

*République Algérienne Démocratique et populaire*  
*Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
*Université Abderrahmane Mira de Bejaia*

*Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*  
*Département de Biologie Physico-chimie*  
*Filière de science biologique*  
*Option : Biochimie Appliquée*



*Réf:.....*

*Mémoire de fin de cycle*  
*En vue de l'obtention du diplôme*  
***Master***

## **Activité inhibitrice de deux plantes médicinales locales sur la HMG-COA réductase**

*Réalisé par :*

*M<sup>lle</sup> KHEYAR Lydia*

*M<sup>lle</sup> HAMANI Nadia*

*Soutenu le 25/06/2018*

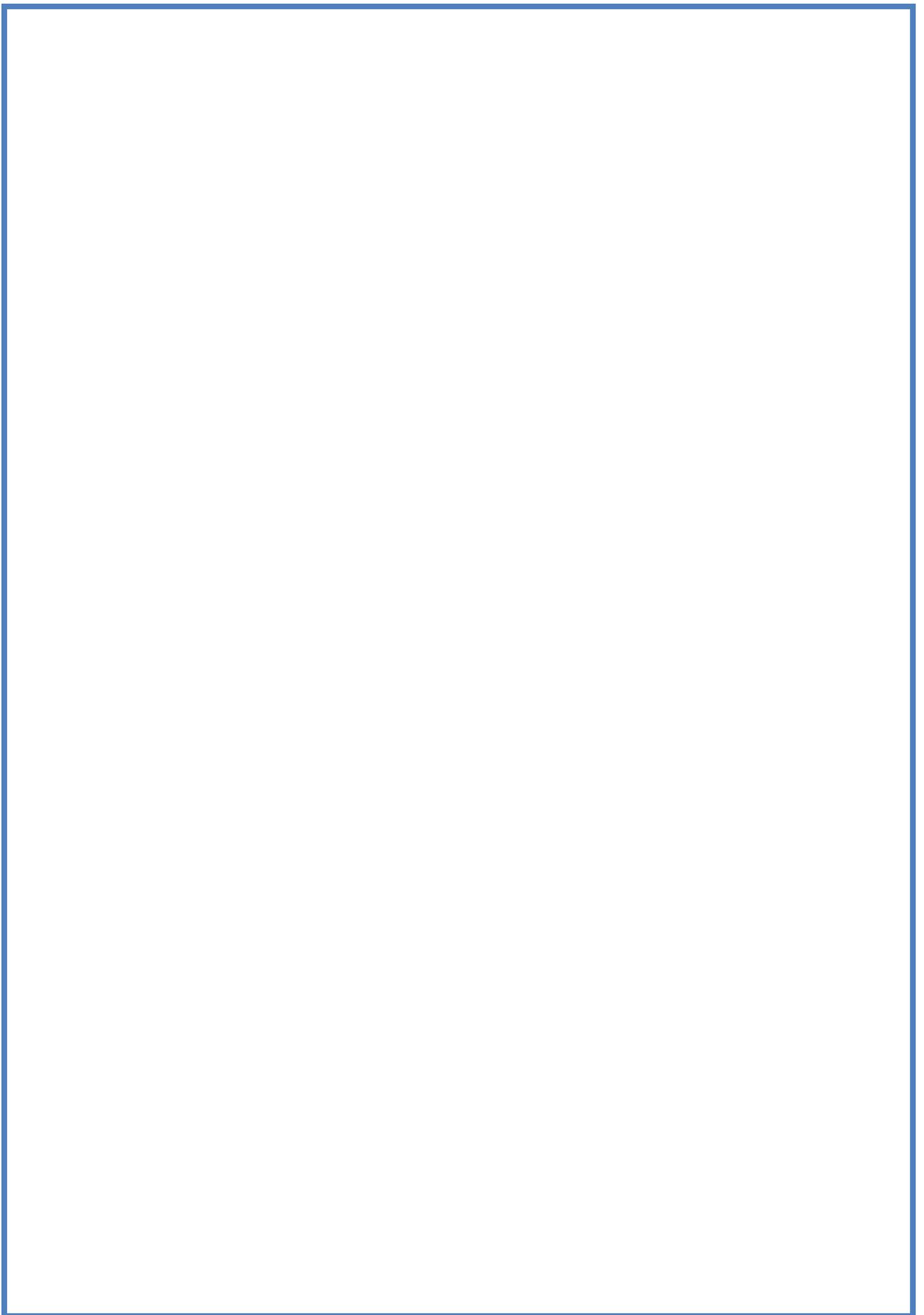
*Membres de jury :*

*M<sup>r</sup> ATMANI. Dj                      Promoteur                      professeur*

*M<sup>me</sup> BEDJOU. F                      Présidente                      professeur*

*M<sup>me</sup> KASMI. S                      Examinatrice                      MAA*

***Promotion : 2017-2018***



# Remerciements

*Nos vifs remerciements au dieu le tout puissant pour tout*

*Nous tenons d'abord à remercier notre promoteur Monsieur le professeur Atmani Djebbar, le doyen de la faculté SNV qui nous a permis de bénéficier de son encadrement, ses conseils, sa confiance.*

*Nos remerciements s'étendent également à M<sup>me</sup> Bazizi –Chaher Nassima et M<sup>me</sup> Atmani Dina pour leur précieux conseils au sein de laboratoire.*

*Nos voudrions aussi remercier les membres de jury qui ont bien voulu juger ce travail:*

*Madame le professeur Bedjou F, d'avoir accepté de présider ce travail*

*Madame Kasmi S, d'avoir accepté de juger et d'examiner ce travail.*

*Nos remerciements vont plus particulièrement à nos familles qui ont su nous soutenir tout au long de nos études.*

*Merci à tout le personnel du laboratoire, ainsi que toute personne de près ou de loin, qui ont contribué à la réalisation de ce travail.*



## *Dédicaces*

*A Dieu, le tout puissant pour tout*

*A mes chers parents MOHAMMED et MERBOUHA pour leur soutiens et sacrifices qui m'ont supportées et m'ont aidées dans les pires moments, je leur dédie avec fierté ce mémoire qui reflète le fruit de l'éducation et de l'attention qu'ils m'ont tant réservé.*

*A mes frères : FODIL, NACER, MESSOUD, SAID pour leur soutiens et encouragement.*

*A mes sœurs : HANANE ET ASSIA et ma nièce LYNDIA(DIDA).*

*A mes belles sœurs : SAMRA et AMEL.*

*A mon mari, ALLAOUA MAINE pour sa patience, son soutien, pour la motivation et le courage qui m'apportes chaque jour pour aller loin. J'ai la chance d'être bien entourée, c'est avec joie que je tacherai d'être à la hauteur de vos espérances, que dieu te garde pour moi, et à toute ma belles familles.*

*A ma très chère collègue et sœur NADIA qui ma accompagnée durant ce travail et tout notre cursus à l'université, et à tout sa famille.*

*A toute la promotion Biochimie Appliquée 2017-2018.*

*KHEYAR LYDIA*



# Dédicaces

*A Dieu, le tout puissant pour tout*

*A mon chère père, NACER pour tous ses efforts fournis pour me rapporte tout le confort que j'avais besoin pour l'avancement de mes études, ma formation et mon bien être ;*

*A ma chère mère, DJAMILA le symbole de tendresse, qui a consacré sa vie pour bâtir la mienne, pour ses précieux conseils, ses orientation, son dévouement pour assurer mon éducation ;*

*A mes chères adorables frères : ABDELOUAHABE et MOUNIR pour leurs encouragement ;*

*A mes deux grandes familles HAMANI et MAINE grand et petit ;*

*A mes oncles et leurs femmes, à mes tantes et leurs maries ;*

*A tous mes cousins et cousines petit et grand ;*

*A tous mes chères amis sans exception ;*

*A ma chère binôme, amie et avant tous sœur qui ma supporté et avec laquelle j'ai partagé le stress, l'inquiétude durant tout le cursus universitaire ainsi que les moments de ce travail :*

*KHEYAR LYDIA et tous sa famille ;*

*A son marie ALLAOUA MAINE mon adorable oncle pour son soutien, son encouragement durant mes études ;*

*A toute la promotion de biochimie appliquée 2017/2018 ;*

*A tous personnes qui m'a aidé de près ou de loin dans ce travail.*

**HAMANI NADIA**



## *Liste des abréviations*

**HMG-COA** : Hydroxy-méthyl-glutarylCo-enzymeA

**HMGR** : Hydroxyméthylglutaryl réductase

**NADPH** : Nicotinamide adénine di nucléotides

**Al Cl<sub>3</sub>** : Chlorure d'aluminium

**BSA** : Bovine sérum albumine

**Eq AG** : Equivalent acide gallique

**Eq Q** : Equivalent quercétine

**Eq AT** : Equivalent acide tannique

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Carbonate de sodium

**SDS** : Dodécyl sulfate de sodium

**TEA** : Triéthanolamine

**LDL** : Low density lipoprotein

**IC<sub>50</sub>** : Concentration causant une inhibition de 50% d'une activité

**SREBP** : Sterol regulatory element-binding proteins.

**ERO** : Espèce réactif d'oxygène.

## *Liste des figures*

<b>Figure 1</b> : Conversion de HMG-COA en mévalonate.....	2
<b>Figure 2</b> : Structure de HMG-COA réductase.....	3
<b>Figure 3</b> : Structure de lovastatine.....	3
<b>Figure 4</b> : Biosynthèse de cholestérol et inhibition de HMG-COA réductase.....	5
<b>Figure 5</b> : Photographie de la plante <i>Fraxinus angustifolia</i> .....	6
<b>Figure 6</b> : Photographie de la plante <i>Clématis flammula</i> .....	8
<b>Figure 7</b> : Structure de phloroglucinol.....	11
<b>Figure 8</b> : Structure de base des flavonoïdes. ....	11
<b>Figure 9</b> : Structure de base des tannins condensés.....	12
<b>Figure 10</b> : Structure de l'acide éllagique.....	12
<b>Figure 11</b> : Protocole de dosage des phénols totaux.....	14
<b>Figure 12</b> : Protocole de dosage des flavonoïdes par AlCl <sub>3</sub> .....	15
<b>Figure 13</b> : Protocole de dosage des tannins par la BSA. ....	16
<b>Figure 14</b> : Inhibition de l'activité HMG-COA réductase par l'extrait des feuilles de <i>F.angustifolia</i> à différentes concentrations.....	21
<b>Figure 15</b> : : Inhibition de l'activité HMG-COA réductase par l'extrait des feuilles de <i>C .flammula</i> à différentes concentrations.....	22



## *Liste des Tableaux*

<b>Tableau I</b> : Classification de <i>Fraxinus angustifolia</i> .....	7
<b>Tableau II</b> : Classification de <i>Clématis flammula</i> .....	8
<b>Tableau III</b> : Test d'inhibition des deux extraits à différentes concentration sur HMG-COA réductase.....	18
<b>Tableau IV</b> : Les teneurs en polyphenols des extraits des feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i> et <i>Clematis flammula</i> .....	19
<b>Tableau V</b> : Les valeurs d'IC <sub>50</sub> obtenus par <i>C. flammula</i> et <i>F. angustifolia</i> .....	23

