE₂	Prostaglandine E2
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	Protéine kinase C
PRX	Peroxiredoxine
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SNC	Système nerveux central

SOD	Superoxyde dismutase
TFT	Toll-like receptor
TLR-4	Teneur en polyphénols totaux
TPT	Teneur en flavonoïdes totaux
TRX	Thioredoxine
TRXR	Thioredoxine réductase

Liste des figures

Liste des figures	Page
Figure 1. Classification générale des métabolites secondaires	6
Figure 2. Structure générale des composés phénoliques simples	6
Figure 3. Exemples de dérivés de l'acide hydroxybenzoïque	7
Figure 4. Structure de l'acide caféique	7
Figure 5. Structure de base des Coumarines et hydroxycoumarines	7
Figure 6. Les sous classes des polyphénols	8
Figure 7. Structure de base des Flavonoïdes	8
Figure 8. Principales classes des flavonoïdes	9
Figure 9. Structure des tanins	10
Figure 10. La structure du noyau de base des stilbènes	11
Figure 11. Structure générale des lignanes et exemples	12
Figure 12. Structure des lignines	13
Figure 13. Les différentes classes de terpenoïdes	13
Figure 14. Structure de quelques alcaloïdes vrais	14
Figure 15. Mescaline	15
Figure 16. Structures de quelques pseudoalcaloïdes	15
Figure 17. Les métabolites secondaires soufrés	16
Figure 18. Activités de biomolécules dérivées de plantes dans la lutte contre certaines maladies	17
Figure 19. Les espèces réactives de l'oxygène et leurs implications dans certaines pathologies	18
Figure 20. Mécanismes d'action antioxydante des polyphénols	19
Figure 21. Mécanismes d'action de certains composés phénoliques (flavonoïdes)	20
Figure 22. Pathogénie des maladies neurodégénératives	21
Figure 23. Hypothèse cholinergique de la physiopathologie de la maladie d'alzheimer	22

Figure 24. Rôle du stress oxydant dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer	23
Figure 25. Action neuroprotectrice des flavonoïdes	24
Figure 26. Effets néfastes des rayons solaires sur la peau	26
Figure 27. Rôle des phyto-antioxydants dans la dermoprotection	27
Figure 28. Les phytoconstituants et la protection solaire	28
Figure 29. Effet anti-inflammatoire des phytomolécules	29
Figure 30. Mode d'action de quelques biomolécules dérivées de plantes	30
Figure 31. Activité anti-uréase des différentes classes des flavonoïdes	32
Figure 32. Approches actuelles pour la découverte de médicaments à partir de biomolécules dérivées de plantes	38
Figure 33. Les principales étapes de la découverte des bioactifs issus de plantes	40
Figure 34. Purification des biomolécules actives extraites de plantes	41
Figure 35. Approche étape par étape pour les tests précliniques des produits botaniques	43
Figure 36. feuilles dimorphiques	45
Figure 37. inflorescence de quelques espèces du genre <i>Plantago</i>	45
Figure 38. Fleurs de quelques espèces des Plantaginacés	46
Figure 39. Corolle personée de <i>Antirrhinum nuttallianum</i> .	46
Figure 40. Fruits de quelques Plantaginacés	47
Figure 41. Quelques espèces Iranienne du genre <i>Veronica</i>	48
Figure 42. Fleurs de quelques espèces du genre <i>Veronica</i>	49
Figure 43. Fruits de quelques espèces de <i>Veronica</i>	50
Figure 44. les parties aérienne illustrant la tige de <i>V.rosea</i>	51
Figure 45. les feuilles de <i>V. rosea</i>	51
Figure 46. la fleur de <i>V. rosea</i>	52
Figure 47. Racèmes de <i>V. rosea</i>	52
Figure 48. Distribution géographique de l'espèce <i>Veronica rosea Desf</i>	54

Figure 49. Feuilles des espèces du genre <i>Cytisus</i>	56
Figure 50. Inflorescence en racème	57
Figure 51. Fleur d'une fabacée	57
Figure 52. Calice des Fabaceae	58
Figure 53. Fruit type des Fabaceae	58
Figure 54. <i>Glycyrrhiza glabra</i>	59
Figure 55. Description botanique de certaines espèces du genre <i>Cytisus</i>	61
Figure 56. <i>Cytisus purgans</i>	63
Figure 57. Distribution géographique de <i>Cytisus balanseae boiss ball</i> Maire	64
Figure 58. Importance médicinale des espèces du genre <i>Cytisus</i>	65
Figure 59. <i>Veronica rosea Desf</i>	66
Figure 60. <i>Cytisus balansae boiss ball</i> Maire	67
Figure 61. La procédure d'extraction séquentielle pour préparer les fractions	69
Figure 62. Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe ferricyanide ferrique Fe (III) et un antioxydant	78
Figure 63. Mécanismes de capture du DPPH par un antioxydant.	80
Figure 64. Mécanisme de réaction du phosphomolybdène	81
Figure 65. Schéma d'hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase	86
Figure 66. Mécanisme de la réaction d'Ellman	86
Figure 67. Activité de l'AChE par la méthode d'Ellman.	87
Figure 68. Etapes du docking moléculaire	92
Figure 69. Méthode d'estimation de fpocket.	94
Figure 70. Prédiction de la druggabilité de la poche	94
Figure 71. Comparaison des poches et scores de chevauchement.	95
Figure 72. Les paramètres de GridBox	97
Figure 73. Composés isolés à partir de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce <i>Veronica rosea</i>	106

Figure 74. Spectre R MN ^1H du composé VAc 1	106
Figure 75. Spectre RMN ^{13}C du composé VAc 1	107
Figure 76. Spectre HSQC du composé VAc 1	107
Figure 77. Isoscutellarein	108
Figure 78. Spectre R MN ^1H du composé VAc2	109
Figure 79. Spectre RMN ^{13}C du composé VAc 2	109
Figure 80. Spectres HMBC du composé VAc 2	110
Figure 81. Isoscutellarein-8-O - β -D-glucopyranoside	110
Figure 82. Spectre R MN ^1H du composé VAc3	110
Figure 83. Spectre RMN ^{13}C du composé VAc3	112
Figure 84. Spectre HSQC du composé VAc3	112
Figure 85. Spectre HMBC du composé VAc3	113
Figure 86. Isoscutellarein-7-O - β -D-glucopyranoside	113
Figure 87. Spectre R MN ^1H du composé VAc4	114
Figure 88. Spectre RMN ^{13}C du composé VAc4	115
Figure 89. Spectre HMBC du composé VAc4	116
Figure 90. Isoscutellarein 7-O- [6-O-acétyl- β -D -allopyranosyl- (1 \rightarrow 2)] - β -D-glucopyranoside	116
Figure 91. Spectre R MN ^1H du composé VAc5	118
Figure 92. Spectre RMN ^{13}C du composé VAc5	119
Figure 93. Apigénine	119
Figure 94. Spectre R MN ^1H du composé VAc6	120
Figure 95. Spectre RMN ^{13}C du composé VAc6	121
Figure 96. Apigenin-7-O- β -glucopyranoside	121
Figure 97. Spectre R MN ^1H du composé VAc7	123
Figure 98. Spectre RMN ^{13}C du composé VAc7	124

Figure 99. Luteoline	124
Figure 100. Spectre R MN 1H du composé VAc8	125
Figure 101. Spectre RMN 13C du composé VAc8	126
Figure 102. Spectre HSQC du composé VAc8	126
Figure 103. Spectre HMBC du composé VAc8	127
Figure 104. Luteolin-7- <i>O</i> -Glucoside	127
Figure 105. Spectre R MN 1H du composé CPB1	131
Figure 106. Spectre RMN 13C du composé CPB1	131
Figure 107. Spectre HSQC du composé CPB1	132
Figure 108. Daidzéine	132
Figure 109. Spectre R MN 1H du composé CPB2	133
Figure 110. Spectre HSQC du composé CPB2	133
Figure 111. Spectre RMN 13C du composé CPB2	134
Figure 112. Génistéine	134
Figure 113. Spectre R MN 1H du composé CPB3	135
Figure 114. Spectre RMN 13C du composé CPB3	136
Figure 115. Spectre HSQC du composé CPB3	136
Figure 116. Isoprunétine	137
Figure 117. Spectre R MN 1H du composé CPB4	137
Figure 118. Spectre HSQC du composé CPB4	138
Figure 119. Spectre RMN 13C du composé CPB4	138
Figure 120. Biochanine A	139
Figure 121. Spectre R MN 1H du composé CPB5	140
Figure 122. Spectre RMN 13C du composé CPB5	141
Figure 123. chrysine	141

Figure 124. Spectre R MN 1H du composé CPB6	142
Figure 125. Spectre RMN 13C du composé CPB6	143
Figure 126. Quercetine	143
Figure 127. Spectre R MN 1H du composé CPB7	147
Figure 128. Spectre RMN 13C du composé CPB7	147
Figure 129. Daucostérol	148
Figure 130. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	148
Figure 131. Courbe d'étalonnage de la quercetine pour le dosage des flavonoïdes totaux	150
Figure 132. Courbe d'étalonnage de l'acide tannique	151
Figure 133. Réaction entre DPPH et acide ascorbique	156
Figure 134. Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour la détermination de la capacité antioxydant totale.	158
Figure 135. les phototypes de la peaux et le SPF correspondant	160
Figure 136. Les stratégies de photoprotection des substances naturelles	161
Figure 137. La lutéoline dans la photo protection de la peau	162
Figure 138. Effet inhibiteur de l'hémolyse induite par l'hypotonicité de l'extrait acétate d'éthyle de <i>V.rosea</i>	165
Figure 139. Effet inhibiteur de l'hémolyse induite par la chaleur de l'extrait acétate d'éthyle de <i>V.rosea</i>	165
Figure 140. Effet inhibiteur de l'hémolyse induite par l'hypotonicité de l'extrait <i>n</i> -butanole de <i>C.purgans</i>	166
Figure 141. Effet inhibiteur de l'hémolyse induite par la chaleur de l'extrait <i>n</i> -butanolique de <i>C.purgans</i>	166
Figure 142. Activités pharmacologiques des flavonoïdes acylés	168
Figure 143. Mécanismes mises en jeu dans l'action antiinflammatoire du daucostérol	170
Figure 144. Quelques biomolécules hémostatique et leurs mécanismes d'action	172
Figure 145. Effet d'inhibition de la butyrylcholinestérase des extraits de <i>C. purgans</i>	175
Figure 146. Effet d'inhibition de l'acétylcholinestérase des extraits de <i>C. purgans</i>	175
Figure 147. Effet d'inhibition de l'acétyl/butyrylcholinestérase des extraits de <i>V.rosea</i>	176
Figure 148. Mécanisme d'action de la quercetine dans la maladie d'Alzheimer	178

Figure 149. Mécanisme de neuroprotection de la daidzeine	179
Figure 150. Mécanisme de la neuroprotection du daucostérol	180
Figure 151. Effet d'inhibition de l'uréase des extraits de <i>V.rosea</i> par rapport à un contrôle classique, la thiourée.	181
Figure 152. Effet d'inhibition de l'uréase des extraits de <i>C.purgans</i> par rapport à un contrôle classique, la thiurée.	182
Figure 153. Les éléments de la drug-likeness	185
Figure 154. Structure 3D de la butyrylcholinestérase humaine (PDB)	201
Figure 155. Visualisation de la liaison de la biochanine A avec le site actif	205

Liste des tableaux	Page
Tableau 1. Les valeurs de $EE(\lambda) \times I(\lambda)$ utilisée dans le calcul de la SPF	100
Tableau 2. Les molécules à étudier	109
Tableau 3. Les logiciels utilisés dans l'étude	109
Tableau 4. Les sites web utilisés dans l'étude	110
Tableau 5. Caractéristiques et rendements des extraits de <i>Veronica rosea</i> et <i>Cytisus purgans</i>	120
Tableau 6. Résultats du screening phytochimiques de <i>V. rosea</i> et <i>C.purgans</i>	121
Tableau 7. Déplacements chimiques RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) des composés VAc 1 , VAc 2 , VAc 3 et VAc 4 identifié dans l'extrait de <i>V.rosea</i>	128
Tableau 8. Déplacements chimiques RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) des composés VAc 5 et VAc6 identifié dans l'extrait de <i>V.rosea</i>	131
Tableau 9. Déplacements chimiques RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) des composés VAc7 et VAc8 identifié dans l'extrait de <i>V.rosea</i>	134
Tableau 10. Structure des biomolécules isolées de l'extrait <i>n</i> -butanolique de <i>C.purgans</i>	136
Tableau 11. Déplacements chimiques RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) des composés CPB1 , CPB2 , CPB3 et CPB4 identifié dans l'extrait de <i>C.purgans</i>	141
Tableau 12. Déplacements chimiques en RMN 1H (à 500 MHz) et RMN ^{13}C (à 125 MHz) des produits CPB5 et CPB6 de <i>Cytisus purgans</i>	144
Tableau 13. Déplacements chimiques en RMN 1H (à 500 MHz)et RMN, ^{13}C (à 125 MHz)du produit CPB7 de <i>Cytisus purgans</i>	146
Tableau 14. Capacité antioxydante des extraits par le test FRAP	154
Tableau 15. Capacité de piégeage du radical DPPH	155
Tableau 16. Valeur du SPF des deux extraits <i>V.rosea</i> et <i>C.purgans</i>	160
Tableau 17. Raccourcissement du temps de coagulation induit par <i>V.rosea</i>	172
Tableau 18. raccourcissement du temps de coagulation induit par <i>C.purgans</i>	173
Tableau 19. Activité inhibitrice de l'acetyl/butyrylcholinesterase par <i>V.rosea</i> et <i>C.purgans</i>	175
Tableau 20. Activité inhibitrice de l'uréase par <i>V.rosea</i> et <i>C. purgans</i>	183
Tableau 21. Structure des phytomolécules extraites de <i>C.purgans</i>	185
Tableau 22. Caractères généraux selon pubchem.	186
Tableau 23. Principaux paramètres physicochimiques selon Molinspiration des composés.	188
Tableau 24. Estimation des scores de bioactivité selon Molinspiration.	189

Tableau 25. Score de drug likeness des phytomolécules extraites de <i>C.purgans</i> .	190
Tableau 26. Classification des phytoconstituants de <i>C.purgans</i> selon la lipophilie	192
Tableau 27. Biodisponibilité des principaux composés	193
Tableau 28. Propriétés ADMET	194
Tableau 29. Classification des composés isolés de la plante <i>C.purgans</i> selon Zhang et al	196
Tableau 30. Classification biopharmaceutique des principaux composés des deux plantes	197
Tableau 31. Résultat de prédiction des activités des principaux composés	199
Tableau 32. Cible potentielle pour chaque composé majoritaire utilisant le serveur Pharmapper.	202
Tableau 33. Résultats Pockdrug.	204
Tableau 34. Résultats des paramètres obtenus des complexes protéines ligands pour la première conformation.	205



Introduction

Introduction

La région méditerranéenne se distingue par une diversité biologique exceptionnelle ainsi qu'une riche biodiversité estimée à 25 000 espèces de plantes vasculaires dont 5 500 sont uniques, représentant 9,2% de la diversité totale des espèces dans un territoire ne couvrant que 1,5% de la surface terrestre (Habib et al., 2020). Le Bassin méditerranéen a été décrit comme l'une des régions les plus riches et les plus complexes sur le plan géologique, biologique et culturel, il fait partie des 34 points chauds de la planète. Ces points chauds se caractérisent par leur richesse spécifique et leur taux d'endémisme (Djebbouri & Terras, 2019), en effet, il est le troisième hotspot le plus important de la planète en termes de diversité végétale et l'un des habitats les plus significatifs pour les espèces endémiques (Bedair et al., 2023, Guemou et al., 2023). En fait, la position de la Méditerranée entre l'Europe et l'Afrique, sa géographie et son rôle de refuge pour les espèces en altitude pendant les périodes glaciaires ont contribué à son immense biodiversité et à un endémisme élevé. (ZEDAM Abdelghani et al., 2016)

En raison de sa position géographique, l'Algérie offre une grande variété d'habitats abritant une importante richesse floristique. (Habib *et al.*, 2020). En effet sa position entre deux empires floraux, le Holarctis au nord et le Paleotropis au sud, la place au septième rang en nombre de taxons floraux. (Benchouala *et al.*, 2023). Selon Quézel & Santa, la flore algérienne compte 3 139 espèces, comprenant 3 744 taxons, dont 464 endémiques et 1 818 espèces plus ou moins rares. Cette évaluation de l'inventaire est désormais portée à 4 449 taxons répartis dans 150 familles botaniques et 917 genres, dont 464 sont des taxons endémiques nationaux comprenant 387 espèces, 53 sous-espèces et 24 variétés. (ZEDAM Abdelghani *et al.*, 2016), avec 3 951 taxons autochtones et 498 introduits en Algérie. (Habib et al., 2020). Indubitablement la flore algérienne est l'une des plus riches d'Afrique du Nord. (Miara *et al.*, 2018)

En plus de sa richesse en biodiversité, l'Algérie possède une tradition médicinale à base de plantes longue et riche. Dans ce pays, la phytothérapie fait partie intégrante de la culture locale qui, dans une large mesure, n'a pas été écrite et continue d'être transmise oralement de génération en génération (Bouasla & Bouasla, 2017). La médecine à base de plantes en Algérie découle de la médecine arabo-islamique, qui combine la médecine prophétique avec la médecine humorale galénique. Elle est pratiquée à la fois par des herboristes professionnels et des guérisseurs basés dans les centres urbains, mais aussi transmise oralement et pratiquée par la population profane. (Miara *et al.*, 2018)

Aujourd'hui, ce patrimoine est moins transmis en raison de l'industrialisation et des changements de mode de vie.(Bouasla & Bouasla, 2017)

L'intérêt des sciences médicales et de l'industrie est croissant pour les plantes médicinales, aromatiques, et endémiques, de leur production à leur utilisation par le public ; plusieurs sciences et disciplines sont concernées, notamment la foresterie, l'agronomie, la chimie, la pharmacie et l'écologie. (Hind *et al.*, 2020)

Les biomolécules synthétisés par les plantes en tant que métabolites secondaires, jouent un rôle crucial dans leur croissance et leur physiologie. Leurs potentiels et leurs abondances en font l'objet d'études constantes, étant parmi les phytochimiques les plus présents dans notre alimentation et dotés d'une gamme d'effets biologiques importants pour la santé et le bien-être général. Ces composés offrent une protection contre les maladies causées par les dommages oxydatifs, tels que les maladies coronariennes, les accidents vasculaires cérébraux et les cancers.

Compte tenu de l'intérêt croissant pour les biomolécules d'origine végétale dans le domaine de la santé, cette étude se concentre sur deux plantes spécifiques. D'abord, *Veronica rosea*, une plante endémique d'Algérie appartenant à la famille des Plantaginaceae. La majorité des espèces du genre *Veronica* sont utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antiulcéreuses, spasmolytiques, expectorantes et hémostatiques (Hasan AL-Hadeethi *et al.*, 2022). Puis, *Cytisus purgans*, une plante appartenant à la famille des Fabaceae et originaire de la région méditerranéenne. Les plantes du genre *Cytisus* ont démontré diverses actions pharmacologiques, telles que des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses, anticancéreuses, antidiabétiques, antirhumatismales, antimicrobiennes, antibactériennes et cytotoxiques (Ahmad *et al.*, 2016) . Une analyse détaillée des phytoconstituants de ces deux plantes est réalisée, suivie d'un criblage pharmacologique visant à étayer leurs utilisations thérapeutiques.

Ce manuscrit est organisé en trois parties :

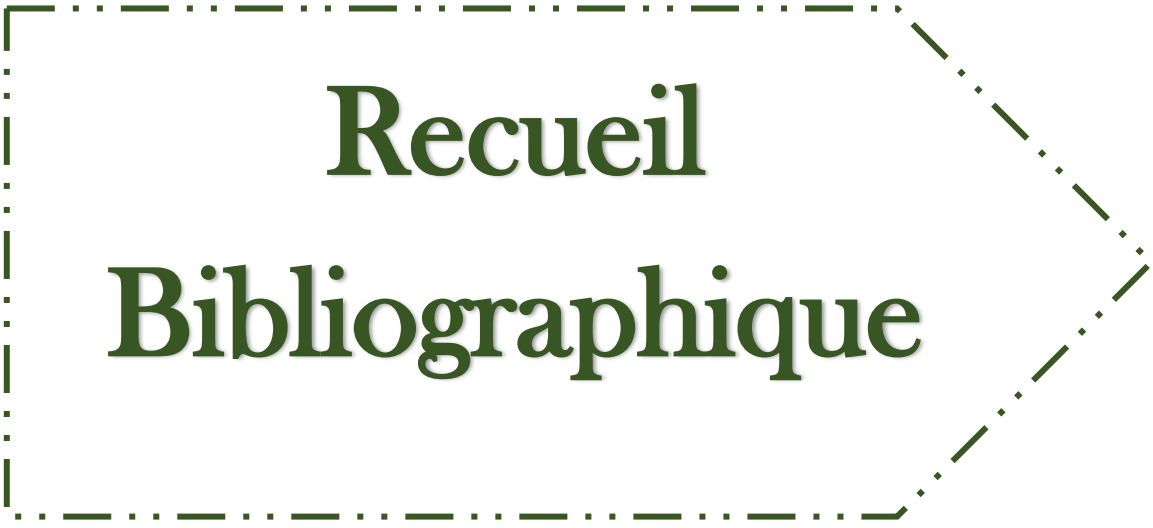
La première partie est une revue de la littérature sur les biomolécules dérivées de plantes, le processus et les techniques de développement de médicaments à partir des plantes ainsi qu'une présentation botanique des deux plantes étudiées.

La seconde partie est consacrée aux protocoles et méthodes opératoires suivies pour la purification et identification des phytomolécules extraites des deux plantes ainsi que

l'évaluation de leur potentiel pharmacologique et une étude bio-informatique des phyocomposés de *Cytisus purgans*

La dernière partie expose et discute les résultats expérimentaux obtenus.

Finalement, l'ensemble de ce travail est clôturé par une conclusion générale portant sur une lecture attentive des différents résultats obtenus et des perspectives de recherche envisageables.



**Recueil
Bibliographique**



Chapitre I
Biomolécules dérivées
de plantes

Chapitre I : BIOMOLECULES DERIVEES DE PLANTES

I.1. Introduction

Les biomolécules, également appelées molécules biologiques, sont produites par toutes les cellules vivantes. Les biomolécules d'origine végétale sont utilisées non seulement pour traiter les maladies, mais sont également populaires en tant que nutraceutiques et excipients pharmaceutiques. (Mandal et al, 2022)

La caractérisation chimique et la purification des plantes ont débuté vers l'an 1800 de notre ère. Ainsi, environ 80 000 structures chimiques uniques ont été isolées à partir de plantes supérieures. Différentes familles de plantes produisent différents métabolites secondaires, qui varient également considérablement dans leur structure chimique, ce qui donne un grand nombre de structures étroitement apparentées. (Omprakash *et al.*, 2019)

I.2. Biomolécules dérivées de plantes

Les biomolécules dérivées des plantes constituent une source inépuisable de composés bioactifs qui possèdent d'innombrables applications potentielles en nutrition, en médecine et en agriculture.

Leur exploration est essentielle pour exploiter pleinement leur potentiel bénéfique dans le domaine des soins de santé humaine, animale et environnementale. Leur utilisation est répandue à l'échelle mondiale, bénéficiant ainsi de leurs propriétés physico-chimiques et pharmacologiques distinctes. (Shin *et al.*, 2020)

Les biomolécules d'origine végétale sont des composés organiques réparties en métabolites primaires et secondaires. (Mandal *et al.*, 2022)

I.2.1. Les métabolites primaires

Sont des produits essentiels à la croissance et au maintien des fonctions cellulaires normales. Les métabolites primaires sont présents dans tous les organismes vivants sans exceptions. Ces métabolites primaires comprennent des glucides, des acides aminés, des acides gras et des acides organiques nécessaires à la croissance, au développement, à la respiration, à la photosynthèse et à la synthèse d'hormones et de protéines (Mandal *et al.*, 2022) .

Les métabolites primaires sont produits à un taux élevé pendant la phase de croissance de l'organisme, appelée tropophase. Leur production requiert la présence de nutriments dans leurs milieux de culture. Ils font partie des structures de base des cellules comme les phospholipides des membranes et le peptidoglycane et la chitine des parois cellulaires, sans oublier leurs rôles

dans la transmission de l'information génétique chapeauté par l'ADN et l'ARN (Elshafie *et al.*, 2023).

I.2.2. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des petites molécules organiques de masse moléculaire généralement inférieure à 3000Da. Leurs natures chimiques ainsi que la composition des plantes en métabolites secondaires varient selon l'espèce. Les métabolites secondaires jouissent d'une importance indéniable pour diverses raisons notamment leurs potentiels d'être candidats médicaments (Twaij & Hasan, 2022) .

Les plantes produisent différents métabolites secondaires à différentes phases de développement qui sont importants pour communiquer et interagir avec d'autres organismes et avec l'environnement, c'est le cas des glycoalcaloïdes tomatine et déshydratmatine qui protègent les tomates vertes contre la consommation par les herbivores et contre l'infection par les champignons et les lichens. Certains métabolites secondaires appelé phytolaxeine se forment uniquement lorsque la plante est infestée par des agents pathogènes microbiens. (Omprakash *et al.*, 2019)

Les métabolites secondaires sont divisés en quatre grandes classes (Fig.1) selon leurs voies de biosynthèse

1. Les composés phénoliques
2. Les terpènes et les stéroïdes
3. Les composés azotés.
4. Les composés soufrés (Twaij & Hasan, 2022)

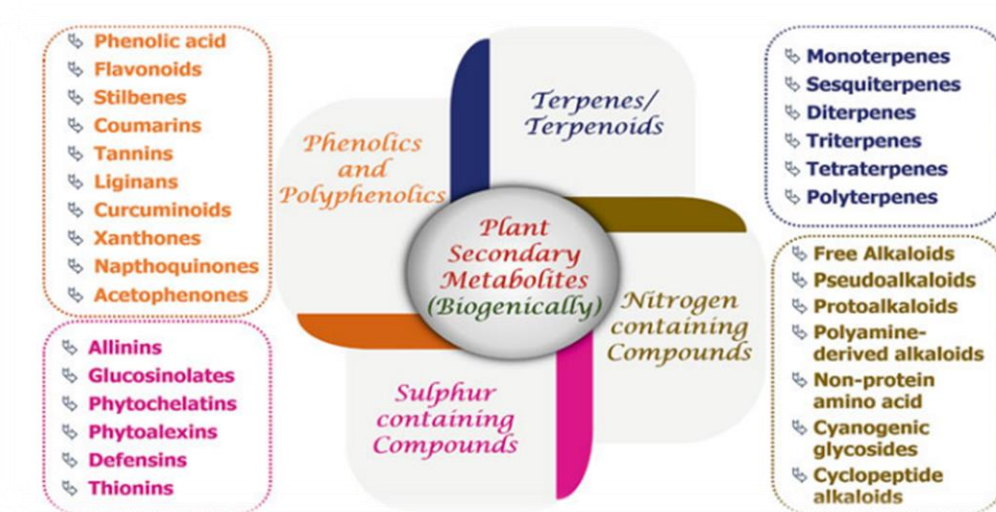


Figure 1. Classification générale des métabolites secondaires (Sharma & Sharma, 2022)

La combinaison infinie des caractéristiques structurales des métabolites secondaires, telles que les noyaux aromatiques complexes spécifiquement agencés, les centres chiraux, ainsi que le nombre et le rapport des hétéroatomes pourrait être essentielle et responsable de leur interaction avec les tissus vivants et avoir un effet sur la santé humaine en tant que point de départ pour la découverte de médicaments (Sharma & Sharma, 2022)

I.2.2.1. Composés phénoliques :

Ils sont classés en composés phénoliques simples et polyphénols

a. Composés phénoliques simples

Ayant dans leurs structures une unité phénolique (ou dérivé). Leur structure générale est illustrée dans la figure (Fig.2)

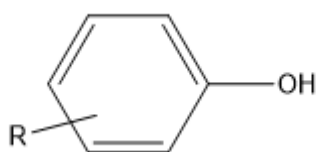


Figure 2. Structure générale des composés phénoliques simples

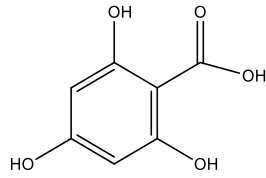
Le substituant désigné R sur la structure peut être en position ortho, méta ou para, on distingue :

+ Composés phénoliques simplement substitués

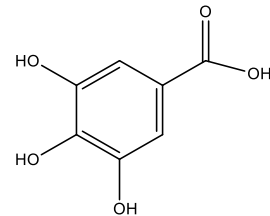
- Hydroxyphénols ou dihydroxybenzène
- Dihydroxyphénols ou trihydroxybenzène

Acides phénoliques

- Si le groupe fonctionnel de l'acide carboxylique est directement lié au cycle phénolique, le composé phénolique est appelé acide hydroxybenzoïque . On cite comme exemple l'acide gallique et le phlorglucinol (Fig.3)



Phlorglucinol



Acide gallique

Figure .3. Exemples de dérivés de l'acide hydroxybenzoïque

- Lorsque le groupe fonctionnel de l'acide carboxylique et le noyau phénolique sont séparés par deux carbones doublement liés (une liaison C=C), les composés phénoliques sont appelés acides hydroxycinnamiques comme l'acide caféique (Fig.4)

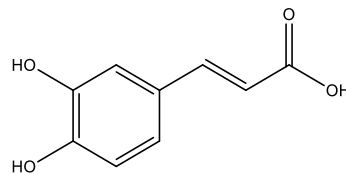
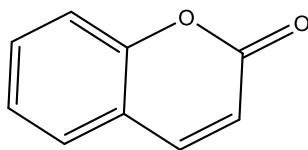


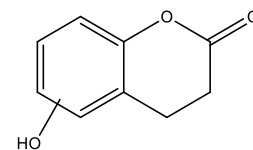
Figure 4. Structure de l'acide caféique

Coumarines

Les coumarines et les hydroxy-coumarine (Fig.5) sont des exemples de substances phénoliques largement répandues dans le règne végétal (Del Río et al., 2014)



Coumarine



Hydroxy-coumarine

Figure 5. Structure de base des Coumarines et hydroxycoumarines

b. Polyphénols

Le terme "polyphénol" désigne les composés phénoliques ayant plus d'une unité phénolique. En général, ils sont caractérisés par au moins deux cycles phényles et un ou plusieurs substitués hydroxyle. (Singla et al., 2019)

On distingue dans cette classe, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes , les lignanes et les lignines (Fig.6)

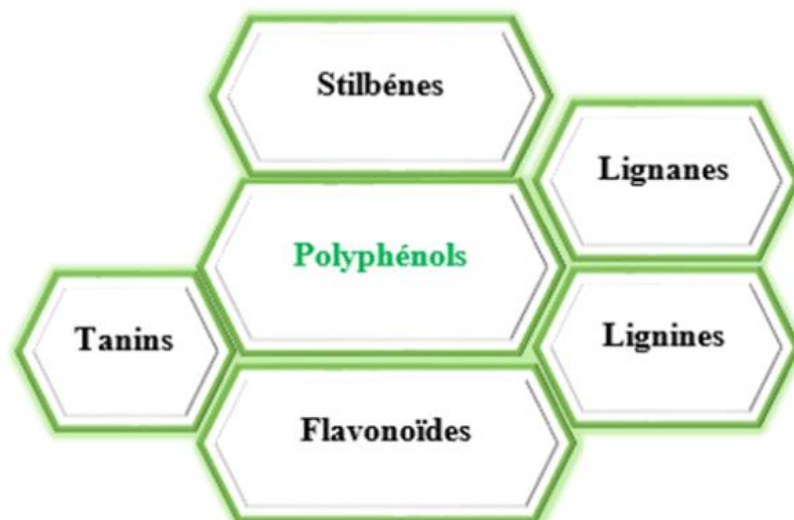


Figure 6. Les sous classes des polyphénols

✚ Flavonoïdes

Le plus grand groupe de composés phénoliques naturels. (Sun & Shahrajabian, 2023) .

Leur dénomination est attribuée au noyau flavane qui provient du squelette 3,4-dihydro-2-phényl-2H-1-benzopyrane. Ils ont un squelette composé de 15 carbones disposés en trois noyaux (Fig.7).

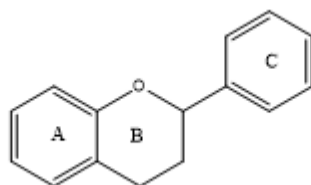


Figure 7. Structure de base des flavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en différents sous-groupes en fonction du carbone de l'anneau C sur lequel est fixé l'anneau B et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C. (Carradori, 2022, Panche *et al.*, 2016)

Sur la figure 8 (Fig.8) sont présentées les différentes biomolécules flavonoïdes

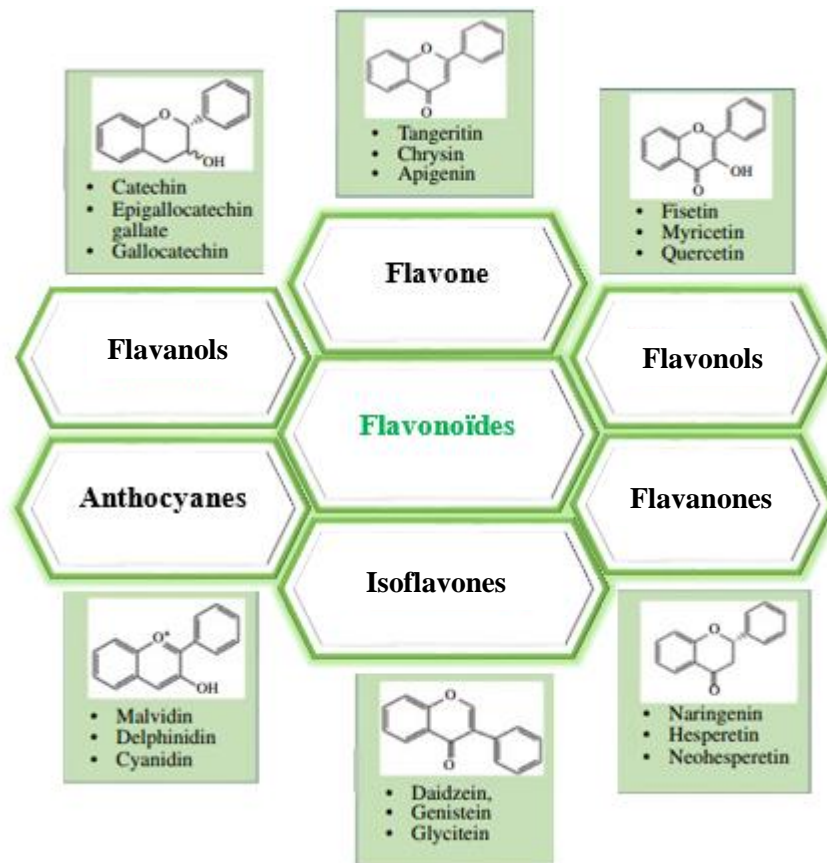


Figure 8. Principales classes des flavonoïdes

Les flavonoïdes dans lesquels l'anneau B est lié à la position 3 de l'anneau C sont appelés isoflavones (daïdzéine). Les flavonoïdes avec l'anneau B lié en position 4 sont appelés néoflavonoïdes. Pour ceux avec l'anneau B lié en position 2, ils peuvent être divisés en plusieurs sous-groupes selon les caractéristiques structurales de l'anneau C. Ces sous-groupes incluent les flavones (lutéoline), les flavonols (kaempférol), les flavanones (naringénine), les flavanols (catéchines), les anthocyanes (delphindine) et les chalcones. La majorité des flavonoïdes se présente sous forme de glycosides, à l'exception des flavan-3-ols, qui sont rarement glycosylés (N. Shen *et al.*, 2022; Sun & Shahrajabian, 2023)

✚ Tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques de poids moléculaire élevé. Historiquement, les tanins ont été divisés en deux groupes principaux : hydrolysables et condensés également connus sous le nom de proanthocyanidines. (Fig 9)

En ce qui concerne leur classification chimique, on peut actuellement les diviser en cinq catégories principales : Gallotanins, ellagitanins, tanins complexes, tanins condensés et phlorotanins. (Fraga-Corral *et al.*, 2020)

Les gallotannins sont des polymères d'unités galloyl qui se lient à des unités polyol, catéchine ou triterpénoïde.

Les unités galloyl sont également les principaux composants des ellagitannins mais, dans ce cas, l'oxydation d'au moins deux moitiés galloyl conduit à leur couplage par des liaisons carbone-carbone, et aboutit à la formation de l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP). La molécule la plus simple appartenant aux éllagitannins est l'acide éllagique qui se forme après la lactonisation spontanée de l'HHDP.

Les tanins complexes où une unité de catéchine est liée de manière glycosidique à une unité de gallotannin ou d'ellagitannin (Fraga-Corral *et al.*, 2020)

Les tanins condensés (proanthocyanidines) sont des produits oligomériques et polymériques issus de la voie de biosynthèse des flavonoïdes. Les éléments constitutifs des proanthocyanidines sont la catéchine et l'épicatéchine. (Sieniawska & Baj, 2017, Rauf *et al.*, 2019)

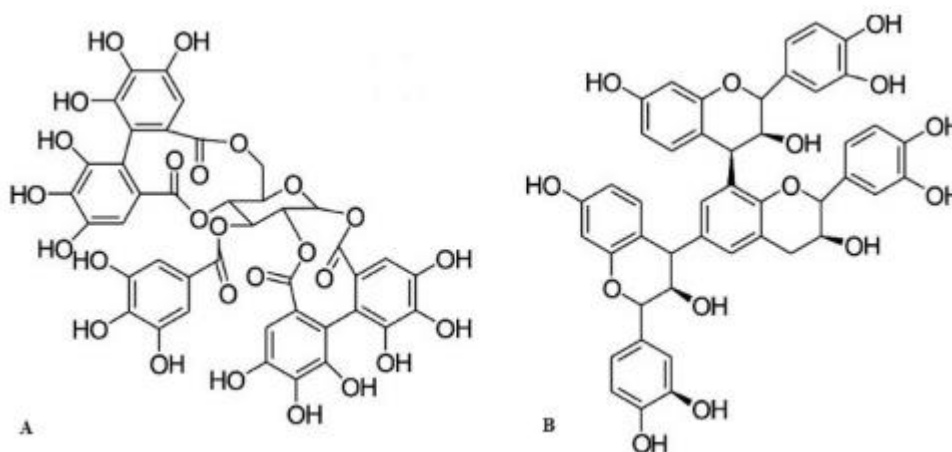


Figure 9. Structure des tanins. A - Tanin Hydrolysable B - Tanin condensé

✚ Stilbènes

Les stilbènes sont définis par la présence d'un noyau 1,2-diphényléthylène et peuvent être classés en deux catégories : les stilbènes monomères et les stilbènes oligomères. (T. Shen *et al.*, 2009)

Cette structure de base relativement simple donne lieu à une grande variété de composés qui se distinguent par le nombre et la position des groupes hydroxyles sur les cycles phénoliques, la conjugaison avec des sucres et divers groupements fonctionnels (méthyles, méthoxyles, etc.), ainsi que la formation d'oligomères résultant de la condensation oxydative des monomères. (Richard *et al.*, 2014; Sun & Shahrajabian, 2023)

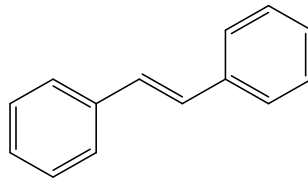


Figure 10. La structure du noyau de base des stilbènes

Lignanes

Les lignanes sont traditionnellement définies comme une classe de métabolites secondaires dérivés de la dimérisation de deux ou plusieurs unités phénylpropanoïdes. Ils présentent une grande diversité structurale. (Barker, 2019)

Dans la nature, ils sont le plus souvent libres et quelques-uns sont des glycosides.

Traditionnellement, les lignanes sont divisées en deux classes : les lignanes classiques et les néolignanes. Il convient de noter que le terme lignane utilisé dans la littérature fait référence aux lignanes classiques dans la plupart des cas.

En ce qui concerne la classification des lignanes classiques, quatre types différents sont signalés. La première classe des lignanes classiques est subdivisée en trois sous-groupes : les dérivés acycliques, les dérivés de l'arylnaphtalène et les dérivés du dibenzocyclooctadiène. Le deuxième type comprend six sous-groupes : dibenzylbutanes, dibenzylbutyrolactones, arylnaphtalènes, dibenzocyclooctadiènes, tétrahydrofuranes substitués et les 2,6-diarylfurofuranes . Le troisième est composé de huit sous-groupes : furofuranes, furanes, dibenzylbutanes, dibenzylbutyrolactones, aryltétralines, arylnaphtalènes, dibenzocyclooctadiènes et dibenzylbutyrolactones. Le quatrième groupe comprend sept sous-groupes (Fang & Hu, 2018).

D'un point de vue chimique, les lignanes et les néolignanes présentent une énorme diversité structurale, bien que leur moléculaire ne comporte que deux unités de phénylpropane (C₆C₃). La nature elle-même offre une immense bibliothèque de composés, qui pourrait difficilement être surpassée par les techniques modernes de chimie combinatoire. Dans la figure 11 quelques exemples de structure des lignanes (Apers *et al.*, 2003)

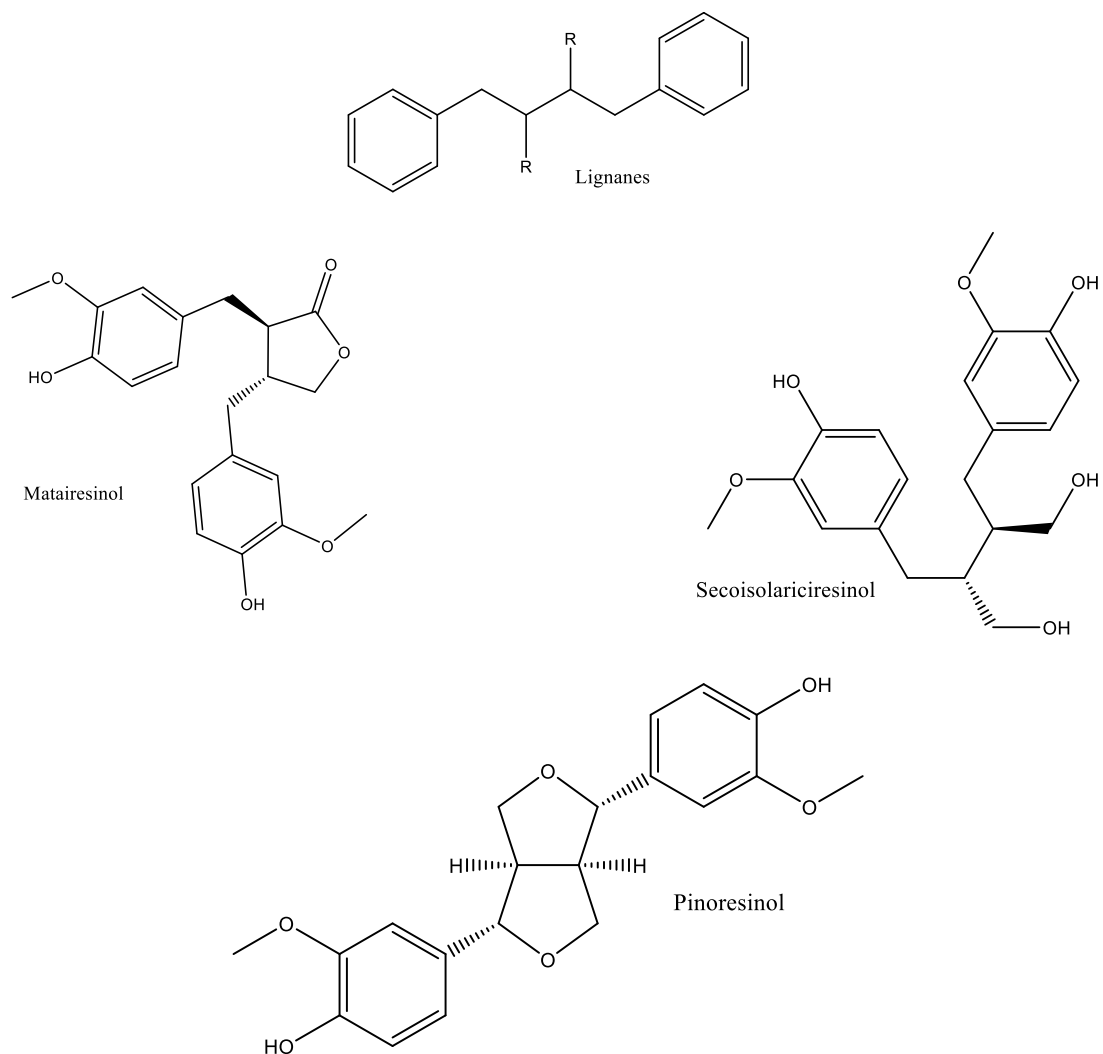


Figure 11. Structure générale des lignanes et exemples

🌈 Lignines

Les lignines sont constituées d'unités phénoliques ou de composés phénoliques liés entre eux par des chaînes de carbone. (Carradori, 2022)

La lignine est un polymère naturel hétérogène et amorphe qui confère résistance et rigidité à la paroi cellulaire. Les lignines représentant jusqu'à 15-30 % de la composition chimique de la lignocellulose.

La lignine naturelle est principalement constituée de trois monomères, l'alcool p -coumarylique (unité H de la lignine), l'alcool coniférylique (unité G de la lignine) et l'alcool sinapylique (unité S de la lignine) (Fig12). Le rapport entre ces monomères diffère entre les lignines des différentes espèces de plantes et dans les différentes parties des plantes. (Okonkwo *et al.*, 2023, Wang & Deuss, 2023)

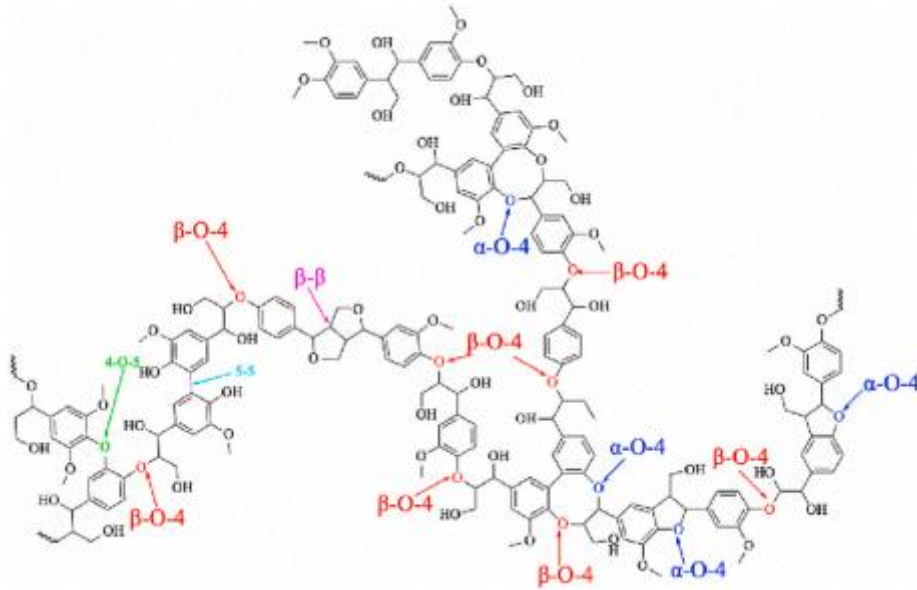


Figure 12. Structure des lignines

I.2.2.2. Terpènes

Les terpénoïdes sont également appelés isoprénoïdes dont la formule générale est $(C_5H_8)_n$. L'isoprène est l'élément constitutif de tous les terpénoïdes et est chimiquement le 2-méthylbuta-1,3-diene (Banik *et al.*, 2022)

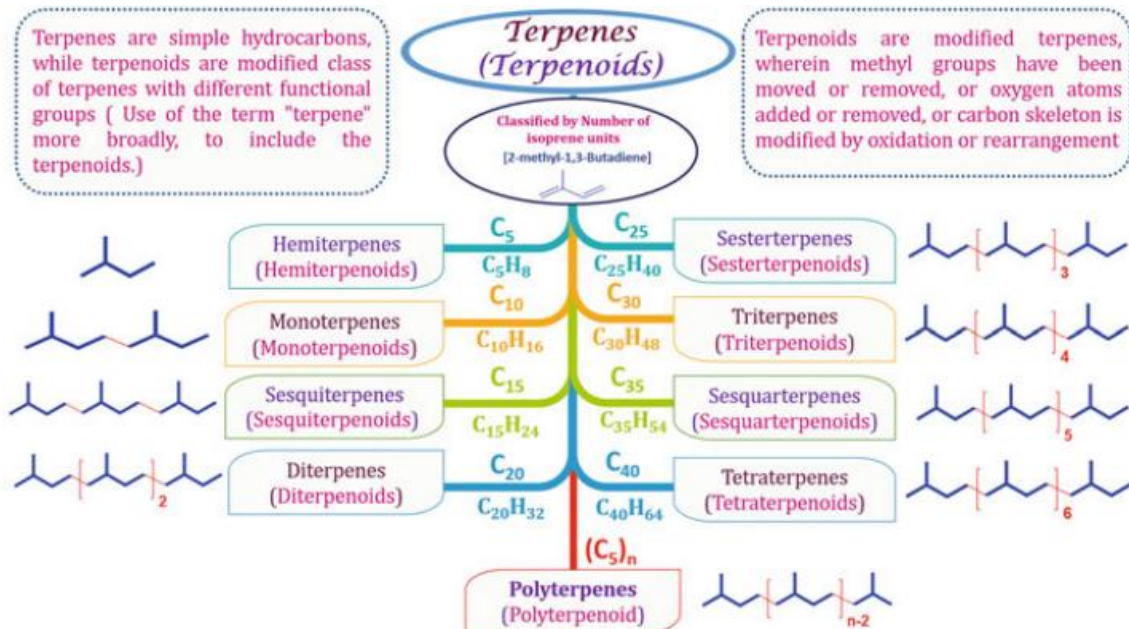


Figure 13. Les différentes classes de terpénoïdes (Sharma , 2022)

I.2.2.3. Composés azotés

Les composés azotés représentent une autre catégorie majeure de métabolites secondaires végétaux, comprenant principalement des alcaloïdes, des glycosides cyanogènes, des glucosinolates et des acides aminés non protéiques. (Sharma, 2022)

Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont généralement divisés en groupes principaux en fonction de la position/de l'emplacement de l'atome d'azote et cette classification est le plus souvent utilisée que l'azote fasse ou non partie d'un cycle, c'est-à-dire les alcaloïdes hétérocycliques et les alcaloïdes non hétérocycliques.

Selon leur précurseur moléculaire, leurs structures et leur origine biologique, les alcaloïdes sont classés en trois principales catégories : les vrais alcaloïdes, les protoalcaloïdes et les pseudoalcaloïdes.

a. Alcaloïdes vrais

Cette classe d'alcaloïdes, également connue sous le nom d'alcaloïdes hétérocycliques, est dérivée des acides aminés. Ils sont également constitués d'un ou plusieurs anneaux hétérocycliques avec des composés mono- ou polycycliques, ainsi qu'avec de l'oxygène, du soufre ou plus d'un atome d'azote.

Par exemple, alcaloïdes de pyridine, alcaloïdes de pyrrolidine, alcaloïdes de pipéridine, alcaloïdes de tropane, alcaloïdes de quinoléine, alcaloïdes d'isoquinoléine, alcaloïdes de quinolizidine, alcaloïdes d'indole, alcaloïdes pyrrolizidiniques et alcaloïdes imidazoliques. (Figure 14)

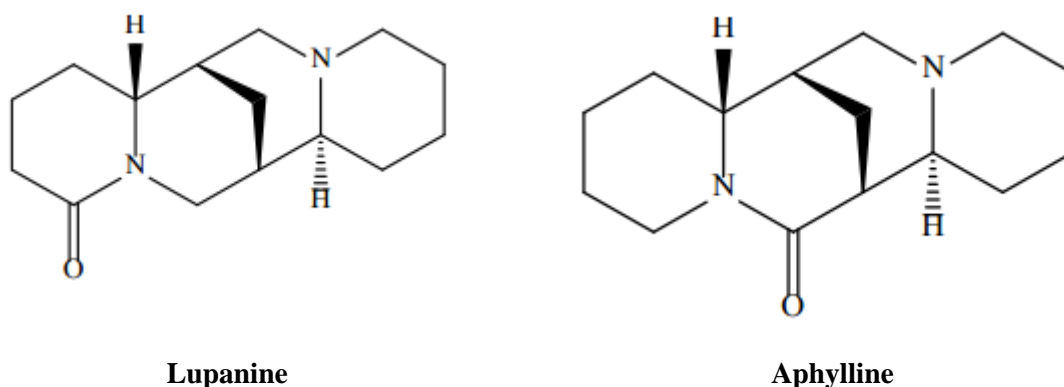


Figure 14. Structure de quelques alcaloïdes vrais

b. Protoalcaloïdes

Les protoalcaloïdes sont également connus sous le nom d'alcaloïdes non hétérocycliques. L'atome d'azote ne fait pas partie de l'anneau hétérocyclique mais est présent dans le système exocyclique. Ce qui signifie qu'il fait partie d'une chaîne latérale comme la mescaline (Fig.15)

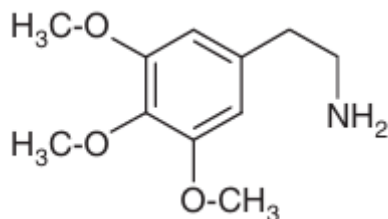


Figure 15. Mescaline

c. Pseudoalcaloïdes

La structure carbonée de base des pseudo-alcaloïdes n'est pas directement dérivée des acides aminés ; au lieu de cela, ils sont liés aux voies des acides aminés d'où ils proviennent par réaction d'amination ou de transamination à partir de précurseurs ou de métabolites postérieurs des acides aminés. Les précurseurs non acides aminés peuvent également produire des pseudo-alcaloïdes. Ils peuvent être dérivés de la phénylalanine ou de l'acétate. La capsaïcine, la caféine et l'éphédrine (Fig. 16) sont des exemples très courants de pseudo-alcaloïdes. (Dey et al., 2020)

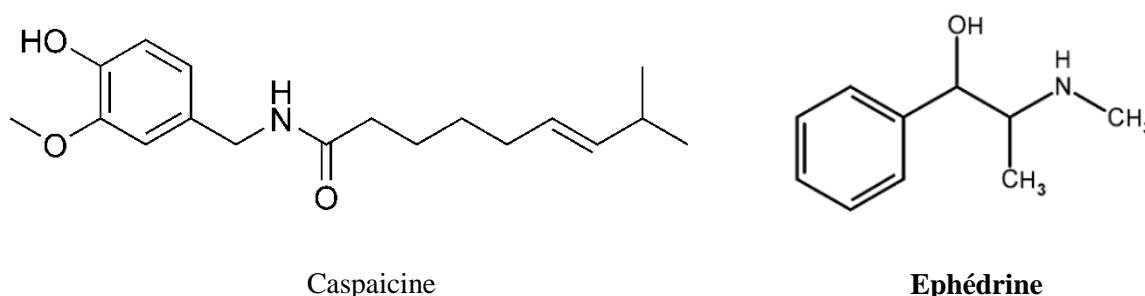


Figure 16. Structures de quelques pseudoalcaloïdes

I.2.2.4. Composés soufrés

Ils ont souvent une odeur caractéristique et jouent divers rôles tels que les molécules de signalisation (pour les fonctions cellulaires fondamentales) et les composés de défense contre les maladies infectieuses.

Ils sont subdivisés en différentes sous-classes : phytochélatins, glucosinolate, phytoalexins, et les défensines. (Fig.17)

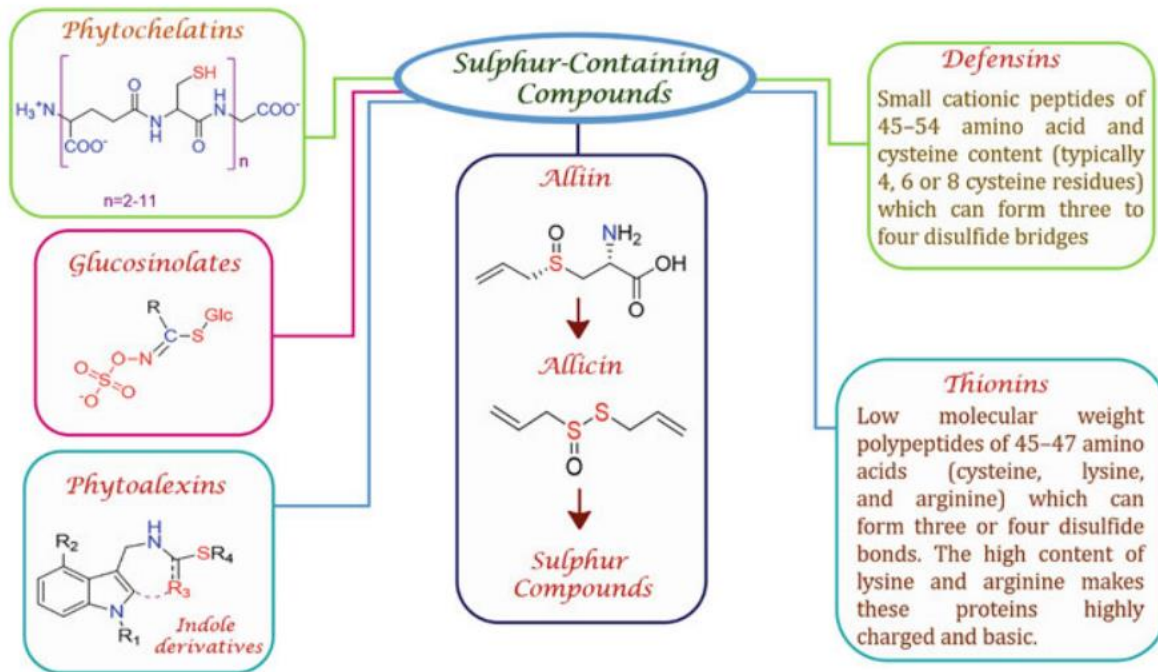


Figure 17. Les métabolites secondaires soufrés (Sharma, 2022)

I.3. Activités biologiques des biomolécules dérivées de plantes

Une molécule bioactive est une molécule ayant une certaine activité biologique, c'est-à-dire elle exerce des effets physiologiques ou cellulaires directs sur un organisme vivant ainsi peut modifier l'état de santé des humains ou des animaux. En général, les composés bioactifs issus des plantes sont des métabolites secondaires, induisant des effets pharmacologiques ou toxicologiques chez les humains et les animaux. (Walia *et al.*, 2019)

Cette section explore brièvement le rôle des biomolécules dérivées de plantes dans le traitement ou prévention de certaines pathologies. (Fig 18)

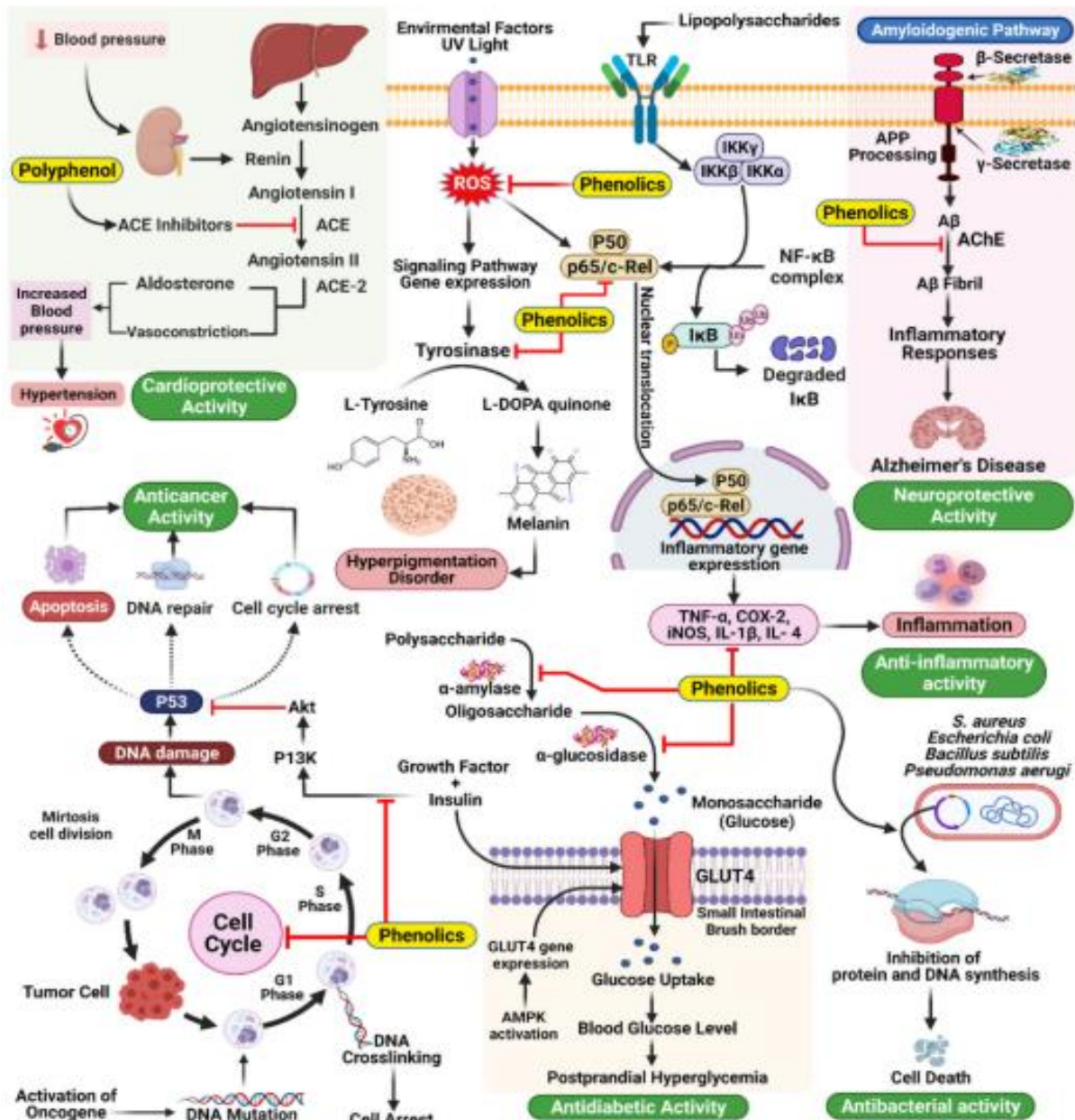


Figure 18. Activités de biomolécules dérivées de plantes dans la lutte contre certaines maladies (Rahman *et al.*, 2022)

I.3.1. Activité antioxydante

Le stress oxydatif fait référence à un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les défenses antioxydantes de l'organisme. Les ROS sont des espèces chimiques avec des électrons appariés, augmentant la réactivité des atomes ou des molécules. Les ROS courants chez les humains comprennent l'hydroxyle, le superoxyde, le monoxyde d'azote, le peroxyde, le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet et l'ozone. L'équilibre entre la génération de ROS cellulaires et la capacité de défense antioxydante détermine le niveau de stress oxydatif.

Lorsque les défenses antioxydantes cellulaires sont insuffisantes, les ROS peuvent endommager les composants cellulaires (protéines, lipides et ADN), servant de facteur déclenchant pour diverses maladies humaines. Les mécanismes de dommages cellulaires dus au stress oxydatif ont été largement étudiés. Le stress oxydatif est impliqué dans la pathogenèse du diabète, du cancer, des maladies cardiovasculaires et des maladies neurodégénératives (Fig 19) .(Al-Gubory & Laher, 2018)

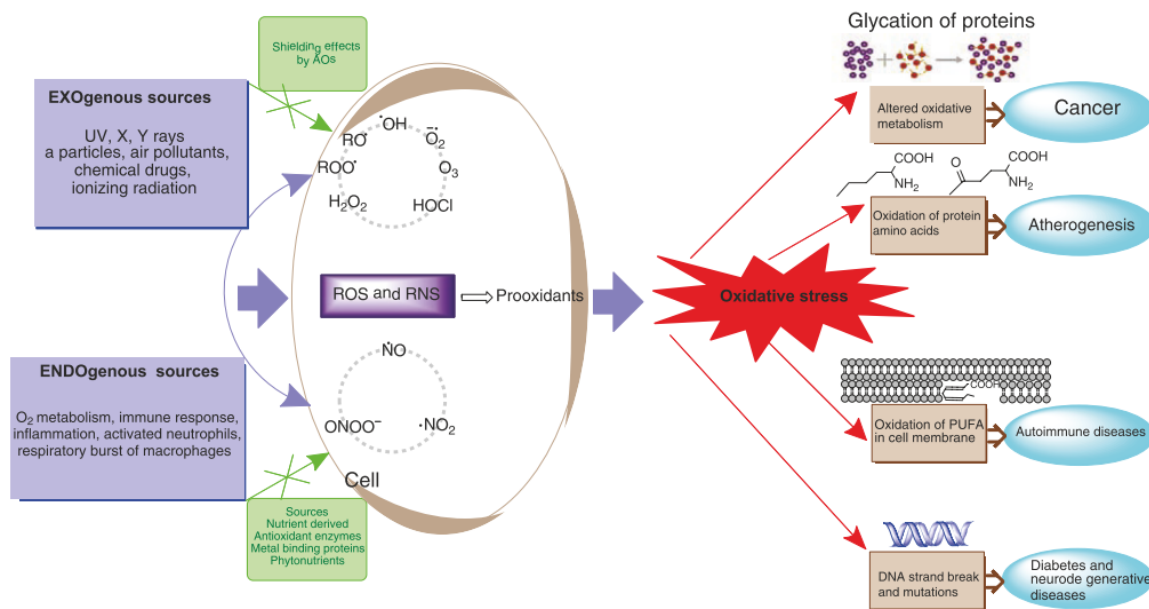


Figure 19. Les espèces réactives de l'oxygène et leurs implications dans certaines pathologies (Al-Gubory and Laher, 2018)

Afin de neutraliser les effets délétères des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'atténuer le stress oxydatif, diverses stratégies antioxydantes ont évolué en renforçant les défenses enzymatiques antioxydantes endogènes et en améliorant les défenses non enzymatiques par des méthodes alimentaires ou pharmacologiques. (Al-Gubory & Laher, 2018)

De nombreuses études ont démontré que les polyphénols ont la capacité de piéger les espèces réactives de l'oxygène (ROS) *in vitro*. Cependant, certains polyphénols ne peuvent exercer cet effets antioxydants *in vivo* en raison de leur biodisponibilité limitée.

Des concentrations plus faibles de polyphénols présentes *in vivo* activent les enzymes antioxydantes endogènes cytoprotectrices pour faciliter l'élimination des ROS et contrer les dommages induits par ces ROS. Les principaux mécanismes antioxydants des polyphénols contre le stress oxydatif sont illustrés dans la figure (Fig 20)

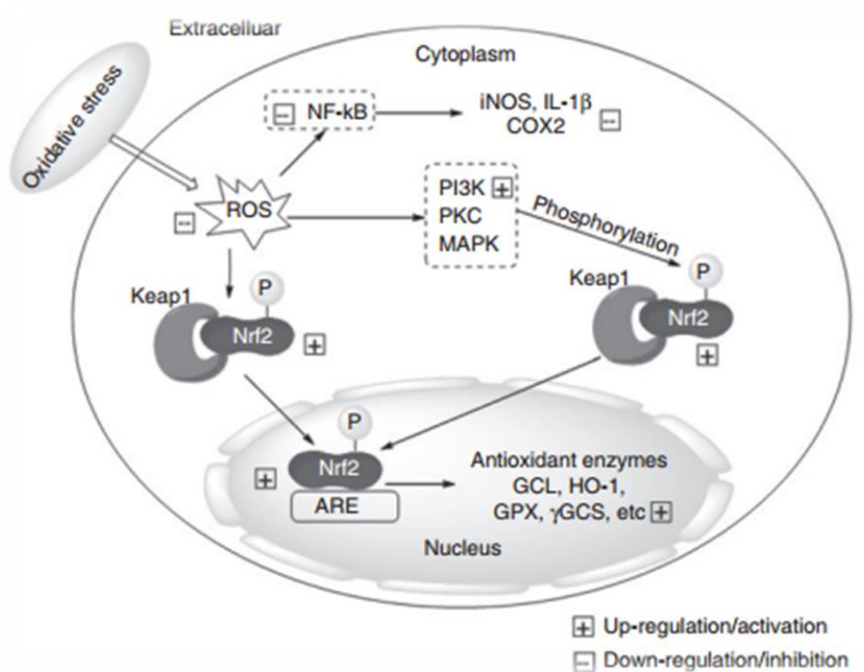


Figure 20. Mécanismes d'action antioxydante des polyphénols (Al-Gubory & Laher, 2018)

Les enzymes antioxydantes cytoprotectrices sont généralement régulées par les régions promotrices des éléments de réponse antioxydants (ARE), et ces enzymes comprennent la de γ -glutamylcystéine synthétase (γ GCS), la glutamate cystéine ligase (GCL), la glutathion peroxydase (GPX), la thioredoxine (TRX), la thioredoxine réductase (TRXR), la peroxiredoxine (PRX) et l'hème oxygénase-1 (HO-1) qui maintiennent les niveaux cellulaires de glutathion et thioredoxine et réduisent les niveaux de ROS. Ce processus est régulé par de multiples voies de signalisation cellulaires. (Al-Gubory & Laher, 2018)

Nrf2 joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie rédox cellulaire en régulant ces gènes porteurs d'ARE. Dans des conditions physiologiques normales, Nrf2 est séquestré par la protéine associée à l'échappement de Kelch-like ECH-1 (Keap1) dans le cytosol et limite l'expression des gènes antioxydants. Lorsque les cellules sont exposées à des polyphénols par exemple, Nrf2 est activé, transloqué vers le noyau, se lie à la séquence ARE pour activer les enzymes antioxydantes cellulaires, qui éliminent les ROS produits en excès (Shen et al. 2014).

Les polyphénols inhibent le stress oxydatif en interagissant avec les kinases activées par les mitogènes (MAPK), la protéine kinase C (PKC), la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et la kinase de la protéine (PERK), car ces kinases activent Nrf2 par phosphorylation

De plus, les polyphénols sont capables de supprimer l'activation de NF- κ B ; d'inhiber l'expression de la NO synthase inductible (iNOS), de l'interleukine (IL)-1 β et de la COX2 ; et ainsi de réduire les réponses immunitaires cellulaires. (Figure.21)

Un nombre croissant de preuves soutient ce rôle des polyphénols, tels que le resvératrol, la curcumine, la quercétine et l'acide caféique, dans l'inhibition du stress oxydatif. La quercétine favorise l'activité de transcription médiée par Nrf2, renforce la stabilisation de Nrf2, augmente le niveau endogène d'antioxydant glutathion (GSH) et augmente les expressions d'enzymes antioxydantes cellulaires, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la GPX et la γ GCS.

Tout comme le resvératrol, la curcumine active Nrf2 et régule les enzymes antioxydantes cellulaires.

En résumé, de nombreuses études ont confirmé l'efficacité des polyphénols contre le stress oxydatif, apportant ainsi la preuve de leur capacité à prévenir diverses maladies non transmissibles telles que le cancer, l'inflammation, les maladies cardiovasculaires et le diabète. (Al-Gubory & Laher, 2018)

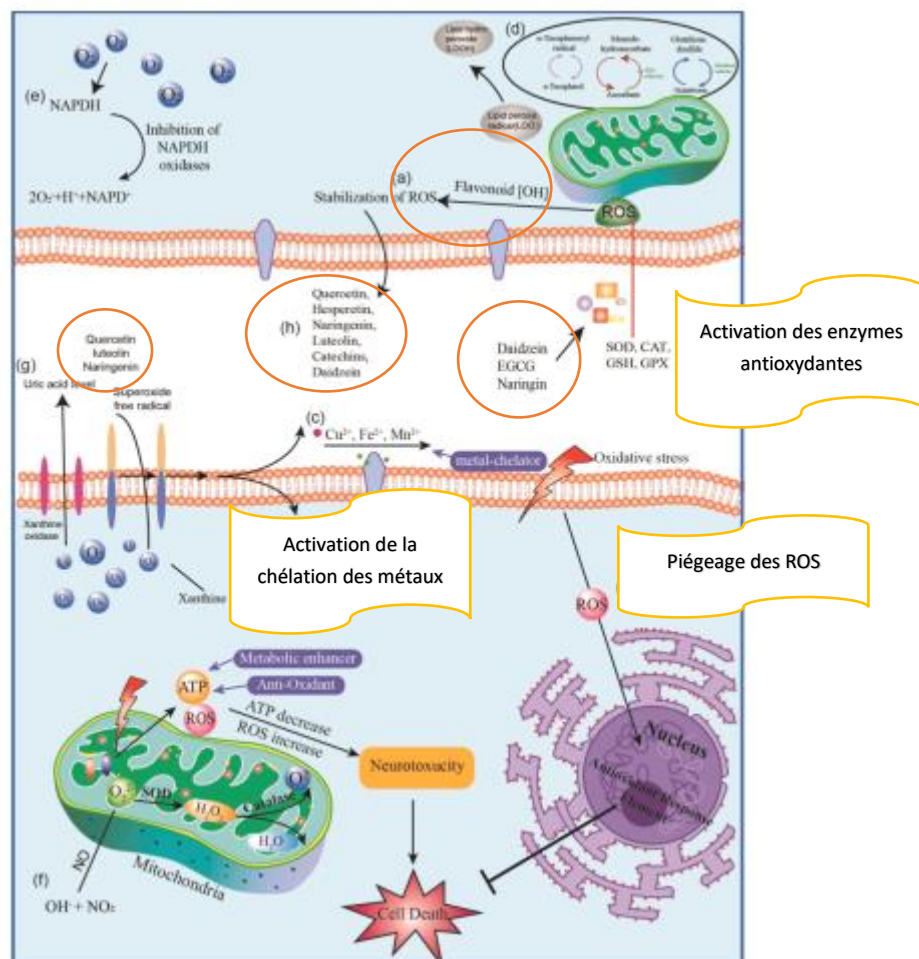


Figure 21. Mécanismes d'action antioxydante de certains composés phénoliques (flavonoïdes) (Shen *et al.*, 2022)

I.3.2. Activité neuroprotectrice

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative progressive principalement causée par le vieillissement de la population humaine. Il s'agit d'une maladie multifactorielle (Figure.22), ainsi l'hypothèse amyloïde et l'hypothèse cholinergique sont les théories majeures qui expliquent cette pathogénèse.

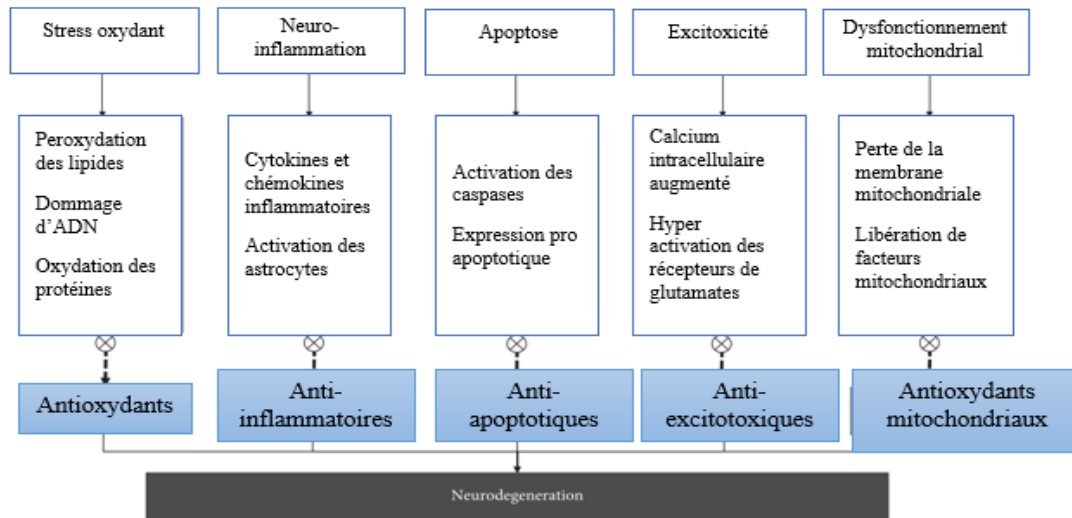
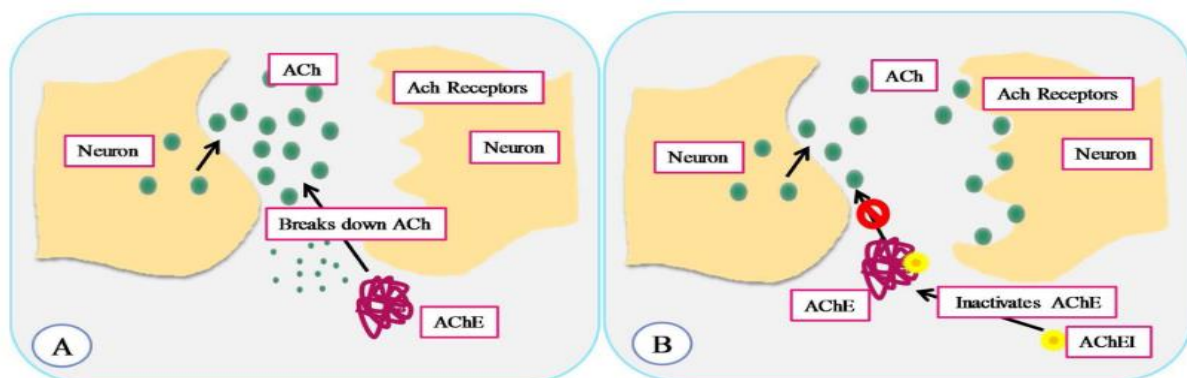


Figure 22. Pathogénie des maladies neurodégénératives (Sairazi & Sirajudeen, 2020)

L'hypothèse de la déficience cholinergique, suggère que la perturbation de la capacité cholinergique est un facteur dans le développement de la maladie d'Alzheimer (Figure. 23). L'acétylcholine est hydrolysée par l'acétylcholinestérase (AChE), qui est responsable de la conduction des impulsions électriques. La butyrylcholinestérase (BChE) est un co-régulateur de l'hydrolyse de l'acétylcholine et de la neurotransmission. L'inhibition de l'AChE et de la BChE peut augmenter la disponibilité de l'acétylcholine (Rahman et al., 2022).



A. Enzyme (AChE) dans la transmission neuronale

B. Après inhibition de l'AChE

Figure 23. Hypothèse cholinergique de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer (Khan *et al.*, 2018)

L'ACh est un neurotransmetteur produit par acétylation de la choline et de l'acétyl-CoA par l'enzyme choline acétyltransférase, qui est générée dans le noyau basal de Meynert. Chez les patients atteints de la MA, le Meynert nucleus basalis est retardé, ce qui entraîne une carence en ACh dans la fente synaptique, l'ACh est dégradée par l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BuChE), formant de l'acétate et de la choline qui sont recapturés par les neurones pré-synaptiques. (Figure.23) (Khan *et al.*, 2018).

Or, l'hypothèse amyloïde se caractérise par des dépôts intracellulaires de protéines tau, qui affectent le transport intracellulaire et conduisent à la mort cellulaire, et des dépôts extracellulaires de peptides β -amyloïdes qui s'accompagnent d'un stress oxydatif et d'une inflammation qui conduisent à la dégénérescence des neurones.

Le stress oxydatif est un facteur clé du vieillissement du cerveau et de la maladie d'Alzheimer (Figure.24). La pléthore de produits thérapeutiques qui ciblent le stress oxydatif neuronal en est la preuve. Le moyen le plus courant de réduire le stress oxydatif est le traitement antioxydant qui, dans certains cas, s'est avéré efficace pour réduire le stress oxydatif lié au vieillissement et les marqueurs de la neurodégénérescence. (Ionescu-Tucker & Cotman, 2021)

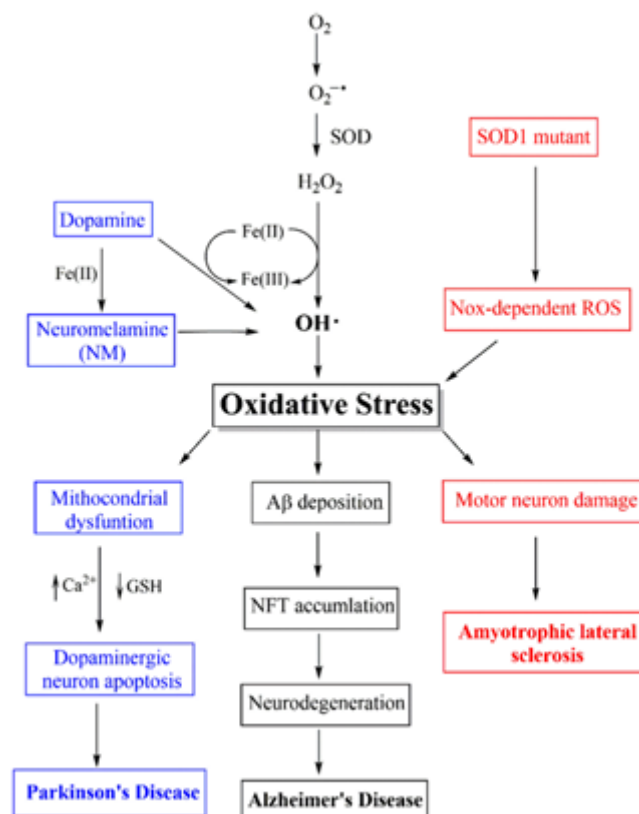


Figure 24. Rôle du stress oxydant dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer (Rodríguez-Arce & Saldías, 2021)

Jusqu'à présent, on sait que quatre médicaments ont été approuvés pour le traitement avec ce mécanisme d'action. Il s'agit de la tacrine, du donépézil, de la galanthamine et de la rivastigmine.

Les biomolécules actives non alcaloïdiques ayant une activité anti-cholinestérasique considérable sont les terpenoïdes, les composés phénoliques notamment les coumarines (Tamfu *et al.*, 2021)

1.3.2.4. Les substances phénoliques et la maladie d'Alzheimer

L'activité antioxydante des composés phénoliques est liée à la position, au nombre de groupes hydroxyle-méthoxyle liés à l'anneau phénolique et à la substitution méthoxy sur l'anneau phénolique de plus les acides phénoliques peuvent inhiber la formation des fibres amyloïdes β -peptide ($A\beta$)

Les acides phénoliques sont considérés comme agents neuroprotecteurs malgré leur faible diffusion à travers la barrière hémato-encéphalique (Szwajgier *et al.*, 2017).

Il semble que les composés phénoliques ayant des motifs structurels similaires à l'acide caféique soient capables de s'insérer dans la gorge du site actif de l'AChE en positionnant l'anneau aromatique dans le sous-site PAS.

