

## Abréviations, acronymes et symboles

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>: pouvoir rotatoire  
aa: acides aminés  
ACAT: acyl-coenzyme A cholestérol acyltransférase  
ACh: acétylcholine  
AChE: acétylcholinestérase  
AChEIs: inhibiteurs de l'acétylcholinestérase  
AcOEt: acétate d'éthyle  
AcOH: acide acétique  
ACT:  $\alpha$ 1-antichymotrypsin  
ADAS-Cog: alzheimer's disease assessment scale-cognitive  
AFLP: amplified fragment length polymorphism  
AICD: amyloid precursor protein intracellular domain  
AINS: anti-inflammatoires non-stéroïdiens  
AMP: adénosine monophosphate  
AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid  
APG: angiosperm phylogeny group  
API: atmospheric pressure ionization  
ApoE: apolipoprotéine E  
ApoE- $\epsilon$ 4: apolipoprotein E epsilon-4  
APP: amyloid precursor protein  
APT: attached proton test  
APweb: angiosperm phylogeny website  
aq: aqueuse  
ATChI: acétylthiocholine iodide  
A $\beta$ : amyloïde-beta  
BCh: butyrylcholine  
BChE: butyrylcholinestérase  
bd: broad doublet  
bs: broad singlet  
BSA: bovine serum albumin  
CamKII: Ca<sup>++</sup>/calmodulin-dependent protein kinase  
CC: chromatographie sur colonne ouverte  
CCM: chromatographie sur couche mince  
CD<sub>3</sub>OD: méthanol deutéré  
CDCl<sub>3</sub>: chloroforme deutéré  
Cerad: consortium to establish a registry for Alzheimer's disease  
ChAT: choline acétyltransférase  
CLU: clusterine  
ColQ: collagène Q  
COSY: CORrelation SpectroscopY  
CR1: complement receptor 1  
CT: cholesterol total  
CTF: fragment C-terminal  
CXCR4: chemokine receptor type 4  
d: doublet  
Da: dalton  
DAD: détecteur à barrette de diodes

DAG: diacylglycérol  
DAPH: 4,5-dianilinophthalimide  
DC: dichroïsme circulaire  
DCM: dichlorométhane  
dd: doublet of doublet  
DEA: diéthylamine  
DIOS: désorption/ionisation sur silicium poreux  
dm: doublet of multiplet  
DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl  
dq: doublet of quartet  
DTNB: 5,5'-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque)  
EAG/ES: équivalent d'acide gallique/extrait sec  
EC/ES: équivalent de catéchine/extrait sec  
ES: electrospray  
ESI: electrospray ionization (ionisation par électropulvérisation)  
EtO<sub>2</sub>: ether diéthylique  
EtOH: ethanol  
FAD: flavine adénine dinucléotide  
FC: flash chromatographie  
Fr: fraction  
GABA: gamma-aminobutyric acid  
GDP: guanosine diphosphate  
GPI: glycoposphatidylinositol  
GTP: guanosine triphosphate  
HCOOH: acide formique  
HDL-C: high density lipoprotein cholesterol  
HMBC: heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy  
HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA  
HPLC: chromatographie liquide à haute performance  
HR-Q-TOF-ESI-MS: high resolution quadrupole time-of-flight electrospray ionization mass spectroscopy  
HSS: high strength silica  
HSV-1: herpes simplex virus 1  
Hz: Hertz  
IC<sub>50</sub>: concentration qui permet l'inhibition de l'activité à 50 %  
ICV: intra-cérébro-ventriculaire  
IL: interleukin  
IMER: réacteur d'enzyme micro-immobilisé monolithique  
Ino(3,4,5)P<sub>3</sub>: inositol trisphosphate  
IRM: imagerie par résonance magnétique  
*J*: constante de couplage  
k<sub>cat</sub>: constante catalytique  
K<sub>m</sub>: constante de Michaelis  
LC: liquid chromatography  
LC-MS/MS: chromatographie liquide / spectrométrie de masse en tandem  
LCR: liquide céphalorachidien  
LDL-C: low density lipoprotein cholesterol  
LPLC: chromatographie liquide basse pression  
M : muscarinique  
m/z: rapport masse/charge électrique

m: multiplet  
MA: maladie d'Alzheimer  
MAC: membrane attack complex  
MALDI: désorption-ionisation laser assistée par matrice  
MAO: monoamine oxydase  
MeCOMe: acétone  
MeOH: méthanol  
mGluR: metabotropic glutamate receptors  
MS: mass spectrometry  
MSD: mass selective detector  
nAChR: récepteurs neuronaux nicotiniques de l'ACh  
n-BuOH: n-butanol  
NDGA: nordihydroguaiaretic acid  
NGF: nerve growth factor  
NMDA: *N*-Methyl-D-Aspartate  
NR2A: NMDA receptor subunits type 2A  
NR2B: NMDA receptor subunits type 2B  
 $\phi\downarrow$ : phase inférieure  
PDA: photodiode array  
PHFs: paired helical filaments  
PKC: protein kinase c  
ppm: partie par million  
Prep: préparative  
PRiMA: proline-rich membrane anchor  
PS: présénilines  
PTLC: preparative thin layer chromatography  
q: quartet  
qq: quartet of quartet  
quin: quintuplet  
RAPD: random amplified polymorphic DNA  
Rf: rapport frontale  
RMN: résonance magnétique nucléaire  
ROESY: Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy  
ROS: reactive oxygen species  
RP18: reversed phase C-18  
s: singlet  
SNC: système nerveux centrale  
SNP: système nerveux périphérique  
Syst-Eur: systolic hypertension in Europe  
TCA: trichloroacetic acid  
TEP: tomographie à émission de positrons  
THS: traitement hormonal substitutif  
TIC: total ion current  
TMTFA: *m*-(*N,N,N*-triméthylammonio)-2,2,2-trifluoroacétophénone  
TNF: tumor necrosis factor  
TOF: temps de vol  
TR: temps de rétention  
UPLC: ultra performance liquid chromatography  
UV: ultraviolet  
vAChT: vesicular acetylcholine transporter

VIH: virus de l'immunodéficience humaine

vis: visible

$\alpha$ : degré de signification

$\delta$ : déplacement chimique

$\lambda_{\max}$ : maximum d'absorption dans l'UV/Vis



# Table des matières

<b>Remerciements</b>	<b>i</b>
<b>Dédicace</b>	<b>ii</b>
<b>Communications et publications</b>	<b>iii</b>
<b>Abréviations, symboles et conventions</b>	<b>iv</b>
<b>Table des matières</b>	<b>viii</b>
<b>Table des figures</b>	<b>xii</b>
<b>Table des tableaux</b>	<b>xvii</b>
<b>Résumé</b>	<b>xviii</b>
<b>Abstract</b>	<b>xix</b>
<b>Chapitre 1: Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 2: Etude bibliographique</b>	
2.1. Plantes étudiées	4
2.1.1. La famille des Anacardiaceae	4
2.1.1.1. Introduction	4
2.1.1.2. Classification systématique, description botanique et distribution	5
2.1.1.2.1. Taxonomie et phylogénie	5
2.1.1.2.2. Description botanique	8
2.1.1.2.3. Distribution	8
2.1.1.3. Importance économique	9
2.1.1.4. Utilisations médicinales et effets biologiques et pharmacologiques	10
2.1.1.5. Toxicité	11
2.1.1.6. Principaux métabolites secondaires isolés de la famille Anacardiaceae	11
2.1.2. Le genre <i>Pistacia</i> (Pistachier)	21
2.1.2.1. Présentation	21
2.1.2.2. Utilisations médicinales et effets biologiques et pharmacologiques	25
2.1.2.3. Etudes phytochimiques antérieures et principaux métabolites secondaires isolés	26
2.1.2.4. <i>Pistacia atlantica</i> Desf.	28
2.1.2.4.1. Description botanique, distribution et habitat	28
2.1.2.4.2. Utilisations médicinales	30
2.1.2.4.3. Propriétés biologiques et pharmacologiques	32
2.1.2.4.4. Etudes phytochimiques antérieures et principaux métabolites secondaires isolés	33
2.1.3. La famille Boraginaceae	34
2.1.3.1. Introduction	34
2.1.3.2. Classification systématique, description botanique et distribution	38
2.1.3.2.1. Taxonomie et phylogénie	38
2.1.3.2.2. Description botanique	38
2.1.3.2.3. Distribution	39
2.1.3.3. Importance économique	39
2.1.3.4. Utilisations médicinales et effets biologiques et pharmacologiques	40
2.1.3.5. Toxicité	41
2.1.3.6. Principaux métabolites secondaires isolés de la famille Boraginaceae	41
2.1.4. Le genre <i>Echium</i> (Vipérine)	42

2.1.4.1. Présentation	42
2.1.4.2. Utilisations médicinales et effets biologiques et pharmacologiques	52
2.1.4.3. Etudes phytochimiques antérieures et principaux métabolites secondaires isolés	53
2.1.4.4. <i>Echium confusum</i> de Coincy	54
2.1.4.4.1. Description botanique, distribution et habitat	54
2.1.4.4.2. Utilisations médicinales	56
2.1.4.4.3. Propriétés biologiques et pharmacologiques	56
2.1.4.4.4. Etudes phytochimiques antérieures et principaux métabolites secondaires isolés	56
2.1.5. Le genre <i>Solenanthus</i> (Solenanthes)	56
2.1.5.1. Présentation	56
2.1.5.2. Utilisations médicinales et effets biologiques et pharmacologiques	56
2.1.5.3. Etudes phytochimiques antérieures et principaux métabolites secondaires isolés	57
2.1.5.4. <i>Solenanthus lanatus</i> A.DC.	57
2.1.5.4.1. Description botanique, distribution et habitat	57
2.1.5.4.2. Utilisations médicinales	59
2.1.5.4.3. Propriétés biologiques et pharmacologiques	59
2.1.5.4.4. Etudes phytochimiques antérieures et principaux métabolites secondaires isolés	59
2.2. Maladie d'Alzheimer: diagnostic, neuropathologie, et stratégies thérapeutiques	59
2.2.1. Historique	60
2.2.2. Diagnostic	63
2.2.2.1. Les manifestations cliniques	64
2.2.2.2. Tests neuropsychologiques	65
2.2.2.3. L'imagerie cérébrale	65
2.2.3. Neuropathologie	67
2.2.3.1. Le peptide amyloïde-beta	67
2.2.3.2. Dégénérescences neurofibrillaires	72
2.2.3.3. Altération des systèmes de neurotransmetteurs	74
2.2.3.3.1. Les cellules du système nerveux	74
2.2.3.3.2. Transmission synaptique	80
2.2.3.3.3. Atteinte des systèmes de neurotransmetteurs	81
2.2.3.4. Pathologie liée à l'altération de l'homéostasie du calcium	84
2.2.4. Causes et facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer	84
2.2.4.1. Facteurs génétiques	84
2.2.4.2. Facteurs biologiques et environnementaux	85
2.2.4.2.1. L'âge	85
2.2.4.2.2. Le sexe	85
2.2.4.2.3. L'hypertension	85
2.2.4.2.4. La glycémie et le diabète	86
2.2.4.2.5. L'alimentation	87
2.2.4.2.6. Le cholestérol	87
2.2.4.2.7. L'obésité	88
2.2.4.2.8. Les œstrogènes	88
2.2.4.2.9. Infection virale	89
2.2.4.2.10. Traumatisme crânien	89
2.2.4.2.11. Métaux	89
2.2.5. Traitements et pistes thérapeutiques de la maladie d'Alzheimer	89

2.2.5.1. Régulation du calcium	90
2.2.5.2. Inhibition de la formation du peptide A $\beta$	90
2.2.5.2.1. Inhibition des sécrétases	90
2.2.5.2.2. Vaccination contre le peptide A $\beta$	91
2.2.5.2.3. Inhibition de l'agrégation du peptide A $\beta$	91
2.2.5.3. Réduire les dégénérescences neurofibrillaires	93
2.2.5.4. Anti-inflammatoires non-stéroïdiens	93
2.2.5.5. Les antioxydants	93
2.2.5.6. Composés réduisant le niveau du cholestérol	95
2.2.5.7. Les inhibiteurs de la monoamine oxydase	96
2.2.5.8. Thérapie par remplacement hormonal	96
2.2.5.9. Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase	97
2.2.5.9.1. Les cholinestérases	97
2.2.5.9.2. Traitements actuels de la maladie d'Alzheimer basés sur l'inhibition de l'acétylcholinestérase	112
2.2.5.9.3. Méthodes de détection des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase	119

### Chapitre 3: Partie expérimentale

3.1. Matériel végétal et extraction	128
3.2. Méthodes chromatographiques analytiques	130
3.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	130
3.2.2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection UV-visible à barrettes de diodes (HPLC-DAD-UV)	132
3.2.3. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-API-ES-MS)	134
3.3. Méthodes chromatographiques séparatives	136
3.3.1. Partage liquide-liquide	137
3.3.2. Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC)	137
3.3.2.1. Chromatographie d'adsorption	138
3.3.2.2. Chromatographie d'exclusion	139
3.3.3. Chromatographie liquide basse pression (LPLC)	139
3.3.4. Chromatographie flash (FC)	140
3.3.5. Chromatographie sur couche mince préparative (PTLC)	141
3.4. Méthodes physico-chimiques	142
3.4.1. Pouvoir rotatoire ( $[\alpha]_D$ )	142
3.4.2. Spectrométrie de masse (MS)	142
3.4.3. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	143
3.5. Tests de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase	144
3.5.1. Méthode bioautographique au Fast Blue B	144
3.5.2. Méthode d'Ellman par spectrométrie	144
3.6. Dosage des polyphénols totaux	145
3.7. Dosage des flavonoïdes	146
3.8. Analyse statistique	146
3.9. Constantes physiques et données spectrales des produits isolés	147

### Chapitre 4: Résultats et discussion

4.1. Préparation des extraits bruts	152
4.2. Investigation phytochimique de l'extrait aqueux des feuilles de <i>P. atlantica</i>	152

4.2.1. Analyses CCM de l'extrait aqueux des feuilles de <i>P. atlantica</i>	152
4.2.2. Analyses HPLC-DAD-UV et HPLC-API-ES-MS de l'extrait aqueux et fractions issus des feuilles de <i>P. atlantica</i>	159
4.2.2.1. Extrait aqueux	159
4.2.2.2. Fraction acétate d'éthyle	162
4.2.2.3. Fraction n-butanol	166
4.2.2.4. Fraction aqueuse	168
4.2.3. Fractionnement bio-guidé de l'extrait aqueux des feuilles de <i>P. atlantica</i> et isolement des produits I-VIII	170
4.2.3.1. Fractionnement bio-guidé de la fraction aqueuse et isolement des produits I-III	172
4.2.3.2. Fractionnement bio-guidé de la fraction acétate d'éthyle et isolement des produits II, IV-VIII	176
4.3. Investigation phytochimique de l'extrait éthanolique de la plante entière de <i>S. lanatus</i> et <i>E. confusum</i>	187
4.3.1. Analyses CCM de l'extrait éthanolique de la plante entière de <i>S. lanatus</i> et <i>E. confusum</i>	187
4.3.2. Fractionnement bio-guidé de l'extrait éthanolique de la plante entière de <i>S. lanatus</i> et isolement des produits IX-XII	199
4.3.3. Interprétations des spectres et détermination de la structure des produits IX-XII	203
4.3.3.1. Détermination de la structure du produit IX	203
4.3.3.2. Détermination de la structure du produit X	208
4.3.3.3. Détermination de la structure du produit XI	211
4.3.3.4. Détermination de la structure du produit XII	214
4.3.4. Fractionnement bio-guidé de l'extrait éthanolique de la plante entière d' <i>E. confusum</i> et isolement des produits XIII-XX	219
4.4. Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase des extraits bruts, fractions et produits des plantes étudiées	224
4.4.1. Test de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase par bioautographie	224
4.4.1.1. Extrait aqueux, fractions et produits purifiés de <i>P. atlantica</i>	224
4.4.1.2. Extrait éthanolique, fractions et produits purifiés de <i>S. lanatus</i>	225
4.4.1.3. Extrait éthanolique, fractions et produits purifiés d' <i>E. confusum</i>	225
4.4.2. Test de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase par dosage spectrophotométrique	226
4.5. Quantification des polyphénols totaux dans les extraits des plantes étudiées	243
4.6. Quantification des flavonoïdes totaux dans les extraits bruts des plantes étudiées	245
<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>247</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>249</b>

## Table des figures

<b>Figure 2.1.</b> Position systématique de la famille Anacardiaceae	5
<b>Figure 2.2.</b> Distribution géographique de la famille Anacardiaceae	9
<b>Figure 2.3.</b> Répartition actuelle des <i>Pistacia</i>	25
<b>Figure 2.4.</b> Photos de <i>P. atlantica</i>	30
<b>Figure 2.5.</b> Position systématique de la famille Boraginaceae	38
<b>Figure 2.6.</b> Distribution géographique de la famille Boraginaceae	39
<b>Figure 2.7.</b> Photos d' <i>E. confusum</i>	55
<b>Figure 2.8.</b> Photos de <i>S. lanatus</i>	58
<b>Figure 2.9.</b> Les trois principales zones du cerveau	60
<b>Figure 2.10.</b> Les lésions neuropathologiques de la MA	62
<b>Figure 2.11.</b> Comparaison des cerveaux et des neurones de personnes saines et d'individus atteints de la MA	63
<b>Figure 2.12.</b> Les étapes de la progression de la MA	64
<b>Figure 2.13.</b> Illustration schématique simplifiée montrant les caractéristiques pathologiques de la MA	66
<b>Figure 2.14.</b> Images par TEP du vieillissement normal et de la MA	67
<b>Figure 2.15.</b> Clivage de l'APP	69
<b>Figure 2.16.</b> Modèle d'activation du complément et de l'inflammation dans la MA	71
<b>Figure 2.17.</b> Schéma montrant le rôle des astrocytes réactives et de l'ACT dans la pathogenèse de la MA	71
<b>Figure 2.18.</b> Schéma du stress oxydatif associé au peptide A $\beta$ et de la neurotoxicité dans le cerveau dans le cas de la MA	72
<b>Figure 2.19.</b> Phosphorylation normale et pathologique de la protéine Tau et son impact sur l'équilibre tubuline-microtubuline	73
<b>Figure 2.20.</b> Un neurone avec un corps qui contient un noyau, qui contrôle toutes les activités de la cellule	75
<b>Figure 2.21.</b> Caractéristiques principales des neurones en microscopie optique et électronique	76
<b>Figure 2.22.</b> Exemple de la variété morphologique des neurones du système nerveux humain	78
<b>Figure 2.23.</b> Les cellules gliales	79
<b>Figure 2.24.</b> Synapse chimique	80
<b>Figure 2.25.</b> Succession des événements à une synapse chimique	82
<b>Figure 2.26.</b> Structure de l'AChE en 3D avec représentation des hélices $\alpha$ , feuillets $\beta$ et résidus du site actif	98
<b>Figure 2.27.</b> L'acétylcholinestérase	99
<b>Figure 2.28.</b> Diagramme en ruban de la structure tridimensionnelle de l'AChE	100
<b>Figure 2.29.</b> Structure tridimensionnelle de l'AChE	102
<b>Figure 2.30.</b> Représentation schématique d'une synapse cholinergique	103
<b>Figure 2.31.</b> Mécanisme proposé de certaines fonctions non-classiques de l'AChE	105
<b>Figure 2.32.</b> Le site actif de la BChE est au fond d'une gorge de 20 Å	107
<b>Figure 2.33.</b> La BChE et la MA	108
<b>Figure 2.34.</b> Représentation schématique de l'épissage alternatif de transcrits de L'AChE, des différents types de sous-unités catalytiques et des formes moléculaires matures	111
<b>Figure 2.35.</b> Réaction de l'hydrolyse de l'ACh par l'AChE	120
<b>Figure 2.36.</b> Réaction d'Ellman	121



<b>Figure 2.37.</b> La réaction de l’AChE avec le 1-naphtyle acétate et la formation subséquente d’un colorant violet	122
<b>Figure 3.1.</b> Schéma de l’extraction sous reflux	129
<b>Figure 3.2.</b> Schéma du détecteur à barate de diode (DAD)	133
<b>Figure 3.3.</b> Principe de l’API-electrospray (API-ES) selon Agilent technologies	136
<b>Figure 4.1.</b> CCM de l’analyse des terpénoides	153
<b>Figure 4.2.</b> CCM de l’analyse des terpénoides	153
<b>Figure 4.3.</b> CCM de l’analyse des lignanes et terpénoides	154
<b>Figure 4.4.</b> CCM de l’analyse des lignanes et terpénoides	154
<b>Figure 4.5.</b> CCM de l’analyse des glycosides cardiotoniques	155
<b>Figure 4.6.</b> CCM de l’analyse des glycosides cardiotoniques	155
<b>Figure 4.7.</b> CCM de l’analyse des glycosides cardiotoniques	156
<b>Figure 4.8.</b> CCM de l’analyse des tanins galliques	156
<b>Figure 4.9.</b> CCM de l’analyse des tanins ellagiques	157
<b>Figure 4.10.</b> CCM de l’analyse des dérivés anthracéniques	157
<b>Figure 4.11.</b> CCM de l’analyse des flavonoïdes, acides phénoliques et dérivés anthracéniques	158
<b>Figure 4.12.</b> Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 280 nm de l’extrait aqueux des feuilles de <i>P. atlantica</i>	160
<b>Figure 4.13.</b> Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 350 nm de l’extrait aqueux des feuilles de <i>P. atlantica</i>	160
<b>Figure 4.14.</b> Chromatogramme HPLC-API-ES-MS de l’extrait aqueux des feuilles de <i>P. atlantica</i>	160
<b>Figure 4.15.</b> Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 280 nm de la fraction acétate d’éthyle	163
<b>Figure 4.16.</b> Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 350 nm de la fraction acétate d’éthyle	163
<b>Figure 4.17.</b> Chromatogramme HPLC-API-ES-MS de la fraction acétate d’éthyle	163
<b>Figure 4.18.</b> Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 280 nm de la fraction n-butanol	166
<b>Figure 4.19.</b> Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 350 nm de la fraction n-butanol	166
<b>Figure 4.20.</b> Chromatogramme HPLC-API-ES-MS de la fraction n-butanol	166
<b>Figure 4.21.</b> Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 280 nm de la fraction aqueuse issue de l’extrait aqueux des feuilles de <i>P. atlantica</i>	168
<b>Figure 4.22.</b> Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 350 nm de la fraction aqueuse issue de l’extrait aqueux des feuilles de <i>P. atlantica</i>	168
<b>Figure 4.23.</b> Chromatogramme HPLC-API-ES-MS de la fraction aqueuse issue de l’extrait aqueux des feuilles de <i>P. atlantica</i>	168
<b>Figure 4.24.</b> Structures de quelques produits identifiés par HPLC-DAD-UV et HPLC-API-ES-MS dans l’extrait aqueux et fractions des feuilles de <i>P. atlantica</i>	169
<b>Figure 4.25.</b> CCM de l’analyse des fractions AcOEt, n-BuOH, H <sub>2</sub> O	170
<b>Figure 4.26.</b> Schéma d’isolement des produits <b>I-III</b> de la fraction aqueuse issue de l’extrait aqueux des feuilles de <i>P. atlantica</i>	171
<b>Figure 4.27.</b> CCM de l’analyse des fractions <b>I-IV</b>	172
<b>Figure 4.28.</b> CCM de l’analyse des fractions <b>I-XVII</b>	173
<b>Figure 4.29.</b> CCM de l’analyse des fractions <b>I-VIII</b>	174
<b>Figure 4.30.</b> CCM de l’analyse des fractions <b>I-VI</b>	175
<b>Figure 4.31.</b> CCM de l’analyse des fractions <b>I-IV</b>	175
<b>Figure 4.32.</b> CCM de l’analyse des fractions <b>I-VII</b>	176
<b>Figure 4.33.</b> Schéma d’isolement des produits <b>II, IV-VIII</b> de la fraction AcOEt issue de l’extrait aqueux des feuilles de <i>P. atlantica</i>	177

<b>Figure 4.34.</b> CCM de l'analyse des fractions <b>I-VII</b>	<b>178</b>
<b>Figure 4.35.</b> CCM de l'analyse des fractions <b>I-IX</b>	<b>179</b>
<b>Figure 4.36.</b> CCM de l'analyse des fractions <b>I-VIII</b>	<b>180</b>
<b>Figure 4.37.</b> CCM de l'analyse des fractions <b>I-IX</b>	<b>181</b>
<b>Figure 4.38.</b> CCM de l'analyse des fractions <b>I-VIII</b>	<b>182</b>
<b>Figure 4.39.</b> CCM de l'analyse des fractions <b>I-VII</b>	<b>183</b>
<b>Figure 4.40.</b> CCM de l'analyse des fractions <b>I-IX</b>	<b>184</b>
<b>Figure 4.41.</b> CCM de l'analyse des fractions <b>I-XI</b>	<b>185</b>
<b>Figure 4.42.</b> CCM de l'analyse des produits <b>I, II et III</b>	<b>185</b>
<b>Figure 4.43.</b> CCM de l'analyse des produits <b>II, IV, V, VI, VII et VIII</b>	<b>186</b>
<b>Figure 4.44.</b> CCM de l'analyse des alcaloïdes	<b>188</b>
<b>Figure 4.45.</b> CCM de l'analyse des saponines	<b>188</b>
<b>Figure 4.46.</b> CCM de l'analyse des saponines	<b>189</b>
<b>Figure 4.47.</b> CCM de l'analyse des saponines	<b>189</b>
<b>Figure 4.48.</b> CCM de l'analyse des saponines	<b>190</b>
<b>Figure 4.49.</b> CCM de l'analyse des saponines	<b>190</b>
<b>Figure 4.50.</b> CCM de l'analyse des lignanes	<b>191</b>
<b>Figure 4.51.</b> CCM de l'analyse des lignanes et terpénoïdes	<b>191</b>
<b>Figure 4.52.</b> CCM de l'analyse des lignanes et terpénoïdes	<b>192</b>
<b>Figure 4.53.</b> CCM de l'analyse des terpénoïdes	<b>192</b>
<b>Figure 4.54.</b> CCM de l'analyse des terpénoïdes	<b>193</b>
<b>Figure 4.55.</b> CCM de l'analyse des glycosides cardiotoniques	<b>193</b>
<b>Figure 4.56.</b> CCM de l'analyse des glycosides cardiotoniques	<b>194</b>
<b>Figure 4.57.</b> CCM de l'analyse des glycosides cardiotoniques	<b>194</b>
<b>Figure 4.58.</b> CCM de l'analyse des sesquiterpènes lactones	<b>195</b>
<b>Figure 4.59.</b> CCM de l'analyse des tanins ellagiques	<b>195</b>
<b>Figure 4.60.</b> CCM de l'analyse des tanins galliques	<b>196</b>
<b>Figure 4.61.</b> CCM de l'analyse des flavonoïdes et coumarines	<b>196</b>
<b>Figure 4.62.</b> CCM de l'analyse des flavonoïdes et coumarines	<b>197</b>
<b>Figure 4.63.</b> CCM de l'analyse des coumarines	<b>197</b>
<b>Figure 4.64.</b> CCM de l'analyse des coumarines	<b>198</b>
<b>Figure 4.65.</b> CCM de l'analyse des fractions <b>I-V</b>	<b>199</b>
<b>Figure 4.66.</b> Schéma d'isolement des produits <b>IX-XII</b> de l'extrait éthanolique de la plante entière de <i>S. lanatus</i>	<b>200</b>
<b>Figure 4.67.</b> CCM de l'analyse des fractions <b>I-XII</b>	<b>201</b>
<b>Figure 4.68.</b> CCM de l'analyse des fractions <b>I-IX</b>	<b>202</b>
<b>Figure 4.69.</b> CCM de l'analyse des produits <b>IX, X, XI, XII</b>	<b>203</b>
<b>Figure 4.70.</b> Spectre HR-Q-TOF-ESI-MS du produit <b>IX</b> en mode positif	<b>204</b>
<b>Figure 4.71.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H du produit <b>IX</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	<b>206</b>
<b>Figure 4.72.</b> Spectre RMN APT du produit <b>IX</b> (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	<b>206</b>
<b>Figure 4.73.</b> Spectre RMN de corrélations homonucléaires COSY du produit <b>IX</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	<b>207</b>
<b>Figure 4.74.</b> Spectre RMN de corrélations hétéronucléaires HMBC du produit <b>IX</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	<b>207</b>
<b>Figure 4.75.</b> Structure du produit <b>IX</b> (3'-acétylheliosupine <i>N</i> -oxyde)	<b>208</b>
<b>Figure 4.76.</b> Spectre HR-Q-TOF-ESI-MS du produit <b>X</b> en mode positif	<b>209</b>
<b>Figure 4.77.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H du produit <b>X</b> (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	<b>210</b>
<b>Figure 4.78.</b> Spectre RMN APT du produit <b>X</b> (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	<b>210</b>
<b>Figure 4.79.</b> Spectre RMN de corrélations homonucléaires COSY du produit <b>X</b> (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	<b>211</b>

<b>Figure 4.80.</b> Structure du produit <b>X</b> (7-angeloylechinatine <i>N</i> -oxyde)	211
<b>Figure 4.81.</b> Spectre HR-Q-TOF-ESI-MS du produit <b>XI</b> en mode positif	213
<b>Figure 4.82.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H du produit <b>XI</b> (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	213
<b>Figure 4.83.</b> Spectre RMN de corrélations homonucléaires COSY du produit <b>XI</b> (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	214
<b>Figure 4.84.</b> Structure du produit <b>XI</b> (Heliosupine <i>N</i> -oxyde)	214
<b>Figure 4.85.</b> Spectre HR-Q-TOF-ESI-MS du produit <b>XII</b> en mode positif	216
<b>Figure 4.86.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H du produit <b>XII</b> (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	216
<b>Figure 4.87.</b> Spectre RMN APT du produit <b>XII</b> (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	217
<b>Figure 4.88.</b> Spectre RMN de corrélations homonucléaires COSY du produit <b>XII</b> (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)	218
<b>Figure 4.89.</b> Structure du produit <b>XII</b> (heliosupine)	218
<b>Figure 4.90.</b> CCM de l'analyse des fractions <b>I-V</b>	219
<b>Figure 4.91.</b> Schéma d'isolement des produits <b>XIII-XX</b> de l'extrait éthanolique de la plante entière d' <i>E. confusum</i>	220
<b>Figure 4.92.</b> CCM de l'analyse des fractions <b>I-XVIII</b>	221
<b>Figure 4.93.</b> CCM de l'analyse des fractions <b>I-XVIII</b>	222
<b>Figure 4.94.</b> CCM de l'analyse des produits <b>XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX et XX</b>	223
<b>Figure 4.95.</b> Détection de l'activité inhibitrice de l'AChE par bioautographique de l'extrait aqueux (1), fraction aqueuse (2), fraction AcOEt (3) et produits purifiés ( <b>I</b> (4), <b>II</b> (5), <b>III</b> (6), <b>IV</b> (7), <b>V</b> (8), <b>VI</b> (9), <b>VII</b> (10) et <b>VIII</b> (11)) de <i>P. atlantica</i> à 15 µg	224
<b>Figure 4.96.</b> Détection de l'activité inhibitrice de l'AChE par bioautographique de l'extrait éthanolique (1), fractions <b>III</b> (2), <b>IV</b> (3) et produits purifiés ( <b>IX</b> (4), <b>X</b> (5), <b>XI</b> (6), <b>XII</b> (7)) de <i>S. lanatus</i> à 15 µg	225
<b>Figure 4.97.</b> Détection de l'activité inhibitrice de l'AChE par bioautographique de l'extrait éthanolique (1), fractions <b>III</b> (2), <b>IV</b> (3) et produits purifiés ( <b>XIII</b> (4), <b>XIV</b> (5), <b>XV</b> (6), <b>XVI</b> (7), <b>XVII</b> (8), <b>XVIII</b> (9), <b>XIX</b> (10) et <b>XX</b> (11)) d' <i>E. confusum</i> à 15 µg	226
<b>Figure 4.98.</b> Activité inhibitrice de l'AChE de l'extrait aqueux des feuilles de <i>P. atlantica</i>	227
<b>Figure 4.99.</b> Activité inhibitrice de l'AChE de la fraction AcOEt issue de l'extrait aqueux des feuilles de <i>P. atlantica</i>	228
<b>Figure 4.100.</b> Activité inhibitrice de l'AChE de la fraction n-BuOH issue de l'extrait aqueux des feuilles de <i>P. atlantica</i>	228
<b>Figure 4.101.</b> Activité inhibitrice de l'AChE de la fraction aqueuse issue de l'extrait aqueux des feuilles de <i>P. atlantica</i>	229
<b>Figure 4.102.</b> Activité inhibitrice de l'AChE du produit <b>I</b>	229
<b>Figure 4.103.</b> Activité inhibitrice de l'AChE du produit <b>II</b>	230
<b>Figure 4.104.</b> Activité inhibitrice de l'AChE du produit <b>III</b>	230
<b>Figure 4.105.</b> Activité inhibitrice de l'AChE du produit <b>IV</b>	231
<b>Figure 4.106.</b> Activité inhibitrice de l'AChE du produit <b>V</b>	231
<b>Figure 4.107.</b> Activité inhibitrice de l'AChE du produit <b>VI</b>	232
<b>Figure 4.108.</b> Activité inhibitrice de l'AChE du produit <b>VII</b>	232
<b>Figure 4.109.</b> Activité inhibitrice de l'AChE du produit <b>VIII</b>	233
<b>Figure 4.110.</b> Activité inhibitrice de l'AChE de l'extrait éthanolique de la plante entière de <i>S. lanatus</i>	234
<b>Figure 4.111.</b> Activité inhibitrice de l'AChE de la fraction <b>III</b> issue de l'extrait éthanolique de la plante entière de <i>S. lanatus</i>	234



<b>Figure 4.112.</b> Activité inhibitrice de l'AcChE de la fraction <b>IV</b> issue de l'extrait éthanolique de la plante entière de <i>S. lanatus</i>	235
<b>Figure 4.113.</b> Activité inhibitrice de l'AcChE de la fraction <b>V</b> issue de l'extrait éthanolique de la plante entière de <i>S. lanatus</i>	235
<b>Figure 4.114.</b> Activité inhibitrice de l'AcChE du produit <b>IX</b>	236
<b>Figure 4.115.</b> Activité inhibitrice de l'AcChE du produit <b>X</b>	236
<b>Figure 4.116.</b> Activité inhibitrice de l'AcChE du produit <b>XI</b>	237
<b>Figure 4.117.</b> Activité inhibitrice de l'AcChE du produit <b>XII</b>	237
<b>Figure 4.118.</b> Activité inhibitrice de l'AcChE de l'extrait éthanolique de la plante entière d' <i>E. confusum</i>	238
<b>Figure 4.119.</b> Activité inhibitrice de l'AcChE de la fraction <b>III</b> issue de l'extrait éthanolique de la plante entière d' <i>E. confusum</i>	239
<b>Figure 4.120.</b> Activité inhibitrice de l'AcChE de la fraction <b>IV</b> issue de l'extrait éthanolique de la plante entière d' <i>E. confusum</i>	239
<b>Figure 4.121.</b> Activité inhibitrice de l'AcChE du produit <b>XIII</b>	240
<b>Figure 4.122.</b> Activité inhibitrice de l'AcChE du produit <b>XVII</b>	240
<b>Figure 4.123.</b> Activité inhibitrice de l'AcChE du produit <b>XVIII</b>	241
<b>Figure 4.124.</b> Activité inhibitrice de l'AcChE du produit <b>XIX</b>	241
<b>Figure 4.125.</b> Activité inhibitrice de l'AcChE du produit <b>XX</b>	242
<b>Figure 4.126.</b> Activité inhibitrice de l'AcChE de la galanthamine	242
<b>Figure 4.127.</b> IC <sub>50</sub> de l'activité inhibitrice de l'AcChE des extraits bruts, fractions et produits purifiés	243
<b>Figure 4.128.</b> Teneurs des polyphénols totaux (mg EAG/g ES) des plantes étudiées	245
<b>Figure 4.129.</b> Teneurs des flavonoïdes (mg EC/g ES) des plantes étudiées	246

## Table des tableaux

<b>Tableau 2.1.</b> Métabolites secondaires isolés des espèces d'Anacardiaceae	<b>12</b>
<b>Tableau 2.2.</b> Distribution des espèces de <i>Pistacia</i> et nombre de chromosomes	<b>22</b>
<b>Tableau 2.3.</b> Classification des espèces de <i>Pistacia</i>	<b>23</b>
<b>Tableau 2.4.</b> Activités biologiques et pharmacologiques des différents organes de <i>P. atlantica</i>	<b>33</b>
<b>Tableau 2.5.</b> Métabolites secondaires isolés et identifiés dans différents extraits et parties végétatives de <i>P. atlantica</i>	<b>35</b>
<b>Tableau 2.6.</b> Métabolites secondaires isolés des espèces de Boraginaceae	<b>43</b>
<b>Tableau 2.7.</b> Inhibiteurs de l'AChE découverts en vue de traiter la MA	<b>113</b>
<b>Tableau 3.1.</b> Matériel végétale utilisé dans le présent travail	<b>128</b>
<b>Tableau 3.2.</b> Phases mobiles pour CCM utilisées pour le criblage phytochimique de <i>P. atlantica</i> , <i>S. lanatus</i> et <i>E. confusum</i>	<b>131</b>
<b>Tableau 3.3.</b> Révélateurs utilisés pour les analyses par CCM	<b>131</b>
<b>Tableau 4.1.</b> Extraits bruts préparés à partir de <i>P. atlantica</i> , <i>S. lanatus</i> et <i>E. confusum</i>	<b>152</b>
<b>Tableau 4.2.</b> Récapitulatif du criblage phytochimique de l'extrait aqueux des feuilles de <i>P. atlantica</i>	<b>158</b>
<b>Tableau 4.3.</b> Temps de rétention (TR), longueurs d'ondes d'absorption maximale ( $\lambda_{\max}$ ), spectre de masse, tentatives d'identification et formules moléculaires des produits présents dans l'extrait aqueux des feuilles de <i>P. atlantica</i>	<b>161</b>
<b>Tableau 4.4.</b> Temps de rétention (TR), longueurs d'ondes d'absorption maximale ( $\lambda_{\max}$ ), spectres de masse, tentatives d'identification et formules moléculaires des produits présents dans la fraction acétate d'éthyle issue de l'extrait aqueux des feuilles de <i>P. atlantica</i>	<b>164</b>
<b>Tableau 4.5.</b> Temps de rétention (TR), longueurs d'ondes d'absorption maximale ( $\lambda_{\max}$ ), spectres de masse, tentatives d'identification et formules moléculaires des produits présents dans la fraction n-butanol issue de l'extrait aqueux des feuilles de <i>P. atlantica</i>	<b>167</b>
<b>Tableau 4.6.</b> Temps de rétention (TR), longueurs d'ondes d'absorption maximale ( $\lambda_{\max}$ ), spectres de masse, tentatives d'identification et formules moléculaires des produits présents dans la fraction aqueuse issue de l'extrait aqueux des feuilles de <i>P. atlantica</i>	<b>169</b>
<b>Tableau 4.7.</b> Rendement du partage liquide-liquide de l'extrait aqueux de <i>P. atlantica</i>	<b>170</b>
<b>Tableau 4.8.</b> Récapitulatif du criblage phytochimique de l'extrait éthanolique de la plante entière de <i>S. lanatus</i> et <i>E. confusum</i>	<b>198</b>

# Résumé

Dans le but de valoriser des plantes médicinales dans le domaine de la recherche de nouveaux composés inhibant l'acétylcholinestérase (AChE), trois extraits provenant de trois plantes *Pistacia atlantica* Desf., *Solenanthus lanatus* A.DC. et *Echium confusum* de Coincy. ont été évalués. Ces extraits ont été soumis aux tests de bioautographie et à l'essai en solution par la méthode d'Ellman. Ces tests ont permis de sélectionner les extraits qui présentent une activité inhibitrice de l'AChE pour un fractionnement bioguidé. Vingt produits naturels ont été isolés. La caractérisation complète de ces produits s'est effectuée à l'aide de différentes méthodes spectroscopiques (MS, RMN 1D et 2D).

Dans un premier temps, un fractionnement bioguidé par différentes techniques chromatographiques (partage Liquide-Liquide, CC, LPLC, FC) de l'extrait aqueux des feuilles de *Pistacia atlantica* Desf. a été entrepris et a permis l'isolement et l'identification de huit produits phénoliques (**I-VIII**). L'extrait brut et des fractions enrichies de *P. atlantica*: AcOEt, n-BuOH et aqueuse ont été analysés par HPLC-DAD-UV et HPLC-API-ES-MS ce qui a permis d'identifier majoritairement des dérivés de l'acide gallique et de la quercétine.

Dans un deuxième temps, le fractionnement bioguidé de l'extrait éthanolique de la plante entière de *Solenanthus lanatus* A.DC. a conduit à l'isolement et à la caractérisation de quatre alcaloïdes pyrrolizidiniques, produits **IX, X, XI** et **XII** dont un nouveau produit naturel qui est le **7-angeloylechinatine N-oxyde** (produit **X**). À notre connaissance, ces alcaloïdes pyrrolizidiniques ont été caractérisés pour la première fois dans le genre *Solenanthus*.

Enfin, le fractionnement bioguidé de l'extrait éthanolique de la plante entière d'*Echium confusum* de Coincy a conduit à l'isolement et à la purification de huit alcaloïdes pyrrolizidiniques, produits **XIII-XX**.

La majorité des produits isolés ont montré une activité inhibitrice de l'AChE par le test de bioautographie. Les essais en solution par la méthode d'Ellman ont confirmé une activité modérée pour les produits isolés; par contre, les produits **XIV, XV** et **XVI** se sont révélés inactifs en solution.

Ainsi ce travail a permis de mieux connaître la phytochimie des trois plantes étudiées, et d'isoler de nouveaux produits naturels ayant une activité inhibitrice de l'AChE.

**Mots clés:** acétylcholinestérase, fractionnement bioguidé, chromatographie, polyphénols, alcaloïdes pyrrolizidiniques, RMN

Rapport-Gratuit.com

# Abstract

In order to valorize medicinal plants in the research of new compounds that inhibit acetylcholinesterase (AChE), three extracts from three plants *Pistacia atlantica* Desf., *Solenanthus lanatus* A.DC. et *Echium confusum* de Coincy were evaluated. These extracts were subjected to bioautography test and to solution test by the Ellman method. These tests were used to select the extracts that present AChE inhibitory activity for bioguided fractionation. Twenty natural compounds have been isolated. The complete characterization of these compounds was carried out using various spectroscopic methods (MS, 1D and 2D NMR).

Firstly, a bioguided fractionation by different chromatographic techniques (liquid-liquid partition, CC, LPLC, FC) of the aqueous extract of *Pistacia atlantica* Desf. leaves was undertaken and resulted in the isolation and identification of eight phenolic compounds (**I-VIII**). The crude extract and enriched fractions from *P. atlantica*: EtOAc, n-BuOH and aqueous were analyzed by HPLC-DAD-UV and HPLC-API-ES-MS and mainly derivatives of gallic acid and quercetin have been identified.

Secondary, the bioguided fractionation of the ethanolic extract of whole plant of *Solenanthus lanatus* A.DC. led to the isolation and characterization of four pyrrolizidine alkaloids, compounds **IX**, **X**, **XI** and **XII** including a new natural product: **7-angeloylechinatine N-oxide** (compound **X**). To our knowledge, these pyrrolizidine alkaloids have been characterized for the first time in the genus *Solenanthus*.

Finally, the bioguided fractionation of the ethanolic extract of the whole plant of *Echium confusum* de Coincy led to the isolation and purification of eight pyrrolizidine alkaloids, compounds **XIII-XX**.

The majority of the isolated products showed AChE inhibitory activity by bioautography test. The solution test by the Ellman method confirmed a moderate activity for the isolated compounds; however, compounds **XIV**, **XV** and **XVI** were found inactive.

Thus, this work has provided a better knowledge of phytochemistry of the three plants studied, and has allowed the isolation of new natural products with AChE inhibitory activity.

**Keywords:** acetylcholinesterase, bioguided fractionation, chromatography, polyphenolics, pyrrolizidine alkaloids, NMR.

# Introduction générale

L'Algérie possède une des flores les plus diversifiées et les plus originales du bassin méditerranéen. Cette flore compte 3.744 espèces réparties dans près de 150 familles (**Quezel et Santa, 1963**). Un grand nombre d'espèces a été utilisé traditionnellement pour le traitement de différentes maladies qui, pour la plupart, n'ont pas fait l'objet d'études scientifiques. En effet, plusieurs de ces espèces sont chimiquement inconnues et peuvent être dangereuses pour la santé. D'autres espèces ne sont pas encore utilisées dans la médecine traditionnelle et peuvent être potentiellement intéressantes.

L'utilisation des produits naturels bioactifs à base de drogues végétales préparées remonte à des centaines, voir des milliers d'années. Leurs applications en tant que composés isolés, ont contribué au développement et à la découverte moderne des médicaments qui n'ont commencé qu'au XIX<sup>ème</sup> siècle, aube de l'ère chimiothérapie. Il est bien admis que les produits naturels ont joué un rôle crucial dans le développement des médicaments modernes, spécialement en tant qu'agents antibactériens et anti-tumoraux. Les produits naturels ont été la principale source pour la médecine commerciale et les médicaments. Un sondage récent a révélé que 61 % des 877 médicaments introduits dans le monde peuvent être attribués à des produits naturels ou inspirés de ces derniers. Parmi les 350.000 espèces végétales, un tiers a été étudié. Sur un quart des recherches publiées sur ces espèces, seulement une fraction d'entre elles a été étudiée chimiquement.

La découverte des médicaments à base de plantes médicinales fournit des pistes nouvelles et importantes vis à vis des cibles pharmacologiques variées, qui incluent le cancer, le virus HIV du sida, les maladies neurodégénératives et la malaria. Les drogues dérivées des plantes médicinales par synthèse chimique, peuvent servir comme de nouveaux médicaments.

La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie évolutive, dégénérative du cerveau. Cette maladie est la forme la plus commune de démence affectant surtout les personnes âgées, avec une durée moyenne de 3 à 10 ans entre l'apparition des symptômes cliniques et la mort. L'incidence de la MA augmente avec l'âge, même pour les personnes les plus âgées: à partir de 0,5 % à l'âge de 65 ans, elle s'élève à près de 8 % à l'âge de 85 ans (**Liang et Fang, 2006**). Le nombre de personnes touchées à travers le monde est de 36,5 millions <sup>(1)</sup> avec 2,4 millions de cas aux Etats-Unis d'Amérique <sup>(2)</sup>, 860.000 cas en France <sup>(3)</sup>, 100.000 cas en Algérie. On estime que ce nombre pourrait atteindre 65,7 millions <sup>(2)</sup> vers 2030.



La neuropathologie de la MA est caractérisée par des dépôts amyloïdes parenchymateux ou plaques neuriques, des dépôts intraneuronaux de neurofibrilles, des angiopathies amyloïdes cérébrales et pertes synaptiques (**Ghiso et Frangione, 2002**). En se basant sur la constatation que l'acétylcholine (ACh) est sévèrement réduite dans le cerveau des patients souffrant de la MA, le traitement courant de la MA dans la plupart des pays consiste à administrer des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChEIs) afin d'augmenter le taux de l'ACh au niveau de la fente synaptique par l'inhibition de l'AChE. Cette dernière enzyme est responsable de la dégradation de l'ACh, neurotransmetteur qui joue un rôle important dans la transmission du flux nerveux et qui est cruciale dans les processus de formation de la mémoire (**Liang et Fang, 2006**). Notons que les AChEIs ont par ailleurs aussi un effet insecticide et antiparasitaire.

À ce jour, quatre AChEIs, Cognex® (Tacrine), Aricept® (Donépezil ou E2020), Exelon® (Rivastigmine) dérivé de la physostigmine présente dans *Physostigma venenosum* Balf, et Reminyl® (galanthamine hydrobromide) isolé de *Galanthus nivalis* L., sont actuellement approuvés comme médicaments de prescription par les États-Unis d'Amérique pour traiter les symptômes avec une intensité légère à modérée de la MA. Cependant, l'efficacité clinique des AChEIs est limitée par sa courte demi-vie et ses effets secondaires excessifs causés par l'activation des systèmes cholinergiques périphériques, ainsi que par l'hépatotoxicité, qui est le plus fréquent et important effet secondaire de la thérapie par la Tacrine (**Farlow et al., 1992; Rogers et al., 1998**). Il y a donc une nécessité à rechercher de nouvelles substances présentant à la fois une forte activité, une toxicité moindre, ainsi qu'une demi-vie plus longue.

Dans une première partie, trois plantes médicinales algériennes: *Pistacia atlantica* Desf., *Solenanthus lanatus* A.DC. et *Echium confusum* de Coincy sont choisies pour une extraction guidée par test biologique afin de rechercher de nouveaux composés inhibiteurs de l'AChE. La sélection de ces espèces s'est basée sur leurs utilisations en médecine traditionnelle, ainsi que sur le résultat du test biochimique par bioautographie. Parallèlement, l'isolement d'autres composés, inactifs sur cette cible, a été effectué afin de contribuer à la connaissance phytochimique des plantes étudiées et qui pourraient trouver une utilisation en thérapeutique.

L'identification d'inhibiteurs de l'AChE a été réalisée par l'utilisation d'une méthode bioautographique sur CCM. Dans une deuxième partie, une comparaison entre ce test et le test en solution par la méthode d'Ellman a été entreprise afin d'évaluer la pertinence des résultats obtenus.

La technique analytique de CCM a été employée pour déterminer les principales classes phytochimiques présentes dans les extraits étudiés. Par ailleurs, certaines techniques analytiques couplées, telle que l'HPLC-UV et l'HPLC-MS, sont aussi employées, afin d'identifier les phytoconstituants des extraits étudiés, ceci permet de montrer le rôle de ces techniques dans le domaine de la dérégulation d'extraits.

Etude  
bibliographique

## **2.1. Plantes étudiées**

### **2.1.1. La famille des Anacardiaceae**

#### **2.1.1.1. Introduction**

Les Anacardiaceae (ordre Sapindales/Rutales, voir **figure 2.1**) sont une petite famille de dicotylédone composée de 600 espèces réparties en 70 genres, bien que certains auteurs répertorient quatre-vingt espèces (**Hormaza et Wunsch, 2011; Pell et al., 2011**). La majorité des espèces de cette famille sont d'origine tropicale (**Watson et Dallwitz, 1992**). La classification la plus largement acceptée divise la famille en cinq tribus: Anacardieae, Rhoeeae, Semecarpeae, Spondiadeae et Dobineae (**Mitchell et Mori, 1987; Wannan et Quinn, 1991**) avec attribution du genre *Pistacia* à la tribu Rhoeeae (**Mitchell et Mori, 1987**).

Les fleurs sont de petites formes en grappes ramifiées (panicules) et sont unisexuées ou bisexuées. Les fruits sont habituellement des drupes (**Glimn-Lacy et Kaufman, 2006**).

La région phytogéographique, Malaisie, qui s'étend de la péninsule malaise à l'archipel Bismarck à l'Est de la Nouvelle-Guinée, contient plus de genres au sein de cette famille que toute autre région du monde (**Bompard et Schnell, 1998**). Il existe plusieurs espèces d'arbres économiquement importants au sein de cette famille. L'anacardier (*Anacardium occidentale* L.) et le mombin jaune et pourpre (*Spondias mombin* L. et *S. purpurea* L.) sont des espèces néotropicales d'Anacardiaceae. Le prunier kaffir (*Harpephyllum caffrum* Bernh.) et le marula (*Sclerocarya caffra* Sond.) sont originaires d'Afrique du Sud. La mangue (*Mangifera indica* L.), le pommier de cythère (*S. dulcis* Forst.) et les espèces du genre *Bouea* ont un centre d'origine dans le Sud-est asiatique. Le pistachier (*Pistacia vera* L.) est probablement originaire de l'Iran et de l'Asie centrale. Beaucoup d'espèces d'Anacardiaceae sont exploitées pour leurs bois et pour leurs produits secondaires, telles que la cire et le vernis (*Rhus* sp. et *Melanorrhoea* sp.), les gommés et les résines (*Pistacia* sp.), les ingrédients de tannage (*Mangifera* sp., *Rhus* sp. et *Schinus* sp.) (**Litz, 2005**), les aliments (*A. occidentale* L. (pommier-cajou), *M. indica* L. (mangue), *P. vera* L. (pistache)), l'ornementation (*Cotinus coggygria* Scop., *R. aromatica* Ait. (sumac aromatique), *R. copallina* L. (sumac ailé), *R. typhina* L. (sumac vinaigrier)), et comme poison (*Metopium toxiferum* L., *Toxicodendron verniciflua* (Stokes) F.A. Barkley, *T. radicans* (L.) Kuntze (sumac radican, lierre toxique), *T. diversiloba* (Torrey & Gray) Green (sumac de l'Ouest ou chêne toxique), *T. vernix* (L.) Kuntze (sumac toxique)) (**Glimn-Lacy et Kaufman, 2006**). Le contact avec de nombreuses

espèces est connu pour induire de graves irritations dermiques, par exemple les *Rhus* sp. du Nord Américain (lierre empoisonné) et les *Gluta* sp. du Sud-est Asiatique. La sève et le pollen de plusieurs espèces, y compris *Mangifera* sp. et *Schinus* sp., peuvent stimuler des réactions allergiques graves (Litz, 2005).

**Règne:** Plantae

**Embranchement:** Spermatophyta

**Sous-embranchement:** Angiospermae

**Classe:** Magnoliopsida

**Sous-classe:** Malvidae

**Super-ordre:** Rutanae

**Ordre:** Rutales

**Famille:** Anacardiaceae

**Sous-famille:** Anacardiaceae

Rhoaceae (→*Pistacia*)

Semecarpeae

Spondiadeae

Dobineae

**Figure 2.1.** Position systématique de la famille Anacardiaceae (Mitchell et Mori, 1987; Wannan et Quinn, 1991; Thorne, 2007).

### **2.1.1.2. Classification systématique, description botanique et distribution**

#### **2.1.1.2.1. Taxonomie et phylogénie**

La famille des Anacardiaceae a d'abord été proposée par Lindley en 1830, mais ses membres ont été diversement placés dans d'autres familles, incluant Blepharocaryaceae, Comocladiaceae, Julianiaceae, Pistaciaceae, Podoaceae, Rhoaceae, Schinaceae, Spondiadiaceae et Terebinthaceae. Engler (1892) a divisé la famille en cinq tribus, Dobineae, Mangifereae, Rhoideae, Semecarpeae et Spondieae. Il les circonscrit en utilisant plusieurs caractères floraux et de fruits, incluant le nombre de carpelles, l'insertion de l'ovule sur le placenta, le nombre de spires staminales, la complexité des feuilles, le nombre de locules dans l'ovaire et les fruits, la morphologie de l'embryon, et l'insertion styloaire sur l'ovaire. La circonscription tribale a été révisée par Mitchell et Mori (1987), qui ont mis à jour la modification de Ding (1978) basée sur la classification d'Engler. Cependant, cette

classification a été remise en question plus récemment. **Wannan et Quinn (1990; 1991)** ont utilisé la structure florale et du péricarpe, l'anatomie du bois, et les données des biflavonoïdes pour étudier la classification des Anacardiaceae. Ils tentent d'identifier deux groupes, A et B, qui ont été divisés chacun en deux sous-groupes, 1 et 2. Les Tribus d'**Engler** Anacardiaceae, Dobineae, Rhoeae et Semecarpeae, à l'exception d'*Androtium*, *Buchanania*, *Camptosperma* et *Pentaspadon*, ont été placées dans le groupe A, tandis que le groupe B contient tous les Spondiadeae plus les quatre genres nommés ci-dessus (deux genres de chacun des Anacardiaceae et des Rhoeae). **Wannan et Quinn (1991)** ont désigné deux genres, *Faguetia* et *Pseudoprotorhus*, attribuables à aucun groupe. Dans une première investigation moléculaire des Anacardiaceae, **Terrazas (1994)** a utilisé des séquences du gène de chloroplaste *rbcL*, avec des données sur la morphologie et l'anatomie du bois pour interpréter la phylogénie de la famille. Il a élucidé une Anacardiaceae monophylétique composée de deux groupes. Le premier groupe, clade A2, contient les Spondiadeae ainsi que *Pentaspadon*, il est uni par la synapomorphie morphologique des glandes multicellulaires situées sur les feuilles. Le deuxième groupe, clade A1, contient d'autres genres dans quatre tribus, et est caractérisé par les synapomorphies anatomiques et morphologiques du bois, les glandes unicellulaires situées sur les feuilles et la présence des deux fibres cloisonnées et non cloisonnées. Se basant sur la phylogénie combinée, **Terrazas (1994)** a proposé de manière informelle le fractionnement de la famille en deux sous-familles, Anacardioideae et Spondioideae. **Pell (2004)** a proposé une division similaire de la famille fondée sur l'analyse de trois gènes de plaste, il décrit et circonscrit les deux sous-familles (**Pell, 2004; Mitchell et al., 2006**). Cette classification est la plus suivie, à l'exception du placement subfamilial de *Buchanania*: les données moléculaires récentes ont aidé à résoudre les données morphologiques ambiguës, et suggèrent que ce genre est un membre de la sous-famille des Spondioideae. Il convient de noter que les récentes analyses, avec un plus large échantillonnage des données de l'cpDNA (*trnLF* et *rps16*) et nrDNA (ETS) (**Pell et al., 2011**) indiquent que la sous-famille Spondioideae (anciennement reconnue comme tribu Spondiadeae) est polyphylétique. Cependant, les deux sous-familles comme circonscrites par **Mitchell et al. (2006)** sont structurellement reconnaissables, et le classement subfamilial formel n'a pas encore été attribué aux clades nouvellement résolus.

Les phylogénies élucidées par **Pell et al. (2011)** ajoutent un support pour plusieurs relations au sein de la famille. La position dans les Anacardiaceae de plusieurs familles autrefois distinctes, y compris les Podoaceae (*Campylopetalum* et *Dobinea*), les Julianiaceae (*Amphipterygium* et *Orthopterygium*) et les Pistaciaceae (*Pistacia*) a été étayée par des

données moléculaires. Les principaux membres de l'ancienne tribu des Anacardiaceae (*Anacardium*, *Bouea*, *Fegimanra*, *Gluta*, *Mangifera*) forment un clade. Le genre *Rhus* est polyphylétique, avec un maximum de cinq origines différentes, et sa taxonomie nécessite une révision (Miller *et al.*, 2001; Pell, 2004; Yi *et al.*, 2004; 2007; Pell *et al.*, 2008). Moffett (2007) a publié les nouvelles combinaisons dans *Searsia* pour les anciennes espèces de *Rhus* dont la plupart sont africaines, mais beaucoup de travail reste à faire. Les Anacardiaceae sont les plus étroitement reliées aux Burseraceae. Les deux familles partagent les synapomorphies des canaux verticaux intercellulaires sécrétoires dans le phloème primaire et secondaire, et sont souvent horizontaux dans les rayons de bois, et la capacité de synthétiser les biflavonoïdes (Wannan *et al.*, 1985; 1986; Wannan et Quinn, 1990; 1991; Terrazas, 1994). En outre, dans ces familles les ovules sont souvent attachés à un court, large obturateur placentaire, et les plantes sont fortement résineuses.

La relation étroite des Anacardiaceae et des Burseraceae a été suggérée par de nombreux auteurs sur la base de caractéristiques morphologiques, anatomiques et des données biochimiques (Gundersen, 1950; Cronquist, 1981; Wannan, 1986; Takhtajan, 1987; Thorne, 1992), encore soutenue par des données de séquences d'ADN (Gadek *et al.*, 1996; APG, 1998; Savolainen *et al.*, 2000a,b; APG, 2003; Pell, 2004; APG, 2009). Néanmoins, les Anacardiaceae se distinguent des Burseraceae pour avoir un seul ovule par locule contre deux ovules par locule, respectivement. Des fonctionnalités supplémentaires qui ne sont pas universelles, mais souvent séparent efficacement les deux familles, incluent les caractéristiques chimiques et de fruits. Les Burseraceae manquent de composés chimiques qui sont présents dans de nombreux Anacardiaceae, y compris les 5-désoxyflavonoïdes et les composés causant une dermatite après un contact. Tous les fruits des Anacardiaceae sont indéhiscent, tandis que de nombreux fruits des Burseraceae sont déhiscent; certains Burseraceae ont des stipules ou pseudostipules qui font défaut chez les Anacardiaceae.

Historiquement la famille des Anacardiaceae a été placée dans les classements taxonomiques les plus élevés de Burserales, Rutales, Sapindales ou Terebinthinae. La plupart des auteurs modernes la considèrent comme un membre des Sapindales, et des études moléculaires récentes à un niveau ordinal (Gadek *et al.*, 1996) et au-dessus (Chase *et al.*, 1993; Bremer *et al.*, 1999; Savolainen *et al.*, 2000a,b; APG, 2003; 2009) soutiennent cette classification.

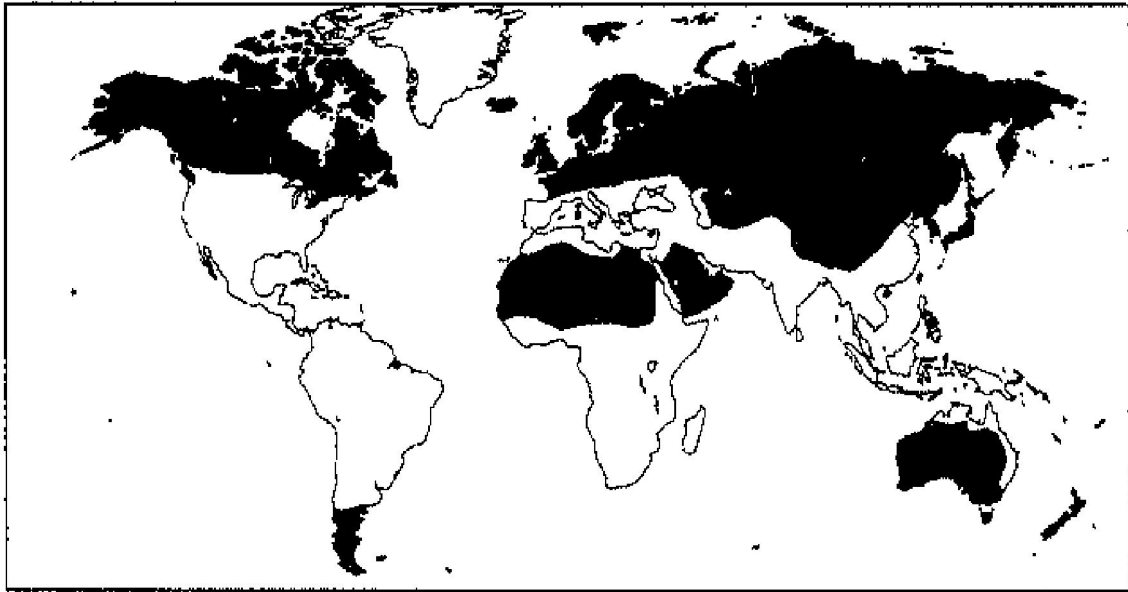
### **2.1.1.2.2. Description botanique**

Les Anacardiaceae sont des arbres et arbustes parfois arbustes sarmenteux, herbacées grimpantes, ou des lianes avec des canaux résineux et claires pour la sève laiteuse qui peut devenir noire par exposition à l'air et est souvent toxique, causant une dermatite sévère par contact. Les produits chimiques irritants peuvent être distribués dans toutes les parties de la plante ou concentrés dans des organes particuliers, par exemple, dans la paroi du fruit de noix de cajou (*A. occidentale* L.). Les feuilles sont alternes, rarement opposées (*Abrahamia*, *Belpharocarya*, *Bouea*), non stipulées, souvent pennées, parfois simples (*Cotinus*, *Anacardium*, *Mangifera*). Les fleurs sont actinomorphes et bisexuées, ou parfois unisexuées, petites et discrètes, en panicules axillaires ou terminales, thyrses, épis, en grappes, en fascicules ou solitaires. Sépales (3-)5(-7), habituellement connés à la base, mais libres au-dessus. Pétales (3-)5(-7), rarement absents, et libres. Étamines 5 à 10 ou plus, formant un tube. Un réceptacle charnu (disque) est généralement présent. Les staminodes sont présents dans les fleurs femelles. L'ovaire est généralement supérieur (inférieur dans *Drimycarpus*) et comprend 1 ou 3 à 5 carpelles unis, très rarement libres, avec 1-5 locules, contenant chacun un seul ovule. Il y a 1-3 styles, parfois absents. Le fruit est généralement indéhiscent et drupacé mais une diversité des types de fruits inhabituels se produit également, comme des samares encerclées par une aile marginale (*Campylopetalum*, *Dobinea*, *Laurophyllus*), des samaroides avec une seule aile (*Faguetia*, *Loxopterygium*), ou des akènes (*Apterokarpos*). Dans l'*Anacardium* et *Semecarpus*, l'hypocarpe est élargie et comestible. La graine solitaire peut avoir un endosperme mince, ou aucun (**Heywood et al., 2007**). Les cotylédons habituellement planoconvexes ou plats et distincts, généralement de taille égale, rarement fusionnés ou ruminés, parfois bilobés (**Pell et al., 2011**).

### **2.1.1.2.3. Distribution**

La famille se distribue dans les deux hémisphères Est et Ouest (**Figure 2.2**), avec une représentation plus ou moins égale en Amérique du Sud, en Afrique et en Asie. Plusieurs genres sont originaires d'Amérique du Nord et d'Eurasie (par exemple, *Rhus*, *Pistacia* et *Cotinus*). La famille s'est diversifiée en Europe Centrale, Amérique du Sud, Afrique du Sud et Centrale, à Madagascar, en Indochine, et en Malaisie. Le plus grand genre, *Rhus*, avec 200 espèces est présent dans les deux régions tempérées et tropicales des deux hémisphères. *Semecarpus* (60 espèces) est Indo-Malaisienne dans la distribution (**Heywood et al., 2007; Takhtajan, 2009; Pell et al., 2011**).





**Figure 2.2.** Distribution géographique de la famille des Anacardiaceae (Heywood *et al.*, 2007)

### 2.1.1.3. Importance économique

Les principaux produits alimentaires agricoles des Anacardiaceae sont les noix de cajou (*Anacardium*), les mangues (*Mangifera*), les baies roses (*Schinus*), et les pistaches (*Pistacia*). Cependant, de nombreux taxons ont d'autres parties comestibles de valeur régionale élevée (par exemple, *Antrocaryon*, *Buchanania*, *Choerospondias*, *Cyrtocarpa*, *Harpephyllum*, *Lannea*, *Ozoroa*, *Rhus*, *Searsia*, *Spondias*, *Tapirira*, *Trichoscypha*). La crème d'amarula est faite du fruit de marula (Hall *et al.*, 2002). La noix de cajou (*A. occidentale* L.) donne trois principaux produits économiques: les semences (noix de cajou), l'hypocarpe (pomme de cajou), et la résine de mésocarpe (liquide de noix de cajou). La noix de cajou est consommée crue ou grillée, et est utilisée dans les confiseries. Les pommes de cajou sont plus importantes localement qu'à l'échelle mondiale, et sont consommées fraîches, comme jus. Le liquide de coquille de noix de cajou est utilisé industriellement dans la fabrication de divers polymères tels que les plastiques, les adhésifs, les lubrifiants, et les résines. Parmi ces produits, la semence est loin la plus importante sur le plan économique. Les principaux pays producteurs sont le Brésil, l'Inde, l'Indonésie, la Guinée, le Mozambique, le Nigéria, la Tanzanie et le Vietnam (Behrens, 1996). *Astronium* et *Myracrodruon* sont d'une importance significative pour le bois exporté. D'autres genres fournissent du bois utilisé pour fabriquer des allumettes, des armoires, des arcs, du charbon, des meubles, bois de chauffage, et des ustensiles de cuisine. De nombreuses espèces d'Anacardiaceae sont appréciées pour leur importance

horticole. Des spécimens de *Cotinus*, *Harpephyllum*, *Lannea*, *Pistacia*, *Rhodosphaera*, *Rhus*, *Schinus*, *Searsia*, *Smodingium* et *Toxicodendron* sont plantés pour leurs belles inflorescences, leur feuillage persistant, et/ou leur feuillage d'automne (Pell *et al.*, 2011).

### 2.1.1.4. Utilisations médicinales et effets biologiques et pharmacologiques

Les Anacardiaceae sont connues depuis longtemps pour leurs propriétés médicinales (Pell *et al.*, 2011). *Spondias* et *Rhus* sont largement utilisés par les populations indigènes pour de nombreux maux, de la guérison des fractures au traitement du rhume. D'autres taxons sont utilisés pour traiter la fièvre (*Buchanania*, *Comocladia*), l'hépatite (*Haematostaphis*), les troubles gastro-intestinaux (*Anacardium*, *Antrocaryon*, *Heeria*, *Lannea*, *Ozoroa*, *Pseudospondias*, *Schinus*, *Sorindeia*), les maladies respiratoires (*Astronium*), les maladies de la peau et/ou des blessures (*Buchanania*, *Lannea*, *Metopium*, *Ozoroa*, *Schinus*, *Sclerocarya*, *Searsia*, *Sorindeia*, *Trichoscypha*), les maladies vénériennes (*Buchanania*, *Lannea*), diverses conditions liées à la grossesse (*Metopium*, *Ozoroa*, *Trichoscypha*), et comme astringents (*Anacardium*, *Astronium*, *Mangifera*) (Morton, 1981; Burkill, 1985; Mitchell, 2004).

La médecine moderne s'est beaucoup intéressé aux utilisations ethnobotaniques et a permis d'isoler plusieurs composés actifs de différentes parties végétatives (Pell *et al.*, 2011). Le cardol, un composé extrait du péricarpe du cajou, présente une activité contre la filariose, une maladie tropicale majeure causée par des parasites filaires qui touche plus de 400 millions de personnes dans le monde (Suresh et Raj, 1990). Trois acides anacardiques isolés du jus de "pomme" de noix de cajou se sont révélés avoir une cytotoxicité significative *in vitro* contre les cellules BT-20 du carcinome du sein (Kubo *et al.*, 1993). L'extrait des feuilles de *R. coriaria* L. possède des activités antioxydantes, anticholinestérasiques réalisées sur des modèles *in vitro* et antibactériennes contre des bactéries Gram négatives et positives (Danis *et al.*, 2014). Les urushiols isolés des feuilles de *R. verniciflua* (Stokes) F.A. Barkley présentent une activité inhibitrice de l'enzyme HIV-1 reverse transcriptase (Kadokura *et al.*, 2015). Sulfuretine et buteine isolées des écorces de *T. vernicifluum* (Stokes) F.A. Barkley présentent une activité anti-inflammatoire et cytotoxique (Kim *et al.*, 2015). Trois acides anacardiques isolés à partir de l'huile de noix de cajou fournissent une puissante activité antibactérienne contre *Streptococcus mutans*, une bactérie qui adhère à la surface des dents et facilite l'accumulation d'autres micro-organismes oraux qui produisent des acides organiques qui détruisent l'émail, conduisant à la formation de cavités (Muroi et Kubo, 1993).

### **2.1.1.5. Toxicité**

La plupart des substances toxiques sont des phénols, principalement des catéchols et des résorcinols qui s'accumulent dans les canaux de résine. Les pentadecylcatéchols (souvent appelés urushiols) sont des composés qui induisent une dermatite et qui sont présents dans les plantes suivantes: le sumac vénéneux, sumac au vernis, et l'arbre à laque asiatique (*Toxicodendron* sp.); ils sont également présents dans *Gluta*, *Holigarna*, *Lithrea*, *Metopium*, *Semecarpus* et *Smodingium*. Les heptadecylcatéchols se trouvent dans *Gluta*, *Lithrea*, *Metopium*, *Semecarpus* et *Toxicodendron*. Les dérivés de l'acide salicylique (acide anacardique) ont été identifiés dans *A. occidentale* L. et *Pentaspadon*. D'autres composés toxiques qui se trouvent dans la famille comprennent les bhilawanols (*Semecarpus*), le glutarenghol, le laccol (*Toxicodendron*), le moreakol (*Gluta usitata* Wall.) (Behl et Capitain, 1979), le thitsiol (*Gluta*), le renghol (*Gluta*, *Semecarpus*), et le semecarpol (un phénol monohydroxylé trouvé dans *Semecarpus*) (Behl et Capitain, 1979). Les composés mentionnés ci-dessus sont de structures diversifiées et peuvent causer une réaction du système immunitaire lors de la liaison avec les protéines de la peau (Mitchell, 1990). Les humains et les autres animaux allergiques à ces composés peuvent avoir une très légère réaction à une réaction mortelle en fonction de la région de contact, des espèces rencontrées, et de la sévérité de leur allergie. La chimie de ces composés toxiques a été recherchée pour de nombreux taxons (Hill *et al.*, 1934; Backer et Haack, 1938; Loev, 1952; Tyman et Morris, 1967; Johnson *et al.*, 1972; Gross *et al.*, 1975; Halim *et al.*, 1980; Stahl *et al.*, 1983; Gambaro *et al.*, 1986), mais la cause de la toxicité dans autres espèces est inconnue.

### **2.1.1.6. Principaux métabolites secondaires isolés de la famille Anacardiaceae**

Les métabolites secondaires (tableau 2.1) au sein des membres d'Anacardiaceae ont été largement étudiés (Aguilar-Ortigoza et Sosa, 2004). Plusieurs de ces études ont porté sur l'activité biologique des composés phénoliques (Corthout *et al.*, 1994), des esters (Corthout *et al.*, 1992; Galvez *et al.*, 1992), et des tanins (Corthout *et al.*, 1991; Galvez *et al.*, 1991; Viana *et al.*, 1997). D'autres ont porté sur les composés toxiques tels que ceux causant une dermatite suite à un contact (Mitchell, 1990; Rivero-Cruz *et al.*, 1997; Drewes *et al.*, 1998), et ceux responsables des allergies à partir de noix (Jansen *et al.*, 1992; Fernandez *et al.*, 1995). Certains composés isolés d'Anacardiaceae se sont révélés avoir une fonction défensive. Ils agissent notamment comme antimicrobiens (Saxena *et al.*, 1994) et antifongiques et/ou insecticides et herbivores (Chen et Wiemer, 1984; Cojocararu *et al.*, 1986). Les composés

Tableau 2.1. Métabolites secondaires isolés des espèces d'Anacardiaceae.

Composés isolés	Structures	Classes phytochimiques	Espèces	Références
Agathisflavone		Flavonoïdes	<i>Anacardium occidentale</i> L.	Ajileye <i>et al.</i> , 2015
Quercétine 3-O-rutinoside		Flavonoïdes	<i>A. occidentale</i> L.	Ajileye <i>et al.</i> , 2015
Quercétine 3-O-rhamnoside		Flavonoïdes	<i>A. occidentale</i> L.	Ajileye <i>et al.</i> , 2015

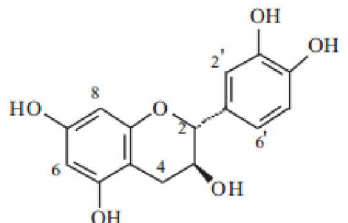
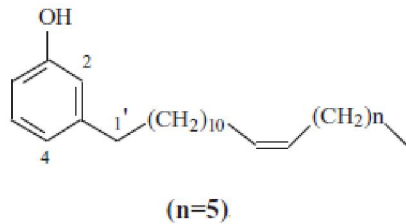
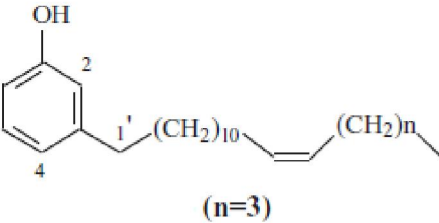
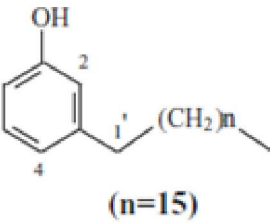
<p><b>(+)-Catéchine</b></p>		<p>Flavonoïdes</p>	<p><i>Harpephyllum caffrum</i> Bernh.</p>	<p><b>Moodley et al., 2014</b></p>
<p><b>Cardanol a</b></p>	 <p>(n=5)</p>	<p>Lipides phénoliques</p>	<p><i>H. caffrum</i> Bernh.</p>	<p><b>Moodley et al., 2014</b></p>
<p><b>Cardanol b</b></p>	 <p>(n=3)</p>	<p>Lipides phénoliques</p>	<p><i>H. caffrum</i> Bernh.</p>	<p><b>Moodley et al., 2014</b></p>
<p><b>Cardanol c</b></p>	 <p>(n=15)</p>	<p>Lipides phénoliques</p>	<p><i>H. caffrum</i> Bernh.</p>	<p><b>Moodley et al., 2014</b></p>

Tableau 2.1 suite.

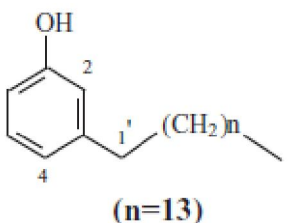
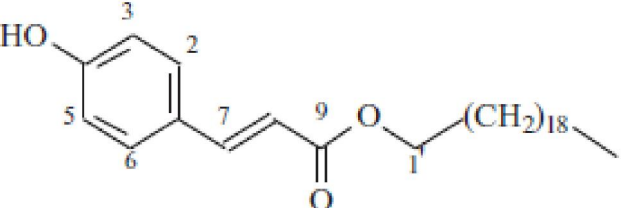
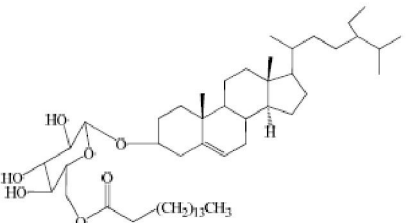
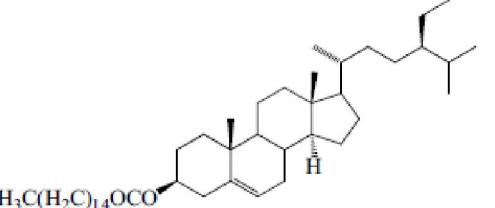
<p><b>Cardanol d</b></p>	 <p>(n=13)</p>	<p>Lipides phénoliques</p>	<p><i>H. caffrum</i> Bernh.</p>	<p><b>Moodley et al., 2014</b></p>
<p><b>Eicosanyl-trans-<i>p</i>-coumarate</b></p>		<p>Lipides phénoliques</p>	<p><i>H. caffrum</i> Bernh.</p>	<p><b>Moodley et al., 2014</b></p>
<p><b><math>\beta</math>-sitosteryl- 3<math>\beta</math>-glucopyranoside- 6'-<i>O</i>-palmitate</b></p>		<p>Stérols</p>	<p><i>Lannea coromandelica</i> (Houtt.) Merr.</p>	<p><b>Yun et al., 2014</b></p>
<p><b><math>\beta</math>-sitosterol palmitate</b></p>		<p>Stérols</p>	<p><i>L. coromandelica</i> (Houtt.) Merr.</p>	<p><b>Yun et al., 2014</b></p>

Tableau 2.1 suite.

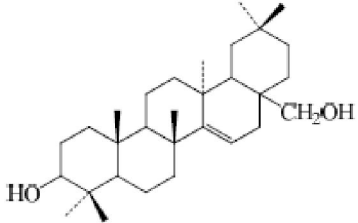
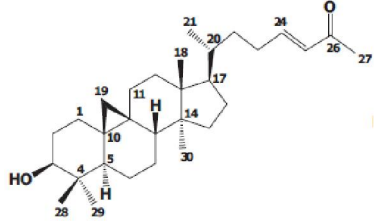
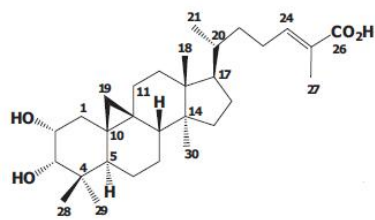
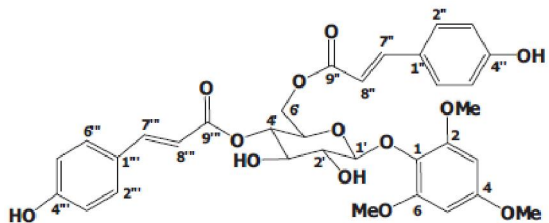
<p><b>Myricadiol</b></p> 	<p>Terpènes</p>	<p><i>L. coromandelica</i> (Houtt.) Merr.</p>	<p><b>Yun et al., 2014</b></p>
<p><b>Mangiferine A</b></p> 	<p>Terpènes</p>	<p><i>Mangifera foetida</i> Lour.</p>	<p><b>Panthong et al., 2015</b></p>
<p><b>Mangiferine B</b></p> 	<p>Terpènes</p>	<p><i>M. foetida</i> Lour.</p>	<p><b>Panthong et al., 2015</b></p>
<p><b>(+)-syringaresinol</b></p> 	<p>Lignanes</p>	<p><i>M. foetida</i> Lour.</p>	<p><b>Panthong et al., 2015</b></p>

Tableau 2.1 suite.

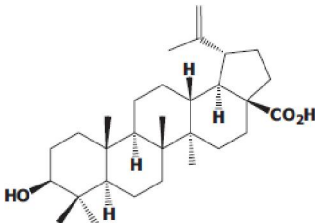
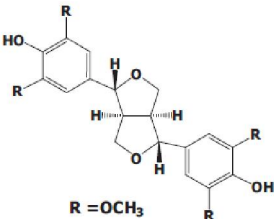
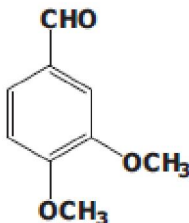
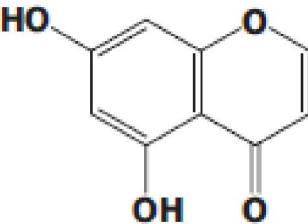
Acide betulinique		Terpènes	<i>M. foetida</i> Lour.	Panthong <i>et al.</i> , 2015
Mangiferzène glucoside	 <p>R = OCH<sub>3</sub></p>	Coumaroyl glucoside	<i>M. foetida</i> Lour.	Panthong <i>et al.</i> , 2015
Vanilline		Aldéhyde aromatique	<i>M. foetida</i> Lour.	Panthong <i>et al.</i> , 2015
5,7-dihydroxychromone		Benzopyranes	<i>M. foetida</i> Lour.	Panthong <i>et al.</i> , 2015

Tableau 2.1 suite.



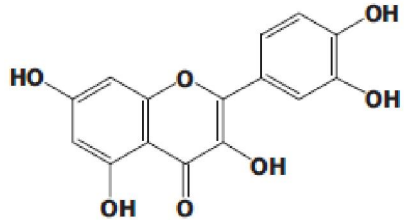
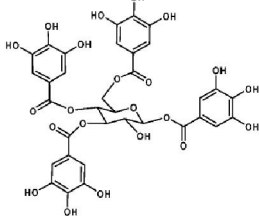
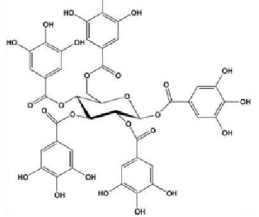
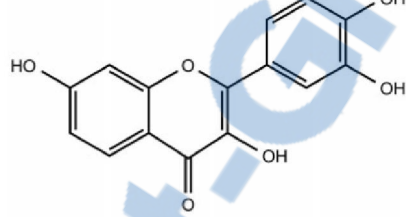
<p><b>Quercétine</b></p>		<p>Flavonoïdes</p>	<p><i>M. foetida</i> Lour.</p>	<p><b>Panthong <i>et al.</i>, 2015</b></p>
<p><b>Tetra-<i>O</i>-galloyl-glucoside</b></p>		<p>Tannins hydrolysables</p>	<p><i>M. indica</i> L.</p>	<p><b>Barreto <i>et al.</i>, 2008</b></p>
<p><b>Penta-<i>O</i>-galloylglucose</b></p>		<p>Tannins hydrolysables</p>	<p><i>Rhus trichocarpa</i> Miquel</p>	<p><b>Cho <i>et al.</i>, 2010</b></p>
<p><b>Fisetine</b></p>		<p>Flavonoïdes</p>	<p><i>R. verniciflua</i> stokes</p>	<p><b>Lee <i>et al.</i>, 2014</b></p>

Tableau 2.1 suite.

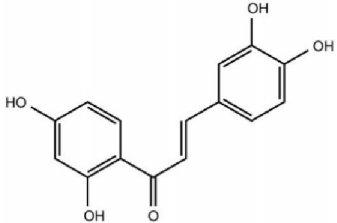
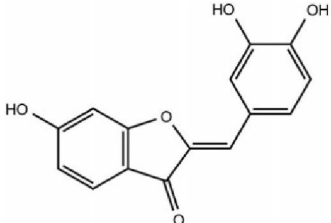
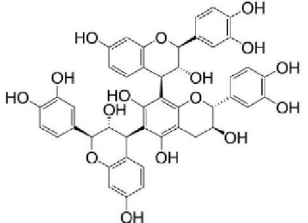
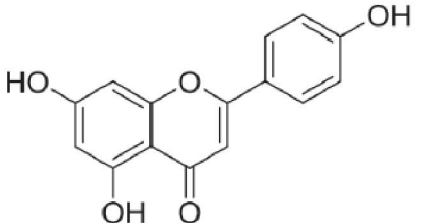
<p><b>Buteine</b></p>		<p>Flavonoïdes</p>	<p><i>R. verniciflua</i> stokes</p>	<p><b>Lee et al., 2014</b></p>
<p><b>Sulfuretine</b></p>		<p>Flavonoïdes</p>	<p><i>R. verniciflua</i> stokes</p>	<p><b>Lee et al., 2014</b></p>
<p><b>Trimer entfisetinidol-(4β→8)-catechine-(6→4β)-ent-fisetinidol</b></p>		<p>Tannins condensés</p>	<p><i>Schinopsis balansae</i> Engl.</p>	<p><b>Venter et al., 2012</b></p>
<p><b>Apigénine</b></p>		<p>Flavonoïdes</p>	<p><i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi</p>	<p><b>Bernardes et al., 2014</b></p>

Tableau 2.1 suite.

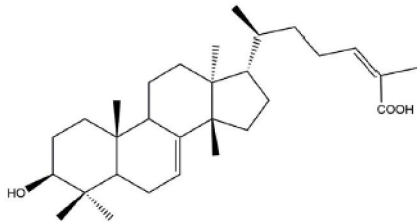
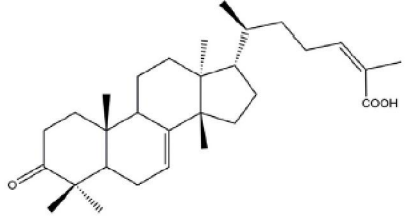
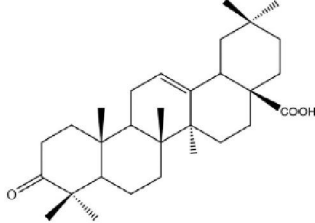
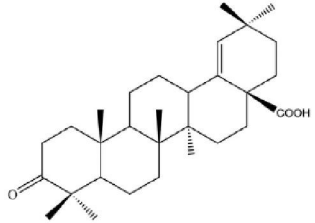
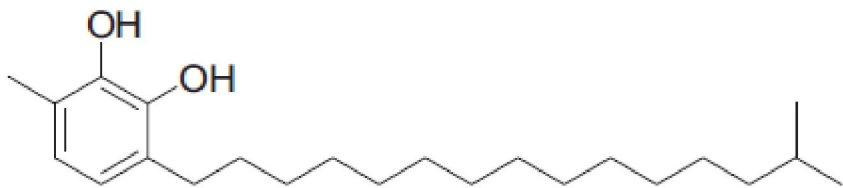
<p><b>Acide masticadienonique</b></p>		<p>Terpènes</p>	<p><i>S. terebinthifolius</i> Raddi</p>	<p><b>Vieira et al., 2015</b></p>
<p><b>Acide 3 β-masticadienolique</b></p>		<p>Terpènes</p>	<p><i>S. terebinthifolius</i> Raddi</p>	<p><b>Vieira et al., 2015</b></p>
<p><b>Acide alsooleanonique</b></p>		<p>Terpènes</p>	<p><i>S. terebinthifolius</i> Raddi</p>	<p><b>Vieira et al., 2015</b></p>
<p><b>Acide moronique</b></p>		<p>Terpènes</p>	<p><i>S. terebinthifolius</i> Raddi</p>	<p><b>Vieira et al., 2015</b></p>
<p><b>Dérivé catéchol I</b></p>		<p>Dérivés catéchols</p>	<p><i>Semecarpus anacardium</i> L.</p>	<p><b>Sundaram et al., 2014</b></p>

Tableau 2.1 suite.

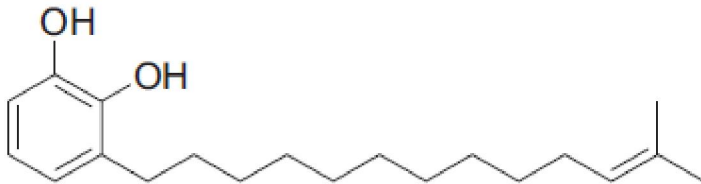
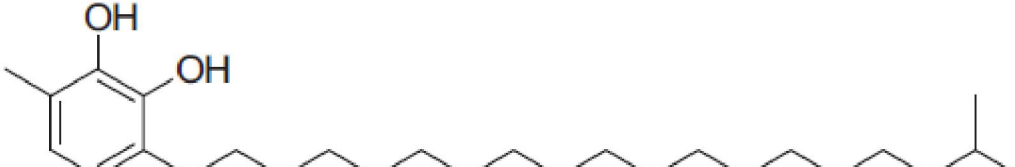
<p><b>Dérivé catéchol II</b></p>	 <p>The structure shows a benzene ring with two hydroxyl groups (OH) at the 1 and 2 positions. A long side chain is attached at the 3 position, consisting of a terminal methyl group, a double bond, and a long zigzag alkyl chain.</p>	<p>Dérivés catéchols</p>	<p><i>S. anacardium</i> L.</p>	<p><b>Sundaram et al., 2014</b></p>
<p><b>Dérivé catéchol III</b></p>	 <p>The structure shows a benzene ring with two hydroxyl groups (OH) at the 1 and 2 positions. A long saturated side chain is attached at the 3 position, ending in a methyl group. There is also a methyl group attached to the benzene ring at the 4 position.</p>	<p>Dérivés catéchols</p>	<p><i>S. anacardium</i> L.</p>	<p><b>Sundaram et al., 2014</b></p>

Tableau 2.1 suite.

causant une dermatite sont présents dans environ 32 genres d'Anacardiaceae (Mitchell, 1990; Aguilar-Ortigoza et Sosa, 2004).

### **2.1.2. Le genre *Pistacia* (Pistachier)**

#### **2.1.2.1. Présentation**

Les espèces du genre *Pistacia* (pistachier) sont à feuilles persistantes ou caduques et de petits arbustes avec des feuilles alternes, pennées composées, avec des cavités qui sécrètent des composés résineux. Les espèces de *Pistacia* sont pollinisées par le vent et sont dioïques, bien que quelques exceptions ont été décrites (Ozbek et Ayfer, 1958; Crane, 1974; Kafkas *et al.*, 2000; Gercheva *et al.*, 2008). Sept espèces du genre sont distribuées dans la zone du bassin méditerranéen à l'Asie Centrale (*P. atlantica* Desf., *P. integerrima* Stew, *P. khinjuk* de stocks, *P. palaestina* Bois., *P. lentiscus* L., *P. terebinthus* L. et *P. vera* L.), deux espèces en Asie de l'Est (*P. chinensis* Bunge et *P. weinmannifolia* Poisson), et deux espèces du Sud-ouest des États-Unis à l'Amérique Centrale (*P. mexicana* HBK et *P. texana* Swingle) (tableau 2.2) (Zohary, 1952; Kafkas, 2006; Yi *et al.*, 2008). Le pistachier (*P. vera*) est la seule espèce du genre qui est cultivée et commercialisée et le reste des espèces sont principalement utilisées comme porte-greffes pour le pistachier. Les produits des autres espèces du genre (principalement les fruits et résines) ont été traditionnellement utilisés localement pour une large gamme d'applications, des utilisations médicinales à la production du carburant (Hormaza et Wunsch, 2011).

L'histoire de l'évolution du genre *Pistacia* et les relations taxonomiques entre les différentes espèces constituent encore l'objet de controverses. L'hybridation est fréquente chez plusieurs espèces de *Pistacia* (Zohary, 1952; Crane et Iwakiri, 1981; Morgan *et al.*, 1992), suggérant une relation phylogénétique proche, et leur classement a changé au fil du temps (tableau 2.3). Les données morphologiques ainsi que moléculaires ont été utilisées pour analyser et classer les espèces du genre (pour revue voir Kafkas, 2006). Initialement, en utilisant des caractères morphologiques, Zohary (1952) considère que le genre comporte 11 espèces réparties en quatre sections (tableau 2.3): *Lentiscella* (*P. mexicana* et *P. texana*), *Eu Lentiscus* (*P. lentiscus*, *P. saportae*, et *P. winmannifolia*), *Butmela* (*P. atlantica*), et *Eu Terebinthus* (*P. chinensis*, *P. khinjuk*, *P. palaestina*, *P. terebinthus*, et *P. vera*), bien que certains auteurs identifient 15 espèces (Whitehouse, 1957). Une de ces espèces (*P. saportae*) a ensuite été suggérée d'être un hybride interspécifique (Zohary, 1972b), qui a été soutenue par des données moléculaires où *P. lentiscus* serait la femelle et *P. terebinthus* serait le mâle

(Yi *et al.*, 2008). *P. aethiopica* a été proposée comme une nouvelle espèce en 1980 (Kokwaro et Gillett, 1980), mais son statut n'a pas été confirmé. De même, *P. integerrima* a été proposée comme une sous-espèce dérivant de *P. chinensis* (Zohary, 1952), mais, se basant sur les analyses des sites de restriction de l'ADN chloroplastique et la phénologie de la floraison, Parfitt et Badenes (1997) a défendu le statut de l'espèce *P. integerrima*; cela a été récemment confirmé par des études moléculaires supplémentaires (Yi *et al.*, 2008). D'autres travaux ont utilisé une gamme de données morphologiques comme la feuille (Lin *et al.*, 1984; Al-Saghir *et al.*, 2006), le bois (Grundwag et Werker, 1976), l'anatomie et la distribution des stomates (Al-Saghir et Porter, 2005) pour classer les espèces de *Pistacia*, mais des résultats plus fiables peuvent être obtenus à partir des études moléculaires.

**Tableau 2.2.** Distribution des espèces de *Pistacia* et nombre de chromosomes (Hormaza et Wunsch, 2011).

Espèces	Noms communs	Distribution	Ploïdie
<i>P. atlantica</i>	Atlas Pistachio, Pistachier de l'Atlas	Méditerranée-Asie	2n = 30
<i>P. integerrima</i>	-	Méditerranée-Asie	2n = 30
<i>P. khinjuk</i>	-	Méditerranée-Asie	2n = 24
<i>P. lentiscus</i>	Lentisque, Mastic-tree	Méditerranée-Asie	2n = 30
<i>P. terebinthus</i>	Terebinth, Turpentine-tree	Méditerranée-Asie	2n = 30
<i>P. vera</i>	Pistachio	Méditerranée-Asie	2n = 30
<i>P. chinensis</i>	Chinese pistachio	Asie de l'Est	2n = 24
<i>P. weinmannifolia</i>	-	Asie de l'Est	-
<i>P. mexicana</i>	Mexican pistachio	Amérique Nord et Centrale	-
<i>P. texana</i>	American pistachio	Amérique Nord et Centrale	-

Sur la base de l'analyse des sites de restriction de l'ADN chloroplastique et des caractères morphologiques, Parfitt et Badenes (1997) ont suggéré la division du genre en deux sections, *Lentiscus* et *Terebinthus* (tableau 2.3); la section *Lentiscus* inclue les sections *Lentiscella* et *Eu Lentiscus* de Zohary (1952), alors que la section *Terebinthus* inclue les sections *Butmela* et *Eu Terebinthus* de Zohary (1952). Les espèces du groupe *Lentiscus* sont persistantes avec des feuilles paripennées, tandis que les espèces du groupe *Terebinthus*, y compris *P. vera*, sont caduques avec des feuilles imparipennées (tableau 2.3). Ces travaux ont confirmé l'hypothèse de Zohary (1952) basée sur des observations morphologiques, *P. khinjuk* et *P. vera* sont des espèces les plus primitives du genre *Pistacia* et l'Asie Centrale sont à l'origine de la diversité du genre. Les relations interspécifiques décrites par Parfitt et Badenes (1997)

en utilisant l'ADN des chloroplastes ont été plus tard confirmées en utilisant l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD: Random(ly) amplified polymorphic DNA) et les marqueurs du polymorphisme de longueur des fragments d'amplification (AFLP: amplified fragment length polymorphism) (Kafkas et Perl-Treves, 2001; Katsiotis *et al.*, 2003; Golan-Goldhirsh *et al.*, 2004). D'autres études basées sur la similarité génétique à partir des données RAPD (Kafkas et Perl-Treves, 2002) ont regroupé le genre en espèces d'arbre commun (*P. atlantica*, *P. eurycarpa*, *P. integerrima*, *P. khinjuk*, et *P. vera*) et arbustes ou de petits arbres (*P. lentiscus*, *P. mexicana*, *P. palaestina*, *P. texana*, et *P. terebinthus*).

**Tableau 2.3.** Classification des espèces de *Pistacia* selon: <sup>a</sup>Zohary (1952), <sup>b</sup>Parfitt et Badenes (1997), (Hormaza et Wunsch, 2011).

Sections <sup>a</sup>	Espèces <sup>a</sup>	Sections <sup>b</sup>	Espèces <sup>b</sup>
<b>Lentiscella</b>	<i>P. mexicana</i>	Lentiscus	<i>P. mexicana</i>
	<i>P. texana</i>		<i>P. texana</i>
<b>Eu Lentiscus</b>	<i>P. wienmannifolia</i>		<i>P. wienmannifolia</i>
	<i>P. saportae</i>		-
	<i>P. lentiscus</i>		<i>P. lentiscus</i>
<b>Eu Terebinthus</b>	<i>P. terebinthus</i>	Terebinthus	<i>P. terebinthus</i>
	<i>P. palaestina</i>		-
	<i>P. khinjuk</i>		<i>P. khinjuk</i>
	<i>P. vera</i>		<i>P. vera</i>
	<i>P. chinensis</i>		<i>P. chinensis</i>
	<i>P. chinensis</i> (var. <i>integerrima</i> )		<i>P. integerrima</i>
<b>Butmela</b>	<i>P. atlantica</i>		<i>P. atlantica</i>

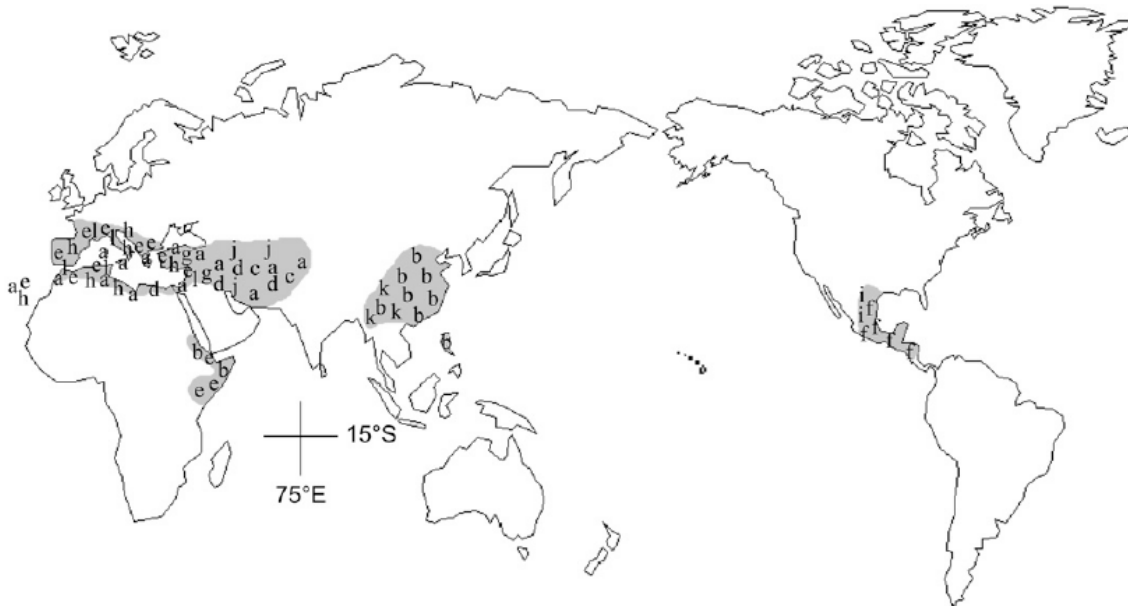
Dans une étude ultérieure en utilisant des marqueurs AFLP, Kafkas *et al.*, (2006) a confirmé la différenciation de *P. therebintus* non seulement à partir de *P. vera*, *P. khinjuk*, *P. integerrima* et *P. atlantica*, mais aussi de *P. mexicana* et *P. lentiscus*. Des études récentes utilisant des données moléculaires de l'ADN nucléaire et chloroplastique (Yi *et al.*, 2008) ont défini de nouvelles relations phylogénétiques au sein du genre, montrant preuve de l'évolution réticulée. *P. atlantica* serait imbriquée dans la section Terebinthus comme cela a été suggéré par Parfitt et Badenes (1997), alors que le groupe Lentiscus de Parfitt et Badenes (1997) ne serait pas monophylétique et les espèces du groupe Lentiscella de Zohary (1952) (*P. texana* et *P. mexicana*) et *P. wienmannifolia* seraient un groupe en deux clades parallèles. Une approche alternative pour étudier la relation phylogénétique dans le genre a été entreprise par Inbar (2008) qui a utilisé les relations très étroites entre les pucerons formateurs de galles (Homoptera: Fordinae) et les espèces de *Pistacia*. Il ne pouvait différencier les espèces du

nouveau Monde (*P. mexicana* et *P. texana*) à partir du reste des espèces où deux groupes pourraient être observés: "Vera" (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. mutica*) et "khinjuk" (*P. khinjuk*, *P. chinensis*, *P. integerrima*, *P. palaestina*, *P. terebinthus*). En dépit de tous les progrès réalisés en utilisant des approches différentes, une certaine confusion est encore présente dans la classification du genre *Pistacia*, et d'autres travaux sont clairement nécessaires pour avoir enfin une vue d'ensemble des relations phylogénétiques entre les différentes espèces de *Pistacia*.

Les *Pistacia* sont des arbustes ou des arbres dioïques avec exsudat clair. Feuilles persistantes ou caduques, alternes, paripennées et/ou imparipennées, rarement simples ou trifoliolées, pétiolées; rachis parfois ailés; folioles opposées ou subopposées, pétiolées; cataphylles parfois présentes. Inflorescences axillaires thyroïdes, panicules, racèmes, ou des pointes; périanthe 0, mais fleurs entourées de 1-3 petites bractées et (1)2-7 tépales bractéoles; androcée: 3-5(-8) étamines; filaments courts; anthères basifixes; pistil réduit ou 0; staminodes réduits ou 0; disque glabre, souvent réduit ou 0; carpelles (2)3; style court, 3-branché, apical; stigmates (2)3, bilobés ou simples, recourbés, ovules pendants à partir du funicule basal. Drupe globuleuse ou ovoïde, 1-loculaire; exocarpe papyracé; mésocarpe mince; endocarpe boisé. n = 12, 14, 15 (Pell *et al.*, 2011).

Douze espèces sont distribuées dans les zones suivantes: Texas, États-Unis, et Nicaragua; Europe méditerranéenne, et Nord et Est de l'Afrique; Asie Centrale et Sud-ouest Asiatique (ex-Républiques Soviétiques), l'Est de l'Afghanistan, tempéré Centrale de la Chine du Sud et du Centre, Sud de la péninsule de la Malaisie et le Philippines. *P. vera* est cultivé dans le monde entier dans les climats chauds et secs (**figure 2.3**) (Pell *et al.*, 2011). Plusieurs espèces de *Pistacia* colonisent le territoire Algérien: *P. lentiscus*, *P. therebintus* et *P. atlantica* sous-espèce *atlantica*. Cette dernière présente une forte variabilité morphologique, *P. therebintus* est moins fréquente en Algérie (Benabderrahmane *et al.*, 2009; Ait Said *et al.*, 2011).





**Figure 2.3.** Répartition actuelle des *Pistacia*. L'ombrage gris clair indique les emplacements généraux des 11 espèces de *Pistacia* et une hybride putative: a = *P. atlantica*, b = *P. chinensis*, c = *P. integerrima*, d = *P. khinjuk*, e = *P. lentiscus*, f = *P. mexicana*, g = *P. palaestina*, h = *P. terebinthus*, i = *P. texana*, j = *P. vera*, k = *P. weinmannifolia*, l = *P. saportae* (Yi *et al.*, 2008).

#### 2.1.2.2. Utilisations médicinales et effets biologiques et pharmacologiques

Quelques utilisations d'espèces du genre *Pistacia* ont été rapportées dans la médecine populaire de diverses régions géographiques. Les infusions de feuilles de *P. lentiscus* sont appliquées pour le traitement de l'eczéma, la diarrhée, et les infections de la gorge (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2013). Les galles de *P. integerrima* sont utilisés pour le traitement de plusieurs affections, y compris l'asthme, la diarrhée, la toux, la fièvre, les vomissements des enfants, la dysenterie, la bronchite chronique, les maladies de peau, les morsures de serpent, les piqûres de scorpion, l'hépatite et les troubles du foie (Ullah *et al.*, 2013). Les feuilles de *P. weinmannifolia* sont utilisées contre la dysenterie, l'entérite, la grippe, les saignements d'origine traumatique, les maux de tête et le cancer du poumon (Zhao *et al.*, 2005). Les graines du pistachier (*P. vera*) sont habituellement utilisées comme ingrédients dans l'industrie alimentaire ou grillées et consommées comme aliments à grignoter (Saitta *et al.*, 2009). L'oléorésine de *P. vera*, est mâchée et est utilisée pour traiter l'asthme et les maux d'estomac, et les hémorroïdes par application externe (Orhan *et al.*, 2006). Les feuilles de *P. terebinthus* sont utilisées dans le traitement des brûlures. La résine collectée à partir des branches, est utilisée comme antiseptique pour les bronchites et autres maladies des systèmes respiratoires et urinaires et est administrée par voie orale avec des doses de 0,2 à 0,5 g trois

fois par jour. Elle est utile pour traiter l'asthme, elle a également des propriétés anti-inflammatoires et antipyrétiques. Les fruits sont consommés comme café, la matière grasse extraite de ses fruits est utilisée comme huile de cuisson ainsi que dans la production du savon (Topçu *et al.*, 2007).

Les travaux d'Azaizeh *et al.* (2013) ont montré une activité de l'extrait éthanolique et aqueux des feuilles de *P. lentiscus* contre un parasite gastro-intestinal. Le test a été évalué avec des larves de nématodes *Teladorsagia circumcincta*, *T. colubriformis* et *Chabertia ovina*. Une autre étude réalisée par Foddai *et al.* (2015) a montré que l'extrait aqueux des feuilles et des fruits de *P. lentiscus* et *P. terebinthus* présente une activité inhibitrice de la lipase pancréatique, l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase, qui sont des cibles pharmacologiques pour la gestion de la dyslipidémie, l'athérosclérose, l'obésité et le diabète. L'acide pistagremique isolé des galles de *P. integerrima* a été testé contre cinq différentes bactéries Gram positives et Gram négatives. L'acide pistagremique présentait une action antibactérienne contre *Klebsiella pneumoniae*, *Straptodirimu* et *Bacillus stearothermophus* avec des zones d'inhibition de 15, 20 et 14 mm, respectivement (Rauf *et al.*, 2014). Les expériences d'Esmat *et al.* (2012) ont mis en évidence l'activité anti-inflammatoire de l'extrait hydrométhanolique des galles de *P. khinjuk* par différents modèles expérimentaux: mesure du volume de la patte, le niveau de la prostaglandine, l'œdème de l'oreille, l'activité de la myéloperoxydase tissulaire, l'histopathologie, le niveau de l'oxyde nitrique, et le facteur de nécrose tumorale. L'extrait s'est révélé actif dans plusieurs modèles expérimentaux. Les procédés de fractionnement de l'extrait des feuilles de *P. weinmannifolia* ont permis d'isoler deux composés phénoliques: pistafoline A et pistafoline B. Ces composés présentent des propriétés antioxydantes par la prévention sur les lipides, des protéines et de l'ADN contre les dommages causés par les espèces réactives d'oxygène (Zhao *et al.*, 2005). L'extrait hydrométhanolique de la coque du fruit de *P. vera* a montré une activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE) avec une  $IC_{50}$  de  $204,10 \pm 6,33$   $\mu\text{g/mL}$  (Jazayeri *et al.*, 2014).

### 2.1.2.3. Etudes phytochimiques antérieures et principaux métabolites secondaires isolés

Les travaux phytochimiques réalisés par de nombreux groupes scientifiques (Hiroi *et al.*, 1966; Kawashty *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2008) sur les bourgeons, le bois et les branches de *P. chinensis* ont permis d'isoler et d'identifier un alcaloïde: acide 4-hydroxy-5-(2-oxo-1-pyrrolidinyl)-benzoïque et des flavonoïdes: fisetine, taxifoline, kaempférol-3-glucoside, vicénine-2, quercétine-3-glucoside.