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	

## Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

### Chapitre I : Synthèse bibliographiques

#### **I.1 HMG-COA**

I-1-1. Définition et localisation .....	2
I-1-2. Structure.....	2
I-1-3. Inhibiteurs et leurs effets secondaires.....	3
I-1-4. Biosynthèse du cholestérol et l'inhibition de la HMG-COA réductase.....	4

#### **I-2. *Fraxinus augustifolia***

I-2-1. Description botanique.....	6
I-2-2. Systématique.....	7
I-2-3. Vertus médicinales et intérêts pharmacologique.....	7

#### **I-3. *Clématis flammula***

I-3-1. Description botanique.....	8
I-3-2. Systématique.....	8
I-3-3. Vertus médicinales et intérêts pharmacologique.....	9

#### **I-4. Métabolites secondaire.**

I-4-1. Définition.....	10
I-4-2. Biosynthèse.....	10
I-4-3. Classification.....	10
I-4-3-1. Phénols simples.....	10
I-4-3-2. Flavonoïdes.....	11
I-4-3-3. Tannins.....	11
I-4-3-3-1. Tannins condensés.....	12
I-4-3-3-1. Tannins hydrolysables.....	12

## Chapitre II : Matériels et Méthodes

### II-1. Matériels

II-1-1. Matériel végétal.....	13
II-1-2. Matériels de laboratoire.....	13

### II-2. Méthodes

II-2-1. Dosages des poly phénols.....	13
II-2-2. Dosage des phénols totaux.....	13
II-2-2-1. Principe de la méthode.....	13
II-2-3. Dosage des flavonoïdes.....	15
II-2-3-1. Principe de la méthode.....	15
II-2-4. Dosage des tannins .....	15
II-2-4-1. Principe de la méthode.....	15
II-2-5. Activité inhibitrice de la HMG-COAR par extraits .....	16
II-2-5-1. Instructions de préparation.....	16
II-2-5-2. Test d'inhibition des extraits sur l'activité de la HMG-CoA réductase.....	17
II-2-5-3. Analyses statistiques.....	18

## Chapitre III : Résultats et discussion

### III-1. Teneur en métabolites secondaires

III-1-1. Teneurs en phénols totaux.....	19
III-1-2. Teneurs en flavonoïdes.....	19
III-1-3. Teneurs en tannins.....	20

### III-2. Evaluation de l'activité inhibitrice des deux extraits *F. angustifolia* et *C. flammula* sur la HMG-COA réductase.

III-2-1. Effet inhibiteur de <i>F. angustifolia</i> .....	21
III-2-2. Effet inhibiteur de <i>C. flammula</i> .....	22
III-2-3. Evaluation des valeurs d'IC <sub>50</sub> des deux extraits.....	23

### Conclusion et perspectives .....

### Références bibliographiques.....

### Annexes



## Introduction

---

Depuis longtemps, les plantes médicinales ont été et restent la source majeure de médicaments grâce à leur richesse en métabolites secondaires qui sont utilisées en médecine traditionnelle.

Plusieurs facteurs de risques connus tels que l'hypercholestérolémie et le stress oxydatif induit par le cholestérol qui améliore la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui conduisent à l'avancement des lésions athérosclérotiques dans les parois vasculaires.

L'hypercholestérolémie est un trouble métabolique qui se traduit par un taux de cholestérol sanguin élevé par rapport à la moyenne établie. Bien que son origine est essentiellement métabolique, elle peut être aussi héréditaire, causée par la présence d'un seul allèle muté dans le gène des récepteurs de LDL. La prise en charge de cette maladie commence par des mesures hygiéno-diététique, mais lorsque ces dernières ne sont plus contrôlables un médicament s'impose tels que les statines et les fibrates, qui sont malheureusement pas dépourvus d'effets secondaires (lésions musculaire, troubles hépatiques et digestifs...).

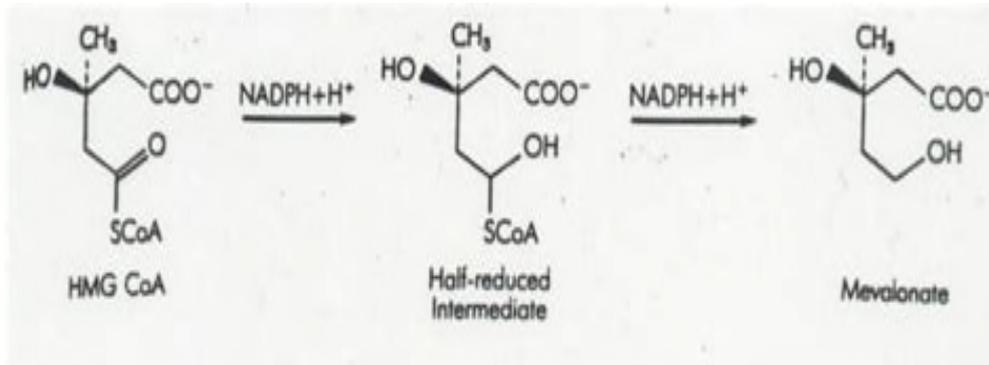
Dans le cadre de la valorisation de la médecine traditionnelle, il y a eu un énorme intérêt ces dernières années pour l'étude des plantes médicinales. Des progrès ont été réalisés pour améliorer l'efficacité du traitement en agissant sur HMG-CoA réductase, l'enzyme clé de la synthèse du cholestérol par conversion de HMG-CoA en mévalonate. Des études récentes ont abouti à des résultats très intéressants sur l'inhibition de la HMG-CoA réductase.

Ainsi, notre travail est consacré à l'évaluation de l'inhibition de HMG-CoA réductase par les extraits de *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula*, deux plantes médicinales à forte utilisation par la population locale, tout en déterminant la teneur en polyphénols, notamment les phénols totaux, les flavonoïdes et les tannins.

## I-1.HMG-CoA réductase

### I-1-1. Définition et localisation

L'hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase (E.C 1.1.1.34) est l'enzyme clé de la voie mévalonate qui synthétise le cholestérol .C'est une glycoprotéine transmembranaire de 97000 Daltons inclus dans le réticulum endoplasmique, elle est considéré comme étant l'étape enzymatique limitante dans la synthèse du cholestérol dans le foie et les autres isoprénoides. L'activité de HMGR est contrôlée par la synthèse, la dégradation et la phosphorylation pour maintenir la concentration des produits dérivés de mévalonate. L'enzyme humain a également été ciblé avec succès par des médicaments, connus sous le nom de statines, dans le traitement clinique de taux élevés de cholestérol sérique (**Koning, 1996 ; Istvan, 2000 ; Friesen, 2004**). L'HMG- CoA réductase catalyse la réaction montrée dans la figure 1:

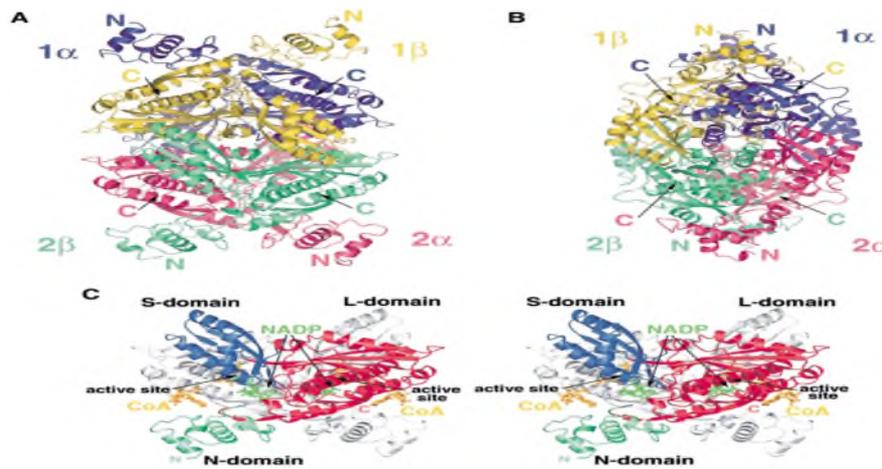


**Figure 1** : Conversion de HMG-CoA en mévalonate (**Holdgate, 2003**).

L'enzyme se trouve chez les eucaryotes et procaryotes, et l'analyse phylogénétique a révélé deux classes de HMG-CoA réductase, Les enzymes de classe I des eucaryotes et certains Archaea et les enzymes de classe II d'eubactéries et certains autres Archaea (**Friesen, 2004**).

### I-1-2. Structure

Les HMGRs de différents organismes sont des multimères d'une espèce spécifique et le nombre de monomères est identique. Le HMGR humain c'est un homotétramère (figure2) localisé sur le chromosome 5 (**Friesen, 2004**).



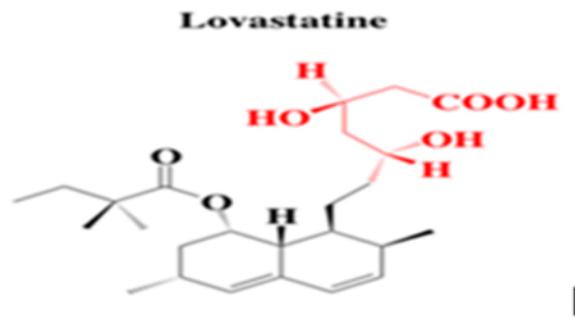
**Figure2 :** Structure de la HMG CoA réductase (Istvan, 2000).

Diagrammes de Ribbon de HMGR humain. (A et B) La structure de l'homotétramère HMGR. Le dimère 1 est constitué des monomères appelés '1α' (violet) et «1β» (jaune), tandis que le dimère 2 est constitué des monomères «2α» (rose) et «2β» (vert). (C) Diagramme stéréo de la structure du dimère HMGR. Pour la clarté, un seul monomère est coloré. Le N-terminall est en vert, le grand L-domaine est en rouge et le petit S-domaine est en bleu. L'extrémité N-terminale et l'extrémité C-terminale pour le monomère coloré sont indiquées. CoA (orange) et NADP (vert) sont étiquetés et les deux sites actifs sont marqués.

### I- 1-3. Inhibiteurs et leurs effets secondaires

Les statines, inhibiteur de HMG-CoA réductase, sont parmi les médicaments les plus prescrits dans le monde industrielle. Ils sont généralement utilisés en clinique depuis plus de 20ans, des myalgies légères peuvent survenir jusqu'à 10% des patients exposés aux statines, utilisés pour diminuer les niveaux de lipoprotéines athérogène chez les patients qui sont à risque élevé des maladies cardiovasculaires (Holdgate, 2003 ; Qiping, 2012).

Les statines comprennent rosuvastatine, pravastatine, simvastatine, et lovastatine dont la structure est décrite dans la figure 3 qui est la plus ancienne..., ces molécules sont efficaces dans la diminution du taux de cholestérol dans le sang, en particulier le taux de LDL-cholestérol (Reddy, 2014).