Par conséquent, les flavonoïdes pourraient jouer un rôle clé dans les systèmes enzymatiques et récepteurs du cerveau, exerçant des effets significatifs sur le système nerveux central, notamment dans la prévention de la neurodégénérescence associée à la maladie d'Alzheimer et à la maladie de Parkinson (Figure. 25).

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber plusieurs enzymes, comme en témoignent de solides rapports sur l'inhibition d'enzymes telles que l'aldose réductase, la xanthine oxydase, la phosphodiesterase, la Ca^{2+} ATPase, la lipoxygénase et la COX dans la prévention des maladies neurodégénératives. En outre, la plupart d'entre eux ont montré des activités inhibitrices de l'AChE plus puissantes que la rivastigmine, un médicament contre la maladie d'Alzheimer. De plus, il a été mentionné que le squelette isoflavone constituerait un modèle structural prometteur pour le développement de nouveaux inhibiteurs de l'AChE. (Panche *et al.*, 2016)

Les flavonoïdes qui possèdent un groupe OH libre à C3 sont plus inhibiteurs que leurs homologues glycosylés qui n'ont pas de groupe C3 -OH, comme la lutéoline et l'apigénine. aussi les anneaux aromatiques potentialisent l'activité inhibitrice de l'AChE des composés phénoliques.(Roseiro & Serralheiro, 2012)

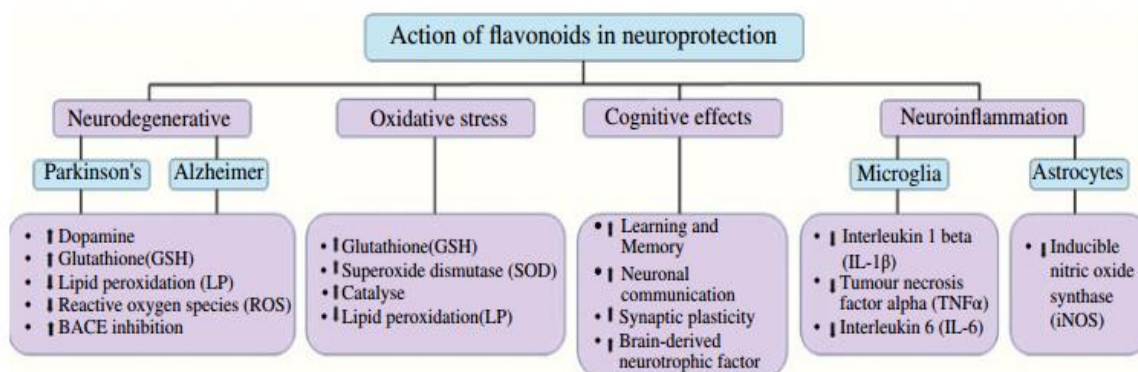


Figure 25. Action neuroprotectrice des flavonoïdes (Solanki *et al.*, 2015)

Les composés phénoliques interagissent avec les résidus d'acides aminés qui définissent le site actif de l'AChE par la formation de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes et π - π . (Katalinić *et al.*, 2010)

On pense que les groupes hydroxyles multiples du composé phénolique renforcent l'inhibition de l'AChE en raison de la capacité de liaison accrue. Ces activités inhibitrices expliquent le potentiel fonctionnel associé à la plupart des composés phénoliques, mais tous n'agissent pas selon le mécanisme exact (Balkis *et al.*, 2015, Aluko, 2021)

1.3.2.5. Les terpénoïdes comme inhibiteurs des cholinestérases

Parmi les diverses activités biologiques des terpénoïdes, l'activité anticholinestérase a retenu l'attention des chercheurs. L'hypothèse cholinergique étant une approche acceptée pour expliquer la pathologie de la maladie d'Alzheimer. (Min *et al.*, 2022)

Bien que plusieurs dérivés terpéniques actifs sur le cholinestérase aient été identifiés, aucun d'entre eux n'a fait l'objet d'évaluations précliniques (pharmacocinétique, pharmacodynamique, toxicité et mécanismes du SNC) et cliniques plus poussées. L'une des principales limites du passage des composés principaux aux études précliniques et cliniques est de produire les composés souhaités à plus grande échelle. Comme les terpènes dérivés des plantes ont généralement un faible rendement d'extraction et une structure complexe, il est difficile de les synthétiser au laboratoire. (Min *et al.*, 2022)

Les terpénoïdes représentatifs des effets anti alzheimer sont les ginsénosides de *Panax. ginseng*, les ginkgolides et bilobalides de *gingko. biloba*, et les cannabinoïdes de *Cannabis. sativa*. (Yoo & Park, 2012)

1.3.2.6. Les coumarines comme agents de neuroprotection

Plusieurs études approfondies se sont penchées sur les fonctions anti-amnésiques, de restauration de la mémoire et neuroprotectrices des dérivés de la coumarine, dans divers modèles expérimentaux d'amnésie associée à la maladie d'Alzheimer Anand *et al.* (2012)

Elles ont démontré les puissantes activités d'inhibition de l'AChE et de restauration de la mémoire des coumarines. Elles ont également projeté les coumarines comme des molécules potentielles pour la synthèse d'agents thérapeutiques efficaces pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. (Anand *et al.*, 2012)

Les études de relation structure activité ont démontré que les coumarines à double site d'interaction présentent d'autres activités pharmacologiques bénéfiques pour la prise en charge de la maladie d'Alzheimer, y compris la diminution des dépôts amyloïdes grâce aux activités antiagrégantes de L'Aβ. En outre, certains de ces composés présentent également des activités inhibitrices significatives de la MAO. (Anand *et al.*, 2012)

I.3.3. Potentiel des composés naturels comme agents de protection solaire

Plusieurs organismes naturels, en particulier ceux exposés à un rayonnement intense, ont développé divers mécanismes de photo-adaptation, notamment via la production de métabolites secondaires antioxydants et absorbant les UV. La caractéristique commune de la molécule de filtrage UV est son système d'électrons π , que l'on trouve principalement dans des structures de liaisons conjuguées représentées à la fois dans des molécules linéaires à liaisons simples et doubles alternées et dans de nombreux composés aromatiques et cycliques contenant une résonance électronique. (Chopra *et al.*, 2018)

Les métabolites secondaires importants agissant comme bloqueurs UV comprennent les acides phénoliques, les non-flavonoïdes, les flavonoïdes, les polyphénols de lichen, les terpénoïdes et les acides aminés de type mycosporine. Ces composés peuvent empêcher la pénétration du rayonnement dans la peau, entraînant la réduction de l'inflammation, du stress oxydatif et des effets endommageant l'ADN. (Saewan & Jimtaisong, 2015)

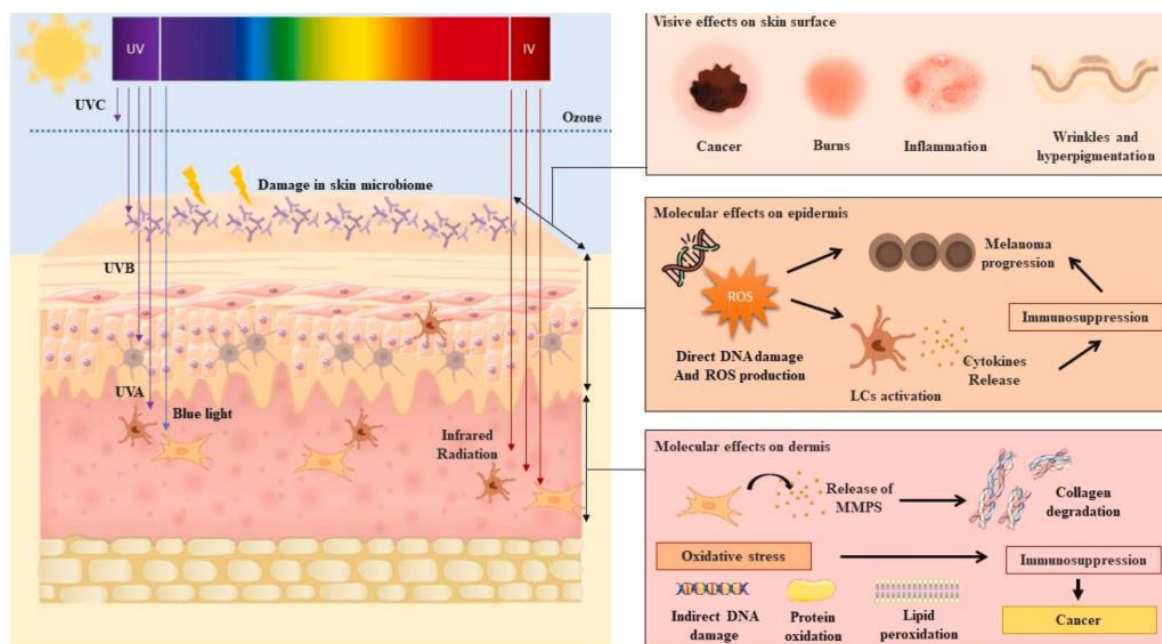


Figure 26. Effets néfastes des rayons solaires sur la peau (Fernandes *et al.*, 2023)

En plus de leur capacité d'absorption des radiations UV, certains composés naturels ont également été découverts pour réduire l'inflammation, le stress oxydatif et affecter plusieurs voies de signalisation pour protéger la peau contre les dommages infligés par les radiations UV. Ainsi, les biomolécules dérivées de plantes ont suscité une attention considérable pour leur utilisation en tant que réducteurs de dommages photo-induits chez l'homme via divers mécanismes en raison de leur implication dans de multiples voies de phototoxicité. (Saewan & Jimtaisong, 2015)

La surexposition au soleil, précisément aux radiations ultraviolettes ayant la capacité de générer des radicaux libres nocifs dans les cellules, pouvant causer des dommages tissulaires ou des pathologies, peut entraîner le cancer de la peau et le photo-vieillessement qui se traduit par l'apparition de ridules, de rides, d'une perte d'élasticité de la peau et l'apparition de marques d'hyperpigmentation (Figure. 26) . (Mansuri *et al.*, 2021)

Dans les tendances anti-âge et beauté, le désir d'ingrédients plus naturels est l'une des croissances les plus rapides dans le monde entier. Les extraits de plantes peuvent guérir et adoucir la peau et fournir des effets de protection solaire. Les antioxydants botaniques ont été associés à une réduction de l'incidence de la photo-carcinogénèse et du vieillissement cutané dûs au soleil. Une combinaison de différents phyto-antioxydants serait la meilleure stratégie de défense contre les dommages dus au soleil (Figure.27). (Serafini *et al.*, 2014)

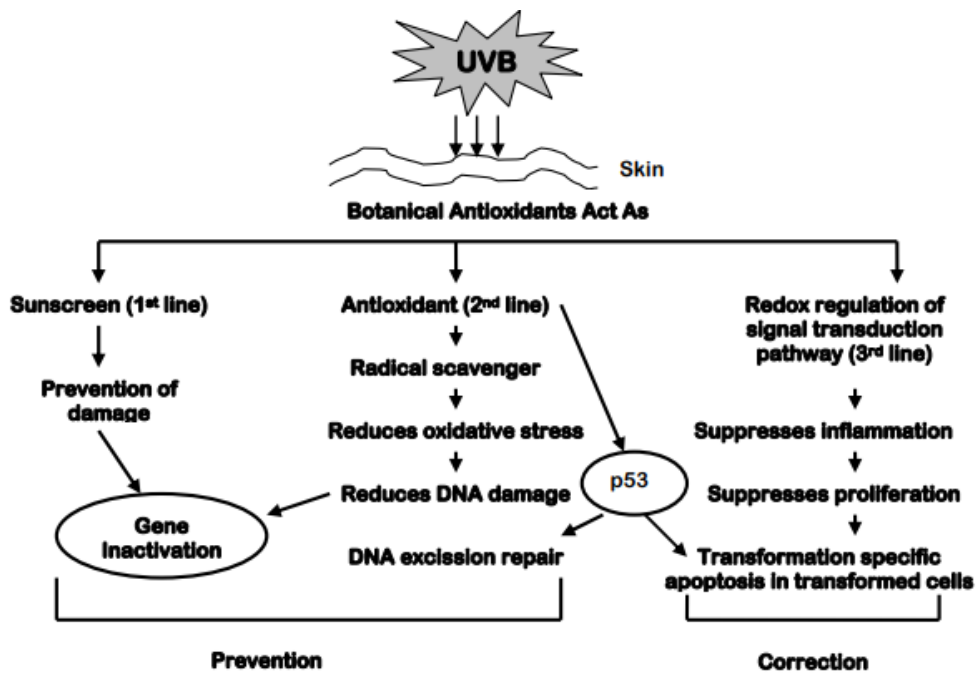


Figure 27. Rôle des phyto-antioxydants dans la dermoprotection (Chanchal & Swarnlata, 2009)

Les composés végétaux naturels tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes et les polyphénols de poids moléculaire élevé sont très utiles pour prévenir les effets néfastes du rayonnement UV sur la peau. (Chanchal & Swarnlata, 2009)

Plusieurs phyto-constituants (ex. phénols, vitamines, flavonoïdes, etc.) peuvent absorber les rayons UV et prévenir les dommages cutanés (Fig 28). Les flavonoïdes peuvent réduire les dommages causés par les UVB en inhibant la génération de radicaux libres et en les piégeant (Kumar & Jose, 2020)

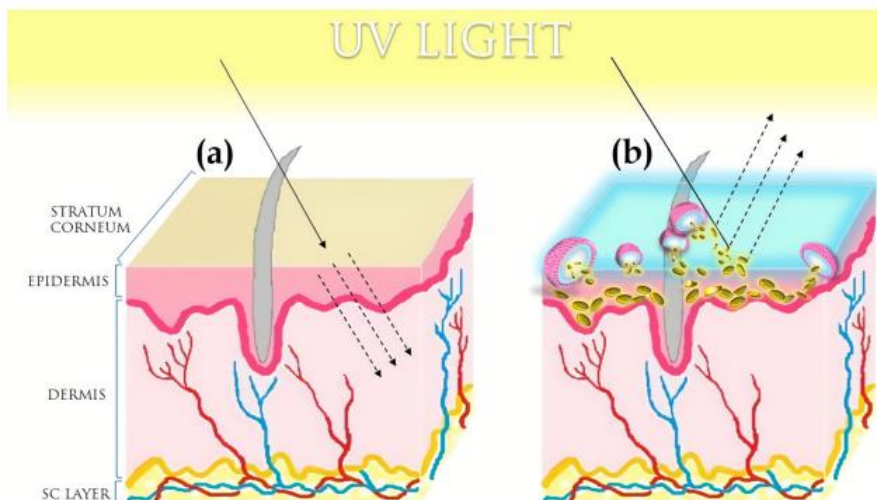


Figure 28. Les phytoconstituants et la protection solaire : (a) : peau non protégée , (b) : peau protégée par une phytomolécule (Kumar & Jose, 2020)

1.3.4. Potentiel anti inflammatoire des biomolécules dérivées de plantes

L'inflammation est une réponse protectrice de l'organisme aux stimuli nocifs tels que les agents pathogènes, les lésions tissulaires et les irritants. Elle est coordonnée par des capteurs inflammatoires (mastocytes, macrophages) et une cascade complexe de médiateurs de signal (chémoquines, cytokines, etc.). (Sychrová *et al.*, 2020)

L'acide arachidonique (AA), libéré par clivage des phospholipides membranaires par la phospholipase A2 (PLA2), subit un métabolisme ultérieur par la voie de la COX pour former des prostaglandines (PG) et la thromboxane A2 (TXA2), ou par la voie de la LOX pour générer des leucotriènes (LT), des acides hydroperoxyeicosatétraénoïques (HpETE) et des acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETE). Ces eicosanoïdes jouent un rôle crucial dans la régulation du processus inflammatoire.

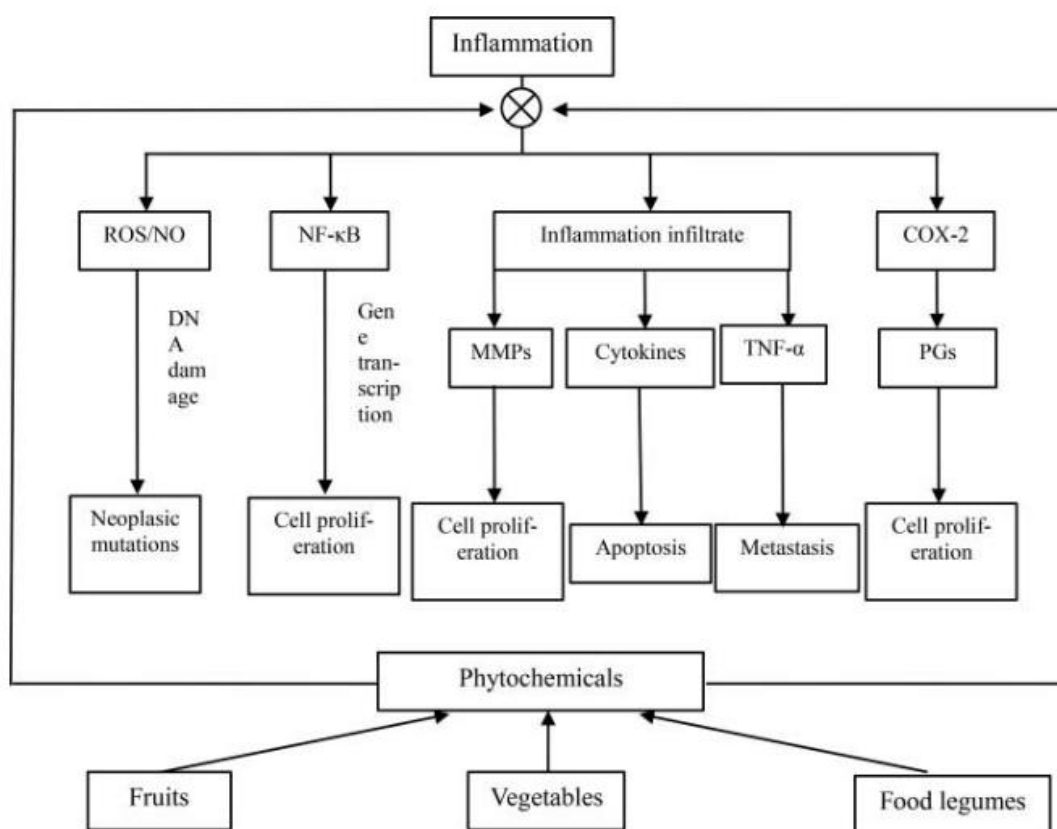


Figure 29. effet antinflammatoire des phytomolécules (Zhu *et al.*, 2017)

Les enzymes COX ont deux isoformes majeures, COX-1 et COX-2, cette dernière étant une enzyme inductible fortement exprimée dans les cellules stimulées par des cytokines pro-inflammatoires. L'inhibition des enzymes impliquées dans la génération d'eicosanoïdes, à savoir PLA2, COX et LOX, s'avère une approche efficace pour limiter la réponse inflammatoire et réduire l'inflammation.

Récemment, Un large éventail de classes de phytoconstitués ciblant les processus inflammatoires a été étudié. Les polyphénols jouent un rôle dans l'inhibition de ces enzymes tant au niveau transcriptionnel que protéique, réduisant ainsi la production d'AA, de PG et de LT. Certains constitués phénoliques peuvent inhiber l'activité ou l'expression génétique des médiateurs pro-inflammatoires, tels que la cyclo-oxygénase (COX) et réguler les éléments transcriptionnels impliqués dans les voies antioxydantes, tels que le facteur nucléaire- κ B (NF- κ B) ou le facteur nucléaire lié au facteur 2 de l'érythroïde (Nrf-2). (Figure. 29)

Ces constitués phénoliques suppriment la liaison des médiateurs pro-inflammatoires, régulent la synthèse des eicosanoïdes, inhibent les unités résistantes stimulées ou inhibent l'activité de la NO synthase et de la COX-2 par des effets inhibiteurs sur le NF- κ B . Les médiateurs inflammatoires, tels que l'IL-6, sont affectés par les flavonoïdes alimentaires, tels que les flavones présents dans le cacao et le thé, qui ont un effet dose-réponse sur les niveaux d'IL-6 dans le sang. (Rahman *et al.*, 2022)

Les constitués polyphénoliques inhibent les phosphatidylinositide 3-kinases/protéine kinase B (PI3K/Akt), l'inhibiteur de la kappa kinase/c-Jun amino-terminal kinases (IKK/JNK), la cible mammalienne du complexe rapamycine 1 (mTORC1), un complexe protéique qui contrôle la synthèse des protéines, et JAK/STAT. Ils peuvent supprimer l'expression des récepteurs Toll-like (TLR) et des gènes pro-inflammatoires. Leur activité antioxydante et leur capacité à inhiber les enzymes impliquées dans la production d'eicosanoïdes contribuent également à leurs propriétés anti-inflammatoires (Figure. 30). (Saleh *et al.*, 2021)

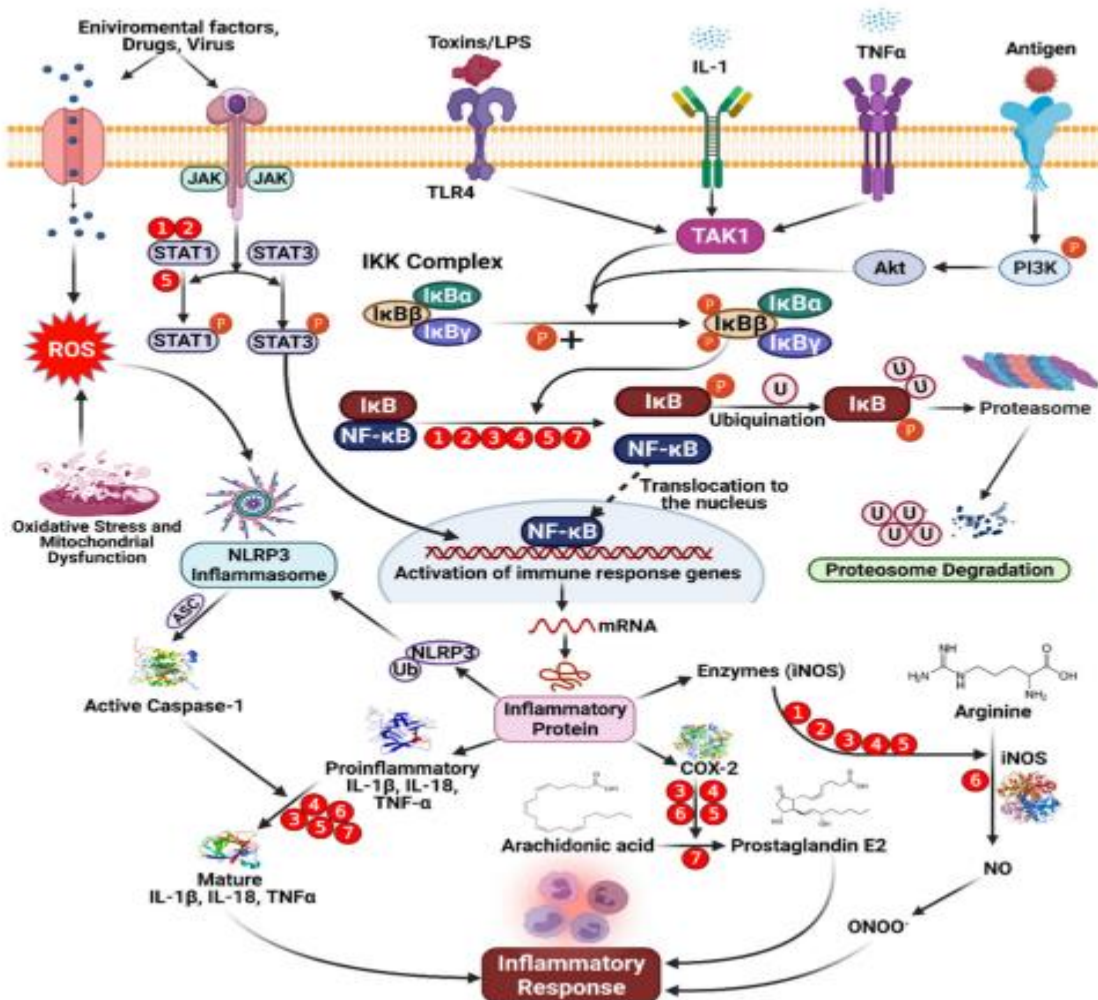


Figure 30. Mode d'action de quelques biomolécules dérivées de plantes **1** Genisteine , daidzeine **3** isorhamnetine **4** pelargonidine **5** kaempferol **6** apigenine and **7** epicatechine . (Rahman *et al.*, 2022)

Une série d'études *in vitro* a montré que les polyphénols tels que l'acide oléanolique, la curcumine, le kaempférol-3-O-sophoroside et le lycopène inhibent la protéine high mobility group box1, une importante protéine de la chromatine qui interagit avec les nucléosomes, les facteurs de transcription et les histones, régulant ainsi la transcription et jouant un rôle clé dans l'inflammation. (Rahman *et al.*, 2022)

I.3.5. Phyto-molécules et inhibition de l'uréase

Les recherches sur l'inhibition des enzymes restent un sujet important dans le domaine du développement des médicaments, car elles ont permis de découvrir de nouveaux composés bioactifs qui peuvent être utilisés dans la lutte contre les maladies infectieuses.

Les métabolites secondaires jouent un rôle crucial dans la recherche pharmaceutique depuis des décennies. Cette recherche a le potentiel de produire de nombreuses pistes thérapeutiques

différentes, chacune ayant une structure chimique unique et un ensemble de propriétés biologiques uniques. (Amin *et al.*, 2013, Al-Rooqi *et al.*, 2023)

L'uréase (urée amidohydrolase ; EC 3.5.1.5) est une enzyme à plusieurs sous-unités contenant du nickel qui catalyse l'hydrolyse de l'urée, en carbamate et en ammoniac à la suite du catabolisme des composés azotés.

Une grande partie de l'urée produite dans le foie est excrétée dans les intestins, où elle peut être digérée et absorbée par diverses bactéries uréolytiques tels que streptococcus salivarius, une bactérie buccale courante, pouvant utiliser l'urée comme principale source d'azote pour sa croissance.

Hélicobacter pylori est une bactérie uréolytique qui provoque des ulcères gastriques et duodénaux. Pendant l'uréolyse résulte une libération d'ammoniac qui augmente le pH, ce qui permet aux bactéries de prospérer dans un tel environnement.

De surcroît, les infections des voies urinaires sont causées par des bactéries uréolytiques telles que Proteus vulgaris et Proteus mirabilis. Les calculs urinaires se forment lorsque le pH de l'urine augmente en raison de la précipitation d'ions polyvalents généralement solubles dans l'urine.

L'ammoniac a un impact cytostatique constant sur les cellules épithéliales. Les dérivés d'acide hydroxamique sont des inhibiteurs puissants et spécifiques de l'uréase, en effet ils possèdent une forte capacité de chélation avec les métaux de transition et peuvent se lier aux ions de nickel du site actif de l'uréase, rendant l'enzyme inactive. (Mamidala *et al.*, 2021). Les acides hydroxamiques liés à une fraction aromatique ont montré une excellente activité contre l'uréase de H. pylori avec des valeurs de IC₅₀ dans la plage des nanomoles. (Liu *et al.*, 2018)

Les extraits de plantes ou les substances naturelles sont une option supérieure car ils ont moins d'effets secondaires et sont bien tolérés. Plusieurs plantes ont été décrites comme puissantes dans l'inhibition de l'uréase dans les essais scientifiques.

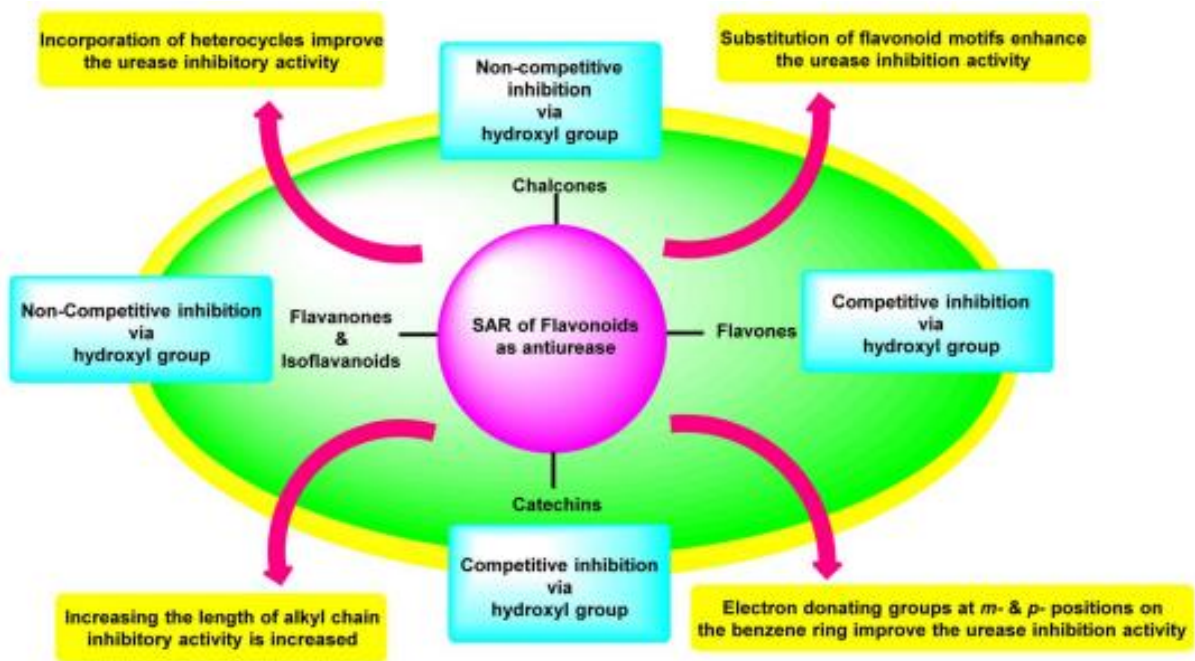


Figure 31. Activité anti uréase des différentes classes des flavonoïdes (Al-Rooqi *et al.*, 2023)

Les polyphénols, en particulier les flavonoïdes, ont été signalés comme des inhibiteurs notables de l'uréase de *Helicobacter pylori*. Ainsi, la génistéine, une isoflavone largement produite par les plantes de la famille des Fabaceae a inhibé l'uréase de *H. pylori* de 50 % lorsqu'elle est à 430 µg/mL, tandis que son dérivé 7-O-glucoside n'avait aucun effet sur l'activité (Modolo *et al.*, 2015)

En effet, les flavonoïdes ont une activité inhibitrice sur l'enzyme uréase. Les flavones ont une activité modérée, les flavonols ont une puissante capacité anti-uréase et un impact anti-adhérent contre *H. pylori*, Les flavonones et les isoflavonoides ont manifesté une activité anti uréase considérable et les anthocyanines ont une activité relativement faible cependant les dernières recherches suggèrent que la teneur en anthocyanes des extraits pourrait être en grande partie responsable des actions inhibitrices contre l'uréase (Al-Rooqi *et al.*, 2023)

Les inhibiteurs de l'uréase à base de flavonoïdes seront probablement explorés plus comme traitement potentiel des calculs rénaux, notamment en combinaison à d'autres thérapies, telles que les antibiotiques, afin d'améliorer l'efficacité du traitement d'affections telles que les infections des voies urinaires. (Al-Rooqi *et al.*, 2023)

L'étude SAR a montré que le profil d'action inhibitrice des espèces dérivées de plantes dépendait de l'emplacement et du type de groupes fonctionnels.

La figure 31 est un résumé des flavonoïdes les plus puissants inhibiteurs de l'uréase, le type d'inhibition qu'ils exercent et les groupements les plus actifs qu'ils contiennent.

I.3.6. Activité hémostatique des biomolécules dérivés de plantes

Les biomolécules dérivées des plantes stimulent le processus d'hémostase. Ces composés bioactifs responsables de l'activité hémostatique comprennent les tanins, les glycosides iridoïdes, les lignanes, les saponines et les composés phénoliques. Les mécanismes d'action comprennent la stimulation de la coagulation, l'inhibition de la fibrinolyse, la constriction des muscles vasculaires ou lisses et l'agrégation plaquettaire. (Ghosh *et al.*, 2023, Ebrahimi *et al.*, 2020)

En raison de leurs excellentes propriétés physiques et chimiques, les composés phénoliques ont suscité beaucoup d'attention et sont devenus l'un des points chauds du développement de médicaments.

Certaines études ont indiqué que les composés phénoliques ont non seulement une activité hémostatique, mais qu'ils présentent également une meilleure activité anticoagulante (Luo *et al.*, 2017)

Les propriétés hémostatiques ont été attribuées à l'activation de la coagulation intrinsèque

Les alcaloïdes qui favorisent l'hémostase en réduisant la perméabilité capillaire, en ralentissant le flux sanguin et en induisant la contraction de la paroi vasculaire sont principalement l'ergonovine, l'hydrastine et l'hydrastinine.

Les quinones et les saccharides réduisent également la perméabilité capillaire, ralentissent le flux sanguin et induisent la contraction des parois vasculaires, formant ainsi des ingrédients actifs hémostatiques. Ils peuvent améliorer également le taux d'agrégation plaquettaire en affectant l'activation, l'adhésion et la déformation des plaquettes pour former l'hémostase.

Les flavonoïdes tels que la rutine, la quercétine et l'isoquercitrine peuvent favoriser l'hémostase en réduisant la perméabilité capillaire et d'autres voies pour promouvoir la contraction de la paroi vasculaire et activent les plaquettes et en augmentent le taux de plaquettes. Ils pourraient exercer des effets hémostatiques en raccourcissant le temps de saignement et en resserrant les vaisseaux sanguins dans les oreilles de lapin isolées.

Les terpénoïdes sont des ingrédients hémostatiques importants, on peut citer la cornine, la loganine, le protopanaxatriol, le panaxatriol, le protopanaxadiol et le panoxadiol, dotés de bons effets hémostatiques. Ils favorisent l'activation des plaquettes, augmentent le nombre de plaquettes et les paramètres de la largeur de distribution des érythrocytes et favorisent l'agrégation plaquettaire induite par l'adénosine triphosphate. (Mu *et al.*, 2023)

Chapitre II
Le processus et les
techniques de
développement d'un
médicament à partir
des plantes

Chapitre II LE PROCESSUS ET LES TECHNIQUES DE DÉVELOPPEMENT DE MÉDICAMENTS À PARTIR DES PLANTES

II.1. Introduction

L'utilisation de produits naturels dérivés de plantes pour concevoir de nouvelles pistes dans le processus de synthèse de médicaments est une tâche très difficile. Ce processus comprend l'analyse phyto-chimique de la plante, l'étude de la nature et des structures des composés bioactifs, les caractérisations et l'évaluation pharmacologique (Koparde *et al.*, 2019).

II.2. Les principales phases du développement des médicaments à partir de biomolécules issues de plantes

Le processus de découverte de médicaments dérivés de plantes implique plusieurs phases, telles que décrites par Pan et al. (2013). (Pan *et al.*, 2013) Ces étapes comprennent la phase pré-médicamenteuse (predrug), la phase quasi-médicamenteuse (quasi-drug) et la phase médicamenteuse complète (full drug) (Figure.32).

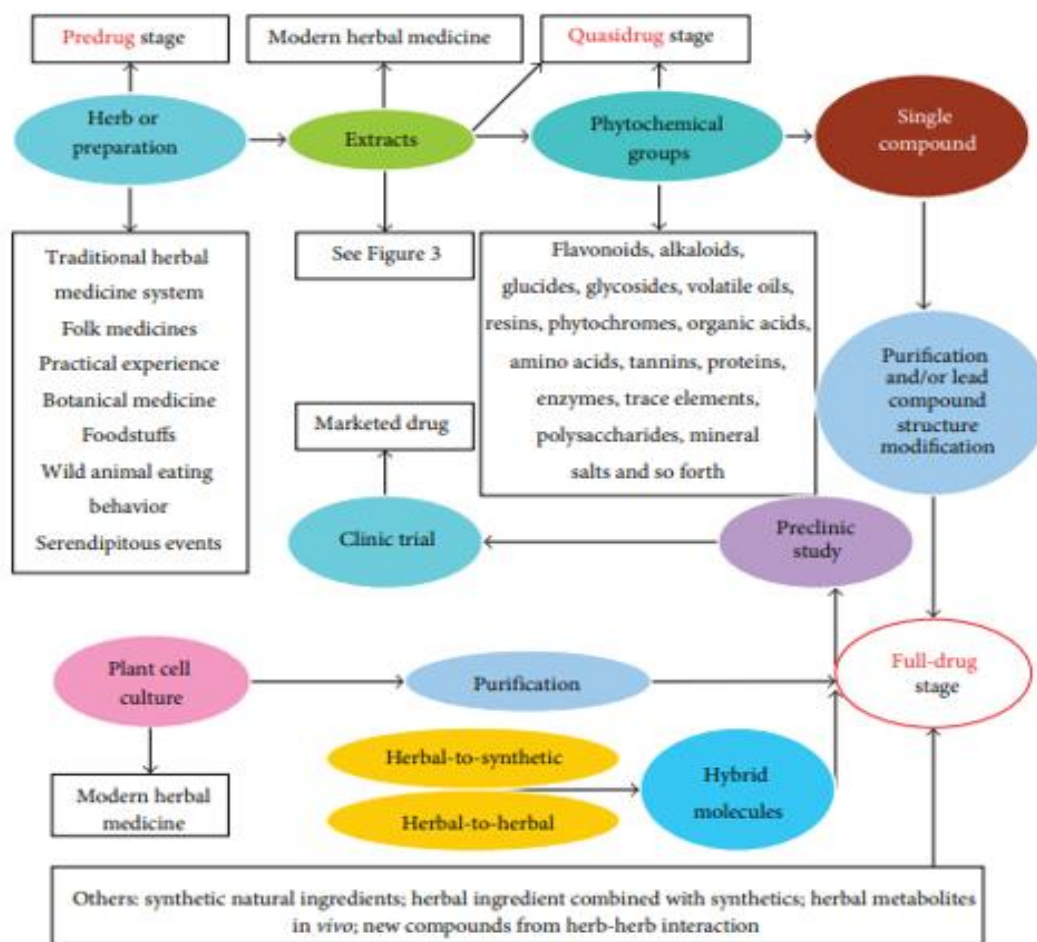


Figure 32. Approches actuelles pour la découverte de médicaments à partir de biomolécules dérivées de plantes (Pan *et al.*, 2013)

Voici un aperçu de chaque étape :

II.2.1. Phase Pré-médicamenteuse (predrug stage)

II.2.1.1. Exploration et Collecte

Dans le processus de découverte de médicaments à partir de sources végétales, la première et l'une des étapes les plus importantes consiste à sélectionner les plantes candidates pour l'extraction/isolation des principes actifs et le dépistage des activités biologiques. (Najmi *et al.*, 2022)

Le processus commence généralement par la collecte, l'identification, l'authentification et le dépôt d'échantillons de plantes dans l'herbier. Une méthode de sélection de plantes appropriée, adaptée aux intérêts du médicament à développer, devrait être adoptée. L'approche peut être une approche de sélection aléatoire, une approche taxonomique, une approche ethnomédicale, une approche phytochimique (chimiotaxonomique) ou une approche gérée par l'information. La plante sélectionnée possède des constituants chimiques ayant une activité biologique, également appelés composés bioactifs. (Sabiou, 2022)

L'authentification des matières premières collectées est le point de départ de base dans le développement des produits naturels. L'authentification des matières végétales peut être réalisée par l'application d'une ou plusieurs des méthodes impliquant l'analyse taxonomique, macroscopique, microscopique, chromatographique, spectroscopique, chimiométrique, d'immunoanalyse et de profilage ADN. (Najmi *et al.*, 2022)

II.2.1.2. Extraction et purification

Les composés actifs sont extraits des herbes collectées. Il est bien évident que la valeur médicinale des herbes/plantes dépend de la présence d'ingrédient(s) biologiquement actif(s) ayant des propriétés semblables à celles des médicaments. Des recherches récentes ont identifié de nombreuses substances/ingrédients biologiquement actifs à la fois dans des végétaux terrestres et marins. (Ibrahim *et al.*, 2017)

Lorsqu'un composé principal (ou principe actif) est observé dans un mélange comprenant d'autres composés d'une plante, le composé identifié doit d'abord être isolé et purifié. La structure, la stabilité et la quantité du composé principal déterminent la facilité avec laquelle le principe actif peut être isolé et purifié. Le processus d'isolement commence par l'extraction par solvant, qui est la préparation des extraits à utiliser pour l'analyse phytochimique et les tests biologiques (Figure. 33). (Sabiou, 2022, Atanasov *et al.*, 2021)

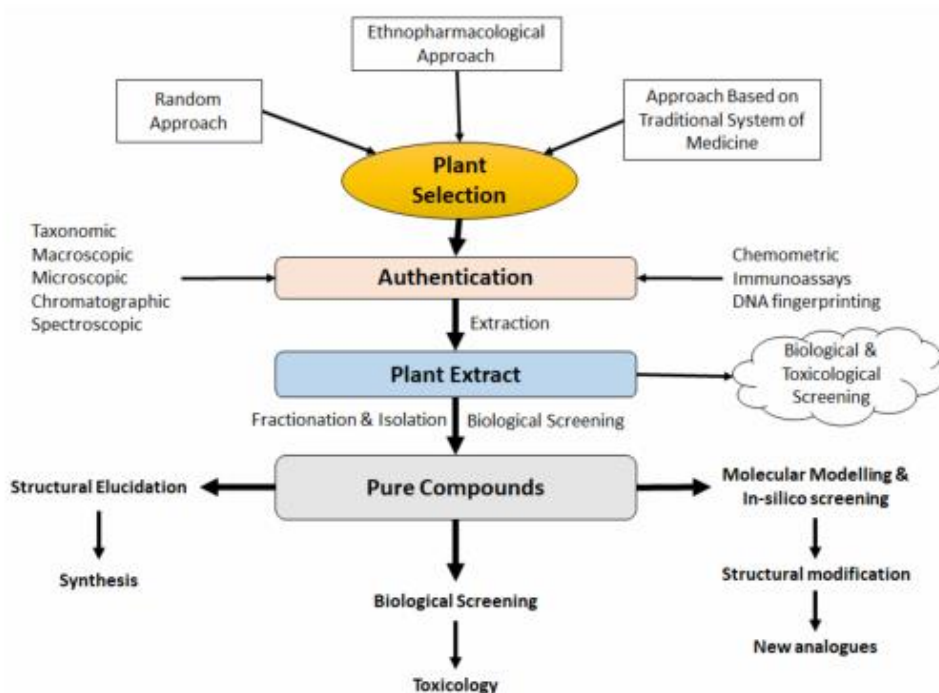


Figure 33. Les principales étapes de la découverte des bioactifs issus de plantes (Najmi *et al.*, 2022)

Les extraits sont soumis à une séparation chromatographique pour isoler les composés d'intérêt. Chaque composé est purifié à l'aide de techniques de purification appropriées telles que la chromatographie sur colonne, la HPLC préparative, Les structures chimiques des composés présentant une activité biologique optimale sont élucidées en utilisant des techniques modernes telles que la spectroscopie RMN, la spectrométrie de masse, la LC-MS, (Figure.34).(Najmi *et al.*, 2022)

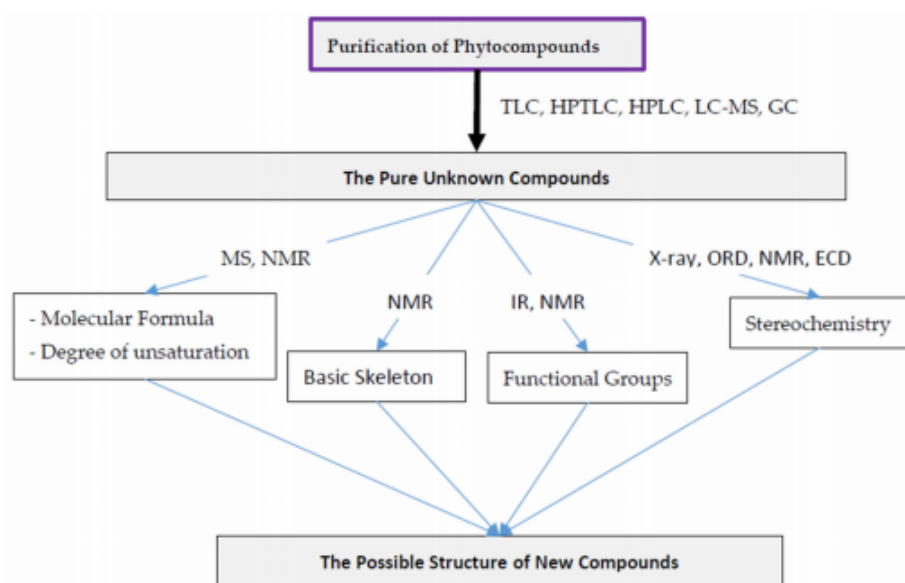


Figure 34. Purification des biomolécules actives extraites de plantes (Najmi *et al.*, 2022)

Par exemple, jusqu'en 2007, 3 563 extraits et 5 000 composés uniques provenant de 3 000 plantes médicinales traditionnelles ont été recueillis en Chine (Ibrahim *et al.*, 2017)

II.2. 2. Phase Quasi-médicamenteuse (quasi drug stage)

II.2.2.1. Screening Biologique

Les composés isolés sont soumis à un criblage biologique pour évaluer leurs activités pharmacologiques. Cette phase implique des tests des composés pour des effets thérapeutiques potentiels, la toxicité et les mécanismes d'action. Des études *in vitro* et *in vivo* sont souvent menées pour évaluer l'efficacité des composés. (Ibrahim *et al.*, 2017; Chugh *et al.*, 2018)

En général, les produits naturels sont criblés pour leurs activités biologiques sur la base de leurs utilisations ethnopharmacologiques et traditionnelles rapportées. Par exemple, la plante médicinale traditionnellement utilisée pour la gestion du diabète peut être testée pour son effet hypoglycémiant et l'utilisation traditionnelle est rationalisée scientifiquement une fois qu'une molécule très prometteuse a été identifiée. Ces essais sont effectués en utilisant plusieurs lignées cellulaires animales ou humaines et des microorganismes. Un certain nombre d'instruments précis et efficaces ont été développés à cet égard. (Najmi *et al.*, 2022)

Les États-Unis, à titre d'exemple ont criblé environ 114 000 extraits issus d'environ 35 000 échantillons de plantes contre divers systèmes tumoraux dès avant les années 1990. (Ibrahim *et al.*, 2017)

II.2.2.2. Études de Relation Structure-Activité (SAR)

Les biomolécules actives extraites de plantes servent de composés de départ pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques. En utilisant la modélisation moléculaire et les bases de données de produits naturels, ces composés sont optimisés grâce à des techniques de chimie médicinale moderne pour créer des analogues plus efficaces. Les familles de molécules structurellement apparentées fournissent des informations SAR précieuses. Les composés isolés font l'objet d'études SAR et de modélisation moléculaire pour concevoir des analogues avec une puissance accrue et une toxicité réduite. (Chugh *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2013). Les analogues prometteurs sont synthétisés et évalués par des essais biologiques pour le développement de médicaments. (Kitchen *et al.*, 2004)

II.2.3. Phase Médicamenteuse Complète (full drug stage)

II.2.3.1. Essais Précliniques

Les composés optimisés font l'objet d'essais précliniques pour évaluer leur sécurité et leur efficacité. Il est proposé que les stratégies de tests précliniques des produits botaniques débutent par l'examen *in vivo* des extraits dans des modèles animaux pertinents pour étayer l'utilisation ethnopharmacologique/ethnopharmaceutique, suivi de processus de fractionnement bio-guidés utilisant un modèle *in vitro* adéquat, puis des études pharmacocinétiques et enfin des tests *in vivo* des composés isolés chez les modèles animaux. (Butterweck & Nahrstedt, 2012)

Une approche étape par étape (Figure..35) est la mieux adaptée pour les tests précliniques des produits botaniques.

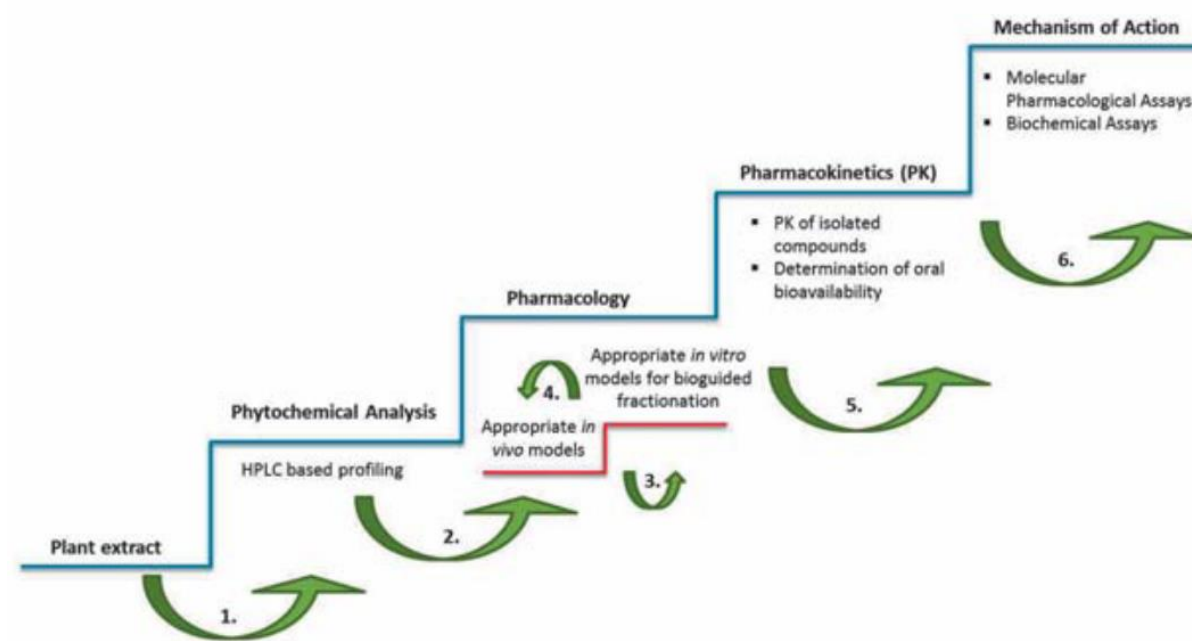


Figure 35. approche étape par étape pour les tests précliniques des produits botaniques(Butterweck & Nahrstedt, 2012)

II.2.3.2. Essais cliniques

En cas de succès, les composés passent aux essais cliniques impliquant des sujets humains. Le but des essais cliniques est d'évaluer l'efficacité, la sécurité et la sélectivité de l'extrait végétal ou des composés isolés pour la découverte de médicaments, et cela se fait en 3 phases.(Sabiou, 2022)

L'achèvement réussi de ces phases peut conduire à une approbation réglementaire pour la commercialisation du médicament.

L'utilisation des biomolécules dérivées de plantes dans la découverte de médicaments offre plusieurs avantages, tels qu'une vaste source de composés chimiques divers, dont beaucoup peuvent avoir des activités pharmacologiques uniques. Cependant, les défis comprennent la

normalisation des extraits à base de plantes, garantir la reproductibilité des résultats, et aborder des problèmes liés à la sécurité et à l'efficacité des médicaments dérivés de plantes.

Les progrès dans les techniques analytiques, la bioinformatique et la collaboration entre les praticiens de la médecine traditionnelle et les scientifiques modernes jouent des rôles cruciaux pour surmonter ces défis et exploiter le potentiel thérapeutique des biomolécules dérivées de plantes.

Chapitre III

Les plantes

étudiées

CHAPITRE III LES PLANTES ETUDIÉES

III.1. *VERONICA ROSEA*

III.1.1. Position taxonomique de *Veronica rosea*

Règne - Plantae

Division - Tracheophyta

Sous-division - Spermatophytina

Classe - Magnoliopsida

Super-ordre - Asteranae

Ordre - Lamiales

Famille – Plantaginaceae

Genre - *Veronica L.*

Espèce – *Veronica rosea Desf*

III.1.2. La famille des Plantaginacées

La famille des Plantaginaceae (anciennement Veronicaceae) est divisée en 10 tribus : Plantagineae, Angelonieae, Gratiroleae, Antirrhineae, Callitricheae, Sibthorpieae, Digitalideae, Cheloneae, Veroniceae et Russelieae et est considéré comme un groupe monophylétique étroitement allié aux Scrophulariaceae .(Maurya *et al.*, 2020)

Les espèces de la famille des Plantaginacées sont des herbes annuelles ou vivaces, et comprennent à la fois des espèces terrestres et des aquatiques enracinées. On compte notamment : les plantains terrestres, les plantains d'eau, les callitriches, les cymbalaires, les digitales, les galanes (chélones), les globulaires, les hydrotriches, les hysopes dont les hysopes d'eau, les limnophiles ou ambulies, les linaires, les littorelles, les lysimaques, les mufliers, et les véroniques. (AquaPortail, 2021)

La plupart des espèces Plantaginaceae se trouvent principalement dans les zones tempérées et humides. Elles peuvent également être trouvées dans les prairies dégradées, les caniveaux et les champs abandonnés. Cette famille comprend diverses plantes médicinales et aromatiques et compte environ 94 genres et 1900 espèces (Hammami *et al.*, 2020)

De nombreux membres des Plantaginaceae sont importants dans le commerce horticole, par exemple la digitale à la fois importante sur le plan horticole et médicinal, car elle est la source des glycosides « cardiaques ». digitoxine et d'autres (Simpson, 2010)

III.1.3. Description botanique des plantaginaceae

Les Plantaginacées, sont une famille de plantes dicotylédones, hermaphrodites, monoïques ou gynomoniques. Les membres de cette famille sont généralement des plantes herbacées qui ont rarement une base ligneuse.

- Les feuilles : sont généralement simples, en spirale, opposées ou verticillées, sans stipules, avec parfois des nervures principales parallèles (Figure. 36).



Callitriche heterophylla

Figure 36. feuilles dimorphiques

- L'inflorescence est une tête, un racème, un thyrses ou des fleurs solitaires.



Plantago lanceolata



Plantago erecta

Figure 37. inflorescence de quelques espèces du genre *Plantago*

- Les fleurs sont généralement bisexuées, zygomorphes ou actinomorphes, bractéolées, hypogynes ou épigynes. Elles sont petites, et discrètes, de couleurs variées telles que le blanc, le brun ou le jaune et vert, et peuvent pousser en grappes ou isolément formant des épis simples, cylindriques, allongés ou globuleux (Fig. 38)



Digitalis purpurea



Veronica anagallis-aquatica

Figure 38. Fleurs de quelques espèces des Plantaginacés

- Le périanthe est membraneux à scarieuses.
- Le calice est fusionné et également scarieux (les sépales sont souvent fusionnés en un tube lobé), il est synseptique avec 3-5 lobes imbriqués.
- La corolle est sympétale, bilabiée dans certains cas, avec 3 à 5 lobes imbriqués. La corolle présente un tube généralement allongé, avec quatre lobes lancéolés, qui deviennent finalement scarieux.(Figure. 39)



Figure 39. Corolle personée de *Antirrhinum nuttallianum*.

- Les étamines sont au nombre de 1 à 8, alternipétales et épipétales.
- Les anthères sont versatiles, à déhiscence longitudinale ou transversale.

- Le gynécée est syncarpe, avec un ovaire supérieur ou inférieur, et 1 à 2 carpelles et loges.
- Le style est solitaire; le(s) stigmate(s) est(sont) à 2 lobes ou capité. La placentation est axile ou basale;
- Les ovules sont anatropes à hémianatropes, uniovulés, de 1 à 40 par carpelle.
- Le fruit est une capsule (circumscissile ou septicide), un akène, une baie ou un schizocarpe de nucules. (Fig.40)



Callitriche heterophylla.



Digitalis lutea

Figure 40. Fruits de quelques Plantaginacés

- Les graines sont endospermiques.
- Les plantes sont pollinisées par les insectes ou le vent. (Simpson, 2010)

III.1.4. Le genre *Veronica*

Les véroniques sont des plantes angiospermes dicotylédones appartenant à la famille des Plantaginacées, un groupe qui passe souvent inaperçu. Pourtant, dès la fin de l'hiver, elles sont parmi les premières à ajouter de la couleur à nos paysages. La véronique de Perse (*Veronica persica*) est la plus connue, se déployant généralement en de jolis tapis bleus au printemps (Norb, 2019.)

Le genre *Veronica* comprend environ 450 (Albach *et al.* 2004) à 500 espèces et est le plus grand genre de Plantaginaceae (Norb, 2019.) . Un tel nombre d'espèces est révélateur de la grande adaptabilité écologique du genre *Veronica* . et peut expliquer l'intérêt que *Veronica* a suscité depuis longtemps. (Prkić *et al.*, 2018 ,Albach & Meudt, 2010)

Récemment, des techniques moléculaires et des analyses phylogénétiques ont été appliquées à *Veronica* et à des genres apparentés (Albach & Chase 2001, Albach & al. 2004). Ces études ont contribué à révolutionner les idées sur l'évolution du genre et ont conduit à une nouvelle classification phylogénomique intragénérique de *Veronica* (Albach & al. 2004). Combiné à la grande quantité d'informations provenant d'autres aspects de leur biologie, nous avons maintenant une bien meilleure compréhension de la manière dont les principaux groupes de *Veronica* sont délimités, apparentés et ont évolué. (Albach, 2006)

En outre, les plantes du genre *Veronica* sont largement utilisées à des fins horticoles et comme plantes de jardin.

Les espèces de *Veronica* sont communément appelées "véronique", "œil d'oiseau », car leur période de floraison est longue et varie du printemps à l'automne, et elles sont faciles à entretenir. (Figure.41)

La véronique est utilisée comme médicament traditionnel pour traiter les rhumatismes, la laryngopharyngite, l'hémoptysie, la hernie et les maladies respiratoires. (Kim *et al.*, 2021)



V.orientalis



V. czerniakowskiana



v.mirabilis

Figure 41. Quelques espèces Iranienne du genre *Veronica* (Doostmohammadi et al., 2022)

III.1.5. Distribution géographique du genre *Veronica*

Les espèces du genre *Veronica* présente une grande diversité de distribution, s'étendant des habitats aquatiques jusqu'aux steppes sèches, et des régions de niveau de la mer jusqu'aux zones alpines. (Salehi *et al.*, 2019)

Veronica se répartit principalement dans l'hémisphère nord et dans la région australasienne (Australie, Nouvelle-Zélande, Nouvelle-Guinée), avec des centres de diversité en Asie occidentale et en Nouvelle-Zélande . (Mehrvarz *et al.*, 2008)

La plupart des espèces de *Veronica* se rencontrent dans les régions à régime méditerranéen, de la mer aux hautes altitudes. Malgré leur importance dans de nombreux habitats, les plantes aquatiques de *Veronica* sont principalement étudiées dans le cadre d'études biosystématiques modernes. (Salehi *et al.*, 2019)

III.1.6. Description botanique du genre *Veronica*

Le genre *Veronica* comprend généralement des plantes annuelles de petite taille, souvent rampantes.

- Les feuilles des espèces appartenant genre *Veronica* sont linéaires-lancéolées, fortement dentées 4-6 fois plus longues que larges, sessiles.
- Le calice hétérosépale à quatre sépales et parfois cinq.
- Dans le genre *Veronica*, la fleur est composée de :
 - 4 sépales formant un calice.
 - 4 pétales formant la corolle, soudés à leur base, ce qui rend la fleur gamopétale.
 - 2 étamines fusionnées à la corolle.
 - 2 carpelles formant un ovaire supère
 - Le pistil est surmonté d'un seul style.

Les fleurs peuvent former des racèmes, plus rarement des épis, ou être solitaires à l'aisselle des feuilles. (Figure. 42)



V.persica



V. beccabunga



Pétales soudées de *V. chamaedrys*

Figure 42. Fleurs de quelques espèces du genre *Veronica* (Doostmohammadi *et al.*, 2022)

Le fruit est une capsule aplatie ou globuleuse, à deux lobes souvent en forme de cœur. Les capsules sont glabres, orbiculaires. (Figure.43)



V. persica



V. hederifolia



V. montana

Figure 43. Fruits de quelques espèces de *Veronica*(Doostmohammadi et al., 2022)

III.1.7. Description botanique de l'espèce *Veronica rosea* Desf

Veronica est un exemple d'un taxon dont les caractères sont généralement dérivés où de nombreuses espèces ont développé des états de caractères autrement considérés comme plésiomorphes (caractère qui n'a pas subi de modification au cours de l'évolution).

Ces reversions de caractères ne se retrouvent pas seulement dans la fleur, mais aussi dans la morphologie de l'inflorescence, l'embryologie et la caryologie.(Albach *et al.*, 2004)

Tiges : Arbustives, filiformes, pubescentes, ascendantes mesurant 10-20 cm de hauteur, décombantes à érigées, pilosées ou pubérulentes (rarement sub glabres), couvertes de poils é glandulaires de longueur variable (<0,1-0,7 mm), généralement incurvés, apprimés et antrorse, parfois concentrés en 2 lignes opposées ; la pousse apicale porte 3-8 paires de feuilles. (Figure.44)



Figure 44. les parties aérienne illustrant la tige de *V.rosea*

Feuilles : De 1 à 2 centimètres de long, 5-7 millimètres de large, glabres , les basales sont le plus souvent elliptiques ou ovales à suborbiculaires ,cunéiformes, dentées, obtuses, décurrentes en pétiole; les feuilles moyennes sont linéaires-lancéolées, oblancéolées, ovales à elliptiques, ± profondément dentées à pinnatifide ; cunéiforme à obtus à la base, subrévoluté à révoluté, subglabre ou pilosé, brièvement pétiolés ; les feuilles de la pousse apicale sont opposées, généralement linéaires à oblancéolées. Entières (rarement dentées), révolues.(Figure.45)



Figure 45. les feuilles de *V. rosea*

Grappes : Terminales, généralement par paires ou par triples, de 6 à 8 centimètres, nues à la base.

Fleurs : Nombreuses, serrées, pédonculées. Bractéole linéaire, un peu plus courte que le pédoncule. Calice à quatre parties ; lobes linéaires-lancéolés, inégaux.

Les fleurs sont d'un bleu pâle et plus courtes que le calice , regroupées en grappes au sommet des rameaux, avec des pédoncules fructifères courts et dressés.(Quezel.,1963)

Apparentée à *V. austriaca* Jacq. Elle diffère par sa tige arbustive ascendante, ses grappes terminales et sa corolle rose. Elle fleurit en été. (Figure.46)



Figure 46. la fleur de *V. rosea*

Les racèmes : sont axillaires, presque toujours opposés, portant des fleurs, disposées de manière lâche à dense ; pédoncules de 1-9 cm de long, subglabres ou couverts du même type d'indument que la tige. (Figure.47)



Figure 47. Racèmes de *V. rosea*

Les bractées : ont 3,5-5 mm de long, linéaires-lancéolées à étroitement elliptiques, entières, subglabres ou pilosées ; pédicelles (3-4) mm de long. Calice de 3-5 mm de long ; les sépales,

linéaires-lancéolés à oblancéolés, le plus souvent plus courts que la capsule, subglabres ou pilosés, avec des poils é glandulaires.

Corolle : Corolle rotative de la taille de *V. Teucii* Lin. ; lobes ovales, obtus ; le lobe inférieur plus petit. 10-14 cm de diamètre, bleue, rarement rose pâle. Capsule légèrement plus longue que large, légèrement plus large que longue ou aussi longue que large, obcordée, obovale à largement obovale ou suborbiculaire, ± arrondie à la base, généralement émarginée, sinus jusqu'à 0,9 mm de profondeur, glabre ou pilosé, avec des poils é glandulaires.

Style : 5-6,5 mm de long.

Graines : 1-2 × 0,7-1,8 mm, environ 6-10 par capsule.

Nombre de chromosomes: $-2n = 16$.

Phénologie: Floraison d'avril à juillet. (Rojas-Andrés & Martínez-Ortega, 2016)

Notons que *Veronica rosea* est morphologiquement très variable. Par conséquent, de nombreux taxons infra-spécifiques ont été décrits . Malgré cette variabilité morphologique, *V. rosea* constitue une lignée monophylétique d'après les données AFLP et les données de séquence ADN . (Rojas-Andrés & Martínez-Ortega, 2016), *Al Yasmina N°1 (2020) - René MAIRE : Flore de L'Afrique du Nord.*)

III.1.8. Répartition géographique de l'espèce *Veronica rosea* Desf

Veronica rosea Desf est retrouvée dans les prairies sèches et rocailleuses et clairières forestières (800-3,500 m.)

Veronica rosea Desf est une plante endémique de l'Algérie et du Maroc. La carte ci-dessous (Figure.48) surligne les zones de pousse de cette espèce.



Figure 48. Distribution géographique de l'espèce *Veronica rosea* Desf (Rojas-Andrés & Martínez-Ortega, 2016)

III.1.9. Propriétés pharmacologiques des espèces du genre *Veronica*

Les espèces de *Veronica* sont devenues importantes en raison de leurs utilisations traditionnelles et de leurs activités biologiques. Auparavant, des rapports indiquaient que la véronique était antimicrobienne (Stojković *et al.*, 2013), diurétique, cicatrisante, analgésique, expectorante et antiscorbutique, possédant des propriétés qui pourraient être utiles pour traiter le cancer, la grippe, l'hémoptysie, la laryngopharyngite, la toux et les maladies respiratoires. (Barreira *et al.*, 2014)

III.2. *CYTISUS PURGANS*

III.2.1. Position Taxonomique de l'espèce *cytisque purgans*

Règne - Plantae

Division - Tracheophyta

Sous-division - Spermatophytina

Classe - Magnoliopsida

Ordre - Fabales

Famille - Fabaceae

Genre - *Cytisus*

Espèce - *Cytisus purgans subsp. balansae (Boiss.) Maire*

III.2.2. Les Fabaceae

Les Fabaceae ou Leguminosae, communément appelées la famille des légumineuses, des pois ou des haricots, est une grande famille de plantes à fleurs, importante sur le plan économique.

Arbres, arbustes ou herbes, vivaces ou annuelles, parfois grimpantes ou décombrantes, et facilement reconnaissables à leurs fruits (légumineuses) et à leurs feuilles composées et stipulées. Ce groupe est la troisième famille de plantes terrestres en nombre d'espèces, derrière les Orchidaceae et les Asteraceae, avec 730 genres et plus de 19 400 espèces. (A. Rahman & Parvin, 2014)

En Algérie, on recense environ 53 genres et 337 espèces de Fabaceae (Quezel et Santa, 1963). Les légumineuses sont remarquablement riches en flavonoïdes. Notamment, la sous-famille des Papilionaceae se distingue par la présence d'isoflavones, d'anthocyanines, et de flavonols glycosylés.

À l'heure actuelle, la famille des légumineuses est classée en trois sous-familles distinctes : les Caesalpinioideae, les Mimosoideae et les Papilionoideae. Les Caesalpinioideae sont subdivisés en quatre tribus, à savoir les Caesalpinieae, Cassieae, Cercideae et Detarieae, regroupant environ 170 genres et 2250 espèces. Les Mimosoideae sont quant à elles divisées en deux tribus, les Ingeae et les Mimoseae, comptant environ 80 genres et 3 270 espèces. Enfin, les

Papilionoideae comprennent 28 tribus, totalisant environ 480 genres et 13 800 espèces.(Andrews & Andrews, 2017)

III.2.3. Description botanique des Fabaceae

Les Fabaceae peuvent être des herbes, sous-arbrisseaux, arbrisseaux, arbustes ou arbres, de port, très varié.

Les tiges sont érigées, grimpantes ou tortueuses.

Feuilles ordinairement alternes, rarement opposées, stipulées composées ou simples, pennées, bi-tri-pennées folioles parfois pourvues de stipelles à leur base, sessiles ou pétiolulées ; feuilles parfois réduites à un phyllade (pétiole dilaté). Stipules et stipelles sont présentes ou absentes, et parfois les stipules se transforment en épines. (Figure.49)



Figure 49 . Feuilles des espèces du genre *Cytisus*

Inflorescences ordinairement en grappes terminales ou axillaires, parfois spiciformes ou capituliformes, ordinairement pourvues de bractées et de bractéales.(Figure.50)



Figure 50. Inflorescence en racème

Fleurs zygomorphes, ou parfois actinomorphes, hermaphrodites, rarement polygames ou dioïques par avortement. Le plus souvent en racèmes, corymbes, épis, têtes ou panicules (Figure.51)

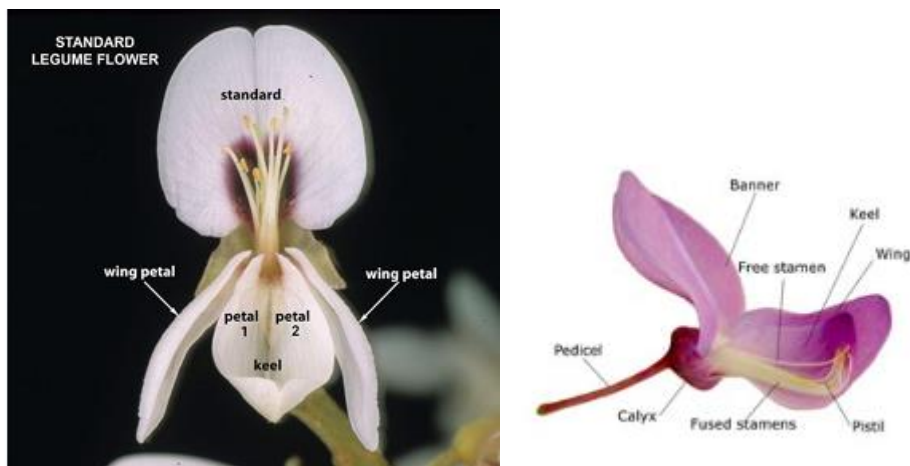


Figure 51. Fleur d'une Fabacée

Calice \pm gamosépale, ordinairement zygomorphe ; les sépales rarement en nombre de 4, ordinairement en nombre 5, libres ou connivents, généralement inégaux et parfois bilabiés avec le sépale impair antérieur. (Figure.52)



Figure 52. Calice des Fabaceae

Les pétales sont généralement isomères avec les sépales, rarement moins nombreux ou inexistant, imbriqués ou valvés, distincts et souvent très différenciés en corolle papilionacée, le pétale supérieur (standard) étant le plus en avant, avec une tête en forme d'étoile., les deux pétales inférieurs les plus internes sont généralement liés par leurs bords inférieurs et forment une carène.

Les étamines sont le plus souvent au nombre de dix , monadelphes, diadelphes ou libres, rarement au moins, hypogynes ou insérées sur un disque \pm périgyne ; anthères basifixes ou dorsifixes, introrses, à 2 loges, déhiscentes par une fente longitudinale, rarement par un pore. parfois transversalement et rarement longitudinalement septés.

Carpelle unique, sessile ou stipité, ordinairement uniloculaire. Ovules ordinairement nombreux, rarement un seul, insérés sur la suture ventrale, campylotropes, amphitropes ou anatropes.

Fruit formé typiquement par une gousse, parfois charnu ou transformé en série d'akènes (lomentum) ou réduit à un akène ou à une samare.(Figure.53)



Figure 53. **Fruit type des Fabaceae**

Graines : . Les graines sont généralement exalbuminées, parfois strophiolées. Les cotylédons sont grands, charnus ou foliacés. à tégument ordinairement coriace ou induré. Funicule \pm allongé ou court, parfois appendiculé au sommet par une strophiole. Albumen souvent peu développé ou nul. Embryon courbé ou droit. Germination hypogée ou épigée. (Xu & Deng, 2017 , Simpson, 2010)

Les fabacées représentent une vaste famille qui se divise en trois sous-familles bien distinctes (*Al Yasmina N°1 (2020) - René MAIRE : Flore de L'Afrique du Nord*)

1. **Mimosoideae**: Fleurs actinomorphes ; corolle très petite, à préfloraison valvaire. Etamines ordinairement vivement colorées. Graines souvent albuminées, à embryon droit. Pollen ordinairement en tétrades ou en glomérules

2. Caesalpinioideae : Fleurs \pm zygomorphes (ou \pm actinomorphes, et alors apétales). Corolle à préfloraison imbriquée, ascendante. Graine souvent albuminée, à embryon droit. Sépales ordinairement libres
3. Papilionoideae : Corolle à préfloraison imbriquée, descendante. Graine exalbuminée, à embryon courbé. Sépales ordinairement concrescents



Figure 54. *Glycyrrhiza glabra*

III.2.4. Le genre *Cytisus*

Le genre *Cytisus* est prévalent dans le bassin méditerranéen, comprenant environ 70 espèces, dont huit poussent dans le nord de l'Algérie. (Bouziane *et al.*, 2018)

Les genêts sont des arbustes à fleurs, des sous-arbrisseaux ou de petits arbres ordinairement inermes, rarement à rameaux un peu spinescents (Figure.55)

Les branches sont alternes .

Les feuilles sont unifoliées à trifoliées, caduques, ordinairement trifoliolées, rarement unifoliolées, souvent stipulées, à stipules petites, sétacées.

Les fleurs sont simples ou en paires jusqu'à quatre axilles foliaires, jaunes, blanches ou purpurines, tantôt latérales axillaires, tantôt en grappes allongées ou courtes ombelliformes ou capituliformes, terminales sur des brachyblastes ou même sur des macroblastes.

Bractées et bractéales ordinairement petites et caduques.

Le calice campanulé ou tubulé, bilabié, à dents ordinairement courtes. Etendard ovale ou suborbiculaire ; ailes obovales ou oblongues ; carène incurvée ou presque droite, obtuse ou à peine acuminée ; onglets des pétales tous libres.

Les étamines toutes concrescentes en tube fermé ; anthères externes dorsifixes ; anthères internes basitixes plus longues.

Ovaire sessile, pluriovulé ;

Le style incurvé à stigmate capité, transversal ou un peu oblique.

Les fruits sont principalement des gousses typiques avec une déhiscence plus ou moins explosive (et valvulaire) via des sutures dorsales et ventrales

Les graines presque toujours arillée. (Ferreira-Sousa *et al.*, 2024)

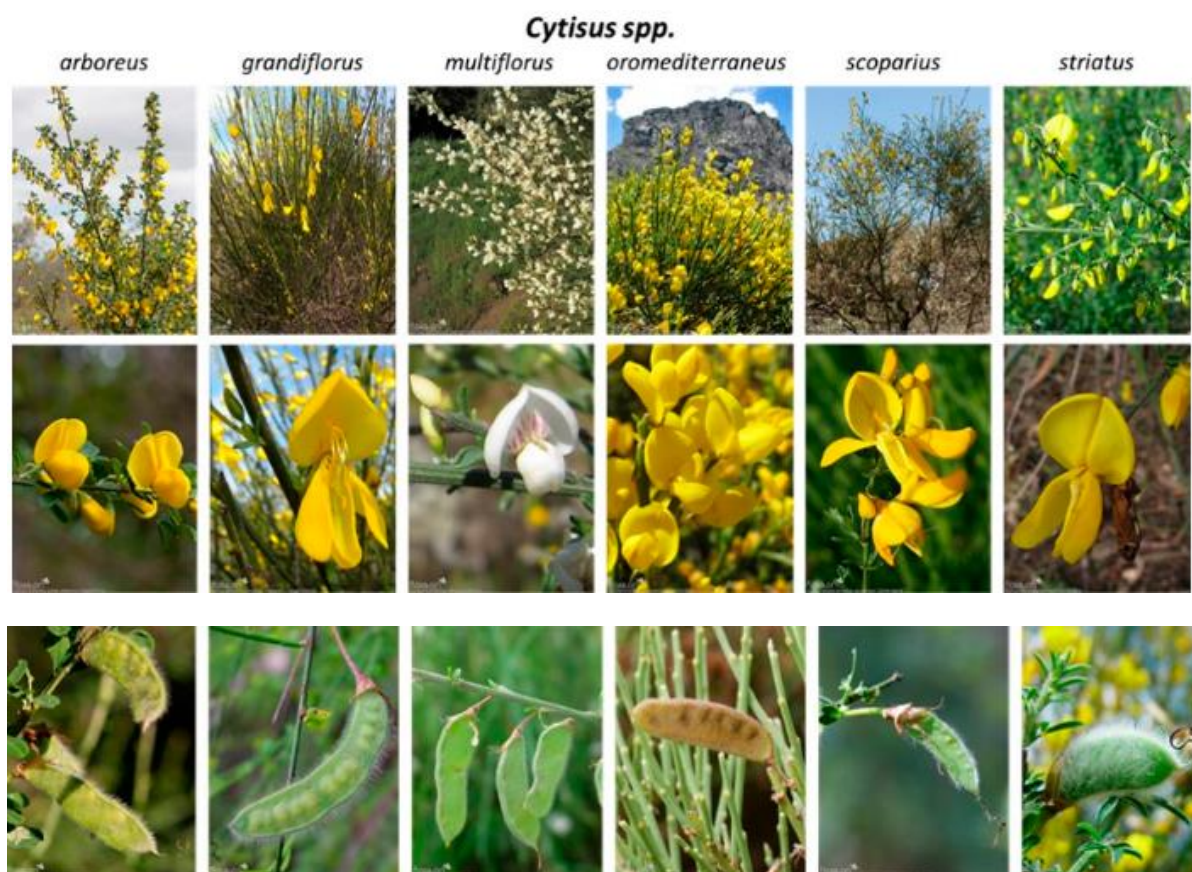


Figure 55 . Description botanique de certaines espèces du genre *Cytisus* (Ferreira-Sousa *et al.*, 2024)

Ces plantes sont distribuées dans le monde entier, prévalant dans les sites ouverts (typiquement les buissons et les landes) du Bassin méditerranéen (Europe et Afrique du Nord) et de l'ouest de l'Asie.

III.2.5. Description botanique de *Cytisus purgans*

Arbrisseau vert sombre, très rameux dès la base, formant un buisson dense plus ou moins hémisphérique, plus ou moins spinescent.

Rameaux jeunes sillonnés-côtelés, pubescents soyeux par des poils simples apprimés, basifixes, atteignant 0,45 mm long., lâchement feuillés, bientôt glabres et aphyllés, rigides, dressés ou étalés-dressés, souvent intriqués.

Feuilles sessiles, non stipulées, toutes unifoliolées, insérées sur un coussinet saillant à 3 côtes, pourvues souvent d'un fascicule foliaire axillaire souvent réduit à des écailles. Foliolles petites, atteignant au plus 8 X 3 mm, linéaires-lancéolées oblancéolées ou obovales-oblongues, atténuées à la base, subsessiles, obtuses ou plus ou moins aiguës, mucronulées au sommet, entières, à marges souvent plus ou moins involutées. Villeuses-soyeuses sur les 2 faces ou glabres sur la face supérieure ; nervation pennée ; nervure médiane un peu saillante en dessous, nervures secondaires très grêles, anastomosées en réseau peu dense, avec des terminaisons libres, visible seulement par transparence.

Fleurs latérales, solitaires ou géminées vers le sommet des rameaux d'un an, à l'aisselle de feuilles plus ou moins réduites. Pédoncules florifères courts (3-5 mm), grêles, pubescents-soyeux, pourvus de 2 bractéales très petites au-dessus du milieu ou au sommet. (Figure.56)

Calice court (3-4 mm), membraneux, blanchâtre ou plus ou moins purpurescent, bilabié, pubescent-soyeux extérieurement, glabre intérieurement ; tube calicinal campanulé, à partie réceptaculaire presque nulle ; lèvres divariquées, subégales, séparées par des sinus très larges et plus ou moins obtus ; labre plus large que long, presque semicirculaire, à 2 dents minuscules, rapprochées, souvent peu visibles ; labiole parfois un peu plus long que le labre, à peu près de même forme, à 3 dents minuscules, rapprochées et parfois peu visibles.

Corolle jaune d'or, 9- 13 mm long, étendard glabre, obovale ou suborbiculaire, 9- 12 X 7,5-9 mm, à limbe multinervié, émarginé au sommet, ± cordé à la base ; ongle court, 1 -2 mm long. Ailes un peu plus longues ou un peu plus courtes que l'étendard, entièrement glabres, oblongues ou oblongues-cultriformes, 3-5 mm larg., à oreillette défléchie ; ongle libre, étroit, 3 mm long.

Carène égalant les ailes ; un peu arquée, non ou ± incurvée au sommet, obtuse, 3,5-4 cm larg, à marges antérieures pubescentes en face de l'oreillette, du reste glabre ; oreillettes non ou ± défléchies ; ongles libres.

Étamines glabres concrescentes en tube fermé long (2/3-3/4 de l'androcée) ; anthères jaunes alternativement linéaires-oblongues, basifixes, c. 1 mm, et oblongues, dorsifixes, 0,6 mm.

Ovaire vert, atténué et substipité à la base, linéaire-lancéolé, comprimé, villosité, 3-6-ovulé, atténué en style aussi ou plus long que lui. Style subulé ± incurvé, glabre ou portant quelques poils à la base, stigmate à peine renflé, un peu oblique extrorse.

Gousse oblongue - linéaire ou largement linéaire, entourée à la base par le calice persistant, non stipitée, J ,2-2,5 X 0,5-0,6 mm, très aplatie, non ou à peine toruleuse, villose (à villosité ± apprimée), brunâtre ou noire à maturité, brièvement acuminée au sommet, coriace, déhiscente, 1 -4-sperme.

Graines brun noir, lisses, ovées ou ovées-suborbiculaires, très comprimées, 2,5-4 x 2,25-3,5 mm (sans l'arille) ; arille jaunâtre, en fer à cheval ou parfois très allongée, bilobée à la base, atteignant 2,75 X 0,75 mm. . (Dobignard & Chatelain, 2010)



Figure 56. *Cytisus purgans*

III.2.6. Répartition géographique du genre *Cytisus*

Le genre *Cytisus* compte environ 60 espèces réparties du nord de l'Afrique (Maroc) à l'Europe du sud, de l'ouest et du centre, atteignant l'Allemagne et la Pologne au nord, et la Russie occidentale, la mer Noire et la Turquie à l'est. La plus grande diversité d'espèces est observée autour de la mer Méditerranée.(Cristofolini et al., 2006)

Cytisus purgans subsp. balansae (Boiss.) Maire est une espèce endémique de la méditerranée on la retrouve exactement en Algérie, Maroc et Espagne. (Figure.57)

En Algérie , *Cytisus purgans subsp. balansae* (Boiss.) Maire, sévit dans les forêts claires et pâturages rocaillieux calcaires et siliceux des moyennes et hautes montagnes bien arrosées et semi-arides, de 1 600 à 3 600 m, - C. Aurès ; Bellezma ; Monts du Hodna - A. Djurdjura :

sommet de Lalla Khadidja - M. Rif : M ont Azrou (E. et M .) ; commun dans le Moyen Atlas et le Grand Atlas ; Siroua et Sargho ; Monts des Aït-Mesrouh (Maire, 1987.)