**Ahmad et al. (2008; 2010; 2011)** et **Rauf et al. (2014)** ont pu isoler et caractériser de l'extrait aqueux des feuilles de *P. integerrima* de nombreux flavonoïdes: apigénine, kaempférol, quercétine, rutine, kaempférol-3-*O*-(4"-*O*-galloyl)- $\alpha$ -L-arabinopyranoside, quercétine-3-*O*-(6"-*O*-syringyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside, kaempférol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, quercétine-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, tandis que l'extrait méthanolique des galles a été caractérisé par la présence de  $\beta$ -sitostérol, ester de pistiphloro-glucinyll, éther de pisticiphloroglucinyll, éther de pistaciaphenyl, acide pisticialanstenoiique, n-octadecan-9,11-diol-7-one, acide hydroxydecanyl arachidique et l'acide pistagremique.

Un dérivé de l'acide gallique: ester éthylique de l'acide gallique a été isolé par **Dominguez et al. (1974)** à partir de l'extrait d'éther diéthylique des parties aériennes de *P. mexicana*.

Nombreux triterpènes tels que: oleanolate, masticadienonate, isomasticadienonate, ont été identifiés dans l'extrait éthanolique des galles de *P. palestena* (**Caputo et al., 1979**).

L'acide gallique, quatre dérivés de l'acide gallique: acide 3-*O*-galloylquinique, méthyle gallate, éthyle gallate, penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, et deux flavonoïdes: myricétine 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside, myricétine-3-*O*-(3"-*O*-galloyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside, ont été isolés de l'extrait hydroéthanolique des feuilles de *P. weinmannifolia* (**Minami et al., 2006**).

Plusieurs métabolites secondaires ont été isolés de l'extrait hydroéthanolique des feuilles de *P. lentiscus*: l'acide gallique et ses dérivés: 5-*O*-galloyl quinique, 3,5-*O*-digalloyl quinique, 3,4,5-*O*-trigalloyl quinique, monogalloyl glucose, flavonoïdes: taxifoline, myricétine, quercétine, lutéoline, génistéine, kaempférol, catéchine, myricétine 3-*O*-rhamnoside, myricétine 3-*O*-rutinoside, quercétine 3-*O*-rhamnoside, myricétine 3-*O*-glucuronide. L'extrait méthanolique des baies renferment des anthocyanes: delphinidine 3-*O*-glucoside, cyanidine 3-*O*-glucoside, cyanidine 3-*O*-arabinoside (**Romani et al., 2002; Baratto et al., 2003; Vaya et Mahmood, 2006; Longo et al., 2007**).

**Kavak et al. (2010)** ont pu isoler de l'extrait hydroéthanolique des feuilles de *P. terebinthus* des flavonoïdes: lutéoline, catéchine, apigénine-7-glycoside, lutéoline-7-glycoside.

L'extraction par l'acide formique dilué et des procédés de purification ont permis d'isoler des anthocyanes à partir des graines de *P. vera*: cyanidine-3-glucoside, cyanidine-3-

galactoside, tandis que l'extrait hexanique renferme des flavonoïdes: (+)-catéchine, (-)-epicatéchine, naringénine, naringénine-7-*O*-neohesperidoside, eriodictyol, eriodictyol-7-*O*-glucoside, daidzéine, génistéine, génistéine-7-*O*-glucoside, quercétine, quercétine-3-*O*-rutinoside, kaempférol, lutéoline, apigénine. L'extrait hydrométhanolique des noix renferment un stilbène: *trans*-resvératrol, des flavonoïdes: daidzéine, génistéine, tandis que l'extrait méthanolique referme de l'acide gallique et l'acide protocatéchique (Bellomo et Fallico, 2007; Gentile *et al.*, 2007; Marinou *et al.*, 2010; Tomaino *et al.*, 2010).

Avec le développement des techniques analytiques comme la GC-MS, plusieurs espèces du genre *Pistacia* ont été étudiées pour leur composition en huiles essentielles. Les travaux de Chryssavgi *et al.* (2008), ont permis de mettre en évidence dans les feuilles sèches de *P. lentiscus*, de nombreux composés volatils, parmi lesquels:  $\alpha$ -pinène (9,4-24,9 %), limonène (9,0-17,8 %), germacrène D (2,7-13,5 %), terpinène-4-ol (6,8-10,6 %), *p*-cymène (0,5-7,5 %),  $\beta$ -pinène (2,0-6,9 %), sabinène (1,0-6,7 %),  $\gamma$ -terpinène (3,1-3,6 %) et  $\alpha$ -terpinéol (2,5-4,0 %).

D'autres composés ont été isolés des feuilles de *P. vera*, dont l'acétate de bornyl (4,4 %),  $\alpha$ ,*p*-diméthylstyrène (4,6 %),  $\alpha$ -terpinène (3,7 %), camphène (8,3 %) en plus du  $\alpha$ -pinène (29,2 %), limonène (12,4 %),  $\alpha$ -terpinéol (9,6 %) déjà cités ci-dessus, ces composés ont montré une activité antifongique contre *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium sambucinum* (Duru *et al.*, 2003).

### 2.1.2.4. *Pistacia atlantica* Desf.

#### 2.1.2.4.1. Description botanique, distribution et habitat

##### ➤ Description botanique

*P. atlantica* Desf. (figure 2.4) est un arbre puissant pouvant atteindre 20 m de hauteur avec un diamètre de 1 m, à tronc bien individualisé, à feuilles caduques (Benhassaini et Belkhodja, 2004; Rowshan *et al.*, 2013), ovales ou oblongues au contour, lancéolées, obtus, mutiques (Hamdan et Afifi, 2004), composées imparipennées avec deux à quatre (cinq) paires de folioles, qui sont variables dans la forme, la taille et la couleur, et avec rachis ailé plus ou moins caractéristique (Tzakou *et al.*, 2007). Les grands sujets peuvent atteindre facilement les 1.000 ans (Benabderrahmane *et al.*, 2009). De par sa dioïcie et ses fleurs nues, *P. atlantica* constitue une espèce particulière des Anacardiaceae (Gaussen *et al.*, 1982). Mais quelques pieds, exceptionnellement monoïques, ont été rencontrés dans les montagnes de Yunt de la Province de Mania en Turquie (Kafkas *et al.*, 2001). Les fleurs sont très courtes

pédonculées, fruits 5-8 mm × 5-6 mm, obovoïdes ou obovoïdes globulaires à globulaires, un peu plat et d'un vert foncé à jaune ou brunâtre. La floraison a lieu en février à avril (**Hamdan et Afifi, 2004; Shaddel et al., 2014**). Le Pistachier de l'Atlas comporte quatre sous-espèces, à savoir *mutica*, *cabulica*, *kurdica* et *atlantica*; cette dernière est présente en Afrique du Nord (**Benhassaini et Belkhodja, 2004**). Ces mêmes sous-espèces présentent une même formule chromosomique (**Ghaffari et al., 2003**). Des vérifications taxonomiques récentes ont indiqué que l'Afrique du nord abrite une sous espèce, appelé *P. atlantica* Desf. ssp. *atlantica* (**Benhassaini et al., 2007**).

### ➤ Distribution

Le Pistachier de l'Atlas est considéré comme une espèce irano-touranienne avec une distribution de l'Asie du Sud-ouest au Nord-ouest de l'Afrique (Maroc) (**Tzakou et al., 2007**).

### ➤ Habitat

Cet arbre a une écologie difficile à cerner; il est d'une grande plasticité, lui permettant d'exister depuis les marges du Sahara jusqu'aux moyennes montagnes subhumides (**Gourine et al., 2010b**). *P. atlantica* est une xérophyte thermophile, qui pousse dans les collines rocheuses, aux bords de champs, aux bords de routes, et dans les sols argileux ou limoneux. Elle peut s'épanouir aussi sur les rochers calcaires où les racines se développent à l'intérieur des fissures (**Tzakou et al., 2007; Ait Said et al., 2011**). Elle trouve habitats principalement dans les zones semi-steppiques et les steppes (**Zohary, 1972a**). C'est une espèce tolérante à la sécheresse, qui s'adapte dans les zones semi-arides et arides. Elle peut être solitaire (**Rowshan et al., 2013**) ou en association avec *Ziziphus lotus* L. et *Pinus halepensis* Mill. (**Benabderrahmane et al. 2009**). Comme cette plante est résistante à la sécheresse, elle peut pousser dans les régions où les précipitations annuelles sont faibles. Bien que, *P. atlantica* est un arbre avec un couvert dense, il pousse à des altitudes variant de 100 m à très haute altitude (par exemple 3000 m d'altitude dans l'Est de Algérie) (**Dorehgirae et Pourabdollah, 2015**).

➤ **Noms vernaculaires**

**Anglais:** Atlas Pistachio

**Français:** Pistachier de l'Atlas

**Arabe:** Betoum, Betm, Elbetoum, Botma, Betouma, Butom

**Berbère:** Iggh



**Figure 2.4.** Photos de *P. atlantica*, à gauche représentation des feuilles, à droite vue d'ensemble <sup>(5)</sup>.

➤ **Classification**

**Règne:** Plantae

**Embranchement:** Spermatophyta

**Sous-embranchement:** Angiospermae

**Classe:** Magnoliopsida

**Sous-classe:** Malvidae

**Super-ordre:** Rutanae

**Ordre:** Rurales

**Famille:** Anacardiaceae

**Sous-famille:** Rhoae

**Genre:** *Pistacia*

**Espèce:** *Pistacia atlantica* Desf.

**2.1.2.4.2. Utilisations médicinales**

*P. atlantica* a longtemps été utilisée dans la médecine populaire par les peuples d'Afrique du Nord (Chief, 1914). Parmi les 11 espèces de *Pistacia*, *P. lentiscus*, *P. vera* et *P. atlantica*

ont une importance économique et pharmaceutique large (**Hatamnia et al., 2014**). Cette plante est utilisée dans le traitement de l'eczéma, la paralysie, les diarrhées, les infections de la gorge, les calculs rénaux et l'asthme. C'est ainsi qu'on la considère comme agent astringent, anti-inflammatoire, antipyrétique, antibactérien et antiviral (**Benabderrahmane et al., 2009**). *P. atlantica* est l'une des plantes largement recommandées par les herboristes et utilisées pour son activité hypoglycémique (**Tzakou et al., 2007**). Cette plante aussi utilisée en médecine traditionnelle pour le soulagement des maux abdominaux supérieurs, des maux d'estomac, la dyspepsie et l'ulcère gastroduodéal (**Hosseini et al., 2013**). De l'écorce du bois, une résine est collectée pour la production de la laque et elle est également utilisée dans la médecine populaire (comme antiseptique sur les plaies). L'oléorésine de *P. atlantica* est une gomme à mâcher naturellement par la population et traditionnellement utilisée dans le traitement de l'ulcère peptique. Le mastic, un exsudat qui renforce les gencives, désodorise l'haleine et lutte contre la toux, les frissons et les maladies de l'estomac (**Tzakou et al., 2007**). Les fruits de *P. atlantica* sont utilisés pour le tannage et comme fourrage pour le bétail. Ils contiennent de l'huile, qui est utilisée pour la préparation du savon (**Tzakou et al., 2007**). Les fruits sont aussi utilisés pour les maux d'estomac (**Lev et Zohar Amar, 2002**). D'un point de vue ethnobotanique, l'huile du fruit est utilisée comme un anti-diarrhéique (**Yousfi et al., 2002**). Les fruits sont utilisés après broyage et mélange avec d'autres ingrédients comme des aliments et les fruits verts sont utilisés pour faire de la confiture. Aussi l'huile de la coque et du noyau est utilisée comme l'huile de friture (**Hatamnia et al., 2014**). En Algérie, les fruits, appelés Elkhoudiri, ont un niveau élevé d'huile (39,80 %) et de protéines (10,39 %). Localement, l'huile est mélangée avec les dattes et le lactosérum, se mange à toute heure de la journée. En médecine populaire, le fruit est utilisé localement comme un antidiarrhéique (**Belyagoubi-Benhammou et al., 2014**). Au printemps, les jeunes feuilles de *P. atlantica* sont utilisées comme légumes et couramment consommées comme aliment cuit dans la partie méditerranéenne et l'Anatolie de l'Est de la Turquie (**Peksel et al., 2010**). Les feuilles sont aussi utilisées comme stomachique (**Benhassaini et al., 2007**). La partie aérienne a été utilisée traditionnellement comme un stimulant, pour ses propriétés diurétiques, et pour traiter l'hypertension, la toux, les maux de gorge, l'eczéma, les maux d'estomac, les calculs rénaux et la jaunisse (**Hosseini et al., 2013**). En outre, les galles de *P. atlantica* qui sont comestibles et vendues dans les marchés, sont utilisées comme agent d'embaumement par les habitants ruraux (**Gourine et al., 2010b**). La population de la région de Bechar (Algérie) utilise l'écorce du tronc du Pistachier de l'Atlas par décoction, dans les cas des maux d'estomac et des douleurs gastriques (**Benaradj et al., 2015**).

**2.1.2.4.3. Propriétés biologiques et pharmacologiques**

L'extrait aqueux des parties aériennes de *P. atlantica* a montré une activité hypoglycémiant par modulation de la sécrétion de l'insuline sur des cellules  $\beta$  MIN6, et par l'inhibition de l'absorption du glucose extrapancréatique (**Kasabri et al., 2011**).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles de la résine de *P. atlantica*, a été testée *in vitro* sur des isolats cliniques de sept souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas maltophila*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) et de trois souches fongiques (*Candida albicans*, *Candida albicans* ATCC20027 et *Candida albicans* ATCC20032). La détermination du pouvoir antibactérien et antifongique a été réalisée par la méthode de diffusion sur gélose. Tous les extraits ont montré une forte activité antimicrobienne vis-à-vis des souches fongiques et bactériennes. Les huiles essentielles ont révélé un grand pouvoir antibactérien vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* avec des concentrations minimales inhibitrices inférieures à 10 mg/mL. *Candida albicans* a présenté une forte résistance aux huiles essentielles testées (**Benabderrahmane et al., 2009**).

L'extrait aqueux de *P. atlantica* a montré une activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase significative *in vitro* (**Hamdan et Afifi, 2004**).

L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique des différentes parties du fruit de *P. atlantica* a été mesurée en utilisant différents dosages: FRAP, l'oxyde nitrique, et le piégeage des radicaux DPPH. Les résultats ont montré que l'extrait de coque possède la plus forte activité antioxydante (**Hatamnia et al., 2014**).

L'extrait de gomme a été évalué pour l'activité inhibitrice d'un agent parasite *Leishmania major* responsable de la leishmaniose cutanée. L'administration quotidienne de gomme obtenue de *P. atlantica* pendant 28 jours, diminue la taille de la lésion de la peau chez des souris infectées par *L. major* par rapport à celles non infectées. Le traitement des souris avec la gomme obtenue de *P. atlantica* diminue le nombre de souris positives aux parasites (**Taran et al., 2010**).

Les activités biologiques et pharmacologiques des différents organes de *P. atlantica* sont répertoriées dans le **tableau 2.4**.



**Tableau 2.4.** Activités biologiques et pharmacologiques des différents organes de *P. atlantica*.

Parties de la plante	Types d'extrait	Activités biologiques et pharmacologiques	Références
-	MeOH 80 %	Activité antioxydante	Souri <i>et al.</i> , 2004
Feuilles	H <sub>2</sub> O, MeOH, EtOH	Activité antibactérienne et antifongique	Rhouma <i>et al.</i> , 2009
Feuilles	Huiles essentielles	Activité antioxydante	Gourine <i>et al.</i> , 2010a,b
Feuilles	EtOH	Activité antioxydante, antibactérienne et antifongique	Benhammou <i>et al.</i> , 2008
Feuilles	H <sub>2</sub> O	Effet antihyperglycémique	Kasabri <i>et al.</i> , 2011
Feuilles	AcOEt, MeOH	Activité antioxydante	Peksel <i>et al.</i> , 2010
Feuilles et branches	AcOEt	Activité antiplasmodiale	Adams <i>et al.</i> , 2009
Gomme	Huiles essentielles	Activité antibactérienne	Ghalem et Mohamed, 2009
Graines	H <sub>2</sub> O, MeCOMe, MeOH	Activité antibactérienne	Hammami <i>et al.</i> , 2009
Parties aériennes	MeOH 20 %	Activité antioxydante	Yousfi <i>et al.</i> , 2009

#### 2.1.2.4.4. Etudes phytochimiques antérieures et principaux métabolites secondaires isolés

La composition en métabolites primaires du fruit comestible de *P. atlantica* a été bien étudiée (Yousfi *et al.*, 2002; Benhassaini *et al.*, 2007; Sharayei *et al.*, 2011). Les extraits: éther éthylique et chloroforme-méthanolique du fruit contiennent des acides gras et des stéroïdes (Benhassaini *et al.*, 2007).

La composition chimique de trois huiles essentielles obtenues par hydrodistillation de la résine, des feuilles et des fruits de *P. atlantica* a été étudiée par GC et GC-MS. Les hydrocarbures monoterpéniques constituent le principal groupe chimique dans l'huile de résine, avec  $\alpha$ -pinène (42,9 %) et  $\beta$ -pinène (13,2 %) comme composés majoritaires. L'huile de fruits contient des quantités élevées de monoterpènes oxygénés, avec l'acétate de bornyle (21,5 %) comme composé principal, tandis que les monoterpènes et sesquiterpènes oxygénés ont été trouvés en prédominance dans l'huile essentielle des feuilles dont le terpinène-4-ol (21,7 %) et l'elemol (20,0 %) sont les composés les plus abondants (Barrero *et al.*, 2005).

L'extrait hydroéthanolique de la plante contient des flavonoïdes (**Kawashty et al., 2000**). L'extrait hydrométhanolique des fruits contient de la lutéoline. L'acide chlorogénique, la lutéoline, la lutéoline 7-glucoside, le kaempférol, la naringine et la naringine 7-glycoside ont été également identifiés dans l'extrait hydrométhanolique des fruits (**Yousfi et al., 2009**). L'extrait méthanolique des fruits contient: l'acide ascorbique, l'acide gallique, la rutine; l'acide caféique, l'acide *p*-hydrobenzoïque, l'acide vanillique, l'acide *p*-coumarique, l'acide syringique, l'acide férulique, et l'acide sinapique (**Hatamnia et al., 2014**). L'extrait aqueux des fruits contient: l'epicatéchine (4,05 %), l'acide chlorogénique (5,86 %), l'acide caféique (0,51 %), la flavanomareine (0,28 %), l'éthyle vanilline (0,49 %), et l'apigénine 7-glucoside (0,55 %) (**Shaddel et al., 2014**). A partir de l'extrait hydrométhanolique des feuilles et des galles, le méthyle ester de l'acide gallique et l'acide gallique ont été isolés (**Yousfi et al., 2009**). Les feuilles contiennent 22,2 % de tanins (**Yousfi et al., 2009**).

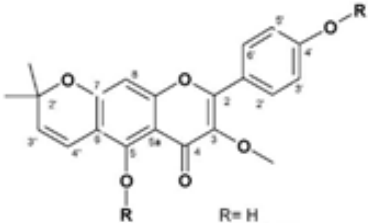
D'autres métabolites secondaires isolés et identifiés dans différents extraits et parties végétatives sont inventoriés dans le **tableau 2.5**.

### 2.1.3. La famille Boraginaceae

#### 2.1.3.1. Introduction

Les Boraginaceae sont une famille des angiospermes, comprenant 1600 espèces réparties en 110 genres (**Cohen, 2013**). On y trouve des herbes annuelles (*Heliotropium*), arbustes et arbres représentés par *Ehretia* et *Cordia* sp. *Tournefortia* sp. sont des arbustes sarmenteux. De façon caractéristique, la tige et les feuilles sont recouvertes de poils raides qui donnent une sensation rugueuse (**Sambamurty, 2005**). Les Boraginaceae ont une distribution cosmopolite. Les espèces du Boraginaceae ont de nombreux usages, mais aucune d'importance économique majeure, sauf pour certaines plantes ornementales, plantes à bois et à colorants. Beaucoup de plantes de Boraginaceae ont des propriétés médicinales utilisées en médecine traditionnelle pour traiter les blessures, les maladies de la peau, de la fièvre, des douleurs thoraciques, etc. C'est le cas de la bourrache (*Borago officinalis* L.), la grande consoude (*Symphytum officinale* L.), la pulmonaire (*Pulmonaria officinalis* L.) et la vipérine (*Echium vulgare* L.). *S. officinale* L., par exemple, a été utilisée en Europe même pour la guérison osseuse (**Neuwinger, 2000**).

Tableau 2.5. Métabolites secondaires isolés et identifiés dans différents extraits et parties végétatives de *P. atlantica*.

Parties de la plante	Types d'extrait	Substances caractérisées	Structures	Classes phytochimiques	Références
Feuilles, gommés, oléorésines	-	Huiles essentielles	-	Terpènes	Delazar <i>et al.</i> , 2004; Ghalem et Mohamed, 2009; Gourine <i>et al.</i> , 2010a,b
Feuilles	EtOH	-	-	Flavonoïdes: flavonols flavones Anthocyanes Acides phénoliques: l'acide gallique et l'acide <i>p</i> - coumarique	Benhammou <i>et al.</i> , 2008; Peksel <i>et al.</i> , 2010
Feuilles et branches	AcOEt	3-Methoxycarpachromene		Flavonoïdes	Adams <i>et al.</i> , 2009

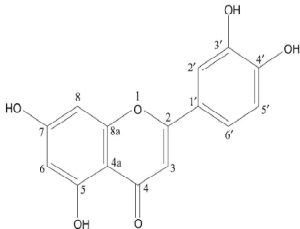
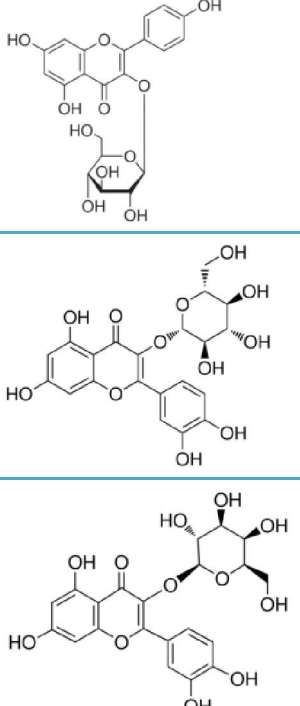
<p><b>Fruits</b></p>	<p>Hexane</p>	<p>Lutéoline</p>	 <p>The structure shows a flavone core with two hydroxyl groups at positions 5 and 7 on the A-ring, and two hydroxyl groups at positions 3' and 4' on the B-ring. The numbering of the rings is indicated with primes for the B-ring and regular numbers for the A-ring.</p>	<p>Flavonoïdes</p>	<p><b>Yousfi <i>et al.</i>, 2009</b></p>
<p>-</p>	<p>EtOH 70 %</p>	<p>Kaempférol-3-glucoside</p> <hr/> <p>Quercétine-3-glucoside</p> <hr/> <p>Quercétine-3-galactoside</p>	 <p>This block contains three chemical structures. The top structure is Kaempferol-3-glucoside, featuring a flavone core with hydroxyl groups at positions 5 and 7 on the A-ring, and a hydroxyl group at position 4 on the B-ring, linked to a glucose molecule at position 3. The middle structure is Quercetin-3-glucoside, with hydroxyl groups at positions 5 and 7 on the A-ring and hydroxyl groups at positions 3 and 4 on the B-ring, linked to a glucose molecule at position 3. The bottom structure is Quercetin-3-galactoside, which is identical to the middle structure but linked to a galactose molecule at position 3.</p>	<p>Flavonoïdes</p>	<p><b>Kawashty <i>et al.</i>, 2000</b></p>

Tableau 2.5 suite.

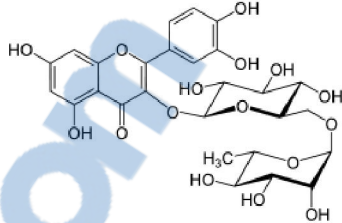
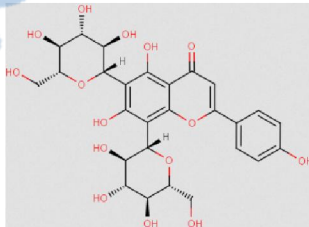
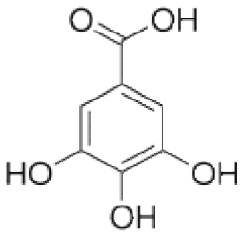
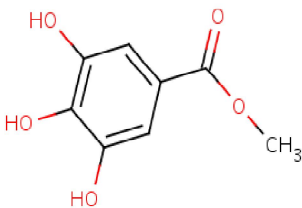
		<p>Quercétine-3-rutinoside</p> 			
		<p>Quercétine-3-glucoside-7-galactoside</p>			
		<p>Apigénine-6,8-di-C-glucoside</p> 			
Feuilles	Hexane	Acide gallique		Acides phénoliques	Yousfi <i>et al.</i> , 2009
		Méthyle ester de l'acide gallique			

Tableau 2.5 suite.

### 2.1.3.2. Classification systématique, description botanique et distribution

#### 2.1.3.2.1. Taxonomie et phylogénie

La famille Boraginaceae est étroitement liée aux Solanaceae, Convolvulaceae et Polemoniaceae avec lesquelles elle partage des feuilles alternes et des fleurs actinomorphes et est souvent classée sous Boraginales suivant Solanales ou sous Solanales, Convolvulales et Polemoniales. La famille montre également d'étroites affinités avec les Lamiaceae et Verbenaceae en ayant un style gynobasique, 4 ovaires lobés devenant 4-loculaire par de faux septums et fruits en général schizocarpique (Singh, 2010). Cronquist place les Boraginaceae sous Lamiales plus proches des Lamiaceae et Verbenaceae. APweb reconnaît six groupes au sein de Boraginaceae: quatre sous-familles Boraginoideae, Heliotropioideae, Cordioideae et Ehretiaceae et deux groupes familiaux Hydrophyllaceae et Lennoaceae. Thorne (2003, 2006, 2007) traite les deux dernières comme familles indépendantes et reconnaît cinq sous-familles sous Boraginaceae, ajoutant Wellstedioideae comme cinquième sous-famille (figure 2.5).

**Règne:** Plantae

**Embranchement:** Spermatophyta

**Sous-embranchement:** Angiospermae

**Classe:** Magnoliopsida

**Sous-classe:** Lamiidae

**Super-ordre:** Solananae

**Ordre:** Solanales

**Famille:** Boraginaceae

**Sous-famille:** Cordioideae

Ehretioideae

Heliotropioideae

Boraginoideae (→*Echium*, *Solenanthus*)

Wellstedioideae

**Figure 2.5.** Position systématique de la famille Boraginaceae (Thorne, 2007).

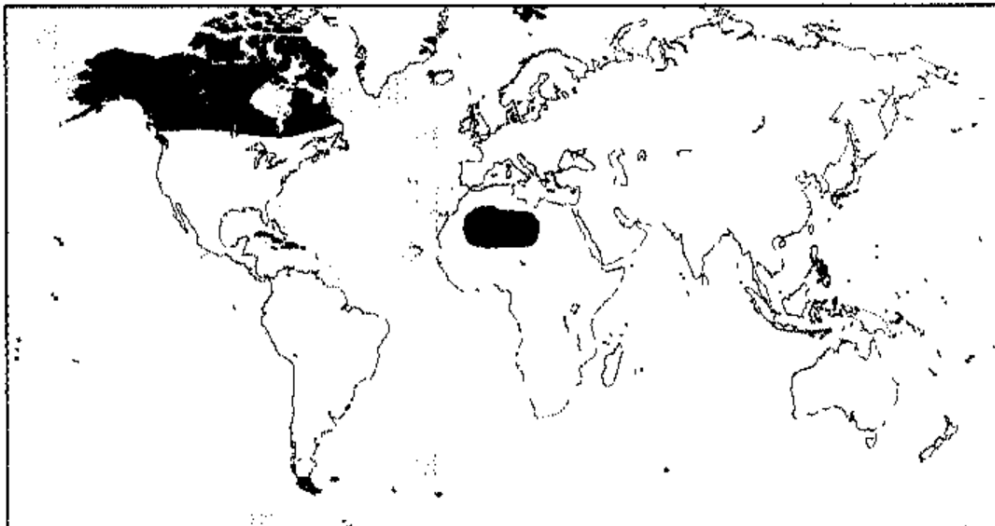
#### 2.1.3.2.2. Description botanique

Herbes, arbustes ou arbres (*Cordia*), parfois lianes, phloème interne manquant, les poils avec cystolithe basale et souvent calcifiés ou silicifiés, rugueux au toucher. Les feuilles sont alternes, simples, entières, nervures pennées, réticulées, stipules absentes. L'inflorescence

habituellement en cymes hélicoïdes, rarement scorpioïdes. Fleurs bisexuées, actinomorphes, rarement zygomorphes (*Echium*), hypogynes, pentamères. Calice à 5 sépales, libres ou légèrement connées à la base, persistantes. Corolle à cinq pétales, unis, tournés, tubulaires ou en forme d'entonnoir. L'androcée avec 5 étamines, epipétale, inséré dans le tube de la corolle, filets libres, anthères introrsés, déhiscence longitudinale, les grains de pollen tricolporés ou multiporés, filaments souvent avec des disques de nectar à la base. Gynécée avec 2 carpelles unis, ovaire supère, profondément 4 lobes, biloculaire, placentation axillaire, devenant 4-loculaire en raison de fausses cloisons, style 1, terminal ou gynobasique, stigmate 1 ou bilobé, capité ou tronqué, l'ovaire assis sur un nectaire. Fruit: drupe, graines avec embryon droit ou courbé. Pollinisation essentiellement par les insectes. Les fruits drupacés sont dispersés par les oiseaux, alors que ceux subéreux (*Argusia*, *Cordia*) sont emportés par l'eau (Singh, 2010).

### 2.1.3.2.3. Distribution

Les genres d'arbres sont pantropicales et subtropicales, tandis que les genres d'herbacées sont distribués dans le monde entier bien que particulièrement abondants dans la région méditerranéenne et en Asie tempérée chaude. Ils se produisent dans un large éventail d'habitats à partir du niveau de la mer à plus de 4.000 mètres d'altitude (Heywood *et al.*, 2007).



**Figure 2.6.** Distribution géographique de la famille Boraginaceae (Heywood *et al.*, 2007).

### 2.1.3.3. Importance économique

A l'exception de certaines valeurs ornementales et médicinales, la famille de la bourrache n'est pas d'une grande importance économique. Les plantes ornementales de la famille

comprennent les espèces d'*Anchusa*, *Borago* (bourrache), *Cordia*, *Cynoglossum* (cynoglosse), *Echium* (vipérine), *Heliotropium* (Héliotrope), *Mertensia*, *Myosotis*, *Omphalodes*, *Pulmonaria* (Pulmonaire) et *Symphytum*. Les plantes avec une valeur médicinale comprennent *C. myxa* L. (les écorces et les fruits sont utilisés pour la toux), *Ehretia macrophylla* Wall. (les feuilles sont utilisées en cas de toux et de maux d'estomac), *H. indicum* L. (les feuilles en décoction sont utilisées pour la fièvre, et les racines pour la toux), *Lithospermum officinale* L. (les graines sont utilisées pour les maladies de la vessie), et *Onosma bracteatum* Wall. (les feuilles et les fleurs sont utilisées comme tonique et diurétique). Les plantes comestibles de la famille sont: *C. dichotoma* Forst., dont les fruits verts sont utilisés comme légumes, et *C. gharaf* Forsk, dont les fruits sont comestibles. Ratan Jot, un colorant rouge, est obtenu à partir des racines d'*O. hispida* Wall. Le bois de différentes espèces d'*Ehretia* est utilisé dans la fabrication des boîtes d'allumettes, le dos de la brosse, boîtes à thé, et d'autres articles similaires (Sharma, 2011).

### 2.1.3.4. Utilisations médicinales et effets biologiques et pharmacologiques

Les racines des espèces d'*Arnebia* sont utilisées dans les ulcères, furoncles, blessures, maux de tête et fièvre. L'extrait aqueux des fleurs traite les infections de la langue et de la gorge, de la fièvre et des troubles cardiaques; tandis que la plante entière est utilisée comme un stimulant, tonique, diurétique et expectorant. De même, les racines d'*Arnebia euchroma* (Royle) Johnston sont utilisées dans des ecchymoses et des éruptions cutanées. *A. hispidissima* Suksd. possède également des propriétés anti-inflammatoires, anti-tumorales, antivirales et inhibitrices des activités de l'agrégation plaquettaire et des prostaglandines. La plante entière de *H. ellipticum* Ledeb. I. est employée comme émétique et dans les morsures de serpent. Les feuilles sont utilisées pour le nettoyage et la cicatrisation des ulcères et roulées et mises dans les oreilles comme un remède pour les maux de tête. Pharmacologiquement, les espèces du genre *Heliotropium* ont montré un effet hypotenseur et des activités antimicrobiennes. L'héliotrine qui un alcaloïde pyrrolizidinique a démontré un effet hypotenseur chez des chiens et réduit de façon significative la nicotine qui induit une réponse spasmogénique vasopresseur. Ces espèces ont été considérées comme responsables de la maladie veino-occlusive hépatique. *H. marifolium* Retz. a été utilisée pour le traitement des ulcères, blessures, inflammations, piqûres de scorpions ou de guêpes, les morsures de serpents et de la rage, mais les représentants de ce genre sont soupçonnés d'être toxiques dans de nombreux pays. *H. subulatum* Hochst., *H. marifolium* Retz. et *H. ellipticum* Ledeb. I. ont également démontré des effets antimicrobiens. *H. subulatum* Hochst. possède en plus des



effets antiviraux et antitumoraux. Les espèces du genre *Trichodesma* ont été utilisées traditionnellement comme antidiurétique, antirhumatisme et administrées comme une boisson pour les enfants souffrant d'une dysenterie. *T. africanum* L. est utilisée comme émoullient et diurétique, la plante entière de *T. amplexicaule* Roth, est utilisée comme émoullient, cataplasme, les racines sont appliquées pour réduire les gonflements, et utilisées comme une boisson dans la dysenterie. Les feuilles de *T. amplexicaule* Roth. possèdent également un effet antimicrobien, et des activités anti-inflammatoires. Les feuilles de *T. zeylanicum* (Burm.f.) R.Br. sont utilisées comme émoullient et diurétique. L'extrait de fruit de *C. dichotoma* Forst. bloque l'éclosion des larves de *Meloidogyne incognita*. Les graines des espèces de *Cordia* sont anti-inflammatoires. *C. myxa* L. est un arbuste qui peut atteindre la hauteur de 5 à 10 m et les décoctions de cette plante sont utilisées contre les douleurs gastriques (Sharma *et al.*, 2009).

### 2.1.3.5. Toxicité

Une intoxication en masse affectant 6.000 personnes a été provoquée par les céréales contaminées par les graines de plusieurs espèces de *Heliotropium* et *Crotalaria*. Plusieurs investigateurs ont rapporté la maladie veino-occlusive hépatique humaine provoquée par l'ingestion de *S. officinale* L., cette plante est aussi considérée comme cancérigène pour les rongeurs. En raison de cette toxicité, l'association américaine des produits végétaux a placé cette plante dans leur liste d'usage restreint (uniquement pour usage externe) (Shi *et al.*, 2002). Le genre *Amsinckia* comprend de nombreuses espèces connues pour produire potentiellement des effets hépato-, pneumo-, et génotoxiques (Colegate *et al.*, 2014).

### 2.1.3.6. Principaux métabolites secondaires isolés de la famille Boraginaceae

Les études phytochimiques entreprises sur la famille Boraginaceae ont conduit à l'isolement de plusieurs classes phytochimiques principalement des alcaloïdes pyrrolizidiniques, naphthoquinones, alkannines dans les racines, uréide allantoiné, cyclitols, acides phénoliques, et tanins (Ghazanfar, 1994). L'étude d'Ozgen (2004), sur les racines d'*O. argentatum* Hub.-Mor., a permis d'isoler et de caractériser à partir d'un extrait n-hexane-dichlorométhane (1 : 1) quatre naphthoquinones: deoxyshikonine, acétyle shikonine, 3-hydroxy-isovaleryl shikonine, et 5,8-*O*-diméthyl acétyl shikonine. Deux arylnaphthalènes type lignane: rufescidride, rufescidride triacétate ont été isolés de l'extrait éthanolique des branches et tiges de *C. rufescens* A.DC. (Souza da Silva, 2004). L'extrait éthanolique des racines et tiges de *C. piauhiensis* Fresen renferme une saponine: acide pomolique 3 $\beta$ -*O*- $\alpha$ -L-

rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl et quatre triterpènes: acide quinovique, acide cinchologique, acide cinchologique 3β-O-6-desoxy-β-D-glucopyranoside et acide quinovique 3β-O-β-D-glucopyranoside (**dos Santos et al., 2005**). Les travaux de **Bergaoui et al. (2007)** sur l'extrait méthanolique des parties aériennes d'*Echiochilon fruticosum* Desf. ont permis de purifier et de caractériser un flavonol diglycoside appelé naringénine-5-O-β-D-glycopyranoside-3-O-α-L-rhamnopyranoside et un phénylpropanoïde glycoside nommé 1-O-[β-D-xylopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranosyl] eugenol. Quatre diterpènes: 19-O-neosarcodonine, 19-O-linoleoylsarcodonine, 19-O-oleoylsarcodonine et 19-O-stearoylsarcodonine ont été isolés de l'extrait dichlorométhanique des fruits de *Sarcodon scabrosus* (Fr.) Karst (**Kamo et al., 2004**). A partir d'une culture de cals de *Mertensia maritima* (L.) Gray, trois composés majeurs, (-)-R-allantoïne, (+)-rabdosiine et l'acide rosmarinique, ont été isolés de différents extraits par HPLC et identifiés par RMN du <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C, UV, DC et HPLC-MS (**Fedoreyev et al., 2012**). L'acide rosmarinique et deux autres acides phénoliques: acide syringique et acide sinapique ont été isolés de l'extrait hydroéthanolique d'une farine préparée des graines de Bourrache (*B. officinalis* L.) (**Wettasinghe et al., 2001**). Deux benzoquinones, heliotropinones A et B, ont été isolés de l'extrait dichlorométhanique des parties aériennes de *H. ovalifolium* Forsk. (**Guntern et al., 2008**). L'alkannine et shikinone ont été identifiés dans l'extrait hexanique des racines d'*Alkanna tinctoria* Tausch (**Assimopoulou et al., 2008**). Les alcaloïdes pyrrolizidiniques ont été isolés à partir des Boraginaceae soit non estérifiés comme la retronecine isolée de *Amsinckia milleri* (**El-Shazly et Wink, 2014**), soit monoestérifiés comme l'heliotrine isolée de *H. indicum* L. (**Avula et al., 2015**), soit diestérifiés comme le 3'-acétylhéliosupine isolé de *H. europaeum* (**Shimshoni et al., 2015**), soit macrocycliques comme l'incanine isolé de *Trichodesma incanum* A.DC. (**El-Shazly et Wink, 2014**), soit glycosylés comme la thesinine-4'-O-β-D-glucoside isolée de *B. officinalis* L. (**Herrmann et al., 2002**), soit N-oxydes comme la symphytine N-oxyde isolée de *S. officinale* L. (**Griffin et al., 2014**).

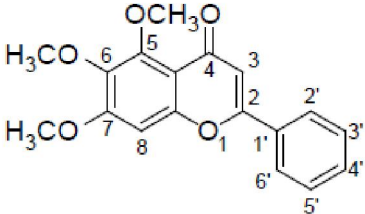
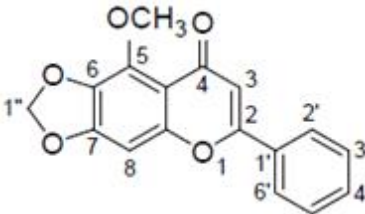
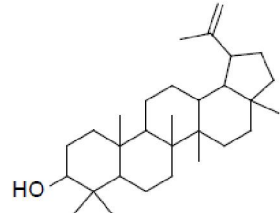
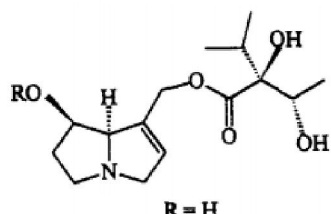
D'autres métabolites secondaires isolés et identifiés dans différentes espèces de Boraginaceae sont répertoriés dans le **tableau 2.6**.

### 2.1.4. Le genre *Echium* (Vipérine)

#### 2.1.4.1. Présentation

Le genre *Echium* L. (Vipérine) appartient à la sous-famille Boraginoideae, le plus grand des Boraginaceae (**Langstrom et Chase 2002**). Pendant longtemps, ce genre a été inclus dans

Tableau 2.6. Métabolites secondaires isolés des espèces de Boraginaceae.

Composés isolés	Structures	Classes phytochimiques	Espèces	Références
5,6,7-triméthoxyflavone		Flavonoïdes	<i>Actinocarya tibetica</i> Benth.	Singh <i>et al.</i> , 2013
5-méthoxy-6,7-méthylendioxyflavone		Flavonoïdes	<i>A. tibetica</i> Benth.	Singh <i>et al.</i> , 2013
Lupeol		Triterpènes	<i>A. tibetica</i> Benth.	Singh <i>et al.</i> , 2013
Lycopsamine		Alcaloïdes	<i>Amsinkia</i> sp.	Colegate <i>et al.</i> , 2014

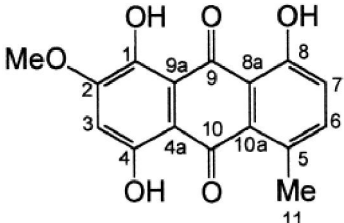
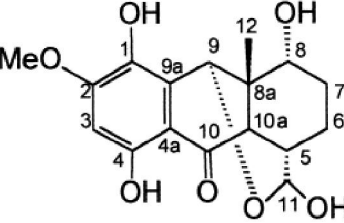
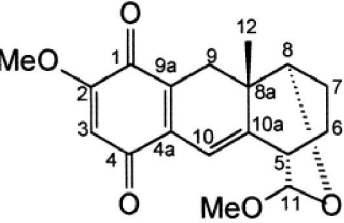
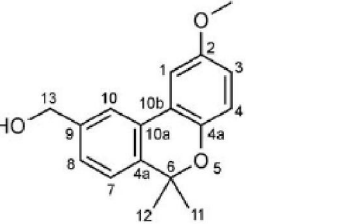
<b>Auxenone</b>		Dérivés anthracéniques	<i>Auxemma oncocalyx</i> Taub.	<b>Marques et al., 2000</b>
<b>Oncocalyxonol</b>		Dérivés anthracéniques	<i>A. oncocalyx</i> Taub.	<b>Marques et al., 2000</b>
<b>Auxemime</b>		Dérivés anthracéniques	<i>A. oncocalyx</i> Taub.	<b>Marques et al., 2000</b>
<b>(6,6-dimethyl-2-methoxy-6H-benzo[c]chromen-9-yl)methanol</b>		Benzochromènes	<i>Bourreria pulchra</i> Millsp.	<b>Erosa-Rejon et al., 2010</b>

Tableau 2.6 suite.

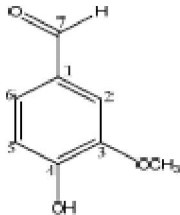
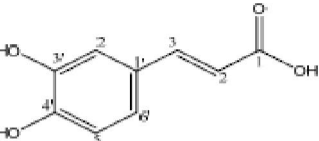
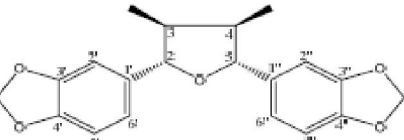
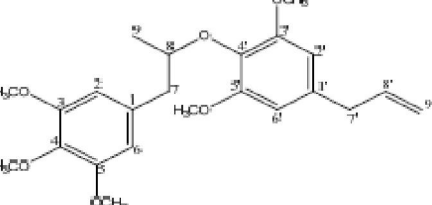
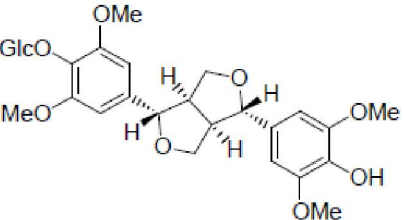
<b><i>m</i>-methoxy-<i>p</i>-hydroxybenzaldehyde</b>		Acides phénoliques	<i>Cordia exaltata</i> Lam.	de Sá de Sousa Nogueira <i>et al.</i> , 2013
<b>Acide (<i>E</i>)-7-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-propenoïque</b>		Acides phénoliques	<i>C. exaltata</i> Lam.	de Sá de Sousa Nogueira <i>et al.</i> , 2013
<b>2,5-bis-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-3,4-dimethyltetrahydrofurane</b>		Neolignanes	<i>C. exaltata</i> Lam.	de Sá de Sousa Nogueira <i>et al.</i> , 2013
<b>3,4,5,3',5'-pentamethoxy-1'-allyl-8.O.4'-neolignane</b>		Neolignanes	<i>C. exaltata</i> Lam.	de Sá de Sousa Nogueira <i>et al.</i> , 2013
<b>Syringaresinol mono-β-D-glucoside</b>		Lignanes	<i>C. rothii</i> Roem. and Schult.	Firdous <i>et al.</i> , 2010

Tableau 2.6 suite.

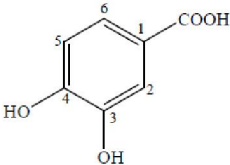
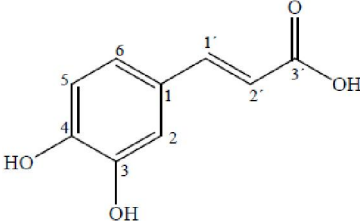
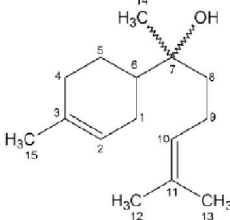
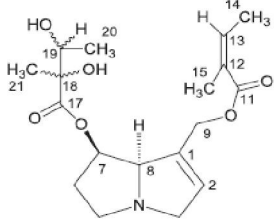
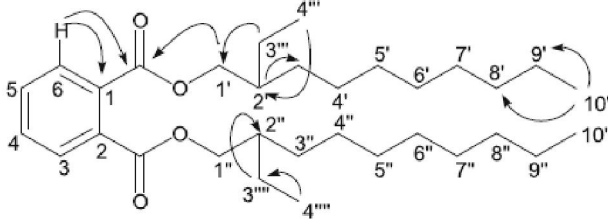
<p><b>Acide protocatechique</b></p>		<p>Acides phénoliques</p>	<p><i>C. sinensis</i> Lam.</p>	<p>Al-Musayeib <i>et al.</i>, 2011</p>
<p><b>Acide <i>trans</i>-caféique</b></p>		<p>Acides phénoliques</p>	<p><i>C. sinensis</i> Lam.</p>	<p>Al-Musayeib <i>et al.</i>, 2011</p>
<p><b><math>\alpha</math>-bisabolol</b></p>		<p>Terpènes</p>	<p><i>C. verbenacea</i> DC.</p>	<p>de Lima Guimarães <i>et al.</i>, 2015</p>
<p><b>Cryptanthine</b></p>		<p>Alcaloïdes</p>	<p><i>Cryptantha utahensis</i> (Gray) Greene.</p>	<p>Colegate <i>et al.</i>, 2013</p>
<p><b><i>o</i>-acide phthalique bis-(2-ethyl decyl)-ester</b></p>		<p>Phtalates</p>	<p><i>Heliotropium Strigosum</i> Willd.</p>	<p>Shah <i>et al.</i>, 2013</p>

Tableau 2.6 suite.

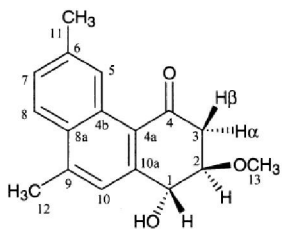
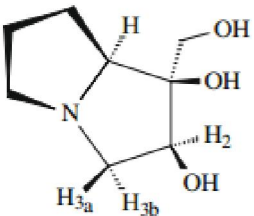
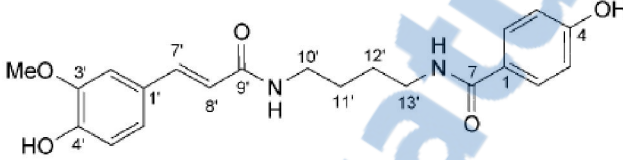
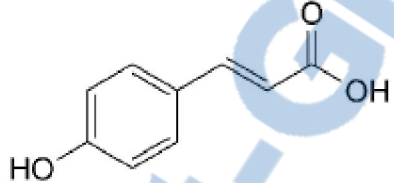
<b>Heliophenanthrone</b>		Phénanthrène	<i>H. ovalifolium</i> Forsk.	Guilet <i>et al.</i> , 2003
<b>Transalpinecine</b>		Alcaloïdes	<i>H. transalpinum</i> var. <i>transalpinum</i> Vell	Medina <i>et al.</i> , 2009
<b>4-hydroxy-N-{4- [(E)-3-(4- hydroxy-3- methoxyphenyl)pro p-2- enamido]butyl}ben zamide</b>		Phénylpropanoïdes (dérivés)	<i>Lindelofia stylosa</i> (Kar. and Kir.)	Choudhary <i>et al.</i> , 2008
<b>Acides p- coumarique</b>		Acides phénoliques	<i>L. stylosa</i> (Kar. and Kir.)	Choudhary <i>et al.</i> , 2008

Tableau 2.6 suite.

<p><b>8-O-β-D-glucopyranosyltora chrysonone</b></p>		<p>Naphtalènes</p>	<p><i>L. stylosa</i> (Kar. and Kir.)</p>	<p><b>Choudhary <i>et al.</i>, 2008</b></p>
<p><b>Shikometaboline A</b></p>		<p>Naphtoquinones</p>	<p><i>Lithospermum erythrorhizon</i> Sieb. et Zucc.</p>	<p><b>Yang <i>et al.</i>, 2014</b></p>
<p><b>Alkannine oligomère</b></p>		<p>Alkannines</p>	<p><i>Onosma echioides</i> (L.) L.</p>	<p><b>Nikita <i>et al.</i>, 2015</b></p>
<p><b>7-O-acetylechinate N-oxyle</b></p>		<p>Alcaloïdes</p>	<p><i>O. erecta</i> Sibth. &amp; Sm.</p>	<p><b>Damianakos <i>et al.</i>, 2013</b></p>

Tableau 2.6 suite.



<b>Viridinatine N-oxyde stereoisomer</b>		Alcaloïdes	<i>O. erecta</i> Sibth. & Sm. <b>Damianakos et al., 2013</b>
<b>7-epi-echimiplatine N-oxyde</b>		Alcaloïdes	<i>O. erecta</i> Sibth. & Sm. <b>Damianakos et al., 2013</b>
<b>Onosmerectine N-oxyde</b>		Alcaloïdes	<i>O. erecta</i> Sibth. & Sm. <b>Damianakos et al., 2013</b>
<b>Heliosupine-N-oxyde</b>		Alcaloïdes	<i>Rindera umbellata</i> (Waldst. & Kit.) Bunge <b>Mandić et al., 2013</b>

Tableau 2.6 suite.

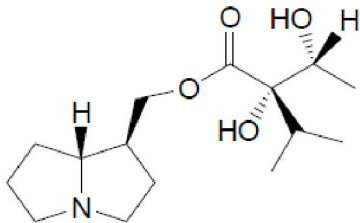
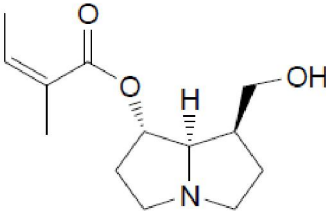
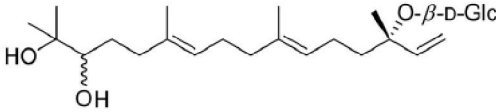
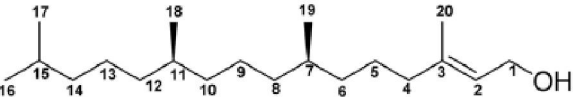
<b>9-(+)- Trachelanthyllabur nine</b>		Alcaloïdes	<i>R. umbellata</i> (Waldst. & Kit.) Bunge	<b>Mandić <i>et al.</i>, 2013</b>
<b>7-Angeloyl heliotridane</b>		Alcaloïdes	<i>R. umbellata</i> (Waldst. & Kit.) Bunge	<b>Mandić <i>et al.</i>, 2013</b>
<b>Lyciumoside X</b>		Terpènes	<i>Trigonotis peduncularis</i> Benth	<b>Song <i>et al.</i>, 2008</b>
<b>Phytol</b>		Terpènes	<i>T. peduncularis</i> Benth	<b>Song <i>et al.</i>, 2008</b>

Tableau 2.6 suite.

la tribu Echieae (**Candolle, 1845; Gürke, 1893**); Toutefois, récemment, **Al-Shehbaz (1991)** et **Riedl (1997)** ont placé *Echium* dans la tribu Lithospermeae. Cela a été corroboré par les données moléculaires, à partir des séquences atpB d'ADN plastidial (**Langstrom et Chase, 2002**). Les relations entre *Echium* et d'autres genres étroitement liés ne sont pas encore résolues (**Bond et Goldblatt, 1984; Koutnik, 1985; Retief et VanWyk, 1998**). **Lehmann (1830)** décrit le genre *Lobostemon* Lehm. qui inclue toutes les espèces endémiques d'Afrique du Sud qui étaient auparavant considérées dans le genre *Echium*. Cet auteur estime que la présence d'un stigmaté minutieusement bicapité plutôt que bifide confirme une position isolée des espèces *Lobostemon*. Plus tard, **Levyns (1934)** a révisé ce genre et a décrit un nouveau genre *Echiostachys*, sur la base de l'absence d'écailles staminales dans les fleurs de certaines espèces d'Afrique du Sud. Cependant, certains auteurs (**Johnston, 1953; Retief et VanWyk, 1998**) n'ont pas accepté *Echiostachys* comme un genre distinct de *Lobostemon*, sur la base de ce caractère. Récemment, les relations phylogénétiques d'*Echium* et *Lobostemon/Echiostachys* ont été déduites de la variation de séquences d'ADN (**Hilger et Bohle, 2000**). Selon ces auteurs, la présence d'un stigmaté bicapité plutôt qu'un stigmaté bifide et les analyses des séquences d'ADN ont confirmé une position isolée pour *E. maculatum* L., endémique en Europe de l'Est. Les mêmes auteurs ont suggéré que *E. maculatum* devrait être inclus dans un nouveau genre, *Pontechium* Bohle & Hilger.

Les espèces du genre *Echium* sont des plantes herbacées ou ligneuses à la base, hérissées de poils tuberculés ou non. Feuilles entières, linéaires ou ovales. Inflorescences en cymes. Fleurs munies de bractées foliacées. Calice profondément divisé en 5 lobes. Corolle en entonnoir irrégulier, à 5 lobes inégaux peu profonds, présentant à sa base un anneau ou 10 écailles ciliées. Etamines 5, inégales. Akènes 4, rugueux (**Quezel et Santa, 1963**).

Le genre *Echium* contient des fleurs irrégulières, principalement pollinisées par des insectes, il est distribué en Macaronésie, Europe, Asie de l'ouest, Nord et Sud de l'Afrique (**Retief et VanWyk, 1998**). 27 espèces du genre sont endémiques de l'archipel des Canaries, de Madère et du Cap-Vert sur les îles de la Macaronésie, tandis que les congénères restants (~30) se trouvent dans le circumméditerranéen ouest (**Bohle et al., 1996**). Toutes les espèces peuvent être propagées par les graines et les plus grandes espèces par boutures (**Cullen et al., 2011**). En Algérie le genre *Echium* est représenté par 23 espèces (**Quezl et Santa, 1963**).

**2.1.4.2. Utilisations médicinales et effets biologiques et pharmacologiques**

*E. amoenum* Fisch & C.A. Mey. a longtemps été utilisée dans la médecine traditionnelle. Les pétales d'*E. amoenum* ont été recommandées pour une variété d'effets tels que émoullient, anti-inflammatoire et analgésique, en particulier pour le rhume, anxiolytique, sédatif et d'autres symptômes psychiatriques, incluant l'obsession dans la médecine traditionnelle de l'Iran (**Ghoreishi et Bataghva, 2014**). Les racines d'*E. vulgare* L. ont été employées dans la médecine traditionnelle pour le traitement des fissure des mains et pour la cicatrisation (**Sezik et al., 1997**).

Selon **Niciforovic et al. (2010)** l'extrait méthanolique d'*E. vulgare* L. et *E. russicum* L. présente une activité antioxydante par inhibition de la peroxydation des lipides, piégeage des radicaux libres par DPPH, chélation des métaux et piégeage des radicaux hydroxyles. L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*E. italicum* L. a été étudiée en utilisant la méthode de diffusion sur disque et en déterminant la concentration minimale inhibitrice contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger* et *Candida albicans*. L'huile essentielle d'*E. italicum* L. a montré une activité antimicrobienne dépendante de la concentration sur tous les microorganismes testés (**Morteza-Semnani et al., 2009**). L'extrait aqueux des fleurs fraîches d'*E. amoenum* Fisch & C.A. Mey. contient un effet antidépresseur (**Sayyah et al., 2006**), tandis que, l'extrait éthanolique des fleurs d'*E. amoenum* Fisch & C.A. Mey. possède une activité anxiolytique avec un effet sédatif moindre que celui du diazépam (**Rabbania et al., 2004**). L'extrait hydrométhanolique des pétales d'*E. amoenum* Fisch & C.A. Mey. a un effet analgésique (**Heidari et al., 2006**). Les extraits méthanolique et chloroformique d'*E. amoenum* Fisch & C.A. Mey. présentent un effet antigénotoxique. L'effet génotoxique a été provoqué par l'emploi de l'éthyle méthanesulfonate qui cause une mutagénèse dans divers organismes (**Uysal et al., 2015**). Des extraits bruts de fleurs et des fractions issues d'*E. wildpretii* H. Pearson subsp. *Wildpretii* ont été testés contre des espèces d'insectes *Spodoptera littoralis*, *Leptinotarsa decemlineata*, et de pucerons *Myzus persicae*, *Diuraphis noxia*, *Metopolophium dirhodum*, *Rhopalosiphum maidis*, *Rhopalosiphum padi*. L'extrait éthanolique et les fractions contenant des lipides et des stéroïdes présentent une activité antiappétante significative contre les pucerons et *L. decemlineata* (**Santana et al., 2012**). Le pollen d'*E. plantagineum* L. est largement utilisé pour ses propriétés thérapeutiques, ainsi les extraits de pollen ont été utilisés dans la prostatite chronique pour leurs effets présumés anti-inflammatoires et anti-androgènes. Le pollen d'*E. plantagineum* L. permet également de

réduire la fragilité capillaire. En outre, l'ingestion quotidienne de pollen d'*E. plantagineum* L. est recommandée car il est capable de réguler les fonctions intestinales et a des effets bénéfiques sur le système cardio-vasculaire, la peau, la vision, etc. Le pollen d'*E. plantagineum* L. est aussi utilisé dans le domaine de la cosmétique pour sa contribution en vitamines aux crèmes froides (Di Paola-Naranjo *et al.*, 2004). L'huile d'*E. plantagineum* L. a montré un effet anti-athérogène, ce qui suggère qu'elle peut être une alternative botanique à l'huile de poisson pour l'athéroprotection (Forrest *et al.*, 2012).

### 2.1.4.3. Etudes phytochimiques antérieures et principaux métabolites secondaires isolés

Les espèces du genre *Echium* sont riches en métabolites secondaires, particulièrement des alcaloïdes pyrrolizidiniques, des naphthoquinones et des acides organiques (Dresler *et al.*, 2015). Selon Dresler *et al.* (2015) les extraits hexaniques et méthanoliques des racines d'*E. vulgare* L. et *E. russicum* L. renferment de l'acide rosmarinique et la shikonine. L'extrait éthanolique des racines jeunes d'*E. plantagineum* L. contient plusieurs naphthoquinones comme shikonine, acétylshikonine, et 1,3 dihydroxy-3-méthylantraquinone, détectés par l'analyse HPLC-MS et GC-MS (Weston *et al.*, 2013). Shikonine, alkannine, shikonin acétate et alkannine acétate ont été retrouvés dans une culture cellulaire d'*E. italicum* L. (Zare *et al.*, 2010). Neuf autres pigments shikonines: shikonine, acétylshikonine, propionylshikonine, isobutyrylshikonine, tiglylshikonine, 3,3-diméthylacrylshikonine, angélylshikonine, 2-méthyl-n-butyrylshikonine et isovalérylshikonine ont été identifiés dans l'épiderme racinaire d'*E. italicum* L. (Albrecht *et al.*, 2009). Deux quinones, echinone et echinofurane, ont été isolées à partir de cultures de cals d'*E. lycopsis* L. ainsi que plusieurs esters d'acyle de shikonine. La structure des deux quinones a été établie par des méthodes spectroscopiques et par des dégradations chimiques (Inouye *et al.*, 1981). L'étude de Sousa *et al.* (2015) a permis d'identifier des flavonoïdes: kaempférol-3-*O*-sophoroside et des anthocyanes: delphinidine-3-*O*-glucoside, petunidine-3-*O*-glucoside et malvidine-3-*O*-rutinoside dans l'extrait méthanolique acidifié du pollen d'*E. plantagineum* L. L'extrait méthanolique des parties aériennes fleuries d'*E. vulgare* L. renferme du kaempférol 3-*O*-néohespéridoside et l'acide rosmarinique (Kuruuzum-Uz *et al.*, 2004). L'huile essentielle des parties aériennes d'*E. amoenum* Fisch. & C.A. Mey. obtenue par hydrodistillation et analysée par GC et GC-MS, contient quarante six composés. Les principaux constituants de l'huile essentielle étaient le thymol (19,5 %) et le carvacrol (7,5 %) (Morteza-Semnani et Saeedi, 2005). L'analyse par GC et GC-MS de l'huile essentielle des parties aériennes d'*E. italicum* L. obtenue par hydrodistillation a permis d'identifier vingt-deux composés dont les principaux sont

l'hexadécanol (27,1 %) et la pulégone (8,8 %) (Morteza-Semnani et al., 2009). L'extrait méthanolique de la plante entière d'*E. glomeratum* Poir. a donné après plusieurs étapes de purification cinq alcaloïdes pyrrolizidiniques: (7S, 8R)-petranine, (7S, 8S)-petranine, (7R, 8R)-petranine ou (7R, 8S)-petranine, 7-angeloylretronecine et 9-angeloylretronecine (Alali et al., 2008). Le fractionnement de l'extrait éthanolique des feuilles d'*E. hypertropicum* Webb et *E. stenosphon* Webb a permis d'isoler sept alcaloïdes pyrrolizidiniques: 7-seneciolyretronecine, 9-angeloylretronecine, lycopsamine, 7-acetyl-lycopsamine, echimidine, 7-(2-méthylbutyryl)-9-echimidinylretronecine, 7-(2-méthylbutyryl)-9-echimidinyl retronecine *N*-oxyde (Carvalho et al., 2013). De l'extrait méthanolique des racines d'*E. plantagineum* L. après passage par une extraction en phase solide et après analyse par HPLC-ESI-MS, plusieurs alcaloïdes pyrrolizidiniques *N*-oxydes ont été identifiés: leptanthine *N*-oxyde, echimiplatine *N*-oxyde, intermedine *N*-oxyde, et lycopsamine *N*-oxyde (Weston et al., 2013).

#### 2.1.4.4. *Echium confusum* de Coincy

##### 2.1.4.4.1. Description botanique, distribution et habitat

###### ➤ Description botanique

Plante rameuse à tiges allongées plus ou moins décombantes, hispides, bisannuelles ou vivaces de 15 à 50 cm, avec plusieurs tiges fleuries. Feuilles basales ovales à obovales; feuilles caulinaires oblancéolées à spatulées, atténuées et sous-pétiolées à la base, plus ou moins denses, avec poils raides ou apprimés. L'inflorescence plus ou moins ramifiée, paniculée relâchée. Calice 6-10 mm à l'anthèse, jusqu'à 16 mm dans les fruits, densément blanc séteux. Grappes fructifères allongées. Corolle 12-22 mm, infundibuliforme, bleu foncé ou rosâtre à bleuâtre-pourpre, généralement avec 1-2 étamines exsertées; filaments parfois légèrement poilus; anneau basal de la corolle formé de 10 écailles intensément soudées (Quezel et Santa, 1963; Gibbs, 1971).

###### ➤ Distribution

*E. confusum* se distribue dans la région Ouest Méditerranéenne au niveau du littoral (Quezel et Santa, 1963; Gibbs, 1971).

###### ➤ Habitat

*E. confusum* habite les sables maritimes (Quezel et Santa, 1963).

➤ **Noms vernaculaires**

**Arabe:** Ras el Afaï, Leçane el assil.



**Figure 2.7.** Photos d'*E. confusum*, à gauche vue d'ensemble et représentation des fruits et fleurs, à droite représentation des feuilles.

➤ **Classification**

**Règne:** Plantae

**Embranchement:** Spermatophyta

**Sous-embranchement:** Angiospermae

**Classe:** Magnoliopsida

**Sous-classe:** Lamiidae

**Super-ordre:** Solananae

**Ordre:** Solanales

**Famille:** Boraginaceae

**Sous-famille:** Boraginoideae

**Genre:** *Echium*

**Espèce:** *Echium confusum* de Coincy.

#### **2.1.4.4.2. Utilisations médicinales**

Les feuilles sont utilisées comme diurétiques et anti-inflammatoires, les racines sont employées pour la cicatrisation des plaies et la nervosité, les fleurs sont utilisées comme tranquillisants et anxiolytiques.

#### **2.1.4.4.3. Propriétés biologiques et pharmacologiques**

Au meilleur de nos connaissances, aucun effet pharmacologique ou activité biologique n'a été décrit dans la bibliographie.

#### **2.1.4.4.4. Etudes phytochimiques antérieures et principaux métabolites secondaires isolés**

Au meilleur de nos connaissances, aucune étude phytochimique n'a été rapportée dans la bibliographie.

### **2.1.5. Le genre *Solenanthus* (Solenanthes)**

#### **2.1.5.1. Présentation**

Plantes vivaces en générale veloutées canescentes, surtout dans l'inflorescence. Feuilles basales grandes, à long pédoncule, poilues. Inflorescence: panicule à plusieurs cymes enroulées et étalées. Calice divisé presque à la base en lobes oblongs-elliptiques. Corolle plus ou moins cylindrique, avec des limbes et tubes indistincts et indéfinis, au maximum à 7 mm, les petits lobes: gorge-étamines présents. Étamines projetées de la corolle. Style beaucoup plus long que le calice et projetant habituellement de la corolle. Noisettes ovoïdes ou presque sphériques, sans ailes, chacune avec de nombreuses épines pointues avec barbes qui se fixent à la fourrure ou aux vêtements. Un genre d'environ 17 espèces présentes en Europe du Sud, Sud-ouest et l'Asie centrale, une espèce en Chine centrale. En Algérie le genre *Solenanthus* est représenté par deux espèces (**Quezel et Santa, 1963**). Plantes faciles à cultiver et à multiplier par graines (**Cullen et al., 2011**).

#### **2.1.5.2. Utilisations médicinales et effets biologiques et pharmacologiques**

Il y a peu d'informations sur l'utilisation médicinale des espèces du genre *Solenanthus* excepté certaines publications faisant état de l'emploi de *S. circinnatus* Ledeb. dans la médecine traditionnelle iranienne pour soulager les douleurs et l'inflammation (**Afsaneh et al., 2010**). Egalement, il y a eu peu d'investigation sur les activités biologiques ou les effets



pharmacologiques de *Solenanthus*. L'extrait hydroalcoolique des racines de *S. circinnatus* Ledeb. induit un effet inhibiteur sur la douleur aiguë et chronique et un effet anti-inflammatoire (Afsaneh *et al.*, 2009; 2010).

### **2.1.5.3. Etudes phytochimiques antérieures et principaux métabolites secondaires isolés**

Seulement quatre métabolites secondaires de la sous-classe alcaloïdes pyrrolizidiniques: echinatine, cerategine, rinderine et turkestanine ont été isolés de quatre espèces du genre *Solenanthus*: *S. circinnatus* Ledeb., *S. coronatus* Rgl., *S. karateginus* et *S. turkestanicus* (Reg & Smirn.) (El-Shazly et Wink, 2014).

### **2.1.5.4. *Solenanthus lanatus* A.DC.**

#### **2.1.5.4.1. Description botanique, distribution et habitat**

##### **➤ Description botanique**

Plante vivace de 20 à 25 cm de hauteur, rameuse, à feuilles alternes lancéolées, entièrement couvertes de poils d'un blanc argenté, particulièrement denses dans l'inflorescence. Petites fleurs penchées, brun-pourpré, disposées en cymes à bractées foliacées. Calice à 5 lobes. Corolle étroitement tubuleuse, à 5 lobes très courts, mesurant environ 1,5 mm de long, gorge comportant des écailles, 5 étamines saillantes, 1 style. Fruits akènes. La floraison est de février à avril (Beniston et Beniston, 1984).

##### **➤ Distribution**

Endémique, Maroc-Algérie (Beniston et Beniston, 1984).

##### **➤ Habitat**

Champs, friches, bord des routes. Commun à l'Ouest, jusqu'au Sahara (Beniston et Beniston, 1984).

##### **➤ Noms vernaculaires**

**Arabe:** Ferach en neda.



**Figure 2.8.** Photos de *S. lanatus*: à gauche, vue d'ensemble; à droite, feuilles et fleurs; en bas, fruits et fleurs.

➤ **Classification**

**Règne:** Plantae

**Embranchement:** Spermatophyta

**Sous-embranchement:** Angiospermae

**Classe:** Magnoliopsida

**Sous-classe:** Lamiidae

**Super-ordre:** Solananae

**Ordre:** Solanales

**Famille:** Boraginaceae

**Sous-famille:** Boraginoideae

**Genre:** *Solenanthus*

**Espèce:** *Solenanthus lanatus* A.DC.

#### **2.1.5.4.2. Utilisations médicinales**

Les feuilles sont utilisées pour le traitement des maladies des yeux, maladies de la peau, de la diarrhée, des brûlures et des plaies, les fruits sont utilisés dans les troubles mentaux.

#### **2.1.5.4.3. Propriétés biologiques et pharmacologiques**

Au meilleur de nos connaissances, aucun effet pharmacologique ou activité biologique n'a été décrit dans la bibliographie.

#### **2.1.5.4.4. Etudes phytochimiques antérieures et principaux métabolites secondaires isolés**

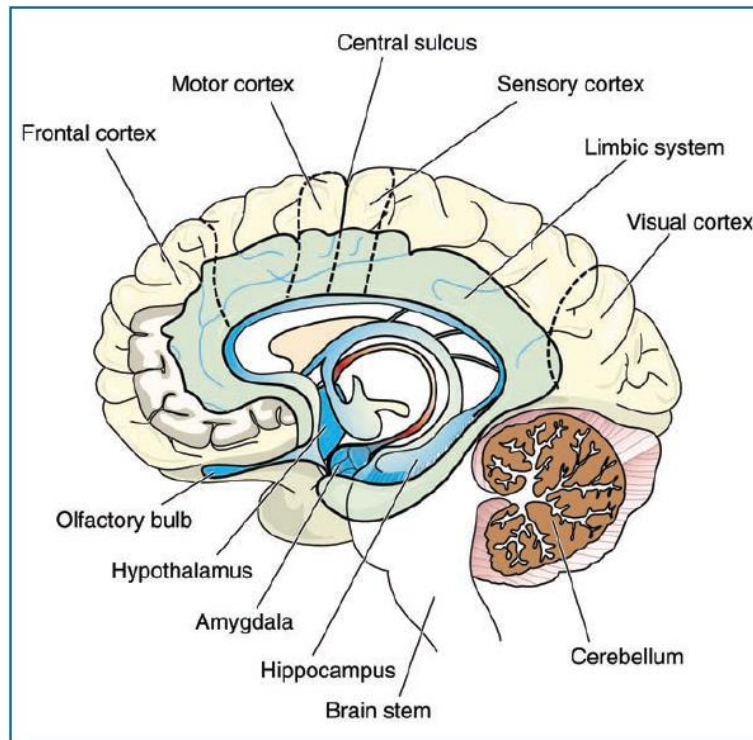
Au meilleur de nos connaissances, aucune étude phytochimique n'a été rapportée dans la bibliographie.

### **2.2. Maladie d'Alzheimer: diagnostic, neuropathologie, et stratégies thérapeutiques**

La maladie d'Alzheimer (MA) est probablement la cause la plus fréquente de démence sénile. C'est une maladie chronique qui s'installe graduellement et conduit dans le temps à une altération dans les fonctions cognitives (la mémoire, le jugement, l'orientation, la compréhension, la capacité d'apprendre et le langage). On compte actuellement, en Algérie, 100.000 cas. La MA est un problème de santé publique mais également un problème de société primordial, en tenant compte des coûts humains et sociaux. Les patients nécessitent une médication adaptée et une assistance.

L'altération des fonctions cognitives, remarquée dans toutes les catégories de démence, est en liaison avec l'efficacité réduite des processus de neurotransmission et la dégénérescence des circuits neuronaux du cerveau (**Poirier, 2002**). Le diagnostic d'une démence est assez difficile, car de nombreuses catégories de démences montrent les mêmes symptômes cliniques. Dans la MA, on remarque une perte graduelle des neurones cholinergiques et, de ce fait, une réduction assez importante du niveau de l'acétylcholine (ACh) dans le cerveau; cette conséquence sera essentiellement importante au niveau des néocortex pariétaux et temporaux, ainsi qu'au niveau de l'hippocampe (**figure 2.9**) (**Davies et al., 1976; Whitehouse et al., 1982**). Ce manque cholinergique est identiquement remarqué dans le cas de démences vasculaires ou liées à des corps de Lewy, ce qui justifie que les sujets atteints de ces différentes maladies neurodégénératives bénéficient de la même médication (**Gottfries et al., 1994; Tohgi et al., 1996; Tiraboschi et al., 2000; McKeith et al., 2003**).

Ces maladies sont couramment liées entre elles: 25 % des malades de l'Alzheimer montrent, après autopsie, une démence vasculaire, alors que 20 % des sujets souffrant de démence, globalement, présentent après autopsie, une MA liée à des corps de Lewy (**Hansen et Crain, 1995; Gorelick et al., 1996; Tiraboschi et al., 2000**).



**Figure 2.9.** Les trois principales zones du cerveau: le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral. Chaque région exerce des fonctions spécifiques. Le cerveau, qui comprend le cortex cérébral, contrôle les activités conscientes, le cervelet coordonne les mouvements des muscles, et le tronc cérébral est responsable des processus vitaux du corps (**Borda, 2006**).

### 2.2.1. Historique

La forme de démence sénile a été décrite pour la première fois par le Docteur Alois Alzheimer, neurologue et psychiatre allemand. Celle-ci prendra le nom de la MA.

C'est en 1906, lors d'une conférence de psychiatres allemands à Tübingen que cet état de démence est décrit pour la première fois. Alzheimer présente le cas de la femme, Auguste, dévoilant une déficience cognitive portant une diminution de la compréhension et de la mémoire (**Maurer et al., 1997**). Après avoir réalisé une autopsie du cerveau de la patiente, il a découvert des plaques et une dégénérescence neurofibrillaire, qui seront les marques caractéristiques de la MA (**figure 2.10**) (**Alzheimer, 1911**).



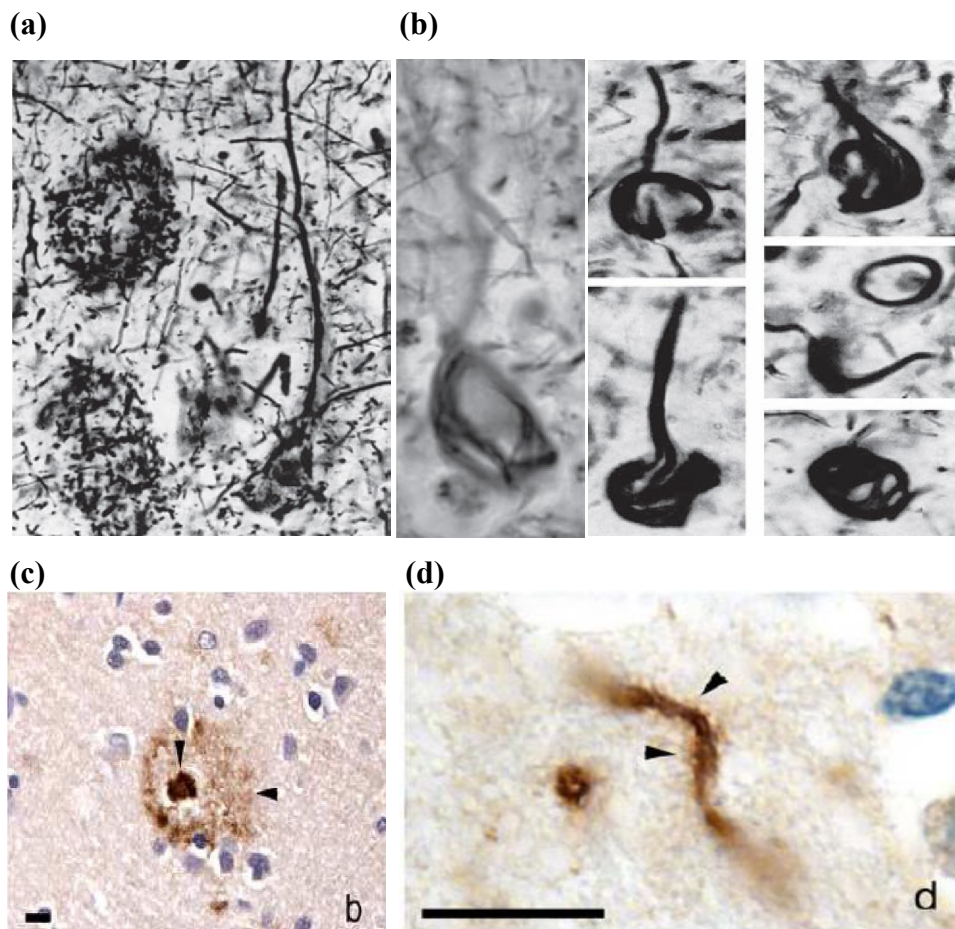
**Dr. Alois Alzheimer 1864-1915 (Feldman, 2007).**

Les neurones dégénérés constituent les plaques, qui présentent une toxicité pour les cellules cérébrales. La dégénérescence neurofibrillaire est un amas de fragments de protéines en hélice dans les neurocytes (**figure 2.10**).

A cette époque, la plupart des psychiatres ont considéré cette maladie comme un état normal de vieillissement. Le rapport entre la diminution des fonctions cognitives et le nombre de neurones dégénérés a été découvert dans les années 60, ce qui conduira à considérer la MA comme pathologie à part entière. De ce fait, les recherches vont se multiplier ce qui amènera à une progression des connaissances de cette pathologie.

L'évolution des outils et des techniques scientifiques a abouti à explorer et à saisir les processus compliqués qui dégénèrent les neurocytes cérébrales. Une hypothèse d'un déficit en un neurotransmetteur l'ACh a été émise par les chercheurs dans les années 70. L'intérêt général de la MA ne croit qu'à partir des années 80. En effet, elle est de plus en plus rencontrée, les sujets à risque étant de plus en plus nombreux du fait de l'augmentation de l'espérance de vie. Les progrès de la recherche, ont permis de démontrer que le peptide amyloïde-beta ( $A\beta$ ) et la protéine Tau sont à l'origine des plaques séniles et des dégénérescences neurofibrillaires respectivement (**figure 2.11**). Ces structures toxiques provoquent un dysfonctionnement du système nerveux central (SNC).



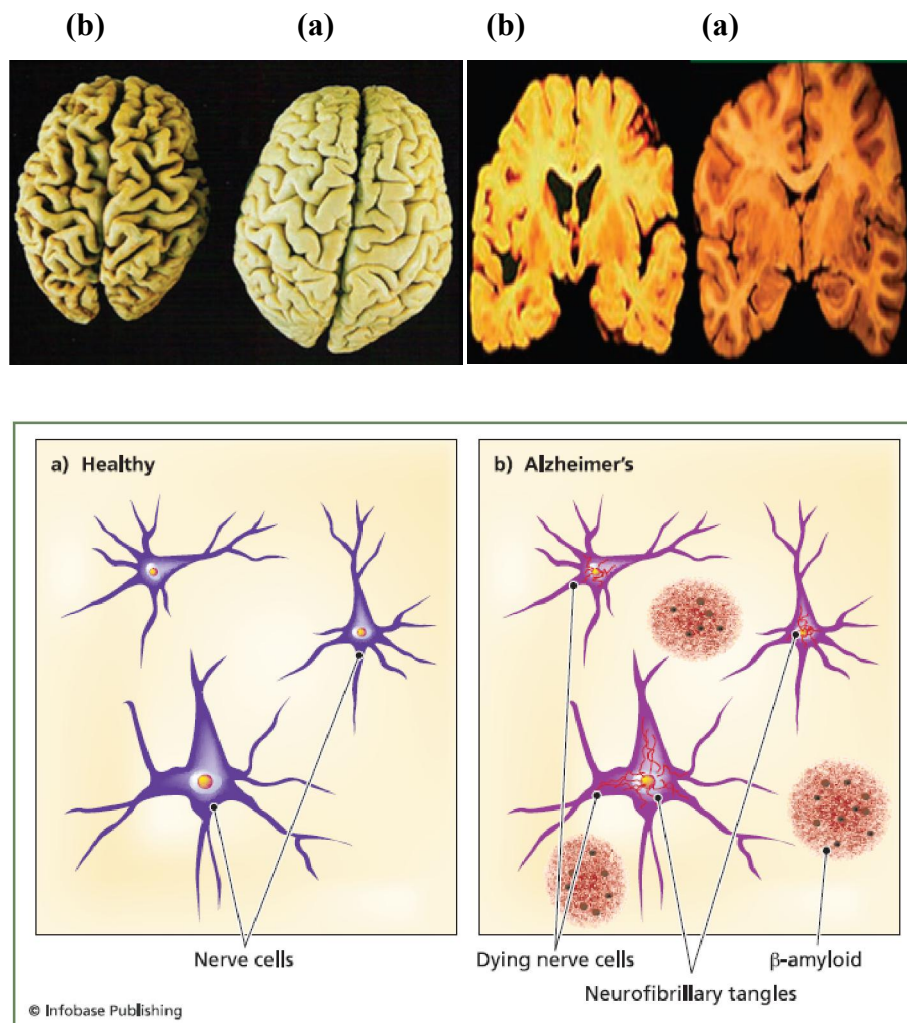


**Figure 2.10.** Les lésions neuropathologiques de la MA. A: Plaques amyloïdes décrites par Aloïs Alzheimer par la technique histologique d'imprégnation argentique (Feldman, 2007), B: Corps neurofibrillaires décrits par Aloïs Alzheimer par la technique histologique d'imprégnation argentique (premier cas: Auguste D. (1906)) (Feldman, 2007). C: Plaques amyloïdes mise en évidence par immunomarquage avec un anticorps dirigé contre le peptide amyloïde (Dako) (Duyckaerts *et al.*, 2009). La région dense centrale (et sa périphérie) est principalement constituée de peptides A $\beta$ 42 insolubles. D: Corps neurofibrillaires mise en évidence par immunomarquage avec un anticorps dirigé contre la protéine Tau (Dako) (Duyckaerts *et al.*, 2009).

Cette maladie est la forme la plus commune de démence affectant les personnes âgées, avec une durée moyenne de 3 à 10 ans entre l'apparition des symptômes cliniques et la mort. L'incidence de la MA augmente avec l'âge, même pour les personnes les plus âgées: à partir de 0,5 % à 65 ans, elle s'élève à près de 8 % à l'âge de 85 ans (Liang et Fang, 2006). La maladie fait aussi des ravages chez les plus jeunes: 30.000 à 50.000 malades ont moins de 60 ans.

Le nombre de personnes touchées à travers le monde est de 36,5 millions <sup>(1)</sup> avec 2,4 millions de cas aux Etats-Unis d'Amérique <sup>(2)</sup>, 860.000 cas en France <sup>(3)</sup>, 100.000 cas en

Algérie. On estime que le nombre pourrait atteindre 65,7 millions vers 2030. La MA est devenue l'un des principaux problèmes de santé publique.



**Figure 2.11.** Comparaison des cerveaux et des neurones de personnes saines (a) et d'individus atteints de la MA (b) (Feldman, 2007; Kelly, 2008).

### 2.2.2. Diagnostic

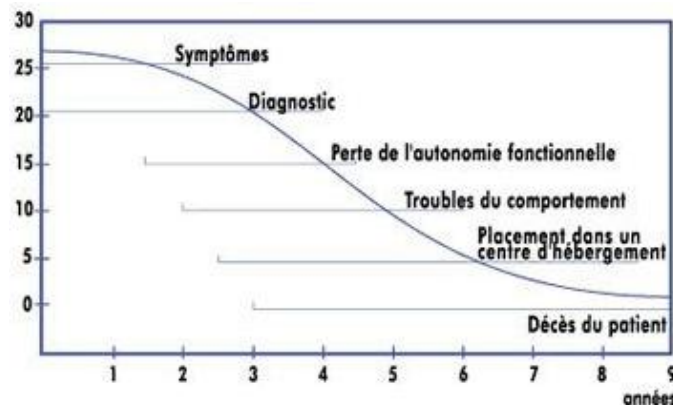
Le diagnostic facilite au patient l'accès aux premières possibilités de soins. Il permet aussi à la famille de s'organiser pour s'adapter à l'évolution. L'absence d'un diagnostic fiable constitue un véritable problème. L'établissement d'un diagnostic conduit à un allongement de l'espérance de vie qui peut atteindre 20 ans, même si la durée de vie moyenne entre l'apparition des symptômes et la mort se situe autour de 8,5 ans.

Plusieurs avancées dans ce domaine ont été atteintes. A présent, le diagnostic comprend la combinaison de signes cliniques, de tests neuropsychologiques et de techniques d'imagerie

cérébrale (imagerie par résonance magnétique (IRM), tomographie à émission de positrons (TEP)). Cependant, les troubles et les lésions de la maladie ne peuvent pas être détectés par aucune de ces techniques. A l'heure actuelle, uniquement l'examen *post mortem* peut établir le diagnostic final.

### 2.2.2.1. Les manifestations cliniques

Le développement des troubles liés à la maladie est progressif et inévitable, il dure plusieurs années (**figure 2.12**). L'absence de signe clinique manifesté cache l'étape asymptomatique. Elle peut progresser sur de nombreuses années. La période de pré-maladie, qui prend en moyenne 3 à 4 ans, fait apparaître les premières manifestations cliniques de la MA que sont les troubles de la mémoire épisodique, en liaison avec l'incapacité de retenir des informations récentes; par contre celles anciennes restent en mémoire jusqu'à un stade avancé de la maladie. Cependant, ces anomalies peuvent être compensées par la personne atteinte de la maladie et par le biais de l'entourage car il y a une conservation importante des autres capacités intellectuelles et l'impact sur la vie quotidienne est minime.



**Figure 2.12.** Les étapes de la progression de la MA (Feldman et Gracon, 1996).

A ces premiers signes cliniques classiques, s'ajoutent d'autres signes tels que les troubles du langage, du mouvement et de la reconnaissance. La maladie mène à une incohérence dans le parler et une incompréhensibilité de l'écrit, ainsi qu'à des atteintes dans d'autres capacités cognitives interférant avec l'humeur, la raison ou le jugement. Il en résulte une détérioration de la personnalité, des troubles neurologiques (aphasie, crises épileptiques) et une démence forte. A un stade tardif de la maladie, le malade devient dépendant car il ne peut pas accomplir des tâches simples comme se nourrir ou se déplacer pour éliminer les sels. En plus, l'anxiété et le mauvais comportement que développe le patient rendent la prise en charge par



l'entourage compliquée. Cette phase terminale difficile pour le patient et son environnement s'accompagne, le plus souvent, par un placement dans un établissement spécialisé.

La défaillance de la mémoire est stable et est liée d'une manière variable aux autres symptômes, ceci montre une variété clinique même dans le stade avancé de la maladie. En plus, le signe le plus précoce est la perte de mémoire ce qui conduit à une difficulté dans l'établissement d'un premier diagnostic face à un vide de mémoire, apparent tout simple et habituel. Face à un tel signe caché, la recherche des signes non apparents passe par des consultations spécialisées pour les troubles de mémoire, ce qui permettra le diagnostic, on parle alors d'examen neuropsychologique.

### **2.2.2.2. Tests neuropsychologiques**

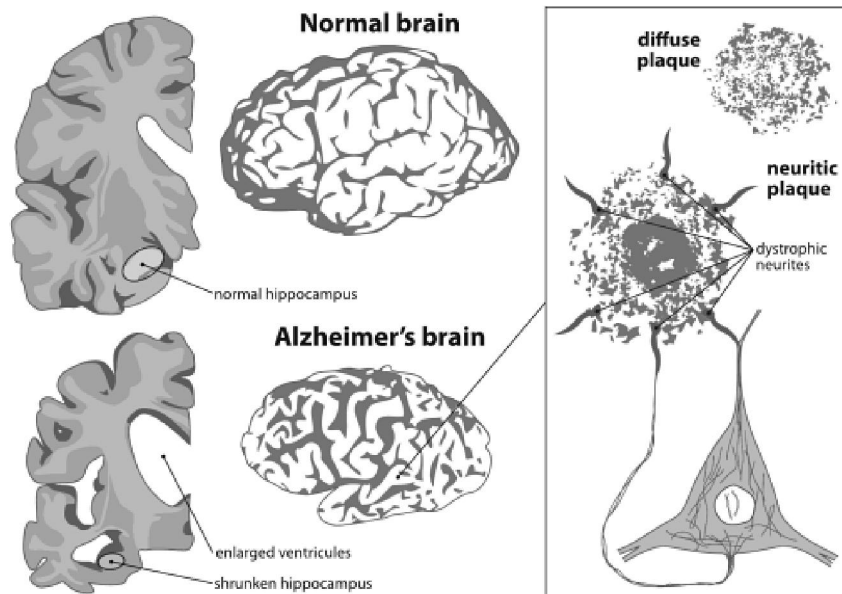
Ils sont établis par des grilles unifiées, facilitant l'examen de la mémoire par une méthode qualitative et quantitative. Cet examen prend en générale une séance de consultation. Ce test est réalisé par les neuropsychologues.

Le diagnostic des patients souffrant de troubles de mémoire est en plus un examen d'élimination, il faut écarter d'autres maladies qui exhibent des signes presque similaires et qui peuvent être traitées autrement (cancer, accident vasculaire cérébrale).

### **2.2.2.3. L'imagerie cérébrale**

Dans le domaine histologique, des recherches ont permis de mettre en évidence des lésions cérébrales (plaques amyloïdes et chevauchement neurofibrillaire) (**figure 2.10, 2.11, 2.13**), perte considérable des neurocytes, au début dans la région la plus profonde du lobe temporal du cerveau (cortex entorhinal et hippocampe), partie dans laquelle se situent les informations, région impliquée dans les processus de formation de la mémoire. Les dommages se dirigent ensuite vers les lobes pariétaux, occipitaux et frontaux, pour toucher environ la totalité du cerveau, en dehors de toucher des régions impliquées dans le processus de mouvement.

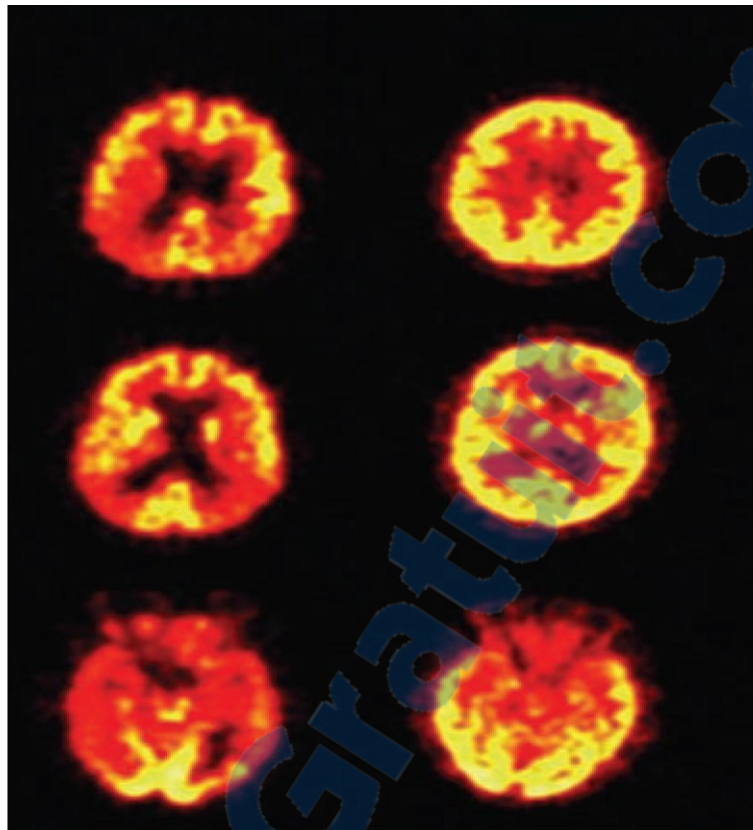
Autres que les lésions, des altérations neuropathologiques sont caractéristiques du cerveau des patients souffrant de la MA, telles que l'atrophie cérébrale (**figure 2.13**), la perte synaptique, diminution de l'ACh, baisse du métabolisme énergétique (**figure 2.14**) et un niveau élevé d'inflammation (**Mattson, 2004**).



**Figure 2.13.** Illustration schématisée simplifiée montrant les caractéristiques pathologiques de la MA; la partie en bas à gauche représente une section coronale de cerveau avec une pathologie de la MA avancée, montrant des espaces ventriculaires étendus et un complexe hippocampique fortement rétréci par rapport à un cerveau normal, ci-dessus. Notez l'état rétréci global du cerveau de la MA (en bas, au centre), la réduction du volume de la circonvolution corticale (cortical gyri), et les sillons élargis (gris), également représentés dans les sections coronales. Les caractéristiques microscopiques observées dans le cortex cérébral et d'autres régions du SNC sont représentées schématiquement dans le panneau à droite. Dans la partie supérieure, l'agrégation du peptide A $\beta$  sous la forme d'une plaque amyloïde diffuse, dans le centre mature, plaque neuritique mature avec un noyau dense (généralement Thioflavine-s positive) entouré par le matériel A $\beta$  et, plus dans le périphérique, une corolle de neurites dystrophiques. Les neurones (en bas à droite) contiennent des enchevêtrements neurofibrillaires (Cuello, 2007).

Le diagnostic différentiel est réalisé par des techniques d'imagerie (scanner cérébral et résonance magnétique), qui apportent des preuves diagnostiques importantes telles que les images d'atrophie de l'amygdale hippocampique, typique de la MA. Les techniques avancées d'imagerie fonctionnelle mettent en évidence des parties atrophiées et non fonctionnelles dans le cerveau qui favorisent le diagnostic de la MA. Cependant, la révélation précoce de la maladie par l'emploi de l'imagerie n'en est qu'à l'étape de recherche.

Par ailleurs, l'absence de marqueurs qui facilitent le diagnostic précoce en observant les structures toxiques par TEP ou par IRM. Cela fait réellement problème. La mise au point et le développement de tels marqueurs est d'ailleurs l'un des principaux défis dans le cadre de la lutte contre la maladie.



**Figure 2.14.** Images par TEP du vieillissement normal (à gauche) et de la MA (à droite). Le métabolisme du glucose est représenté sur une échelle de chaleur, avec des couleurs plus vives reflétant une plus grande utilisation du glucose. Le métabolisme du glucose est réduit dans les régions corticales postérieures (lobes pariétaux et temporaux) chez les patients atteints de la MA (Feldman, 2007).

### 2.2.3. Neuropathologie

#### 2.2.3.1. Le peptide amyloïde-beta

Les plaques séniles amyloïdes sont constituées par un peptide de 4 KDa. Le clivage protéolytique de l'APP (amyloid precursor protein) donne au cours du métabolisme normal le peptide A $\beta$  (figure 2.15) (Haass *et al.*, 1992; Shoji *et al.*, 1992). L'APP est une glycoprotéine transmembranaire multifonctionnelle (Mattson, 1997; Sambamurti *et al.*, 2002), constituée par trois domaines: cytoplasmique, transmembranaire hydrophobe, et extracellulaire. L'expression de l'APP est régulée par un gène situé sur le chromosome 21. N- et O-glycosylations, sulfatations et phosphorylations, sont les modifications post-traductionnelles que subit l'APP durant sa maturation. Elle existe sous deux formes: sécrétée ou ancrée à la membrane. L'APP subit plusieurs clivages protéolytiques. Il existe trois sites principaux de

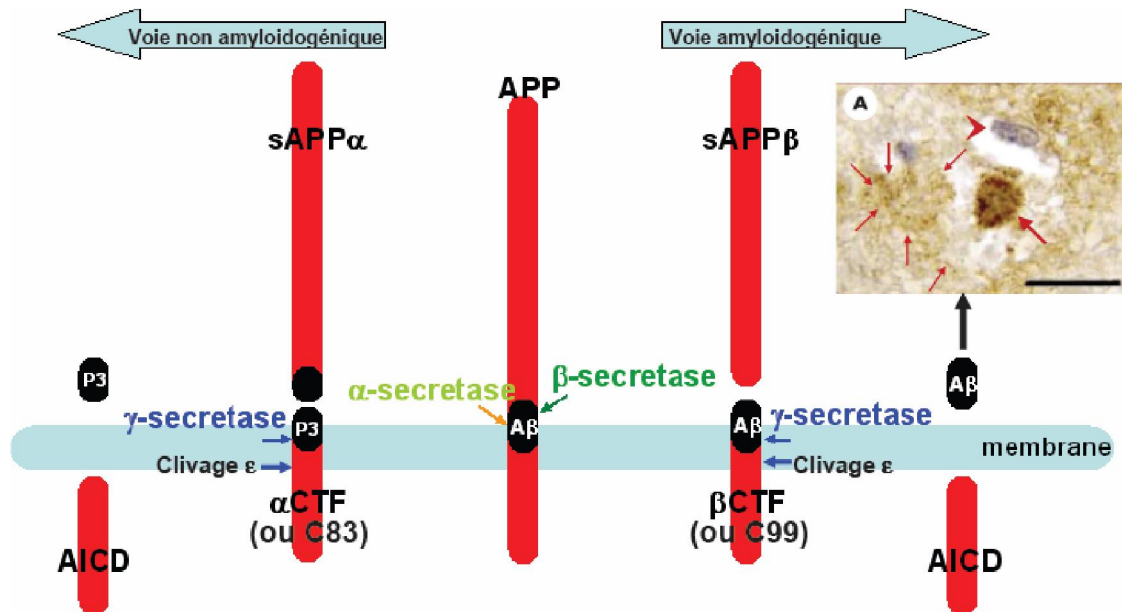
clivage de l'APP (**figure 2.15**), qui impliquent chacun un système enzymatique spécifique (**Mattson, 1997; Nunan et Small, 2002**). La  $\beta$ -sécrétase coupe entre les acides aminés (aa) 671 et 672 de l'APP de 770 aa (extrémité *N*-terminale d'A $\beta$ ), l' $\alpha$ -sécrétase coupe entre les aa 687 et 688 (aa 16 et 17 d'A $\beta$ ) et la  $\gamma$ -sécrétase coupe après les aa 710 à 714 (extrémité *C*-terminale d'A $\beta$ ). Deux principales voies de coupure de l'APP ont été identifiées (**figure 2.15**):

- La coupure par l' $\alpha$ -sécrétase, entre les aa 16 et 17 d'A $\beta$  (**Kamino *et al.*, 1992**), aboutit à la libération d'un grand fragment *N*-terminal, appelé sAPP $\alpha$ , et à la construction d'un fragment *C*-terminal, appelé C83 ( $\alpha$ CTF: fragment *C*-terminal), constitué du fragment amputé d'A $\beta$  (incomplet) et de la queue cytoplasmique de l'APP (AICD: *amyloid precursor protein intracellular domain*). La coupure par la  $\gamma$ -sécrétase libère le fragment p3, qui est sécrété par la cellule, de la queue cytoplasmique ( $\alpha$ CTF).
- La  $\beta$ -sécrétase coupe l'APP avant le premier acide aminé d'A $\beta$ . Cette coupure aboutit à la libération du fragment *N*-terminal appelé sAPP $\beta$  et à la génération du fragment *C*-terminal appelé C99 ( $\beta$ CTF), composé de la séquence d'A $\beta$  et de la queue cytoplasmique (AICD). La coupure par la  $\gamma$ -sécrétase forme le peptide A $\beta$ , qui est sécrété par la cellule.

Signalons que la coupure par la  $\gamma$ -sécrétase, qui se réalise dans la membrane cellulaire, s'exécute en différents sites voisins et aboutit ainsi à une hétérogénéité *C*-terminale des peptides p3 et A $\beta$ , respectivement en p3(17-Z) et A $\beta$ (1-Z) avec Z = 39 à 43.

Les peptides A $\beta$  et p3 ont été identifiés dans le plasma, le liquide céphalorachidien (LCR) et des extraits de tissus cérébraux (**Seubert *et al.*, 1992; Vigo-Pelfrey *et al.*, 1993**). Cependant, ces deux peptides sont impliqués dans les lésions liées à la MA. Le peptide A $\beta$  est le composant essentiel des plaques séniles amyloïdes, tandis que le p3 est le composant essentiel des dépôts diffus non amyloïdogènes (**Gowing *et al.*, 1994; Iwatsubo *et al.*, 1994; Higgins *et al.*, 1996; Lalowski *et al.*, 1996**).

L'APP semble avoir un rôle dans la croissance et l'attachement des cellules (**Saitoh *et al.*, 1989; Breen *et al.*, 1991; Milward *et al.*, 1992**). Ces effets physiologiques sont réalisés par l'interaction des molécules situées dans la surface des cellules et dans la matrice extracellulaire avec l'APP, telles que les protéines fibreuses (collagènes), les glycoprotéines de structure (laminine,  $\beta$ -1-intégrine), et les glycosaminoglycanes (l'héparine et l'héparane-sulphate) (**Bush *et al.*, 1994; Behr *et al.*, 1996; Storey *et al.*, 1996**).



**Figure 2.15.** Clivage de l'APP. La voie non amyloïdogénique de l'APP est la succession de deux clivages: le premier par l' $\alpha$ -sécrétase, le second par la  $\gamma$ -sécrétase formant de nombreux dérivés (P3, AICD, sAPP $\alpha$ ). L'action de la  $\beta$ -sécrétase remplace celle de l' $\alpha$ -sécrétase pour entrer dans la voie amyloïdogénique. Les peptides terminaux sont: AICD, sAPP $\beta$  et le peptide amyloïde A $\beta$ . Ce dernier s'agrège pour former les plaques amyloïdes (Cossec, 2009).

La protéine sAPP $\alpha$  a un effet neurotrophique, elle protège les neurones et assure la croissance (Ninomiya *et al.*, 1993; Jin *et al.*, 1994; Ohsawa *et al.*, 1997). Elle régule aussi l'excitabilité neuronale et la plasticité synaptique, par l'activation des canaux potassiques qui régulent eux-mêmes la concentration intracellulaire en calcium des neurones (Mattson *et al.*, 1993; Furukawa *et al.*, 1996). La protéine sAPP $\beta$  assure un rôle neurotrophique très faible par rapport à sAPP $\alpha$  (Furukawa *et al.*, 1996), et elle est associée à l'altération de la régulation du calcium.

Le peptide A $\beta$  peut être lié à la membrane, soluble ou agrégé. La première forme est la plus répandue chez les individus sains, par contre la forme soluble et agrégée s'élève chez les individus atteints de la MA (McLean *et al.*, 1999; Bush, 2003). Le peptide A $\beta$  assure une activité neurotrophique à faible quantité (Yankner *et al.*, 1990). Le rôle physiologique du peptide p3 n'est pas à présent bien élucidé.

Les CTFs ( $\alpha$  et  $\beta$ ) ont été découverts transloqués dans le noyau (Gao *et al.*, 2001; Kinoshita *et al.*, 2002), en interaction avec une protéine appelée Fe65 (Kesavapany *et al.*,

2002). Le complexe protéique CTF-Fe65 contrôle la transcription de gènes par la régulation d'une histone acétylase (Cao *et al.*, 2001).

La pathogénie des peptides A $\beta$  a été prouvée par de nombreux groupes scientifiques sur des modèles *in vitro* (cultures cellulaires) (Iversen *et al.*, 1995). L'existence d'agrégats de peptides A $\beta$  dans des cultures de cellules neuronales provoque une dystrophie des neurites et une perte neuronale, ces observations sont étant similaires à celles de la MA (Pike *et al.*, 1991; Busciglio *et al.*, 1992). Il a été signalé aussi que la toxicité des peptides A $\beta$  dépend de l'âge (Geula *et al.*, 1998; Fukuta *et al.*, 2001).

Des réactions inflammatoires ont été détectées liées à l'installation des peptides A $\beta$ , puisque ces derniers sont observés dans l'entourage de microgliocytes et d'astrocytes activées. Les astrocytes provoquent des réponses apoptotiques, tandis que les microgliocytes libèrent des médiateurs de l'inflammation telle que les cytokines. Ces réactions inflammatoires provoquent des effets toxiques sur les neurones (figure 2.16 et 2.17) (Giulian, 1999; Malchiodi-Albedi *et al.*, 2001).

La MA est bien liée au stress oxydatif, et les peptides A $\beta$  jouent un rôle crucial dans son développement (Hensley *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 2000). Des dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species* (ROS)) tels que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH $\cdot$  et O<sub>2</sub> $\cdot^-$  sont libérés par les peptides A $\beta$  insérés dans la membrane plasmique des neurones et des cellules gliales. Certains cations métalliques par des réactions d'oxydo-réduction interagissent avec les peptides A $\beta$  et libèrent des dérivés réactifs de l'oxygène (Sayre *et al.*, 2000; Opazo *et al.*, 2002). Ces derniers induisent une déstructuration de la membrane plasmique par l'oxydation des protéines membranaires ce qui se traduit par exemple par un dysfonctionnement des récepteurs de certains neurotransmetteurs (figure 2.18).

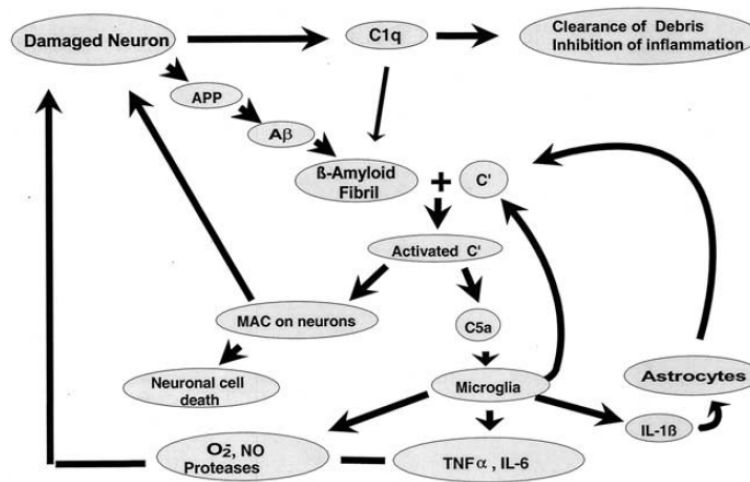


Figure 2.16. Modèle d'activation du complément et de l'inflammation dans la MA (Tenner, 2001).