**Figure 3 :** Structure de lovastatine (Friesen; 2004).

Les statines ne sont pas dénuées d'effets secondaires, notamment au niveau musculaire. Les plus graves que sont les myosites (douleurs musculaire, fatigabilité à l'effort et diminution de la force) et les rhabdomyolyses (lésions musculaires sévères avec défaillance des organes cibles) aussi elle cause le problème diabétique et digestif (Qiping, 2012).

#### **I-1-4. Biosynthèse du cholestérol et l'inhibition de HMG CoA réductase**

Le cholestérol est une composante structurelle essentielle de membranes cellulaires et est converti en hormones stéroïdes et les acides biliaires, qui remplissent des rôles importants dans la médiation des signaux cellulaires. La synthèse du cholestérol peut être divisée en trois parties principales selon la figure 4.

**a.** Dans le compartiment cytoplasmique, la thiolase combine deux unités de CoA à l'acétoacétyl-CoA qui est en outre combiné par HMG-CoA synthase avec une troisième unité d'acétyl-CoA pour former HMG-CoA intermédiaire à six atomes de carbone (C<sub>6</sub>). HMG-CoA est transporté à la membrane RE où il est réduit en mévalonate par l'enzyme membranaire HMG-CoA réductase en utilisant NADPH comme réducteur (Kleeman, 2005).

**b.** Le mévalonate est ensuite décarboxylé pour former de l'isoprène, un intermédiaire clé C<sub>5</sub>, qui est également impliqué dans la synthèse de l'ubiquinone, de la vitamine K et des caroténoïdes. Six unités d'isoprène sont utilisées pour générer le composé C<sub>30</sub> squalène. Au cours de la synthèse du squalène, l'intermédiaire farnésyl-pyrophosphate (F-PP) et le produit secondaire géranylgeranyl-pyrophosphate (GG-PP) sont formés. GG-PP et F-PP sont requis pour la modification post-traductionnelle de protéines et servent d'attachements lipidiques.

c. Le squalène est réduit en présence d'oxygène moléculaire et de NADPH à hypoxyde de squalène et cyclisé pour former du lanostérol. Ce dernier est finalement réduit et diméthylé pour former le produit final cholestérol (Kleeman, 2005).

La HMG-CoA réductase et d'autres enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol sont régulées par les protéines liant à l'élément régulateur des stérols (SREBP). SREBPs aussi contrôle l'expression du récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDLR) et les gènes impliqués dans la synthèse des acides gras et l'inflammation. Les statines inhibent la HMG-CoA réductase qui donne naissance à l'isoprénylation post-traductionnelle et la signalisation des molécules, telles que Ras, Rho et Rac1, qui altérées et conduit à modulation des processus cellulaires et biologiques (Kleeman, 2005).

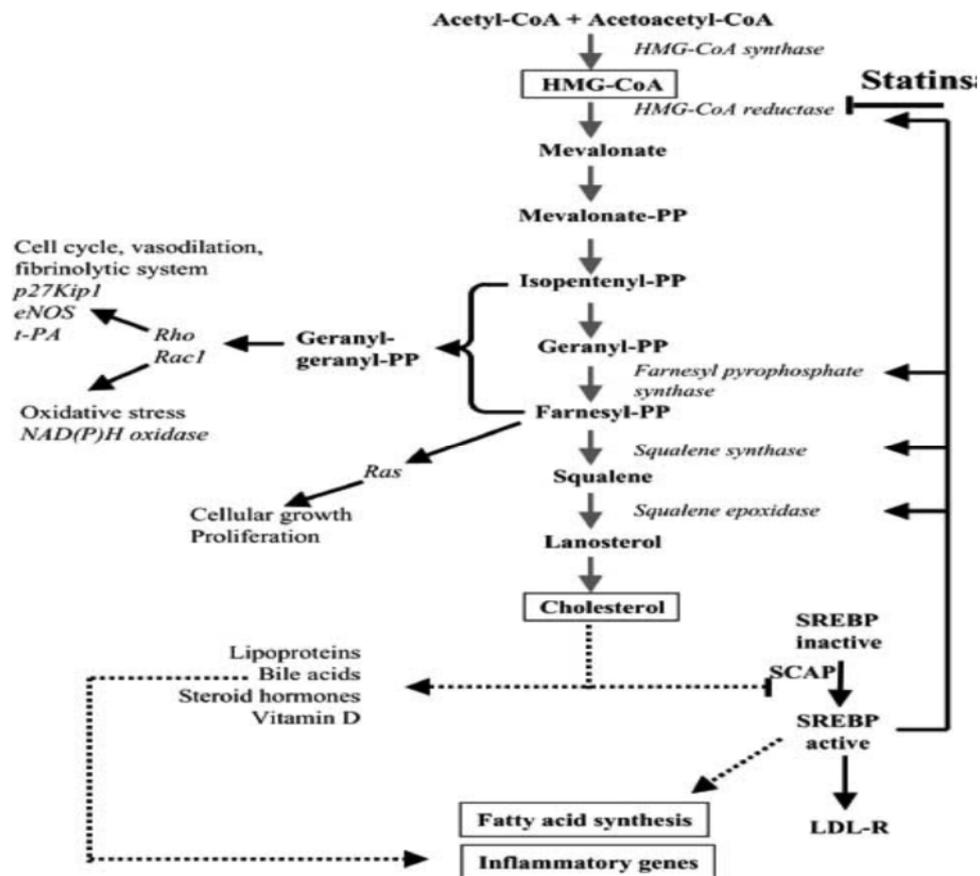


Figure 4 : Biosynthèse de cholestérol et inhibition de HMG CoA réductase (kleeman, 2005).

**I-2. *Fraxinus angustifolia***

**I-2-1. Description botanique**

*Fraxinus* vient du mot grec «fraxis» qui signifie la clôture. *Fraxinus angustifolia* connu sous le nom de frêne à feuilles étroites ou frêne oxyphylle est un arbre ou arbuste appartenant à la famille des Oleacees qui comporte plus de 65 espèces dans le monde en tiers. Elle peut atteindre de 15 à 35 m de hauteur et 1 ,5 m de diamètre, à rameaux verts, ponctués de blanc (Wallander, 2008). Une photo originale qui a été prise à l’université de Targua- Ouzemour illustrée dans la figure 5.



**Figure 5** : Photographie de la plante *Fraxinus angustifolia*.

L’écorce de *Fraxinus angustifolia* est de couleur grise en face externe, de couleur brune en face interne, ses feuilles peuvent être regroupées sous forme d une seule feuille et prennent une longueur de 15 à 25 cm. Les fruits typiques sont ovales, lancéolés, aigus au sommet, ayant l’aspect de langue de passereaux et les graines bien plus longues que l’aile ; sa fructification est en Avril-Juin (Beloued, 2001 ; Yildiz et al., 2009).

*Fraxinus angustifolia* est localisé dans les aires biogéographiques méditerranéens, dans le Sud-est de l Europe sur les côtes de France, d’Italie, de Grèce, l’ouest de la Russie et l’Asie, et ainsi que dans le nord Africain (l’Algérie et le Maroc, la Tunisie). Sa longévité est de 150 à 200 ans (Gerard, 2006 ; wallander, 2008).

**I- 2-2. Systématique**

*Fraxinus angustifolia* a été classée par Wallander (2008) dans le tableau I :

**Tableau I** : Classification de *Fraxinus angustifolia*.

Règne	Végétal
Embranchement	Spermatophytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Lamiales
Famille	Oleaceae
Genre	<i>Fraxinus</i>
Espèce	<i>Fraxinus angustifolia</i>

**I- 2-3. Vertus médicinales et intérêt pharmacologiques de *Fraxinus angustifolia*.**

Les espèces de *Fraxinus angustifolia* ont une importance commerciale, économique, et même médicinale. Le bois est employé pour la construction et constitue une source principale de carburant.

Le frêne est connu et utilisé en médecine populaire depuis les temps anciens. Il a été utilisé dans la médecine traditionnelle au Maroc en dermocosmétique et les problèmes du système nerveux et en Algérie comme anti- inflammatoire, antioxydant mais aussi diurétique, astringent et digestif (Djerroumi et al., 2004 ; Atmani et al., 2009).

Les infusions de feuilles de *Fraxinus angustifolia* ont présentés des activités biologiques intéressantes comme inhibiteurs d'acétylcholines estérase et antioxydant. Les feuilles, en décoction sont efficaces pour la régulation des selles, contre les parasites intestinaux et la diarrhée. L 'écorce est utilisé contre les calculs biliaires, les hémorragies passives, et particulièrement contre les fièvres intermittentes, rhumatismes et la goutte atonique (Djerroumi et al., 2004 ; Atmani et al., 2009) .

Toutes ces propriétés thérapeutiques sont fortement liées à sa composition photochimique. Récemment, la capacité antioxydant des extraits des feuilles de *Fraxinus angustifolia* a été mesurée et attribuée à une teneur élevée en composés poly phénoliques (Fakchich et Elachouri, 2014).

**I-3 .*Clematis flammula***

**I-3-1. Description botanique**

*Clematite* est une plante méditerranéenne à tige caduque, ligneuse et grimpantes qui peut atteindre 4 à 5 mètres de hauteur. Les feuilles pétiolées sont bipennées et ovale. Ses petite fleurs hermaphrodites de 4 à 5 sépales pétiolés, sont de couleur blanche à odeur suave, d’ où le nom Clématite odorante.

*Clematis flammula* est une liane qui se développe en s’accrochant par les pétioles de ses feuilles et s’enroulant autour d’un support. Sa floraison est en période d’été (Juin à aout) (**Rameau et al. 2008**).Une photo original qu’on a pris à l’université de Targua - Ouzemour apparait dans la figure 6.



**Figure 6 :** Photographie de la plante *Clematis flammula*.

C’est une espèce méditerranéenne, on la trouve en Italie, Espagne et beaucoup plus dans la région Kabyle en Algérie (**Atmani et al., 2011**).

**I-3-2. Systématique**

La classification de *Clematis flammula* est établie par Quézel et Santa (1962) dans le tableau I

**Tableau II :** Classification de *Clematis flammula*.

Embranchement	Magnoliophyta
Classe	<b>Dicotylédones</b>
Ordre	<b>Magnoliopsida</b>
Famille	<b>Renonculacées</b>
Genre	<b>Clematis</b>
Espèce	<i>Clematis flammula</i>

**I- 3-3. Vertus médicinales et intérêt pharmacologiques de *Clematis******flammula.***

Dans le passé, les feuilles de *Clematis flammula* ont été entièrement utilisées en tant que révulsives d'insectes contre la détérioration du blé stocké. Aussi, des extraits obtenus à partir des parties aériennes sèches d'espèces de *Clematis* ont été traditionnellement employés pour le traitement de beaucoup de maux tels que l'arthrite, les brûlures superficielles, la malaria, la goutte et le rhumatisme et comme analgésique, anti – inflammatoire, anti- bactérienne...etc (Atmani et al., 2011 ; Chawla et al., 2012 ).

## **I- 4. Métabolites secondaires**

### **I-4-1. Définition**

Les composés phénoliques ou poly phénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction : éther, ester et hétéroside. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (**Bruneton, 2009**).