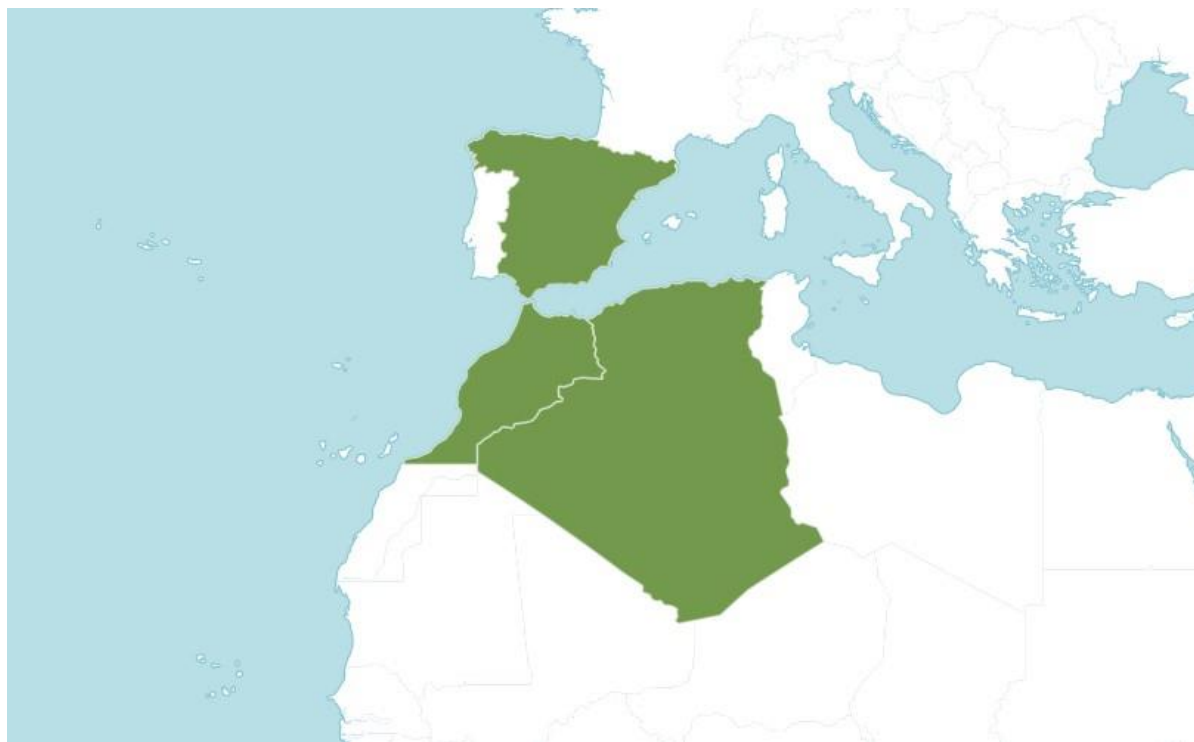


Figure 57. Distribution géographique de *Cytisus balanseae* boiss ball Maire

III.2.7. Propriétés pharmacologiques du genre *Cytisus*

Les Fabaceae sont utilisées pour synthétiser une large gamme de produits naturels y compris des arômes, des poisons, des colorants, et ont aussi une grande importance à des fins médicinales. Traditionnellement, ces plantes fournissent une thérapie sûre et efficace pour le traitement de nombreuses pathologies. (Ahmad *et al.*, 2016)

Le genre *Cytisus* a été mentionné dans la médecine populaire comme diurétique et pour le traitement de l'hypertension légère. De plus, une décoction de feuilles a également été signalée comme efficace pour soulager les problèmes des voies respiratoires.

Plusieurs espèces du genre *Cytisus* ont été utilisées en médecine traditionnelle, principalement pour leurs potentiels antioxydants, cytoprotecteurs, diurétiques, hypnotiques, anxiolytiques, antiparasitaires et antidiabétiques. (Bouziane *et al.*, 2018)

Plusieurs espèces du genre sont utilisées dans la médecine traditionnelle de différents pays. Au Portugal, les espèces *Cytisus multiflorus* (L'Hér.) Sweet, *C. scoparius* (L.) Link et *C. striatus* (Hill) Rothm sont utilisées en médecine populaire pour leurs propriétés biologiques et parfois comme condiment alimentaire. Ces espèces sont connues pour leurs propriétés anti-

inflammatoires. Des infusions, décoctions et toniques préparés à partir de fleurs fraîches ou séchées à l'ombre sont utilisés pour les affections respiratoires, gastro-intestinales et cutanées. Ils sont également appliqués pour contrôler le diabète et le cholestérol (Pinela *et al.*, 2011). Les fleurs de *C. multiflorus* ("Xesta branca") sont utilisées dans la médecine traditionnelle du Portugal comme diurétique, pour traiter les problèmes du système urinaire et contre l'hypertension artérielle. *Cytisus scoparius*, également appelé *Sarothamnus scoparius*, est une plante bien connue en Ayurveda. Cette plante est utilisée comme diurétique, hypnotique et sédatif, anti-diabétique et hépatoprotecteur. Elle est également connue comme un tonique cardiaque stimulant et diurétique et a été signalée comme un remède utile dans la gestion de l'insuffisance cardiaque et de l'œdème cardiaque (Bouziane *et al.*, 2018)

Comme rapporté précédemment, depuis longtemps, les extraits de ces plantes sont utilisés à des fins thérapeutiques en raison de leurs propriétés hypnotiques et sédatives, diurétiques, antidiabétiques, hépatoprotectrices, antioxydantes, anti-inflammatoires, antiparasitaires, lithotritiques, cardiotoniques, hypotensives, cathartiques et émétiques. Les propriétés thérapeutiques des *Cytisus spp.* sont principalement associées à leur haute concentration en composés polyphénoliques, Le schéma de la Figure.58 présente les principales actions thérapeutiques rapportées jusqu'à présent pour les produits dérivés des plantes du genre *Cytisus*.

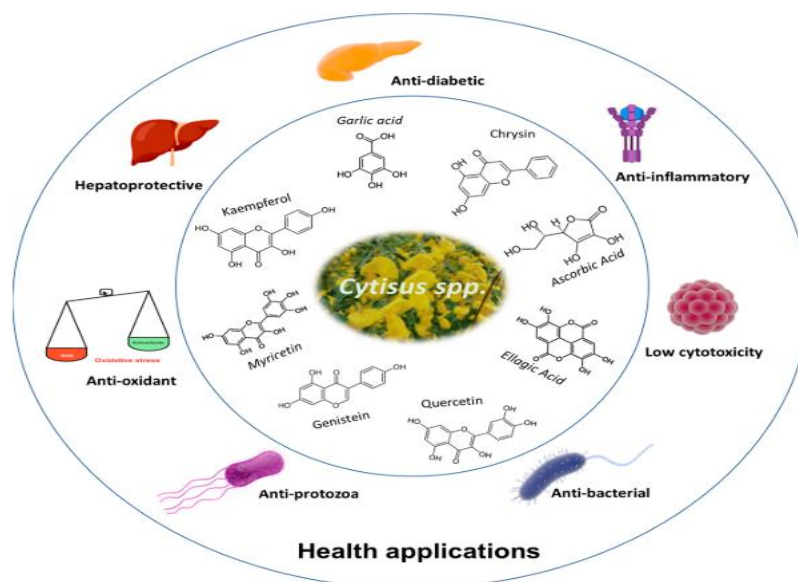


Figure.58 : Importance médicinale des espèces du genre *Cytisus* (Ferreira-Sousa *et al.*, 2024)



**Travaux
Personnel**

Chapitre VI

Matériel et

Méthodes

VI. 1. Objectifs de l'étude

Dans le but d'accroître les chances de découvrir de nouvelles biomolécules naturelles issues des plantes, les chercheurs sont souvent incités à explorer des espèces peu étudiées, voire inédites jusqu'à présent. Cependant, un scientifique avisé peut également faire des découvertes significatives en examinant une plante déjà largement étudiée sous un nouvel angle : en se concentrant sur un organe ou un extrait différent, en utilisant de nouvelles techniques analytiques, en visant des cibles biologiques différentes, etc.

L'objectif de cette étude est d'explorer les phytoconstituants de deux plantes de la flore Algérienne *Cytisus purgans* et *Veronica rosea*, puis d'évaluer leur effet thérapeutique en examinant les différentes activités biologiques de leurs extraits.

VI.2. Matériel végétal

VI.2.1. *Veronica rosea* Desf

Veronica rosea Desf a été récoltée au mois de juin 2020 dans les montagnes de Chelia, à l'est de l'Algérie précisément dans la région de Khenchela. (Fig.59)



Figure 59. *Veronica rosea* Desf

L'identification botanique de l'espèce a été réalisée par le Professeur Bachir Oudjehih de l'Institut des Sciences Vétérinaires et des Sciences Agronomiques de l'Université de Batna1.

Un échantillon de référence a été déposé au niveau du laboratoire sous la référence 155/LPTPCMB.

Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires et à température ambiante, les parties aériennes ont été coupées en petits morceaux, réduites en une poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique et pesées (500g)

VI.2.2. *Cytisus purgans subsp. balansae* (Boiss.) Maire

Cytisus purgans a été récolté au mois de juillet 2020 dans les montagnes des Aurès plus précisément à Ichemoule .

L'espèce *Cytisus purgans subsp. balansae* (Boiss.) Maire a été identifié par Professeur F.Bekdouche de l'Université de Batna2. Des spécimens de référence ont été déposés dans l'herbier du Laboratoire de pharmacognosie du département de pharmacie de Batna, Algérie (Figure.60) sous le numéro de référence : 194/LPTPCMB



Figure 60. *Cytisus balansae* Boiss ball Maire

Le matériel végétal collecté a été séché à l'abri de la lumière directe du soleil, à l'obscurité et à température ambiante puis réduit en poudre fine.

VI.3. Analyses phytochimiques

VI.3.1. Préparation des extraits de plantes

L'extrait hydro-éthanolique a été obtenu par macération de la poudre de plante (500g) dans 5 L d'un mélange éthanol/eau (70:30, V/V) pendant trois jours à température ambiante. Cette étape a été répétée deux fois de plus en remplaçant le solvant.

L'extrait obtenu a été filtré sur du papier filtre Wattman n°3 et le solvant organique a été éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite à 35°C. Le fractionnement de l'extrait brut par la méthode liquide-liquide est effectué en utilisant une série de solvants de polarité croissante. (Figure. 61)

L'extrait aqueux brut a été initialement mélangé l'hexane (V/V) pour éliminer les lipides et les pigments, et après séparation, la phase organique supérieure a été récupérée. Cette étape est répétée plusieurs fois avec renouvellement du solvant jusqu'à ce qu'il devienne transparent.

La phase aqueuse inférieure a été soumise à un autre fractionnement avec de l'acétate d'éthyle pour donner la fraction d'acétate d'éthyle (EAE) et enfin au *n*-butanol pour donner l'extrait au *n*-butanol (BuE).

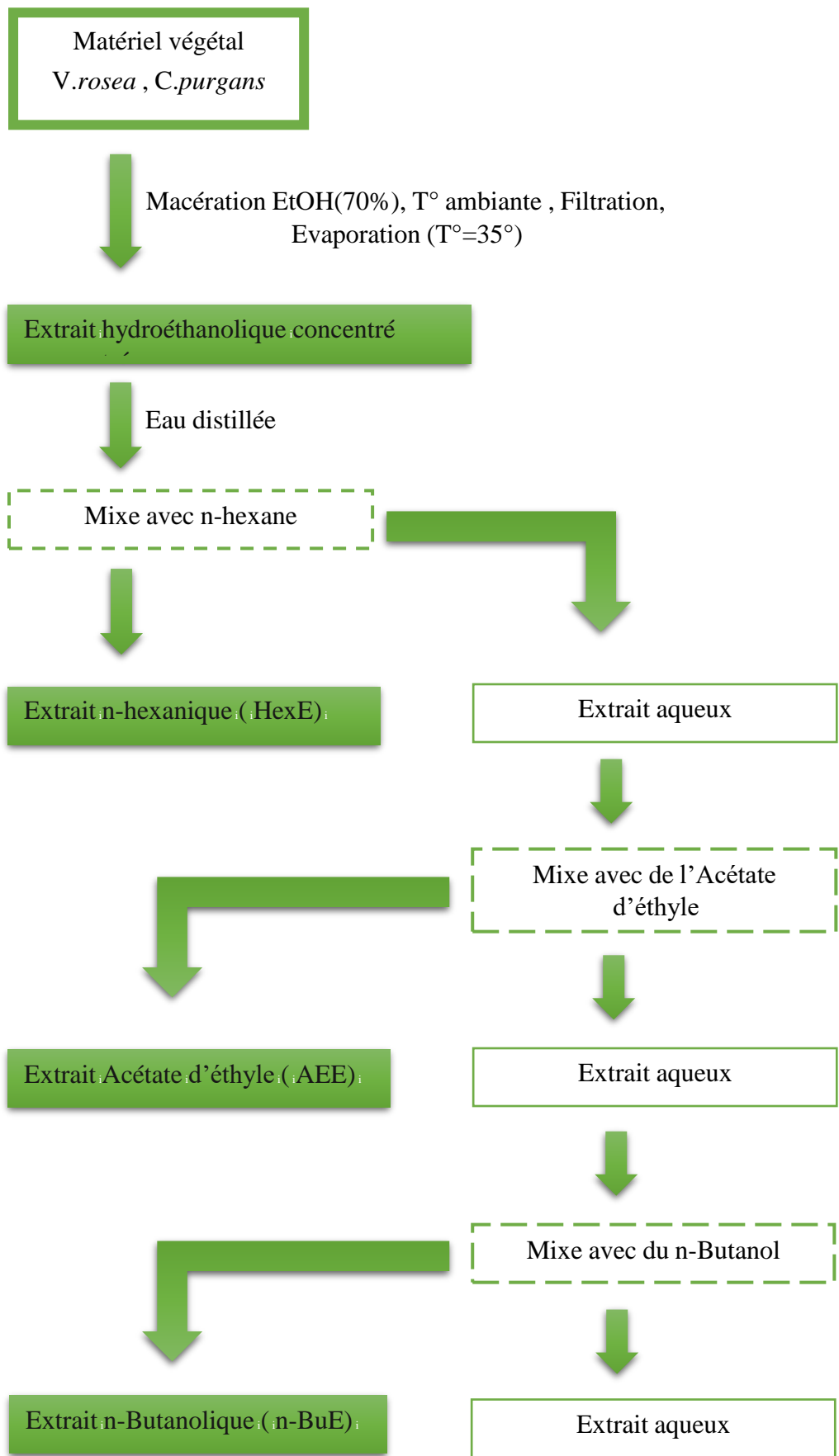


Figure 61. La procédure d'extraction séquentielle pour préparer les fractions

VI.3.2. Calcul du rendement d'extraction

Le rendement en pourcentage (%), est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait et celle de la plante sèche en poudre. Il est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rendement \%} = \frac{\text{poids de l'extrait}}{\text{poids de la poudre}} \times 100$$

VI.3.3. Criblage phytochimique

Le screening phytochimique implique l'analyse qualitative et quantitative des extraits de plantes pour identifier la présence de différentes classes de phytochimiques ou métabolites secondaires. (Traoré *et al.*, 2019)

Les phytocomposés couramment testés comprennent les alcaloïdes, les flavonoïdes, les saponines, les tanins, les glycosides, les terpénoïdes et les composés phénoliques. (Dubale *et al.*, 2023)

Plusieurs méthodes sont utilisées pour le dépistage phytochimique, notamment des tests colorimétriques, des réactions de précipitation et des tests chimiques spécifiques pour les phytochimiques individuels. (Hamid EL-Haoud *et al.*, 2018)

Dans l'ensemble, le dépistage phytochimique est une étape importante dans l'évaluation des extraits de plantes pour leurs composés bioactifs potentiels.

Les essais phytochimiques ont été réalisés selon les techniques classiques (P. K. Singh *et al.*, 2022) Les groupes phytochimiques majeurs qui ont été déterminés sont les suivants : les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tannins, saponines, stéroïdes et les terpènes.

Les différents protocoles sont décrits ci-après :

VI.3.3.1. Test des Alcaloïdes

La méthode de détection des alcaloïdes repose sur leur aptitude à former des précipités ou des complexes insolubles avec des métaux lourds et/ou des métalloïdes (comme Bi, Hg, I2, etc.) présents dans les "réactifs généraux des alcaloïdes" (Mayer, Bouchardât, Dragendorff).

Les réactions de précipitation ne donnent un résultat positif qu'avec les sels d'alcaloïdes dans une phase aqueuse acide.

Dans cette démarche, nous avons effectué une macération sous agitation pendant 2 heures de 2 grammes de poudre végétale (*C. purgans* et *V. rosea*) dans 40 millilitres de solution d'HCl diluée à 1%. Ensuite, ce mélange a été filtré. L'apparition d'une turbidité ou d'un précipité blanc,

orange ou marron après l'ajout des réactifs de Mayer, Bouchardât et Dragendorff, respectivement, indique la présence des alcaloïdes.(Shaikh & Patil.,2020)

VI.3.3.2. Test des Flavonoïdes

Dans un tube à essai, mettre 0,5 g de poudre de plante et 8 ml d'éthanol, puis chauffer au bain de sable pendant 10 minutes. Ensuite, filtrer à chaud sur papier filtre et ajouter au filtrat 1 ml d'acide chlorhydrique (HCl) et une pincée de Mg. Le dégagement de gaz (H₂) et la présence d'une couche surnageant de couleur rouge indiquent la présence des flavonoïdes vrais (Jaradat *et al.*, 2015). Si cette coloration devient :

- rose orangée : présence de flavones.
- rouge violacée : présence de flavanones.
- rouge cerise : présence de flavonols.

VI.3.3.3. Test des Tanins

On peut se servir de ces deux réactifs (Stiasny et FeCl₃) pour mettre en évidence les différents types de tanins présents dans une drogue végétale. Par ailleurs pour l'identification des tanins catéchiques, on peut se servir de la réaction spécifique de Bate-Smith dans laquelle les tanins condensés, traités à chaud par un acide, se dégradent en anthocyanidols pigments colorés en rouge.

a. Oxydation des tanins condensés (Bate-Smith)

Par chauffage en milieu chlorhydrique, les tanins condensés s'oxydent en phlobaphènes colorés en rouge.

-On mélange 0.5g de la poudre avec 5ml de butanol chlorhydrique.

-On porte à ébullition ce mélange.

*Le test est positif si on obtient une coloration rouge

b. Recherche des tanins hydrolysables (Stiasny et FeCl₃)

On peut mettre en évidence les tanins hydrolysables par addition de FeCl₃ à 2% dans le filtrat, après précipitation des tanins condensés à chaud par addition à l'infusé du réactif de Stiasny.

-Dans un erlenmeyer, on met 0.5g de la poudre à laquelle on ajoute 1 ml d'eau distillée., on laisse infuser pendant 30 min, puis on filtre. Au filtrat, on ajoute 2 ml de réactif de Stiasny. On met le mélange à l'évaporation pendant 30 min au bain de sable . On note la présence d'un

précipite, donc la présence des tanins condensés. On filtre, puis au filtrat on ajoute de l'acétate de sodium (tampon) jusqu'à saturation. Ensuite, on met quelques gouttes de FeCl_3 à 2%.

L'obtention d'une coloration bleu-noire indique la présence des tanins hydrolysables.

VI.3.3.4. Test des Saponines

Le test de la mousse consiste à placer 2 grammes de matière végétale dans une fiole contenant 50 millilitres d'eau tiède, à laisser bouillir pendant 5 minutes, puis à filtrer le mélange et à le laisser refroidir.

Dans un tube à essais, on met quelques millilitres du filtrat. La solution est fortement agitée pendant environ 30 secondes et on laisse reposer quelques secondes. La présence de saponines est indiquée par l'apparition d'une mousse qui dure quelques secondes.

VI.3.3.5. Test des Stérols et des terpènes

La détection est basée sur la réaction de Libermann Burchard. C'est une réaction colorée, les réactifs employés donnent des indications positives, avec les composés triterpéniques et avec les composés stéroïdiques sachant que ces derniers sont des composés de biodégradation de triterpènes, donc elle sert à distinguer entre les triterpénoïdes et les stéroïdes.

Le groupement OH en 3 est protégé par addition d'anhydride acétique. Cette réaction est suivie soit d'une isomérisation soit d'une transposition moléculaire, ce qui provoque le changement de coloration

- La réaction se fait sur une macération dans l'hexane : 1 g de poudre avec 10 ml d'hexane avec agitation. Le mélange est ensuite filtré, puis le volume est ajusté à 10 ml, ensuite évaporé à sec dans un bain marie. Le résidu obtenu est repris par un mélange de 0,1 ml d'anhydride acétique et 0.1 ml de chloroforme.

La formation d'un anneau rouge-brunâtre ou violet dans la zone de contact des deux phases et d'une coloration verte ou violette de la couche surnageant indique la présence des stérols et des triterpènes.

VI.3.3.6. Les hétérosides cardiotoniques

La détection est basée sur la réaction de Keller Killiani. En effet, les 2-désoxy-hexoses des cardénolides peuvent être mis en évidence par le test de Keller Killiani. En présence d'acide acétique et d'acide sulfurique (renfermant des traces de sels ferriques), les 2-désoxyriboses sont responsables de la formation d'un anneau brun à l'interface.

-Dans un tube à essai, on introduit 1g de poudre, puis on ajoute 5ml d'acide acétique et 5ml d'acide sulfurique, ensuite, on rajoute au mélange 2 à 3 gouttes de FeCl₃ 2%.

La présence des glycosides cardiotoniques est confirmée par la formation de deux phases, l'une colorée en brun rouge (acide acétique), et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique)

VI.3.3.7. Les coumarines

La mise en évidence des coumarines est basée sur la fluorescence des coumarines sous la lumière ultraviolette à 366 nm .

Une quantité de quelques milligrammes de l'extrait est solubilisée dans 2 ml d'eau chaude. La solution obtenue est divisée en deux parties égales dont :

- La première représente un témoin ; - La deuxième est traitée avec 0.5 ml de NH₄OH à 10%.

L'examen est réalisé sous la lumière ultraviolette et l'apparition d'une fluorescence intense révèle la présence de coumarines (Houta et al., 2012.)

VI.3.4. Séparation chromatographique des fractions et identification structurale des produits purs

Les fractions acétate d'éthyle des deux extraits ont subi des tests préliminaires sur plaque CCM afin de déterminer le bon système de séparation sur colonne.

Le fractionnement des extraits acétate d'éthyle de *Veronica rosea* (11.2g) et de *n*-butanolique de *Cytisus purgans* (11,3g) a été effectué par chromatographie sur colonne ouverte.

VI.3.4.1. Fraction acétate d'éthyle de *Veronica rosea*

La fraction acétate d'éthyle de *V. rosea* a été séparée par chromatographie sur colonne en polyamide et l'élution en mode gradient avec des mélanges toluène-Éthanol (de 1:0 à 0:1).

Des fractions de 100 ml recueillies à chaque fois sont soumises à une chromatographie sur couche mince (C.C.M), visualisées à la lumière UV (254 et 365 nm) et révélées avec une solution de chlorure d'aluminium ou à la vanilline sulfurique et chauffage à 100°C.

Les 7 fractions collectées (P1 à P7) ont ensuite été purifiées sur colonne de gel de silice, colonne à phase inverse la RP-18 et enfin sur colonne de gel de polyamide.

Le suivi de ce fractionnement par chromatographie sur couche mince, a permis de rassembler les fractions présentant des similitudes, ce qui aboutit à l'obtention de fractions majoritaires . Plusieurs étapes de séparation et purification par une combinaison de chromatographie sur

colonne de gel de silice ainsi les plaques préparatives (CCE) ont conduit à l'isolement de 08 huit composés (1-8), dont les structures ont été soigneusement identifiées à l'aide d'une combinaison de techniques spectrales notamment la spectrométrie de masse et la RMN .

VI.3.4.2. Fraction *n*-butanolique de *Cytisus purgans*

La fraction *n*-butanolique de *C.purgans* a été dissoute dans le méthanol et mélangée avec du gel de silice et évaporée à sec, en donnant une poudre solide qui est déposée sur une colonne de gel de silice préparée dans l'hexane .

L'élution effectuée en mode de gradient en utilisant un mélange de solvants Hexane – Acétate d'éthyle 100/00 à 00/100 puis Acétate d'éthyle/Méthanol 100/00 à 100/00

Les CCM des fractions collectées sont visualisées sous la lumière UV et révélées à l'acide sulfurique et chauffage.

Les huit fractions majoritaires obtenues ont été retraitées avec différentes techniques chromatographiques de purifications ce qui nous a permis l'isolement de 7 composés purs.

L'identification structurale des composés isolés est basée sur les données d'analyse spectroscopiques . Les spectres de résonance magnétique nucléaire monodimensionnelle et bidimensionnelle (RMN ¹H, RMN ¹³C, COSY, HSQC et HMBC) ont été enregistrés sur un appareil de type BRUKER Avance de l'Institut de Chimie de l'Université de Strasbourg. Les spectres RMN ¹H ont été obtenus à 500 et 300 MHz, tandis que les spectres RMN ¹³C ont été enregistrés à 125 et 75 MHz. Les échantillons ont été solubilisés dans des solvants deutérés tels que le CDCl₃, le CD₃OD et le DMSO-d₆.

VI.3.5. Dosage des polyphénols totaux

Les teneurs phénoliques totaux (PPT) ont été déterminées selon la méthode de Mousavi *et al.*, (2019) en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu avec des modifications mineures. (Mousavi *et al.*, 2019)

La technique des réactifs de Folin-Ciocalteu, initialement décrite en 1965 par Singleton et Rossi, et est largement utilisée pour quantifier les polyphénols dans les extraits d'origine végétale, ainsi que dans les aliments et les boissons.

La pharmacopée inclut le test Folin–Ciocalteu , et l'Europe l'a adopté comme une procédure officielle de mesure de la teneur totale en phénols dans les vins (Communauté européenne 1990).(Munteanu & Apetrei, 2021)

En effet , ce réactif est un acide jaune constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) , qui une fois réduit par les polyphénols forme un complexe molybdène (Mo_8O_{23}) -tungstène (W_8O_{23}) bleu fixe .(Georgé *et al.*, 2005)

Brièvement, Un volume de 200 μ L de chaque extrait (dilué au 1/50) est introduit dans un tube à essai, 1 mL de réactif Folin-Ciocalteu (dilué au 1/10) y est additionné. Après incubation à température ambiante de 5 min, 800 μ L de solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3 7.5 %) sont ajoutés. La solution finale est bien mélangée et gardée à l'obscurité pendant 30 min dans un bain marie. L'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le composé de référence utilisé dans cette méthode est l'acide gallique

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme standard à différentes concentrations (0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 et 20 μ g/mL d'acide gallique)

La concentration des polyphénols totaux est exprimée en milligramme d'équivalent acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g MS) en valeur moyenne \pm écart-type (n = 3).

Ces tests, basés sur le phénomène d'oxydo-réduction, ne présentent pas de spécificité à l'égard d'une classe particulière de polyphénols et sont sujets à des interférences avec des composés tels que les acides aminés de type tyrosine et d'autres substances non phénoliques, comme l'acide ascorbique. (Georgé *et al.*, 2005)

VI.6. Dosage des flavonoïdes

L'une des méthodes phares largement utilisées pour la détermination du taux des flavonoïdes dans les extraits de plantes est le dosage colorimétrique au chlorure d'aluminium, où Al(III) est utilisé comme agent complexant.(Shraim *et al.*, 2021). Le réactif est une solution incolore de nitrite de sodium ($NaNO_2$, 5%) et de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$, 10%). La réaction d'oxydation des flavonoïdes possédant un groupe hydroxyle libre conduit à la formation de complexes jaunâtre par chélation de l'ion Al^{+3} absorbant à 415 nm.

Dans un flacon, 250 μ L de l'extrait (dilué au 1/50) sont mélangés avec 1 mL d'eau distillée, on introduit ensuite 75 μ L d'une solution de $NaNO_2$ (5%). Après 5 minutes on ajoute 75 μ L de $AlCl_3$ (10 %) suivi de l'addition après 6 minutes de 500 μ L de NaOH (1N) et 600 μ L d'eau distillée et le mélange est agité immédiatement.

L'absorbance est mesurée à 415 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la quercétine comme standard à différentes concentrations (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 101, 110 et 120 µg/mL de quercétine)

La concentration des flavonoïdes totaux est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS) et calculée comme une valeur moyenne \pm écart-type (n = 3)

VI.3.7. Dosage des tanins

VI.3.7.1. Les tanins condensés

La teneur en proanthocyanidine est déterminée par la méthode de Scalbert (Scalbert1989, in.d.).

Un volume de 200 µL des extraits (dilué au 1/10) est ajouté à 2 ml d'une solution ferreuse acide (77 mg de FeSO₄.7H₂O dissoute dans 500 mL de HCl / BuOH (2/3)). La solution est incubée pendant 15 min dans un bain marie.

L'absorbance est mesurée à 530 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

La concentration est exprimée en milligramme de cyanidine équivalent (CyaE) par gramme d'extrait sec (mg CyaE / g MS) . La teneur en tanins condensés a été calculée en utilisant la formule donnée ci-dessous :

$$\text{mg CyaE/gMS} = \frac{\text{Abs} \times V \times D \times M \times V2}{l \times \epsilon \times v \times m}$$

Abs est l'absorbance de l'échantillon à 530 nm;

V est le volume de réaction total (ml);

D est le facteur de dilution;

M est la masse molaire de cyanidine (g mol⁻¹);

V2 est le volume de l'extrait avant dilution (ml);

L est la longueur du trajet (cm⁻¹);

ε est le coefficient d'extinction molaire (34.700 L mol⁻¹cm⁻¹)

v est le volume de l'extrait dilué 10 fois

m est la masse en poids sec de la matière sèche (g) (Naima *et al.*, 2015)

VI.3.7.2. Les tanins hydrolysables

La teneur en tanins hydrolysables est déterminée par la méthode de Bossu *et al.* (2006) (Bossu *et al.*, 2006)

Un volume de 500 µL des extraits (dilués au 1/50) est ajouté à 2,5 mL d'une solution de KIO₃ (2.5%) et laissé réagir pendant 2 min à 30°C dans un bain marie.

L'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide tannique comme standard à différentes concentrations (0, 100, 200, 400, 600, 800, et 100 µg/mL d'acide tannique)

La concentration des tannins hydrolysables est exprimée en milligramme d'équivalent acide tannique par gramme de matière sèche (mg EAT/g MS)

VI.3.8. Dosage des anthocyanes

Les pigments anthocyaniques subissent des transformations structurelles réversibles lors d'un changement de pH qui se manifestent par des spectres d'absorbance remarquablement différents. La forme oxonium colorée (orange à violet) prédomine à pH 1,0 et la forme hémikétal incolore à pH 4,5 . La méthode de différence de pH est basée sur cette réaction et permet une mesure précise et rapide des anthocyanines totales, même en présence de pigments dégradés et d'autres composés interférents.

La quantification des anthocyanes totaux a été évaluée par la méthode du différentiel de pH (Giusti & Wrolstad, 2001)

Pour le dosage de nos extraits, deux solutions sont préparées, l'une à pH = 1 à l'aide d'un tampon de chlorure de potassium (0,03 M) et la seconde à un pH = 4,5 à l'aide d'un tampon d'acétate de sodium (0,4 M).

Un volume de 2 mL de chaque solution tampon est mélangé avec 1mL de chaque extrait (dilue au 1/50). Les solutions sont ensuite incubées pendant 15 min à l'obscurité puis l'absorbance est mesurée à deux longueurs d'ondes 510 nm et 700 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre. L'absorbance est calculée par la formule ci-dessous :

$$\mathbf{Abs} = (\mathbf{Abs}_{\lambda 520} - \mathbf{Abs}_{\lambda 700})_{\text{pH}=1} - (\mathbf{Abs}_{\lambda 520} - \mathbf{Abs}_{\lambda 700})_{\text{pH}=4.5}$$

La concentration des anthocyanes exprimée en mg/L est calculée selon la formule suivante.

$$mg/l = \frac{Abs \times PM \times FD \times 1000}{\epsilon \times d}$$

Avec :

Abs est l'absorbance ;

PM est le poids moléculaire (g/mol) = 449,2 g/mol pour le cyanidin 3 glucoside ;

FD est le facteur de dilution (FD=10) ;

E est le coefficient d'extinction pour le cyanidin 3-glucoside ($E = 26900 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) et

d est l'épaisseur de la cuve (**d** =1cm).

VI.4. Activités biologiques des extraits des plantes étudiées

VI.4.1. Potentiel antioxydant

Les méthodes et instruments utilisés pour mesurer l'activité des antioxydants ont connu des progrès remarquables au cours des dernières décennies(Munteanu & Apetrei, 2021)

Pour évaluer l'activité antioxydante in vitro des deux extraits, nous avons sélectionné trois méthodes qui ont l'avantage d'être simples et rapides.

VI.4.1.1. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par(Bougandoura & Bendimerad, 2013) La méthode de la réduction du fer est basée sur la réduction directe de fer ferrique de la forme ferrique $\text{Fe}^{3+}(\text{CN}^-)_6$ de couleur jaune en une forme ferreuse $\text{Fe}^{2+}(\text{CN}^-)_6$, par les antioxydants, qui est déterminée par la détection spectrophotométrique du complexe $(\text{Fe}^{3+})_4[\text{Fe}^{2+}(\text{CN}^-)_6]_3$ de couleur bleu (bleu de Prusse) présentant une forte absorption à 700 nm (Figure.62)

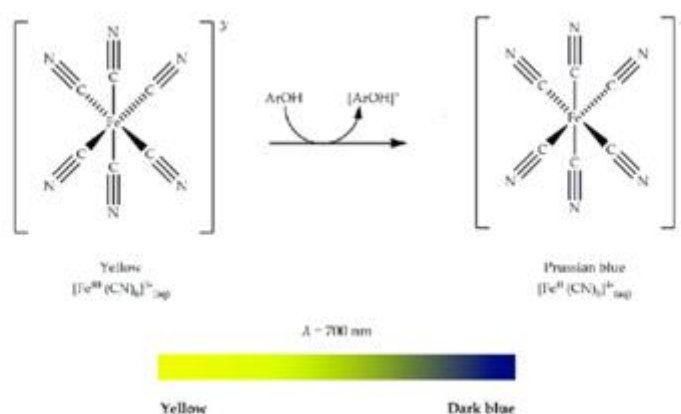


Figure 62. Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe ferricyanide Fe(III) et un antioxydant (Sadeer *et al.*,2020)

En pratique, un millilitre de des solutions méthanoliques des extraits étudiés à différentes concentrations est mélangé avec 0,5mL d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 0,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min et ensuite laissé refroidir, 0.5ml d'acide trichloracétique à

10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 min. Un aliquote (0,5mL) de surnageant est combinée avec 0,5ml d'eau distillée et 0,1mL d'une solution aqueuse de FeCl₃ (Chlorure ferrique) à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (spectrophotomètre UV-VIS). (Vijayalakshmi & Ruckmani, 2016)

Le contrôle positif est représenté par un standard d'un antioxydant; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à l'augmentation de l'activité antioxydante .

Le pouvoir réducteur de fer est exprimé par IC₅₀ qui correspond à la concentration de l'échantillon donnant une absorbance de 0.5.

VI.4.1.2. Activité de piégeage des radicaux DPPH

Le pouvoir antioxydant des extraits des deux plantes a été testé par la méthode qui utilise le DPPH (1,1-diphénylpicrylhydrazyl) comme un radical libre relativement stable.

Cette méthode est basée sur la dégradation des radicaux DPPH•. Le DPPH de couleur violette se réduit en un composé jaune, le diphénylpicrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité réductrice des antioxydants présents dans le milieu.(Munteanu & Apetrei, 2021)

Cela permet d'évaluer le taux de réduction de DPPH• et fournit donc un moyen pratique de mesurer le pouvoir antioxydant des extraits étudiés.

Dans notre expérimentation, nous avons utilisé le protocole expérimental développé par (Mousavi *et al.*, 2019) avec des modifications mineures. Une solution de 0.1 mM de DPPH a été préparée dans du méthanol et gardé à l'abri de la lumière.

La réaction est réalisée dans un volume total de 2.5 ml contenant 2 ml de DPPH à 0,1 mM solubilisé dans le méthanol. Les échantillons des extraits ont été préparés par dissolution dans le méthanol absolu, ces solutions dites solutions mères subiront ensuite des dilutions pour obtenir les concentrations finales.

L'acide ascorbique est utilisé comme un antioxydant de référence, une solution mère de 0.05mg/ml est préparés, cette solution subira des dilutions pour obtenir des concentrations finales de 1 à 10 µg/mL.(Huang *et al.*, 2016)

Les échantillons sont ensuite laissés à l'obscurité pendant 60 minutes, et la décoloration par rapport au témoin négatif contenant uniquement la solution du DPPH est mesurée à 515 nm. L'activité antioxydante est estimée selon l'équation suivante :

$$AA \% = \frac{ABS_{\text{contrôle}} - ABS_{\text{test}}}{ABS_{\text{contrôle}}} \times 100$$

Tel que :

AA : activité antioxydante, Abs : absorbance à 515 nm.

La concentration inhibitrice de 50 % de l'activité DPPH• (IC₅₀) de chaque extrait a ensuite été calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur. Elle a été exprimée en µg/mL et comparée à celle de l'acide ascorbique.

Cette méthode est basée sur la dégradation des radicaux DPPH•. L'antioxydant réagira avec le DPPH•, lui transférant ainsi des électrons singulets. La solution de radical DPPH pourpre sera réduite en DPPH jaune-vert (Figure.63). En mesurant la diminution du violet en fonction du temps, il sera possible de déterminer l'IC₅₀, qui correspond au temps après la disparition de 50% de la couleur, c'est-à-dire que la moitié de l'antioxydant réagit avec (DPPH•) (Rahal, 2018)

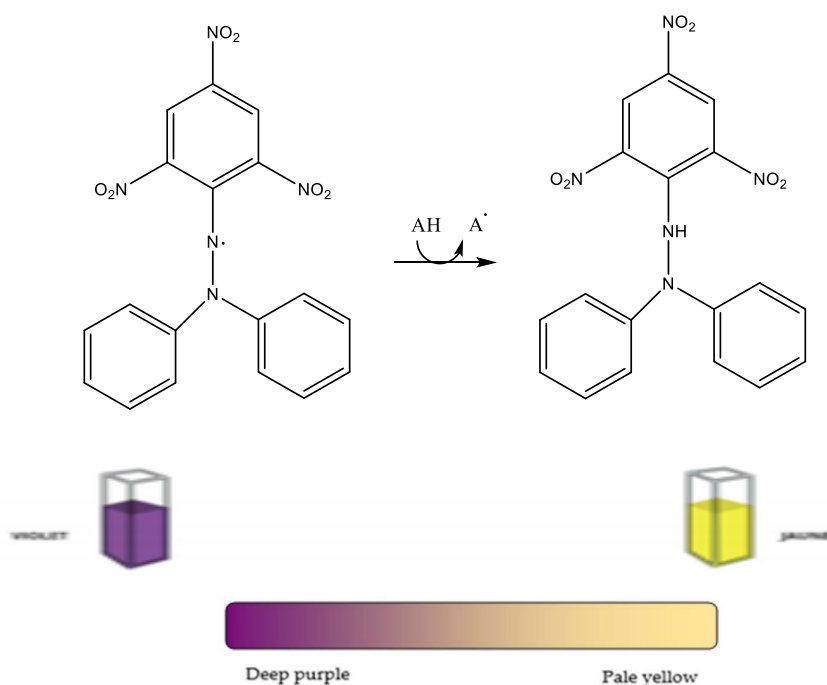


Figure 63. Mécanismes de capture du DPPH par un antioxydant.(Munteanu & Apetrei, 2021; Sadeer *et al.*, 2020)

VI.4.1.3. La capacité antioxydante totale (CAT)

Elle est évaluée par la méthode de phosphomolybdène. Cette technique est basée sur la réduction des ions molybdène Mo (VI) présents sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo (V) MoO^{2+} en présence de l'extrait ou d'un agent antioxydant (V). Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/ Mo (V) à un pH acide (Fig.64) qui absorbe la lumière à une longueur d'onde de 695 nm. (Prieto *et al.*, 1999)

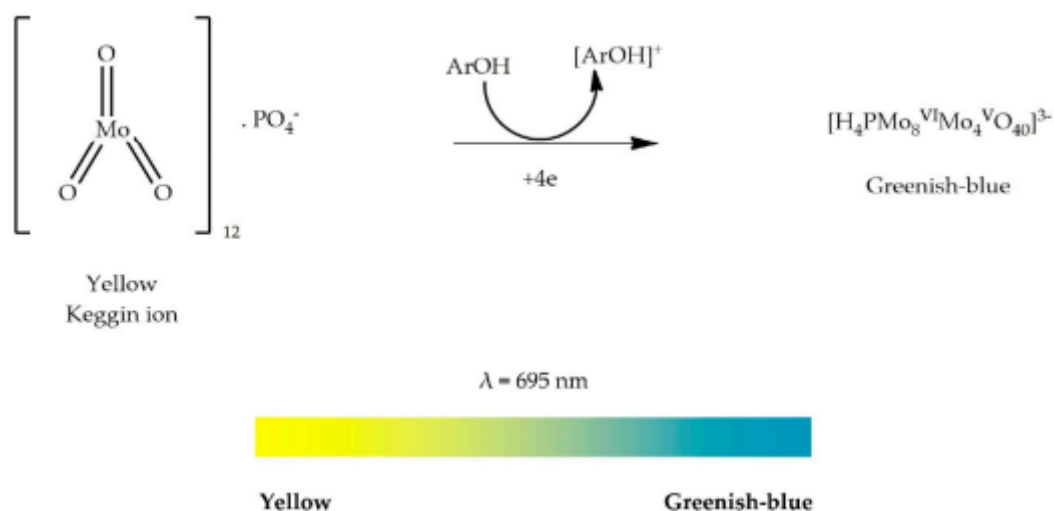


Figure 64. Mécanisme de réaction du phosphomolybdène(Sadeer *et al.*, 2020)

A la différence des autres tests, ce test permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des polyphénols mais aussi d'autres composés antioxydants tel que les vitamines (C, E...).

En pratique, On a mélangé 0,3 ml de chaque extrait avec 3 ml d'une solution réactive (0,6 M d'acide sulfurique, 28 mM de phosphate de sodium, et 4 mM de molybdate d'ammonium). Les tubes contenant la solution réactive ont été incubés à 95 °C pendant 90 minutes. Ensuite, l'absorbance de la solution a été mesurée à 695 nm à l'aide d'un spectrophotomètre par rapport au blanc. La capacité antioxydante totale a été exprimée en milligrammes d'équivalent d'acide ascorbique par gramme d'extrait.(Cheurfa & Allem, 2016). Le blanc est constitué de de méthanol mélangé avec les réactifs mentionnés ci-dessus. Les échantillons et le blanc sont incubés dans les mêmes conditions.

VI.4.2. Activité photoprotectrice

Le facteur de protection solaire (FPS) de l'EAE de *V. rosea* a été évalué selon le protocole largement utilisé rapide et accessible décrit par Mansur *et al.* (1986). (Terto *et al.*, 2020)

En effet, L'activité photoprotectrice a été mesurée à l'aide d'une technique spectrophotométrique en scannant l'absorbance de différentes dilutions de l'extrait (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 et 1 mg/ml) à des longueurs d'onde allant de 290 à 320 nm, avec des intervalles de 5 nm. En utilisant le méthanol comme blanc de référence Trois répliques ont été analysées à chaque longueur d'onde en utilisant une cuvette en quartz d'une longueur de trajet de 1 cm et du méthanol comme blanc pour déterminer la longueur d'onde d'absorption maximale (max).

Le FPS *in vitro* a été déterminé pour chaque concentration en utilisant l'équation mathématique développée par Mansur *et al* :

$$SPF = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

Avec :

EE (λ) : est le spectre d'effet érythémal (erythemal effect spectrum) ;

I (λ) : est le spectre d'intensité solaire (solar intensity spectrum) ;

Abs (λ) : est l'absorbance des échantillons (absorbance of sunscreen product) ;

CF : est le facteur de correction (correction factor : 10).

Les valeurs de **EE (λ) × I (λ)** sont des constantes (Tab.1) , et elles ont été déterminées par (Sayre *et al.*, 1979).

Tableau 1. Les valeurs de $EE(\lambda) \times I(\lambda)$ utilisées dans le calcul de la SPF (Mansur et al., 1986).

Longueur d'onde λ (nm)	EE (λ)x I(λ)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0837
320	0,0180
Total	1

VI.4.3. Test de stabilisation des membranes de globules rouges

Le test de stabilisation des membranes des globules rouges est une méthode couramment utilisée pour évaluer l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits de plantes. Cette méthode

implique l'utilisation de globules rouges qui sont soumis à des conditions de stress, telles que la chaleur ou l'hypotonie, qui peuvent endommager les membranes cellulaires. Les extraits de plantes sont ensuite ajoutés aux globules rouges pour évaluer leur capacité à protéger et stabiliser les membranes cellulaires contre les dommages.

Les résultats de ces tests peuvent fournir des informations sur le potentiel des extraits de plantes en tant qu'agents anti-inflammatoires, ce qui est pertinent dans le domaine de la recherche en médecine et en santé. (Ranasinghe *et al.*, 2012)

En effet, la membrane globulaire est analogue à la membrane lysosomale et peut être utilisée pour l'évaluation du pouvoir stabilisateur de membrane par des extraits des plantes. Plusieurs études ont évalué l'activité anti-inflammatoire *in vitro* d'extraits de plantes en utilisant des méthodes telles que la mesure de la libération d'hémoglobine, la dénaturation protéique et la stabilisation membranaire des globules rouges. Ces études ont montré que certains extraits de plantes possèdent une activité anti-inflammatoire *in vitro*, ce qui en fait des candidats prometteurs pour le développement de traitements anti-inflammatoires de stabilisation des membranes des globules rouges (Akinyemi *et al.*, 2021)

VI.4.3.1. Préparation de la suspension érythrocytaire

Un échantillon de sang total (5 mL) a été prélevé chez des volontaires sains n'ayant pas pris d'anti-inflammatoires depuis 2 semaines par ponction veineuse à l'aide d'une seringue et immédiatement transféré dans un tube EDTA. L'échantillon de sang a été centrifugé pendant 10 minutes à 3000 tours par minute (rpm) et le surnageant a été soigneusement éliminé tandis que culot globulaire était lavé dans une solution d'isosaline stérile (0,9 % de NaCl m/v) fraîchement préparée et centrifugé à plusieurs reprises jusqu'à ce que le surnageant devienne clair et incolore. Le composant cellulaire a été reconstitué en une suspension à 40 % (v/v) avec du tampon phosphate salin (10 mM, pH 7,4) et a été utilisé dans les tests. (Md. K. M. Akanda & Hasan, 2021)

VI.4.3.2. L'hémolyse induite par l'hypotonie

Le mélange d'essai contenait 1 mL de tampon de phosphate de sodium (pH 7,4, 0,15 mol/L), 2 mL de solution d'hyosaline (0,36% p/v de NaCl), 0,5 mL de suspension de globules rouges (10%, v/v) avec 0,5 mL de l'extrait ou de diclofénac sodique à des concentrations variables dans des tubes à essai. Notons que Le tampon de phosphate a été utilisé pour préparer une série de dilutions de chaque extrait de plante ainsi que celles du diclofénac de sodium. Pour le témoin négatif, de l'eau distillée a remplacé la solution d'hyosaline pour induire une hémolyse à

100%. Les différents tubes à essai ont été incubés à 56 °C dans un bain-marie pendant 30 minutes, puis centrifugés à 5000 tours par minute. La teneur en hémoglobine de chaque tube a été estimée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (Schimadzu Double Beam UV-2600, Japon) à 560 nm. (Parvin *et al.*, 2015, Anyasor *et al.*, 2019).

Le pourcentage de stabilisation est calculé selon l'équation :

$$\text{Stabilisation \%} = 100 - \left[\frac{\text{densité optique du tube avec extrait}}{\text{densité optique du tube témoin}} \times 100 \right]$$

VI.4.3.3. Test d'hémolyse induite par la chaleur

Dans le présent essai , 1 mL de tampon phosphate contenant des dilutions de l'extrait allant de 50 à 400 µg/ml a été combiné avec 1 mL de suspension globulaire , et le mélange obtenu a ensuite été incubé pendant 20 min à 54 °C dans un bain-marie agité. Le mélange a été centrifugé (2500 rpm pendant 3 min) après l'incubation, et l'absorbance du surnageant a été mesurée à 540 nm .

L'expérience a été réalisée avec une solution isosaline comme contrôle , et une solution de diclofénac sodique a été utilisée comme témoin positif. (Rehman et al., 2021)

Le pourcentage d'hémolyse de la membrane des globules rouges humains a été calculé selon l'équation :

$$\text{Inhibition \%} = \frac{\text{Absorbance du test}}{\text{absorbance controle}} \times 100$$

VI.4.4. Activité hémostatique :

L'analyse *in vitro* de l'activité hémostatique par la mesure du temps de recalcification du plasma (PRT) est une méthode couramment utilisée pour évaluer l'effet des extraits de plantes sur la coagulation sanguine.

Cette méthode implique la mesure du temps nécessaire pour que le plasma coagule en présence d'extraits de plantes. Plusieurs études ont utilisé cette méthode pour évaluer l'activité hémostatique des extraits de plantes, démontrant ainsi son importance dans la recherche sur les traitements hémostatiques naturels. Cette méthode est donc un outil précieux pour évaluer le potentiel des extraits de plantes dans le traitement des troubles de la coagulation sanguine

Le sang a été prélevé chez des adultes sains dans des tubes contenant du citrate de sodium. La capacité de l'extrait de *V. rosea* et *C.purgans* à induire l'hémostase a été évaluée en mesurant le temps de recalcification du plasma sanguin.

Afin de déterminer le temps de recalcification du plasma sanguin, une première étape consiste en la préparation du plasma appauvri en plaquettes nécessaire pour l'étude. En effet, Après centrifugation de l'échantillon de sang à 3000 tours par minute pendant 20 minutes, le surnageant constitué de plasma a été prélevé à l'aide d'une pipette pour obtenir du plasma appauvri en plaquettes (PPP). Ensuite, 200 µl de PPP ont été mélangés avec 200 µL d'extrait à différentes doses (1, 2, 4, 6 et 8 mg/mL) et incubés pendant 1 minute à 37 °C. Le processus de recalcification a été initié en ajoutant 200 µL d'une solution aqueuse de CaCl₂ (0,025 M). Les tests ont été réalisés en triplicata. Chaque tube a été légèrement incliné à 45 ° afin de déceler la présence éventuelle du coagulat qui est représenté par une masse visqueuse semi-solide et le chronomètre a été arrêté dès qu'un caillot a été observé. Un autre tube ne contenant que du plasma et CaCl₂ a été considéré comme témoin. (Wang et al., 2011)

VI.4.5. Activité inhibitrice des cholinestérases

Une grande variété de méthodes a été développée au cours des dernières décennies pour la quantification de l'activité inhibitrice de l'AChE

L'activité de l'AChE est déterminée suivant la méthode colorimétrique d'Ellman *et al.*, (1961) (Ellman et al., 1961), une méthode courante pour la détermination de l'inhibition de la cholinestérase *in vitro* 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 mesurée à l'aide du spectrophotomètre est proportionnelle à l'activité enzymatique de l'Acétylcholinestérase.

Le test d'Ellman est largement utilisé pour quantifier les groupes sulfhydryles dans les peptides et les protéines, et il est utile dans la recherche en biologie moléculaire et en biochimie pour évaluer la présence de thiols libres dans les échantillons. Le test d'Ellman est également utilisé pour évaluer l'activité de la cholinestérase, en particulier pour le dépistage de nouveaux composés visant à traiter les maladies neurodégénératives.(Patel, 2023)

Principe du test d'Ellman

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme spécifique des tissus nerveux et des jonctions neuromusculaires. Elle hydrolyse rapidement l'acétylcholine (neurotransmetteur) en choline inerte et en acétate. (Figure.65)

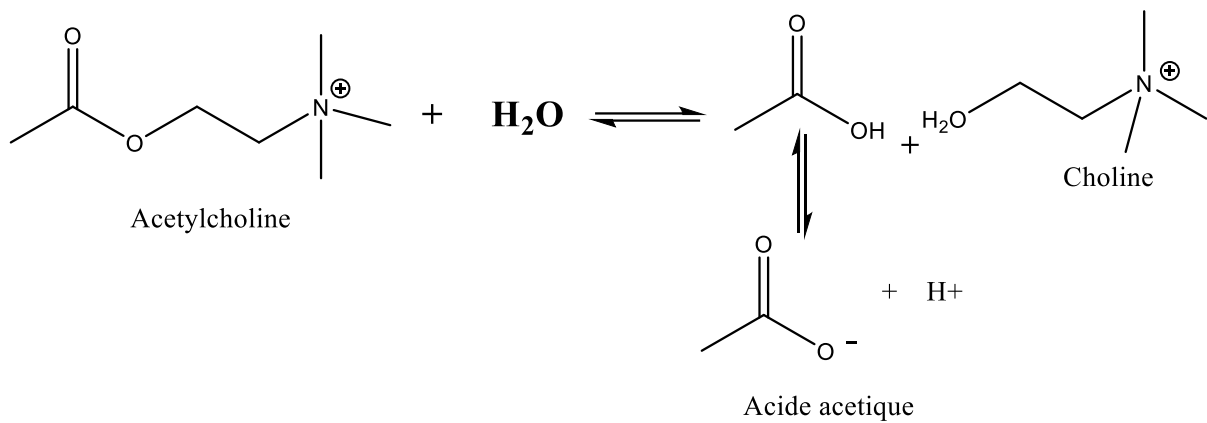


Figure 65. Schéma d'hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinesterase

Ce test implique l'utilisation du réactif DTNB (5,5'-dithio-bis-(2-acide nitrobenzoïque)), qui réagit avec les groupes sulfhydryles pour produire un produit coloré, permettant une mesure spectrophotométrique. Le processus implique la préparation d'un réactif de travail DTNB, l'ajout d'échantillons ou de produit de référence, et la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde spécifique, généralement 412 nm.

Expérimentalement on utilise l'iodure d'acétylcholine (IATC) comme substrat de cet enzyme dont le produit de la réaction est la Thiocholine .

Le test d'Ellman évalue l'inhibition d'un produit sur l'AChE. C'est un protocole standard qui permet de déterminer les thiols libres. Le test d'Ellman repose sur le clivage de l'acétylthiocholine par l'AChE / butyrylcholinesterase pour produire du thiocholine, qui réagit avec le 5,5'-dithiobisnitrobenzoate (DTNB) pour former un anion jaune. Cette réaction est illustrée dans la figure.66.

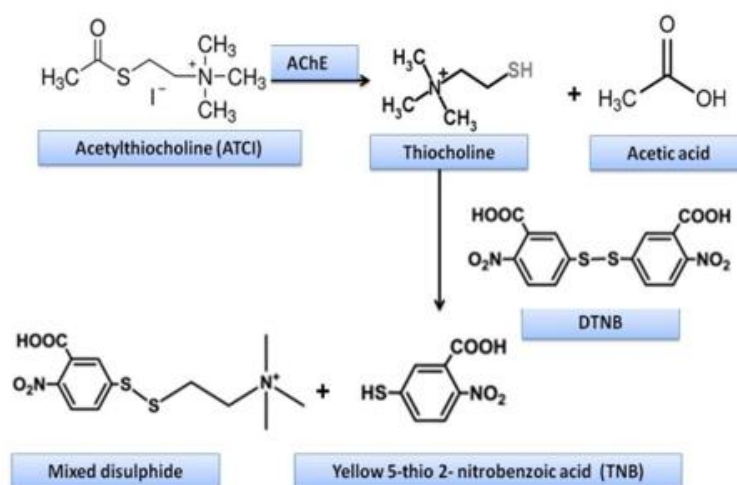


Figure 66. Mécanisme de la réaction d'Ellman (Ali-Shtayeh *et al.*,2014)

En présence d'inhibiteurs enzymatiques, la réaction permet d'étudier les paramètres cinétiques puis de quantifier l'inhibition exprimée par sa IC_{50} (la concentration réduit de moitié l'activité enzymatique) (Ellman *et al.*, 1961).

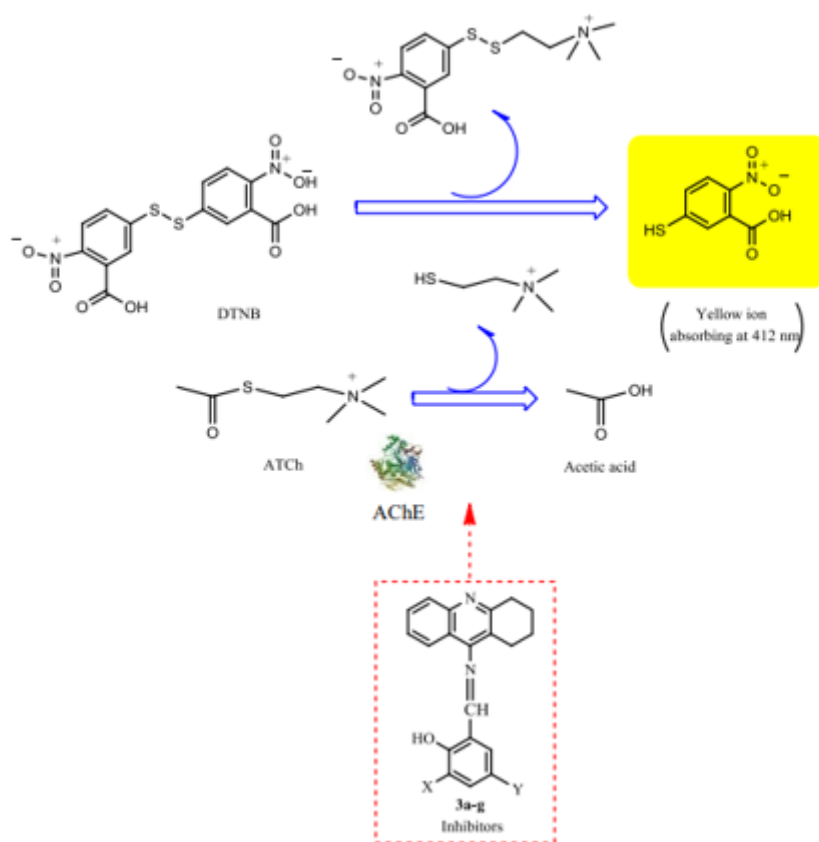


Figure 67. Activité de l'AChE par la méthode d'Ellman (Koyuncu *et al.*, 2019)

En pratique, 150 μ l de tampon phosphate de sodium (100 mM, pH 8,0), 10 μ l d'une solution d'échantillon dissoute dans de l'éthanol à diverses concentrations, et un volume de 20 μ l d'AChE ($5,32 \times 10^{-3}$ U) ou de BChE ($6,85 \times 10^{-3}$ U) ont été mélangés et incubés pendant 15 minutes à 25°C. Ensuite, 10 μ l de DTNB (0,5 mM) ont été ajoutés. La réaction a été initiée par l'addition de 20 μ l d'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM) ou de chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM). Les hydrolyses de ces substrats ont été suivies par spectrophotométrie en mesurant la formation d'un anion jaune de 5-thio-2-nitrobenzoate de méthyle, résultant de la réaction de DTNB avec la thiocholine, libérée par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine ou du chlorure de butyrylthiocholine, respectivement, à une longueur d'onde de 412 nm, à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits (Figure.67) .

L'absorbance du TNB est proportionnelle à l'activité enzymatique de l'Acétylcholinestérase ou la butyrylcholinestérase

Le contrôle négatif est préparé de la même manière avec du méthanol au lieu de l'extrait de la plante. Quant à la galantamine hydrobromide de l'espèce *Lycoris sp.* est utilisée comme un contrôle positif.

Le pourcentage d'inhibition de l'ACHé ou BChE a été déterminé par comparaison des vitesses de réaction d'échantillons par rapport à l'échantillon témoin (éthanol dans du tampon phosphate, pH 8) en utilisant la formule :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

Les différences entre les résultats ont été considérées comme statistiquement significatifs lorsque la valeur $P < 0,05$.

VI.4.6. Activité inhibitrice de l'uréase

Cette méthode, établie par (Muhammad Taha *et al.*, 2018), a été légèrement modifiée.

Dans des plaques de 96 puits, le mélange réactionnel comprenait 10 μL d'extrait, 25 μL d'enzyme urease (1 mg enzyme dans 1mL tampon) , 50 μl d'urée(0,2553 g Urea dans 25 mL tampon (PH=8,2)), et 45 μL du réactif de phénol (2 g Phenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) dans 25 mL H_2O + 25 mg $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 25 mL H_2O). Ces échantillons ont été incubés avec 70 μL du réactif basique (0,7125 g NaOH dans 25 mL H_2O + 1,175 mL NaOCL (Liq) dans 25 mL H_2O) à 30°C dans une étuve pendant 50 minutes. Ensuite, la lecture de l'absorbance a été effectuée à 630 nm. La thiourée a été utilisée comme standard.(Taha *et al.*, 2018)

Le pourcentage d'inhibition de l'uréase a été calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

Où **Acontrôle** est l'absorbance du contrôle négatif, et **Aextrait** l'absorbance de l'extrait/standard.

VI.5. Calculs statistiques

Tous les tests ont été répétés trois fois et les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écarts types. Les valeurs de l'IC₅₀ ont été calculées en effectuant une analyse de régression linéaire. Pour des comparaisons efficaces, le test de *student* a été appliqué en utilisant le logiciel GraphPad. Les différences ont été considérées comme significatives à $P \leq 0,05$.

IV.6. Approche *in silico* et docking moléculaire

Les biomolécules dérivées des plantes présentent un intérêt pharmacologique significatif et sont appelées à devenir des futurs médicaments.

Historiquement, le processus de découverte de nouveaux médicaments impliquait un criblage aléatoire et des observations empiriques des effets des produits naturels sur les maladies connues. Actuellement, ce processus est amélioré par le criblage à haut débit (HTS), permettant un dépistage rapide de nombreux composés contre des cibles moléculaires ou des tests cellulaires. De plus, les chercheurs explorent continuellement de nouvelles méthodes pour améliorer l'efficacité du processus de découverte de médicaments. La conception de médicaments assistée par ordinateur (CADD), souvent désignée sous le nom de méthodes *in silico*, est une stratégie visant à améliorer l'efficacité du développement de nouveaux médicaments. Grâce à la modélisation moléculaire, le CADD permet de cribler virtuellement un grand nombre de composés pour leurs propriétés similaires à celles des médicaments et leur interaction avec les cibles pharmacologiques.

Le profilage de l'activité *in silico* des composés est une méthode informatique émergente permettant de prédire les cibles les plus probables d'un composé bioactif (Bultum *et al.*, 2022)

Les méthodes *in silico* peuvent permettre l'identification de candidats médicaments prometteurs avant même que des tests *in vitro* ne soient réalisés, en effet le docking moléculaire est un outil utile pour prédire l'activité biologique des molécules (Dilshad *et al.*, 2022).

Cependant, les expériences *in vitro* sont essentielles pour valider les prédictions faites par les méthodes *in silico* et fournir des preuves directes de l'activité biologique d'un composé.

IV.6.1. Les molécules à étudier

Les molécules isolées retrouvées dans l'extrait *n*-butanolique de *Cytisus purgans* ont été analysées *in silico* afin de prédire les activités biologiques probables de l'extrait et les confronter aux résultats des tests *in vitro* déjà effectués

Le tableau ci-dessous (Tableau.2) regroupe les molécules incluses dans l'étude *in silico*

Tableau 2. Les molécules à étudier

Plantes	Molécules
<i>Cytisus purgans</i>	Quercetin
	Chrysine
	Biochanine
	Isopruneatine
	Genistein
	Daidzein
	Daucostérol

IV. 6.2. Outils *in silico*

Les outils *in silico* offrent des moyens efficaces et économiques pour effectuer des analyses, des prédictions et des simulations dans de nombreux domaines scientifiques, Au fil du temps, de nombreux logiciels de docking ont été développés, proposant une diversité d'algorithmes de recherche et de fonctions de score.

Dans la présente étude on a utilisé des logiciels ainsi que des sites web qui sont répertoriés dans les tableaux ci-dessous (Tableau.3 et Tableau.4)

Tableau 3. Les logiciels utilisés dans l'étude

Logiciels	Référence	Usage
Open Babel	2.4.1	système expert principalement utilisé dans des applications de chemo-informatique pour la conversion de fichiers de structures chimiques.
Auto Dock Tools	1.5.6	Logiciel de simulation de modélisation moléculaire. Il est particulièrement efficace pour l'accostage de protéines-ligands.
Maestro		Offre une interface conviviale et un environnement graphique avancé. Elle permet d'accéder à des flux de travail de modélisation computationnelle et d'apprentissage automatique de pointe, permettant des prédictions précises et économisant du temps pour les chercheurs.

Tableau 4. Les sites web utilisés dans l'étude

Nom	Adresse électronique	Usage
PubChem	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov	Informations générales (S. Kim et al., 2016)
Molinspiration	http://www.molinspiration.com/	prédire les scores de bioactivité des ligands (Jarrahpour et al., 2012)
ADMET-SAR	http://lmm.d.ecust.edu.cn/admetsar 1	prédire les propriétés ADMET des ligands (Cheng et al., 2012)
SwissADME	http://www.SwissADME.ch	de prédire avec précision les cibles protéiques les plus probables des petites molécules.(Daina et al., 2019)
PASS online	www.pharmaexpert.ru/passonline/	prédire les activités biologiques (Jairajpuri et al., 2021)
Pharmmapper	http://lilab.ecust.edu.cn/pharmmapper/	ne plateforme web dédiée à l'identification potentielle de cibles médicamenteuses.(X. Wang et al., 2017)
PDB Bank	http://www.rcsb.org/	Télécharger la protéine sous forme de PDB
pockdrug	https://pockdrug.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/index.py?page=home	Prédire le site actif (Hussein et al., 2015)

IV.6.3. Méthode du docking moléculaire

Les principales étapes (Figure. 68) impliquées dans la mécanique du docking moléculaire sont les suivantes :

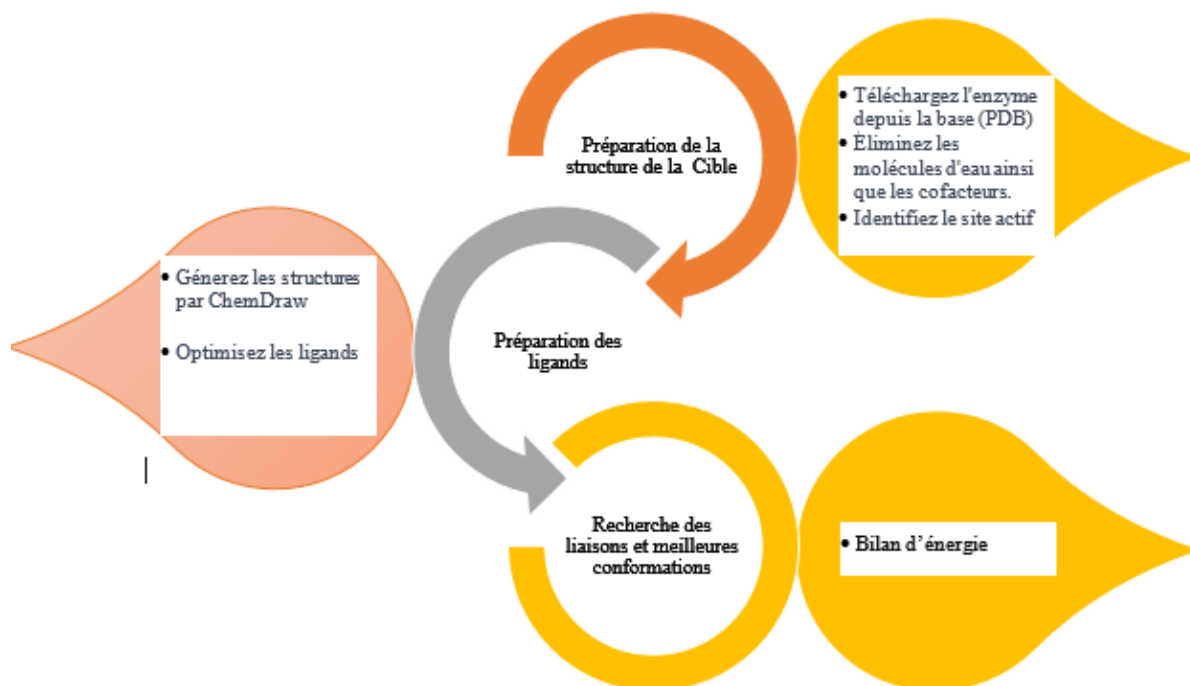


Figure 68. Etapes du docking moléculaire

IV.6.3.1. Étape I - préparation de la protéine

✚ Choix d'une cible à intérêt biologique

Le serveur PharmMapper est un serveur web accessible conçu pour identifier les candidats cibles potentiels pour les petites molécules données (médicaments, produits naturels ou autres composés récemment découverts avec des cibles de liaison non identifiées) en utilisant une approche de cartographie pharmacophore. Il possède une grande capacité de débit et ne prend en moyenne qu'une heure pour analyser l'ensemble de PharmTargetDB. (X. Liu *et al.*, 2010)

Les sept molécules ont été saisies sur PharmMapper pour avoir les cibles thérapeutiques potentielles. Et suite aux résultats encourageants obtenus pour l'évaluation de l'activité inhibitrice des cholinestérases, un screening sur le site PDB data base pour sélectionner la protéine humaine la plus appropriée pour cette activité que nous avons examiné attentivement la littérature avant de choisir l'ID PDB.

La structure tridimensionnelle de la protéine doit être récupérée à partir de la banque de données des protéines (PDB) ensuite, elle doit être prétraitée optimisées et minimisées. Cela devrait permettre l'amputation des molécules d'eau de la cavité, la stabilisation des charges, la substitution des résidus manquants, la production des chaînes latérales, etc., selon les paramètres disponibles. (Kumar *et al.*, 2023)

IV.6.3.2. Étape II - prédiction du site actif

Une étape fondamentale dans la stratégie de criblage virtuel est l'identification des résidus d'acides aminés pouvant intervenir dans le processus de reconnaissance du ligand. Après la préparation de la protéine, le site actif de la protéine doit être prédit. La protéine réceptrice possède de nombreux sites actifs, car, pour un même récepteur, le site actif peut être différent selon le profil pharmacologique de la molécule (agoniste, antagoniste, agoniste inverse). Généralement, les molécules d'eau et les atomes hétéro sont négligés s'ils sont présents. (Dnyandev *et al.*, 2021)

Le "PockDrug-Server" est un outil efficace pour prédire la « druggabilité » des poches, même lorsqu'elles ne sont pas associées à la présence d'un ligand. Il se base sur l'analyse des atomes d'acides aminés formant la surface des cavités potentielles de liaison. Ce serveur offre une estimation fiable de la « druggabilité » en utilisant diverses méthodes d'analyse des poches, garantissant ainsi des résultats cohérents. (Hussein *et al.*, 2015)

Un ligand cristallisé avec le récepteur peut offrir de renseigner sur l'emplacement du site actif. Néanmoins, il est impératif de traiter ces informations avec précaution et de les interpréter judicieusement.

Prédiction de la druggabilité à l'aide d'une protéine

La structure de la protéine correspond à un code PDB ;

Le type d'information sur la structure de la protéine est la méthode d'estimation fpocket.

Cette méthode, qui n'est pas guidée par des informations sur les ligands, est une méthode géométrique automatisée basée sur la décomposition d'une protéine 3D en polyèdres de Voronoï. Elle extrait toutes les poches de la surface de la protéine apo ou holo (Figure.69) en utilisant des sphères de différents diamètres. Ses avantages résident dans sa rapidité de calcul et ses performances satisfaisantes en termes de superposition des sites de liaison connus avec les sites prédits. Cette méthode est utilisée par défaut car elle convient à la fois aux protéines apo et holo. (Hussein *et al.*, 2015)

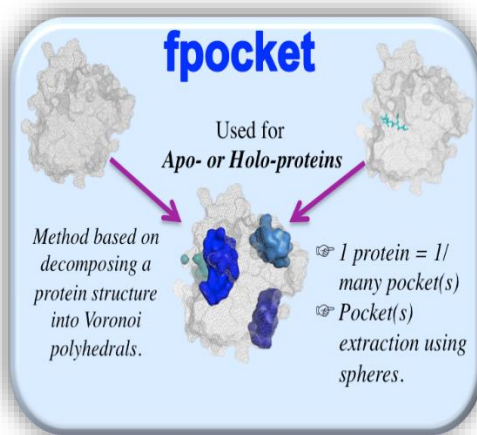


Figure 69. Méthode d'estimation de fpocket.

Après cette première étape d'estimation de la poche, certains descripteurs géométriques et physico-chimiques de la poche et des descripteurs de la protéine impliqués dans le modèle PockDrug sont calculés en arrière-plan, dans le but de prédire la druggabilité de la poche. Dans la partie suivante, les détails de la sortie seront affichés.

La page de sortie peut être constituée d'un ou deux onglet(s), variant en fonction du choix d'une ou deux méthode(s) d'estimation : un onglet de résultat par méthode d'estimation sélectionnée. En fonction du type d'entrée, deux affichages de résultats sont possibles (Figure.70) :

Pockets	Vol. ¹	Surface Hull ²	Hydrophob. Kyte ³	Polar Res. ⁴	Hydroph. Res. ⁵	Oily atom	Score Drugg	Standard Deviation
097 (A1)	556.09	373.07	-0.32	0.54	0.92	0.0	0.71	0.08
NAG (A1)	5.4	25.2	-2.2	1.0	0.5	0.0	0.06	0.05

Figure 70. Prédiction de la druggabilité de la poche

Si la requête soumise correspond à une liste de codes PDB, chaque onglet correspond à un tableau tribal présentant :

Code PDB de la protéine : donnant accès à la page de résultats détaillés telle qu'elle est décrite précédemment dans ce paragraphe (case a).

- Nombre de poches estimées (pour chaque méthode)
- Nombre de poches druggables (probabilité de druggabilité supérieure à 0,5)
- Probabilité de druggabilité la plus élevée et son écart-type

🚦 Section d'aide à l'analyse

Scores de chevauchement entre les poches estimées différemment (prox vs fpocket) :

Si différentes méthodes d'estimation des poches sont appliquées, il est possible de comparer les poches grâce aux scores de chevauchement.

La figure 71 montre une poche de 1R55 liant le ligand "097", estimée par prox (en magenta) et fpocket (en bleu).

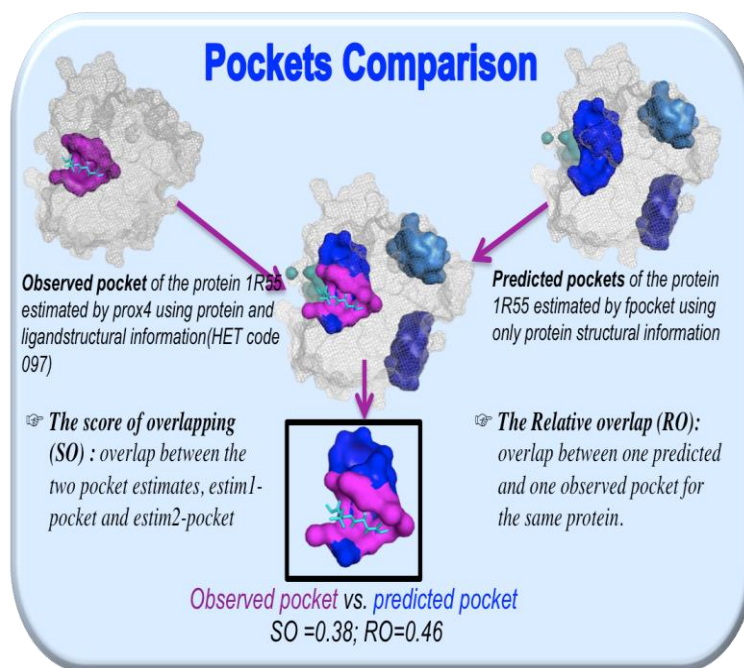


Figure 71. Comparaison des poches et scores de chevauchement.

Si deux méthodes d'estimation de poche par défaut (prox et fpocket) sont testées, les scores de chevauchement entre ces deux estimations de poche sont calculés et inclus dans le fichier de résultats compressé téléchargé, afin de comparer les estimations de poche. Le chevauchement entre deux poches estimées a été quantifié à l'aide de deux scores :

Le score de chevauchement (SO) indique le chevauchement entre les deux poches estimées, c'est-à-dire la poche 1 et la poche 2, comme suit :

$$SO = \frac{N_{common}}{N_{pocket1} + N_{pocket2} - N_{common}}$$

Où $N_{pocket1}$ et $N_{pocket2}$ sont le nombre d'atomes dans la poche1 et la poche2, respectivement, et N_{common} est le nombre d'atomes communs à la poche1 et à la poche2. SO donne des valeurs comprises entre 0 et 100 %. Une valeur SO de 100 % indique un chevauchement maximal entre les paires de poches estimées utilisées.

Le chevauchement relatif (RO) a été défini par Schmidtke *et al* (2010). indique le chevauchement en termes d'atomes exposés entre les deux poches estimées pour le même site de liaison :

$$RO = \frac{SA_{pocket1} \cap SA_{pocket2}}{SA_{pocket1}}$$

Où $SA_{pocket1}$ et $SA_{pocket2}$ sont les zones accessibles au solvant de la poche 1 et de la poche 2, respectivement, calculées à l'aide du logiciel NACCESS. Une valeur RO proche de 100 % indique que toutes les zones exposées de la poche 1 sont incluses dans la poche 2.

Le chevauchement mutuel (MO) a été défini par Schmidtke *et al.* en complément du RO.

$$MO = \frac{SA_{pocket1} \cap SA_{pocket2}}{SA_{pocket2}}$$

Préparation du fichier des macromolécules

Le poche a été extrait de la protéine de la base de données Protein Data Bank (PDB) au format (* .pdb). Les molécules d'eau ont été supprimées en plus de toute molécule étrange ou d'une entité chimique trouvée à la surface de nos macromolécules. Tous les atomes d'hydrogène ont été ajoutés avant que les charges totales de Kollman et de Gastiger attribuées puis enregistrées.

IV.6.3.3. Étape III - préparation du ligand

Le ligand peut être récupéré à partir de nombreuses bases de données telles que ZINC, Pub Chem, ou peut être dessiné en utilisant un outil de dessin chimique.

Les fichiers de ligands de tous les composés ont été extraits de la base de données Pubchem dans un format SDF puis convertis par un logiciel Openbabel à un format PDB.

Lors du choix du ligand, la règle de Lipinski des 5 doit être utilisée. La règle de Lipinski des 5 aide à discriminer entre les molécules non médicamenteuses et médicamenteuses. La méthode

de conception et de détection assistée par ordinateur (CADD) promet une grande possibilité de réussite ou d'échec en raison de la similarité avec les médicaments .

VI.6.3.4. Étape IV - Docking

Le ligand est docké avec la protéine et les interactions sont analysées (Dnyandev *et al.*, 2021)

c. Préparation du fichier de ligands

Avant le démarrage, AUTODOCK 4.2 assignait automatiquement le type de chaque atome et détectait la racine (la partie rigide du ligand) ainsi que le nombre de liaisons rotatives qui étaient déplacées via une option de torsion dans le logiciel. Enfin, le ligand a été enregistré au format (* .pdbqt).

d. Préparation du fichier des paramètres de Grid

Le fichier d'autogrid a été préparé avec des dimensions pré-calculées; selon la taille de Grid appropriée, selon les résidus flexibles, l'espacement de la grille a été modifié en fonction de la taille de chaque macromolécule (Figure.72). Le fichier Grid était situé à un endroit de la surface du récepteur où l'interaction récepteur-ligand attendue se produit. Enfin, le fichier Grid préparé a été enregistré au format de fichier (* .gpf).

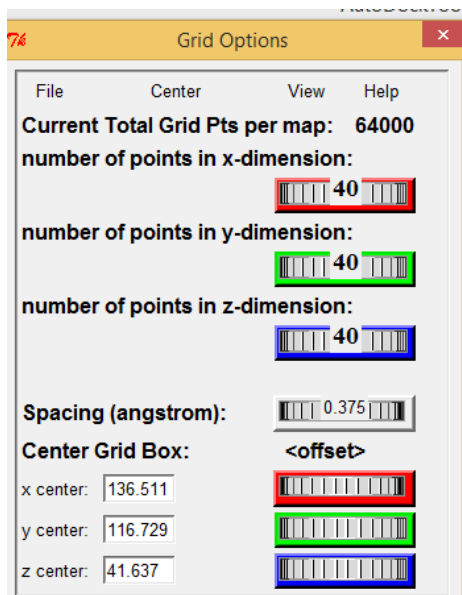


Figure 72. Les paramètres de GridBox

e. Préparation du fichier des paramètres d'Autodock

Après une préparation correcte des fichiers d'entrée (ligand et protéine) et le calcul des cartes d'affinité, des analyses d'amarrage ont été effectuées à l'aide du logiciel AUTODOCK4.2

utilisant l'algorithme Lamarckian Genetic Algorithm avec les fichiers de structure résultants d'AUTODOCK4.2

L'amarrage peut être effectué par différentes méthodes. Mais la méthode la plus efficace est l'algorithme génétique de Lamarckian. AUTODOCK a été exécuté plusieurs fois pour obtenir diverses conformations ancrées et pour analyser l'énergie d'amarrage prévue.

Les sites de liaison de ces molécules ont été sélectionnés sur la base de la poche de fixation du ligand des gabarits(T. Khan *et al.*, 2018)

Chapitre V

Résultats et

Discussion

V.1. Introduction

Ce chapitre présente une synthèse des résultats obtenus lors de l'identification structurale des phytoconstitués. En plus des dosages des flavonoïdes, polyphénols totaux, et tanins. Ainsi que des tests d'activités biologiques réalisés sur différents extraits des deux plantes du nord-est de l'Algérie : *Veronica rosea* et *Cytisus purgans*.

Les activités biologiques évaluées *in vitro* comprennent :

- L'activité antioxydante, mesurée à l'aide de trois tests distincts.
- L'activité photoprotectrice et dermoprotectrice
- Test de stabilisation de la membrane des globules rouges
- L'activité hémostatique
- L'activité neuroprotectrice
- L'activité inhibitrice de l'uréase

V.2. Résultats de l'investigation chimique

V.2.1. Rendements des extractions

Les biomolécules actives se trouvent généralement à des concentrations faibles dans les plantes. Une méthode d'extraction efficace est celle qui permet d'obtenir des extraits à haut rendement tout en préservant au mieux les propriétés fonctionnelles des composés.

Les extraits, des deux plantes étudiées sont obtenus par macération, puis fractionnés par extraction liquide-liquide avec des solvants à polarité croissante. Les rendements d'extraction ainsi que les aspects et les couleurs des extraits obtenus sont répertoriés dans le tableau.5

Tableau 5. Caractéristiques et rendements des extraits de *Veronica rosea* et *Cytisus purga*

Plante	Extrait	Aspect	Couleur	Rendement
Veronica rosea	n-Hexanique	huileux	Vert foncé	0.6
	Acétate d'éthyle	Pâte visqueuse	Vert foncé	1.6
	n- butanolique	poudreux	Marron foncé	3.4
Cytisus purgans	n- Hexanique	huileux	Vert foncé	0.54
	Acétate d'éthyle	pâteux	Vert foncé	1.3
	n-butanolique	poudreux	Marron foncé	2.34

La méthode d'extraction revêt une importance capitale dans l'isolement et la récupération des composés phytochimiques contenus dans le matériel végétal. Cette étape est influencée par la nature chimique des composés, la technique d'extraction employée, la quantité d'échantillon étudiée et la présence de substances interférentes. (Vuong *et al.*, 2013)

Malgré l'utilisation d'une méthode d'extraction non épuisante par macération à froid, les rendements obtenus sont adéquats pour atteindre nos objectifs d'étude.