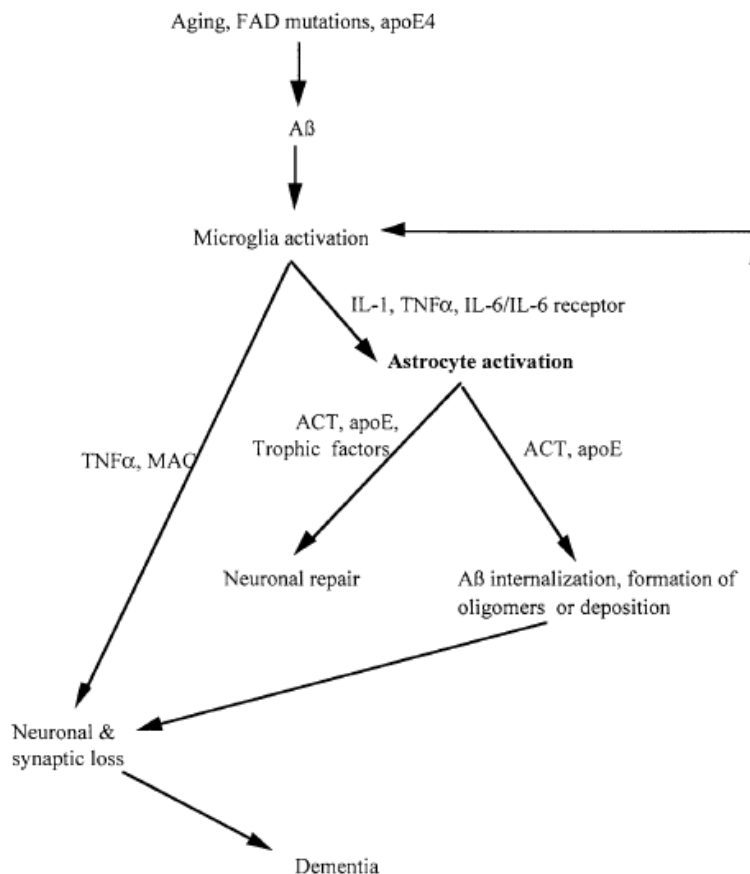
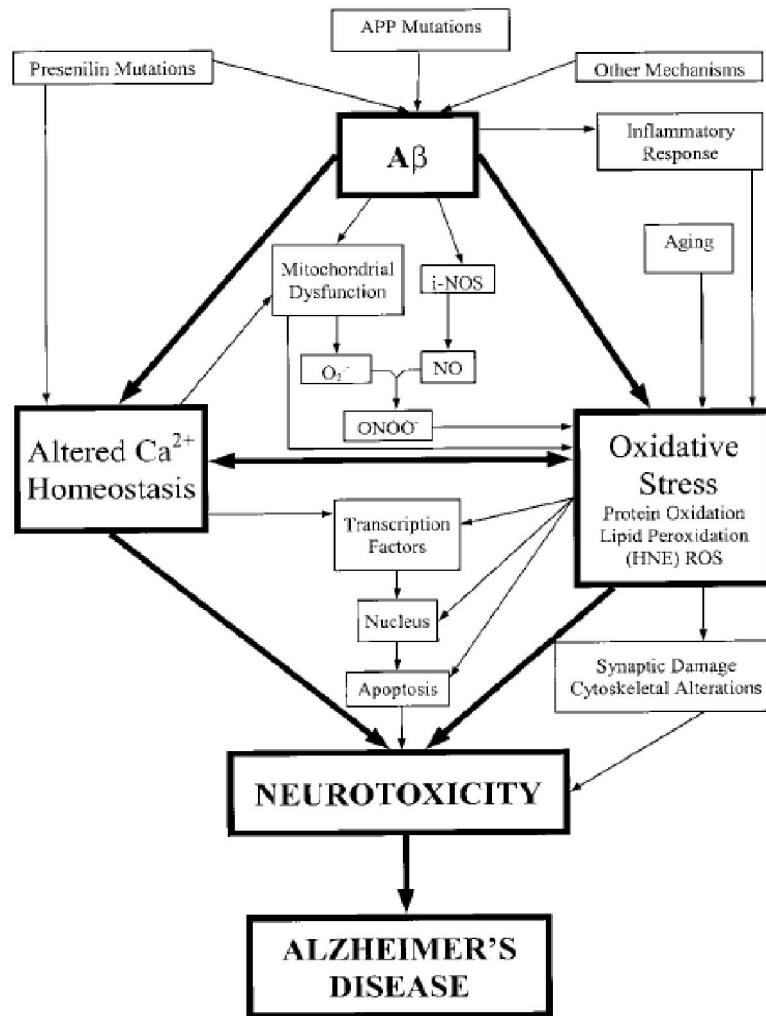


Figure 2.17. Schéma montrant le rôle des astrocytes réactives et de l'ACT ( $\alpha$ 1-antichymotrypsin) dans la pathogenèse de la MA. MAC (*membrane attack complex*) est le complexe d'attaque membranaire produit par l'activation du complément. Notez que les astrocytes jouent un rôle central dans l'équilibre délicat entre la réparation neuronale et la perte neuronale (Abraham, 2001).



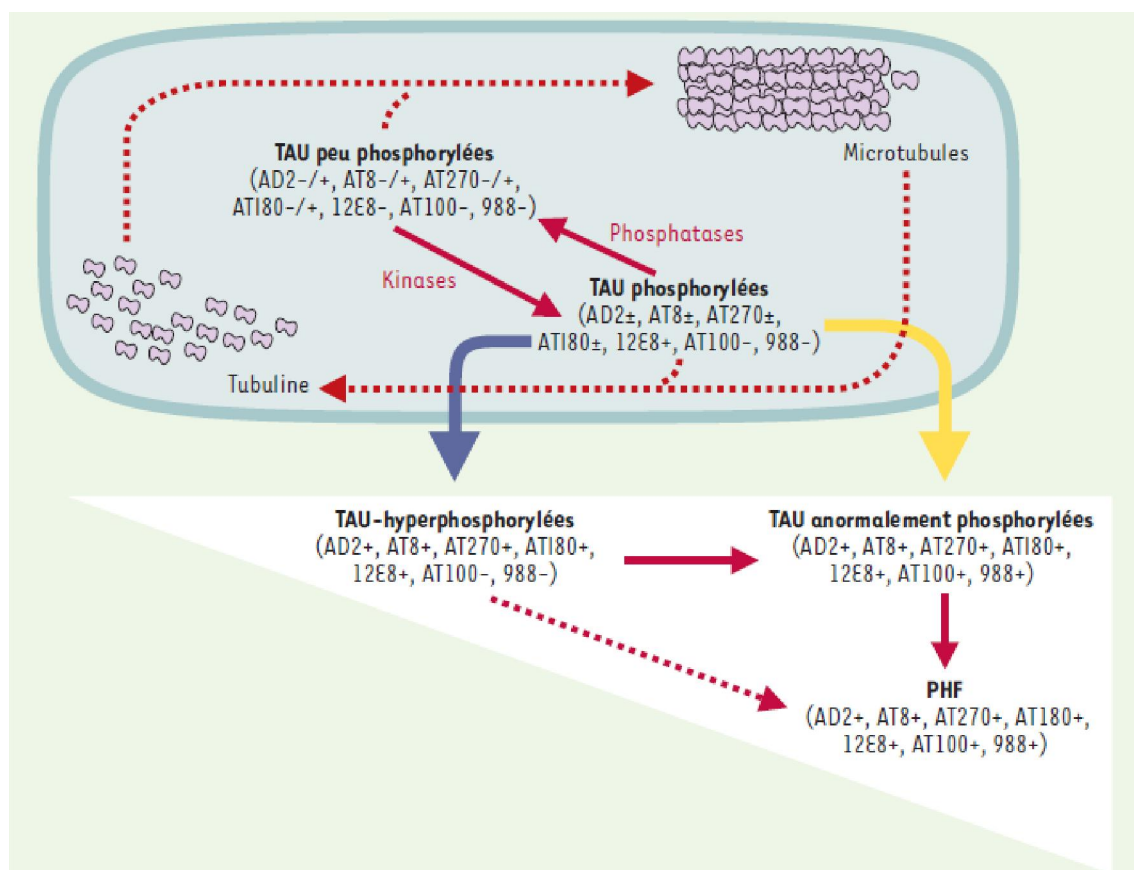
**Figure 2.18.** Schéma du stress oxydatif associé au peptide Aβ et de la neurotoxicité dans le cerveau dans le cas de la MA. Ce modèle est consistant avec un rôle central du peptide Aβ dans la pathogenèse et le stress oxydatif extensif sous l'existence de la MA dans le cerveau (Butterfield et Kanski, 2001).

### 2.2.3.2. Dégénérescences neurofibrillaires

En 1838, **Remak (1815-1865)** décrit pour la première fois les neurofibrilles, ce sont de fines structures intracellulaires localisées dans le soma et les axones des cellules nerveuses. Dans les années 1980, le constituant essentiel des neurofibrilles a été découvert, une protéine appelée Tau associée aux microtubules (**Brion et al., 1985; Grundke-Iqbal et al., 1986; Kosik et al., 1986; Wood et al., 1986**). La protéine Tau permet de lier et stabiliser les microtubules dans les neurones, c'est son rôle physiologique (**Figure 2.19**) (**Drubin et Kirschner, 1986**), elle contrôle donc le transport axonal. Une hyperphosphorylation inhabituelle de cette protéine est observée dans la MA (**Ihara et al., 1986**), provoquant une baisse de son affinité pour les microtubules (**Iqbal et al., 1986**). Au niveau périnucléaire, la protéine Tau libre constitue des filaments hélicoïdaux (**Figure 2.19**), ensuite forme des



structures neurofibrillaires. Une réduction du transport intraneuronal du soma vers les régions distales du neurone est parfois provoquée par le changement des protéines Tau en neurofibrilles, compromettant les fonctions et la viabilité des neurones. La toxicité des structures neurofibrillaires est variable d'une partie cérébrale à une autre durant le développement de la MA. Plusieurs stades d'évolution de la maladie ont été déterminés et chaque stade de développement est caractérisé par la formation des structures neurofibrillaires dans des parties bien précises. Le stade I est caractérisé par la formation des neurofibrilles au niveau de la région transentorhinale, tandis que le stade II est caractérisé par des structures neurofibrillaires situées dans la partie entorhinale et hippocampique (**Braak et Braak, 1991**). De plus, les protéines Tau comme pour les peptides A $\beta$  ont le pouvoir de produire une réaction inflammatoire par l'activation du système du complément. Par ailleurs, ce type de protéine, réagit avec le protéasome et pourrait produire une anomalie dans la fonction du système protéolytique ubiquitine/protéasome liée à la MA (**Shen et al., 2001; Keck et al., 2003**).



**Figure 2.19.** Phosphorylation normale et pathologique de la protéine Tau et son impact sur l'équilibre tubuline-microtubuline (**Buée et Delacourte, 2002**). *PHFs: paired helical filaments* (paires de filaments appariés en hélice).

### **2.2.3.3. Altération des systèmes de neurotransmetteurs**

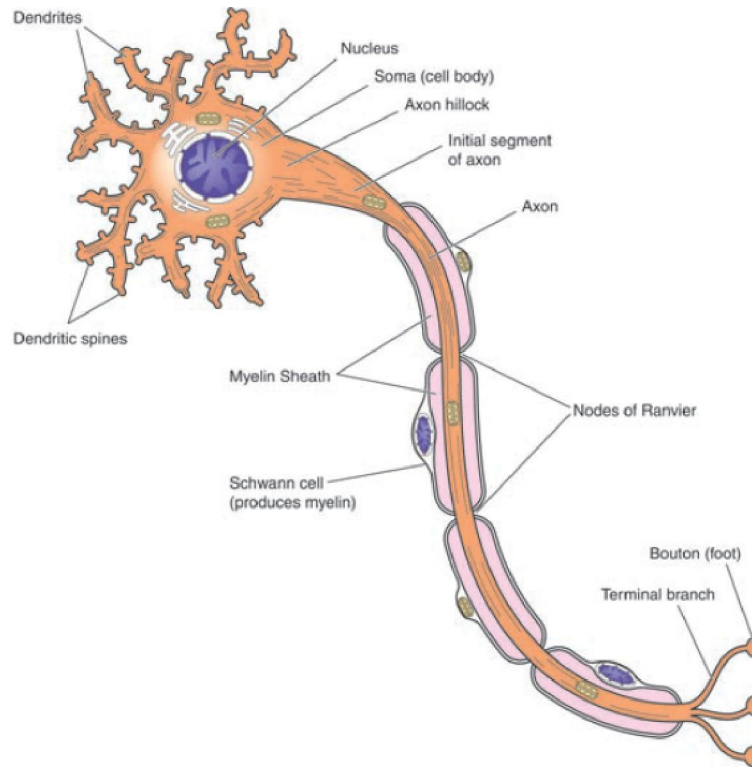
Certaines fonctions de neurotransmetteurs (ACh et glutamate) sont essentiellement altérées lors de la MA, l'hippocampe et le cortex sont les principales régions du cerveau affectées par la maladie.

#### **2.2.3.3.1. Les cellules du système nerveux**

##### **➤ Les neurones**

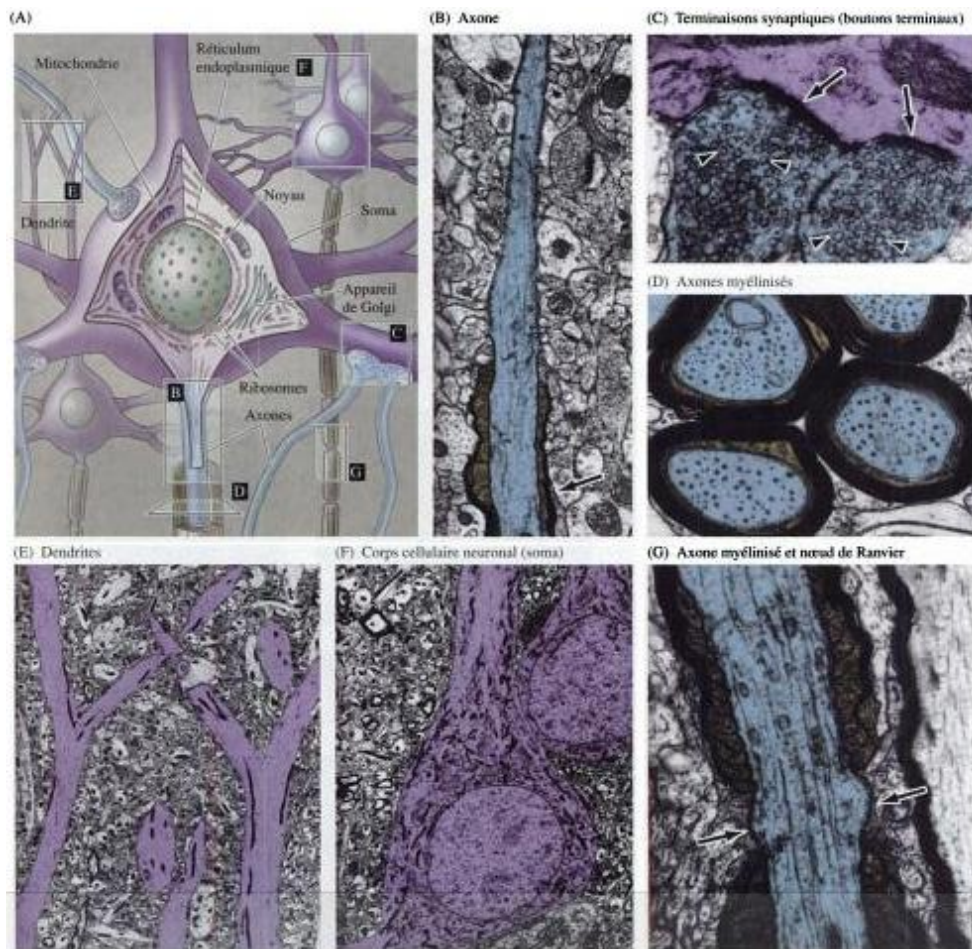
Les neurones et la glie possèdent les mêmes organites cellulaires que ceux qui sont présents dans toutes les cellules, notamment le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les mitochondries ainsi que diverses structures vésiculaires (**figure 2.20**).

Les neurones ont une organisation cellulaire de base qui ressemble à celle des autres cellules. Ils s'en distinguent toutefois nettement par leur spécialisation pour la communication intercellulaire. Cette propriété se manifeste dans leur morphologie générale, dans la spécialité de leur membrane pour la signalisation électrique et dans la complexité structurale et fonctionnelle de leurs contacts synaptiques (**figure 2.21**). Le signe le plus net de la spécialisation des neurones pour communiquer par signaux électriques est l'étendue de leurs ramifications. Ce qui marque le plus dans une cellule nerveuse typique est l'arborisation de dendrites émanant du corps cellulaire. Les dendrites sont la cible principale des afférences synaptiques issues d'autres neurones; ils se distinguent par une abondance particulière ainsi que par des protéines du cytosquelette spécifiques reflétant leur rôle dans la réception et l'intégration des informations venues d'autres neurones. La gamme des morphologies neuroniques va d'une petite minorité de cellules complètement dépourvues de dendrites à d'autres dont l'arborisation dendritique ne le céderait pas en complexité à la ramure d'un arbre en pleine maturité (**figure 2.22**). Le nombre d'afférences que reçoit un neurone donné dépend de la complexité de ses ramifications dendritiques. Les cellules nerveuses qui n'ont pas de dendrites ne reçoivent d'énervation (et donc de signaux électriques) que d'un petit nombre d'autres neurones, voire d'un seul; celles qui ont un panache dendritique plus élaboré sont énervées par un nombre de neurones nettement plus important.



**Figure 2.20.** Un neurone avec un corps qui contient un noyau, qui contrôle toutes les activités de la cellule. L'axone est une extension du corps de la cellule et transmet des messages à d'autres neurones. Les dendrites sont des extensions cellulaires chargées de recevoir des messages d'autres neurones (**Borda, 2006**).

Les contacts synaptiques qui se font sur les dendrites comportent une spécialisation particulière de l'appareil sécrétoire que l'on trouve chez la plupart des cellules épithéliales polarisées. Typiquement, la terminaison présynaptique se trouve à proximité immédiate d'une spécialisation postsynaptique de la cellule cible (**figure 2.21**). Pour la grande majorité des synapses, il n'y a pas de continuité physique entre les éléments pré- et postsynaptiques. Ces éléments communiquent par des molécules que sécrètent la terminaison présynaptique et qui se fixent sur des récepteurs de la spécialisation postsynaptique, qui sépare les éléments pré- et postsynaptiques. La fente synaptique n'est toutefois pas simplement un espace qu'il faut franchir; c'est un site où des protéines extracellulaires viennent influencer la diffusion, la liaison et la dégradation des molécules sécrétées par la terminaison présynaptique. Le nombre d'afférences synaptiques que reçoit un neurone du système nerveux humain varie de 1 à 100.000 environ. Ce nombre reflète l'un des rôles fondamentaux des cellules nerveuses. La quantité d'afférences reçues par un neurone donné apparaît donc comme un facteur déterminant des fonctions neuronales.



**Figure 2.21.** Caractéristiques principales des neurones en microscopie optique et électronique. (A) schéma de cellules nerveuses et de leurs divers constituants. (B) segment initial d'un axone (bleu) pénétrant dans une gaine de myéline (doré). (C) boutons terminaux (bleu) chargés de vésicules synaptiques (pointes de flèches) formant synapse (flèches) avec une dendrite (violet). (D) Coupe transversale d'axones (bleu) entourés par les prolongements d'oligodendrocytes (doré). (E) Dendrite apicale (violet) de cellules corticales pyramidales. (F) corps cellulaires neuronaux (violet) contenant de volumineux noyaux arrondis. (G) Portion d'un axone myélinisé (bleu) montrant l'intervalle, appelé nœud de Ranvier (flèches), entre segments adjacents de myéline (doré) (**Purves et al., 2005**).

Les informations transmises par les fibres afférentes qui font contact avec les dendrites sont intégrées et « traduites » en sortie au point d'origine de l'axone, du segment de la cellule nerveuse spécialisé dans la conduction du signal jusqu'au site suivant l'interaction synaptique (**figures 2.21 et 2.22**). L'axone est un prolongement du corps cellulaire unique en son genre; il peut s'étendre sur une centaine de micromètres, voire beaucoup plus, selon le type du neurone et la taille de l'espèce considérée.

Partout dans le cerveau, ces axones courts sont caractéristiques des neurones de circuits locaux ou interneurones. Beaucoup d'axones, cependant, s'étendent jusqu'à des cibles plus

éloignées. Ainsi, les axones qui, chez l'homme, vont de la moelle épinière jusqu'au pied font à peu près un mètre de long. Le mécanisme par lequel l'axone transmet un signal sur de telles distances est le potentiel d'action; il s'agit d'une onde électrique qui s'auto-régénère et se propage le long de l'axone depuis son lieu d'origine, dit segment initial (ou cône axonique), au niveau du corps cellulaire, jusqu'à son extrémité où se font les contacts synaptiques. Les cellules cibles des neurones comprennent d'autres neurones du cerveau, de la moelle et des ganglions végétatifs ainsi que les cellules des muscles et des glandes du corps entier.

Le processus chimique et électrique par lequel l'information codée par les potentiels d'action est communiquée à la cellule suivante de la voie nerveuse est la transmission synaptique. Les éléments terminaux présynaptiques sont appelés terminaisons synaptiques ou boutons synaptiques et les spécialisations postsynaptiques sont, en règle générale, des synapses chimiques. Un autre type très faiblement abondant est la synapse électrique. Les organites sécrétoires de la terminaison présynaptique des synapses chimiques sont les vésicules synaptiques (**figure 2.21**), structures généralement sphériques remplies de molécules de neurotransmetteurs. Le positionnement des vésicules synaptiques au niveau de la membrane présynaptique et leur fusion avec cette même membrane, fusion qui déclenche la libération de neurotransmetteur, sont régulés par des protéines contenues dans les vésicules ou associées avec elles. Les transmetteurs libérés par les vésicules synaptiques modifient les propriétés électriques de la cellule cible en se liant à des récepteurs des neurotransmetteurs localisés en majeure partie au niveau de la spécialisation postsynaptique.

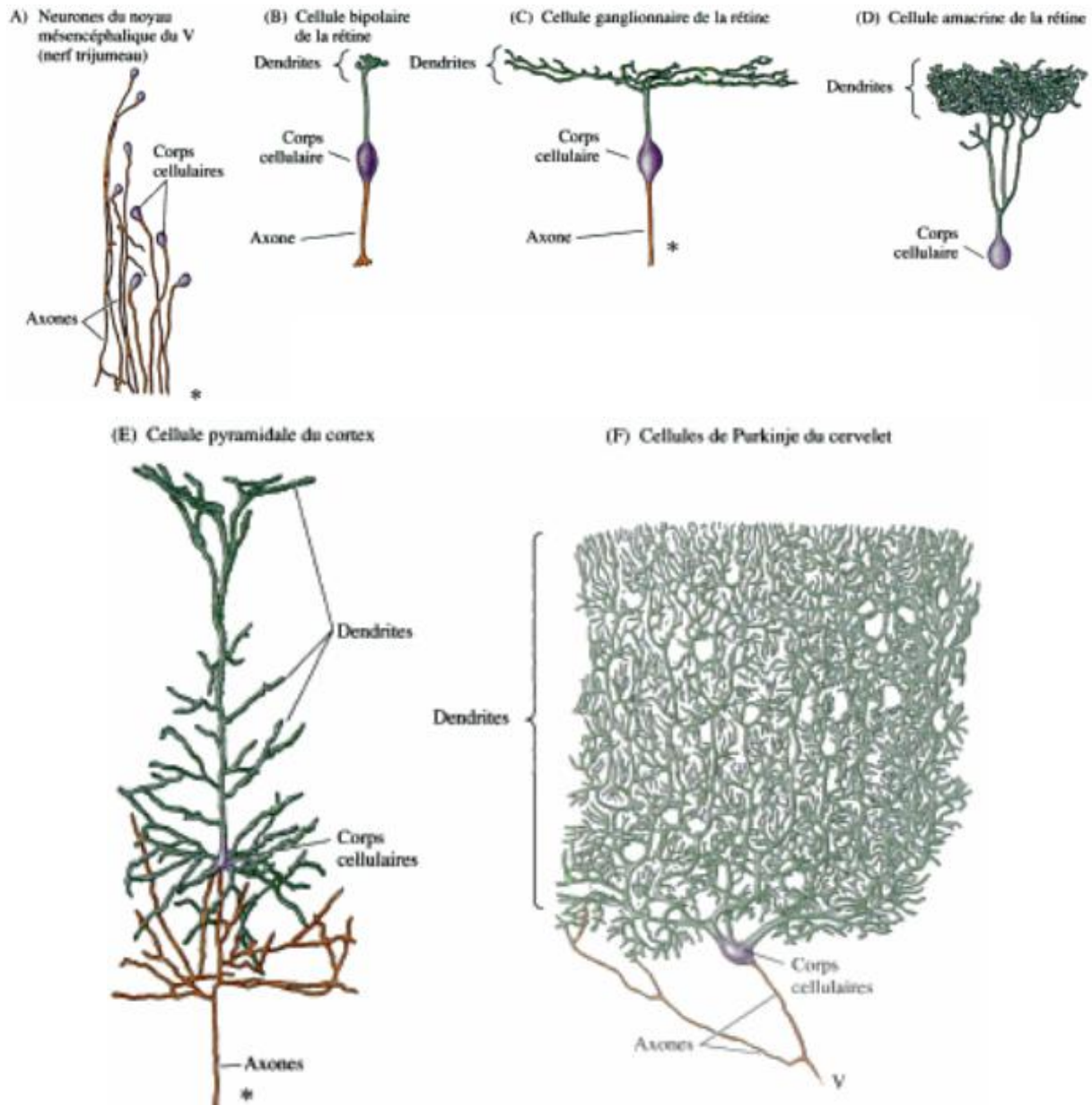
L'activité concertée très complexe des neurotransmetteurs, des récepteurs, des éléments concernés du cytosquelette et des molécules assurant la transmission est donc à la base de la communication des neurones entre eux et avec les cellules effectrices des muscles et des glandes (**Purves *et al.*, 2005**).

### ➤ Les cellules gliales

Les cellules gliales ne transmettent pas de signal électrochimique mais sont indispensables au maintien de l'environnement biochimique dans lequel travaillent les neurones. Ainsi, les cellules gliales maintiennent le pH et l'osmolarité des liquides extracellulaires dans les limites physiologiques. De plus, les cellules gliales améliorent la conduction axonale des influx électrochimiques, modulent la neurotransmission au niveau des jonctions synaptiques et facilitent la régénération des nerfs après des lésions nerveuses



périphériques. L'importance des cellules gliales dans les fonctions de soutien des neurones est mise en évidence par le fait qu'elles représentent 70 % à 80 % de la totalité des cellules du système nerveux.



**Figure 2.22.** Exemple de la variété morphologique des neurones du système nerveux humain. Les dessins ont été réalisés d'après des préparations histologiques de cellules imprégnées de sels d'argent (technique dite de Golgi, utilisée dans les travaux classiques de Golgi et de Cajal). Les astérisques indiquent que l'axone s'étend beaucoup plus loin que ne le représente la figure. On notera que certaines cellules, comme les cellules bipolaires de la rétine, ont un axone très court et que d'autres, comme les cellules amacrines, en sont totalement dépourvues. Les divers dessins ne sont pas à la même échelle (**Purves *et al.*, 2005**).

En fonction de leurs aspects structuraux et fonctionnels, les cellules névrogliques peuvent être rangées en trois principales catégories: les astrocytes, les oligodendrocytes et les microgliaocytes (**figure 2.23**). Des cellules gliales de même nature existent dans le SNP et paraissent avoir les mêmes fonctions. Les cellules de Schwann, cellules gliales les plus communes du SNP, sont équivalentes aux oligodendrocytes du SNC (**Pritchard et Alloway, 2002**).

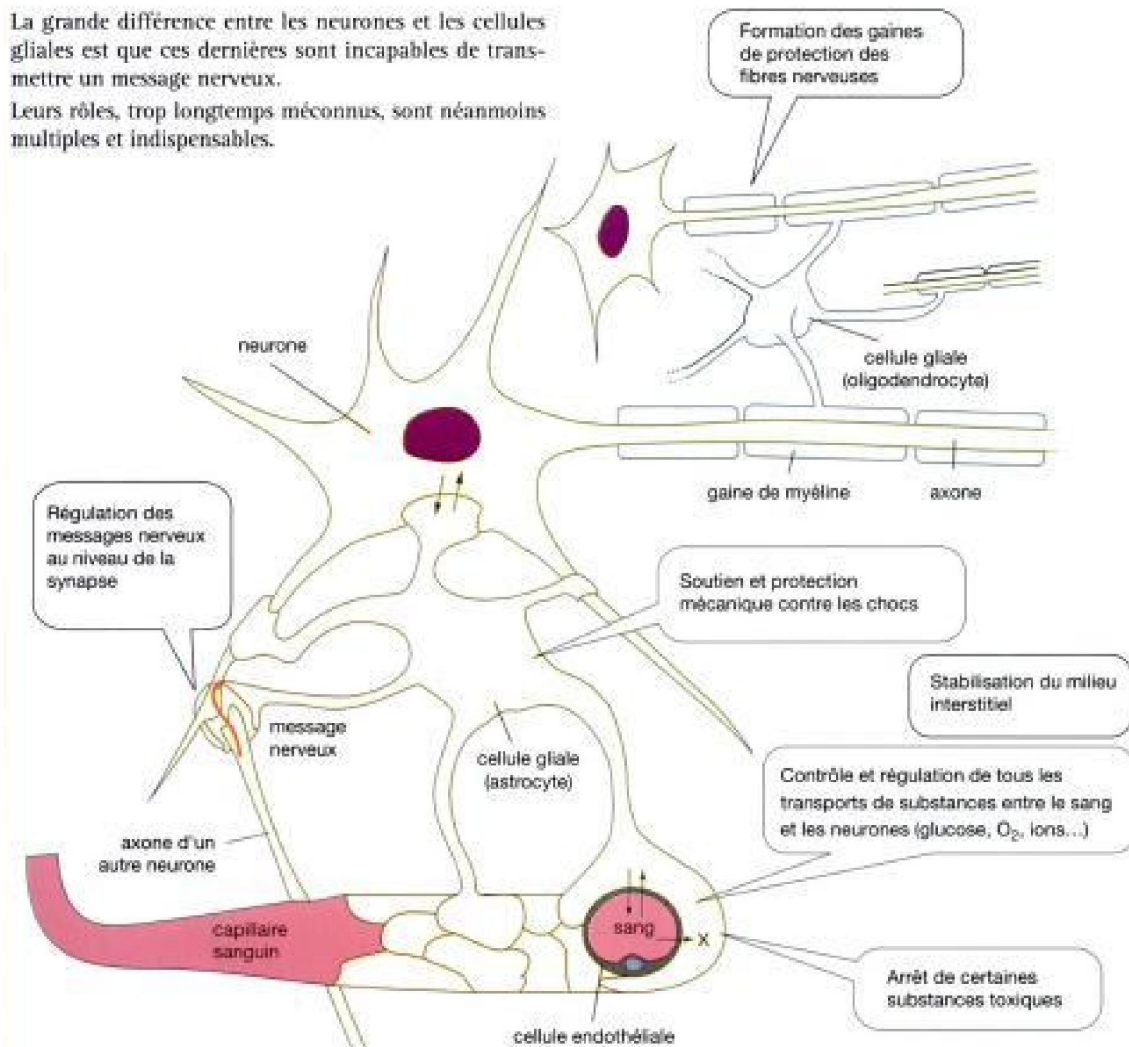


Figure 2.23. Les cellules gliales (Cornet, 2009).

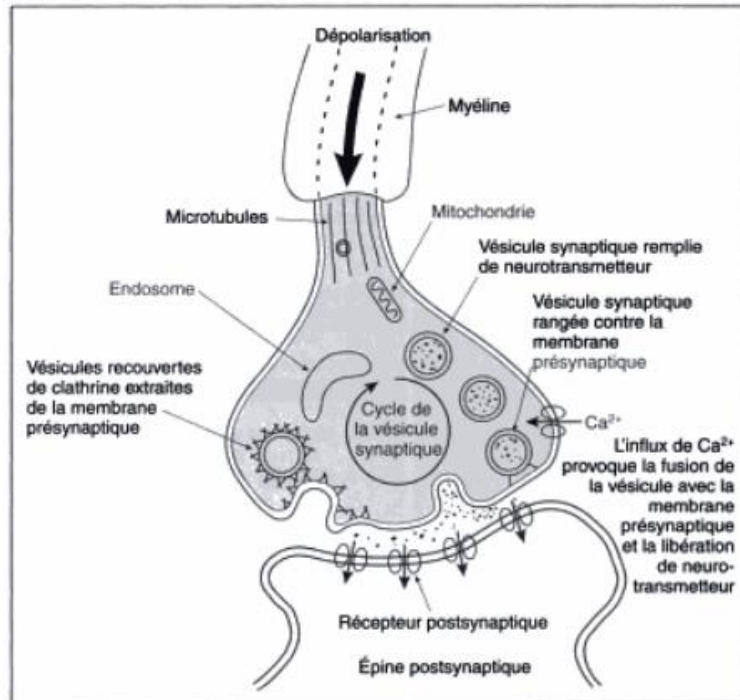


Figure 2.24. Synapse chimique (Pritchard et Alloway, 2002).

#### 2.2.3.3.2. Transmission synaptique

Les synapses chimiques sont caractérisées par la présence des terminaisons chimiques, d'organites de petite taille, limités par une membrane, appelés vésicules synaptiques (**figure 2.24 et 2.25**). Ces organites sphériques sont remplis d'un ou de plusieurs neurotransmetteurs, signaux chimiques sécrétés par le neurone présynaptique.

La transmission qu'opèrent les synapses chimiques est fondée par la succession complexe d'événements (**figure 2.25**). Le processus commence par l'arrivée d'un potentiel d'action envahissant la terminaison du neurone présynaptique. Le changement concomitant du potentiel de membrane provoque, dans la membrane présynaptique, l'ouverture de canaux calciques activés par le voltage. Etant donné le fort gradient de concentration du  $\text{Ca}^{++}$  de part et d'autres de la membrane présynaptique, l'ouverture de ces canaux provoque une rapide entrée du  $\text{Ca}^{++}$  dans la terminaison présynaptique. Cette entrée du calcium fait passer sa concentration dans le cytoplasme de la terminaison, d'un niveau normalement faible à un niveau beaucoup plus élevé. Cet accroissement de la concentration présynaptique du  $\text{Ca}^{++}$  entraîne une fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique du neurone présynaptique, processus qui dépend du  $\text{Ca}^{++}$ . La fusion des vésicules synaptiques avec la



membrane terminale s'accompagne de la libération de leur contenu, des neurotransmetteurs pour l'essentiel, dans sa fente synaptique.

A la suite de cette exocytose, les neurotransmetteurs diffusent dans toute la fente synaptique et se lient à des récepteurs spécifiques de la membrane du neurone postsynaptique. La liaison du neurotransmetteur avec les récepteurs entraîne l'ouverture (ou parfois la fermeture) de canaux de la membrane postsynaptique, modifiant ainsi la capacité des ions à entrer dans les cellules postsynaptiques. Le courant qui s'ensuit, induit par le neurotransmetteur, modifie la conductance et le potentiel de membrane du neurone postsynaptique, augmentant ou réduisant la probabilité que ce neurone émette un potentiel d'action. De cette façon l'information passe d'un neurone à un autre (**Purves *et al.*, 2005**).

### **2.2.3.3.3. Atteinte des systèmes de neurotransmetteurs**

#### **➤ L'acétylcholine**

A côté d'une approche purement morphologique des lésions cérébrales de la maladie, une autre approche, neurochimique, s'est développée à la suite de la découverte, à la fin des années 70, de l'importance de l'altération d'un système particulier de neurotransmetteurs. Il a été constaté que la synthèse de l'ACh diminue notablement dans les cerveaux de sujets décédés de la MA, en particulier au niveau du néocortex et de l'hippocampe. L'ACh est en fait principalement synthétisée dans les prolongements des neurones dont les corps cellulaires sont situés dans deux régions profondes du cerveau antérieur (la région appelée « *basal forebrain* »): le noyau basal de Meynert et les noyaux de septum. Ces neurones, qui envoient leurs prolongements vers l'hippocampe et vers le néocortex, sont considérablement raréfiés, expliquant le défaut de production du neurotransmetteur au niveau de la terminaison synaptique. Enfin, un argument indirect du rôle de l'ACh dans la MA est la survenue, chez le sujet normal, de troubles de la mémoire à la suite d'un blocage du métabolisme de l'ACh par de l'atropine par exemple (**Seron et Jeannerod, 1998**).

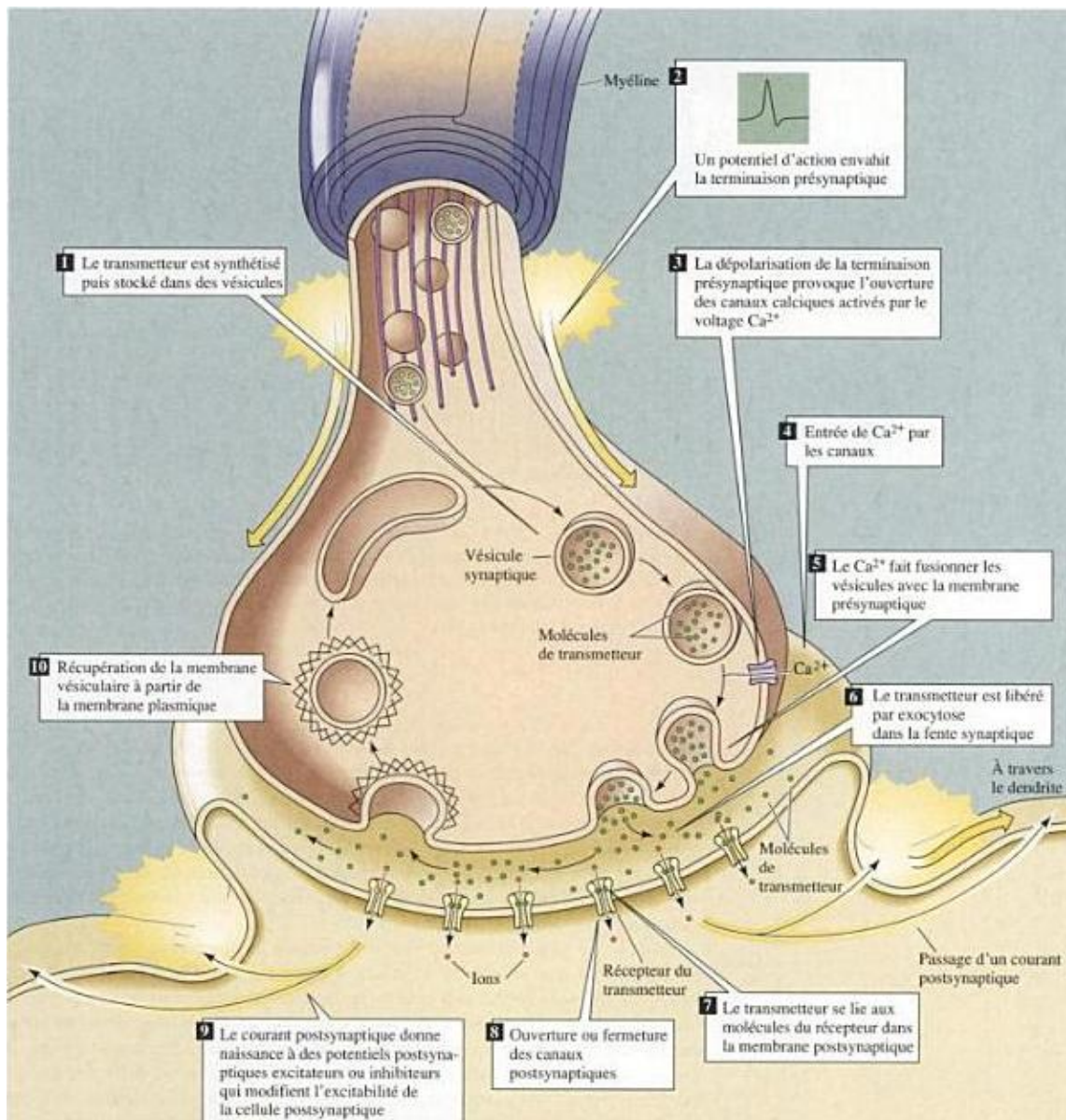


Figure 2.25. Succession des événements à une synapse chimique (Purves *et al.*, 2005).

### ➤ Glutamate

Le glutamate est un neurotransmetteur essentiel du SNC, intervenant dans de très nombreuses fonctions parmi lesquelles la transmission d'informations sensorielles, le contrôle de la motricité, des émotions, des processus mnésiques. Des neurones glutamatergiques sont présents dans le cortex cérébral, les noyaux sous-corticaux dont l'hippocampe, structures très sensibles aux phénomènes de dégénérescence observés dans la MA. Le glutamate possède des récepteurs spécifiques ionotropiques perméables aux cations (*N*-Methyl-D-Aspartate (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA), Kainates) et métabotropiques couplés à différentes protéines G (mGluR (metabotropic Glutamate

Receptors)). Ainsi, l'activité des différents récepteurs du glutamate conduit à une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium. Celle-ci doit être rapidement régulée soit par une sortie du calcium de la cellule, soit par une réintégration dans les réserves intracellulaires (réticulum endoplasmique, mitochondries), soit par une neutralisation avec de nombreuses protéines liant le calcium, ce qui peut alors activer des protéines proapoptotiques (**Mattson et chan, 2003**). Il a été montré d'ailleurs qu'une inhibition pharmacologique du récepteur NMDA, une inhibition de l'expression de certaines sous-unités des récepteurs ionotropiques NR2A (NMDA receptor subunits type 2A), NR2B (NMDA receptor subunits type 2B), ou encore de CamKII (Ca<sup>++</sup>/calmodulin-dependent protein kinase) diminuent fortement les capacités d'apprentissage spatial chez des souris (**Tsien et al., 1996; Tang et al., 2001**). Une concentration élevée de glutamate extracellulaire, à la suite de surstimulations des neurones glutamatergiques qui libèrent de grandes quantités de glutamate ou à la suite de la mort de neurones glutamatergiques dont la membrane ne retient plus le glutamate cellulaire, ce glutamate va devenir toxique pour les cellules environnantes. C'est le processus d'excitotoxicité intervenant dans un grand nombre de pathologies comme l'hypoxie, l'épilepsie, la sclérose latérale amyotrophique. De nombreuses études ont suggéré qu'une interaction entre excitotoxicité et neurodégénérescence pourrait se produire aussi au cours de la MA (**Doble, 1999; Lejeune et Maury-Rouan, 2007**).

### ➤ Autres neurotransmetteurs

A côté du déficit cholinergique, d'autres systèmes de neurotransmetteurs sont également déficitaires. Il a été rapporté un déficit de deux systèmes monoaminergiques à projections corticales diffuses: le système sérotoninergique et le système noradrénergique. La particularité de ces systèmes est qu'en raison de leurs projections diffuses, ils semblent capables de réguler le fonctionnement synchrone de multiples ensembles neuronaux. En revanche, l'autre système monoaminergique, celui utilisant la dopamine, serait intact dans la MA, ce qui prouve à nouveau le caractère spécifique de l'atteinte dans cette maladie.

En outre, il a été décrit aussi une altération du système de neurones corticaux dit intrinsèques utilisant comme neurotransmetteur le GABA (gamma-aminobutyric acid) ou encore la somatostatine (**Seron et Jeannerod, 1998**).

#### **2.2.3.4. Pathologie liée à l'altération de l'homéostasie du calcium**

La MA est caractérisée par une dérégulation de l'homéostasie du  $\text{Ca}^{++}$  par les neurones. Ce dysfonctionnement est l'origine de la perte neuronale. Des toxicités importantes sont provoquées par des concentrations élevées de calcium intracellulaire. En effet, des facteurs provoquant l'apoptose, telles que l'activation de la caspase et la kinase, sont induits par une élévation inhabituelle de  $\text{Ca}^{++}$  intracellulaire (Suh et Checler, 2002; Lipton, 2006). De plus, la libération de neurotransmetteurs et la plasticité synaptique sont causées par une dérégulation de l'homéostasie du calcium.

#### **2.2.4. Causes et facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer**

La MA comme nous l'avons signalé dans la partie 2.2.3.1 et 2.2.3.2 est caractérisé par des lésions cérébrales largement causées par des plaques séniles et la dégénérescence des neurofibrilles. Cependant, les facteurs susceptibles de favoriser la survenue de ces structures toxiques sont activement recherchés. De façon générale, de nombreuses recherches ont déterminé deux types de facteurs primordiaux: les facteurs génétiques et les facteurs environnementaux. Alors que les premiers sont maintenant pour la plupart bien élucidés, les derniers sont en voie d'identification.

##### **2.2.4.1. Facteurs génétiques**

Il existe une forme héréditaire de la MA, qui concerne moins de 5 % des sujets atteints de cette maladie, et se déclenche précocement entre 30 et 60 ans (forme de MA familiale). Trois gènes ont été déterminés et sont responsables de la transmission génétique de la maladie. Les trois gènes susceptibles de porter ces mutations sont un gène situé sur le chromosome 21 codant pour la protéine APP, générateur du peptide  $\text{A}\beta$  impliqué dans la maladie, et deux gènes localisés sur les chromosomes 14 et 1, codant respectivement pour les protéines présénilines 1 et 2 (protéines s'associent à l'enzyme  $\gamma$ -sécrétase pour aboutir à la libération d' $\text{A}\beta$  à partir de l'APP). C'est pour cela que des individus porteurs du syndrome de Down (trisomie 21) expriment un et demi fois plus d'APP que des sujets non porteurs du syndrome et souffrent de la MA (Selkoe, 2001a,b).

Pour les formes de la maladie apparaissant au-delà de 60 ans, appelées formes sporadiques, il existe également des facteurs de susceptibilité génétique. Le facteur de risque génétique le plus connu pour ces formes implique le gène (situé sur le chromosome 19) de l'apolipoprotéine E (ApoE), une protéine qui intervient dans le transport du cholestérol

(Lambert *et al.*, 2007). En 2009, grâce à l'analyse du génome de plus de 20.000 individus dont 6.000 étaient atteints de la MA, deux nouveaux gènes de prédisposition de la MA ont pu être identifiés (Lambert *et al.*, 2009): le gène de la clusterine (CLU), connu aussi sous le nom d'apolipoprotéine J, localisé sur le chromosome 8, et le gène du récepteur 1 du composant 3b/4b du complément (CR1: complement receptor 1), situé sur le chromosome 1. Le rôle de ces deux nouveaux gènes dans l'apparition de la MA n'est pas encore connu, mais ils pourraient intervenir dans l'élimination du constituant majeur des plaques amyloïdes, le peptide A $\beta$  (Berr *et al.*, 2009).

### 2.2.4.2. Facteurs biologiques et environnementaux

#### 2.2.4.2.1. L'âge

Il s'agit sans conteste du principal facteur de risque de la MA, la prévalence de la démence augmente avec l'âge: elle est de 1,2 % entre 65 et 69 ans et atteint 28,5 % après 90 ans; celle de la MA augmente de 0,6 % à 22,2 % (Letenneur *et al.*, 1994), l'incidence doublant pratiquement par tranche d'âge de 5 ans après 65 ans (Dartigues *et al.*, 2002).

#### 2.2.4.2.2. Le sexe

Le sexe féminin paraît aussi être un facteur de risque. La plupart des observations ont montré une prévalence de la maladie plus importante chez les femmes (Bachman *et al.*, 1992; Corso *et al.*, 1992; Graves *et al.*, 1996; Letenneur *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2006). Cette différence d'incidence en fonction du sexe pourrait être expliquée par des différences biologiques et hormonales, avec particulièrement un possible effet des œstrogènes, mais également des différences socioculturelles. L'espérance de vie, plus élevée chez les femmes que chez les hommes, pourrait également expliquer les résultats observés, en supposant que les hommes, dont la longévité est accrue, sont plus résistants aux maladies neurodégénératives. Il faut noter que dans certains pays comme les États-Unis où cet écart d'espérance de vie entre hommes et femmes est moindre, l'incidence de la MA ne varie pas selon le sexe (Edland *et al.*, 2000; Dartigues *et al.*, 2002).

#### 2.2.4.2.3. L'hypertension

L'hypertension non traitée autour de 50 ans pourrait multiplier le risque de développer une démence par un facteur de 4 environ par rapport à une personne ayant une tension normale (Launer *et al.*, 2000). Plusieurs essais thérapeutiques ont évalué l'impact d'un

traitement antihypertenseur sur les fonctions cognitives. L'étude Syst-Eur (systolic hypertension in Europ) (**Forette et al., 1998**) a démontré que le traitement de l'hypertension systolique isolée du sujet de plus de 60 ans par un inhibiteur calcique réduisait de 55 % l'incidence de la MA. L'hypertension augmente l'intensité des structures neurofibrillaires et des plaques séniles (**Petrovitch et al., 2000**).

#### 2.2.4.2.4. La glycémie et le diabète

L'hypoglycémie et l'hyperglycémie majeure sont des causes connues de confusion, de troubles de la vigilance ou de coma. Cependant, des variations plus modérées de la glycémie semblent bien avoir un impact sur les performances cognitives. Deux études ont montré que chez des patients diabétiques, l'amélioration du contrôle glycémique pouvait améliorer les performances cognitives. Seize patients atteints de diabète de type II, non traités, présentaient une glycémie à jeûne à  $13,8 \pm 1,2$  mmol/L en moyenne. Une batterie de tests psychométriques a été réalisée, puis des hypoglycémifiants oraux ont été prescrits. Six mois plus tard, la glycémie à jeûne avait baissé à  $8,4 \pm 0,4$  mmol/L et les auteurs observent une amélioration des performances cognitives (**Meneilly et al., 1993**). De même, chez des patients âgés diabétiques, l'amélioration du contrôle glycémique améliore les capacités d'apprentissage et les performances mnésiques (**Gradman et al., 1993**).

Le diabète représente un facteur de risque de démence vasculaire (**Hebert et al., 2000; Hassing et al., 2002**). Mais l'insulinorésistance pourrait aussi être impliquée dans la physiopathologie de lésions de type neurodégénératives (**Watson et Craft, 2003**). En effet, les études anatomopathologiques ont montré la présence dans le cerveau, et en particulier dans la région médiotemporale (impliquée dans la mémoire), d'insuline, de récepteurs à l'insuline, et de transporteurs du glucose insulinosensibles. De plus, une prévalence élevée d'anomalies de l'insuline et d'insulinorésistance a été rapportée chez les patients atteints de la MA. Lors d'un clamp euglycémique, l'augmentation de l'insulinémie améliore les performances cognitives chez des patients atteints de la MA (**Craft et al., 1996**). Il semble que l'insuline interfère sur le métabolisme de l'APP et sur la dégradation du peptide A $\beta$ 4, en faveur de l'accumulation du peptide et donc de la formation des plaques séniles caractéristiques de la MA. Ainsi, le diabète et l'insulinorésistance semblent impliqués dans la physiopathologie des démences vasculaires, dégénératives ou mixtes (**Raynaud-Simon, 2004**).

### 2.2.4.2.5. L'alimentation

La nutrition semble, par ailleurs, influencer les fonctions cognitives et le comportement psychiatrique. De nombreux travaux rapportent en effet une association entre le statut vitaminique, principalement les vitamines du groupe B et les vitamines antioxydantes, et l'altération des fonctions cognitives. D'autres éléments, comme l'aluminium ou la silice, sont également incriminés. La dénutrition représente, avec les troubles psychiatriques et les troubles moteurs, l'une des principales complications de la MA, notamment au stade sévère de cette affection (**Gillette-Guyonnet *et al.*, 2005**).

### 2.2.4.2.6. Le cholestérol

Le SNC de l'homme, qui ne représente que 2 % de sa masse corporelle totale, est très riche en cholestérol. Environ 25 % du cholestérol non estérifié se situe au niveau du SNC et est nécessaire à son fonctionnement. Dans la MA, il a été observé une réduction du taux de cholestérol cérébral dans les régions hippocampiques et corticales, à l'exception du cortex cérébelleux, et une réduction des phospholipides et de l'épaisseur de la membrane plasmique au niveau des régions frontales et temporales (**Mason *et al.*, 1992; Svennerholm *et al.*, 1994**). Ces altérations ont suggéré qu'une élévation du cholestérol total plasmatique pourrait être associée au risque de la MA (**Poirier, 2003**). Chez les patients présentant une MA clinique, le profil lipidique sanguin serait différent de celui du risque cardiovasculaire et associerait une élévation du CT (cholestérol total), LDL-C (low density lipoprotein cholesterol) et des triglycérides, avec une normalité du HDL-C (high density lipoprotein cholesterol) et du ratio CT/HDL-C (**Sabbagh *et al.*, 2004**). L'augmentation du CT et du HDL-C a été observée dans les études neuropathologiques dans lesquelles le diagnostic de la MA était établi selon les critères du Cerad (Consortium to establish a registry for Alzheimer's disease) (**Kuo *et al.*, 1998; Lesser *et al.*, 2001**). L'association de l'ApoE-ε4 (apolipoprotein E epsilon-4) à la MA suggère un lien entre le cholestérol et la MA en raison du rôle de l'ApoE dans le métabolisme du cholestérol (**Letthimaki *et al.*, 1995**). Environ 20 % de la variabilité interindividuelle de l'ApoE plasmatique serait expliquée par le génotype de l'ApoE. Chez les sujets non déments, le taux étant plus bas en présence d'ApoE-ε4 et plus élevé chez les sujets homozygotes ApoEε2 (**Saunders *et al.*, 1993; Schiele *et al.*, 2000**). De plus, l'ApoEε4 a été associée à un CT et LDL-C plasmatiques élevés (**Solfrizzi *et al.*, 2006**).

#### **2.2.4.2.7. L'obésité**

Des travaux plus récents soulignent la relation positive entre l'obésité et le risque de survenue d'une démence suggérant ainsi l'implication des facteurs vasculaires dans l'apparition de la démence et de la MA en particulier (**Hébuterne *et al.*, 2009**). Il ressort principalement de ces études que l'obésité à l'âge adulte est associée à de moins bonnes performances cognitives (**FNCLCC, 2000; Jeremic *et al.*, 2003**) et à un plus grand risque de survenue d'une démence aux âges plus avancés (**Holmes, 1993; Reeves *et al.*, 2006**). D'autres études ont confirmé que l'obésité aux âges avancés est un facteur de risque de démence et en particulier de la MA (**Inui, 2002**). D'autres études ont montré que le tissu adipeux est à l'origine de la libération des cytokines et interleukines participant à un état chronique d'inflammation, de résistance à l'insuline, et de défauts cognitifs (**Gunstad *et al.*, 2006**).

#### **2.2.4.2.8. Les œstrogènes**

Les données épidémiologiques montrent que les femmes ont un risque plus élevé de la MA que les hommes après l'âge de 80 ou 85 ans; la diminution post-ménopausique des œstrogènes endogènes pourrait en partie expliquer ce risque. Les œstrogènes exerceraient des effets neuroprotecteurs sur le cerveau âgé, notamment via l'inhibition de la formation de peptides A $\beta$  (**Xu *et al.*, 1998**), la stimulation de l'activité cholinergique et la diminution des lésions cellulaires liées au stress oxydatif (**McEwen, 1999**). Plusieurs études ont exploré le rôle du traitement hormonal substitutif (THS) sur le risque de la MA chez les femmes âgées; les résultats sont mitigés: une méta-analyse incluant 10 études d'observation, dont 8 études cas-témoins et 2 études prospectives, a montré que le risque de la MA chez les femmes ménopausées ayant été traitées par œstrogènes était réduit de 29 % par rapport aux femmes qui n'avaient jamais reçu d'œstrogènes (**Yaffe *et al.*, 1998**). Cependant, dans ces études, les femmes sous THS pourraient avoir un niveau d'éducation, un statut économique et un accès aux soins médicaux meilleurs que les autres femmes. L'étude prospective *Cache study* montre que le THS est surtout utile au moment de la ménopause, au moment où la déplétion en œstrogènes pourrait avoir des conséquences les plus importantes sur les neurones (**Zandi *et al.*, 2002**). Deux autres études vont dans ce même sens d'un rôle neuroprotecteur d'autant plus efficace qu'un traitement appliqué longtemps avant l'apparition des signes cliniques de la MA (**Tang *et al.*, 1996; Kawas *et al.*, 1997**).



#### **2.2.4.2.9. Infection virale**

Les virus de l'herpès de type 1 (HSV-1: Herpes simplex virus 1) a été proposé comme possible facteur dans la MA en raison de son tropisme neurologique, de son ubiquité, de sa latence, et des localisations cérébrales superposables à celles de la MA, c'est-à-dire le cortex frontal et temporal et l'hippocampe (**Ball, 1982**). La publication d'**Itzhaki et al. (1997)** est particulièrement digne d'intérêt, car l'auteur y démontre que l'association de l'existence d'HSV-1 au niveau cérébral et de l'allèle du gène ApoE-ε4 constitue un risque important pour la MA, alors que chacun des facteurs pris individuellement n'augmente pas le risque.

#### **2.2.4.2.10. Traumatisme crânien**

Des études ont mis en évidence un risque augmenté de la MA chez les sujets ayant des antécédents de traumatismes crâniens. En outre, certains auteurs ont mis en évidence une interaction avec le gène codant pour l'ApoE, l'effet du traumatisme crânien étant élevé chez les sujets porteurs de l'allèle ε4 (**Mayeux et al., 1993**).

#### **2.2.4.2.11. Métaux**

Les ions zinc, cuivre et fer ont été retrouvés en concentration élevée dans les plaques séniles amyloïdes (**Lovell et al., 1998; Suh et al., 2000**). En effet, ils provoquent l'agrégation des peptides Aβ (**Mantyh et al., 1993; Bush et al., 1994; Atwood et al., 1998**). La réduction du cuivre par le précurseur de la protéine Aβ catalyse la génération des radicaux libres. Le fer est à l'origine de formation des radicaux OH· (**Christen, 2000; Desport et Cauratier, 2002**).

### **2.2.5. Traitements et pistes thérapeutiques de la maladie d'Alzheimer**

Précédemment plusieurs facteurs et causes de la MA ont été évoqués. Ceux-ci conduisent à déterminer les cibles thérapeutiques éventuelles.

Il ne subsiste pratiquement aucun traitement curatif de la MA ni aucun traitement qui peut ralentir son évolution. Les thérapies utilisées ne visent que les symptômes de la maladie. Les traitements disponibles proposés aux malades, permettent de maintenir stable les symptômes ou les effets néfastes durant un intervalle de temps comme le déficit de mémoire, les problèmes d'orientation ou de raisonnement (**Scarpini et al., 2003; Calon, 2004; Klafki et al., 2006; <sup>(4)</sup>**). Les traitements disponibles visent les stratégies suivantes: la production des plaques amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires, les métaux engagés dans l'agrégation du peptide Aβ, la production des radicaux libres, et le déficit cholinergique.

### **2.2.5.1. Régulation du calcium**

L'activation des récepteurs du NMDA par le glutamate provoque l'influx du calcium dans la cellule par les canaux ioniques. Cette action induit un stress oxydatif important exactement comme dans la MA. La forte concentration de calcium provoquée aboutit à l'activation du processus de l'apoptose. A partir de cette toxicité, une stratégie a été proposée qui consiste à bloquer les récepteurs du NMDA par des antagonistes. Ces derniers vont donc arrêter l'influx de calcium généré par le glutamate et par conséquent bloquer la neurotoxicité causée par les peptides A $\beta$ .

La mémantine (Namenda®) antagoniste du récepteur NMDA, bloque les canaux calciques. En conséquence elle diminue le processus de l'apoptose sans avoir des effets négatifs sur ce récepteur important pour la transmission nerveuse et pour les processus de mémoire (**Lipton, 2006**). Chez des souris avec la MA, la mémantine a amélioré les performances d'apprentissage. Cette même molécule en association avec le donépézil, a conduit à l'amélioration des fonctions cognitives. Actuellement, la mémantine est administrée chez des patients souffrant de la MA comme médicament neuroprotecteur (**Minkeviciene et al., 2004; Tariot et al., 2004**).

### **2.2.5.2. Inhibition de la formation du peptide A $\beta$**

#### **2.2.5.2.1. Inhibition des sécrétases**

L'inhibition de la  $\beta$ -sécrétase ou de la  $\gamma$ -sécrétase réduit la formation du peptide A $\beta$ , et permet d'inactiver la cascade d'événements toxiques responsable de la survenue de la maladie.

- **Inhibition de la  $\beta$ -sécrétase**

La  $\beta$ -sécrétase est une protéine transmembranaire de 501 acides aminés appartenant à la famille des pepsines. C'est une protéase à aspartate (possède deux acides aminés aspartate dans le site actif) produisant la clivage de l'APP suivant la voie amyloïdogénique (**Lin et al., 2000**).

La majorité des inhibiteurs de la  $\beta$ -sécrétase sont des molécules peptidomimétiques aisément dégradables et présentent une faible aptitude à traverser les membranes biologiques, menant à une perte d'activité lors des essais cellulaires. Des inhibiteurs de petites tailles avec

meilleures effets pharmacologiques sont essentiels pour découvrir un candidat médicament. En plus, il est important de trouver des inhibiteurs sélectifs de la  $\beta$ -sécrétase 1, pour ne pas bloquer son homologue, la  $\beta$ -sécrétase 2, qui est impliquée dans la vascularisation des tissus. Il est donc risqué de bloquer la  $\beta$ -sécrétase, même si des essais sur des souris pour cette enzyme présentent une réduction importante de taux du peptide A $\beta$  dans le cerveau, sans avoir des effets secondaires comme le développement, l'état de santé et la fertilité (Luo *et al.*, 2001).

- **Inhibition de la  $\gamma$ -sécrétase**

Nombreux inhibiteurs de la  $\gamma$ -sécrétase, qui visent les présénilines PS1 et PS2, ont été découverts (Golde et Younkin, 2001). Un inhibiteur de cette enzyme a permis de réduire le taux du peptide A $\beta$  dans le cerveau et un dépôt d'amyloïde après administration chez des souris porteuses de la MA (Dovey *et al.*, 2001). Cependant, les limites de cette stratégie résident dans l'altération du clivage protéolytique d'autres protéines comme la protéine Notch, dont la coupure par la  $\gamma$ -sécrétase joue un rôle important dans la voie de signalisation de la protéine, ou alors un risque d'accumulation de chaînes C-terminaux de l'APP (C99 et C83). Ces chaînes ont été localisées au niveau des plaques séniles amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires, et présentent un effet neurotoxique (Yankner *et al.*, 1989), ce qui n'exclut pas leurs implications dans la pathologie (Suh, 1997).

### 2.2.5.2.2. Vaccination contre le peptide A $\beta$

Une autre approche pour traiter la MA a été développée et qui consiste à utiliser l'immunothérapie (Schenk *et al.*, 1999; DeMattos *et al.*, 2001). Des recherches ont montré que l'immunisation vis à vis du peptide A $\beta$  conduit à une diminution du peptide amyloïde au niveau cérébral (Schenk *et al.*, 1999). Cependant, les effets indésirables rencontrés après vaccination par un peptide A $\beta$  entier chez des patients (5 % d'embolie pulmonaire sévère) a permis d'abandonner cette voie (Gilman *et al.*, 2005).

### 2.2.5.2.3. Inhibition de l'agrégation du peptide A $\beta$

L'agrégation du peptide A $\beta$  est à l'origine de la neurotoxicité, provoquée par la production de fibrilles à partir de structures en feuillets- $\beta$ . Une voie de traitement donc comporte à employer des substances ayant la possibilité de se lier aux peptides A $\beta$  et d'affaiblir ces feuillets- $\beta$ .

Des peptides courts comme le peptide KLVFF (Lys-Val-Leu-Phe-Phe, A $\beta$ 16-20) (Tjernberg *et al.*, 1996), et LPFFD (Leu-Pro-Phe-Phe-Asp, noté iA $\beta$ 5) déstructurent les plaques A $\beta$ , les peptides avec l'acide aminé proline favorisent la destruction des feuillets  $\beta$  (Soto *et al.*, 1998). Les peptides avec cinq acides aminés montrent une affinité élevée pour les formes monomères des peptides A $\beta$  et conduisent à la déstructuration des plaques amyloïdes *in vitro* et *in vivo*. Toutefois ces pentapeptides présentent des effets indésirables comme leur hydrolyse avant d'arriver à la cible, l'incapacité à passer la barrière hémato-méningée, au changement de la conformation des protéines autres que celles ciblées et provocation de réactions allergiques (Suh et Checler, 2002).

Des voies de recherches sont dirigées maintenant vers la découverte de molécules non peptidiques avec des propriétés similaires de déstructurer des plaques amyloïdes. Certaines de ces molécules ont été choisies par criblage très large, comme le 4,5-dianilinophthalimide, qui réduit la formation de feuillets- $\beta$ , restreint le volume de fibrilles et la toxicité (Blanchard *et al.*, 2004) ou la molécule *N,N'*-bis(3-hydroxyphenyl)pyridazine-3,6-diamine qui inhibe la production d'oligomères et de fibrilles d'A $\beta$ , désagrège des fibrilles préformées et réduit la toxicité d'A $\beta$  (Nakagami *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2005).

Certains polyphénols avec propriétés antioxydantes ont prouvé la capacité d'arrêter la formation des fibrilles A $\beta$  (Porat *et al.*, 2006). La curcumine permet d'empêcher la production des fibrilles de A $\beta$ 40 et de les déstructurer et de se fixer aux plaques amyloïdes, diminuant leur volume chez des souris (Yang *et al.*, 2005). De même, l'acide nordihydroguaiarétique ou les polyphénols permettent d'empêcher la production de fibrilles de A $\beta$ 40 et de fragiliser des fibrilles préexistantes (Ono *et al.*, 2003).

En outre, une molécule ionique simple, le tramiprosate (Alzhemed™) est au stade d'essais cliniques. Elle se fixe au A $\beta$  soluble, permettant de maintenir celui-ci dans une structure hélice- $\alpha$ /boucles et diminue les plaques amyloïdes et les volumes du peptide A $\beta$  soluble et insoluble chez des souris (Gervais *et al.*, 2006). Il subsiste cependant une limite à cette voie de thérapie. Dans l'hypothèse où les molécules d'A $\beta$  les plus néfastes ne sont pas les plaques mais des oligomères, des molécules inhibant la formation de fibrilles mais pas l'oligomérisation (ou qui déstructurent ces fibrilles en oligomères) pourraient avoir des conséquences inattendues de celles espérées.

### **2.2.5.3. Réduire les dégénérescences neurofibrillaires**

Une autre stratégie de thérapie de la maladie consiste à diminuer les dégénérescences neurofibrillaires formées de protéines Tau hyperphosphorylées. Les voies de recherche visent à bloquer les kinases à l'origine de la phosphorylation élevée ou à activer les phosphatases déphosphorylantes. Récemment, un essai clinique de phase II a testé la toxicité et le dosage d'une substance inhibant l'agrégation des protéines Tau, chez des patients atteints de la MA. Après 2 ans de thérapie avec du méthylthionium chloride (Rember™), les patients ont présenté une diminution de 81 % de leur taux de déclin cognitif, en comparaison aux témoins (**Iqbal et al., 2003; Wischik et al., 2008**).

### **2.2.5.4. Anti-inflammatoires non-stéroïdiens**

Récemment, les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) ont permis une diminution importante de l'incidence de la MA, particulièrement chez des patients consommant de l'ibuprofène (**Vlad et al., 2008**). Les AINS ont permis également une baisse de la teneur en oligomères des peptides A $\beta$  intraneuronaux chez des souris (**Lim et al., 2000; McKee et al., 2008**).

L'utilisation intra-cérébro-ventriculaire (ICV) de cannabinoïdes diminue l'accumulation de plaques amyloïdes et l'inflammation chez des rats avec injection ICV de peptide A $\beta$  25-35 (**Ramirez et al., 2005**).

### **2.2.5.5. Les antioxydants**

Les antioxydants sont employés en vue de freiner les aboutissements du stress oxydatif. L'alimentation riche en composés antioxydants (exemple: les tanins ou vitamines) ou l'administration de médicaments contenant des antioxydants constitue une voie pour combattre le stress oxydatif.

De nombreux travaux scientifiques ont présenté des propriétés antioxydantes de certaines molécules naturelles ou synthétiques ainsi que leurs effets bénéfiques (**Johnson, 1999; Christen, 2000; Grundman, 2000**). En revanche, il y a eu moins d'expériences cliniques sur les molécules à effet antioxydant, bien que certaines d'entre-elles se sont révélées très prometteuses.

L' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) freine le développement de la maladie mais ne présente pas d'effets sur les fonctions cognitives. L'extrait de *Ginko biloba* L. possède des activités neuroprotectrices. Il permet aussi l'amélioration des capacités cognitives chez des personnes souffrant de la MA (**Desport et Cauratier, 2002; Ann Marie et Martin, 2004**).

Certains antioxydants sont actifs sur les radicaux libres. Ce type de molécule comporte un groupement hydroxyle (OH) dans la structure. On peut citer la vitamine E, le resvératrol, la curcumine, la quercétine, et l'acide ascorbique (vitamine C).

La quercétine (aglycone) appartient à la classe des flavonoïdes (polyphénols). A présent, différents travaux scientifiques avec nombreuses méthodes ont permis de présenter ses vertus antioxydantes (**Boots et al., 2008**). La quercétine possèdent dans leur structure deux parties antioxydantes: le groupement catéchol dans le cycle B et le groupement hydroxyle en position 3 dans les cycles A et C.

Le pigment jaune du curcuma, la curcumine est un neuroprotecteur *in vitro* vis-à-vis du peptide A $\beta$  (**Smith et al., 2007**).

Le resvératrol est un stilbène de la famille des polyphénols. Le raisin est parmi ses principales sources. Il présente également des effets neuroprotecteurs sur des cellules nerveuses (**Fukui et al., 2008**).

D'autres antioxydants sont actifs sur la chélation des métaux tels que le fer et le cuivre. Ces métaux provoquent la solubilisation du peptide A $\beta$ . Parmi ces antioxydants, on peut citer la desferrioxamine, le JLK 169, le clioquinol, et la déféripone (**Di Vaira et al., 2004; Moret et al., 2006**).

La desferrioxamine est un chélateur du fer mais aussi du cuivre, du zinc et de l'aluminium. Des travaux scientifiques ont présenté un effet de ralentissement du développement de la MA. Elle a par contre des effets indésirables tels que l'anémie et son administration par voie intramusculaire affaiblie son potentiel (**Smith et al., 2007**).

La déféripone est un chélateur du fer et de l'aluminium. Elle a une bonne biodisponibilité par voie orale et un bon passage à travers la barrière hémato-encéphalique (**Yu et al., 2001**). Lors des essais cliniques cette molécule a présenté des effets néfastes sur la moelle osseuse et l'agranulocytose.

Le JLK 169 commercialisé sous le nom de Mozobil<sup>®</sup> est un chélateur du cuivre, réduit son taux dans le cortex cérébral et maintient sa concentration constante dans le sang (**Smith et al., 2007**). Cette molécule est une excellente candidate pour le traitement de la MA. En outre, elle possède des effets sur le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) et le cancer. C'est aussi un antagoniste des récepteurs CXCR4 (chemokine receptor type 4) et elle a un effet de mobilisation des hématopoïétiques. Elle possède une faible toxicité (**Moret et al., 2006**).

Le clioquinol est un chélateur de métaux apolaires, possède une bonne capacité pour traverser la barrière hémato-encéphalique et a un effet antiparasitaire (**Whitnall et Richardson, 2006**). De nombreux travaux ont montré qu'il possède des propriétés chélatrices du cuivre (**Gouras et Beal, 2001; Di Vaira et al., 2004**). Le clioquinol a montré aussi une augmentation de la solubilité du peptide A $\beta$  sur des cerveaux malades post-mortem. Il a montré aussi une inhibition de la formation des plaques A $\beta$  par chélation du cuivre et du fer chez des souris transgéniques.

### 2.2.5.6. Composés réduisant le niveau du cholestérol

L'inhibition de la HMG-CoA (3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA) réductase par les statines permet de réduire le niveau du cholestérol. La HMG-CoA réductase transforme le HMG-CoA en mévalonate lors de la biosynthèse du cholestérol (**Shobab et al., 2005**). En baissant les niveaux de cholestérol, les statines modifient l'activité des sécrétases responsables du clivage de la protéine APP. Elles mènent alors à la diminution de la génération du peptide A $\beta$  *in vitro* et *in vivo* (**Fassbender et al., 2001**).

L'utilisation des statines comme la simvastatine (Zocor<sup>®</sup>) et l'atorvastatine (Lipitor<sup>®</sup>) pourraient diminuer la possibilité de développer la MA de 40 à 70 % (**Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000**).

Dans la même stratégie de réduction des niveaux de cholestérol afin d'arrêter la formation du peptide A $\beta$ , des inhibiteurs de l'acyl-coenzyme A cholestérol acyltransférase (ACAT) sont en voie de recherche. L'ACAT est une enzyme clé de la réserve du cholestérol dans l'organisme à l'état d'ester de cholestérol. En condition de déficience de cette enzyme, les cellules ne peuvent stocker qu'un faible taux de cholestérol. Le CP-113,818, un inhibiteur de l'ACAT conduit à la diminution du niveau du cholestérol chez des souris sauvages. Il permet également de diminuer les niveaux du peptide A $\beta$ 42 soluble et des plaques et d'augmenter la mémoire chez des souris (**Hutter-Paier et al., 2004**).

### **2.2.5.7. Les inhibiteurs de la monoamine oxydase**

La monoamine oxydase (MAO) est une enzyme impliquée dans les mécanismes de stress oxydatif et est responsable de la désamination des neurotransmetteurs ou des neuromodulateurs tels que la noradrénaline, la dopamine, la sérotonine ou  $\beta$ -phényléthylamine. Deux types de MAO existent, la MAO-A et MAO-B, qui diffèrent par leur distribution tissulaire et par leur substrat et inhibiteur de spécificité. La MAO-A désamine préférentiellement la sérotonine et ses inhibiteurs ont été révélés être antidépresseurs, tandis que le substrat préférentiel de la MAO-B est le  $\beta$ -phényléthylamine et ses inhibiteurs sont utilisés dans le traitement de la maladie de Parkinson. La MAO-B représente environ 80 % de l'activité totale de la MAO dans le cerveau (**Riederer et al., 2004**). Dans la MA, les circuits neuronaux noradrénergiques et dopaminergiques sont souvent détériorés, et les inhibiteurs de la MAO pourraient améliorer le niveau des deux neurotransmetteurs (**Cutler et Sramek, 2001**).

La sélégiline inhibiteur de la MAO-B a une action neuroprotectrice multiple. Elle diminue la formation de radicaux libres due à la métabolisation des amines endogènes dans le SNC, elle augmente la capacité du piègeage des radicaux libres du cerveau, elle peut empêcher l'activation des pré-toxines environnementales, elle inhibe l'oxydation des lipoprotéines de basse densité dans les tissus vasculaires et neuronaux, elle réduit la sécrétion des produits neurotoxiques, et enfin elle présente une activité neuroprotectrice contre l'apoptose neuronale en culture cellulaire (**Riederer et al., 2004**). Un essai clinique a montré que la sélégiline ne semble pas améliorer les paramètres tels que ADAS-Cog (*Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive*), mais elle retarde l'hospitalisation, la perte d'indépendance ou la mort de patients atteints de la MA (**Cutler et Sramek, 2001**). Une autre étude clinique a montré un effet statistiquement significatif de la sélégiline sur la mémoire et l'attention, dû probablement à une amélioration de la fonction des systèmes monoaminergiques impliqués dans le processus de dégénérescence neuronale. En outre, la sélégiline est associée à une amélioration de l'agitation et des symptômes de dépression aussi observés dans la MA (**Riederer et al., 2004**).

### **2.2.5.8. Thérapie par remplacement hormonal**

L'œstrogène a de nombreux effets dans le cerveau, incluant l'augmentation de la circulation sanguine cérébrale, la protection contre l'apoptose, les actions anti-inflammatoires et des propriétés antioxydantes (**Moreira et al., 2006**). Il y a deux avantages potentiels de



l'œstrogène à retarder la MA, c'est un piègeur de radicaux libres d'une part, et est donc en mesure de protéger les cellules contre le stress oxydatif, et d'autre part, il a été démontré qu'il améliore la santé neuronale (Cutler et Sramek, 2001).

De nombreuses études à court terme suggèrent que la thérapie par remplacement hormonal améliore la cognition chez des patients souffrant de la MA, et certaines études longitudinales suggèrent qu'elle peut diminuer la MA. Cependant, des études plus récentes montrent que les patients traités et non traités souffrent de déclin cognitif parallèle et concluent que l'œstrogène n'est pas un traitement efficace pour les femmes avec une MA légère à modérée (Cutler et Sramek, 2001; Moreira *et al.*, 2006).

### **2.2.5.9. Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase**

#### **2.2.5.9.1. Les cholinestérases**

Les esters de choline tels que l'ACh, le butyrylcholine (BCh) et le succinylcholine sont hydrolysés par les cholinestérases en acide carboxylique et en choline. Les synapses cholinergiques du système nerveux central, les jonctions neuromusculaires et les membranes neuromusculaires sont les principaux sites de l'AChE. Tandis que la butyrylcholinestérase (BChE) se trouve essentiellement au niveau plasmatique, on peut la retrouver dans différents tissus comme le foie, l'intestin, les poumons, le cœur, les muscles, le cerveau. La BChE montre une grande similarité avec l'AChE, particulièrement au niveau de sa composition en acides aminés, de sa structure tridimensionnelle et de son site catalytique.

#### **➤ L'acétylcholinestérase**

- **Structure**

Le monomère de l'AChE est constitué d'un repliement de modèle  $\alpha/\beta$  hydrolase (Ollis *et al.*, 1992), variant 15 hélices  $\alpha$  et 11 feuillets  $\beta$  (figure 2.26). La terminaison *N*-terminale montre une section de feuillet  $\beta$  et n'interagissant pas avec le reste de la composition. Le dimère de l'enzyme est formé par l'union de deux hélices  $\alpha$  de chaque monomère. Les quatre hélices  $\alpha$  ainsi liées garantissent la consistance des deux monomères en un dimère très stable. La structure moléculaire de l'AChE a conduit à la découverte de deux sites primordiaux à l'AChE, placés de part et d'autre de la gorge qui traverse l'enzyme jusqu'à son centre: le site actif au fond, et le site périphérique à l'entrée (figure 2.27).

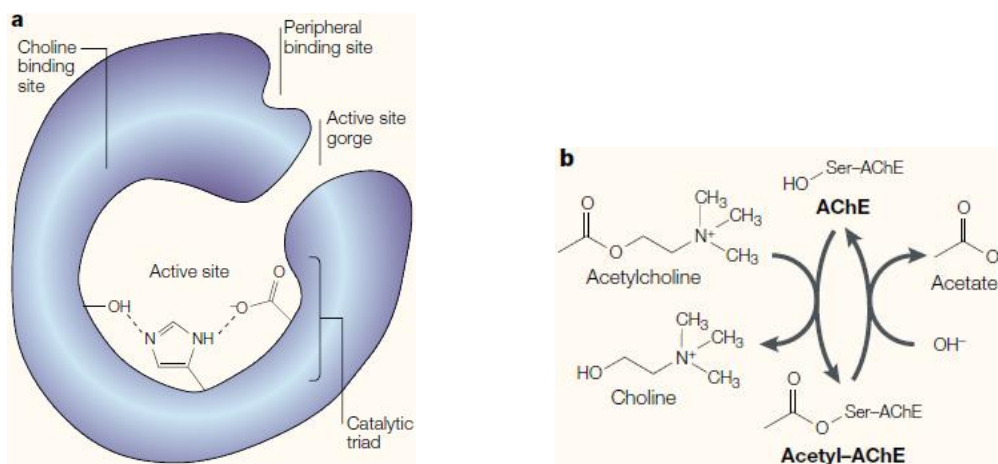


**Figure 2.26.** Structure de l'AChE en 3D avec représentation des hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$  et résidus du site actif (Sussman *et al.*, 1991).

- **Le site actif**

Le site actif (**figure 2.27**), dans lequel se réalise la catalyse ou l'hydrolyse du substrat, se fractionne en deux sous-sites l'un appelé estérasique l'autre appelé anionique. Le site estérasique héberge la triade catalytique. Cette dernière est caractéristique des protéases à sérine, l'AChE possède une telle triade. Elle se compose des acides aminés suivants: Ser200, His440 et Glu327 (Gibney et Taylor, 1990; Shafferman *et al.*, 1992). La réaction catalytique se compose de deux étapes essentielles dont la Ser200 joue un rôle crucial. En effet, dans une première étape appelée l'étape d'acétylation, le groupement acétyle de l'ACh se fixe à la Ser200 pour produire l'intermédiaire tétraédrique. Ensuite la partie choline est libérée par coupure de l'ACh. Enfin, l'étape de déacétylation permet de libérer l'enzyme, en dissociant l'acétate. Les protons nécessaires aux étapes de catalyse sont libérés par L'His440. Le Glu327 polarise et maintient l'His440 dans une position convenable aux transferts des protons. La réaction catalytique est optimisée par les acides aminés qui tapissent la proximité du fond de la gorge. Ainsi, la poche ou le trou oxyanion stabilise la charge négative qui se produit au niveau de l'oxygène du carbonyle durant l'acétylation. Le trou oxyanion est composé des acides aminés suivants: Gly117, Gly118 et Ala201. Les acides aminés aromatiques stabilisent le groupement méthyle du carbonyle de l'ACh. Ce sont les acides aminés (Trp233, Phe288, Phe290 et Phe331) qui constituent la poche acyle. La sélectivité de

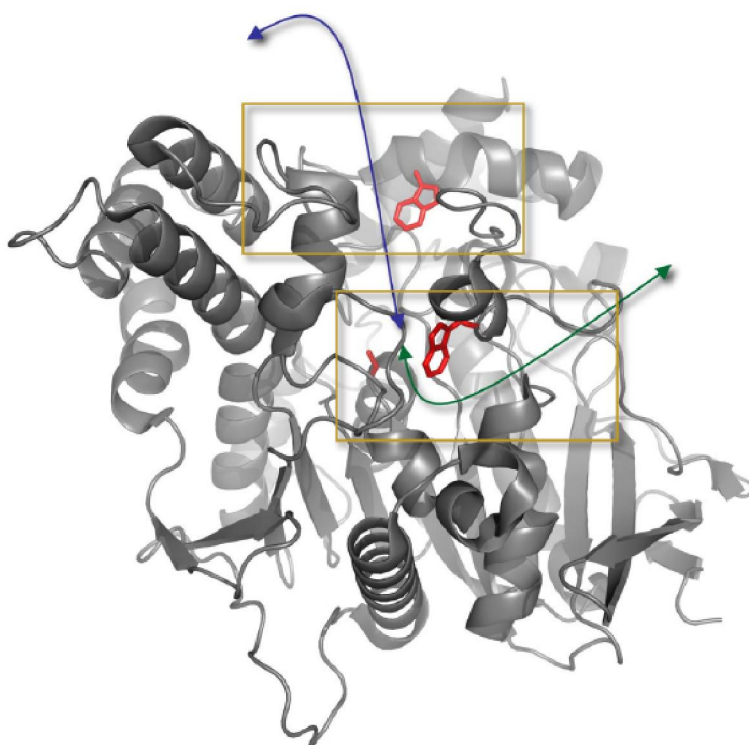
l'AChE pour ses substrats est garantie par la poche dont elle joue un rôle important (Harel *et al.*, 1992). Les acides aminés Trp84, Glu199 et Phe330 forment le site anionique. La charge positive de Glu199 maintient la charge positive de l'ACh. Les électrons  $\pi$  du Trp84 et du Phe330 assurent cette charge. Ainsi, les acides aminés aromatiques du site anionique mettent des interactions de caractère cation- $\pi$  avec la partie choline de l'ACh. La fixation des inhibiteurs au site actif de l'enzyme est assurée en partie par le sous-site anionique. Le complexe de l'edrophonium et la tacrine avec l'AChE présente des interactions de caractère cation- $\pi$ , et des empilements  $\pi$  ( $\pi$ -stackings), respectivement avec le noyau indole du Trp84 (Harel *et al.*, 1993). Il est estimé que le site anionique livre près d'un demi de l'énergie libre de stabilisation de substrat (Harel *et al.*, 1996). En plus, le site anionique présente des affinités très supérieures à celle de son substrat classique l'ACh, par exemple l'affinité de ce site pour un analogue de structure à l'ACh, le *m*-(*N,N,N*-triméthylammonio)-2,2,2-trifluoroacétophenone (TMTFA) est estimée à 1010 fois supérieure que celle de l'ACh (Harel *et al.*, 1996).



**Figure 2.27.** L'acétylcholinestérase. **a.** Les caractéristiques structurales de l'enzyme. La cristallographie aux rayons X a identifié un site actif au fond d'une gorge étroite, bordé de chaînes latérales d'acides aminés hydrophobes. La triade catalytique est constituée d'une chaîne latérale à glutamate. Le site de liaison de la choline sélectionne les résidus tryptophanes hydrophobes à la place des groupes anioniques attendus; le site de fixation périphérique a également été identifié par mutagenèse dirigée au site. **b.** La réaction de l'AChE. L'AChE permet l'hydrolyse de l'ACh par formation de l'intermédiaire acétyl-AChE avec la libération de la choline, et hydrolyse ensuite l'intermédiaire pour libérer l'acétate (Soreq et Seidman, 2001).

- **La gorge aromatique**

La gorge aromatique est tapissée pratiquement par des acides aminés aromatiques (**figure 2.28**), sa profondeur est estimée à 20 Å avec un espace de 3 Å, avec cette dimension seules des molécules d'eau ont la possibilité de passer la gorge, ce qui prouve que la structure n'est pas statique afin de permettre à des molécules plus grandes (ACh) que l'espace disponible de traverser la gorge. A mi-profondeur, il existe un rétrécissement des acides aminés suivants Tyr121, Phe330 et Phe331. L'activité de l'enzyme est conditionnée par la flexibilité conformationnelle, en laissant l'entrée et la sortie des molécules (substrats, produits, inhibiteurs, ect.).



**Figure 2.28.** Diagramme en ruban de la structure tridimensionnelle de l'AChE. Les deux principaux contributeurs à la stabilisation du substrat dans le site actif Trp-84, et sur le site périphérique Trp-279, sont mis en évidence. La Ser-200 catalytique est représentée au fond de la gorge. La flèche bleue indique la gorge du site actif, et la flèche verte marque la porte arrière putative (*Colletier et al., 2008*).

- **Le site périphérique**

Le site périphérique est un site de fixation des substrats et des ligands, il est localisé à l'entrée de la gorge qui conduit au site actif (**figure 2.27**). La fixation des molécules cationiques est une caractéristique du site périphérique. Ce site est principalement composé d'acides aminés aromatiques. La fonction du site périphérique n'a pas encore été entièrement

clarifiée. Toutefois, il a une fonction dans les mécanismes de blocage par le substrat lorsqu'il s'agit de l'AChE (**Bergmann et al., 1950; Radic et al., 1991**), et d'activation par excès de substrat dans les cas de la BChE (**Masson et al., 1996; 1997**). L'étape initiale de la catalyse se produit par la fixation de l'ACh à l'Asp72 (**Mallender et al., 2000**). À faibles concentrations de substrat, le site périphérique pourrait conduire à l'accélération de la réaction catalytique (**Nachmansohn et Rothenberg, 1945; Brochier et al., 2001**). Le site périphérique pourrait adapter l'action de l'AChE à la concentration de son substrat, ainsi il joue le rôle de régulateur de fonction catalytique. L'inhibition de l'enzyme durant un temps nécessaire par l'ACh lors de sa libération permet à ce dernier de se lier aux récepteurs (muscariniques ou nicotiques) et de conduire l'influx nerveux. Ensuite, l'enzyme est activée par la faible concentration de l'ACh non lié à son site, ce qui permet à l'enzyme d'accomplir son rôle cholinergique. Le site périphérique n'a pas qu'une action d'ordre stérique, mais il contrôle aussi allostériquement l'activité de l'enzyme (**Changeux, 1966; Rosenberry, 1975**).

- **Mécanisme d'hydrolyse**

L'AChE (EC 3.1.1.7) appartient à la classe des carboxylestérases de type B, de la famille des sérines hydrolases (**Quinn, 1987; Taylor et Radic, 1994**). Le clivage de l'ACh par l'AChE passe par deux étapes. Après fixation de l'ACh dans le site actif de l'enzyme, il se produit l'ajout de l'oxygène de la sérine sur le carbonyle de l'ACh, ensuite l'élimination de la choline, c'est l'étape de l'acylation. Le mouvement de cette étape vers la production du complexe acyl-enzyme est assuré par l'histidine de la triade catalytique par fixation du proton de la Ser203 (**figure 2.29**). Le départ de la choline du site actif s'accompagne par la fixation de ce proton par la choline. Le trou oxyanionique stabilise le complexe acyl-enzyme tétraédrique formé. L'ajout d'une molécule d'eau sur le complexe formé permet l'élimination de l'acétate, cette étape constitue la déacylation. Le clivage de l'ACh se réalise très rapidement car le turnover de l'enzyme change de 10.000 à 20.000 d'ACh clivé par seconde, l'efficacité catalytique ( $k_{cat}/K_m$ ) est estimée à  $1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (**Colletier et Weik, 2007**). Le mécanisme d'hydrolyse de l'ACh est de type michaelien. L'étape initiale se produit par la production du complexe de Michaelis-Menten entre l'AChE et l'ACh. Ensuite, un ajustement conformationnel se réalise après la liaison de l'ACh avant la catalyse. Enfin, les deux étapes de la catalyse se forment: production du complexe acyl-enzyme et déacylation de ce complexe.

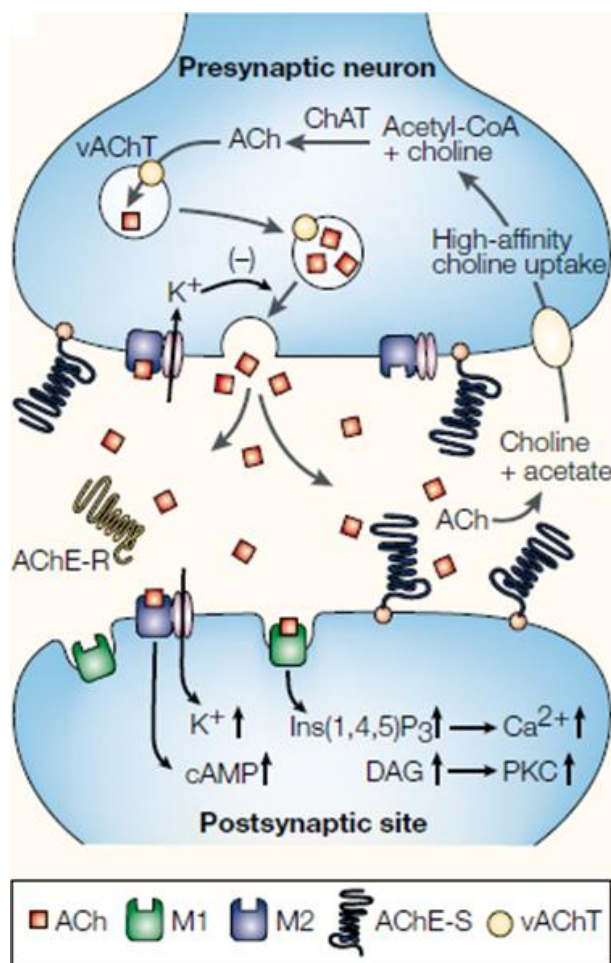


**Figure 2.29.** Structure tridimensionnelle de l'AChE montrant la triade catalytique (Ser200, His440, Glu327), le principal contributeur à la stabilisation de l'ACh dans le site actif (Trp84), et les deux principaux constituants du site périphérique (Trp279, Tyr70) (Colletier et Weik, 2007).

- **Fonctions de l'acétylcholinestérase**

Le contrôle de l'influx nerveux se produit par le clivage de l'ACh par l'AChE dans les synapses du système nerveux central et périphérique et dans les jonctions neuromusculaires, c'est la fonction capitale de l'AChE (figure 2.30).

La production de l'ACh est catalysée par la choline acétyltransférase (ChAT) au niveau de la cellule présynaptique à partir de deux substrats la choline et l'acétyl-coenzyme A. Les mitochondries des neurones produisent l'acétyl-coenzyme A. La choline est récupérée par la cellule présynaptique du milieu extracellulaire (fente synaptique). L'ACh (approximation 4.000 molécules) est emmagasinée dans des vésicules de la membrane présynaptique des cellules nerveuses. La dépolarisation de la membrane présynaptique au cours d'un influx nerveux se produit après une arrivée d'un potentiel d'action. L'exocytose des vésicules stockant l'ACh vers la fente synaptique est produite par l'ouverture des canaux membranaires à calcium qui permettent l'entrée des ions calcium suite à l'arrivée d'un potentiel d'action. L'ACh libérée se lie sur les récepteurs de la membrane postsynaptique, conduisant à la diffusion de l'influx nerveux.



**Figure 2.30.** Représentation schématique d'une synapse cholinergique (Soreq et Seidman, 2001).

Les récepteurs muscariniques sont des protéines localisées au niveau de la membrane, constituées de sept hélices liées à une protéine G située elle-même dans le cytoplasme de la cellule postsynaptique. Le récepteur change de conformation suite à liaison de l'ACh, la protéine G troc son GDP (guanosine diphosphate) par un GTP (guanosine triphosphate) par sa sous-unité alpha. Cette dernière se sépare du complexe formé par les sous-unités beta et gamma. Quand  $G_{\alpha}$  convertit son GTP en GDP, il a y reformation du complexe récepteur- $G_{\alpha, \beta, \gamma}$ . Des voies différentes sont activées par  $G_{\alpha}$  et  $G_{\beta, \gamma}$  respectant les cinq classes de récepteur (M1, 2, 3, 4 et 5) (Hulme et Birdsall, 1990; Caulfield et Birdsall, 1998).

Les récepteurs M1, M3 et M5 ont un rôle excitateur. Suivant les tissus, l'excitation neuronale et la contraction musculaire sont dues à une activation de la phospholipase C elle-même activée par la sous-unité alpha. Les récepteurs M2 et M4, produisent un effet inhibiteur, au niveau de la membrane postsynaptique, le complexe  $G_{\beta, \gamma}$  permet l'ouverture des



canaux à potassium (**Brown, 2010**). La propagation de l'influx nerveux est réalisée par la création d'un courant ionique suite à la sortie des ions potassium intracellulaires.

Les récepteurs nicotiniques se situent au niveau du système nerveux central, des ganglions (N1), des jonctions neuromusculaires (N2), et d'autres cellules comme les lymphocytes B, T et les kératinocytes. Ce sont des récepteurs ionotropes pentamériques transmembranaires (**Gotti *et al.*, 1997; Paterson et Nordberg, 2000**). L'ouverture de canaux sodium et/ou potassium suivant le sous-type de récepteur est provoquée par la liaison de deux résidus de l'ACh. Ensuite, il se produit une dépolarisation de la membrane et une diffusion de l'influx nerveux pour les N1 ou une contraction musculaire pour N2, suite à l'entrée de cations dans la cellule postsynaptique.

L'AChE clive l'ACh en choline et acétate, c'est la fonction de régulation de la transmission synaptique. L'AChE se trouve sous différents assemblages oligomériques et modes d'ancrages à la surface de la cellule postsynaptique avec des propriétés catalytiques identiques.

L'AChE montre une similarité de séquence avec les protéines d'adhésion de membrane postsynaptique (neuroligine) et aux récepteurs de surface au niveau axonal (neurotactine) responsables du développement du système nerveux (**figure 2.31**) (**Scholl et Scheiffele, 2003; Leone *et al.*, 2010**). Des changements dans la séquence de la neuroligine conduisent à certaines formes d'autisme et de retard mental (**Laumonnier *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2009**).

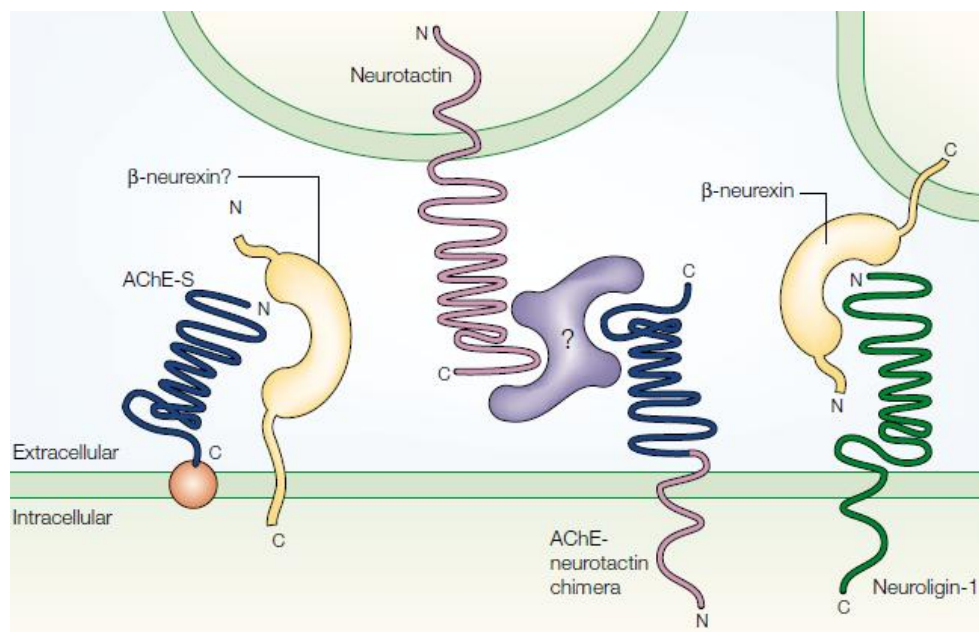
Le site périphérique de l'AChE est engagé dans l'assemblage des plaques amyloïdes responsables des dommages observés dans la MA par un complexe enzyme-peptide A $\beta$ . Ce dernier change l'hémostasie calcique et la fonction mitochondriale des neurones de l'hippocampe (**Dinamarca *et al.*, 2010**). Le blocage du site périphérique de l'enzyme permet de freiner la production des plaques amyloïdes, c'est la nouvelle stratégie pour traiter la MA. En outre, l'augmentation de l'ACh dans la fente synaptique se produit par une inhibition réversible du site périphérique de l'AChE, l'accumulation de l'ACh permet d'élever la stimulation des récepteurs cholinergiques.

Il a été démontré que la croissance du corps cellulaire (neurite) des neurones (axone et dendrite) est réalisée par l'implication de l'AChE (**Sharma *et al.*, 2001; Paraoanu et Layer,**



2008). Cependant, l'inhibition du site périphérique de l'AChE pourrait arrêter la neuritogenèse (Small *et al.*, 1995; Howard *et al.*, 2005).

La présence de l'AChE dans les précurseurs des cellules du sang expliquerait son implication dans l'activité hématopoïétique et thrombopoïétique (Lev-Lehman *et al.*, 1997). Certaines anomalies dans les fonctions immunitaires comme la prolifération myéloïde chez des malades de leucémies sont à l'origine de l'AChE (Perry et Soreq, 2004; Battisti *et al.*, 2009).



**Figure 2.31.** Mécanisme proposé de certaines fonctions non-classiques de l'AChE. L'AChE-S (bleu) est représentée par une ligne repliée, comme le sont les régions homologues de neurotactine (magenta) et neuroligine-1 (vert). L'AChE-S liée à la membrane à travers une sous-unité structurale (orange) peut être associée avec la β-neurexine (jaune) dans une molécule voisine où chacune incorporée seule dans une même membrane (à gauche). Alternativement, si elles sont intégrées dans les sites pré et postsynaptiques, la neuroligine et la β-neurexine pourraient contrôler l'adhésion cellule-cellule (droite). La Neurotactine pourrait adhérer à une autre molécule de neurotactine (non représentée), ou être liée à l'AChE à travers une protéine de liaison pas encore identifiée (? , violet). L'AChE ou des protéines similaires ne peuvent pas former une de ces interactions par eux-mêmes. Cependant, lorsque la région homologue de l'AChE remplace une région de la neurotactine, la protéine chimère conserve la capacité d'adhérence cellule-cellule de la neurotactine originale (Darboux *et al.*, 1996). Il a donc été proposé que l'AChE-R (Grifman *et al.*, 1998), qui manque l'élément d'ancrage à la membrane, peut rivaliser avec la neurotactine, la neuroligine-1 ou l'AChE-S et modifier les interactions cellule-cellule et la signalisation intracellulaire (Soreq et Seidman, 2001).

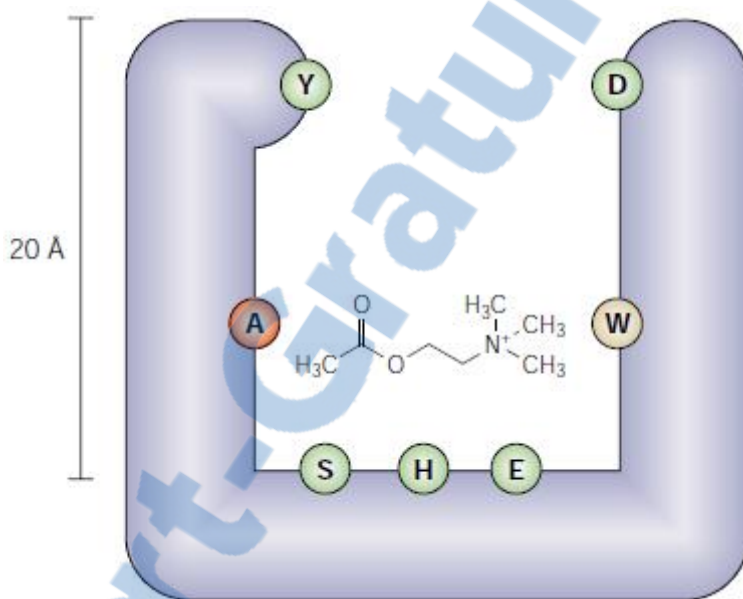
➤ **La butyrylcholinestérase**

La fonction de la BChE chez l'homme n'est pas bien élucidée. L'activité enzymatique peut être réduite ou nulle due à la présence de différentes variantes alléliques de cette enzyme chez l'homme, ceci prouve que ce dernier peut s'en passer. L'existence de variantes de la BChE n'est pas nocive pour l'homme, mais peut entraîner des sensibilités au succinylcholine employé en anesthésie. En effet, le succinylcholine est dégradé par la BChE, dans le cas contraire il se produit un blocage dans la transmission synaptique dans les muscles respiratoires conduisant à une apnée prolongée (**Lockridge et Masson, 2000**). En plus, une large gamme de substrat peut être hydrolysée par la BChE comme les alcaloïdes naturels, ainsi cette enzyme peut prévenir la diffusion de l'ACh dans le sang ou l'ingestion par voie orale de substances toxiques (**Neville et al., 1990; Sun et al., 2001**).

La BChE très similaire à l'AChE appartient à la classe des protéines pli- $\alpha/\beta$ , et un acide aminé sérine est important pour l'hydrolyse de son substrat (**figure 2.32**). La BChE permet le clivage de l'ACh en choline et acétate avec une efficacité inférieure à celle de l'AChE (**Li et al., 2000; Mesulam et al., 2002a,b**). Elle peut également hydrolyser d'autres esters comme la cocaïne, l'héroïne et l'acide acétylsalicylique (**Lockridge et al., 1980; Gatley, 1991; Masson et al., 1998**).

La BChE joue un rôle important à une importance dans le système nerveux humain vue sa distribution différentielle largement répandue dans les neurones par rapport à l'AChE, elle pourrait être impliquée dans différentes activités neuronales comme contrôleur de l'activité de l'ACh et non neuronales (**Soreq et Zakut, 1993; Small et al., 1996; Li et al., 2000; Greig et al., 2001; Soreq et Seidman, 2001; Mesulam et al., 2002a,b**). Le contrôle de l'hydrolyse de l'ACh par la BChE est prouvé par le blocage de la BChE, qui conduit à une élévation de la concentration de l'ACh dans le cerveau (**Giacobini, 2000**). Cette enzyme pourrait remplacer une partie des fonctions de l'AChE en cas d'absence de cette dernière dans le système cholinergique (**Li et al., 2000; Mesulam et al., 2002b**). Il a été prouvé que la BChE était profondément unie à différentes protéines comme l'albumine, la transferrine et des peptidases (**Masson, 1989; Small et al., 1996; Weitnauer et al., 1999**). Il a été expliqué qu'une liaison entre la BChE et les protéases comme la trypsine signifie une implication dans l'activité protéolytique (**Darvesh et al., 2003b**). Cette association a un rôle dans l'activité du système nerveux puisque la trypsine se situe dans le cerveau humain sain et elle pourrait être associée à la pathologie de la MA (**Katona et al., 2002**). En plus, la BChE pourrait posséder des

activités liées à sa réaction avec différentes protéines, outre que la régulation cholinergique. Il a été proposé que les deux cholinestérases jouent un rôle durant le développement du système nerveux, dans la régulation de la prolifération cellulaire et dans le développement des neurites (Robertson et Mostamand, 1988; Dubovy et Haninec, 1990; Layer, 1991; Soreq et Seidman, 2001). La BChE a été localisée dans les axones, dans les terminaisons nerveuses, dans les cônes de croissance et dans les cellules entourant les axones, ce qui montre son implication dans le développement des neurites (Dubovy et Haninec, 1990).

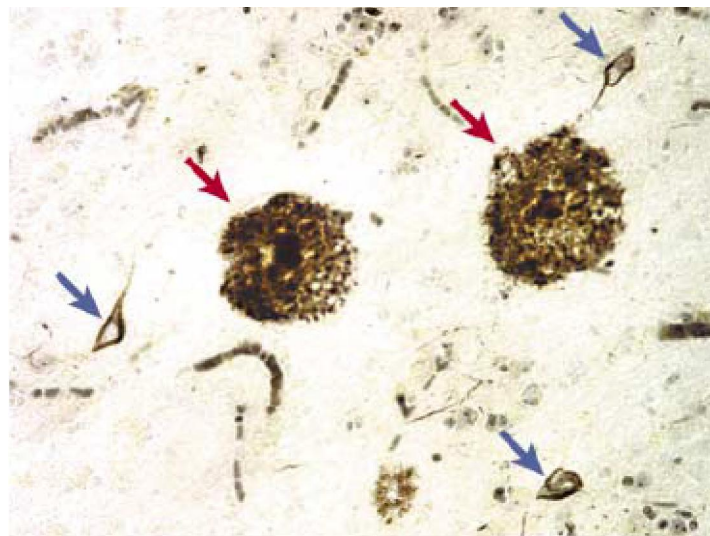


**Figure 2.32.** Le site actif de la BChE est au fond d'une gorge de 20 Å. La triade catalytique est constituée des acides aminés sérine (S), histidine (H), et acide glutamique (E). Le groupe acyle du substrat (ACh est représentée ici) s'ajuste dans la poche acyle (A), tandis que l'atome d'azote quaternaire interagit avec le site actif anionique qui est formé par l'acide aminé tryptophane (W). Les substrats sont guidés vers le bas de la gorge du site actif par interaction avec l'acide aspartique (D) et la tyrosine (Y), des résidus trouvés à la lèvre de la gorge du site actif (Darvesh *et al.*, 2003a).

Le taux de la BChE corticale est associé à la MA (Perry *et al.*, 1978; Atask *et al.*, 1986; Geula et Mesulam, 1995). Plus il est élevé, plus les plaques neuritiques et les dégénérescences neurofibrillaires sont nombreuses, ce sont là les caractéristiques neuropathologiques de la MA (figure 2.33) (Friede, 1965; Geula et Mesulam, 1989; Arendt *et al.*, 1992; Wright *et al.*, 1993; Mesulam et Geula, 1994; Morán *et al.*, 1994; Geula et Mesulam, 1995; Guillozet *et al.*, 1997). Dans le cortex, le nombre des plaques BChE positives est significativement plus élevé que celui chez des personnes âgées normales, dont

le cortex ne contient qu'un petit nombre de plaques diffuses primaires (Mesulam et Geula, 1994). L'activité de la BChE est observée dans les plaques matures, par opposition à la diffuse, forme bénigne (Mesulam et Geula, 1994; Guillozet, 1997). Ceci mène à suggérer que la BChE pourrait participer à la maturation des plaques à partir de la forme diffuse à la forme compacte, qui est la forme pathogène (Mesulam et Geula, 1994; Guillozet, 1997).

En conclusion, la BChE participe dans les activités du système nerveux sain et pourrait avoir une implication dans les voies pathologiques observées par exemple dans la MA.



**Figure 2.33.** La BChE et la MA. BChE dans les plaques (flèches rouges) et les enchevêtrements (flèches bleues) dans le cortex cérébral d'un patient atteint de la MA. De nombreux enchevêtrements et des plaques dans le cerveau des patients atteints de la MA contiennent l'activité de la BChE (Darvesh *et al.*, 2003a).

#### ➤ Les formes des cholinestérases

Différentes formes de cholinestérases ont été identifiées suivant de propriétés biochimiques, l'enzyme peut être sous une forme monomérique, dimérique et tétramérique, cette dernière forme peut être liée au collagène ou à une protéine transmembranaire. La différence dans l'organisation moléculaire est à l'origine de modifications génétiques, post-transcriptionnelles et post-traductionnelles (figure 2.34). Ainsi, les différentes formes moléculaires désignent la fonction dans les synapses cholinergiques et des compartiments non synaptiques.

Chaque forme moléculaire est formée de deux parties protéiques distinctes: une partie catalytique commune constituée approximativement de 500 acides aminés et une petite partie C-terminale constituée de moins de 50 acides aminés (**Massoulie *et al.*, 1998; Massoulie, 2002**). L'épissage alternatif au niveau de la région 3' du gène codant pour les cholinestérases, diffère selon l'espèce animale et la cholinestérase. Il existe trois formes d'exons qui compose les gènes des cholinestérases, qui codent pour des parties C-terminales distinctes, nommée H "Hydrophobic", T "Tailed", S "Soluble". En plus, il y a la forme R "Readthrough" découverte dans les torpilles et les mammifères. De ce fait, le mécanisme d'épissage produit diverses sous-unités de clivage qui se composent de la même partie catalytique liée à des parties C-terminales différentes H, ou T, ou S, ou R (**Massoulie *et al.*, 1998**). Les petites parties C-terminales ne sont pas indispensables pour la catalyse enzymatique, mais conduisent au devenir et à la maturation des cholinestérases.

- **La forme R**

La forme R de l'AChE est fonctionnelle d'une façon normale, soluble et monomérique (**figure 2.34**) (**Massoulie, 2002**). Elle est moins répandue dans le cerveau et semble qu'elle participe moins à l'activité cholinergique par le clivage de l'ACh au niveau du système nerveux (**Perrier *et al.*, 2005**). Elle joue des activités dans le système immunitaire, précisément en régulant les réponses auto-immunes (**Grisaru *et al.*, 1999; Brenner *et al.*, 2003**). Elle est impliquée dans le clivage non synaptique et à la morphogénèse. Il a été prouvé que la forme R de l'AChE est située largement dans le sérum des rats malades de la myasthénie grave par rapport à celui des rats sains. Son implication dans ces myasthénies a été bien définie (**Brenner *et al.*, 2003**). L'importance de l'AChE forme R semble être due à la spécificité de sa partie C-terminale qui peut se détacher et être libérée dans le plasma (**Grisaru *et al.*, 2001**). La partie C-terminale du peptide R ne comporte ni cystéines qui peuvent constituer des ponts disulfures, ni des séquences hydrophobes afin que le peptide puisse se fixer à la membrane (**Massoulie *et al.*, 1998**).