### **I- 4-2. Biosynthèse**

Les composés phénoliques sont issus de deux grandes voies : la voie la plus courante est celle de shikimate, conduit des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acides benzoïque, lignines, coumarines. L'autre voie commence de l'acétate et conduit à des poly b-cétoesters de longueur variable (poly acétate) qui engendrent, par cyclisation des composés souvent polycycliques : quinones,...etc (**Bruneton, 1999**).

### **I-4-3. Classification**

La classification s'effectue d'abord selon, la complexité du squelette de base(allant d'un simple C<sub>6</sub> à des forme très polymérisées), ensuite selon le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, de l'hydroxylation, de méthylation...etc .), donnant naissance ainsi à plusieurs classes présentées par phénols simples, flavonoïdes, tannins ( **Ribereau-Gayon, 1968 ; Sarni-Manchado et Chaynier, 2006** ).

#### **I-4-3-1. Les phénols simples**

Les phénols simples, tel que le catéchol, phloroglucinol (Figure 7) sont reconnus par des formes les plus simple qui présentent des structures chimiques ; ils sont divisés en acides benzoïques à sept atomes de carbone (C<sub>6</sub> –C<sub>1</sub>), en acides cinnamique à neuf atomes de carbone (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) et enfin en coumarines qui possèdent un hétérocycle oxygéné à six atomes, accolés à un noyau benzoïque et qui dérivent des acides cinnamiques par cyclisation de leur chaîne latérale (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

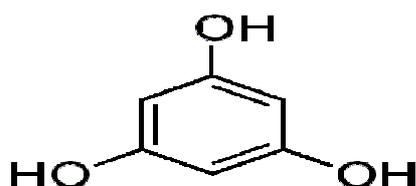


Figure 7 : Structure de phloroglucinol (Bruneton, 1999).

### I-4- 3-2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des dérivés phényl propanoïdes soluble dans l'eau, souvent incolores ou jaunes (à l'exception des anthocyanes). Ces composés sont des dérivés de naringénine-chalcone, elle-même, issue de la condensation de trois résidus malonyl-COA avec une molécule d'acide cinnamique. La structure de base (Figure 8) comporte deux cycle aromatiques à 6 carbones joints par un hétérocycle à oxygène (Vercauteren et al., 2006 ; Yilmaz, 2006).

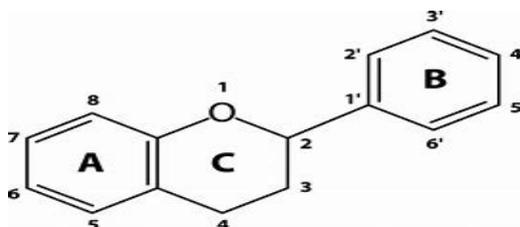


Figure 8 : Structure de base des flavonoïdes avec la numérotation classique (Vercauteren et al., 2006).

Les flavonoïdes constituent, eux même, une famille de composés extrêmement vaste, jouant des rôle physiologiques importants La variété des composés est essentiellement liée au degré d'hydroxylation, méthylation et glycosylation, de chacun des trois cycles des molécules de base.

Les principales catégories de flavonoïdes sont caractérisés par :

- La présence ou l'absence d'une double liaison entre les carbones 2 et 3 du cycle C, qui déterminent la planéité de la molécule. En effet, les flavones, les flavonols et dérivés présentent une double liaison et sont des molécules planes, contrairement aux flavanes, flavanones et dérivés.
- La présence d'une fonction cétones, alcools et méthoxy (Bruneton, 1999 ; Manach et al., 2004).

### I-4-3-3. Les tannins

Les tannins sont des composés phénoliques ayant des poids moléculaires compris entre 500 et 3000 Daltons. Deux groupes de tannins se diffèrent aussi bien par leur structure que

par leur origine biosynthétique : tannins hydrolysable et tannins condensés (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Bruneton, 1999).

**I-4-3-3-1. Tannins condensés (proanthocyanidines)**

Les tannins condensés sont des structure plus complexes, on les appelle également proanthocyanidines, largement présents dans la règne végétal, et que l’on rencontre dans de nombreux produits alimentaires (fruits, légumes, boissons...). Ils ne renferment pas de sucres dans leurs molécules, ils sont hydrolysés en présence d’acide forts ou d’agents d’oxydation, ils se transforment en substance rouges qui sont des polymères de flavan-3-ol (catéchine) et de flavan 3,4-diols (leuco anthocyanidine), ou un mélange des deux ( Luthar, 1992 ; Okamura et al., 1993).

Les chaines de polymères comptent de 2 à 20 unités environ, et il existe de nombreuses hydroxylations possibles en différents endroits de chaque monomère comme elle montre la (Figure 9). Cette diversité structurale explique les variations d’activité biologique.

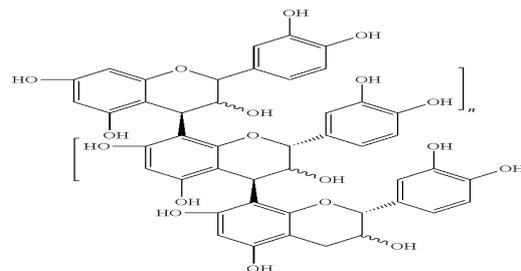


Figure 9 : Structure de base des tannins condensés (Li et al., 2004).

**I-4-3-3-2. Tannins hydrolysables**

Les tannins hydrolysables ou appelés tannins pyrogalliques, sont des polyesters de glucides et d’acide- phénols .Ils sont facilement scindés par les acides ou les enzymes en ose et en acide- phénol. Selon la nature de ces tannins, on distingue : les tannins galliques dans le cas de l’acide gallique et les tannins éllagiques dans le cas de l’acide éllagique(Figure 10)(Lauthar, 1992 ; Bruneton, 1999).

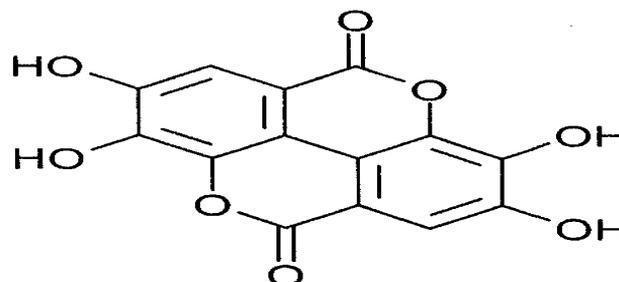


Figure 10 : Structure de l’acide éllagique (Okuda et al., 1995).

## II-1. Matériels

### II-1-1. Matériels végétale

La récolte des plantes étudiées a été effectuée en fin mai pour *Clematis flammula* dans la région AZRU N'BECHAR de la commune d'Amizour de Bejaia, et au mois d'octobre pour *Fraxinus angustifolia*. L'extraction des feuilles des deux plantes est réalisée dans l'éthanol à 90%.

### II-1-2. Matériel de laboratoire

- ✓ Spectrophotomètre.
- ✓ Vortex.
- ✓ Balance de précision.
- ✓ Epprouvettes, tubes, bécher, micropipettes ...
- ✓ Agitateur magnétique.
- ✓ Microplaque.

## II-2. Méthodes

### II-2-1. Dosage des polyphénols

La détermination des taux en phénols totaux, et en tannins et en flavonoïdes a été réalisée sur les 2 extraits des feuilles de *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula*.

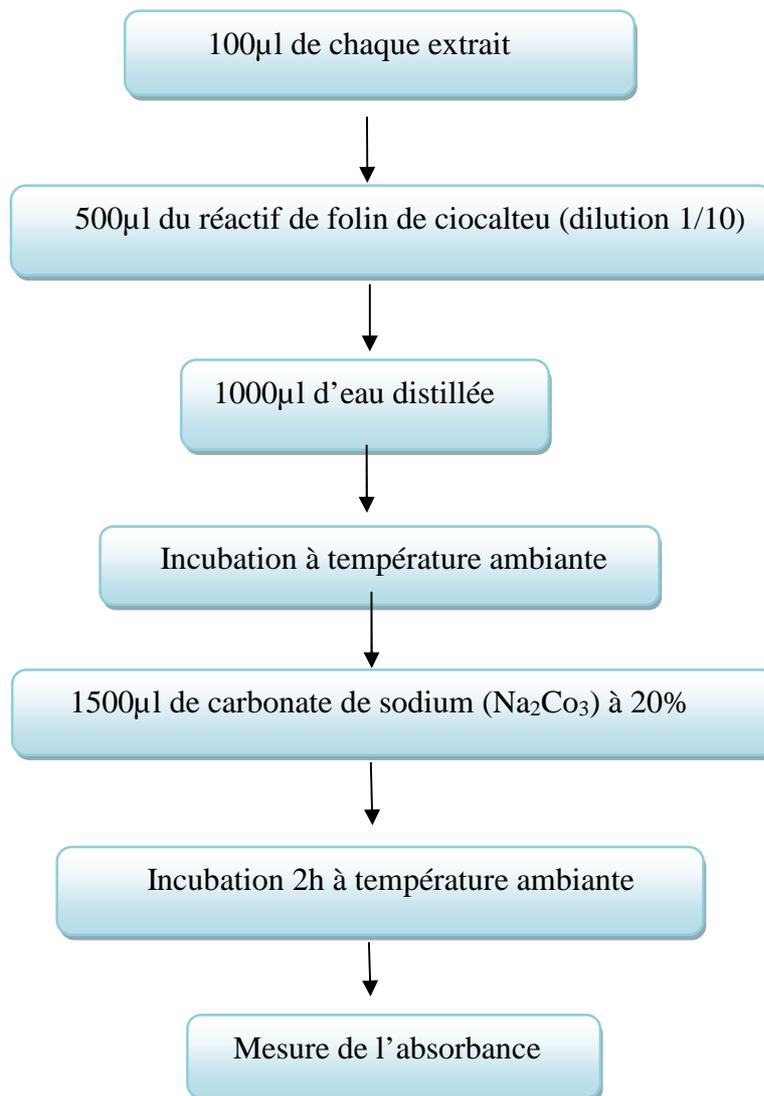
### II-2-2. Dosage des phénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode de **Djeridane et al (2006)**, inspirée de la méthode utilisant le réactif de folin-coicalteu qui a été décrit en 1965 par Singleton et Rossi. Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origine plus diverses.

#### II-2-2-1. Principe de la méthode

Le réactif de folin coicalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximale est à 750nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

Le protocole de djeridane et al suivi et résumé dans la figure 11.