Les extractions successives par des solvants de polarité croissante permettent de séparer les composés de la matière végétale selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction.

Le rendement d'extraction des deux espèces ci étudiées est grandement influencé par la méthode et le solvant d'extraction. Le *n*-butanol, le solvant le plus polaire, a montré le rendement le plus élevé, tandis que le *n*-hexane a donné le rendement le plus bas. (Vuong *et al.*, 2013). Ces résultats sont concordants avec les rendements d'extraction obtenus avec *Veronica thymoides* (1.4% extrait éther de pétrole et 5.2% extrait méthanolique) (Ertas *et al.*, 2015) et également *Cytisus villosus* (0.05% chloroforme , 0.5% acétate d'éthyle , 1% *n*-butanolique) (Larit *et al.*, 2019)

En général, le rendement d'extraction augmente avec la teneur croissante en eau dans les systèmes d'éthanol, d'acétone et de méthanol. Cela peut être dû à la combinaison de solvant organique et d'eau qui facilite l'extraction de tous les composés solubles à la fois dans l'eau et les solvants organiques. Contrairement au rendement d'extraction, les taux en polyphénols et flavonoïdes diminuent avec la teneur croissante en eau dans les solvants organiques. (Do *et al.*, 2014)

V.2.2. Criblage phytochimique

Les tests phytochimiques ont permis d'identifier les différentes familles de métabolites secondaires présentes dans la partie étudiée de la plante à l'aide de réactions qualitatives de caractérisation.

L'objectif du screening est de diriger les recherches vers les familles moléculaires réellement présentes dans les plantes étudiées, telles que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les saponines, les alcaloïdes et les terpènes.

Ces réactions reposent sur des phénomènes de précipitation ou de coloration induits par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

Les résultats des tests préliminaires du screening phytochimique des extraits des deux plantes sont présentés dans le tableau.6.

Tableau 6. Résultats du screening phytochimiques de *V. rosea* et *C.purgans*

Composé phytochimique	Test / réaction	Résultat	
		<i>V.rosea</i>	<i>C.purgans</i>
Flavonoïde	Test de Shinoda	+++	++
Alcaloïde	Dragendorff	-	++
	Bouchardat	-	+++
	Mayer	-	+++
Tanins	Tanins condensés	-	-
	Stiasny et FeCl ₃ Tanins gallique	+	+
Triterpènes	Liebermann Burchard	+	+
Hétérosides cardiotoniques	Keller killiani	-	-
Dérivés anthracéniques	Bornträger	-	-
Saponosides	Test de mousse	++	+++

(-) : absence (+) : faible présence (+++) : forte présence

Cette évaluation fournit des informations précieuses sur le profil chimique des plantes, Par exemple, le screening phytochimique peut aider à identifier les composés bioactifs présents dans les plantes, ce qui peut orienter la recherche sur de nouvelles applications thérapeutiques ou la découverte de principes actifs. (Salam *et al.*, 2023)

Les deux plantes sélectionnées ont été présentés avec des résultats phytochimiques positifs intéressants (Tableau.6), qui ont été confirmés par des changements de couleur remarquables. Les flavonoïdes, les alcaloïdes et les saponosides étaient les classes de composés les plus abondantes dans les plantes testées. Les flavonoïdes ont montré une forte positivité avec un changement de couleur significativement visible.

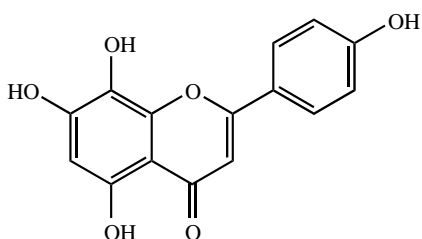
En effet, les espèces du genre *Veronica* étudiées jusqu'ici sont toutes riches en iridoïdes et aussi en flavonoïdes . (Salehi *et al.*, 2019) . En outre dans le genre *Cytisus* des alcaloïdes quinolizidiniques, dont la cytisine et la spartéine, sont courants (Wink, 2003) aussi bien que des isoflavonoïdes.(Faugeras & Paris, 1965)

V.2.3. Investigation chimique des espèces étudiées

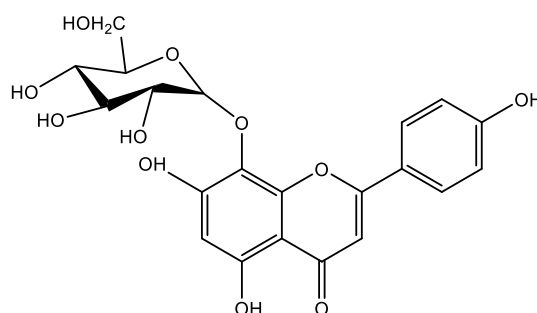
L'investigation phytochimique des deux fractions, d'une part, acétate d'éthyle de *Veronica rosea* et, d'autre part, *n*-butanolique de *Cytisus purgans* a conduit à l'isolement de huit composés purs de *Veronica rosea* et sept produits de *Cytisus purgans*. L'identification de ces composés a été réalisée au moyen de méthodes spectroscopiques RMN et spectroscopie de masse ainsi que la comparaison avec la littérature.

V.2.3.1. Investigation chimique de l'espèce *Veronica rosea*

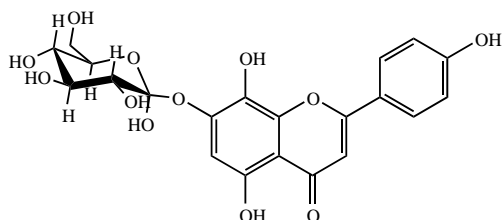
La purification de l'extrait acétate d'éthyle de *V. rosea* a abouti à l'isolement de huit flavonoïdes dont les structures sont représentées dans la figure.73



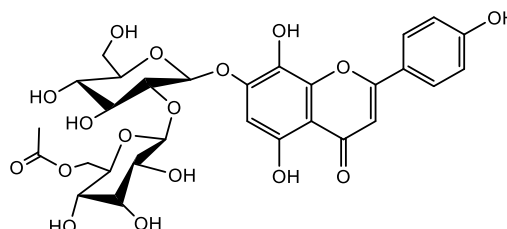
Isoscutellareine



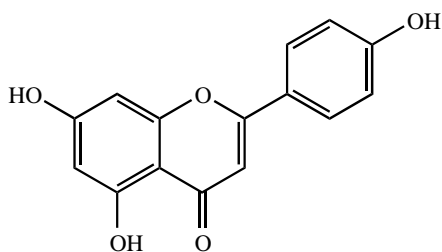
Isoscutellareine-8-O - β -D-glucopyranoside



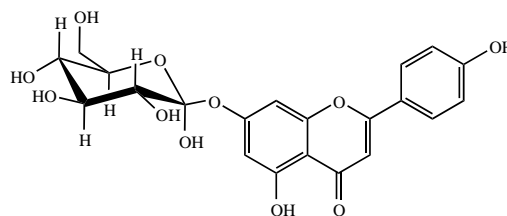
Isoscutellareine-7-O - β -D-glucopyranoside



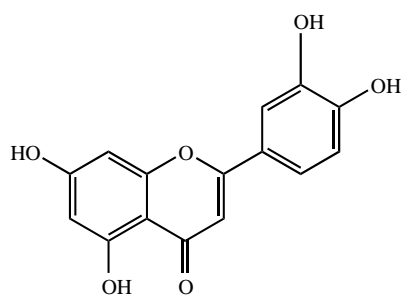
Isoscutellareine 7-O- [6-O-acétyl- β -D -
allopyranosyl- (1 \rightarrow 2)] - β -D-
glucopyranoside



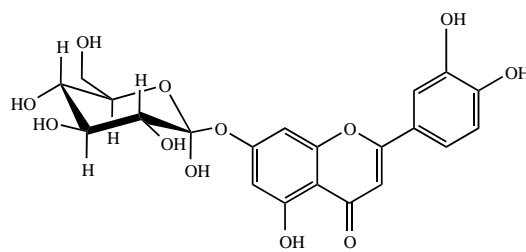
Apigenine



apigenine-7-O- β -glucopyranoside



Luteoline



Luteoline-7-O-Glucoside

Figure 73. Composés isolés à partir de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *Veronica rosea*

Elucidation structurale du composé VAc1 :

L'examen du spectre RMN ^1H du **composé VAc 1** montre des signaux caractéristiques d'un noyau flavonoïde (Fig.74).

On détecte sur ce spectre :

- Deux doublet d'intégration 2H résonant à δH 7,88 et δH 6,91 attribuables aux protons (H-2'/H-6') et (H-3'/H-5') du noyau B oxygéné en position para.
- Un singlet à δH 6,59 correspondant au proton H3.
- Un singlet à δH 6,75 d'intégration un proton attribuable au proton H6.

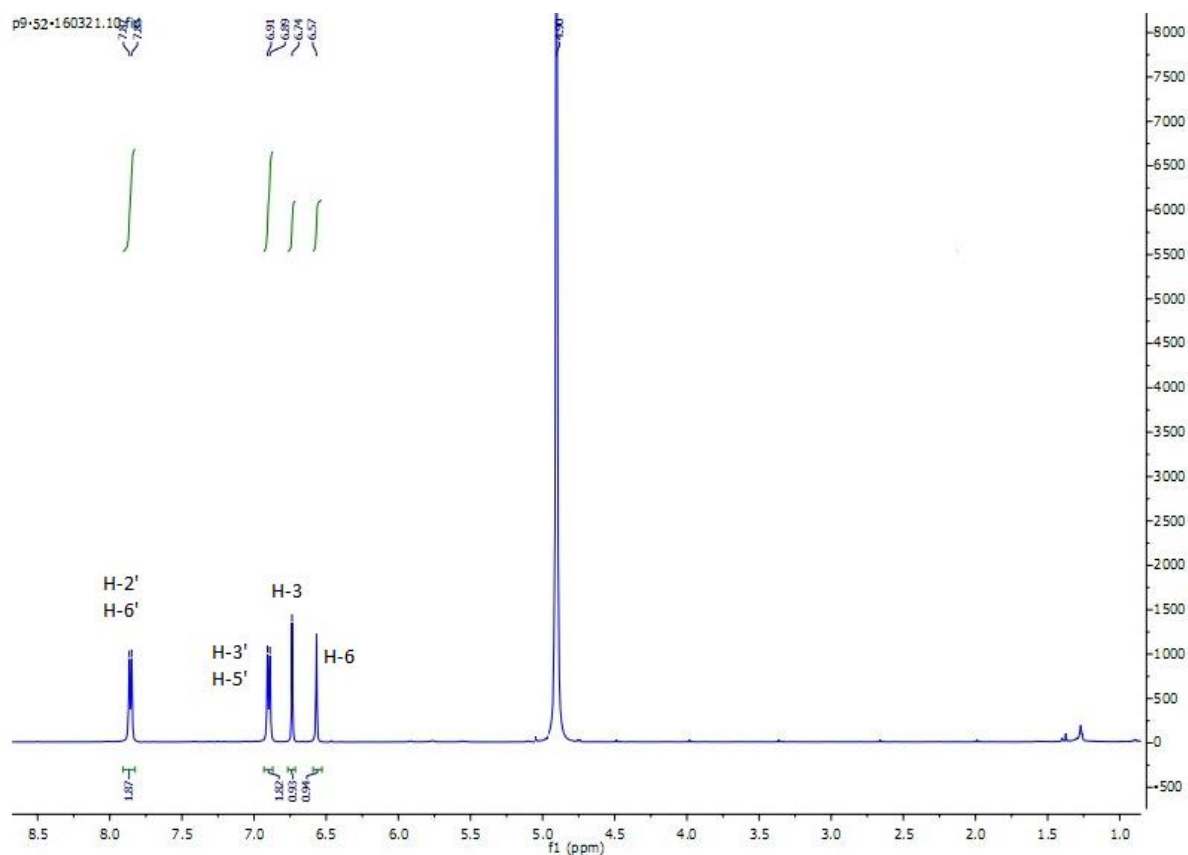


Figure 74. Spectre R MN ^1H du composé VAc 1

L'analyse conjuguée des spectres RMN ^{13}C (Fig. 75) et HSQC (Fig.76) a permis de localiser tous les 15 carbones du composé **VAc 1**, identifiés comme suit: $\delta\text{C}183,0(\text{C-4})$ $\delta\text{C}165,1(\text{C-2})$; $\delta\text{C}161,5(\text{C-4}')$; $\delta\text{C}152,5(\text{C-7})$; $\delta\text{C}150,4(\text{C-5})$; $\delta\text{C}143,7(\text{C-9})$; $128,4(\text{C-2}'\text{et C-6}')$; $128,2(\text{C-8})$; $121,6(\text{C-1}')$; $115,6(\text{C-3}'\text{ et C-5}')$; $106,2(\text{C-10})$; $102,8(\text{C-3})$; $100,2(\text{C-6})$.

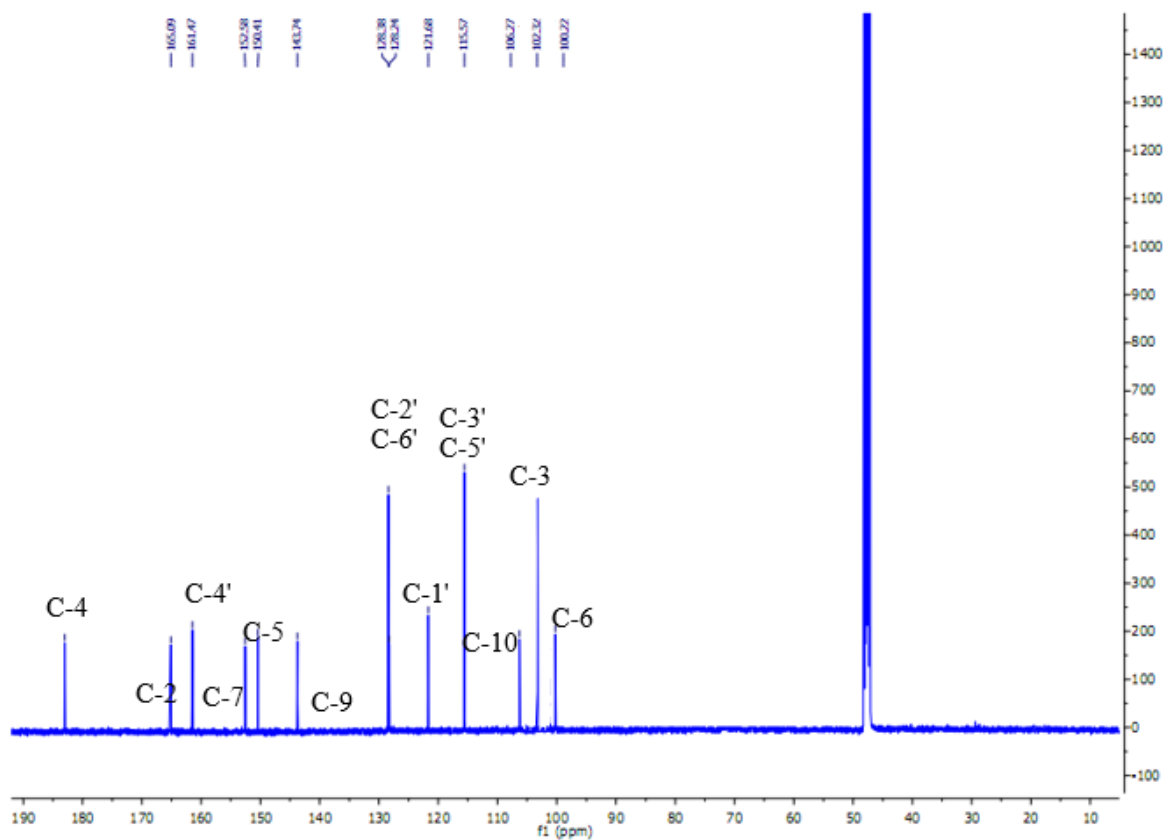


Figure 75. Spectre RMN ^{13}C du composé VAc 1

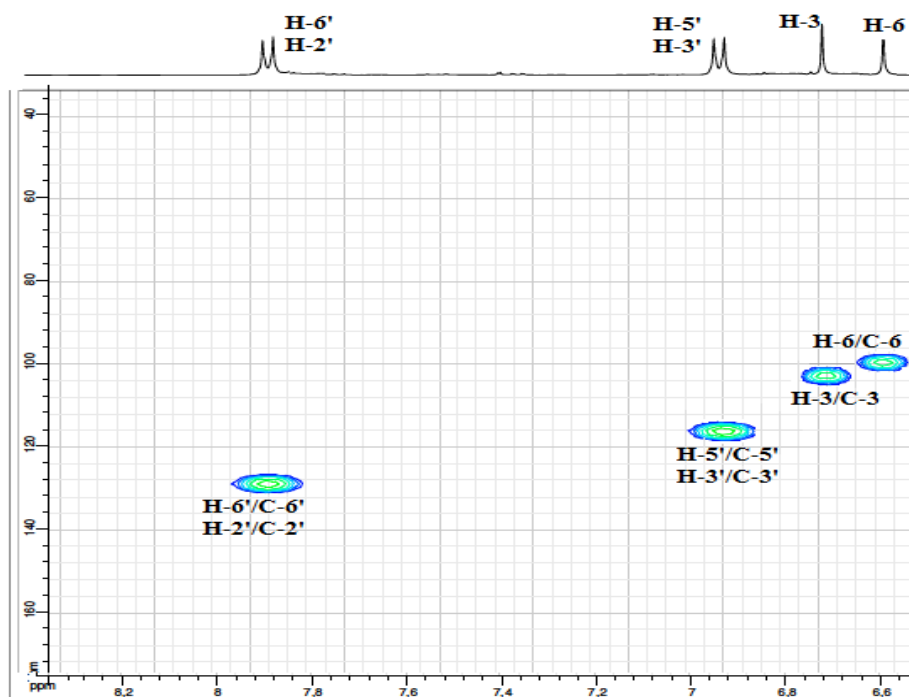


Figure 76. Spectre HSQC du composé VAc 1

Ces données spectrales ainsi la comparaison avec la littérature (Teles *et al.*, 2015) suggère une structure 5,7,8,4'-tétrahydroxyflavone connu sous le nom **Isoscutellareine** (Fig.77)

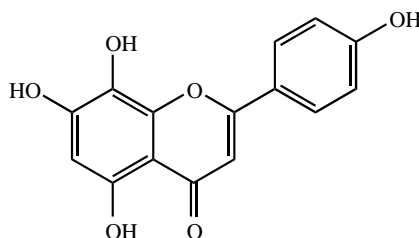


Figure 77. Isoscutellarein

Elucidation structurale du composé VAc2

L'examen des spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C du **composé VAc2** montre une grande similitude avec ceux du **composé VAc1**. La seule différence consiste à la présence des signaux osidiques dans l'intervalle 3,27- 5,07ppm.

Sa masse moléculaire de 448 uma correspond parfaitement à une Isoscutellareine glycosylée.

On observe :

- Deux doublets d'intégration 2H chacun à δH 6,93 ($J = 9$ Hz) et δH 8,14 ($J = 8,8\text{Hz}$) attribuables aux protons (H-3'/H5') et (H-2'/H6') respectivement
- Un singulet d'intégration 1H résonnant à δH 6,80 caractéristique au proton H-3.
- Un singulet d'intégration 1H à δH 6,26ppm attribuable au proton H-6
- En plus, le spectre RMN ^1H permet de visualiser les protons osidiques d'un glucose :
 - Un proton anomérique résonnant à δH 4,67 ($J = 7,7$ Hz), la grande constante de couplage indique une liaison de configuration β .
 - Un triplet à δH 3,42 (t, $J = 8$ Hz) correspondant au proton H-2''.
 - Un autre triplet d'intégration 1H à δH 3.32 correspondant au proton H- 3''
 - Un doublet de doublet à δH 3,67 (dd, $J = 12,0, 4,0\text{Hz}$) attribuable au proton H-6''a
 - Un double de doublet à δH 3,59 attribuable au proton H-6''b
 - Un massif d'intégration de 2 H à δH 3,25 attribuable aux protons H-4'' et H-5''

Les déplacements chimiques des protons osidiques (Fig.78) ainsi que les valeurs des constantes de couplage sont caractéristique d'un hexose de type glucose

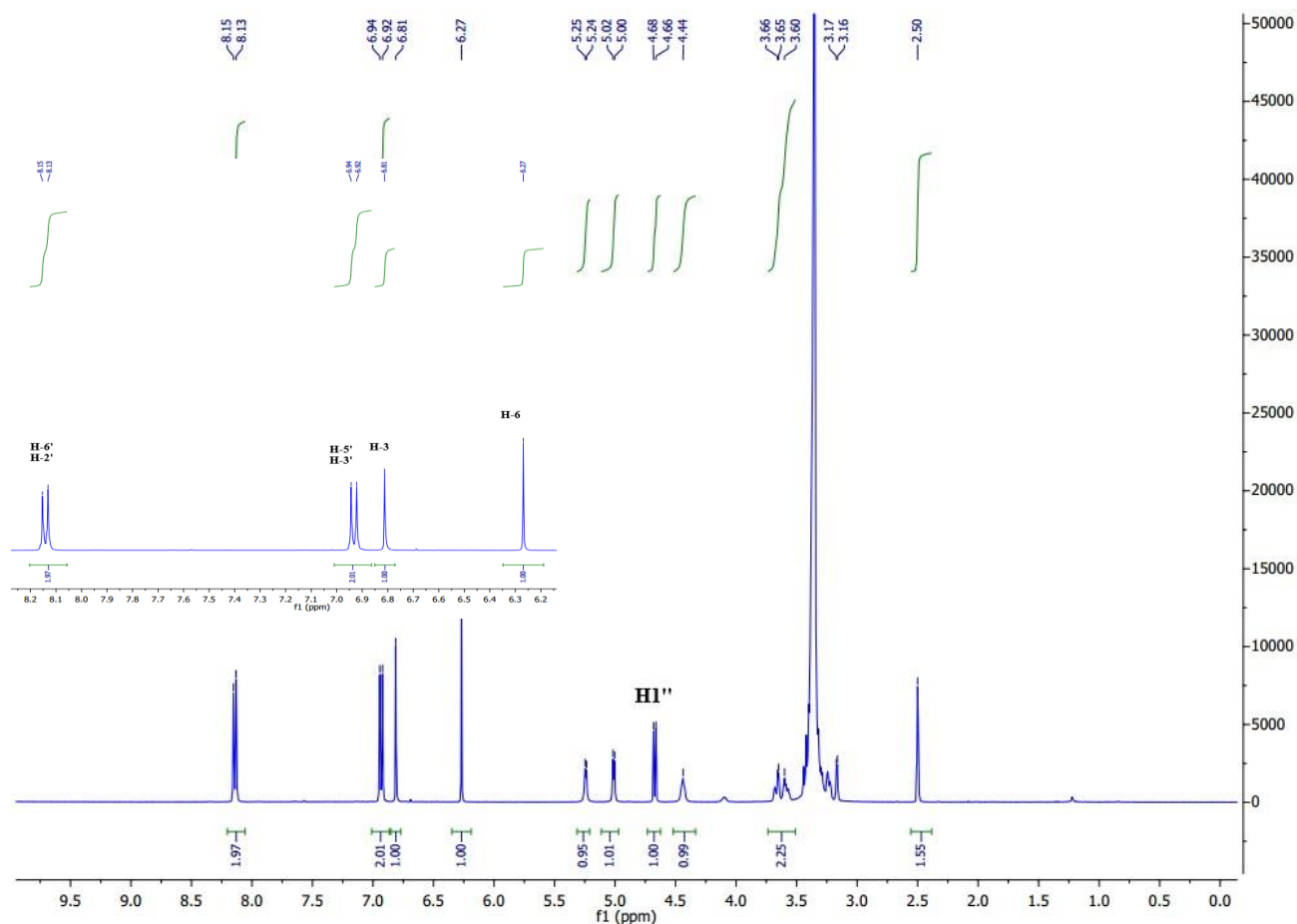


Figure 78. Spectre R MN ^1H du composé VAc 2

Le spectre RMN ^{13}C (Fig.79) montre la présence de 21 atomes de carbone résonant à δC 182,3 (C-4), 164,4 (C-2), 161,7 (C-4'), 157,7 (C-5), 157,5 (C-7), 149,8 (C-9), 129,6 (C-2'et C-6'), 125,7(C-8), 121,5 (C-1'), 116,2(C-3'et C-5'),99,4 (C-6),103,9(C-10), 102,8(C-3), 106,9 (C-1'') 77,7(C-3''), 76,4(C-5''), 74,5(C-2''), 69,5(C-4''), 60,9(C-6'').

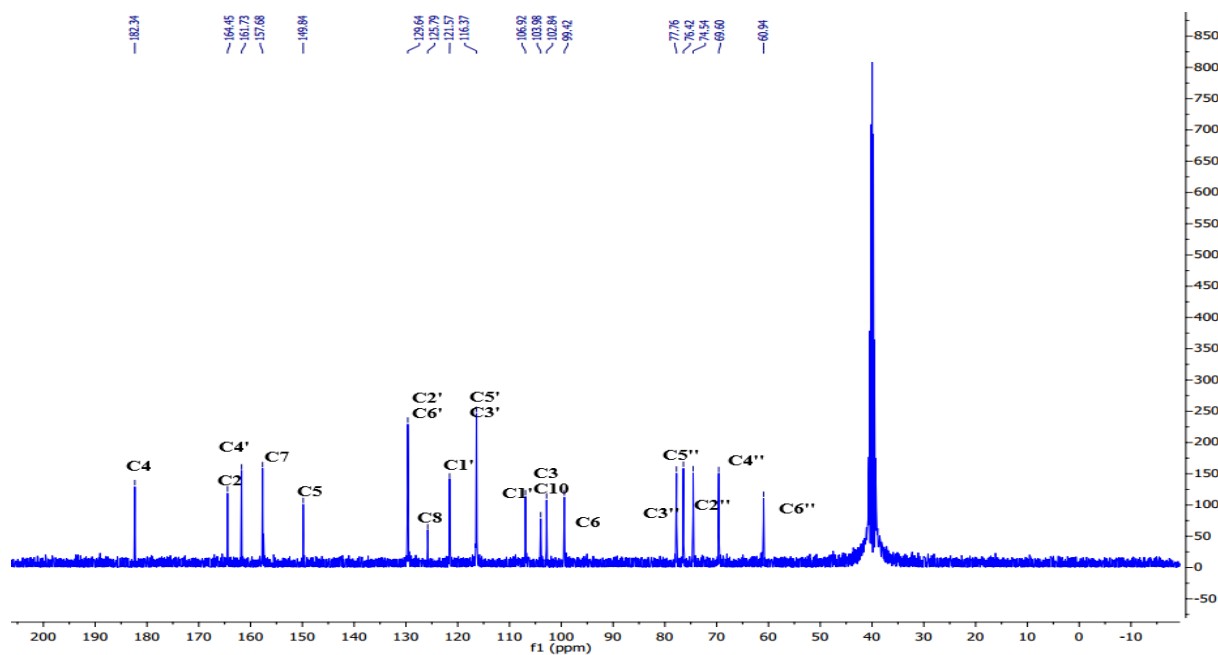


Figure 79. Spectre RMN ^{13}C du composé VAc 2

Le point de branchement du glucose sur la génine est localisé en position C-8 suite aux corrélations visualisées sur le spectre HMBC (Fig.80).

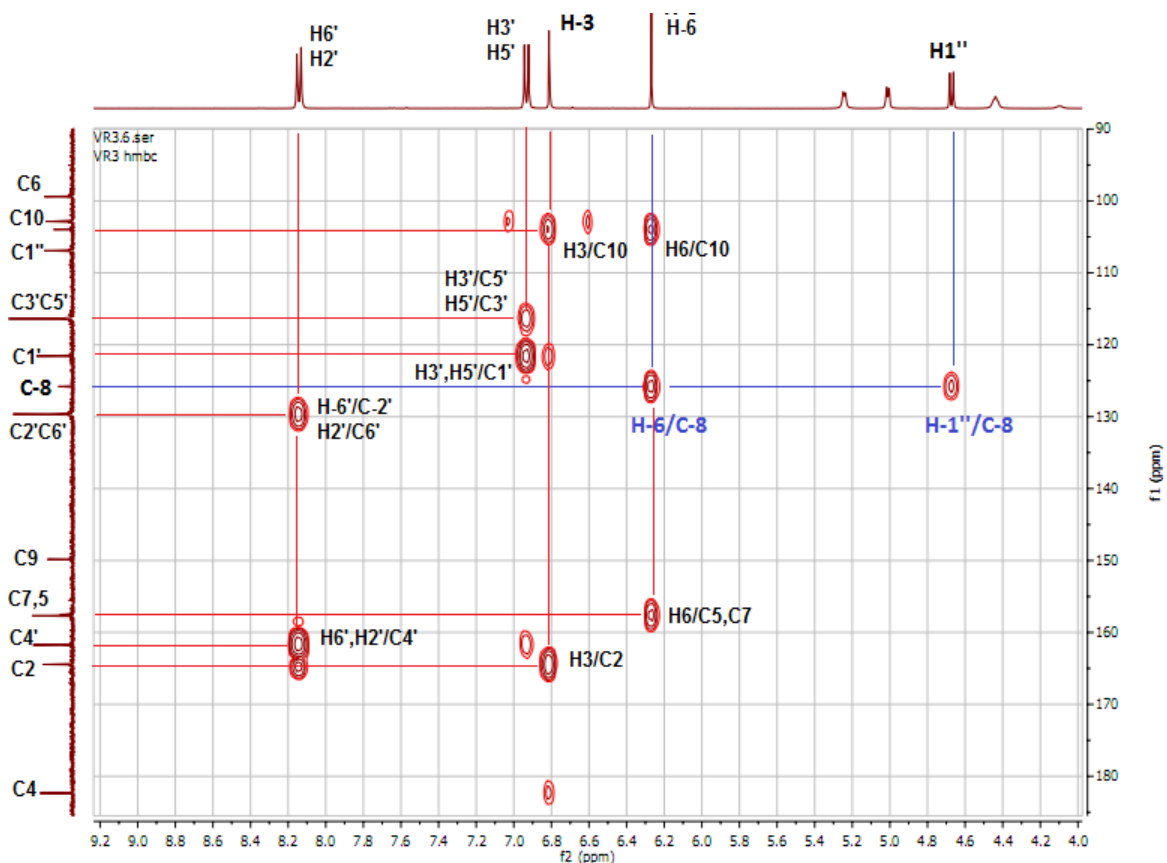


Figure 80. Spectres HMBC du composé VAc 2

Sur la base de cette analyse et par comparaison avec les données de la littérature (Matławska *et al.*, 2007.), le composé **VAc2** est identifié comme étant **l'isoscutellareine-8-O-β-D-glucopyranoside**.(Fig. 81)

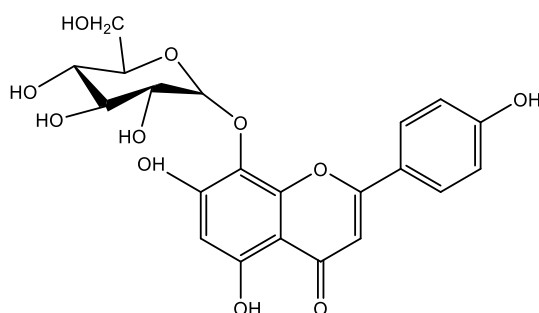


Figure 81. Isoscutellarein-8-O -β-D-glucopyranoside

Elucidation structurale du composé VAc 3

Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C du **composé VAc3** sont très voisin à ceux du **composé VAc 2** et semblables à ceux attendus pour une flavonoïde Isoscutellareine glycosylée que l'on peut identifier par la présence des signaux caractéristiques de ce squelette.

Le spectre RMN ^1H permet de reconnaître tous les signaux des protons (Fig.82) constituant le noyau isoscutellareine glycosylé. En effet, on identifie facilement :

- Deux doublets à δH 6,95 et à δH 7,96 attribuables aux protons H-3'/H-5' et H-2'/H-6' respectivement.
- Un singulet résonant à 6,81ppm correspond au proton H3.
- Un autre singulet à 6.70 ppm correspondant au proton H-6 du cycle A.

En plus de ces signaux, le spectre RMN ^1H montre également les protons du glucose:

- Un signal sous forme de doublet d'intégration 1H à δH 5.07 (1H, d, $J = 8,0\text{Hz}$) caractéristique au proton anomérique H-1'''. La grande constante de couplage indique une configuration β .
- Un triplet d'intégration 1H à 3,60 ppm attribuable au proton H-2'''
- Un massif à δH 3,27 s'intégrant pour 1H correspondant au H-4'''.
- Un autre massif à δH 3,45-3,55 s'intégrant pour 2H correspondant aux protons H-3''' et H-5'''.
- Un doublet de doublet résonant à δH 3,75 attribuable au proton H-6'''a
- Un autre doublet de doublet à δH 3,88 ppm correspondant au proton H-6'''b

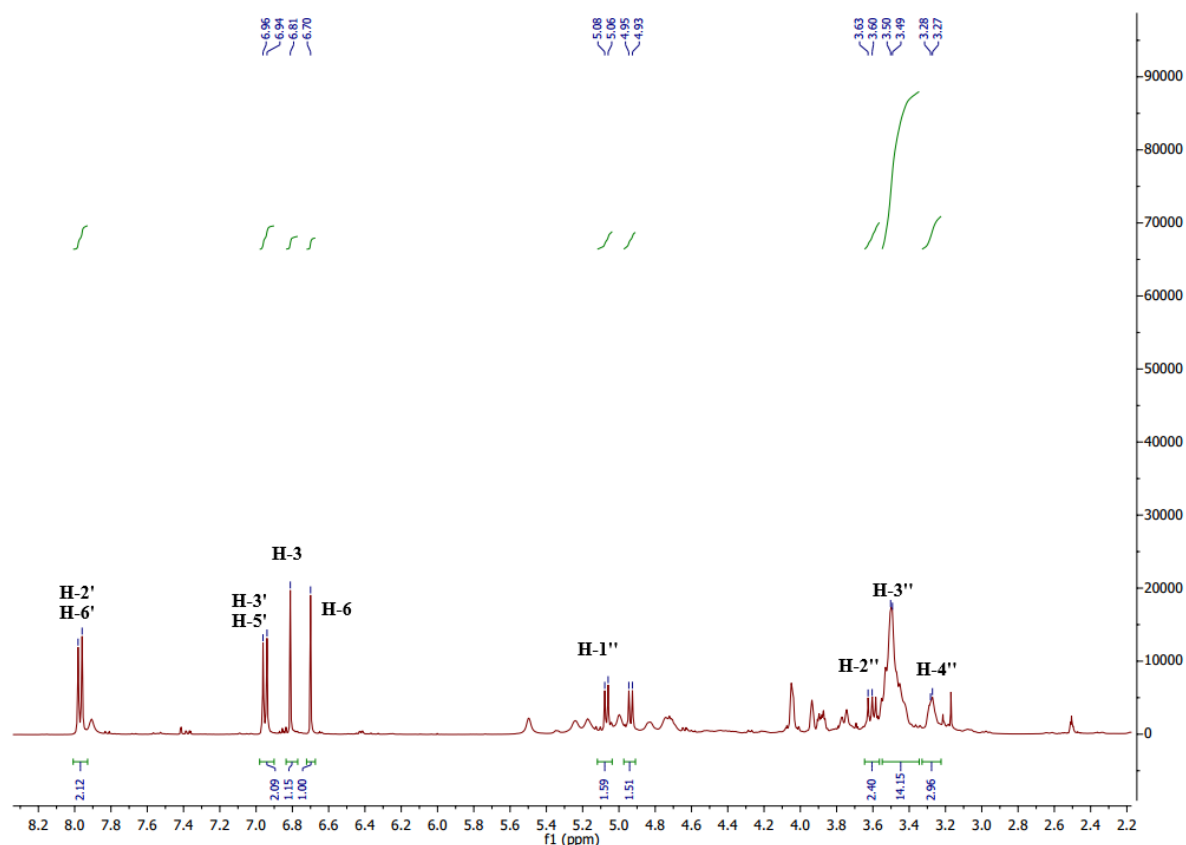


Figure 82. Spectre RMN ^1H du composé VAc 3

Les spectres RMN ^{13}C (Fig.83) et HSQC (Fig.84) confirme bien la nature flavone glycosylé du composé VAc3.

L'analyse conjointe de ces spectres RMN ^{13}C et HSQC permet d'attribuer les déplacements chimiques de tous les carbones : 182,8 (C-4), 164,5 (C-2), 161,8 (C-4'), 152,6 (C-5), 150,9 (C-7), 144,2 (C-9), 129,1 (C-6'), 129,1 (C-2'), 127,9 (C-8), 121,6 (C-1'), 116,4 (C-3'), 116,4 (C-5'), 106,0 (C-10), 103,0 (C-3), 99,9 (C-6), δC 100,9 83,1 (C-2''), 77,6 (C-5''), 76,1 (C-3''), 69,4 (C-4''), 61,0 (C-6'').

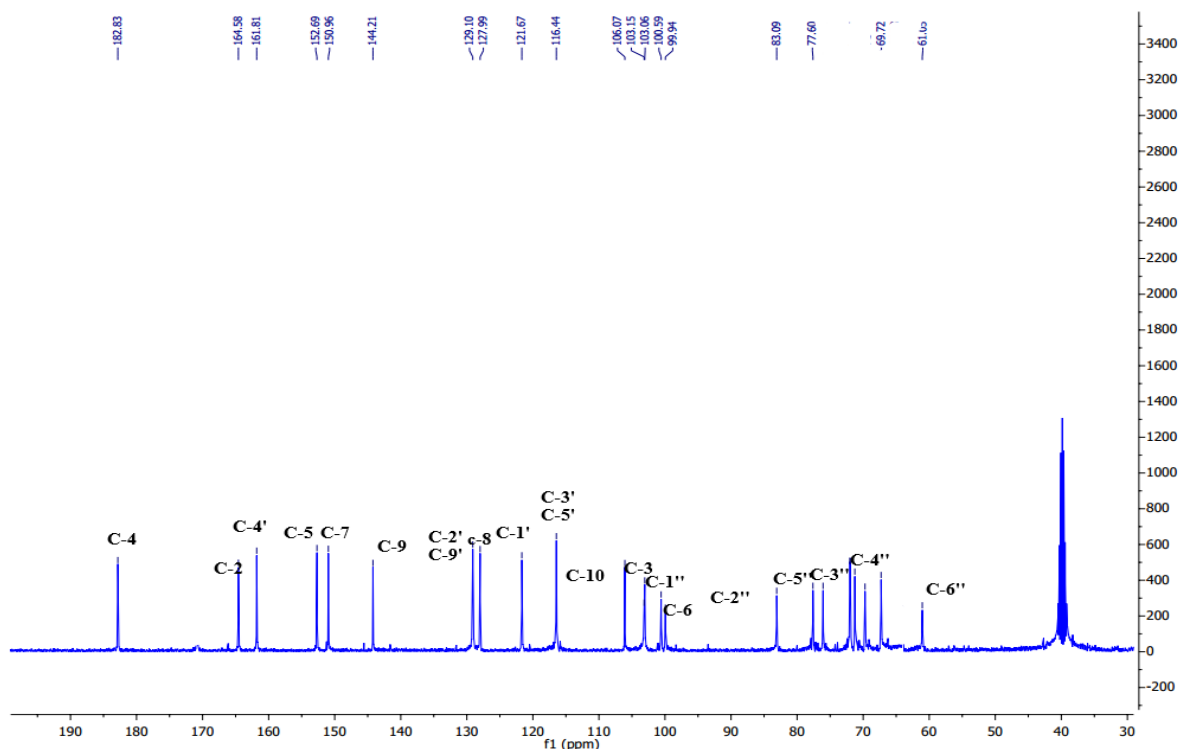


Figure 83. Spectre RMN ^{13}C du composé VAc3

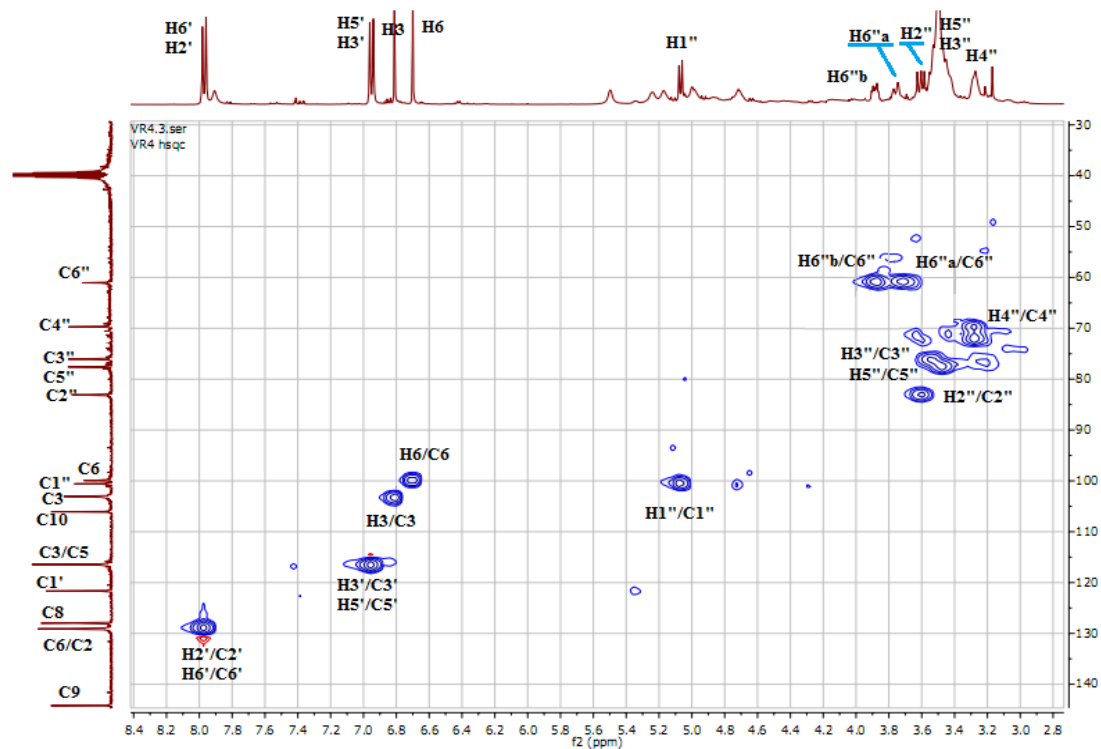


Figure 84. Spectre HSQC du composé VAc3

L'expérience HMBC (Fig.85) indique à travers les taches de corrélations que la glycosylation est en position C-7.

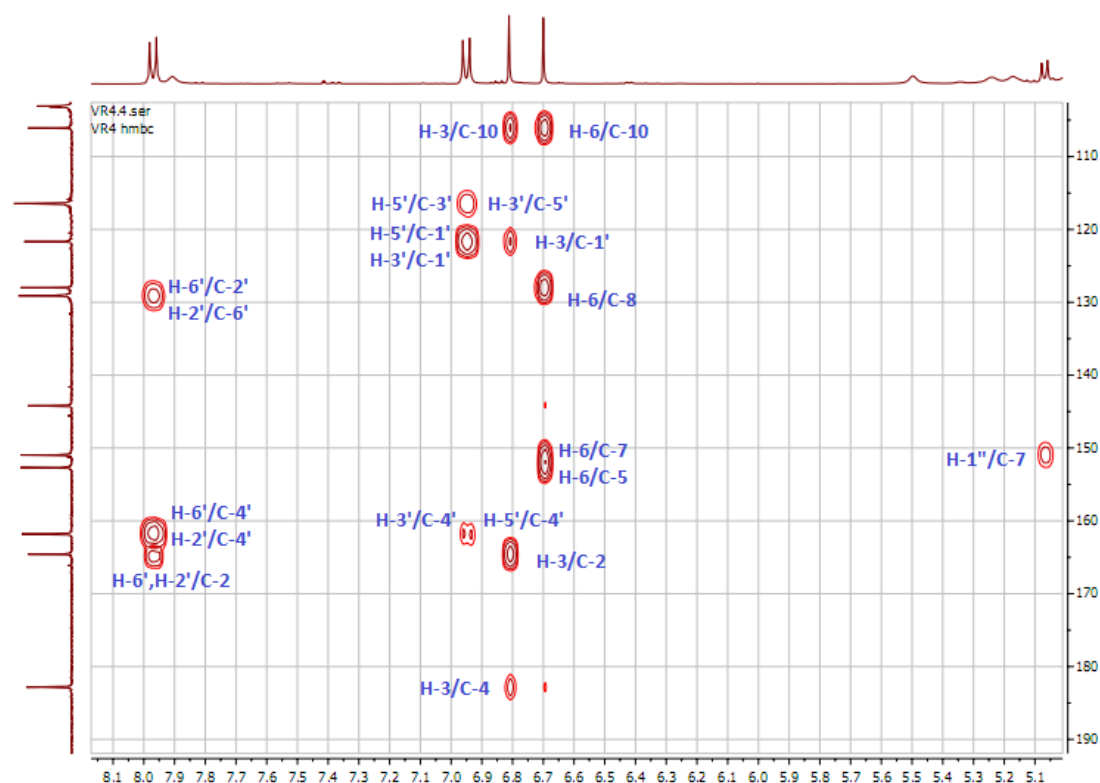


Figure 85. Spectre HMBC du composé VAc3

Cette analyse spectrale plus les données de la littérature (Pereira *et al.*, 2012) permet de proposer la structure **Isoscutellarein-7-O - β -D-glucopyranoside** (Fig.85)

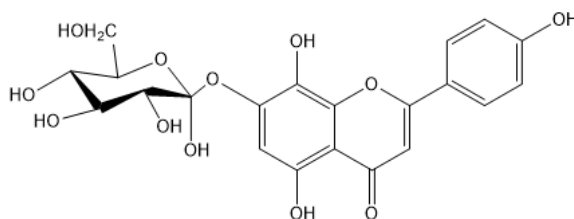


Figure 86. Isoscutellarein-7-O - β -D-glucopyranoside

Ce composé a déjà été isolé antérieurement de plusieurs espèces du genre *Veronica*, telles que *V. teucrium* L. et *V. jacquinii*. (Živković *et al.*, 2017)

Elucidation structurale du composé VAc4

L'analyse des spectres RMN ^1H et ^{13}C du **composé VAc 4** révèle une forte similitude avec les spectres du **composé VAc 3**, l'unique différence est la présence des signaux en plus dans la région osidique 3,30-4,40ppm .

On repère sur le spectre RMN ^1H tous les protons caractéristiques de **Isoscutellareine-7-O - β -D-glucopyranoside**, à savoir (Fig.87) :

- Un singulet à δH 6,85 d'intégration 1H attribués au proton H-3
- Deux doublets d'intégration 2H à δH 7,01 ($J = 8,5$ Hz) et 7,98 (H-2'/6') attribuable au protons . (H-3'/5')
- Un singulet d'intégration 1H à δH 6,69 attribuable au proton H-6
- Deux doublet d'intégration 1H à δH 4,79 (d, $J = 7,5$ Hz, H-1''') et 5,16 (d, $J = 8,1$ Hz, H-1'') caractéristiques de protons anomériques, ce ci révèle que le composé VAc4 est diosidique. Les grandes valeurs des constantes de couplage pour ces deux protons indiquent une conformation β pour chaque unité osidique.
- On observe également la présence d'un signal à 2,10 ppm d'intégration 3H sous forme singulet attribuable à un méthyle.

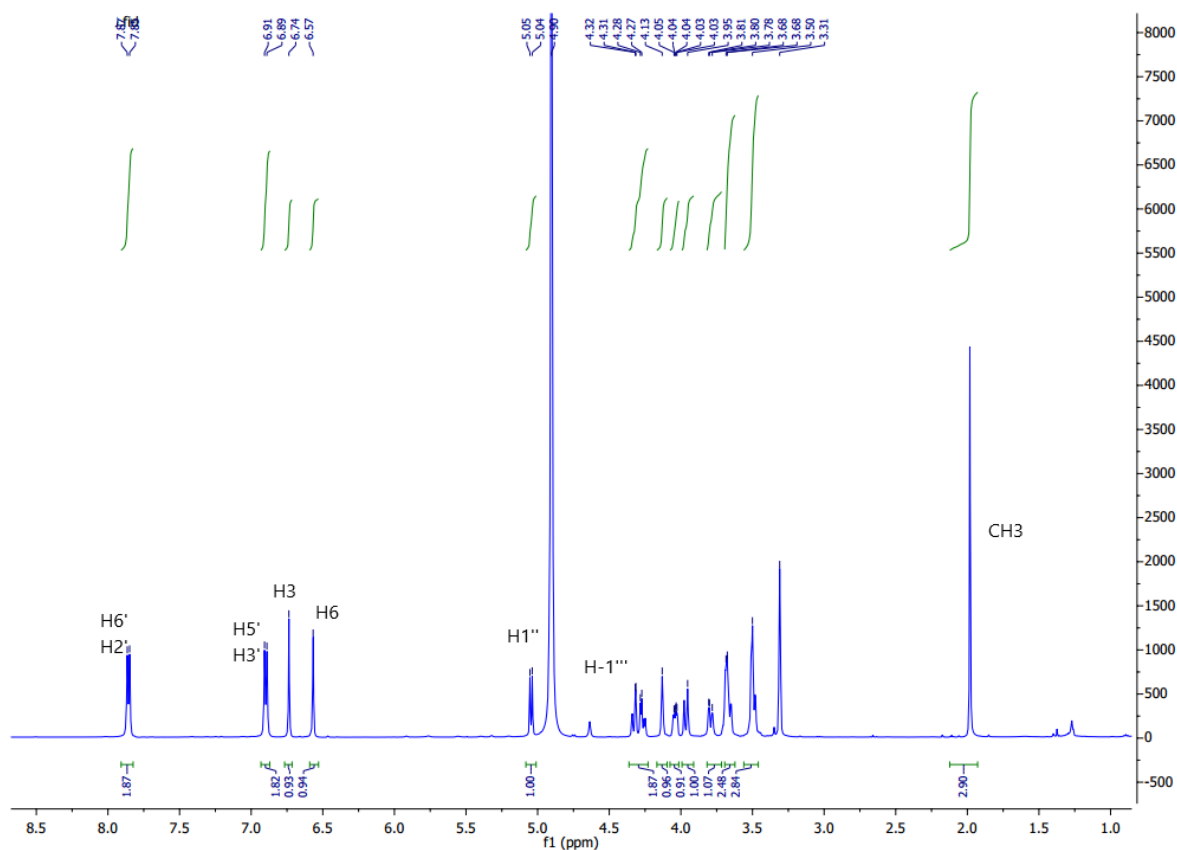


Figure 87. Spectre R MN ^1H du composé VAc4

Sur le spectre RMN ^{13}C (Fig.88) on constate : 29 signaux de carbones repartis en 14 carbones aromatiques, 12 osidiques, 2 carbonyles et un méthyle.



Figure 88. Spectre RMN ^{13}C du composé VAc4

La localisation des déplacements chimiques des protons et des carbones osidiques a été effectuée par comparaison avec les données de la littérature (Chari *et al.*, 1981, Abdel-Sattar *et al.* 1995), qui suggèrent que les deux unités hexose sont un glucose et un allose.

- Les signaux de carbones caractéristiques du β -D-glucose sont : δ_{C} 83,9 (C-2''), 77,4 (C-3''), 70,6 (C-4''), 78,3 (C-5'') et 62,1 (C-6'').
- Les signaux de carbones caractéristiques du β -D-allose sont : δ_{C} 72,9 (C-2'''), 72,5 (C-3'''), 68,2 (C-4'''), 73,3 (C-5''') et 64,8 (C-6''').

Les taches de corrélations sur le spectre HMBC (Fig. 89) indiquent une glycosylation en C7 et une liaison β -D-glucosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-allose. On effect observe des tâches de corrélation entre le carbone C-7 (δ_{C} 153,85) et H-1'' (δ_{H} 5,16) et entre le proton anomérique à δ_{H} 4,79 et le carbone C-2'' résonant à δ_{C} 83,9 ppm. On repère également des corrélations entre les protons du méthyle (δ_{H} 2,10 ppm) et le carbone d'un carbonyle (δ_{C} 172,1 ppm), indiquant la présence d'un groupement acétyle. Ce carbonyle montre d'autres corrélations dans ce spectre avec les deux protons Ha-6''' et Hb-6''' de l'allose, révélant son estérification en position 6'''.

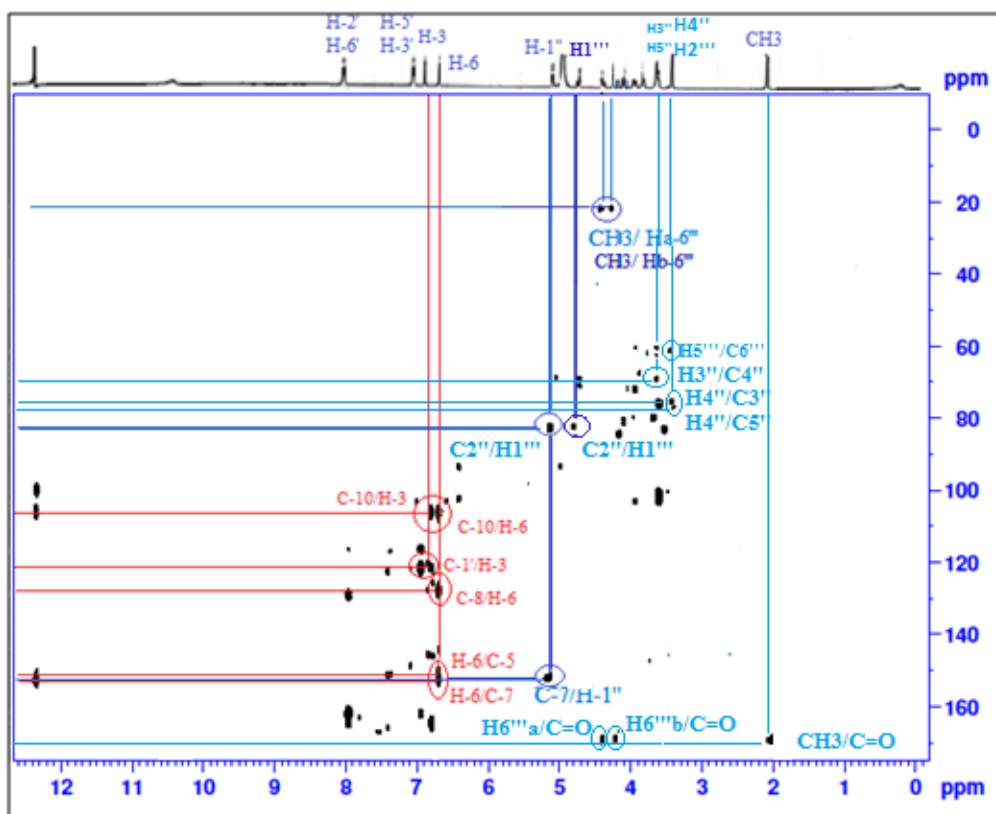


Figure 89. Spectre HMBC du composé VAc4

Ces données spectrales ainsi que la comparaison avec la littérature (Frezza *et al.*, 2022) permettent de proposer la structure isoscutellareine 7-O- [6-O-acétyl- β -D-allopyranosyl-(1 \rightarrow 2)] - β -D-glucoyranoside (Fig.90)

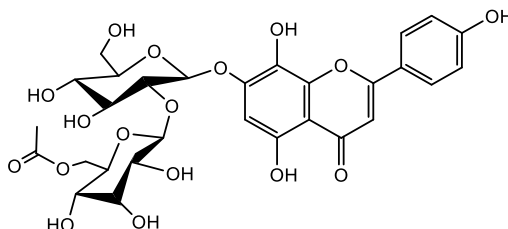


Figure 90. Isoscutellarein 7-O- [6-O-acétyl- β -D -allopyranosyl- (1 \rightarrow 2)] - β -D-glucoyranoside

Notons que l'isoscutellarein 7-O-[6-O-acétyl- β -D-allopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucoyranoside est un glycoside de flavone acétylé présent dans nombreuses espèces de *Veronica*. Il a été isolé à partir des parties aériennes de *Veronica fuhsii* et *V. multifida*, ainsi que de *Veronica orientalis* Mill, *Veronica multifida*.(Ozipek *et al.*, 2002) et *Veronica teucrium* (Živković *et al.*, 2017)

Les déplacements chimiques des protons et des carbones des composés 1,2,3,4 sont regroupés dans le tableau suivant

Tableau 7. Déplacements chimiques RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz) des composés 1.2.3et 4 identifié dans l'extrait de *V.rosea*

Position	VAc 1		VAc 2		VAc 3		VAc 4	
	^a δ _H	^a δ _C	^b δ _H	^b δ _C	^b δ _H	^b δ _C	^a δ _H	^a δ _C
2		165,1		164,4		164,5		166,4
3	6,75, s	102,8	6,80, s	103,9	6,81, s	103,0	6,85, s	103,6
4		183,0		182,3		182,8		184,3
5		150,4		157,7		152,6		151,7
6	6,59, s	100,2	6,26, s	99,4	6,70, s	99,9	6,69, s	101,5
7		152,5		157,5		150,9		153,8
8		128,2		125,7		127,9		129,7
9		143,7		149,8		144,2		145,0
10		106,2		102,8		106,0		107,6
1'		121,6		121,5		121,6		122,9
2'	7,88, d (10)	128,4	8,14, d (8,8)	129,6	7,95, d (8,8)	129,1	7,98, d (8,5)	129,5
3'	6,91, d (10)	115,6	6,93, d (9)	116,8	6,95, d (9,6)	116,4	7,01, d (8,5)	116,8
4'		161,5		161,7		161,8		162,7
5'	6,91, d (10)	115,6	6,93, d (9)	116,8	6,95, d (9,6)	116,4	7,01, d (8,5)	116,8
6'	7,88,d (10)	128,4	8,14, d (8,8)	129,6	7,95, d (8,8)	129,1	7,98, d (8,5)	129,5
1''			4,67, d (7,7)	106,9	5,09, d (8,0)	100,9	5,16, d (7,5)	102,6
2''			3,42,t (8,0)	74,5	3,60, t (9,8)	83,1	3,80, m	83,9
3''			3,32,t (8,1)	77,7	3,48, m	76,1	3,63, m	77,4
4''			3,25, m	69,6	3,27, m	69,4	3,43, m	70,6
5''			3,25, m	76,4	3,52, m	77,6	3,63, m	78,3
6''(a)			3,67, dd (12,0;	60,9	3,75, dd (12,5;	61,0	3,80, m	62,1
(b)			4,0)		4,0)		3,91, dl (12)	
1'''			3.58, dd (12;8,0)		3,88, dd		4,74, d (8,1)	104,2
2'''					(12,5;8,5)		3,43, m	72,9
3'''							4,25, t (2,5)	72,5
4'''							4,08, dl (12)	68,2
5'''							3,63, m	73,3
6'''(a)							4,40, dd (12; 5)	64,8
(b)							4,16, dd (12;2,5)	
CH₃							2,10, s	20,8
C=O								172,9

Elucidation structurale du composé VAc 5

Le spectre RMN ¹H du produit **VAc5** (Fig.91) présente des signaux des protons aromatiques caractéristique d'un noyau flavonoïde répartis comme suit :

- Un signal singulet sortant à δH 6,60 d'intégration 1H attribué au proton H-3.
- Deux singulets larges d'intégration 1H pour chacun résonant à δH 6,21 et 6,46 attribués aux protons H-6 et H-8, respectivement du cycle A.
- Deux doublets d'intégration 2H pour chacun résonant à δH 6,94 et 7,85 attribués aux protons H-3'/H-5' et H-2'/H-6', respectivement du cycle B.

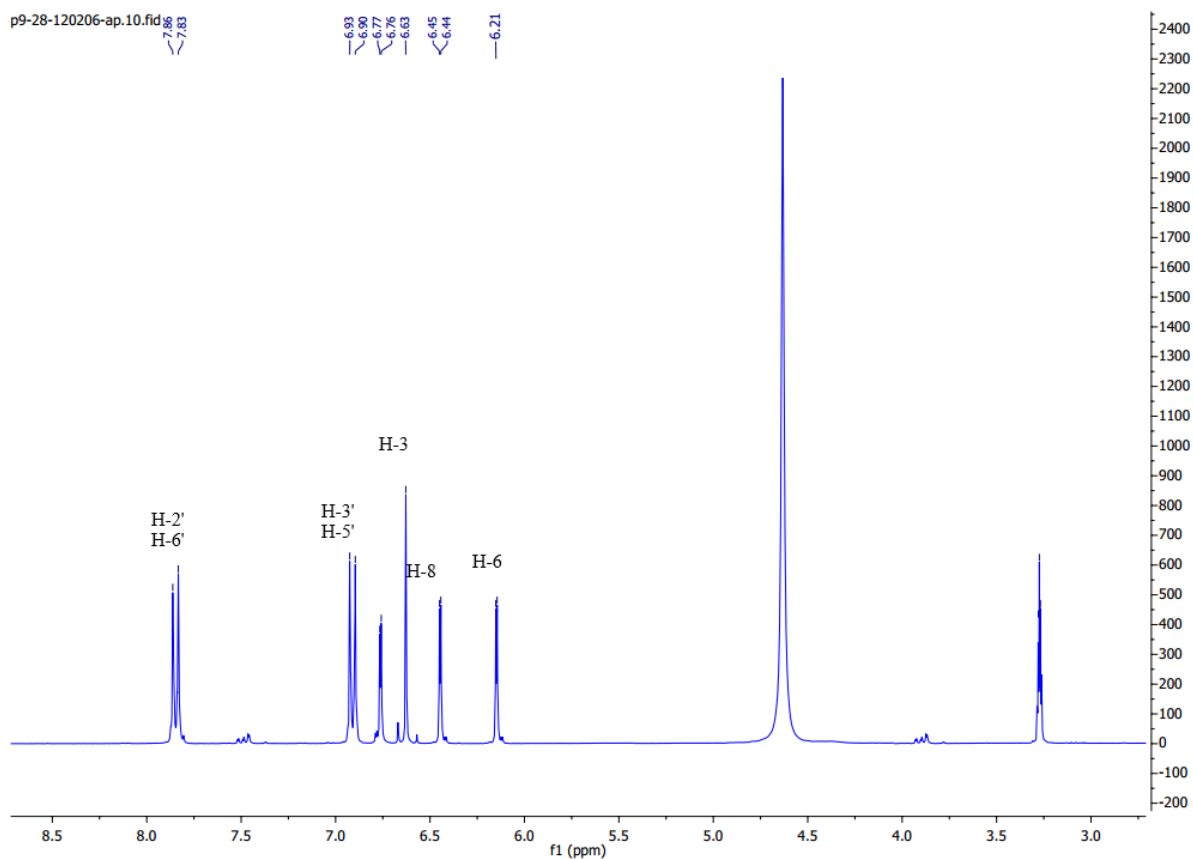


Figure 91. Spectre R MN 1H du composé VAc5

Le spectre RMN ^{13}C (Fig.92) révèle la présence de quinze atomes de carbone repérés à δC 102,4 (C-3), 98,8 (C-6), 93,7 (C-8), 128,1 (C-2'/C-6'), 115,7 (C-3'/C-5'), 164,6 (C-2), 182,6 (C-4), 161,8 (C-5), 164,9 (C-7), 158 (C-9), 103,9 (C-10), 121,8 (C-1') et 161,3 (C-4').

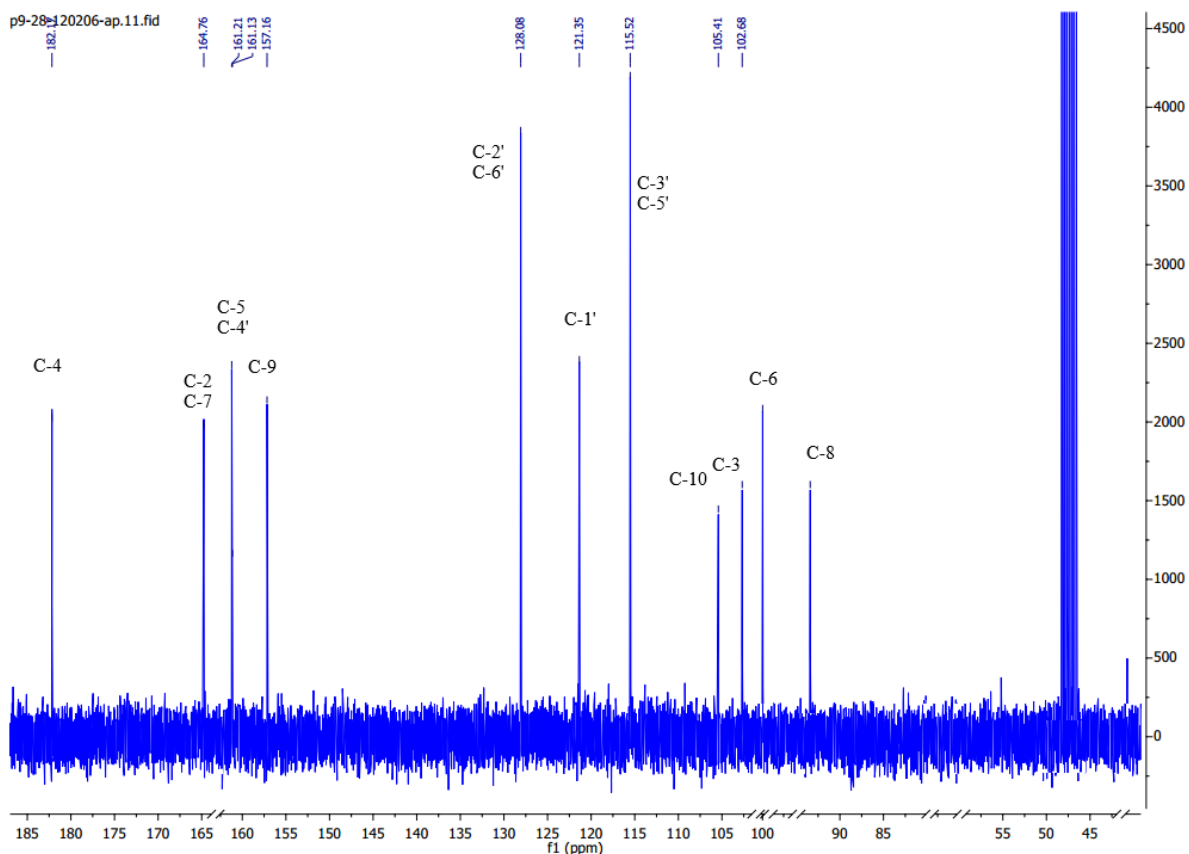


Figure 92. Spectre RMN ^{13}C du composé VAc5

Ces élucidations spectrales ainsi que la comparaison avec la littérature (Owen *et al.*, 2003) permettent d'assigner le composé **VAc5** la structure : 5,7,4' trihydroxyflavone connu sous le nom Apigénine (Fig.93)

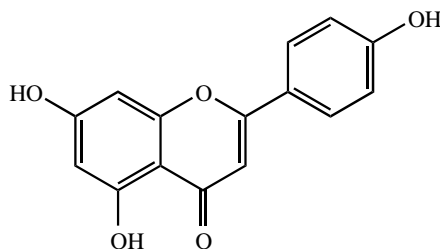


Figure 93. Apigénine

L'apigénine apparaît comme le composé le plus caractéristique des *Veronica*. (Nikolova *et al.*, 2005). On la retrouve dans *V. teucrium*, *V. jacquinii* and *V. urticifolia* (Bera *et al.*, 2015) *V. triloba* , *V. cymbalaria* , *V. alpina* , *V. bellidioides* , *V. officinalis* et *V. beccabunga* (Nikolova *et al.*, 2005)

Elucidation structurale du composé VAc 6

La comparaison entre les spectres RMN ^1H des **composés VAc 5 et VAc 6** indique que ce dernier possède des signaux d'une flavone glycosylée de type Apigénine.

On observe clairement sur le spectre du composé **VAc 6** (Fig.94) les signaux du noyau Apigenine suivants :

- Deux doublets à δ H 7,86 et 6,91 ppm d'intégration 2H chacun, attribuables aux protons (H-2', H-6') et (H-3', H-5') du noyau B.
- Un singulet à δ H 6,80 ppm d'intégration 1H attribuable au proton H-3.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun à δ H 6,63 et à δ H 6,47 correspondant aux protons H-8 et H-6 du cycle A.
- Ce spectre présente également des signaux caractéristiques d'un hexose:
 - Un doublet à 3,93 ppm attribuable au proton H-6b''
 - Un doublet de doublet résonant à 3,72 ppm correspondant au proton H-6a''
 - Plusieurs multiplets apparaissent dans la région de 3,2 à 3,7 ppm, accompagnés d'un doublet à 5,06 ppm avec une intégration de 1H, attribuable au proton anomérique H-1'' du glucose. La valeur de la constante de couplage ($J= 7,3$ Hz) indique qu'il est de configuration β .

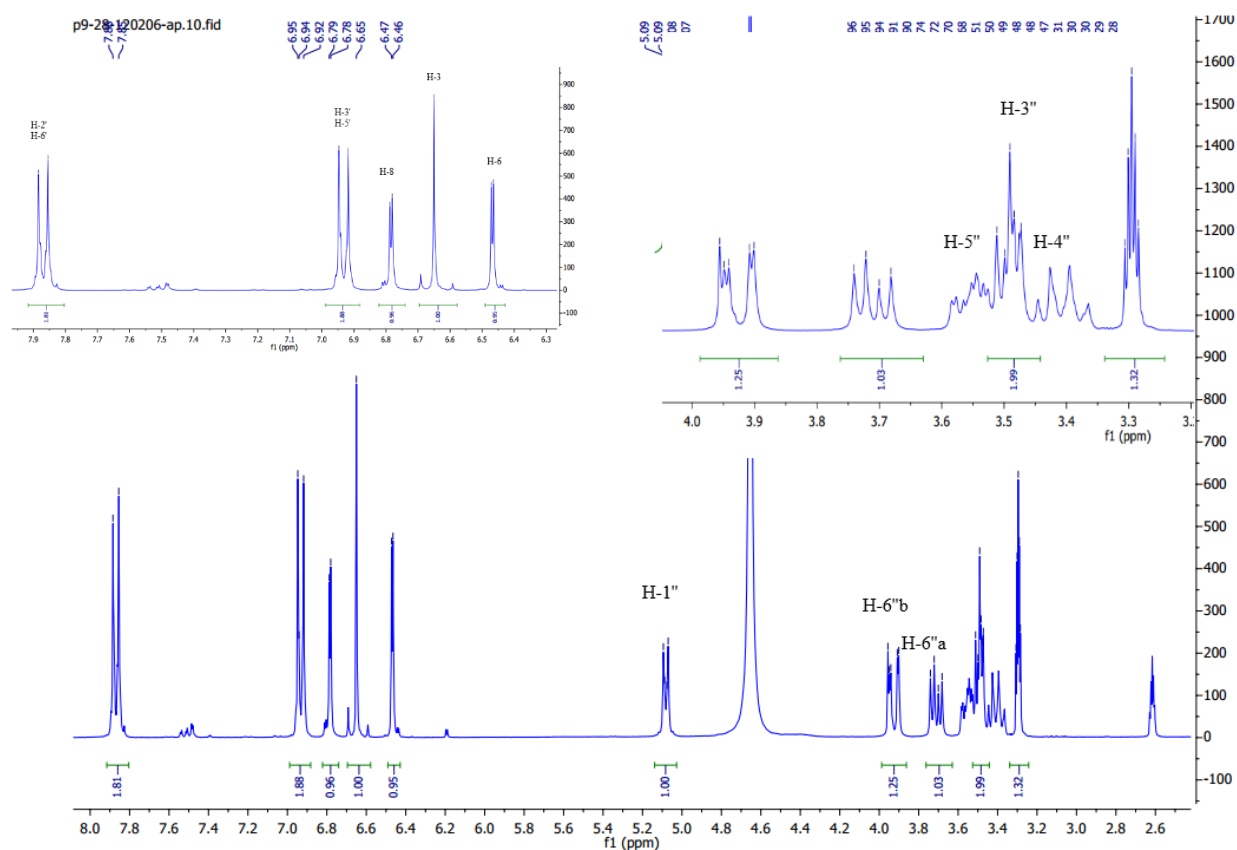


Figure 94. Spectre R MN ¹H du composé VAc6

Le spectre RMN¹³C du **composé VAc6** (Fig.95) présente 21 signaux distincts dont quinze correspondent aux signaux du noyau Apigénine, et six signaux caractéristiques d'un glucopyranoside.

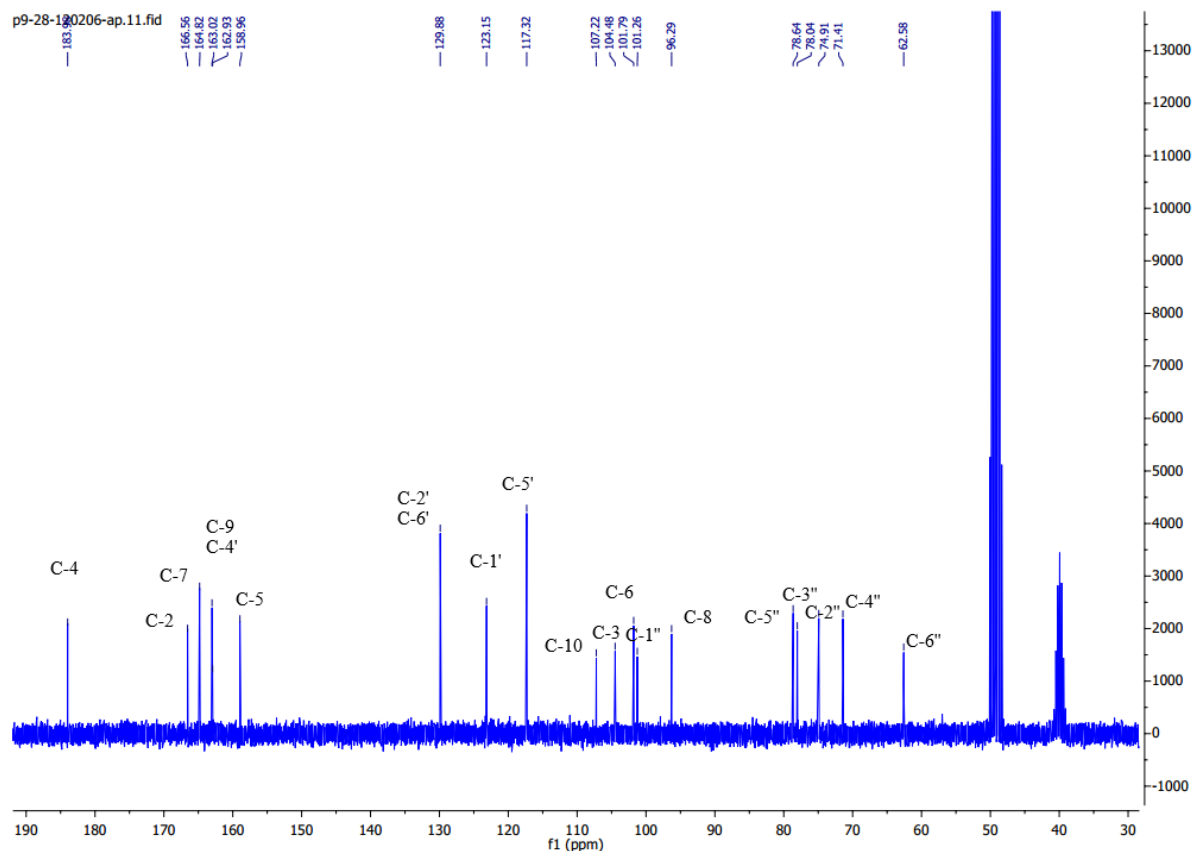


Figure 95. Spectre RMN ¹³C du composé VAc6

L'ensemble de ces données spectrales ainsi que la comparaison avec les données de la littérature (Frezza *et al.*, 2022) nous permettent d'attribuer au **composé VAc6** la structure 5,4'-dihydroxyflavone-7-O-β-D-glucoside appelé également **Apigenin-7-O glucopyranoside** (Fig.96)

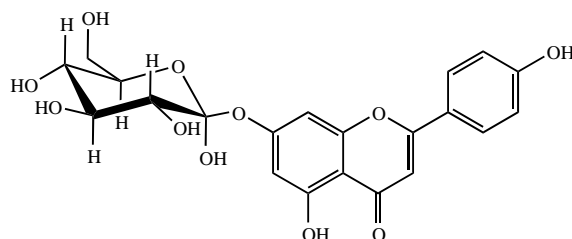


Figure 96. Apigenine-7-O-β-glucopyranoside

L' Apigenin-7-O- β -glucopyranoside a été antérieurement caractrisée dans les espèces suivantes *V. teucrium*, *V. jacquinii* et *V. urticifolia* (Beara *et al.*, 2015)

Les déplacements chimiques des protons et carbones des **composé VAc 5 et VAc 6** sont regroupés dans le tableau suivant.

Tableau 8. Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) des composés **VAc 5 et 6** identifié dans l'extrait de *V.rosea*

position	VAc 5		VAc 6	
	^a δ_{H}	^a δ_{C}	^b δ_{H}	^b δ_{C}
2		164,6		166,5
3		102,4	6,80, s	104,4
4	6,60, s	182,6		183,9
5		161,8		158,9
6	6,21, s	98,8	6,47, d(3,0)	101,1
7		164,9		161,0
8	6,46, s	93,7	6,63, d(3,0)	96,2
9		158		162,9
10		103,9		107,2
1'		121,8		123,1
2'		128,1	7,87, d (9,0)	129,8
3'	7,85, d (9,0)	115,7	6,91, d (7,5)	117,3
4'	6,94, d (7,5)	161,3		162,7
5'		115,7	6,91, d (7,5)	117,3
6'	6,94, d (7,5)	128,1	7,87, d (9,0)	129,8
1''	7,85, d (9,0)		5,08, d (7,3)	101,7
2''			3,48, m	74,9
3''			3,50, m	77,9
4''			3,40,t (10)	71,4
5''			3,58, t (9,5)	78,6
6''(a)			3,71, dd(6,0;12,5)	62,5
(b)			3,93, dl (13,0)	

Elucidation structurale du composé VAc 7

Les données spectrales RMN ^1H du **composé VAc 7** révèlent des signaux aromatiques d'un flavonoïde de type lutéoline (Fig.97) caractérisé par ;

- Un singulet à δ_{H} 6,50 attribuable au proton H-3.
- Deux doublet à δ_{H} 6,16 et 6,40 attribuables aux protons H-6 et H-8 en position méta du cycle A

- Un doublet à δ H 6,86 correspondant au proton H-5'
- Un multiplet à 7,35 ppm d'intégration 2H attribuable aux protons H-2' et H-6'.

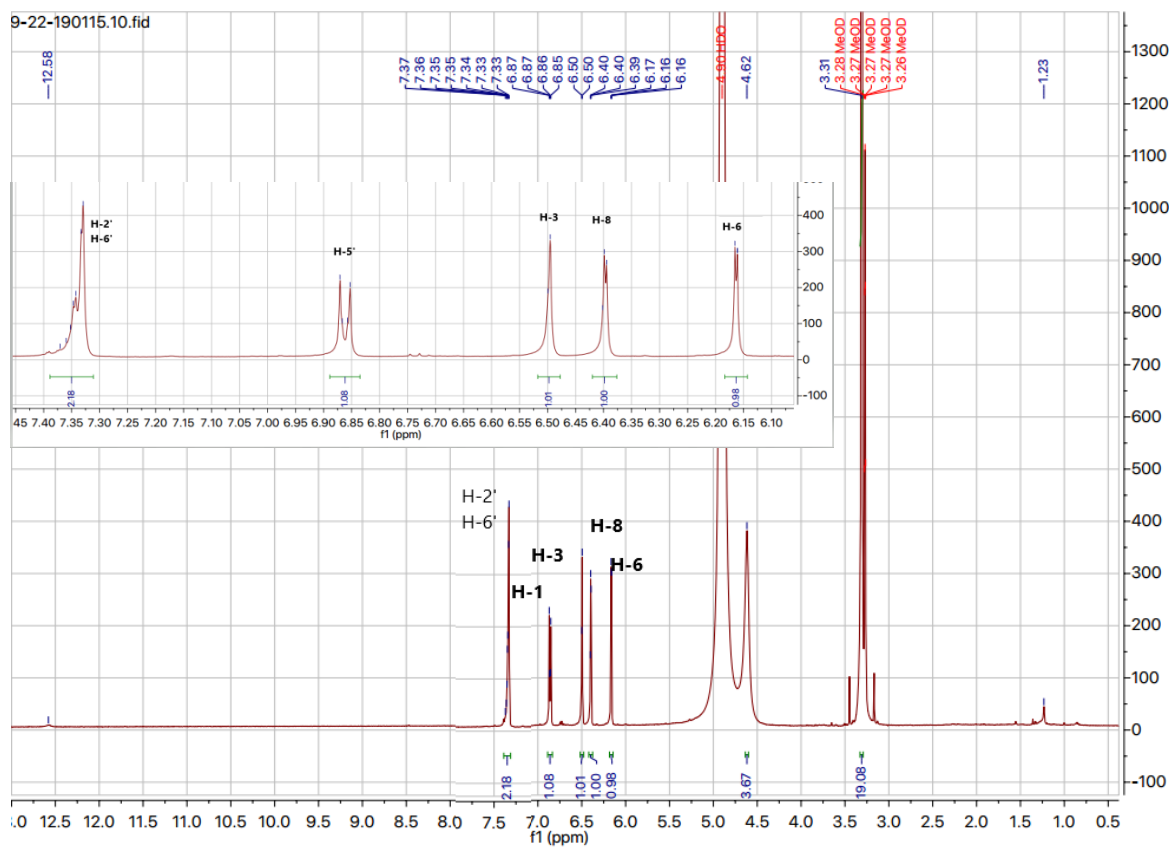


Figure 97. Spectre R MN ^1H du composé VAc7

Le spectre RMN ^{13}C du **composé VAc 7** (Fig.98) montre clairement les déplacements chimiques des carbones caractéristiques du noyau lutéoline résonant à : δ C182,4 (C-4), 164,8(C-7),164,6 (C-2), 161,7 (C- 5), 157,9 (C-9), 149,6 (C-4'), 145,6 (C-3'), 122,2 (C-1'), 118,9 (C-6'), 115,3 (C-5'), 112,7 (C-2'),103,8 (C-10), 102,4 (C-3), 98,7 (C-6) et 93,6 (C-8).