- **La forme H**

Les sous-unités de type H se composent d'une partie C-terminale hydrophobe contenant un signal pour l'hydrolyse et l'ajout d'un lipide et une ou plus de cystéines voisines de la partie catalytique qui conduisent à la dimérisation par formation des ponts disulfures (**figure 2.34**).

- **La forme T**

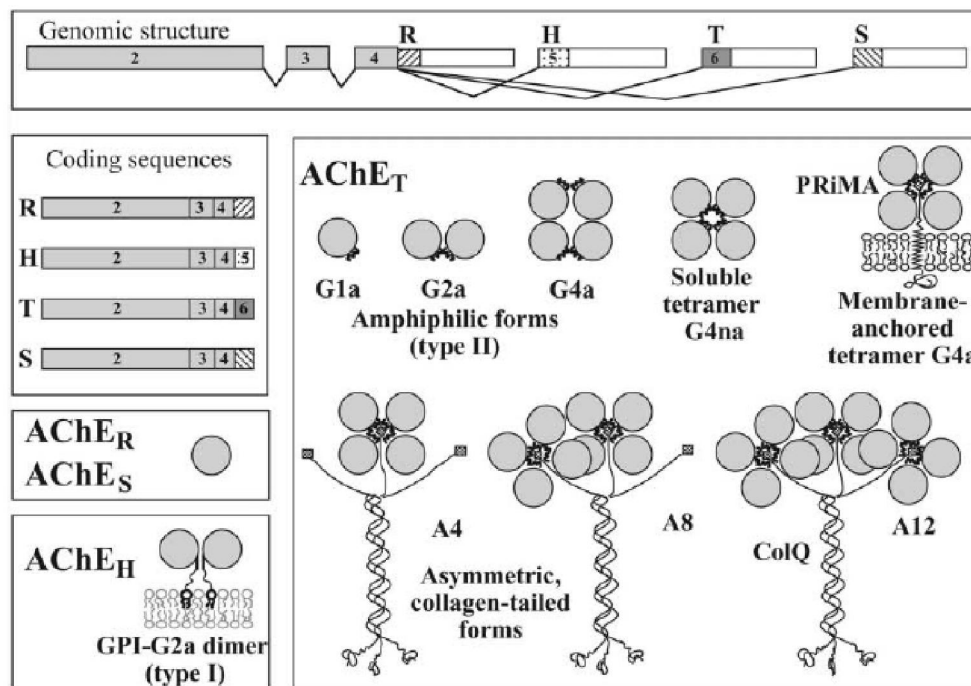
L'ACHe T existe sous une variété de forme d'oligomères, soit monomères, ou dimères ou tétramères libres non liés, soit des tétramères associés au collagène Q (ColQ) ou associés à la protéine membranaire riche en proline (PRiMA) (**figure 2.34**). Les sous-unités catalytiques de type « T » sont présentes chez tous les vertébrés pour l'ACHe et représentent la seule forme de sous-unités pour la BChE.

Les formes T possèdent 40 et 41 acides aminés pour l'ACHe et BChE respectivement, contenant 7 acides aminés aromatiques dont 3 tryptophanes (**Arpagaus et al., 1994**). La cystéine est également présente dans la partie C-terminale. La cystéine constitue des ponts disulfures soit entre deux sous-unités catalytiques soit entre une sous-unité catalytique et une protéine adhérente ou liée, ColQ ou PRiMA (**Massoulie, 2002**).

Les dimères (G2a), les tétramères (G4a) amphiphiles et les tétramères non amphiphiles (G4na) libres ou associés à ColQ et PRiMA sont les principales sous-unités de la forme T de l'ACHe. L'interférence avec les micelles des détergents, qui influence leur sédimentation dans le gradient de sucrose et leur mobilité électrophorétique dans les gels de polyacrylamide non dénaturants sont les caractéristiques de l'ACHe T amphiphile (**Bon et al., 1991**). Il a été proposé que cette interférence avec les micelles des détergents donne une conformation de la partie T en hélice  $\alpha$  (**Massoulie et al., 1993a**); cette hélice amphiphile pourrait produire une zone hydrophobe avec les séquences aromatiques. Ces sous-unités produisent différentes formes d'oligomères; des simples monomères aux oligomères liés à un collagène ou à une protéine de structure. Ces structures sont amphiphiles mais différentes des formes adhérentes par GPI (glycophosphatidylinositol), par leur solubilité plus élevée dans les milieux aqueux sans détergent et elles ne constituent pas d'agrégats. Elles sont nommées molécules amphiphiles modèle II (**Bon et al., 1988a,b; Massoulie et al., 1993b**). De plus, il y a, aussi, des tétramères et des oligomères générés (**Bon et Massoulie, 1997**). Les tétramères se trouvent sous des structures amphiphiles et non amphiphiles, et diffèrent éventuellement par la disposition des peptides « T ». Dans les structures amphiphiles, la dernière séquence de la zone hydrophobe de la partie T reste libre alors qu'elle peut être prise à l'intérieur de la région hydrophobe dans les structures non amphiphiles. Dans les structures moléculaires avec le collagène ou asymétriques (A), chaque brin de triple hélice de collagène peut être lié à un tétramère de sous-unités AChE type T. Dans la forme A12, chaque brin de collagène est lié à un tétramère catalytique. Lorsque un ou deux de ces brins sont inoccupés, les formes

correspondantes moléculaires sont appelées A4 et A8 respectivement, leur nom indiquant le nombre de sous-unités catalytiques. La structure moléculaire adhérente à la membrane est la forme la plus répandue d'AChE dans le cerveau des mammifères, elle se compose d'une protéine hydrophobe de 20 KDa (**Gennari et al., 1987; Inestrosa et al., 1987**) et montre une disposition similaire grâce aux ponts disulfures (**Roberts et al., 1991**). L'AChE type T se caractérise par la capacité de se lier au ColQ qui adhère les cholinestérases dans la lame basale des jonctions neuromusculaires (**Hall, 1973; Feng et al., 1999**) ou PRiMA qui adhère l'AChE dans la membrane des cellules musculaires ou des neurones (**Gennari et al., 1987; Inestrosa et al., 1987; Perrier et al., 2002**).

Les dimères liés par GPI sont constitués par un pont disulfure avec les cystéines présentes dans les parties *N*-terminales du peptide H, pas loin de la fin du domaine catalytique, les sous-unités d'AChE type T peuvent aussi constituer des dimères. Cependant, les ponts disulfures entre les sous-unités sont constitués par des cystéines situées pas loin de la partie *C*-terminale du peptide T. La constitution de tels dimères est basée sur l'existence de cystéine en aval du domaine catalytique (**Massoulie, 2002**).



**Figure 2.34.** Représentation schématique de l'épissage alternatif de transcrits de l'AChE, des différents types de sous-unités catalytiques et des formes moléculaires matures. Seulement les sous-unités de type T sont communes à toutes les espèces et existent également pour la BChE. Les sous-unités du Type S ont été trouvées exclusivement dans certains serpents d'Elapidae (**Massoulie, 2002**).

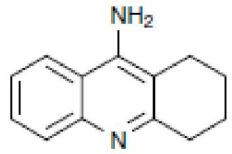
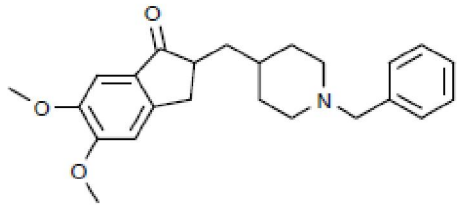
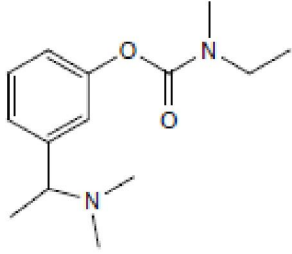
### **2.2.5.9.2. Traitements actuels de la maladie d'Alzheimer basés sur l'inhibition de l'acétylcholinestérase**

L'utilisation des inhibiteurs réversibles de l'AChE (AChEIs) représentent actuellement la principale stratégie de la thérapie symptomatique de la MA. Leur efficacité clinique est liée à leur capacité à inhiber l'AChE, en augmentant l'action de l'ACh, et donc indirectement l'augmentation de la concentration d'ACh est atténuée dans le cerveau avec la MA (**Farlow et Cummings, 2007**). Il reste encore incertain si les bienfaits thérapeutiques de cette classe de composés peuvent s'expliquer entièrement par la disponibilité accrue d'ACh au niveau de la synapse (**Terry et Buccafusco, 2003**). Certes, cette action contribue à l'amélioration de la mémoire et de la cognition, mais d'autres mécanismes peuvent sous-tendre l'efficacité de ces médicaments (**Sortino et al., 2004**). À ce jour, l'hypothèse cholinergique de la MA reste l'une des approches suivies dans la découverte de médicaments, et les AChEIs hautement sélectifs, d'origine naturelle, par exemple les polyphénols (**Queiroz et al., 2014; Choi et al., 2015; Ma et al., 2015; Nag et al., 2015; Somani et al., 2015; Topal et al., 2015**) et les alcaloïdes (**Lam et al., 2015; Li et al., 2015; Ramli et al., 2015**), ainsi que des composés synthétiques (**Trujillo-Ferrara et al., 2003; Feng et al., 2005; Sheng et al., 2005**) sont toujours sous investigations dans le but de développer des composés avec moins d'effets secondaires toxiques (**tableau 2.7**). Les inhibiteurs de l'AChE sont aussi utilisés comme insecticides (**Ye et al., 2014**). En effet, plusieurs travaux indiquent que les monoterpénoides provoquent la mortalité des insectes en inhibant l'AChE (**Houghton et al., 2006**).

Suite à l'introduction dans le marché à la fin des années quatre-vingt d'une première génération des AChEIs, représentés par la physostigmine et la tacrine, une deuxième génération de composés plus appropriés ont été développés dans les années quatre-vingt dix. Trois d'entre eux sont commercialisés: donépézil, rivastigmine et galanthamine et sont couramment utilisés pour traiter les patients souffrant de la MA légère à modérée (**tableau 2.7**). En outre, les médicaments actuels sont plus efficaces sur le plan clinique et produisent des effets secondaires moins graves à des doses efficaces que la tacrine (**Giacobini, 2004**). La physostigmine (un alcaloïde de la fève de Calabar, *Physostigma venenosum* Balf.) est un excellent inhibiteur de l'AChE, mais présente une mauvaise absorption intestinale chez les humains. Pour cette raison, des analogues tels que la rivastigmine et plus récemment, la phenserine ont été introduits. La phenserine, inhibiteur puissant et hautement sélectif de l'AChE est actuellement en cours d'essais cliniques (**Greig et al., 2000**). La donépézil a également une activité antagoniste sur les récepteurs cholinergiques muscariniques et NMDA



Tableau 2.7. Inhibiteurs de l'AChE découverts en vue de traiter la MA.

Molécules	Structures	Mécanismes d'action	Indications	Années	Références
<b>Tacrine (Cognex©)</b>		Inhibiteur sélectif, rapidement réversible.	Le premier médicament spécifiquement commercialisé pour le traitement des déficits cognitifs de la MA.	1993	<b>Davis et Powchik, 1995</b>
<b>Donépézil (Aricept®)</b>		Inhibiteur sélectif, rapidement réversible, protège les neurones de rat contre l'apoptose induite par un dysfonctionnement du glutamate.	L'un des médicaments les plus utilisés pour le traitement des stades précoces et/ou modéré de la MA	1996	<b>Giacobini, 2000; Takada-Takatori et al., 2006</b>
<b>Rivastigmine (Exelon©)</b>		Inhibiteur lentement réversible de l'AChE et de la BChE	Traitement des formes légères à modérées de la MA.	2000	<b>Liang et Tang, 2004</b>

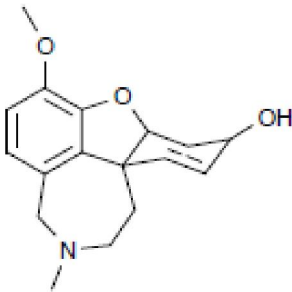
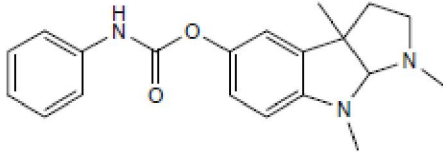
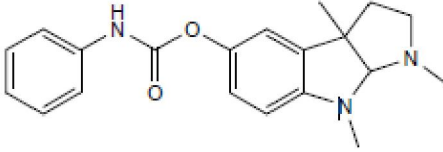
<p><b>Galanthamine</b> (Razadyne©, Reminyl©)</p>		<p>Inhibiteur sélectif, rapidement réversible. Modulateur de récepteurs nicotiniques cholinergiques. Protège les neurones de rat contre l'apoptose induite par un dysfonctionnement du glutamate.</p>	<p>Traitement des formes légères à modérées de la MA. Amélioration de l'attention et de la mémoire.</p>	<p>2001</p>	<p><b>Bai <i>et al.</i>, 2000;</b> <b>Caramelli <i>et al.</i>, 2004;</b> <b>Takada-Takatori <i>et al.</i>, 2006</b></p>
<p><b>Huperzine A</b></p>		<p>Inhibiteur réversible, puissant et sélectif avec un index thérapeutique mieux que la physostigmine et la tacrine.</p>	<p>Effets neuroprotecteurs multiples sur plusieurs sites moléculaires (transformation d'APP; neurotoxicité associée au Aβ; NGF; systèmes de neurotransmission).</p>	<p>En essais cliniques: phase IV en Chine, phase II aux états unies d'Amérique.</p>	<p><b>Bai <i>et al.</i>, 2000; Zhang et Tang, 2006</b></p>
<p><b>Phenserine</b></p>		<p>Inhibiteur puissant et sélective de l'AChE</p>	<p>Longue durée d'action. Réduction de la fréquence de dose. Diminution de l'exposition aux médicaments du corps et minimise la dépendance de l'action du médicament.</p>	<p>En essais clinique: phase II.</p>	<p><b>Al-Jafari <i>et al.</i>, 1998;</b> <b>Greig <i>et al.</i>, 2000</b></p>

Tableau 2.7 suite.

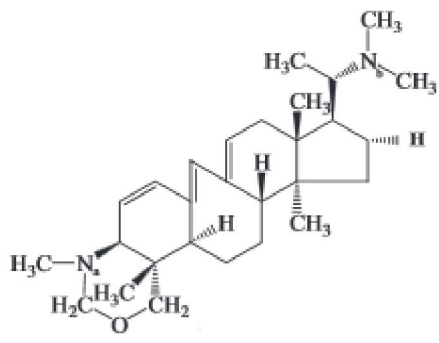
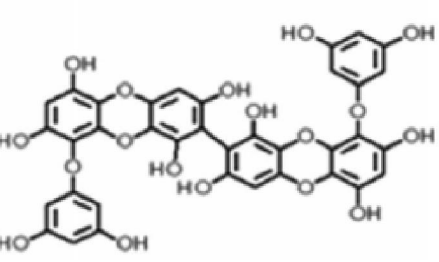
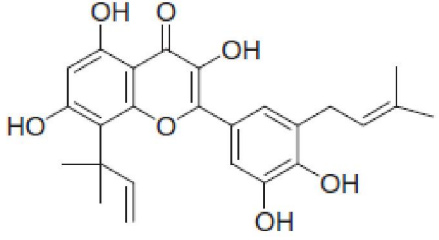
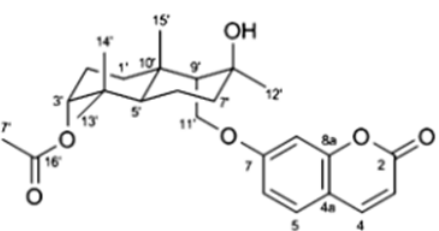
<p><b>Macowanitriene</b></p>		<p>-</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>Lam <i>et al.</i>, 2015</p>
<p><b>8,8'-Bieckol</b></p>		<p>-</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>Choi <i>et al.</i>, 2015</p>
<p><b>8-(1,1-Dimethylallyl)-50-(3-methylbut-2-enyl)-30,40,5,7-tetrahydroxyflavonol</b></p>		<p>Inhibiteur mixte de l'AChE et de la BChE</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>Ryu <i>et al.</i>, 2012</p>
<p><b>Kellerine</b></p>		<p>-</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>Adhami <i>et al.</i>, 2014</p>

Tableau 2.7 suite.

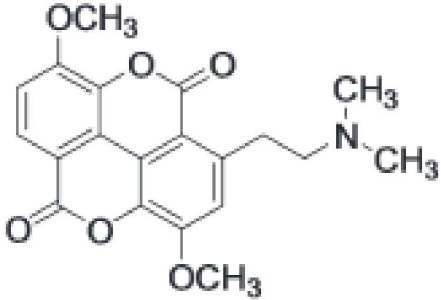
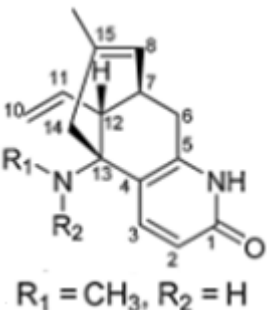
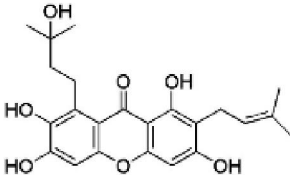
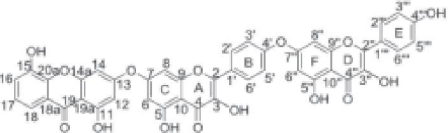
Taspine		-	-	-	Queiroz <i>et al.</i> , 2014
N-demethylhuperzine	 <p><math>R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}</math></p>	-	-	-	Zhang <i>et al.</i> , 2014
Garcinone C		Inhibiteur sélective de l'AChE	-	-	Khaw <i>et al.</i> , 2014
Garcineflavonol A		Inhibiteur sélective de l'AChE	-	-	Tan <i>et al.</i> , 2014

Tableau 2.7 suite.

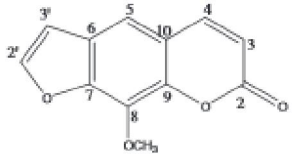
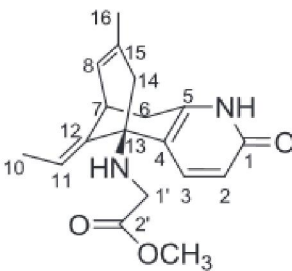
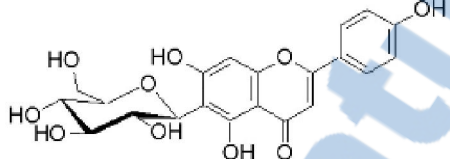
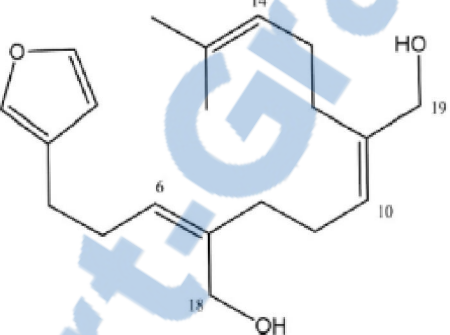
Xanthotoxine		-	-	-	Ben Salem <i>et al.</i> , 2013
Huperserine E		-	-	-	Jiang <i>et al.</i> , 2014
Isovitexine		-	-	-	Choi <i>et al.</i> , 2014
Conyopodiol		-	-	-	Khan <i>et al.</i> , 2010

Tableau 2.7 suite.

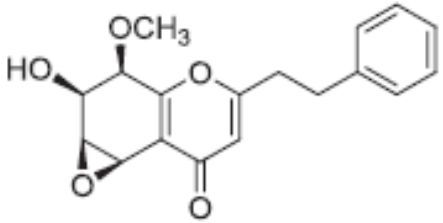
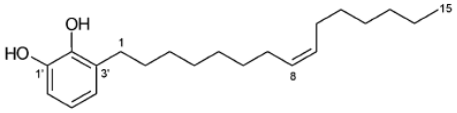
<p><b>5,6-Epoxy-7β-hydroxy-8β-methoxy-2-(2-phenylethyl) chromone</b></p>		-	-	-	<p><b>Li <i>et al.</i>, 2014</b></p>
<p><b>1',2'-dihydroxy-3'-pentadec-8-enylbenzene A</b></p>		<p>Inhibiteur sélective de l'AChE</p>	-	-	<p><b>Adhami <i>et al.</i>, 2012</b></p>

Tableau 2.7 suite.

et une interaction supposée avec un site allostérique sur les récepteurs nicotiniques (Sortino *et al.*, 2004). La galanthamine, un alcaloïde tertiaire isolé à partir de plantes de la famille Amaryllidaceae tels que la perce-neige (*Galanthus nivalis* L.) ou flocon de neige de printemps (*Leucojum vernum* L.), est moins puissant mais moins toxique que la tacrine. Ce composé est un inhibiteur compétitif et réversible. C'est l'AChEI le plus récemment approuvé à être utilisé pour le traitement de la MA et il a été démontré qu'il produit une amélioration significative des performances cognitives chez les patients souffrant de la MA (Caramelli *et al.*, 2004; Grossberg *et al.*, 2006; Takada-Takatori *et al.*, 2006). L'huperzine A, un nouvel alcaloïde isolé de la plante chinoise *Huperzia serrata* Thunb. (Lycopodiaceae), actuellement en essais cliniques aux Etats-Unis et au Chine, est un inhibiteur bien toléré, réversible, puissant et sélectif de l'AChE, des propriétés qui peuvent être particulièrement favorables pour le traitement de la MA (tableau 2.7) (Bai *et al.*, 2000). En plus de son activité inhibitrice de l'AChE, Tang *et al.* (2005) ont montré que l'huperzine A améliore l'expression et la sécrétion de NGF (*nerve growth factor*) *in vitro*, ce qui pourrait être bénéfique dans le traitement de la MA. En outre, des travaux récents ont montré que l'huperzine A a de nouveaux effets neuroprotecteurs sur la transformation de l'APP, qui est associée à la neurotoxicité (Wang *et al.*, 2001), et les systèmes de neurotransmission (Zhang et Tang, 2006).

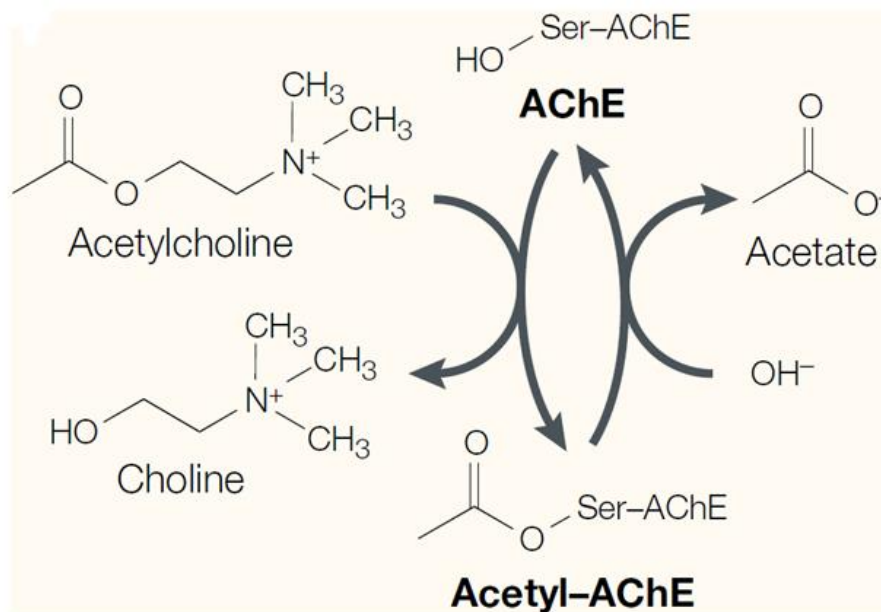
Comme mentionné ci-dessus, en plus de la perte de neurones cholinergiques, des niveaux réduits de récepteurs neuronaux nicotiniques de l'ACh (nAChR), impliqués dans les fonctions cognitives et la mémoire, ont également été observés dans le cerveau des patients souffrant de la MA et le traitement avec des médicaments cholinergiques a été suggéré d'améliorer la cognition par la stimulation des nAChR (Nordberg, 2001). Par conséquent, le développement de nouveaux agonistes de nAChR semble une stratégie thérapeutique intéressante pour la MA.

### 2.2.5.9.3. Méthodes de détection des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

La plupart des médicaments existants disponibles dans le commerce pour le traitement de la MA sont des AChEIs, mais ils possèdent encore quelques effets secondaires. Afin de trouver de nouveaux inhibiteurs, il est nécessaire de disposer d'outils de criblage appropriés disponibles. Les tests *in vitro* développés pour cet usage doivent être simples et rapides, de sorte que le test peut être réalisé avec un minimum d'effort possible. Certains de ces tests ont également été développés afin de quantifier l'AChE dans les tissus ou d'étudier des agents anticholinergiques pour utilisation comme insecticides.

➤ Tests basés sur le réactif de DTNB

Afin de comprendre les différentes approches utilisées, il est intéressant de rappeler la réaction catalysée par l'AChE (**figure 2.35**).



**Figure 2.35.** Réaction de l'hydrolyse de l'ACh par l'AChE (Soreq et Seidman, 2001).

- Réaction colorimétrique d'Ellman

Un certain nombre de tests colorimétriques développés jusqu'à présent sont basés sur la méthode d'Ellman (**figure 2.36**). L'acétylthiocholine (ATCh) est clivée par l'AChE pour former la thiocholine, qui à son tour réagit avec le 5,5'-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB) pour donner le jaune 5-thio-2-nitrobenzoate anion qui absorbe à 412 nm (**Ellman et al., 1961**).

La méthode d'Ellman a été adaptée à plusieurs reprises pour essais de microplaques à 96 puits. En général, les mesures sont effectuées en suivant la cinétique de la réaction enzymatique, et ce paramètre a été adapté aux différents protocoles décrits. La différence principale entre l'ensemble de ces essais est la durée de réaction. L'absorbance à 405 nm est enregistrée toutes les 13 s, soit cinq fois avant d'ajouter l'enzyme et après huit fois, de sorte que la correction pour l'hydrolyse spontanée du substrat pourrait être faite (**Ingkaninan et al., 2000**). La cinétique de la réaction a également été suivie avec une lecture toutes les 5 s à 2 min après l'addition de l'enzyme (**Ingkaninan et al., 2003**). La longueur d'onde utilisée pour



les essais peut varier légèrement d'une méthode à l'autre. L'augmentation de l'absorbance a donc été suivie à 412 nm pendant 3 min à la température ambiante (Brühlmann *et al.*, 2004). La réaction peut aussi être démarrée par l'addition des deux réactifs; dans ce cas, les mesures ont été effectuées à 450 nm avec une lecture toutes les 2 min pendant 10 min (Kim *et al.*, 2004). Enfin, un microdosage a été développé en utilisant une lecture au point final; la réaction est démarrée par l'addition des réactifs, 7 minutes après l'ajout de l'enzyme. La mesure a été effectuée à 414 nm après 10 min de réaction (Hammond et Forster, 1989).

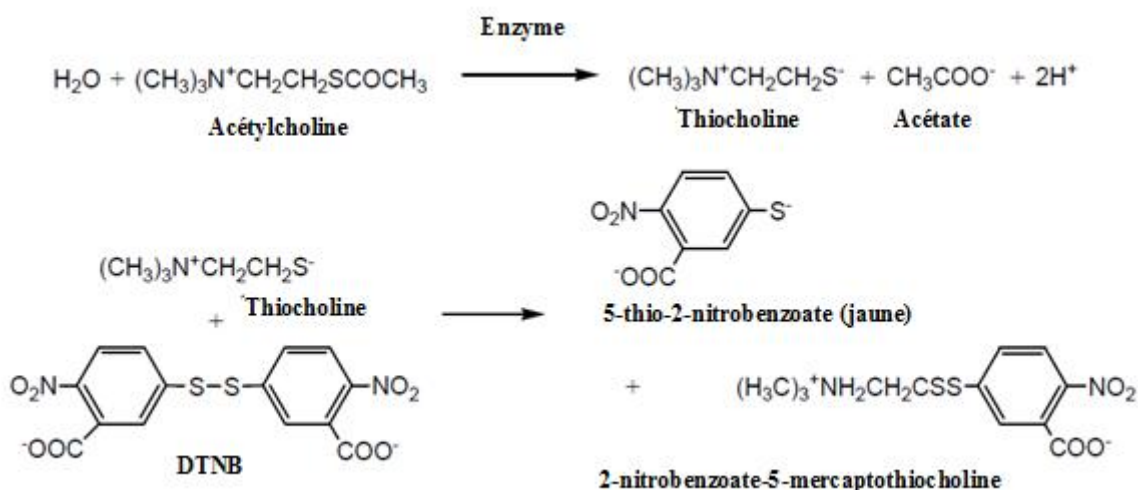


Figure 2.36. Réaction d'Ellman (Ellman *et al.*, 1961).

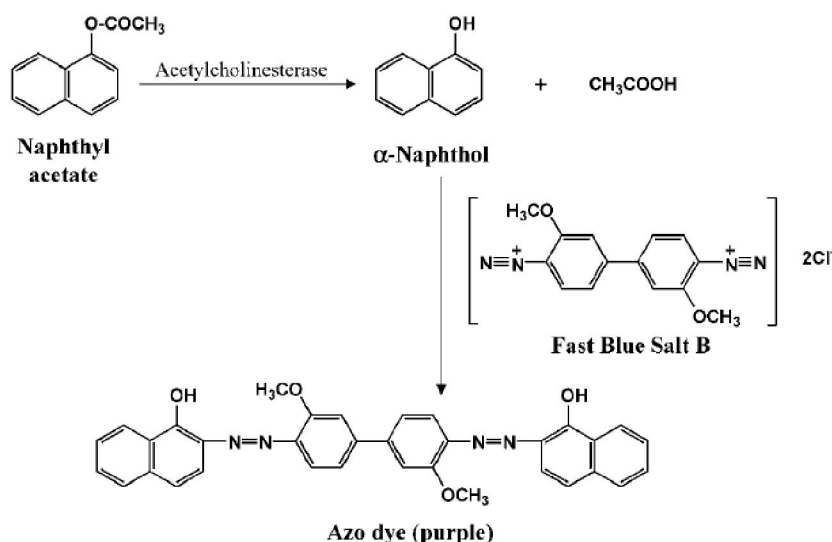
- **Test de bioautographie**

L'avantage des tests effectués sur la chromatographie sur couche mince (CCM), est qu'ils fournissent des méthodes extrêmement rapides et moins coûteuses pour cribler un grand nombre d'échantillons complexes comme des extraits de plantes. La réaction d'Ellman a été adaptée pour la CCM. Après le développement de la plaque, un mélange de DTNB et d'ATChI (acétylthiocholine iodade) est pulvérisé jusqu'à la saturation de la silice avec le solvant, puis la solution enzymatique est appliquée. Une coloration jaune se développe après environ 5 min à travers la plaque; les composés inhibiteurs apparaissent sous forme de taches blanches (Kiely *et al.*, 1991). Cependant, ce procédé est connu pour donner un certain nombre de faux-positifs. Afin de prouver que les taches observées sont dues à une inhibition de l'enzyme, et non pas à une réaction chimique entre le DTNB et thiocholine, la plaque CCM est pulvérisée avec une solution de DTNB, et ensuite avec la thiocholine obtenue par pré-mélange de l'ACHé avec l'ATChI. Les taches blanches observées sont comparées à celles

enregistrées pour l'inhibition de l'enzyme (Rhee *et al.*, 2003). L'analyse par CCM est plus sensible que les essais par microplaques et elle est très utile comme procédé pour détecter les AChEIs qualitativement. Les substances actives connues peuvent être reconnues à un stade précoce, et le solvant utilisé pour dissoudre les échantillons avant le test n'a pas d'influence sur l'activité enzymatique (Rhee *et al.*, 2001). D'autre part, les essais de microplaques peuvent donner des résultats quantitatifs tels que les valeurs d'IC<sub>50</sub>.

➤ **Test basé sur le sel de Fast Blue B**

Afin d'améliorer la détection des AChEIs sur les plaques de CCM, un autre essai biologique colorimétrique a été développé. Il est basé sur la réaction entre le 1 ou le 2-naphtol, obtenu par le clivage du 1 ou 2-naphtyle acétate par l'AChE, et le sel de Fast Blue B pour former un colorant violet (**figure 2.37**). La plaque est développée dans un système de solvant contenant ou pas le substrat, ensuite la plaque est pulvérisée par la solution d'enzyme et incubée pendant 10 ou 30 min à 37 °C dans une atmosphère humide; puis elle est pulvérisée par la solution de réactif. Les taches d'inhibition apparaissent blanches après 1 à 3 min sur un fond violet (Weins et Jork, 1996; Mroczek, 2009). Ce test a également été réalisé par pulvérisation des réactifs sur la plaque avec la même séquence et le même résultat. L'inhibition est plus facile à voir avec ces méthodes étant donné que le contraste du fond de la plaque est plus fort que lors de l'utilisation de la réaction d'Ellman (Marston *et al.*, 2002).



**Figure 2.37.** La réaction de l'AChE avec le 1-naphtyle acétate et la formation subséquente d'un colorant violet (Marston *et al.*, 2002).

### ➤ Autres procédés de détection

#### • Essais par HPLC

La méthode d'Ellman a également été adaptée pour la détection biochimique en ligne de l'AChEI après chromatographie liquide à haute performance (HPLC). La détection est réalisée en parallèle avec l'ultraviolet (UV) et la spectrométrie de masse (MS) comme détecteur. Après l'HPLC, l'effluent est divisé entre l'UV (94 %), la MS (3 %) et la détection biochimique (3 %). La dernière partie est réalisée en ajoutant le DTNB et l'AChE à l'effluent, puis après le substrat l'ATCh. Le mélange passe ensuite dans une bobine de réaction pendant environ 2 min. Comme les réactifs sont mélangés en continu, le 5-thio-2-nitrobenzoate (absorbance à 405 nm) est toujours détecté. La présence d'un inhibiteur dans le système se traduit par un pic négatif. Bien que cette méthode ait fourni un bon moyen d'identifier rapidement de nouveaux AChEIs en donnant directement les données UV et MS, elle a été limitée par la quantité de solvants organiques qui peuvent être utilisés sans trop avoir un effet sur l'activité enzymatique. Le méthanol est choisi, car il est relativement bien toléré par l'AChE; jusqu'à 40 % de méthanol n'affecte pas la réaction, mais les méthodes de gradient ne sont pas appropriées, comme la variation de la concentration en solvant organique bouleverse la ligne de base de la détection biochimique. La limite de détection pour la galanthamine par cette méthode est de 0,3 nmol (**Ingkaninan *et al.*, 2000**). A titre de comparaison, la limite de détection dans les tests de microplaques et CCM sont de l'ordre de 0,25 et 0,0375 nmol respectivement (**Rhee *et al.*, 2001**).

#### • Essais basés sur la méthode de photoluminescence

Un matériel de silicone poreux *p*-type immobilisant l'AChE pour la détection des AChEIs a été démontré. L'enzyme immobilisée lors de l'incubation avec les inhibiteurs standards de l'AChE (néostigmine méthyle sulfate et la tacrine) pendant 30 minutes à 37 °C provoque une photoluminescence avec une intensité améliorée jusqu'à trois fois avec un déplacement hypsochromique de 3 nm. Le changement brusque de la photoluminescence de la surface de l'enzyme immobilisée par réaction avec l'inhibiteur de l'enzyme peut être utilisé comme un outil pour la détection des AChEIs, en utilisant la réponse de photoluminescence par incubation avec l'inhibiteur correspondant (**Saleem *et al.*, 2014**).

- **Essais basés sur des méthodes fluorimétriques**

Un certain nombre d'essais fluorimétriques ont été développés pour mesurer l'activité de l'AChE. La fluorimétrie est plus spécifique et sensible que la colorimétrie; cela peut être un avantage, en particulier lorsqu'on travaille avec des extraits de plantes qui contiennent généralement de nombreux composés. Le substrat peut devenir fluorescent par lui-même après clivage par l'enzyme, ou réagir avec un autre composé pour donner fluorescence. Dans le premier cas, il y a moins de risque d'avoir de faux positifs, qui pourraient se produire en raison d'interférence de l'extrait de plante avec la réaction entre le produit de l'AChE et le colorant fluorescent. Le résorufine butyrate et l'indoxyle acétate sont deux composés non fluorescents qui, une fois hydrolysés par la cholinestérase, deviennent hautement fluorescents (resorufine et 3-hydroxy-indole, respectivement). Le taux d'hydrolyse de l'indoxyle acétate est beaucoup plus rapide que celui de resorufine butyrate; il possède également une plus grande stabilité à l'hydrolyse spontanée ainsi qu'une plus grande différence entre les longueurs d'onde d'excitation et d'émission, ce qui réduit les interférences. D'autre part, la resorufine a une plus grande fluorescence, ce qui permet de réaliser des dosages à des faibles concentrations de substrat. La sensibilité du test est environ la même avec les deux types de substrat (**Guilbault et Kramer, 1965**).

Le 2-naphtyle acétate a également été utilisé pour la détermination directe de l'activité de l'AChE, par le biais de son produit fluorescent, le 2-naphtol. La concentration du pesticide organophosphoré fenitrothione a été déterminée par ce substrat, ainsi que par l'indoxyle acétate (**Navas Diaz et al., 1997**).

Cependant, certaines réactions utilisent des produits dérivés pour détecter l'activité enzymatique. La formation de thiocholine peut être suivie par une réaction supplémentaire avec le composé fluorogène *N*-(4-(7 diethylamino-4-methyl-coumarin-3-yl)phenyl)maleimide, pour donner un produit fluorescent intense, fournissant par cette voie une méthode très sensible (**Parvari et al., 1983**). Un autre essai utilise cette réaction; la solution d'inhibiteur, l'enzyme, le substrat et un agent de dérivation, ils sont mélangés dans les canaux d'une micropuce utilisant un contrôle de transport électrocinétique. Le thioéther résultant est détecté par fluorescence induite par laser. Les inhibiteurs produisent un pic négatif (**Hadd et al., 1999**). Un autre dosage fluorimétrique est basé sur l'ajout du thiocholine résultant de l'hydrolyse de l'ATCh par l'AChE à un composé appelé cétone  $\alpha,\beta$ -insaturé, le composé formé produit une forte fluorescence et un changement dans

l'absorption. En présence d'inhibiteur, le renforcement de la fluorescence ou la variation d'absorption serait inhibé par le fait que la formation du thiocholine a été freinée (**Wang et al., 2014**).

- **Essais basés sur la méthode radiométrique**

L'activité de l'AChE et l'effet des inhibiteurs ont également été mis en évidence par radiométrie. La vitesse d'hydrolyse de [ $^{14}\text{C}$ ]ACh en [ $^{14}\text{C}$ ]acide acétique a été mesurée par la quantification de l'acide. Ceci a été réalisé après extraction par réaction avec du [ $^{14}\text{C}$ ] bicarbonate de sodium pour donner [ $^{14}\text{C}$ ] dioxyde de carbone. Cette dernière a été mesurée en utilisant un système de chambre d'ionisation. Le [ $^{14}\text{C}$ ] dioxyde de carbone produit est proportionnelle à la quantité de l'ACh hydrolysé (**Guilarte et al., 1983**).

- **Essais basés sur la détection par la spectrométrie de masse**

Donnant une grande sensibilité et spécificité de la spectrométrie de masse (MS), cette méthode a naturellement été utilisée pour la détection des AChEIs. Elle permet de quantifier la réaction de l'AChE avec l'ACh en mesurant la quantité produite de choline et la quantité disparue du substrat. Un essai a utilisé la MS avec ionisation par électropulvérisation (ESI) pour la détection de ces deux composés. Après séparation par HPLC, l'enzyme a été ajoutée à l'effluent, suivi par le substrat. Les valeurs de l'IC<sub>50</sub> déterminées par ce procédé sont comparables à celles rapportées dans la littérature. Toutefois, certains composés tels que l'huperzine A, s'avèrent être moins actifs. Cela a été expliqué par un temps trop court de séjour dans les bobines de réaction, et l'interaction entre l'AChE avec le composé inhibiteur est donc insuffisante (**de Jong et al., 2006**).

La MS utilisant la technique désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) avec un analyseur à temps de vol (TOF) a également été mise au point pour cribler les AChEIs en détectant le substrat et le produit natif de l'enzyme. Un mélange est préparé avec l'AChE, le composé candidat et l'ACh, puis incubé à 30 °C pendant 30 min avant l'addition d'acétonitrile pour arrêter la réaction. Il est ensuite déposé sur une matrice constituée d'une couche de nanotubes de carbone avant de poursuivre l'analyse MS (**Hu et al., 2006**). Une méthode de Désorption/ionisation sur silicium poreux (DIOS) couplée à un TOF-MS a été comparée à la chromatographie liquide-spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). La réaction enzymatique est effectuée dans un milieu tamponné et incubée à 37 °C. La réaction est arrêtée après 30 min par l'addition de l'acétonitrile contenant de la choline-*d*<sub>9</sub> comme

étalon interne. La solution est ensuite repérée sur la puce DIOS ou diluée 10 fois avant HPLC-MS/MS. Afin de trouver les valeurs de l'IC<sub>50</sub>, la concentration de choline est tracée contre la concentration de l'inhibiteur. La méthode DIOS est quantitative grâce à la présence de l'étalon interne, et les IC<sub>50</sub> sont comparables à celles obtenues avec LC-MS/MS. Cette dernière donne lieu à une gamme dynamique linéaire large. Les deux méthodes peuvent être utilisées pour la quantification rapide et spécifique de l'activité inhibitrice de l'enzyme (**Wall et al., 2004**).

- **Essais basés sur l'enzyme immobilisée**

Une autre approche pour tester l'activité de l'AChE a été développée, elle consiste à immobiliser l'enzyme sur un support solide. Le principal avantage de ce procédé est d'éviter la perte d'activité qui se produit avec l'enzyme à des dilutions élevées. Toutes les méthodes de détection considérées précédemment et d'autres peuvent être effectuées avec l'enzyme immobilisée; elle peut également être utilisée après un procédé de séparation. Un essai a été développé en utilisant la chromatographie liquide en phase inverse dans un système isocratique pour séparer les composés. Les réactifs (1-naphtyle acétate et *p*-nitrobenzenediazonium fluoroborate ou sel de Fast rouge GG) sont ajoutés à l'éluant et l'activité de l'AChE immobilisée sur du verre poreux dans une mini-colonne est contrôlée par détection spectrophotométrique à 500 nm (**Leon-Gonzalez et Townshend, 1991**). Une autre phase stationnaire avec l'AChE immobilisée est préparée dans une colonne en acier inoxydable remplie avec l'époxyde de silice. L'activité de l'enzyme est testée en injectant l'ATCh avec une phase mobile contenant du DTNB, et en mesurant l'absorbance à 412 nm. Les solutions d'échantillons avec l'ATCh sont préparées ensuite et injectées dans le système. Les aires des pics sont comparées à celles obtenues en l'absence d'inhibiteur et le pourcentage d'inhibition en est déduit. La stabilité de l'enzyme est augmentée et l'automatisation du système permet d'analyser un grand nombre de composés en continu (**Andrisano et al., 2001**).

Afin de travailler avec l'AChE humaine recombinante, la quantité d'enzyme utilisée doit être diminuée pour abaisser le coût de la méthode. L'AChE peut être immobilisée de manière covalente sur un milieu d'interaction convectif d'éthylènediamine monolithique préalablement dérivé avec du glutaraldéhyde afin de fournir un réacteur d'enzyme monolithique micro-immobilisé (IMER). L'IMER est approprié pour un système HPLC. La détection est alors la même que celle décrite par **Andrisano et al. (2001)**. Cette méthode

assure l'activité d'une petite quantité d'enzyme, permet de réaliser des études cinétiques et peut être utilisée pour le criblage large de médicaments candidats (Bartolini *et al.*, 2005). Les deux méthodes décrites précédemment ont été comparées. La liaison de la base de Schiff obtenue avec l'IMER donne des réacteurs plus stables qu'avec des groupes époxy, sans aucun changement significatif dans le comportement de l'enzyme. Ces deux types de matrices ont montré très peu de temps de conditionnement et une récupération rapide de l'activité enzymatique. Le disque monolithique semble être le meilleur pour satisfaire aux exigences générales pour une analyse rapide et reproductible (Bartolini *et al.*, 2005).

Un système d'injection de flux utilisant l'enzyme immobilisée sur des particules magnétiques a également été décrit. Une quantité connue de l'AChE est incubée avec la solution d'échantillon, l'activité résiduelle est inversement proportionnelle à la quantité d'inhibiteur. Les mesures sont effectuées soit par la méthode d'Ellman ou par détection électrochimique avec un réacteur enzymatique supplémentaire contenant de la choline-oxydase immobilisée (Kindervater *et al.*, 1990).

- **Essais par UPLC**

La chromatographie liquide ultra performance rapide, sélective et sensible combinée à la MS en tandem avec ESI a été développée et utilisée pour la détection de l'inhibition de l'AChE et de la BChE en déterminant directement le produit commun, la choline. Une séparation adéquate est atteinte pour la choline et le chlorméquat (étalon interne) à moins de 1,2 min par élution isocratique (acide formique 0,1 % : méthanol (98 : 2)) sur une colonne HSS (*High Strength Silica*) T3 après une simple précipitation des protéines pour le traitement de l'échantillon. La méthode présente les avantages suivants: un petit volume de réaction total (100  $\mu\text{L}$ ), analyse en temps court (1,2 min), haute sensibilité (la limite de quantification est de 0,036  $\mu\text{M}$  pour la choline), et un faible coût (petites quantités d'enzymes consommées, 0,0035 et 0,008 unité  $\text{mL}^{-1}$  pour l'AChE et la BChE respectivement, et les substrats 5,505 et 7,152  $\mu\text{M}$  pour l'ACh et la BCh, respectivement en tests individuels). La méthode développée a été appliquée avec succès pour détecter les activités inhibitrices de l'AChE et la BChE pour des médicaments modèles, y compris la galanthamine, la tacrine, la néostigmine méthyle sulfate, l'ésérine, ainsi que la  $\beta$ -carboline et les alcaloïdes quinazoliques de *Peganum harmala* L. (Liu *et al.*, 2014).

# Partie expérimentale



### 3.1. Matériel végétal et extraction

Les plantes étudiées dans ce travail appartiennent aux familles Anacardiaceae et Boraginaceae et ont été récoltées dans deux sites différents. Le **tableau 3.1** montre l'origine et la date de récolte des différentes plantes. L'identification botanique a été faite par Prof. Abderrazak MAROUF (Centre Universitaire Salhi Ahmed, Naama, Algérie).

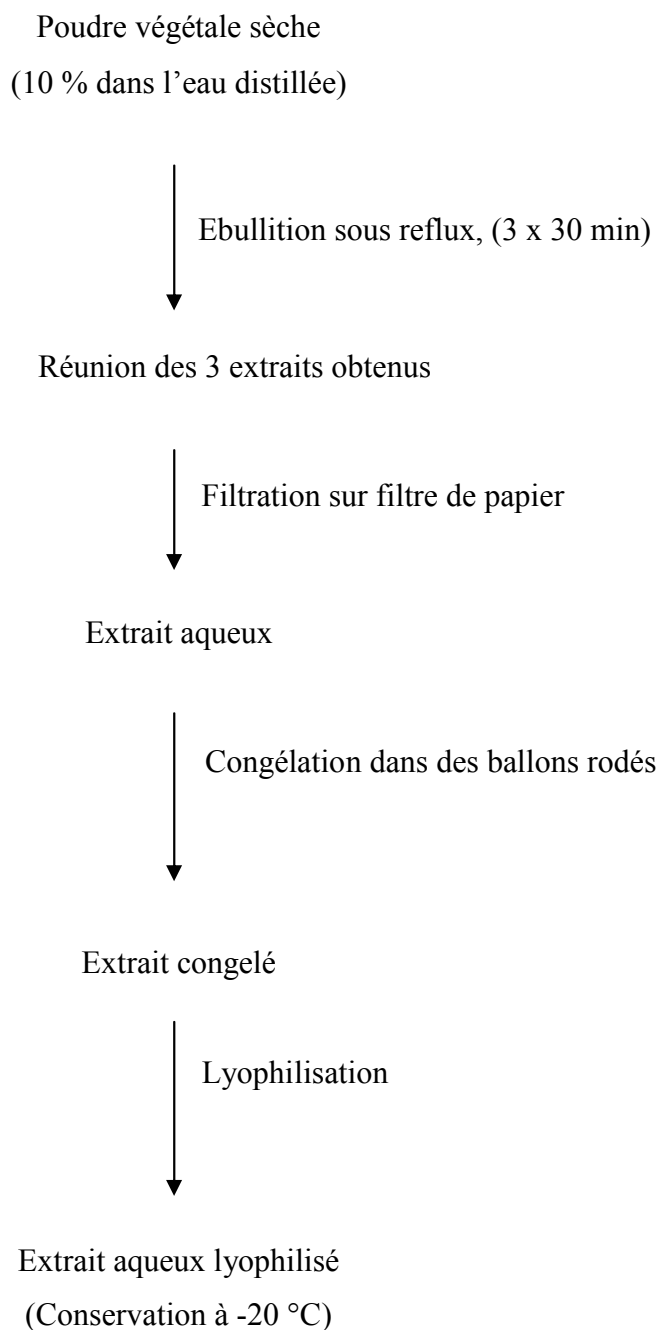
**Tableau 3.1.** Matériel végétale utilisé dans le présent travail.

Nom botanique	Organe	Lieu de récolte	Date de récolte
<i>Pistacia atlantica</i> Desf.	Feuilles	Ain Benkhelil (Naama)	Avril 2011
<i>Solenanthus lanatus</i> A.DC.	Plante entière	Tamzoura (Ain Temouchent)	Février 2014
<i>Echium confusum</i> de Coincy	Plante entière	Tamzoura (Ain Temouchent)	Mai 2014

Après la récolte, le matériel végétal a été séché à 30 °C dans une chambre bien aérée. Le matériel végétal a été ensuite broyé en poudre fine à l'aide d'un broyeur à couteau. Ainsi, la poudre fine présentera une plus grande surface de contact avec le solvant extracteur, ce qui permettra d'améliorer le rendement d'extraction. Les poudres de plantes sont, ensuite, conservées dans des flacons à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation. Toutes ces opérations permettent de pallier à la dégradation de certains constituants et contribuent à l'inhibition de toutes activités enzymatiques responsables de leur dénaturation. Tous les essais qui suivent ont porté sur du matériel séché à l'air libre.

Deux méthodes d'extraction ont été utilisées, extraction sous reflux (**figure 3.1**) et extraction par macération. La première méthode concerne *P. atlantica* et consiste à porter l'échantillon (10 % de poudre broyée) à ébullition sous reflux en utilisant l'eau distillée pendant 30 min avec trois extractions successives. Cette technique permet d'extraire les composés chimiques les plus polaires présents dans la plante étudiée. Les trois extraits obtenus sont filtrés à l'aide du filtre de papier, réunis, et répartis dans des ballons rodés avant d'être congelés. Les extraits sont ensuite lyophilisés à l'aide d'un lyophilisateur (Virtis) jusqu'à dessiccation complète. La deuxième méthode concerne *S. lanatus* et *E. confusum* et consiste à mettre le matériel végétal (2 Kg) en contact avec l'éthanol 95 % à la température du laboratoire. Le volume de solvant utilisé doit être approprié à la quantité de matière végétale, dans notre travail il est de 12 L soit un rapport de 6 %. L'extraction est effectuée trois fois durant 24 heures avec une agitation occasionnelle. Après filtration et évaporation du solvant à

40 °C par un évaporateur rotatif (Buchi Rotavapor), on obtient un extrait brut éthanolique. Les échantillons sont conservés à -20 °C.



**Figure 3.1.** Schéma de l'extraction sous reflux.

### **3.2. Méthodes chromatographiques analytiques**

#### **3.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)**

Le criblage phytochimique pour *P. atlantica*, *S. lanatus* et *E. confusum* a été réalisé sur des plaques CCM commerciales composées d'un support en aluminium sur lequel a été étalée une fine couche de silice (Silicagel 60) avec un indicateur de fluorescence F<sub>254</sub> comme phase stationnaire (Merck). Les échantillons ont été déposés sous forme de trait d'un centimètre à une quantité de 250 µg pour les extraits bruts et 100 µg pour les produits purifiés à 1,5 cm du bout de la plaque. La plaque CCM est développée dans des cuves en verre (Camag), dont l'atmosphère aura préalablement été saturée en vapeurs de la phase mobile (30 à 60 min). La phase mobile est un mélange binaire ou ternaire ou quaternaire de solvants, adaptée au type de séparation ou classe phytochimique recherchée. Les systèmes de solvants employés pour le criblage phytochimique sont représentés dans le **tableau 3.2**.

Les analyses par CCM ont été aussi conduites pour la recherche des phases mobiles qui seront utilisées pour l'isolement et la purification des produits à partir des extraits bruts de *P. atlantica*, *S. lanatus* et *E. confusum* sur colonne ou CCM préparative. Dans ce cas en plus de la phase stationnaire citée ci-dessous, une fine couche d'un milieu de sorption la silice (Silicagel 60) modifiée chimiquement par greffage de résidus octadécyls (C-18 ou RP18) sur les groupes silanols (phase inverse) avec un indicateur de fluorescence F<sub>254</sub> a été utilisée comme phase stationnaire (Merck). Ce type de plaque est développé uniquement par un système de solvants binaires MeOH-H<sub>2</sub>O dans notre travail.

Les plaques CCM sont pulvérisées par des révélateurs spécifiques pour chaque classe phytochimique recherchée ou universels dans le cas des étapes de purification pour vérifier la pureté des produits purifiés (par exemple le Godin). Une liste de révélateurs utilisés dans notre travail est présentée dans le **tableau 3.3**.

Les observations des plaques CCM se réalisent dans un premier temps avant révélation à 254 et 365 nm à l'aide de lampes UV. Ensuite, après révélation au visible et/ou à 365 nm.

**Tableau 3.2.** Phases mobiles pour CCM utilisées pour le criblage phytochimique de *P. atlantica*, *S. lanatus* et *E. confusum* (Wagner et Blatt, 1996; Wagner *et al.*, 2011).

Phases mobiles	Proportions	Classes phytochimiques ciblées
Toluene-HCOOH	99 : 01 (N° 11)	Dérivés anthracéniques, naphtoquinones, flavonoïdes
Toluene-EtO <sub>2</sub>	01 : 01, 10 % AcOH (N° 10)	Coumarines
AcOEt-HCOOH-AcOH-H <sub>2</sub> O	100 : 11 : 11 : 26 (N° 1)	Flavonoïdes, coumarines, naphtoquinones, dérivés anthracéniques, acides phénoliques
AcOEt-MeOH-H <sub>2</sub> O	100 : 13,5 : 10 (N° 2)	Alcaloïdes, dérivés anthracéniques, glycosides cardiotoniques, coumarines, flavonoïdes, naphtoquinones, acides phénoliques
CHCl <sub>3</sub> -MeOH-H <sub>2</sub> O	60 : 40 : 04 (N° 3)	Terpénoïdes, sesquiterpènes lactones
CHCl <sub>3</sub> -MeOH-H <sub>2</sub> O	65 : 35 : 10 φ↓ (N° 4)	Saponines
CHCl <sub>3</sub> -MeOH-H <sub>2</sub> O	70 : 30 : 04 (N° 5)	Lignanes, terpénoïdes
n-BuOH-AcOH-H <sub>2</sub> O	60 : 15 : 25 (N° 7)	Tanins
Toluene-AcOEt-DEA	70 : 20 : 10 (N° 6)	Alcaloïdes
DCM-MeOH-NH <sub>4</sub> OH	64 : 16 : 02 (N° 8)	
CHCl <sub>3</sub>	100 % (N° 9)	Sesquiterpènes lactones

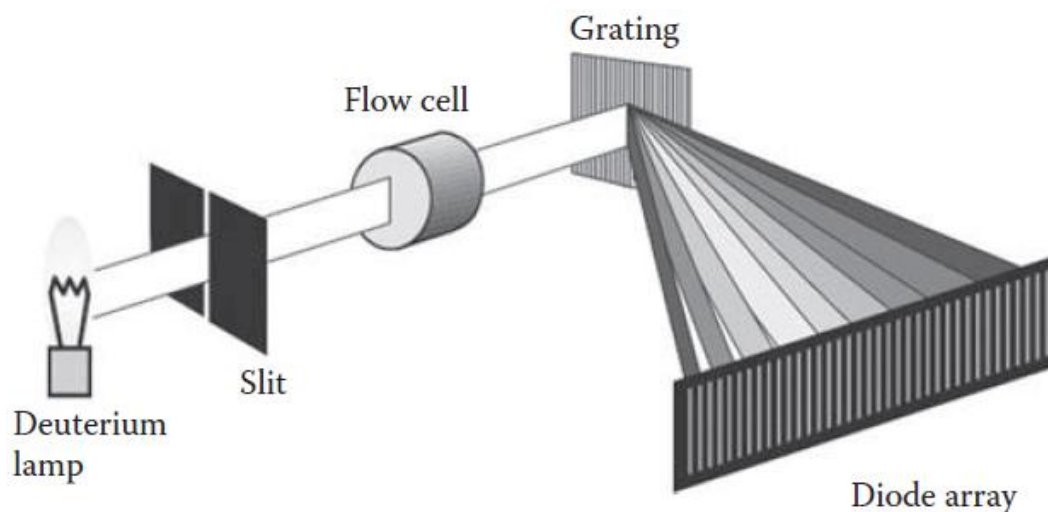
**Tableau 3.3.** Révélateurs utilisés pour les analyses par CCM (Wagner et Blatt, 1996; Wagner *et al.*, 2011).

Révélateurs	Classes phytochimiques ciblées
Anisaldéhyde-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Saponines, glycosides cardiotoniques, terpénoïdes
Chloramine-TCA	Glycosides cardiotoniques
Dragendorff	Alcaloïdes
KIO <sub>3</sub>	Tanins galliques
KOH	Dérivés anthracéniques, coumarines, naphtoquinones
Komarowsky	Saponines
Liebermann-Burchard	Terpénoïdes
NaNO <sub>2</sub>	Tanins ellagiques
Neu	Flavonoïdes, acides phénoliques, dérivés anthracéniques, coumarines, naphtoquinones
SbCl <sub>3</sub>	Saponines, lignanes, glycosides cardiotoniques
Vanilline-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Saponines, lignanes, terpénoïdes
Vanilline-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Saponines, lignanes, terpénoïdes
Vanilline-HCl	Tanins catéchiques
Zimmermann	Sesquiterpènes lactones

**3.2.2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection UV-visible à barrettes de diodes (HPLC-DAD-UV)**

Le détecteur spectroscopique Ultraviolet-visible (UV-vis) est considéré comme un détecteur universel pour n'importe quel système de HPLC. La détection par PDA (photodiode array) est une technique avancée de détecteur UV-vis, qui peut être couplée à une HPLC pour former le couplage de la technique HPLC-PDA, également connue sous le nom LC-PDA. Au cours des deux dernières décennies, la détection en ligne par PDA a été employée pour l'analyse d'extraits bruts de produits naturels d'origines diverses. Une HPLC-PDA est extrêmement utile pour l'analyse des produits naturels contenant des chromophores comme les composés phénoliques, y compris les flavonoïdes, les isoflavonoïdes, les coumarines, les ptérocarpanes, etc. Un détecteur de PDA peut aider à analyser les pics individuels de l'HPLC après que l'élution soit terminée, et à obtenir le spectre UV-vis complet des composés individuels. L'ensemble du chromatogramme à plusieurs longueurs d'onde peut être récupéré à partir des fichiers de données après analyse. Le temps de rétention de l'HPLC et le spectre UV-vis de n'importe quel composé (LC pic) peuvent être des caractéristiques de certains composés. Un détecteur de PDA permet également la génération de données 3D UV, typiquement constituées par les spectres d'absorption UV de 190 à 500 nm, pour chaque point le long du chromatogramme HPLC. Les données peuvent être visualisées rapidement pour les régions d'absorption uniques en corrélation avec des composés spécifiques ou des groupes fonctionnels. Les chromatogrammes indépendants peuvent également être construits pour chaque longueur d'onde pour augmenter la sélectivité des données. Les données UV peuvent être complétées par les données sélectives de la MS (mass spectrometry) ou la RMN (résonance magnétique nucléaire). Le choix de la phase mobile de l'HPLC est crucial pour le fonctionnement de l'HPLC-PDA et doit être fait en fonction de sa propre absorption de l'UV, de sorte que toute interférence de la phase mobile peut être évitée. Les systèmes HPLC-PDA modernes sont gérés par un logiciel sophistiqué qui permet de construire des bibliothèques spectrales pour des composés de référence et la recherche automatisée des composés (**Sarker et Nahar, 2006**).

L'HPLC présente un avantage par rapport à la CCM qui réside dans la limite de détection (sensibilité) et la résolution de la séparation.



**Figure 3.2.** Schéma du détecteur à barattes de diode (DAD) (Markowski et Waksmundzka-Hajnos, 2011).

Les analyses HPLC-DAD-UV ont été réalisées sur un système HPLC (LC Agilent technologies 1200 Infinity series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)) constitué des éléments suivants:

- Dégazeur;
- Colonne: Zorbax SB-C18 column (5 $\mu$ m, 4,6 x 150 mm);
- Four pour colonne thermostatée G1316A;
- Quatre pompes 1260 Infinity quaternary pump G1311B avec une pression allant de 69,1 à 117,3 bars;
- Injecteur automatique 1260 Infinity standard auto sampler G1329B;
- Echantillonneur automatique thermostaté 1290 Infinity thermostat G1330B;
- Détecteur à barattes de diode 1260 diode array detector G4212B, longueur d'onde de détection (DAD): balayage de 190 à 550 nm;
- Logiciel de contrôle: OpenLAB CDS Chemstation (Rev.C.01.05).

Les solutions des échantillons (10 mg/mL dans MeOH) sont injectées à un volume de 10  $\mu$ L. Les extraits analysés par ce système ont été auparavant filtrés par des filtres Millipore (0,45  $\mu$ m) avant l'analyse.

La température d'analyse est de 30 °C. La phase mobile binaire composée de proportions variables est constituée de l'eau acidifiée par 0,25 % AcOH (A), v/v, et MeOH (B), à un débit

de 0,8 mL/min. Le gradient (phase mobile de composition variable en cours d'analyse) utilisé est programmé comme suivant:

00-10 min → 0-5% B

10-25 min → 5-40% B

25-35 min → 40-51% B

35-38 min → 51-68% B

38-43 min → 68-95% B

43-48 min → 95-100 % B

48-55 min → 100 % B

### 3.2.3. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-API-ES-MS)

Aujourd'hui, une variété de spectromètres de masse est disponible. En raison de la complexité des métabolites en ce qui concerne la variabilité de leurs propriétés chimiques et physiques ainsi que leur concentration, aucune plate-forme analytique ne peut répondre à toutes les questions. Néanmoins, MS est un outil puissant qui gagne de plus en plus d'importance. La fonctionnalité d'un spectromètre de masse peut être considérée comme un processus en quatre étapes, l'entrée de l'échantillon, le transfert en phase gazeuse par la source d'ions, l'analyseur de masse et finalement le détecteur. Cela conduit à différents fragments qui sont importants pour l'utilisateur. L'entrée de l'échantillon et la source d'ions définissent les exigences pour la concentration de l'échantillon, la matrice, et le prétraitement. Le détecteur de masse et les systèmes d'analyse sont définis par le fabricant du spectromètre de masse et ne sont normalement pas interchangeables.

En règle générale, une classification en hors-ligne (*off-line*) comme l'infusion directe par spectrométrie de masse (DIMS: *direct-infusion mass spectrometry*), MALDI-MS et le couplage en ligne de la chromatographie à la MS comme l'HPLC-MS est possible. En HPLC-MS ce qu'on appelle la source d'ion accomplit le transfert des analytes à partir de la solution à

la pression atmosphérique à la phase gazeuse à la pression du vide avec l'ionisation simultanée (Stecher *et al.*, 2011).

Dans le présent travail, les analyses HPLC-API-ES-MS ont été réalisées sur un système HPLC identique à celui de l'HPLC-DAD-UV avec un spectromètre de masse quadripolaire MSD Agilent technologies 6100 series modèle 6130 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) couplé à un détecteur de masse sélectif (MSD: *mass selective detector*) équipé d'une interface de type API-ES (ionisation à pression atmosphérique avec électropulvérisation, *atmospheric chemical ionization-electrospray*) contrôlé par le logiciel OpenLAB CDS Chemstation (Rev.C.01.05).

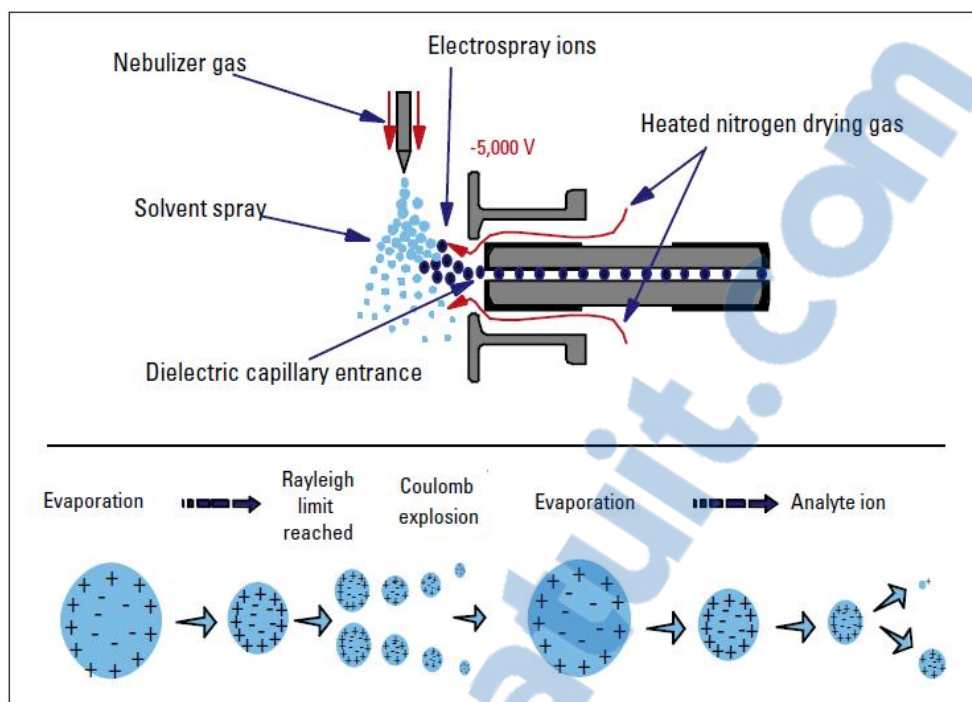
Les analyses ont toutes été réalisées avec les paramètres opératoires API-ES-MS suivants:

- Mode de détection: négatif (les ions obtenus en mode négatif sont de type  $[M-H]^-$ )
- Voltage du capillaire: 4000 V
- Température du quadripôle: 100 °C
- Flux du gaz sec (N<sub>2</sub>): 8 L/min
- Vitesse de scan: 0,1 scan/s
- Température du gaz sec: 350 °C
- Pression du gaz de nébulisation (N<sub>2</sub>): 15 psig
- Les spectres de MS ont été enregistrés de 50 à 1100 m/z en mode de courant ionique total (TIC, total ion current)
- Voltage du fragmenteur: 70 V

Les conditions de séparations sont identiques à celles réalisées dans l'analyse HPLC-DAD-UV.

L'identification des constituants de *P. atlantica* a été réalisée par comparaison des propriétés spectrales (UV, MS et fragments observés) des composés élués avec les données de la littérature.





**Figure 3.3.** Principe de l'API-electrospray (API-ES) selon Agilent technologies.

### 3.3. Méthodes chromatographiques séparatives

Depuis la découverte de la chromatographie par M.S. Tswett il ya plus d'un siècle, des progrès remarquables ont été observés dans ce domaine. La chromatographie s'est développée de façon significative à travers le travail révolutionnaire d'Archer J. Porter Martin et Richard L.M. Synge durant les années 1940-1950 sur les principes fondamentaux et les méthodes de base de la chromatographie de partage. De la première utilisation de papier filtre pour examiner les pigments végétaux au développement des plus modernes colonnes de haute performance et les gels d'affinité, la chromatographie continue à jouer un rôle important dans la séparation des composés de mélanges complexes, tels que des extraits de produits naturels. Avant les années 1970, il n'y avait que quelques méthodes chromatographiques fiables disponibles dans le commerce. Pendant les années 1970, la plupart des séparations chimiques utilisaient une variété de techniques incluant la chromatographie sur colonne ouverte (CC), la chromatographie sur papier, et la CCM. Le concept de la chromatographie liquide à pression qui consiste à économiser le solvant d'élution et par conséquent réduire le temps de purification des composés étant isolés par CC, a commencé à se tourner vers la réalité (**Reid et Sarker, 2012**).

### 3.3.1. Partage liquide-liquide

L'extrait aqueux de *P. atlantica* (53 g) a été solubilisé dans l'eau (1800 mL), mis dans une ampoule à décanter, puis partagé successivement avec *n*-hexane (3 × 1800 mL), CHCl<sub>3</sub> (3 × 1800 mL), AcOEt (3 × 1800 mL) et *n*-BuOH saturé en eau (3 × 1800 mL), conduisant ainsi à l'obtention de quatre fractions de polarité croissante après évaporation à 40 °C par un évaporateur rotatif: *n*-hexane, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt, *n*-BuOH. La fraction aqueuse résiduelle a été lyophilisée. Les échantillons ont été conservés à -20 °C. La qualité de la séparation a été contrôlée par analyses CCM avec un révélateur universel le réactif de Godin. La chromatographie de partage liquide-liquide a été appliquée aussi pour extraire les alcaloïdes de *S. lanatus* et *E. confusum* voir la section 4.3.2 & 4.3.4.

### 3.3.2. Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC)

La méthode de chromatographie par gravité, colonne ouverte classique est encore largement utilisée dans la filtration rapide. Des rapports de 1 : 10 à 1 : 300 (échantillon : phase stationnaire) peuvent être utilisés en fonction de la difficulté de séparation des composés du mélange. Diverses phases stationnaires de différentes tailles de particules (10-200 µm) et de porosité (50 nm) sont disponibles. La silice est la phase la plus largement utilisée, mais plusieurs phases de silice greffée (cyano, amino, hydroxyle, nitro) sont également utilisées, mais elles sont plus coûteuses. Des billes de polyacrylamide (45-180 µm) et les dextrans réticulés (Sephadex) sont utiles en tant que matériel de remplissage inerte dans la chromatographie des composés labiles. Les deux phases se gonflent dans l'eau, qui est également utilisée comme phase mobile. Les polymères de styrène-divinylbenzène (résines XAD, HP, SP) sont utiles pour la chromatographie en phase inverse, bien que leurs billes relativement grosses (250-600 µm) empêchent la séparation à haute résolution. Ils peuvent être avantageusement utilisés dans le dessalement et l'extraction des composés organiques à partir des milieux aqueux. L'alumine (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), initialement très utilisé en CC, doit être utilisée uniquement avec des composés très stables. La CC est une méthode lente avec la conséquence de perdre le matériel par adsorption irréversible, en particulier avec de la silice et de l'alumine, présente une faible reproductibilité (la facilité avec laquelle les colonnes peuvent être conditionnées souvent conduit à la négligence) et nécessite de grandes quantités de solvants, qui, dans un gradient de solvant d'éluion par étape, ne sont pas facilement récupérables (**Ghisalberti, 2008**).

### 3.3.2.1. Chromatographie d'adsorption

La méthode couramment employée en première étape pour le fractionnement d'extraits bruts ou de fractions complexes est la chromatographie sur colonne ouverte (CC). Les mécanismes de séparation sont les mêmes que ceux de la CCM. La dimension de la colonne, la granulométrie de la phase stationnaire et la composition de la phase mobile sont déterminées d'après la quantité et la qualité de l'échantillon à fractionner (extrait brut ou fraction enrichie) et au moyen d'analyses CCM préalables (**Hostettmann *et al.*, 1998**). Dans le présent travail, la phase stationnaire employée est du Silicagel 60 (40-63  $\mu\text{m}$ , Merck).

La préparation manuelle d'une CC commence par le dépôt d'un coton hydrophile dans l'embouchure d'écoulement. La phase stationnaire (30 à 50 fois la masse de l'échantillon) est mise en suspension dans la phase mobile de départ puis versée dans la colonne en plusieurs fois jusqu'à atteindre le niveau choisi. Le dépôt de l'échantillon peut être sous forme liquide ou solide. Le dépôt liquide peut être effectué quand l'échantillon se solubilise complètement dans la phase mobile de départ. L'échantillon solubilisé est introduit soigneusement sur la phase stationnaire. Dans notre cas, l'échantillon ne se solubilisant pas complètement dans la phase mobile de départ, un dépôt solide de l'échantillon a été réalisé. L'échantillon est adsorbé sur une petite quantité de phase stationnaire correspondant à 2-3 fois sa masse, habituellement par le MeOH. Après évaporation du solvant, l'échantillon adsorbé sur la phase stationnaire est introduit délicatement à la surface du gel de silice. L'éluant est versé soigneusement sans perturber le dépôt de l'échantillon.

Les phases mobiles pour CC employées dans le présent travail sont des mélanges binaires ou ternaires. La composition et la proportion de la phase mobile de départ sont déterminées par analyse CCM, en faisant migrer les substances recherchées à un  $R_f$  d'environ 0,2 à 0,25. L'élution se fait en mode gradient ou isocratique et les dernières fractions sont lavées avec du méthanol. Le débit varie de 1 à 2 mL/min. Les fractions sont récupérées dans des tubes à essai (5-25 mL) ou flacons (30-100 mL). La récolte de fractions se fait soit manuellement, soit à l'aide d'un collecteur de fractions automatique (CF-1 fraction collector, Spectrum® chromatography, Houston, TX, USA). L'analyse par CCM (révélation par le réactif de Godin) du contenu des tubes permet finalement de rassembler les fractions identiques avant d'éliminer les solvants par un évaporateur rotatif à une température de 30-40 °C.

### 3.3.2.2. Chromatographie d'exclusion

La chromatographie d'exclusion ou filtration sur gel est réalisée comme étape de fractionnement ciblant à éliminer des pigments (grosses molécules). Elle est effectuée sur gel de Sephadex<sup>®</sup> LH-20 (50 fois la masse de l'échantillon) avec un système MeOH-H<sub>2</sub>O [80 : 20] ou MeOH comme phase mobile à un débit de 0,5 ml/min. Les échantillons à séparer sont introduits sous forme liquide après dissolution dans un petit volume d'éluant MeOH-H<sub>2</sub>O ou MeOH. Les fractions ont été récoltées par un collecteur automatique (CF-1 fraction collector, Spectrum<sup>®</sup> chromatography, Houston, TX, USA). Les fractions sont récupérées dans des tubes à essai (15 mL). L'évolution de la séparation et la réunion des fractions sont faites sur la base d'analyses par CCM avec une révélation par le réactif de Godin.

### 3.3.3. Chromatographie liquide basse pression (LPLC)

Cette méthode peut être réalisée sur des colonnes en verre ou en acier inoxydable. Des colonnes en verre (240 x 10 mm à 440 x 37 mm) prêtes à l'emploi remplies avec de la silice en phase normale ou en phase inverse RP-8 (40 à 60 µm) sont disponibles dans le commerce. Le système nécessite une pompe capable d'atteindre une pression de 6 bar et un système d'injection. Les petites colonnes sont adaptées pour des charges d'échantillon jusqu'à 200 mg, alors que les grosses colonnes tolèrent jusqu'à 3 g. Le choix du solvant peut être extrapolé à partir de la CCM, et normalement une seule combinaison de solvant (isocratique) est utilisée. Cette technique est particulièrement utile pour la séparation des extraits bruts en petites fractions discrètes, alors qu'elle ne fournit pas nécessairement des composés purs, les fractions individuelles peuvent être soumises à une chromatographie avec un pouvoir de résolution plus élevé (**Ghisalberti, 2008**).

Le système utilisé pour LPLC est constitué d'une pompe Chemco Low-Prep 81-M-2 (1 à 2 bars). Diverses colonnes employées sont remplies soit de silice phase normale (Silicagel 60, 25-40 µm, Merck) soit de silice phase inverse LiChroprep RP18 (Silicagel 60, 25-40 µm, Merck), la quantité du gel étant de 30 à 50 fois la masse de l'échantillon. L'élution est opérée en mode gradient ou isocratique et la phase mobile est constituée de mélanges binaires ou tertiaires de solvants. L'échantillon est introduit sous forme de solide adsorbé sur une quantité de phase stationnaire correspondant à 2-3 fois sa masse à l'aide du MeOH. Les fractions sont récoltées par un collecteur automatique (CF-1 fraction collector, Spectrum<sup>®</sup> chromatography, Houston, TX, USA) ou manuellement. Le débit est de 4 mL/min. Les fractions sont récupérées dans des tubes à essai (5-25 mL) ou flacons (30-100 mL). L'évolution de la

séparation et la réunion des fractions identiques sont faites sur la base d'analyses par CCM avec une révélation par le Godin.

### **3.3.4. Chromatographie flash (FC)**

La chromatographie flash (FC) est une technique très simple et pratique qui trouve une application dans le domaine des produits synthétiques et naturels. En bref, une colonne est de préférence remplie d'adsorbant sec, l'échantillon est introduit, et le solvant est forcé à travers la colonne sous la pression de l'air comprimé ou de l'azote (environ 1 bar). Le gel de silice (25-200  $\mu\text{m}$ ) est le plus fréquemment utilisé, le chargement de l'échantillon est en fonction du  $\Delta R_f$  des composés à séparer. Les phases greffées, y compris des phases stationnaires chirales, peuvent également être utilisées. La FC en phase inverse s'est révélée comme étant particulièrement utile dans la séparation des métabolites bioactifs polaires. Le procédé comprend l'adsorption de l'extrait brut sur un support en phase inverse. L'extrait est chargé comme une suspension aqueuse ou comme une poudre sur une colonne remplie avec le même support (100 g pour 20 g d'extrait), et une élution normale, par exemple, gradient par étape à partir de l'eau, méthanol au dichlorométhane, peut être effectuée. Le support solide peut être recyclé plusieurs fois (**Ghisalberti, 2008**).

La FC a permis le fractionnement de la fraction Fr-aq-IV-III de *P. atlantica* en un temps relativement rapide (environ 2 heures). L'appareil de type Flash chromatography (CombiFlash Rf 200, Teledyne Isco, Nebraska, USA) est composé d'une pompe pouvant aller jusqu'à 13,78 bars, d'un collecteur de fractions automatique et d'un détecteur UV-vis. Avec un débit maximal de 200 ml/min, le système de pompe permet de travailler en mode isocratique ou en mode gradient, en binaire. Avec la gamme de colonnes disponibles contenant de la silice phase inverse ou phase normale, il est possible de trouver les conditions optimales pour fractionner rapidement un échantillon pouvant peser jusqu'à 33 g. Ce système compact et complètement automatique est contrôlé par un PC à écran tactile incorporé et piloté par le logiciel PeakTrak® software. Ce programme est lié au détecteur UV-vis et donne la possibilité de faire un fractionnement automatique en fonction de l'intensité des pics d'absorbance UV-vis mesurés.

La recharge de l'extrait à sec implique de préparer l'échantillon en l'absorbant sur la phase inverse LiChroprep RP-18 (Silicagel 60, 25-40  $\mu\text{m}$ , Merck). L'échantillon est introduit sous forme de solide adsorbé sur une quantité de phase stationnaire correspondant à 2-3 fois

sa masse à l'aide du MeOH. Une fois le solvant évaporé à l'aide de la hôte chimique, la poudre est placée sur une cartouche qui se placera dans l'instrument en amont de la colonne RediSep Rf Reversed-phase C18 Column (40-63  $\mu\text{m}$ , 26 g) (Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA). La séparation a été réalisée par un système de solvant binaire MeOH-H<sub>2</sub>O avec un débit de 25 ml/min, (0 : 100  $\rightarrow$  100 : 0) pendant 40 min (3 min 100 % H<sub>2</sub>O, 27 min gradient MeOH-H<sub>2</sub>O 0 : 100  $\rightarrow$  100 : 0 et 10 min 100 % MeOH). La détection est fixée à  $\lambda = 254$  et 360 nm et la récolte des fractions est effectuée selon l'intensité des pics d'absorption, 5 ml (pic) et 20 ml (non pic). Le contrôle et la combinaison des fractions se réalisent par analyses CCM à l'aide d'une révélation universelle.

### 3.3.5. Chromatographie sur couche mince préparative (PTLC)

La chromatographie sur couche mince préparative a longtemps été une méthode populaire pour l'isolement principalement, en raison de son accessibilité universelle aux étudiants et aux chercheurs travaillant dans le domaine des produits naturels. Cette popularité a été diminuée ces dernières années en raison du succès de l'HPLC et la chromatographie centrifuge à contre-courant (CCC). Contrairement à ces deux techniques, la CCM préparative ne nécessite pas un équipement coûteux, la séparation peut être effectuée rapidement et la quantité du matériel isolé se situe généralement dans la gamme de 1 mg à 1 g qui est certainement suffisante pour l'élucidation structurale (**Gibbons, 2012**).

Dans notre travail, les plaques que nous avons utilisées sont des plaques en verre d'une dimension de 20 cm x 20 cm contenant une couche de gel de silice (Silicagel 60) d'une épaisseur de 1 mm avec un indicateur de fluorescence F<sub>254</sub> (Merck). L'échantillon (20 à 50 mg) à séparer est solubilisé dans un petit volume de MeOH. Il est ensuite déposé sur la plaque à l'aide d'une microseringue (Hamilton). La plaque est développée dans une cuve saturée contenant l'éluant adéquat (système de migration). Comme dans la CCM analytique, la plaque est séchée à température ambiante ou avec un sèche-cheveux. On visualise les taches des constituants sous lumière UV 254 et 365 nm ou bien on révèle une petite partie du bord de la plaque par le réactif de Godin. A l'aide d'une spatule on récupère les produits recherchés fixés sur la silice. Cette dernière est ensuite dispersée dans une petite quantité de MeOH, puis filtrée, pour permettre la récupération des produits recherchés.

### 3.4. Méthodes physico-chimiques

#### 3.4.1. Pouvoir rotatoire ( $[\alpha]_D$ )

La technique d'observation de la rotation de la lumière polarisée plane est appelée polarimétrie; c'est une méthode directe de découvrir si un échantillon est racémique ou s'il contient plus d'un énantiomère que l'autre (optiquement actif). Les mesures polarimétriques sont réalisées à l'aide d'un polarimètre qui possède une source lumineuse ayant une seule longueur d'onde (monochromatique), un filtre polarisant, un porte échantillon où on peut placer une solution de la substance à examiner, et un détecteur qui indique de quelle angle le plan de polarisation de la lumière est tourné. La rotation vers la droite donne une valeur positive (dextrogyre), la rotation vers la gauche une valeur négative (lévogyre) (**Clayden *et al.*, 2001**).

Le pouvoir rotatoire du nouveau produit naturel (produit **X**), dissous dans le méthanol, est mesuré à une température de 22 °C grâce à un polarimètre JASCO DIP-370 digital polarimeter (Jasco, Easton, MD, USA) équipé d'une lampe à sodium. La solution, introduite dans une cellule de 10 cm de longueur ( $l$ ), est traversée par un rayon lumineux polarisé à la longueur d'onde de la raie D du sodium (589 nm). La formule utilisée pour le calcul est la suivante:

$$[\alpha]_D^T = (1000 \times \alpha) / l \times c$$

$\alpha$ : angle de rotation en degrés lu à la température T

$l$ : longueur en décimètres de la cellule polarimétrique

$c$ : concentration de la substance en g/l ( $c = 0,50$  g/L, MeOH)

#### 3.4.2. Spectrométrie de masse (MS)

Le principe de la spectrométrie de masse est basé sur la mesure directe du rapport masse sur le nombre de charges élémentaires ( $m/z$ ), positives ou négatives, d'ions obtenus à partir du composé à analyser. Le dalton (Da) est l'unité du rapport  $m/z$ . Le spectromètre de masse est composé de la source qui produit les ions, l'analyseur qui est chargé de les séparer, et le détecteur. Le spectre enregistré montre l'abondance relative des différentes espèces ioniques présentes, comme une fonction de  $m/z$  (**Silverstein *et al.*, 1998**). Des informations sur le processus de fragmentation d'un composé ou sur sa masse moléculaire sont obtenues par le spectromètre de masse en fonction de la source d'ionisation utilisée.

Un mode d'ionisation douce, comme par exemple l'ionisation par électropulvérisation (ESI) permet de détecter l'ion pseudomoléculaire, et donc de déterminer la masse moléculaire du composé. L'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution (HR-Q-TOF-ESI-MS: *high resolution quadrupole time-of-flight electrospray ionization mass spectroscopy*) conduit, grâce à une combinaison entre l'ESI et un analyseur TOF, à déterminer la formule moléculaire du composé. Les produits isolés ont été soumis à cette analyse. Les mesures ont été réalisées sur un spectromètre de masse équipé d'une source ESI Q-TOF MICRO spectrometer (Waters, Manchester, UK) et qui a été opéré en mode positif. Les analyses ont toutes été réalisées dans les conditions suivantes: voltage du cône 45 V; voltage du capillaire 3000 V; énergie de collision 3.0 eV; énergie d'ion 1.0 V; température de la source 80 °C; température de désolvatation 200; volume de l'échantillon injecté 10 µL; débit d'élution de l'échantillon 10 µL/min; les spectres de MS ont été enregistrés de 100 à 1000 m/z avec 100 acquisitions par spectre. Les données sont analysées par le logiciel MassLynx développé par Waters.

### 3.4.3. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La RMN est une méthode largement efficace et plus utilisée pour l'identification des produits synthétiques et naturels. Cette méthode est basée sur la propriété qu'ont des noyaux tels que  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de posséder un moment magnétique nucléaire permanent. Installés dans un champ magnétique extérieur, ils prennent par rapport à celui-ci certaines positions bien déterminées, auxquelles concordent des niveaux d'énergie distincts. Pour une valeur donnée de champ, des transitions entre niveaux immédiatement contigus sont dues à l'absorption de radiations électromagnétiques de longueurs d'onde caractéristiques dans la région des radiofréquences (Silverstein *et al.*, 1998).

Les mesures de RMN sont réalisées sur un spectromètre Bruker Avance 400 NMR spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany). Sur ce type d'appareil, toutes les transitions sont excitées simultanément par irradiation avec une impulsion multifréquence (large bande), puis l'ordinateur transforme les interférogrammes ainsi obtenus en un spectre conventionnel par une opération mathématique (transformée de Fourier). Les déplacements chimiques  $\delta$  des différents signaux sont exprimés en ppm par rapport au signal de référence du standard interne, le tétraméthylsilane (TMS). Pour chaque élément possédant un moment magnétique nucléaire permanent, ces déplacements sont caractéristiques de son environnement nucléaire et électronique dans la molécule. Les constantes de couplage  $J$  sont exprimées en Hz. Les



solvants deutérés utilisés pour les mesures de RMN dans le présent travail sont le  $\text{CDCl}_3$  et le  $\text{CD}_3\text{OD}$  (Sigma). La température de travail est fixée à 25 °C pour toutes les mesures effectuées.

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  sont acquis à une radiofréquence de 400 MHz et les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  à 100 MHz. Des mesures additionnelles, dites « bidimensionnelles », sont essentielles pour mettre en évidence des corrélations homonucléaires et hétéronucléaires entre les atomes de carbone et d'hydrogène au sein des produits analysés. Il s'agit des expériences suivantes, effectuées grâce à des programmes de séquences d'impulsions, fournis par Bruker pour l'instrument décrit plus haut : COSY, HMBC, ROESY et APT.

### 3.5. Tests de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase

#### 3.5.1. Méthode bioautographique au Fast Blue B

L'essai de l'activité inhibitrice de l'AChE des extraits bruts, fractions et produits purs a été réalisé par bioautographie sur CCM comme décrit par **Mroczek (2009)**. L'AChE (500 U, anguille électrique (EC 3.1.1.7, type V-S, poudre lyophilisée, 827 U/mg solide, 1256 U/mg protéine), Sigma) est dissoute dans un tampon tris-HCl 50 mM, pH 7,8 pour faire une solution stock de 1000 U/mL qui est ensuite diluée avec du tampon tris-HCl 50 mM, pH 7,8 contenant 0,1 % BSA (bovine serum albumin) (Sigma) pour obtenir la solution enzymatique de travail à 3 U/mL. La solution mère a été conservée à -20 °C. Les échantillons sont appliqués à une quantité de 15  $\mu\text{g}$  sur CCM (gel de silice 60, F254, feuilles d'aluminium). La galanthamine (Sigma) est déposée à 1  $\mu\text{g}$  sur les plaques comme témoin positif. Après migration des échantillons dans une phase mobile appropriée, contenant en plus 1,5 mg/mL du 2-naphtyle acétate (Sigma), les plaques de CCM sont séchées à l'air libre. Les plaques sont ensuite pulvérisées avec 3 U/mL de la solution enzymatique de travail, soigneusement séchées et incubées pendant 10 min à 37 °C dans une atmosphère humide. Par la suite, les plaques sont pulvérisées avec une solution aqueuse de sel Fast Blue B à 1,25 mg/mL (Sigma). Un fond violet apparaît après environ 1 min. Les composés actifs apparaissent sous forme de taches claires sur un fond violet.

#### 3.5.2. Méthode d'Ellman par spectrométrie

Le test de l'AChE est réalisé selon le principe de l'hydrolyse de l'ATChI (acetylthiocholine iodide) en contrôlant la formation du 5-thio-2-nitrobenzoate par spectrométrie à 412 nm (**Ellman *et al.*, 1961**) et est conduit comme décrit par **Ingkaninan *et***

*al.* (2000) avec une légère modification. Le mélange de réaction mis dans des cuves en plastiques jetables (LP ITALIANA SPA, Italy, volume 2 mL) contenait 295 µl de tampon tris-HCl 50 mM, pH 8 contenant BSA à 0,1 %, 100 µl d'AChE à 0,226 U/mL dans du tampon tris-HCl 50 mM, pH 8 contenant BSA à 0,1 %, 5 µl de l'extrait brut ou fraction ou produit pur ou galanthamine (témoin positif) dans du méthanol à cinq concentrations différentes ou méthanol (témoin ou contrôle négatif) et 500 µl de 3 mM DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) (Sigma) dans un tampon tris-HCl 50 mM, pH 8 contenant 0,1 M NaCl et MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,02 M, qui ont été mélangés et incubés pendant 15 min à 37 °C dans une atmosphère humide. La réaction est ensuite initiée par l'addition dans les cuves 100 µl d'ATChI 15 mM (Sigma) dans l'eau. Les cuves sont alors agitées pendant 5 s et les variations de l'absorbance sont mesurées à 412 nm toutes les 20 s pendant 4 min par un spectrophotomètre (2120 Optizen UV spectrophotometer). Toutes les réactions sont réalisées en triplicata et les vitesses initiales sont mesurées en calculant le taux de changement de l'absorbance/temps ( $\Delta\text{absorbance}/\Delta t$ ) (Purich, 2010). Le pourcentage d'inhibition de l'AChE est déterminé en utilisant la formule  $1 - (\text{RR}_{\text{sample}} / \text{RR}_{\text{control}}) \times 100$ , où  $\text{RR}_{\text{sample}}$  est la vitesse de la réaction de l'échantillon et  $\text{RR}_{\text{control}}$  est celle du témoin négatif (Nair *et al.*, 2011). L'activité inhibitrice de l'AChE est exprimée en termes de valeur d'IC<sub>50</sub> (concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber l'hydrolyse du substrat par 50 %).

### 3.6. Dosage des polyphénols totaux

L'analyse quantitative des polyphénols totaux est réalisée par un dosage spectrophotométrique selon la méthode de Folin Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999).

Dans des tubes à essai, on additionne à 40 µL de l'extrait brut (dans le MeOH) 2400 µL d'eau distillée et 200 µL de réactif de Folin Ciocalteu (Sigma), on agite et on laisse à l'obscurité pendant 5 min à température ambiante, ensuite on ajoute 600 µL d'une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20 % dans l'eau distillée) et 760 µL eau distillée. Après agitation et repos à l'obscurité pendant 2 heures à température ambiante, la couleur jaune du réactif vire au bleu. Les dosages sont réalisés en triplicata. Les absorbances sont lues au spectrophotomètre UV-visible (2120 UV Optizen) à 760 nm en utilisant des cuves en plastiques jetables (LP ITALIANA SPA, Italy, volume 2 mL).

La quantification des polyphénols est faite au moyen d'une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide de différentes concentrations d'acide gallique (Sigma) (05-25 µg/mL, concentrations

finales) à partir d'une solution mère d'acide gallique de 0,5 mg/mL (dans le MeOH). Cette courbe est réalisée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons.

Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par g d'extrait sec (mg EAG/g ES).

Le blanc est préparé en remplaçant l'échantillon par le MeOH, en gardant les mêmes conditions.

### **3.7. Dosage des flavonoïdes**

L'analyse quantitative des flavonoïdes est réalisée par un dosage spectrophotométrique selon la méthode décrite par **Kim *et al.* (2003)**.

Dans des tubes à essai, 200  $\mu$ L de l'extrait brut (dans le MeOH) sont mélangés à 800  $\mu$ L d'eau distillée, à  $t = 0$  min, on ajoute 60  $\mu$ L d'une solution de  $\text{NaNO}_2$  (5 % dans l'eau distillée), à  $t = 5$  min on ajoute 60  $\mu$ L d'une solution de  $\text{AlCl}_3$  (10 % dans l'eau distillée), à  $t = 6$  min on ajoute 400  $\mu$ L de  $\text{NaOH}$  (1 M dans l'eau distillée), puis on mélange au vortex. Les dosages sont réalisés en triplicata. Les absorbances sont lues au spectrophotomètre UV-visible (2120 UV Optizen) à 510 nm en utilisant des cuves en plastiques jetables (LP ITALIANA SPA, Italy, volume 2 mL).

Une courbe d'étalonnage a été réalisée par différentes concentrations (5-55  $\mu$ g/mL, concentrations finales) de la catéchine (Sigma) à partir d'une solution mère à 0,5 mg/mL (dans le MeOH). Cette courbe a été effectuée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons. La teneur en flavonoïdes est exprimée en mg d'équivalent de catéchine par g d'extrait sec (mg EC/g ES).

Le blanc est préparé en remplaçant l'échantillon par le MeOH, dans les mêmes conditions.

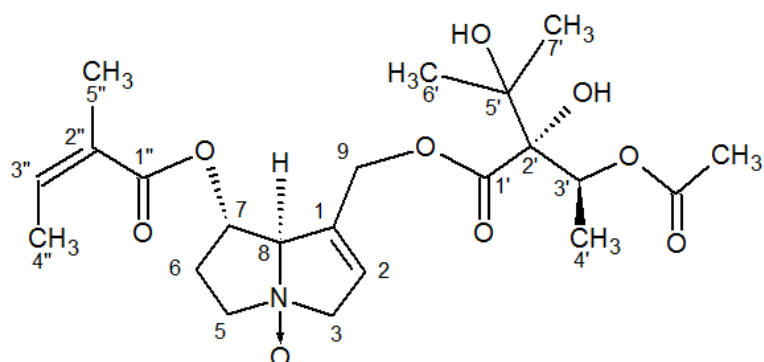
### **3.8. Analyse statistique**

Les résultats sont exprimés en écart type de moyenne (Standard Errors Means (S.E.M)) calculées sur la moyenne de trois expériences pour chaque essai. Le coefficient de corrélation  $R^2$  est calculé à l'aide du logiciel Microsoft Excel 2007. Les valeurs d' $\text{IC}_{50}$  sont calculées à partir de la droite de régression obtenue en traçant graphiquement le pourcentage d'inhibition de l'ACHé en fonction de la concentration de l'inhibiteur. Les analyses statistiques ont été

effectuées par l'analyse de la variance à un facteur (ANOVA 1), suivie par des comparaisons multiples post-hoc (test Student-Newman-Keuls en combinaison avec le test de Tukey). La valeur de  $\alpha < 0,05$  a été considérée comme indicateur de la significativité statistique. L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel IBM SPSS Statistics 20.

### 3.9. Constantes physiques et données spectrales des produits isolés

- **Produit IX (3'-acétylhéliosupine N-oxyde)**



**Nom chimique:** [(7R)-7-[(Z)-2-methylbut-2-enoyl]oxy-5,6,7,8-tetrahydro-3H-pyrrolizin-1-yl]methyl 2-(1-acetyloxyethyl)-2,3-dihydroxy-3-methylbutanoate N-oxide

**Aspect:** Gomme brune

**Formule moléculaire:** C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>9</sub>

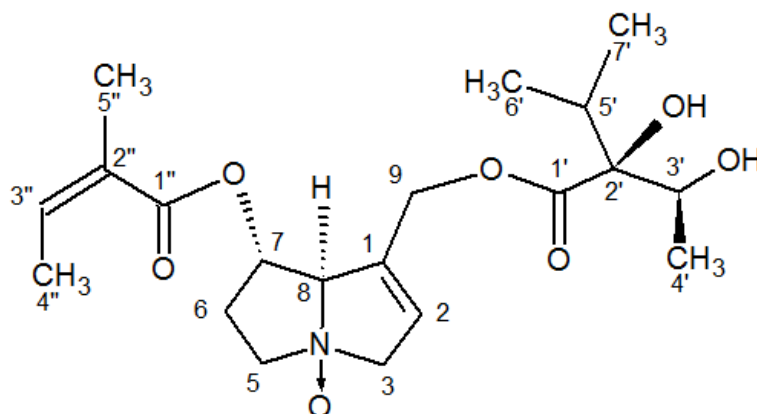
**Masse exacte:** 455,2155

**HR-Q-TOF-ESI-MS (MeOH):** 456,1720 [M+H]<sup>+</sup>; 440,1990 [M+H-16]<sup>+</sup>; 360,1154 [M+H-80]<sup>+</sup>; 338,1297 [M+H-22]<sup>+</sup>; 243,0618 [M+H-95]<sup>+</sup>; 218,0976 [M+H-25]<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz), CDCl<sub>3</sub>:**  $\delta$  1,18 (3H, s, H-6'); 1,28 (3H, d,  $J = 6$  Hz, H-4'); 1,30 (3H, s, H-7'); 1,82 (3H, q,  $J = 1,5$  Hz, H-5''); 1,90 (3H, dq,  $J = 7/1,5$  Hz, H-4''); 1,95 (3H, d, 3'-Ac); 2,36 (1H, m, H-6b); 2,53 (1H, m, H-6a); 4,15 (1H, m, H-5b); 4,30 (1H, m, H-5a); 4,70 (1H, bd, H-3b); 4,83 (1H, d, H-9b); 4,92 (1H, d, H-9a); 5,05 (1H, bd, H-3a); 5,07 (1H, bs, H-8); 5,09 (1H, d,  $J = 5/2,5$  Hz, H-7); 5,35 (1H, q,  $J = 6$  Hz, H-3'); 5,92 (1H, bs, H-2); 6,19 (1H, qq,  $J = 7/1,5$  Hz, H-3'').

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz),  $\text{CDCl}_3$ :**  $\delta$  15,43 (C-4'); 16,24 (C-4''); 20,44 (C-5''); 21,29 (C3'-COCH<sub>3</sub>); 25,15 (C-7'); 26,58 (C-6'); 30,29 (C-6); 60,92 (C-9); 66,92 (C-5); 71,97 (C-3'); 72,52 (C-7); 73,60 (C-5'); 74,76 (C-3); 83,54 (C-2'); 93,12 (C-8); 124,25 (C-2); 126,35 (C-2''); 132,50 (C-1); 142,11 (C-3''); 167,50 (C-1''); 169,75 (C3'-CO); 173,20 (C-1').

• **Produit X (7-angeloylechinate *N*-oxyde)**



**Nom chimique:** [(7*S*,8*R*)-7-[(*Z*)-2-methylbut-2-enoyl]oxy-5,6,7,8-tetrahydro-3*H*-pyrrolizin-1-yl]methyl (2*S*)-2-hydroxy-2-[(1*S*)-1-hydroxyethyl]-3-methylbutanoate *N*-oxide

**Aspect:** Gomme brune

**Pouvoir rotatoire:**  $[\alpha]_D^{22} = +3,5^\circ$  ( $c = 0,50$  g/L, MeOH)

**Formule moléculaire:** C<sub>20</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>7</sub>

**Masse exacte:** 397,2100

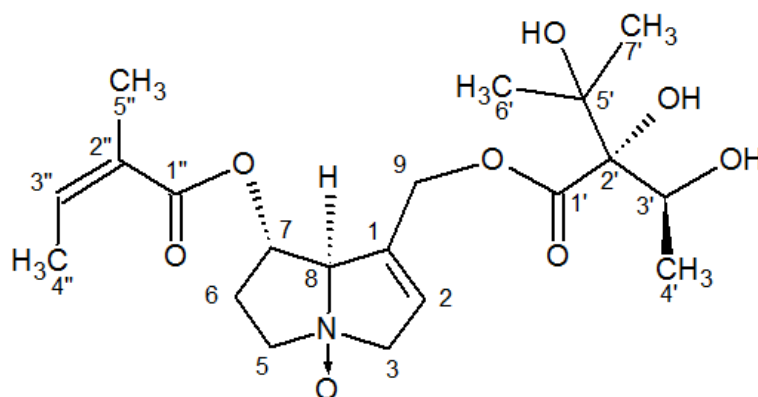
**HR-Q-TOF-ESI-MS (MeOH):** 398,2221 [M+H]<sup>+</sup>; 382,2275 [M+H-16]<sup>+</sup>; 365,2897 [M+H-17]<sup>+</sup>; 326,9991 [M+H-39]<sup>+</sup>; 301,1441 [M+H-25]<sup>+</sup>; 262,9528 [M+H-39]<sup>+</sup>; 239,0184 [M+H-23]<sup>+</sup>; 225,9786 [M+H-14]<sup>+</sup>; 185,0087 [M+H-40]<sup>+</sup>; 164,9633 [M+H-21]<sup>+</sup>; 120,9755 [M+H-44]<sup>+</sup>

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz),  $\text{CD}_3\text{OD}$ :**  $\delta$  0,84 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-6'); 0,86 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-7'); 1,07 (3H, d,  $J = 6,8$  Hz, H-4'); 1,74 (1H, m, H-5'); 1,83 (3H, s, H-5''); 1,93 (3H, d,  $J = 7,6$  Hz, H-4''); 2,28 (1H, m, H-6a); 2,37 (1H, m, H-6b); 3,72 (1H, m, H-5a); 3,84 (1H, m, H-5b);

3,96 (1H, q,  $J = 6,8$  Hz, H-3'); 4,30 (1H, bd,  $J = 15,8$  Hz, H-3a); 4,58 (1H, s, H-8); 4,60 (1H, bd,  $J = 15,8$  Hz, H-3b); 4,83 (1H, d,  $J = 14,0$  Hz, H-9a); 4,94 (1H, d,  $J = 14,0$  Hz, H-9b); 5,18 (1H, bs, H-7); 5,94 (1H, s, H-2); 6,16 (1H, q,  $J = 7,6$  Hz, H-3'').

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz),  $\text{CD}_3\text{OD}$ :**  $\delta$  16,5 (C-4''); 17,12 (C-4'); 17,44 (C-6'); 17,77 (C-7'); 20,54 (C-5''); 31,31 (C-6); 34,29 (C-5'); 61,61 (C-9); 68,94 (C-5); 70,48 (C-3'); 74,73 (C-7); 78,30 (C-3); 83,00 (C-2'); 96,30 (C-8); 124,99 (C-2); 128,20 (C-2''); 133,00 (C-1); 141,40 (C-3''); 167,60 (C-1''); 173,10 (C-1').

• **Produit XI (Heliosupine N-oxyde)**



**Nom chimique:** [(7S,8R)-7-[(Z)-2-methylbut-2-enoyl]oxy-5,6,7,8-tetrahydro-3H-pyrrolizin-1-yl]methyl (2S)-2,3-dihydroxy-2-[(1S)-1-hydroxyethyl]-3-methylbutanoate N-oxyde

**Aspect:** Gomme brune

**Formule moléculaire:**  $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{NO}_8$

**Masse exacte:** 413,2050

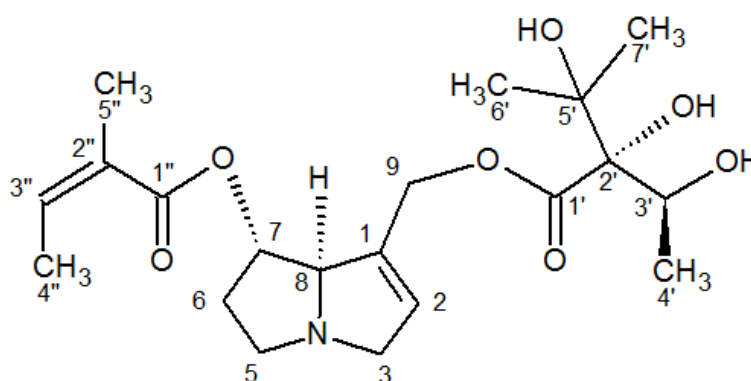
**HR-Q-TOF-ESI-MS (MeOH):** 414,1736  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; 365,2385  $[\text{M}+\text{H}-49]^+$ ; 301,1069  $[\text{M}+\text{H}-64]^+$ ; 229,1150  $[\text{M}+\text{H}-72]^+$ ; 201,0496  $[\text{M}+\text{H}-28]^+$ ; 184,9941  $[\text{M}+\text{H}-17]^+$ ; 118,9625  $[\text{M}+\text{H}-66]^+$

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz),  $\text{CD}_3\text{OD}$ :**  $\delta$  1,14 (3H, s, H-6'); 1,18 (3H, d,  $J = 7$  Hz, H-4'); 1,21 (3H, s, H-7'); 1,84 (3H, s, H-5''); 1,93 (3H, dd,  $J = 7/2$  Hz, H-4''); 2,26 (1H, m, H-6b); 2,38 (1H, m, H-6a); 3,70 (1H, m, H-5b); 3,82 (1H, m, H-5a); 4,10 (1H, q,  $J = 7$  Hz, H-3'); 4,27 (1H, bd,  $J = 16$  Hz, H-3b); 4,55 (1H, s, H-8); 4,57 (1H, bd,  $J = 16$  Hz, H-3a); 4,82 (1H, d,  $J = 14$  Hz, H-

9b); 4,98 (1H, d,  $J = 14$  Hz, H-9a); 5,18 (1H, m, H-7); 5,96 (1H, bs, H-2); 6,17 (1H, dq,  $J = 7,00/1,00$  Hz, H-3'').

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz),  $\text{CD}_3\text{OD}$ :**  $\delta$  16,00 (C-4''); 18,57 (C-4'); 20,25 (C-5''); 24,15 (C-6'); 24,50 (C-7'); 30,00 (C-6); 60,72 (C-9); 67,80 (C-5); 69,42 (C-3'); 72,90 (C-5'); 73,12 (C-7); 77,20 (C-3); 83,67 (C-2'); 94,49 (C-8); 122,73 (C-2); 126,50 (C-2''); 132,35 (C-1); 140,44 (C-3''); 167,55 (C-1''); 173,90 (C-1').

• **Produit XII (Heliosupine)**



**Nom chimique:** [(7S,8R)-7-[(Z)-2-methylbut-2-enoyl]oxy-5,6,7,8-tetrahydro-3H-pyrrolizine-1-yl]methyl (2S)-2,3-dihydroxy-2-[(1S)-1-hydroxyethyl]-3-methylbutanoate

**Aspect:** Huile brune

**Formule moléculaire:**  $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{NO}_7$

**Masse exacte:** 397,2100

**HR-Q-TOF-ESI-MS (MeOH):** 398,2221  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; 336,1912  $[\text{M}+\text{H}-62]^+$ ; 301,1441  $[\text{M}+\text{H}-35]^+$ ; 220,1362  $[\text{M}+\text{H}-81]^+$

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz),  $\text{CD}_3\text{OD}$ :**  $\delta$  1,10 (3H, s, H-6'); 1,13 (3H, q,  $J = 6,5$  Hz, H-4'); 1,19 (3H, s, H-7'); 1,79 (3H, quin,  $J = 1,5$  Hz, H-5''); 1,89 (3H, dq,  $J = 7/1,5$  Hz, H-4''); 1,94 (1H, m, H-6b); 1,94 (1H, m, H-6a); 2,87 (1H, m, H-5b); 3,08 (1H, m, H-5a); 3,40 (1H, dm, H-3b); 3,84 (1H, bd,  $J = 16$  Hz, H-3a); 4,07 (1H, m, H-8); 4,09 (1H, q,  $J = 6,5$  Hz, H-3'); 4,79 (1H, d,  $J =$

13 Hz, H-9b); 4,87 (1H, d,  $J = 13$  Hz, H-9a); 5,16 (1H, m, H-7); 5,82 (1H, bs, H-2); 6,07 (1H, qq,  $J = 7/1,5$  Hz, H-3'').