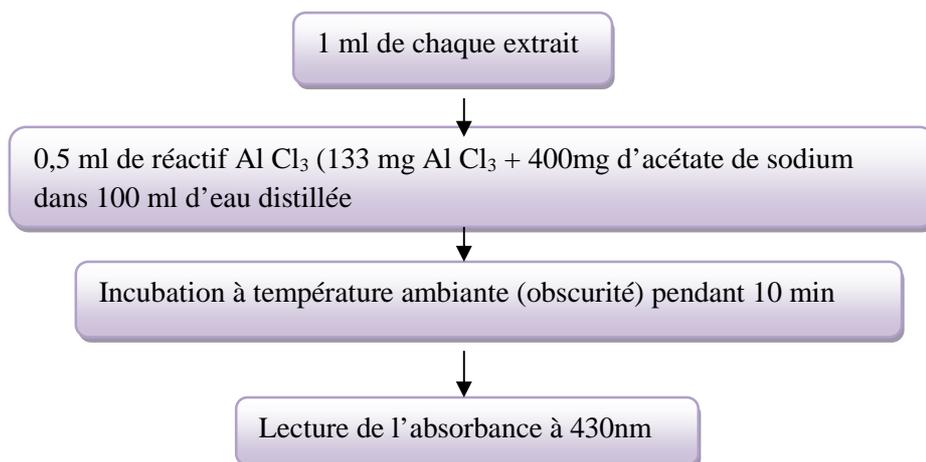
**Figure 11** : Protocole de dosage des phénols totaux (Djeridane et al., 2006).

La quantification des polyphénols a été faite en fonction de courbe d'étalonnage linéaire ( $Y=ax+b$ ) réalisée en utilisant une molécule de référence l'acide gallique dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats ont été exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg Eq Ag/g d'extrait). Toutes les mesures ont été répétées 3 fois.

### II-2-3. Dosage des flavonoïdes

#### II-2-3-1. Principe de la méthode

La méthode de trichlorure d'aluminium ( $\text{Al Cl}_3$ ) (Maksimovic et al., 2005) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits. Cette méthode est basée sur la formation de complexes jaunâtres par chélation de métaux (Fe et Al) par les différents extraits. Le protocole suivi avec une petite modification résume dans la figure 12.



**Figure 12** : Protocole de dosage des flavonoïdes par  $\text{Al Cl}_3$  (Maksimovic et al., 2005).

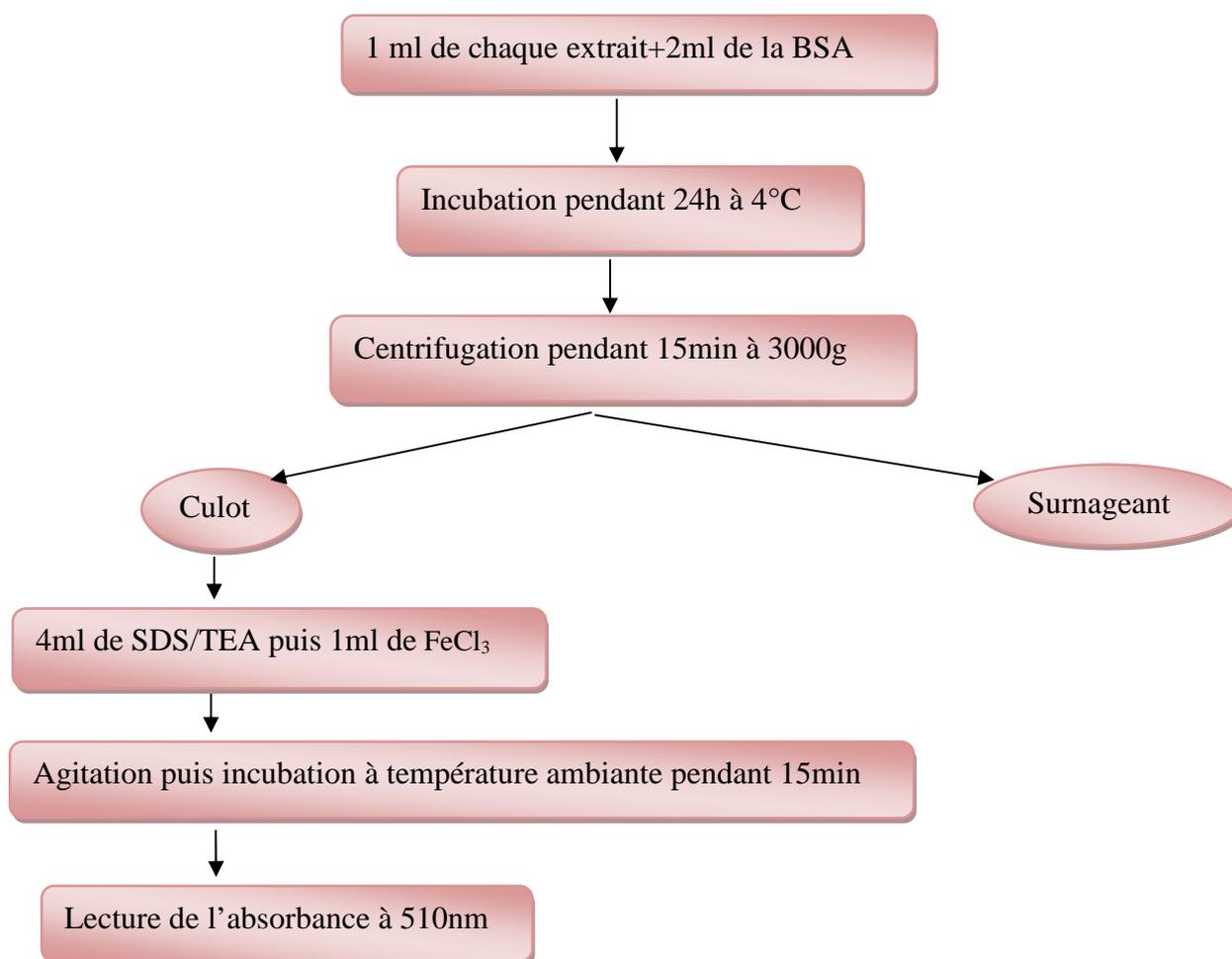
Les concentrations, exprimées en milligramme équivalent quercétine par gramme d'extrait, sont calculées à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine. Toutes les mesures sont répétées 3fois.

### II-2-4. Dosage des tannins

L'estimation de la teneur en tannins contenus dans les extraits à été réalisée par la méthode de Hagerman et Butler (1978).

#### II-2-4-1. Principe de la méthode

Les tannins sont connus par leur propriété principale, qui est la précipitation des protéines en fonction des facteurs liées au milieu réactionnel (pH, température et temps). L'utilisation de la BSA dans le dosage des tannins au milieu acide a pour but de séparer ces derniers des autres polyphénols présents dans l'extrait. Le chlorure ferrique ( $\text{Fe Cl}_3$ ) réagit avec les tannins (en milieu alcalin :SDS/TEA pour former des chélates de couleur violette. Le protocole suivi montré dans la figure 13.



**Figure 13** : Protocole de dosage des tannins par la BSA (Hagerman et Butler, 1978).

La concentration en tannins a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage préparé avec l'acide tannique. Les concentrations sont exprimées en milligramme équivalent l'acide tannique par gramme d'extrait (mg Eq AT/g d'extrait). Toutes les mesures ont été répétées 3 fois.

### II-2-5. Activité inhibitrice de HMG-CoA réductase

Le kit de dosage HMG-CoA réductase utilisé a été acheté chez Sigma Aldrich et comporte la solution tampon (10ml) et le substrat HMG-CoA (2ml), NADPH (25mg), solution inhibitrice (Pravastatine) (200µl) et HMG-CoA réductase (200µl).

#### II-2-5-1. Instruction de préparation

Le kit est expédié sur glace carbonique et stocker à -70°C, avant la première utilisation conserver les composants dans une aliquote de travail. L'enzyme ne doit pas rester plus de 60 min sur la glace afin d'éviter une réduction de l'activité enzymatique.

Le tampon 5x est dilué avec l'eau distillée, puis conserver le tampon concentré sur glace ou dans des aliquotes de travail à -20°C pour une utilisation ultérieure. Reconstituer le NADPH avec 1,5ml de tampon d'essai, et le stocker dans les aliquotes de travail.

### II-2-5-2. Test d'inhibition des extraits sur l'activité de HMG-CoA réductase.

L'effet des extraits des deux plantes sur l'activité HMG-CoA réductase a été étudié spectrophotométriquement à 340nm. La procédure de test d'inhibition réalisé sur une microplaque est résume dans le tableau III.

**Tableau III** : Test d'inhibition des différentes concentrations des extraits sur l'activité de HMG-CoA réductase.

Echantillons	Solution tampon	Extrait	Pravastatine	NADPH	HMG-CoA	HMG-CoA réductase
Blanc	184µl	–	–	4µl	12µl	–
Activité	182µl	–	–	4µl	12µl	2µl
Inhibition	181µl	–	1µl	4µl	12µl	2µl
	181µl	1µl (Fr 50)	–	4µl	12µl	2µl
	181µl	1µl (Fr 100)	–	4µl	12µl	2µl
	181µl	1µl (Cl 50)	–	4µl	12µl	2µl
	181µl	1µl (Cl 100)	–	4µl	12µl	2µl

L'enzyme et le substrat sont moins stables lorsqu'ils sont ajoutés au tampon d'essai. Il est donc très important d'ajouter les différents composants selon l'ordre indiqué dans la procédure de kit acheté afin d'obtenir le meilleur résultat.

Avant de commencer on règle le spectrophotomètre à 37°C et 340nm avec un programme cinétique en raison de la diminution de la concentration de la NADPH (pour une microplaque on lire l'absorbance chaque 20 secondes pendant 10min).

L'activité inhibitrice de la HMG-CoA réductase est exprimée en pourcentage, calculée comme suit :

$$\%D'inhibition = [(AE-AI)/AE]*100$$

- ❖ AE : activité de l'enzyme.
- ❖ AI : activité inhibitrice.

### **II-2-5-3. Analyse statistique**

Les résultats ont été exprimés en moyenne± SD. La comparaison statistique de ces résultats a été effectuée en utilisant le Graph Pad Prism 7 software. Les résultats ont été analysés par le test d'ANOVA suivi du test Tukey pour la comparaison des résultats en présence des extraits avec le contrôle (Pravastatine), et la comparaison des extraits entre eux.

### III-1. Teneur en métabolites secondaires

#### III-1-1. Teneurs en phénols totaux

Les résultats de dosage des phénols totaux des extraits des feuilles de *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula* sont illustrées dans le tableau IV qui sont exprimés en mg EAG /g d'extrait.

D'après les résultats obtenus et selon l'analyse statistique aucune différence significative n'a été enregistrée entre les extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula* ( $120,64 \pm 3,64$  ;  $113,65 \pm 8,00$  mg EAG/g d'extrait, respectivement). On constate que les feuilles de ces deux plantes médicinales constituent une source prometteuse en phénols totaux.

En comparaison avec les résultats obtenus par Berboucha et *al.* (2009) pour le dosage des phénols totaux des feuilles de *Fraxinus angustifolia* dont le taux trouvés est  $96,11 \pm 4,30$  mg EAG/g d'extrait, on constate une légère différence avec nos résultats obtenus de la même espèce ( $120,64 \pm 3,65$ ).

Et concernant les feuilles de *Clematis flammula* en comparant nos résultats obtenus ( $113,65 \pm 8,00$ ) à celles établie par Atmani et *al.* (2009) dont la teneur est de  $19,65 \pm 3,61$  où on remarque une différence très importante. Ces différences peuvent être expliquées par l'influence des facteurs climatiques (saison et la maturation...etc).