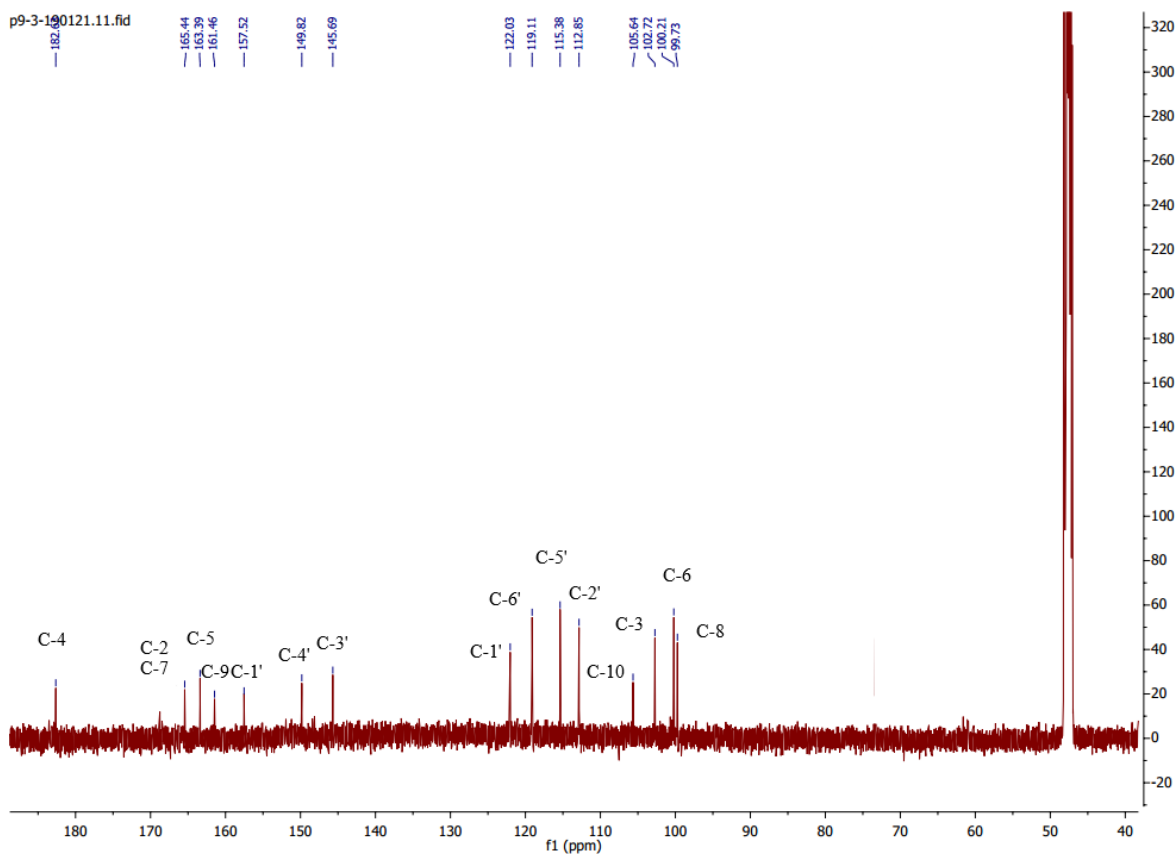


Figure 98. Spectre RMN ^{13}C du composé VAc7

Toutes ces analyses spectrales, associées à la comparaison avec les données bibliographiques (Francisco *et al.*, 2014) permettent de proposer pour le **composé VAc 7** présente la structure de la 5,7,3',4'-tétrahydroxyflavone, connu sous le nom **lutéoline**.(Fig.99)

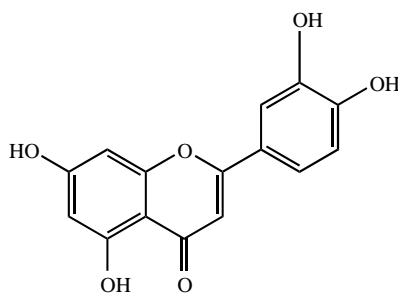


Figure 99. Luteoline

Elucidation structurale du composé VAc 8

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C du **composé VAc 8** sont quasiment identiques à ceux du **composé VAc7** et révèlent la présence des signaux d'une flavone osidique de type lutéoline glycosylée, identifiables par (Fig.100) :

- Deux singulets larges à 6,49 et 6,79 ppm attribuables aux protons (H-6) et (H-8) respectivement.
- Un singulet à δH 6,60 d'intégration 1H correspondant au proton H-3.

- Un doublet d'intégration 1H repéré à 6,90 ppm attribuable au proton H-5'.
- Un massif à 7,40 ppm d'intégration 2H correspondant aux protons H-2' et H-6'

Pour la partie osidique, le spectre RMN ¹H étalé présente :

- Un doublet à δH 5.06 ppm (J= 9,4 Hz) attribuable au proton anomérique. La constante de couplage est en faveur d'une configuration β-osidique.
- Un multiplet résonant à δH 3,50 attribuable aux protons H-2'' et H-3'' respectivement.
- Un triplet sortant à δH 3,41 correspondant au carbone H-4''.
- Un signal à δH 3,55 attribuable au proton C-5''.
- Deux signaux sous forme de doublet de doublet à δH 3,94 et à 3,73 attribuable aux Protons H-6''α et H-6''β.

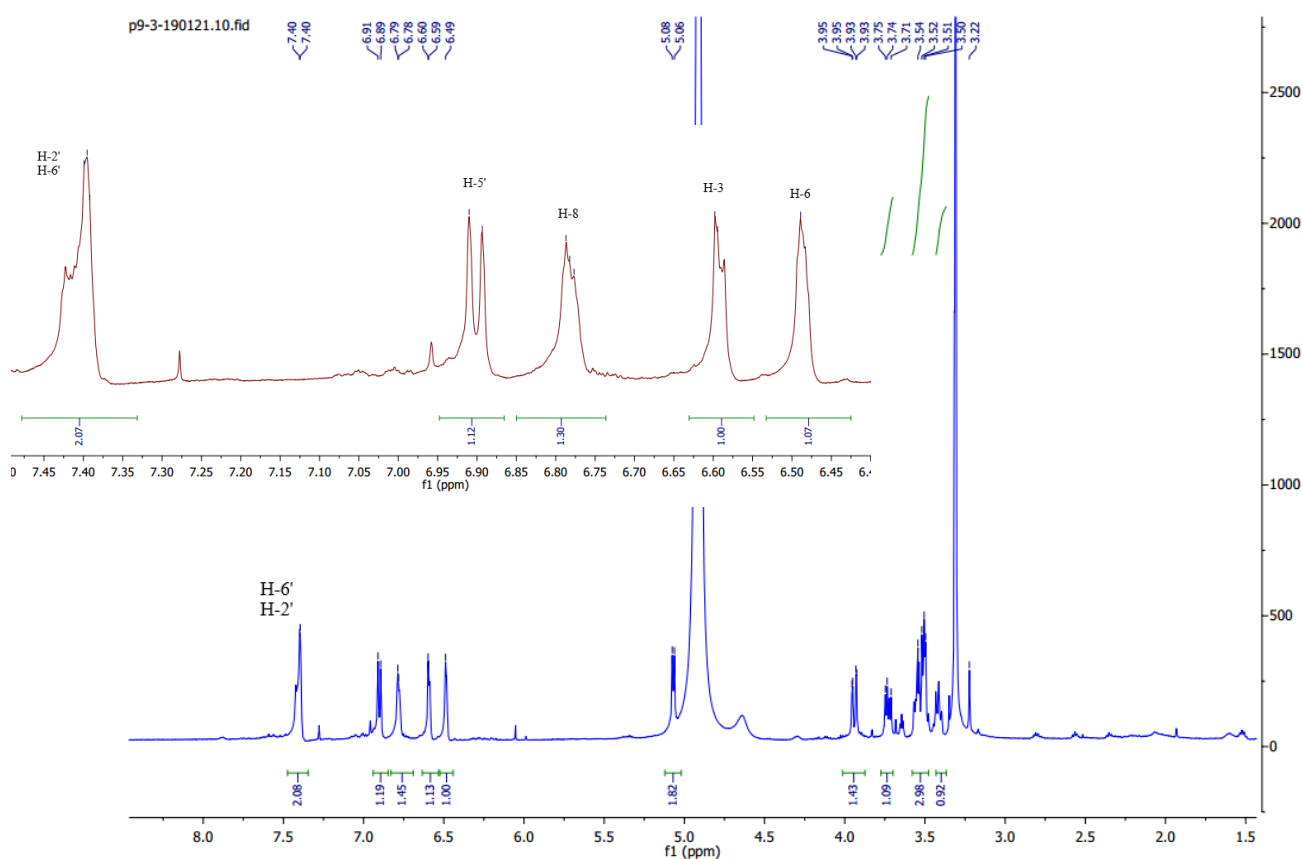


Figure 100. Spectre RMN ¹H du composé VAc8

Les déplacements chimiques des carbones sont déduits par analyse combinée des spectres RMN ¹³C (Fig.101) et HSQC (Fig.102). Ils sont localisés à : δC182,6 (C-4), 165,4 (C-2), 163,3 (C-7), 161,4 (C-5), 157,5 (C-9), 149,4 (C-4'), 145,6 (C-3'), 122,0 (C-1'), 119,1 (C-6'), 115,3 (C-5'), 112,8 (C-2'), 105,6 (C-10), 102,7 (C-3), 99,7 (C-6), 94,6 (C-8), 100 (C-1''), 76,9 (C-5''), 73,3 (C-3''), 76,4 (C-2''), 69,8 (C-4''), 61,0 (C-6'') et 76,9 (C-5'').

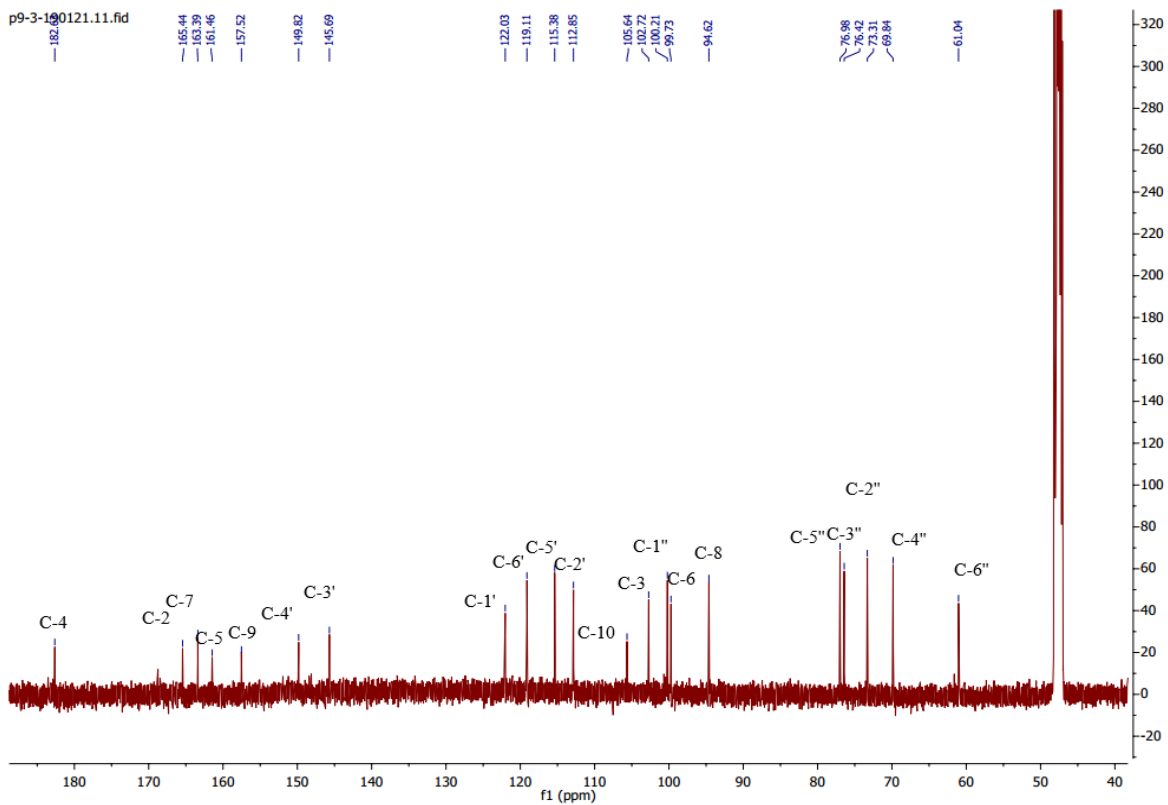


Figure 101. Spectre RMN ^{13}C du composé VAc8

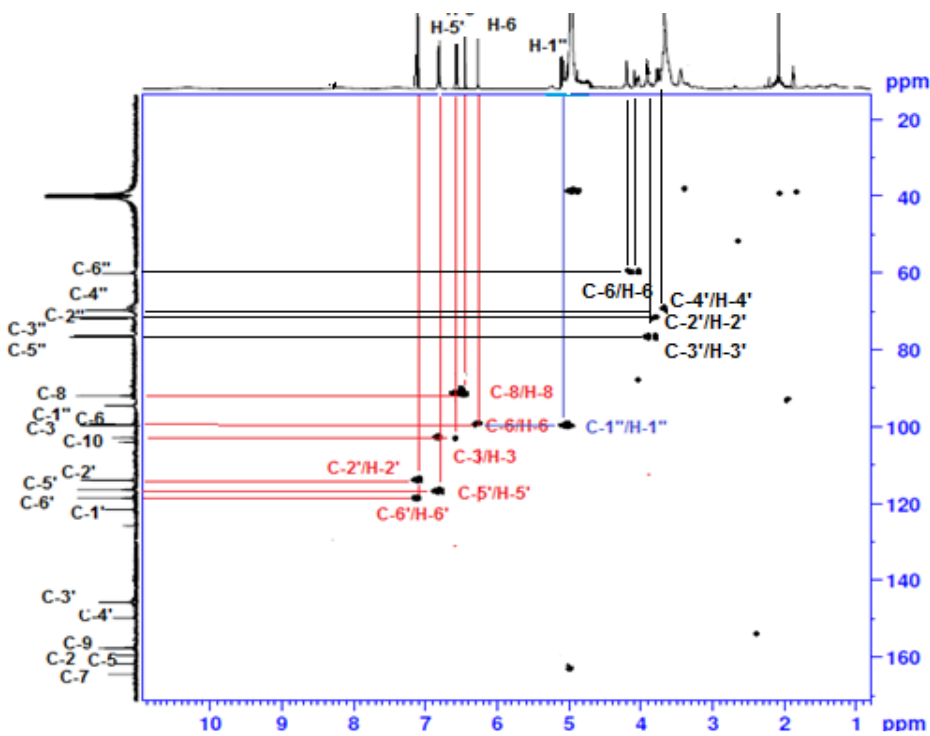


Figure 102. Spectre HSQC du composé VAc8

Le point de branchement du glucose avec la flavone lutéoline est localisé en position C-7 en raison de la présence d'une tache de corrélation sur le spectre HMBC (Fig.103) entre le proton anomère H-1'' et le carbone C-7 (163,3 ppm).

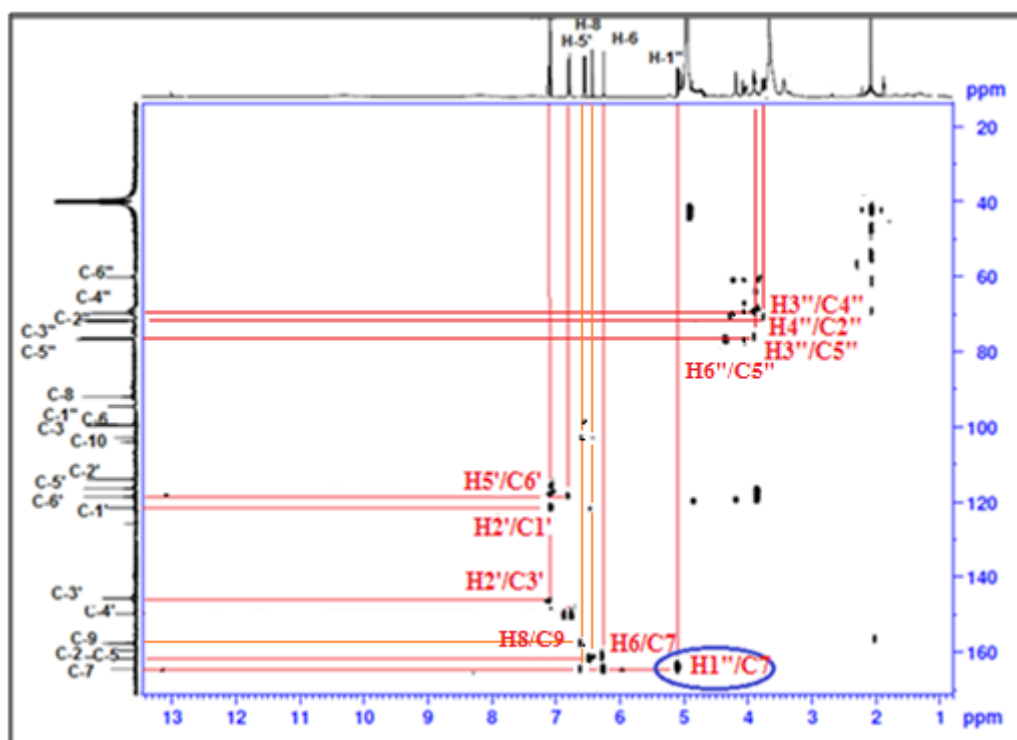


Figure 103. Spectre HMBC du composé VAc8

L'analyse spectrale ainsi que la comparaison avec les données existantes dans la littérature (Francisco et al., 2014) nous permettent de déterminer de manière précise la structure du composé 8 comme étant le 5,3',4' trihydroxyflavone7-O- β -D-glucoside, appelé aussi **lutéoline7-O- β glucoside**. (Fig.105)

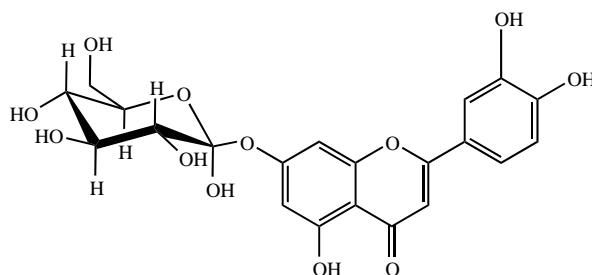


Figure 104. Luteolin-7-O-Glucoside

La lutéoline et l'apigénine 7-O-glycosides sont très courantes dans les espèces du genre *Veronica*. (Taskova et al., 2008) . Le Luteolin-7-O-Glucoside a été retrouvé dans d'autres espèces comme *Veronica spicata L.*, *Veronica thymoides* (Saracoglu et al., 2004), *Veronica montana*, *V. polita*, *V. spuria* (Barreira et al., 2014), *V. teucrium*, *V. jacquinii*, *V. urticifolia* (Beara et al., 2015, Živković et al., 2017) et *V. fushii* (Ozipek et al., 1999)

Les déplacements chimiques des protons et carbones des **composés VAc 7 et VAc 8** sont regroupés dans le tableau suivant. (Tableau .9)

Tableau 9. Déplacements chimiques RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz) des composés 7 et 8 identifié dans l'extrait de *V.rosea*

position	VAc 7		VAc 8	
	^a δ _H	^a δ _C	^b δ _H	^b δ _C
2		164,6		165,4
3	6,50, s	102,4	6,60, s	102,7
4		182,4		182,6
5		161,7		161,4
6	6,16,d (5,0)	98,7	6,49, sl	99,7
7		164,8		163,3
8	6,40,d (5,0)	93,6	6,79, sl	94,6
9		157,9		157,5
10		103,8		105,6
1'		122,2		122,0
2'	7,35,m	112,7	7,40, m	112,8
3'		145,6		145,6
4'		149,6		149,4
5'	6,86, d (10)	115,3	6,91, d (9,0)	115,3
6'	7,35, m	118,9	7,40, m	119,1
1''			5,06, d (9,4)	100,2
2''			3,50, m	73,3
3''			3,50, m	76,4
4''			3,41, t (9)	69,8
5''			3,55, m	76,9
6''(a)			3,94, dd(12,5;2,5)	61,0
(b)			3,73, dd(12,5;6,0)	

Dans la littérature 46 flavonoïdes ou glycosides de flavonoïdes ont été isolés du genre *Veronica*. Un hydroxyle libre est généralement observé au C-5, C-6 ou C-8 du cycle A. Les sites de glycosylation des glycosides de flavone sont principalement présents au C-7 du cycle A, et l'acylation des sucres est une autre caractéristique de ces composés. La distribution des glycosides de flavone acylés chez les espèces de *Veronica* peut être utile du point de vue de la chimiotaxonomie du genre (Albach *et al.*, 2003 ; Saracoglu *et al.*, 2004 , Xue *et al.*, 2019)

Notons que les espèces retrouvées à des altitudes plus élevées présentent souvent une composition aglycone plus complexe par rapport à ceux des altitudes inférieures : *V.*

vindobonensis, *V. arvensis*, *V. verna*, *V. officinalis* et *V. beccabunga* en sont de bons exemples

Les populations qui poussent sur des roches calcaires et dans des conditions plus xériques présentent des teneurs plus élevées en flavonoïdes (*V. teucrium s.str.*) ou des profils aglycone plus complexes (*Veronica hederifolia*, *Veronica urticifolia*, *V. officinalis*)

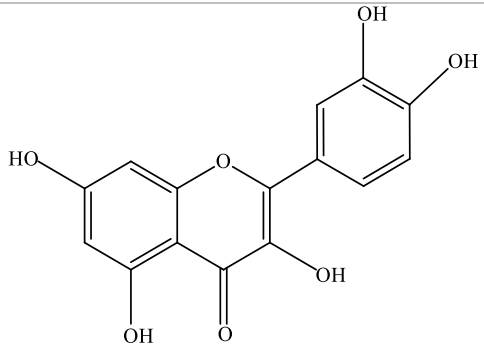
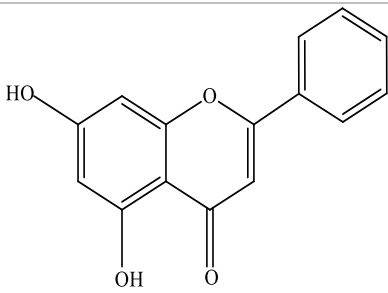
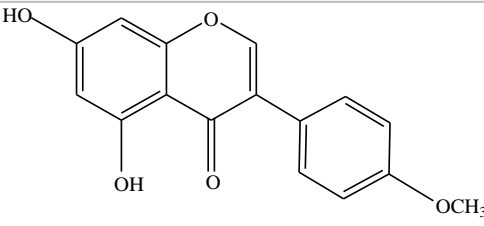
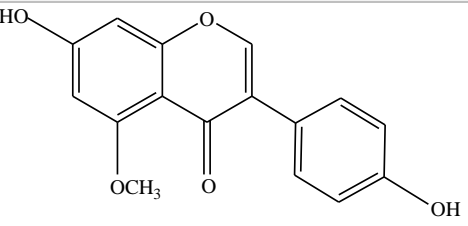
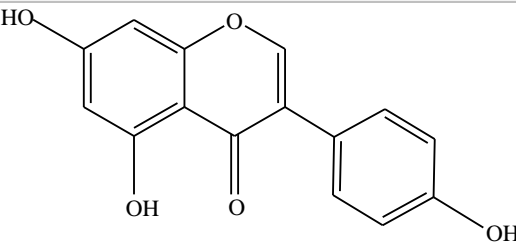
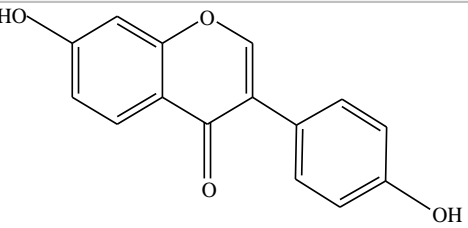
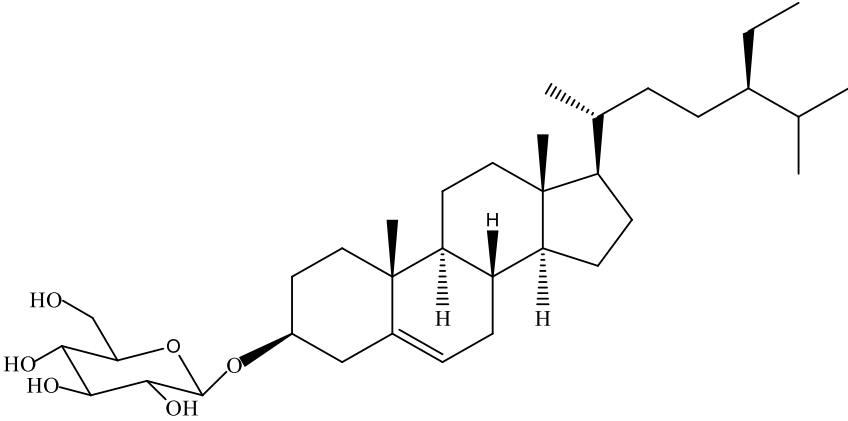
Au niveau des espèces, on a également observé certaines tendances d'accumulation liées à l'influence des conditions écologiques. Les espèces alpines vivaces *V. fruticulosa*, *V. fruticans*, *V. kellererii* et *V. alpina* contiennent des quantités considérables de flavones aglycones, principalement l'apigénine et la lutéoline non méthylées. Ce schéma pourrait s'expliquer par les habitats alpins xériques et la fonction présumée de protection contre les rayons UV des flavonoïdes présents à la surface des feuilles (Nikolova *et al.*, 2005)

V.2.3.2. Investigation chimique de l'espèce *Cytisus purgans*

Les méthodes d'analyse spectroscopiques telles que la RMN 1D (^1H , ^{13}C), la RMN 2D (COSY H-H, HSQC, HMBC), la spectrométrie de masse ESI-MS ainsi que la comparaison avec les données de la littérature, ont été utilisées également pour la détermination structurale des différents produits isolés de *Cytisus purgans* .

Les produits isolés et caractérisés de l'extrait *n*-butanolique de *C. purgans* sont organisés dans le tableau.10

Tableau10. Structure des biomolécules isolées de l'extrait *n*-butanolique de *C.purgans*

	
Quercetin	Chrysin
	
Biochanin A	Isoprunein
	
Genistein	Daidzein
	
Daucosterol	

Elucidation structurale du produit CPB1

Le spectre RMN ^1H du produit **CPB 1**(Fig.105) montre huit protons aromatiques répartis comme suit :

- Deux doublets d'intégration 2H chacun résonant à 6,85 et 7,35 attribuables aux protons (H-3', H-5') et (H-2', H-6') du cycle B substitué en position para.
- Deux autre doublets résonant à δ H 8,04 et 6,82 correspondant respectivement aux protons H-5 et H-8 du cycle A substitué en C-7.
- Doublet dédoublé détecté à δ H à 6,91 correspondant au proton H-6
- Un singulet résonant à δ H 8,14, relatif au proton H-2 d'une isoflavone.

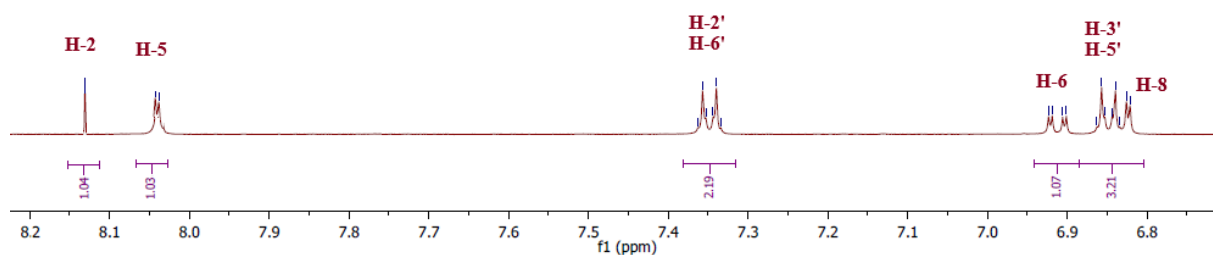


Figure 105. Spectre R MN ^1H du composé CPB 1

L'identification des déplacements chimiques des carbones du composé **CPB 1** est réalisée par l'analyse combinée des spectres RMN ^{13}C (Fig.106) et HSQC (Fig.107). Ils sont localisé à : δ C 102,1(C-8), 115 (C3',C-5'), 115,3(C-6), 123,1 (C-1'), 127,2 (C-5), 130,1 (C-2',C-6'), 153(C-2), 158,3 (C-9), 163,2 (C-7), 175,9 (C-4).

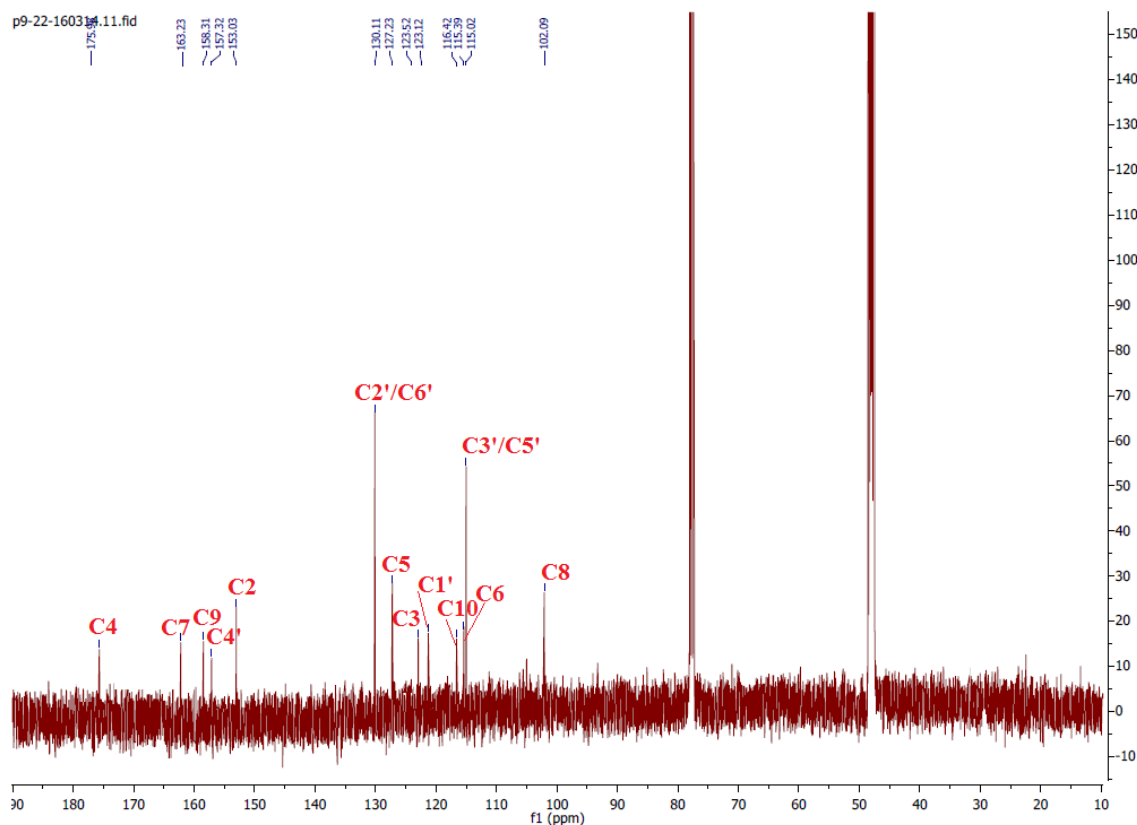


Figure 106. Spectre RMN ^{13}C du composé CPB 1

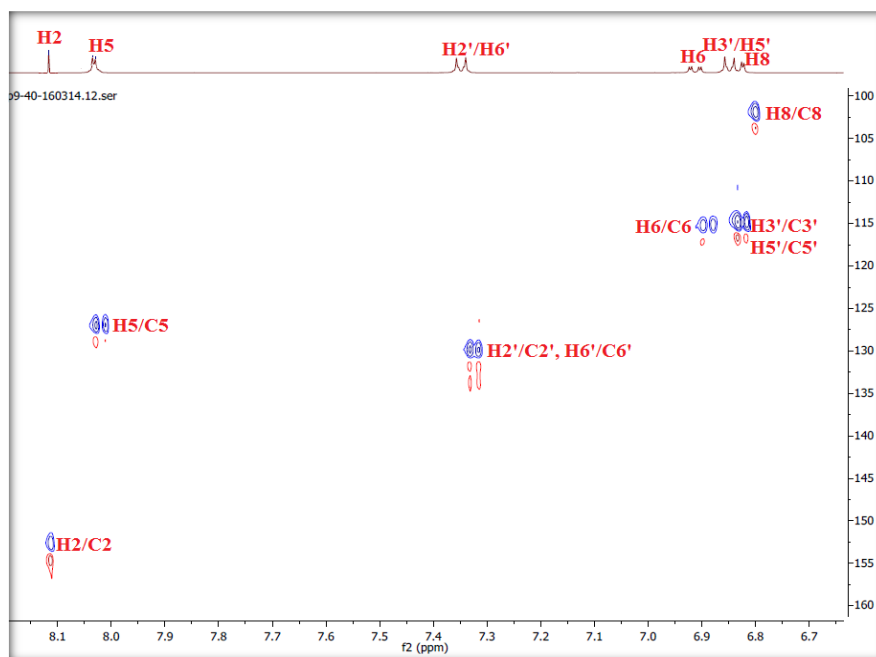


Figure 107. Spectre HSQC du composé CPB 1

En se basant sur ces résultats spectraux et la comparaison avec les références existantes, le composé a été identifié comme étant **la daidzéine** (Fig.108), une isoflavone également désignée sous le nom de 4',7-dihydroxyisoflavone retrouvée dans (Abreu *et al.*, 2017).

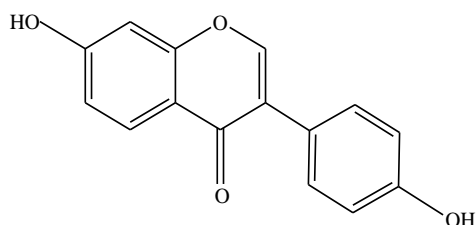


Figure 108. Daidzéine

Elucidation structurale du produit CPAc2

Le profil du spectre RMN ^1H du composé **CPB2** (Fig.109) est proche de celui du composé **CPB1**. On observe sur ce spectre :

- Un singulet sortant à δ_{H} 7,84 caractéristique du proton en position 2 du noyau isoflavone.
- Deux doublets repérés à δ_{H} 6,82 et 7,32 correspondant aux protons H-3'/H-5' et H-2'/H-6'
- Deux doublets résonant à δ_{H} 6,37 et 6,41 attribuables aux protons H-6 et H-8 respectivement.

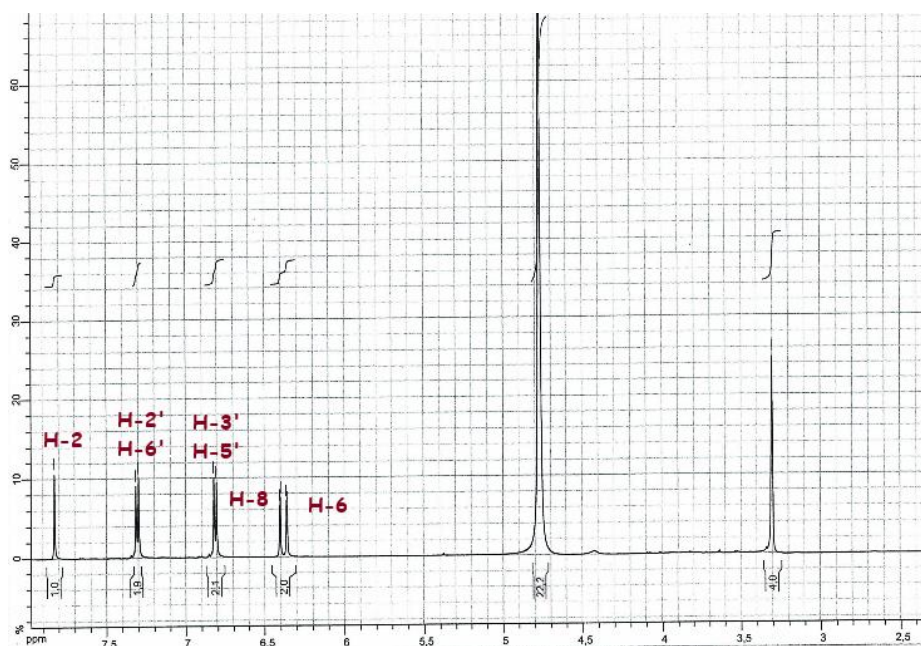


Figure 109. Spectre R MN ^1H du composé CPB2

Les corrélations de ces protons sur le spectre HSQC (Fig.110) ont permis de visualiser les déplacements chimiques de leurs carbones à : δ_{C} 152,9 (C-2), 98,3 (C-6) ; 93,1 (C-8) ; 114,9 (C-3', C-5') ; 130,3 (C-2', C-6').

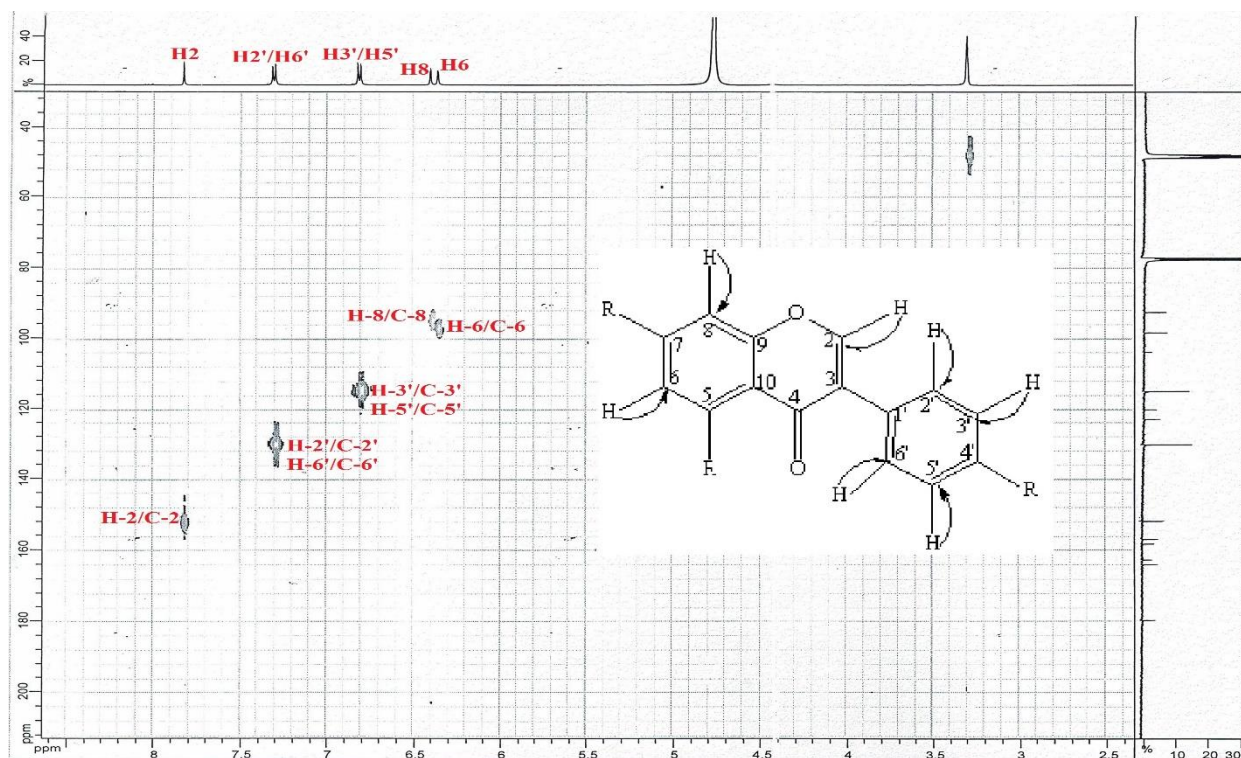


Figure 110. Spectre HSQC du composé CPB2

La multiplicité du proton H-6 (d, $J = 2$ Hz), ainsi que le déplacement du carbone C-5 à δ_{C} 162,6 indiquent la substitution du proton H-5 par un groupement hydroxyle.

Le spectre RMN¹³C (Fig.111) présente 13 signaux relatifs aux 15 atomes de carbones, avec des déplacements chimiques similaire aux carbones du composé **CPB 1** sauf pour le carbone C-5 oxygéné dans le composé **CPB 2**. Ce carbone est bien localisé sur le spectre HMBC à travers la tache de corrélations entre le proton aromatique H-6 à δ_H 6,37 et le carbone **C-5** à δ_C 162,6.

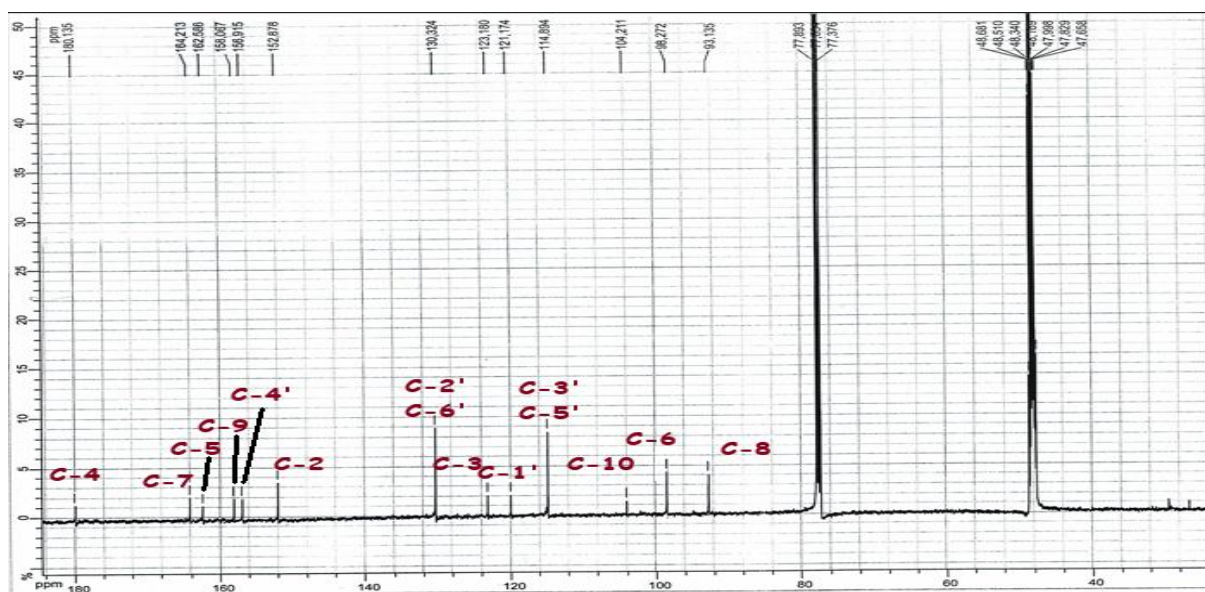


Figure 111. Spectre RMN ¹³C du composé CPB2

L'ensemble de ces données spectroscopiques ainsi que la comparaison avec les données bibliographiques (Venkata et al., 2013.) permettent d'identifier le composé **CPB2** au 4',5,7 trihydroxyisoflavone, connu sous le nom de Génistéine.(Fig.112)

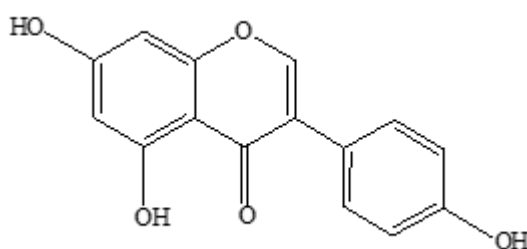


Figure 112. la génistéine

La genisteine a été isolée précédemment de *Cytisus jankae*, *Cytisus striatus* (Abreu et al., 2017), *C. scoparius* (Caramelo et al., 2022) et *Cytisus villosus* Pourr.(Larit, Nael, et al., 2018)

Elucidation structurale du produit CPB 3

Les spectres RMN ¹H et RMN ¹³C du composé **CPB 3** présentent une grande ressemblance avec ceux du produit **CPB 2**. L'unique différence entre ces deux composés est la présence d'un groupement méthoxyle à δ_H 3,90 (s, 3H) / δ_C 55,9

L'examen du spectre RMN¹H (Fig.113) permet de visualiser les signaux du squelette génistéine suivants:

- Un singulet d'intégration 1H détecté à δ_H 7,96 caractéristique du proton H-2 d'une isoflavone.
- Deux doublets d'intégration 2H chacun localisés à δ_H = 6.84 et 7.35 ppm correspondant aux protons H-3', H-5' et H-2', H-6' respectivement.
- Un singulet repéré à δ_H 6,43 ppm d'intégration 2H attribuable aux protons H-6 et H8 suggérant la di-substitution du noyau A.

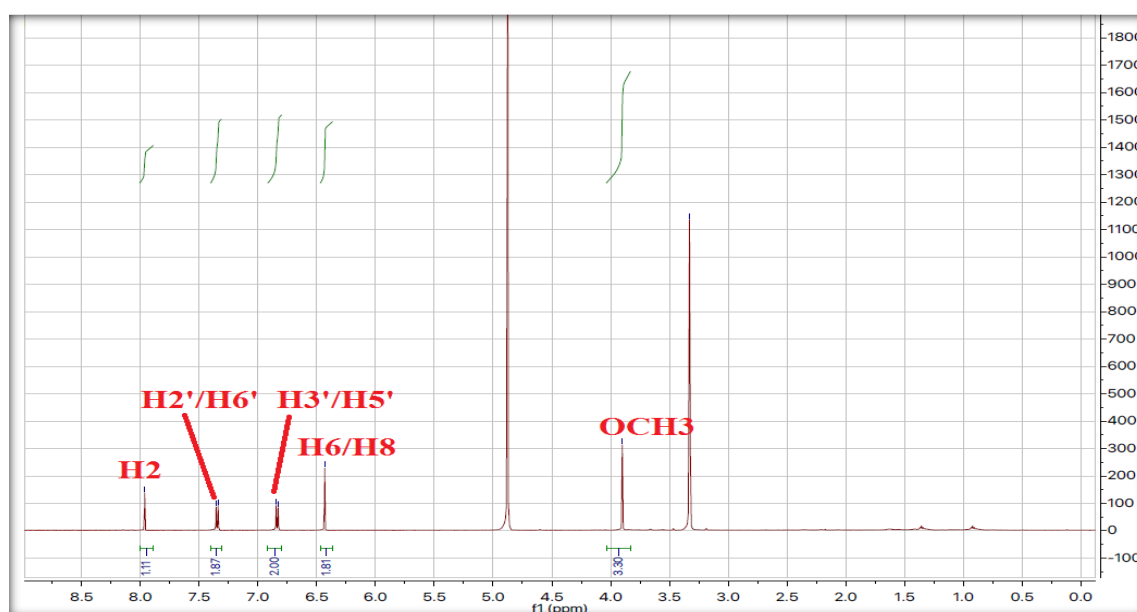


Figure 113. Spectre R MN ¹H du composé CPB 3

L'étude combinée des spectres RMN ¹³C (Fig.114) et HSQC (Fig.115) permet de déterminer tous les signaux des carbones du composé **CPB3**. Ils sont détectés à : δ_C 151,1 (C-2); 125,5 (C-3); 174,9 (C-4); 161,6 (C-5); 96,2 (C-6); 162,9 (C-7); 94,8 (C-8); 160,1 (C-9); 107,8 (C-10); 123,1 (C-1'); 130,2 (C- 2'/C-6'); 114,6 (C-3'/C-5'); 157,1(C-4') et OCH₃ à δ_C 55,9.

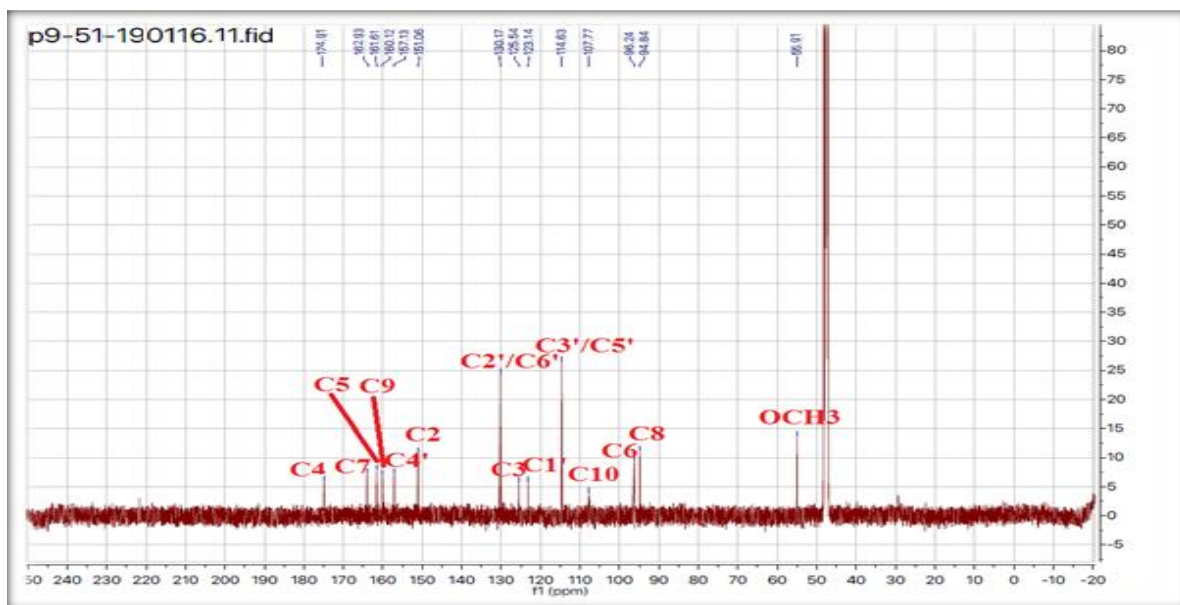


Figure 114. Spectre RMN ^{13}C du composé CPB3

La position du groupement OCH_3 est déterminé à partir de la tache de corrélation entre les protons OCH_3 à δ_{H} 3,90 et le carbone C-5 à δ_{C} 161,6 indiquant que ce groupement est localisé en position C-5.

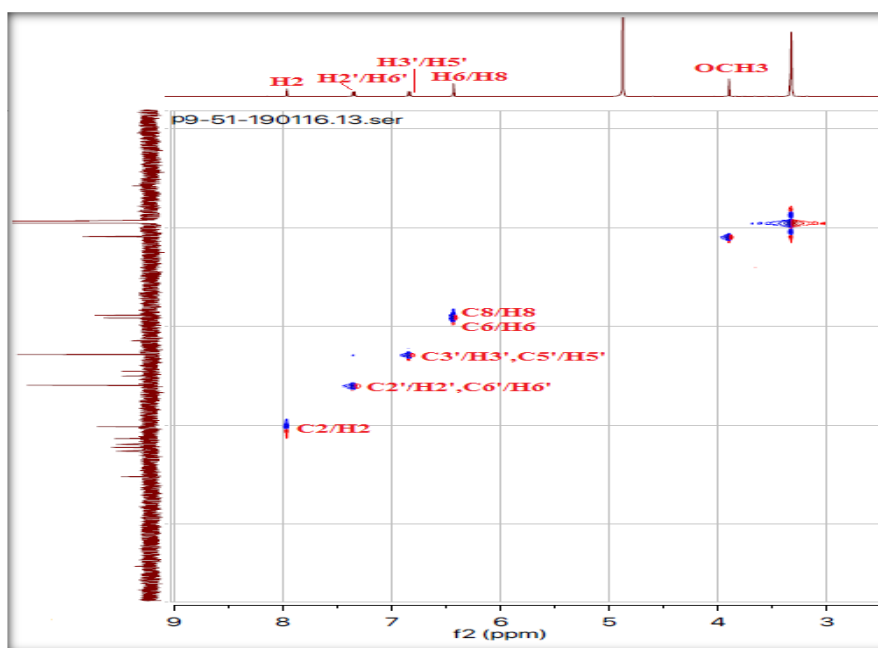


Figure 115. Spectre HSQC du composé CPB3

Toutes ces analyses spectrales ainsi que la comparaison avec les données de la littérature (Kamel *et al.*, 2024) permettent de déterminer le composé **CPB 3** comme: 7, 4' dihydroxy-5-méthoxyisoflavone connu sous le nom Isoprunétine (Fig.116)

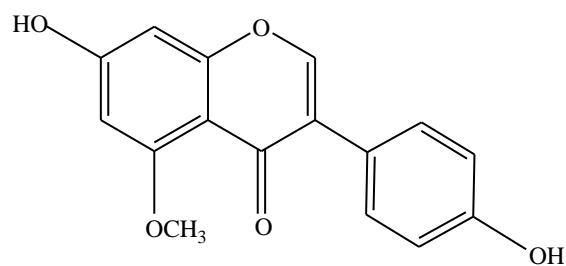


Figure 116. Isopruneine

Elucidation structurale du produit CPB 4

Les spectres RMN ^1H des deux composés **CPB 3** et **CPB 4** sont quasiment identiques par la présence de :

- Un singulet déblindé d'intégration 1H à δ_{H} 7,98 attribuable à H-2, caractérisant la structure isoflavone.
- Un singulet à δ_{H} 6,42 ppm d'intégration 2H correspondant aux protons aromatiques H-6 et H-8 du cycle A substitué en positions 5 et 7.
- Deux doublets d'intégration 2H à δ_{H} 6,82 et δ_{H} 7,33 attribuables aux protons H-3', H-5' et H-2', H-6' respectivement indiquant que le cycle B est substitué en position 4'.
- Un singulet à δ_{H} 3,88 d'intégration 3H attribuable à un groupement méthoxyle (Fig.117)

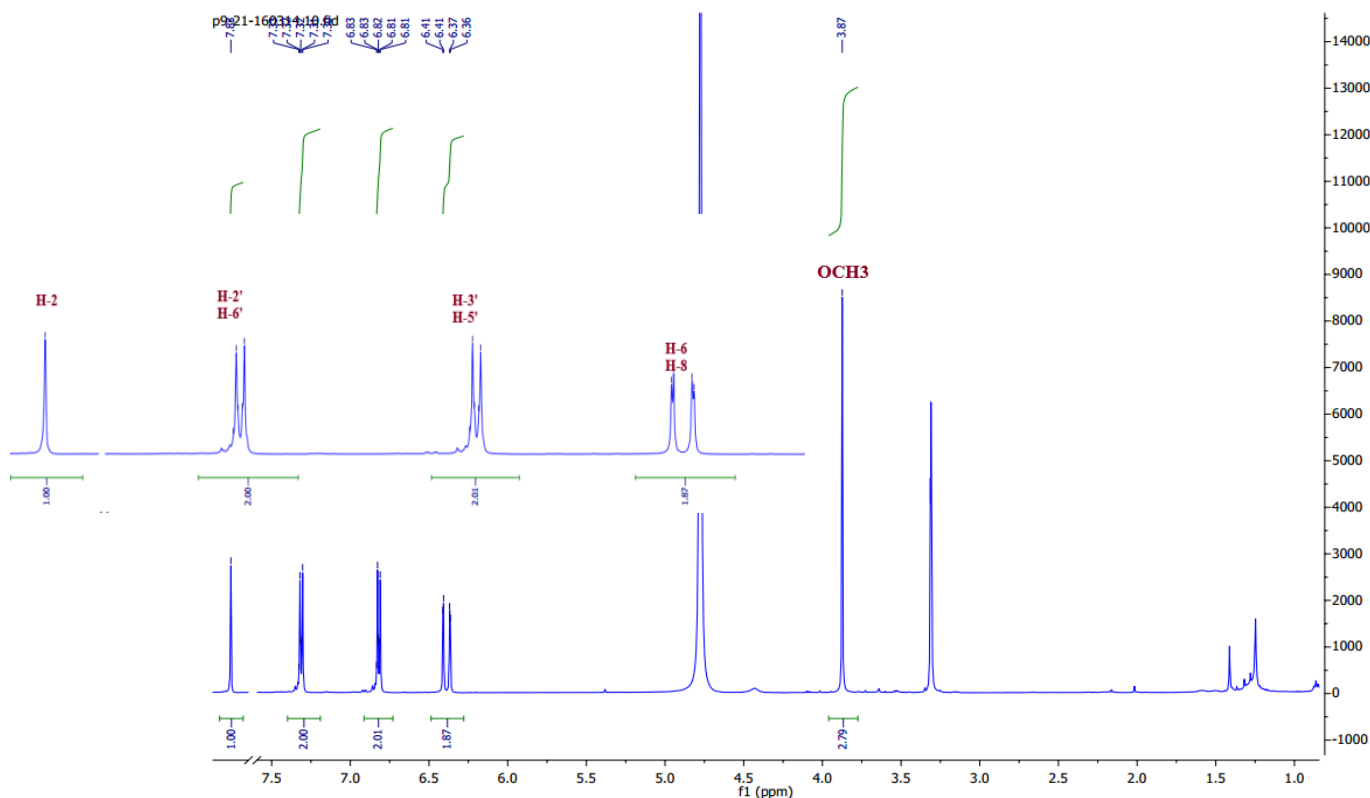


Figure 117. Spectre R MN ^1H du composé CPB4

L'analyse du spectre HMBC (Fig.118) permet de localiser le branchement du groupement méthoxyle sur l'isoflavone par la présence d'une tache de corrélation entre ce groupement à δ_H 3,88 et le carbone quaternaire C-4' à δ_C 161,1.

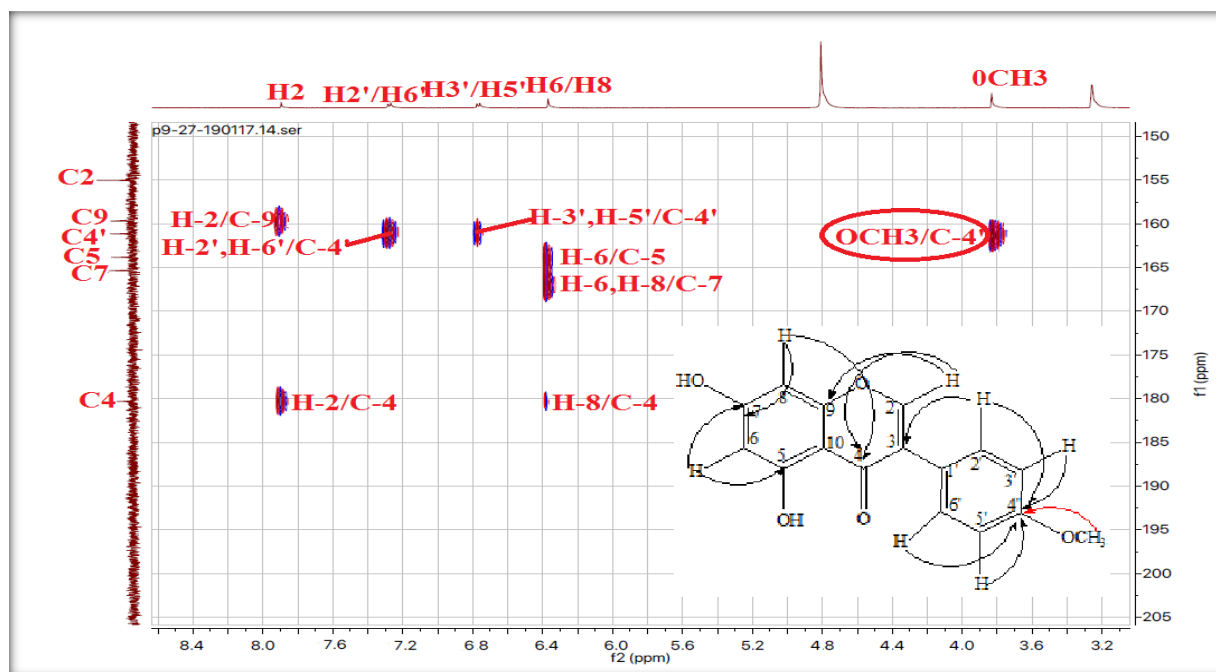


Figure 118. Spectre HSQC du composé CPB4

L'analyse combinée des spectres RMN ^{13}C et HMBC (Fig.119) permet de localiser les déplacements chimiques de tous les carbones du composé CPB4 .

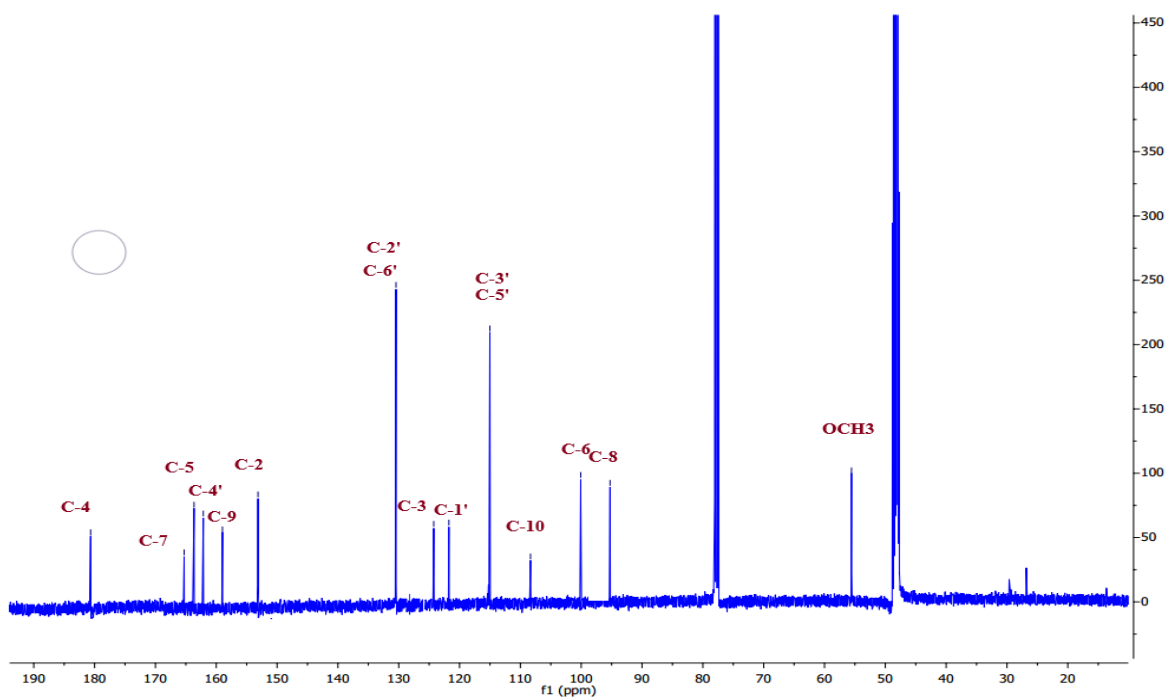


Figure 119. Spectre RMN ^{13}C du composé CPB4

Les données spectroscopiques et la comparaison avec celles de la littérature (De Almeida *et al.*, 2008) nous permettent de suggérer au composé **CPB 4** la structure suivante: 5,7-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavone ou Biochanine A.(Fig.120)

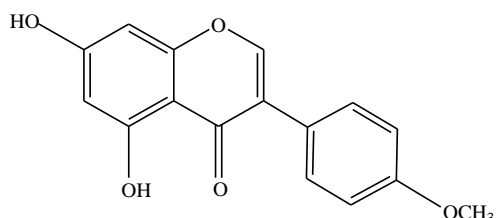


Figure 120. Biochanine A

Les déplacements chimiques des protons et carbones des composés **CPB 1**, **CPB 2**, **CPAc 3** et **CPAc 4** sont réunis dans le tableau suivant (Tableau .11) :

Tableau 11. Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) des composés **CPB1** , **CPB 2** , **CPB 3** et **CPB 4** identifié dans l'extrait de *C.purgans*

position	CPB 1 Daidzeine		CPB 2 Genisteine		CPB 3 Isoprunetine		CPB 4 Biochanine	
	δ_{H} Multiplicité J(Hz)	δ_{C}	δ_{H} Multiplicité J(Hz)	δ_{C}	δ_{H} Multiplicité J(Hz)	δ_{C}	δ_{H} Multiplicité J(Hz)	δ_{C}
2	8,14(s)	153,0	7,84(s)	152,9	7,96(s)	151,1	7,98(s)	155,0
3	/	123,5	/	123,2	/	125,5	/	123,9
4	/	175,9	/	180,1	/	174,9	/	180,3
5	8,04 d ($J = 8,4$)	127,2	/	162,6	/	161,6	6,42(s)	164,0
6	6,91 dd ($J = 2-8,4$)	115,3	6,37 d ($J = 2$)	98,3	6,43(s)	96,2	/	100,1
7	/	136,2	/	164,2	/	160,1	6,42 (s)	165,6
8	6,82 d ($J = 2$)	102,1	6,41 d ($J = 2$)	93,1	6,43(s)	94,8	/	94,7
9	/	158,3	/	158,1	/	160,1	/	159,7
10	/	116,4	/	104,2	/	107,8	/	105,8
1'	/	123,1	/	121,2	/	123,1	/	122,9
2'	7,35 d ($J = 8,4$)	130,1	7,32 d ($J=8,5$)	130,3	7,35 d ($J=8,8$)	130,2	7,33 d ($J=8,8$)	131,1

3'	6,85 d ($J = 8,4$)	115,0	6,82 d ($J=8,5$)	114,9	6,84	114,6	6,82 d ($J=8,8$)	115,2
4'	/	157,3	/	156,9	/	157,1	/	161,1
5'	6,85 d ($J = 8,4$)	115,0	6,82 d ($J=8,5$)	114,9	6,84 d ($J=8,8$)	114,6	6,82 d ($J=8,8$)	115,2
6'	7,35 d ($J = 8,4$)	130,1	7,32 d ($J=8,5$)	130,3	7,35 d ($J=8,8$)	130,2	7,33 d ($J=8,8$)	131,1
OCH_3					3,90 (s)	55,9	3,88 (s)	55,9

Elucidation structurale du produit CPB5

Le spectre RMN 1H du composé **CPB 5** (Fig.121) permet de visualiser une structure flavonoïque pour ce composé. Il présente :

- Un doublet repéré à 6,22 ppm, attribuable au proton H-6.
- Un doublet à 6,48 ppm d'intégration 1H attribuable au proton H-8.
- Un singulet sortant à 6,73 ppm caractéristique du proton oléfinique H-3 d'une flavone.
- Un doublet de doublet d'intégration 2H repéré à 7,99 attribuable aux protons H-2'/ H-6' du noyau B.
- Deux signaux massif chacun résonant à 7,58 et 7,56 ppm d'intégration 1H et 2H respectivement attribuable aux protons H-4' et H-3'/H-5'.

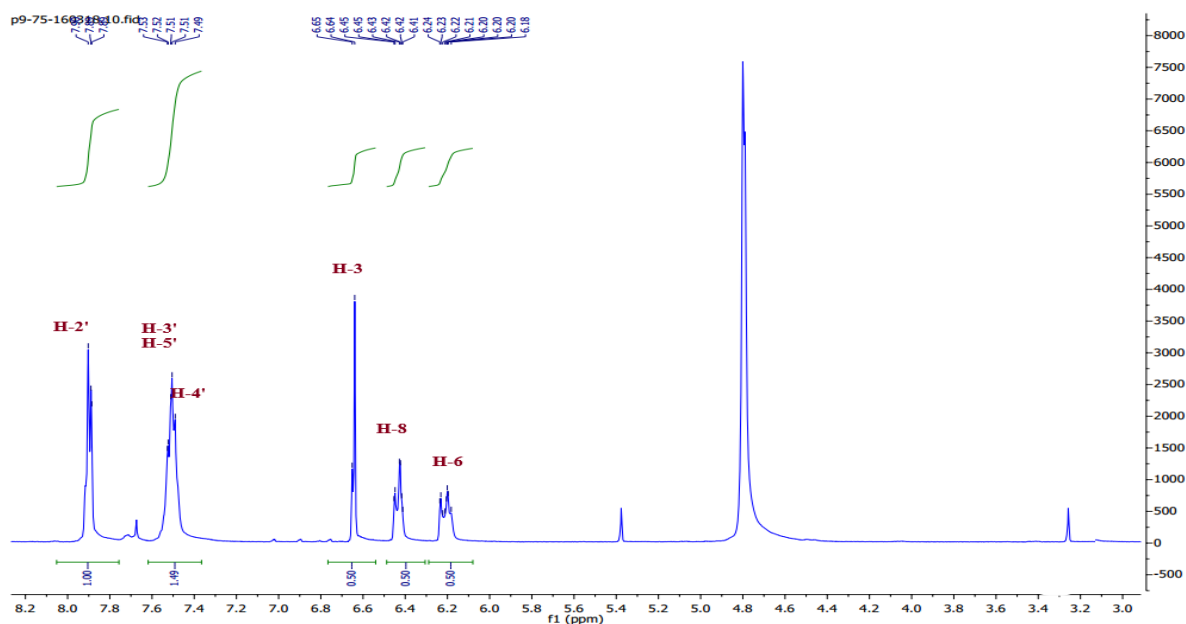


Figure 121. Spectre RMN 1H du composé CPB5

Le spectre RMN ^{13}C (Fig.122) permet de confirmer la structure flavonoïque du composé **CPB 5**.

On détecte la présence de 13 signaux pour des carbones aromatiques. La comparaison avec les données de la littérature (Bertelli *et al.*, 2012), permet l'attribution des signaux des atomes de carbones: δ_{C} 164,2 (C-2), 182,5 (C-4), 161,9 (C-5), 164,9 (C-7), 158,1 (C-9), 104,1 (C-10) et 131,1 (C-1'), 104,6 (C-3), 98,9 (C-6), 93,7 (C-8), 131,6 (C-4'), 126 (C-2'/C-6') et 128,8 (C-3'/C-5').

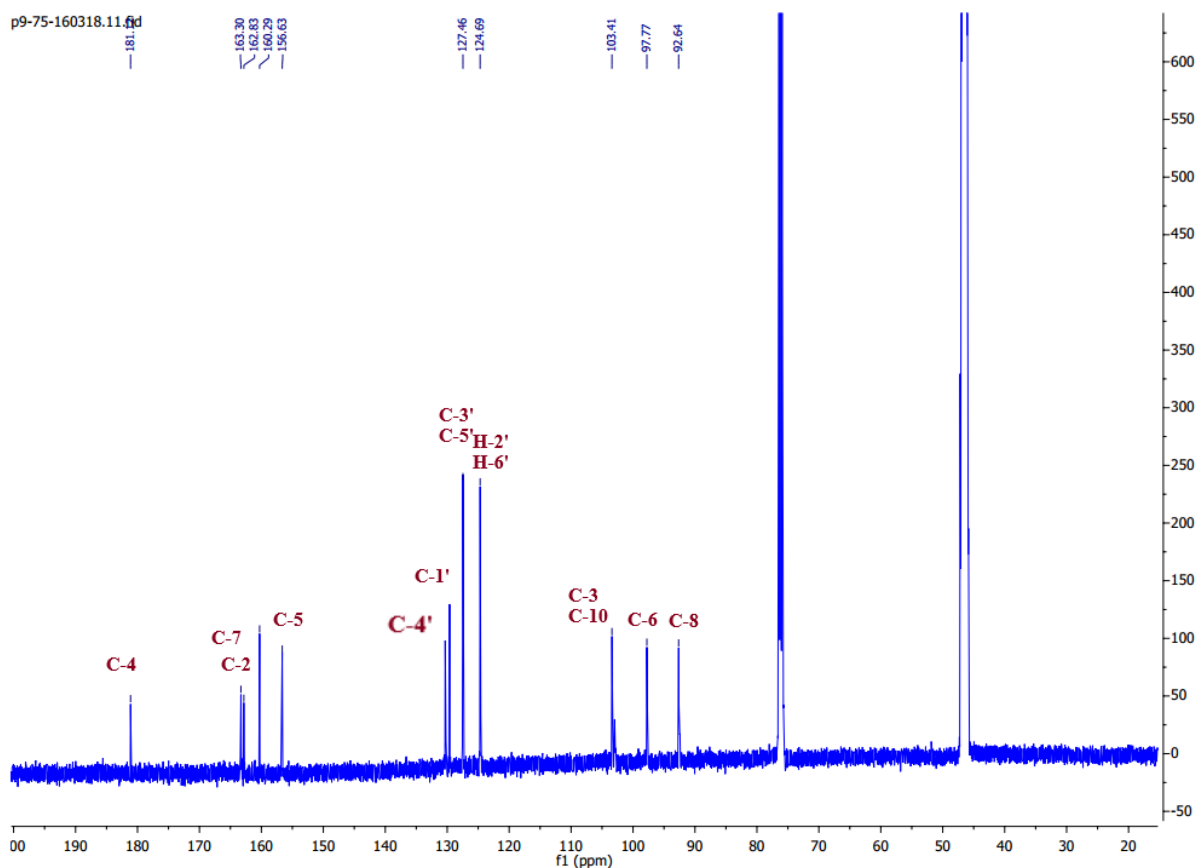


Figure 122. Spectre RMN ^{13}C du composé CPB5

Les données spectroscopiques permettent d'identifier le composé **CPB 5** comme étant 5,7-dihydroxyflavone (Chryisine) (Fig.123).

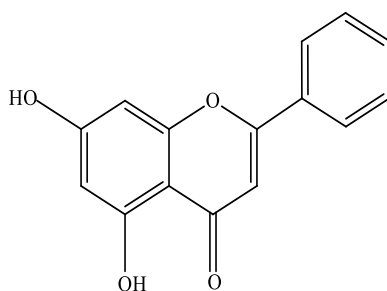


Figure 123. chryisine

Ce métabolite a été précédemment détecté dans plusieurs espèces du genre *Cytisus* telles que : *C. triflorus* l'Her, *C. multiflorus*, *C. striatus* (Abreu *et al.*, 2017) , *C. multiflorus* (Caramelo *et al.*, 2022) et *Cytisus villosus* Pourr. (Larit *et al.*, 2018)

Elucidation structurale du produit CPB 6

Le spectre RMN ^1H (Fig.124) présente des signaux reconnaissables pour une structure flavonoïdique du composé **CPB 6**. Il révèle la présence de :

- Deux doublets à δ_{H} 6,19 et 6,36 ppm attribués respectivement aux protons aromatiques H6 et H-8 du cycle A substitué en positions C-5 et C-7.
- Deux autres doublets à δ_{H} 6,90 et 7,64 attribués respectivement aux protons H-5' et H-2'
- Un doublet dédoublé à 7,59 correspondant au proton H-6'.

Ceci suggère la présence d'un cycle B trisubstitué en positions C-1', C-3', C-4'.

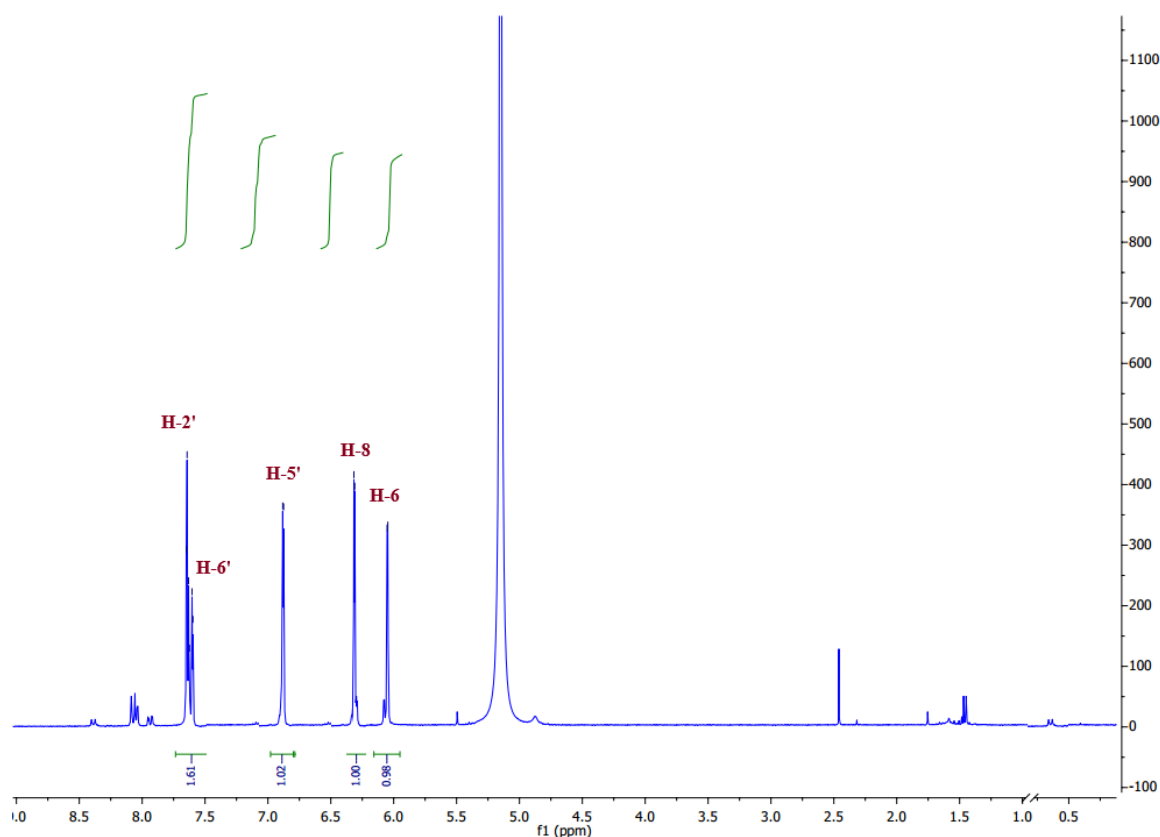


Figure 124. Spectre R MN ^1H du composé CPB6

Le spectre RMN ^{13}C (Fig.125) montre 15 atomes de carbone , à δ_{C} 176,9 (C-4), 166,1 (C-7), 161,4 (C-5), 158,7 (C-9), 150,0 (C-4'), 148,1 (C-2), 146,6 (C-3'), 136,5 (C-3), 123,2 (C-1'), 121,1 (C-6'), 117,2 (C-5') 116,6 (C-2'), 103,8 (C-10), (C-6), 94,9 (C-8).

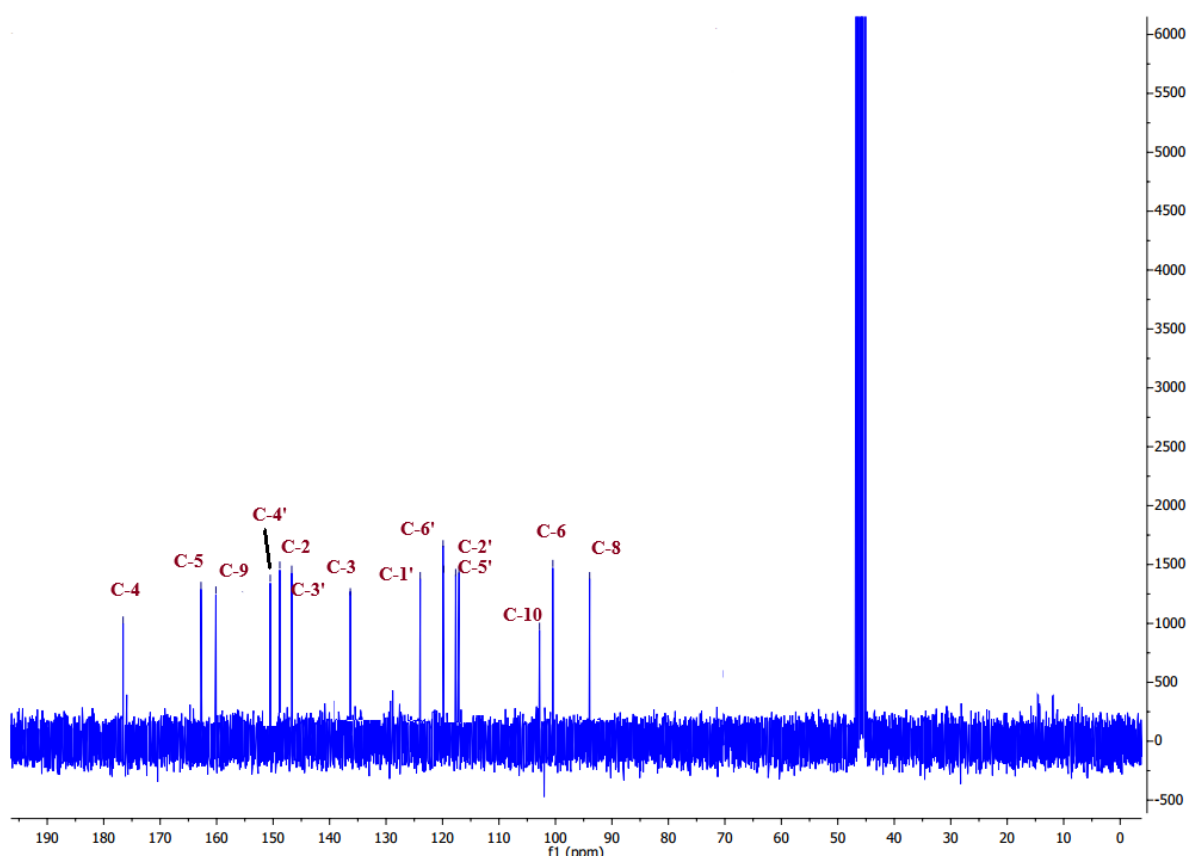


Figure 125. Spectre RMN ^{13}C du composé CPB6

La comparaison avec la littérature (Bertelli *et al.*, 2012) nous permet de déterminer tous les carbones d'un flavonol 5,7,3',4'-tétrahydroxyflavonol, connu sous le nom Quercétine (Fig.126).

La quercétine a été isolée de plusieurs espèces du genre *Cytisus* comme *C. multiflorus* (Caramelo *et al.*, 2022)

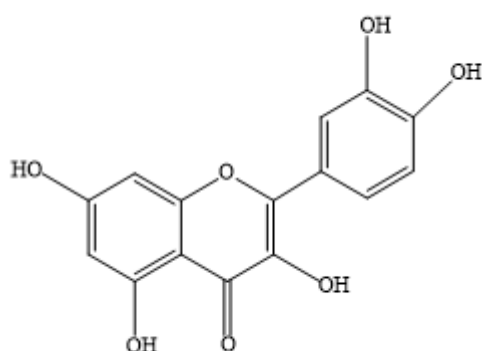


Figure 126. La quercétine

Les déplacements chimiques des protons et carbones des composés **CPB 5** et **CPB 6** sont rassemblés dans le tableau (Tableau .12) suivant :

Tableau 12. Déplacements chimiques en RMN ¹H (à 500 MHz) et RMN ¹³C (à 125 MHz) des produits **CPB 5** et **CPB 6** de *Cytisus purgans*

Position	CPB 5. Chryisine		CPB 6. Quercétine	
	δ_H & Multiplicité, J(Hz)	δ_C	δ_H & Multiplicité, J(Hz)	δ_C
2	/	164,2	/	148,1
3	/	104,6	6,73 s	136,5
4	/	182,5	/	176,9
5	/	161,9	/	161,4
6	6,19 d (J=2,1)	98,9	6,22 d (J = 2)	100,0
7	/	164,9	/	166,1
8	6,36 d (J=2,1)	93,7	6,48 d (J = 2)	94,9
9	/	158,1	/	158,7
10	/	104,1	/	103,8
1'	/	131,1	/	123,2
2'	7,64 d (J=2,1)	126,0	7,99 dd (J = 8,2-1,9)	116,6
3'	/	128,8	7,56 m	146,6
4'	/	131,6	7,58 m	150,0
5'	6,90 d (J=8,4)	128,8	7,56 m	117,2
6'	7,59 dd (J=8,4-2,1)	126,0	7,99 dd (J = 8,2-1,9)	121,1

Elucidation structurale du produit **CPB 7**

Les spectres RMN¹H (Fig. 127) et RMN ¹³C (Fig.128) du composé **CPB 7** montrent des signaux caractéristiques d'un phytostérol de type β -sitosterol glycosylé.