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz),  $\text{CD}_3\text{OD}$ :**  $\delta$  16,08 (C-4''); 17,21 (C-4'); 19,20 (C-5''); 24,14 (C-7'); 25,26 (C-6'); 29,61 (C-6); 53,62 (C-5); 61,30 (C-3); 61,50 (C-9); 69,25 (C-3'); 72,99 (C-5'); 76,35 (C-7); 78,73 (C-8); 83,71 (C-2'); 127,42 (C-2''); 127,67 (C-2); 134,50 (C-1); 138,28 (C-3''); 168,53 (C-1''); 173,73 (C-1').



Résultats  
&  
discussion

#### 4.1. Préparation des extraits bruts

Dans le présent travail, trois extraits bruts ont été préparés à partir de plantes *Pistacia atlantica* Desf. (Anacardiaceae), *Solenanthus lanatus* A.DC. et *Echium confusum* de Coincy (Boraginaceae) récoltées à Ain Benkhelil (Naama, Algérie) et Tamzoura (Ain Temouchent, Algérie) par Prof. A. MAROUF (Centre Universitaire Salhi Ahmed, Naama, Algérie) et moi-même lors de différentes sorties botaniques. Le sous chapitre 3.1 donne des informations sur les conditions de récolte, de séchage, de broyage et d'extraction. La première étape consiste à broyer le matériel végétal (grâce à un broyeur à couteau muni d'un tamis) pour obtenir une poudre homogène. Deux méthodes d'extraction ont été réalisées, une extraction sous-reflux par l'eau distillée pour *P. atlantica* et une extraction par macération à froid par l'éthanol pour *S. lanatus* et *E. confusum*. Le résultat de ces méthodes d'extraction est montré dans le **tableau 4.1**.

**Tableau 4.1.** Extraits bruts préparés à partir de *P. atlantica*, *S. lanatus* et *E. confusum*.

Plantes	Origines	Organe (poids sec en g)	Méthodes d'extraction	Solvants d'extraction	Rendement (%)
<i>P. atlantica</i>	Ain Benkhelil	Feuilles (190 g)	Sous-reflux	H <sub>2</sub> O	28,65 %
<i>S. lanatus</i>	Tamzoura	Plante entière (2000 g)	Macération	EtOH	5,48 %
<i>E. confusum</i>	Tamzoura	Plante entière (2000 g)	Macération	EtOH	3,04 %

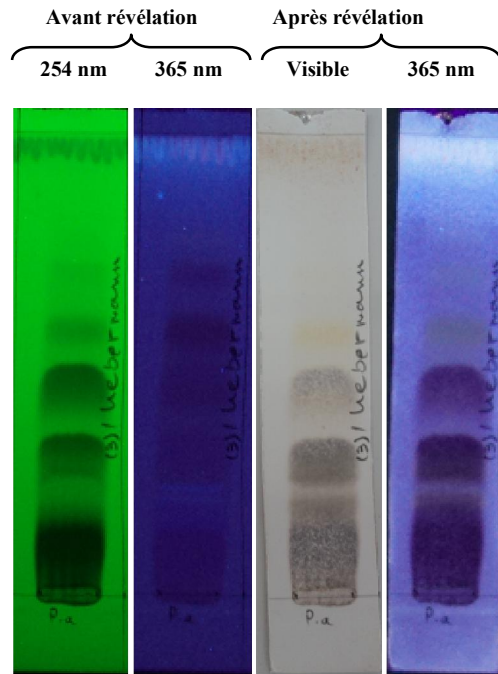
#### 4.2. Investigation phytochimique de l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica*

##### 4.2.1. Analyses CCM de l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica*

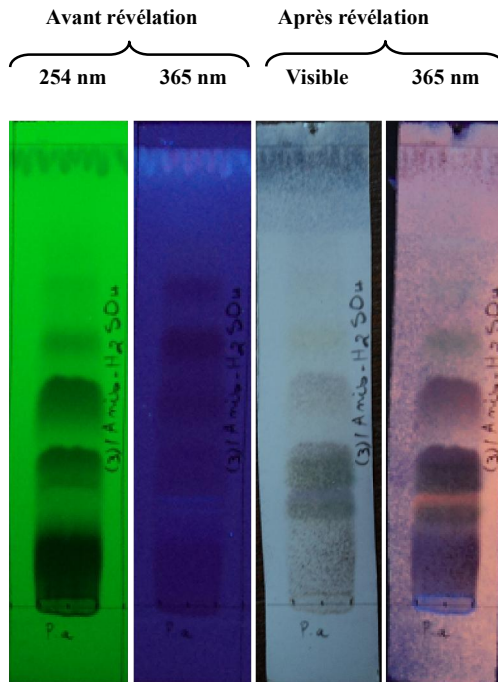
L'extrait brut obtenu après extraction sous-reflux par l'eau distillée a été solubilisé dans le méthanol à une concentration de 10 mg/mL. Afin d'avoir un aperçu général sur la composition en métabolites secondaires, l'extrait a été séparé sur CCM dont le protocole est décrit sous 3.2.1. L'observation des plaques CCM a été réalisée sous lampes UV 254 et 365 nm avant révélation ainsi qu'après révélation avec des réactifs chimiques spécifiques de chaque classe phytochimique voir **tableau 3.3** (Wagner et Bladt, 1996; Wagner *et al.*, 2011).

Le criblage phytochimique sur plaques CCM a permis de mettre en évidence la présence majoritairement des glycosides de flavonoïdes, acides phénoliques, tanins galliques et

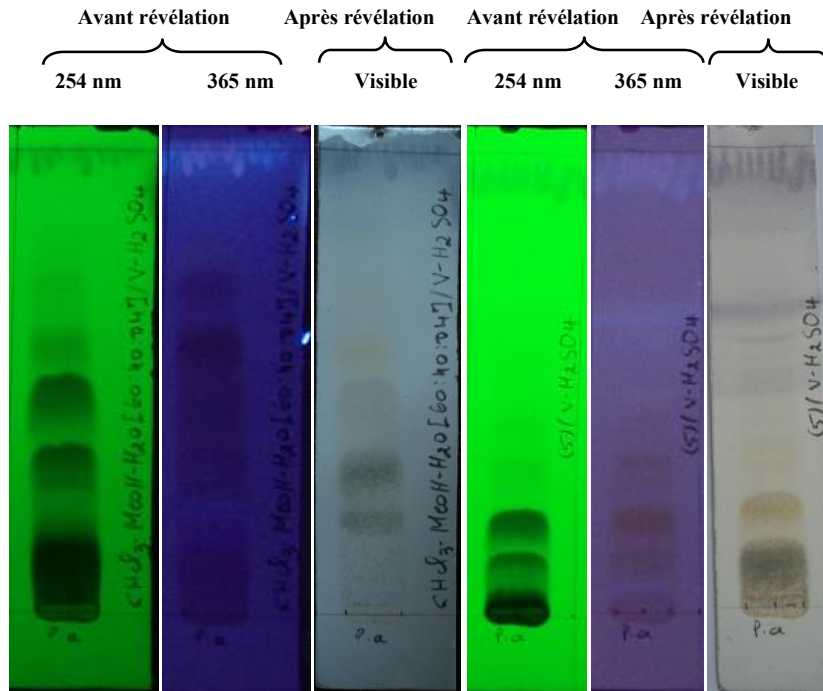
ellagiques. Les dérivés anthracéniques, lignanes, saponines, terpénoïdes et glycosides cardiotoniques ont été présents en faible abondance. Par contre, les alcaloïdes, coumarines, naphthoquinones, tanins catéchiques et sesquiterpènes lactones n'ont pas été détectés (figure de 4.1 à 4.11 et tableau 4.2).



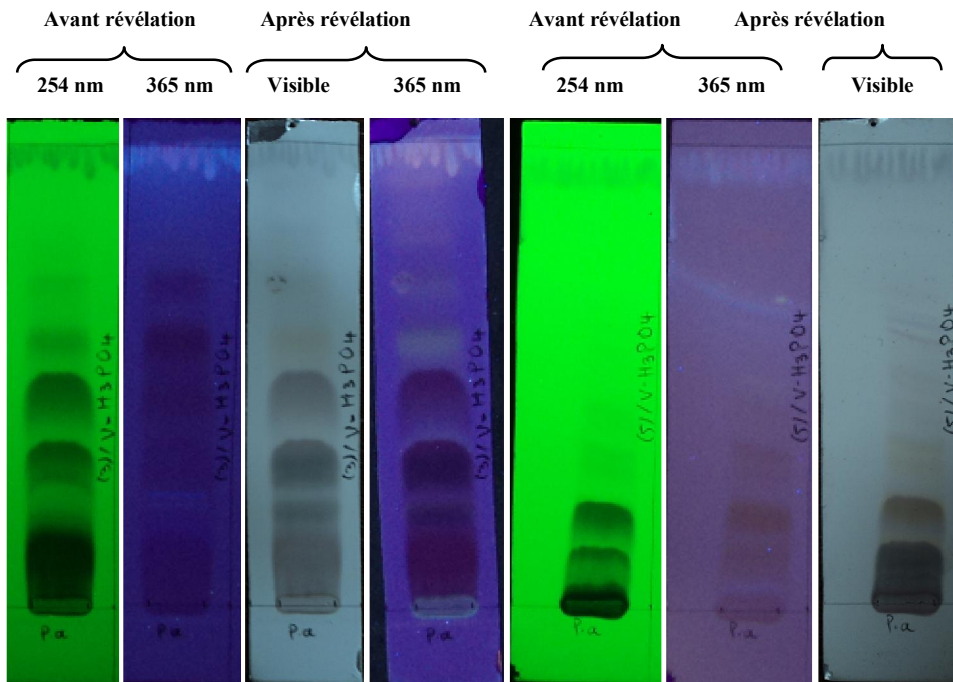
**Figure 4.1.** CCM de l'analyse des terpénoïdes avant et après révélation avec le Liebermann-burchard, système de migration N° 3, P.a. = *P. atlantica*.



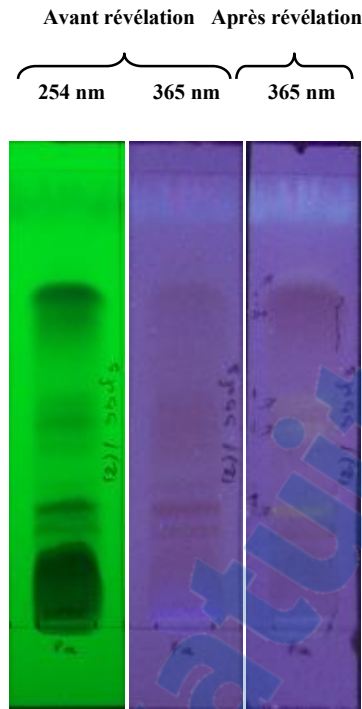
**Figure 4.2.** CCM de l'analyse des terpénoïdes avant et après révélation avec l'anisaldéhyde- $H_2SO_4$ , système de migration N° 3, P.a. = *P. atlantica*.



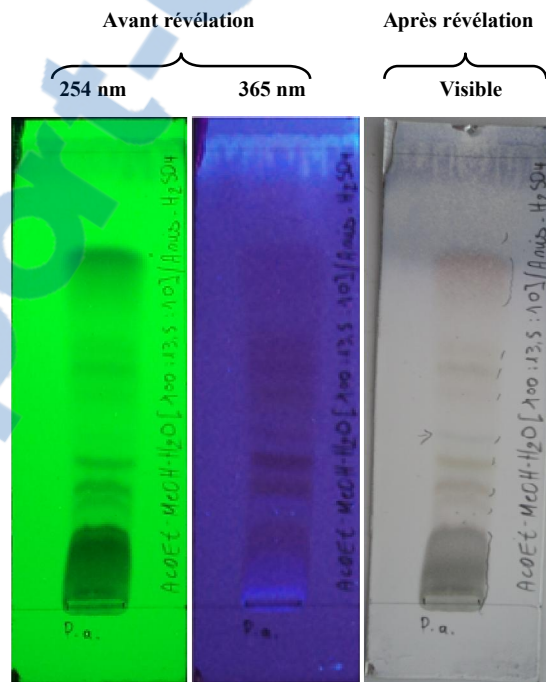
**Figure 4.3.** CCM de l'analyse des lignanes et terpénoïdes avant et après révélation avec la vanilline- $H_2SO_4$ , système de migration N° 3 et 5, P.a. = *P. atlantica*.



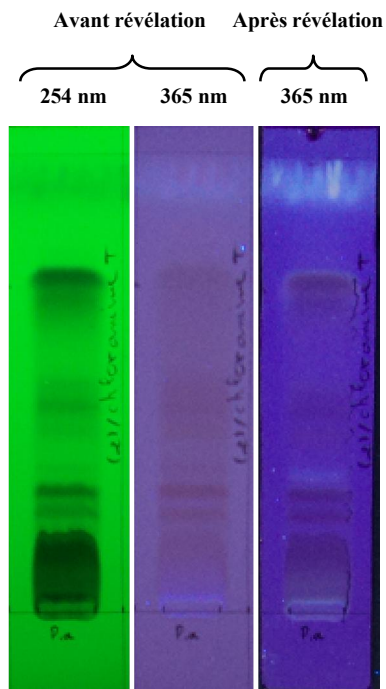
**Figure 4.4.** CCM de l'analyse des lignanes et terpénoïdes avant et après révélation avec la vanilline- $H_3PO_4$ , système de migration N° 3 et 5, P.a. = *P. atlantica*.



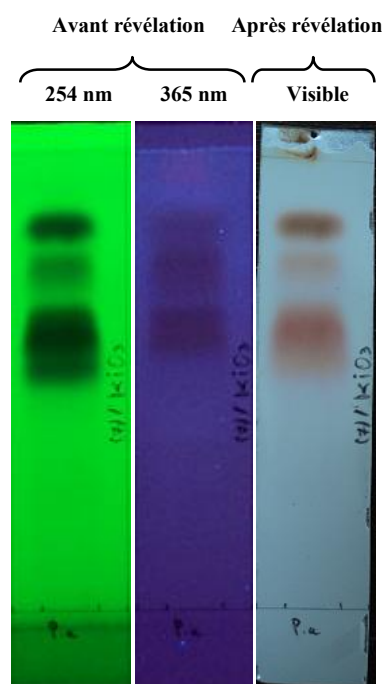
**Figure 4.5.** CCM de l'analyse des glycosides cardiotoniques avant et après révélation avec le  $SbCl_3$ , système de migration N° 2, P.a. = *P. atlantica*.



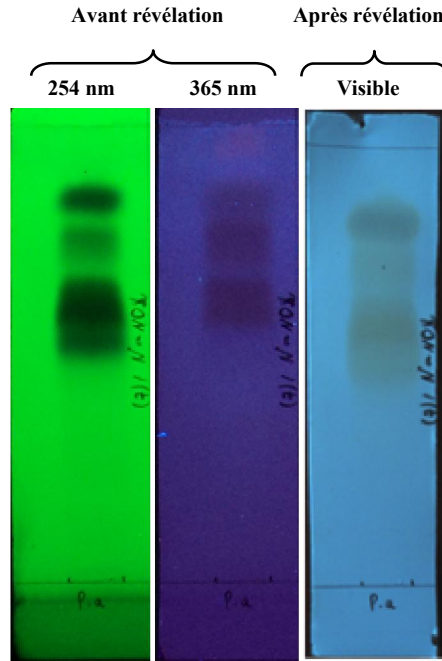
**Figure 4.6.** CCM de l'analyse des glycosides cardiotoniques avant et après révélation avec l'anisaldéhyde- $H_2SO_4$ , système de migration N° 2, P.a. = *P. atlantica*.



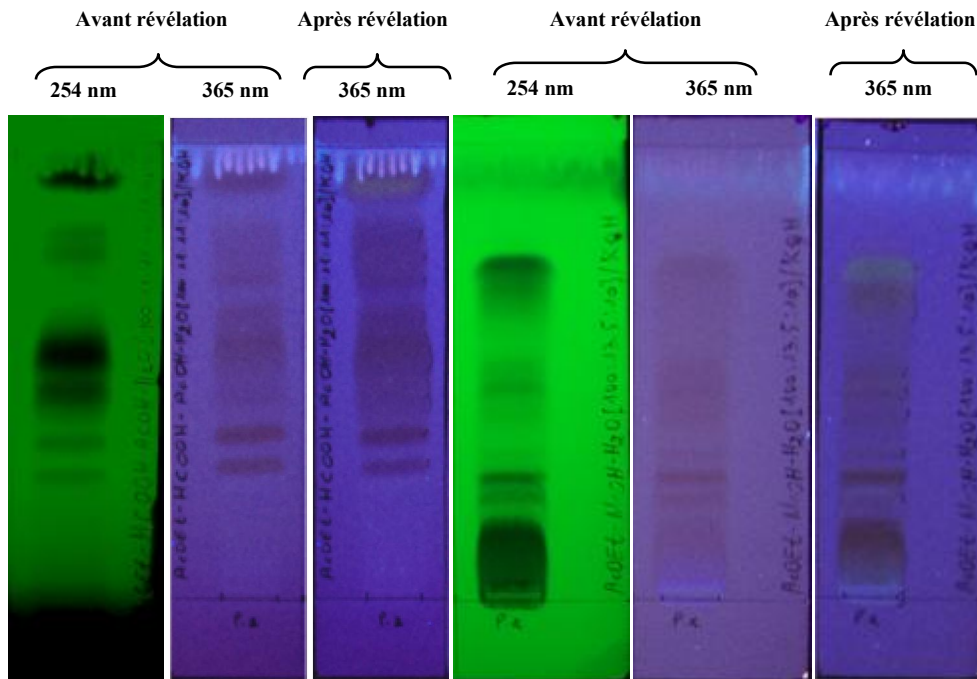
**Figure 4.7.** CCM de l'analyse des glycosides cardiotoniques avant et après révélation avec la chloramine-TCA, système de migration N° 2, P.a. = *P. atlantica*.



**Figure 4.8.** CCM de l'analyse des tanins galliques avant et après révélation avec le  $KiO_3$ , système de migration N° 7, P.a. = *P. atlantica*.



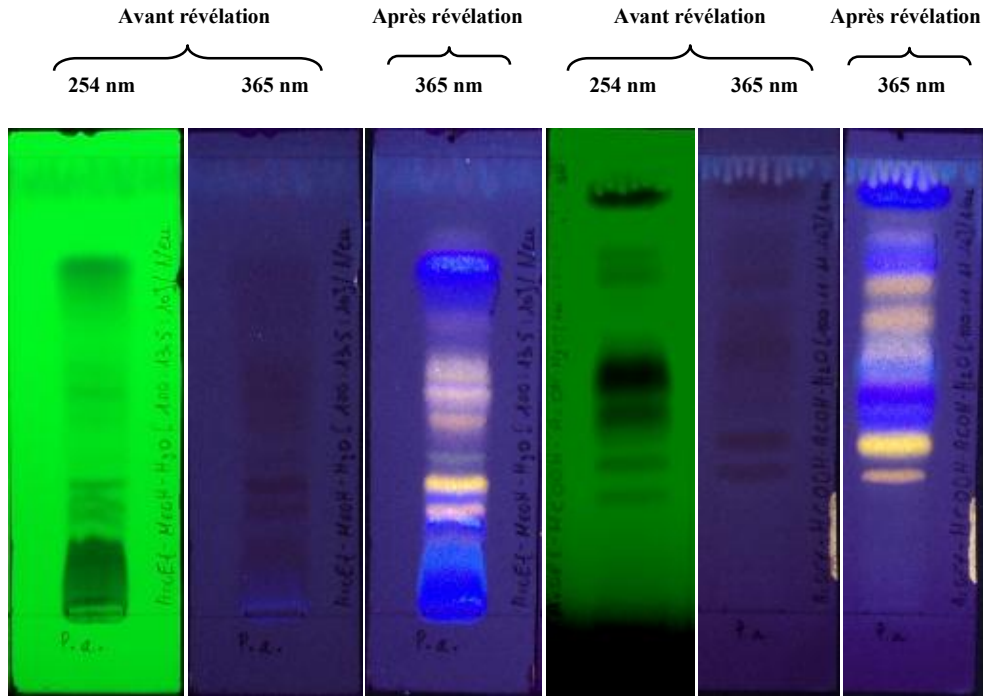
**Figure 4.9.** CCM de l'analyse des tanins ellagiques avant et après révélation avec le  $\text{NaNO}_2$ , système de migration N° 7, P.a. = *P. atlantica*.



**Figure 4.10.** CCM de l'analyse des dérivés anthracéniques avant et après révélation avec le  $\text{KOH}$ , système de migration N° 1 et 2, P.a. = *P. atlantica*.







**Figure 4.11.** CCM de l'analyse des flavonoïdes, acides phénoliques et dérivés anthracéniques avant et après révélation avec le Neu, système de migration N° 1 et 2, P.a. = *P. atlantica*.

**Tableau 4.2.** Récapitulatif du criblage phytochimique de l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica*.

Phytoconstituants	Résultats
Acides phénoliques	+++
Alcaloïdes	-
Coumarines	-
Dérivés anthracéniques	+
Flavonoïdes	+++
Glycosides cardiotoniques	+
Lignanes	+
Naphtoquinones	-
Saponines	+
Sesquiterpènes lactones	-
Tanins catéchiques	-
Tanins ellagiques	+++
Tanins galliques	+++
Terpénoides	+

-: absence, +: présence en faible quantité, ++: présence en moyenne quantité, +++: présence en grande quantité.



### **4.2.2. Analyses HPLC-DAD-UV et HPLC-API-ES-MS de l'extrait aqueux et fractions issus des feuilles de *P. atlantica***

#### **4.2.2.1. Extrait aqueux**

Les techniques HPLC-DAD-UV (**figure 4.12** et **4.13**) et HPLC-API-ES-MS (**figure 4.14**) ont permis d'obtenir des informations qualitatives sur la composition phytochimique de l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica*. Vingt-trois principaux métabolites secondaires ont été identifiés au moyen des données UV et MS (**tableau 4.3**), parmi lesquels douze produits (**1, 2, 4 à 6, 8, 9, 11, 17, 19, 23, 25**) sont caractérisés pour la première fois dans *P. atlantica*.

Le produit **1** a été caractérisé comme étant l'acide quinique sur la base de sa fragmentation. En fait, la décomposition de la molécule déprotonée à  $m/z$  191, conduit à la formation de l'ion de fragment à  $m/z$  173, correspondant à la perte d'une molécule d'eau ( $-H_2O$ ) (**Pacifico et al., 2014**).

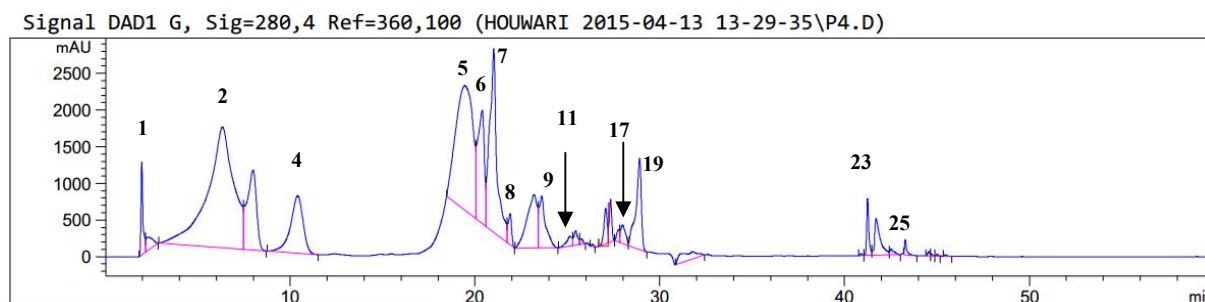
Les produits **2** et **4** sont des dérivés de l'acide quinique, et en particulier, ils ont été identifiés comme des isomères d'acide galloylquinique, montrant un ion pseudomoléculaire déprotoné à  $m/z$  343, qui à son tour génère un ion à  $m/z$  191 correspondant à la perte d'un résidu de l'acide gallique (**Rodríguez-Pérez et al., 2013; Pacifico et al., 2014**).

L'extrait aqueux contient également deux pics caractérisés par un ion pseudomoléculaire déprotoné à  $m/z$  495 (produits **5** et **6**). La fragmentation de l'ion  $[M-H]^-$  à  $m/z$  495 a fourni le fragment à  $m/z$  343 ( $[M-H-152]^-$ ), correspondant à la perte d'une moitié galloyl. Sur la base de ces données expérimentales, ces produits ont été identifiés comme des isomères de l'acide digalloylquinique (**Rodríguez-Pérez et al., 2013; Pacifico et al., 2014**).

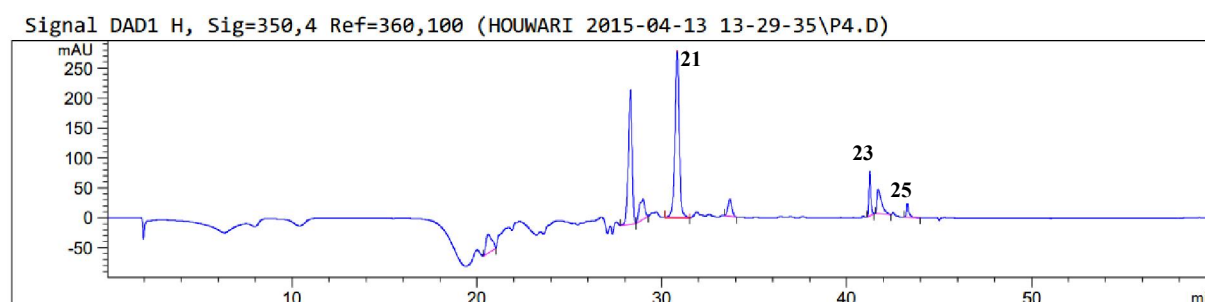
Le produit **7** a montré un ion pseudomoléculaire déprotoné à  $m/z$  183, la fragmentation de cet ion a produit un ion à  $m/z$  124 ( $[M-H-59]^-$ ), selon la littérature ce produit correspond au méthyle gallate (**Rodríguez-Pérez et al., 2013**) précédemment isolé de l'extrait hexanique des feuilles de *P. atlantica* par **Yousfi et al. (2009)**.

Le métabolite **8** a montré un ion moléculaire à  $m/z$  321. En se basant sur la fragmentation qui libère un ion à  $m/z$  169 correspondant à l'acide gallique et à la littérature, ce produit a été assigné à l'acide digallique (**Abu-Reidah et al., 2015**).

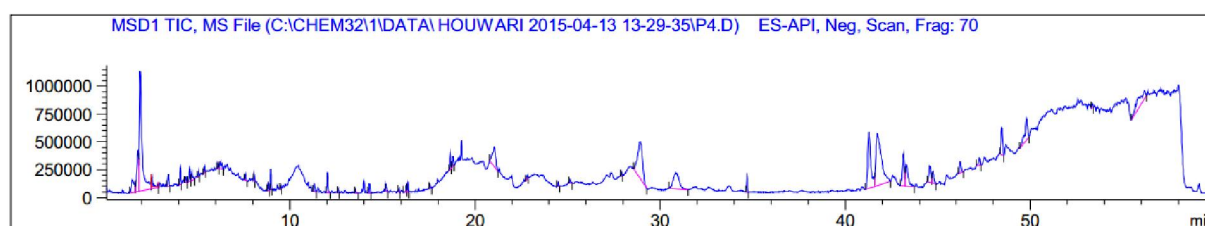
Le produit **9**, avec l'ion  $[M-H]^-$  pseudomoléculaire à  $m/z$  647, a été identifié comme l'acide trigalloylquinique (par exemple, Pistafoline A). Le fragment à  $m/z$  495 correspond à une perte d'une molécule d'acide gallique (**Rodríguez-Pérez et al., 2013; Remila et al., 2015**).



**Figure 4.12.** Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 280 nm de l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica*. Conditions expérimentales décrites sous 3.2.2.



**Figure 4.13.** Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 350 nm de l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica*. Conditions expérimentales décrites sous 3.2.2.



**Figure 4.14.** Chromatogramme HPLC-API-ES-MS de l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica*. Conditions expérimentales décrites sous 3.2.3.

L'ion fragment à  $m/z$  321 résulte après la perte de la moitié de l'acide gallique à partir d'un ion principal à  $m/z$  473 dans l'analyse HPLC-API-ES-MS du produit **11**. Ce dernier a été identifié comme étant l'acide trigallique (**Abu-Reidah et al., 2015**).

Les molécules **17** et **19** ont montré un ion déprotoné pseudomoléculaire à  $m/z$  335 et un ion fragment caractéristique à  $m/z$  183, qui ont permis de les identifier comme des isomères

du méthyle digallate sur la base des données de la littérature (**Pacifico et al., 2014; Abu-Reidah et al., 2015**).

Sur la base de leur motif de fragmentation, le métabolite **21** a été identifié comme un diglycoside de la quercétine, la rutine (m/z 609). L'ion produit à m/z 301 correspond à la quercétine déprotonée (**Pacifico et al., 2014**). La rutine a été identifiée par **Kawashty et al. (2000)** dans l'extrait hydroéthanolique de *P. atlantica*.

Il a été rapporté dans la littérature que la famille Anacardiaceae est caractérisée par la présence des dérivés de l'acide gallique et la myricétine (**Romani et al., 2002; Tian et al., 2009**). En plus, il est bien documenté que les espèces de *Pistacia* constituent une source riche d'acides phénoliques, de flavonoïdes et de tanins (**Balan et al., 2007; Longo et al., 2007; López-Lázaro, 2009; Bhourri et al., 2010; Azaizeh et al., 2013**). Nos données confirment ces preuves. En effet, à côté des dérivés de l'acide gallique discutés ci-dessus, l'extrait aqueux de *P. atlantica* contient également un dérivé de la myricétine (produit **23**). En particulier, le produit **23** (m/z 631) a été caractérisé par la présence d'une moitié galloylhexoside suite à une perte de 314 Da. Il a été identifié comme étant myricétine galloylhexoside (**Abu-Reidah et al., 2015**). L'ion fragment à m/z 317 correspond à la myricétine.

Le produit **25** a été caractérisé comme quercitrine-*O*-gallate, selon le fragment observé. En effet, on a montré un ion moléculaire déprotoné à m/z 599, qui a abouti à un ion fragment à m/z 301 (quercétine déprotoné), en raison de la perte de la moitié galloyldésoxyhexoside (**Rodríguez-Pérez et al., 2013**).

**Tableau 4.3.** Temps de rétention (TR), longueurs d'ondes d'absorption maximale ( $\lambda_{\max}$ ), spectre de masse, tentatives d'identification et formules moléculaires des produits présents dans l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica*.

Pics N°	TR (min)	UV $\lambda_{\max}$ (nm)	[MS-H] <sup>-</sup> (m/z)	Autres ions (m/z)	Composés proposés	Formules moléculaires	Références
1	1,966	220	191	173	Acide quinique	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	<b>Pacifico et al., 2014</b>
2	6,331	275	343	191	Acide galloylquinique (isomère 1)	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	<b>Rodríguez-Pérez et al., 2013; Pacifico et al., 2014</b>
3	7,986	270	974	169	Dérivé de l'acide gallique	-	-
4	10,399	275	343	191	Acide galloylquinique (isomère 2)	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	<b>Rodríguez-Pérez et al., 2013; Pacifico et al., 2014</b>
5	19,449	274	495	343	Acide digalloylquinique (isomère 1)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub>	<b>Rodríguez-Pérez et al., 2013; Pacifico</b>

6	20,393	274	495	343	Acide digalloylquinique (isomère 2)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub>	<i>et al.</i> , 2014 Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> , 2013; Pacifico <i>et al.</i> , 2014
7	21,013	272	183	124	Méthyle gallate	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> , 2013
8	21,902	271	321	169	Acide digallique	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	Abu-Reidah <i>et al.</i> , 2015
9	23,198	277	647	495	Acide trigalloylquinique (Pistafoline A)	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>18</sub>	Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> , 2013; Remila <i>et al.</i> , 2015
10	23,615	275	509	-	Dérivé de l'acide gallique	-	-
11	25,141	275	473	321	Acide trigallique	C <sub>21</sub> H <sub>14</sub> O <sub>13</sub>	Abu-Reidah <i>et al.</i> , 2015
12	25,446	272	365	-	Dérivé de l'acide gallique	-	-
13	25,749	277	-	-	Dérivé de l'acide gallique	-	-
14	27,070	281	-	-	Dérivé de l'acide gallique	-	-
15	27,331	281	-	-	Dérivé de l'acide gallique	-	-
16	27,768	281	-	-	Dérivé de l'acide gallique	-	-
17	27,987	282	335	183	Méthyle digallate (isomère 1)	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>	Pacifico <i>et al.</i> , 2014; Abu-Reidah <i>et al.</i> , 2015
18	28,311	260, 360	-	-	Inconnu	-	-
19	28,908	281	335	183	Méthyle digallate (isomère 2)	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>	Abu-Reidah <i>et al.</i> , 2015
20	28,983	270	-	-	Dérivé de l'acide gallique	-	-
21	30,833	258, 355	609	301	Rutine	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	Pacifico <i>et al.</i> , 2014
22	33,682	266, 350	-	-	Dérivé du quercétine	-	Remila <i>et al.</i> , 2015
23	41,245	275, 355	631	317	Myricétine galloylhexoside	C <sub>29</sub> H <sub>28</sub> O <sub>16</sub>	Abu-Reidah <i>et al.</i> , 2015
24	41,705	242, 289, 329	543	271	Inconnu	-	-
25	43,285	263, 355	599	301	Quercitrine- <i>O</i> -gallate	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>15</sub>	Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> , 2013

Tableau 4.3 suite.

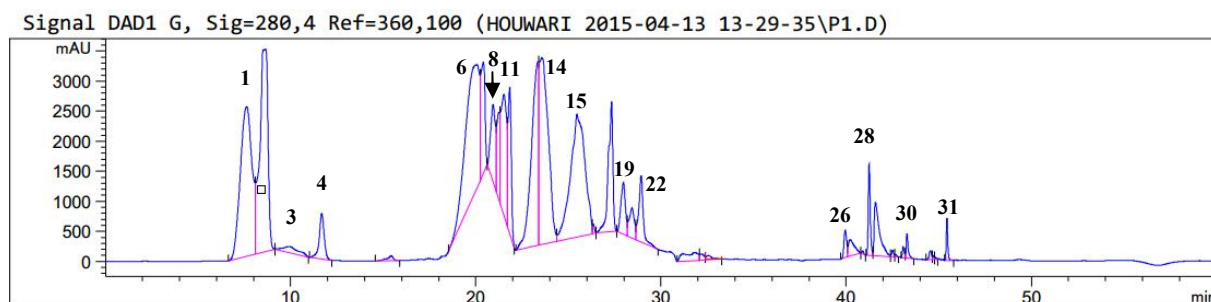
#### 4.2.2.2. Fraction acétate d'éthyle

Vingt six produits ont été identifiés au moyen des données UV et MS (figure 4.15 à 4.17 et tableau 4.4). Parmi lesquels onze produits (3, 4, 6, 11, 14, 15, 19, 22, 26, 28, 30) sont caractérisés pour la première fois dans *P. atlantica*.

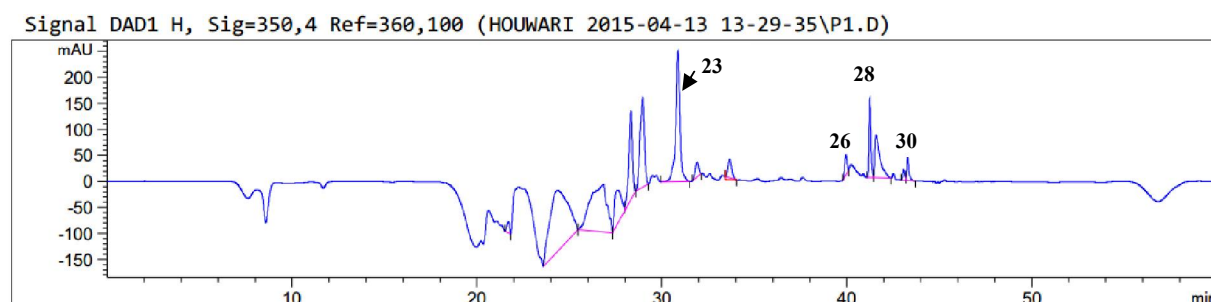
L'acide gallique (produit 1) a été caractérisé par l'ion moléculaire à m/z 169 et le fragment produit à m/z 125 qui correspond à une décarboxylation du groupe galloyl (Remila *et al.*, 2015). L'acide gallique a été précédemment isolé de l'extrait hexanique des feuilles de *P. atlantica* par Yousfi *et al.* (2009).

Les produits **3** et **4** ont été identifiés comme des isomères d'acide galloylquinique (**Rodríguez-Pérez *et al.*, 2013; Pacifico *et al.*, 2014**). Ils ont les mêmes caractéristiques des produits **2** et **4** de l'extrait aqueux (**tableau 4.3**).

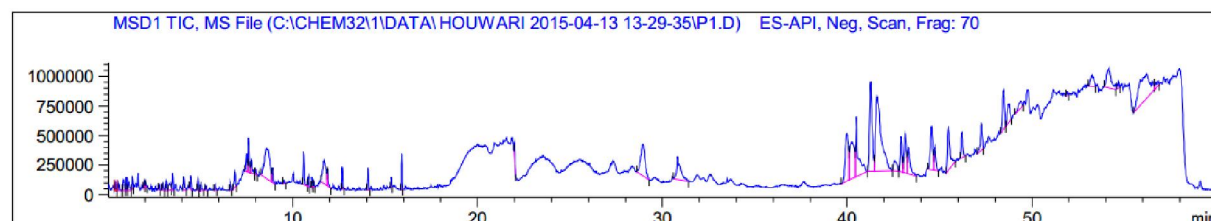
Le produit **6** a été identifié comme un isomère de l'acide digalloylquinique (**Rodríguez-Pérez *et al.*, 2013; Pacifico *et al.*, 2014**) avec les mêmes caractéristiques du produit **6** de l'extrait aqueux (**tableau 4.3**).



**Figure 4.15.** Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 280 nm de la fraction acétate d'éthyle. Conditions expérimentales décrites sous 3.2.2.



**Figure 4.16.** Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 350 nm de la fraction acétate d'éthyle. Conditions expérimentales décrites sous 3.2.2.



**Figure 4.17.** Chromatogramme HPLC-API-ES-MS de la fraction acétate d'éthyle. Conditions expérimentales décrites sous 3.2.3.

Le méthyle gallate correspond au produit **8** (**Rodríguez-Pérez *et al.*, 2013**) qui présente des caractéristiques identiques à celles du produit **7** de l'extrait aqueux (**tableau 4.3**). Ce

produit a été précédemment isolé de l'extrait hexanique des feuilles de *P. atlantica* par **Yousfi et al. (2009)**.

Le métabolite **11** a été caractérisé comme étant l'acide digallique (**Abu-Reidah et al., 2015**) avec les mêmes caractéristiques du produit **8** de l'extrait aqueux (**tableau 4.3**).

L'acide trigallique correspond à la molécule **14** (**Abu-Reidah et al., 2015**) avec des informations structurales similaires à celles du produit **11** de l'extrait aqueux (**tableau 4.3**).

Le pic **15** présente un modèle de fragmentation indiqué dans le **tableau 4.4**. L'ion moléculaire observé à m/z 799 ainsi que le fragment produit à m/z 647 qui correspond à une perte d'une unité d'acide gallique, indique que le pic **15** est l'acide tetragalloylquinique (**Sannomiya et al., 2005**).

Les produits **19** et **22** sont identifiés comme des isomères du méthyle digallate (**Pacifico et al., 2014; Abu-Reidah et al., 2015**) avec des caractéristiques similaires aux produits **17** et **19** de l'extrait aqueux (**tableau 4.3**).

Le pic **23** correspond à la rutine similaire dans les informations structurales avec le produit **21** de l'extrait aqueux (**tableau 4.3**). La rutine a été identifiée par **Kawashty et al. (2000)** dans l'extrait hydroéthanolique de *P. atlantica*.

Les produits **26** et **28** sont des isomères de myricétine galloylhexoside avec des ions moléculaires et fragments identiques à ceux du produit **23** de l'extrait aqueux de *P. atlantica* (**Abu-Reidah et al., 2015**).

Le métabolite **30** correspond à la quercitrine-*O*-gallate (**Rodríguez-Pérez et al., 2013**), ce produit a été aussi identifié dans l'extrait aqueux de *P. atlantica* (produit **25**, **tableau 4.3**).

**Tableau 4.4.** Temps de rétention (TR), longueurs d'ondes d'absorption maximale ( $\lambda_{max}$ ), spectres de masse, tentatives d'identification et formules moléculaires des produits présents dans la fraction acétate d'éthyle issue de l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica*.

Pics N°	TR (min)	UV $\lambda_{max}$ (nm)	[MS-H] <sup>+</sup> (m/z)	Autres ions (m/z)	Composés proposés	Formules moléculaires	Références
1	7,623	270	169	125	Acide gallique	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	<b>Remila et al., 2015</b>
2	8,643	270	769	169	Dérivé de l'acide gallique	-	-
3	9,909	275	343	191	Acide galloylquinique (isomère 1)	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	<b>Rodríguez-Pérez et al., 2013; Pacifico et al.,</b>

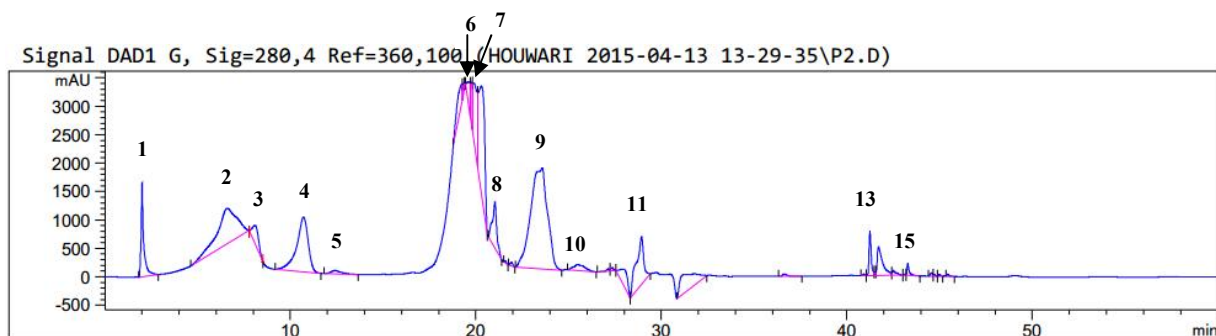
							2014
4	11,680	273	343	191	Acide galloylquinique (isomère 2)	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> , 2013; Pacifico <i>et al.</i> , 2014
5	15,428	260, 294	270	-	Inconnu	-	-
6	20,058	274	495	343	Acide digalloylquinique	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub>	Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> , 2013; Pacifico <i>et al.</i> , 2014
7	20,410	273	-	-	Dérivé de l'acide gallique	-	-
8	20,933	272	183	124	Méthyle gallate	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> , 2013
9	21,254	270	-	-	Dérivé de l'acide gallique	-	-
10	21,521	270	-	-	Dérivé de l'acide gallique	-	-
11	21,834	272	321	169	Acide digallique	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	Abu-Reidah <i>et al.</i> , 2015
12	23,370	277	-	-	Dérivé de l'acide gallique	-	-
13	23,571	273	-	-	Dérivé de l'acide gallique	-	-
14	24,351	273	473	321	Acide trigallique	C <sub>21</sub> H <sub>14</sub> O <sub>13</sub>	Abu-Reidah <i>et al.</i> , 2015
15	25,459	273	799	647	Acide tetragalloylquinique	C <sub>35</sub> H <sub>28</sub> O <sub>22</sub>	Sannomiya <i>et al.</i> , 2005
16	26,828	241	-	-	Inconnu	-	-
17	27,332	281	-	-	Dérivé de l'acide gallique	-	-
18	27,606	242	-	-	Inconnu	-	-
19	27,971	282	335	183	Méthyle digallate (isomère 1)	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>	Pacifico <i>et al.</i> , 2014; Abu-Reidah <i>et al.</i> , 2015
20	28,328	265, 300, 358	-	-	Dérivé du quercétine	-	Remila <i>et al.</i> , 2015
21	28,435	265, 300, 358	-	-	Dérivé du quercétine	-	Remila <i>et al.</i> , 2015
22	28,929	282	335	183	Méthyle digallate (isomère 2)	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>	Abu-Reidah <i>et al.</i> , 2015
23	30,871	258, 355	609	301	Rutine	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	Pacifico <i>et al.</i> , 2014
24	31,905	258, 350	-	-	Dérivé du myricétine	-	Remila <i>et al.</i> , 2015
25	33,667	266, 350	-	-	Dérivé du quercétine	-	Remila <i>et al.</i> , 2015
26	39,951	275, 355	631	317	Myricétine galloylhexoside (isomère 1)	C <sub>29</sub> H <sub>28</sub> O <sub>16</sub>	Abu-Reidah <i>et al.</i> , 2015
27	40,217	240, 288, 329	543	271	Inconnu	-	-
28	41,240	275, 355	631	317	Myricétine galloylhexoside (isomère 2)	C <sub>29</sub> H <sub>28</sub> O <sub>16</sub>	Abu-Reidah <i>et al.</i> , 2015
29	41,583	242, 289, 329	543	271	Inconnu	-	-
30	43,285	263, 355	599	301	Quercitrine- <i>O</i> -gallate	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>15</sub>	Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> , 2013
31	45,442	277	251	205	Dérivé de l'acide gallique	-	-

Tableau 4.4 suite.

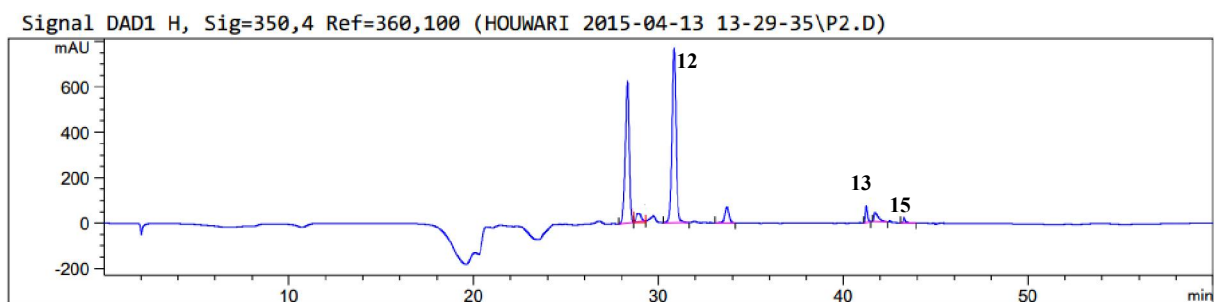


### 4.2.2.3. Fraction n-butanol

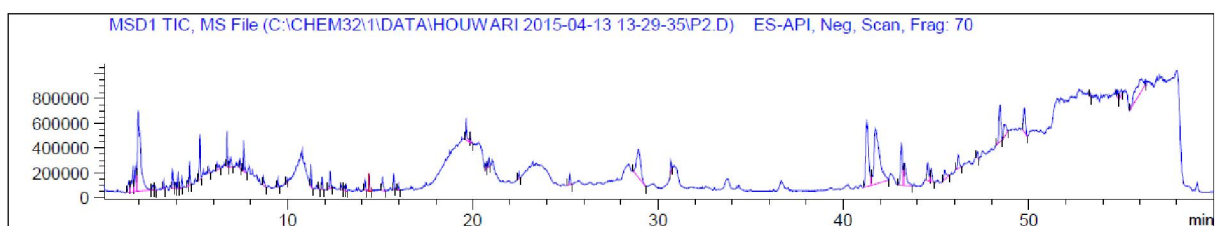
Quatorze produits ont été identifiés par les techniques UV et MS (figure 4.18 à 4.20 et tableau 4.5). Parmi lesquels douze produits (1, 2, 4 à 7, 9 à 13, 15) sont caractérisés pour la première fois dans *P. atlantica*.



**Figure 4.18.** Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 280 nm de la fraction n-butanol. Conditions expérimentales décrites sous 3.2.2.



**Figure 4.19.** Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 350 nm de la fraction n-butanol. Conditions expérimentales décrites sous 3.2.2.



**Figure 4.20.** Chromatogramme HPLC-API-ES-MS de la fraction n-butanol. Conditions expérimentales décrites sous 3.2.3.

Le métabolite 1 montre un ion déprotoné pseudomoléculaire à  $m/z$  331. Sur la base des données MS, comparativement à ceux qui sont présentes dans la littérature (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2013; Pacifico *et al.*, 2014), le métabolite 1 a été identifié comme isomère de glucogalline (ou isomère de galloylhexoside). En fait, la fragmentation de l'ion précurseur à  $m/z$  331 conduit à la formation d'ion compatible avec cette hypothèse, à savoir l'ion fragment



à m/z 169 ([M-H-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>]<sup>-</sup>) pourrait être due à la perte du résidu d'hexose, et pourrait par conséquent être attribuée à l'acide gallique déprotoné.

Les pics **2-13**, **15** correspondent respectivement à l'acide galloylquinique (isomère 1), acide gallique, acide galloylquinique (isomère 2), acide galloylquinique (isomère 3), acide digalloylquinique (isomère 1), acide digalloylquinique (isomère 2), méthyle gallate, acide trigalloylquinique (Pistafoline A), méthyle digallate (isomère 1), méthyle digallate (isomère 2), rutine, myricétine galloylhexoside, et quercitrine-*O*-gallate (**Rodríguez-Pérez et al., 2013; Pacifico et al., 2014; Abu-Reidah et al., 2015; Remila et al., 2015**), dont les interprétations et les informations structurales sont identiques à celles des produits identifiés dans l'extrait aqueux et la fraction acétate d'éthyle de *P. atlantica* (**tableau 4.3 et 4.4**).

**Tableau 4.5.** Temps de rétention (TR), longueurs d'ondes d'absorption maximale ( $\lambda_{\max}$ ), spectres de masse, tentatives d'identification et formules moléculaires des produits présents dans la fraction n-butanol issue de l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica*.

Pics N°	TR (min)	UV $\lambda_{\max}$ (nm)	[MS-H] <sup>-</sup> (m/z)	Autres ions (m/z)	Composés proposés	Formules moléculaires	Références
1	2,005	273	331	169	Glucogalline	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	Rodríguez-Pérez et al., 2013; Pacifico et al., 2014
2	6,606	274	343	191	Acide galloylquinique (isomère 1)	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	Rodríguez-Pérez et al., 2013; Pacifico et al., 2014
3	8,087	270	169	125	Acide gallique	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	Remila et al., 2015
4	10,708	273	343	191	Acide galloylquinique (isomère 2)	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	Rodríguez-Pérez et al., 2013; Pacifico et al., 2014
5	12,397	273	343	191	Acide galloylquinique (isomère 3)	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	Pacifico et al., 2014
6	19,641	277	495	343	Acide digalloylquinique (isomère 1)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub>	Pacifico et al., 2014
7	19,846	274	495	343	Acide digalloylquinique (isomère 2)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub>	Pacifico et al., 2014
8	21,030	272	183	124	Méthyle gallate	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	Rodríguez-Pérez et al., 2013
9	23,583	272	647	495	Acide trigalloylquinique (Pistafoline A)	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>18</sub>	Rodríguez-Pérez et al., 2013; Remila et al., 2015
10	25,475	282	335	183	Méthyle digallate (isomère 1)	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>	Pacifico et al., 2014; Abu-Reidah et al., 2015
11	28,909	282	335	183	Méthyle digallate (isomère 2)	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>	Abu-Reidah et al., 2015
12	30,838	258, 355	609	301	Rutine	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	Pacifico et al., 2014
13	41,247	275, 355	631	317	Myricétine galloylhexoside	C <sub>29</sub> H <sub>28</sub> O <sub>16</sub>	Abu-Reidah et al., 2015

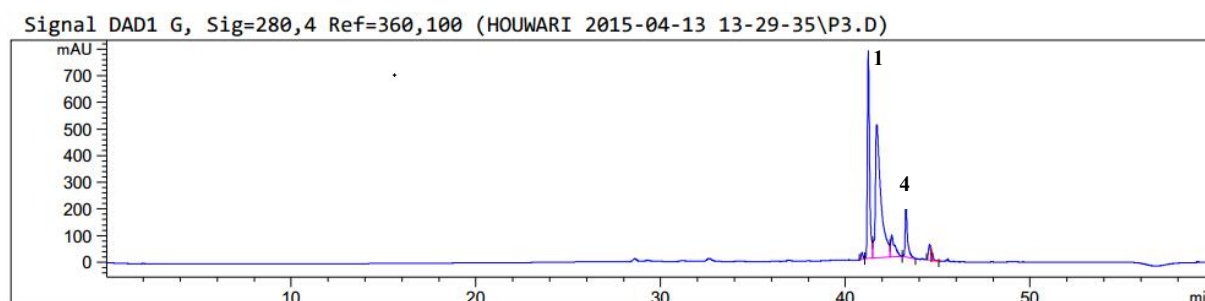
14	41,712	242, 289, 329	543	271	Inconnu	-	-
15	43,287	263, 355	599	301	Quercitrine- <i>O</i> -gallate	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>15</sub>	Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> , 2013

Tableau 4.5 suite.

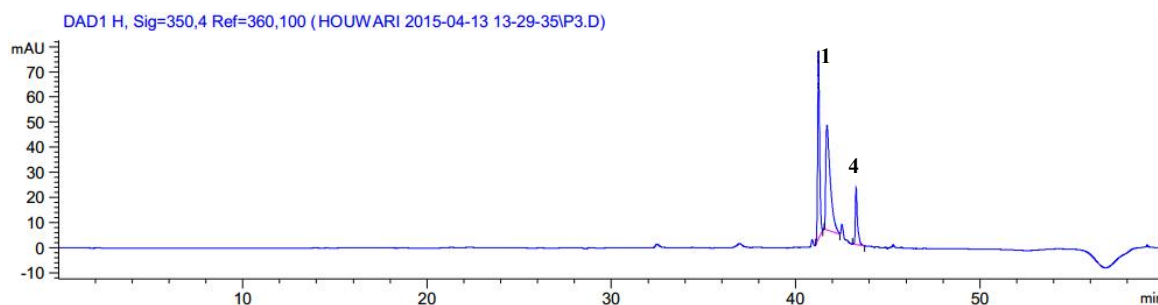
#### 4.2.2.4. Fraction aqueuse

Trois métabolites ont été identifiés par les techniques UV et MS (figure 4.21 à 4.23 et tableau 4.6). Parmi lesquels deux produits (**1** et **4**) sont caractérisés pour la première fois dans *P. atlantica*.

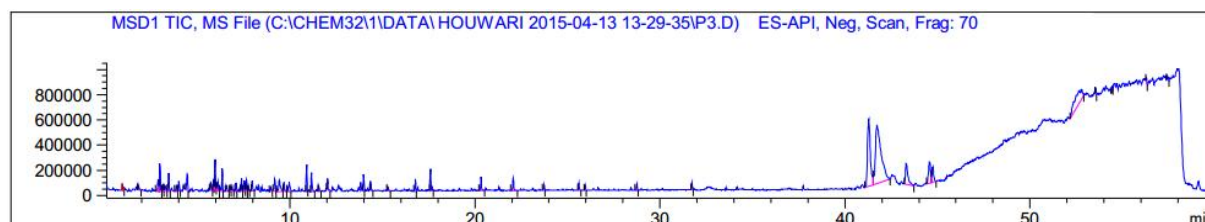
Les pics **1** et **4** correspondent respectivement à la myricétine galloylhexoside et la quercitrine-*O*-gallate (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2013; Abu-Reidah *et al.*, 2015).



**Figure 4.21.** Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 280 nm de la fraction aqueuse issue de l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica*. Conditions expérimentales décrites sous 3.2.2.



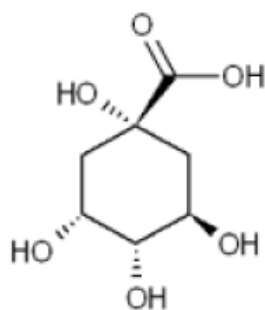
**Figure 4.22.** Chromatogramme HPLC-DAD-UV à 350 nm de la fraction aqueuse issue de l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica*. Conditions expérimentales décrites sous 3.2.2.



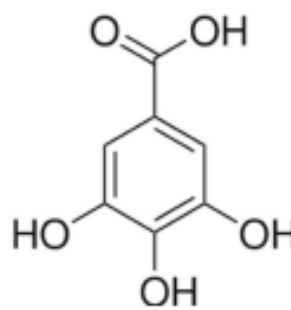
**Figure 4.23.** Chromatogramme HPLC-API-ES-MS de la fraction aqueuse issue de l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica*. Conditions expérimentales décrites sous 3.2.3.

**Tableau 4.6.** Temps de rétention (TR), longueurs d'ondes d'absorption maximale ( $\lambda_{\max}$ ), spectres de masse, tentatives d'identification et formules moléculaires des produits présents dans la fraction aqueuse issue de l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica*.

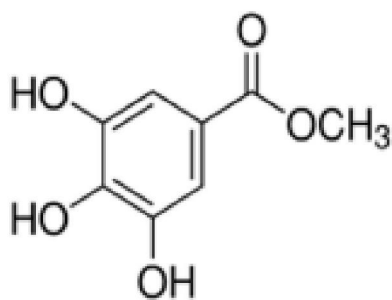
Pics N°	TR (min)	UV $\lambda_{\max}$ (nm)	[MS-H] <sup>-</sup> (m/z)	Autres ions (m/z)	Composés proposés	Formules moléculaires	Références
1	41,244	275, 355	631	317	Myricétine galloylhexoside	C <sub>29</sub> H <sub>28</sub> O <sub>16</sub>	Abu-Reidah <i>et al.</i> , 2015
2	41,703	242, 289, 329	543	271	Inconnu	-	-
3	42,513	242, 289, 329	543	271	Inconnu	-	-
4	43,284	263, 355	599	301	Quercitrine-O-gallate	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>15</sub>	Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> , 2013
5	44,568	279	385	277	Dérivé de l'acide gallique	-	-



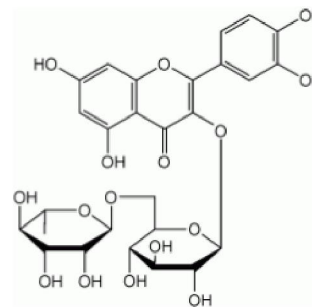
Acide quinique



Acide gallique



Méthyle gallate



Rutine

**Figure 4.24.** Structures de quelques produits identifiés par HPLC-DAD-UV et HPLC-API-ES-MS dans l'extrait aqueux et fractions des feuilles de *P. atlantica*.

4.2.3. Fractionnement bio-guidé de l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica* et isolement des produits I-VIII

Dans le but d'isoler des produits actifs de l'extrait aqueux de *P. atlantica* ayant présenté une activité inhibitrice de l'AChE par bioautographie et en solution, il a été décidé de le fractionner par différentes techniques chromatographiques. Les différentes étapes de purification ont été guidées par les résultats de l'activité anticholinestérasique obtenus par bioautographie à chaque étape.

L'extrait a été dissous dans l'eau distillée, après une bonne solubilisation, l'extrait a été mis dans une ampoule à décanter et soumis à une série de partage liquide-liquide par des solvants organiques non miscibles avec l'eau et de polarité croissante: hexane, chloroforme (CHCl<sub>3</sub>), acétate d'éthyle (AcOEt) et n-butanol (n-BuOH). Quatre phases organiques sont alors obtenues après une évaporation à 40 °C par un évaporateur rotatif plus une phase aqueuse résiduelle (aq ou H<sub>2</sub>O) qui est lyophilisée (tableau 4.7 et figure 4.25 et 4.26).

Tableau 4.7. Rendement du partage liquide-liquide de l'extrait aqueux de *P. atlantica*.

Extrait aqueux	Fr. aq	Fr. n-BuOH	Fr. AcOEt	Fr. CHCl <sub>3</sub>	Fr. hexane
53 g	15,521 g	16,663 g	16,246 g	3,358 g	0,913 g

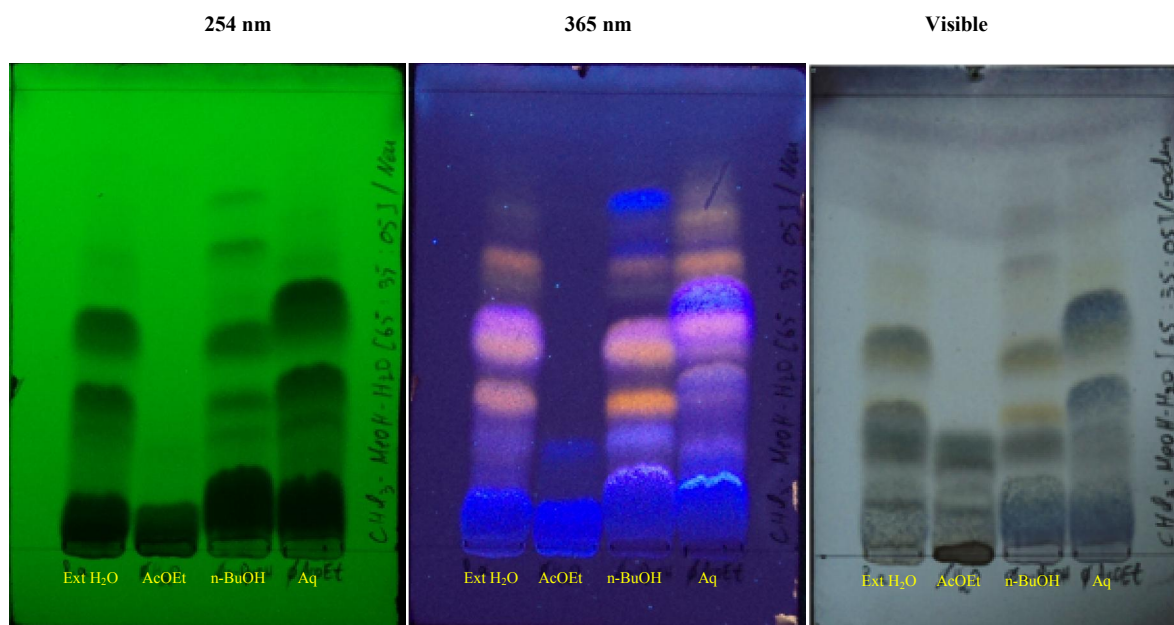
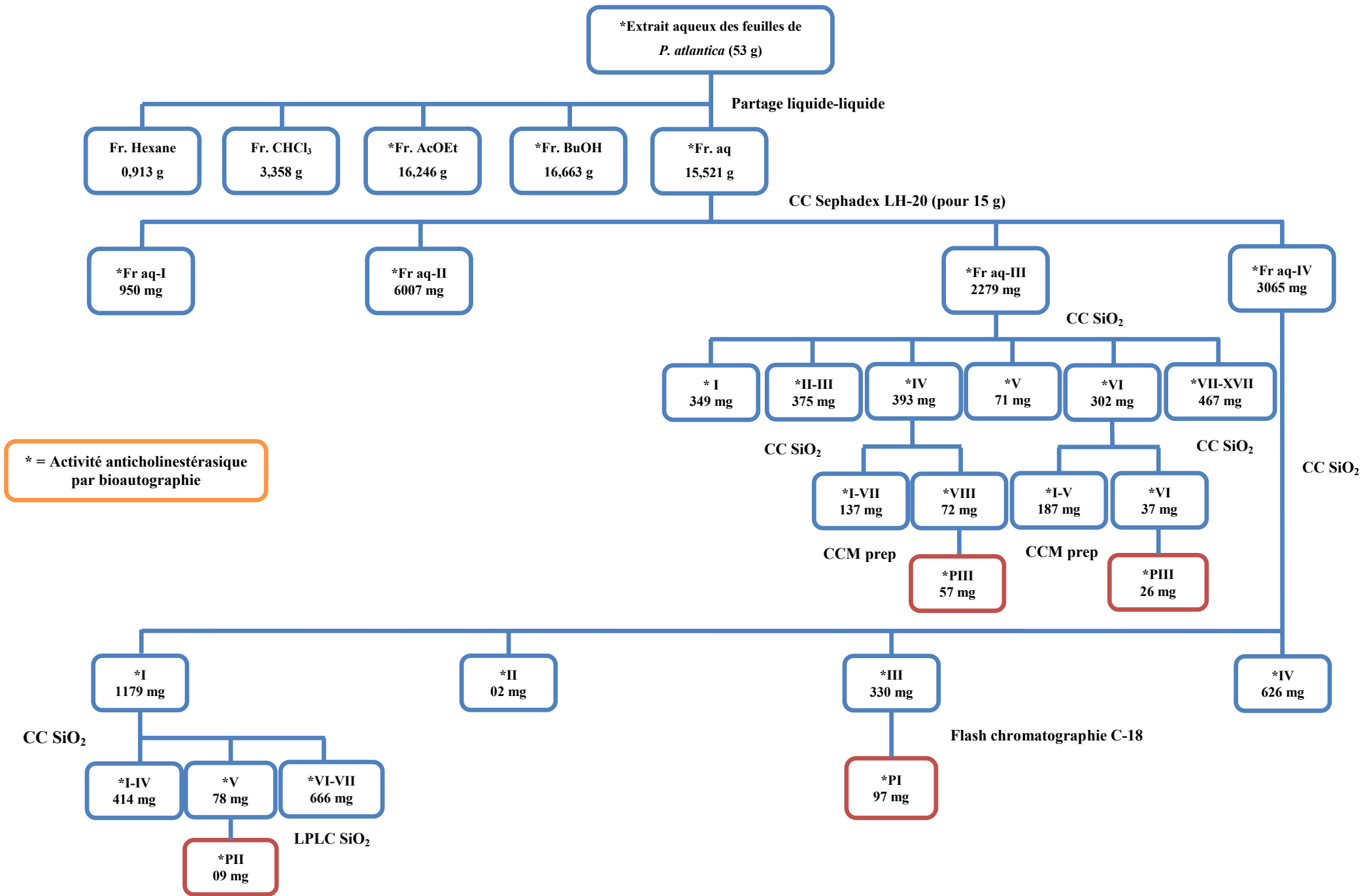


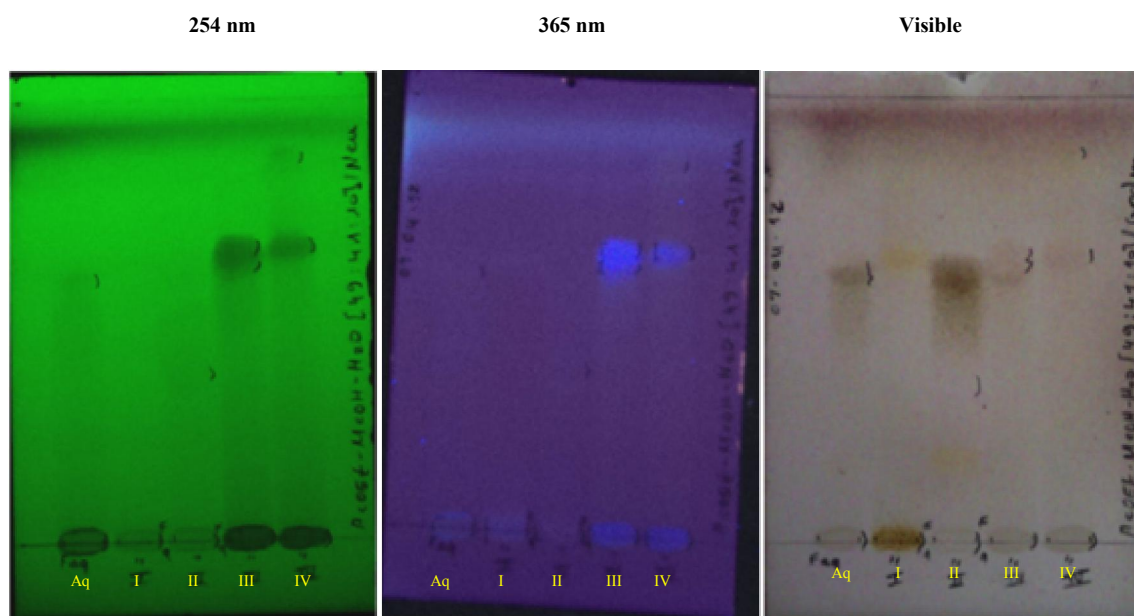
Figure 4.25. CCM de l'analyse des fractions (AcOEt, n-BuOH, H<sub>2</sub>O) issues de l'extrait aqueux de *P. atlantica*, avant (254 nm) et après révélation avec le Neu (365 nm) et le Godin (visible), système de migration CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O [65 : 35 : 05].



**Figure 4.26.** Schéma d'isolement des produits I-III de la fraction aqueuse issue de l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica*.

#### 4.2.3.1. Fractionnement bio-guidé de la fraction aqueuse et isolement des produits I-III

La phase aqueuse (15 g) active contre l'AChE est fractionnée dans un premier temps par une chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC) (60 x 3 cm) avec le gel de Sephadex LH-20 afin d'avoir des produits actifs en quantités suffisantes pour les analyses physico-chimiques et l'activité anticholinestérasique en solution. Le système d'éluion employé est constitué d'un mélange de MeOH-H<sub>2</sub>O [80 :20] (9,450 L). La chromatographie d'exclusion moléculaire/gel de filtration sur des supports tels que le Sephadex LH-20 joue un rôle important dans l'isolement des produits naturels. Le gel permet la séparation des composés en fonction de leurs poids moléculaires et est, par conséquent, très utile pour la séparation de poids moléculaire élevé et de matériau polymère à partir d'un échantillon. Ces molécules causent souvent plus de problèmes au cours de la chromatographie sur des supports solides, une étape chromatographique d'exclusion moléculaire est utile comme une étape préliminaire (Hostettmann *et al.*, 1998). L'évolution de la séparation sur colonne a été suivie par CCM et il en a résulté quatre fractions (de I à IV) voir **figure 4.27** dont les rendements sont indiqués dans la **figure 4.26**.

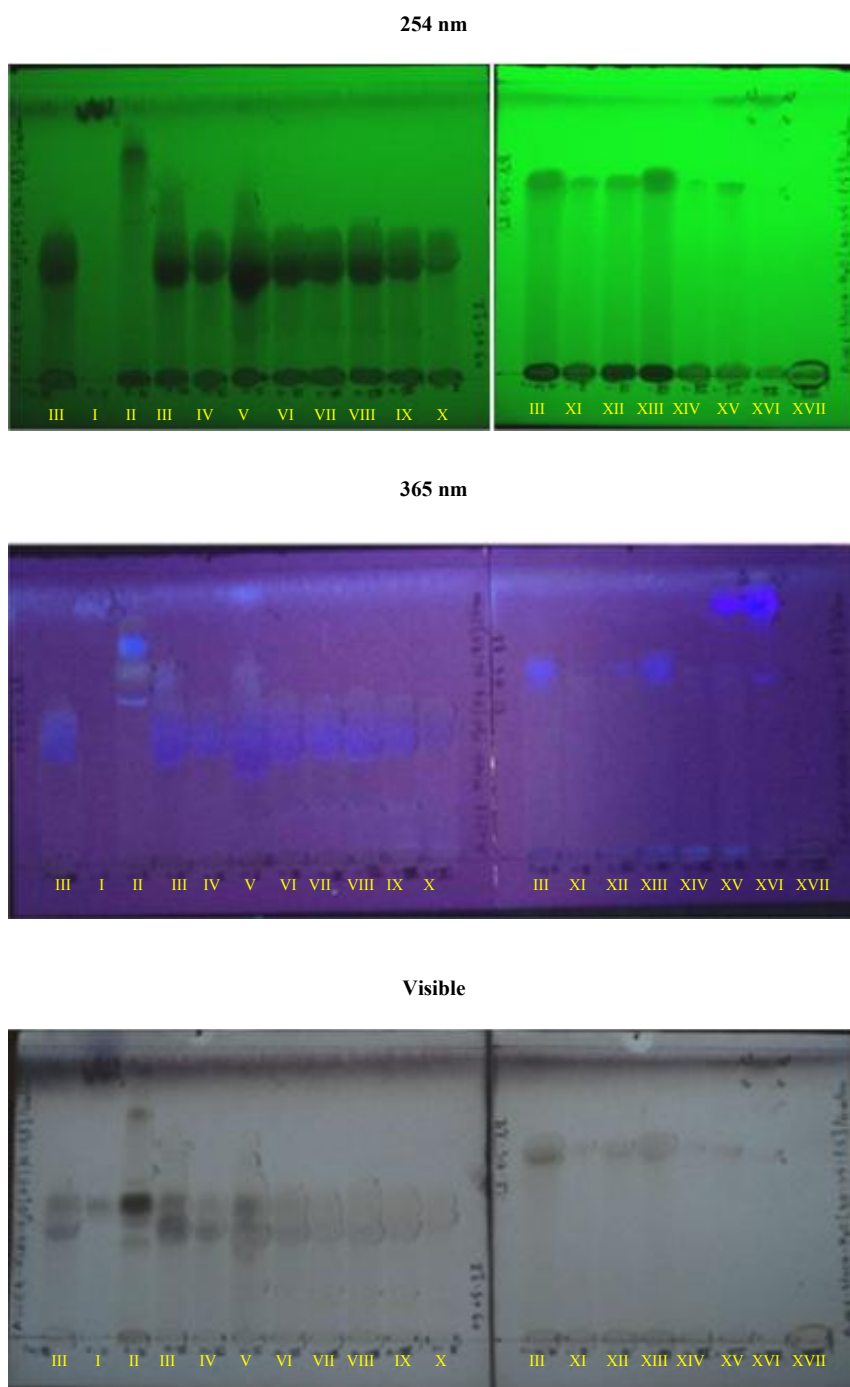


**Figure 4.27.** CCM de l'analyse des fractions (I-IV) issues de la phase aqueuse, avant (254 nm) et après révélation avec le Neu (365 nm) et le Godin (visible), système de migration AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O [49 : 41 : 10].

La fraction **III** (2279 mg) active a été ensuite séparée sur CC (80 x 2,5 cm) de gel de silice (Silicagel 60, 40-63 µm), éluion en gradient par palier. Les mélanges AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O suivants ont été utilisés [80 : 20 : 02 → 50 : 50 : 10, 1,816 L]. La phase stationnaire a

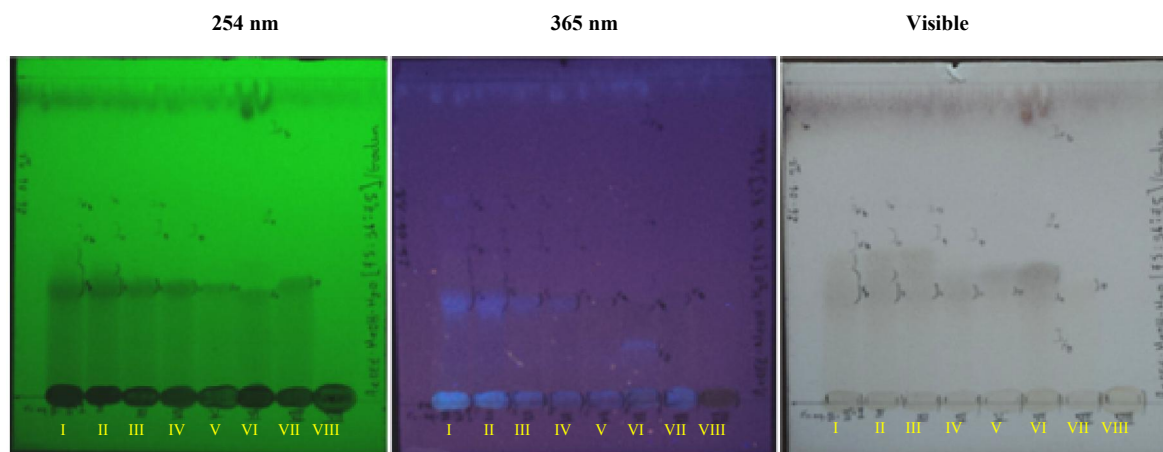


ensuite été lavée avec 454 mL de MeOH. L'évolution de la séparation sur colonne a été suivie par CCM et il en a résulté dix sept fractions (de III-I à III-XVII) voir figure 4.26 et 4.28.



**Figure 4.28.** CCM de l'analyse des fractions (I-XVII) issues de la fraction III, avant (254 nm) et après révélation avec le Neu (365 nm) et le Godin (visible), système de migration AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O [75 : 36 : 7,5] (à gauche) et [40 : 35 : 7,5] (à droite).

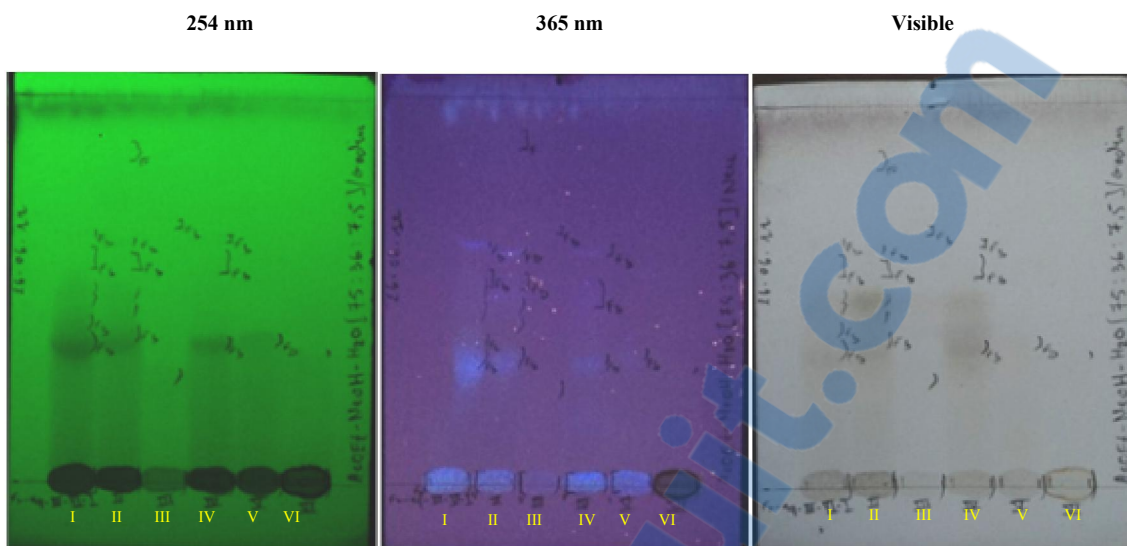
La fraction **III-IV** (393 mg) active a été après fractionnée sur CC de gel de silice (Silicagel 60, 40-63  $\mu\text{m}$ , 65 x 1 cm, AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O [60 : 40 : 10, 228 mL] et MeOH (76 mL)), pour donner huit fractions (de **III-IV-I** à **III-IV-VIII**) voir **figure 4.26** et **4.29**. La fraction **III-IV-VIII** (72 mg) active a été purifiée par CCM préparative avec gel de silice (Silicagel 60, F254, glass plate, 1 mm thickness) éluée avec AcOEt-HCOOH-AcOH-H<sub>2</sub>O [100 : 11 : 11 : 26] pour donner le produit **III** (57 mg) voir **figure 4.26** et **4.42**.



**Figure 4.29.** CCM de l'analyse des fractions (**I-VIII**) issues de la fraction **III-IV**, avant (254 nm) et après révélation avec le Neu (365 nm) et le Godin (visible), système de migration AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O [75 : 36 : 7,5].

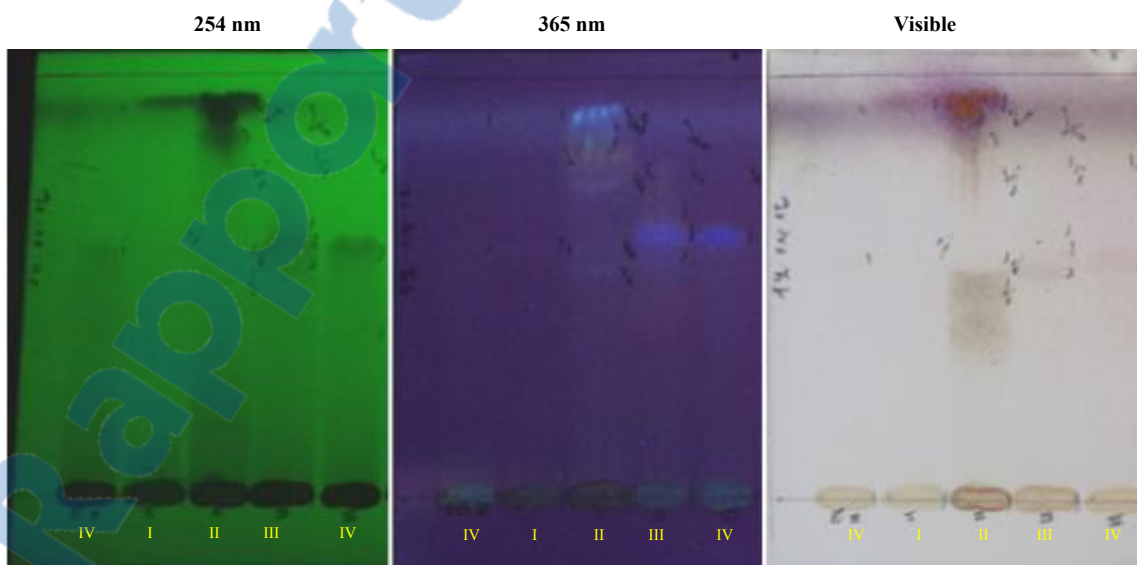
La fraction **III-VI** (302 mg) active à son tour a été fractionnée sur CC de gel de silice (Silicagel 60, 40-63  $\mu\text{m}$ , 65 x 1 cm, AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O [60 : 40 : 10, 180 mL] et MeOH (60 mL)), pour donner six fractions (de **III-VI-I** à **III-VI-VI**) voir **figure 4.26** et **4.30**. La fraction **III-VI-VI** (37 mg) active a été purifiée par CCM préparative avec gel de silice (Silicagel 60, F254, glass plate, 1 mm thickness) éluée avec AcOEt-HCOOH-AcOH-H<sub>2</sub>O [100 : 11 : 11 : 26] pour donner aussi le produit **III** (26 mg) voir **figure 4.26** et **4.42**.





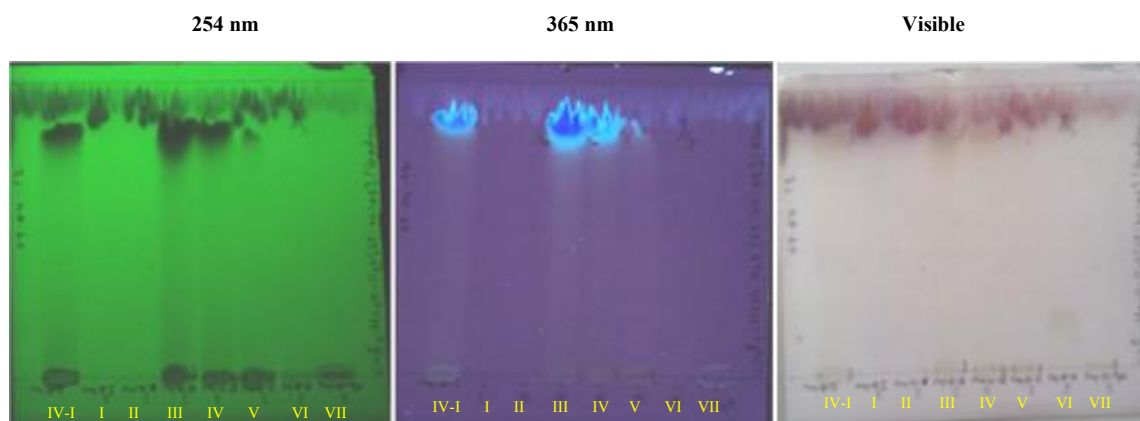
**Figure 4.30.** CCM de l'analyse des fractions (I-VI) issues de la fraction III-VI, avant (254 nm) et après révélation avec le Neu (365 nm) et le Godin (visible), système de migration AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O [75 : 36 : 7,5].

La fraction IV (3065 mg) avec une activité anticholinestérasique intéressante a été fractionnée de la même manière que la fraction III et a donnée quatre fractions (de IV-I à IV-IV) voir figure 4.26 et 4.31.



**Figure 4.31.** CCM de l'analyse des fractions (I-IV) issues de la fraction IV, avant (254 nm) et après révélation avec le Neu (365 nm) et le Godin (visible), système de migration AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O [75 : 36 : 7,5].

La fraction **IV-I** (1179 mg) active a été ensuite fractionnée successivement par CC (55 x 2,5 cm) avec gel de silice (Silicagel 60, 40-63  $\mu\text{m}$ ) éluée en gradient par palier:  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  [90 : 10 : 01  $\rightarrow$  50 : 50 : 05, 1,170 L], ensuite par le MeOH (234 mL) et par chromatographie liquide basse pression LPLC sur colonne (50 x 0,6 cm) avec gel de silice (Silicagel 60, 25-40  $\mu\text{m}$ ), élution isocratique par  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  [90 : 10 : 01, 70 mL] pour donner le produit **II** (9 mg) voir **figure 4.26, 4.32 et 4.42**.

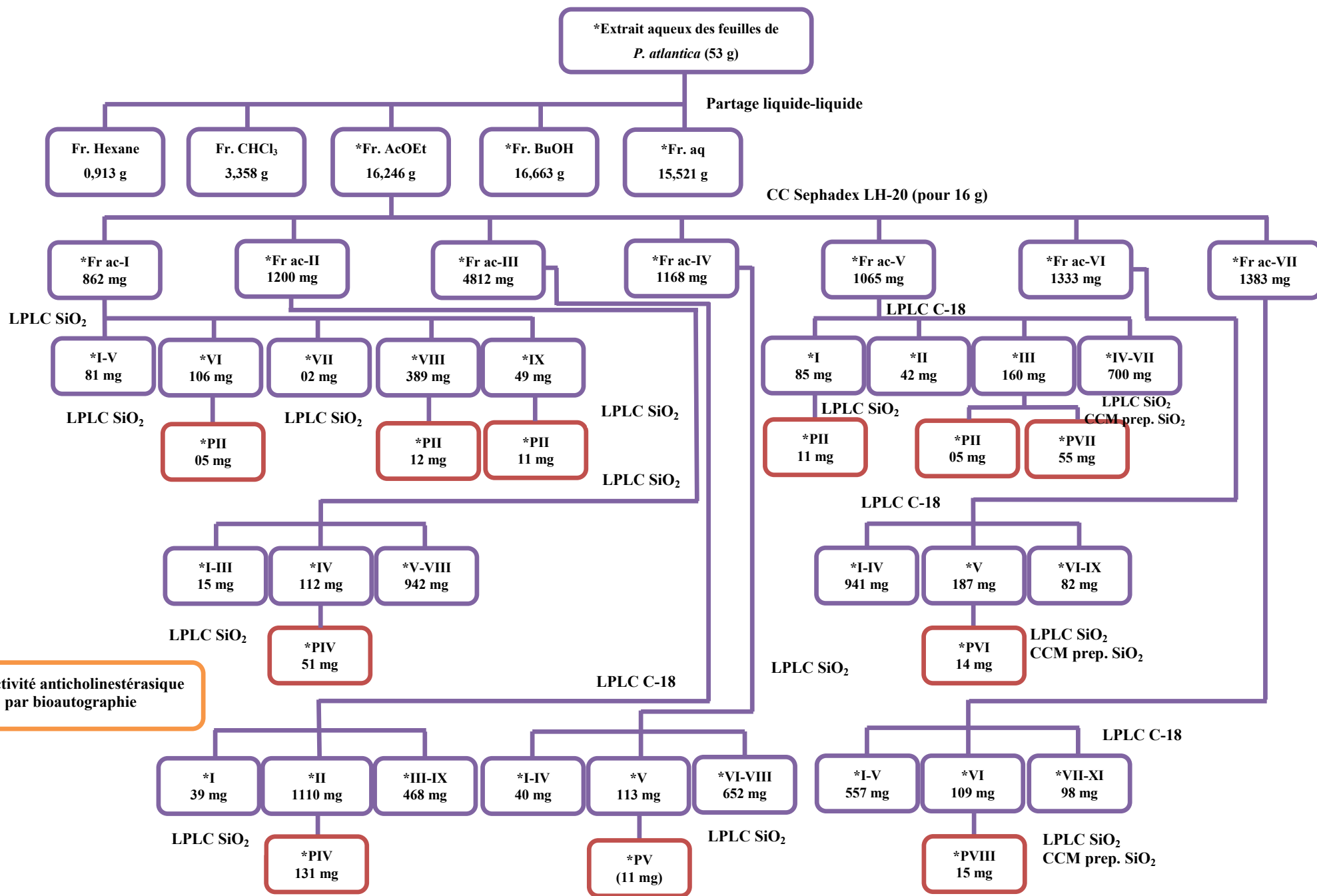


**Figure 4.32.** CCM de l'analyse des fractions (**I-VII**) issues de la fraction **IV-I**, avant (254 nm) et après révélation avec le Neu (365 nm) et le Godin (visible), système de migration  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  [65 : 40 : 06].

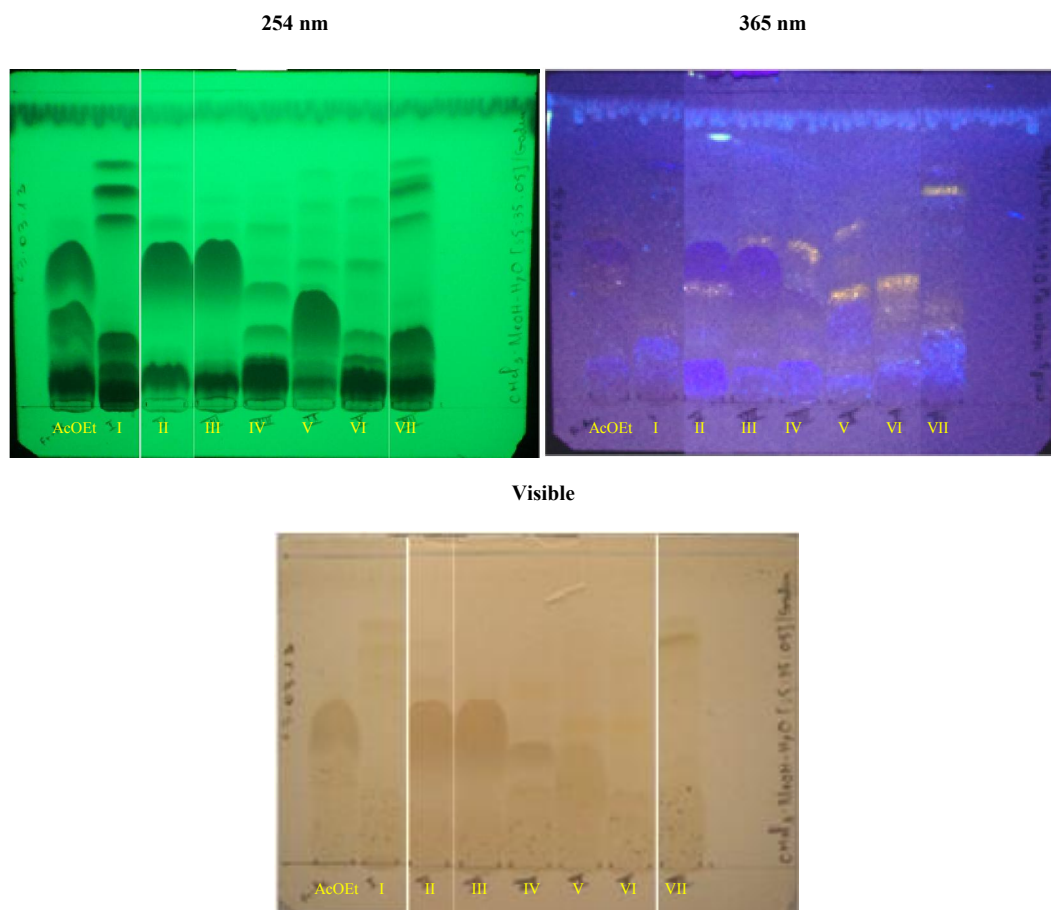
La fraction **IV-III** (330 mg) active a été à son tour soumise à la chromatographie flash en phase inverse RP-18 (40-63  $\mu\text{m}$ , 26 g) éluée avec un gradient de  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  [100:00  $\rightarrow$  00:100] pour donner le produit **I** (97 mg) voir **figure 4.26 et 4.42**.

#### 4.2.3.2. Fractionnement bio-guidé de la fraction acétate d'éthyle et isolement des produits **II, IV-VIII**

Une quantité de 16 g de la phase acétate d'éthyle a d'abord été filtrée par CC (65 x 3 cm) avec le gel de Sephadex LH-20. Le système d'élution employé est constitué de MeOH (11,25 L). L'évolution de la séparation sur colonne a été suivie par CCM et il en résulte sept fractions (de **I** à **VII**) voir **figure 4.34** dont les rendements sont indiqués dans la **figure 4.33**.

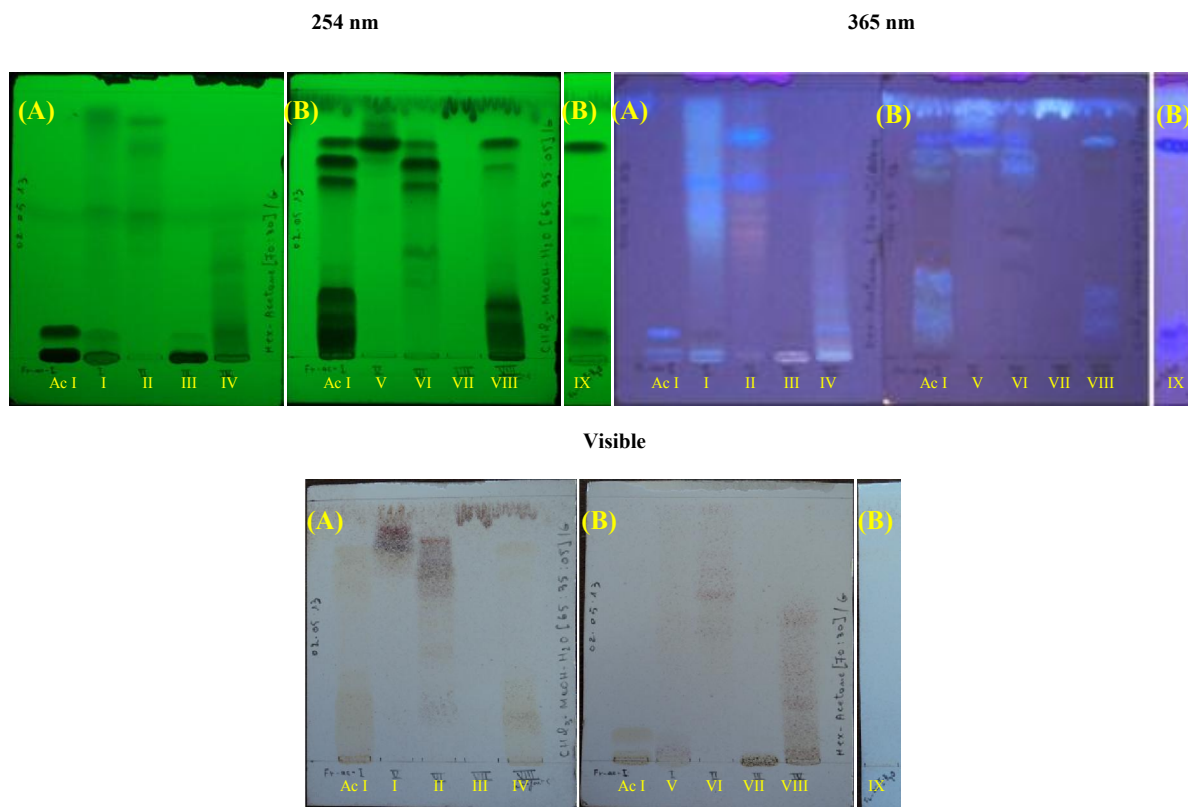


**Figure 4.33.** Schéma d'isolement des produits II, IV-VIII de la fraction AcOEt issue de l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica*.



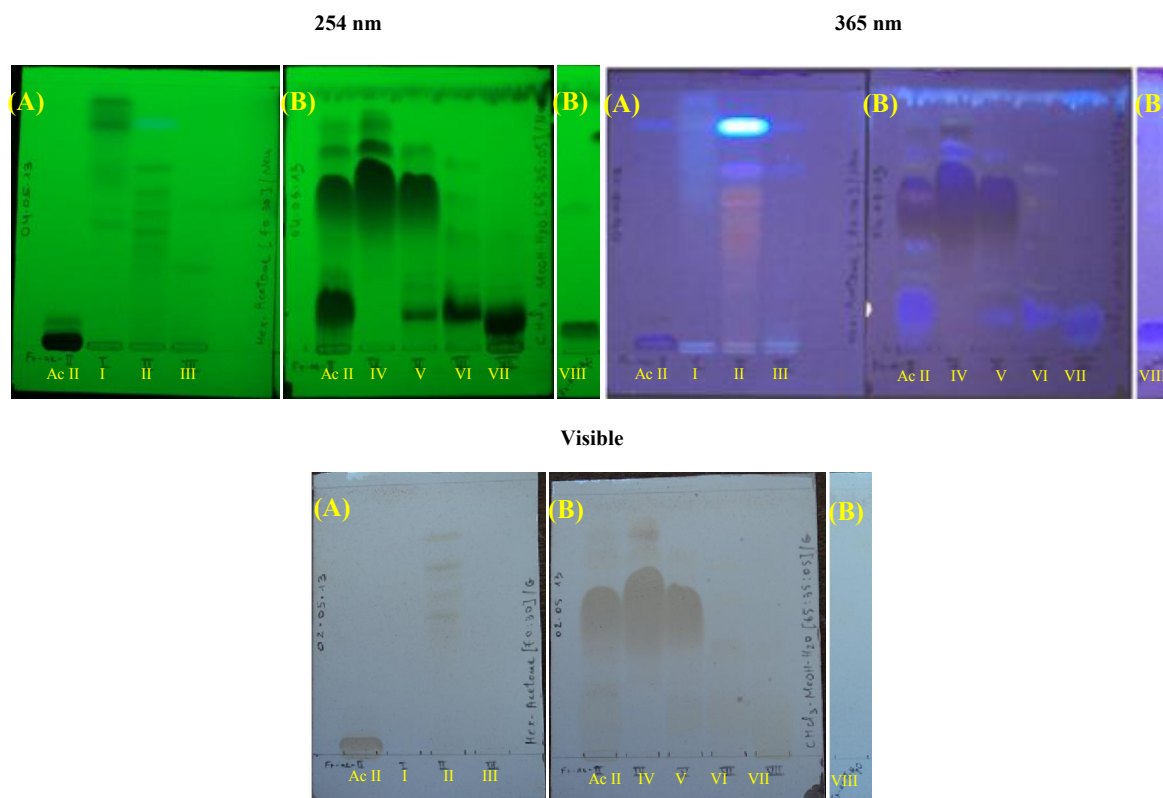
**Figure 4.34.** CCM de l'analyse des fractions (**I-VII**) issues de la fraction acétate d'éthyle, avant (254 nm) et après révélation avec le Neu (365 nm) et le Godin (visible), système de migration  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  [65 : 35 : 05].

La fraction **I** (862 mg) active a été séparée ensuite par LPLC sur colonne (90 x 1,5 cm) avec gel de silice (Silicagel 60, 25-40  $\mu\text{m}$ ), élution en gradient par palier. La composition du mélange d'élution:  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  a évolué de la manière suivante: 100 : 00 : 00  $\rightarrow$  50 : 50 : 05 (1,020 L). La phase stationnaire a ensuite été lavée avec du MeOH (170 mL). L'évolution de la séparation sur colonne a été suivie par CCM et il en résulte neuf fractions (de **I-I** à **I-IX**) voir **figure 4.33** et **4.35**. Le produit **II** (28 mg) a été une autre fois purifié à partir des fractions actives **I-VI** (106 mg), **I-VIII** (389 mg) et **I-IX** (49 mg) par LPLC sur colonne (60 x 1 cm et 50 x 0,6 cm) avec gel de silice (Silicagel 60, 25-40  $\mu\text{m}$ ), élution en gradient par palier:  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  [100 : 00  $\rightarrow$  70 : 30] voir **figure 4.33** et **4.43**.



**Figure 4.35.** CCM de l'analyse des fractions (**I-IX**) issues de la fraction **I**, avant (254 nm) et après révélation avec le Neu (365 nm) et le Godin (visible), système de migration Hexane-Acétone [70 : 30] (A) et  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  [65 : 35 : 05] (B).

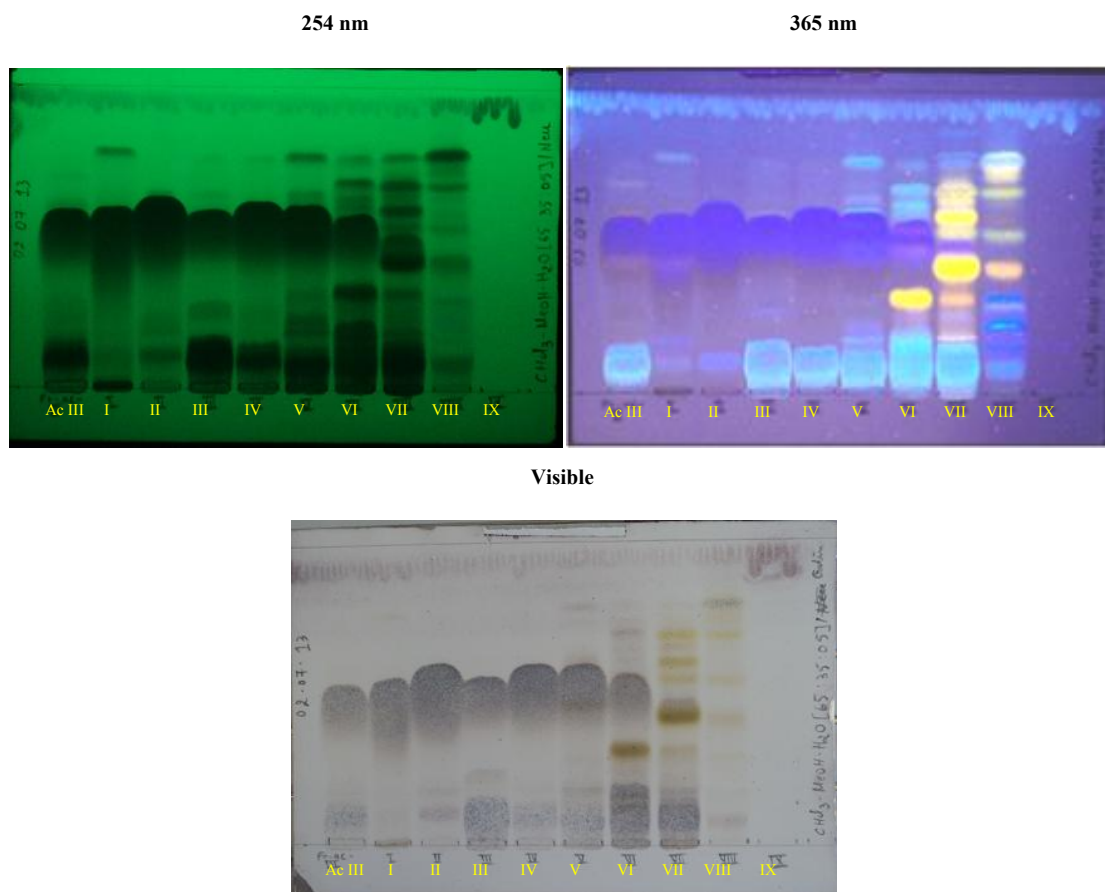
La fraction **II** (1200 mg) active a été séparée à son tour par LPLC sur colonne (55 x 2,5 cm) avec gel de silice (Silicagel 60, 25-40  $\mu\text{m}$ ), élution en gradient par palier. La composition du mélange d'élution:  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  a évolué de la manière suivante: 100 : 00 : 00  $\rightarrow$  50 : 50 : 05 (1,428 L). La phase stationnaire a ensuite été lavée avec du MeOH (476 mL). L'évolution de la séparation sur colonne a été suivie par CCM et il en résulte huit fractions (de **II-I** à **II-VIII**) voir **figure 4.33** et **4.36**. Le produit **IV** (51 mg) a été purifié à partir de la fraction active **II-IV** (112 mg) par LPLC sur colonne (60 x 1 cm) avec gel de silice (Silicagel 60, 25-40  $\mu\text{m}$ ), élution en gradient par palier:  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  [100 : 00  $\rightarrow$  70 : 30] (88 mL) voir **figure 4.33** et **4.43**.



**Figure 4.36.** CCM de l'analyse des fractions (I-VIII) issues de la fraction II, avant (254 nm) et après révélation avec le Neu (365 nm) et le Godin (visible), système de migration Hexane-Acétone [70 : 30] (A) et CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O [65 : 35 : 05] (B).

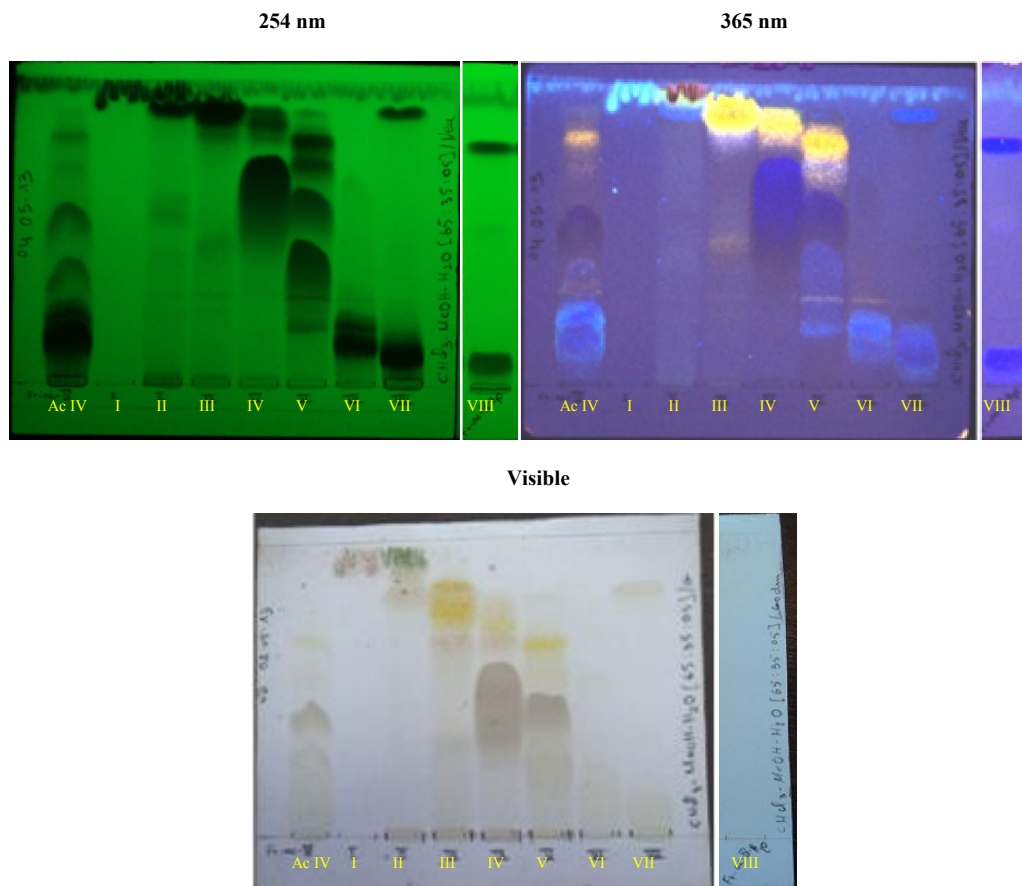
La fraction **III** (4812 mg) active a été séparée à son tour par LPLC sur colonne (65 x 3 cm) LiChroprep phase inverse RP-18 (Silicagel 60, 25-40  $\mu$ m) éluée avec un mélange de MeOH-H<sub>2</sub>O en gradient [100 : 00  $\rightarrow$  00 : 100] (5,280 L) pour donner neuf fractions (de **III-I** à **III-IX**) voir **figure 4.37** et **4.33**. Ensuite, la fraction **III-II** (1110 mg) active a été purifiée par LPLC sur colonne (55 x 2,5 cm) avec gel de silice (Silicagel 60, 25-40  $\mu$ m), élution en gradient par palier: CHCl<sub>3</sub>-MeOH [100 : 00  $\rightarrow$  70 : 30] (960 mL) et enfin par le MeOH (240 mL) pour donner aussi le produit **IV** (131 mg) voir **figure 4.33** et **4.43**.





**Figure 4.37.** CCM de l'analyse des fractions (I-IX) issues de la fraction III, avant (254 nm) et après révélation avec le Neu (365 nm) et le Godin (visible), système de migration  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  [65 : 35 : 05].