#### III-1-2. Teneurs en flavonoïdes

Les résultats de dosage des flavonoïdes des extraits des feuilles de *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula* sont illustrés dans le tableau IV qui sont exprimées en mg EQ/g d'extrait.

Les extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula* sont pauvre en flavonoïdes avec des teneurs de  $16,67 \pm 0,43$  ;  $15,40 \pm 0,14$  mg EQ/g d'extrait, respectivement et ça ne montre aucune différence significative entre eux. Concernant fraxinus, nous remarquons que le taux révélé par cette étude est un peu proche au taux trouvés par **Berboucha et al.** (2009) ( $20,78 \pm 1,15$ ). Par contre, *Clematis* a donnée une teneur supérieur à celle trouvés par **Atmani et al.** (2009) ( $5,15 \pm 0,10$ ). Ceci nous amène à supposer que les contraintes saisonnières jouent un rôle prépondérant dans la composition du *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia* en flavonoïdes.

**III-1-3. Teneurs en tannins**

Les résultats de dosage des tannins des extraits des feuilles de *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia* sont illustrés dans le tableau IV, exprimés en mg EAT/g d'extrait.

La variation de la teneur en tannins entre les deux extraits est non significative : elle est de 208,87±48,41 mg EAT/g d'extrait pour *Fraxinus* et 266,06±92,60 mg EAT/g d'extrait pour *Clematis*. Des résultats inférieurs ont été enregistrés par Berboucha et al. Et Atmani et al. (2009) qui sont de 160,67±4,83 et 86,33±10,82 mg EAT/g d'extrait respectivement. Il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie, le rendement n'est que relatif et dépend aussi de la méthode et les conditions dont lesquelles l'extraction a été effectuée.

**Tableau IV** : Teneurs en polyphénols des extraits des feuilles de *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula*.

Polyphénols	<i>Fraxinus angustifolia</i>	<i>Clematis flammula</i>
Phénols totaux	120,64± 3,64	113,65± 8,00
Flavonoïdes	16,67±0,43	15,40± 0,14
Tannins	208,87±48,41	266,06 ±92,60

III-2. Evaluation de l'activité inhibitrice des deux extraits de *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula* sur la HMG-CoA réductase

III-2-1. Effet inhibiteur de *F. angustifolia*

La figure 14 représente les résultats d'inhibition de la HMG-CoA réductase par des feuilles de *Fraxinus angustifolia* aux différentes concentrations (50, 100, 200µg/ml), comparé au contrôle (Pravastatine).

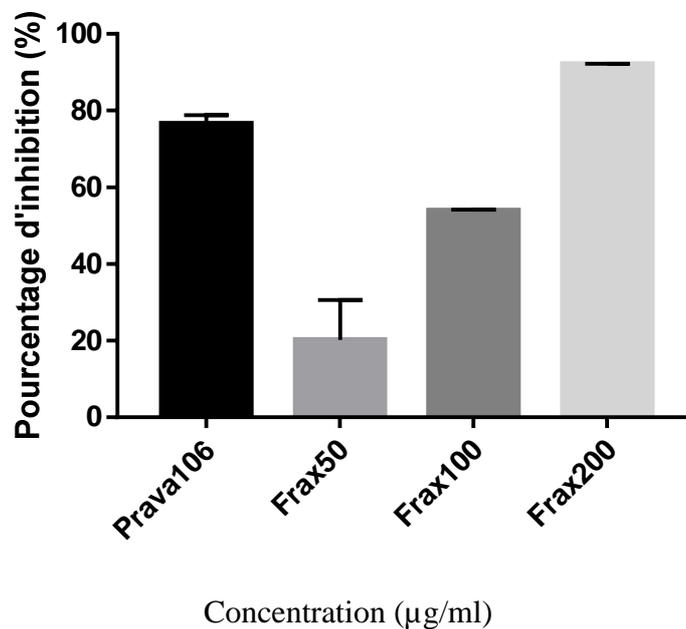


Figure 14 : Inhibition de l'activité HMG-CoA réductase par l'extrait de feuilles de *Fraxins angustifolia* à différentes concentrations. Les barres verticales représentent les Ecart-type.

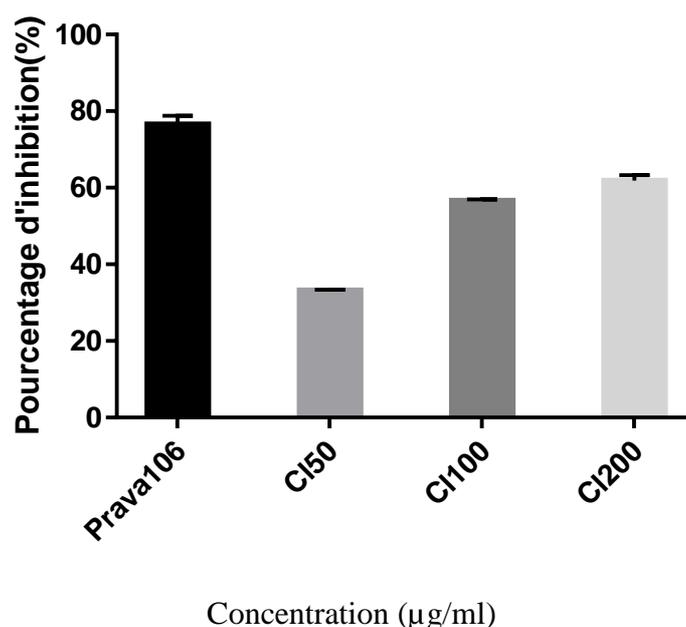
D'après ces résultats, l'extrait de plante a montré une activité anti-HMGR supérieure à 50% pour les concentrations 100 et 200µg/ml et inférieure pour 50µg/ml. L'extrait à une concentration de 200µg/ml semble avoir l'effet inhibiteur le plus élevé (92,15±0,02%), cette activité est significativement ( $P < 0,05$ ) plus élevée que celle de pravastatine (76,55±2,22%).

Un effet anti-HMGR inférieure a été obtenue avec la concentration 100µg/ml (53,98±0,19) qui est, tout de même significativement ( $p < 0,05$ ) supérieure à celui de 50µg/ml (20,19±10,45) qui représente l'effet le moins actif.

En comparaison avec une étude réalisée en 2015 par Gunasekaran et ses collaborateurs sur l'activité inhibitrice de *Basella alba* et 25 autres plantes médicinales sur la HMG-CoA réductase, l'extrait de *Basella alba* qui a le même effet thérapeutique que *Fraxinus angustifolia* a montré un pourcentage d'inhibition de  $74,1 \pm 2,3\%$  nettement inférieur à celui de notre étude à  $200 \mu\text{g/ml}$  ( $92,15 \pm 0,02\%$ ), une différence peut être due aux conditions de travail et aux facteurs climatiques.

### III-2-2. Effet inhibiteur de *Clematis flammula*

Les résultats d'inhibition de la HMG-CoA réductase par des feuilles de *Clematis flammula* aux différentes concentrations (50, 100,  $200 \mu\text{g/ml}$ ) et avec le contrôle (Pravastatin) ont été présentées dans la figure 15.



**Figure 15 :** Inhibition de l'activité HMG-CoA réductase par l'extrait de feuilles de *Clematis flammula* à différentes concentrations. Les barres verticales représentent les Ecart-type.

D'après les résultats, toutes les concentrations utilisées à l'exception de celle de  $50 \mu\text{g/ml}$  ont montré une activité anti-HMGR supérieur à 50%. L'effet inhibiteur le plus élevé est obtenu par la concentration de  $200 \mu\text{g/ml}$  avec un pourcentage d'inhibition de  $61,86674 \pm 1,447$ , inférieur à celui de contrôle la pravastatine ( $76,55 \pm 2,22\%$ ). Un effet anti-HMGR moins important a été obtenu avec la concentration  $50 \mu\text{g/ml}$  ( $33,22086 \pm 0,159851$ ).

En comparant toujours avec les résultats obtenus par Gunasekaran et *al.* (2015) qui a étudié l'effet inhibiteur de plusieurs espèces sur la HMG-CoA réductase tel qu'*Ocimum bacilicum* qui a le même effet thérapeutique que *Clematis flammula* où ils ont trouvés pour cette plante un pourcentage de  $32,9 \pm 3,6\%$  inférieur aux résultats enregistré dans la présente étude. Le contrôle utilisé dans leur étude la simvastatine qui est de même famille que la pravastatine a donné un pourcentage d'inhibition de  $89,2 \pm 3,5\%$  supérieur à celui de pravastatine avec un pourcentage de  $76,55 \pm 2,22\%$ . Ces différences peuvent être expliquées toujours par les conditions de manipulation où les facteurs climatiques où peut être par la richesse des extraits de nos plants en substances responsables à cet effet inhibiteur.

### III-2-3.Evaluation des valeurs de l'IC<sub>50</sub> des deux extraits

Les valeurs de l'IC<sub>50</sub> des deux extraits sont établies dans le tableau IV.

**Tableau V** : Les valeurs IC<sub>50</sub> obtenus par *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula*

Extraits	<i>F. angustifolia</i>	<i>C. flammula</i>
IC <sub>50</sub> µg/ml	78,491	69,157

D'après le tableau V qui montre que les deux extraits possèdent une bonne activité inhibitrice sur l'enzyme étudié, nous remarquons que l'extrait de *Clematis flammula* présente une IC<sub>50</sub> ( $69,157 \mu\text{g/ml}$ ) supérieur à celle de *Fraxinus angustifolia* ( $78,491 \mu\text{g/ml}$ ). Donc nos résultats montrent clairement que, l'extrait de *Clematis* possède une bonne activité inhibitrice sur la HMG-COA réductase par rapport à celui de *Fraxinus angustifolia*. En comparant nos résultats avec l'IC<sub>50</sub> de pravastatine trouvée dans l'étude de Danish et *al.* (2014) qui est de  $70,25 \mu\text{g/ml}$ , on peut dire que nos extraits reste un bon choix plus particulièrement *Clematis flammula* pour inhiber la HMG-CoA réductase et de les utilisées autant que des inhibiteurs naturels au lieu des inhibiteurs synthétiques, les statines.

## Conclusion et perspectives

---

Les plantes médicinales ont été utilisées pendant longtemps par les populations pour le traitement des maladies. Jusqu'à ce jour, moins de 10% des espèces végétales qui occupent la planète ont été explorées pour leurs propriétés chimiques et biologiques. La validation scientifique pour cette utilisation a concerné deux plantes *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula*.

Notre étude a été focalisée sur l'activité inhibitrice des extraits de ces deux plantes sur la HMG-CoA réductase. En premier lieu, nous avons identifié les taux en métabolites secondaires notamment les phénols totaux, flavonoïdes et tannins totaux des feuilles de ces deux plantes. D'après nos résultats obtenus, les deux extraits de plantes étudiées se caractérisent par leur richesse en phénols totaux et tannins, et leur pauvreté en flavonoïdes.