En effet on observe sur ces spectres :

- Un groupement oxyméthine CHO-3 résonant à δ_H 3,57 / δ_C 78,7.

- Six groupements méthyliques résonant à δ_H 0,72 (CH3-18) / δ_C 11,3 ; δ_H 1,04 (CH3-19) / δ_C 19,7 ; δ_H 0,94 (CH3-21) / δ_C 18,9; δ_H 0,93 (CH3-26) / δ_C 20,9; δ_H 0,83 (CH3-27) / δ_C 19,4; δ_H 0,86 (CH3-29) / δ_C 11,4.
- Une double liaison à δ_{H6} 5,35 / δ_{C6} 121,7 et δ_{C5} 140,4

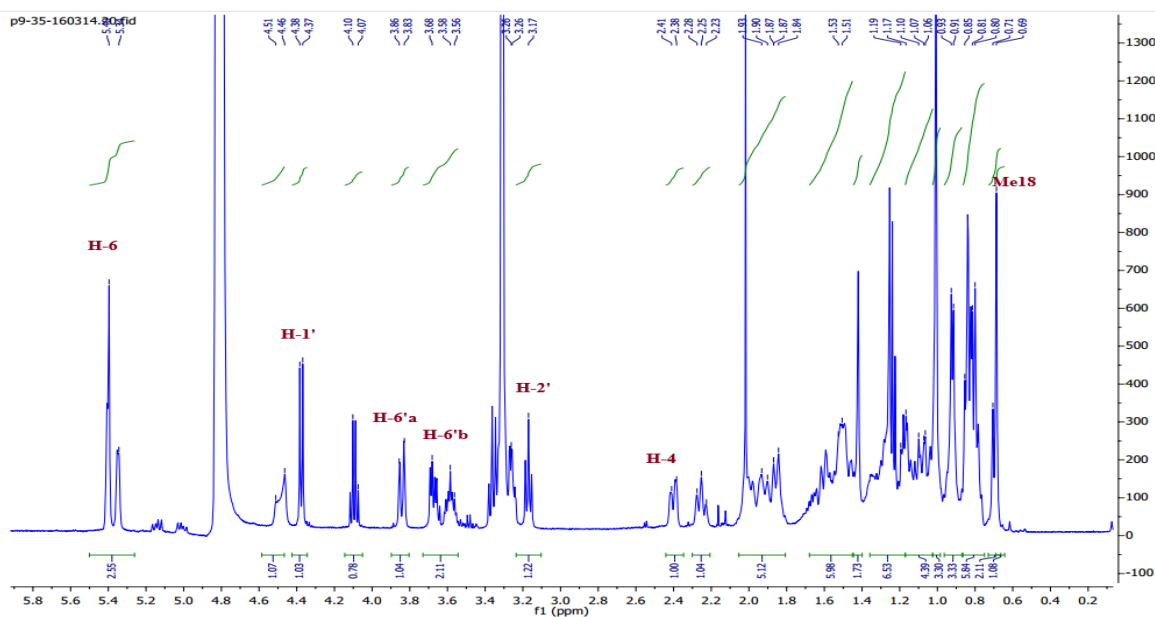


Figure 127. Spectre R MN 1H du composé CPB7

La comparaison des déplacements chimiques des protons et des carbones osidiques avec les données bibliographiques révèle que ce composé possède un glucose de configuration β .

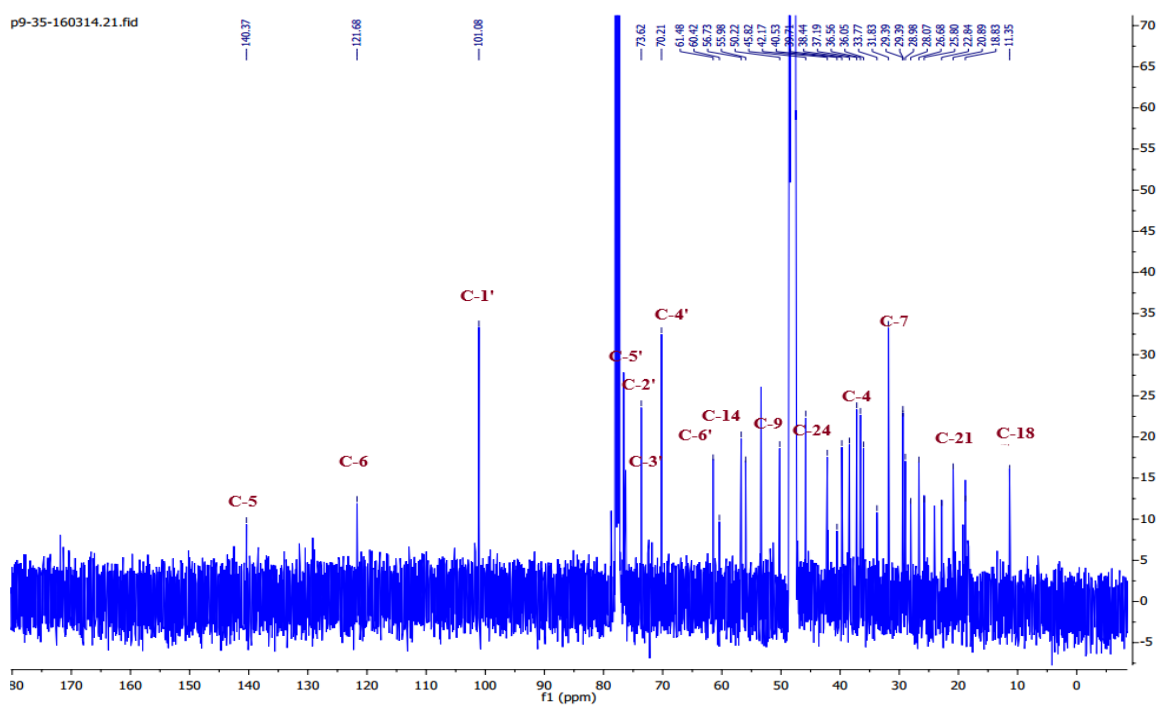


Figure 128. Spectre RMN ^{13}C du composé CPB7

Les données spectrales ainsi que la comparaison avec celles de la littérature (Njinga *et al.*, 2016) permettent d'identifier le composé **CPB 7** comme étant β -sitostéryl-3-O- β -D-glucopyranoside nommé Daucostérol. (Fig.129)

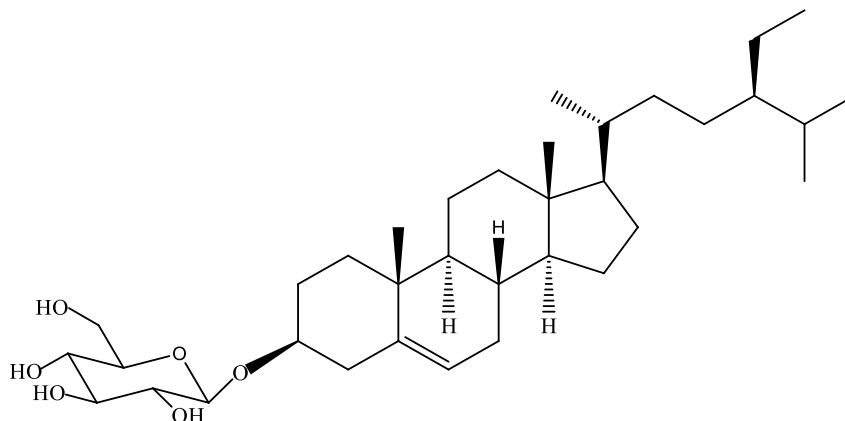


Figure 129. CPB7 Daucostérol

Le tableau 13 regroupe les déplacements chimiques des signaux observés en RMN ^1H et ^{13}C du composé **CPAc 7**.

Tableau 13. Déplacements chimiques en RMN ^1H (à 500 MHz) et RMN ^{13}C (à 125 MHz) du produit **CPB 7** de *Cytisus purgans*

Position	CPB 7. Daucostérol	
	δ_{H} Multiplicité, J(Hz)	δ_{C}
1	a=1,87 m b=1,07 m	37,2
2	a=1,90 m b=1,58 m	29,4
3	3,57 m	78,7
4	a=2,40 ddd (J = 13-6-3) b=2,22 td (J = 13-3)	38,5
5	/	140,4
6	5,35 d (J = 5,9)	121,7
7	1,48 m	31,8
8	1,96 m	31,9
9	0,97 m	50,2
10	/	36,6
11	a=1,45 m b=1,02 m	22,9

12	a=2,01 m b=1,17 m	39,7
13	/	42,2
14	1,03 m	56,8
15	a=1,59 m b=1,11 m	25,8
16	a=1,84 m b=1,29 m	28,1
17	1,16 m	53,4
18	11,3 s	11,3
19	1,04 s	19,7
20	1,36 m	36,1
21	0,94 d (J = 6,7)	18,9
22	a = 1,35 m b = 1,05 m	33,8
23	1.19 m	26,7
24	0.93 m	45,8
25	1.66 m	45,8
26	0,93 d (J = 5,4)	20,9
27	0.83 d (J = 6,9)	19,4
28	1,28 m	24.1
29	0.86 t (J = 7,5)	11,4
1'	4.37 d (J = 8)	101,1
2'	3.17 t (J = 8,6)	73.6
3'	3.36 t (J = 8,6)	77,4
4'	3,33 m	70.2
5'	3,26 m	76,4
6'	a = 3,85 dl (J = 12) b = 3,66 dd (J = 12-5,4)	61.5

Le daucostérol a été isolé à partir de diverses espèces de la famille Fabaceae, notamment *Astragalus tanae*, *Ononis mitissima* L, *Cassia italica*, , *Archidendron clypearia* , *Cassia mimosoides* var. *nomame* Makino et *Astragalus membranaceus*. (Omari *et al.*, 2022). Sa présence a été signalée pour la première fois dans le genre *Cytisus*

V.3. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux dans les plantes est une mesure de la quantité totale de composés phénoliques présents, tels que les flavonoïdes et les acides phénoliques. L'évaluation des polyphénols totaux dans les deux extraits ci étudiés a été effectuée à l'aide de la méthode Folin-Ciocalteu, qui en raison de sa simplicité et de son utilisation minimale de réactifs, convient pour une estimation initiale de la teneur en polyphénols totaux. Toutefois, elle présente des limites en termes de spécificité envers les polyphénols, étant donné qu'elle repose sur l'utilisation d'un composé standard. (Attard, 2013)

Les concentrations en polyphénols totaux ont été déterminées en utilisant l'équation de régression dérivée de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Fig. 130), et les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g ES).

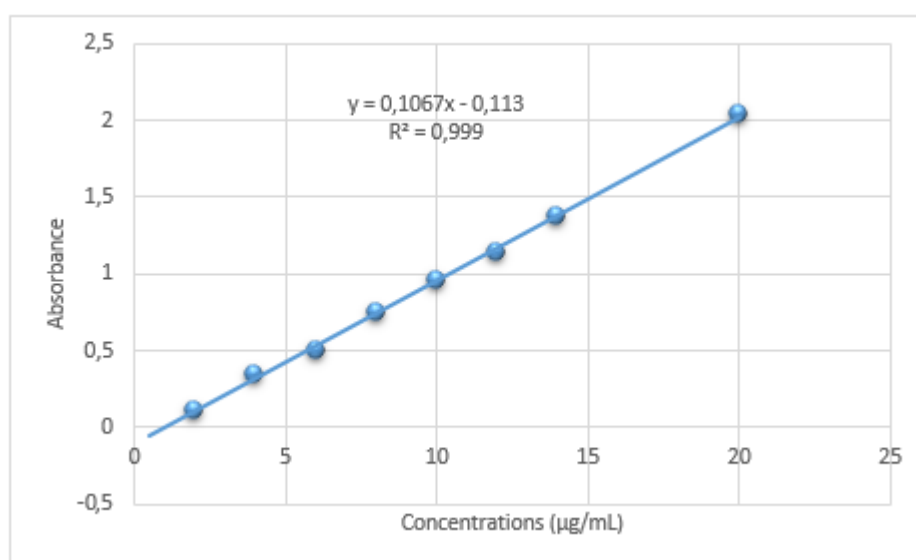


Figure 130. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

Les résultats du dosage indiquent une richesse des deux plantes en polyphénols.

Avec une teneur en polyphénols de 158.8 ± 0.4 mg GAE/g, l'extrait acétate d'éthyle de *V. rosea* est considéré comme assez riches en composés phénolique. Dans la littérature, les études précédentes sur les espèces de *Veronica* ont montré que la teneur totale en polyphénols varie considérablement. Bien que certains chercheurs aient découvert que la teneur en polyphénols dans les parties aériennes de *Veronica teucrium* serbe est d'environ 157 mg GAE/g d'extrait méthanolique sec et 172 mg GAE/g d'extrait d'acétone sec, d'autres ont observé des niveaux plus élevés dans *Veronica officinalis*, atteignant environ 200 mg GAE/g d'extrait méthanolique sec. Cependant, des recherches antérieures ont mis en évidence que la quantité totale de

composés phénoliques présents dans plusieurs espèces telles que *Veronica jacquinii*, *Veronica urticifolia*, *Veronica orientalis*, *Veronica multifida*, *Veronica spicata* et *Veronica baranetzki* Bordz, variait de 83,15 mg GAE/g à 196,67 mg GAE/g de poids sec (Ignjatović *et al.*, 2015 , Dunkić *et al.*, 2015)

Par ailleurs, l'extrait *n*-butanolique de *C.purgans* a montré également une teneur intéressante en polyphénols (138.98 ± 5.38 mg GAE/g d'extrait sec) . Si on compare cette valeur avec celles trouvées dans les études antérieures, on constate que *C.purgans* est relativement riche en polyphénols. Récemment, Larit *et al.* (2019) ont utilisé un solvant hydroéthanolique (80% d'éthanol) pour l'extraction sélective des composés phénoliques de la plante Algérienne *Cytisus villosus* Pourr. Les auteurs ont indiqué que la teneur totale en composés phénoliques de la fraction acétate d'éthyle était de l'ordre de (208 mg GAE/g d'extrait (Larit *et al.*, 2019). De surcroît, l'extrait des feuilles de *C.multiflorus* a révélé une teneur en polyphénols semblable à celle de *C.purgans* ci- étudiée (142.4 mg GAE/g) (Luís *et al.*, 2011).

Il est important de noter que la teneur totale en polyphénols d'une plante dépend de nombreux paramètres, tels que l'espèce végétale, le tissu végétal et le stade de développement, ainsi que des facteurs environnementaux tels que la température, le stress hydrique et les conditions lumineuses.(Chaves *et al.*, 2020)

Le choix du solvant d'extraction a un impact significatif sur la teneur totale en polyphénols et le potentiel antioxydant des extraits de plantes. Diverses études ont démontré que différents solvants peuvent influencer la quantité et la qualité des composés extraits, ainsi que la capacité antioxydante des extraits. Par exemple, des solvants organiques hautement polaires tels que l'éthanol et le méthanol se sont révélés efficaces pour l'extraction de formes d'aglycones phénoliques hautement hydroxylées, qui sont solubles dans ces solvants. (Temesgen *et al.*, 2022)

Les polyphénols sont reconnus comme des métabolites secondaires bioactifs, réputés pour leurs propriétés anti radicalaires, notamment les flavonoïdes et les tanins. Ces composés ont été au centre de nombreuses recherches récentes dans le domaine de la thérapeutique antioxydante.(Srinivasan, 2014)

V.4. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur totale en flavonoïdes des extraits des parties aériennes des plantes a été déterminée en utilisant un dosage colorimétrique au chlorure d'aluminium en utilisant la quercétine comme étalon pour construire une courbe d'étalonnage.

La courbe d'étalonnage (Fig.131) de la quercétine a été établie en traçant différentes concentrations de quercétine par rapport à l'absorbance $y = 0,0055x - 0,0351$, ($R^2 = 0,997$).

En utilisant cette courbe d'étalonnage, la teneur totale en flavonoïdes des extraits a été calculée

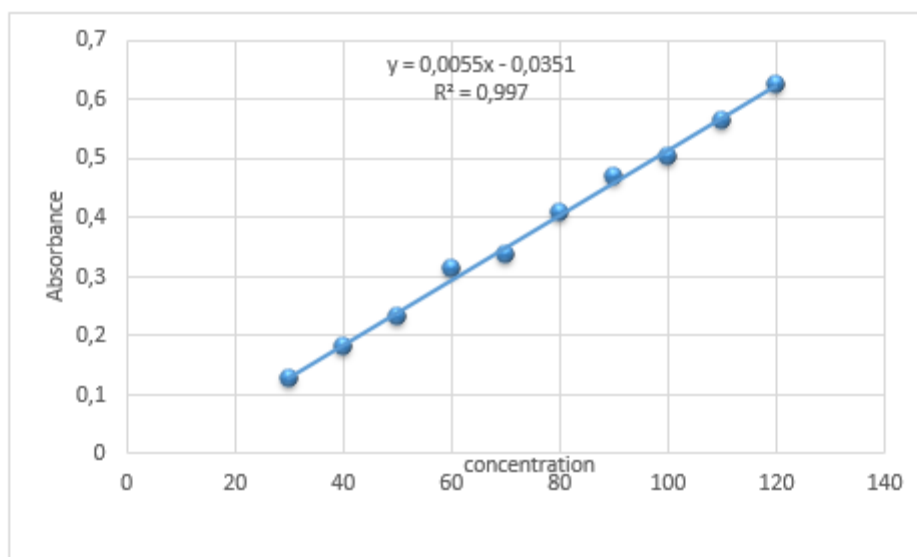


Figure 131. Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des polyphénols totaux

Les flavonoïdes sont une classe de métabolites secondaires végétaux avec des activités biologiques profondes. Ces activités biologiques des flavonoïdes dépendent de la structure et du motif de substitution des groupes hydroxyle (Pandey, 2013).

Le contenu total en flavonoïdes de *Veronica rosea* était de $179,48 \pm 9,86$ mg QE/g d'extrait sec, cette teneur considérée comme élevée en flavonoïdes et est similaire aux valeurs obtenues pour *V. multifida* avec 206,17 mg QE/g d'extrait sec (Koç *et al.*, 2019) et *Veronica polita* avec un taux de $289,785 \pm 0,988$ mg RU/g d'extrait. (Jeon, 2012).

La richesse de l'EAE de *V. rosea* peut s'expliquer par l'efficacité élevée de l'extraction. Effectivement, le choix du solvant devrait être déterminé en fonction des types de métabolites secondaires prévus à extraire des matériaux végétaux. Les extraits aqueux et éthanoliques ont démontré une forte concentration en composés phénoliques, tandis que l'acétone s'est avérée efficace pour l'extraction des flavonoïdes. (Dirar *et al.*, 2019)

Quant à *C. purgans*, la teneur en flavonoïde de l'extrait *n*-butanolique était de l'ordre de $101 \pm 4,73$ mg QE/g extrait sec. La comparaison avec d'autres espèces du genre *Cytisus* a révélé que l'extrait de *C. purgans* est notablement riche en flavonoïdes par rapport aux autres espèces. En effet, un taux élevé de flavonoïde a été rapporté par Olgica *et al.* (2011) dans les extraits acétone

de *C. nigricans* (169,96 mg de RUE/g d'extrait sec) et *C. capitatus* (168,11 mg de RUE/g). (Stefanović & Čomić, 2011)

Cependant un taux plutôt modéré en flavonoïde a été observé avec l'extrait hydro-ethanolique de *C. triflorus* ($52,13 \pm 1,69$ mg QE/g) (Ait-KaciAourahoun *et al.*, 2015)

L'évaluation des teneurs en flavonoïdes réalisée par Pinela et al. (2011) de *C. multiflorus*, *C. scoparius* et *C. striatus* a démontré des taux modérés également (72.64 ± 7.08 , 45.55 ± 7.36 et 86.98 ± 4.24 respectivement) (Pinela *et al.*, 2011)

Ces variations peuvent être expliquées par le fait que la méthode d'extraction liquide-liquide (par fractionnement) peut diluer ou au contraire augmenter les teneurs en composés phénoliques de l'extrait brut. Aussi, il est très important de souligner que la méthode de détermination du taux des flavonoïdes totaux n'est pas basée sur des mesures des quantités absolues, mais sur leurs capacités de réduction chimique par rapport à la quercétine .(Amzad Hossain & Shah, 2015)

V.5. Dosage des tanins hydrolysables et condensés

La concentration des tanins hydrolysables a été calculé après établissement de la courbe d'étalonnage de l'acide tannique et l'équation de régression correspondante ($y = 0,0012x + 0,003$, avec $R^2 = 0,9941$) (Fig.132) Les teneurs en tanins hydrolysables ont été exprimés en mg EAG/mg d'extrait sec .

La teneur en tanins hydrolysables de l'extrait acétate d'éthyle de *Veronica rosea* était de $36,44 \pm 3,37$ mg TAE/g d'extrait sec et celle de *Cytisus purgans* était 35.96 ± 3.51 mg TAE/g.

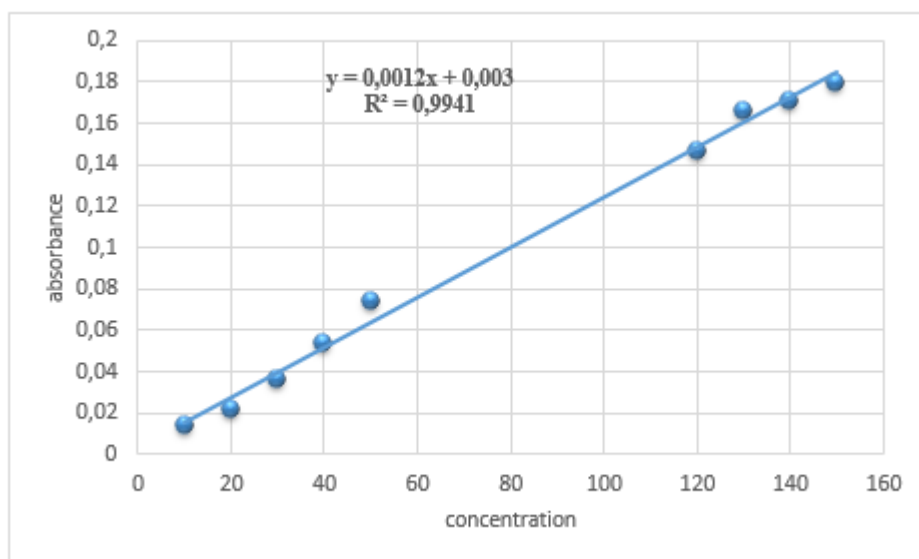


Figure 132. Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour le dosage des tanins hydrolysables

Les concentrations des tannins condensés sont exprimées en mg/g de matière végétale sèche. Pareillement, la teneur en tanins condensé de *C.purgans* est de 25.17 ± 2.31 mg/g tandis que celle de *V.rosea* est de 10.05 ± 1.53 mg/g .

Le dosage des tanins hydrolysables et condensés a révélé que les tanins ne sont pas les constituants majoritaires des composés phénoliques des plantes étudiées ci présents.

Les tanins sont des composés astringents naturels présents dans les plantes, ils aident à la défense de la plante contre les attaques fongiques, bactériennes et insecticides, ainsi qu'à sa survie pendant les périodes de sécheresse. (Pizzi, 2021)

V.6. Dosage des anthocyanes

Les anthocyanes constituent un sous-type de flavonoïdes qui confèrent différentes teintes de rose, de rouge, de violet et de bleu aux fleurs, aux légumes et aux fruits. Ils sont produits par les plantes et sont principalement présents dans les fruits et les fleurs, mais sont également détectés dans les organes végétatifs. Ils jouent également un rôle important dans la propagation des plantes, l'écophysiologie et les mécanismes de défense des plantes.

Structurellement, les anthocyanes sont des anthocyanidines modifiées par des sucres et des acides acylés. Les couleurs des anthocyanes sont sensibles au pH, à la lumière, aux températures et aux ions métalliques. La stabilité des anthocyanes est contrôlée par divers facteurs, notamment les complexations inter et intramoléculaires. (Alappat & Alappat, 2020)

Dans notre étude, la teneur en anthocyanes de *V. rosea* et *C.purgans* s'est avérée modeste avec des valeurs de 7.47 ± 0.45 mg de Cy-3-glu équivalents/100 g extrait sec et $1,66 \pm 0,88$ Cy-3-glu équivalents/100 g extrait sec respectivement .

Vu que les fleurs du genre *Veronica* se présentent dans une variété de couleurs, notamment le bleu, le rose et le pourpre il était judicieux de tenter de quantifier les anthocyanes. Une analyse des anthocyanes dans l'extrait de pétales bleues de *Veronica persica* a démontré effectivement la présence d'anthocyanines de type delphinidine acylées contribuant à la coloration bleue. (Ono *et al.*, 2010)

V.7. Résultats de l'investigation pharmacobiologique

V.7.1. Pouvoir antioxydant de *Veronica rosea* et *Cytisus purgans*

Des preuves chimiques, biochimiques, cliniques et épidémiologiques prouvent les effets chimioprotecteurs des antioxydants phénoliques contre les troubles médiés par le stress oxydatif.

Les actions pharmacologiques des antioxydants phénoliques découlent principalement de leurs propriétés de piégeage des radicaux libres et de chélation des métaux, ainsi que de leurs effets sur les voies de signalisation cellulaire et l'expression des gènes (Soobrattee *et al.* 2005).

Les études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les composés phénoliques présents dans les aliments sont bénéfiques pour maintenir la santé humaine. Les activités de piégeage des radicaux libres et d'antioxydant des composés phénoliques dépendent de l'arrangement des groupes fonctionnels autour de la structure nucléaire. Le nombre et la configuration des groupes hydroxyle donneurs d'hydrogène sont les principales caractéristiques structurelles influençant la capacité antioxydante des composés phénoliques (Zeb, 2021)

Pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* des extraits naturels, diverses méthodes ont été élaborées. Ces méthodes impliquent la combinaison d'espèces oxydantes telles que les radicaux libres ou les complexes métalliques oxydés avec un échantillon contenant des antioxydants capables d'inhiber la formation de radicaux. Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes principaux : soit en transférant des atomes d'hydrogène, soit en transférant des électrons.(Dontha, 2016; Gupta, 2015)

Trois méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de *V.rosea* et *C. purgans* car l'activité antioxydante n'est pas conclue sur la base d'un seul modèle de test antioxydant. (Dontha, 2016). Malheureusement, une méthode spécifique appropriée pour mesurer l'activité antioxydante n'est pas disponible c'est pourquoi différents tests sont nécessaires pour évaluer les différents modes d'action des antioxydants.

Les tests DPPH, ABTS et FRAP ont été largement utilisés pour déterminer le potentiel antioxydant des extraits de plantes car ils sont simples à appliquer et fournissent des résultats rapides et reproductibles. De plus, les tests DPPH et ABTS sont les plus faciles à utiliser et fournissent les résultats les plus cohérents. (Stephanie dudonne, xavier vitrac, philippe coutiere & merillon, 2009)

V.7.1.1. Pouvoir réducteur du fer :

Cette démarche a été utilisée pour mesurer la capacité réductrice des extraits étudiés. Le fer est reconnu comme le pro-oxydant le plus important des lipides en raison de sa grande réactivité. Ainsi, les agents chélateurs offrent une protection contre les dommages oxydatifs des cellules en éliminant les ions Fe^{2+} qui participent à la peroxydation lipidique. En pratique , le fer peut stimuler l'oxydation des lipides par la réaction de Fenton et accélérer cette oxydation en

décomposant les hydroperoxydes en radicaux peroxyde et alcoyles, qui peuvent à leur tour entretenir la réaction de peroxydation lipidique. (H. Khan, Jawad, *et al.*, 2018)

La capacité réductrice de l'extrait de *V. rosea*. Ainsi que celle de *C.purgans* a augmenté de manière dépendante de la concentration (Tableau . 14) avec une valeur de IC₅₀ de 5,87±0,096 µg/mL et 6.37±0.27 respectivement. Ces valeurs sont très proches de la valeur de l'IC₅₀ de la molécule de référence utilisée : l'acide ascorbique IC₅₀= 4.74±0.073 µg/mL.

Tableau 14. Capacité antioxydante des extraits par le test FRAP

Extrait	Concentrations µg/mL									
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
<i>v. rosea</i>	0,3624	0,6603	1,1619	1,1935	1,743	1,9332	2,2857	2,4878	2,8906	2,9163
<i>c.purgans</i>	0,2819	0,3106	0,5111	0,7198	1,5764	1,4488	1,8618	2,4054	3,6362	3,7062

La recherche bibliographique sur le pouvoir réducteur des espèces du genre *Veronica*, a relevé qu'elles sont dotées d'un puissant potentiel de réduction du fer. En effet, les extraits de *Veronica teucrium* et *Veronica spicata* présentent une activité FRAP élevée par rapport à la référence BHT avec des valeurs d'IC₅₀ de 4,06 mmol Fe²⁺/g), et IC₅₀ = 2,25 ± 0,02 µg/mL respectivement. (Dunki *et al.*, 2015, Živković *et al.*, 2012)

L'excellente activité observée est due certainement à la présence de composés réducteurs dans les extraits, notamment des donneurs d'électrons qui sont probablement les groupement hydroxyle des composés phénoliques.

Plusieurs études se sont focalisées sur les propriétés réductrices des polyphénols particulièrement les flavonoïdes et leur capacité à former des complexes stables avec les métaux de transition, surtout le fer et le cuivre qui peuvent moduler divers processus d'importance biologique impliquant l'état redox de l'ion métallique. L'interaction des polyphénols avec les métaux de transition joue un rôle significatif dans les propriétés antioxydantes de ces composés. (Perron & Brumaghim, 2009)

Notons qu'au niveau cellulaire, l'évaluation FRAP reflète adéquatement la capacité à maintenir l'état redox dans les cellules ou les tissus et n'est pas valable pour les composés qui agissent par piégeage des radicaux (transfert d'H), en particulier les bio-thiols (comme le glutathion) et les protéines. Pour cette raison, la méthode est plutôt inadéquate pour mesurer la capacité antioxydante des fluides intracellulaires et du plasma/sérum humain. (Danet, 2021)

Le mécanisme FRAP est totalement un transfert d'électrons et non un mélange de transfert d'électrons et de transfert d'hydrogène, et donc en association avec d'autres méthodes antioxydantes, il peut être très utile pour différencier les mécanismes prédominants avec différents antioxydants (Danet, 2021)

V.7.1.2. Test de piégeage du radical DPPH

Les résultats obtenus, sont exprimés en termes de concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC_{50}). L' IC_{50} est inversement lié à la capacité antioxydant d'un extrait, il représente la concentration d'antioxydant nécessaire pour inhiber 50% du radical DPPH. Plus la valeur d' IC_{50} est basse, plus l'activité antioxydante est importante.

L'extrait acétate d'éthyle de *V. rosea* a montré une activité de piégeage du radical DPPH très intéressante, en effet, avec une IC_{50} de $16.09 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$ et en comparaison avec l'acide ascorbique ($IC_{50} = 3.813 \pm 0.008 \mu\text{g/mL}$) (Tableau .15) *V. rosea* a une excellente activité antioxydante .

Tableau 15. Capacité de piégeage du radical DPPH

Extrait	Concentrations $\mu\text{g/mL}$								
	20	30	40	50	60	70	80	90	100
<i>v.rosea</i>	61,17	84,28	94,14	95,23	95,803	95,57	95,57	95,63	95,47
<i>c.purgans</i>	31.16	44.82	61.51	76.29	82.53	88.53	90.63	91.01	91.11

Quant à *C. purgans*, une valeur de IC_{50} de $26.66 \pm 0.25 \mu\text{g/mL}$ a été trouvé. En comparaison avec l'acide ascorbique, cette plante est aussi considérée comme ayant une très bonne activité de piégeage du radical DPPH.

Selon Reviana R et al. (2021) une substance est classée en terme de force de piégeage de DPPH selon la valeur IC_{50} comme suit : très forte si la valeur de l' IC_{50} est $<10 \mu\text{g/ml}$, forte si la valeur de l' IC_{50} se situe entre 10 et 50 $\mu\text{g/ml}$, modérée si la valeur de l' IC_{50} est comprise entre 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$, faible si la valeur de l' IC_{50} est entre 100 et 250 $\mu\text{g/ml}$, et non active si l' IC_{50} dépasse 250 $\mu\text{g/ml}$.(Reviana et al., 2021). Donc *V. rosea* et *C. purgans* possèdent un fort effet antioxydant pour la neutralisation des radicaux libres (DPPH•).

Ces propriétés peuvent être dues à l'activité combinée des composants bioactifs identifiés dans ces extraits, des composés polyphénoliques capables de donner de l'hydrogène à un radical libre (DPPH•) pour les convertir en espèces non réactives comme il est le cas de l'acide ascorbique (Fig.133).

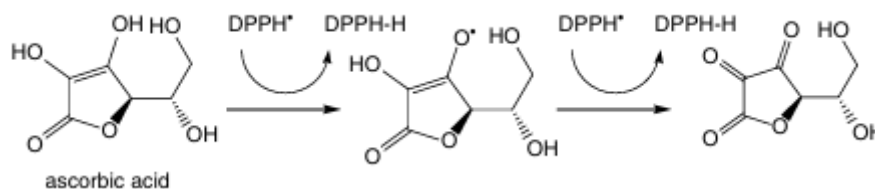


Figure 133. Réaction entre DPPH et acide ascorbique (Apak *et al.*, 2018)

En effet, les antioxydants, à savoir les phénols, les amines aromatiques, les phénothiazines, les pyridinols, les pyrimidinols et les thiols, peuvent éliminer les radicaux libres tels que le radical peroxy par donation d'atome d'hydrogène. Cela est possible en raison de la liaison relativement faible formée entre l'hydrogène et l'hétéroatome correspondant (O, N, S). Néanmoins, des études sur les propriétés de capture des radicaux libres des phénols ont démontré une contribution de transfert d'électron (ET). Ce dernier suit ou précède un transfert de proton ou peut même se produire de manière concertée de sorte que le mécanisme de la réaction présente un mode mixte. (Apak *et al.*, 2018)

Les espèces de *Veronica* sont d'excellentes sources de biomolécules avec des activités antioxydantes puissantes. Les extraits de plusieurs espèces ont été testés *in vitro* par plusieurs méthodes telles que le piégeage des radicaux libres DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle).

Dans une étude antérieure, le pouvoir antioxydant de divers extraits obtenus à partir des parties aériennes fleuries de trois espèces de *Veronica* à savoir : *V. teucrium*, *V. jacquinii*, *V. officinalis* et *V. urticifolia*, a été évalué *in vitro* par l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH, les valeurs d'IC₅₀ variaient de 12,58 à 66,34 µg/mL témoignant un potentiel anti radicalaire considérable. (Živković *et al.*, 2012, Harput *et al.*, 2011)

L'activité antioxydante des espèces de *Veronica* pourraient être attribuées à leur teneur en iridoïdes et en acides phénoliques et surtout en flavonoïdes. A titre illustratif, les flavonoïdes acylés et les glycosides phénoliques de *V. thymoides subsp. pseudocinerea* ont montré une activité puissante de piégeage du radical DPPH (Saracoglu *et al.*, 2004). Les deux glycosides phényléthanoides, turrilliosides A et B, isolés de *Veronica turrilliana* Stoj. & Stef, se sont révélés être de puissants piègeurs du radical DPPH, environ 1,6 fois plus efficaces que la quercétine (Kostadinova *et al.*, 2007). Aussi, la capacité antioxydante des extraits enrichis en flavonoïdes de *V. persica* étaient corrélée à leur teneur totale en phénols. (Fierăscu *et al.*, 2018)

Plusieurs espèces du genre *Cytisus* ont été évaluées pour leur activité antioxydante. Par exemple, les extraits hydroalcooliques des feuilles de *C. villosus* ont montré une forte activité antioxydante dans le piégeage du DPPH, avec une valeur de IC₅₀ de 19,17 µg/mL (Bouziane *et al.*, 2018) résultat similaire à celui obtenu dans la présente étude avec *C. purgans*.

Des études antérieures sur *C. multiflorus* ont révélé une capacité significative à piéger le DPPH, avec une valeur de IC₅₀ de 13,4 ± 0,5 µg/mL, (Pereira et al., 2012). De surcroit, *C. monspessulanus*, *C. nigricans*, *C. albus* et *C. scoparius* ont montré des variations dans leur capacité de capture du DPPH, avec des valeurs de IC₅₀ respectives de 14 ± 0,018 µg/mL, 88,44 ± 0,72 µg/mL, 131,13 ± 0,6 µg/mL et 24,33 ± 0,14 µg/mL. (Bakchiche & Gherib, 2014, Sundararajan et al., 2006, Hanganu et al., 2016)

Evidemment, toutes les molécules isolées des deux plantes sont dotées de pouvoir antiradicalaires ainsi, Chunlian Tian et al. (2021) ont testé l'activité anti radicalaire DPPH de la lutéoline, et de la quercétine, les valeurs IC₅₀ étaient spectaculaire avec des valeurs de 1,977 et 1,819 µg/mL respectivement, et toutes les deux étaient inférieures à celle du l'acide ascorbique (Tian et al., 2021). Deux glucosides d'isoscuteellareine acylée ont été testées par Ali Sen et al. (2019) pour leurs activité de piégeage du radical DPPH, d'excellents résultats ont été constatés, les valeurs d'IC₅₀ obtenues étaient de l'ordre de 2.35 ± 0,00 et 13.94 ± 1,65 µg/mL (Sen et al., 2019)

V.7.1.3. Capacité antioxydante totale

La méthode du phosphomolybdène est couramment utilisée pour évaluer la capacité antioxydante totale des extraits de plantes. Cette méthode est quantitative et fournit des résultats en tant que nombre d'équivalents d'acide ascorbique ou d'α-tocophérol.

C'est un outil précieux dans l'évaluation du potentiel antioxydant des sources naturelles et a été utilisé dans de nombreuses études de différents échantillons d'origines et de compositions différentes à la recherche de sources naturelles de vitamine E et d'autres puissants antioxydants.

La capacité antioxydante totale (CAT) au phosphomolybdène évalue à la fois les antioxydants liposolubles et hydrosolubles. Elle se distingue par le fait qu'elle est simple, peu coûteuse et constitue une bonne alternative aux autres méthodes laborieuses utilisées pour évaluer la capacité antioxydante totale. (Dixit & Reddy, 2017)

Le test du phosphomolybdate est une variante du test du piégeage du DPPH. Pendant ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé réducteur (extrait-antioxydant) vers le complexe oxydant (PPM). Ce transfert est conditionné par le potentiel redox, le pH du milieu et la structure propre du composé antioxydant. (Prieto et al., 1999)

La capacité antioxydante totale est rapportée en équivalents d'acide ascorbique par gramme d'extrait. La courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique établie dans la présente étude était linéaire dans la plage de $y = 0,005x - 0,057$, avec $R^2 = 0,9901$. (Fig.134)

Les valeurs d'absorbance significatives obtenues indiquent une forte capacité antioxydante de cette molécule standard (acide ascorbique).

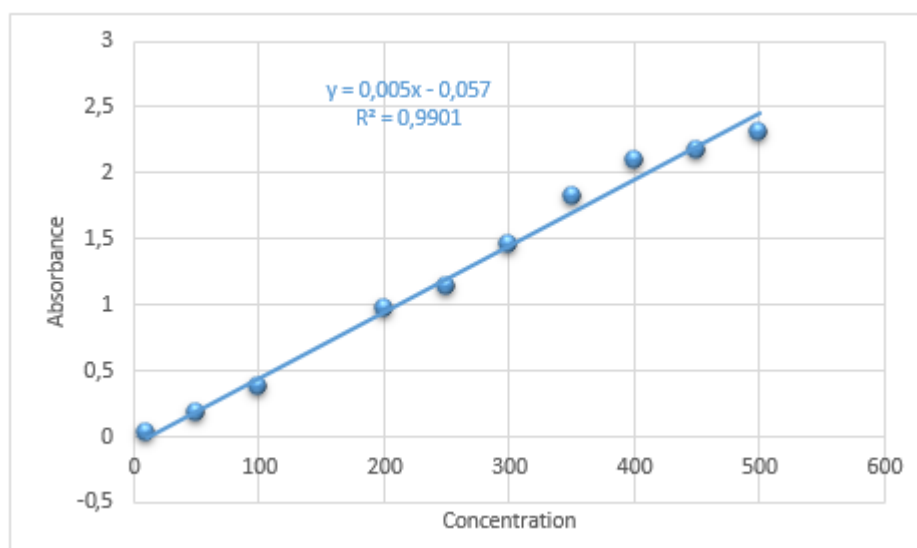


Figure 134. Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour la détermination de la capacité antioxydante totale

La capacité antioxydante totale de *V. rosea* a été quantifiée à $172,74 \pm 6,17$ mg d'AA éq/g d'extrait sec, et celle de *C.purgans* à $106,57 \pm 5,81$ mg d'AA éq/g d'extrait sec . Les extraits ont montré une capacité antioxydante concentration dépendante.

Le test au molybdate a indiqué que l'extrait hydroéthanolique de *C. villosus* avait une valeur TAC élevée de $101,14 \pm 3,02$ mg EAA/g d'extrait, une valeur comparable au résultat obtenu avec *C.purgans* , tandis que l'extrait aqueux a montré une capacité antioxydante de $94,18 \pm 2,31$ mg EAA/g d'extrait.(Zouhri *et al.*, 2023)

V.7.2. Activité dermoprotectrice et photoprotectrice

La peau est une cible principale du stress oxydatif car elle est constamment exposée à l'environnement, y compris aux rayons UV, qui induisent la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la peau.

Il est largement accepté que les rayons UVA et UVB jouent un rôle significatif dans le vieillissement prématuré et les dommages photo-induits de la peau par divers mécanismes impliquant le stress oxydatif . Alors que les UVB ont un impact biologique sur la peau principalement en causant des dommages directs à l'ADN et une inflammation , les UVA contribuent aux dommages photo-induits de la peau en générant divers types de radicaux libres qui interagissent avec les biomolécules et perturbent la signalisation cellulaire, affectant ainsi la survie cellulaire et la fonction des cellules cutanées (Dunaway *et al.*, 2018) .

Les dommages oxydatifs induits par les UVA et les UVB sont associés à l'apoptose et à la nécrose des cellules cutanées, associées à la réaction de coup de soleil et au processus de vieillissement cutané.(Chopra *et al.*, 2018)

Par conséquent, la recherche visant à fournir des connaissances dans ces domaines a augmenté de manière exponentielle afin de développer des approches préventives et thérapeutiques.(Bosch *et al.*, 2015)

Le facteur de protection solaire (SPF) est un indice qui mesure l'efficacité d'un produit de protection solaire (PPS) contre les rayons UVB. Le calcul du SPF est basé sur la capacité d'un produit à bloquer les rayonnements UVB, et il est déterminé à l'aide de tests *in vitro* et *in vivo*.

Il y a un nombre suffisant de phytomolécules à potentiel photoprotecteur qui pourraient constituer une part importante des formulations photoprotectrices. citons comme exemples les flavonoïdes, les polyphénols, les polyphénols du thé, la curcumine, le resvératrol, etc , Elles sont capables de moduler la machinerie apoptotique (Bax, Caspase-3, Caspase-9, APAF-1) vers des voies de survie cellulaire (Bcl-2, PI3/AKT, kinases activées par les mitogènes).(Chopra *et al.*, 2018b)

Les extraits de plantes sont parfois utilisés dans la formulation de produits de protection solaire pour leur potentiel photoprotecteur, mais il est important de noter que l'utilisation seule d'extraits végétaux comme filtre UV n'est pas suffisante pour procurer un SPF élevé.

Dans le présent travail, une absorption manifeste dans les longueurs d'onde UVB/UVA a été observée dans le scan spectrophotométrique de l'extrait de *V. rosea* et *C.purgans* .

Le SPF a été calculé pour estimer la valeur de la photoprotection en utilisant les valeurs d'absorbance de balayage et les résultats sont rassemblés dans le tableau 16

Tableau 16. Valeur du SPF des deux extraits *V.rosea* et *C.purgans*

Concentration (mg/mL)	SPF	
	<i>V.rosea</i>	<i>C.purgans</i>
0.2	41.53±0.01	40.55
0.4	58.55±0.02	45.64
0.6	54.80±0.03	46.10
0.8	73.80±0.13	80.45
1	92.09±0.15	87.84

L'extrait de *V. rosea* a montré un SPF élevé (de 40 à 92 pour des concentrations de 0,2 à 1,0 mg/mL) et a ainsi efficacement protégé contre les radiations UVA et UVB. Cet effet bénéfique pourrait être attribué à sa teneur considérable en polyphénols, notamment les flavonoïdes, qui sont tous de puissants piègeurs de radicaux.

De même les résultats issus de nos investigations sur l'extrait *n*-butanolique de *C.purgans* (SPF = 87.84 à 1mg/mL) indiquent son utilité potentielle en tant qu'agent de protection solaire dans les formulations cosmétiques .

Le phototypage de la peau fait référence à un système de classification de la peau basé sur la façon dont la peau réagit à l'exposition au soleil. La classification de Fitzpatrick est la méthode de phototypage de la peau la plus largement acceptée sur la base de la tendance d'une personne à prendre des coups de soleil et sur sa capacité à bronzer (Fig.135) . Le phototypage de la peau est également utile pour prédire le risque de photo-dommages et de cancer de la peau.(Sashdeva 2008) .

Les résultats de SPF des deux extraits indiquent que nos deux plantes peuvent potentiellement être exploitées pour la formulation des préparations écran solaire pour les phototypes de peau I et II

Fitzpatrick phototype	Description	Individual Typology Angle (ITA)	Skin color (ITA classification)	UVB protection (SPF)	UVA protection (UVA-PF)	High energy visible light protection (VL-PF)
I	Always burns, never tans	ITA° >55°	Very light	SPF50+	UVA-PF +++ (>1/3 labelled SPF)	VL-PF+++
II	Burns easily, sometimes tans	41° <ITA° <55°	Light			
III	Sometimes burns, always tans	28° <ITA° <41°	Intermediate			
IV	Rarely burns, tans easily	10° <ITA° <28°	Tan			
V	Rarely burns tans easily; moderately pigmented	-30° <ITA° <10°	Brown			
VI	Rarely burns, tans promptly and intensely; highly pigmented	ITA° <-30°	Dark			

Figure 135. les phototypes de la peau et le SPF correspondant .(Sashdeva 2008)

En fait, une utilisation appropriée des écrans solaires atténue les chances de développer un cancer de la peau induit par les UV. Certains phytoconstituants remplissent cette fonction parfaitement.(Bosch *et al.*, 2015)

Les stratégies de photoprotection reposent essentiellement sur : le blocage de l'incidence des photons UV, la réparation de l'ADN grâce aux enzymes de réparation, l'élimination des ROS avec des agents antioxydants, et l'anti-inflammation/immunomodulation avec des agents anti-inflammatoires.

Beaucoup de ces stratégies de photoprotection impliquent des dérivés de plantes, y compris des polyphénols (flavonoïdes et non-flavonoïdes), des dérivés non phénoliques et des extraits de plantes entières (Fig. 136), qui assurent une augmentation du blocage des radiations UV ainsi que le renforcement de l'équilibre antioxydant cellulaire réduiront l'incidence du photo-vieillessement et de la photocarcinogénèse.(Bosch *et al.*, 2015)

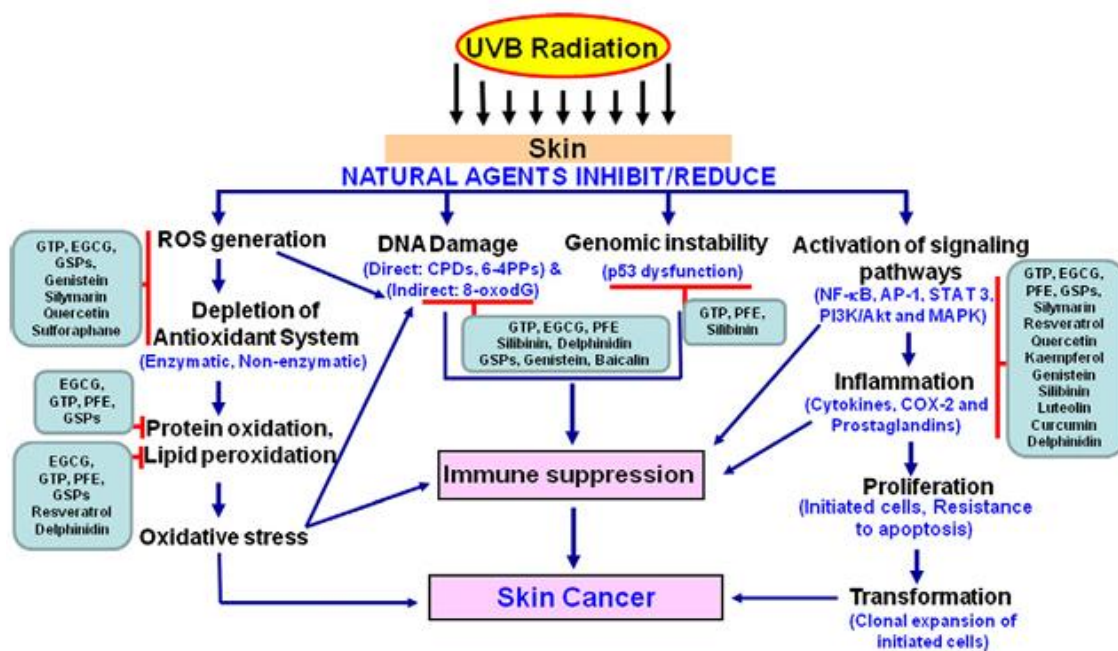


Figure 136. Les stratégies de photoprotection des substances naturelles(Bosch *et al.*, 2015)

Rappelons que dans les deux plantes ci étudiées, plusieurs flavonoïdes ont été détectés et identifiés. Les effets protecteurs des flavonoïdes dans les systèmes biologiques sont attribués à leur capacité à transférer des électrons aux radicaux libres, à chélater les catalyseurs métalliques à activer des enzymes antioxydantes , à réduire les radicaux de l'alpha-tocophérol et à inhiber les oxydases . De plus, les flavonoïdes protègent les plantes contre le rayonnement solaire UV et neutralisent les ROS générés par les UV. Par conséquent, les flavonoïdes naturels ont un potentiel de photoprotection incontestable. (Saewan & Jimtaisong, 2013)

Il est maintenant évident que l'extrait acétate d'éthyle de *V. rosea* est riche en luteoline et apigénine . Ces deux flavonoides ont été déjà testés pour leurs action photoprotectrice . Ainsi dans une étude précédente ; le SPF-UVB de l'apigenine a été calculé par la méthode de Diffey et al. (1989) et était de l'ordre de 28.8. (De Alencar Filho *et al.*, 2016) Une valeur très

intéressante dans la protection solaire. Par conséquent, l'apigénine peut être considérée comme un composé photoprotecteur à large spectre. (Forero *et al.*, 2019)

D'autre part, les propriétés antioxydantes et photoprotectrices de la lutéoline ont été étudiées *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* sur des kératinocytes humains. La spectroscopie a révélé des absorptions maximales de lutéoline dans la région UVB ainsi que dans la région UVA, et moins de 10 % d'absorption étaient en dessous de 370 nm, la lutéoline inhibait à la fois l'érythème cutané induit par les UVB, la surexpression de la cyclooxygénase-2 et la production de prostaglandine E2 dans la peau humaine en interférant avec la voie MAPK. Ces données suggèrent que la lutéoline peut protéger la peau humaine contre les dommages causés par les UVB par une combinaison d'absorption des UV, de protection de l'ADN, d'activité antioxydante et de propriétés anti-inflammatoires (Fig.137) (Afaq, 2011)

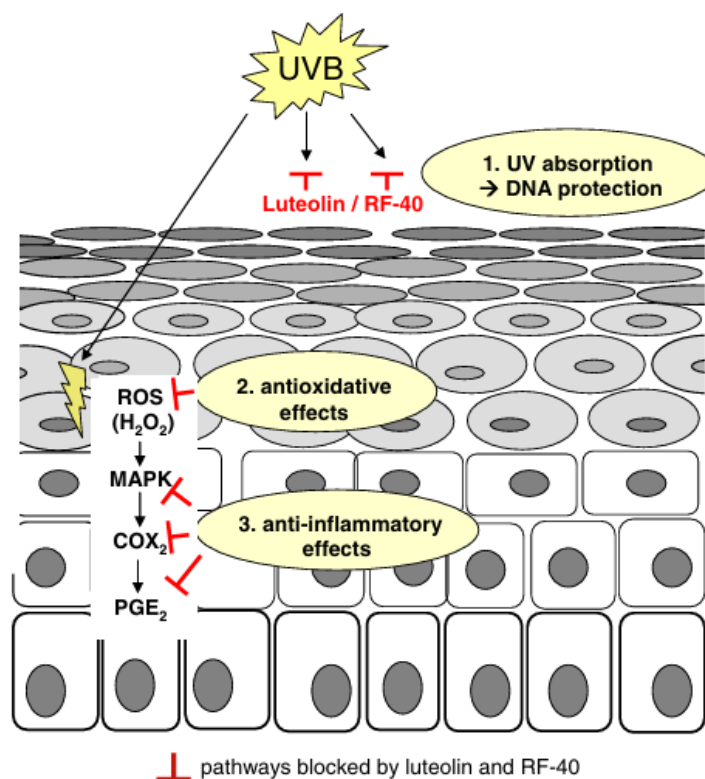


Figure 137. La lutéoline dans la photo protection de la peau (Wölfle *et al.*, 2011)

La quercétine protège les systèmes antioxydants de la peau, protège les activités de la glutathion peroxydase, de la réductase, de la catalase et de la dismutase. Dans le cadre de l'étude de la photoprotection, la quercétine a présenté un SPF-UVB de 10,3, selon la méthode de Diffey *et al.* (1989). (De Alencar Filho *et al.*, 2016)

Evans-Johnson *et al.* (2013) ont découvert que l'application topique d'un mélange de polyphénols dérivés d'amandes où la quercétine prédominait, a significativement atténué

l'apoptose induite par les rayons UVA dans les fibroblastes dermiques. De plus, ce mélange a également eu un impact positif sur la morphologie de la peau ainsi que sur la différenciation cellulaire, tout en tendant à réduire la prolifération des kératinocytes induite par les UVA..(Evans-Johnson *et al.*, 2013)

Les isoflavonoïdes purifiés à partir de l'extrait de *C.purgans* ont prouvé une dermoprotection efficace , en effet l'application topique de la génistéine et de ses métabolites tels que l'équol, l'isoequol et le déhydroéquol, sur la peau de souris glabre a considérablement inhibé la production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) induite par les UV-B, l'hypersensibilité de contact et réduit la réaction d'œdème inflammatoire.(Saraf & Kaur, 2010)

Dans ce même contexte, La daidzéine , la biochanin A et la genistéine ont manifesté une activité photoprotectrice efficace *in vitro* en utilisant la peau de porc comme model . En effet une protection contre l'érythème et des brûlure UV-induits a été constaté (De Alencar Filho *et al.*, 2016, Wölfle *et al.*, 2011)

Dans une étude portant sur la chryisine, on a constaté que ce flavonoïde isolé présente un spectre d'absorption dans les deux régions (UVA et UVB). Son SPF calculé par la méthode de Diffey *et al.* (1989) était de 18,6 . (De Alencar Filho *et al.*, 2016)

D'après cette analyse des effets des flavonoïdes et iso flavonoïdes constituant les deux extraits étudiés, on peut expliquer l'excellente photoprotection assurée par *V.rosea* et *C.purgans* .

Selon la FDA une protection solaire adéquate permettant de minimiser les risques de dommages cutanés, pourra être garantie par l'utilisation régulière de crèmes solaires ayant un indice de protection solaire (SPF) de 15 ou plus, combinée à d'autres mesures de protection. Par conséquent , l'utilisation de substances naturelles dérivées de plantes (flavonoïdes et polyphénols) comme ingrédients actifs dotés de propriétés antioxydantes dans les cosmétiques solaires est une alternative aux produits chimiques qui sont également nocifs pour la peau (Sabrina *et al.*, 2022) et *V. rosea* et *C. purgans* ont le potentiel d'être développées comme écrans solaires et également comme soins anti-âge adapté aux peaux hyper allergiques .(Mishra *et al.*, 2011)

V.7.3. Test de stabilisation de la membrane des globules rouges

L'inflammation est une réponse défensive compliquée impliquée dans différentes physiopathologies de plusieurs maladies. C'est une réaction du corps aux substances étrangères, déclenchée par la reconnaissance par les cellules immunitaires. Les voies pro-inflammatoires sont activées, entraînant la production de cytokines et l'activation des cellules immunitaires.

L'inflammation chronique, déclenchée par une surproduction de cytokines, de chimiokines et d'enzymes inflammatoires, est régulée par des voies à médiation récepteur comme les récepteurs de type Toll, la voie MPK et NF- κ B. La dérégulation de ces voies peut conduire à des troubles inflammatoires tels que la prolifération vasculaire, la destruction tissulaire, la fibrose et des maladies secondaires telles que l'arthrite, l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires, la maladie d'Alzheimer, l'asthme et le cancer. (Al-Khayri *et al.*, 2022)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens et stéroïdiens actuellement utilisés parviennent efficacement à contrôler la réaction inflammatoire aiguë. Cependant, lors d'états inflammatoires chroniques, un traitement prolongé avec ces médicaments entraîne souvent des effets indésirables graves. Cette réalité justifie la quête de nouveaux agents anti-inflammatoires sûrs, parmi lesquels les composés végétaux se présentent comme d'excellents candidats. (Gonçalves & Romano, 2017)

La méthode HRBC a été choisie pour évaluer *in vitro* la propriété anti-inflammatoire car la membrane des érythrocytes présente une analogie avec la membrane lysosomale, et sa stabilisation suggère que l'extrait pourrait également stabiliser les membranes lysosomales. Cette stabilisation est importante pour limiter la réponse inflammatoire en empêchant la libération des composants lysosomaux des neutrophiles activés, tels que les enzymes bactéricides et les protéases, qui peuvent entraîner une inflammation et des dommages tissulaires supplémentaires lors de leur libération extracellulaire. (RanaSingh *et al.*, 2012)

Evidemment, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) exercent leurs effets soit en inhibant la libération des enzymes lysosomales, soit en stabilisant les membranes lysosomales. D'où la prévention de la lyse de la membrane HRBC par les extraits de plantes est considérée comme une mesure de l'activité anti-inflammatoire. (Salvamani *et al.*, 2016)

L'extrait de *V. rosea* a démontré une significative activité de stabilisation membranaire dose dépendante en présence de pression hypotonique ($p < 0,05$), À une dose de 400 μ g/mL, la membrane des globules rouges humains a été stabilisée à hauteur de 65 %. Une comparaison avec le diclofénac, un AINS couramment utilisé, révèle que cet extrait est aussi actif que ce médicament standard. (Fig.138)

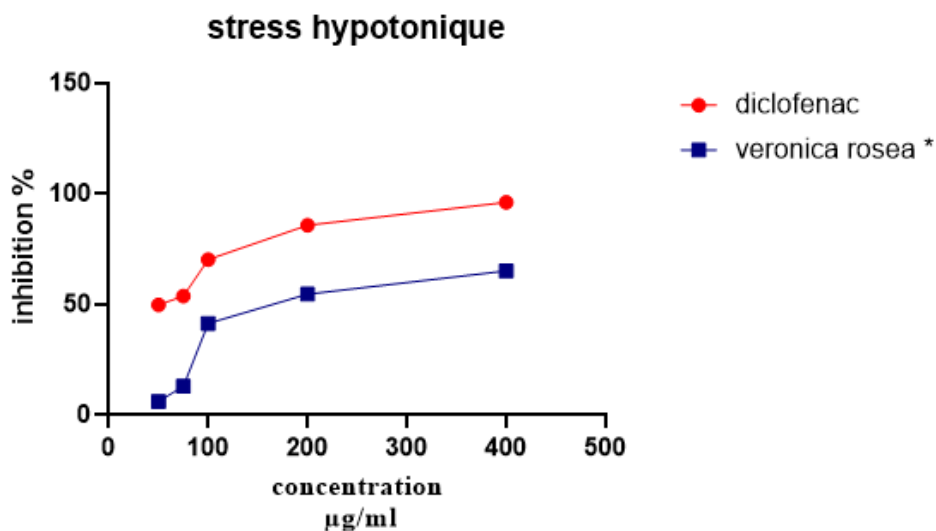


Figure 138. Effet inhibiteur de l'hémolyse induite par l'hypotonicité de l'extrait acétate d'éthyle de *V.rosea*

En outre, l'inhibition de l'hémolyse induite par le stress thermique a également été évaluée, la stabilisation de la membrane est évidente et est proportionnelle aux concentration de l'extrait (Fig.139) avec une inhibition optimale de 88 % à 400 µg/mL. De manière similaire, cette forte activité était comparable à celle du diclofénac (88,10 % d'inhibition à 400 µg/mL).

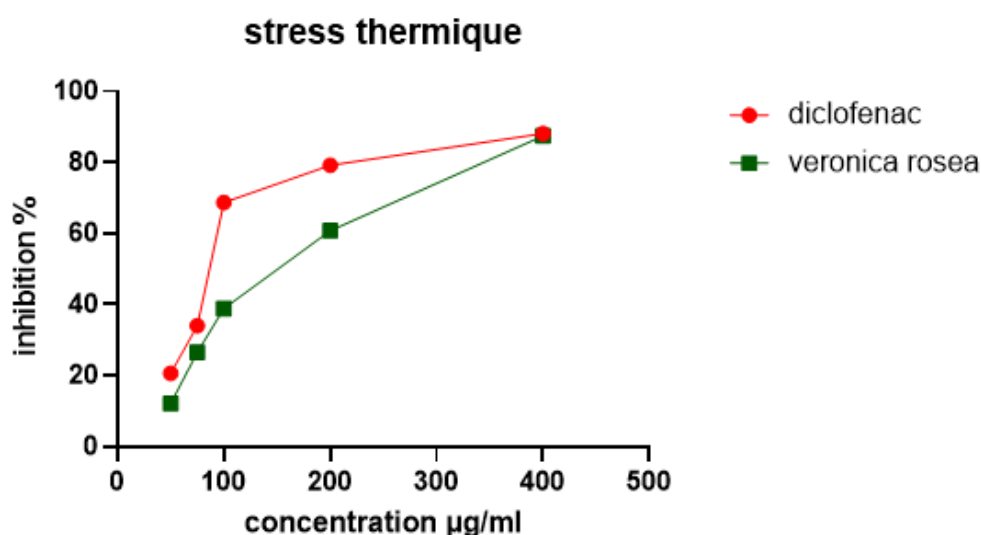


Figure 139. Effet inhibiteur de l'hémolyse induite par la chaleur de l'extrait acétate d'éthyle de *V.rosea*

Par ailleurs, *C. purgans* a montré un effet stabilisant de la membrane mais moins prononcé que celui de *V.rosea*.

Sous stress hypotonique, l'extrait de *C.purgans* a montré une action protectrice de la membrane des globules rouge dose dépendante jusqu'à la dose de 200 µg/mL au-dessus de la quelle une recrudescence de l'hémolyse a été constatée (Fig.140) .

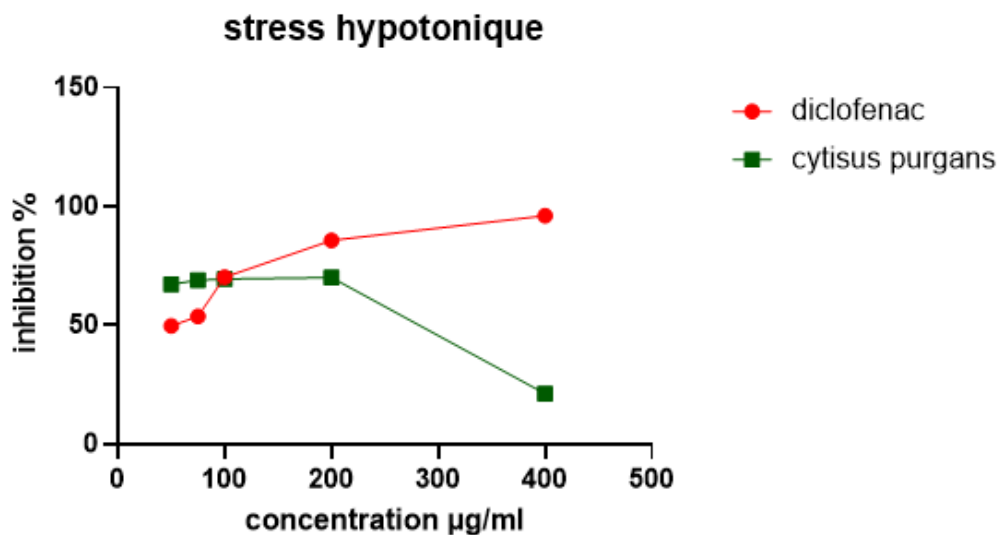


Figure 140. Effet inhibiteur de l'hémolyse induite par l'hypotonie de l'extrait acétate d'éthyle de *C.purgans*

Quant à l'hémolyse induite par la chaleur, *C.purgans* a démontré une activité inhibitrice modérée en comparaison avec le diclofenac (Fig.141) .

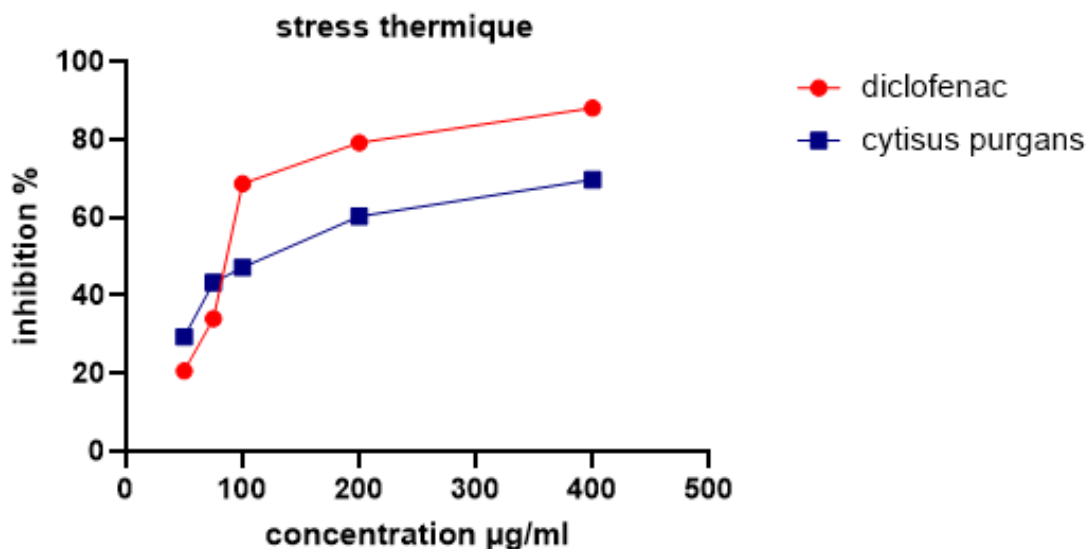


Figure 141. Effet inhibiteur de l'hémolyse induite par la chaleur de l'extrait acétate d'éthyle de *C. .purgans*

Les résultats *in vitro* suggèrent que l'extrait de la partie aérienne de *V.rosea* et *C.purgans* possèdent une activité anti-inflammatoire potentielle . Bien que le mécanisme exact de la

stabilisation de la membrane par les extrait ne soit pas encore complètement élucidé, il est plausible que l'hémolyse induite par l'hypotonie soit causée par le rétrécissement des cellules dû à la perte osmotique d'électrolytes intracellulaires et de composants fluides. L'extrait pourrait inhiber les processus qui favorisent la sortie de ces composants intracellulaires, contribuant ainsi à la protection contre l'hémolyse.(Parvin *et al.*, 2015)

Tandis que les espèces de *Veronica* aient déjà été utilisées dans la médecine traditionnelle pour traiter divers troubles inflammatoires, y compris le rhumatisme, leurs mécanismes d'action pharmacodynamiques demeurent encore largement méconnus. Plus récemment, pour confirmer l'efficacité de leurs usages traditionnels et identifier leurs principes actifs, des évaluations pharmacologiques modernes associées à la phytochimie ont été entreprises sur nombreuses espèces. Ces études ont révélé que de nombreux extraits et composés actifs présentent des effets bénéfiques, notamment des propriétés anti-inflammatoires, tant *in vivo* qu'*in vitro*.(Xue *et al.*, 2019)

Citons comme exemple type, *V. polita* qui se distingue par ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires prononcées. Son étude phytochimique a mis en évidence une teneur élevée en phénoliques totaux et en flavonoïdes. *V. polita* a démontré des effets anti inflammatoires dans plusieurs modèles animaux : elle a amélioré la colite induite par le sulfate de dextran chez les souris et atténué les cytokines pro-inflammatoires dans un modèle murin de prostatite. (R. Akanda *et al.*, 2018)

De plus, les molécules phénoliques essentielles que nous avons découvertes dans les extraits des deux plantes possèdent des effets anti-inflammatoires efficaces. D'une manière générale, ces phytomolécules sont bien entendu des flavonoïdes qui exercent leurs effets anti-inflammatoires à travers plusieurs mécanismes d'action tels que la suppression des enzymes régulatrices et des facteurs de transcription, l'inhibition des enzymes telles que la protéine kinase C, les protéines tyrosine kinases, la phospholipase A2 et les phosphodiesterases et le piégeage des radicaux libres. (Essa *et al.*, 2023) (Parvin *et al.*, 2015)

Malgré que les flavonoïdes soient omniprésents dans la nature, les flavonoïdes acylés sont moins courants, bien qu'ils présentent des effets biologiques potentiels (Fig.142)

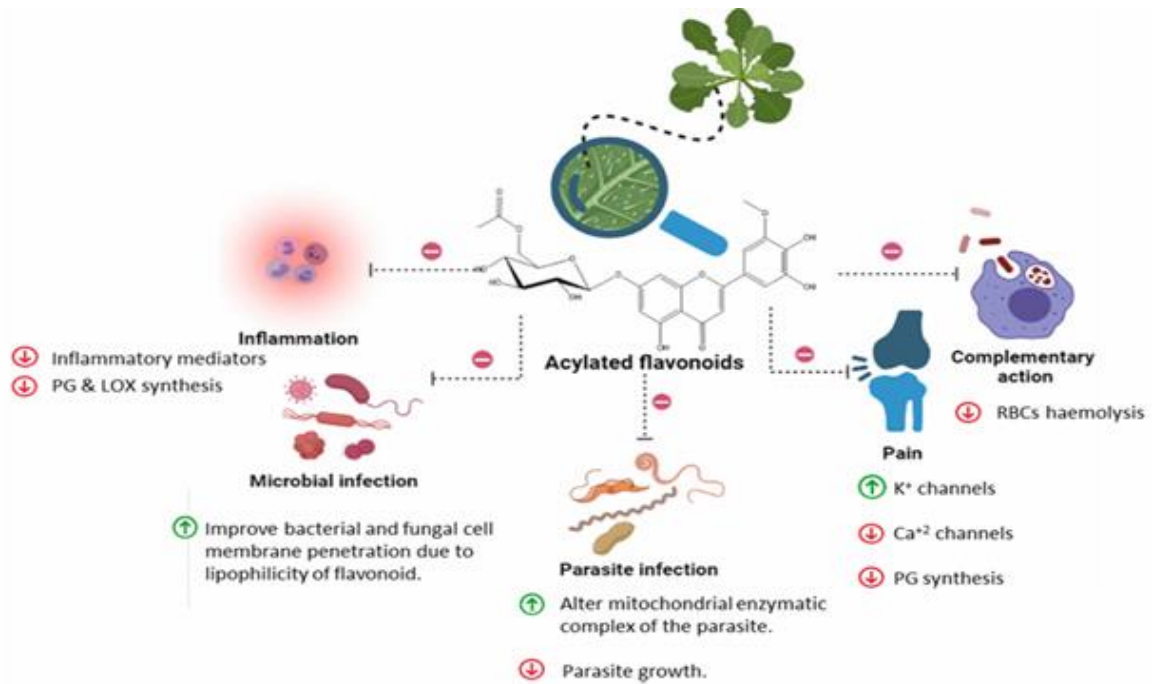


Figure 142. Activités pharmacologiques des flavonoïdes acylés(Essa *et al.*, 2023)

Les isoscutellareins acétylés à titre d'exemple, sont de puissants inhibiteurs de la lipooxygénase (LOX) notamment l' isoscutellarein-7-O-[6''-O-acetyl-β-D-allopyranosyl-(1 →2)]-β-D-glucopyranoside, ce dernier a été identifié dans l'extrait acétate d'éthyle de *V. rosea* et pouvant être responsable sur son activité antiinflammatoire . Ce même produit a été testé *in vivo* , ainsi une diminution très sensible de l'œdème de la patte postérieure induit par la carraghénane a été constatée . (Küpeli *et al.*, 2007)

Le mécanisme d'action pourrait être médié par l'activité antioxydante des flavonoïdes acétylés et leur capacité à chélater le fer présent dans le site actif de la LOX . L'étude de relation structure-activité pourrait expliquer le rôle des sucres acétylés dans la structure des flavonoïdes, bien que la position de l'acylation soit trouvée moins influente.(Essa *et al.*, 2023)

Mutoh *et al.* ont évalué l'activité inhibitrice de douze flavonoïdes différents sur la transcription du gène de la cyclooxygénase-2 (COX-2) dans une lignée cellulaire de cancer du côlon humain, spécifiquement les cellules DLD-1. Les flavonoïdes comprenaient la quercétine, la génistéine , la lutéoline , la chrysin et l'apigénine tous ont été supprimeur de la transcription de COX-2 , néanmoins la quercétine était le supprimeur le plus puissant. (Shamsudin *et al.*, 2022)

Redrejo-Rodriguez *et al.* ont étudié l'activité inhibitrice des enzymes LOX de quatre flavonoïdes différents, à savoir la quercétine , la lutéoline . Leur résultat suggère que la structure plane de ces flavonoïdes joue un rôle significatif dans la détermination de leur capacité inhibitrice. (Nile *et al.*, 2018) . L'apigénine a été testée également pour son effet

anti-inflammatoire, et les résultats étaient excellents, en effet à 100 μg , l'apigénine a inhibé à 71% la LOX. (Shamsudin *et al.*, 2022)

De plus, il a été découvert que l'effet inhibiteur des flavonoïdes sur la LOX est attribuable à la présence de la double liaison C2-C3 dans le cycle C, ainsi qu'au groupe hydroxyle en C-3 et C-4 dans le cycle B. Cependant, la présence de groupes hydroxyle en C3 du cycle C diminue l'activité inhibitrice. (Shamsudin, *et al.*, 2022)

López-Posadas *et al.* ont étudié les effets anti-inflammatoires de 14 flavonoïdes sur les splénocytes de rats et ont réalisé leur relation structure-activité. Cinq différents essais *in vitro* ont été réalisés, à savoir l'inhibition de l'iNOS, de la COX-2, de la sécrétion de cytokines, l'activité antiproliférative sur les splénocytes et la réduction de la viabilité des splénocytes, afin de comprendre l'effet anti-inflammatoire de ces flavonoïdes. Premièrement, pour l'inhibition de l'iNOS, l'apigénine, la lutéoline et la quercétine ont montré une inhibition complète ; tandis que la chrysin a montré une faible inhibition. En revanche, la génistéine et la daïdzéine ont été rapportés comme complètement inactifs contre l'iNOS. Pour l'inhibition de la COX-2, seuls l'apigénine a exercé une inhibition. D'un point de vue structure activité, il a été souligné que la présence de groupes hydroxyle au C2' et au C4' du cycle B peut influencer les deux activités. En revanche, les groupes méthoxy et hydroxyle en C3 peuvent réduire l'inhibition de l'iNOS. (López-Posadas *et al.*, 2008). Deuxièmement, pour l'inhibition de la production de cytokines telles que le TNF- α , l'IFN- γ , et l'IL-2, il a été conclu que tous les flavonoïdes testés ont montré une bonne et efficace inhibition. Les auteurs ont résumé cinq exigences structurelles pour l'inhibition de la production de cytokines. La double liaison C2-C3, le groupe hydroxyle en C4, le groupe hydroxyle en C3, l'absence du groupe hydroxyle en C3, et le groupe hydroxyle en C5 favorisaient l'inhibition de la production de cytokines. (López-Posadas *et al.*, 2008)

Le daucostérol pourrait être un agent anti-inflammatoire naturel en raison de son puissant effet inhibiteur sur les cellules inflammatoires activées (Fig. 143). Comme cela a été observé dans l'expérience réalisée par Yang *et al.*, ou le daucostérol a diminué de manière significative la teneur en NO des macrophages péritonéaux de rat induits par le LPS (Yang *et al.*, 2015)

Dans une autre étude, Kim *et al.* (2020) ont prouvé que le daucostérol agissait comme anti-inflammatoire non seulement par diminution de la production de NO mais aussi par inhibition de la COX-2, de la iNOS, de la collagénase et des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-6) (M. J. Kim *et al.*, 2020) (Omari *et al.*, 2022)

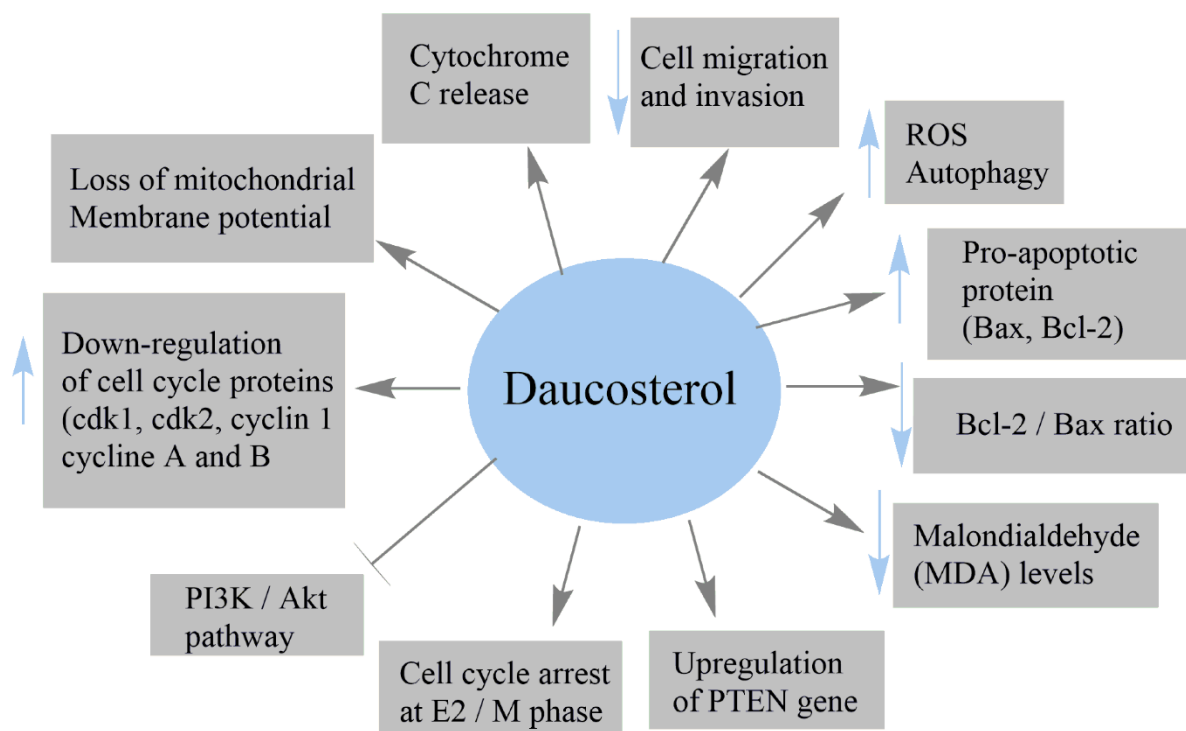


Figure 144 . Mécanismes mises en jeu dans l’action antiinflammatoire du daucostérol
(Omari *et al.*, 2022)

V.7.4. Activité hémostatiques

L'hémostase est un processus en cascade très compliqué qui implique des plaquettes et une variété de molécules, conduisant à la formation de chaînes de fibrine insolubles. Il existe plusieurs indicateurs pour l'étude *in vitro* des effets hémostatiques, notamment le temps de saignement, le temps de coagulation, le temps de prothrombine, l'activité de la prothrombine, le temps de recalcification du plasma et le taux d'adhésion et d'agrégation des plaquettes. En général, un ou plusieurs indicateurs peuvent être utilisés pour cribler les agents hémostatiques. (Ibrahimi *et al.*, 2020)

Depuis que l'utilisation des médicaments à base de plantes est devenue populaire dans le monde entier et compte tenu de la longue histoire de l'utilisation ethnométriculaire des plantes dans le contrôle des saignements, cela constituerait une source inestimable pour trouver de nouveaux médicaments hémostatiques. (Ibrahimi *et al.*, 2020)

Le temps de recalcification du plasma est le temps nécessaire pour la récupération du processus de coagulation sanguine intrinsèque après l'ajout de Ca^{2+} au plasma privé de calcium. La mesure du temps de recalcification du plasma est une méthode simple et directe pour simuler un processus de coagulation intrinsèque *in vitro*. Il est principalement utilisé dans l'évaluation de

la capacité des plaquettes à former un thrombus, ce qui est important dans les études sur l'hémostase.(Hu *et al.*, 2018)

L'activité hémostatique *in vitro* de *V. rosea* a été évaluée en mesurant le temps de recalcification du plasma (PRT). Le temps de coagulation a été raccourci de manière dose-dépendante. En effet, l'ajout de différentes concentrations (2, 3, 4, 6 et 8 mg/mL) de l'extrait d'acétate d'éthyle (EAE) a considérablement réduit le temps de coagulation par rapport au témoin (Tab.17).