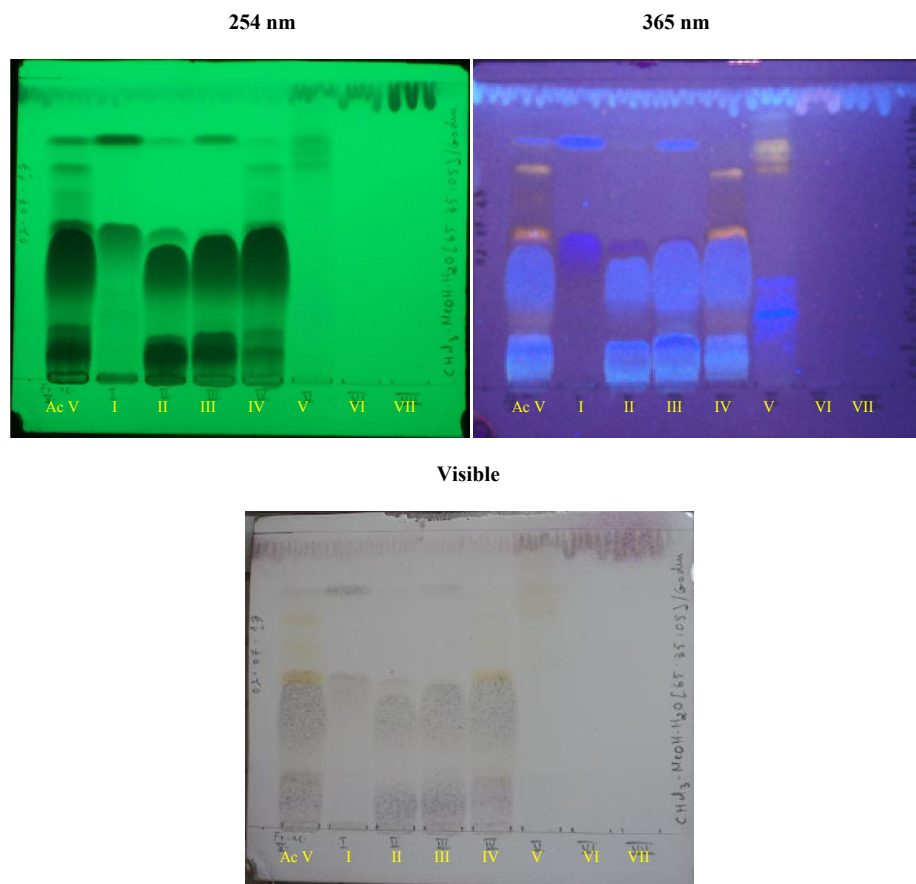
La fraction IV (1168 mg) active a été séparée à son tour par LPLC sur colonne (55 x 2,5 cm) avec gel de silice (Silicagel 60, 25-40  $\mu\text{m}$ ), élution en gradient par palier. La composition du mélange d'élution:  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  a évolué de la manière suivante: 100 : 00 : 00  $\rightarrow$  50 : 50 : 05 (1,392 L). La phase stationnaire a ensuite été lavée avec du MeOH (464 mL). L'évolution de la séparation sur colonne a été suivie par CCM et il en résulte huit fractions (de IV-I à IV-VIII) voir **figure 4.33** et **4.38**. Le produit V (11 mg) a été purifié à partir de la fraction active IV-V (113 mg) par LPLC sur colonne (50 x 0,6 cm) avec gel de silice (Silicagel 60, 25-40  $\mu\text{m}$ ), élution en gradient par palier:  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  [100 : 00  $\rightarrow$  70 : 30] (88 mL) voir **figure 4.33** et **4.43**.



**Figure 4.38.** CCM de l'analyse des fractions (I-VIII) issues de la fraction IV, avant (254 nm) et après révélation avec le Neu (365 nm) et le Godin (visible), système de migration  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  [65 : 35 : 05].

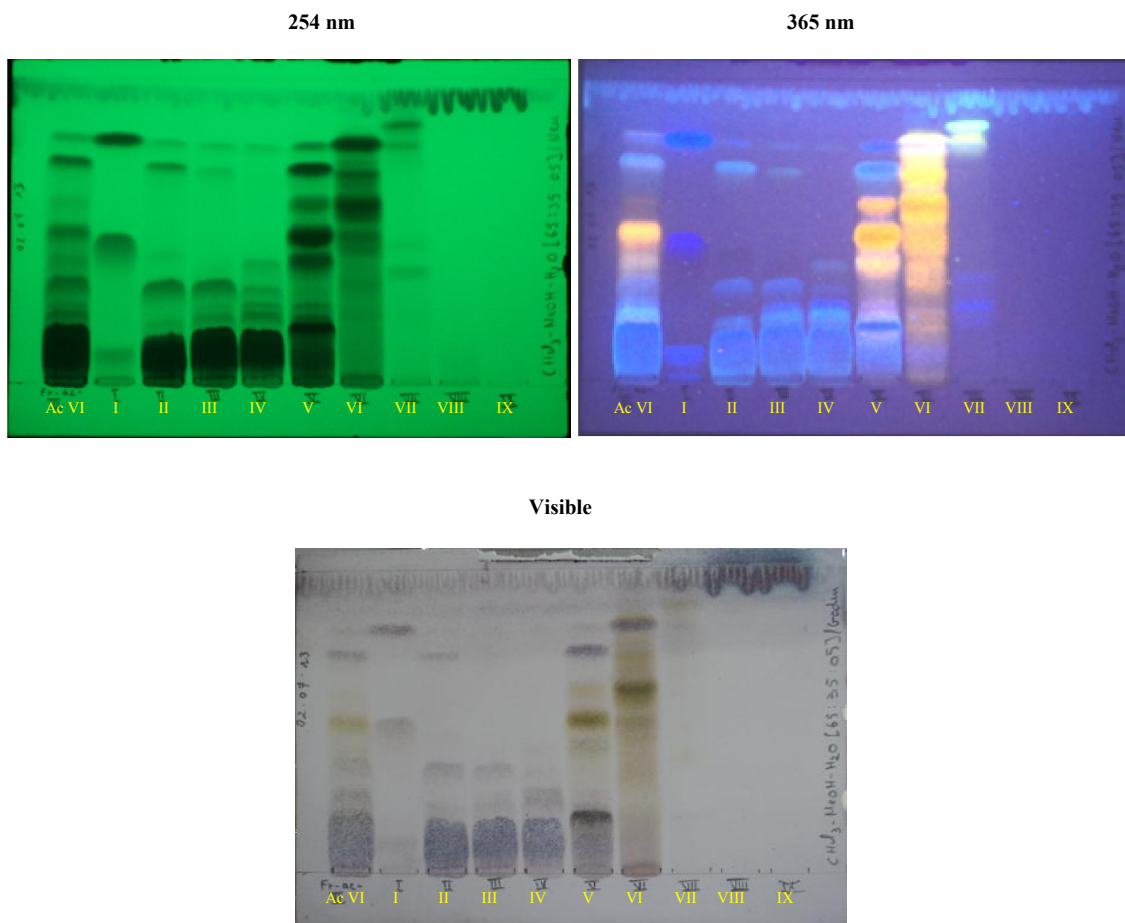
La fraction V (1065 mg) active a été séparée à son tour par LPLC sur colonne (55 x 2,5 cm) LiChroprep phase inverse RP-18 (Silicagel 60, 25-40  $\mu\text{m}$ ) éluée en gradient avec un mélange de  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  [100 : 00  $\rightarrow$  00 : 100] (2,332 L) pour donner sept fractions (de V-I à V-VII) voir **figure 4.33** et **4.39**. Ensuite, la fraction V-I (85 mg) active a été purifiée par LPLC sur colonne (60 x 1 cm) avec gel de silice (Silicagel 60, 25-40  $\mu\text{m}$ ), élution en gradient par palier:  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  [100 : 00  $\rightarrow$  70 : 30] (64 mL) et en fin par le  $\text{MeOH}$  (32 mL) pour donner aussi le produit II (11 mg). Enfin la fraction V-III (160 mg) active a été séparée de même que la fraction V-I et a donné aussi le produit II (05 mg), plus le produit VII (55 mg) qui a nécessité une autre étape de purification par la CCM préparative avec gel de silice (Silicagel, F254, glass plate, 1 mm thickness) éluée par  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-AcOH}$  [75 : 35 : 05] voir **figure 4.33** et **4.43**.





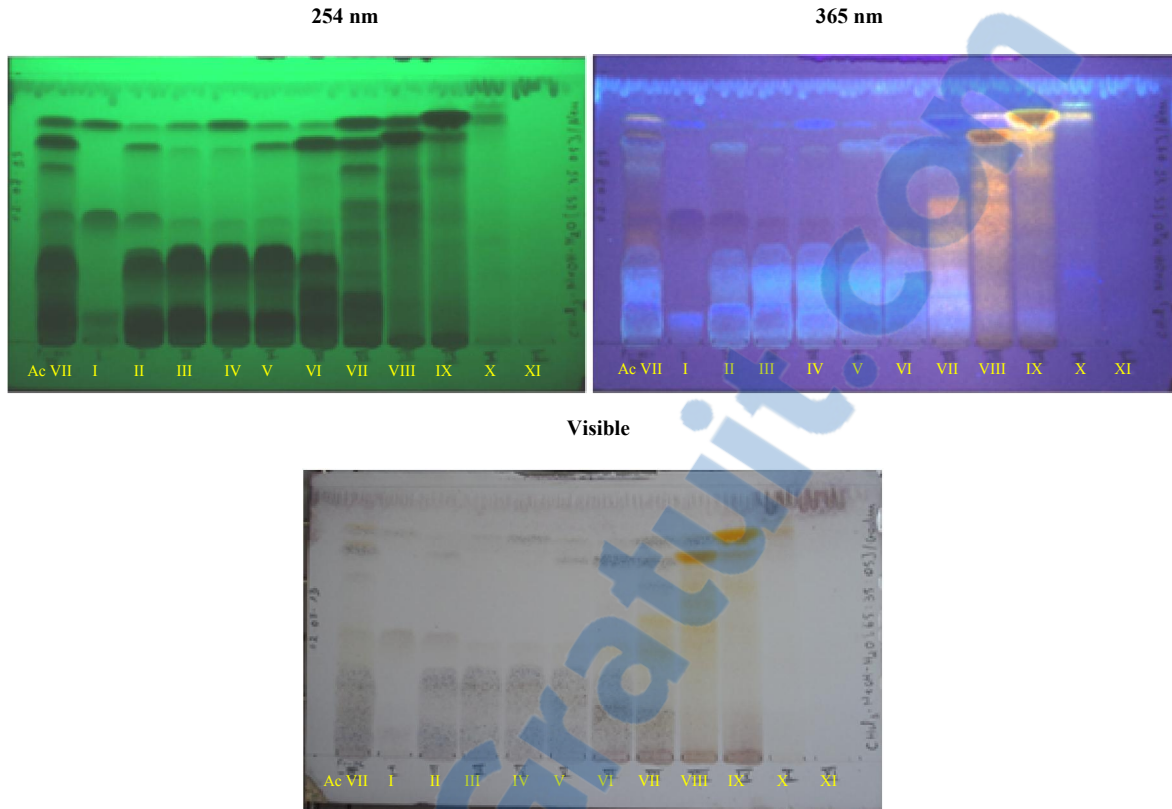
**Figure 4.39.** CCM de l'analyse des fractions (I-VII) issues de la fraction V, avant (254 nm) et après révélation avec le Neu (365 nm) et le Godin (visible), système de migration  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  [65 : 35 : 05].

La fraction **VI** (1333 mg) active a été séparée à son tour par LPLC sur colonne (55 x 2,5 cm) LiChroprep phase inverse RP-18 (Silicagel 60, 25-40  $\mu\text{m}$ ) éluée avec un mélange de  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  en gradient [100 : 00  $\rightarrow$  00 : 100] (2,926 L) pour donner neuf fractions (de **VI-I** à **VI-IX**) voir **figure 4.33** et **4.40**. Ensuite, la fraction **VI-V** (187 mg) active a été purifiée par LPLC sur colonne (60 x 1 cm) avec gel de silice (Silicagel 60, 25-40  $\mu\text{m}$ ), élution en gradient par  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  [100 : 00  $\rightarrow$  70 : 30] (144 mL) et en fin par le  $\text{MeOH}$  (36 mL) pour donner le produit **VI** avec des impuretés. Une dernière étape de purification par la CCM préparative avec gel de silice (Silicagel, F254, glass plate, 1 mm thickness) éluée par  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  [70 : 30 : 05] a donné 14 mg de **VI** voir **figure 4.33** et **4.43**.

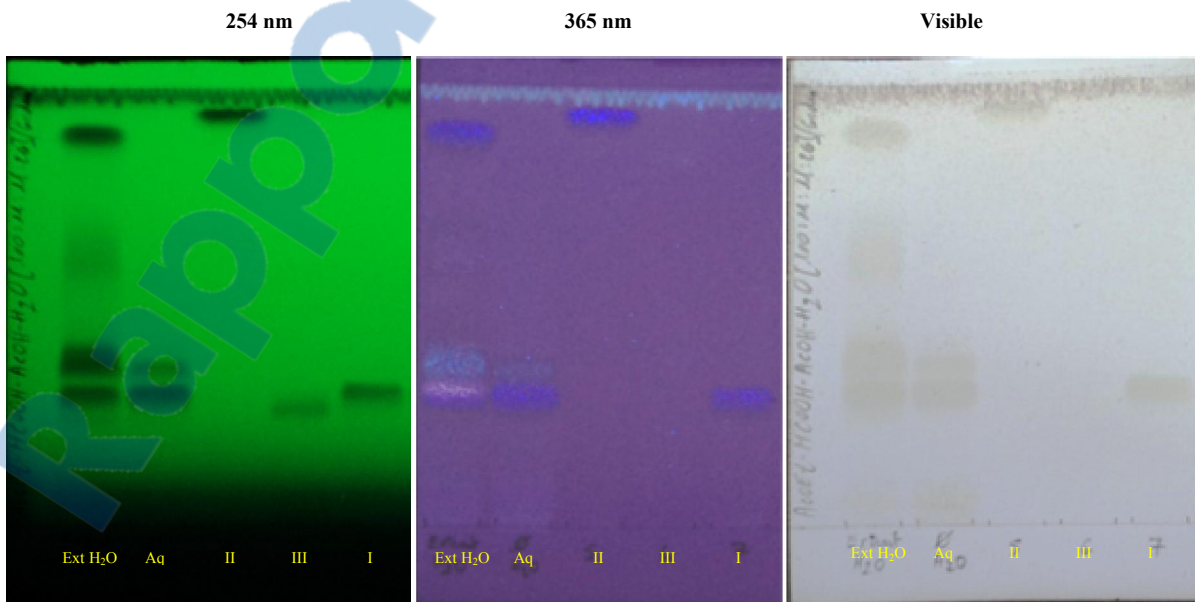


**Figure 4.40.** CCM de l'analyse des fractions (I-IX) issues de la fraction VI, avant (254 nm) et après révélation avec le Neu (365 nm) et le Godin (visible), système de migration  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  [65 : 35 : 05].

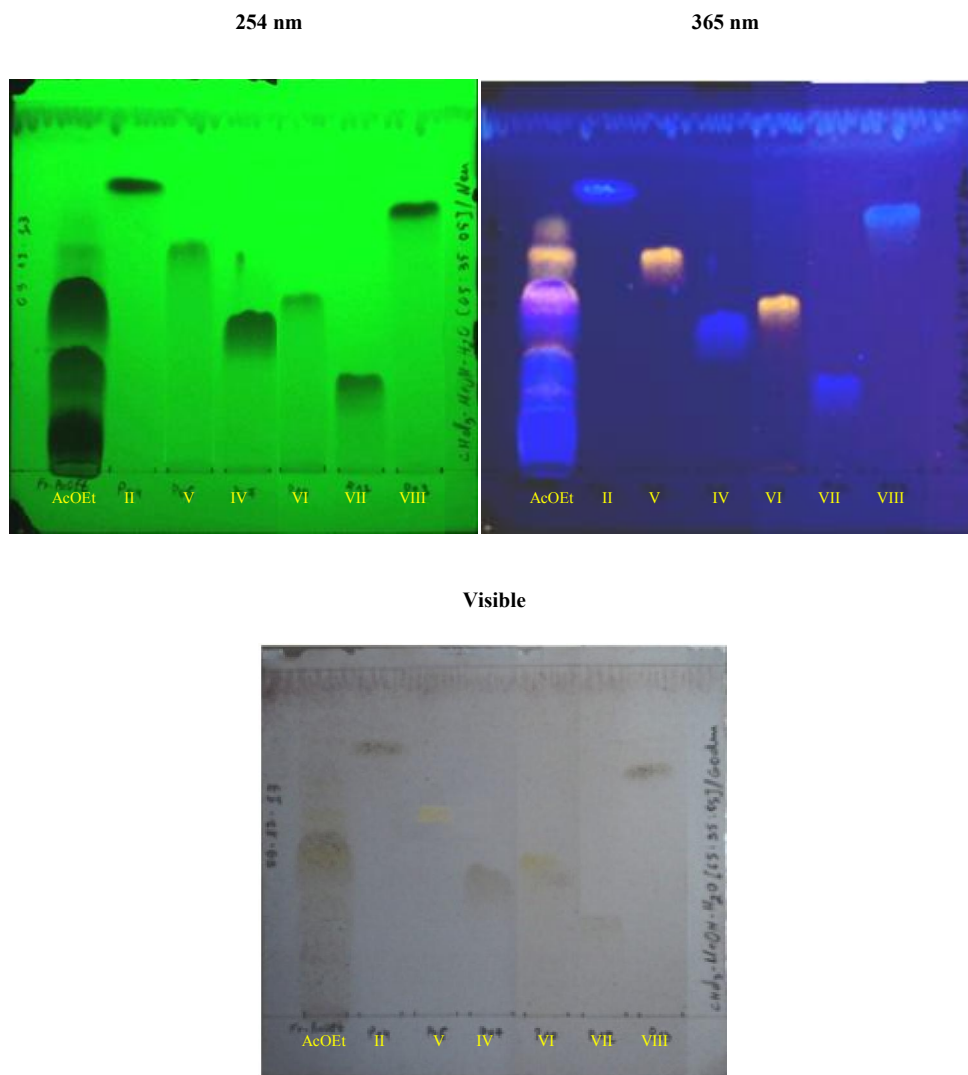
La fraction **VII** (1383 mg) active a été séparée à son tour par LPLC sur colonne (55 x 2,5 cm) LiChroprep phase inverse RP-18 (Silicagel 60, 25-40  $\mu\text{m}$ ) éluée avec un mélange de  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  en gradient [100 : 00  $\rightarrow$  00 : 100] (3,036 L) pour donner onze fractions (de **VII-I** à **VII-XI**) voir **figure 4.33** et **4.41**. Ensuite, la fraction **VII-VI** (109 mg) active a été purifiée par LPLC sur colonne (60 x 1 cm) avec gel de silice (Silicagel 60, 25-40  $\mu\text{m}$ ), élution en gradient par palier:  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  [100 : 00  $\rightarrow$  70 : 30] (80 mL) et enfin par le  $\text{MeOH}$  (20 mL) pour donner le produit **VIII** avec des impuretés. Une dernière étape de purification par la CCM préparative avec gel de silice (Silicagel, F254, glass plate, 1 mm thickness) éluée par  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  [70 : 30 : 05] a donné 15 mg de **VIII** voir **figure 4.33** et **4.43**.



**Figure 4.41.** CCM de l'analyse des fractions (I-XI) issues de la fraction VII, avant (254 nm) et après révélation avec le Neu (365 nm) et le Godin (visible), système de migration CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O [65 : 35 : 05].



**Figure 4.42.** CCM de l'analyse des produits I, II et III, avant (254 nm) et après révélation avec le Neu (365 nm) et le Godin (visible), système de migration AcOEt-HCOOH-AcOH-H<sub>2</sub>O [100 : 11 : 11 : 26].



**Figure 4.43.** CCM de l'analyse des produits **II**, **IV**, **V**, **VI**, **VII** et **VIII** avant (254 nm) et après révélation avec le Neu (365 nm) et le Godin (visible), système de migration  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  [65 : 35 : 05].

Les différentes techniques chromatographiques (partage liquide-liquide, CC gel de Sephadex LH-20, CC gel de silice, chromatographie flash phase inverse RP-18, LPLC gel de silice, LPLC phase inverse RP-18 et CCM préparative gel de silice) ont permis d'isoler à partir de l'extrait aqueux de *P. atlantica* huit produits: **I** ( $R_f = 0,30$ ; fluorescence bleu), **II** ( $R_f = 0,96$  ou  $0,80$ ; fluorescence bleu), **III** ( $R_f = 0,26$ ; fluorescence bleu légère), **IV** ( $R_f = 0,30$ ; fluorescence bleu), **V** ( $R_f = 0,57$ ; fluorescence jaune), **VI** ( $R_f = 0,47$ ; fluorescence jaune), **VII** ( $R_f = 0,24$ ; fluorescence bleu) et **VIII** ( $R_f = 0,73$ ; fluorescence bleu) voir **figure 4.26**, **4.33**, **4.42** et **4.43**, laissant dire qu'il s'agit de dérivés de quercétine et d'acides phénoliques principalement l'acide gallique. L'analyse structurale des produits isolés est en cours.

### 4.3. Investigation phytochimique de l'extrait éthanolique de la plante entière de *S. lanatus* et *E. confusum*

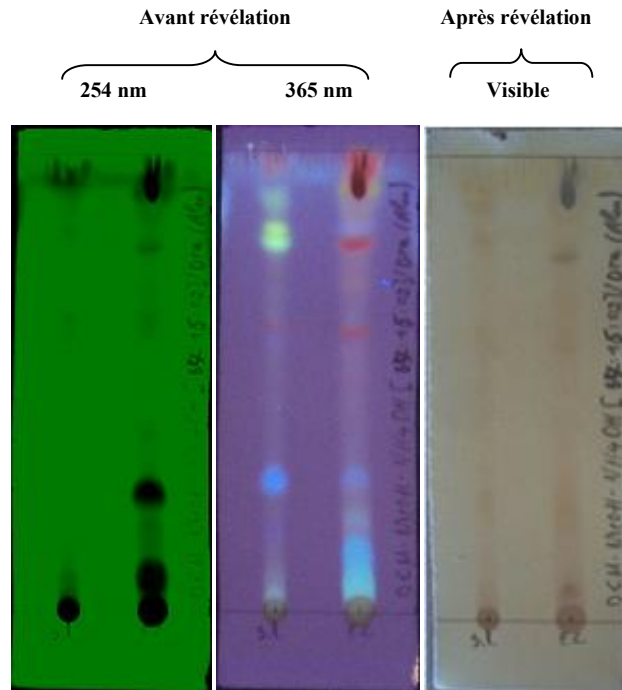
#### 4.3.1. Analyses CCM de l'extrait éthanolique de la plante entière de *S. lanatus* et *E. confusum*

Les extraits bruts obtenus après macération par l'éthanol 95 % à température ambiante ont été solubilisés dans le méthanol à une concentration de 10 mg/mL. Ils ont été ensuite analysés par CCM dans les conditions expérimentales décrites dans 3.2.1. Outre l'observation sous rayonnement UV à 254 nm et 366 nm, les plaques ont été révélées à l'aide de réactifs chimiques présentés dans le **tableau 3.2**, dans le but de donner un premier aperçu de la composition en métabolites secondaires des extraits bruts (**Wagner et Blatt, 1996; Wagner et al., 2011**).

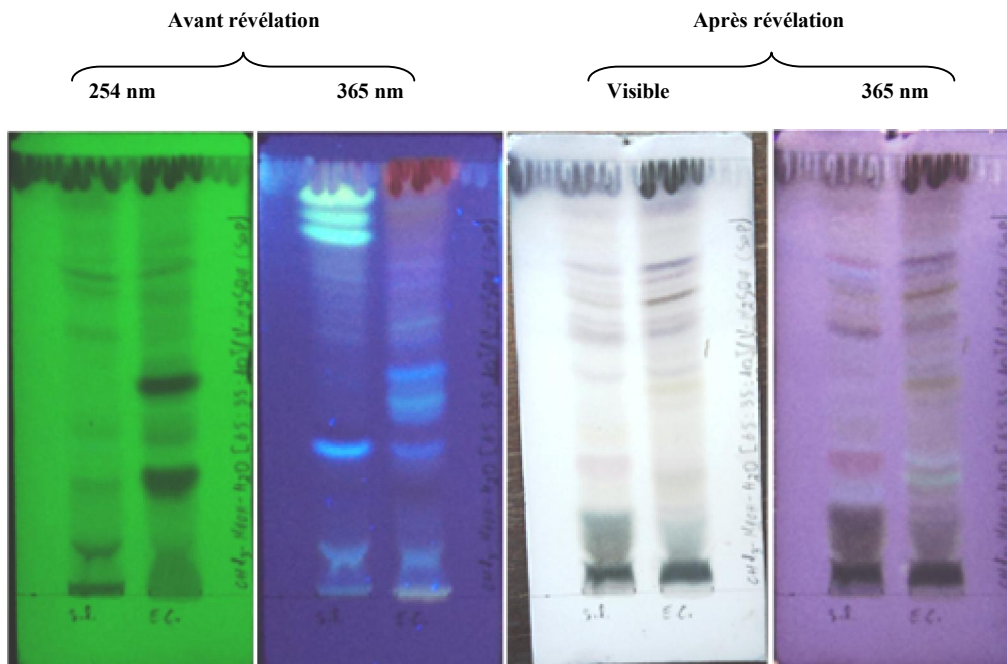
Le criblage phytochimique sur plaque CCM a permis de mettre en évidence plusieurs classes phytochimiques. La révélation au réactif Dragendorff a montré la présence systématique, dans les extraits bruts, de plusieurs alcaloïdes. La présence de ce type de composés n'est pas surprenante, car ils sont fréquemment décrits chez les espèces de la famille Boraginaceae (**El-Shazly et Wink, 2014**). Nombreuses taches de saponines ont pu être mises en évidence par la vanilline-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, l'anisaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, le SbCl<sub>3</sub>, le Komarowsky et la vanilline-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. La révélation des plaques CCM par le SbCl<sub>3</sub>, la vanilline-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, la vanilline-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, le Liebermann et l'anisaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> permet à de nombreux composés de prendre des colorations caractéristiques, permettant alors de supposer la présence des lignanes et terpénoïdes. La vanilline-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, le SbCl<sub>3</sub> et la chloramine-TCA ont montré une faible réaction, il paraîtrait donc, que les extraits bruts ne renferment qu'une faible abondance en glycosides cardiotoniques. Les sesquiterpènes lactones sont plus présents dans *E. confusum* suite à la réaction de plusieurs taches avec le Zimmermann. Le réactif de Neu a permis de mettre en évidence la présence dans les extraits bruts des flavonoïdes et des acides phénoliques en moyenne et en faible abondance, respectivement.

*S. lanatus* et *E. confusum* renferment aussi des tanins (galliques et ellagiques) et coumarines. Les dérivés anthracéniques, naphthoquinones et tanins catéchiques sont absents dans les extraits bruts de *S. lanatus* et *E. confusum* (**figure 4.44 à 4.64 et tableau 4.8**). Les résultats obtenus après le criblage phytochimique par CCM ne sont qu'indicatives, la présence de faux positifs ou faux négatifs est possible.

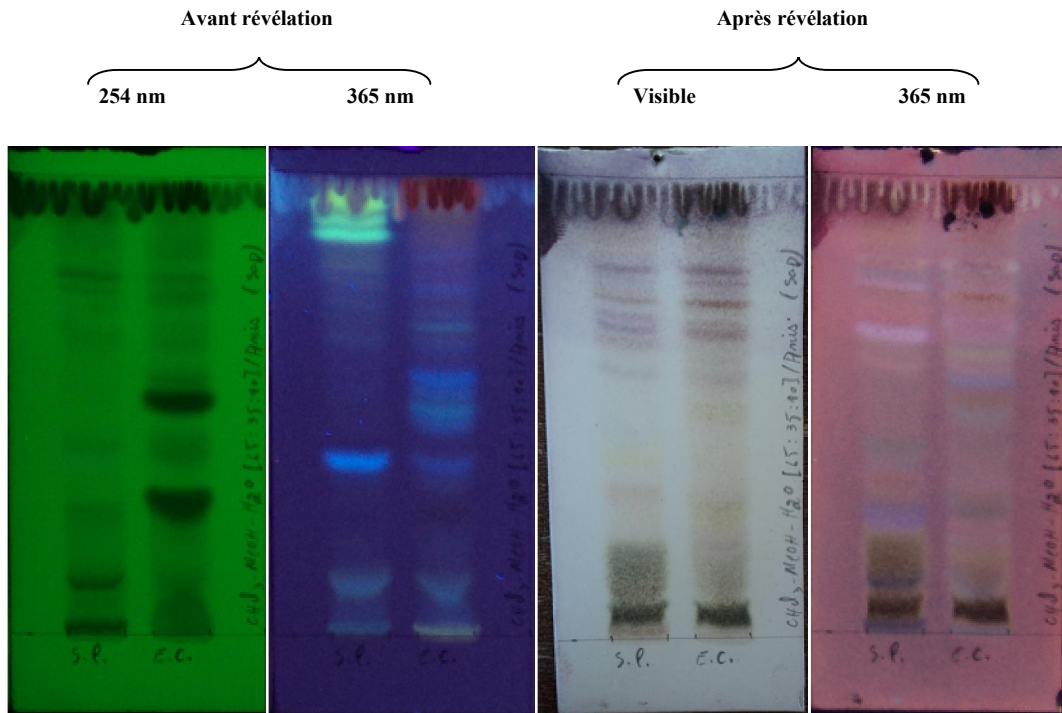




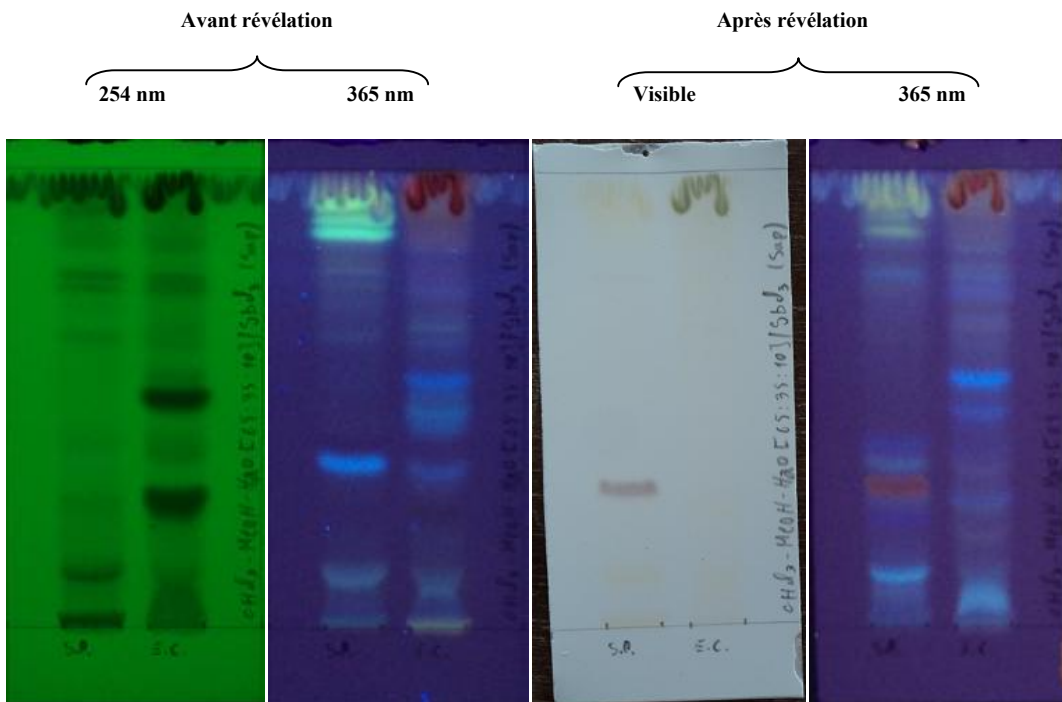
**Figure 4.44.** CCM de l'analyse des alcaloïdes avant et après révélation avec le Dragendorff, système de migration N° 8, S.l. = *S. lanatus*; E.c. = *E. confusum*.



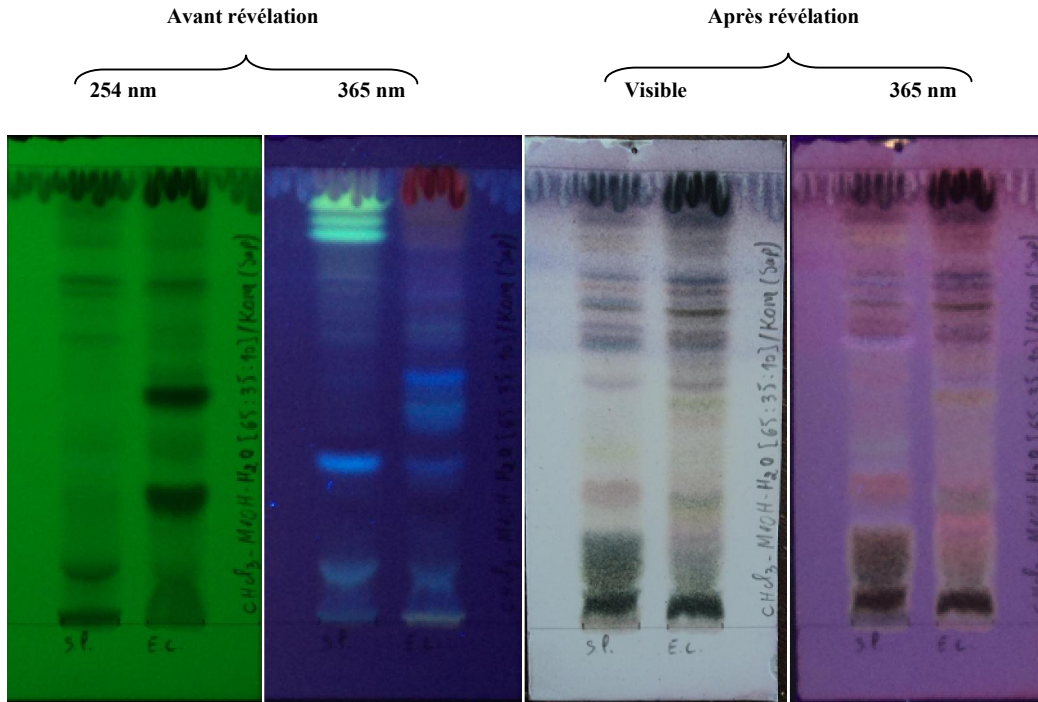
**Figure 4.45.** CCM de l'analyse des saponines avant et après révélation avec la vanilline-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, système de migration N° 4, S.l. = *S. lanatus*; E.c. = *E. confusum*.



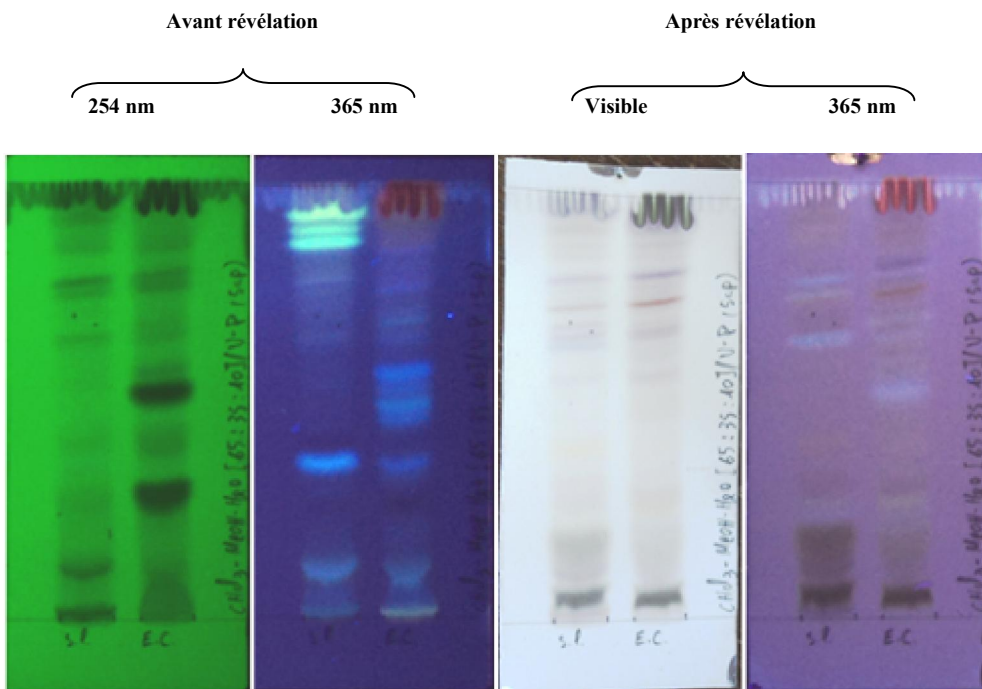
**Figure 4.46.** CCM de l'analyse des saponines avant et après révélation avec l'anisaldéhyde- $H_2SO_4$ , système de migration N° 4, S.l. = *S. lanatus*; E.c. = *E. confusum*.



**Figure 4.47.** CCM de l'analyse des saponines avant et après révélation avec le  $SbCl_3$ , système de migration N° 4, S.l. = *S. lanatus*; E.c. = *E. confusum*.

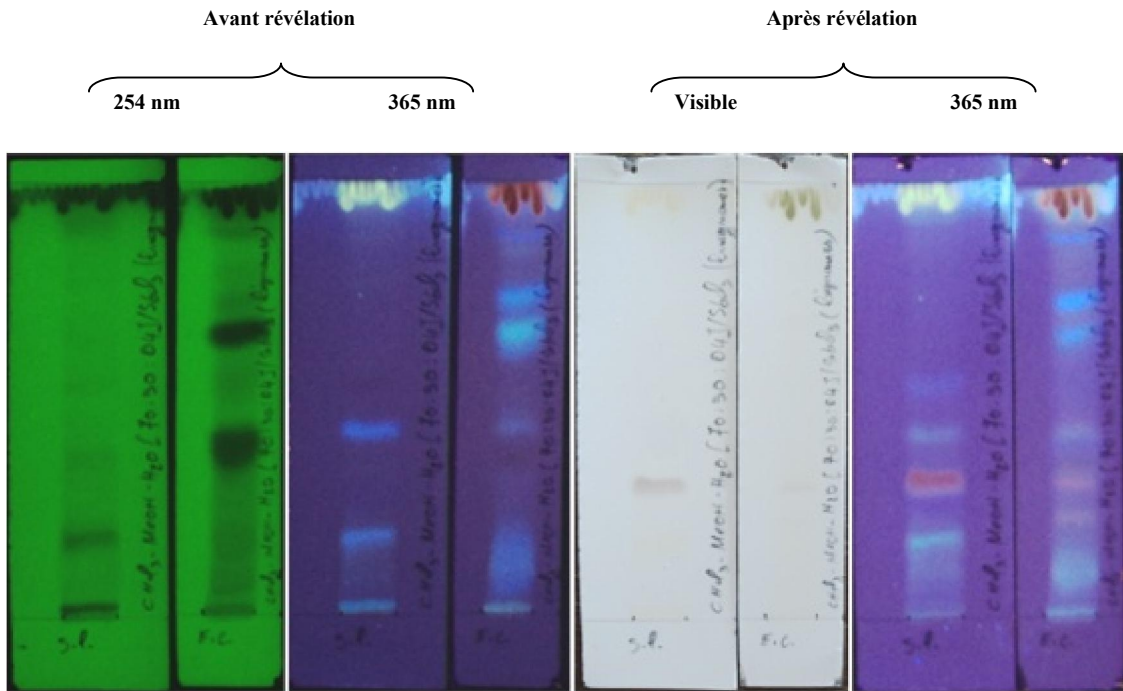


**Figure 4.48.** CCM de l'analyse des saponines avant et après révélation avec le Komarowsky, système de migration N° 4, S.l. = *S. lanatus*; E.c. = *E. confusum*.

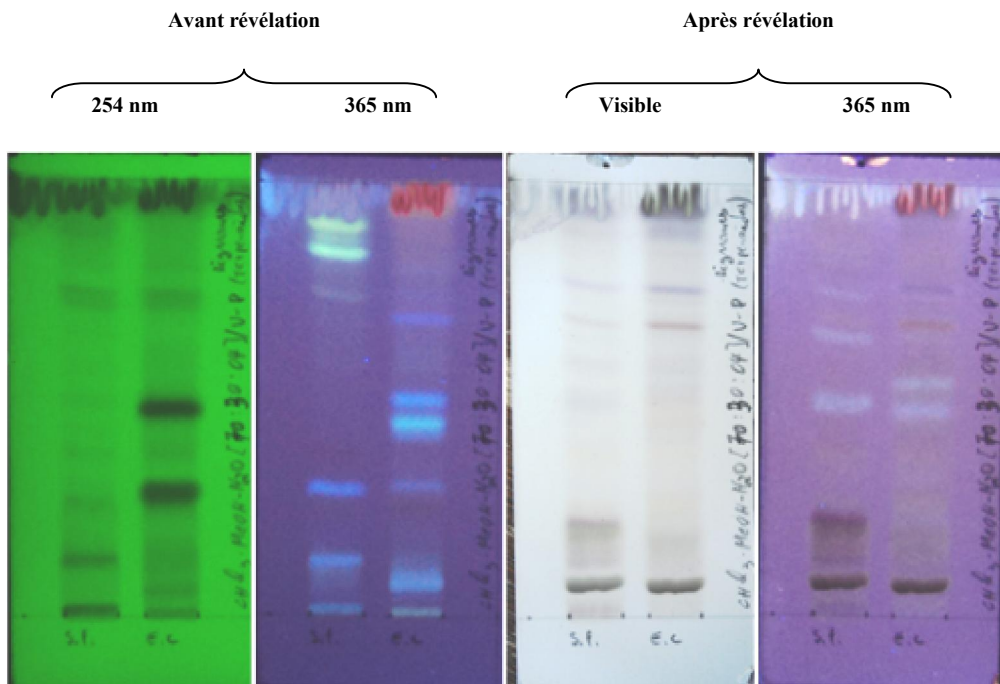


**Figure 4.49.** CCM de l'analyse des saponines avant et après révélation avec la vanilline- $H_3PO_4$ , système de migration N° 4, S.l. = *S. lanatus*; E.c. = *E. confusum*.

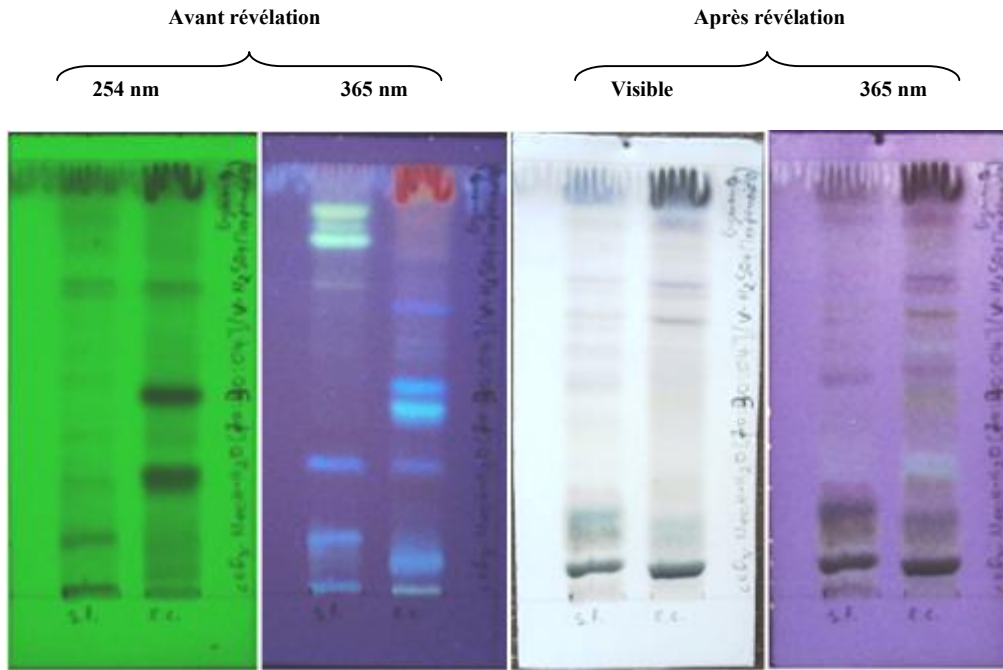




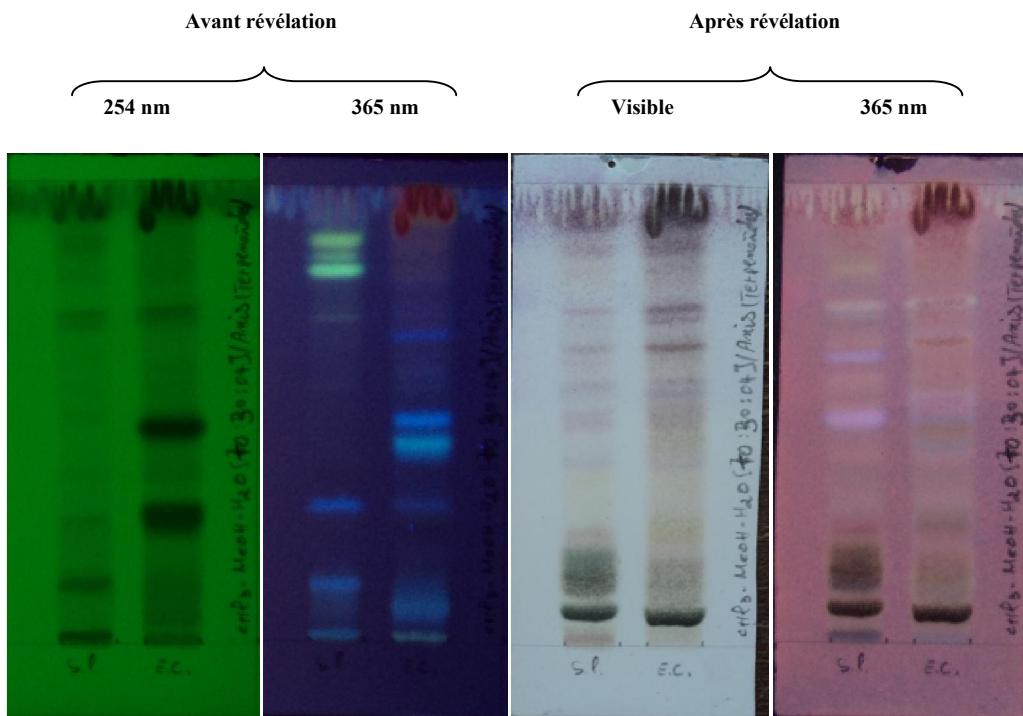
**Figure 4.50.** CCM de l'analyse des lignanes avant et après révélation avec le  $SbCl_3$ , système de migration N° 5, S.l. = *S. lanatus*; E.c. = *E. confusum*.



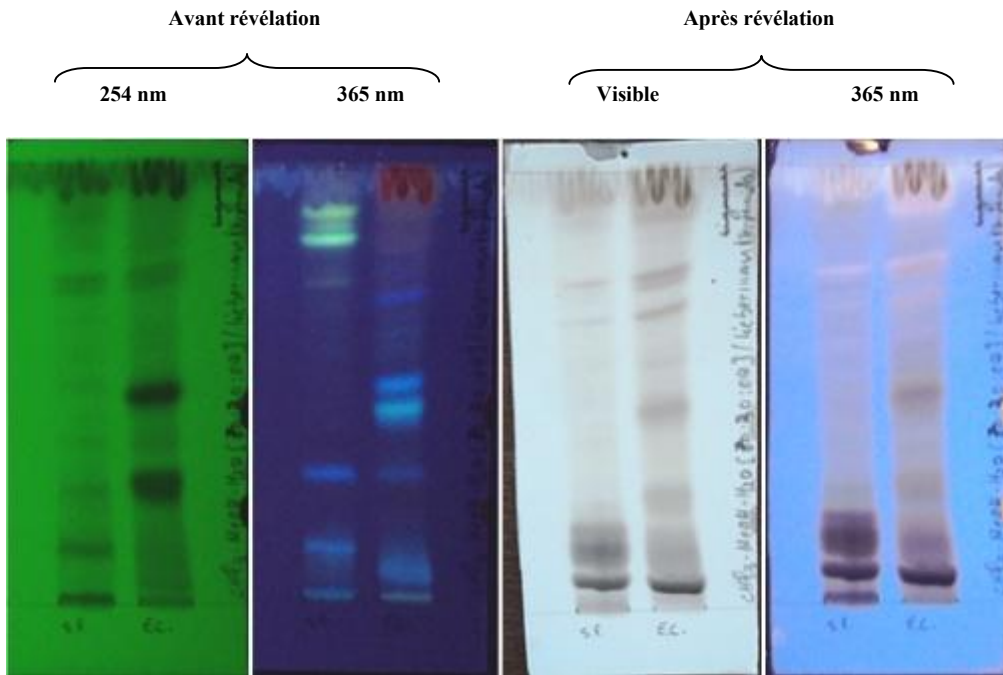
**Figure 4.51.** CCM de l'analyse des lignanes et terpénoïdes avant et après révélation avec la vanilline- $H_3PO_4$ , système de migration N° 5, S.l. = *S. lanatus*; E.c. = *E. confusum*.



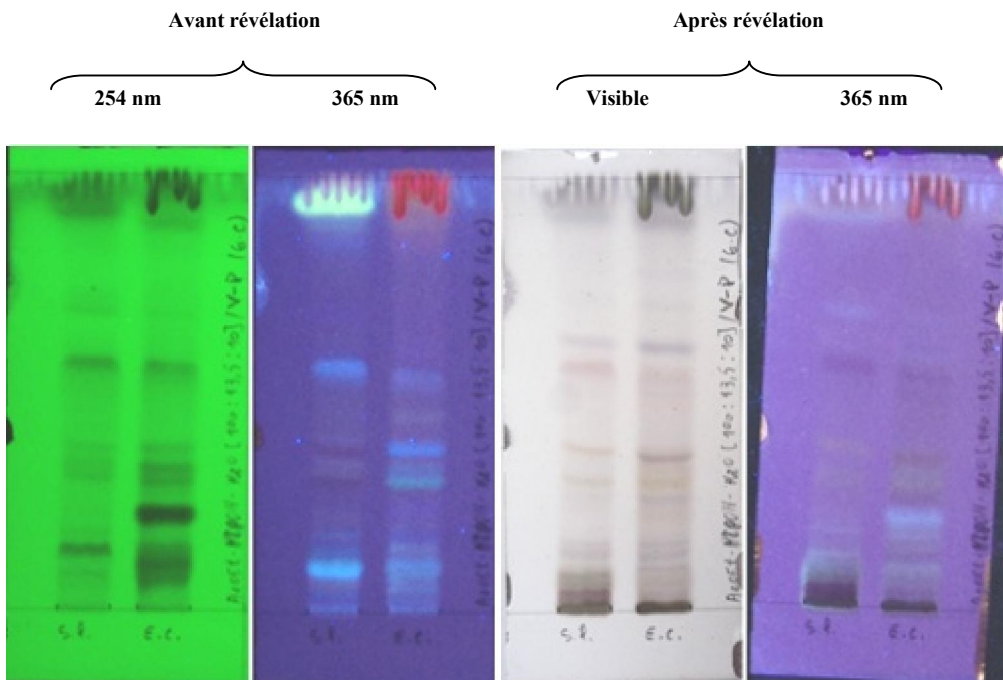
**Figure 4.52.** CCM de l'analyse des lignanes et terpénoïdes avant et après révélation avec la vanilline-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, système de migration N° 5, S.l. = *S. lanatus*; E.c. = *E. confusum*.



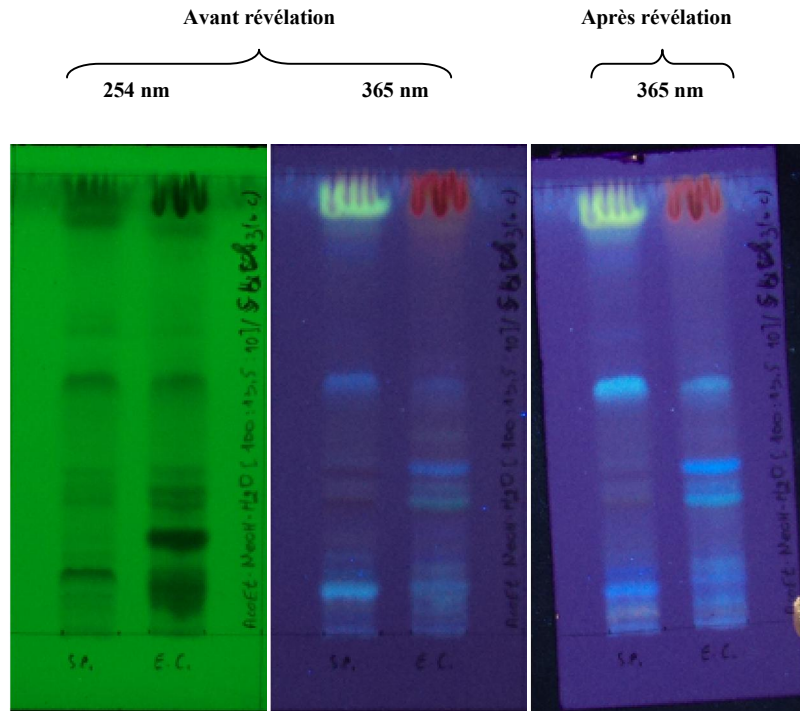
**Figure 4.53.** CCM de l'analyse des terpénoïdes avant et après révélation avec l'anisaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, système de migration N° 5, S.l. = *S. lanatus*; E.c. = *E. confusum*.



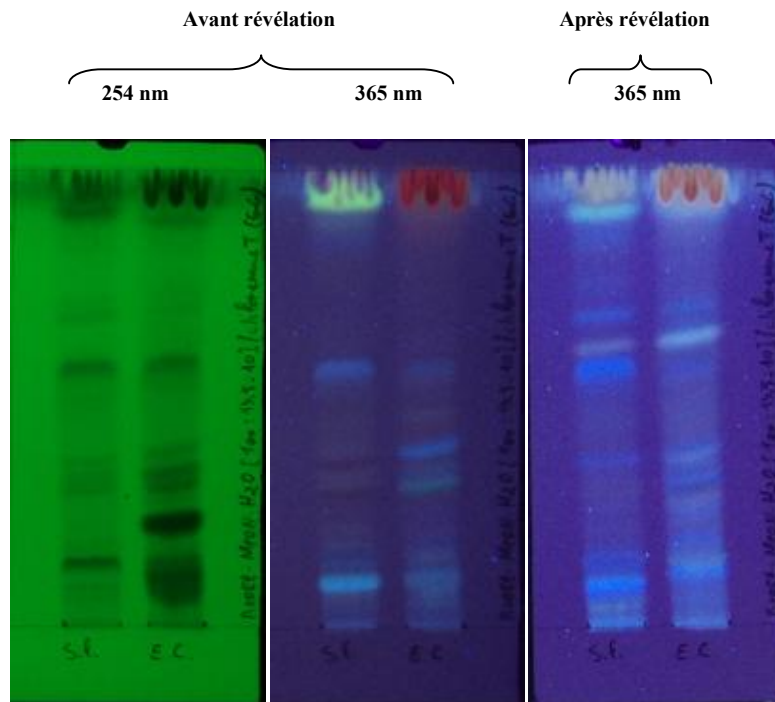
**Figure 4.54.** CCM de l'analyse des terpénoïdes avant et après révélation avec le Liebermann, système de migration N° 5, S.I. = *S. lanatus*; E.c. = *E. confusum*.



**Figure 4.55.** CCM de l'analyse des glycosides cardiotoniques avant et après révélation avec l'anisaldéhyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, système de migration N° 2, S.I. = *S. lanatus*; E.c. = *E. confusum*.

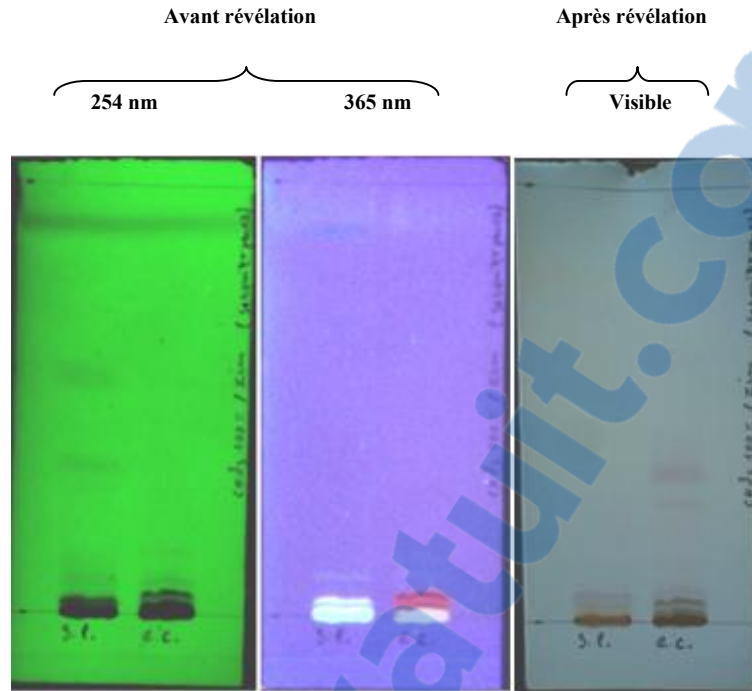


**Figure 4.56.** CCM de l'analyse des glycosides cardiotoniques avant et après révélation avec le  $SbCl_3$ , système de migration N° 2, S.l. = *S. lanatus*; E.c. = *E. confusum*.

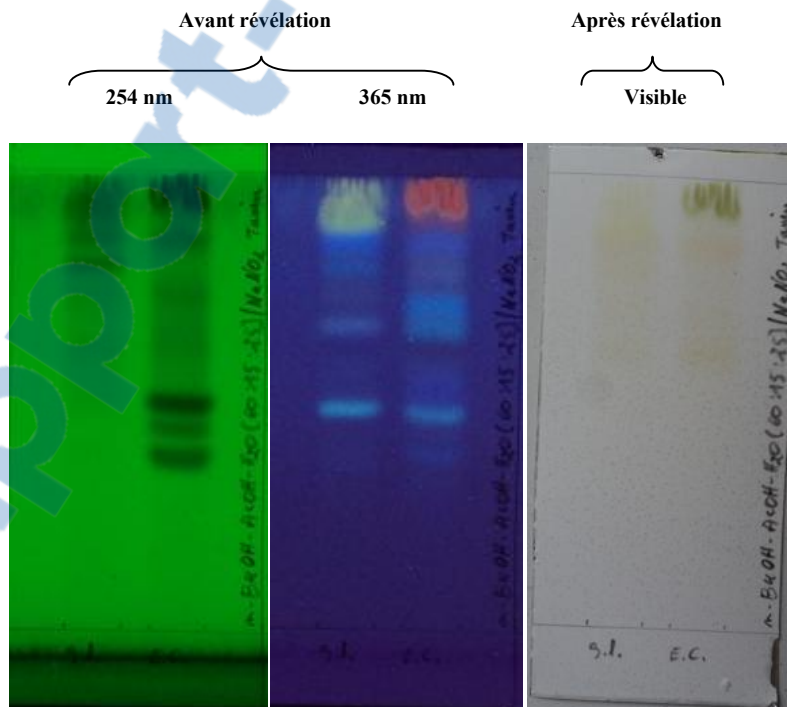


**Figure 4.57.** CCM de l'analyse des glycosides cardiotoniques avant et après révélation avec la chloramine-TCA, système de migration N° 2, S.l. = *S. lanatus*; E.c. = *E. confusum*.

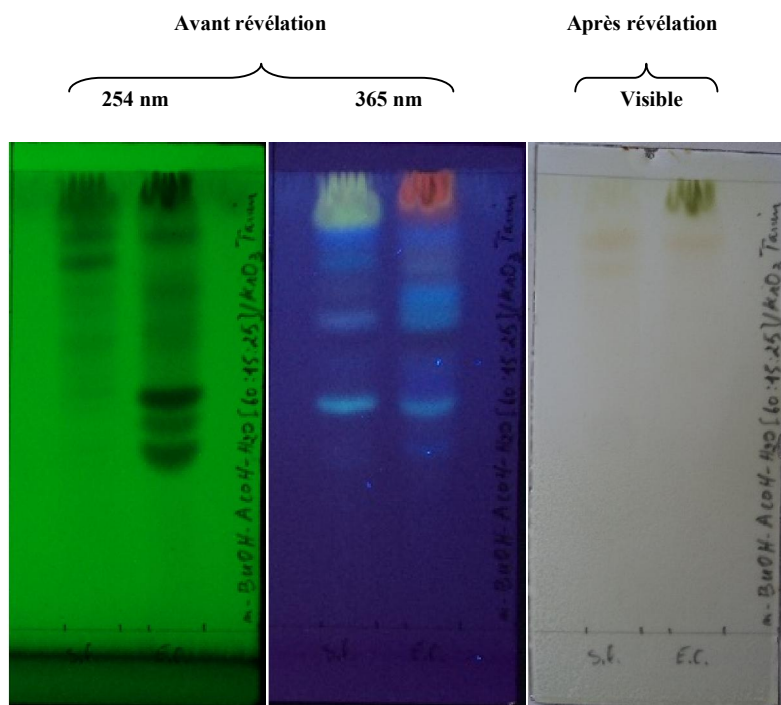




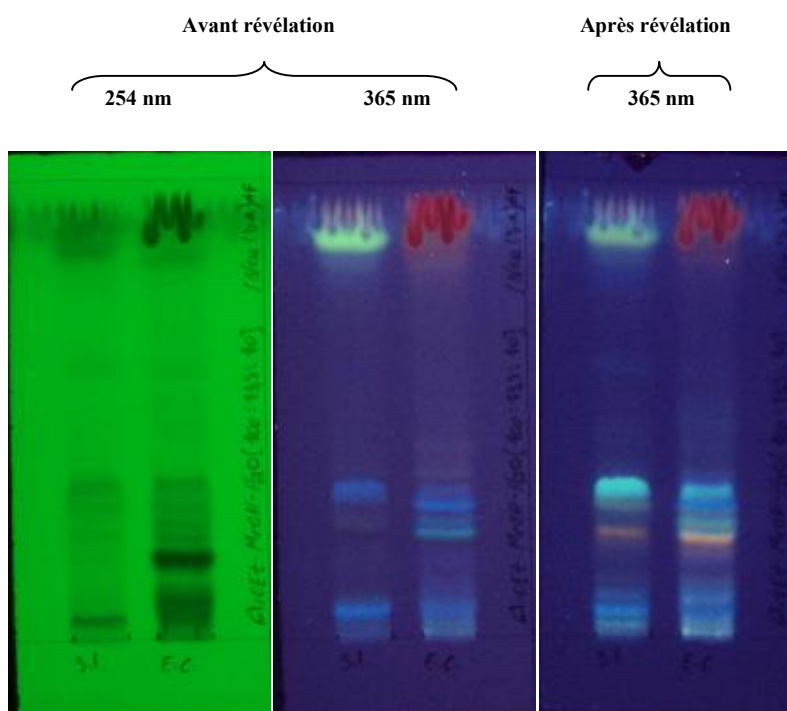
**Figure 4.58.** CCM de l'analyse des sesquiterpènes lactones avant et après révélation avec le Zimmermann, système de migration N° 9, S.l. = *S. lanatus*; E.c. = *E. confusum*.



**Figure 4.59.** CCM de l'analyse des tanins ellagiques avant et après révélation avec le  $\text{NaNO}_2$ , système de migration N° 7, S.l. = *S. lanatus*; E.c. = *E. confusum*.



**Figure 4.60.** CCM de l'analyse des tanins galliques avant et après révélation avec le  $KiO_3$ , système de migration N° 7, S.l. = *S. lanatus*; E.c. = *E. confusum*.



**Figure 4.61.** CCM de l'analyse des flavonoïdes et coumarines avant et après révélation avec le Neu, système de migration N° 2, S.l. = *S. lanatus*; E.c. = *E. confusum*.

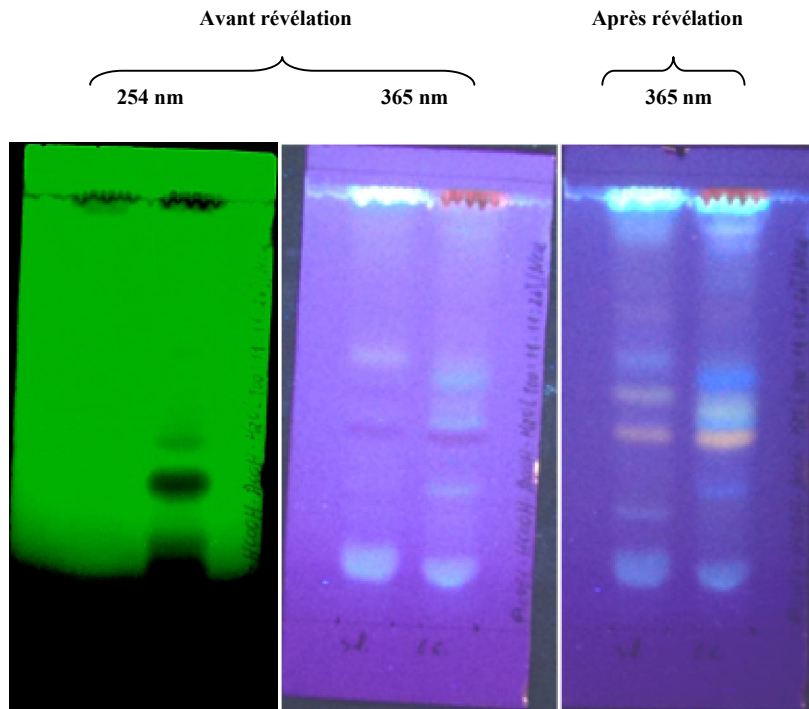


Figure 4.62. CCM de l'analyse des flavonoïdes et coumarines avant et après révélation avec le Neu, système de migration N° 1, S.l. = *S. lanatus*; E.c. = *E. confusum*.

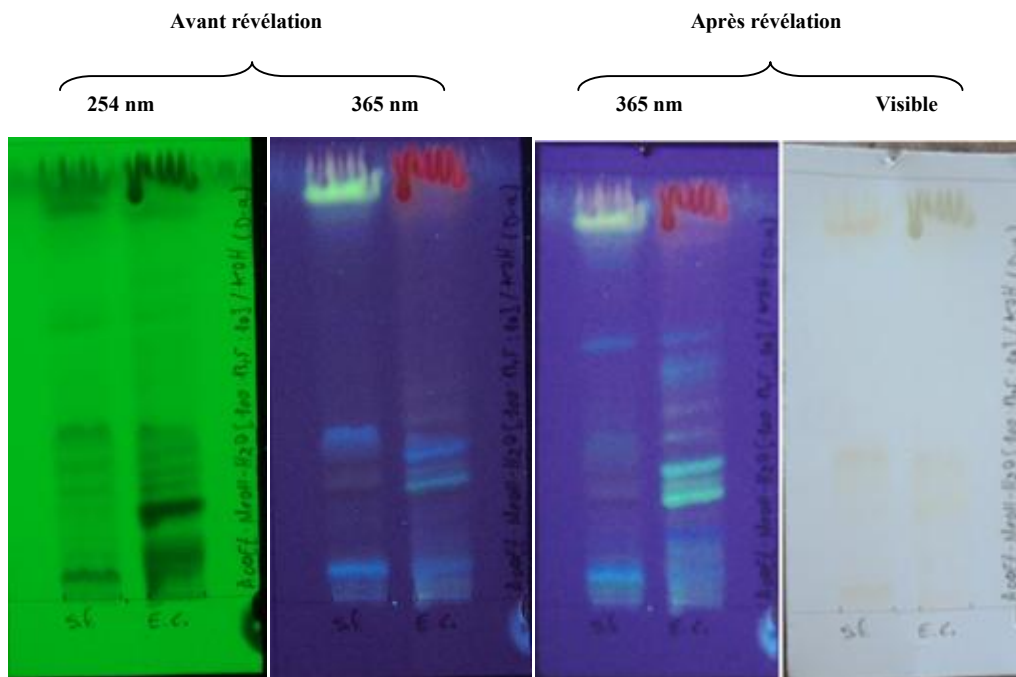
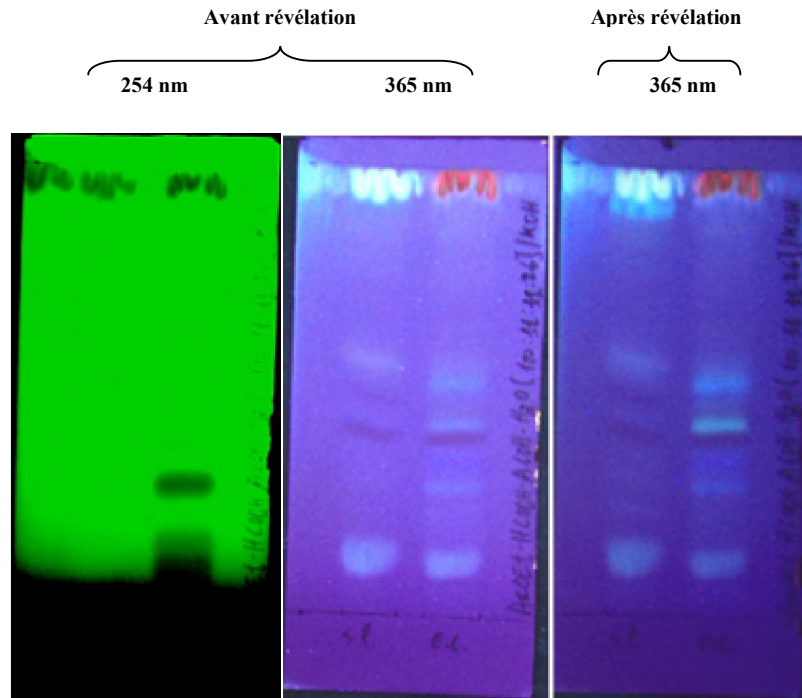


Figure 4.63. CCM de l'analyse des coumarines avant et après révélation avec le KOH, système de migration N° 2, S.l. = *S. lanatus*; E.c. = *E. confusum*.



**Figure 4.64.** CCM de l'analyse des coumarines avant et après révélation avec le KOH, système de migration N° 1, S.l. = *S. lanatus*; E.c. = *E. confusum*.

**Tableau 4.8.** Récapitulatif du criblage phytochimique de l'extrait éthanolique de la plante entière de *S. lanatus* et *E. confusum*.

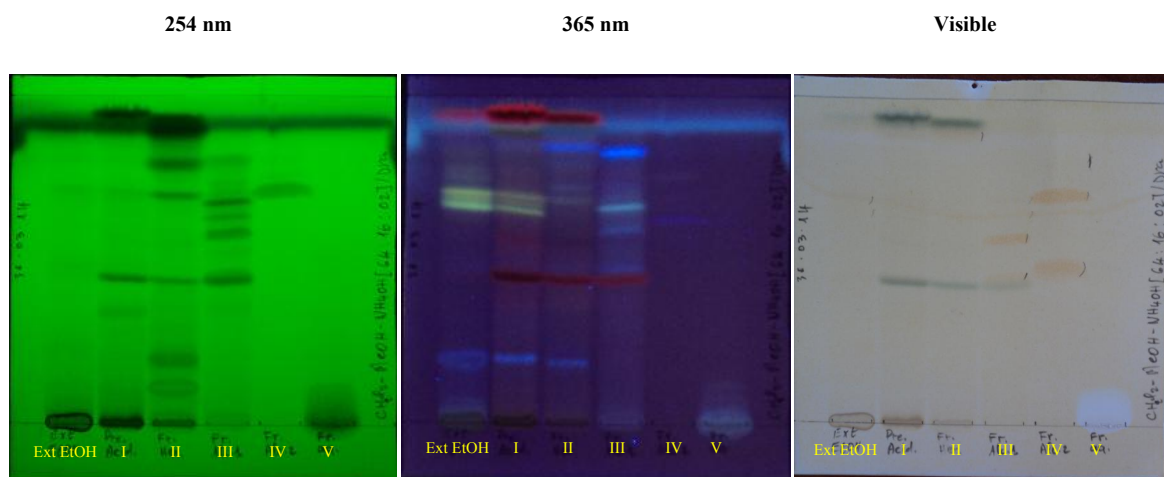
Phytoconstituants	Résultats	
	<i>S. lanatus</i>	<i>E. confusum</i>
Acides phénoliques	+	+
Alcaloïdes	+++	+++
Coumarines	+	+
Dérivés anthracéniques	-	-
Flavonoïdes	++	++
Glycosides cardiotoniques	+	+
Lignanes	+++	+++
Naphtoquinones	-	-
Saponines	+++	+++
Sesquiterpènes lactones	+	+++
Tanins catéchiques	-	-
Tanins ellagiques	+	+
Tanins galliques	+	+
Terpénoides	+++	+++

- : absence, + : présence en faible quantité, ++ : présence en moyenne quantité, +++ : présence en grande quantité.



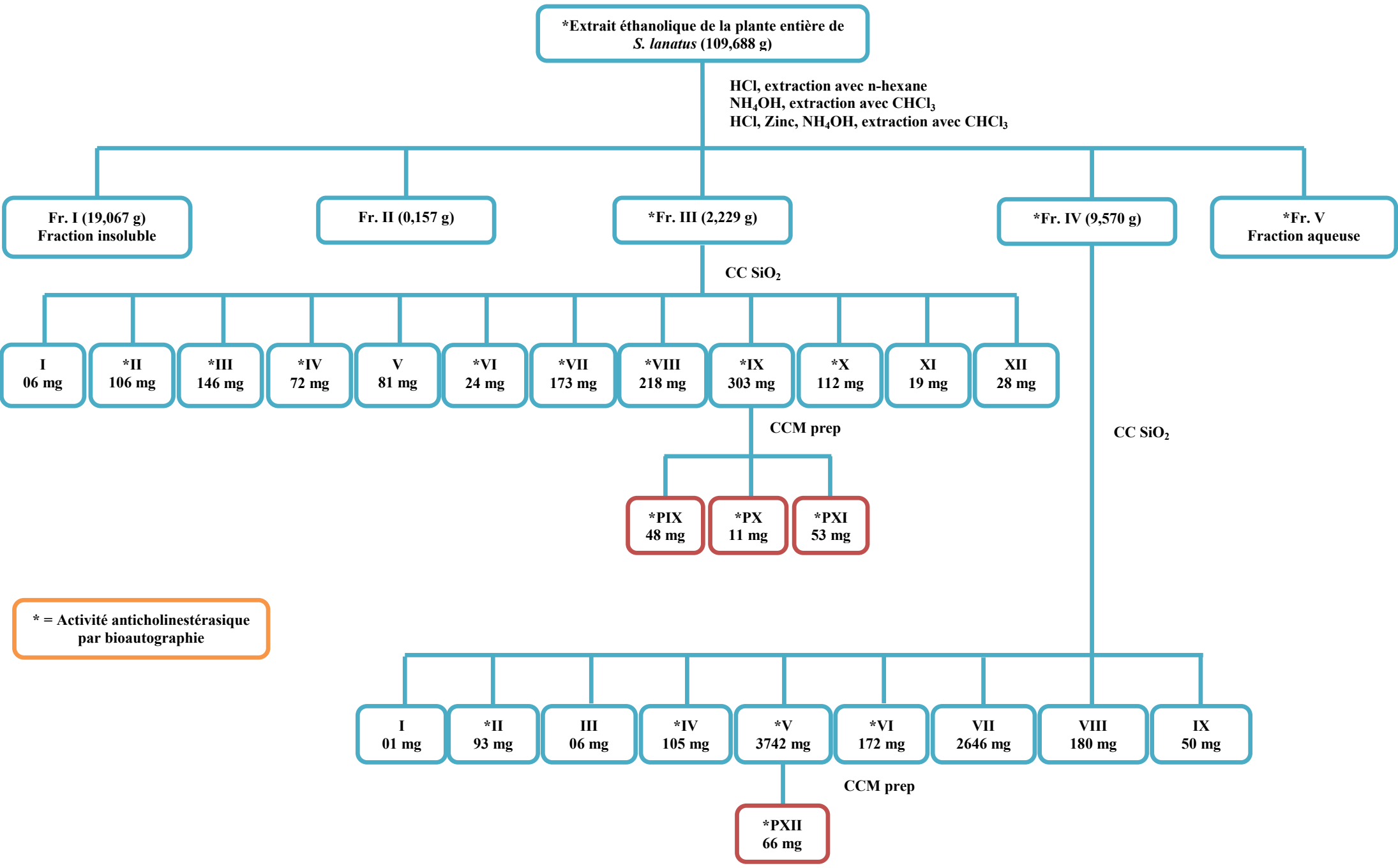
### 4.3.2. Fractionnement bio-guidé de l'extrait éthanolique de la plante entière de *S. lanatus* et isolement des produits IX-XII

Après avoir montré une activité inhibitrice de l'AChE par bioautographie, l'extrait éthanolique de la plante entière de *S. lanatus* a été fractionné par bio-essais dans le but d'isoler des produits actifs. Plusieurs procédés de purification ont été employés concernant essentiellement des techniques chromatographiques. Cet extrait (109,688 g) a été imprégné de 500 mL d'HCl (2 M) pendant 30 min et filtré. La fraction insoluble a été récupérée par l'acétone et constitue la fraction **I** (19,067 g). Le matériel neutre a été extrait à partir du filtrat par le n-hexane ( $3 \times 1000$  mL) et constitue la fraction **II** (0,157 g). Les fractions **I** et **II** sont testées négatives au Dragendorff, indiquant une absence d'alcaloïdes. La solution acidifiée a été ensuite basifiée par  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 25 % jusqu'à pH 10 et extraite avec  $\text{CHCl}_3$  ( $3 \times 1000$  mL) pour donner la fraction **III** (2,229 g) contenant des alcaloïdes. Afin de réduire les alcaloïdes *N*-oxydes non extractibles avec du  $\text{CHCl}_3$ , la phase aqueuse a été réacidifiée avec l'HCl jusqu'à pH 2, réduite avec la poudre de zinc pendant la nuit, filtrée et alcalinisée par  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 25 % jusqu'à pH 10. La solution alcalinisée a été extraite avec  $\text{CHCl}_3$  ( $3 \times 1000$  mL) pour donner la fraction **IV** (9,570 g) contenant des alcaloïdes libres. La solution alcaline restante constitue la fraction **V** (figure 4.65 et 4.66).



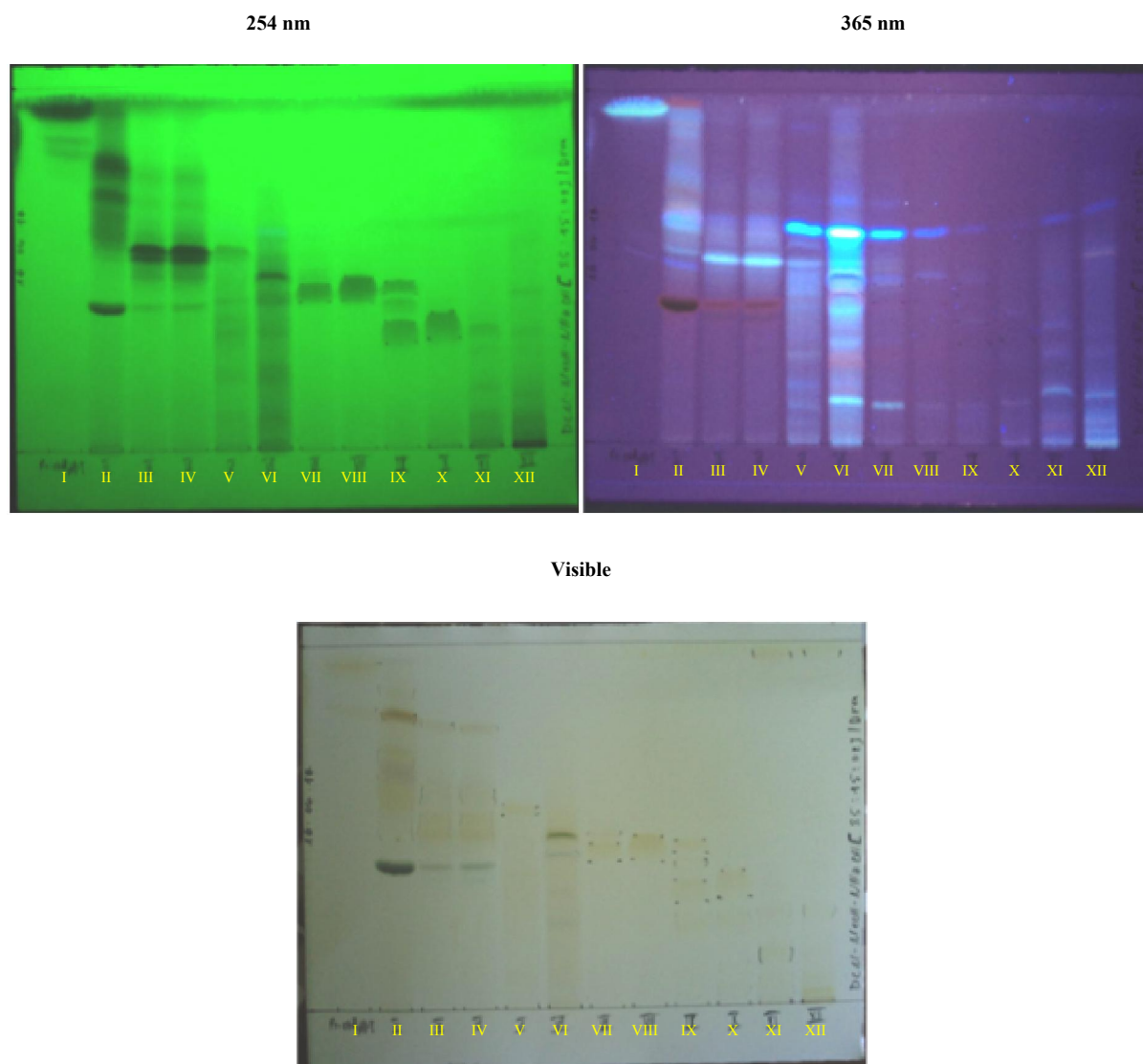
**Figure 4.65.** CCM de l'analyse des fractions (**I-V**) issues de l'extrait éthanolique de *S. lanatus*, avant (254 et 365 nm) et après révélation avec le Dragendorff (visible), système de migration DCM-MeOH- $\text{NH}_4\text{OH}$  [64 : 16 : 02].

Nous avons choisi de travailler sur les fractions alcaloïdiques (**III** et **IV**) en raison de leur activité anticholinestérasique. Nous avons tout d'abord réalisé un fractionnement de la



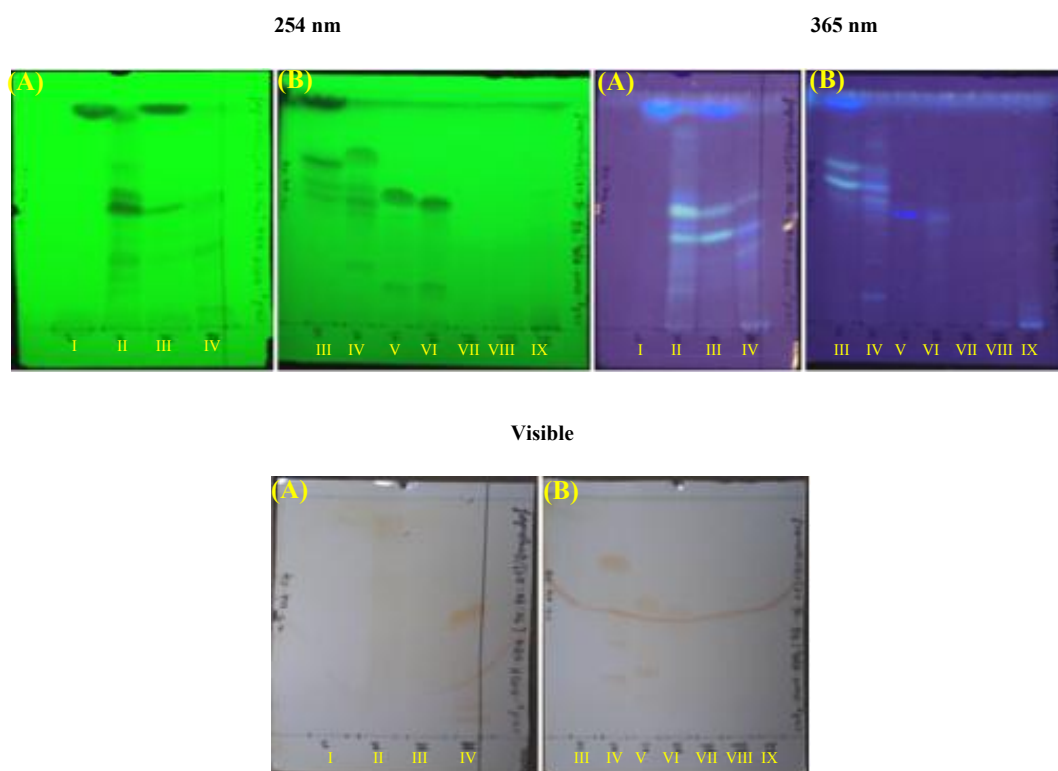
**Figure 4.66.** Schéma d'isolement des produits IX-XII de l'extrait éthanologique de la plante entière de *S. lanatus*.

fraction **III** (2,229 g) sur CC (55 x 2,5 cm) de gel de silice (Silicagel, 40-65  $\mu$ m) éluée par un gradient de DCM-MeOH (100 : 00  $\rightarrow$  65 : 35, 2,132 L) ensuite lixivée avec du MeOH (267 mL). L'évolution de la séparation sur colonne a été suivie par CCM et il en résulte douze fractions (de **I** à **XII**) voir **figure 4.67** dont les rendements sont indiqués dans la **figure 4.66**. La fraction **III-IX** (303 mg) active a été ensuite séparée par la CCM préparative avec gel de silice (Silicagel, F254, glass plate, 1 mm thickness), éluée par DCM-MeOH-NH<sub>4</sub>OH [85 : 15 : 02] pour donner les produits **IX** (48 mg), **X** (11 mg), et **XI** (53 mg) voir **figure 4.69** et **4.66**.

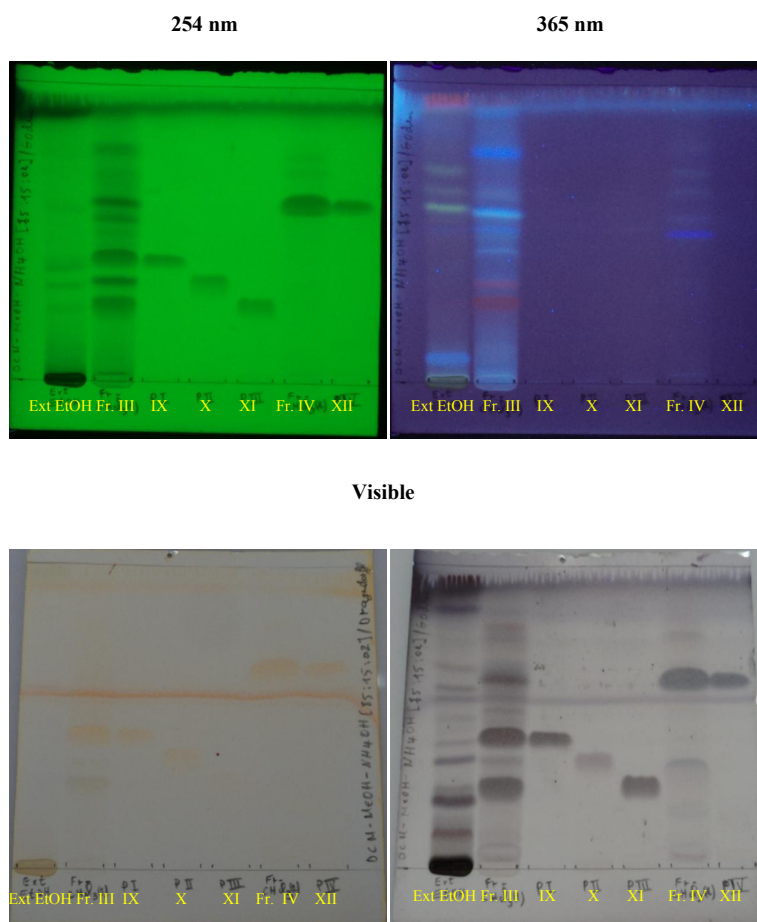


**Figure 4.67.** CCM de l'analyse des fractions (**I-XII**) issues de la fraction **III**, avant (254 et 365 nm) et après révélation avec le Dragendorff (visible), système de migration DCM-MeOH-NH<sub>4</sub>OH [85 : 15 : 02].

La fraction **IV** (9,570 g) à son tour a été séparée sur CC (65 x 3 cm) de gel de silice (Silicagel, 40-65  $\mu\text{m}$ ) éluée par un gradient de DCM-MeOH (100 : 00  $\rightarrow$  65 : 35, 4,560 L) ensuite lixivée avec du MeOH (570 mL). L'évolution de la séparation sur colonne a été suivie par CCM et il en résulte neuf fractions (de **I** à **IX**) voir **figure 4.68** dont les rendements sont indiqués dans la **figure 4.66**. La fraction **IV-V** (3742 mg) active a été ensuite séparée par la CCM préparative avec gel de silice (Silicagel, F254, glass plate, 1 mm thickness), éluée par DCM-MeOH-NH<sub>4</sub>OH [64 : 16 : 02] pour donner le produit **XII** (66 mg) voir **figure 4.69** et **4.66**.



**Figure 4.68.** CCM de l'analyse des fractions (**I-IX**) issues de la fraction **IV**, avant (254 et 365 nm) et après révélation avec le Dragendorff (visible), système de migration DCM-MeOH-NH<sub>4</sub>OH [90 : 10 : 01] (A) et [85 : 15 : 02] (B).



**Figure 4.69.** CCM de l'analyse des produits **IX**, **X**, **XI**, **XII** avant (254 et 365 nm) et après révélation avec le Dragendorff (visible à gauche) et le Godin (visible à droite), système de migration DCM-MeOH-NH<sub>4</sub>OH [85 : 15 : 02].

### 4.3.3. Interprétations des spectres et détermination de la structure des produits IX-XII

#### 4.3.3.1. Détermination de la structure du produit IX

Le produit **IX** se présente sous forme d'une gomme brune. Il réagit avec le Dragendorff, ce qui laisse présager qu'il s'agit d'alcaloïde. La formule brute C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>9</sub> du produit **IX** a été établie sur la base d'analyses par la spectrométrie de masse (HR-Q-TOF-ESI-MS, high resolution quadrupole time-of-flight electrospray ionization mass spectroscopy) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) monodimensionnelle et bidimensionnelle (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, APT (Attached Proton Test), COSY (COrrrelation SpectroscopY) et HMBC (Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy)).

Le spectre de masse haute résolution en mode positif (**figure 4.70**) donne un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  456,1720 [M+H]<sup>+</sup> (calculée pour C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>9</sub>, 456,2234) indiquant sept

degrés d'insaturation. Le fragment à  $m/z$  440,1990 doit donc être issu du départ d'un groupe *N*-oxyde (16 Da). Le 3'-acétylhéliosupine *N*-oxyde présente une masse moléculaire  $m/z$  456, ce qui est en accord avec l'ion pseudomoléculaire observé. Par ailleurs, le schéma de fragmentation de l'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  456,1720 présente un fragment identique à celui observé pour le 3'-acétylhéliosupine *N*-oxyde (Shimshoni *et al.*, 2015).

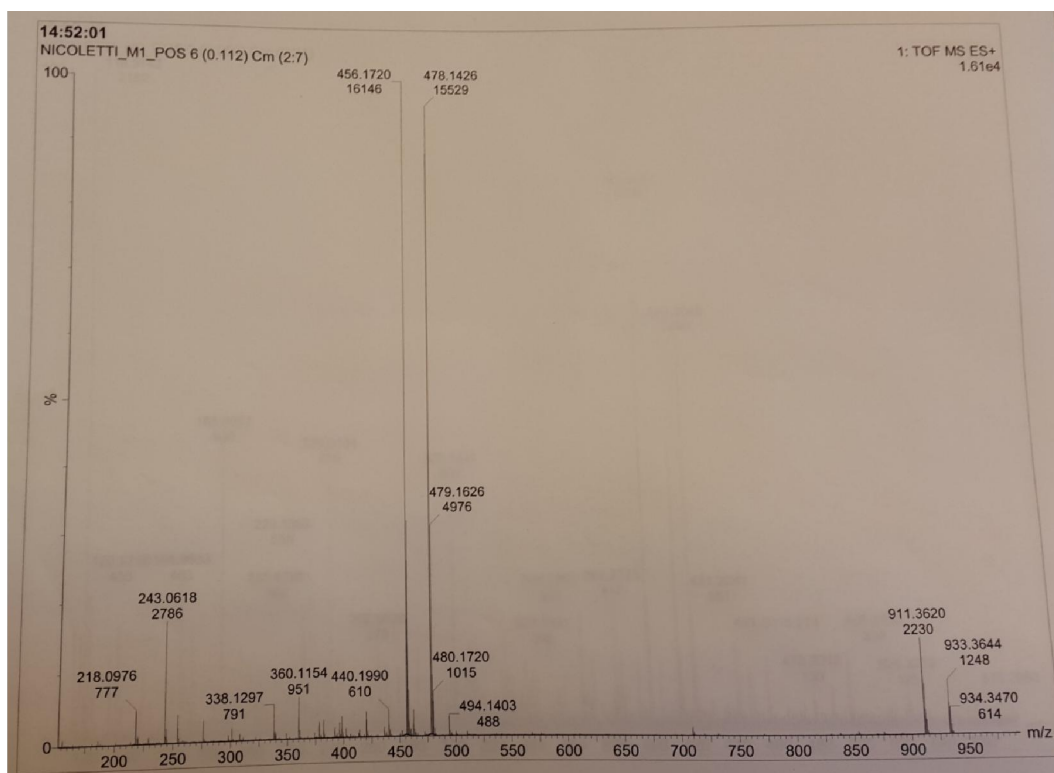


Figure 4.70. Spectre HR-Q-TOF-ESI-MS du produit IX en mode positif.

Le spectre APT (figure 4.72) présente 22 signaux, incluant six méthyles, quatre méthylènes (un carbone oxygéné à  $\delta C$  60,92 (C-9)), cinq méthines (deux carbones oxygénés à  $\delta C$  72,52 (C-7); 71,97 (C-3') et deux carbones oléfiniques à  $\delta C$  124,25 (C-2); 142,11 (C-3'')), et sept carbones quaternaires (deux carbones oxygénés à  $\delta C$  83,54 (C-2'); 73,60 (C-5'); deux oléfiniques à  $\delta C$  132,50 (C-1); 126,35 (C-2'') et trois carbones carbonyles à  $\delta C$  173,20 (C-1'); 167,50 (C-1''); 169,75 (C3'-CO)). Les déplacements chimiques du spectre RMN  $^1H$  (figure 4.71) du cycle sont en accord avec les valeurs rapportées pour l'héliotridine *N*-oxydes (Logie *et al.*, 1994). Les déplacements chimiques des protons déplacés H-3a/H-3b ( $\delta H$  5,05; bd/4,60; bd), H-5a/H-5b ( $\delta H$  4,30; m/4,15; m), et H-8 ( $\delta H$  5,07; bs) confirme la présence de la partie *N*-oxyde (Asibal *et al.*, 1989; Constantinidis *et al.*, 1993; Logie *et al.*, 1994). La présence de la double liaison  $\Delta^{1,2}$  est confirmée par les signaux déplacés de H-2 à  $\delta H$  5,92 (1H, bs), et C-



1/C-2 à  $\delta C$  132,50/124,25. Le spectre RMN  $^1H$  du produit **IX** montre aussi un signal oléfinique à  $\delta H$  6,19 (1H, qq,  $J = 7/1,5$  Hz, H-3''), qui, conjointement avec les signaux de deux groupes méthyles à  $\delta H$  1,90 (3H, dq,  $J = 7/1,5$  Hz, H-4'') et  $\delta H$  1,82 (3H, q,  $J = 1,5$  Hz, H-5''), sont indicatifs d'un groupe angeloyloxy (Villanueva-Cañongo *et al.*, 2014). De plus, la position des deux méthyles et le méthine a été confirmée par les corrélations COSY et HMBC (figure 4.73 et 4.74). Ainsi, le signal H-7 observé à  $\delta H$  5,09 (1H, d,  $J = 5/2,5$  Hz) révèle la présence d'un groupe hydroxy estérifié à C-7 (Asibal *et al.*, 1989; Constantinidis *et al.*, 1993; El-Shazly *et al.*, 1996). Le spectre HMBC, par les couplages entre C-1' et H-9, a indiqué que l'heliotridine est estérifié en position C-9. Le spectre RMN  $^1H$  du produit **IX** montre aussi des signaux de protons à  $\delta H$  5,35 (1H, q,  $J = 6$  Hz, H-3'),  $\delta H$  1,28 (3H, d,  $J = 6$  Hz, H-4'),  $\delta H$  1,18 (3H, s, H-6'),  $\delta H$  1,30 (3H, s, H-7') et  $\delta H$  1,95 (3H, d, 3'-Ac) attribués, avec l'aide du spectre APT à un signal méthine, trois signaux méthyles et un groupe acétoxy, respectivement, correspondant à la partie acide nécique du 3'-acétylhéliosupine et 3'-acétylhéliosupine *N*-oxyde (Constantinidis *et al.*, 1993; El-Shazly *et al.*, 1996). Cette hypothèse a été confirmée par la corrélation COSY du H-3' à 3H-4', ainsi que par les corrélations HMBC du C-2' à 3H-4', 3H-6', 3H-7'; C-3' à 3H-4'; C-5' à 3H-6', 3H-7'; C-6' à 3H-7'; et C-7' à 3H-6'. Le spectre APT du produit **IX** confirme la présence du groupe acétoxy à partir des signaux à  $\delta C$  169,75 (C3'-CO) et  $\delta C$  21,29 (C3'-COCH<sub>3</sub>) et le signal du C-3' déplacé à 71,97 ppm, comparé avec ceux du heliosupine (El-Shazly *et al.*, 1996), ainsi la corrélation HMBC du 1H-3' au C3'-CO révèle que le groupe acétoxy est lié au C-3' dans le produit **IX**. La structure du produit **IX** a été élucidée, comme présentée dans la figure 4.75 et a été identifiée comme étant 3'-acétylhéliosupine *N*-oxyde. Ce produit a été isolé à partir des parties aériennes de *Heliotropium hirsutissimum* Grauer (Constantinidis *et al.*, 1993), par contre il n'a jamais été isolé ou caractérisé dans le genre *Solenanthus*. Une évaluation préliminaire de l'activité cytotoxicité du 3'-acétylhéliosupine *N*-oxyde a été déterminée *in vitro* contre une culture de cellules L1210. Ce produit a montré une activité cytotoxique significative avec une IC<sub>50</sub> de 3  $\mu g/mL$  (Constantinidis *et al.*, 1993).

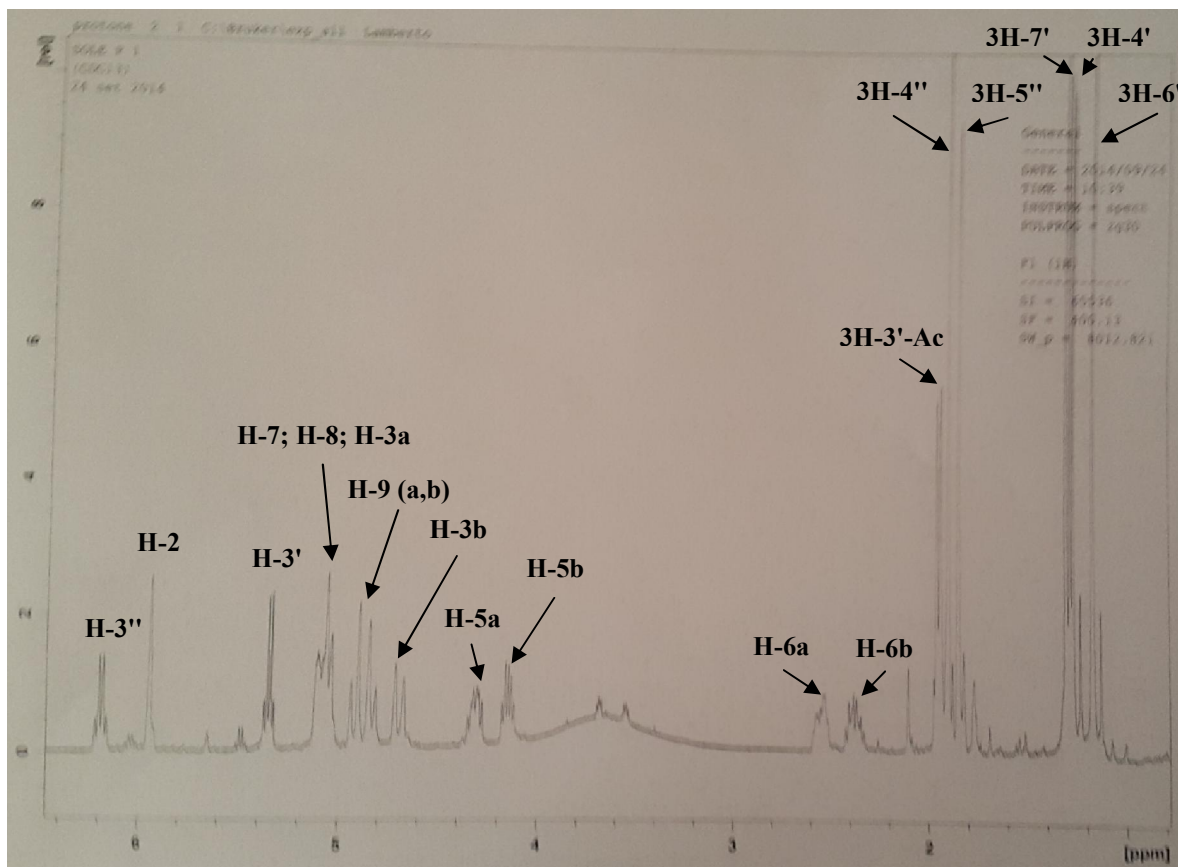


Figure 4.71. Spectre RMN  $^1\text{H}$  du produit IX (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

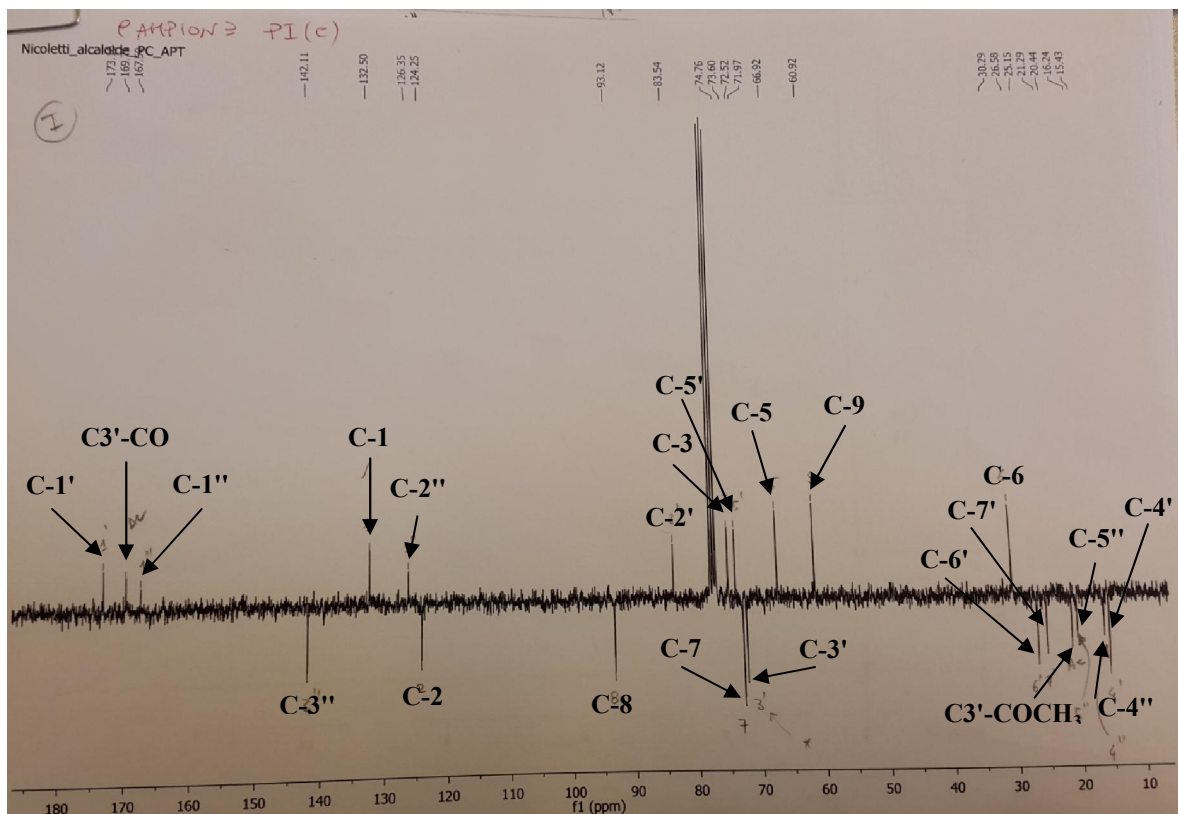
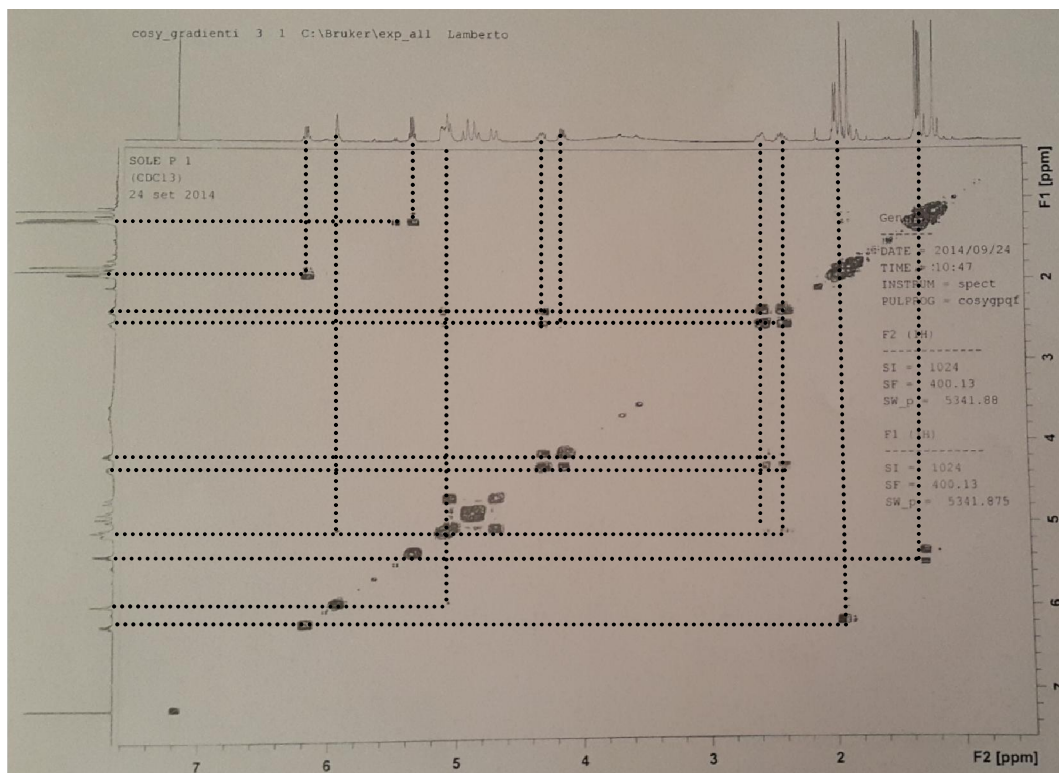
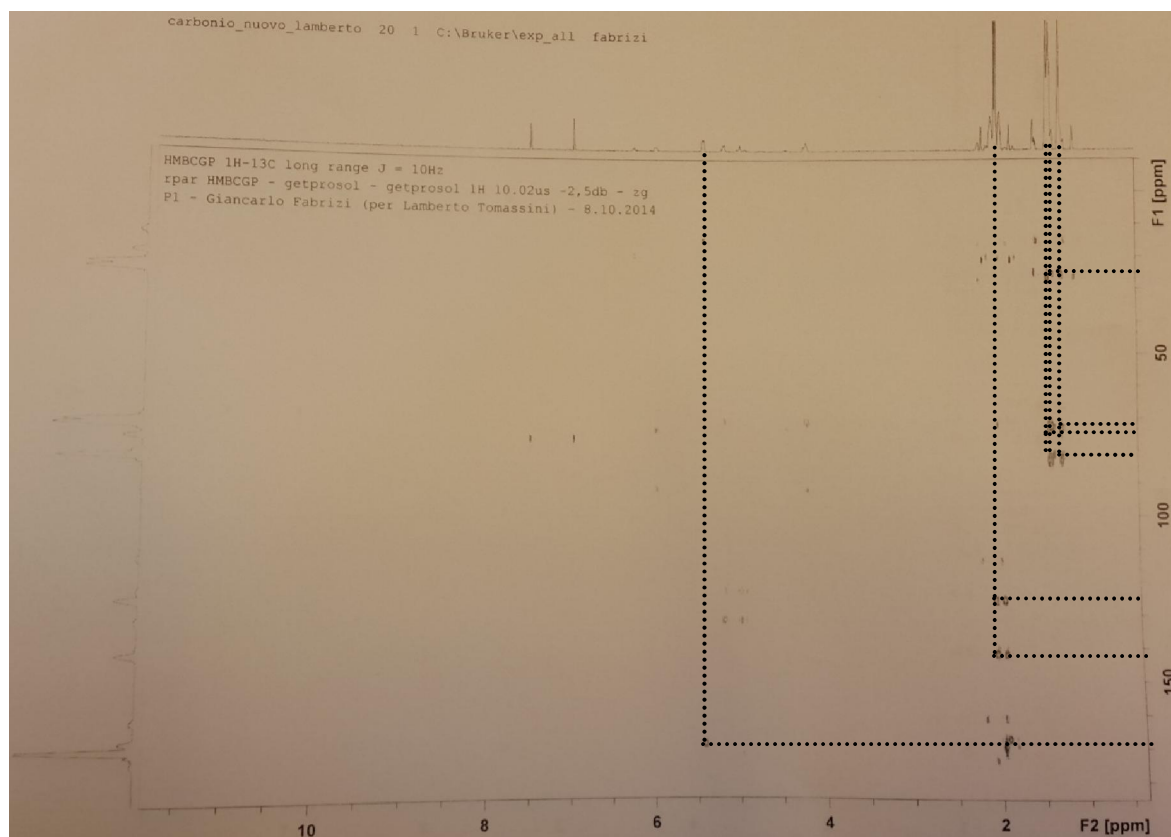


Figure 4.72. Spectre RMN APT du produit IX (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

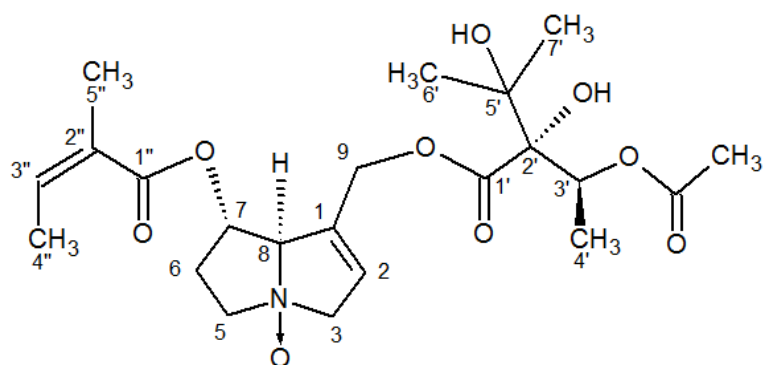




**Figure 4.73.** Spectre RMN de corrélations homonucléaires COSY du produit IX (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**Figure 4.74.** Spectre RMN de corrélations hétéronucléaires HMBC du produit IX (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



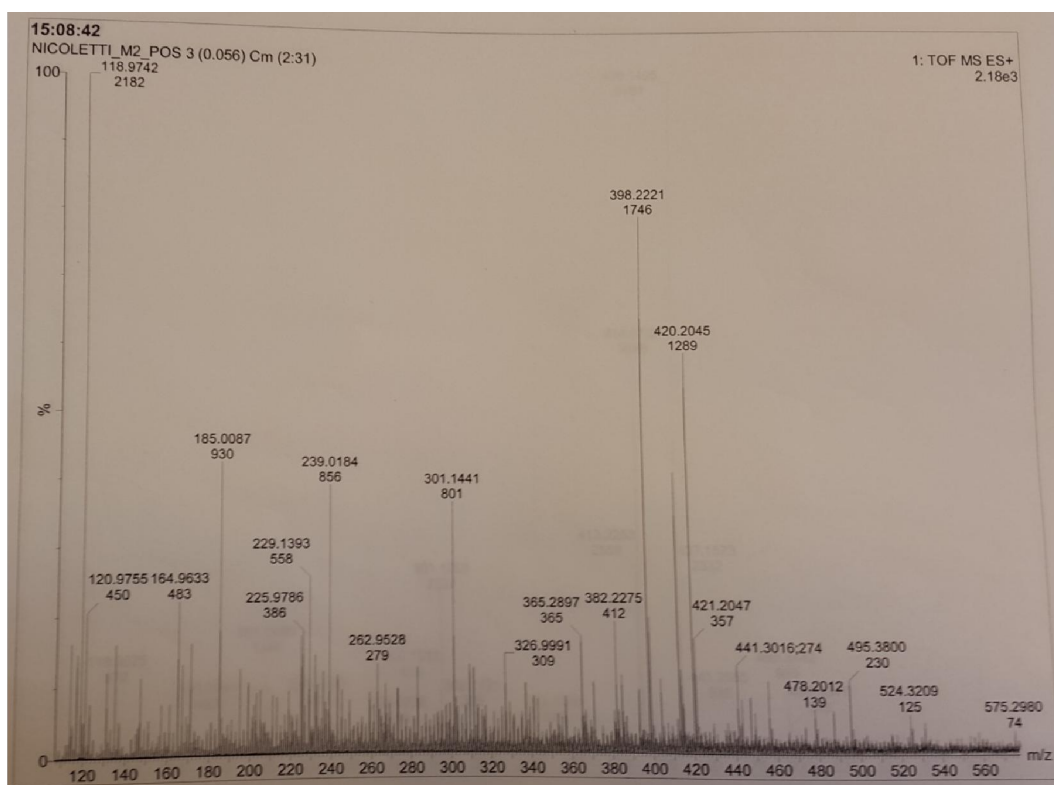
**Figure 4.75.** Structure du produit **IX** (3'-acétylheliosupine *N*-oxyde).