En effet, les feuilles de *Fraxinus angustifolia* montre un taux élevé en tannins ( $208,87 \pm 48,41$  mg EAT/g d'extrait) et en phénols totaux ( $120,64 \pm 3,65$   $\mu$ g EAG/g d'extrait), et un taux faible en flavonoïdes ( $16,67 \pm 0,43$   $\mu$ g EQ/g d'extrait). De même, pour les feuilles de *Clematis flammula* se sont les tannins et les phénols totaux qui ont enregistré les meilleures teneurs ( $266,66 \pm 92,60$  mg EAT/g d'extrait) et ( $113,65 \pm 8,00$   $\mu$ g EAG/g d'extrait) respectivement, et un taux faible en flavonoïdes ( $15,40 \pm 0,14$   $\mu$ g EQ/g d'extrait).

D'après les résultats de test d'inhibition des deux plantes sur la HMG-CoA réductase montrent que :

- Les extraits de *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula* possèdent un pouvoir inhibiteur élevé sur l'enzyme, dont le pourcentage d'inhibition calculé est proportionnel avec les concentrations utilisées où la concentration à 200mg/ml a donnée le meilleur pourcentage d'inhibition  $92,159 \pm 0,02$  pour *fraxinus angustifolia* et  $61,86 \pm 1,44$  pour *Clematis flammula*.
- L'extrait de *Clematis flammula* possède une  $IC_{50}$  ( $69,157$   $\mu$ g/ml) supérieur à celle de *Fraxinus angustifolia* ( $IC_{50} = 78,491$   $\mu$ g/ml), et cela indique que l'extrait de *Clematis flammula* a l'effet inhibiteur le plus important.

Dans l'ensemble, on peut dire que l'effet inhibiteur des deux extraits peut être dû à sa richesse en composés phénoliques notamment les tannins et les phénols totaux.

## Conclusion et perspectives

---

L'ensemble des résultats obtenus au fil de cette étude n'est qu'une étape préliminaire, Alors il est souhaitable d'accomplir et d'enrichir ce travail par :

- ❖ L'évaluation de l'activité inhibitrice sur la HMG-CoA réductase *in vivo* des deux extraits sur des animaux représentant des pathologies telles que l'athérosclérose.
- ❖ Faire un fractionnement de ces extraits et d'identifier les molécules responsables de l'effet inhibiteur de la HMG-CoA réductase.

## Références bibliographiques

---

### -A-

**Atmani D., Chaher N., Berboucha M., Ayouni K., Lounis H., Boudaoud H., Debbache N., Atmani D. (2009).** Antioxydant capacity and phénols contents of selected algerian medicinal plants. *Food chemistry*. **112** : 303-309.

**Atmani D., Ruiz-Larrea M. B., Ruiz-Sanz J.I., Leandro J.L., Lizcano L. J., Bakkali F., Atmani D. (2011).** Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *clematis flammula* leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*. **5(4)** : 589-5.

### - B-

**Beloued A. (2001).** *Plantes médicinales d'Algérie*. 5ème Edition. Algérie: Office des publications Universitaires .284p.

**Berboucha M., Ayouni K., Atmani D., Atmani D., Benboubetra M. (2009).** Kinetic study on the inhibition of xanthine oxidase by extracts from two selected Algerian plants traditionally used for the treatment of inflammatory diseases. *Journal of medicinal food*. **13** (4): 1-9

**Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie Phytochimie. *Plantes médicinales*. Technique et documentation. 1120p.

**Bruneton J. (2009).** *Pharmacognosie Phytochimie, Plantes médicinales*. 4<sup>ème</sup> édition. Ed Lavoisier. 25p.

### -C-

**Chawla R., Kumar S. et Sharma A. (2012).** The genus *clematis* (ranunculaceae); chemical and pharmacological perspectives. *Journal of ethnopharmacology*, **143** :116-150 .

### - D –

**Danish I., Salman Kh., Amir Kh., Mohd S., Saheem A., Ashwani S., and Paramdeep B. (2014).** *Biomedicin research international*. **2014**: 1-10

## **Références bibliographiques**

---

**Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., & Vidal N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal: plants extracts containing phenolic compound. *Food Chemistry*. **97**(4): 654–660.

**Djerroumi A., Nacef M. (2004).** *100 Plantes Médicinales d'Algérie*. Palais de livre. 45–110p.

### **-F-**

**Fakchich J., Elachouri M. (2014).** Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. *Journal of Ethnopharmacology*. **154** : 76-87.

**Friesen J. and Rodwel V. (2004).** The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductases. *Genome biology*. **248**(5): 1-7.

### **- G –**

**Gerard, P. (2006).** Isolement reproducteur et dispersion en zone hybride forestière : L'exemple des frênes (*Fraxinus excelsior* L. et *F. angustifolia* Vahl). Thèse de docteur sciences forestiers. Ecole nationale de génie rural, des eaux et forêt, centre de paris .29-34p.

**Gunasekaran B., Salvamani S., Ahmad SA., Shaharuddin NA., Pattiram Mohd P.D., Shukor M.y. (2015).** HMG-CoA reductase inhibitory activity and phytochemical investigation of *Basella alba* leaf extract as a treatment for hypercholesterolemia. *Drug Design, Development and Therapy*. **9**: 509-517.

### **-H-**

**Holdgate G.A., Ward W., Taqqart F. (2003).** Molecular mechanism for inhibition of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductase by rosuvastatin. *Biochemical society transactions*. **31**: 528-531.

**Hagerman A.E and Butler L.G. (1978).** Precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of agricultural and food chemistry*. **26** : 809-812.

## Références bibliographiques

---

### -I-

**Istvan E.S., Palnikar M., Buchanan S., Deisenhofer J. (2000).** Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA réductase : insights into régulation of activity and catalysis. *European Molecular Biology Organisation Journal*. **19** : 819-830.

**Istvan E.S., and Deisenhofer J. (2000).** The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA réductase. *Biochimica. Biophysica. Acta* .**1529**: 9 -18.

### -K-

**Koning A.J., Roert C., and Wright R. (1996).** Different subcellular localization of *Saccaromyces cervisiae* HMG-CoA réductase isozymes at elevated levels corresponds ti distinct endoplasmic reticulum membrane proliferations. *Biochemistry and molecular cell of biology*. **7**: 769-789.

**Kleemann R., and Kooistra T. (2005).** HMG-CoA réductase inhibitors : effects on chronics subacute inflammation and onset of atherosclerosics induced by dietary cholesterol. *Curr .Drug Targests cardiovascular and .Haematological Disorders*. **5**: 441-453.

### -L-

**Lauthar Z. (1992).** Polyphénol classification and tanin content of buckwheat seeds (*Fagopyrum exculenium Moench*), *Fagopyrum*.**12** : 36-42.

**Li K., Geng., Simonsen J., & Karchesy. (2004).** Novel wood adhésive from condensed tanins and polyéthylénimine *.International Journal of Adhesion and Adhesive*, **24**: 327-333.

### -M-

**Manach, Scalbert A., Morand C., Remesy C., and Jimenezl. (2004).** polyphenols : Food sources and biovaibility. *Americain journal of clinical nutrtrion*.**79**: 727-747.

## Références bibliographiques

---

**Maksimovic Z., Malencic D., Kovacević N. (2005).** Polyphénol contents and antioxydant activity of *Maydis stigma* extract. *Bioresource Technology* **96**: 873-877.

-O-

**Okuda T., Yoshida T., et Hatano T. (1995).** Hydrolysable Tanins and related polyphenols, *Progress in the chemistry of organic natural product journal.cannas*. **1996** :1-19.

**Okamura H., Mimura A. & Yakou Y. (1993).** Antioxydant activity of tannins, flavonoïd in *Eucalyptus rostarta*. *phytochemistry*. **33**: 577-561.

-Q-

**Qiping F., Russel W. (2012).** Toxicité musculaire induite par les statines : déterminants cliniques et génétiques du risque : *Biologie fondamentale et mécanisme de la maladie*. **2** : 945-954p.

**Quézel P. et Santa S. (1962).** *Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Edition du centre national de la recherche scientifique. Paris. 656p.

- R-

**Rameau J.C., Mansion D., Dumé, G. et Gauberville C. (2008).** *La flore forestière française (guide écologique illustré)*, tome 3: Région méditerranéenne. *Institut pour le développement forestier*. 2426p.

**Ribereau-Gayon, P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. *Edition Dunod*, 38-40p.

**Reddy P.V., Mahalingu, S. and Urooj. (2014).** Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A (HMG-CoA) réductase (*ex vivo*) by medicinal plants from westernghats. *Annals of phytomedicin*. **3 (1) : 56-61**.

- S-

**Sarni-Manchado P.; Cheynier V. (2006).** Les polyphenols en agroalimentaires. *lavoisier*. Editions Technology &document. Paris. 380-398p.

## Références bibliographiques

---

-V-

vercautern J., Cheze C., and Triand J. polyphenols96 .Ed :INRA,1996. 31-43.