Tableau 17. Raccourcissement du temps de coagulation induit par *V.rosea*

Echantillon	Concentration mg/mL	Temps de coagulation S
<i>V. rosea</i> extract	2	16.78±0.04****
	3	14.52±0.17****
	4	12.03±0.06****
	6	7.63±0.17****
	8	6.15±0.18****
Control	/	18.09±0.07

L'extrait *n*-butanolique *C.purgans* a révélé également un raccourcissement du temps de coagulation dose- dépendant . Ces résultats étaient hautement significatifs en comparaison avec le contrôle négatif

Tableau 18. Raccourcissement du temps de coagulation induit par *C.purgans*

Echantillon	Concentration mg/mL	Temps de coagulation S
<i>c. purgans</i> extract	2	13,2±0.1****
	3	9.95±0.07****
	4	9,71±0.37****
	6	8,23±0.04****
	8	7.36±0.17****
Control	/	18.09±0.07

En fait, il est suggéré que les composés bioactifs, souvent impliqués dans la régulation des saignements, peuvent être classés en tant que tanins, saponines, glycosides et autres phénoliques

(Fig.144) . De plus, l'effet anti-fibrinolytique de la browplasminine (un tanin), du 8-O-acétyl shanzhiside méthylestere (un glycoside iridoïde) et de la lignine a été confirmé.(Ibrahimi *et al.*, 2020)

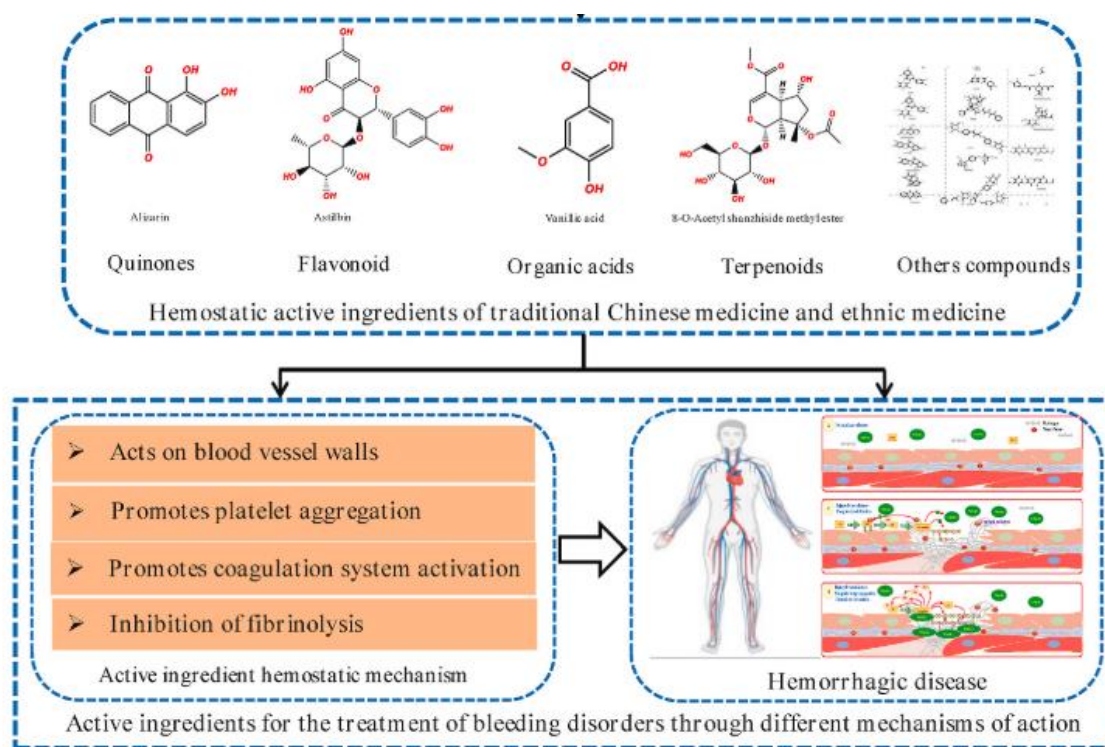


Figure 145. Quelques biomolécules hémostatique et leurs mécanismes d'action (Mu *et al.*, 2023)

Après consultation des études précédentes pertinentes, il a été établi que les flavonoïdes tels que la quercétine et l'isoquercitrine peuvent favoriser l'hémostase en réduisant la perméabilité capillaire et en agissant sur d'autres voies pour induire la contraction de la paroi vasculaire. (Sachetto *et al.*, 2018). La lutéoline par exemple active le système de coagulation interne et externe. (Lin *et al.*, 2014; Mu *et al.*, 2023). Certains isoflavonoïdes comme daidzéine peuvent favoriser l'hémostase en inhibant la fibrinolyse.

V.7.5. Les activités enzymatiques

Un aspect clé de la découverte de médicaments est l'identification de petites molécules ayant des activités inhibitrices enzymatiques. Les enzymes sont essentielles à la vie humaine, médiant les processus biochimiques, y compris le métabolisme, la transduction des signaux cellulaires, le cycle cellulaire et le développement. Un dysfonctionnement de ces systèmes biochimiques conduit souvent à des maladies, dont la cause première peut souvent être attribuée à la dysfonction, la surexpression ou l'hyperactivation des enzymes impliquées. Une

compréhension des maladies au niveau moléculaire a conduit à la découverte d'inhibiteurs d'enzymes efficaces utilisés en pratique clinique. (Ata *et al.*, 2011)

V.7.5.1. Activité neuroprotectrice et anti-alzheimer

Effectivement, il est bien établi que la carence en acétylcholine dans le système nerveux est un facteur prédisposant à de nombreux problèmes neurologiques, notamment la maladie d'Alzheimer (AD). Par conséquent, l'augmentation des niveaux d'acétylcholine dans le cerveau est considérée comme l'une des approches les plus efficaces pour traiter la maladie d'Alzheimer. (Marucci *et al.*, 2021)

Quatre inhibiteurs de l'AChE : tacrine, donepezil, galantamine et rivastigmine sont approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis pour être utilisés en clinique. Ces composés ont une efficacité limitée et un certain nombre d'effets secondaires. Par exemple, la tacrine présente une labilité hépatotoxique et la rivastigmine a une demi-vie courte. (Vecchio *et al.*, 2021)

Les inhibiteurs de l'AChE ont également des applications dans le traitement de la démence sénile, de l'ataxie, de la myasthénie grave et de la maladie de Parkinson. Dans notre effort continu pour découvrir de nouveaux inhibiteurs de l'AChE, notre recherche phytochimique sur *V.rosea* et *C.purgans* a été suivie par l'investigation de potentiel inhibiteur des cholinestérases

L'activité inhibitrice de l'enzyme acétylcholinestérase des deux extraits de la plante étudiée est évaluée par une méthode calorimétrique en utilisant la galantamine comme contrôle positif . Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition et IC₅₀. Les résultats du test sont présentés dans le tableau 19.

Tableau 19 . Activité inhibitrice de l'acetyl/butyrylcholinesterase par *V.rosea* et *C. purgans*

Acétylcholinestérase inhibition assay								
Extraits	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC ₅₀ (µg/ml)
<i>V.rosea</i>	06.33± 0.79	10.57± 0.48	17.61± 1.08	25.35± 1.00	38.16± 0.51	49.31± 0.93	60.47± 1.90	121.6± 03.29
<i>C. purgans</i>	10,25± 1.00	22.89± 1.34	30.10± 1.00	52.60± 1.15	69,63± 1.50	75,90± 1.40	88.16± 1.86	24.40± 02.84
Galanthamine	35,93 ± 2,28	43,77 ± 0.00	68,50 ± 0,31	80,69 ± 0,41	85,78 ± 1,63	91,80 ± 0,20	94,77 ± 0,34	6.27±1. 15

Butyrylcholinestérase inhibition assay								
<i>C. purgans</i>	13,69± 0.51	22,35± 1.12	30,79± 1.17	46,44± 0.85	57,92± 0.53	68,72± 1.21	75,88± 1.40	36.39± 0.75
<i>V.rosea</i>	10.96± 1.23	17.04± 0,95	22.38± 0,46	30,26± 0.97	41.26± 1.55	49,48± 0.82	60,83± 1.46	108.94 ±4.24
Galanthamine	3,26± 0,62	6,93± 0,62	24,03± 2,94	45,13± 2,60	63,87± 2,85	73,57± 0,77	78,95± 0,58	34.75± 1.99

L'analyse des résultats indique que les deux extraits testés ont une bonne activité inhibitrice de l'ACh, avec une suprématie de *C.purgans* . En effet, en comparant nos résultats avec ceux de la galanthamine , une molécule de référence , l'extrait de *C.purgans* montre une excellente activité inhibitrice de la butyrylcholinesterase avec une valeur d'IC₅₀ de 36.39 µg/mL contre 34.75 µg/mL pour la galanthamine (Figure.145) .

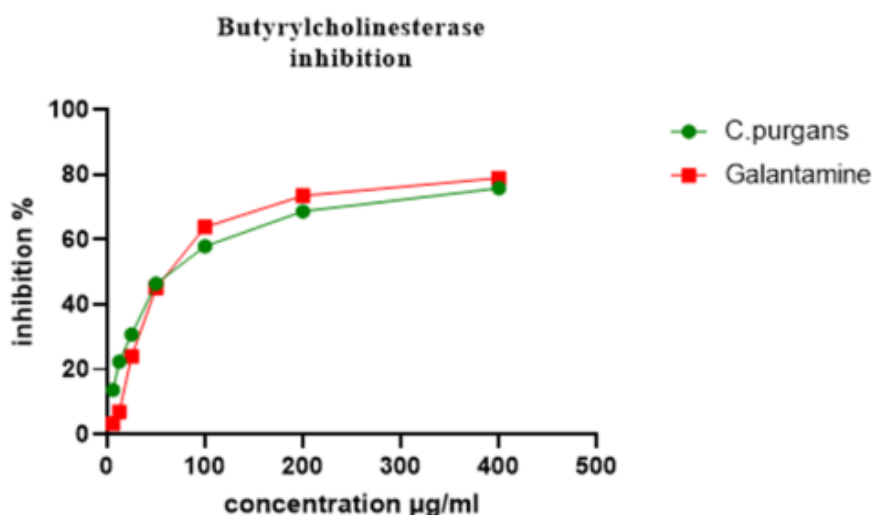


Figure 145. Effet inhibiteur de la butyrylcholinesterase de l'extrait butanolique de *C.purgans*. Les données représentent la moyenne \pm SD. * $p < 0.05$

Pareillement pour l'acetylcholinesterase ou on observe à 200 $\mu\text{g/mL}$ un pourcentage élevé d'inhibition de l'ordre de 88.16% contre 94,77 % d'inhibition par la galanthamine à la même dose. (Figure.147)

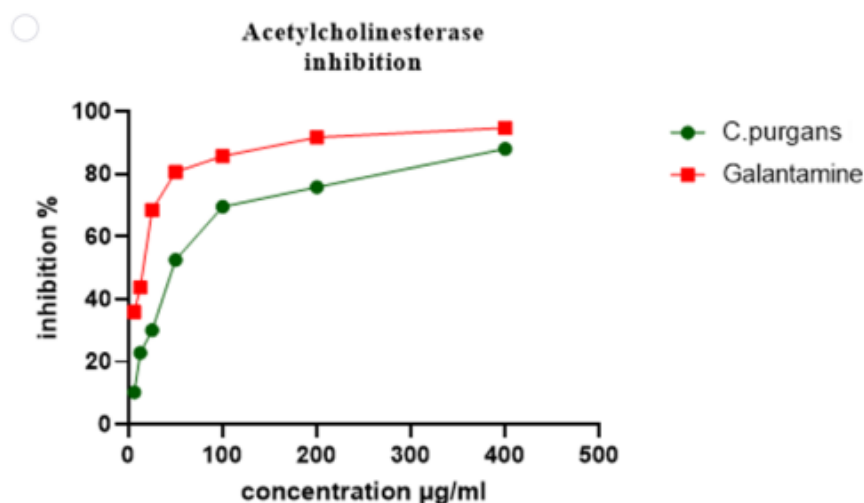


Figure 146 Effet inhibiteur de l'acetylcholinesterase de l'extrait butanolique de *C.purgans*. Les données représentent la moyenne \pm SD. * $p < 0.05$

Peu d'études ont été conduites sur les autres espèces du genre *Cytisus* et leurs effet neuroprotecteur, encore moins l'intérêt des flavonoïdes issus de ce genre. Néanmoins les alcaloïdes extraits des espèces du genre *Cytisus* ont attiré une attention particulière. Par exemple, les alcaloïdes extraits de *C. scoparius* ont été observés pour moduler les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChR), activer la voie Akt, et préserver l'activité synaptique dans les neurones hippocampiques. Ces composés représentent des types moléculaires

importants, offrant ainsi une nouvelle avenue pour le développement de nouveaux outils pharmacologiques dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.(Gavilan et al., 2019). Un autre effet neuroprotecteur exploré d'une espèce du genre *Cytisus*, l'effet inhibiteur sur les monoamines oxydases humaines exercé par *C. villosus* responsable sur sa capacité neuroprotective potentielle.(Larit, Elokely, et al., 2018)

L'extrait de *V. rosea* a montré aussi une activité inhibitrice des cholinestérases modérée avec des IC₅₀ de 121.6 et 108.94 µg/mL (acetyl/butyrylcholinestérase). Toutefois, cette activité inhibitrice reste inférieure à celle de la galanthamine (Figure.147). Dans une étude précédente, nous avons rapporté un effets neuroprotecteur modéré des extraits de *V. jacquinii* et de *V. teucrium* sur la lignée cellulaire humaine de neuroblastome SH-SY5Y et de leurs extraits méthanoliques sur l'AChE. (Živković et al., 2017)

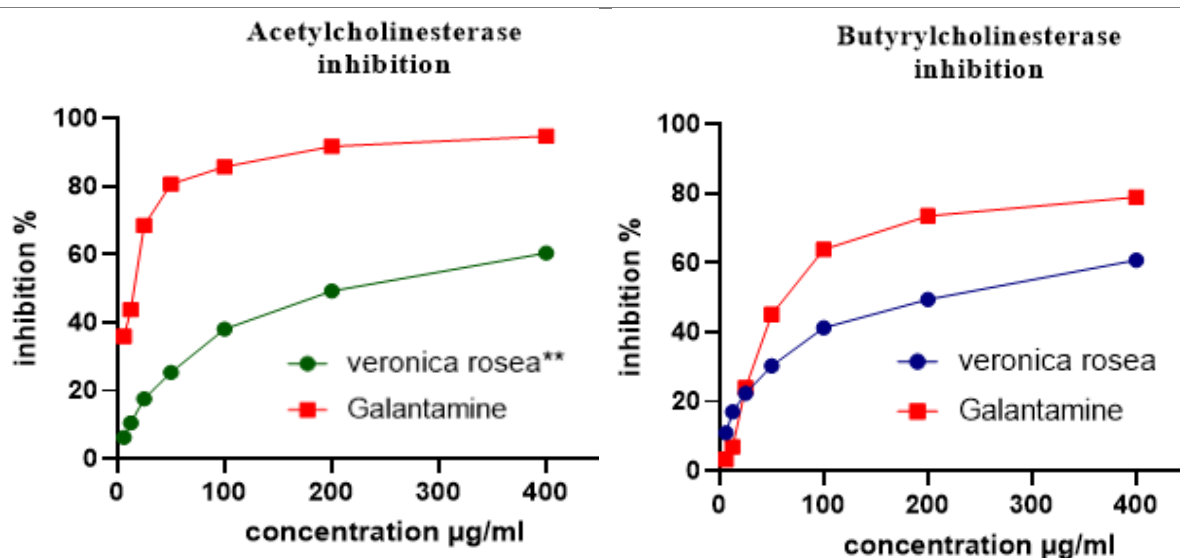


Figure 147. Effet inhibiteur de l'acétyl/butyrylcholinestérase de l'extrait acétate d'éthyle de *V.rosea*. Les données représentent la moyenne ±SD. *p<0.05

De nos jours, de nouveaux inhibiteurs efficaces et sûrs sont recherchés, en particulier ceux qui agissent par l'intermédiaire de plusieurs sites récepteurs sans provoquer d'effets indésirables. À cet égard, l'évaluation des substances phytochimiques telles que les flavonoïdes peut constituer une approche rationnelle. (H. Khan, Marya, et al., 2018)

Effectivement, les extraits de *V.rosea* et de *C. purgans* présentent une capacité inhibitrice de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase, probablement en raison des phytoconstituants contenus dans ces extraits, à savoir les flavonoïdes et les isoflavonoïdes.

Les polyphénols, connus pour leurs propriétés antioxydantes, ont également été associés à des effets neuroprotecteurs. Hashim et al (2021) ont découvert que la lutéoline, la myricétine et le

kaempférol sont de puissants inhibiteurs de l'AChE, ce qui suggère que les flavonoïdes peuvent interagir efficacement avec le site actif de l'enzyme (Hashim *et al.*, 2021) . En outre, les substances phytochimiques ayant des propriétés neuroprotectrices ont un impact sur diverses voies en raison de leurs effets antioxydants, anti-inflammatoires et antiapoptotiques. En résumé, les flavonoïdes présentent un potentiel significatif pour l'activité anticholinestérasique, tandis que les acides phénoliques présentent un potentiel plus faible ou moins élevé (Chaira *et al.*, 2022)

Revoyons les flavonoides contenus dans *V. rosea* , on constate que l'apigénine est un composant important pouvant être impliqué dans l'activité inhibitrice des cholinestérases . En effet, selon la récente revue de Nabavi *et al.* (2018) l'apigénine joue un rôle neuroprotecteur dans les modèles animaux expérimentaux de la maladie d'Alzheimer (AD) et de la maladie de Parkinson (PD), ainsi que dans les études cliniques conduites chez l'homme. Au-delà de l'activité antioxydante bien connue de ce flavonoïde, l'effet de neuroprotection observé semble être lié à l'amélioration des composants inflammatoires de la maladie d'Alzheimer.(Nabavi *et al.*, 2018)

Par conséquent l'apigénine pourrait représenter un nouvel outil pour retarder l'apparition de la maladie d'Alzheimer ou ralentir sa progression.(Salehi, Venditti, *et al.*, 2019)

D'autre part, une étude précédente a suggéré que la lutéoline peut retarder ou prévenir l'apparition et la progression de la maladie d'Alzheimer grâce à ses propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et anti-déclin cognitif. Cependant, le mécanisme exact impliqué dans les effets neuroprotecteurs de la lutéoline n'est pas clairement compris. (Kempuraj *et al.*, 2021) . Ce qui est évident est que la lutéoline protège les rats atteints de la maladie d'Alzheimer contre les troubles cognitifs induits par A β en régulant le système cholinergique ainsi qu'en prévenant les lésions oxydatives. (Gupta *et al.*, 2018)

Quant aux produits purifiés de l'extrait de *C.purgans* , la quercétine exerce une neuroprotection *in vitro* à des concentrations qui se situent dans la plage des micromoles. En effet la quercétine a une capacité à contrer la neurotoxicité induite par le stress oxydatif.(Costa *et al.*, 2016) . Elle protège les cellules neuronales en atténuant le stress oxydatif et la neuroinflammation , inhibe l'agrégation d'A β et la phosphorylation de la tau. Elle restaure les niveaux d'acétylcholine en inhibant l'hydrolyse de l'acétylcholine par l'enzyme AChE (Figure 148) . (H. Khan, Jawad, *et al.*, 2018)

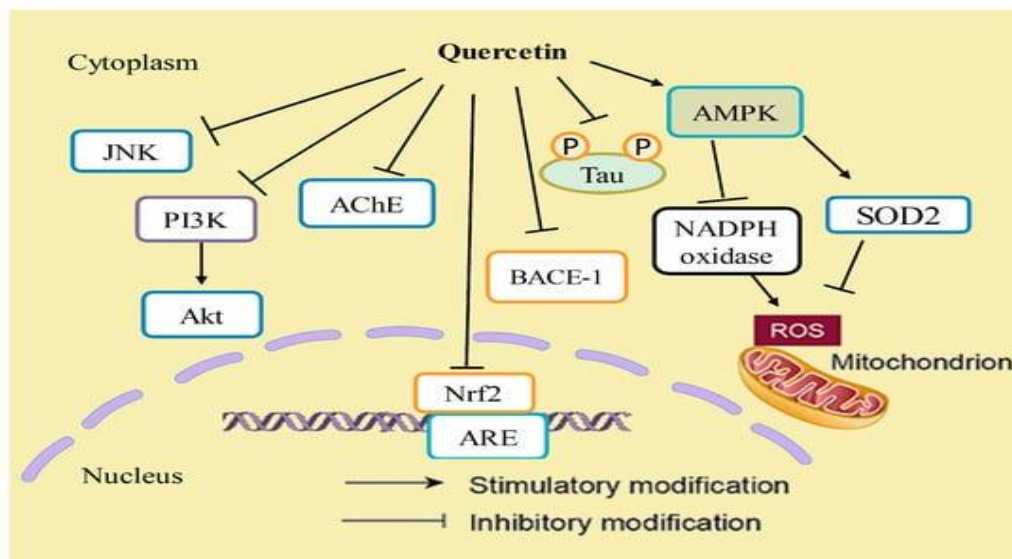


Figure 148. Mécanisme d'action de la quercétine dans la maladie d'Alzheimer (H. Khan, Jawad, et al., 2018)

Deux mécanismes primaires, et probablement complémentaires, ont été proposés pour les effets neuroprotecteurs des isoflavones : leur capacité à imiter les effets transcriptionnels des œstrogènes et leur activité antioxydante. Chimiquement, les isoflavones ont des structures similaires à l'estradiol et sont classées comme phytoestrogènes. Bien que leur rôle en tant que phytoestrogènes soit clairement important, ces composés ont probablement plusieurs mécanismes d'action, notamment des effets antioxydants significatifs dans les mitochondries. (Schreihofner, 2015, Alshehri *et al.*, 2021).

Le mécanisme moléculaire de la neuroprotection de la daidzéine était médié par la diminution de l'altération cellulaire induite par le palmitate. Plus précisément, le phytoestrogène non seulement réduit l'apoptose neuronale induite par le palmitate et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, mais protège également contre les lésions neuro-inflammatoires en diminuant la production de ROS, la dysfonction mitochondriale et l'activation de p-JNK et de la caspase-3, démontrant ainsi à la fois une action antioxydante et anti-apoptotique (Fig.149) (Morelli *et al.*, 2021)

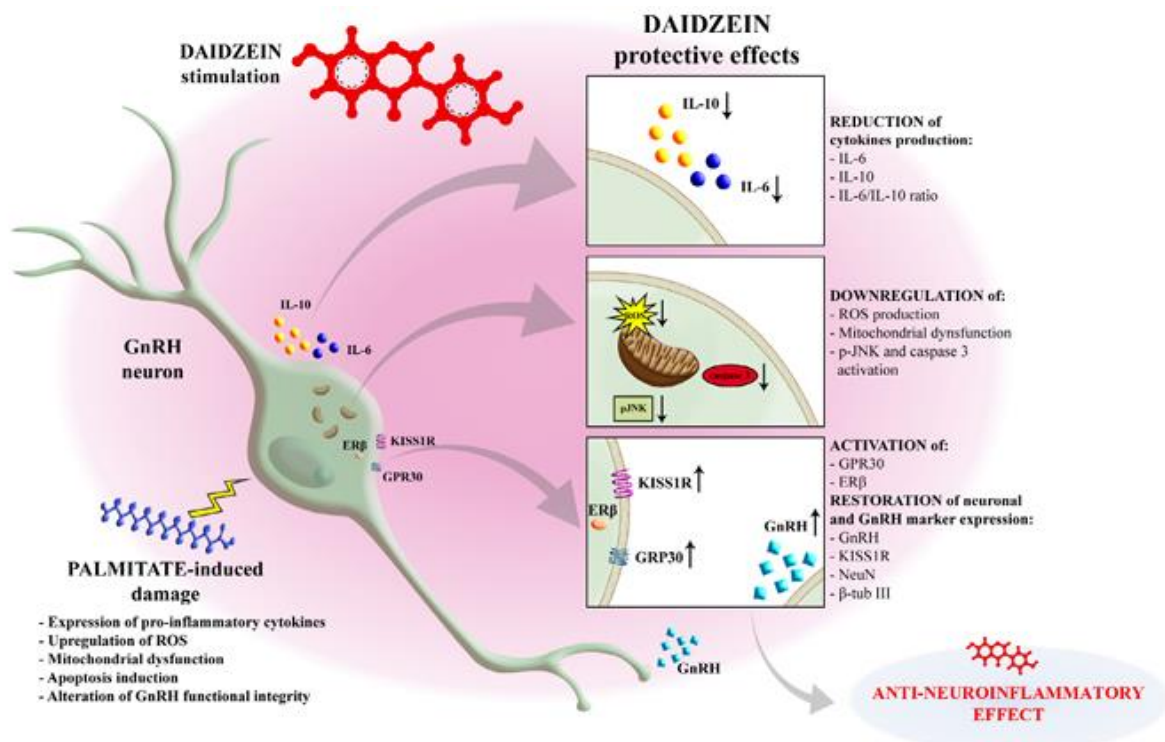


Figure 149. Mécanisme de neuroprotection de la daidzeine (Morelli *et al.*, 2021)

La génistéine , améliore la lésions cérébrales hypoxiques-ischémiques chez les souris néonatales en atténuant le stress oxydatif et l'inflammation grâce à l'activation de l'enzyme Nrf2/HO-1 et l'inhibition de la voie NF-κB. (Li *et al.*, 2022)

Enfin le phytostérol , daucostérol présente des effets neuroprotecteurs . Il réduit la perte neuronale et l'apoptose cellulaire en diminuant l'activation de la caspase-3 dans les neurones traités par privation d'oxygène et de glucose et reperfusion simulée (OGD/R). Il a également augmenté le niveau d'expression de la protéine IGF1 et diminué la régulation de p-AKT3 et p-GSK-3b4, activant ainsi la voie de signalisation AKT5.

De plus, le daucostérol diminue la régulation des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-2 et ainsi que le niveau d'expression de la protéine pro-apoptotique Bax. Le daucostérol exerce une activité neuroprotectrice contre le stress oxydatif induit par l'H₂O₂ par le biais d'une inhibition des voies MAPK, d'une minimisation des ROS et d'une stimulation des gènes antioxydants (HO-1, CAT et SOD2) (Figure 150) (Omari *et al.*, 2022)

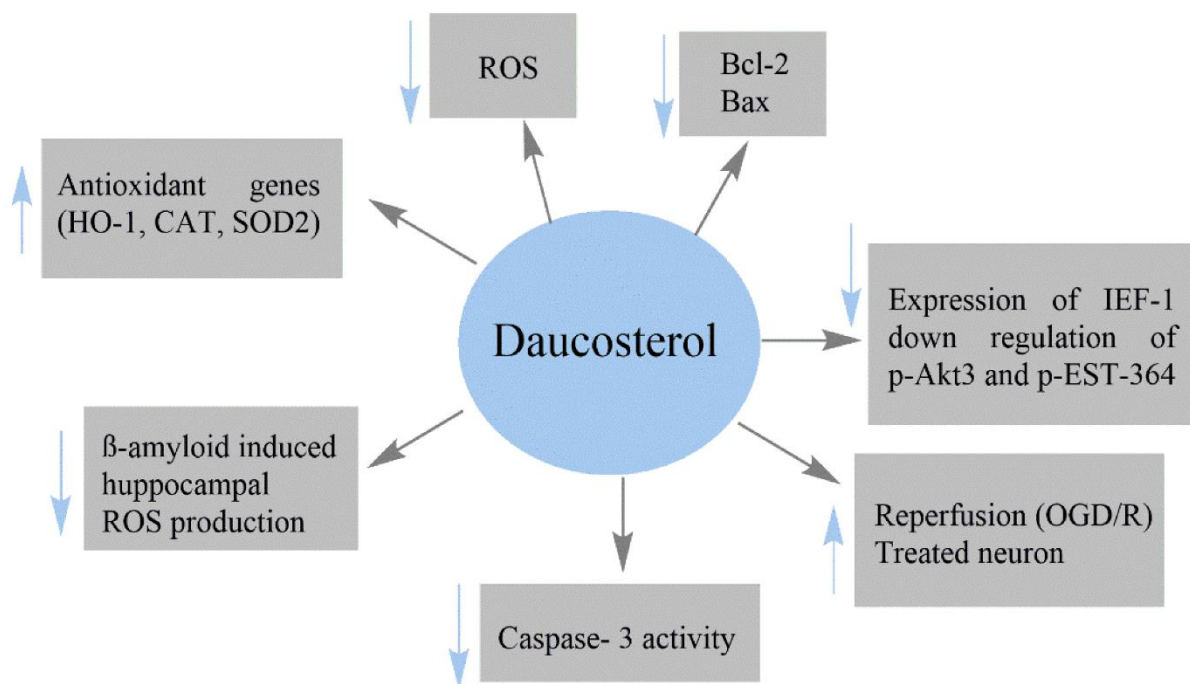


Figure 150. Mécanisme de la neuroprotection du daucostérol (Omari *et al.*, 2022)

V.7.5.2. Activité anti uréase

La quête de médicaments inhibant l'uréase est cruciale dans la lutte contre les infections bactériennes. Ces inhibiteurs jouent un rôle essentiel dans le contrôle des micro-organismes uréolytiques et contribuent également à l'exploration et à la compréhension de nouveaux aspects du mécanisme d'action des uréases. L'acide anthranilique possède une longue histoire en tant que précurseur chimique de nombreux composés bioactifs organiques, tels que des diurétiques, des antioxydants, des agents antiprolifératifs et antiallergiques.(El-Zahabi *et al.*, 2019)

De nombreux polyphénols d'origine naturelle, en particulier les flavonoïdes, ont été signalés comme des inhibiteurs notables de l'uréase. Nos résultats ont montré que les flavonoïdes étudiés avaient une capacité prometteuse d'inhibition de l'uréase, montrant plus de 50% d'inhibition à une concentration finale (**200 µg/mL**) avec une valeur de IC_{50} variant de 77.82 et 132.77 (µg/mL) en comparaison avec le contrôle positif thiourée (11.57/mL) (Tableau 20).

Tableau 20. Activité inhibitrice de l'uréase par *V.rosea* et *C. purgans*

Urease inhibition assay								IC ₅₀ (µg/ml)
Extraits	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400µg	
<i>C.purgans</i>	18,17±1 ,52	29,92±1 ,71	38,32±1 ,40	46,03±0 ,73	53,99±1 ,47	61,94±1 ,39	73,13±1 ,13	77.82±4. 59
<i>V.rosea</i>	15,28±1 ,24	22,18±1 ,50	28,44±1 ,65	35,91±1 ,58	48,74±0 ,46	58,39±0 ,38	67,69±1 ,05	132.77± 4.73
Thiourea	19,85±2 ,74	55,64±4 ,24	94,17±0 ,15	98,42±0 ,19	98,49±0 ,41	98,90±0 ,05	Nt	11.57±0. 68

Les extraits de *V.rosea* et *C.purgans* ont montré une activité inhibitrice modérée de l'uréase (Fig 151 et 152) . En effet dans les études antérieures la lutéoline, l'apigénine, la diosmétine et la chryisine ont montré une inhibition significative de l'uréase par rapport à tous les autres flavonoïdes.

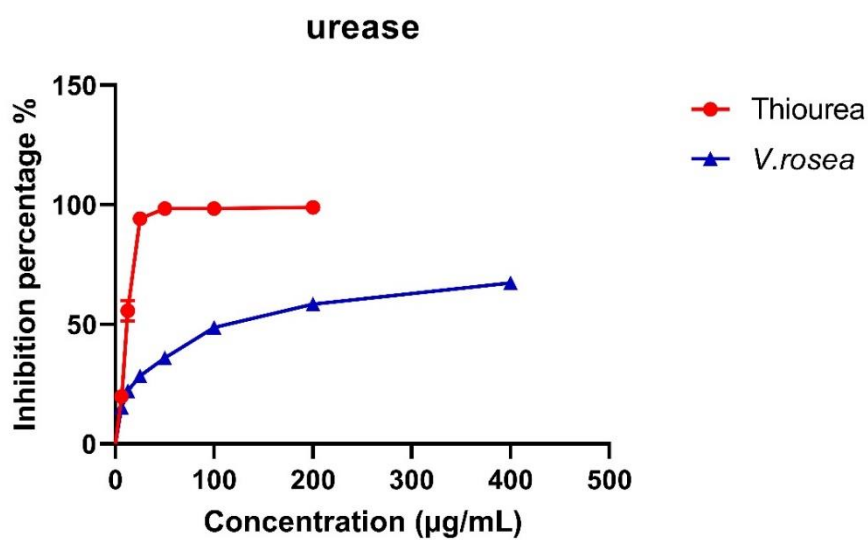


Figure 151. Effet d'inhibition de l'uréase des extraits de *V.rosea* par rapport à un contrôle classique, la thiourée.

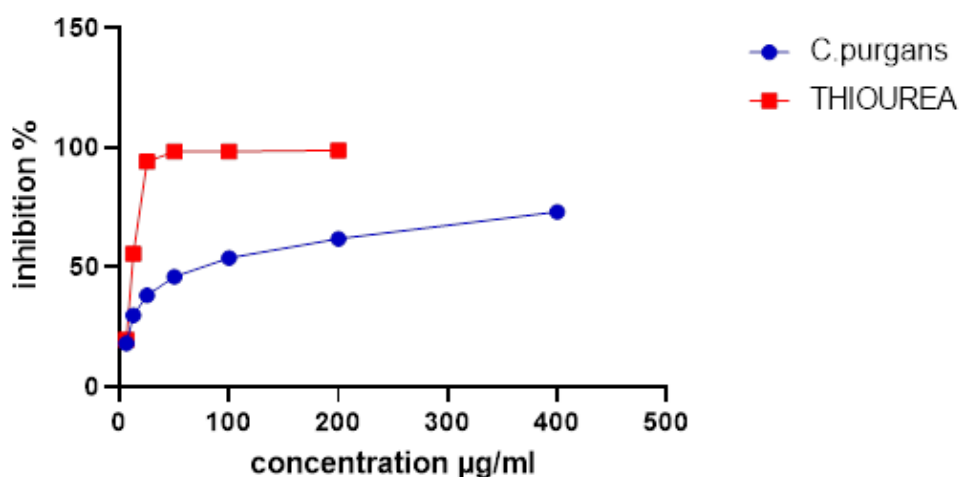


Figure 152. Effet d'inhibition de l'uréase des extraits de *C.purgans* par rapport à un contrôle classique, la thiurée.

Plusieurs composés phénoliques bioactifs ont été étudiés, ont montré un effet inhibiteur significatif et qui ont été identifiés à partir de matériaux végétaux, parmi lesquels figurent les flavonoïdes, les tanins, les terpènes, les aldéhydes aromatiques, les alcools, les tanins et les catéchines qui ont été largement étudiés. (Nile *et al.*, 2018)

Parmi les flavonoïdes retrouvés dans les extraits de *V. rosea* et *C.purgans* : la quercétine a démontré une activité anti-uréase avec une valeur de IC_{50} de 80mM, le lutéoline-7-O-glucoside a révélé une forte inhibition de l'uréase de *H. pylori* avec des valeurs de IC_{50} de 55,8 mM. De surcroît, la génistéine a montré une forte inhibition de l'uréase de *H. pylori* avec une valeur de IC_{50} de 1,6 mM. (Hassan & Žemlička, 2016)

L'étude structure activité a confirmé que les activités inhibitrices de ces composés sont dues à la présence de groupes hydroxyle, qui peuvent facilement se chélater avec le nickel dans le site actif de l'uréase.

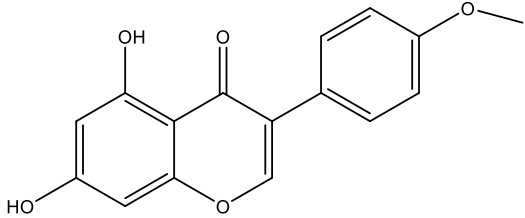
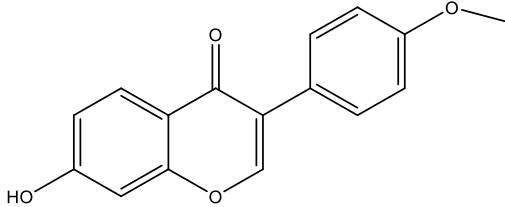
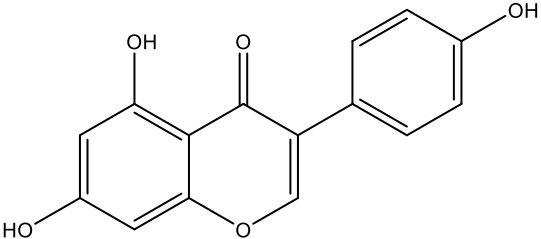
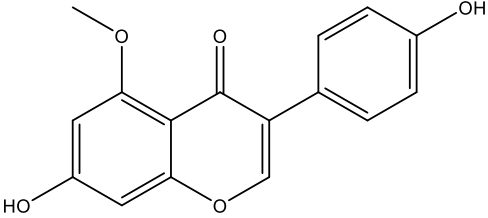
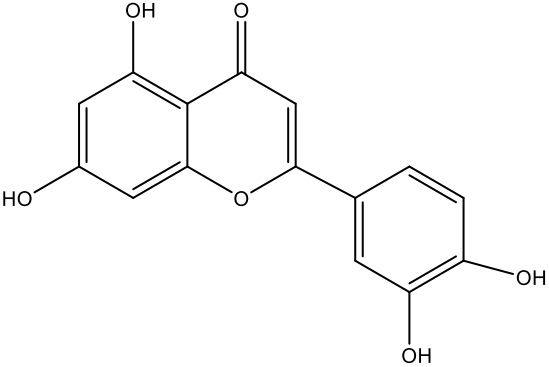
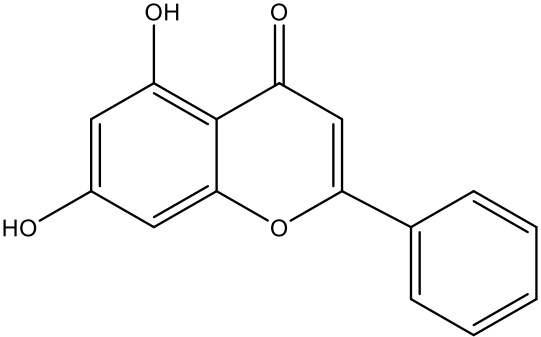
V.8. Résultats de l'étude *in silico* et du docking moléculaire

Les résultats de l'investigation pharmacobiologique des deux extraits de plantes a révélé entre autres résultats une activité inhibitrice de l'acétyl/butyrylcholinesterase remarquable. Suite à quoi, on a proposé un effet neuroprotecteur *in vitro* ce qui nécessite davantage d'expériences pour le confirmer. De ce fait, une étude *insilico* docking moléculaire s'impose pour essayer de comprendre ou prédire le mécanisme d'action des phytomolécules isolées de l'extrait le plus actif celui de *C.purgans* sur la butyrylcholinesterase.

V.8.1. Les résultats obtenus du site PubChem

Les informations générales obtenues sur les composés de *C.purgans* comme la formule moléculaire, poids moléculaire, nom IUPAC et SMILES canoniques sont affichés dans les tableaux suivants :

Tableau 21. Structure des phytomolécules extraites de *C.purgans*

 <p>Biochanine</p>	 <p>Daidzene</p>
 <p>Genestine</p>	 <p>Isoprunitine</p>
 <p>Quercitine</p>	 <p>Chrysrine</p>

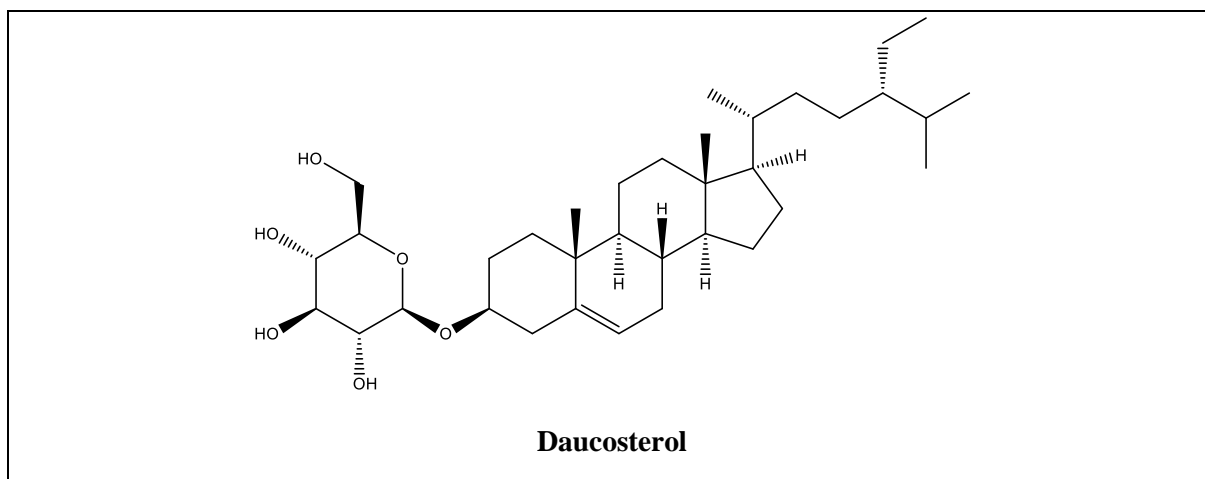


Tableau 21. Caractères généraux selon pubchem

Substance	Formule	Nom IUPAC	SMILES canoniques
Biochanine	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	5,7-dihydroxy-3-(4-methoxy phenyl)-4H-chromen-4-one	COC1=CC=C(C=C1)C2=COC3=CC(=CC=C3C2=O)O
Chrysin	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	5,7-dihydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one	C1=CC=C(C=C1)C2=CC(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O
Daidzeine	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	7-hydroxy-3-(4-methoxy phenyl)-4H-chromen-4-one	C1=CC(=CC=C1C2=COC3=C(C2=O)C=CC(=C3)O)O
Isoprune- tine	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	7-hydroxy-3-(4-hydroxy phenyl) -5-methoxy-4H-chromen-4-one	COC1=CC(=CC2=C1C(=O)C(=CO2)C3=CC=C(C=C3)O)O
Genisteine	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	5,7-dihydroxy-3-(4-hydroxy phenyl)-4H-chromen-4-one	C1=CC(=CC=C1C2=COC3=CC(=CC(=C3C2=O)O)O)O
Daucosterol	C ₃₅ H ₆₀ O ₆	(2R,3R,4S,5S,6R)-2-(((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-((2R,5S)-5-ethyl-6-methyl heptan-2-yl)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9, 10,11,12, 13,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-yl)oxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol	CCC(CCC(C)C1CCC2C1(CCC3C2CC=C4C3(CCC(C4)OC5C(C(C(O5)CO)O)O)O)C)C(C)C
Quercetine	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one	C1=CC(=C(C=C1)C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O)O

V.8.2. Résultats obtenu à partir de site Molinspiration, PubChem et SwissADME

Le calcul des descripteurs moléculaires tels que le coefficient de partage, de surface topologique et un certain nombre d'accepteurs et de donneurs de liaisons hydrogène a été réalisé à l'aide de l'outil en ligne des trois sites Molinspiration, Pubchem et Swissadme

Le concept de drug likeness, établi à partir de l'analyse des : propriétés structurales (moitiés formant des liaisons hydrogène, lipophilicité, poids moléculaire (PM), surface polaire), physico-chimiques (solubilité, perméabilité, stabilité), propriétés biochimiques (métabolisme, liaison aux protéines et aux tissus, modalité de transport) et pharmacocinétique / toxicité (clairance, demi-vie, biodisponibilité). (Figure 153)

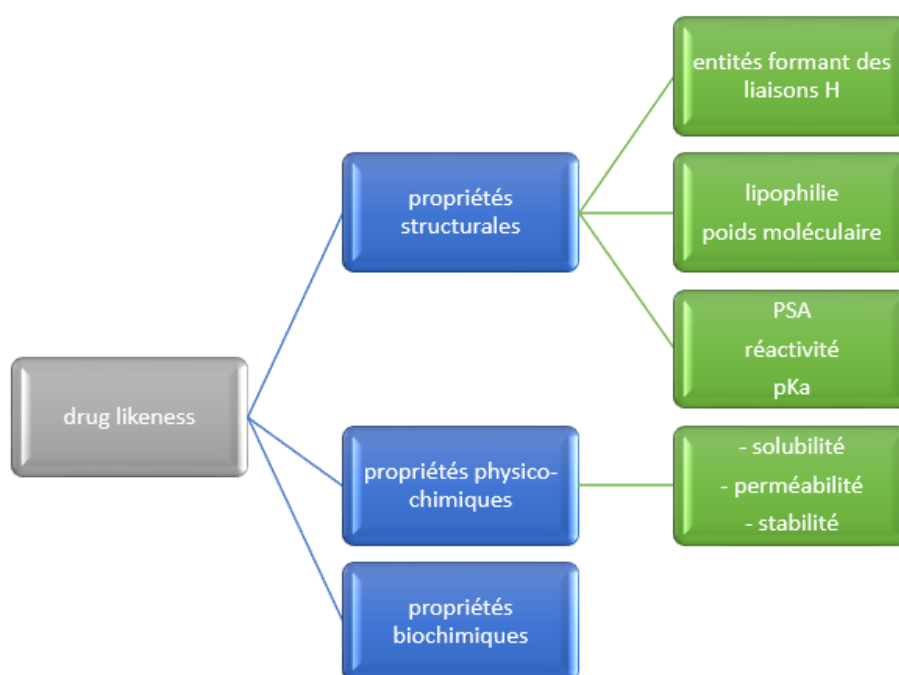


Figure 153. Les éléments de la drug-likeness (Athar *et al.*, 2019)

Ci-dessous, sont résumés les caractéristiques des composés isolés de *C. purgans* (Tableau 23) nécessaires pour l'évaluation de la drug likeness. (Athar *et al.*, 2019)

Tableau 23. Principaux paramètres physicochimiques selon Molinspiration des composés

	Biochanin A	Daidzein	Isopruneftin	Genisteine	Chrysin	Quercetin	Daucosterol	Galantamine
Formule	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	C ₃₅ H ₆₀ O ₆	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃
Poids moléculaire	284.26 g/mol	254.24 g/mol	284.26 g/mol	270.24 g/mol	254.24 g/mol	302.24 g/mol	576.85 g/mol	287.35 g/mol
Fraction Csp ³	0.06	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.94	0.53
Nombre. liaisons rotatables	2	1	2	1	1	1	9	1
Nombre d'accepteurs de liaison H	5	4	5	5	4	7	6	4
Nombre de donneurs de liaison H	2	2	2	3	2	5	4	1
Réfractivité molaire	78.46	71.97	78.46	73.99	71.97	78.03	165.61	84.05
TPSA	79.90 Å ²	70.67 Å ²	79.90 Å ²	90.90 Å ²	70.67 Å ²	131.36 Å ²	99.38 Å ²	41.93 Å ²
mi Log P	2,8	2,56	2,54	2,27	2,94	1,68	8,37	1,32
Volume	241.58	216.03	241.58	224.05	216.03	240.08	612.13	268.19
charge	0	0	0	0	0	0	0	0

V.8. 3. La bioactivité à partir de molinspiration

Les propriétés de la pharmacorésistance des molécules actives de la plante en tant que ligands GPCR, modulateurs des canaux ioniques, inhibiteurs de la kinase, ligands des récepteurs nucléaires, inhibiteurs de la protéase et inhibiteurs enzymatiques ont été étudiés.

Les résultats ont été obtenus en tant que scores de bioactivité (tableau 24) Dans ce contexte, les scores > 0,00 indiquent une activité élevée, tandis que les scores compris entre 0,00 et - 0,5 indiquent une activité modérée et les scores < -0,5 indiquent une inactivité.(Suganya *et al.*, 2020)

Tableau 24. Estimation des scores de bioactivité selon Molinspiration

	Biochanin	Chrysin	Daidzein	Daucosterol	Genistein	Isopruneitin	Quercetin	Galantamine
GPCR ligand	-0.23	-0.11	-0.30	0.16	-0.22	-0.21	-0.06	0.93
Ion channel modulator	-0.59	-0.08	-0.64	-0.41	-0.54	-0.58	-0.19	0.26
Kinase inhibitor	-0.07	0.15	-0.20	-0.50	-0.06	-0.06	0.28	-0.15
Nuclear receptor ligand	0.23	0.30	0.04	0.40	0.23	0.19	0.36	0.20
Protease inhibitor	-0.66	-0.30	-0.83	0.21	-0.68	-0.67	-0.25	0.01
Enzyme inhibitor	0.07	0.26	0.02	0.31	0.13	0.04	0.28	1.02

V.8.4. La biodisponibilité des biomolécules

L'outil en ligne SWISS ADME est utilisé pour analyser le profil pharmacologique et pharmacognostique des phytoconstitués sélectionnés sur la base de cinq filtres basés sur des règles différentes, à savoir Lipinski, Ghose, Verber, Egan et Mugge. (Tableau 25) (Daina *et al.*, 2017)

Tableau 25 . Score de drug likeness des phytomolécules extraites de *C.purgans*

	Biochanin A	Daidzein	Isoprune tin	Genistei n	Chrysin	Quercetin	Daucosterol	Galantamine
Lipinski	Yes; 0 violation	Yes; 0 violation	Yes; 0 violation	Yes; 0 violatio n	Yes; 0 violatio n	Yes; 0 violation	Yes; 1 violation: MW>500	Yes; 0 violation
Ghose	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No; 4 violations: MW>480, WLOGP>5.6, MR>130, #atoms>70	Yes
Veber	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Egan	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Muegge	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No; 1 violation: XLOGP3>5	Yes
Bioavailabil ity Score	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55

La règle de cinq de Lipinski est utilisée comme outil pour évaluer la similarité avec les médicaments des composés actifs, afin de déterminer s'ils sont actifs par voie orale ou non. Le filtre de Lipinski (Pfizer) caractérise les petites molécules en fonction de la propriété physico-chimique, qui comprend un poids moléculaire < 500 Da, un MLOGP 5, un nombre de liaisons rotatives inférieur à 10 et un nombre d'accepteurs et de donneurs de liaisons hydrogène inférieur à 10 et 5 respectivement . (Lipinski *et al.*, 1997)

Si un composé présente plus d'une violation, il est considéré comme ayant une mauvaise absorption par voie orale et est probablement exclu de tout développement ultérieur. (Weerakoon *et al.*, 2023)

Le filtre de Ghose (Amgen) décrit la propriété physico-chimique, l'existence de sous-structures et de groupes fonctionnels des petites molécules. La plage de qualification comprend la réfractivité molaire entre 40 et 130, le poids moléculaire entre 160 et 480 Da, le WlogP entre -0,4 et +5,6 et le nombre total d'atomes entre 20 et 70 respectivement pour une petite molécule (Ghose *et al.*, 1999).

Le filtre de Veber (filtre GSK) représente la similarité avec les médicaments si l'aire de surface polaire totale (TPSA) est égale ou inférieure à 140 Å avec 12 donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène et que le nombre de liaisons rotatives doit être de 10. Les composés ayant ces propriétés auront une bonne biodisponibilité par voie orale, un nombre accru de liaisons rotatives nuisant au taux de perméation et une TPSA réduite corrélée à une augmentation du taux de perméation (Veber *et al.*, 2002).

Le modèle computationnel d'Egan pour l'absorption intestinale passive humaine (HIA) des petites molécules tient compte des mécanismes de transport actif et d'efflux et est donc efficace pour prédire l'absorption des médicaments. La règle d'Egan est basée sur les valeurs de TPSA et de WLogP qui sont inférieures ou égales à 131,6 et 5,88 respectivement (Egan *et al.*, 2000).

Le filtre de Muegge (filtre Bayer) est un filtre de points pharmacophores indépendant qui sépare les molécules semblables aux médicaments des molécules non semblables aux médicaments. Ce modèle symbolise une molécule comme un médicament si elle a un poids moléculaire compris entre 200 et 600 Da, un XLOGP entre -2 et +5, une TPSA de 150, un nombre d'anneaux de 7, un nombre d'atomes de carbone > 4, un nombre d'hétéroatomes > 1, un nombre de liaisons rotatives de 15, un accepteur de liaison hydrogène de 10, un donneur de liaison hydrogène de 5 respectivement (Muegge *et al.*, 2001).

En pratique, les valeurs de Log P, de PM et de TPSA indiquent une bonne perméabilité membranaire et une bonne biodisponibilité orale des composés. En effet, l'hydrophobicité, la perméabilité membranaire et la biodisponibilité des molécules médicamenteuses dépendent de ces paramètres, y compris HBA et HBD. (M *et al.*, 2023)

Une lipophilicité élevée ($clogP > 5$) conduit fréquemment à des composés ayant un turnover métabolique rapide, une faible solubilité et une mauvaise absorption. De plus, une augmentation de la lipophilicité ($clogP > 5$) augmente la probabilité que les composés se lient à des cibles protéiques hydrophobes autres que celles désirées, ce qui induit donc des effets toxiques dans les systèmes biologiques. (Maliehe *et al.*, 2020)

Les phytomolécules étudiées ici ont toutes une moyenne lipophilicité à l'exception de la quercétine qui est faiblement lipophile (Tableau 26)

Tableau 26. Classification des phytoconstituants de *C.purgans* selon la lipophilie

Composé	logP	Lipophilie
Biochanine	2,44	Moyenne
Chrysin	2,55	Moyenne
Daidzeine	2,24	Moyenne
Isopruneatine	2,19	Moyenne
Genisteine	2,04	Moyenne
Daucosterol	5,51	Moyenne
Quercétine	1,23	Faible

Les valeurs admissibles de nRotB et de MR reflètent également une bonne absorption intestinale et une bonne biodisponibilité orale des composés. Il est donc affirmé que les molécules violant les règles ci-dessus ne présentent pas les propriétés optimales de perméabilité membranaire, d'absorption et de biodisponibilité orale. (Kalita *et al.*, 2019)

De plus, il est également important que la conformation (c'est-à-dire la stéréospécificité) de la molécule médicamenteuse soit telle qu'elle entraîne une interaction optimale avec le récepteur de médicament. Cela dépend de la propriété de nRotB, le nombre de liaisons rotatives est une mesure de la flexibilité moléculaire et constitue l'un des filtres les plus largement utilisés lors du processus de découverte de médicaments. De plus, TPSA et MR sont très utiles pour définir le comportement de transport et de bio distribution du médicament. (Maliehe *et al.*, 2020)

Dans la présente étude, tous les phytocomposés à l'exception du Daucostérol respectent les limites standard prescrites pour chaque règle et indiquent ainsi un taux d'absorption accru. De même, le nombre de donneurs et d'accepteurs de liaisons hydrogène doit être dans la plage acceptable ; s'il dépasse cette capacité, la capacité de la molécule médicamenteuse à traverser la membrane cellulaire sera affectée. En fin de compte, il peut être suggéré que les phytomolécules extraites de *C.purgans* ont un comportement de similarité avec les médicaments favorable à une perméabilité membranaire optimale et une biodisponibilité orale (pharmacocinétique) avec une interaction souhaitée avec le récepteur de médicament (pharmacodynamique). (Kalita *et al.*, 2019)

Après analyse les phytomolécules de *C.purgans* la biodisponibilité de toutes les molécules est jugée bonne (Tableau 27) .

Tableau 27. Biodisponibilité des principaux composés

Plante	Composé	Biodisponibilité
<i>Cytisus purgans</i>	Biochanine	Bonne
	Chryisine	Bonne
	Daidzeine	Bonne
	Isoprunitine	Bonne
	Genisteine	Bonne
	Daucosterol	Bonne
	Quercetine	Bonne

V.8.5. Les résultats obtenus à partir de site Admet-SAR

Le degré d'activité biologique d'un médicament envers sa protéine cible, ainsi que ses effets indésirables, est fortement influencé par ses qualités pharmacocinétiques. Cela aide également à déterminer si les composés ou les ligands présentent des qualités souhaitables telles que l'administration par voie orale, l'absorption, etc., afin d'éviter les échecs en fin de processus (Chandrasekaran *et al.*, 2019)

Ainsi, les propriétés ADMET jouent un rôle significatif dans le filtrage des phytomolécules, qui est réalisé en évaluant les propriétés de similarité avec les médicaments.

Parmi les propriétés ADME, la perméabilité, qui est la capacité d'un médicament à pénétrer à travers le tractus gastro-intestinal humain (TGI), est un facteur prévalant l'absorption intestinale humaine (AIH). La perméabilité des cellules Caco-2 (cellules d'adénocarcinome dérivées du côlon), l'absorption intestinale (humaine) et la perméabilité des cellules MDCK (rein de chien Madin-Darby) ont été utilisées comme méthodes de criblage à haut débit pour évaluer la perméabilité de molécules similaires à des médicaments. Les résultats des propriétés ADMET pour les phytocomposés criblés provenant de *C.purgans* sont rassemblés dans le tableau 28 .

Le processus de conception des molécules ciblées exige que le profilage ADMET soit initié au début du processus de découverte. La perméabilité BBB, HIA, Caco-2, la toxicité d'Ames et de nombreux autres paramètres ont été calculés pour les différents composés.

Tableau 28. Propriétés ADMET

	Biochain A	Daidzeine	Isopruneitin	Genistein	Chrysrine	Quercetine	Daucosterol	Galantamine
Model	Probability							
	Absorption							
Blood-Brain Barrier	0.5674	0.7448	0.5230	0.6785	0.6364	0.5711	0.6947	0.9959
Human Intestinal Absorption	0.9816	0.9942	0.9913	0.9877	0.9887	0.9650	0.8788	1.0000
Caco-2 Permeability	0.9526	0.7270	0.9478	0.7002	0.8541	0.8957	0.8336	0.8259
P-glycoprotein Substrate	0.6232	0.5151	0.6115	0.5000	0.5073	0.5629	0.8499	0.8976
P-glycoprotein Inhibitor	0.8111	0.9040	0.7490	0.9288	0.9543	0.9297	0.6804	0.6069
Renal Organic Cation Transporter	0.6095	0.7657	0.6399	0.7828	0.7525	0.8382	0.7436	0.9443
	0.8889	0.8982	0.8775	0.9075	0.9037	0.9310	0.8187	0.5728
	Distribution							
Subcellular localization	0.7877	0.8516	0.8722	0.7606	0.6655	0.5892	0.7468	0.5635
	Metabolism							
CYP450 2C9 Substrate	0.7181	0.7878	0.7418	0.7672	0.7813	0.7898	0.8716	0.8072
CYP450 2D6 Substrate	0.8957	0.9113	0.8943	0.9105	0.9126	0.9116	0.8748	0.8919
CYP450 3A4 Substrate	0.6019	0.6927	0.6109	0.6821	0.6907	0.6530	0.7502	0.7408
CYP450 1A2 Inhibitor	0.9540	0.9108	0.9528	0.9254	0.9222	0.9106	0.8052	0.9046
CYP450 2C9 Inhibitor	0.8287	0.9757	0.9266	0.8949	0.7746	0.5823	0.7682	0.9071

CYP450 2D6 Inhibitor	0.6939	0.9199	0.7966	0.9232	0.9231	0.9287	0.9187	0.5414
CYP450 2C19 Inhibitor	0.9470	0.8994	0.9623	0.8881	0.7043	0.9025	0.8388	0.8301
CYP450 3A4 Inhibitor	0.7746	0.6261	0.6125	0.7960	0.9580	0.6951	0.7938	0.8832
CYP Inhibitory Promiscuity	0.8845	0.6929	0.8179	0.8009	0.7316	0.5822	0.7103	0.9439
Excretion								
	Toxicity							
Human Ether-a-go-go-Related Gene Inhibition	0.9521	0.9559	0.9508	0.9569	0.9559	0.9781	0.9452	0.8023
AMES Toxicity	0.8682	0.9098	0.8819	0.8917	0.9098	0.8161	0.5000	0.7424
Carcinogens	0.9132	0.8906	0.7566	0.9638	0.9211	0.7220	0.7989	0.7995
Fish Toxicity	0.9347	0.9181	0.9277	0.9276	0.9203	0.9450	0.9587	0.9055
Tetrahymena Pyriformis Toxicity	0.8680	0.8694	0.9248	0.9017	0.9427	0.9564	0.9564	0.9623
Honey Bee Toxicity	0.9965	0.9394	0.9967	0.9810	0.9881	0.9961	0.9981	0.9628
Biodegradation	0.7212	0.7348	0.7140	0.6794	0.6719	0.6330	0.8668	0.5318
Acute Oral Toxicity	0.8757	0.8384	0.8989	0.8572	0.8811	0.8672	0.8433	1.0000
Carcinogenicity (Three-class)	0.7005	0.7012	0.7059	0.5830	0.5629	0.7348	0.6774	0.4944
	0.6169	0.6044	0.5611	0.7003	0.6163	0.6750	0.6820	0.6110

Tous les composés, ont révélé de fortes probabilités d'être absorbés dans le tractus gastro-intestinal. Cela implique une éventuelle administration par voie orale .

D'après la classification de Zhang *et al*, les composés sont classés selon leurs hydrosolubilités (logS) en trois catégories :

- Un composé de bonne solubilité : $\log S > -2$

- Un composé de solubilité moyenne : $-7 < \log S < -2$
- Un composé de mauvaise solubilité : $\log S < -7$

Tous les composés étudiés ont une solubilité moyenne entre -7 et -2.(tableau .29)

Tableau 29. Classification des composés isolés de la plante *C.purgans* selon Zhang *et al* (Zhang *et al.*, 2009)

Composé	LogS	Solubilité
Biochanine	-5,10	Moyenne
Chryisine	-4,98	Moyenne
Daidzeine	-4,48	Moyenne
Isopruneatine	-5.10	Moyenne
Genisteine	-4,40	Moyenne
Daucosterol	-4,40	Moyenne
Quercetine	-3,24	Moyenne

Selon le système de classification biopharmaceutique (BCS), les substances médicamenteuses sont classées en quatre catégories en fonction de leur solubilité et de leur perméabilité:

- **Classe I** : haute perméabilité, haute solubilité.
- **Classe II** : haute perméabilité, faible solubilité.
- **Classe III** : faible perméabilité, haute solubilité.
- **Classe IV**: faible perméabilité, faible solubilité.

Selon ces critères, les phytomolécules de *C.purgans* sont classées dans le tableau 30

Tableau 30. Classification biopharmaceutique des principaux composés des deux plantes

Composés	Perméabilité	Solubilité	Classe
Biochanine	Bonne	Moyenne	Classe II
Chryisine	Mauvaise	Moyenne	Classe IV
Daidzeine	Mauvaise	Moyenne	Classe IV
Isopruneatine	Mauvaise	Moyenne	Classe IV
Genisteine	Bonne	Moyenne	Classe II
Daucosterol	Bonne	Moyenne	Classe II
Quercetine	Mauvaise	Moyenne	Classe IV

Toutes les molécules testées pourraient traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) sauf la quercétine et la biochanine A. La pénétration à travers la BHE est uniquement obligatoire pour les composés ciblant le système nerveux central (SNC).

Les phyto-constituants trop polaires ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique (BHE). Les coefficients de partition sang-cerveau ($\log B/B$) ont été calculés et utilisés comme prédicteurs de l'accès au système nerveux central. Et la quercétine est faiblement lipophile ce qui explique qu'elle pénètre pas la barrière hématoencéphalique (James *et al.*, 2023)

Effectivement pour l'activité butyrylcholinestérasique, un passage de la barrière hématoencéphalique est souhaité et toutes les molécules sont capables de la traverser à l'exception de la quercétine .

Il est également essentiel de connaître l'interaction des molécules avec les cytochromes P450 (CYP). Cette superfamille d'isoenzymes joue un rôle clé dans l'élimination des médicaments par biotransformation métabolique. Il a été suggéré que les CYP et la P-gp peuvent traiter synergiquement de petites molécules pour améliorer la protection des tissus et des organismes.

On estime que 50 à 90 % (selon les auteurs) des molécules thérapeutiques sont des substrats des cinq principaux isoformes (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4). L'inhibition de ces isoformes est certainement l'une des principales causes d'interactions médicamenteuses liées à la pharmacocinétique entraînant des effets indésirables toxiques ou autres en raison d'un abaissement du taux d'élimination et d'une accumulation du médicament ou de ses métabolites. De nombreux inhibiteurs des isoformes du CYP ont été identifiés, certains affectent différentes isoformes du CYP, tandis que d'autres composés montrent une sélectivité pour des isoenzymes spécifiques . Il est donc d'une grande importance pour la découverte de médicaments de prédire la propension avec laquelle la molécule provoquera des interactions médicamenteuses significatives par inhibition des CYP, et de déterminer quelles isoformes sont affectées.(Daina *et al.*, 2017)

Les glycoprotéines P (P-gp) sont des transporteurs membranaires de composés dans les directions intracellulaires ou extracellulaires. Presque tous les composés, à l'exception de la daidzeine et la chryisine , ont été estimés comme non substrats pour la P-gp.

Cela implique que les composés ne seraient pas affectés par l'action d'efflux de la P-gp, qui élimine les composés des cellules, entraînant un échec thérapeutique.

L'inhibition du canal ionique hERG2 chez l'humain éther-à-go-go est un élément crucial à considérer dans le choix de candidats médicamenteux de haute qualité. Une inhibition de l'hERG2 peut entraîner un blocage du canal ionique du potassium dans le myocarde, affectant

ainsi le cœur et pouvant causer des problèmes de santé graves, voire la mort . Heureusement, les composés sélectionnés et la substance de référence ne sont pas des inhibiteurs de l'hERG2 et n'induisent pas de corrosion oculaire.(Abdul-Hammed *et al.*, 2022)

En somme, tous les candidats médicamenteux sélectionnés et les normes démontrent d'excellentes propriétés ADMET, ce qui les positionne comme des inhibiteurs potentiels fiables et sûrs contre le récepteur cible.

Comme prévu, la plupart des composés sélectionnés et la galanthamine ne sont pas des inhibiteurs des cytochromes P450. Ils ne présentent pas de toxicité AMES, La toxicité AMES a été évaluée en se référant à ADMET , qui mentionne une décision empirique selon laquelle une valeur de 0 à 0,3 est considérée comme une excellente toxicité, de 0,3 à 0,7 comme une toxicité modérée, et de 0,7 à 1 comme une toxicité faible.ne sont pas carcinogènes, et affichent une toxicité orale de type III (légèrement toxique)).(Abdul-Hammed *et al.*, 2022)(James *et al.*, 2023)

V.8.6. Résultats de la Prédiction de l'activité biologique obtenu de site Way2drug

L'activité biologique possible de certains constituants bioactifs de *C.purgans* a été obtenus à l'aide du serveur en ligne PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances). La méthode PASS estime les probabilités en se basant sur les structures des composés et leur masse moléculaire. Deux paramètres sont utilisés pour la prédiction PASS : Pa et Pi. Pa représente la probabilité qu'un composé "soit actif", tandis que Pi représente la probabilité qu'un composé "soit inactif". Les valeurs de Pa et Pi peuvent varier de zéro à un . Si la valeur de Pa est supérieure à 0,7, la probabilité d'observer l'activité d'une substance lors d'une expérience est plus élevée. En revanche, si Pa est supérieur à 0,5 mais inférieur à 0,7, la probabilité d'observer une activité particulière lors d'une expérience est bonne, bien que moins élevée que la probabilité déterminée lorsque Pa > 0,7. De plus, si Pa est inférieur à 0,5, la probabilité d'observer l'activité est la plus faible. Cependant, la chance de trouver une activité donnée lors d'une expérience augmente avec l'augmentation de la valeur de Pa ainsi que la diminution de la valeur de Pi .(Jairajpuri *et al.*, 2021)

Les résultats de la prédiction PASS sont indiqués dans le tableau suivant.(Tableau 31)

Tableau 31. Résultat de prédiction des activités des principaux composés

Biochain A			Daidzein			Genisteine			Isopruneitin		
Pa	Pi	activité	Pa	Pi	activité	Pa	Pi	Activité	Pa	Pi	activité
0,976	0,0 02	Aldehyde oxidase inhibitor	0,967	0,00 2	Aldehyde oxidase inhibitor	0,9 39	0,00 4	HIF1A expression inhibitor	0,9 69	0,002	Aldehyde oxidase inhibitor
0,958	0,0 01	Histidine kinase inhibitor	0,960	0,00 1	Histidine kinase inhibitor	0,9 36	0,00 3	Ubiquinol- cytochrome-c reductase inhibitor	0,9 55	0,001	Histidine kinase inhibitor
0,947	0,0 01	CYP1A 1 inhibitor	0,917	0,00 3	CYP2A6 substrate	0,9 28	0,00 3	Chlordecone reductase inhibitor	0,9 35	0,004	CYP1A2 substrate
0,936	0,0 01	CYP1B 1 inhibitor	0,915	0,00 5	HIF1A expressio n inhibitor	0,9 28	0,00 4	CYP1A substrate	0,9 35	0,004	CYP1A substrate
0,938	0,0 03	Chlorde cone reductas e inhibitor	0,912	0,00 4	CYP2A substrate	0,9 20	0,00 2	Monophenol monooxygena se inhibitor	0,9 29	0,004	Ubiquinol- cytochrome-c reductase inhibitor
0,936	0,0 04	CYP1A substrate	0,910	0,00 4	CYP1A substrate	0,9 13	0,00 2	CYP1B substrate	0,9 19	0,004	CYP1A1 substrate
0,932	0,0 03	Ubiquin ol- cytochro me-c reductas e inhibitor	0,905	0,00 1	CF transmem brane conducta nce regulator agonist	0,9 14	0,00 4	CYP2A6 substrate	0,9 17	0,002	Monophenol monooxygenas e inhibitor
0,930	0,0 02	Monoph enol monoox	0,905	0,00 4	CYP1A2 substrate	0,9 11	0,00 4	CYP1A2 substrate	0,9 18	0,004	Chlordecone reductase inhibitor

		ygenase inhibitor									
0,930	0,004	CYP1A2 substrate	0,901	0,005	Ubiquinol-cytochrome-c reductase inhibitor	0,913	0,008	Membrane integrity agonist	0,914	0,004	CYP2A6 substrate
0,928	0,003	CYP1A inhibitor	0,903	0,011	CYP2C12 substrate	0,906	0,004	CYP2A substrate	0,914	0,005	HIF1A expression inhibitor

Chrysrine			Daucosterol			Quercetine			Galantamine		
Pa	Pi	activité	Pa	Pi	activité	Pa	Pi	Activité	Pa	Pi	activité
0,9 67	0,0 02	Chlordec one reductase inhibitor	0,9 73	0,0 02	Membra ne integrity agonist	0,9 85	0,0 01	Antihypercholeste rolemic	0,9 47	0,0 03	Respirato ry analeptic
0,9 65	0,0 03	Membran e integrity agonist	0,9 69	0,0 02	HIF1A expressi on inhibitor	0,9 80	0,0 00	Cholesterol antagonist	0,8 54	0,0 10	Nootropi c
0,9 62	0,0 03	HIF1A expressio n inhibitor	0,9 62	0,0 01	Peroxid ase inhibitor	0,9 80	0,0 01	Alkenylglyceroph osphocholine hydrolase inhibitor	0,8 46	0,0 04	Analeptic
0,9 46	0,0 02	Membran e permeabil ity inhibitor	0,9 57	0,0 02	HMOX 1 expressi on enhance r	0,9 67	0,0 01	Chemopreventive	0,7 75	0,0 03	Histamin e release stimulant
0,9 44	0,0 02	2- Dehydrop antoate 2- reductase inhibitor	0,9 51	0,0 01	CYP1A inducer	0,9 66	0,0 03	Respiratory analeptic	0,7 36	0,0 03	Neurotra nsmmitter antagonis t
0,9 42	0,0 02	Kinase inhibitor	0,9 44	0,0 02	UGT1A 6 substrat e	0,9 63	0,0 01	Proliferative diseases treatment	0,7 09	0,0 04	Antitussi ve
0,9 42	0,0 05	CYP2C1 2 substrate	0,9 45	0,0 04	CYP1A substrat e	0,9 63	0,0 03	Hypolipemic	0,6 87	0,0 02	CYP2D1 substrate

0,9 38	0,0 01	Aryl- alcohol dehydrog enase (NADP+) inhibitor	0,9 40	0,0 01	Antimut agenic	0,9 61	0,0 01	Hepatoprotectant	0,6 88	0,0 04	Polarisati on stimulant
0,9 34	0,0 03	Anaphyla toxin receptor antagonis t	0,9 40	0,0 03	CYP1A 1 substrat e	0,9 57	0,0 03	Caspase 3 stimulant	0,6 94	0,0 12	CYP3A2 substrate
0,9 33	0,0 03	Aldehyde oxidase inhibitor	0,9 39	0,0 02	UGT1A 10 substrat e	0,9 46	0,0 02	Glucan endo-1,3- beta-D- glucosidase inhibitor	0,6 84	0,0 09	CYP2D6 substrate

V.8.7. Résultats du docking moléculaire

V.8.7.1. Résultats des principaux ligands obtenus du site Pharammapper

D'après les résultats obtenus à partir du site pharammapper, les sept molécules avaient une cible commune : les cholinesterases en s'appuyant sur les résultats *in vitro* le choix est tombé sur : la butyrylcholinestérase ayant comme ID : **4BDS** (Tableau.32)
Au sein de notre champ d'étude notre objectif principal est de confirmer l'effet inhibiteur obtenu *in vitro* et le confronter aux résultats *in silico*

Tableau 32. Cible potentielle pour chaque composé majoritaire utilisant le serveur Pharammapper

Composé	ID	Nom des protéines cibles
Biochanine	4BDS	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
Chryisine		
Daidzeine		
Isopruneine		
Genisteine		
Daucosterol		
Quercetine		

La butyrylcholinestérase est une hydrolase à sérine qui catalyse l'hydrolyse des esters dans le corps. Contrairement à l'acétylcholinestérase, la butyrylcholinestérase a une large gamme de substrats et une efficacité catalytique inférieure pour l'acétylcholine. La différence dans la

distribution tissulaire et la sensibilité aux inhibiteurs suggère également son implication en dehors de la neurotransmission cholinergique. Les études initiales sur la butyrylcholinestérase ont montré que l'inhibition de l'enzyme entraîne une augmentation des niveaux d'acétylcholine dans le cerveau. De plus, des études de knockout génique ultérieures ont suggéré son implication dans la régulation de l'amyloïde-bêta, une protéine pathogène du cerveau. Ainsi, elle représente une cible intéressante pour les troubles neurologiques tels que la maladie d'Alzheimer.(Ha *et al.*, 2019)

La butyrylcholinestérase (BChE) est une α -glycoprotéine présente dans le système nerveux central et périphérique, dans la plupart des tissus et dans le foie. sa demi-vie est d'environ 12 jours. Une activité accrue de cette enzyme a été rapportée dans l'obésité, le diabète, l'urémie, l'hyperthyroïdie et chez les sujets hyperlipidémiques.(Santarpia *et al.*, 2013)

Pratiquement, le téléchargement de la structure de l'enzyme a été effectué à partir de la base de données Protein Data Bank de Bookhaven (www.rcsb.org/pdb) en utilisant le code d'accès (4BDS).

La structure tridimensionnelle (3D) de l'enzyme a été principalement déterminée par diffraction aux rayons X avec une résolution de 2.10 Å. Elle est co-cristallisée avec la tacrine (Fig 154)

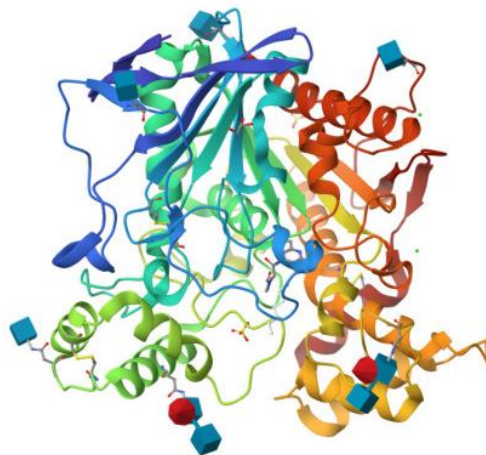


Figure 154. Structure 3D de la butyrylcholinestérase humaine (PDB)

La structure macromoléculaire de l'enzyme est corrigée et simplifiée pour permettre une utilisation plus aisée lors du docking moléculaire.

V.7.8.2. Prédiction du site actif par pockDrug

L'identification des sites actifs revêt une importance cruciale dans la compréhension de la fonction des protéines et des mécanismes d'interaction. Les protéines présentent souvent des

cavités ou des poches en surface susceptibles de se lier à de petites molécules. Ainsi, repérer ces cavités représente souvent le point de départ pour prédire les sites de liaison protéine-ligand, facilitant ainsi l'annotation de la fonction protéique et la conception de médicaments basée sur la structure.

Une détection précise des sites actifs du ligand constitue une étape préalable indispensable au docking protéine-ligand et au criblage virtuel à haut débit visant à identifier les molécules candidates lors du processus de découverte de médicaments.

Le server PockDrug a été utilisée pour détecter les différentes cavités enzymatiques et leurs propriétés. Le site le plus favorable pour mener notre étude possède le volume le plus important

Les sites actifs identifiés dans la protéine 4BDS sont présentés dans le tableau suivant (Tab.33)

Tableau 33. Résultats Pockdrug

Pockets	Vol	Hydroph	Polar	Aromatic	Otyr	Nb	Drugg	Standard
	Hull	Kyte	Res	Res	Atom	Res	Prob	deviation
P0	1472.41	-0.08	0.48	0.3	0.01	23.0	0.9	0.04
P1	1090.25	-0.07	0.5	0.2	0.04	20.0	0.87	0.04
P2	684.75	-0.62	0.6	0.33	0.03	15.0	0.73	0.06
P3	544.44	-1.66	0.67	0.07	0.0	15.0	0.04	0.01

La cavité P0 a été choisie pour faire le docking moléculaire à cause du volume important par rapport aux autres poches

V.4.8.3. Résultats de l'analyse d'AUTODOCK

Le docking moléculaire vise à élucider le mode d'interaction entre un complexe composé de deux ou plusieurs molécules en explorant les orientations spatiales et les conformations favorables pour la liaison d'un ligand à un récepteur.

Ainsi, chaque ligand donne naissance à un ensemble de modes de liaison, appelés « poses », pour lesquels un score est calculé. Ce score, qui est une estimation de l'énergie de liaison du complexe (exprimée en Kcal/mol), reflète la qualité de l'interaction prédite : plus il est négatif, meilleure est l'affinité prévue. Le ligand co-cristallisé sert souvent de référence idéale dans ce processus. Les résultats du docking des sept phyto-molécules extraites de *C.purgans* sont exposés dans le tableau 34 .

Tableau 34. Résultats des paramètres obtenus des complexes protéines ligands pour la première conformation

	Biochanine	Daidzein	Isopruneitin	Genistein	Chrysin	Quercetine	Daucosterol	Galantamine
Energie de liaison	-6.36	-6.38	-6.28	-6.29	-6.27	-6.04	-6.68	-5.72
Efficacité du ligand	-0.3	-0.34	-0.3	-0.31	-0.33	-0.27	-0.16	-0.27
Constante d'inhibition	21.72	21.1	25.09	24.41	25.39	37.23	12.7	64.33
Energie intermoléculaire	-7.55	-7.27	-7.47	-7.49	-7.16	-7.83	-10.56	-6.31
Energie électrostatique	-0.04	-0.01	00	-0.05	-0.02	-0.02	-0.01	0.09
Energie de torsion	1.19	0.89	1.19	1.19	0.89	1.79	3.88	0.6
Energie de non liaison	24.22	17.04	27.05	16.59	9.38	9.57	85.87	-0.56
cIRMS	00	00	00	00	0.06	0	0	0
refRMS	178.74	178.27	178.46	178.39	177.38	179.52	176.05	181.39
Acide aminé	LEUC 286	LEU 286	LEUC 286	GLY 117 LEU 286 SER 139	SER 198	GLY116 LEU286	SER198	SER198
Nombre liaison H	1	1	1	3	1	2	1	1
Distance	2.119	2.179	2.217	GLY 117 2.117 LEU 286 2.106	2.232	GLY116 2.189 LEU286 2.158	2.659	/
Theta (don-h->acc)	148.478	139.132	135.548	GLY117 164.90 2 LEU286 148.38 1	163.829	GLY116 133.56 8 LEU286 140.31 3	136.099	/

Phi (h->acc-accN)	114.418	111.188	110.599	GLY117 113.08	91.076	GLY116 96.545	/	/
				9		LEU286 112.68		
				LEU286 127.94		5		
			9					
Energie	-0.769	-0.468	0.358	GLY117 -1.077	-6.589	GLY116 -0.028	/	/
				LEU286 -1.57		LEU286 -0.497		

L'analyse du complexe entre le pocket 0 et la molécule de référence revêt une importance significative pour permettre une comparaison avec d'autres ligands.

Les résultats du docking moléculaire révèlent que la galantamine, en tant que ligand de référence, présente une énergie de liaison d'environ -5.72 kcal/mol. Une analyse visuelle démontre que la galantamine a établi une liaison hydrogène avec le résidu SER198 du site actif.

Les énergies de liaison de tous les ligands testés dans la présente étude sont plus faibles que celles du complexes pocket 0 – galantamine et est inférieure à -6 kcal/mol.

Un deuxième paramètre dans l'analyse du docking moléculaire est l'efficacité du ligand « ligand efficiency », plus les valeurs de LE sont élevées meilleure est l'affinité de la protéine au ligand .(Chen *et al.*, 2017) Dans le contexte de nos molécules testées , les ligands efficiency sont relativement basses à l'exception de LE du daucostérol et de la quercetine qui sont égale ou supérieures à la LE de la galantamine .

La constante d'inhibition (Ki) est largement utilisée comme indicateur absolu de l'affinité de liaison. Ki représente l'affinité absolue d'un inhibiteur pour son enzyme cible, et théoriquement, on peut utiliser Ki pour classer les affinités de liaison de différents inhibiteurs pour une enzyme commune, définir la sélectivité d'un inhibiteur pour différentes enzymes, et évaluer les approches in silico pour prédire les affinités de liaison des inhibiteurs.(Darras & Pang, 2017)

Toutes les constantes d'inhibition des phytomolécules testées sont plus réduite que celle de la molécule de référence.

L'énergie intermoléculaire a été évaluée durant le docking et contrairement à l'énergie intramoléculaire qui est étudiée pour la transition de l'état non lié à la conformation liée du ligand et de la protéine. L'énergie intermoléculaire a été estimée pour la combinaison du ligand et de la protéine dans leur conformation liée.(Fu *et al.*, 2018) . D'après nos résultats l'énergie

intermoléculaire de toutes les phytomolécules est nettement plus basse que celle de la galantamine.

Autre conclusion tirée des résultats du docking est le nombre de liaisons établies avec le site actif, en effet en comparaison avec la galantamine ayant une seule liaison hydrogène avec l'acide aminé SER198, la majorité des phytomolécules ont établi également une seule liaison hydrogène avec le site d'action à savoir : biochanine A (Fig 155) et daidzeine et l'isoprunitine avec l'acide aminé LEUC 286 avec des longueurs de liaison différentes, la chryisine et le daucostérol avec le même acide aminé mis en jeu dans la liaison de la galantamine SER 198.

Cependant, la génisteine s'est lié à la pocket via trois liaisons hydrogènes avec les acides aminés GLY 117, LEU 286 et SER 139. La quercétine forme un complexe avec l'enzyme par deux liaisons hydrogènes avec les acides aminés GLY116 et LEU286 du site actif.