#### 4.3.3.2. Détermination de la structure du produit **X**

Le produit **X** se présente sous forme d'une gomme brune. Il réagit avec le Dragendorff, ce qui laisse présager qu'il s'agit d'alcaloïde. La formule brute  $C_{20}H_{31}NO_7$  du produit **X** a été établie sur la base d'analyses par la spectrométrie de masse (HR-Q-TOF-ESI-MS) et la RMN monodimensionnelle et bidimensionnelle ( $^1H$ ,  $^{13}C$ , APT, COSY, HMBC et ROESY (Rotating-frame Overhauser Effect SpectroscopY)).

Le spectre de masse haute résolution en mode positif (**figure 4.76**) donne un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  398,2221  $[M+H]^+$  (calculée pour  $C_{20}H_{32}NO_7$ , 398,2179) indiquant six degrés d'insaturation. Le fragment à  $m/z$  382,2275 doit donc être issu du départ d'un groupe *N*-oxyde (16 Da).

Les déplacements chimiques des protons  $^1H$  du spectre RMN (**figure 4.77**) du cycle étaient en accord avec les valeurs rapportées pour l'héliotridine *N*-oxydes (**Logie et al., 1994**). En fait, dans le spectre NOESY aucun effet NOE n'a été observé entre le H-7 à  $\delta H$  5,18 (1H, bs) et H-8 à  $\delta H$  4,58 (1H, s), ce qui confirme la configuration *trans* des protons (**Roeder et al., 1991**). La présence de la double liaison  $\Delta^{1,2}$  est confirmée par les signaux déplacés de H-2 à  $\delta H$  5,94 (1H, s), et C-1/C-2 ( $\delta C$  133,00/124,99). Le groupe angeloyloxy a été identifié à la position C-7 ( $\delta C$  74,73) comme dans le produit **IX**. Les signaux restants dans les spectres RMN  $^1H$  et APT (**figure 4.78**) indiquent la présence de l'acide (-)-viridiflorique, estérifiant la partie nécine à C-9 ( $\delta C$  61,61). Tandis que le spectre HMBC, par les couplages entre C-1' et H-9, indique que l'héliotridine est estérifié en position C-7 par l'acide angélique et en C-9 par de l'acide (-)-viridiflorique.



**Figure 4.76.** Spectre HR-Q-TOF-ESI-MS du produit **X** en mode positif.

En effet, un groupe hydroxyéthyle représenté par les signaux à  $\delta H$  3,96 (1H, q,  $J = 6,8$  Hz, H-3'),  $\delta H$  1,07 (3H, d,  $J = 6,8$  Hz, H-4') et un groupe isopropyle représenté par les signaux à  $\delta H$  1,74 (1H, m, H-5'),  $\delta H$  0,84 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-6'),  $\delta H$  0,86 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-7') ont été reconnus par la RMN  $^1H$  et les corrélations COSY (**figure 4.79**). Les carbones carbonyles à  $\delta C$  167,60 et 173,10 sont attribués à C-1'' et C-1', respectivement. De plus, le pic à  $\delta C$  83,00 (C-2') suggère la présence d'un atome de carbone quaternaire oxygéné. Le produit **X** a été nommé 7-angeloylechinate *N*-oxyde, un nouveau produit naturel, il n'a pas été décrit antérieurement dans la littérature, sa structure a été élucidée, comme représentée dans la **figure 4.80**.

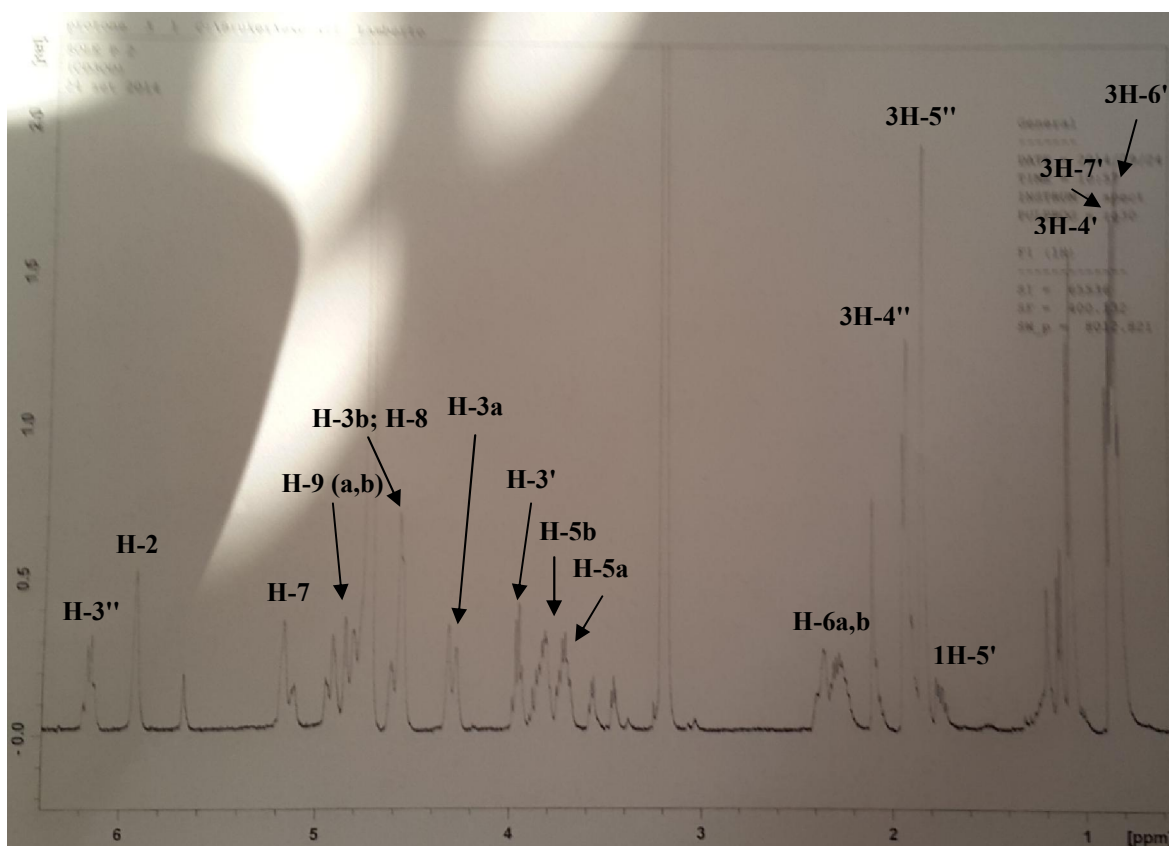


Figure 4.77. Spectre RMN  $^1\text{H}$  du produit X (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

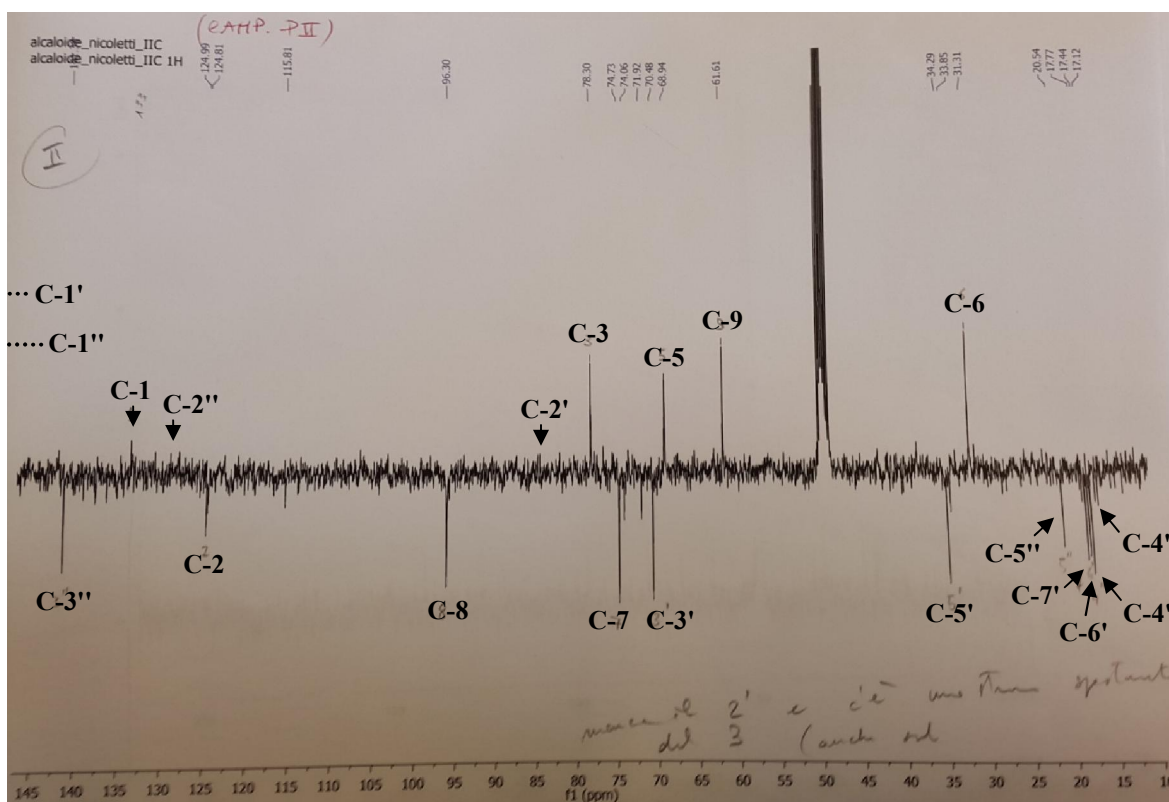
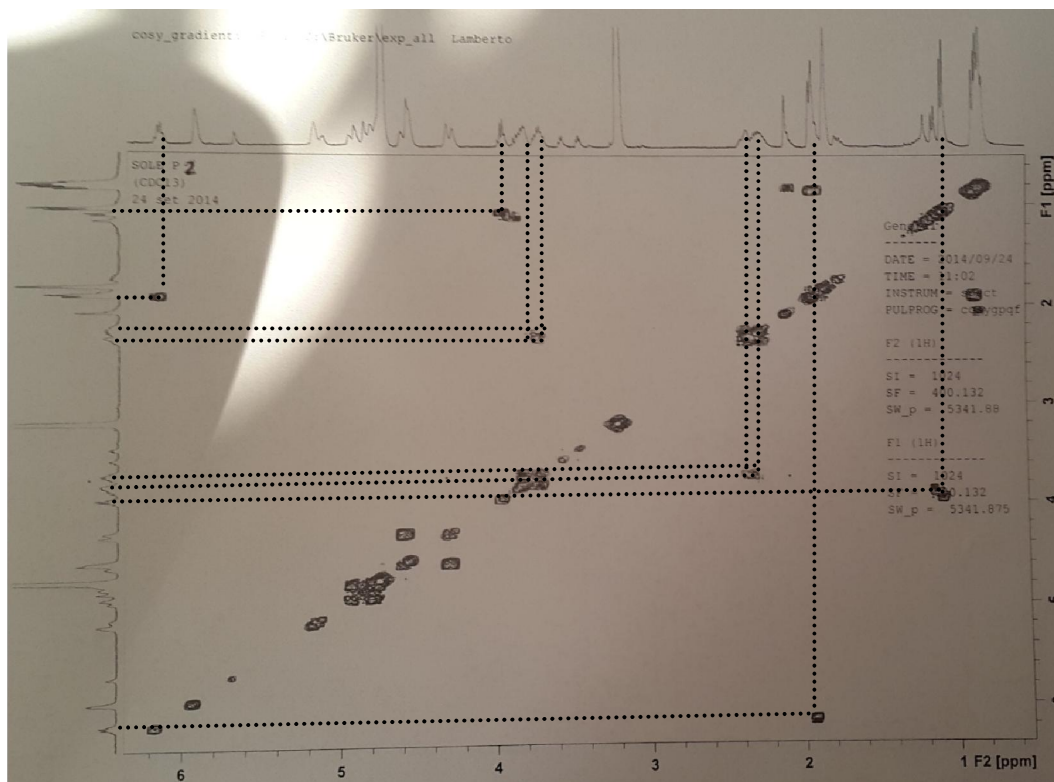
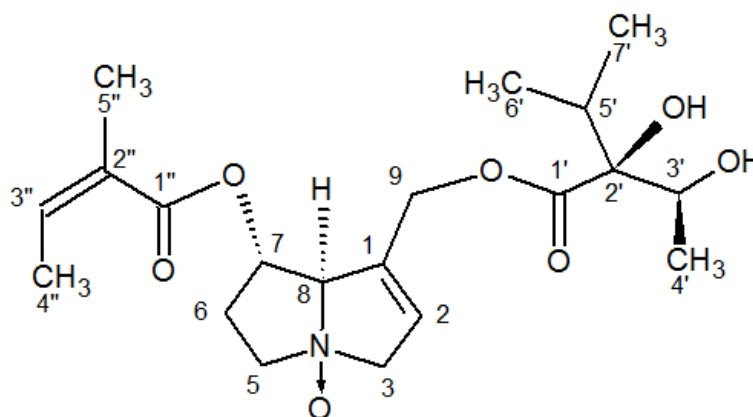


Figure 4.78. Spectre RMN APT du produit X (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



**Figure 4.79.** Spectre RMN de corrélations homonucléaires COSY du produit X (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).



**Figure 4.80.** Structure du produit X (7-angeloylechinatine *N*-oxyde).

#### 4.3.3.3. Détermination de la structure du produit XI

Le produit **XI** se présente sous forme d'une gomme brune. Il réagit avec le Dragendorff, ce qui laisse présager qu'il s'agit d'alcaloïde. La formule brute C<sub>20</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>8</sub> du produit **XI** a été établie sur la base d'analyses par la spectrométrie de masse (HR-Q-TOF-ESI-MS) et la RMN monodimensionnelle et bidimensionnelle (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, APT, COSY).

Le spectre de masse haute résolution en mode positif (**figure 4.81**) donnent un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  414,1736  $[M+H]^+$  (calculée pour  $C_{20}H_{32}NO_8$ , 414,2128) indiquant six degrés d'insaturation.

Le spectre APT présente 20 signaux, incluant cinq méthyles, quatre méthylènes (un carbone oxygéné à  $\delta C$  60,72 (C-9)), cinq méthines (deux carbones oxygénés à  $\delta C$  73,12 (C-7); 69,42 (C-3') et deux carbones oléfiniques à  $\delta C$  122,73 (C-2); 140,44 (C-3'')), et six carbones quaternaires (deux carbones oxygénés à  $\delta C$  83,67 (C-2'); 72,90 (C-5'); deux oléfiniques à  $\delta C$  132,35 (C-1); 126,50 (C-2'') et deux carbones carbonyles à  $\delta C$  173,90 (C-1'); 167,55 (C-1'')). Les déplacements chimiques du spectre RMN  $^1H$  (**figure 4.82**) du cycle sont en accord avec les valeurs rapportées pour l'héliotridine *N*-oxydes (**Logie et al., 1994**). Les déplacements chimiques des protons déplacés H-3a/H-3b ( $\delta H$  4,57; bd,  $J = 16$  Hz/4,27; bd,  $J = 16$ ), H-5a/H-5b ( $\delta H$  3,82; m/3,70; m), et H-8 ( $\delta H$  4,55; s) confirme la présence de la partie *N*-oxyde (**Asibal et al., 1989; Logie et al., 1994**). La présence de la double liaison  $\Delta^{1,2}$  est confirmée par les signaux déplacés de H-2 à  $\delta H$  5,96 (1H, bs), et C-1/C-2 à  $\delta C$  132,35/122,73. Le spectre RMN  $^1H$  du produit **XI** montre aussi un signal oléfinique à  $\delta H$  6,17 (1H, dq,  $J = 7/1$  Hz, H-3''), qui, conjointement avec les signaux de deux groupes méthyles à  $\delta H$  1,93 (3H, dd,  $J = 7/2$  Hz, H-4'') et  $\delta H$  1,84 (3H, s, H-5''), sont indicatifs d'un groupe angeloyloxy (**Villanueva-Cañongo et al., 2014**). De plus, la position des deux méthyles et le méthine a été confirmée par les corrélations COSY (**figure 4.83**). Ainsi, le signal H-7 observé à  $\delta H$  5,18 (1H, m) révèle la présence d'un groupe hydroxy estérifié à C-7 (**Asibal et al., 1989; El-Shazly et al., 1996**). Le spectre RMN  $^1H$  du produit **XI** montre aussi des signaux de protons à  $\delta H$  4,10 (1H, q,  $J = 7$  Hz, H-3'),  $\delta H$  1,18 (3H, d,  $J = 7$  Hz, H-4'),  $\delta H$  1,14 (3H, s, H-6') et  $\delta H$  1,21 (3H, s, H-7') attribués, avec l'aide du spectre APT à un signal méthine et trois signaux méthyles, respectivement, correspondant à la partie acide nécique du heliosupine et heliosupine *N*-oxyde (**Asibal et al., 1989; El-Shazly et al., 1996**). Cette hypothèse a été confirmée par la corrélation COSY du H-3' à 3H-4'. Ainsi, la structure du produit **XI** a été élucidée, comme présentée dans la **figure 4.84**. et a été identifiée comme étant heliosupine *N*-oxyde. Ce produit a été identifié dans *Heliotropium europaeum* L. et *Symphytum officinalis* L. (**Avula et al., 2015; Shimshoni et al., 2015**), par contre il n'a jamais été isolé ou caractérisé dans le genre *Solenanthus*.



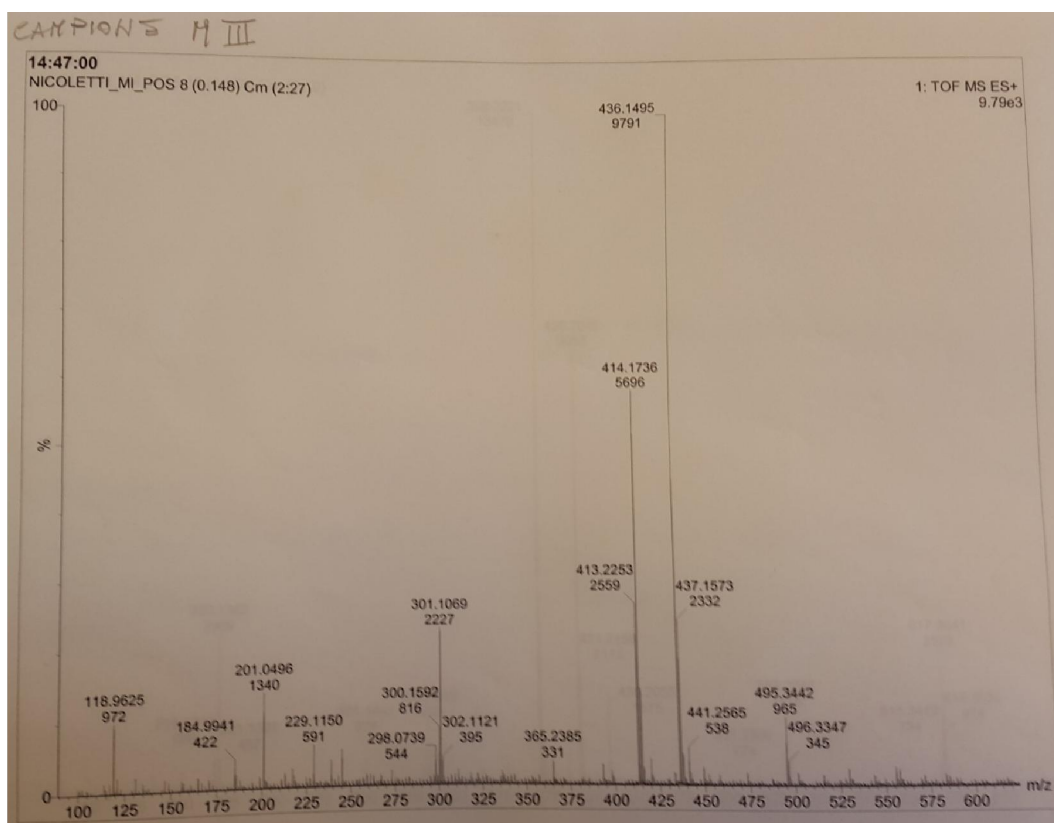


Figure 4.81. Spectre HR-Q-TOF-ESI-MS du produit XI en mode positif.

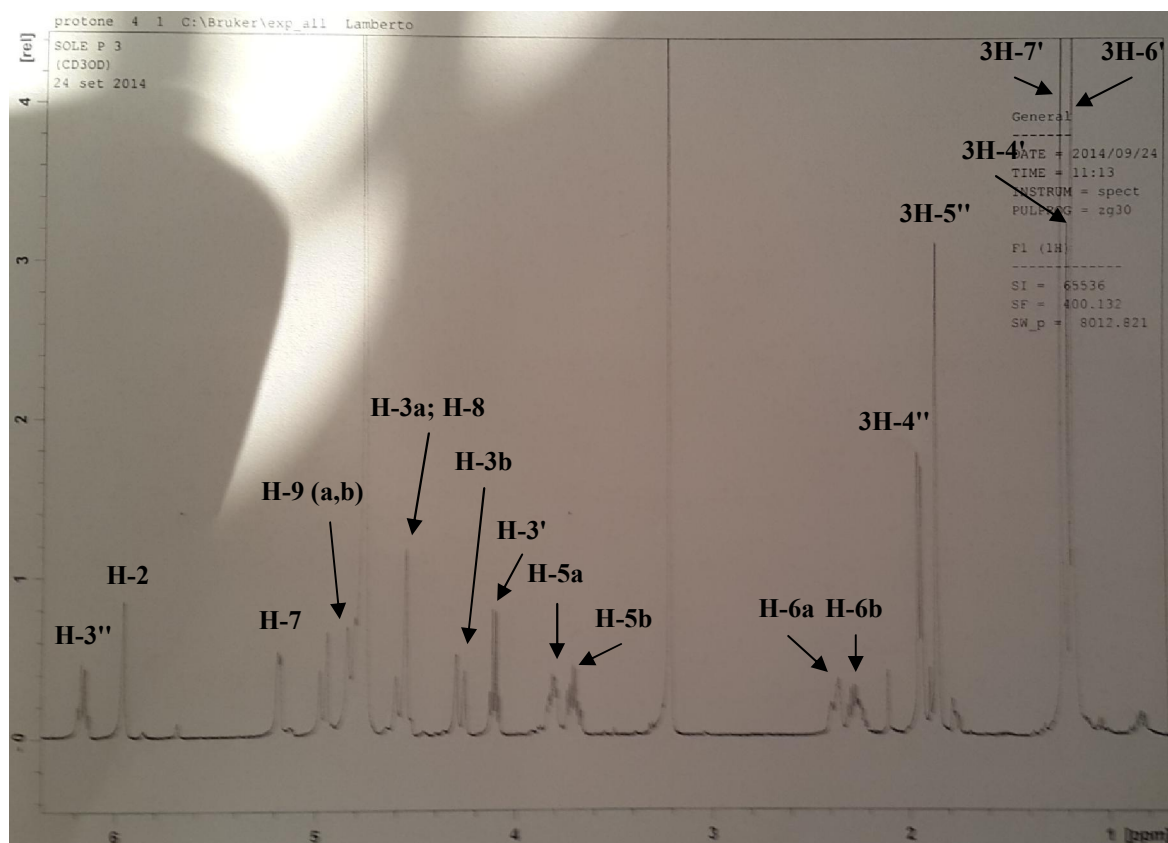
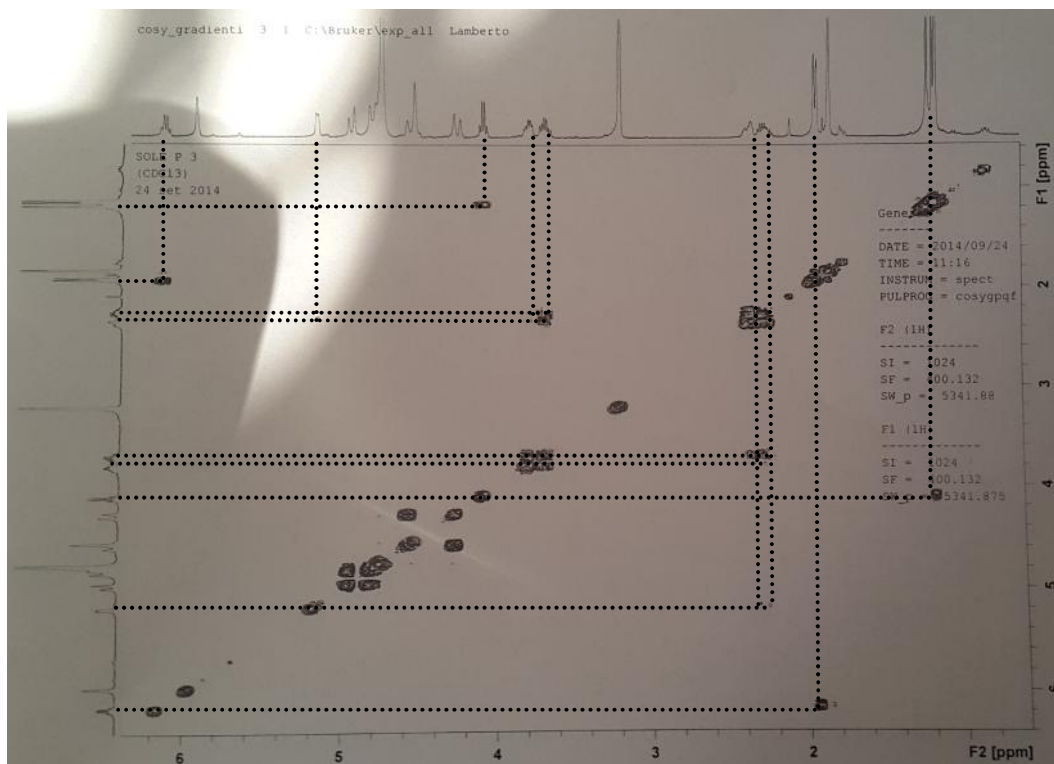
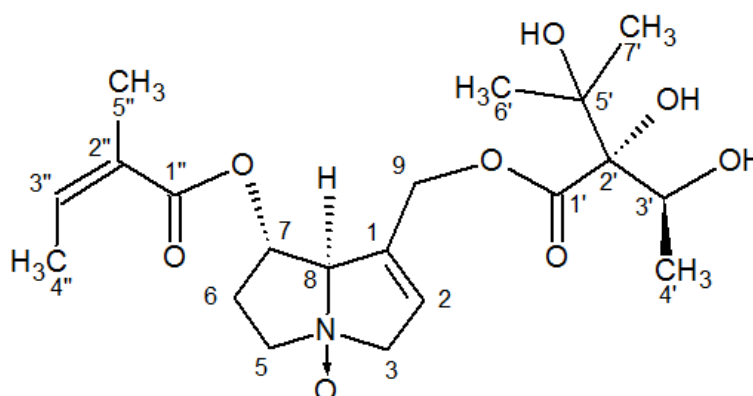


Figure 4.82. Spectre RMN  $^1\text{H}$  du produit XI (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



**Figure 4.83.** Spectre RMN de corrélations homonucléaires COSY du produit **XI** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).



**Figure 4.84.** Structure du produit **XI** (Heliosupine *N*-oxyde).

#### 4.3.3.4. Détermination de la structure du produit **XII**

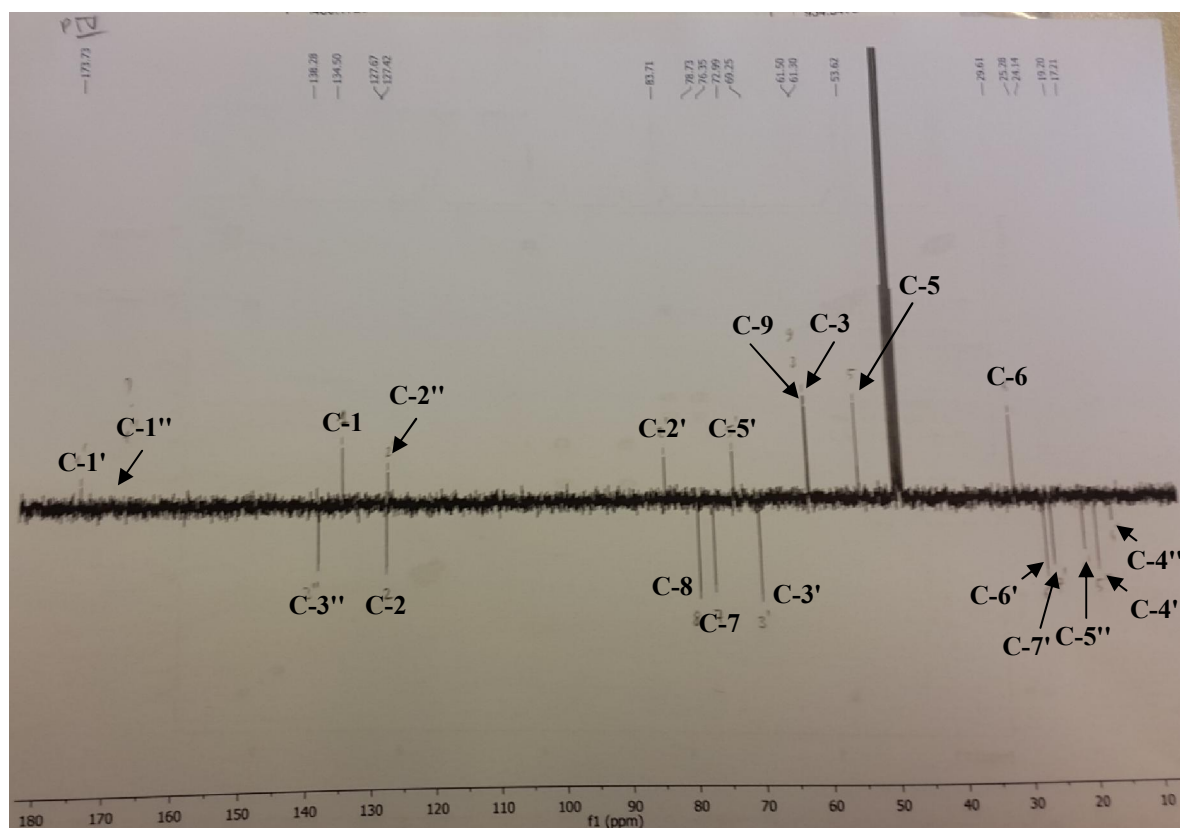
Le produit **XII** se présente sous forme d'une huile brune. Il réagit avec le Dragendorff, ce qui laisse présager qu'il s'agit d'alcaloïde. La formule brute C<sub>20</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>7</sub> du produit **XII** a été établie sur la base d'analyses par la spectrométrie de masse (HR-Q-TOF-ESI-MS) et la RMN monodimensionnelle et bidimensionnelle (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, APT, COSY).



Le spectre de masse haute résolution en mode positif (**figure 4.85**) donne un ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  398,2221  $[M+H]^+$  (calculée pour  $C_{20}H_{32}NO_7$ , 398,2179) indiquant six degrés d'insaturation. L'héliosupine présente une masse moléculaire  $m/z$  398, ce qui en accord avec l'ion pseudomoléculaire observé. Par ailleurs, le schéma de fragmentation de l'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  398,2221 présente une fragmentation similaire à celui observé pour l'héliosupine (**figure 4.85**) (**Avula et al., 2015**).

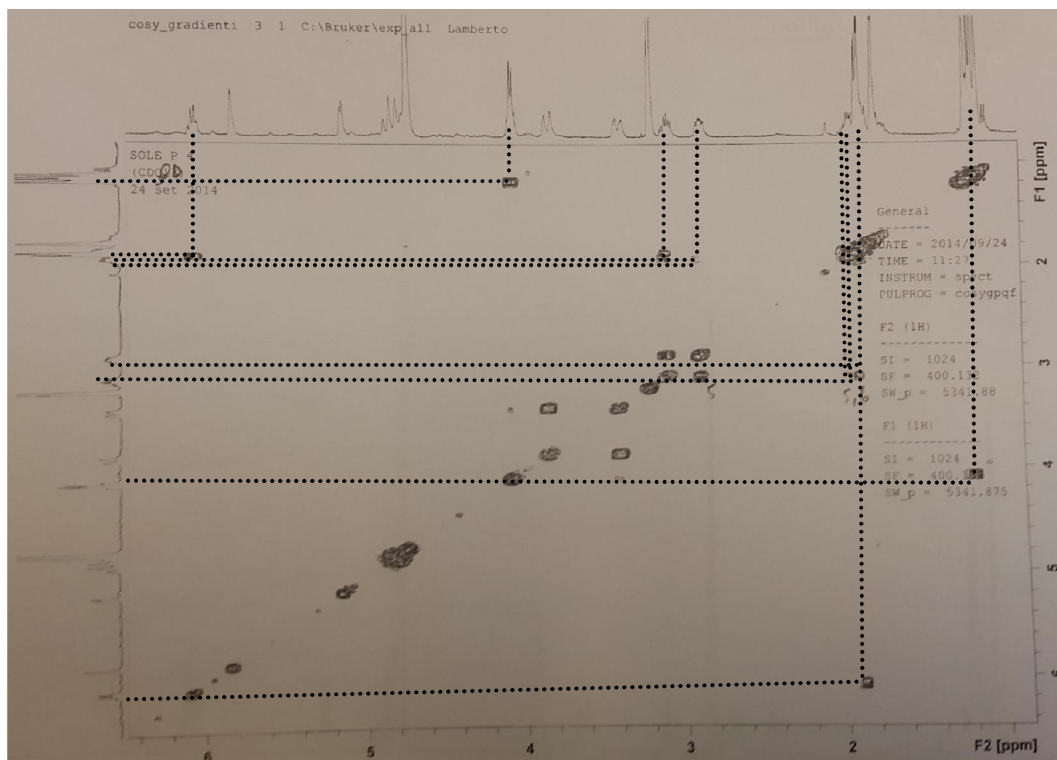
Le spectre APT (**figure 4.87**) présente 20 signaux, incluant cinq méthyles, quatre méthylènes (un carbone oxygéné à  $\delta C$  61,50 (C-9)), cinq méthines (deux carbones oxygénés à  $\delta C$  76,35 (C-7); 69,25 (C-3') et deux carbones oléfiniques à  $\delta C$  127,67 (C-2); 138,28 (C-3'')), et six carbones quaternaires (deux carbones oxygénés à  $\delta C$  83,71 (C-2'); 72,99 (C-5')); deux oléfiniques à  $\delta C$  134,50 (C-1); 127,42 (C-2'') et deux carbones carbonyles à  $\delta C$  173,73 (C-1'); 168,53 (C-1'')). Les déplacements chimiques du spectre RMN  $^1H$  (**figure 4.86**) du cycle sont en accord avec les valeurs rapportées pour l'héliotridine (**Logie et al., 1994**). Les déplacements chimiques des protons déplacés H-3a/H-3b ( $\delta H$  3,84; bd,  $J = 7/3,40$ ; dm), H-5a/H-5b ( $\delta H$  3,08; m/2,87; m), et H-8 ( $\delta H$  4,07; m) en comparaison au produit **XI** confirme l'absence de la partie *N*-oxyde (**Logie et al., 1994**; **El-Shazly et al., 1996**). La présence de la double liaison  $\Delta^{1,2}$  est confirmée par les signaux déplacés de H-2 à  $\delta H$  5,82 (1H, bs), et C-1/C-2 à  $\delta C$  134,50/127,67. Le spectre RMN  $^1H$  du produit **XII** montre aussi un signal oléfinique à  $\delta H$  6,07 (1H, qq,  $J = 7/1,50$  Hz, H-3''), qui, conjointement avec les signaux de deux groupes méthyles à  $\delta H$  1,89 (3H, dq,  $J = 7/1,50$  Hz, H-4'') et  $\delta H$  1,79 (3H, quin,  $J = 1,5$  Hz, H-5''), sont indicatifs d'un groupe angeloyloxy (**Villanueva-Cañongo et al., 2014**).



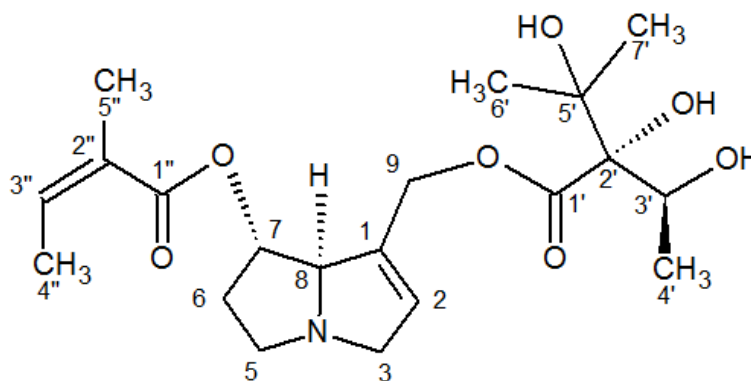


**Figure 4.87.** Spectre RMN APT du produit **XII** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

De plus, la position des deux méthyles et du méthine a été confirmée par les corrélations COSY (**figure 4.88**). Ainsi, le signal H-7 observé à  $\delta$ H 5,16 (1H, m) révèle la présence d'un groupe hydroxy estérifié à C-7 (**Asibal et al., 1989; El-Shazly et al., 1996**). Le spectre RMN <sup>1</sup>H du produit **XII** montre aussi des signaux de protons à  $\delta$ H 4,09 (1H, q,  $J = 6,35$  Hz, H-3'),  $\delta$ H 1,13 (3H, q,  $J = 6,5$  Hz, H-4'),  $\delta$ H 1,10 (3H, s, H-6') et  $\delta$ H 1,19 (3H, s, H-7') attribués, avec l'aide du spectre APT à un signal méthine et trois signaux méthyles, respectivement, correspondant à la partie acide nécique du heliosupine (**El-Shazly et al., 1996**). Cette hypothèse a été confirmée par la corrélation COSY du H-3' à 3H-4'. Ainsi, la structure du produit **XII** a été élucidée, comme présentée dans la **figure 4.89** et a été identifiée comme étant heliosupine. Ce produit a été identifié dans *Cynoglossum creticum* Miller, *Heliotropium europaeum* L. et *Symphytum officinalis* L. (**El-Shazly et al., 1996; Avula et al., 2015; Shimshoni et al., 2015**), par contre il n'a jamais été isolé ou caractérisé dans le genre *Solenanthus*. En particulier, l'heliosupine est rapporté pour posséder une action sur l'adénocarcinome d'Ehrlich et le sarcome 45. Ces derniers ont été inhibés par l'heliosupine à un pourcentage de 54 et 28 % respectivement (**Pukhal'skaya et al., 1959**).



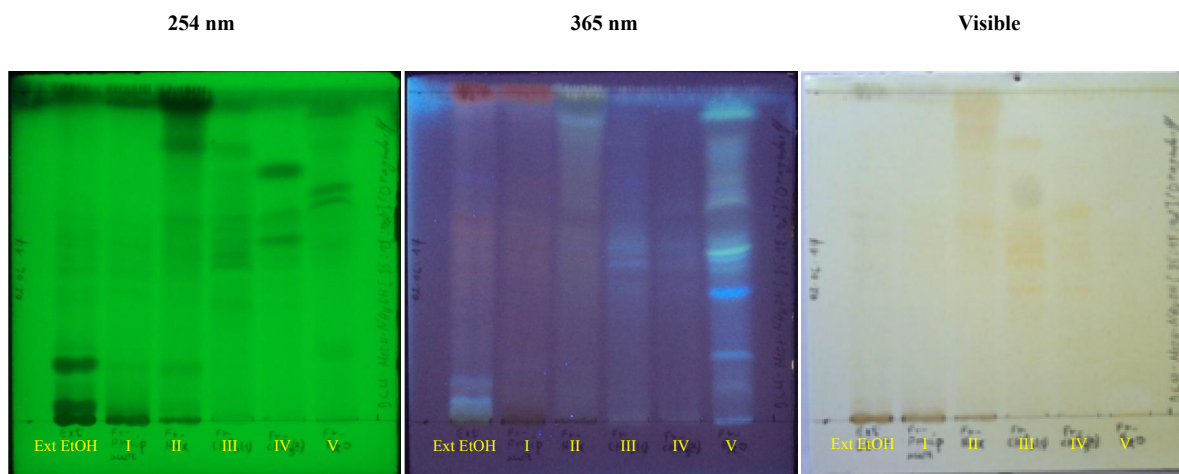
**Figure 4.88.** Spectre RMN de corrélations homonucléaires COSY du produit **XII** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).



**Figure 4.89.** Structure du produit **XII** (heliosupine).

#### 4.3.4. Fractionnement bio-guidé de l'extrait éthanolique de la plante entière d'*E. confusum* et isolement des produits XIII-XX

L'extrait éthanolique de la plante entière d'*E. confusum* a montré une activité inhibitrice de l'AChE par bioautographie et a été fractionné par bio-essais en vue d'isoler des produits actifs. La purification a été réalisée principalement aux moyens des techniques chromatographiques. Cet extrait (60,840 g) a été imprégné de 500 mL d'HCl (2 M) pendant 30 min et filtré. La fraction insoluble a été récupérée par l'acétone et constitue la fraction **I** (14,671 g). Le matériel neutre a été extrait à partir du filtrat par le n-hexane ( $3 \times 1000$  mL) et constitue la fraction **II** (0,079 g). Les fractions **I** et **II** sont testées négatives au Dragendorff, indiquant une absence d'alcaloïdes. La solution acidifiée a été ensuite basifiée par  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 25 % jusqu'à pH 10 et extraite avec  $\text{CHCl}_3$  ( $3 \times 1000$  mL) pour donner la fraction **III** (0,829 g) contenant des alcaloïdes. Afin de réduire les alcaloïdes *N*-oxydes non extractibles avec du  $\text{CHCl}_3$ , la phase aqueuse a été réacidifiée avec l'HCl jusqu'à pH 2, réduite avec la poudre de zinc pendant la nuit, filtrée et alcalinisée par  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 25 % jusqu'à pH 10. La solution alcalinisée a été extraite avec  $\text{CHCl}_3$  ( $3 \times 1000$  mL) pour donner la fraction **IV** (0,726 g) contenant des alcaloïdes libres. La solution alcaline restante constitue la fraction **V** (figure 4.90 et 4.91).



**Figure 4.90.** CCM de l'analyse des fractions (**I-V**) issues de l'extrait éthanolique d'*E. confusum*, avant (254 et 365 nm) et après révélation avec le Dragendorff (visible), système de migration DCM-MeOH- $\text{NH}_4\text{OH}$  [85 : 15 : 02].

Nous avons choisi de travailler les fractions alcaloïdiques (**III** et **IV**) en raison de leur activité inhibitrice de l'AChE. Nous avons tout d'abord réalisé un fractionnement de la fraction **III** (0,829 g) sur CC (55 x 2,5 cm) de gel de silice (Silicagel, 40-65  $\mu\text{m}$ ) éluée par un

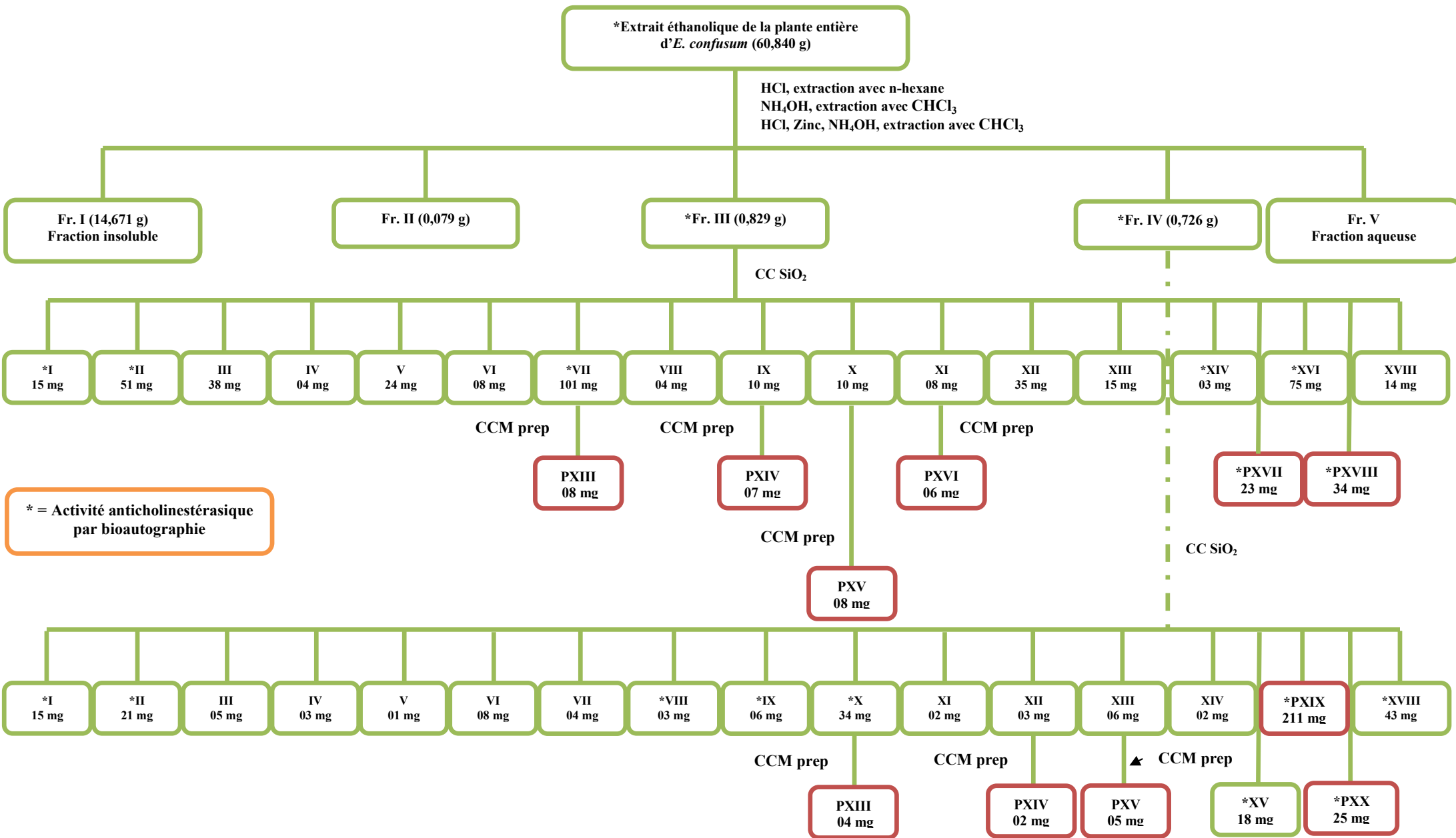
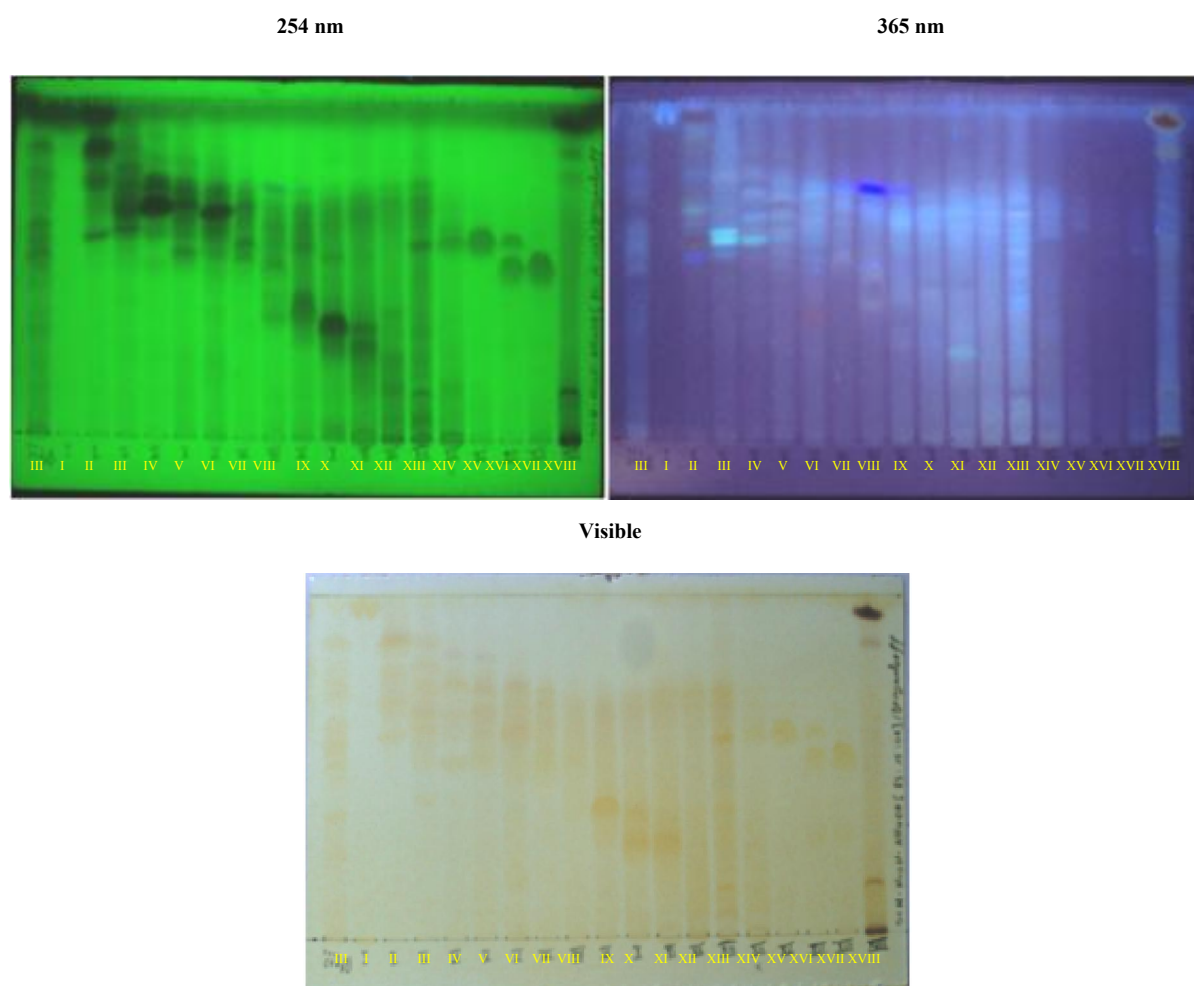


Figure 4.91. Schéma d'isolement des produits XIII-XX de l'extrait éthanolique de la plante entière d'*E. confusum*.

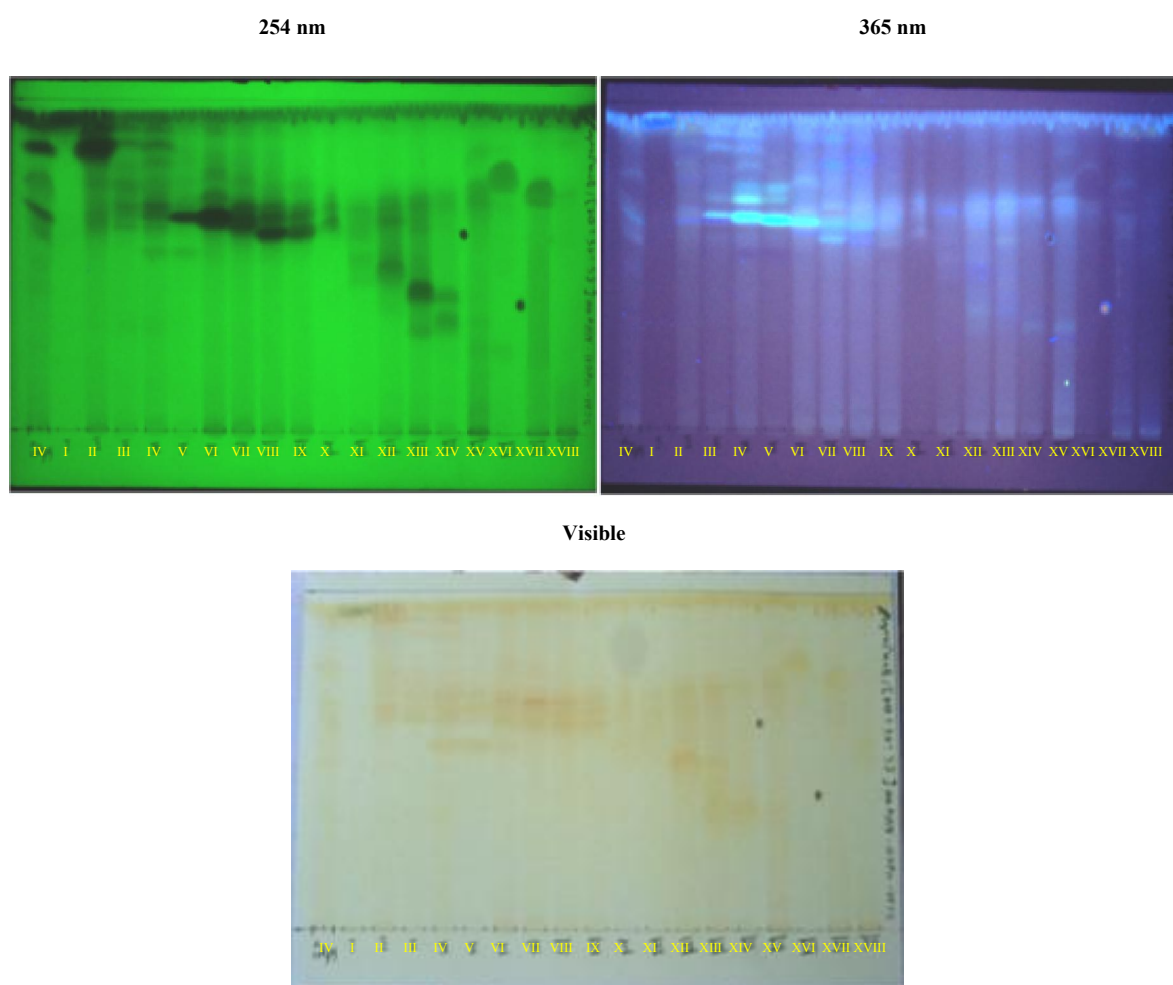


gradient de DCM-MeOH (100 : 00 → 65 : 35, 1,280 L) ensuite lixivée avec du MeOH (160 mL). L'évolution de la séparation sur colonne a été suivie par CCM et il en résulte dix-huit fractions (de **I** à **XVIII**) voir **figure 4.92** dont les rendements sont indiqués dans la **figure 4.91**. La fraction **III-VII** active a été ensuite séparée par la CCM préparative avec gel de silice (Silicagel, F254, glass plate, 1 mm thickness), éluée par DCM-MeOH-DEA [85 : 15 : 02] pour donner le produit **XIII** (8 mg) voir **figure 4.91** et **4.94**. Les produits **XIV** (7 mg), **XV** (8 mg) et **XVI** (6 mg) ont été séparés à partir de trois fractions inactives **III-IX**, **III-X** et **III-XI**, respectivement par la CCM préparative avec gel de silice (Silicagel, F254, glass plate, 1 mm thickness), éluée par DCM-MeOH-NH<sub>4</sub>OH [85 : 15 : 02] (**figure 4.91** et **4.94**). Les fractions **III-XV** et **III-XVII** ont montré qu'une seule tache après analyse CCM et ont donné les produits **XVII** (23 mg) et **XVIII** (34 mg), respectivement.



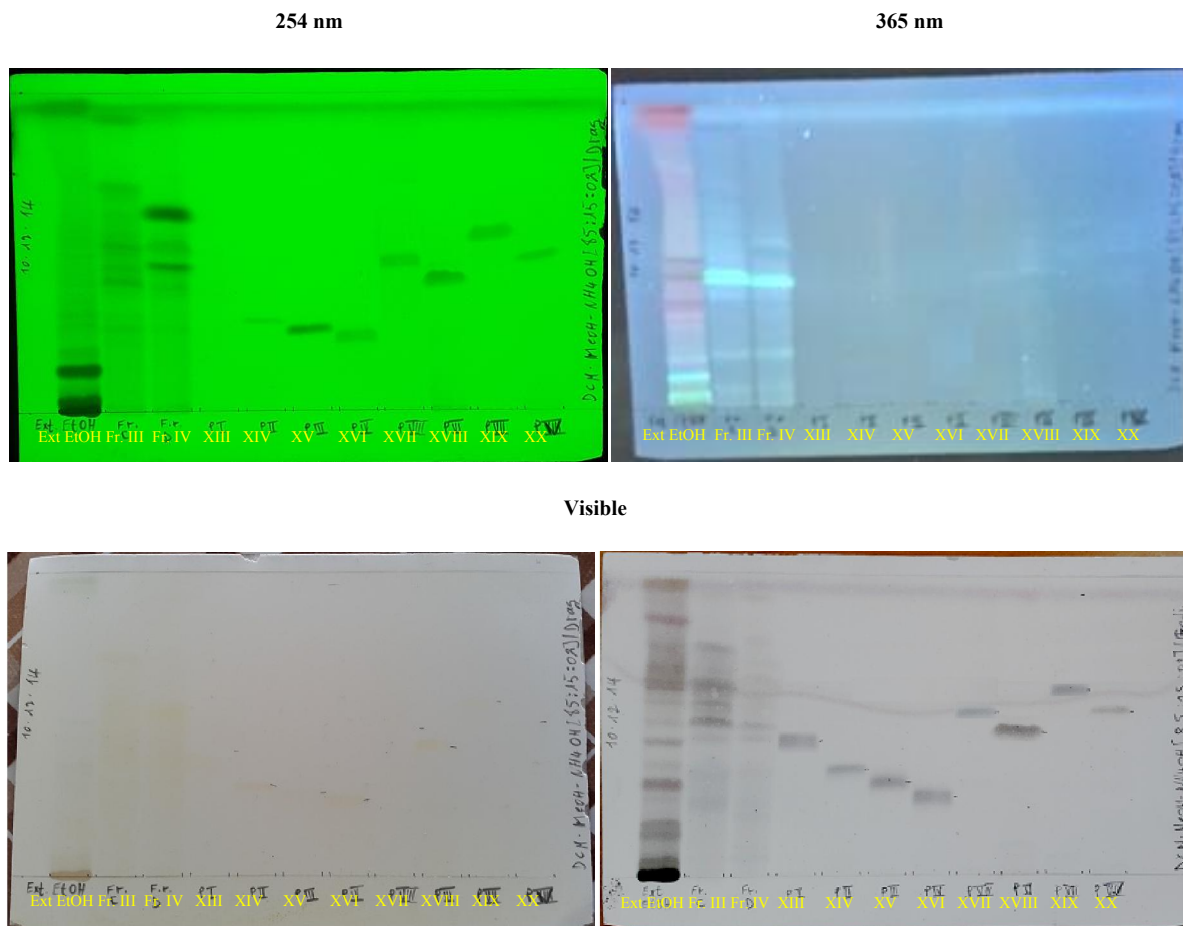
**Figure 4.92.** CCM de l'analyse des fractions (**I-XVIII**) issues de la fraction **III**, avant (254 et 365 nm) et après révélation avec le Dragendorff (visible), système de migration DCM-MeOH-NH<sub>4</sub>OH [85 : 15 : 02].

La fraction **IV** (0,726 g) à son tour a été séparée sur CC (55 x 2,5 cm) de gel de silice (Silicagel, 40-65  $\mu\text{m}$ ) éluée par un gradient de DCM-MeOH (100 : 00  $\rightarrow$  65 : 35, 1,120 L) ensuite lixivée avec du MeOH (140 mL). L'évolution de la séparation sur colonne a été suivie par CCM et il en a résulté dix-huit fractions (de **I** à **XVIII**) voir **figure 4.93** dont les rendements sont indiqués dans la **figure 4.91**. Les produits **XIII** (4 mg), **XIV** (2 mg) et **XV** (5 mg) ont été une autre fois isolés de la fraction active **IV-X** et des fractions inactives **IV-XII** et **IV-XIII**, respectivement dans les mêmes conditions citées ci-dessus pour les produits correspondant. Les fractions **IV-XVI** et **IV-XVII** ont montré qu'une seule tache après analyse CCM et ont donné les produits **XIX** (211 mg) et **XX** (25 mg), respectivement (**figure 4.94**).



**Figure 4.93.** CCM de l'analyse des fractions (**I-XVIII**) issues de la fraction **IV**, avant (254 et 365 nm) et après révélation avec le Dragendorff (visible), système de migration DCM-MeOH-NH<sub>4</sub>OH [85 : 15 : 02].





**Figure 4.94.** CCM de l'analyse des produits **XIII**, **XIV**, **XV**, **XVI**, **XVII**, **XVIII**, **XIX** et **XX** avant (254 et 365 nm) et après révélation avec le Dragendorff (visible à gauche) et le Godin (visible à droite), système de migration DCM-MeOH-NH<sub>4</sub>OH [85 : 15 : 02].

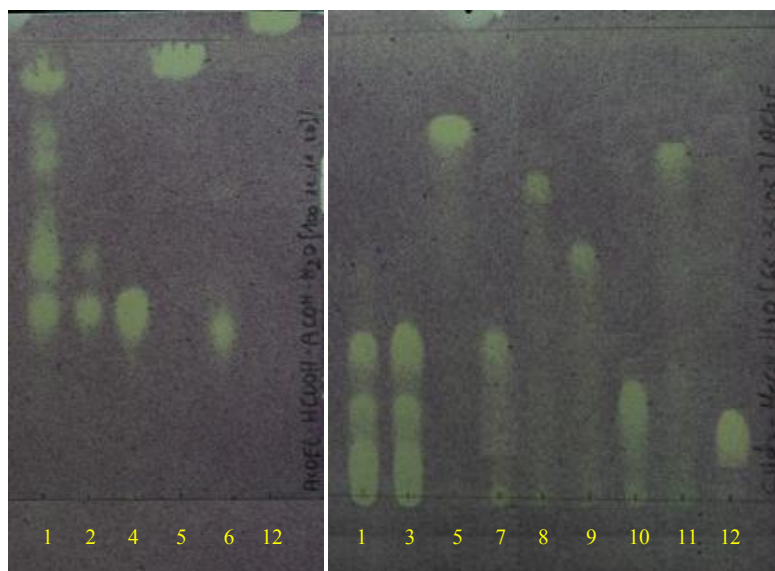
Les différentes techniques chromatographiques (partage liquide-liquide, CC gel de silice, et CCM préparative gel de silice) ont permis d'isoler à partir de l'extrait éthanolique de la plante entière d'*E. confusum* huit produits positifs au Dragendorff: **XIII** (Rf = 0,44), **XIV** (Rf = 0,36), **XV** (Rf = 0,32), **XVI** (Rf = 0,27), **XVII** (Rf = 0,58), **XVIII** (Rf = 0,52), **XIX** (Rf = 0,66) et **XX** (Rf = 0,58) voir **figure 4.91** et **4.94**, laissant dire qu'il s'agit d'alcaloïdes. L'analyse structurale des produits isolés est en cours.

#### 4.4. Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase des extraits bruts, fractions et produits des plantes étudiées

##### 4.4.1. Test de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase par bioautographie

##### 4.4.1.1. Extrait aqueux, fractions et produits purifiés de *P. atlantica*

L'extrait aqueux, fraction aqueuse, fraction n-butanol, fraction acétate d'éthyle, fraction chloroforme, fraction hexane et produits purifiés de *P. atlantica* sont testés à 15 µg par bioautographie afin d'évaluer leur effet inhibiteur sur l'AChE. Le test par bioautographie a démontré que l'extrait aqueux, la fraction n-butanol et la fraction acétate d'éthyle possèdent plusieurs taches actives, la fraction aqueuse n'a montré que deux taches inhibitrices de l'AChE, par contre la fraction hexane et la fraction chloroforme sont inactives. Tous les produits purifiés de l'extrait aqueux de *P. atlantica* ont montré une zone d'inhibition de l'AChE. La galanthamine utilisée comme témoin a montré une activité importante à 1 µg (**figure 4.95**). Sur la plaque de CCM duplicata (**figure 4.42 et 4.43**) pulvérisée avec le réactif de Neu, les taches actives ont donné des fluorescences bleu ou jaune. Comme il a été bien démontré dans l'analyse HPLC, *P. atlantica* renferme des dérivés d'acide gallique et quercétine glycosides et qui peuvent donner ces fluorescences caractéristiques. L'activité anti acétylcholinestérasique observée dans cette étude pourrait être due à ce type de métabolites.



**Figure 4.95.** Détection de l'activité inhibitrice de l'AChE par bioautographie de l'extrait aqueux (1), fraction aqueuse (2), fraction AcOEt (3) et produits purifiés (I (4), II (5), III (6), IV (7), V (8), VI (9), VII (10) et VIII (11)) de *P. atlantica* à 15 µg. La galanthamine (12) est utilisée comme témoin (1 µg). Système de migration AcOEt-HCOOH-AcOH-H<sub>2</sub>O [100 : 11 : 11 : 26] (à gauche) et CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O [65 : 35 : 05] (à droite).

#### 4.4.1.2. Extrait éthanolique, fractions et produits purifiés de *S. lanatus*

L'extrait éthanolique de la plante entière de *S. lanatus* a présenté plusieurs zones d'inhibition de l'AChE sur CCM (**figure 4.96**). Les fractions obtenues après plusieurs procédés d'extraction à partir de l'extrait éthanolique ont été aussi testées, parmi lesquelles les fractions **III**, **IV** et **V** ont montré aussi plusieurs zones d'inhibition de l'AChE. Le fractionnement des fractions **III** et **IV** a permis d'obtenir quatre produits tous positifs aux Dragendorff. Les données spectrales ont permis de leur attribuer la nature alcaloïde pyrrolizidinique. Les produits (de **IX** à **XII**) ont ensuite été testés à 15 µg contre l'AChE en utilisant la bioautographie. Tous les produits ont donné une zone d'inhibition après pulvérisation du fast blue B. L'activité inhibitrice de l'AChE observée dans cette étude est due aux alcaloïdes pyrrolizidiniques.

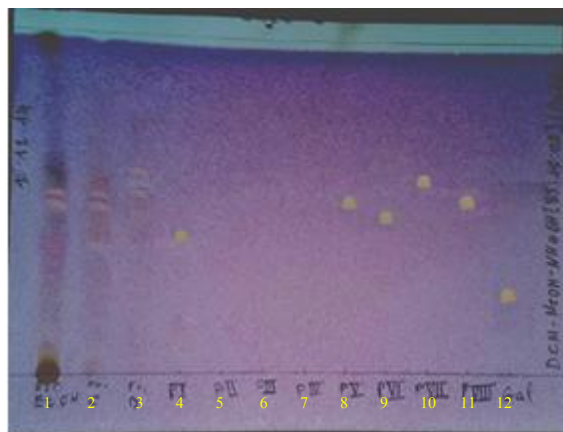


**Figure 4.96.** Détection de l'activité inhibitrice de l'AChE par bioautographique de l'extrait éthanolique (1), fractions **III** (2), **IV** (3) et produits purifiés (**IX** (4), **X** (5), **XI** (6), **XII** (7)) de *S. lanatus* à 15 µg. La galanthamine (8) est utilisée comme témoin (1 µg). Système de migration DCM-MeOH-NH<sub>4</sub>OH [85 : 15 : 02].

#### 4.4.1.3. Extrait éthanolique, fractions et produits purifiés d'*E. confusum*

L'extrait éthanolique de la plante entière d'*E. confusum* a montré deux taches actives contre l'AChE par bioautographie (**figure 4.97**). Les fractions obtenues après plusieurs séries de traitement et d'extraction à partir de l'extrait éthanolique ont été aussi testées, parmi lesquelles les fractions **III**, **IV** ont montré plus d'une tache active contre l'AChE. Le

fractionnement des fractions **III** et **IV** a permis d'obtenir huit produits tous positifs aux Dragendorff, indiquant qu'il s'agit d'alcaloïdes. Les produits (de **XIII** à **XX**) ont ensuite été testés à 15 µg contre l'AChE en utilisant la bioautographie. Seuls les produits **XIII**, **XVII**, **XVIII**, **XIX** et **XX** ont donné une zone d'inhibition après pulvérisation du fast blue B. Les produits **XIV**, **XV**, **XVI** sont inactifs. L'activité inhibitrice de l'AChE observée dans cette étude est due aux alcaloïdes.



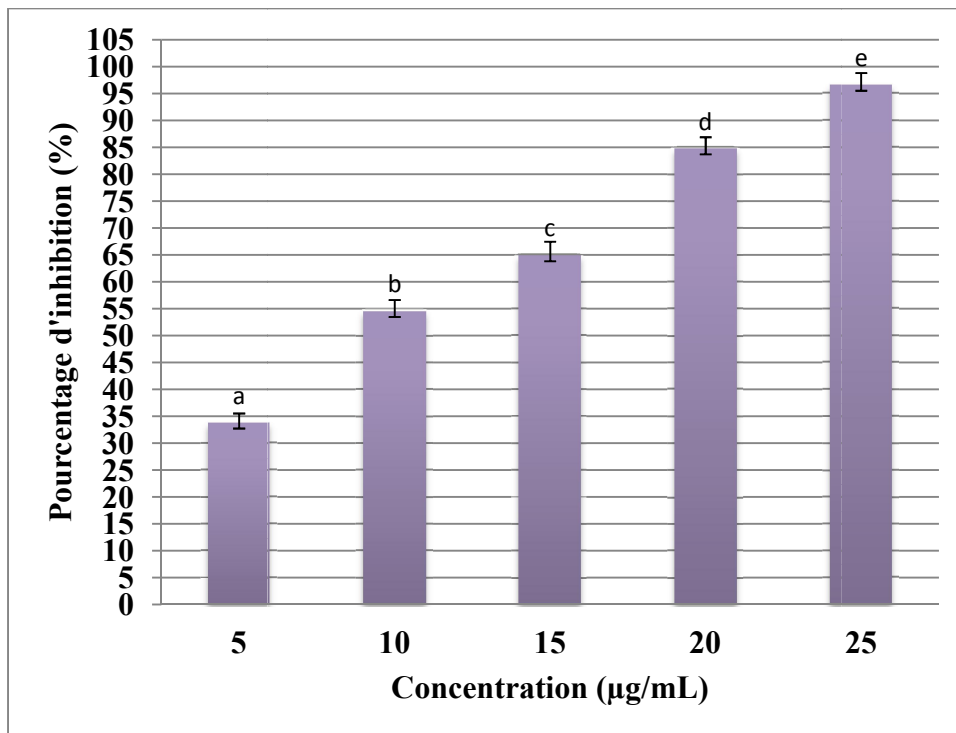
**Figure 4.97.** Détection de l'activité inhibitrice de l'AChE par bioautographique de l'extrait éthanolique (1), fractions **III** (2), **IV** (3) et produits purifiés (**XIII** (4), **XIV** (5), **XV** (6), **XVI** (7), **XVII** (8), **XVIII** (9), **XIX** (10) et **XX** (11)) d'*E. confusum* à 15 µg. La galanthamine (12) est utilisée comme témoin (1 µg). Système de migration DCM-MeOH-NH<sub>4</sub>OH [85 : 15 : 02].

#### 4.4.2. Test de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase par dosage spectrophotométrique

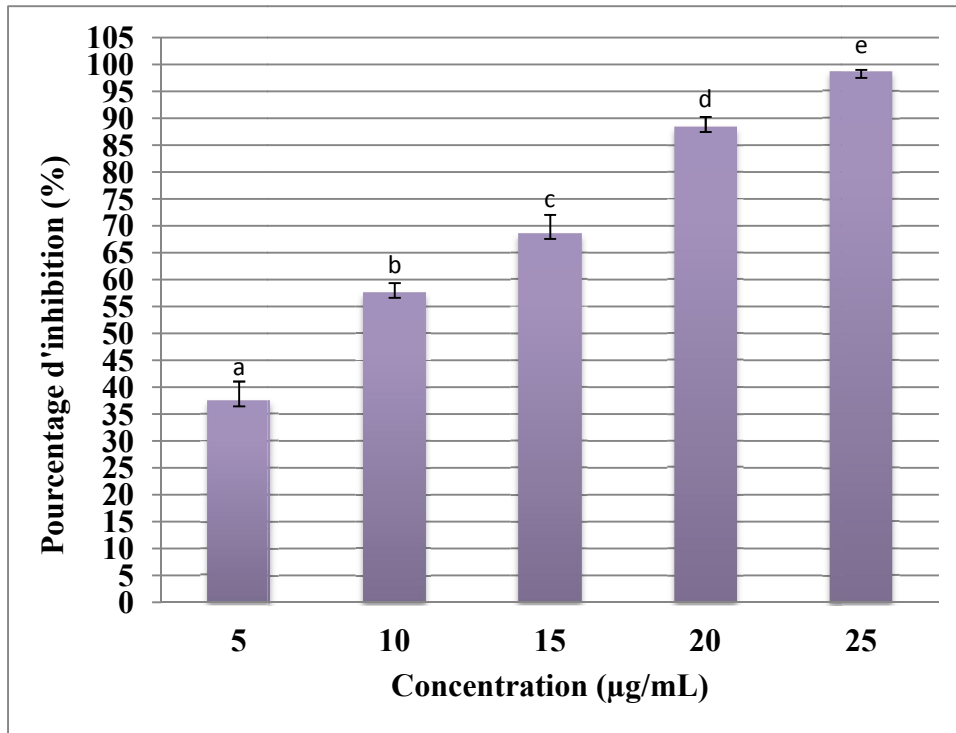
Les différents échantillons (extraits bruts, fractions et produits purifiés) ont été testés à différentes concentrations par la méthode d'Ellman en solution en vue de déterminer le taux d'inhibition de l'AChE. On retrouve une assez bonne corrélation entre les deux méthodes en ce qui concernant les échantillons testés.

Parmi les échantillons issus de *P. atlantica* testés, la fraction acétate d'éthyle a montré l'inhibition la plus importante avec un taux d'inhibition supérieur de 95 % à une concentration de 25 µg/mL. L'extrait aqueux a également présenté un taux d'inhibition supérieur de 95 % à la même concentration (**figure 4.98 et 4.99**). La fraction n-butanol et les produits **II**, **V**, **VI**, **VIII** ont présenté une activité moyenne avec une inhibition qui dépasse 80 % à 250 µg/mL. Par contre, la fraction aqueuse et les produits **I**, **III**, **IV**, **VII** ont montré un faible pouvoir inhibiteur de l'AChE, plus de 50 % à une concentration de 500 µg/mL (**figure**

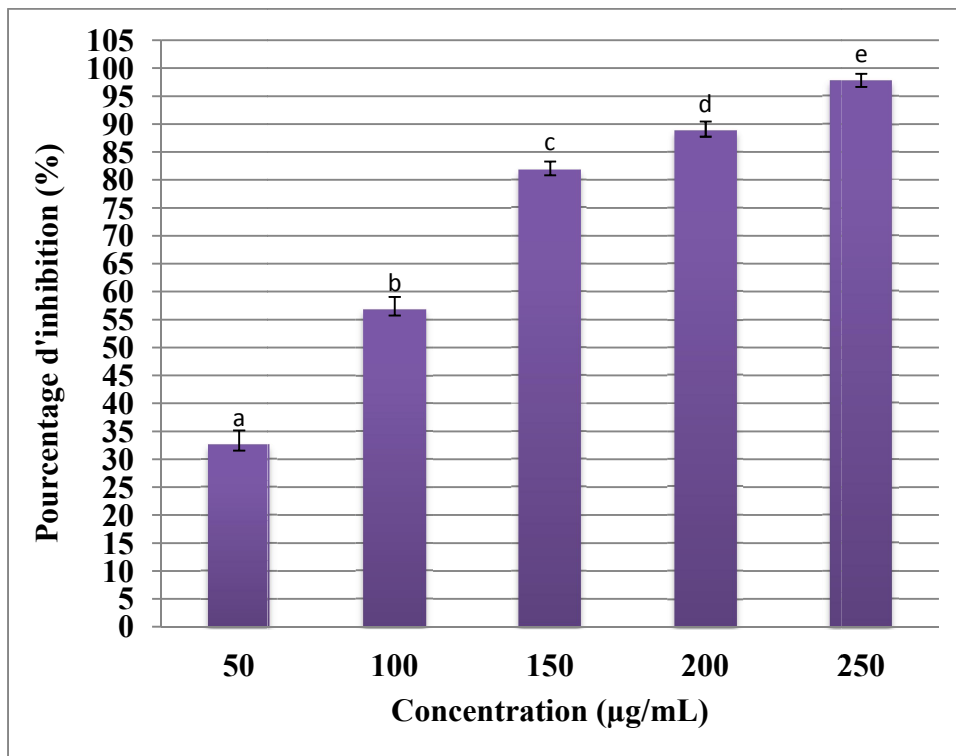
de 4.100 à 4.109). La fraction hexane et chloroforme n'ont pas d'effet sur l'AChE dans ce test. La diminution de l'activité anticholinestérasique observée s'explique par l'effet synergique des produits actifs présents dans l'extrait brut et la fraction enrichie acétate d'éthyle. Selon les analyses par HPLC et CCM, ces deux extraits renferment essentiellement des dérivés d'acide gallique et quercétine glycoside. En effet, les polyphénols tels que les acides phénoliques, tanins et flavonoïdes présents dans les végétaux ont montré des propriétés anticholinestérasiques importantes (Gomathi et Manian, 2015). Selon les travaux de Pendota *et al.* (2013), la quercétine est active contre l'AChE et présente une  $IC_{50}$  de  $66,8 \pm 0,09$   $\mu\text{g/mL}$ . L'acide gallique présente un taux d'inhibition de 15,7 % à 100  $\mu\text{g/mL}$  (Orhan *et al.*, 2012).



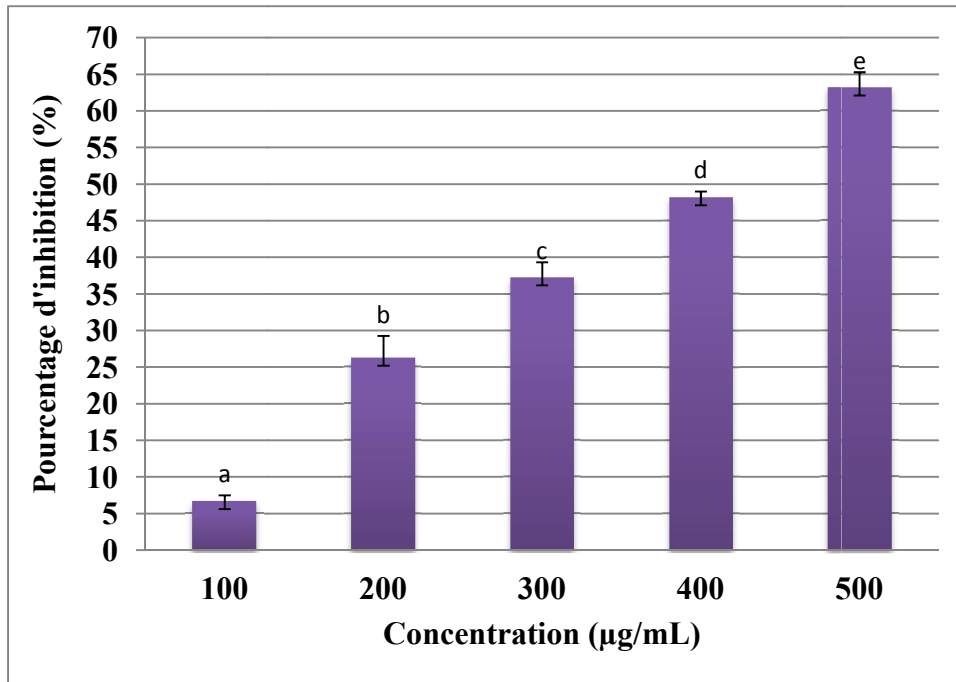
**Figure 4.98.** Activité inhibitrice de l'AChE de l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica*. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .



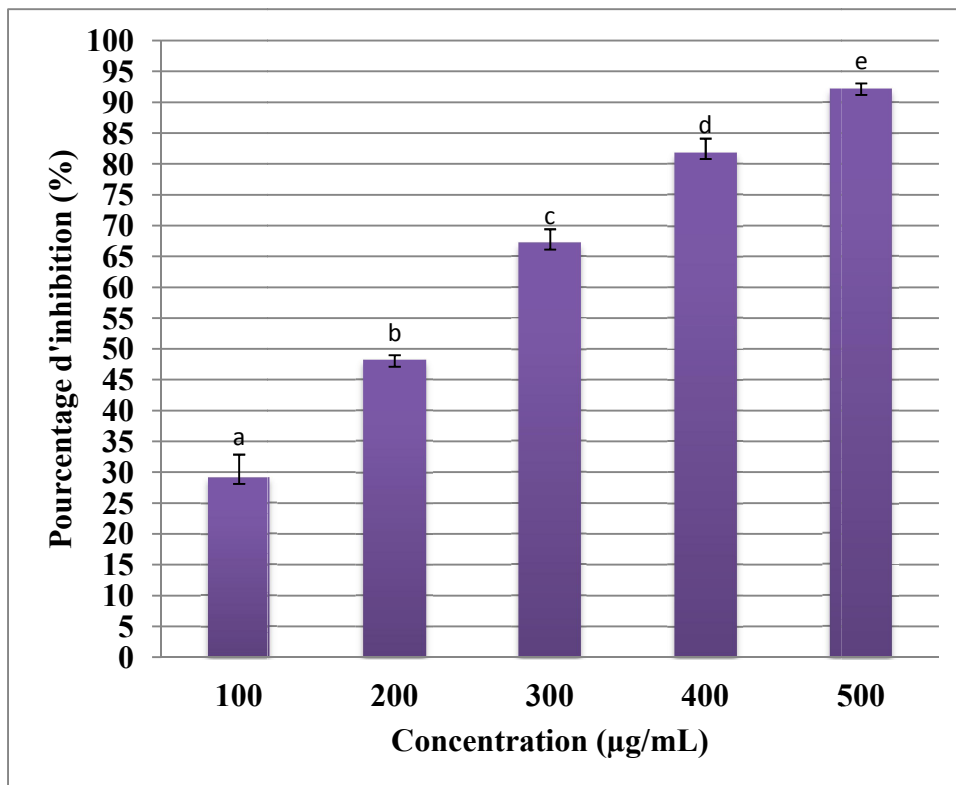
**Figure 4.99.** Activité inhibitrice de l'AChE de la fraction AcOEt issue de l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica*. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .



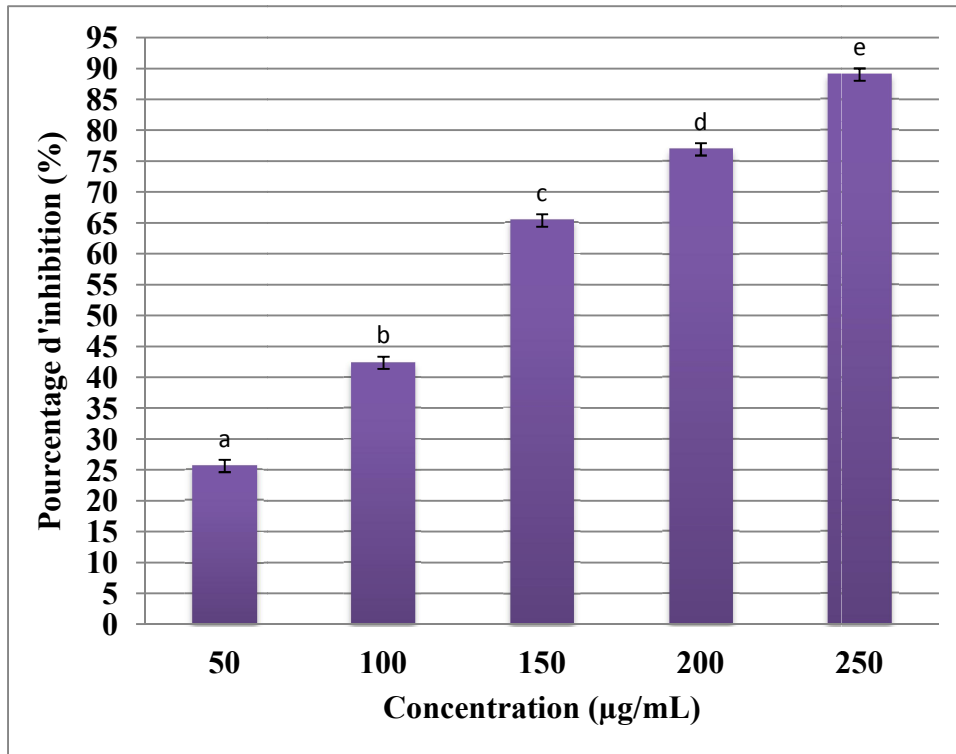
**Figure 4.100.** Activité inhibitrice de l'AChE de la fraction n-BuOH issue de l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica*. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .



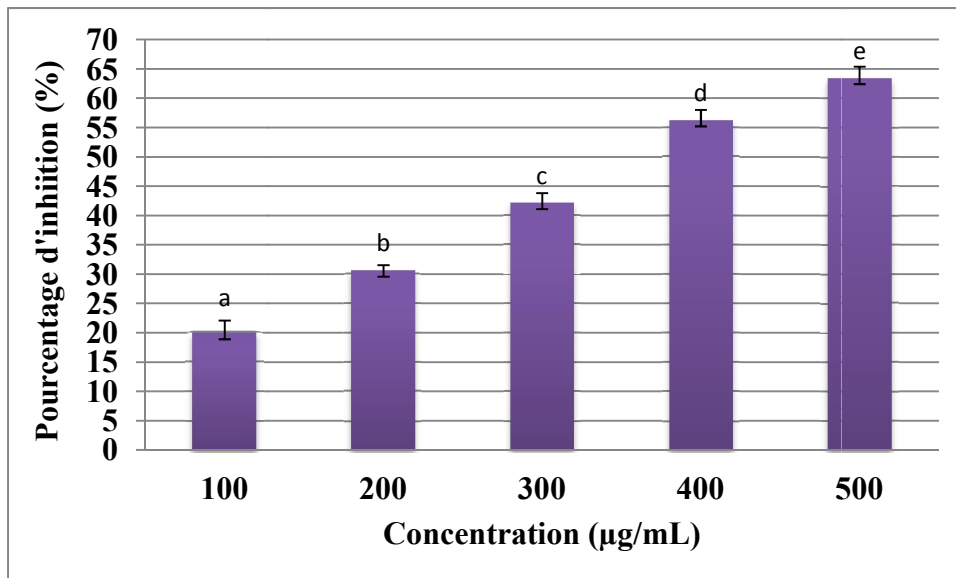
**Figure 4.101.** Activité inhibitrice de l'AChE de la fraction aqueuse issue de l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica*. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .



**Figure 4.102.** Activité inhibitrice de l'AChE du produit I. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .

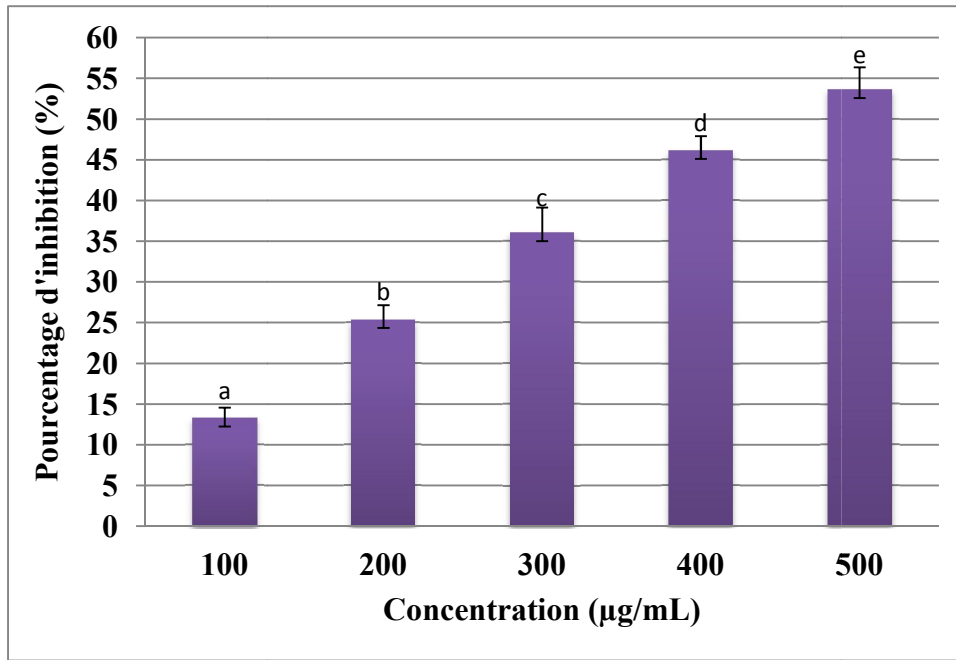


**Figure 4.103.** Activité inhibitrice de l'AChE du produit **II**. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .

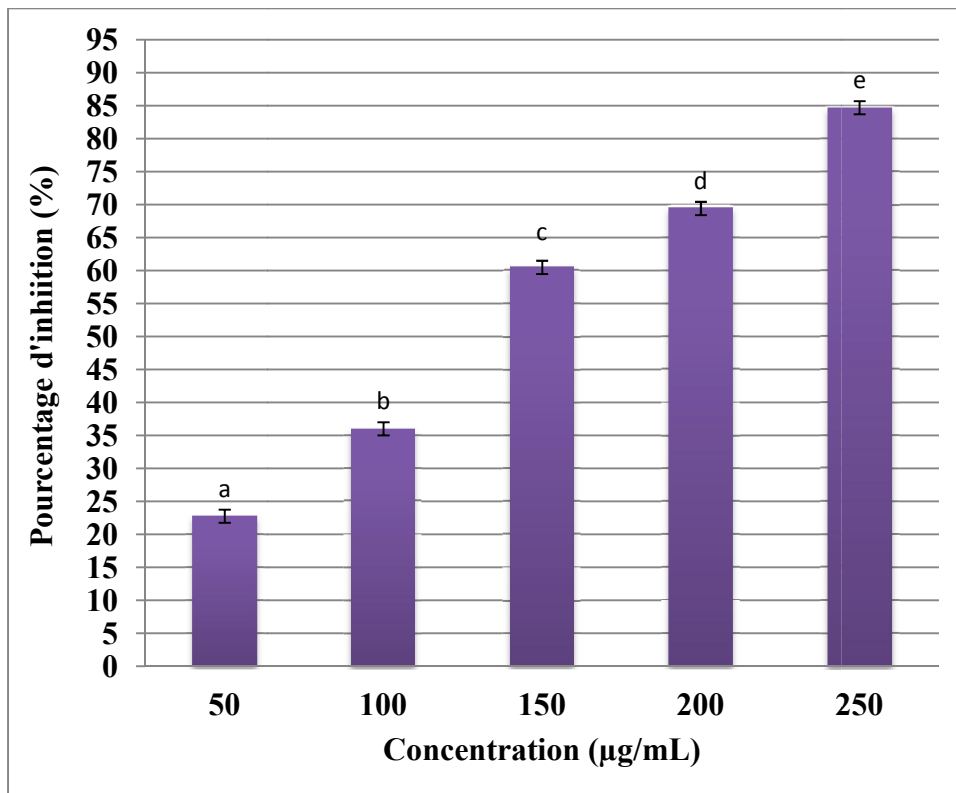


**Figure 4.104.** Activité inhibitrice de l'AChE du produit **III**. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .

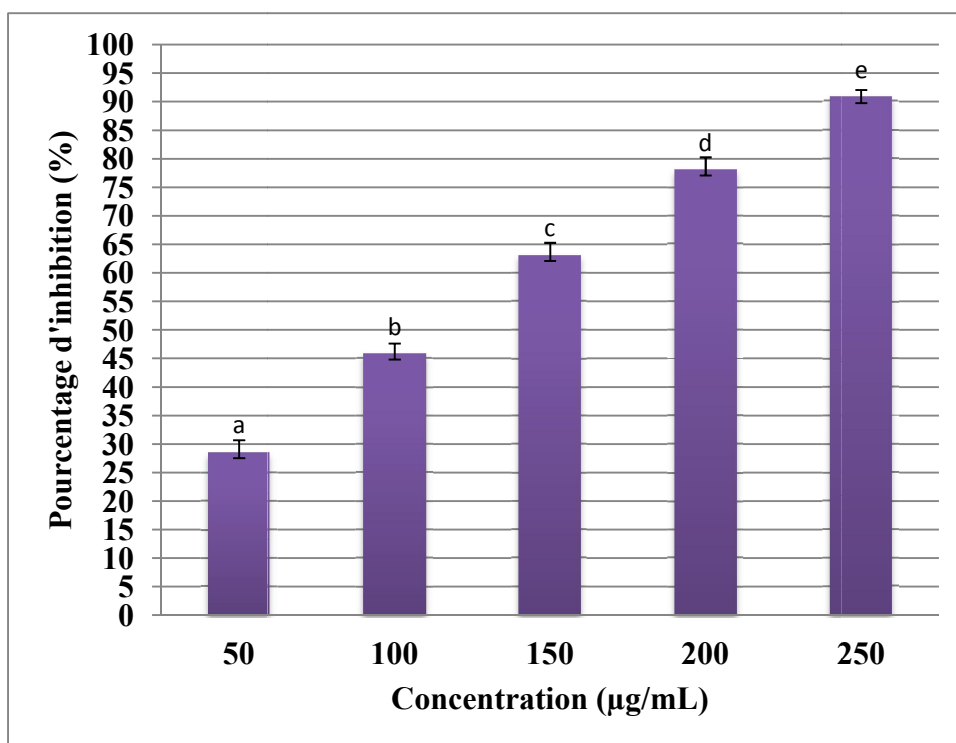




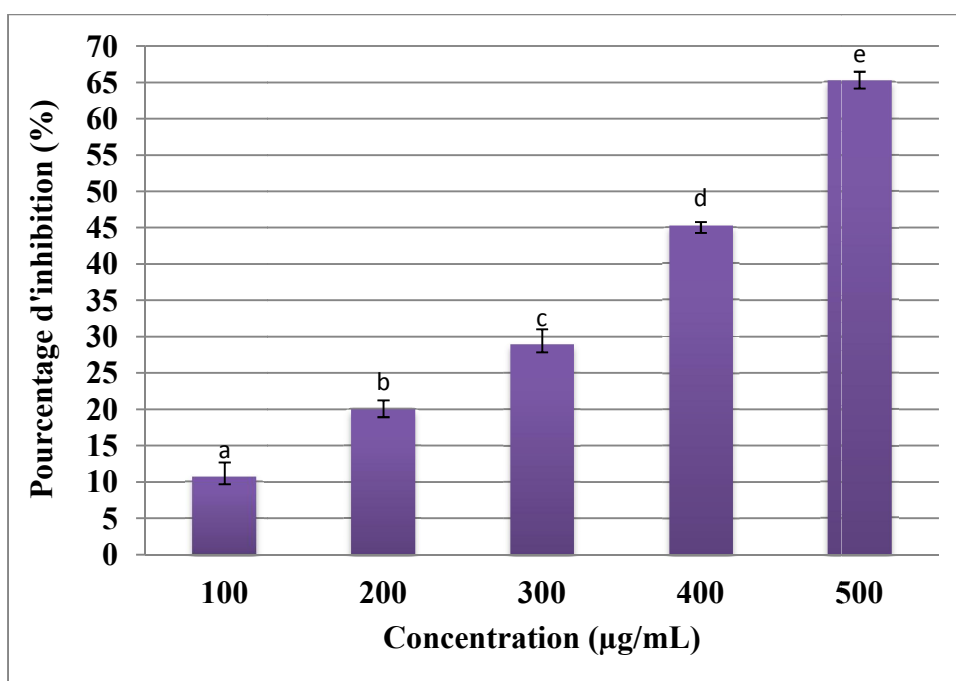
**Figure 4.105.** Activité inhibitrice de l'AChE du produit IV. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .



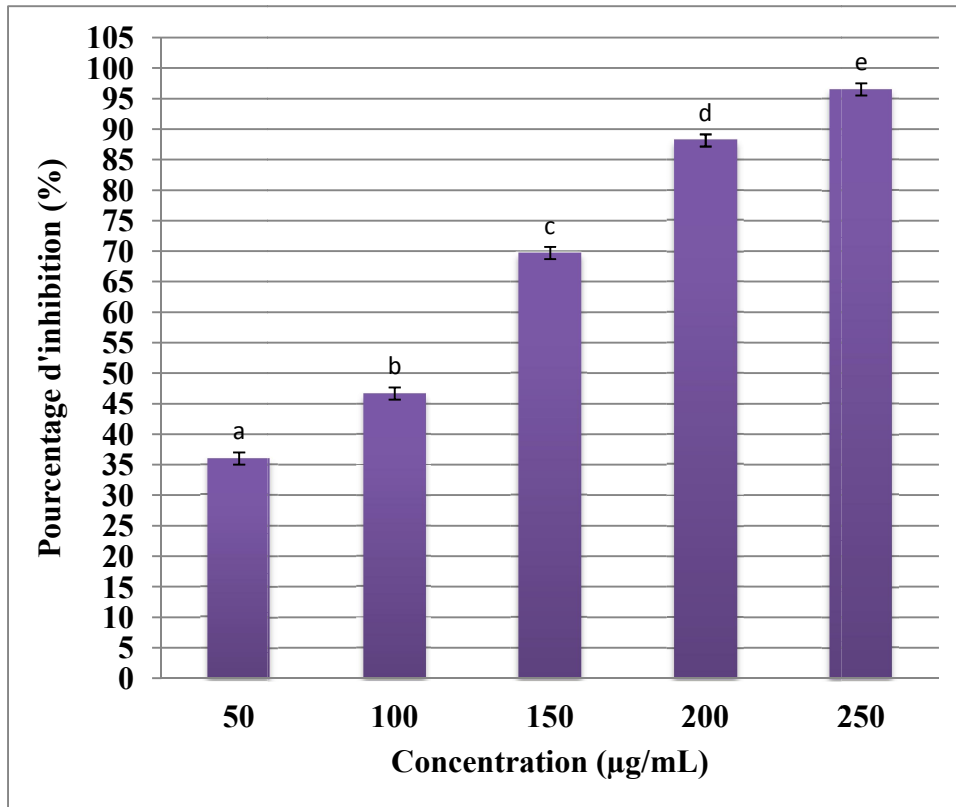
**Figure 4.106.** Activité inhibitrice de l'AChE du produit V. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .



**Figure 4.107.** Activité inhibitrice de l'AChE du produit VI. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .

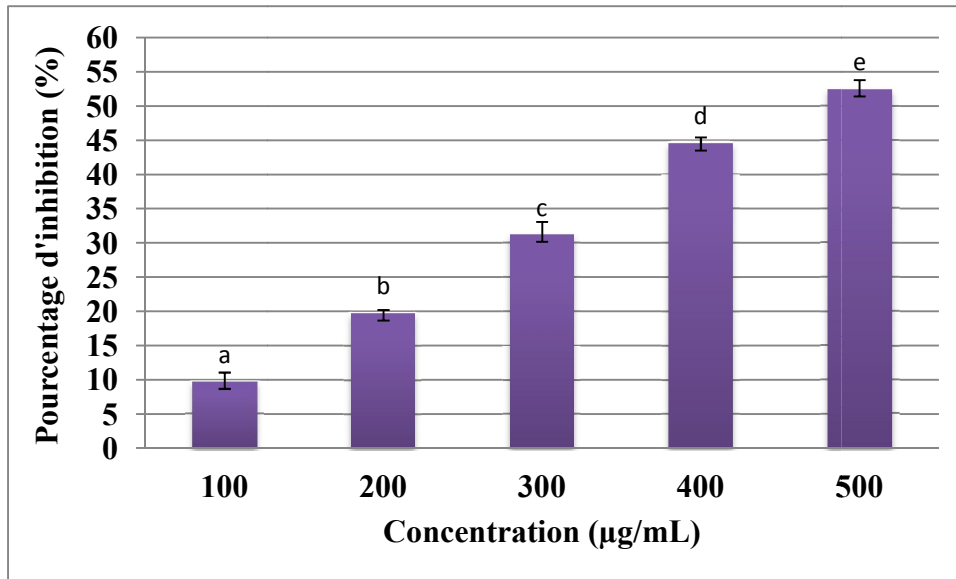


**Figure 4.108.** Activité inhibitrice de l'AChE du produit VII. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .

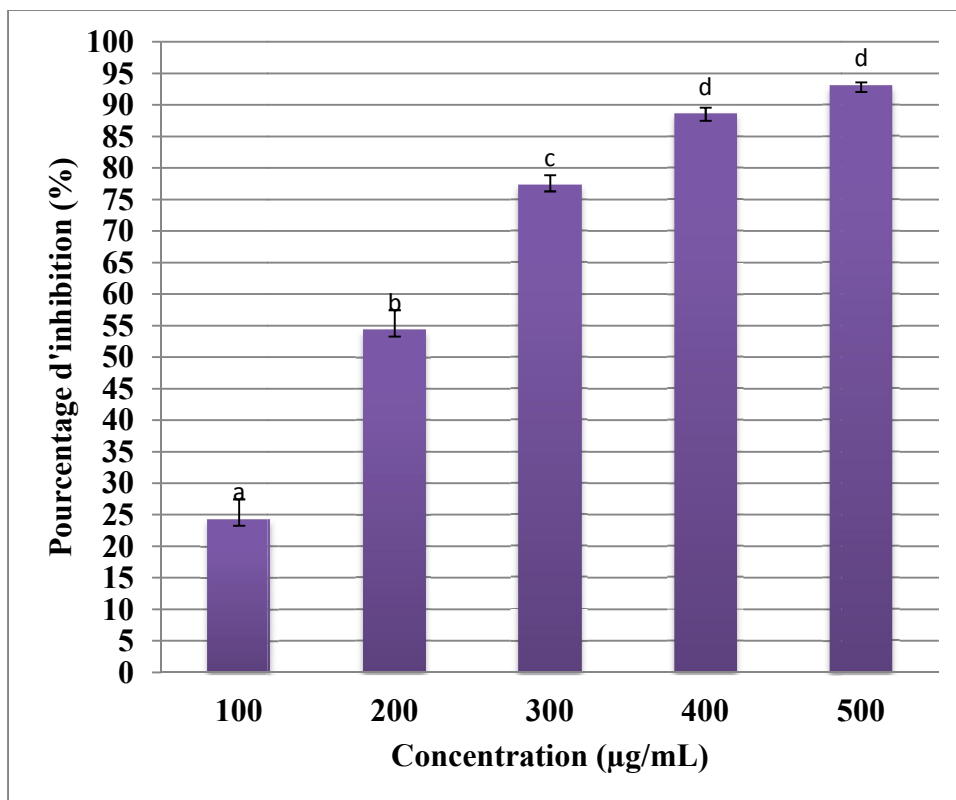


**Figure 4.109.** Activité inhibitrice de l'AChE du produit **VIII**. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .

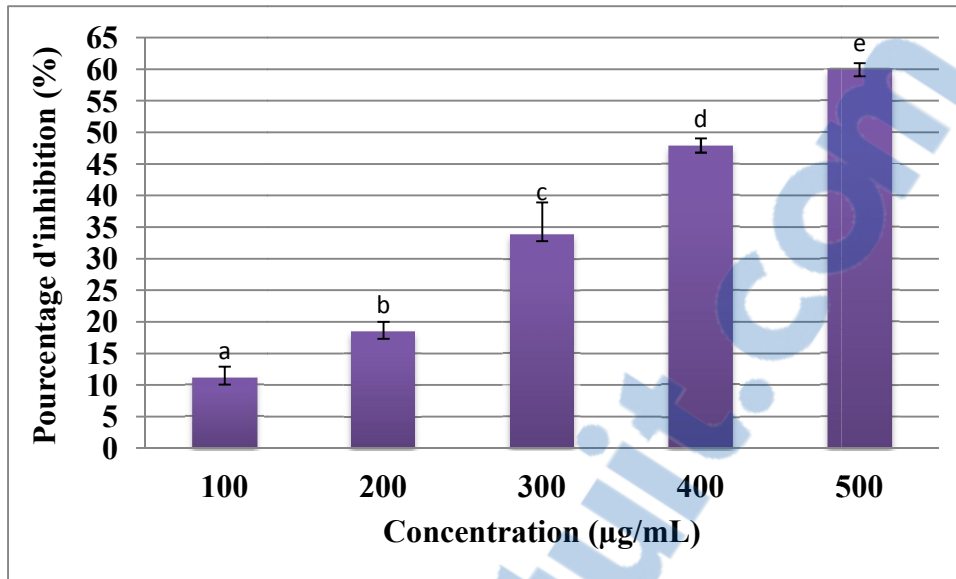
L'activité inhibitrice de l'AChE la plus importante des échantillons issus de *S. lanatus* a été enregistrée dans la fraction **III** avec un taux d'inhibition supérieur de 90 % à une concentration de 500 µg/mL. L'ordre de l'activité pour les extraits et fractions a été comme suit: fraction **III** > fraction **IV** > fraction **V** > extrait éthanolique. L'activité n'a pas pu être déterminée dans la fraction **II**, par contre la fraction **I** est considérée comme inactive (**figure 4.110 à 4.113**). Les produits isolés (**IX à XII**) ont présenté une activité assez similaire allant de 50 à 60 % à une concentration de 250 µg/mL. L'ordre de l'activité pour les produits a été comme suit produit **XII** > produit **XI** > produit **X** > produit **IX** (**figure 4.114 à 4.117**). Les analyses spectrales ont confirmé la nature alcaloïdique de ces produits. Parmi les inhibiteurs de l'AChE, les alcaloïdes sont considérés comme les plus forts, et les inhibiteurs de l'AChE commercialisés pour traiter la MA contiennent presque des atomes de N (**Houghton et al., 2006**).