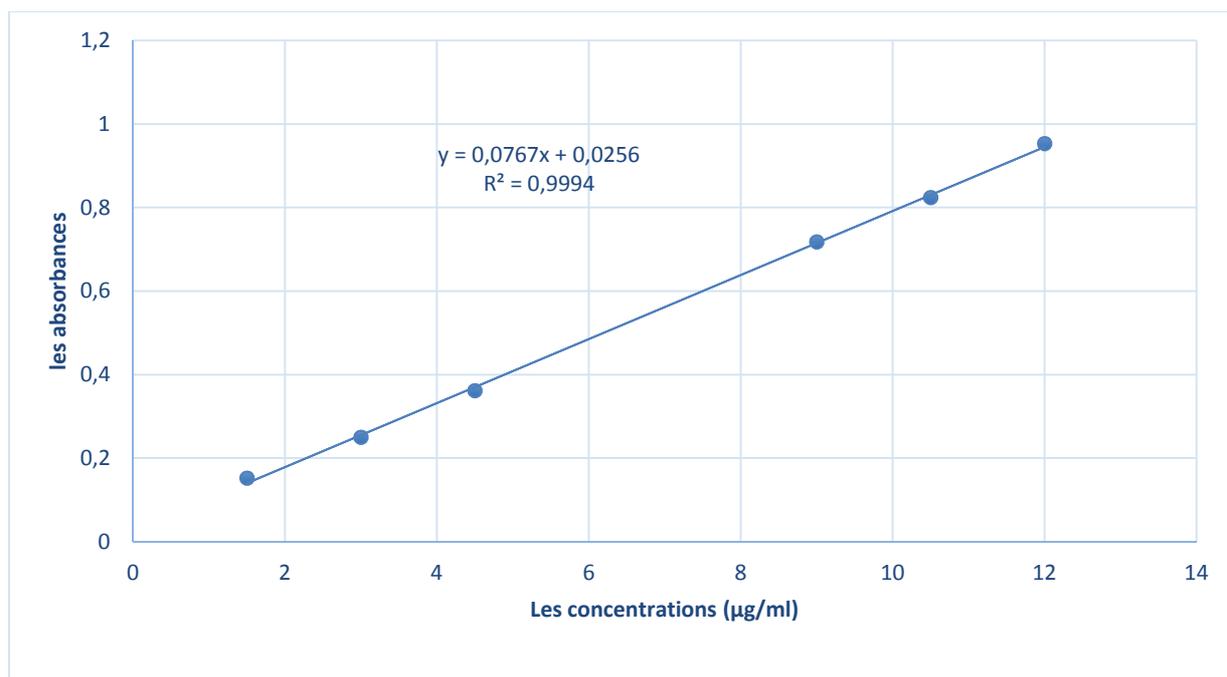
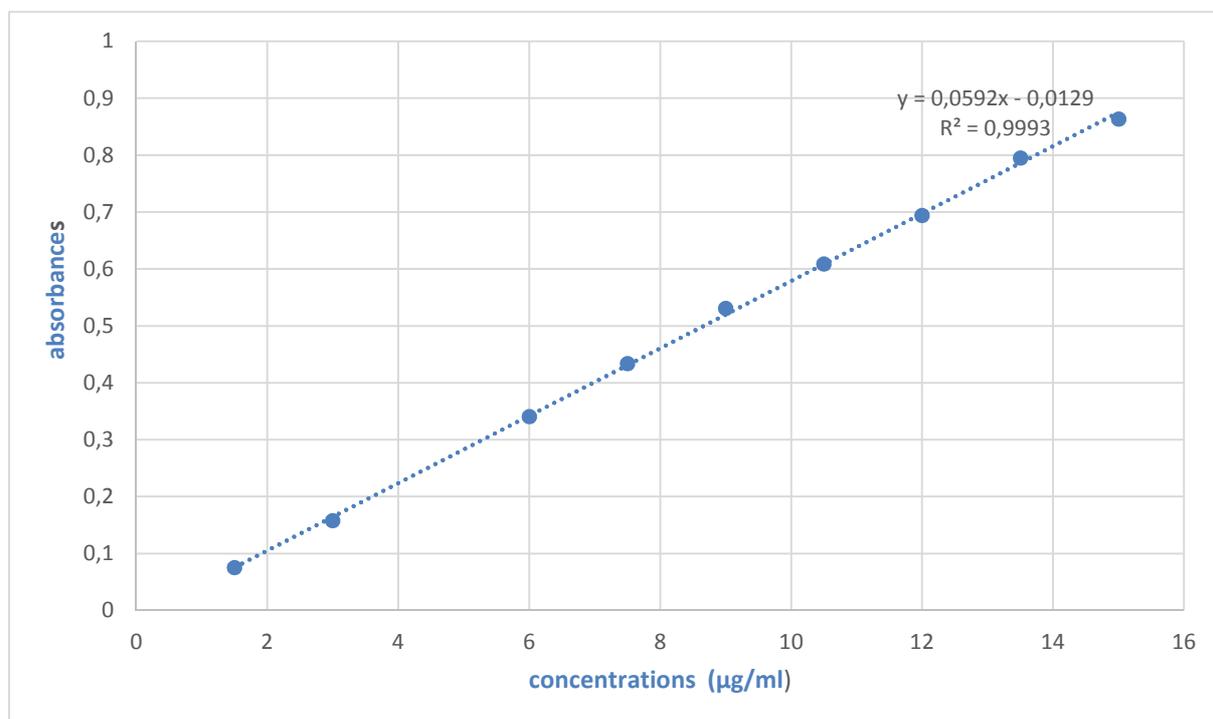
-W-

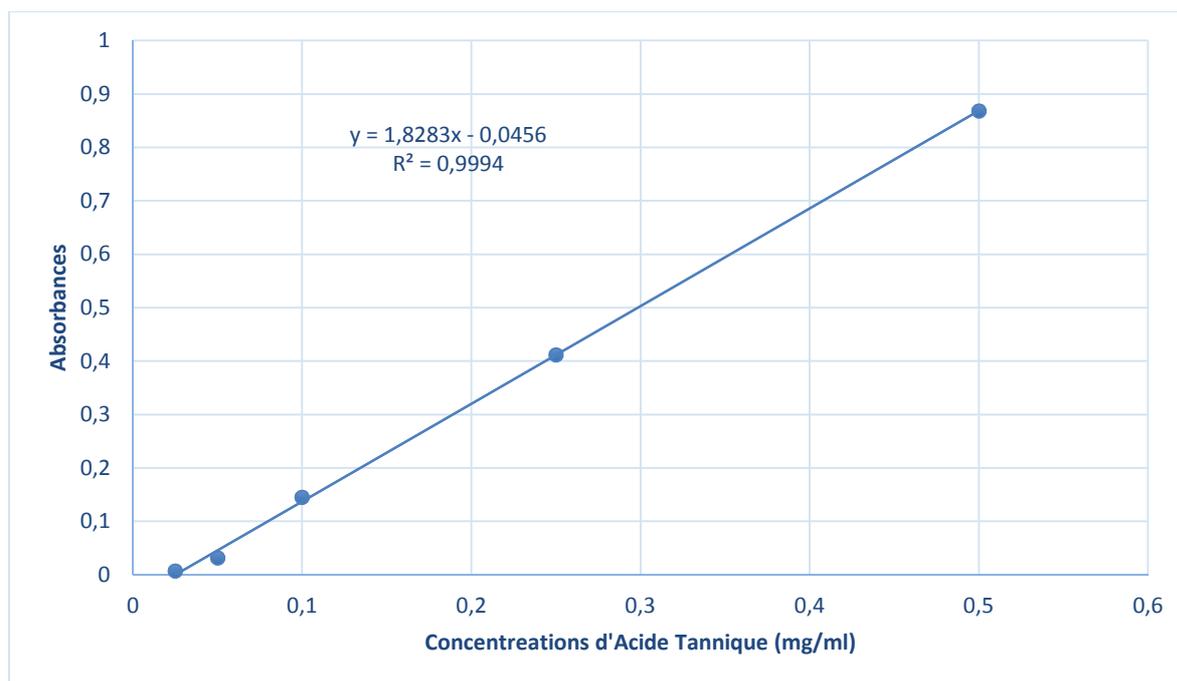
Wallander E. (2008). Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plan System Evolution*. **273** : 25-40.

-Y-

Yilmaz Y, (2006). Novel uses of catechine in foods. *food science and technology*, 64-71.

Yildiz M. and Arikan, E.S. (2008). Genotoxicity testing of quizalofod P-ethyle herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Caryologia*. **61(1)**: 45-52.

**Annexe 01 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique****Annexe 02 : Courbe d'étalonnage de la quercétine**

**Annexe 03 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique**

## Résumé

À fin de mieux comprendre et évaluer la validité de la phytothérapie nous avons étudié l'effet inhibiteur des extraits des feuilles de *F. angustifolia* et *C. flammula* spectrophotométriquement *in vitro*, deux plantes utilisées traditionnellement en Algérie contre plusieurs maladies inflammatoire tel que le rhumatisme, l'arthrite et la goutte, le contenu phénolique notamment les phénols totaux et les flavonoïdes, les tannins des feuilles de *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula* a été estimé dont les teneurs les plus important ont été trouvées chez les deux extraits sont celles des tannins et les phénols totaux.

Les résultats de test d'inhibition sur la HMG-CoA réductase indique une activité vis-à-vis la HMGR par les deux extraits étudiés dont le pourcentage d'inhibition calculé est proportionnel avec les concentrations utilisées, notamment à 200µg/ml où le pourcentage d'inhibition le plus élevé pour *C. flammula* est de 61,86±1,44% et 92,15±0,02% pour *F. angustifolia*. D'après les valeurs d'IC<sub>50</sub>, la meilleure capacité inhibitrice a été enregistré par *Clématis flammula* avec une meilleure IC<sub>50</sub>=61,157µg/ml comparé à celle de *Fraxinus angustifolia* (IC<sub>50</sub>=78,491µg/ml).

D'après les résultats obtenus, il apparait que l'activité inhibitrice des deux extraits de plantes est fortement liée à leur richesse en composés phénolique notamment les tannins et phénols totaux.

**Mots clés :** HMG-CoA réductase ; activité inhibitrice ; *F. angustifolia* ; *C. flammula* ; composés phénoliques.

## Abstract :

In order to better understand and evaluate the validity of herbal medicine, we studied the inhibitory effect of extracts of leaves of *F. angustifolia* and *C. flammula* spectrophotometrically *in vitro*, two plants used traditionally in Algeria against several inflammatory diseases such as rheumatism, arthritis and gout. The total phenolic contents including total phenols and flavonoids, tannin of leaves of *Fraxinus* and *Clematis* was estimated, the highest levels found in both extracts are those of tannins and total phenols.

Inhibition test results on HMG-COA reductase indicate an activity with respect to HMGR by the two extracts studied, the percentage of inhibition calculated is proportional to the concentrations used, where at 200 µg/ ml was found the highest percentage inhibition for *C. flammula* is 61.86 ± 1.44% and 92.15 ± 0.02% for *F. angustifolia*. Based on the IC<sub>50</sub> values, the best inhibitory capacity was recorded by *Clematis flammula* with an IC<sub>50</sub> = 61.157 µg/ml greater than that of *Fraxinus angustifolia* (IC<sub>50</sub> = 78.491 µg/ml).

From the results obtained, it is suggested that the observed inhibitory activity of the two extracts is strongly related to their richness in phenolic compounds including tannins and total phenols.

**Key words:** HMG-CoA reductase, inhibitory activity, *F. Angustifolia*, *C. Flammula*, phenolic compounds.

## ملخص

من أجل فهم وتقييم صحة الأدوية العشبية بشكل أفضل، قمنا بدراسة التأثير التثبيطي لمستخلصات أوراق شجرة الدردار و الياسمين البري في المختبر، وهما نباتان يستخدمان عادة في الجزائر ضد العديد من الأمراض الالتهابية مثل الروماتيزم، التهاب المفاصل والنقرس. أيضا المحتوى الفينولي بما في ذلك الفينول الكلي، والفلافونويد، والتانينات سجل نسب عالية لدى التانينات والفينول الكلي

تشير نتائج اختبار التثبيط على اختزال COA-HMG إلى وجود نشاط يتعلق بـ HMGR من خلال المستخلصين المدروسين، فإن النسبة المئوية للتثبيط المحسوبة تتناسب طرديا مع التركيزات المستخدمة، حيث وجدنا عند 200 ميكروغرام / مل أعلى نسبة تثبيط الياسمين البري هي 61.86 ± 1.44% و 92.15 ± 0.02% ل الدردار. وفقا لقيم IC<sub>50</sub>، تم تسجيل أفضل قدرة تثبيطية بواسطة الياسمين البري مع IC<sub>50</sub> = 61.157 ميكروغرام / مل أعلى من الدردار (IC<sub>50</sub> = 78.491 ميكروغرام / مل). من النتائج التي تم الحصول عليها، يقترح أن النشاط التثبيطي الملاحظ للمستخلصين مرتبط بترائها في المركبات الفينولية بما في ذلك التانينات والفينول الكلي.

**كلمات المفتاح :** المحتوى الفينولي. الياسمين البري ; الدردار ; قوة التثبيط ; HMG-COA ريدوكتاز.