À un niveau plus approfondi, l'analyse de docking révèle que la distance entre chaque ligand et les sites de liaison variait entre [2.106 Å et 2.659 Å]. Selon Anne Imbert *et al*(1991), les interactions avec des distances comprises entre 2,5 Å et 3,1 Å sont considérées comme étant fortes, celles entre 3,1 Å et 3,55 Å sont considérées comme moyennes, et au-delà de 3,55 Å, elles sont considérées comme faibles.(Imbert *et al.*, 1991). Ainsi toutes les phytomolécules testées se lient au site actif par des liaisons hydrogènes relativement fortes.

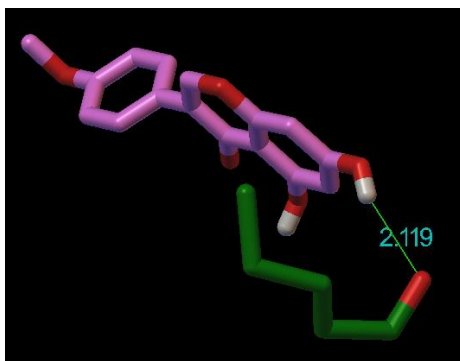


Figure 155. Visualisation de la liaison de la biochanine A avec le site actif

En conclusion, Les résultats du docking étaient cohérents avec nos données expérimentales. Cette étude démontre l'existence de l'interaction entre la butyrylcholinestérase et les phytomolécules extraites de *C.purgans* identifiés, suggérant qu'elle pourrait être à l'origine de l'activité significative de cet extrait à l'égard de cette enzyme. Notons que nous pouvons affirmer que ces composés ne posent aucun problème de biodisponibilité orale et présentent des propriétés similaires à celles de la galantamine.



Conclusion

Conclusion générale

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à deux plantes de la flore Algérienne. La première *Veronica rosea*, une plante endémique appartenant à un genre réputé par sa richesse en flavonoides notamment une large variété de flavones aglycones et des flavones glycosylées. La seconde plante est *Cytisus purgans*, dont le genre est une source prometteuse de biomolécules polyphénoliques bioactives.

Nos recherches se sont déroulées autour de deux principaux axes :

Un axe chimique

Un axe pharmaco-biologique

Dans le premier axe chimique, les phytoconstituants des deux plantes ont été purifiés et identifiés. Comme prévu par le screening phytochimique préalable, la majorité de ces phytoconstituants appartenait à la classe des polyphénols précisément des flavonoïdes et isoflavonoïdes. En effet, grâce aux techniques chromatographiques de séparation et les techniques spectrales différentes (RMN, ESI-Masse) utilisées dans cette étude, la structure de ces biomolécules est précisément élucidée. Effectivement on a pu identifier dans l'extrait acétate d'éthyle de *Veronica rosea* huit flavonoïdes à savoir : l'isoscutezareine, de l'isoscutezarein-8-O- β -D-glucopyranoside identifié pour la première fois dans le genre *Veronica*, de l'isoscutezarein-7-O- β -D-glucopyranoside, de Isoscutezarein 7-O- [6-O-acétyl- β -D-allopyranosyl- (1 \rightarrow 2)] - β -D-glucopyranoside, de l'apigénine, Apigénin-7-O- β -glucopyranoside, lutéoline et Lutéolin-7-O-Glucoside. D'autre part, quatre isoflavonoïdes qui sont : daïdzeïne, genistéine, isoprunitine et biochanine A ont été identifiés dans l'extrait *n*-butanolique de *Cytisus purgans* en plus de la quercétine et la chrysin deux flavonoïdes connues et aussi un phytostérol le daucostérol retrouvé pour la première fois dans le genre *Cytisus*.

Cette richesse en flavonoïdes et isoflavonoïdes nous a incité à étudier ces deux plantes d'un point de vue pharmaco-biologique.

Dans ce second axe pharmaco-biologique, et étant donné que le stress oxydant est impliqué dans la pathogénèse de nombreuses maladies chroniques, l'activité antioxydante était explorée en premier en utilisant trois tests différents mais complémentaires : le test de piégeage du DPPH, le test de réduction de fer et le test au phosphomolybdate. Les résultats sont très satisfaisants car *Veronica rosea* a montré une très forte activité de piégeage du radical DPPH, une excellente activité réductrice du fer et une significative capacité antioxydante totale. Également *Cytisus*

purgans a démontré une forte activité anti-radicalaire DPPH, un potentiel pouvoir réducteur et une excellente capacité antioxydante totale. Ce potentiel antioxydant indéniable nous a conduit à tester l'activité photoprotectrice et dermoprotective extrêmement liée au pouvoir antioxydant. Cette activité était évaluée en calculant le facteur de protection solaire et les résultats sont encourageant avec des valeurs de SPF qui dépasse 80 à une concentration de 1mg/mL ce qui fait des extraits de ces deux plantes des ingrédients potentiels dans les préparations cosmétiques de protection solaire aussi bien que certains soins anti- âge de la peau.

Veronica rosea aussi bien que *Cytisus purgans* appartiennent à des genres connus pour leurs usage dans les maladies inflammatoires, ce qui a impliqué une investigation de propriétés anti-inflammatoires *in vitro* via le model du globule rouge. Par conséquent, les deux plantes ont prévenu l'hémolyse des globules rouges induites par l'hypotonicité et la chaleur avec des degrés variables affirmant ainsi l'effet anti-inflammatoire qui probablement est lié à leurs richesse en flavonoïdes. Dans le même contexte, les effets des deux plantes sur les paramètres de l'hémostase ont été testés, plus précisément un effet hémostatique a été investigué et les deux extraits des plantes étudiées ont raccourci de manière significative le temps de recalcification du plasma signifiant un potentiel hémostatique non négligeable.

Le screening pharmacologique s'est étendu sur l'effet inhibiteur des deux plantes sur des enzymes clefs impliquées dans la pathogénèse de maladies lourdes comme les maladies neurodégénératives et les maladies infectieuses. Les premières enzymes testées étaient l'acétyl/butyrylcholinesterase impliquées dans la maladie d'Alzheimer et les syndromes neurodégénératifs. En comparaison avec la galantamine, une molécule de référence , une forte inhibition a été constaté avec *C.purgans* sur la butyrylcholiesterase mais aussi sur l'acétylcholiesterase . Quant à *Veronica rosea*, l'inhibition est modérée pour les deux enzymes. Cet effet est probablement la résultante de la synergie des effets neuroprotecteur des phytoconstituants identifiés dans les deux extraits.

La deuxième enzyme testée est impliquée dans la pathogénie infectieuse de certains germes urolytique comme *Helicobacter pylori* et *Proteus mirabilis*. Une bonne inhibition a également été observée, avec des valeurs d'IC₅₀ de 77.82±4.59 µg/mL pour *C. purgans* et 132.77±4.73 µg/mL pour *Veronica rosea*, mettant en évidence un potentiel effet anti-uréasique significatif.

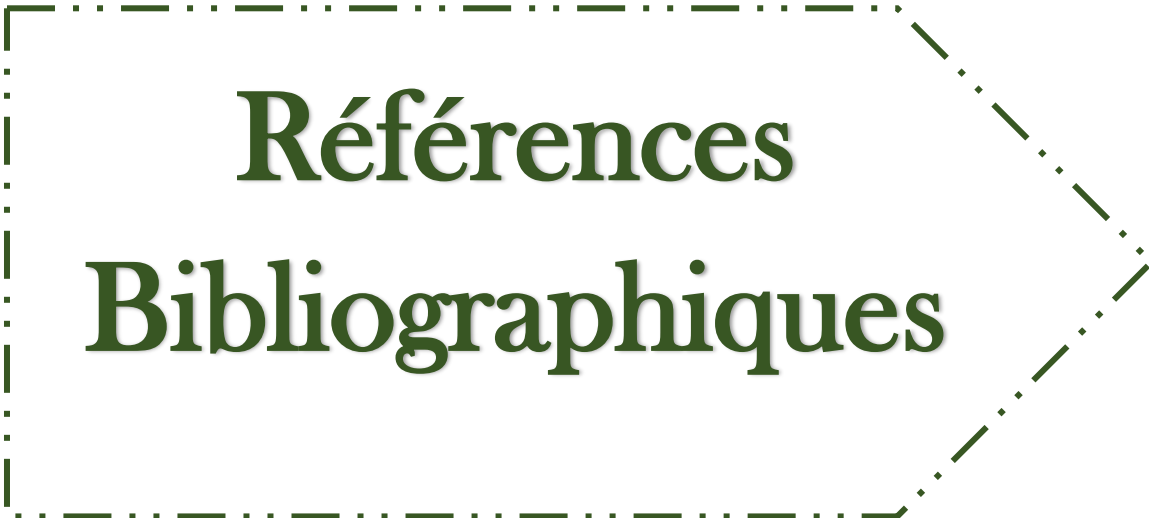
À la suite de l'exploration de cet axe pharmaco-biologique, l'activité butyrylcholinestérasique *in vitro* intéressante nous a incités à entreprendre une étude *in silico* des phytomolécules identifiées dans l'extrait le plus actif, à savoir les phytomolécules de *C. purgans*. Le docking

moléculaire a été utilisé dans un premier temps pour confirmer cette activité puis pour tenter de prédire le mécanisme de cette inhibition.

Les résultats confirment l'activité retrouvée *in vitro*, car toutes les phytomolécules testées se lient de manière efficace au site d'action de l'enzyme butyrylcholinestérase par au moins une liaison hydrogène, à l'instar de la molécule de référence, la galantamine. Il s'agit de la biochanine A, de l'isoprunétine, de la daidzéine, de la chrysine et du daucostérol. Selon la longueur de la liaison hydrogène établie entre l'acide aminé du site actif et la phytomolécule, celle-ci est plutôt forte, ce qui signifie que ces molécules forment des complexes enzyme-ligand stables avec des énergies de liaison plus basses que celles de la galantamine.

Toutes les conclusions tirées sont très prometteuses, cependant, elles représentent seulement le début de l'exploration des substances naturelles et de leurs activités biologiques. Des recherches complémentaires, plus précises et approfondies sont nécessaires pour valider pleinement les découvertes réalisées jusqu'à présent. Plusieurs pistes de recherche peuvent être envisagées pour les études futures, notamment :

- Exploration de méthodes avancées pour identifier d'autres métabolites responsables des effets thérapeutiques.
- Utilisation de cultures cellulaires et d'isolats cellulaires *in vitro* pour évaluer l'activité antioxydante et anti-inflammatoire afin de corroborer les découvertes antérieures.
- La réalisation d'essais *in vivo* serait indispensable pour élucider toute synergie potentielle entre différents composés bioactifs, permettant ainsi de déterminer les cibles biologiques et de comprendre les mécanismes moléculaires et tissulaires sous-jacents.
- Réalisation d'études pharmaco-toxicologiques approfondies sur les deux plantes pour évaluer leurs effets à long terme.
- Exploration de nouvelles applications thérapeutiques en évaluant d'autres effets potentiels.



**Références
Bibliographiques**

Abdel-Sattar A., Bankova V., Popov S.(1995) Acylated flavonoid glycosides from *Sideritis cardica*, *Fitoterapia*, 66, 190,.

Abdul-Hammed, M., Adedotun, I. O., Olajide, M., Irabor, C. O., Afolabi, T. I., Gbadebo, I. O., Rhyman, L., & Ramasami, P. (2021). Virtual screening, ADMET profiling, PASS prediction, and bioactivity studies of potential inhibitory roles of alkaloids, phytosterols, and flavonoids against COVID-19 main protease (Mpro). *Natural Product Research*, 36(12), 3110-3116. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1935933>

Abreu, A. C., Coqueiro, A., Sultan, A. R., Lemmens, N., Kim, H. K., Verpoorte, R., Van Wamel, W. J. B., Simões, M., & Choi, Y. H. (2017). Looking to nature for a new concept in antimicrobial treatments: isoflavonoids from *Cytisus striatus* as antibiotic adjuvants against MRSA. *Scientific Reports*, 7(1), 3777. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03716-7>

Afaq, F. (2011). Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 508(2), 144-151. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.007>

Ahmad, F., Anwar, F., & Hira, S. (2016). Review on medicinal importance of Fabaceae family. *Pharmacologyonline*, 3, 151-157.

Ait-KaciAourahoun, K., Fazouane, F., & Benayache, S. (2015). Pharmacological potential of *Cytisus triflorus* l'Hérit. Extracts as antioxidant and anti-inflammatory agent. *Pharm. Lett*, 7, 104-110.

Akanda, M. K. M., & Hasan, A. N. (2021). Characterization of pharmacological properties of methanolic seed and stem bark extracts of *Ziziphus mauritiana* (BAU Kul) using in-vitro and in-vivo animal (Swiss albino male mice) model. *Clinical Phytoscience*, 7, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s40816-020-00246-0>

Al Yasmina n°1 (2020) - René MAIRE : Flore de l'Afrique du Nord.
<https://alyasmina.org/archives/maire-fan.html>

AL-Hadeethi, M. A. H., Hawar, S. N., AL-Taie, A. T., & Ahmed, L. Q. (2022). Morphological and anatomical review of some *Veronica* species from the Plantaginaceae family. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 192-197.

Alappat, B., & Alappat, J. (2020). Anthocyanin pigments : Beyond aesthetics. *Molecules*, 25(23), 5500-5. <https://doi.org/10.3390/molecules25235500>

- Albach, D. C., Martínez-Ortega, M. M., Fischer, M. A., & Chase, M. W.** (2004). Evolution of Veroniceae: a phylogenetic perspective. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 275-302.
- Albach, D. C.** (2006). Evolution of Veronica (Plantaginaceae) on the Balkan Peninsula. *Phytologia Balcanica*, 12(2), 231-244.
- Albach, D. C., & Meudt, H. M.** (2010). Phylogeny of Veronica in the Southern and Northern Hemispheres based on plastid, nuclear ribosomal and nuclear low-copy DNA. *Molecular Phylogenetics And Evolution*, 54(2), 457-471. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.09.030>
- Al-Gubory, K. H., & Laher, I.** (2018). *Nutritional Antioxidant Therapies : Treatments and Perspectives*. Springer.
- Al-Khayri, J. M., Sahana, G. R., Nagella, P., Joseph, B., Alessa, F. M., & Al-Mssallem, M. Q.** (2022). Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules : A Review. *Molecules*, 27(9), 2901. <https://doi.org/10.3390/molecules27092901>
- Al-Rooqi, M. M., Mughal, E. U., Raja, Q. A., Hussein, E. M., Naeem, N., Sadiq, A., Asghar, B. H., Moussa, Z., & Ahmed, S. A.** (2023). Flavonoids and related privileged scaffolds as potential urease inhibitors : a review. *RSC Advances*, 13(5), 3210-3233. <https://doi.org/10.1039/d2ra08284e>
- 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.
- Alshehri, M. M., Sharifi-Rad, J., Herrera-Bravo, J., Jara, E., Salazar, L. A., Kęrgiel, D., Uprety, Y., Akram, M., Iqbal, M., Martorell, M., Torrens-Mas, M., Pons, D. G., Daştan, S. D., Cruz-Martins, N., Özdemir, F. A., Kumar, M., & Cho, W. C.** (2021). Therapeutic Potential of Isoflavones with an Emphasis on Daidzein. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2021, 1-15. <https://doi.org/10.1155/2021/6331630>
- Aluko, R. E.** (2021). Food-derived Acetylcholinesterase Inhibitors as Potential Agents against Alzheimer's Disease. *eFood*, 2(2), 49-58. <https://doi.org/10.2991/efood.k.210318.001>
- Amin, M., Anwar, F., Naz, F., Mehmood, T., & Saari, N.** (2013). Anti-Helicobacter pylori and Urease Inhibition Activities of Some Traditional Medicinal Plants. *Molecules*, 18(2), 2135-2149. <https://doi.org/10.3390/molecules18022135>

Anand, P., Singh, B., & Singh, N. (2012). A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(3), 1175-1180. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.12.042>

Andrews, M., & Andrews, M. E. (2017). Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *International Journal Of Molecular Sciences*, 18(4), 705. <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>

Anyasor, G. N., Okanlawon, A. A., & Ogunbiyi, B. T. (2019). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Justicia secunda* Vahl leaf extract using in vitro and in vivo inflammation models. *Clinical Phytoscience*, 5(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s40816-019-0137-8>

Apak, R., Capanoglu, E., & Shahidi, F. (2018). *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity : Recent Trends and Applications*. John Wiley & Sons.

Apers, S., Vlietinck, A., & Pieters, L. (2003). Lignans and neolignans as lead compounds. *Phytochemistry Reviews*, 2, 201-217.

AquaPortail, Q. (2021, août 24). *Plantaginaceae*. AquaPortail. <https://www.aquaportail.com/especes/taxonomie/famille/157/plantaginaceae>

Ata, A., Naz, S., & Elias, E. M. (2011). Naturally occurring enzyme inhibitors and their pharmaceutical applications. *Pure And Applied Chemistry*, 83(9), 1741-1749. <https://doi.org/10.1351/pac-con-10-11-16>

Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., & Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery : advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200-216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>

Athar, M., Sona, A. N., Bekono, B. D., & Ntie-Kang, F. (2019). Fundamental physical and chemical concepts behind “drug-likeness” and “natural product-likeness”. *Physical Sciences Reviews*, 4(12). <https://doi.org/10.1515/psr-2018-0101>

Attard, E. (2013). A rapid microtitre plate Folin-Ciocalteu method for the assessment of polyphenols. *Central European Journal Of Biology*, 8(1), 48-53. <https://doi.org/10.2478/s11535-012-0107-3>

Bakchiche, B., & Gherib, A. (2014). Activités antioxydantes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle d'Algérie [Antioxidant activities of

polyphenol extracts from medicinal plants in Algerian traditional pharmacopoeia]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 9(1), 167-172.

Balkis, A., Tran, K., Lee, Y. Z., & Ng, K. (2015). Screening Flavonoids for Inhibition of Acetylcholinesterase Identified Baicalein as the Most Potent Inhibitor. *Journal Of Agricultural Science*, 7(9) 26. <https://doi.org/10.5539/jas.v7n9p26>

Banik, B. K., Sahoo, B. M., & Tiwari, A. (2022). *Terpenoids: Chemistry, Biochemistry, Medicinal Effects, Ethno-pharmacology*. CRC Press.

Barker, D. (2019). Lignans. *Molecules*, 24(7), 1424.

Barreira, J. C., Días, M. I., Živković, J., Stojković, D., Soković, M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2014). Phenolic profiling of Veronica spp. grown in mountain, urban and sandy soil environments. *Food Chemistry*, 163, 275-283. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.117>

Beara, I., Živković, J., Lesjak, M., Ristić, J. D., Šavikin, K., Maksimović, Z., & Janković, T. (2015). Phenolic profile and anti-inflammatory activity of three Veronica species. *Industrial Crops And Products*, 63, 276-280. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.034>

Bedair, H., Shaltout, K. H., & Halmy, M. W. A. (2023). A critical inventory of the mediterranean endemics in the egyptian flora. *Biodiversity And Conservation*, 32(4), 1327-1351. <https://doi.org/10.1007/s10531-023-02555-5>

Benchouala, A., Bekdouch, F., & Bachir, A. S. (2023). The update and ecological status of the flora of the Belezma National Park, Algeria. *Biodiversitas*, 24(11), 6134-6150 . <https://doi.org/10.13057/biodiv/d241135>

Bertelli, D., Papotti, G., Bortolotti, L., Marcazzan, G. L., & Plessi, M. (2011). ¹H-NMR Simultaneous Identification of Health-Relevant Compounds in Propolis Extracts. *Phytochemical Analysis*, 23(3), 260-266. <https://doi.org/10.1002/pca.1352>

Bosch, R. J., Philips, N., Suárez-Pérez, J. A., Juarranz, Á., Devmurari, A., Chalensouk-Khaosaat, J., & González, S. (2015). Mechanisms of Photoaging and Cutaneous Photocarcinogenesis, and Photoprotective Strategies with Phytochemicals. *Antioxidants*, 4(2), 248-268. <https://doi.org/10.3390/antiox4020248>

Bossu, C. M., Ferreira, E., Chaves, F. S., Menezes, E. A., & Nogueira, A. R. A. (2006). Flow injection system for hydrolysable tannin determination. *Microchemical Journal*, 84(1-2), 88-92. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2006.04.022>

- Bouasla, A., & Bouasla, I.** (2017). Ethnobotanical survey of medicinal plants in northeastern of Algeria. *Phytomedicine*, *36*, 68-81. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.09.007>
- Bouziane, A., Bakchiche, B., Días, M. I., Barros, L., Ferreira, I. C., ALSalamat, H., & Bardaweel, S. K.** (2018). Phenolic Compounds and Bioactivity of *Cytisus villosus* Pourr. *Molecules*, *23*(8), 1994-2005. <https://doi.org/10.3390/molecules23081994>
- Bultum, L. E., Tolossa, G. B., Kim, G., Kwon, O., & Lee, D.** (2022). *In silico* activity and ADMET profiling of phytochemicals from Ethiopian indigenous aloes using pharmacophore models. *Scientific Reports*, *12*(1), 22221-22239. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26446-x>
- Butterweck, V., & Nahrstedt, A.** (2012). What Is the Best Strategy for Preclinical Testing of Botanicals ? A Critical Perspective. *Planta Medica*, *78*(08), 747-754. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1298434>
- Caramelo, D., Barroca, C., Guiné, R., Gallardo, E., Anjos, O., & Gominho, J.** (2022). Potential Applications of the Cytisus Shrub Species : *Cytisus multiflorus*, *Cytisus scoparius*, and *Cytisus striatus*. *Processes*, *10*(7), 1287-1303. <https://doi.org/10.3390/pr10071287>
- Carradori, S.** (2022). *Flavonoids and Phenolics*. Bentham Science Publishers.
- Chaira, S., Ben Moussa, M. T, Hanfer, M., Ouache, R., Kaddi, I., Pale, P., & Harkat, H.** (2022). Veronica rosea biomolecule profiling, antioxidant potential, dermoprotective effect, anti-inflammatory and hemostatic activities and enzyme inhibitory action. *European Journal Of Integrative Medicine*, *56*, 102198-102210. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2022.102198>
- Chanchal, D., & Swarnlata, S.** (2009). Herbal photoprotective formulations and their evaluation. *The Open Natural Products Journal*, *2*(1).
- Chandrasekaran, B., Agrawal, N., & Kaushik, S.** (2019). Pharmacophore Development. (p. 677-687). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.20276-8>
- Chari, V. M., Grayer-Barkmeijer, R. J., Harborne, J. B., & Österdahl, B. G.** (1981). An acylated allose-containing 8-hydroxyflavone glycoside from *Veronica filiformis*. *Phytochemistry*, *20*(8), 1977-1979.
- Chaturvedula, V. S. P., & Prakash, I.** (2013). Isolation and structure elucidation of daidzein and genistein from *Siraitia grosvenorii*. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 67-72.

- Chaves, N., Santiago, A., & Gallego, J. C.** (2020). Quantification of the Antioxidant Activity of Plant Extracts : Analysis of Sensitivity and Hierarchization Based on the Method Used. *Antioxidants*, 9(1), 76-89. <https://doi.org/10.3390/antiox9010076>
- Chen, H., Zhou, X., Gao, Y., & Zhou, J.** (2017). Fragment-based drug design: Strategic advances and lessons learned. In *Drug Discovery Technologies* (pp. 212-232). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.12319-4>
- Cheng, F., Li, W., Zhou, Y., Shen, J., Wu, Z., Liu, G., Lee, P. W., & Tang, Y.** (2012). admetSAR : A Comprehensive Source and Free Tool for Assessment of Chemical ADMET Properties. *Journal Of Chemical Information And Modeling*, 52(11), 3099-3105. <https://doi.org/10.1021/ci300367a>
- Cheurfa, M., & Allem, R.** (2015). Évaluation de l'activité anti-oxydante de différents extraits des feuilles d'Aloysia triphylla (L'Hérit.) d'Algérie in vitro. *Phytothérapie*, 14(3), 181-187. <https://doi.org/10.1007/s10298-015-0969-4>
- Chopra, D., Singh, J., Srivastav, A. K., Dubey, D., Ray, R. S., & Gupta, K. C.** (2018). Protective Role of Phytochemicals Against UVR. *Photocarcinogenesis & Photoprotection*, 129-139.
- Chugh, N. A., Bali, S., & Koul, A.** (2018). Integration of botanicals in contemporary medicine : road blocks, checkpoints and go-ahead signals. *Integrative Medicine Research*, 7(2), 109-125. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2018.03.005>
- Costa, L. G., Garrick, J. M., Roqué, P. J., & Pellacani, C.** (2016). Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin : Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2016, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2016/2986796>
- Cristofolini, G., & Troia, A.** (2006). A reassessment of the sections of the genus *Cytisus* Desf.(Cytiseae, Leguminosae). *Taxon*, 55(3), 733-746.
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V.** (2017). SwissADME : a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(1), 42717-42729 . <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Danet, A. F.** (2021). Recent Advances in Antioxidant Capacity Assays. *IntechOpen eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96654>

Darras, F. H., & Pang, Y. P. (2017). On the use of the experimentally determined enzyme inhibition constant as a measure of absolute binding affinity. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 489(4), 451-454. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.168>

De Alencar Filho, J. M. T., Sampaio, P. A., Pereira, E. C. V., De Oliveira JÃonior, R. G., Silva, F. S., Da Silva Almeida, J. R. G., Rolim, L. A., Nunes, X. P., & Da Cruz AraÃojo, E. C. (2016). Flavonoids as photoprotective agents : A systematic review. *Journal Of Medicinal Plants Research*, 10(47), 848-864. <https://doi.org/10.5897/jmpr2016.6273>

De Almeida, J. G. L., Silveira, E. R., & Pessoa, O. D. L. (2007). NMR spectral assignments of a new [C \square O \square C] isoflavone dimer from *Andira surinamensis*. *Magnetic Resonance In Chemistry*, 46(1), 103-106. <https://doi.org/10.1002/mrc.2138>

Del RíO, J. A., Díaz, L., García-Bernal, D., Blanquer, M., Ortuño, A., Corréal, E., & Moraleda, J. M. (2014). Furanocoumarins. Dans *Studies in natural products chemistry* (p. 145-195). <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63430-6.00005-9>

Dey, P. K., Kundu, A., Kumar, A., Gupta, M., Lee, B. M., Bhakta, T., Dash, S., & Kim, H. S. (2020). Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). 505-567. *Elsevier* . <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816455-6.00015-9>

Dilshad, R., Khan, K., Ahmad, S., Aati, H. Y., Alqahtani, J., Sherif, A. E., Hussain, M., Ghalloo, B. A., Tahir, H., Basit, A., & Ahmed, M. (2022). Phytochemical profiling, in vitro biological activities, and in-silico molecular docking studies of *Typha domingensis*. *Arabian Journal Of Chemistry*, 15(10), 104133. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104133>

Dirar, A. I., Alsaadi, D. H. M., Wada, M., Mohamed, M. A., Watanabe, T., & Devkota, H. P. (2019). Effects of extraction solvents on total phenolic and flavonoid contents and biological activities of extracts from Sudanese medicinal plants. *South African Journal Of Botany*, 120, 261-267. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.07.003>

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), 45-61. <https://doi.org/10.3390/cosmetics4040045>

Djebbouri, M., & Terras, M. (2019). Floristic diversity with particular reference to endemic, rare or endangered flora in forest formations of Saïda (Algeria). *International Journal Of Environmental Studies*, 76(6), 990-1003. <https://doi.org/10.1080/00207233.2019.1620541>

- Dnyandev, K. M., Babasaheb, G. V., Chandrashekhar, K. V., Chandrakant, M. A., & Vasant, O. K.** (2021). A Review on Molecular Docking. *International Research Journal Of Pure And Applied Chemistry*, 60-68. <https://doi.org/10.9734/irjpac/2021/v22i330396>
- Do, Q., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y.** (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal Of Food And Drug Analysis*, 22(3), 296-302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- Dobignard, A., & Chatelain, C.** (2010). *Index synonymique de la flore d'Afrique du Nord : Dicotyledoneae : Fabaceae - Nymphaeaceae*.
- Dontha, S.** (2016). A review on antioxidant methods. *Asian J. Pharm. Clin. Res*, 9(2), 14-32.
- Doostmohammadi, M., Bordbar, F., Albach, D. C., & Mirtadzadini, M.** (2022). Phylogeny and Historical Biogeography of *Veronica* Subgenus *Pentasepalae* (Plantaginaceae) : Evidence for Its Origin and Subsequent Dispersal. *Biology*, 11(5), 639-665. <https://doi.org/10.3390/biology11050639>
- Dubale, S., Kebebe, D., Zeynudin, A., Abdissa, N., & Suleman, S.** (2023). Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity Evaluation of Selected Medicinal Plants in Ethiopia. *Journal Of Experimental Pharmacology*, Volume 15, 51-62. <https://doi.org/10.2147/jep.s379805>
- Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., & Mérillon, J. M.** (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1768-1774.
- Dunaway, S., Odin, R., Zhou, L., Ji, L., Zhang, Y., & Kadekaro, A. L.** (2018). Natural Antioxidants : Multiple Mechanisms to Protect Skin From Solar Radiation. *Frontiers In Pharmacology*, 9, 392-405. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00392>
- DunkiĆ, V., Kosalec, I., Košir, I. J., Potočnik, T., Čerenak, A., Končić, M. Z., Vitali, D., Müller, I. D., Kopričanec, M., Bezić, N., Srećec, S., & Kremer, D.** (2015). Antioxidant and antimicrobial properties of *Veronica spicata* L. (Plantaginaceae). *Current Drug Targets*, 16(14), 1660-1670. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150531161820>

Ebrahimi, F., Torbati, M., Mahmoudi, J., & Valizadeh, H. (2020). Medicinal Plants as Potential Hemostatic Agents. *Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, 23(1), 10-23. <https://doi.org/10.18433/jpps30446>

Egan, W. J., Merz, K. M., & Baldwin, J. J. (2000). Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. *Journal Of Medicinal Chemistry*, 43(21), 3867-3877. <https://doi.org/10.1021/jm000292e>

El-Haoud, H., Boufellous, M., Berrani, A., Tazougart, H., & Bengueddour, R. (2018). Screening phytochimique d'une plante medicinale: Mentha spicata L. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 7, 226-233.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.

Elshafie, H. S., Camele, I., & Mohamed, A. A. (2023). A Comprehensive Review on the Biological, Agricultural and Pharmaceutical Properties of Secondary Metabolites Based-Plant Origin. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24(4), 3266-3285. <https://doi.org/10.3390/ijms24043266>

Elzahabi, H. S. A., Abdulwahab, H. G., Edrees, M. M., & Hegab, A. M. (2019). Utility of anthranilic acid and diethylacetylenedicarboxylate for the synthesis of nitrogenous organo/organometallic compounds as urease inhibitors. *Archiv Der Pharmazie*, 352(7), 1800314- 1800326 . <https://doi.org/10.1002/ardp.201800314>

Ertas, A., Boğa, M., Kızıl, M., Çeken, B., Goren, A. C., Haşimi, N., Demirci, S., Topcu, G., & Kolak, U. (2014). Chemical profile and biological activities of Veronica thymoidessubsp.pseudocinerea. *Pharmaceutical Biology*, 53(3), 334-339. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.919326>

Essa, A. F., Teleb, M., El-Kersh, D. M., Gendy, A. E. G. E., Elshamy, A. I., & Farag, M. A. (2022). Natural acylated flavonoids : their chemistry and biological merits in context to molecular docking studies. *Phytochemistry Reviews*, 22(6), 1469-1508. <https://doi.org/10.1007/s11101-022-09840-1>

Esho, B. A., Samuel, B., Akinwunmi, K. F., & Oluyemi, W. M. (2021). Membrane stabilization and inhibition of protein denaturation as mechanisms of the anti-inflammatory activity of some plant species. *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 7(4), 269-278.

- Evans-Johnson, J. A., Garlick, J. A., Johnson, E. J., Wang, X., & Chen, C. O.** (2013). A pilot study of the photoprotective effect of almond phytochemicals in a 3D human skin equivalent. *Journal Of Photochemistry And Photobiology B : Biology*, *126*, 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.07.006>
- Fang, X., & Hu, X.** (2018). Advances in the Synthesis of Lignan Natural Products. *Molecules*, *23*(12), 3385. <https://doi.org/10.3390/molecules23123385>
- Faugeras, G., & Paris, R.** (1965). Chimiotaxinomie des Papilionacées—Génistées. *Bulletin de la Société Botanique de France*, *112*(sup1), 75-102. <https://doi.org/10.1080/00378941.1965.10838288>
- Fernandes, A. S., Rodrigues, P., Pintado, M., & Tavaría, F. K.** (2023). A systematic review of natural products for skin applications : Targeting inflammation, wound healing, and photo-aging. *Phytomedicine*, *115*, 154824-154846. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.154824>
- Ferreira-Sousa, D., Genisheva, Z., Rodríguez-Yoldi, M. J., Gullón, B., Costa, C. E., Teixeira, J. A., Botelho, C. M., & Ferreira-Santos, P.** (2024). Exploration of Polyphenols Extracted from Cytisus Plants and Their Potential Applications : A Review. *Antioxidants*, *13*(2), 192 -212. <https://doi.org/10.3390/antiox13020192>
- Fierăscu, R. C., Georgiev, M. I., Fierăscu, I., Ungureanu, C., Avramescu, S. M., Orțan, A., Georgescu, M., Șuțan, A. N., Zăncărescu, A., Dinu-Pîrvu, C., Velescu, B. Ș., & Anuța, V.** (2018). Mitodepressive, antioxidant, antifungal and anti-inflammatory effects of wild-growing Romanian native *Arctium lappa* L. (Asteraceae) and *Veronica persica* Poiret (Plantaginaceae). *Food And Chemical Toxicology*, *111*, 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.008>
- Forero, A. G., Mantilla, D. A. V., Núñez, L. A., Ocazonez, R. E., Stashenko, E. E., & Fuentes, J. L.** (2019). Photoprotective and Antigenotoxic Effects of the Flavonoids Apigenin, Naringenin and Pinocembrin. *Photochemistry And Photobiology*, *95*(4), 1010-1018. <https://doi.org/10.1111/php.13085>
- Fraga-Corral, M., García-Oliveira, P., Pereira, A. G., Lourenço-Lopes, C., Jiménez-López, C., Prieto, M. A., & Simal-Gándara, J.** (2020). Technological Application of Tannin-Based Extracts. *Molecules*, *25*(3), 614-640. <https://doi.org/10.3390/molecules25030614>
- Francisco, V., Figueirinha, A., Costa, G., Liberal, J., Lopes, M. C., García-Rodríguez, C., Geraldes, C. F. G. C., Cruz, M. T., & Batista, M. T.** (2014). Chemical characterization and

anti-inflammatory activity of luteolin glycosides isolated from lemongrass. *Journal Of Functional Foods*, 10, 436-443. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.003>

Frezza, C., Bozzato, G., Sciubba, F., Serafini, I., Franceschin, M., Curini, R., Cianfaglione, K., Venditti, A., Bianco, A., Serafini, M., & Foddai, S. (2022). Phytochemical analysis on the aerial parts of *Teucrium capitatum* L. with aspects of chemosystematics and ethnobotany. *Natural Product Research*, 37(14), 2398-2407. <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2081967>

Fu, Y., Zhao, J., & Chen, Z. (2018). Insights into the Molecular Mechanisms of Protein-Ligand Interactions by Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation : A Case of Oligopeptide Binding Protein. *Computational And Mathematical Methods In Medicine*, 2018, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2018/3502514>

Gavilán, J. F., Mennickent, D., Ramírez-Molina, O., Triviño, S., Pérez, C., Silva-Grecchi, T., Godoy, P. A., Becerra, J., Aguayo, L. G., Moraga-Cid, G., Martin, V. S., Yévenes, G. E., Castro, P., Guzmán, L., & Fuentealba, J. (2019). 17 Oxo Sparteine and Lupanine, Obtained from *Cytisus scoparius*, Exert a Neuroprotection against Soluble Oligomers of Amyloid- β Toxicity by Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Journal Of Alzheimer's Disease*, 67(1), 343-356. <https://doi.org/10.3233/jad-180945>

Georgé, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, M. (2005). Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 53(5), 1370-1373. <https://doi.org/10.1021/jf048396b>

Ghose, A. K., Viswanadhan, A. V. N., & Wendoloski, J. J. (1998). A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *Journal Of Combinatorial Chemistry*, 1(1), 55-68. <https://doi.org/10.1021/cc9800071>

Ghosh, S., Sarkhel, S., Ghosh, K., Dhar, S., Karar, S., & Roychowdhury, V. (2023). Plant-Derived hemostats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 33(2), 259-271. <https://doi.org/10.1007/s43450-022-00346-7>

Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*, (1), F1-2.

Gonçalves, S., & Romano, A. (2017). Inhibitory properties of phenolic compounds against enzymes linked with human diseases. *Phenolic compounds-biological activity*, 40(5), 100-120. <https://doi.org/10.5772/66844>

- Guemou, L., Fellah, S., Maïrif, M., Chouhim, K. M. L., Moussaoui, B., Bouzemarene, I. N., & Boubekour, C.** (2023). Floristic diversity of the steppe area of Tissemsilt, Northwest of Algeria. *Biodiversitas*, 24(4), 2483-2491. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240464>
- Gupta, D.** (2015). Methods for determination of antioxidant capacity: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(2), 546-566. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(2\)](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(2)).
- Gupta, G., Tiwari, J., Dahiya, R., Sharma, R., Mishra, A., & Dua, K.** (2018). Recent updates on neuropharmacological effects of luteolin. *PubMed*, 17, 211-214. <https://doi.org/10.17179/excli2018-1041>
- Ha, Z. Y., Mathew, S., & Yoon, Y. K.** (2020). Butyrylcholinesterase : A Multifaceted Pharmacological Target and Tool. *Current Protein & Peptide Science*, 21(1), 99-109. <https://doi.org/10.2174/1389203720666191107094949>
- Habib, N., Regagba, Z., Miara, M. D., Hammou, M. A., & Snorek, J.** (2020). Floristic diversity of steppe vegetation in the region of Djelfa, North-West Algeria. *Acta Botánica Malacitana*, 45, 37-46. <https://doi.org/10.24310/abm.v45i.7987>
- Hammami, S., Debbabi, H., Jlassi, I., Joshi, R. K., & Mokni, R. E.** (2020). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from the aerial parts of *Plantago afra* L. (Plantaginaceae) growing wild in Tunisia. *South African Journal Of Botany*, 132, 410-414. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.05.012>
- Hanganu, D., Filip, L., Olah, N.-K., Mocan, A., Vlase, L., Raita, O., Oniga, I., & Benedec, D.** (2016). Evaluation of polyphenolic profile and antioxidant activity for *Cytisus nigricans* and *Cytisus albus*. *Farmacia*, 64(6), 863-867.
- Harput, U. Ş., Genç, Y., Khan, N., & Saracoglu, I.** (2011). Radical Scavenging Effects of Different *Veronica* Species. *Records of Natural Products*, 5(2),100-107.
- Hashim, F. J., Vichitphan, S., Boonsiri, P., & Vichitphan, K.** (2021). Neuroprotective Assessment of *Moringa oleifera* Leaves Extract against Oxidative-Stress-Induced Cytotoxicity in SHSY5Y Neuroblastoma Cells. *Plants*, 10(5), 889-902. <https://doi.org/10.3390/plants10050889>
- Hassan, S. T. S., & Žemlička, M.** (2016). Plant-Derived Urease Inhibitors as Alternative Chemotherapeutic Agents. *Archiv Der Pharmazie*, 349(7), 507-522. <https://doi.org/10.1002/ardp.201500019>

Hind, M., Missoune, B., & Bounar, R. (2021). The medicinal plants of Bousaada (M'sila, Algeria). *Zenodo (CERN European Organization For Nuclear Research)*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5810361>

Houta, O., Chouaeb, H., Neffati, M., & Amri, H. (2012). Criblage chimique préliminaire des protéines et caroténoïdes présents dans un crithmum maritimum cultivé en Tunisie. *Nous*, *11*, 12.77-82.

Huang, C., Wu, S., Yang, W., Kuan, A., & Chen, C. (2016). Antioxidant activities of crude extracts of fucoidan extracted from *Sargassum glaucescens* by a compressional-puffing-hydrothermal extraction process. *Food Chemistry*, *197*, 1121-1129. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.100>

Hussein, H. A., Borrel, A., Geneix, C., Petitjean, M., Regad, L., & Camproux, A. (2015). PockDrug-Server : a new web server for predicting pocket druggability on holo and apo proteins. *Nucleic Acids Research*, *43*(1), 436-442. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv462>

Ibrahim, J. A., Egharevba, H. O., & Gamaniel, K. (2017). Chemical and Biological Screening Approaches to Phytopharmaceuticals. *International Journal Of Sciences*, *3*(10), 22-31. <https://doi.org/10.18483/ijsci.1443>

Ignjatović, Đ., Živković, J., Tovilović, G., Šavikin, K., Tomić, M., Maksimović, Z., & Janković, T. (2015). Evaluation of angiogenic and neuroprotective potential of different extracts from three *Veronica* species. *Frontiers In Life Science*, *8*(2), 107-116. <https://doi.org/10.1080/21553769.2014.998297>

Imberty, A., Hardnian, K. D., Carver, J. P., Pe, S., & Rez, " (1991). *Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A*, *1*(6), 631-642. <http://glycob.oxfordjournals.org/>

Ionescu-Tucker, A., & Cotman, C. W. (2021). Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology Of Aging*, *107*, 86-95. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.07.014>

Jairajpuri, D. S., Hussain, A., Nasreen, K., Mohammad, T., Anjum, F., Rehman, T., Hasan, G. M., Alajmi, M. F., & Hassan, M. I. (2021). Identification of natural compounds as potent inhibitors of SARS-CoV-2 main protease using combined docking and molecular dynamics simulations. *Saudi Journal Of Biological Sciences*, *28*(4), 2423-2431. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.01.040>

James, J. P., Ail, P. D., Crasta, L., Kamath, R., Shura, M. H., & TJ, S. (2023). In Silico ADMET and Molecular Interaction Profiles of Phytochemicals from Medicinal Plants in Dakshina Kannada. *Journal Of Health And Allied Sciences*, 4(02), 190-201 <https://doi.org/10.1055/s-0043-1770057>

Jaradat, N., Mohammed Hussen, F., Hussen, F., & Al Ali, A. (2015). Preliminary Phytochemical Screening, Quantitative Estimation of Total Flavonoids, Total Phenols and Antioxidant Activity of Ephedra alata Decne. *J. Mater. Environ. Sci*, 6(6), 1771–1778.

Jarrahpour, A., Fathi, J., Mimouni, M., Hadda, T. B., Sheikh, J., Chohan, Z. H., & Ali, P. (2011). Petra, Osiris and Molinspiration (POM) together as a successful support in drug design : antibacterial activity and biopharmaceutical characterization of some azo Schiff bases. *Medicinal Chemistry Research*, 21(8), 1984-1990. <https://doi.org/10.1007/s00044-011-9723-0>

Jeon, H. (2012). Anti-inflammatory activity of Veronica peregrina. *Natural Product Sciences*, 18(3), 141–146.

Kalita, J. M., Chetia, D., & Rudrapal, M. (2019). Molecular Docking, Drug-likeness Studies and ADMET Prediction of Quinoline Imines for Antimalarial Activity. *Journal Of Medicinal Chemistry And Drug Design*, 2(1), 1-7. <https://doi.org/10.16966/2578-9589.113>

Kamel, A. I., El-Rokh, A. R., Dawidar, A. M., & Abdel-Mogib, M. (2024). Bioactive compounds from Retama raetam (Forssk.) Webb & Berthel. and their insecticidal activity against cotton pests Aphis gossypii and Amrasca biguttula. *Fitoterapia*, 172, 105749-105754. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2023.105749>

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. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.09.041>

Kempuraj, D., Thangavel, R., Kempuraj, D. D., Ahmed, M. E., Selvakumar, G. P., Raikwar, S. P., Zaheer, S., Iyer, S. S., Govindarajan, R., Chandrasekaran, P. N., & Zaheer, A. (2020). Neuroprotective effects of flavone luteolin in neuroinflammation and neurotrauma. *BioFactors*, 47(2), 190-197. <https://doi.org/10.1002/biof.1687>

Khan, H., Jawad, M. S., Kamal, M. A., Baldi, A., Xiao, J., Nabavi, S. M., & Daglia, M. (2018). Evidence and prospective of plant derived flavonoids as antiplatelet agents : Strong candidates to be drugs of future. *Food And Chemical Toxicology*, 119, 355-367. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.014>

- Khan, H., Marya, Amin, S., Kamal, M. A., & Patel, S.** (2018). Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors : Current therapeutic standing and future prospects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *101*, 860-870. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.007>
- Khan, T., Ahmad, R., Azad, I., Raza, S., Joshi, S., & Khan, A. R.** (2018). Computer-aided drug design and virtual screening of targeted combinatorial libraries of mixed-ligand transition metal complexes of 2-butanone thiosemicarbazone. *Computational Biology And Chemistry*, *75*, 178-195. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.05.008>
- Kim, M. J., Wang, H. S., & Lee, M. W.** (2020). Anti-Inflammatory Effects of Fermented Bark of *Acanthopanax sessiliflorus* and Its Isolated Compounds on Lipopolysaccharide-Treated RAW 264.7 Macrophage Cells. *Evidence-based Complementary And Alternative Medicine*, *2020*, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2020/6749425>
- Kim, S., Kim, J., Oh, H., Kim, S., & Suh, G.** (2021). Vegetative propagation of *Veronica dahurica* and *Veronica pusanensis* by stem cuttings with auxins. *Rhizosphere*, *17*, 100315-100318. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100315>
- Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J.** (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery : methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, *3*(11), 935-949. <https://doi.org/10.1038/nrd1549>
- Koç, E., Üngördü, A., & Candan, F.** (2019). Antioxidant properties of methanolic extract of ‘*Veronica multifida*’ and DFT and HF analyses of its the major flavonoid component. *Journal Of Molecular Structure*, *1197*, 436-442. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.07.056>
- Koparde, A. A., Doijad, R. C., & Magdum, C. S.** (2019). Natural products in drug discovery. In *Pharmacognosy-medicinal plants*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82860>
- Kostadinova, E., Alipieva, K., Kokubun, T., Taskova, R. M., & Handjieva, N.** (2007). Phenylethanoids, iridoids and a spirostanol saponin from *Veronica turrilliana*. *Phytochemistry*, *68*(9), 1321-1326. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.02.014>
- Koyuncu, E. A., Yaşar, A., Arslan, F., & Sarı, N.** (2019). Synthesis of novel Schiff base derivatives of tacrine and investigation of their acetylcholinesterase inhibition potency. *Macedonian Journal Of Chemistry And Chemical Engineering*, *38*(1), 75-84 . <https://doi.org/10.20450/mjcce.2019.1561>

Kumar, N., & Jose, J. (2020). Current developments in the nanomediated delivery of photoprotective phytochemicals. *Environmental Science And Pollution Research*, 27(31), 38446-38471. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10100-y>

Kumar, S., Manoharan, A., Jayalakshmi, J., Abdelgawad, M. A., Mahdi, W. A., Alshehri, S., Ghoneim, M. M., Pappachen, L. K., Zachariah, S. M., Aneesh, T. P., & Mathew, B. (2023). Exploiting butyrylcholinesterase inhibitors through a combined 3-D pharmacophore modeling, QSAR, molecular docking, and molecular dynamics investigation. *RSC Advances*, 13(14), 9513-9529. <https://doi.org/10.1039/d3ra00526g>

Küpeli, E., Şahin, Yeşilada, E., Caliş, İ., & Ezer, N. (2007). In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity evaluation of phenolic compounds from *Sideritis stricta*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62(7-8), 519-525.

Larit, F., Elokely, K. M., Chaurasiya, N. D., Benyahia, S., Nael, M. A., León, F., Abu-Darwish, M. S., Efferth, T., Wang, Y., Belouahem-Abed, D., Benayache, S., Tekwani, B. L., & Cutler, S. J. (2018). Inhibition of human monoamine oxidase A and B by flavonoids isolated from two Algerian medicinal plants. *Phytomedicine*, 40, 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.12.032>

Larit, F., León, F., Benyahia, S., & Cutler, S. J. (2019). Total Phenolic and Flavonoid Content and Biological Activities of Extracts and Isolated Compounds of *Cytisus villosus* Pourr. *Biomolecules*, 9(11), 732-748. <https://doi.org/10.3390/biom9110732>

Larit, F., Nael, M. A., Benyahia, S., Radwan, M. M., León, F., Jasicka-Misiak, I., Poliwoda, A., Wiczorek, D., Benayache, F., Benayache, S., Wiczorek, P., & Cutler, S. J. (2018). Secondary metabolites from the aerial parts of *Cytisus villosus* Pourr. *Phytochemistry Letters*, 24, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2017.12.012>

Lin, Z., Fang, Y., Huang, A., Chen, L., Suhua, G., & Chen, J. (2014). Chemical constituents from *Sedum aizoon* and their hemostatic activity. *Pharmaceutical Biology*, 52(11), 1429-1434. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.895019>

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2012). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 4-17.

Liu, Q., Shi, W., Ren, S., Ni, W., Li, W., Chen, H., Liu, P., Yuan, J., He, X., Li, J., Cao, P., Yang, P., Zhang, X., & Zhu, H. (2018). Arylamino containing hydroxamic acids as potent

urease inhibitors for the treatment of Helicobacter pylori infection. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 156, 126-136. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.06.065>

Liu, X., Ouyang, S., Yu, B., Liu, Y., Huang, K., Gong, J., Zheng, S., Li, Z., Li, H., & Jiang, H. (2010). PharmMapper server : a web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach. *Nucleic Acids Research*, 38, 609-614. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq300>

Liu, Y., Liu, Y., Liu, G., Ran, F., Zhou, L., Wu, Y., Peng, L., Shao, M., Chang-Ju, L., & Zhang, Y. (2023). A review of hemostatic chemical components and their mechanisms in traditional Chinese medicine and ethnic medicine. *Journal Of Ethnopharmacology*, 307, 116200-116219. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116200>

López-Posadas, R., Ballester, I., Abadía-Molina, A. C., Suárez, M. D., Zarzuelo, A., & Martínez-Augustin, O. (2008). Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure–activity relationship study. *Biochemical Pharmacology*, 76(4), 495-506. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.06.001>

Luis, A., Domingues, F., & Duarte, A. P. (2011). Bioactive compounds, RP-HPLC analysis of phenolics, and antioxidant activity of some Portuguese shrub species extracts. *Natural product communications*, 6(12), 1863 - 1872.

Luo, X., Chuanrong, D., Cheng, H., Chen, J., & Lin, C. (2017). Study on the Anticoagulant or Procoagulant Activities of Type II Phenolic Acid Derivatives. *Molecules*, 22(12), 2047-2062. <https://doi.org/10.3390/molecules22122047>

Maire, R. (1987). Flore de l’afrique du nord, vol XVI. *Editions Lechevalier, Paris*.

Maliehe, T. S., Tsilo, P. H., & Shandu, J. S. (2020). Computational Evaluation of ADMET Properties and Bioactive Score of Compounds from *Encephalartos ferox*. *Pharmacognosy Journal*, 12(6), 1357-1362. <https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.187>

Mamidala, R., Bhimathati, S. R. S., & Vema, A. (2021). Discovery of Novel Dihydropyrimidine and hydroxamic acid hybrids as potent Helicobacter pylori Urease inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 114, 105010-105020. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105010>

Mandal, S. C., Nayak, A. K., & Dhara, A. K. (2021). *Herbal Biomolecules in Healthcare Applications*. Elsevier.

- Mansur, J. D. S., Breder, M. N. R., Mansur, M. C. D. A., & Azulay, R. D.** (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol*, 121-124.
- Mansuri, R., Diwan, A., Kumar, H., Dangwal, K., & Yadav, D.** (2021). Potential of Natural Compounds as Sunscreen Agents. *Pharmacognosy Reviews*, 15(29), 47-56. <https://doi.org/10.5530/phrev.2021.15.5>
- Marucci, G., Buccioni, M., Ben, D. D., Lambertucci, C., Volpini, R., & Amenta, F.** (2021). Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 190, 108352-108366. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108352>
- Matlawska, I., Sikorska, M., El-Sayed, N. H., Budzianowski, J., Holderna-Kędzia, E., & Mabry, T. J.** (2007). Bioactive flavone sulfates of *Abutilon indicum* leaves. *Natural Product Communications*, 2(10), 1003-1008.
- Maurya, S., Darshetkar, A. M., Yi, D., Kim, J., Lee, C., Ali, M. A., Choi, S., Choudhary, R. K., & Kim, S.** (2020). Plastome comparison and evolution within the tribes of Plantaginaceae : Insights from an Asian gypsyweed. *Saudi Journal Of Biological Sciences*, 27(12), 3489-3498. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.040>
- Mehrvarz, S. S., & Mahmoodi, N.** (2008). Iridoid and flavonoid patterns of the genus *Veronica* sect. *Alsinebe* subsect. *Agrestis* (Benth.) Stroh (Lamiales) and their systematic significance. *Planta Medica*, 1(1), 1-5.
- Min, S. L. S., Liew, S. Y., Chear, N. J. Y., Goh, B. H., Tan, W., & Khaw, K. Y.** (2022). Plant Terpenoids as the Promising Source of Cholinesterase Inhibitors for Anti-AD Therapy. *Biology*, 11(2), 307-318. <https://doi.org/10.3390/biology11020307>
- Mishra, A. K., Mishra, A. K., & Chattopadhyay, P.** (2011). Herbal Cosmeceuticals for Photoprotection from Ultraviolet B Radiation : A Review. *Tropical Journal Of Pharmaceutical Research*, 10(3), 351-360. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v10i3.7>
- Miara, M. D., Bendif, H., Hammou, M. A., & Teixidor-Toneu, I.** (2018). Ethnobotanical survey of medicinal plants used by nomadic peoples in the Algerian steppe. *Journal Of Ethnopharmacology*, 219, 248-256. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.03.011>
- Modolo, L. V., De Souza, A. X., Horta, L. P., Araújo, D. P., & De Fátima, Â.** (2015). An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors : A review. *Journal Of Advanced Research*, 6(1), 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2014.09.001>

- Morelli, S., Piscioneri, A., Guarnieri, G., Morelli, A., Drioli, E., & De Bartolo, L.** (2020). Anti-neuroinflammatory effect of daidzein in human hypothalamic GnRH neurons in an in vitro membrane-based model. *BioFactors*, 47(1), 93-111. <https://doi.org/10.1002/biof.1701>
- Mousavi, M., Zaiter, A., Modarressi, A., Baudelaire, E., & Dicko, A.** (2019). The positive impact of a new parting process on antioxidant activity, malic acid and phenolic content of *Prunus avium* L., *Prunus persica* L. and *Prunus domestica* subsp. *Insititia* L. powders. *Microchemical Journal*, 149, 103962-103974. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.103962>
- Muegge, I., Heald, S. L., & Brittelli, D. R.** (2001). Simple Selection Criteria for Drug-like Chemical Matter. *Journal Of Medicinal Chemistry*, 44(12), 1841-1846. <https://doi.org/10.1021/jm015507e>
- Mu, K., Liu, Y., Liu, G., Ran, F., Zhou, L., Wu, Y., ... & Zhang, Y.** (2023). A review of hemostatic chemical components and their mechanisms in traditional Chinese medicine and ethnic medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 307, 116200-116219.
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C.** (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity : A Review. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(7), 3380-3409. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Nabavi, S. F., Khan, H., D'Onofrio, G., Šamec, D., Shirooie, S., Dehpour, A. R., Argüelles, S., Habtemariam, S., & Sobarzo-Sánchez, E.** (2018). Apigenin as neuroprotective agent : Of mice and men. *Pharmacological Research*, 128, 359-365. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.10.008>
- Najmi, A., Javed, S. A., Bratty, M. A., & Alhazmi, H. A.** (2022). Modern Approaches in the Discovery and Development of Plant-Based Natural Products and Their Analogues as Potential Therapeutic Agents. *Molecules*, 27(2), 349-374. <https://doi.org/10.3390/molecules27020349>
- Naima, R., Oumam, M., Hannache, H., Sesbou, A., Charrier, B., Pizzi, A., & Charrier-El Bouhtoury, F.** (2015). Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from Moroccan *Acacia mollissima* barks. *Industrial Crops and Products*, 70, 245-252.
- Nikolova, M., Taskova, R. M., & Peev, D.** (2005). Exudate flavonoid aglycones of *Veronica* : Ecological and systematic implications. *Biochemical Systematics And Ecology*, 33(12), 1258-1268. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2005.07.006>

Nile, S. H., Keum, Y. S., Nile, A., Jalde, S. S., & Patel, R. V. (2017). Antioxidant, anti-inflammatory, and enzyme inhibitory activity of natural plant flavonoids and their synthesized derivatives. *Journal Of Biochemical And Molecular Toxicology*, 32(1), 119-126. <https://doi.org/10.1002/jbt.22002>

Njinga, N. S., Sule, M. I., Pateh, U. U., Hassan, H. S., Abdullahi, S. T., & Ache, R. N. (2016). Isolation and antimicrobial activity of β -sitosterol-3-O-glucoside from *Lannea kerstingii* engl. & K. Krause (Anacardiaceae). *Journal of Health and Allied Sciences NU*, 6(01), 004-008.

Norb, S. (2019). *Sauvages du Poitou - Promenade au pays des Véroniques*. <https://www.sauvagesdupoitou.com/82/314>

Okonkwo, C. E., Hussain, S. Z., Onyeaka, H., Adeyanju, A. A., Nwonuma, C. O., Bashir, A. A., Farooq, A., Zhou, C., & Shittu, T. (2023). Lignin polyphenol : From biomass to innovative food applications, and influence on gut microflora. *Industrial Crops And Products*, 206, 117696-117713. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117696>

Omari, N. E., Jaouadi, I., Lahyaoui, M., Benali, T., Taha, D., Bakrim, S., Menyiy, N. E., Kamari, F. E., Zengin, G., Punia, S., Roohinejad, S., Gallo, M., Montesano, D., & Bouyahya, A. (2022). Natural Sources, Pharmacological Properties, and Health Benefits of Daucosterol : Versatility of Actions. *Applied Sciences*, 12(12), 5779-5805. <https://doi.org/10.3390/app12125779>

Bhusnure, O. G., Shinde, M. C., Vijayendra, S. S., Gholve, S. B., Giram, P. S., & Birajdar, M. J. (2019). Phytopharmaceuticals: An emerging platform for innovation and development of new drugs from botanicals. *Journal of Drug delivery and therapeutics*, 9(3), 1046-1057.

Ono, E., Ruike, M., Iwashita, T., Nomoto, K., & Fukui, Y. (2010). Co-pigmentation and flavonoid glycosyltransferases in blue *Veronica persica* flowers. *Phytochemistry*, 71(7), 726-735. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.02.008>

Owen, R. W., Haubner, R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2003). Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food And Chemical Toxicology*, 41(5), 703-717. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(03\)00011-5](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(03)00011-5)

Ozipek, M., Saracoglu, I., Ogihara, Y., & Çaliş, İ. (2002). Nuatigenin-type steroidal saponins from *Veronica fuhsii* and *V. multifida*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(7-8), 603-608.

- Diwan, A. D., Ninawe, A. S., & Harke, S. N.** (2017). Gene editing (CRISPR-Cas) technology and fisheries sector. *Canadian Journal of Biotechnology*, *1*(2), 65-72.
- Pandey, R. P., Koirala, N., Lee, J. H., Lee, H. C., & Sohng, J. K.** (2013). Comparative study of the antioxidative potential of common natural flavonoids and isoflavonoids. *Microbiology and Biotechnology Letters*, *41*(3), 367-371.
- Parvin, M. S., Das, N., Jahan, N., Akhter, M. A., Nahar, L., & Islam, M. E.** (2015). Evaluation of in vitro anti-inflammatory and antibacterial potential of *Crescentia cujete* leaves and stem bark. *BMC Research Notes*, *8*(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1384-5>
- Patel, A. B.** (2023). Simple and rapid colorimetric method for determination of erythrocyte and plasma cholinesterase activities and comparison with the standard Ellman's method. *Public Health And Toxicology*, *3*(3), 1-10. <https://doi.org/10.18332/pht/172229>
- Pereira, O. R., Silva, A. M. S., Domingues, R. M., & Cardoso, S. M.** (2012). Identification of phenolic constituents of *Cytisus multiflorus*. *Food Chemistry*, *131*(2), 652-659. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.045>
- Perron, N. R., & Brumaghim, J. L.** (2009). A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochemistry And Biophysics*, *53*(2), 75-100. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9043-x>
- Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C.** (2011). Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteeae (Fabaceae). *Food And Chemical Toxicology*, *49*(11), 2983-2989. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.07.054>
- Pizzi, A.** (2021). Tannins medical / pharmacological and related applications : A critical review. *Sustainable Chemistry And Pharmacy*, *22*, 100481-100494. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100481>
- Prkić, A.** (2018). Potentiometric Determination of Copper in Herbal Material and Hydrolats of Veronica Species (Family Plantaginaceae). *International Journal Of Electrochemical Science*, *13*(12), 11923-11930. <https://doi.org/10.20964/2018.12.16>
- 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 I*. 341, 337-341.

Quezel P and Santa S. Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales.,1963 2 Tomes, Editions CNRS, Paris, 1170.

Rahal, N. B. (2012). *Extraction, identification et caractérisation des molécules bioactives de la graine et de l'huile de Silybum marianum. Étude de leurs activités antioxydante et antitumorale* (Thèse de doctorat, Université de Lorraine).

Rahman, A., & Parvin, M. I. A. (2014). Study of Medicinal Uses on Fabaceae Family at Rajshahi, Bangladesh. *Bangladesh Research In Plant Sciences*, 2(1), 6-8. <https://doi.org/10.12691/plant-2-1-2>

Rahman, M. M., Rahaman, M. S., Islam, M. R., Rahman, F., Mithi, F. M., Alqahtani, T., Almikhlaifi, M. A., Alghamdi, S. Q., Alruwaili, A. S., Hossain, M. S., Ahmed, M., Das, R., Emran, T. B., & Uddin, M. S. (2021). Role of Phenolic Compounds in Human Disease : Current Knowledge and Future Prospects. *Molecules*, 27(1), 233-268. <https://doi.org/10.3390/molecules27010233>

Ranasinghe, P., Ranasinghe, P., Abeysekera, W. K. M., Premakumara, G. S., Perera, Y. S., Gurugama, P., & Gunatilake, S. B. (2012). In vitro erythrocyte membrane stabilization properties of Carica papaya L. leaf extracts. *Pharmacognosy Research*, 4(4), 196-202. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.102261>

Rauf, A., Imran, M., Abu-Izneid, T., Haq, I., Patel, S., Pan, X., Naz, S., Sanches-Silva, A., Saeed, F., & Suleria, H. A. R. (2019). Proanthocyanidins : A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 116, 108999-109004. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108999>

Rehman, S., Shah, S., Butt, A. M., Shah, S. M., Jabeen, Z., & Nadeem, A. (2021). Biochemical Profiling and Elucidation of Biological Activities of Beta vulgaris L. Leaves and Roots Extracts. *Saudi Journal Of Biological Sciences*, 28(1), 592-602. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.048>

Reviana, R., Usman, A. N., Raya, I., Aliyah, Dirpan, A., Arsyad, A., & Fendi, F. (2021). Analysis of antioxidant activity on cocktail honey products as female pre-conception supplements. *Gaceta Sanitaria*, 35, 202-205. <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2021.10.021>

Richard, T., Tamsamani, H., Delaunay, J., Krisa, S., & Mérillon, J. (2014). Stilbènes : de la chimie à la neuroprotection. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 49(4), 173-180. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2014.03.001>

- Rodríguez-Arce, E., & Saldías, M. (2021).** Antioxidant properties of flavonoid metal complexes and their potential inclusion in the development of novel strategies for the treatment against neurodegenerative diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *143*, 112236 -112244.
- Rojas-Andrés, B. M., & Martínez-Ortega, M. M. (2016).** Taxonomic revision of Veronica subsection Pentasepalae (Veronica, Plantaginaceae sensu APG III). *Phytotaxa*, *285*(1), 1-100. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.285.1.1>
- Roseiro, L., & Serralheiro, M. L. (2012).** Polyphenols as acetylcholinesterase inhibitors : Structural specificity and impact on human disease. *Nutrition And Aging*, *1*(2), 99-111. <https://doi.org/10.3233/nua-2012-0006>
- Sabiu, S. (2022).** *Therapeutic Use of Plant Secondary Metabolites*. Bentham Science Publishers.
- Sabrina, A. P., Tania, E., Nuryamah, S., & Yuniarsih, N. (2022).** The Potential of Natural Ingredients as Sunscreen : A Narrative Literature Review. *Open Access Indonesian Journal Of Medical Reviews*, *2*(4), 265-269. <https://doi.org/10.37275/oaijmr.v2i4.221>
- Sachdeva, S. (2009).** Fitzpatrick skin typing: Applications in dermatology. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology*, *75*, 93-97.
- Sachetto, A. T. A., Rosa, J. G., & Santoro, M. L. (2018).** Rutin (quercetin-3-rutinoside) modulates the hemostatic disturbances and redox imbalance induced by Bothrops jararaca snake venom in mice. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *12*(10), 0006774-0006795. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006774>
- Sadeer, N. B., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020).** The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*, *9*(8), 709-748. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>
- Saewan, N., & Jimtaisong, A. (2013).** Photoprotection of natural flavonoids. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *3*(9), 129-141.
- Saewan, N., & Jimtaisong, A. (2015).** Natural products as photoprotection. *Journal of cosmetic dermatology*, *14*(1), 47-63.
- Sairazi, N. S. M., & Sirajudeen, K. N. S. (2020).** Natural Products and Their Bioactive Compounds : Neuroprotective Potentials against Neurodegenerative Diseases. *Evidence-based Complementary And Alternative Medicine*, *2020*, 1-30. <https://doi.org/10.1155/2020/6565396>

Salam, S. G. A., Rashed, M., Ibrahim, N. A., Rahim, E. A. A., Aly, T. A. A., & Al-Farga, A. (2023). Phytochemical screening and in-vitro biological properties of unprocessed and household processed fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* Linn.) seeds and leaves. *Scientific Reports*, 13(1), 7032-7044. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31888-y>

Saleh, H. A., Yousef, M. H., & Abdelnaser, A. (2021). The Anti-Inflammatory Properties of Phytochemicals and Their Effects on Epigenetic Mechanisms Involved in TLR4/NF- κ B-Mediated Inflammation. *Frontiers In Immunology*, 12, 606069-606097. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.606069>

Salehi, B., Shetty, M. S., N, A. K., Živković, J., Calina, D., Docea, A. O., Emamzadeh-Yazdi, S., Kılıç, C. S., Goloshvili, T., Senesi, N., Pignata, G., Sharopov, F., Del Mar Contreras, M., Cho, W. C., Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2019a). Veronica Plants—Drifting from Farm to Traditional Healing, Food Application, and Phytopharmacology. *Molecules*, 24(13), 2454. <https://doi.org/10.3390/molecules24132454>

Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kręgiel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A., Lucarini, M., Santini, A., Souto, E. B., Novellino, E., Antolak, H., Azzini, E., Setzer, W. N., & Martins, N. (2019). The Therapeutic Potential of Apigenin. *International Journal Of Molecular Sciences*, 20(6), 1305. <https://doi.org/10.3390/ijms20061305>

Salvamani, S., Gunasekaran, B., Shukor, M. Y., Shaharuddin, N. A., Sabullah, M. K., & Ahmad, S. A. (2016). Anti-HMG-CoA Reductase, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities of *Amaranthus viridis* Leaf Extract as a Potential Treatment for Hypercholesterolemia. *Evidence-based Complementary And Alternative Medicine*, 2016, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2016/8090841>

Santarpia, L., Grandone, I., Contaldo, F., & Pasanisi, F. (2012). Butyrylcholinesterase as a prognostic marker : a review of the literature. *Journal Of Cachexia, Sarcopenia And Muscle*, 4(1), 31-39. <https://doi.org/10.1007/s13539-012-0083-5>

Saraçoğlu, İ., Varel, M., Harput, Ü. Ş., & Nagatsu, A. (2004). Acylated flavonoids and phenol glycosides from *Veronica thymoides* subsp. *pseudocinerea*. *Phytochemistry*, 65(16), 2379-2385. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.05.011>

Saraf, S., & Kaur, C. D. (2010). Phytoconstituents as photoprotective novel cosmetic formulations. *Pharmacognosy Reviews*, 4(7), 1-11. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.65319>

Sayre, R. M., Agin, P. P., LeVee, G. J., & Marlowe, E. (1979). A comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens formulas. *Photochemistry and Photobiology*, 29(3), 559-566.

Schmidtke, P., Le Guilloux, V., Maupetit, J., & Tuffi; ½ry, P. (2010). Fpocket: online tools for protein ensemble pocket detection and tracking. *Nucleic acids research*, 38, 582-589.

Schreihöfer, D. A. (2015). Neuroprotection by dietary isoflavones and their role in cerebral ischemia. In *Bioactive nutraceuticals and dietary supplements in neurological and brain disease* (385-394). Academic Press.

Şen, A., Göğçer, F., Doğan, A., & Bitiş, L. (2019). Two Acylated Isoscutellarein Glucosides with Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities Isolated from Endemic *Stachys Subnuda* Montbret & Aucher ex Benth. *Acta Chimica Slovenica*, 831-838. <https://doi.org/10.17344/acsi.2018.4921>

Serafini, M. R., Detoni, C., Menezes, P. D. P., Filho, R. N. P., Fortes, V. S., Vieira, M. J. F., Guterres, S. S., De Albuquerque, R. L. C., & De Souza Araújo, A. A. (2014). UVA-UVB Photoprotective Activity of Topical Formulations Containing *Morinda citrifolia* Extract. *BioMed Research International*, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2014/587819>

Shaikh, J. R., & Patil, M. (2020). Qualitative tests for preliminary phytochemical screening : An overview. *International Journal Of Chemical Studies*, 8(2), 603-608. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i2i.8834>

Shamsudin, N. F., Ahmed, Q. U., Mahmood, S., Shah, S. A. A., Sarian, M. N., Khattak, M. M. A. K., Khatib, A., Sabere, A. S. M., Yusoff, Y. M., & Latip, J. (2022). Flavonoids as Antidiabetic and Anti-Inflammatory Agents : A Review on Structural Activity Relationship-Based Studies and Meta-Analysis. *International Journal Of Molecular Sciences*, 23(20), 12605-12639. <https://doi.org/10.3390/ijms232012605>

Sharma, I., Thakur, A., Sharma, A., Singh, N., Kumar, R., & Sharma, A. (2022). *Plant secondary metabolites* (329-353). Singapore:: Springer.

Shen, T., Wang, X. N., & Lou, H. X. (2009). Natural stilbenes: an overview. *Natural product reports*, 26(7), 916-935.

Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., & Jin, B. (2022). Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food chemistry*, 383, 132531-132543.

Shin, S. A., Joo, B. J., Lee, J., Ryu, G., Han, M., Kim, W. Y., Park, H. H., Lee, J. H., & Lee, C. S. (2020). Phytochemicals as Anti-Inflammatory Agents in Animal Models of Prevalent

- Inflammatory Diseases. *Molecules*, 25(24), 5932-5958.
<https://doi.org/10.3390/molecules25245932>
- Shraim, A., Ahmed, T., Rahman, M., & Hijji, Y. M.** (2021). Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay : A critical evaluation. *LWT*, 150, 111932-111942.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932>
- Shruti, Y., Prabhudev, S. M., Channamma, M., Hanamanth, J. K., & Kishore Singh, C.** (2023). Drug likeness, bioavailability, virtual screening and docking studies of some sulfonamide. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 12,1094-1107.
- Sieniawska, E., & Baj, T.** (2017). Tannins. Dans *Elsevier eBooks* (199-232).
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802104-0.00010-x>
- Simpson, M. G.** (2010). Diversity and Classification of Flowering Plants : Eudicots. Dans *Elsevier eBooks* (275-448). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374380-0.50008-7>
- Singh, P. K., Singh, J., Medhi, T., & Kumar, A.** (2022). Phytochemical Screening, Quantification, FT-IR Analysis, and In Silico Characterization of Potential Bio-active Compounds Identified in HR-LC/MS Analysis of the Polyherbal Formulation from Northeast India. *ACS Omega*, 7(37), 33067-33078. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c03117>
- Singla, R. K., Dubey, A. K., Garg, A., Sharma, R., Fiorino, M., Ameen, S. M., Haddad, M. A., & Al-Hiary, M.** (2019). Natural Polyphenols : Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *Journal of aoac international*, 102(5), 1397-1400.
<https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0133>
- Solanki, I., Parihar, P., Mansuri, M. L., & Parihar, M. S.** (2015). Flavonoid-Based Therapies in the Early Management of Neurodegenerative Diseases. *Advances In Nutrition*, 6(1), 64-72. <https://doi.org/10.3945/an.114.007500>
- Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., & Bahorun, T.** (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents : Mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis*, 579(1-2), 200-213. <https://doi.org/10.1016/j.mrfm.2005.03.023>
- Srinivasan, K.** (2013). Antioxidant Potential of Spices and Their Active Constituents. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 54(3), 352-372.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2011.585525>

- Stefanović, O. D., & Čomić, L. R.** (2011). Inhibitory effect of *Cytisus nigricans* L. and *Cytisus capitatus* Scop. on growth of bacteria. *African Journal Of Microbiology Research*, 5(27), 4725-4730. <https://doi.org/10.5897/ajmr10.650>
- Stojković, D., Živković, J., Soković, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C., Janković, T., & Maksimović, Z.** (2013). Antibacterial activity of *Veronica montana* L. extract and of protocatechuic acid incorporated in a food system. *Food And Chemical Toxicology*, 55, 209-213. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.005>
- Sun, W., & Shahrajabian, M. H.** (2023). Therapeutic Potential of Phenolic Compounds in Medicinal Plants—Natural Health Products for Human Health. *Molecules*, 28(4), 1845-1887. <https://doi.org/10.3390/molecules28041845>
- Sundararajan, R., Haja, N. A., Venkatesan, K., Mukherjee, K., Saha, B. P., Bandyopadhyay, A., & Mukherjee, P. K.** (2006). *Cytisus scoparius* link - A natural antioxidant. *BMC Complementary And Alternative Medicine*, 6(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-8>
- Sychrová, A., Koláriková, I., Žemlička, M., & Šmejkal, K.** (2020). Natural compounds with dual antimicrobial and anti-inflammatory effects. *Phytochemistry Reviews*, 19(6), 1471-1502. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09694-5>
- Szwajgier, D., Borowiec, K., & Pustelniak, K.** (2017). The Neuroprotective Effects of Phenolic Acids : Molecular Mechanism of Action. *Nutrients*, 9(5), 477-497. <https://doi.org/10.3390/nu9050477>
- Taha, M., Ullah, H., Muqarrabun, L. M. R. A., Khan, M. N., Rahim, F., Ahmat, N., Javid, M. T., Ali, M., & Khan, K. M.** (2018). Bisindolylmethane thiosemicarbazides as potential inhibitors of urease : Synthesis and molecular modeling studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(1), 152-160. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.11.028>
- Tamfu, A. N., Küçükaydın, S., Yeskalyeva, B., Öztürk, M., & Dinică, R. M.** (2021). Non-Alkaloid Cholinesterase Inhibitory Compounds from Natural Sources. *Molecules*, 26(18), 5582-5594. <https://doi.org/10.3390/molecules26185582>
- Teles, Y. C. F., Horta, C. C. R., De Fátima Agra, M., Siheri, W., Boyd, M., Igoli, J. O., Gray, A. I., & De Fátima Vanderlei de Souza, M.** (2015). New Sulphated Flavonoids from *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl (Malvaceae). *Molecules*, 20(11), 20161-20172. <https://doi.org/10.3390/molecules201119685>

Temesgen, S., Sasikumar, J. M., & Egigu, M. C. (2022). Effect of Extraction Solvents on Total Polyphenolic Content and Antioxidant Capacity of *Syzygium Aromaticum* L. Flower Bud from Ethiopia. *BioMed Research International*, 2022, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2022/4568944>

Terto, M. V. C., Gomes, J. M., De Araújo, D. I. A. F., Silva, T. S., Ferreira, J. M., De Souza, J. J. N., Silva, M. S., & Tavares, J. F. (2020). Photoprotective Activity of *Plectranthus amboinicus* Extracts and HPLC Quantification of Rosmarinic Acid. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 30(2), 183-188. <https://doi.org/10.1007/s43450-020-00040-6>

Tian, C., Liu, X., Chang, Y. C., Wang, R., Lv, T., Cui, C., & Liu, M. (2021). Investigation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of luteolin, kaempferol, apigenin and quercetin. *South African Journal Of Botany*, 137, 257-264. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.10.022>

Traoré, K., Haïdara, M., Dénou, A., Kanadjigui, F., Sogoba, M. N., Diarra, B., Maïga, S. Z., & Sanogo, R. (2019). Criblage Phytochimique et Activités Biologiques de Quatre Plantes Utilisées au Mali dans la Prise en Charge du Paludisme Chez les Enfants. *European Scientific Journal, ESJ*, 15(6), 212-226. <https://doi.org/10.19044/esj.2019.v15n6p210>

Twaij, B. M., & Hasan, N. (2022). Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources : Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. *International Journal Of Plant Biology*, 13(1), 4-14. <https://doi.org/10.3390/ijpb13010003>

Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H., Smith, B. R., Ward, K. W., & Kopple, K. D. (2002). Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal Of Medicinal Chemistry*, 45(12), 2615-2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>

Vecchio, I., Sorrentino, L., Paoletti, A. M., Marra, R., & Arbitrio, M. (2021). The State of The Art on Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Journal Of Central Nervous System Disease*, 13, 1-13. <https://doi.org/10.1177/11795735211029113>

Vijayalakshmi, M., & Kandasamy, R. (2016). Ferric reducing anti-oxidant power assay in plant extract. *Bangladesh Journal Of Pharmacology*, 11(3), 570-572. <https://doi.org/10.3329/bjp.v11i3.27663>

Vuong, Q. V., Hirun, S., Roach, P. D., Bowyer, M. C., Phillips, P. A., & Scarlett, C. J. (2013). Effect of extraction conditions on total phenolic compounds and antioxidant activities of *Carica papaya* leaf aqueous extracts. *Journal Of Herbal Medicine*, 3(3), 104-111. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2013.04.004>

- Walia, A., Gupta, A. K., & Sharma, V.** (2019). Role of bioactive compounds in human health. *Acta Sci. Med. Sci*, 3(9), 25-33.
- Wang, B., Sui, J., Yu, Z., & Zhu, L.** (2011). Screening the hemostatic active fraction of *Artemisia annua* L. in-vitro. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 10(1), 57-62.
- Wang, X., Shen, Y., Wang, S., Li, S., Zhang, W., Liu, X., Lai, L., Pei, J., & Li, H.** (2017). PharmMapper 2017 update : a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database. *Nucleic Acids Research*, 45(1), 356-360. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx374>
- Wang, Z., & Deuss, P. J.** (2023). The isolation of lignin with native-like structure. *Biotechnology Advances*, 68, 108230-108251. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108230>
- Weerakoon, T., Nadarajah, N., Rizwan, R., Ranathunga, R., & Vithanage, J.** (2022). In Silico Comparison of Drug-Likeness of Phytochemicals from Nine Herbal Plants against Asthma. *Chemistry Proceeding*.12(1) , 93-99. <https://doi.org/10.3390/ecsoc-26-13527>
- Wink, M.** (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3-19. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(03\)00300-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(03)00300-5)
- Wölfle, U., Esser, P. R., Simon-Haarhaus, B., Martin, S. F., Lademann, J., & Schempp, C. M.** (2011). UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo. *Free Radical Biology And Medicine*, 50(9), 1081-1093. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.027>
- Xu, Z., Deng, M., Xu, Z., & Deng, M.** (2017). Fabaceae or Leguminosae. *Identification and Control of Common Weeds: Volume 2*, 547-615.
- Xue, H., Chen, K., Zhang, L., & Li, Y.** (2019). Review of the Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Pharmacology of the Genus *Veronica*. *The American Journal Of Chinese Medicine*, 47(06), 1193-1221. <https://doi.org/10.1142/s0192415x19500617>
- Yang, N., Wang, L., & Zhang, Y.** (2015). Immunological Activities of Components from Leaves of *Liriodendron chinensis*. *Chinese Herbal Medicines*, 7(3), 279-282. [https://doi.org/10.1016/s1674-6384\(15\)60051-x](https://doi.org/10.1016/s1674-6384(15)60051-x)

- Yoo, K., & Park, S.** (2012). Terpenoids as Potential Anti-Alzheimer's Disease Therapeutics. *Molecules*, 17(3), 3524-3538. <https://doi.org/10.3390/molecules17033524>
- Zeb, A., & Zeb.** (2021). *Phenolic Antioxidants in Foods: Chemistry, Biochemistry and Analysis* (385-411). Berlin/Heidelberg, Germany: Springer.. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-74768-8>
- Zedam, A., Mimeche, F., Benkherif, M., Sarri, D., & Fenni, M.** (2016). Diversity and plant distribution according to the topographical factors in Djebel Messaad forest (M'Sila-Algeria). *Advances in Environmental Biology*, 10(6), 27-39.
- Zhang, H., Xiang, M., Ma, C., Huang, Q., Li, W., Xie, Y., Wei, Y., & Yang, S.** (2009). Three-class classification models of logS and logP derived by using GA–CG–SVM approach. *Molecular Diversity*, 13(2), 261-268. <https://doi.org/10.1007/s11030-009-9108-1>
- Zhu, F., Du, B., & Xu, B.** (2017). Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes : A review. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 58(8), 1260-1270. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1251390>
- Živković, J., Barreira, J. C., Šavikin, K., Alimpić, A., Stojković, D., Días, M. I., Santos-Buelga, C., Duletić-Laušević, S., & Ferreira, I. C.** (2017). Chemical Profiling and Assessment of Antineurodegenerative and Antioxidant Properties of *Veronica teucrium* L. and *Veronica jacquinii* Baumg. *Chemistry & Biodiversity*, 14(8), 167-178. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700167>
- Živković, J., Čebović, T., & Maksimović, Z.** (2012). In vivo and in vitro antioxidant effects of three *Veronica* species. *Central European Journal Of Biology*, 7(3), 559-568. <https://doi.org/10.2478/s11535-012-0041-4>
- Zouhri, A., Menyiy, N. E., El-Mernissi, Y., Bouddine, T., El-Mernissi, R., Amhamdi, H., Elharrak, A., Salamatullah, A. M., Nafidi, H., Khallouki, F., Bourhia, M., & Hajji, L.** (2023). Mineral composition, principal polyphenolic components, and evaluation of the anti-inflammatory, analgesic, and antioxidant properties of *Cytisus villosus* Pourr leaf extracts. *Open Chemistry*, 21(1), 20220338-20220352. <https://doi.org/10.1515/chem-2022-0338>