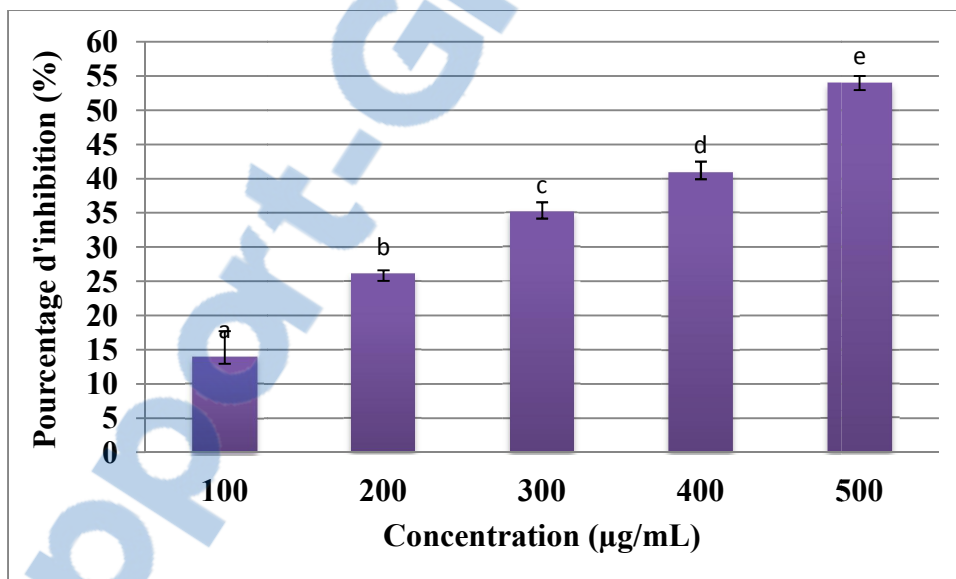
**Figure 4.110.** Activité inhibitrice de l'AChE de l'extrait éthanolique de la plante entière de *S. lanatus*. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .



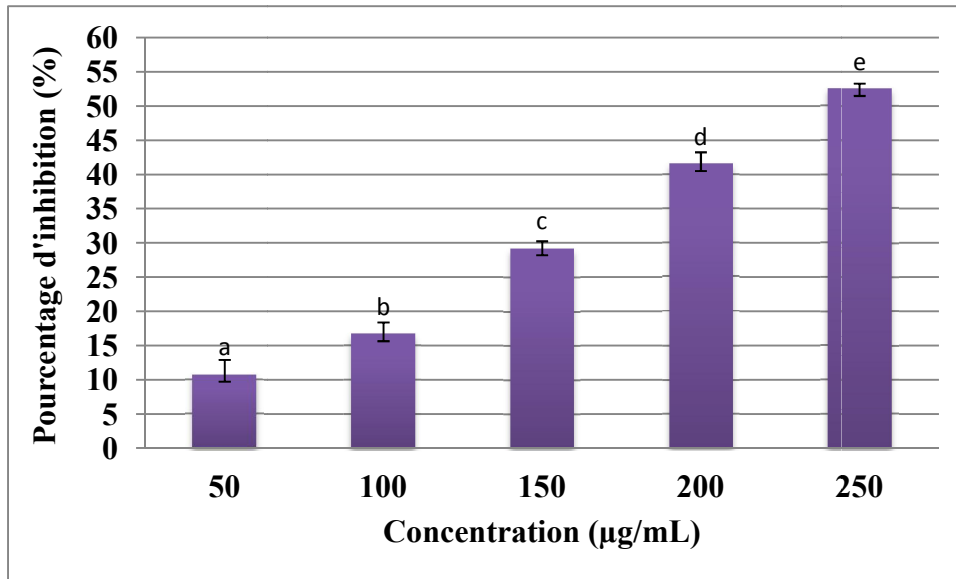
**Figure 4.111.** Activité inhibitrice de l'AChE de la fraction III issue de l'extrait éthanolique de la plante entière de *S. lanatus*. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .



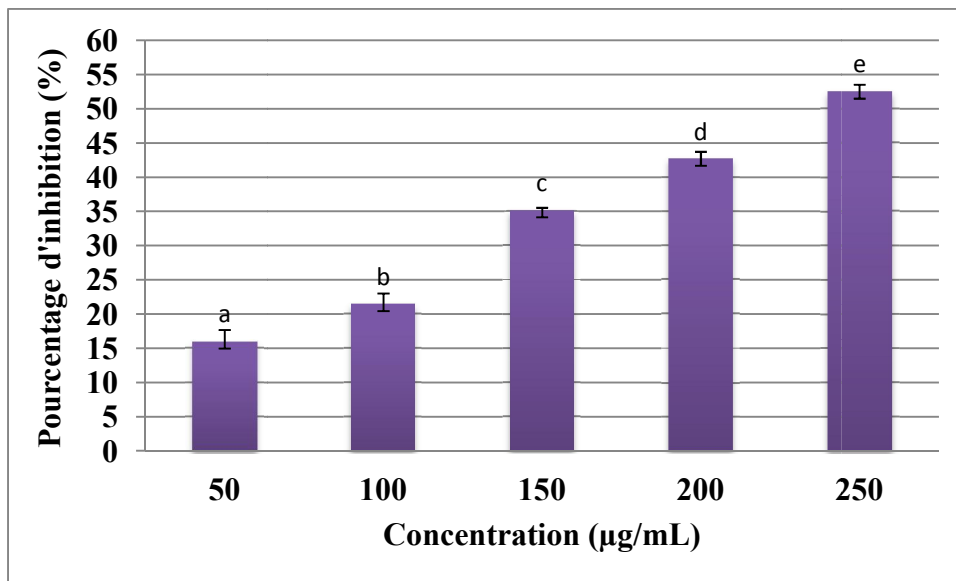
**Figure 4.112.** Activité inhibitrice de l'AChE de la fraction IV issue de l'extrait éthanolique de la plante entière de *S. lanatus*. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .



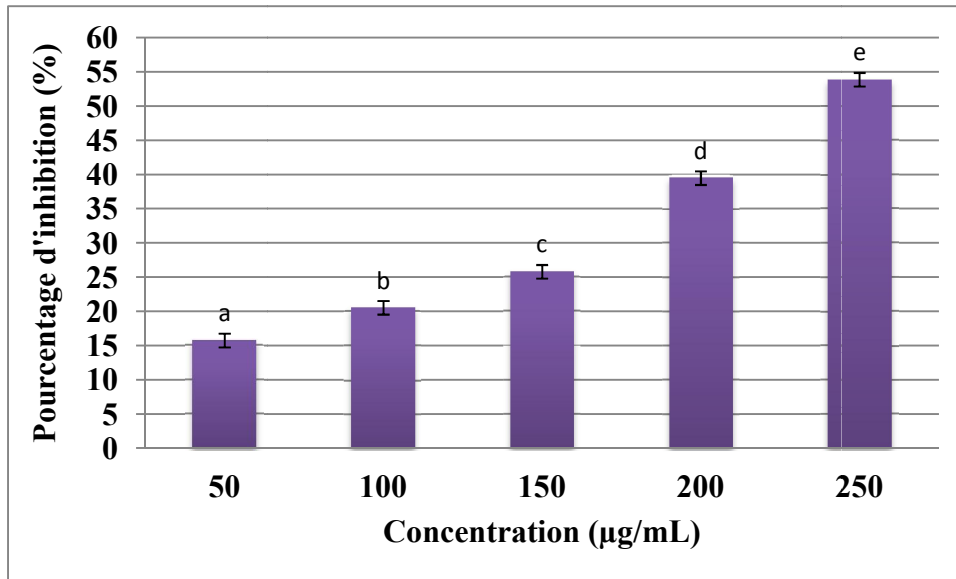
**Figure 4.113.** Activité inhibitrice de l'AChE de la fraction V issue de l'extrait éthanolique de la plante entière de *S. lanatus*. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .



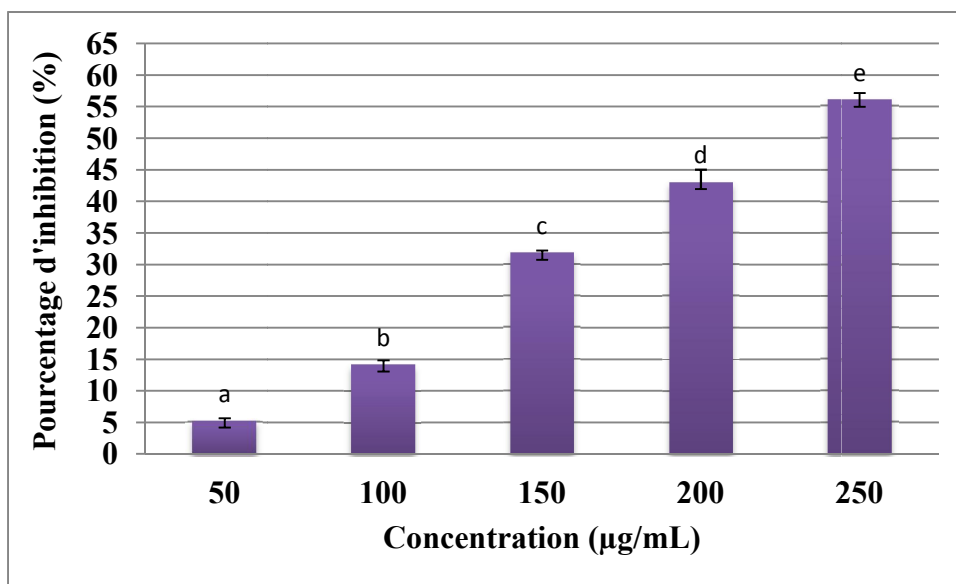
**Figure 4.114.** Activité inhibitrice de l'AChE du produit IX. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .



**Figure 4.115.** Activité inhibitrice de l'AChE du produit X. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .



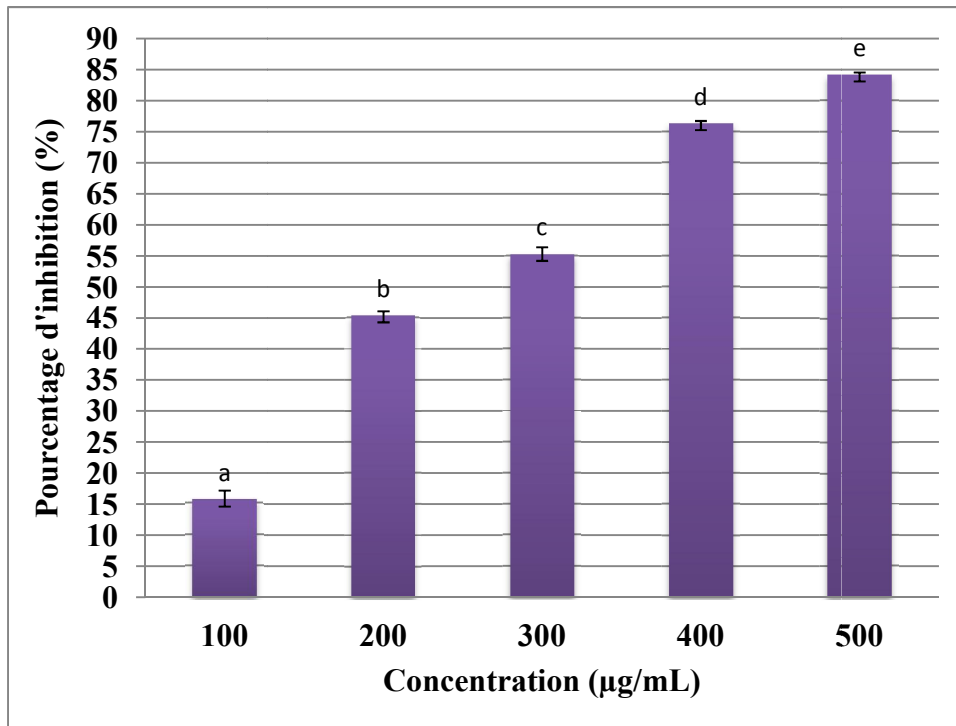
**Figure 4.116.** Activité inhibitrice de l'AChE du produit **XI**. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .



**Figure 4.117.** Activité inhibitrice de l'AChE du produit **XII**. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .

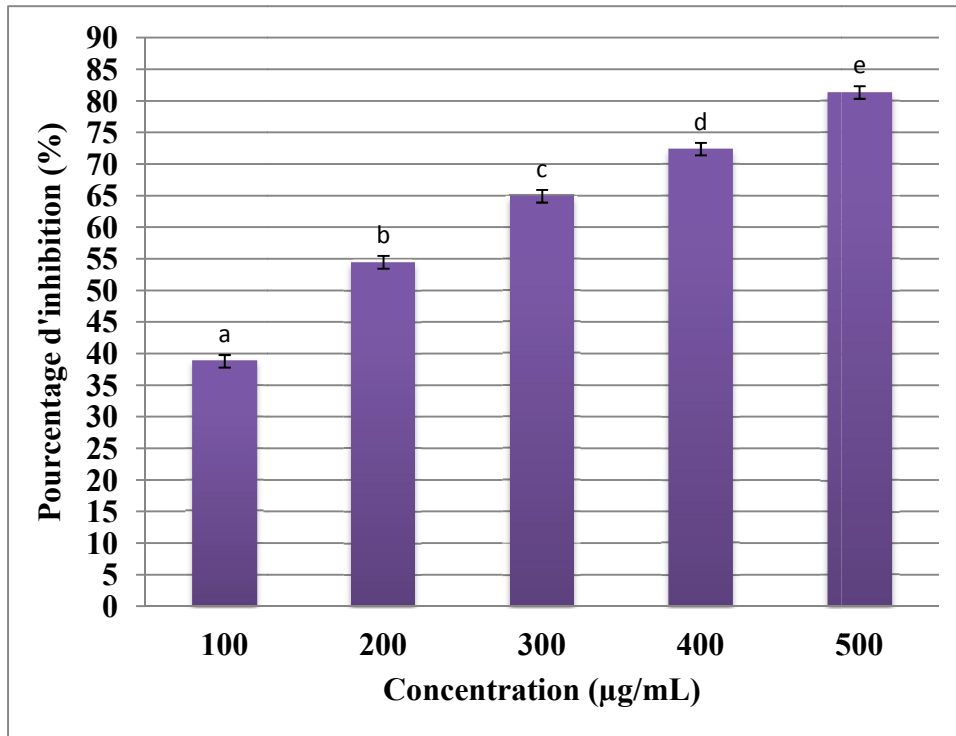
L'activité inhibitrice de l'AChE des échantillons issus d'*E. confusum* est similaire pour l'extrait éthanolique, fraction **III** et fraction **IV** avec un taux d'inhibition compris entre 80 et 90 % à une concentration de 500 µg/mL. L'ordre de l'activité pour les extraits et fractions a été comme suit: fraction **IV** > extrait éthanolique > fraction **III**. L'activité n'a pas pu être déterminée pour la fraction **II**, par contre les fractions **I** et **V** sont considérées comme inactives (**figure 4.118 à 4.120**). Les produits isolés (**XIII, XVII à XX**) ont présenté une activité différente allant de 65 à 90 % à une concentration de 250 µg/mL, par contre les

produits **XIV**, **XV** et **XVI** sont considérées comme inactifs. L'ordre de l'activité pour les produits a été comme suit produit **XIX** > produit **XVII** > produit **XVIII** > produit **XX** > produit **XIII** (figure 4.121 à 4.125). L'analyse par CCM des produits actifs (figure 4.94) a montré une réaction positive au Dragendorff, ce qui laisse dire que l'activité enregistrée est due aux alcaloïdes. La galanthamine (alcaloïde) utilisée comme témoin a présenté une forte activité inhibitrice de l'AChE avec un taux d'inhibition dépassant 80 % à une concentration de 4  $\mu\text{M}$  ( $\approx 1,47 \mu\text{g}$ ) (figure 4.126). Plusieurs alcaloïdes, y compris la classe pyrrolizidine, ont la propriété d'interagir avec les récepteurs nicotiniques et muscariniques de l'ACh (**Green et al., 2013; Tasso et al., 2013; Wink, 2013; Xu et al., 2013**). Les produits isolés pourraient probablement se lier à ces types de récepteurs, ce qui pourrait avoir des effets synergiques, agissant à la fois comme inhibiteur de l'AChE et agoniste des récepteurs de l'ACh.

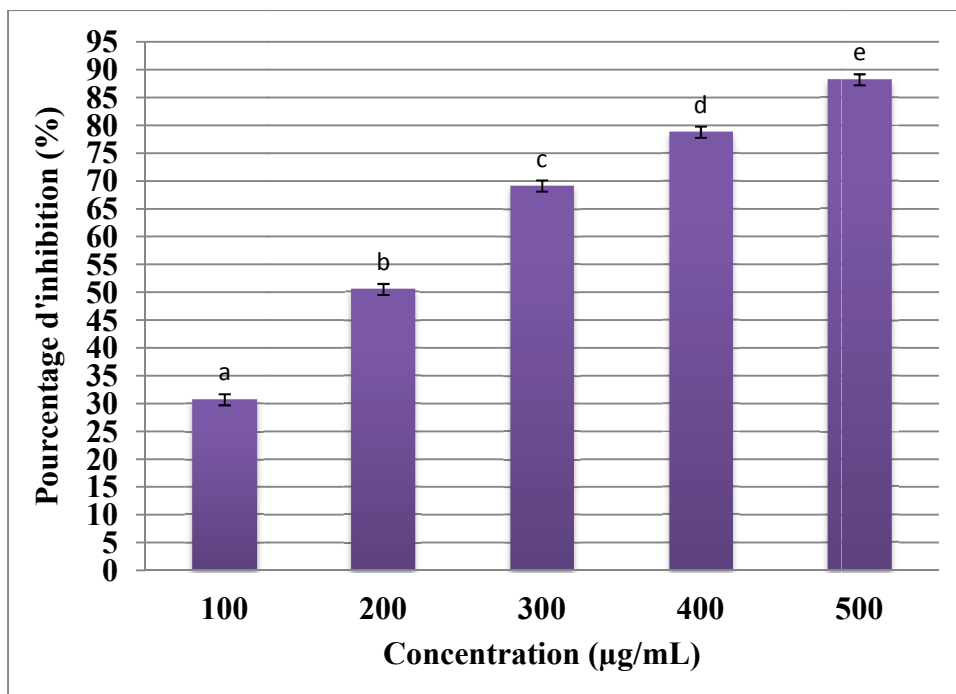


**Figure 4.118.** Activité inhibitrice de l'AChE de l'extrait éthanolique de la plante entière d'*E. confusum*. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .

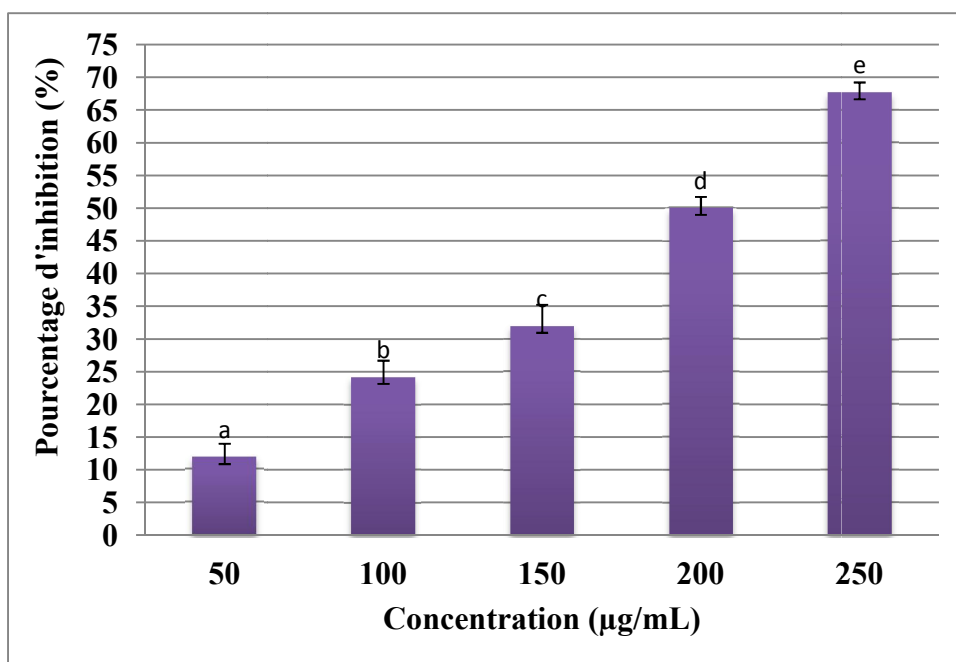




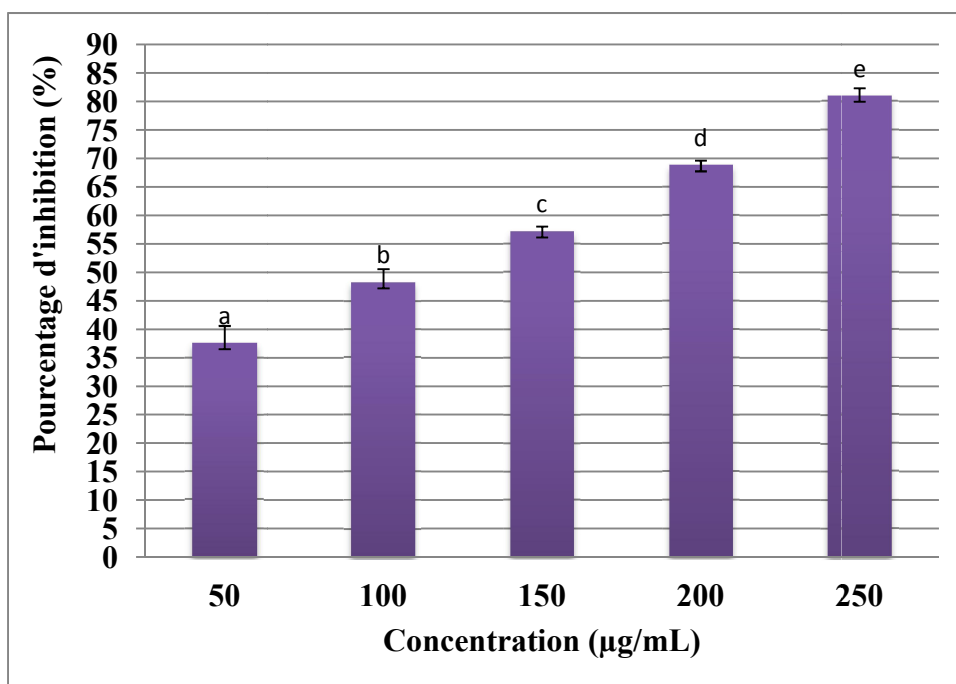
**Figure 4.119.** Activité inhibitrice de l'AChE de la fraction **III** issue de l'extrait éthanolique de la plante entière d'*E. confusum*. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .



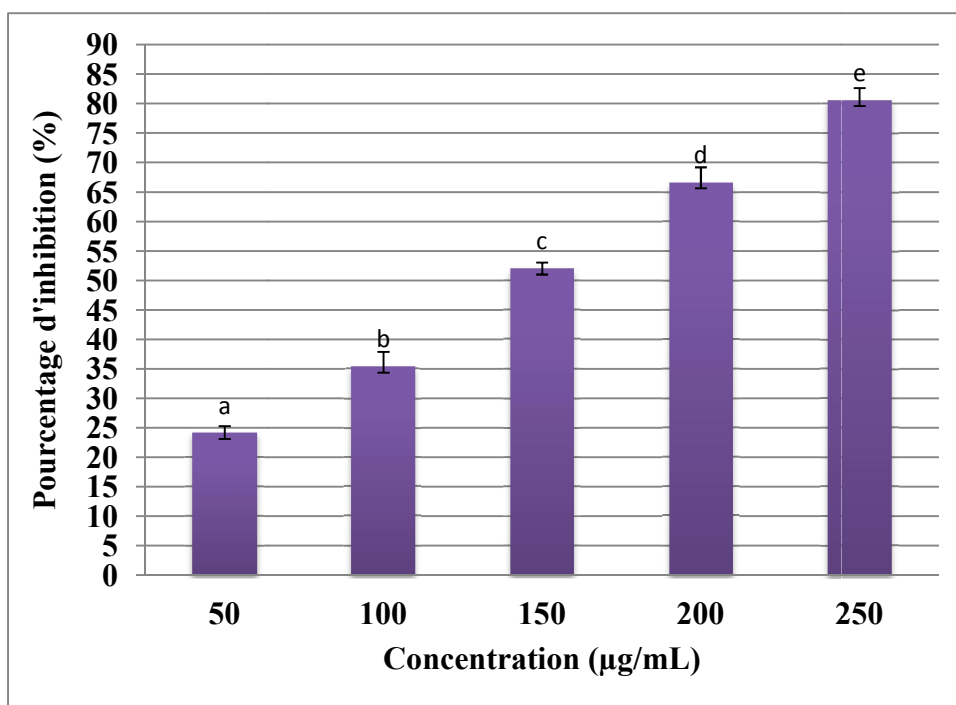
**Figure 4.120.** Activité inhibitrice de l'AChE de la fraction **IV** issue de l'extrait éthanolique de la plante entière d'*E. confusum*. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .



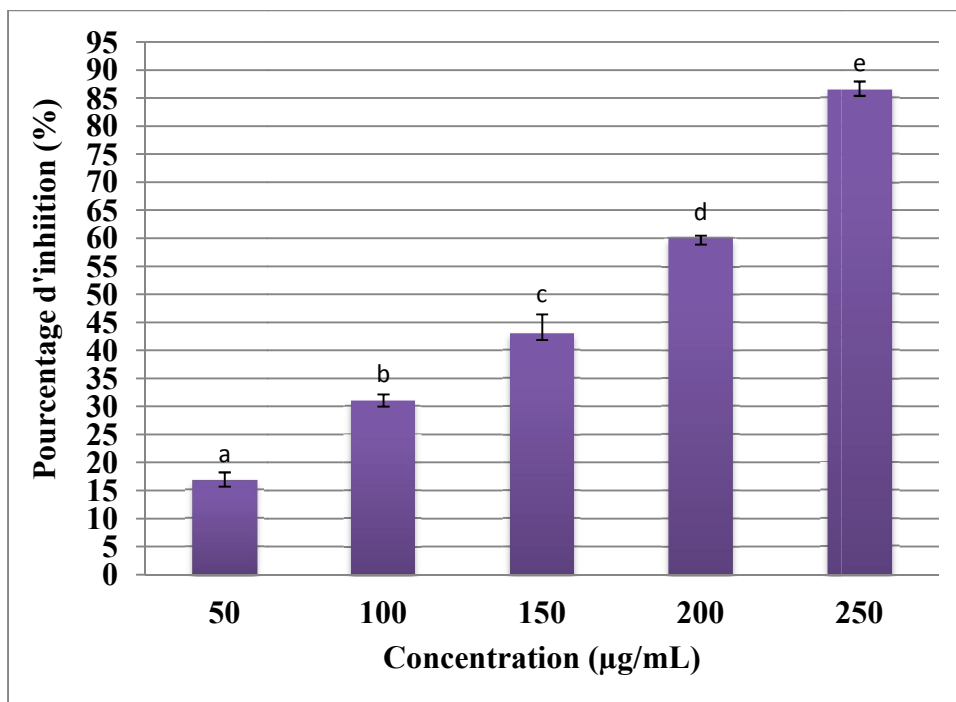
**Figure 4.121.** Activité inhibitrice de l'AChE du produit XIII. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .



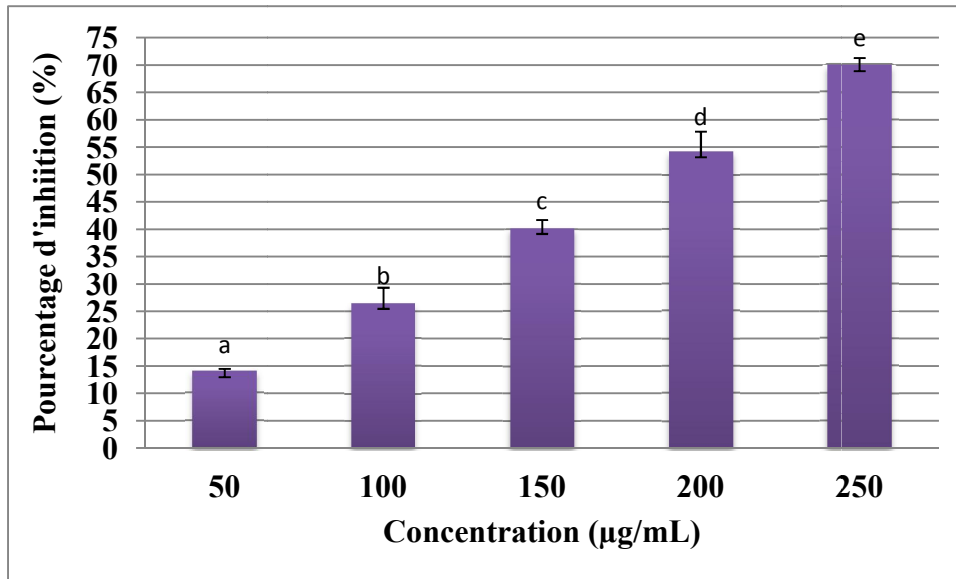
**Figure 4.122.** Activité inhibitrice de l'AChE du produit XVII. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .



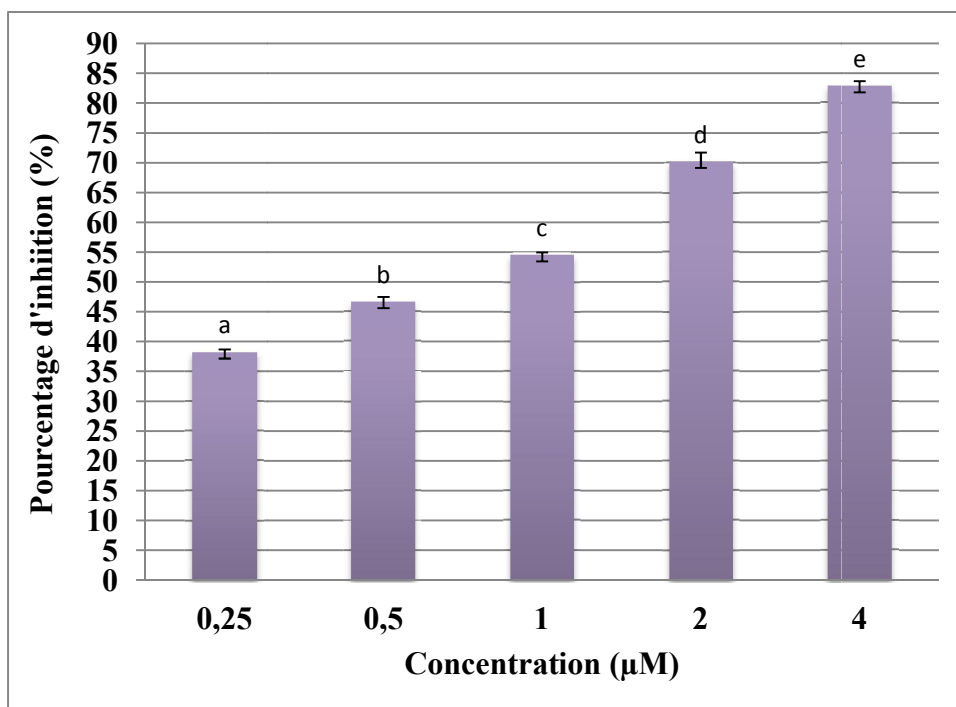
**Figure 4.123.** Activité inhibitrice de l'AChE du produit XVIII. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .



**Figure 4.124.** Activité inhibitrice de l'AChE du produit XIX. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .



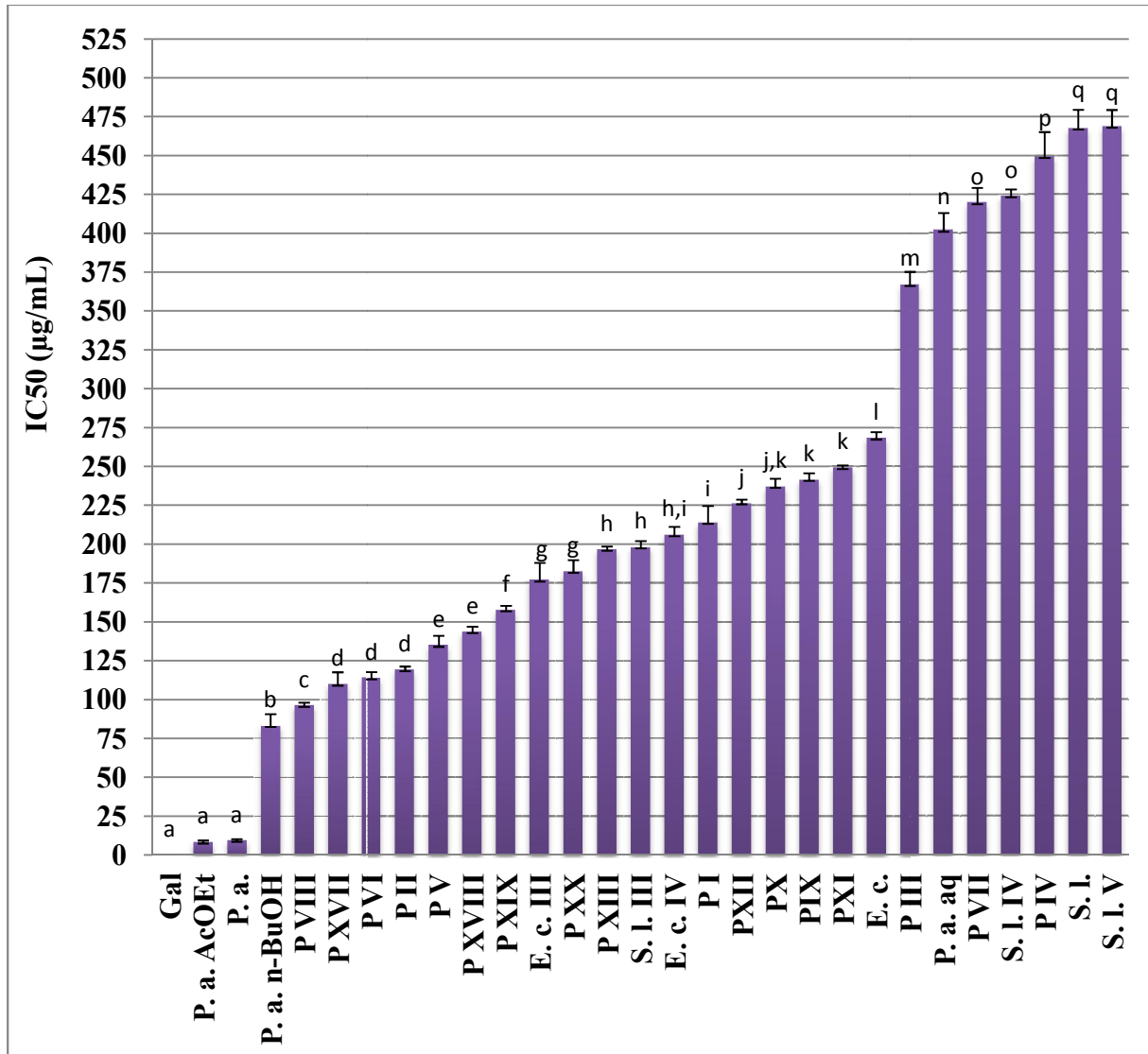
**Figure 4.125.** Activité inhibitrice de l’AChE du produit XX. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .



**Figure 4.126.** Activité inhibitrice de l’AChE de la galanthamine. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .

Concernant la comparaison de tous les échantillons testés contre l’AChE par dosage spectrophotométrique, la fraction acétate d’éthyle et l’extrait brut de *P. atlantica* sont les plus actives avec une  $IC_{50}$  de  $8,38 \pm 0,95$  et  $9,58 \pm 0,60$  µg/mL, respectivement, la fraction n-butanol et le produit VIII ont présenté une  $IC_{50}$  en dessous de 100 µg/mL ( $83,48 \pm 7,10$ ;

96,28 ± 1,70 µg/mL, respectivement). Les autres échantillons ont montré une IC<sub>50</sub> comprise entre 100 et 475 µg/mL. La fraction V de *S. lanatus* a présenté l'IC<sub>50</sub> la plus élevée parmi les échantillons testés (468,93 ± 10,41 µg/mL). La galanthamine utilisée comme témoin présente l'IC<sub>50</sub> la plus faible (0,30 ± 0,0037 µg/mL) (**figure 4.127**).



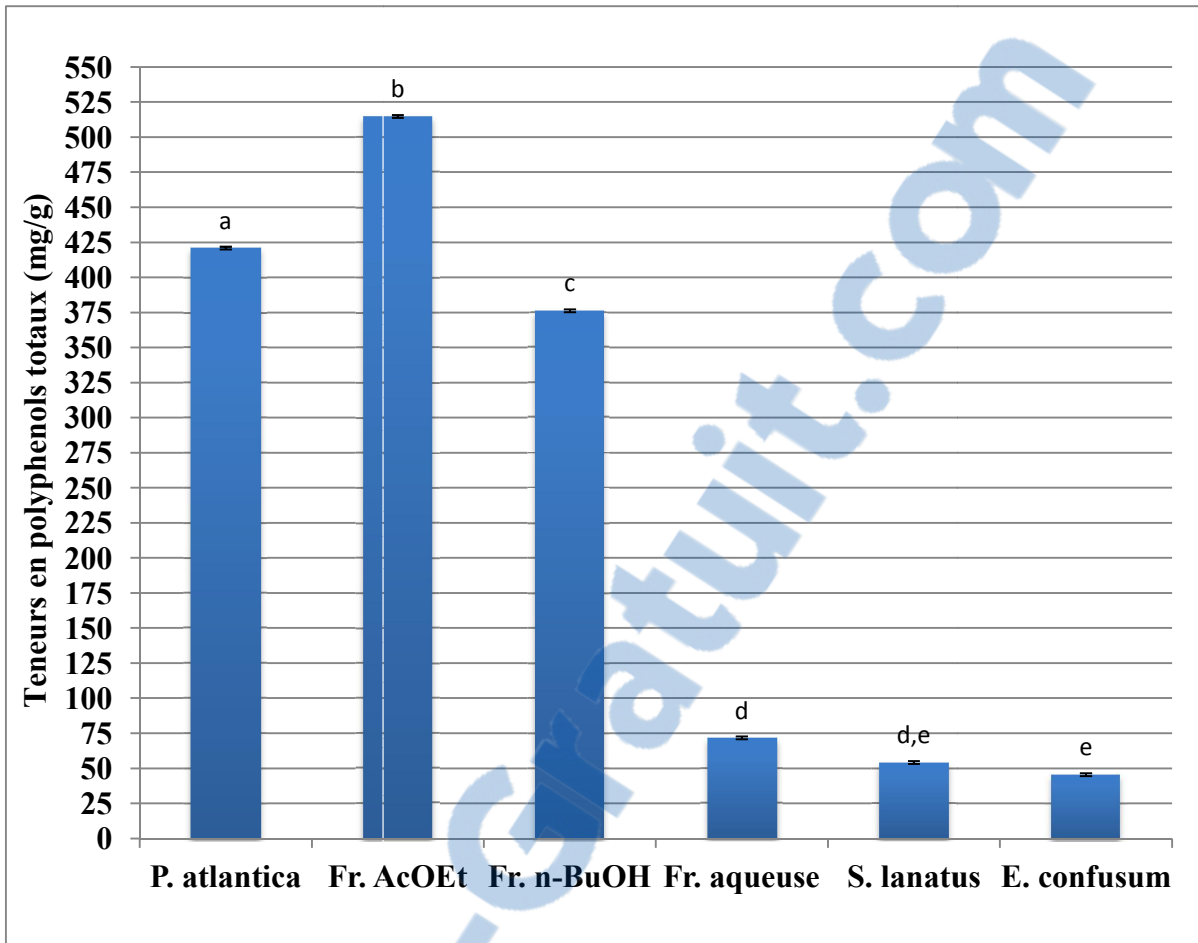
**Figure 4.127.** IC<sub>50</sub> de l'activité inhibitrice de l'AChE des extraits bruts, fractions et produits purifiés. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .

#### 4.5. Quantification des polyphénols totaux dans les extraits des plantes étudiées

La **figure 4.128** montre les résultats des polyphénols totaux quantifiés. Il convient de souligner que ces résultats des polyphénols constituent des estimations et sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique (EAG) par gramme d'extrait sec (ES). Les composés phénoliques solubles ont été mesurés par la méthode de Folin-Ciocalteu. Réactif de Folin-

Ciocalteu, est un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), est réduit en oxyde bleu de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ) au cours de l'oxydation du phénol. Cette réaction se produisant dans des conditions alcalines, est effectuée en présence de carbonate de sodium. La coloration bleu est contrôlée à 726 nm et reflète la quantité de phénols, généralement exprimée en équivalent d'acide gallique ou d'acide chlorogénique (**Conforti et al., 2009**).

Les quantités de composés phénoliques totaux diffèrent largement dans les différents extraits analysés et varient de  $514,811 \pm 3,643$  à  $45,607 \pm 0,56$  mg/g (**figure 4.128**). Cette variation peut être prévue pour des extraits de plantes, en raison de la présence d'autres constituants et/ou la présence de différents types de phénols. Parmi les extraits de plantes, la fraction acétate d'éthyle de *P. atlantica* contient la plus grande quantité de composés phénoliques ( $514,811 \pm 3,643$  mg/g), suivie par l'extrait aqueux de *P. atlantica* ( $421,019 \pm 15,458$  mg/g) et de la fraction n-butanol de *P. atlantica* ( $376,348 \pm 5,951$  mg/g), tandis que le niveau le plus bas a été enregistré dans l'extrait éthanolique d'*E. confusum* ( $45,607 \pm 0,56$  mg/g). La quantité de polyphénols totaux trouvés dans l'extrait aqueux de *P. atlantica* ( $421,019 \pm 15,458$  mg/g) diffère largement de celle estimée par **Peksel et al. (2010)** pour l'extrait acétate d'éthyle et méthanolique de la même plante ( $112,62 \pm 18,51$ ;  $245,60 \pm 6,02$  mg/g, respectivement). Selon le même auteur la quantité des polyphénols totaux dans les feuilles de *P. atlantica* augmente avec l'augmentation de la polarité du solvant. Les résultats de **Sen et al. (2010)** et **Abbaszadeh et al. (2013)**, ont montré aussi que la quantité des polyphénols varie avec la région (lieu de récolte). La quantité des polyphénols estimée dans l'extrait éthanolique d'*E. confusum* ( $45,607 \pm 0,56$  mg/g) est similaire à celle de l'extrait hydroéthanolique des tiges d'*E. amoenum* Fisch. & C.A. Mey. ( $43,02 \pm 3,49$  mg/g) (**Abbaszadeh et al., 2013**). En effet, les plantes riches en polyphénols sont d'importantes sources d'antioxydants et sont efficaces contre les dommages oxydatifs des tissus (**Darvesh et al., 2010**). Nous avons bien montré dans le chapitre 2 le rôle de l'oxydation dans le développement de la MA, ceci dit que *P. atlantica* pourrait être une source naturelle d'antioxydants précieux et semblerait être applicable à la fois dans la prévention de la MA et dans les industries agroalimentaires. En plus, Il existe de nombreuses études indiquant que la consommation régulière de régime alimentaire riche en polyphénols fournit une protection contre les maladies neurodégénératives comme la MA (**Bhullar et Rupasinghe, 2015**).



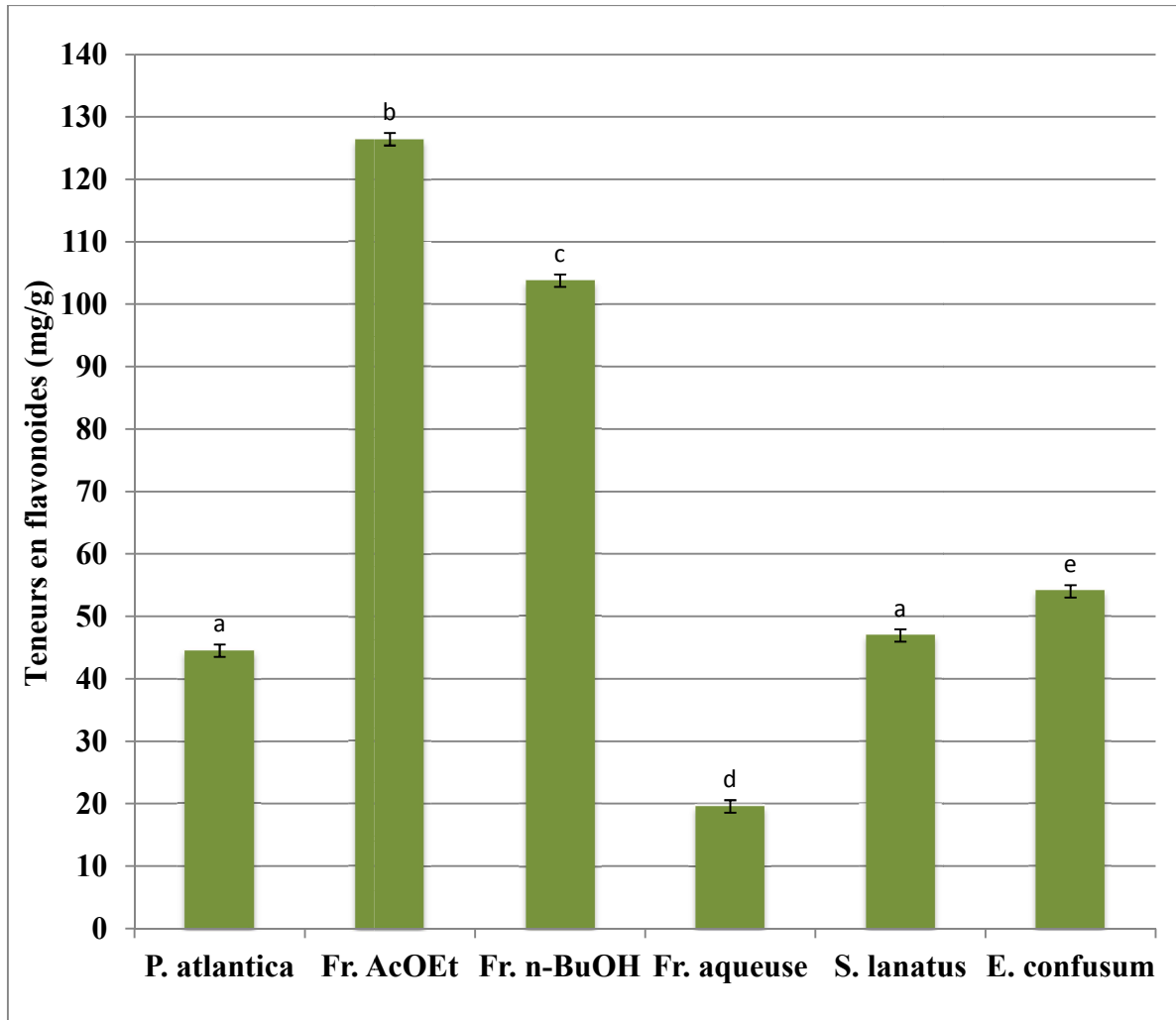
**Figure 4.128.** Teneurs des polyphénols totaux (mg EAG/g ES) des plantes étudiées. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .

#### 4.6. Quantification des flavonoïdes totaux dans les extraits bruts des plantes étudiées

Parmi les extraits de plantes évalués pour la quantification des flavonoïdes, les fractions AcOEt et n-butanol ont montré la teneur la plus élevée ( $126,431 \pm 2,283$  et  $103,774 \pm 1,869$  mg/g, respectivement). Les extraits bruts (*P. atlantica*, *S. lanatus* et *E. confusum*) ont montré des teneurs en flavonoïdes assez proches ( $44,511 \pm 0,507$ ;  $46,954 \pm 0,479$ ;  $54,022 \pm 1,143$  mg/g, respectivement), tandis que le niveau le plus bas a été trouvé dans la fraction aqueuse ( $19,571 \pm 0,891$  mg/g) (**figure 4.129**). La valeur estimée dans l'extrait aqueux des feuilles de *P. atlantica* est légèrement au dessus de celle estimée par **Peksel et al. (2013)** pour le même type d'extrait, organe et plante ( $33,52 \pm 2,04$  mg/g). Par contre, la teneur observée dans l'extrait éthanolique d'*E. confusum* est largement inférieure à celle estimée par **Niciforovic et al. (2010)** dans l'extrait méthanolique des parties aériennes d'*E. vulgare* L.

Les flavonoïdes sont largement répons dans le règne végétal, avec une liste de 10.000 structures connues. Ils sont connus comme antioxydants et piègeurs des radicaux libres. Les

flavonoïdes ont un grand intérêt pour leurs activités biologiques, telle que la neuro-protection (Cao *et al.*, 2013; Peksel *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2015). Ceci dit les extraits des plantes étudiées pourraient jouer un rôle dans la prévention de la MA à travers leur richesse en flavonoïdes.



**Figure 4.129.** Teneurs des flavonoïdes (mg EC/g ES) des plantes étudiées. Les colonnes non reliées par la même lettre sont statistiquement différentes à  $\alpha < 0,05$ .



# Conclusion & perspectives

Au cours de ce travail, ayant pour objectif de rechercher des extraits de plantes présentant une activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE), trois extraits bruts provenant de trois plantes médicinales *Pistacia atlantica* Desf., *Solenanthus lanatus* A.DC. et *Echium confusum* de Coincy. ont été évalués par le test de bioautographie et l'essai en solution par la méthode d'Ellman. Les trois plantes se sont révélées actives de façon significative.

Dans cette étude, le fractionnement bioguidé a été entrepris pour ces trois plantes et a permis l'isolement de vingt produits. Dans un premier temps, le fractionnement de l'extrait aqueux de *P. atlantica*, en suivant son activité inhibitrice de l'AChE, a permis la purification et l'identification principalement des dérivés de l'acide gallique et de la quercétine (produits **I-VIII**). Le fractionnement bioguidé de l'extrait éthanolique de *S. lanatus* a conduit à l'isolement et à la caractérisation de quatre alcaloïdes pyrrolizidiniques, produits **IX, X, XI** et **XII** dont un nouveau produit naturel: **7-angeloylechinate N-oxyde** (produit **X**). A notre connaissance, ces alcaloïdes pyrrolizidiniques ont été caractérisés pour la première fois dans le genre *Solenanthus*. De même, le fractionnement bioguidé de l'extrait éthanolique d'*E. confusum* a conduit à l'isolement et à la purification de huit alcaloïdes pyrrolizidiniques, produits **XIII-XX**. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques se retrouvent dans un grand nombre de plantes supérieures, et sont surtout très présents dans la famille Boraginaceae.

La plupart des produits isolés ont révélé une activité inhibitrice de l'AChE par le test de bioautographie. Les essais en solution par la méthode d'Ellman ont confirmé une activité modérée pour les produits isolés; en revanche, les produits **XIV, XV** et **XVI** se sont révélés inactifs en solution. Les différences dans l'activité observée pourraient éventuellement s'expliquer par des variations dans la structure des inhibiteurs.

Une méthode associant un système HPLC couplé à un détecteur UV (HPLC-UV) et un spectromètre de masse (HPLC-MS) a été utilisée afin de déterminer la composition phytochimique de *P. atlantica*. L'utilisation de ces deux techniques a conduit à l'amélioration de la vitesse de séparation, à la résolution et surtout à la sensibilité de détection, permettant ainsi de détecter les produits minoritaires. L'analyse par HPLC-UV et HPLC-MS a donc permis l'identification en ligne dans l'extrait de *P. atlantica* principalement des dérivés de l'acide gallique et de la quercétine. Ces méthodes offrent en outre d'intéressantes perspectives dans le domaine de l'analyse d'extraits de plantes.

Les plantes étudiées dans le présent travail, ainsi que les divers produits naturels isolés ont montré des potentialités intéressantes. Dans ce contexte, l'étude des genres *Pistacia*, *Solenanthus* et *Echium* est encourageante pour la recherche de nouvelles molécules actives. Les travaux effectués ont donc permis de mettre en évidence la présence de produits inhibant l'activité de l'AChE dans les plantes étudiées. Les molécules isolées appartiennent à deux classes phytochimiques: polyphénols et alcaloïdes. Il est possible que ces produits possèdent un mode d'action différent. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives quant à l'utilisation de molécules naturelles dans le traitement de la MA.

Afin d'évaluer davantage l'activité inhibitrice de l'AChE des échantillons étudiés, le présent travail doit être poursuivi par:

- une étude de l'inhibition de l'AChE *in vivo* chez des modèles animaux, cependant, les tests *in vivo* demeurent complexes à mettre en place et sollicitent de plus une grande quantité de produit à tester, ce qui n'est pas toujours évident dans le cas des produits minoritaires. Ainsi, de nouvelles étapes de fractionnement sont nécessaires afin d'obtenir les produits actives en quantité importante.
- une détermination du type d'inhibition des produits actifs afin d'explicitier le mode d'action. En effet, une attention toute particulière doit être portée aux doubles inhibiteurs, lesquels peuvent se lier à la fois au site actif et au site périphérique de l'enzyme. Le site périphérique de l'AChE est impliqué dans la formation des plaques amyloïdes qui sont à l'origine de la MA.

# Références bibliographiques

Abbaszadeh S., Radjabian T. et Taghizadeh M., 2013. Antioxidant Activity, Phenolic and Flavonoid Contents of *Echium* Species from Different Geographical Locations of Iran. *Journal of Medicinal Plants and By-products*, 1, 23-31.

Abraham C.R., 2001. Reactive astrocytes and alpha1-antichymotrypsin in Alzheimer's disease. *Neurobiology Aging*, 22, 931-936.

Abu-Reidah I.M., Ali-Shtayeh M.S., Jamous R.M., Arráez-Román D. et Segura-Carretero A., 2015. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. *Food Chemistry*, 166, 179-191.

Adams M., Plitzko I., Kaiser M., Brun R. et Hamburger M., 2009. HPLC-profiling for antiplasmodial compounds—3-Methoxycarpachromene from *Pistacia atlantica*. *Phytochemistry Letters*, 2, 159-162.

Adhami H.-R., Fitz V., Lubich A., Kaehlig H., Zehl M. et Krenn L., 2014. Acetylcholinesterase inhibitors from galbanum, the oleo gum-resin of *Ferula gummosa* Boiss. *Phytochemistry Letters*, 10, Ixxxii-Ixxxvii.

Adhami H.R., Linder T., Kaehlig H., Schuster D., Zehl M. et Krenna L., 2012.. Catechol alkenyls from *Semecarpus anacardium*: Acetylcholinesterase inhibition and binding mode predictions. *Journal of Ethnopharmacology*, 139, 142-148.

Afsaneh R., 2009. The effect of *Solenanthus circinnatus* root extract on actue carrageenan-induced inflammation. *Journal of Isfahan Medical School*, 26, 349-353.

Afsaneh R., 2010. The analgesic effect of *Solenanthus circinnatus* root extract in male rat. *Journal of Isfahan Medical School*, 27, 660-668.

Aguilar-Ortigoza C.J. et Sosa V., 2004. The evolution of toxic phenolic compounds in a group of Anacardiaceae genera. *Taxon*, 53, 357-364.

Ahmad N.S., Farman M., Najmia M.H., Miana K.B. et Hasan A., 2008. Pharmacological basis for use of *Pistacia integerrima* leaves in hyperuricemia and gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 117, 478-482.

Ahmad S., Ali M. et Ansari S.H., 2011. Phenolic constituents from galls of *Pistacia integerrima* Stewart. *Indian Journal of Chemistry*, 50, 115-118.

Ahmad S., Ali M., Ansari S.H. et Ahmed F., 2010. Phytoconstituents from the galls of *Pistacia integerrima* Stewart. *Journal of Saudi Chemical Society*, 14, 409-412.

Ajileye O.O., Obuotor E.M., Akinkunmi E.O. et Aderogba M.A., 2015. Isolation and characterization of antioxidant and antimicrobial compounds from *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) leaf extract. *Journal of King Saud University*, 27, 244-252.

Alali F.Q., Tahboub Y.R., Ibrahim E.S., Qandil A.M., Tawaha K., Burgess J.P. *et al.*, 2008. Pyrrolizidine alkaloids from *Echium glomeratum* (Boraginaceae). *Phytochemistry*, 69, 2341-2346.

- Albrecht A., Vovk I., Simonovska B. et Srbinoska M., 2009. Identification of shikonin and its ester derivatives from the roots of *Echium italicum* L. *Journal of Chromatography A*, 1216, 3156-3162.
- Al-Jafari A.A., Kamal M.A., Greig N.H., Alhomida A.S. et Perry E.R., 1998. Kinetics of human erythrocyte acetylcholinesterase inhibition by a novel derivative of physostigmine: phenserine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 248, 180-185.
- Al-Musayeb N., Perveen S., Fatima I., Nasir M. et Hussain A., 2011. Antioxidant, Anti-Glycation and Anti-Inflammatory Activities of Phenolic Constituents from *Cordia sinensis*. *Molecules*, 16, 10214-10226.
- Al-Saghir M. et Porter D.M., 2005. Stomatal distribution in *Pistacia* species (Anacardiaceae). *International Journal of Botany*, 1, 183-187.
- Al-Saghir M., Porter D.M. et Nilsen E.T., 2006. Leaf anatomy of *Pistacia* species (Anacardiaceae). *Journal of Biological Sciences*, 6, 242-244.
- Al-Shehbaz I.A., 1991. The genera of Boraginaceae in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum, Supplementary Series*, 1, 1-169.
- Alzheimer A., 1911. über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie*, 4, 356-385.
- Andrisano V., Bartolini M., Gotti R., Cavrini V. et Felix G., 2001. Determination of inhibitors' potency (IC<sub>50</sub>) by a direct high-performance liquid chromatographic method on an immobilised acetylcholinesterase column. *Journal of Chromatography B*, 753, 375-383.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG III), 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 105-121.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG), 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 85, 531-553.
- Ann Marie H. et Martin R.F., 2004. On the horizon: pathways for drug development in Alzheimer's disease. *Clinics in Geriatric Medicine*, 20, 141-152.
- Arendt T., Bruckner M.K., Lange M. et Bigl V., 1992. Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development—a study of molecular forms. *Neurochemistry International*, 21, 381-396.
- Arpagaus M., Fedon Y., Cousin X., Chatonnet A., Berge J.B., Fournier D. *et al.*, 1994. cDNA sequence, gene structure, and in vitro expression of ace-1, the gene encoding acetylcholinesterase of class A in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 9957-9965.
- Asibal C.F., Glinsiu J.A., Gelbaum L.T. et Zalko L.H., 1989. Pyrrolizidine alkaloids from *Cynoglossum creticum*. Synthesis of the pyrrolizidine alkaloids echinatine, rinderine, and analogues. *Journal of Natural Products*, 52, 109-118.

Assimopoulou A.N., Ganzera M., Stuppner H. et Papageorgiou V.P., 2008. Simultaneous determination of monomeric and oligomeric alkannins and shikonins by high-performance liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 22, 173-190.

Atack J.R., Perry E.K., Bonham J.R., Candy J.M. et Perry R.H., 1986. Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 47, 263-277.

Atwood C.S., Moir R.D., Huang X., Scarpa R.C., Bacarra N.M., Romano D.M. *et al.*, 1998. Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 12817-12826.

Avula B., Sagi S., Wang Y.-H., Zweigenbaum J., Wang M. et Khan I.A., 2015. Characterization and Screening of Pyrrolizidine Alkaloids and *N*-oxides from Botanicals and Dietary Supplements using UHPLC-High Resolution Mass Spectrometry. *Food Chemistry*, 178, 136-148.

Azaizeha H., Halahleha F., Abbasa N., Markovicsc A., Mukladad H., Ungard E.D., *et al.*, 2013. Polyphenols from *Pistacia lentiscus* and *Phillyrea latifolia* impair the exsheathment of gastro-intestinal nematode larvae. *Veterinary Parasitology*, 191, 44-50.

Bachman D.L., Wolf P.A., Linn R., Knoefel J.E., Cobb J., Belanger A. *et al.*, 1992. Prevalence of dementia and probable senile dementia of the Alzheimer type in the Framingham Study. *Neurology*, 42, 115-119.

Backer H.J. et Haack N.H., 1938. Le principe toxique des fruits de Renghas (*Semecarpus heterophylla* Bl.). *Recueil Travaux Chimiques Pays-Bas*, 57, 225-232.

Bai D.L., Tang X C. et He X.C., 2000. Hupezine A, a potential therapeutic agent for treatment of Alzheimer's disease. *Current Medicinal Chemistry*, 7, 355-374.

Balan K.V., Prince J., Hana Z., Dimas K., Cladaras M., Wyche J.H. *et al.*, 2007. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. chia. *Phytomedicine*, 14, 263-272.

Ball M., 1982. Limbic predilection in Alzheimer's dementia: is reactivated herpes virus involved? *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 9, 303-306.

Baratto M.C., Tattini M., Galardi C., Pinelli P., Romani A., Visioli F. *et al.*, 2003. Antioxidant Activity of Galloyl Quinic Derivatives Isolated from *P. lentiscus* Leaves. *Free Radical Research*, 37, 405-412.

Barrero A.F., Herrador M.M., Arteaga J.F., Akssira M., Mellouki F., Belgarrabe A. *et al.*, 2005. Chemical composition of the essential oils of *Pistacia atlantica* Desf. *Journal of Essential Oil Research*, 17, 52-54.

Barreto J.C., Trevisan M.T.S., Hull W.E., Erben G., De Brito E.S. et Pfundstein B., 2008. Characterization and Quantitation of Polyphenolic Compounds in Bark, Kernel, Leaves, and

Peel of Mango (*Mangifera indica* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 5599-5610.

Bartolini M., Cavrini V. et Andrisano V., 2005. Choosing the right chromatographic support in making a new acetylcholinesterase-micro-immobilised enzyme reactor for drug discovery. Journal of Chromatography A, 1065, 135-144.

Battisti V., Schetinger M.R., Maders L.D., Santos K.F., Bagatini M.D. et Correa M.C., 2009. Changes in acetylcholinesterase (AChE) activity in lymphocytes and whole blood in acute lymphoblastic leukemia patients. Clinica Chimica Acta, 402, 114-118.

Beher D., Hesse L., Masters C.L. et Multhaup G., 1996. Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. Journal of Biological Chemistry, 271, 1613-1620.

Behl P.N. et Captain R.M., 1979. Skin-irritating and sensitizing plants found in India. Ram Nagar, ed., New Delhi: S. Chand & Co. p. 1-186.

Behrens R., 1996. Cashew as an agroforestry crop: prospects and potentials. Margraf Verlag, ed., Weikersheim. p. 1-83.

Bellomo M.G. et Fallico B., 2007. Anthocyanins, chlorophylls and xanthophylls in pistachio nuts (*Pistacia vera*) of different geographic origin. Journal of Food Composition and Analysis, 20, 352-359.

Belyagoubi-Benhammou N., Belyagoubi L., El Zerey-Belaskri A. et Atik-Bekkara F., 2014. *In vitro* antioxidant properties of flavonoid fractions from *Pistacia atlantica* Desf. subsp. *atlantica* fruit using five techniques. Journal of Materials and Environmental Science, 6, 1118-1125.

Ben Salem S., Jabrane A., Harzallah-Skhiri F. et Ben Jannet H., 2013. New bioactive dihydrofuranocoumarins from the roots of the Tunisian *Ferula lutea* (Poir.) Maire. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 23, 4248-4252.

Benabderrahmane M., Benali M., Aouissat H. et Jordan Bueso M.-J., 2009. Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pistacia atlantica* Desf. de l'Algérie. Phytothérapie, 7, 304-308.

Benaradj A., Boucherit H., Bouazza M. et Hasnaoui O., 2015. Ethnobotanique du pistachier de l'atlas (*Pistacia atlantica*) auprès la population de Béchar (Algérie occidentale). Journal of Advanced Research in Science and Technology, 2, 139-146.

Benhammou N., Bekkara F.A. et Panovska T.K., 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2, 22-28.

Benhassaini H., Bendahmane M. et Benchalgo N., 2007. The Chemical Composition Of Fruits Of *Pistacia atlantica* Desf. Subsp. *atlantica* From Algeria. Chemistry of Natural Compounds, 43, 121-124.



Benhssaini H. et Belkhodja M., 2004. Le pistachier de l'Atlas en Algérie entre la survie et disparition. La feuille et l'aiguille, 54, 1-2.

Beniston N.T. et Beniston W.S., 1984. Fleurs d'Algérie. Entreprise Nationale du Livre, ed., Alger. p. 143.

Bergaoui A., Hammami S., Ben Jannet H. et Mighri Z., 2007. Echiofruzine, a novel naringenin diglycoside from *Echiochilon fruticosum* growing in Tunisia. Natural Product Research, 21, 686-691.

Bergmann F., Wilson I.B. et Nachmansohn D., 1950. Acetylcholinesterase. IX. Structural features determining the inhibition by amino acids and related compounds. Journal of Biological Chemistry, 186, 693-703.

Bernardesa N.R., Heggdorne-Araújo M., Borges I.F.J.C., Almeida F.M., Amaral E.P., Lasunskaja E.B. *et al.*, 2014. Nitric oxide production, inhibitory, antioxidant and antimycobacterial activities of the fruits extract and flavonoid content of *Schinus terebinthifolius*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 24, 644-650.

Berr C., Vercambre M.-N. et Akbaraly T.N., 2009. Epidémiologie de la maladie d'Alzheimer: aspects méthodologiques et nouvelles perspectives. Psychologie et Neuropsychiatrie du Vieillessement, 7, 7-14.

Bhourri W., Derbel S., Skandrani I., Boubaker J., Bouhlel I., Sghaier M. *et al.*, 2010. Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia lentiscus* fruits. Toxicology In Vitro, 24, 509-515.

Bhourri W., Skandrani I., Sghair M.B., Franca M.G., Ghedira K. et Ghedira L.C., 2012. Digallic acid from *Pistascia lentiscus* fruits induces apoptosis and enhances antioxidant activities. Phytotherapy Research, 26, 387-391.

Bhullar K.S. et Rupasinghe H.P.V., 2015. Partridgeberry polyphenols protect primary cortical and hippocampal neurons against  $\beta$ -amyloid toxicity. Food Research International, 74, 237-249.

Blanchard B.J., Chen A., Rozeboom L.M., Stafford K.A., Weigele P. et Ingram V.M., 2004. Efficient reversal of Alzheimer's disease fibril formation and elimination of neurotoxicity by a small molecule. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 101, 14326-14332.

Bohle U.-R., Hilger H. et Martin W.F. 1996. Island colonization and evolution of the insular woody habit in *Echium* L. (Boraginaceae). Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 93, 11740-11745.

Bompard J.M. et Schnell R.J., 1998. Taxonomy and systematics. In Litz R.E. The Mango Botany, Production and Uses. CAB International, ed., Wallingford. p. 21-47.

Bon S. et Massoulie J., 1997. Quaternary associations of acetylcholinesterase. I. Oligomeric associations of T subunits with and without the amino-terminal domain of the collagen tail. Journal of Biological Chemistry, 272, 3007-3015.

- Bon S., Rosenberry T.L. et Massoulie J., 1991. Amphiphilic, glycoposphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC)-insensitive monomers and dimers of acetylcholinesterase. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 11, 157-172.
- Bon S., Toutant J.P., Meflah K. et Massoulie J., 1988a. Amphiphilic and nonamphiphilic forms of *Torpedo* cholinesterases: I. Solubility and aggregation properties. *Journal of Neurochemistry*, 51, 776-785.
- Bon S., Toutant J.P., Meflah K. et Massoulie J., 1988b. Amphiphilic and nonamphiphilic forms of *Torpedo* cholinesterases: II. Electrophoretic variants and phosphatidylinositol phospholipase C-sensitive and -insensitive forms. *Journal of Neurochemistry*, 51, 786-794.
- Bond P. et Goldblatt P., 1984. Plants of the Cape Verde flora. A descriptive catalogue. *Journal of South Africa Botany*, 13.
- Boots A.W., Haenen G.R.M.M. et Bast A., 2008. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585, 325-337.
- Borda C., 2006. *Alzheimer's Disease and Memory Drugs*. Chelsea House, ed., New York. p. 20.
- Braak H. et Braak E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 82, 239-259.
- Breen K.C., Bruce M. et Anderton B.H., 1991. Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. *Journal of Neuroscience Research*, 28, 90-100.
- Bremer K., Bremer B. et Thulin M., 1999. Introduction to phylogeny and systematics of flowering plants. Uppsala University, ed., Uppsala. 5<sup>ème</sup> édition. p. 1-99.
- Brenner T., Hamra-Amitay Y., Evron T., Boneva N., Seidman S. et Soreq H., 2003. The role of readthrough acetylcholinesterase in the pathophysiology of myasthenia gravis. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 17, 214-222.
- Brion J.P., Passareiro H., Nunez J. et Flament-Durand J., 1985. Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Archives de Biologie*, 95, 229-235.
- Brochier L., Pontie Y., Willson M., Estrada-Mondaca S., Czaplicki J., Klæbe A. *et al.*, 2001. Involvement of deacylation in activation of substrate hydrolysis by *Drosophila* acetylcholinesterase. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 18296-18302.
- Brown D.A., 2010. Muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in the nervous system: some functions and mechanisms. *Journal of Molecular Neuroscience*, 41, 340-346.
- Brühlmann C., Marston A., Hostettmann K., Carrupt P.-A. et Testa B., 2004. Screening of non-alkaloidal natural compounds as acetylcholinesterase inhibitors. *Chemistry Biodiversity*, 1, 819-829.

Buée L. et Delacourte A., 2002. La maladie d'Alzheimer: une tauopathie parmi d'autres ? *Medecine/Sciences*, 18, 727-736.

Burkill H.M., 1985. Useful plants of West Tropical Africa. Families A-D. Royal Botanic Gardens, ed., Kew, London. Volume 1. p. 1-960.

Busciglio J., Lorenzo A. et Yankner B.A., 1992. Methodological variables in the assessment of beta amyloid neurotoxicity. *Neurobiology of Aging*, 13, 609-612.

Bush A.I., 2003. The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosciences*, 26, 207-214.

Bush A.I., Pettingell W.H. Jr., de Paradis M. et Tanzi R.E., 1994a. Modulation of A beta adhesiveness and secretase site cleavage by zinc. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 12152-12158.

Bush A.I., Pettingell W.H. Jr., de Paradis M., Tanzi R.E. et Wasco W., 1994b. The amyloid beta-protein precursor and its mammalian homologues. Evidence for a zinc-modulated heparin-binding superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 26618-26621.

Butterfield D.A. et Kanski J., 2001. Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122, 945-962.

Calon F., 2004. "Qu'avons-nous à offrir aux patients de la maladie d'Alzheimer?". *Québec Pharmacie*, 51, 13.

Candolle A.P., 1845. Borragineæ. In 'Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis'. Candolle A.P., ed. p. 466-566.

Cao J., Xia X., Chen X., Xiao J. et Wang Q., 2013. Characterization of flavonoids from *Dryopteris erythrosora* and evaluation of their antioxidant, anticancer and acetylcholinesterase inhibition activities. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 242-250.

Cao X. et Sudhof T.C., 2001. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*, 293, 115-120.

Cao J., Zhenga Y., Xia X., Wang Q. et Xiao J., 2015. Total flavonoid contents, antioxidant potential and acetylcholinesterase inhibition activity of the extracts from 15 ferns in China. *Industrial Crops and Products*, x, x-x.

Caputo R., Mangoni L., Monaco P. et Palumbo G., 1979. Triterpenes from the galls of *Pistacia palestina*. *Phytochemistry*, 18, 896-898.

Caramelli P., Chaves M.L.F., Engelhardt E., Machado J.C.B., Schultz R.R., Vale F.A.C. *et al.*, 2004. Effects of galantamine on attention and memory in Alzheimer's disease measured by computerized neuropsychological tests. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 62, 379-384.

- Carvalho J.C.B., dos Santos Almeida H., Lobo J.F.R., Ferreira J.L.P., Oliveira A.P. et Rocha L., 2013. Pyrrolizidine alkaloids in two endemic capeverdian *Echium* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 50, 1-6.
- Castola V., Bighelli A. et Casanova J., 2000. Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28, 79-88.
- Caulfield M.P. et Birdsall N.J., 1998. "International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors." *Pharmacological Reviews*, 50, 279-290.
- Changeux J.P., 1966. Responses of acetylcholinesterase from *Torpedo marmorata* to salts and curarizing drugs. *Molecular Pharmacology*, 2, 369-92.
- Chase M.W., Soltis D.E., Olmstead R.G., Morgan D., Les D.H., Mishler B.D. *et al.*, 1993. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 80, 528-580.
- Chen T.K. et Wiemer D.F., 1984. A volatile leafcutter ant repellent from *Astronium graveolens*. *Naturwissenschaften*, 71, 97-98.
- Chief R., 1914. Les plantes médicinales. Solar, ed., Paris. p. 235.
- Cho M.J.-Y., Sohn M.-J., Lee J. et Kim W.-G., 2010. Isolation and identification of pentagalloylglucose with broad-spectrum antibacterial activity from *Rhus trichocarpa*. *Food Chemistry*, 123, 501-506.
- Choi B.W., Lee H.S., Shin H.-C. et Lee B.H., 2015. Multifunctional Activity of Polyphenolic Compounds Associated with a Potential for Alzheimer's Disease Therapy from *Ecklonia cava*. *Phytotherapy Research*, x, x-x.
- Choi J.S., Islam M.N., Ali M.Y., Kim E.J., Kim Y.M. et Jung H.A., 2014. Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin. *Food and Chemical Toxicology*, 64, 27-33.
- Choudhary M.I., Begum A., Abbaskhan A., Musharraf S.G., Ejaz A. et Atta-ur-Rahman, 2008. Two New Antioxidant Phenylpropanoids from *Lindelofia stylosa*. *Chemistry & Biodiversity*, 5, 2676-2683.
- Christen Y., 2000. Oxidative Stress and Alzheimer Disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 7, 621-629.
- Chryssavgi G., Vassiliki P., Athanasios M., Kibouris T. et Michael K., 2008. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*, 107, 1120-1130.
- Clayden J., Warren S., Greeves N. et Wothers P., 2001. Chimie organique. de Boeck, ed., Paris. p. 388.

- Cohen J.I., 2013. A phylogenetic analysis of morphological and molecular characters of Boraginaceae: evolutionary relationships, taxonomy, and patterns of character evolution. *Cladistics*, 30, 139-169.
- Cojocar M., Droby S., Glotter E., Goldman A., Gottlieb H.E., Jacoby B. *et al.*, 1986. 5-(12-Heptadecenyl)-resorcinol, the major component of the antifungal activity in the peel of mango fruit. *Phytochemistry*, 25, 1093-1095.
- Colegate S.M., Gardner D.R., Davis T.Z., Betz J.M. et Pantera K.E., 2013. Dehydropyrrolizidine Alkaloids in Two *Cryptantha* Species: Including Two New Open Chain Diesters One of Which is Amphoteric. *Phytochemical Analysis*, 24, 201-212.
- Colegate S.M., Gardner D.R., Joy R.J., Betz J.M. et Panter K.E., 2012. Dehydropyrrolizidine Alkaloids, Including Monoesters with an Unusual Esterifying Acid, from Cultivated *Crotalaria juncea* (Sunn Hemp cv. 'Tropic Sun'). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 3541-3550.
- Colegate S.M., Welsh S.L., Gardner D.R., Betz J.M. et Panter K.E., 2014. Profiling of Dehydropyrrolizidine Alkaloids and their *N*-Oxides in Herbarium-Preserved Specimens of *Amsinckia* Species Using HPLC-esi(+)MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 7382-7392.
- Colletier J.-P. et Weik M., 2007. Exploring the conformational energy landscape of acetylcholinesterase by kinetic crystallography. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 65, 108-118.
- Colletier J.-P., Bourgeois D., Sanson B., Fournier D., Sussman J.L., Silman I. *et al.*, 2008. Shoot-and-Trap: Use of specific x-ray damage to study structural protein dynamics by temperature-controlled cryo-crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 11742-11747.
- Conforti F., Sosa S., Marrelli M., Menichini F., Statti G.A., Uzunov D. *et al.*, 2009. The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: The role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. *Food Chemistry*, 112, 587-594.
- Constantinidis T., Harvala C. et Skaltsounis AL., 1993. Pyrrolizidine *N*-oxide alkaloids of *Heliotropium hirsutissimum*. *Phytochemistry*, 32, 1335-1337.
- Cornet M., 2009. *Biologie 5<sup>ème</sup> Manuel: Sciences générales (2 pér./sem.)*. de boek, ed., Bruxelles. p. 21.
- Corso E.A., Campo G., Triglio A., Napoli A., Reggio A. et Lanaia F., 1992. Prevalence of moderate and severe Alzheimer dementia and multi-infarct dementia in the population of southeastern Sicily. *Italian Journal of the Neurological Sciences*, 13, 215-219.
- Corthout J., Pieters L.A., Claeys M., Geerts S., Vanden Berghe D. et Vlietinck A.J., 1994. Antibacterial and molluscicidal phenolic acids from *Spondias mombin*. *Planta Medica*, 60, 460-463.

- Corthout J., Pieters L.A., Claeys M., Vanden Berghe D.A. et Vlietinck A.J., 1991. Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin*. *Phytochemistry*, 30, 1129-1130.
- Corthout J., Pieters L.A., Claeys M., Vanden Berghe D.A. et Vlietinck A.J., 1992. Antiviral caffeoyl esters from *Spondias mombin*. *Phytochemistry*, 31, 1979-1981.
- Cossec J.-C., 2009. Endosomes elargis et cholesterol: de la trisomie 21 à la maladie d'Alzheimer. Thèse doctorat, Université Denis Diderot Paris 7, Paris.
- Craft S., Newcomer J., Kanne S., Dagogo-Jack S., Cryer P., Sheline Y. *et al.*, 1996. Memory improvement following induced hyperinsulinemia in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 17, 123-130.
- Crane J.C. et Iwakiri B.T., 1981. Morphology and reproduction of pistachio. *Horticultural Reviews*, 3, 376-393.
- Crane J.C., 1974. Hermaphroditism in *Pistacia*. *California Agriculture*, 28, 3-4.
- Cronquist A., 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, ed., New York. p. 1-1262.
- Cuello A.C., 2007. Pharmacological Mechanisms in Alzheimer's Therapeutics. Springer Sciences & Business media, ed., New York. p. 2.
- Cullen J., Knees S.G. et Cubey H.S., 2011. The European Garden Flora Flowering Plants. Boraginaceae to compositae. Cambridge University Press, ed., Cambridge. 2<sup>ème</sup> édition. p. 35.
- Cutler N.R. et Sramek J.J., 2001. Review of the next generation of Alzheimer's disease therapeutics: challenges for drug development. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 25, 27-57.
- Damianakos H., Sotiroudis G. et Chinou I., 2013. Pyrrolizidine Alkaloids from *Onosma erecta*. *Journal of Natural Products*, 76, 1829-1835.
- Danis Ö., Yuce-Dursun B., Çimen T., Demir S., Salan Ü., Yalçın G. *et al.*, 2014. Evaluation Of Antioxidant, Radical-Scavenging And Acetylcholinesterase Inhibitory Activities Of Various Culinary Herbs Cultivated In Southern Turkey. *Journal of Food Biochemistry*, 38, 602-611.
- Darboux I., Barthalay Y., Piovant M. et Hipeau Jacquotte R., 1996. The structure–function relationships in *Drosophila* neurotactin show that cholinesterasic domains may have adhesive properties. *European Molecular Biology Organization Journal*, 15, 4835-4843.
- Dartigues J.-F., Berr C., Helmer C. et Letenneur L., 2002. Épidémiologie de la maladie d'Alzheimer. *Medecine/Sciences*, 18, 737-743.
- Darvesh A.S., Carroll R.T. et Bishayee A., 2010. Oxidative stress and Alzheimer's disease: dietary polyphenols as potential therapeutic agents. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 10, 729-745.

Darvesh S., Hopkins D.A. et Geula C., 2003a. Neurobiology of Butyrylcholinesterase. *Neuroscience*, 4, 131-138.

Darvesh S., Hopkins D.A. et Geula C., 2003b. The first demonstration of altered enzymatic properties of cholinesterases associated with plaques and tangles in AD. *Nature Reviews Neuroscience*, 4, 131-138.

Davies P. et Maloney A.J., 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*, 2, 1403.

Davis K.L. et Powchik P., 1995. Tacrine. *Lancet*, 345, 625-630.

de Jong C.F., Derks R.J.E., Bruyneel B., Niessen W. et Irth H., 2006. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry-based acetylcholinesterase assay for the screening of inhibitors in natural extracts. *Journal of Chromatography A*, 1112, 303-310.

de Lima Guimarães L.G., das Graças Cardoso M., Lucas E.M.F., de Freitas M.P., Francisco W. et Nelson D.L., 2015. Structural Elucidation of a New Sesquiterpene Alcohol by Comparative NMR Studies. *Records of Natural Products*, 9, 201-207.

de Sá de Sousa Nogueira T.B., de Sá de Sousa Nogueira R.B., Silva D.A., Tavares J.F., de Oliveira Lima E., de Oliveira Pereira F. *et al.*, 2013. First Chemical Constituents from *Cordia exaltata* Lam and Antimicrobial Activity of Two Neolignans. *Molecules*, 18, 11086-11099.

Delazar A., Reid R.G. et Sarker S.D., 2004. GC-MS Analysis of the essential oil from the oleoresin of *Pistacia atlantica* var. *mutica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 40, 24-27.

DeMattos R.B., Bales K.R., Cummins D.J., Dodart J.C., Paul S.M. et Holtzman D.M., 2001. Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 98, 8850-8855.

Desport J-C. et Cauratier P., 2002. Stress oxidant et maladies neurodégénératives Oxydative stress in neurodegenerative disease. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16, 253-259.

Di Paola-Naranjo R.D., Sánchez-Sánchez J., González-Paramás A.M. et Rivas-Gonzalo J.C., 2004. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of anthocyanin composition of dark blue bee pollen from *Echium plantagineum*. *Journal of Chromatography A*, 1054, 205-210.

Di Vaira M., Bazzicalupi C., Orioli P., Messori L., Bruni B. et Zatta P., 2004. Clioquinol, a drug for Alzheimer's disease specifically interfering with brain metal metabolism: structural characterization of its zinc(II) and copper(II) complexes. *Inorganic Chemistry*, 43, 3795-3797.

Dinamarca M.C., Sagal J.P., Quintanilla R.A., Godoy J.A., Arrázola M.S. et Inestrosa N.C., 2010. Amyloid-beta-Acetylcholinesterase complexes potentiate neurodegenerative changes induced by A beta peptide. Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegenerative*, 5, 4.

Doble A., 1999. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 81, 163-221.

Dominguez X., Soriano M., Loza C.V. et Butruille D., 1974. L'acide masticadienonique de *Pistacia mexicana*. *Phytochemistry Reports*, 13, 656.

Dorehgirae A. et Pourabdollah E., 2015. Comparison of the chemical profile of oil extracted from *Pistacia atlantica* subspecies *cabulica* with *Pistacia atlantica* subspecies *mutica*. *Pakistan Journal of Food Sciences*, 25, 1-6.

dos Santos R.P., Lemos T.L.G., Pessoa O.D.L., Braz-Filho R., Rodrigues-Filho E., Viana F.A. *et al.*, 2005. Chemical Constituents of *Cordia piauhiensis* - Boraginaceae. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16, 662-665.

Dovey H.F., John V., Anderson J.P., Chen L.Z., de Saint Andrieu P., Fang L.Y. *et al.*, 2001. Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *Journal of Neurochemistry*, 76, 173-181.

Dresler S., Kubrak T., Bogucka-Kocka A. et Szymczak G., 2015. Determination of shikonin and rosmarinic acid in *Echium vulgare* (L.) and *Echium russicum* (L.) by capillary electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38, 698-701.

Drewes S.E., Horn M.M. et Mabaso N.J., 1998. *Loxostylis alata* and *Smodingium argutum* - a case of phytochemical bedfellows? *South African Journal of Botany*, 64, 128-129.

Drubin D.G. et Kirschner M.W., 1986. Tau protein function in living cells. *Journal of Cell Biology*, 103, 2739-2746.

Dubovy P. et Haninec P., 1990. Non-specific cholinesterase activity of the developing peripheral nerves and its possible function in cells in intimate contact with growing axons of chick embryo. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 8, 589-602.

Durua M.E., Cakirb A., Kordalic S., Zenginc H., Harmandara M., Izumid S. *et al.*, 2014. Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia*, 74, 170-176.

Duyckaerts C., Delatour B. et Potier M.C., 2009. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathologica*, 118, 5-36.

Edland S.D., Rocca W., Petersen R.C., Cha R.H. et Kokmen E., 2000. The incidence of Alzheimer's disease does not vary by gender in Rochester, MN. *Neurobiology of Aging*, 21, S203.

Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. et Featherstone R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.

El-Shazly A. et M. Wink, 2014. Diversity of Pyrrolizidine Alkaloids in the Boraginaceae Structures, Distribution, and Biological Properties. *Diversity*, 6, 188-282.



- El-Shazly A., Sarg T., Witte L. et Wink M., 1996. Pyrrolizidine alkaloids from *Cynoglossum creticum*. *Phytochemistry*, 42, 1217-1221.
- Engler A., 1897. Anacardiaceae. In Engler A. et Prantl K. Die natürlichen Pflanzenfamilien. W. Engelmann, ed., Leipzig. p. 138-178.
- Erosa-Rejon G.J., Yam-Puc A., Chan-Bacab M.J., Gimenez-Turbax A., Salamanca E., Pena-Rodriguez L.M. *et al.*, 2010. Benzochromenes from the roots of *Bourreria pulchra*. *Phytochemistry Letters*, 3, 9-12.
- Esmat A., Al-Abbasi F.A., Algandaby M.M., Moussa A.Y., Labib R.M., Ayoub N.A. *et al.*, 2012. Anti-Inflammatory Activity of *Pistacia khinjuk* in Different Experimental Models: Isolation and Characterization of Its Flavonoids and Galloylated Sugars. *Journal of Medicinal Food*, 15, 278-287.
- Farlow M., Gracon S.I., Hershey L.A., Lewis K.W., Sadowsky C.H. et Dolan Ureno J., 1992. A controlled trial of tacrine in Alzheimer's disease. The Tacrine Study Group. *Journal of the American Medical Association*, 268, 2523-2529.
- Farlow M.R. et Cummings J.L., 2007. Effective pharmacologic management of Alzheimer's disease. *American Journal of Medicine*, 120, 388-397.
- Fassbender K., Simons M., Bergmann C., Stroick M., Lutjohann D., Keller P. *et al.*, 2001. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 98, 5856-5861.
- Fedoreyev S.A., Inyushkina Y.V., Bulgakov V.P., Veselova M.V., Tchernoded G.K., Gerasimenko A.V. *et al.*, 2012. Production of allantoin, rabsosin and rosmarinic acid in callus cultures of the seacoastal plant *Mertensia maritima* (Boraginaceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 110, 183-188.
- Feldman H. et Gracon S., 1996. Alzheimer's Disease: symptomatic drugs under development. In Gauthier S. *Clinical Diagnosis and Management of Alzheimer's Disease*. Martin Dunitz, ed., London. p. 239-259.
- Feldman H.H., 2007. *Atlas of Alzheimer's Disease*. CRC Press & Taylor & Francis, ed., New York. p. 12-16.
- Feng G., Krejci E., Molgo J., Cunningham J.M., Massoulie J. et Sanes J.R., 1999. Genetic analysis of collagen Q: roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function. *Journal of Cell Biology*, 144, 1349-1360.
- Feng S., Wang Z., He X., Zheng S., Xia Y., Jiang H. *et al.*, 2005. Bis-huperzine B: highly potent and selective acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48, 655-657.
- Fernandez C., Fiandor A., Martineez-Garate A. et Martinez Quesada J., 1995. Allergy to pistachio: crossreactivity between pistachio nut and other Anacardiaceae. *Clinical and Experimental Allergy*, 25, 1254-1259.

Firdous S., Khan K., Zikr-Ur-Rehman S., Ali Z., Soomro S., Ahmad V.U. *et al.*, 2010. Isolation of Phytochemicals from *Cordia rothii* (Boraginaceae) and Evaluation of their Immunomodulatory Properties. *Records of Natural Products*, 8, 51-55.

FNCLCC, 2003. Standards, Options et Recommandations 2000 pour la prise en charge des patients atteints d'un cancer bronchopulmonaire non a petites cellules (rapport abregé). *Bulletin du Cancer*, 90, 151-166.

Forette F., Seux M.L., Staessen J.A., Thijs L., Birkenhäger W.H., Babarskiene M.R. *et al.*, 1998. Prevention of dementia in randomised double-blind placebo-controlled systolic hypertension in Europe (Syst-Eur) trial. *Lancet*, 352, 1347-1351.

Forresta L.M., Boudyguina E., Wilsona M.D. et Parks J.S., 2012. *Echium* oil reduces atherosclerosis in apoB100-only LDLrKO mice. *Atherosclerosis*, 220, 118-121.

Friede R.L., 1995. Enzyme histochemical studies of senile plaques. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 24, 477-491.

Fukui M., Choi H.J. et Zhu B.T., 2010. Mechanism for the protective effect of resveratrol against oxidative stress-induced neuronal death. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 800-813.

Fukuta T., Nitta A., Itoh A., Furukawa S. et Nabeshima T., 2001. Difference in toxicity of beta-amyloid peptide with aging in relation to nerve growth factor content in rat brain. *Journal of Neural Transmission*, 108, 221-230.

Furukawa K., Barger S.W., Blalock E.M. et Mattson M.P., 1996. Activation of K<sup>+</sup> channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature*, 379, 74-78.

Gadek P.A., Fernando E.S., Quinn C.J., Hoot S.B., Terrazas T., Sheahan M.C. *et al.*, 1996. Sapindales: molecular delimitation and infraordinal groups. *American Journal of Botany*, 83, 802-811.

Galvez J., Zarzuelo A., Busson R., Cobbaert C. et deWitte P., 1992. (-)-Epicatechiin-3-galloyl ester: a secretagogue compound from the bark of *Sclerocarya birrea*. *Planta Medica*, 58, 174-175.

Galvez J., Zarzuelo A., Crespo M.E., Utrilla M.P., Jimenez J., Spiessens C. *et al.*, 1991. Antidiarrhoeic activity of *Sclerocarya birrea* bark extract and its active tannin constituent in rats. *Phytotherapy Research*, 5, 276-278.

Gambaro V., Chamy M.C., von Brand E. et Gambarino J.A., 1986. 3-(pentadec-10-enyl)-catechol, a new allergenic compound from *Lithraea caustica* (Anacardiaceae). *Planta Medica*, 44, 20-22.

Gao Y. et Pimplikar S.W., 2000. The gamma-secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 98, 14979-14984.

Gatley S.J., 1991. Activities of the enantiomers of cocaine and some related compounds as substrates and inhibitors of plasma butyrylcholinesterase. *Biochemical Pharmacology*, 41, 1249-1254.

Gaussen H., Leroy J.F. et Ozenda P., 1982. Précis de botanique. Les végétaux supérieurs. Masson, ed., Paris. p. 579.

Gennari K., Brunner J. et Brodbeck U., 1987. Tetrameric detergent-soluble acetylcholinesterase from human caudate nucleus: subunit composition and number of active sites. *Journal of Neurochemistry*, 49, 12-18.

Gentile C., Tesoriere L., Butera D., Fazzari M., Monastero M., Allegra M. *et al.*, 2007. Antioxidant Activity of Sicilian Pistachio (*Pistacia vera* L. Var. Bronte) Nut Extract and Its Bioactive Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 643-648.

Gercheva P., Zhivondov A., Nacheva L. et Avanzato D., 2008. Transsexual forms of pistachio (*Pistacia terebinthus* L.) from Bulgaria - biotechnological approaches for preservation, multiplication and inclusion in selection programs. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 14, 449-453.

Gervais F., Paquette J., Morissette C., Krywkowski P., Yu M., Azzi M. *et al.*, 2007. Targeting soluble A $\beta$  peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis. *Neurobiology of Aging*, 28, 537-547.

Geula C. et Mesulam M.-M., 1989. Special properties of cholinesterases in the cerebral cortex of Alzheimer's disease. *Brain Research*, 498, 185-189.

Geula C. et Mesulam M.-M., 1995. Cholinesterases and the pathology of Alzheimer disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 9, 23-28.

Geula C., Wu C.K., Saroff D., Lorenzo A., Yuan M. et Yankner B.A., 1998. Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Natural Medicines*, 4, 827-831.

Ghaffari S.M., Shabazaz M. et Behboodi B.S., 2003. Chromosome variation in *Pistacia* genus. XIII<sup>ème</sup> réunion de GREMPA sur l'Amandier et le Pistachier. Portugal. Options méditerranéennes, Série A, Séminaires méditerranéens 63.

Ghalem B.R. et Mohamed B., 2009. Essential oil from gum of *Pistacia atlantica* Desf.: Screening of antimicrobial activity. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3, 87-91.

Ghazanfar S.A., 1994. Handbook of Arabian Medicinal Plants. CRC press, INC, ed., USA. p. 52.

Ghisalberti E.L., 2008. Detection and Isolation of Bioactive Natural Products. In Colegate S.M. et Molyneux R.J. Bioactive Natural Products. Detection, Isolation, and Structural Determination. CRC press, ed., Boca Raton. 2<sup>ème</sup> édition. p. 45-48.

Ghiso J. et Frangione B., 2002. Amyloidosis and Alzheimer's disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 1539-1551.

- Ghoreishi S.M. et Bataghva E., 2014. Supercritical extraction of essential oil from *Echium amoenum* seed: Experimental, modeling and genetic algorithm parameter estimation. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 31, 1632-1640.
- Giacobini E., 2000. Cholinesterase inhibitor therapy stabilizes symptoms of Alzheimer disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 14, 3-10.
- Giacobini E., 2004. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacological Research*, 50, 433-440.
- Gibbons S., 2012. An Introduction to Planar Chromatography and Its Application to Natural Products Isolation. In Sarker S.D. et Nahar L. *Natural Products Isolation*. Springer, ed., New York. 3<sup>ème</sup> édition. p. 129.
- Gibbs P.E., 1971. Taxonomic studies on the genus *Echium*. I. An outline revision of the Spanish species. *Lagascalia*, 1, 27-82.
- Gibney G. et Taylor P., 1990. Biosynthesis of *Torpedo* acetylcholinesterase in mammalian cells. Functional expression and mutagenesis of the glycopospholipid-anchored form. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 12576-12583.
- Gillette-Guyonnet S., Lauque S. et Ousset P.-J., 2005. Nutrition et maladie d'Alzheimer. *Psychol. NeuroPsychiatr. Vieillesse*, 3, 35-41.
- Gilman S., Koller M., Black R.S., Jenkins L., Griffith S.G., Fox N.C. *et al.*, 2005. Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in a interrupted trial. *Neurology*, 64, 1553-1562.
- Glimn-Lacy J. et Kaufman P.B., 2006. *Botany Illustrated: Introduction to Plants, Major Groups, Flowering Plant Families*. Springer, ed., New York. 2<sup>ème</sup> édition. p. 1-292.
- Giulian D., 1999. Microglia and the immune pathology of Alzheimer disease. *American Journal of Human Genetics*, 65, 13-18.
- Golan-Goldhirsh A., Barazani O., Wang Z.S., Khadha D.K., Saunders J.A., Kostukovsky V. *et al.*, 2004. Genetic relationships among Mediterranean *Pistacia* species evaluated by RAPD and AFLP markers. *Plant Systematics and Evolution*, 246, 9-18.
- Golde T.E. et Younkin S.G., 2001. Presenilins as therapeutic targets for the treatment of Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine*, 7, 264-269.
- Gomathia R. et Maniana S., 2015. Analgesic and acetylcholinesterase inhibition potential of polyphenols from *Scolopia crenata* (Flacourtiaceae): An endemic medicinalplant of India. *Industrial Crops and Products*, 73, 134-143.
- Gorelick P.B., Nyenhuis D.L., Garron D.C. et Cochran E., 1996. Is vascular dementia really Alzheimer's disease or mixed dementia? *Neuroepidemiology*, 15, 286-290.
- Gottfries C.G., 1994. Therapy options in Alzheimer's disease. *British Journal of Clinical Practice*, 48, 327-330.

Gouras G.K. et Beal M.F., 2001. Metal Chelator Decreases Alzheimer  $\beta$ -amyloid Plaques. *Neuron*, 30, 641-647.

Gotti C., Fornasari D. et Clementi F., 1997. Human neuronal nicotinic receptors. *Progress in Neurobiology*, 53, 199-237.

Gourine N., Yousfi M., Bombarda I., Nadjemi B. et Gaydou E., 2010a. Seasonal Variation of Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil from *Pistacia atlantica* Desf. Leaves. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 87, 157-166.

Gourine N., Yousfi M., Bombarda I., Nadjemi B., Stocker P. et Gaydou E.M., 2010b. Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlantica* from Algeria. *Industrial Crops and Products*, 31, 203-208.

Gowing E., Roher A.E., Woods A.S., Cotter R.J., Chaney M., Little S.P. *et al.*, 1994. Chemical characterization of A beta 17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 10987-10990.

Gradman T.J., Laws A., Thompson L.W. et Reaven G.M., 1993. Verbal learning and/or memory improves with glycemic control in older subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of the American Geriatrics Society*, 41, 1305-1312.

Graves A.B., Larson E.B., Edland S.D., Bowen J.D., McCormick W.C., McCurry S.M. *et al.*, 1996. Prevalence of dementia and its subtypes in the Japanese American population of King County, Washington state. The Kame Project. *American Journal of Epidemiology*, 144, 760-771.

Green B.T., Welch K.D., Panter K.E. et Lee S.T., 2013. Plant toxins that affect nicotinic acetylcholine receptors: a review. *Chemical Research in Toxicology*, 26, 1129-1238.

Greig N.H., De Micheli E., Holloway H.W., Yu Q.-S., Utsuki T., Perry T.A. *et al.*, 2000. The experimental Alzheimer drug pheneserine: preclinical pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Acta Neurologica Scandinavica*, 176, 74-84.

Griffin C.T., Gosetto F., Danaher M., Sabatini S. et Furey A., 2014. Investigation of targeted pyrrolizidine alkaloids in traditional Chinese medicines and selected herbal teas sourced in Ireland using LC-ESI-MS/MS. *Food Additives & Contaminants*, 31, 940-961.

Grifman M., Galyam N., Seidman S. et Soreq H., 1998. Functional redundancy of acetylcholinesterase and neuregulin in mammalian neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 95, 13935-13940.

Grisaru D., Deutsch V., Shapira M., Pick M., Sternfeld M., Melamed-Book N. *et al.*, 2001. ARP, a peptide derived from the stress-associated acetylcholinesterase variant, has hematopoietic growth promoting activities. *Molecular Medicine*, 7, 93-105.

Grisaru D., Lev-Lehman E., Shapira M., Chaikin E., Lessing J.B., Eldor A. *et al.*, 1999. Human osteogenesis involves differentiation-dependent increases in the morphogenetically active 3' alternative splicing variant of acetylcholinesterase. *Molecular and Cell Biology*, 19, 788-795.

- Gross M., Baer H. et Fales H.M., 1975. Urushiols of poisonous Anacardiaceae. *Phytochemistry*, 14, 2263-2266.
- Grossberg G.T., Edwards K.R. et Zhao Q., 2006. Rationale for combination therapy with galantamine and memantine in Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Pharmacology*, 46, 17-26.
- Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y.C., Quinlan M., Wisniewski H.M. et Binder L.I., 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 83, 4913-4917.
- Grundman M., 2000. Vitamin E and Alzheimer disease: the basis for additional clinical trials. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 630-636.
- Grundwag M. et Werker W., 1976. Comparative wood anatomy as an aid to identification of *Pistacia* L. species. *Israel Journal of Botany*, 25, 152-167.
- Guilarte T.R., Burns H.D., Dannals R.F. et Wagner Jr. H.N., 1983. A simple radiometric *in vitro* assay for acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72, 90-91.
- Guilbault G.G. et Kramer D.N., 1965. Resorufin butyrate and indoxyl acetate as fluorogenic substrates for cholinesterase. *Analytical Chemistry*, 37, 120-123.
- Guilet D., Guntern A., Ioset J.-R., Queiroz E.F., Ndjoko K., Foggin C.M. *et al.*, 2003. Absolute Configuration of a Tetrahydrophenanthrene from *Heliotropium ovalifolium* by LC-NMR of Its Mosher Esters. *Journal of Natural Products*, 66, 17-20.
- Guillozet A.L., Smiley J.F., Mash D.C. et Mesulam M.-M., 1997. Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Annals of Neurology*, 42, 909-918.
- Gundersen A., 1950. Families of dicotyledons. MA: Chronica Botanica Company, ed., Waltham. p. 1-237.
- Gunstad J., Paul R.H., Cohen R.A., Tate D.F. et Gordon E., 2006. Obesity is associated with memory deficits in young and middle-aged adults. *Eating and Weight Disorders*, 11, 15-19.
- Gunterna A., Ioseta J.-R., Queiroza E.F., Fogginb C.M. et Hostettmanna K., 2008. Quinones from *Heliotropium ovalifolium*. *Phytochemistry*, 58, 631-635.
- Gürke M., 1893. Boraginaceae (Asperifoliaceae). In Engler A. et Prantl K. *Die natürlichen Pflanzenfamilien*. W. Engelmann, ed., Leipzig. p. 71-131.
- Haass C., Schlossmacher M.G., Hung A.Y., Vigo-Pelfrey C., Mellon A., Ostaszewski B.L. *et al.*, 1992. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 359, 322-325.
- Hadd A.G., Jacobson S.C. et Ramsey J.M., 1999. Microfluidic assays of acetylcholinesterase inhibitors. *Analytical Chemistry*, 71, 5206-5212.

Halim H., Locksley H.D. et Memon J.J., 1980. Vesicant principles of poison ivy and related plants: synthesis of the urushiols, 1,2-dihydroxy-3-((Z)-pentadec-8-enyl)benzene and 1,2-dihydroxy-3-pentadecylbenzene. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 1, 2331-2337.

Hall J.B., O'Brien E.M. et Sinclair F.L., 2002. *Sclerocarya birrea*: a monograph. School of Agricultural and Forest Sciences Publication Number 19, University of Wales, ed., Bangor. p. 1-157.

Hall Z.W., 1973. Multiple forms of acetylcholinesterase and their distribution in endplate and non-endplate regions of rat diaphragm muscle. *Journal of Neurobiology*, 4, 343-361.

Hamdan I.I. et Afifi F.U., 2004. Studies on the *in vitro* and *in vivo* hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 117-121.

Hammami R., Zouhir A., Ben Hamida J., Neffati M., Vergoten G., Naghmouchi K. *et al.*, 2009. Antimicrobial properties of aqueous extracts from three medicinal plants growing wild in arid regions of Tunisia. *Pharmaceutical Biology*, 47, 452-457.

Hammond P.S. et Forster J.S., 1989. A microassay-based procedure for measuring low levels of toxic organophosphorus compounds through acetylcholinesterase inhibition. *Analytical Biochemistry*, 180, 380-383.

Hansen L.A. et Crain B.J., 1995. Making the diagnosis of mixed and non-Alzheimer's dementias. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 119, 1023-1031.

Harel M., Quinn D.M., Nair H.K., Silman I. et Sussman J.L., 1996. The X-ray Structure of a Transition State Analog Complex Reveals the Molecular Origins of the Catalytic Power and Substrate Specificity of Acetylcholinesterase. *Journal of the American Chemical Society*, 118, 2340-2346.

Harel M., Schalk I., Ehret-Sabatier L., Bouet F., Goeldner M., Hirth C. *et al.*, 1993. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 90, 9031-9035.

Harel M., Sussman J.L., Krejci E., Bon S., Chanal P., Massoulie J. *et al.*, 1992. Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 89, 10827-10831.

Hassing L.B., Johansson B., Nilsson S.E., Berg S., Pedersen N.L., Gatz M. *et al.*, 2002. Diabetes mellitus is a risk factor for vascular dementia, but not for Alzheimer's disease: a population-based study of the oldest old. *International Psychogeriatrics*, 14, 239-248.

Hatamnia A.A., Abbaspour N. et Darvishzadeh R., 2015. Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *kurdica*) fruits. *Food Chemistry*, 145, 306-311.

- Hebert R., Lindsay J., Verreault R., Rockwood K., Hill G. et Dubois M.F., 2000. Vascular dementia: incidence and risk factors in the Canadian study of health and aging. *Stroke*, 31, 1487-1493.
- Hébuterne X., Alix E., Raynaud-Simon A. et Vellas B., 2009. *Traité de nutrition de la personne âgée*. Springer, ed., Paris. p. 190.
- Heidari M.R., Azada E.M. et Mehrabani M., 2006. Evaluation of the analgesic effect of *Echium amoenum* Fisch & C.A. Mey. extract in mice: Possible mechanism involved. *Journal of Ethnopharmacology*, 103, 345-349.
- Hensley K., Carney J.M., Mattson M.P., Aksenova M., Harris M., Wu J.F. *et al.*, 1994. A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 91, 3270-3274.
- Herrmann M., Joppe H. et Schmaus G., 2002. Thesinine-40-O- $\beta$ -d-glucoside the first glycosylated plant pyrrolizidine alkaloid from *Borago officinalis*. *Phytochemistry*, 60, 399-402.
- Heywood V.H., Brummitt R.K., Culham A. et Seberg O., 2007. *Flowering plant families of the World*. Richmond Hill, ed., Ontario, Canada: Firefly Books. p. 51-409.
- Higgins L.S., Murphy G.M. Jr., Forno L.S., Catalano R. et Cordell B., 1996. P3 beta-amyloid peptide has a unique and potentially pathogenic immunohistochemical profile in Alzheimer's disease brain. *American Journal of Pathology*, 149, 585-596.
- Hilger H. et Bohle U., 2000. *Pontechium*: a newgenus distinct from *Echium* and *Lobostemon* (Boraginaceae). *Taxon*, 49, 737-746.
- Hill G.A., Mattacotti V. et Graham W.D., 1934. The toxic principle of the poison ivy. *Journal of the American Chemical Society*, 56, 2736-2738.
- Hiroi, T., Takahashi T. et Imamura H., 1966. Wood extractives. XV. Constituents of *Pistacia chinensis* Wood. *Nippon Mokuzai Gakkaishi*, 12, 324-326.
- Holmes S., 1993. Food avoidance in patients undergoing cancer chemotherapy. *Support Care Cancer*, 1, 326-330.
- Hormaza J.I. et Wunsch A., 2011. *Pistacia*. In Kole C. *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources Temperate Fruits*. Springer-Verlag, ed., Berlin. p. 119-128.
- Hosseini F., Adlgostar A. et Sharifnia F., 2013. Antibacterial Activity of *Pistacia atlantica* extracts on *Streptococcus mutans* biofilm International. *Research Journal of Biological Sciences*, 2, 1-7.
- Hostettmann K., Marston M. et Hostettmann M., 1998. *Preparative Chromatography Techniques-Applications in Natural Product Isolation*. Springer Verlag, ed., Berlin. 2<sup>ème</sup> édition. p. 1-242.



- Hou D., 1978. Anacardiaceae. Flora Malesiana I, 8, 395-548.
- Houghton P.J., Ren Y. et Howes M.J., 2006. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. Natural Products Reports, 23, 181-199.
- Howard A.S., Bucelli R., Jett D.A., Bruun D., Yang D. et Lein P.J., 2005. Chlorpyrifos exerts opposing effects on axonal and dendritic growth in primary neuronal cultures. Toxicology and Applied Pharmacology, 207, 112-124.
- Hu L., Jiang G., Xu S., Pan C. et Zou H., 2006. Monitoring enzyme reaction and screening enzyme inhibitor based on MALDI-TOF-MS platform with a matrix of oxidized carbon nanotubes. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 17, 1616-1619.
- Hulme E.C. et Birdsall N.J., 1990. "Muscarinic receptor subtypes." Annual Review of Pharmacology & Toxicology, 30, 633-673.
- Hutter-Paier B., Huttunen H.J., Puglielli L., Eckman C.B., Kim D.Y., Hofmeister A. *et al.*, 2004. The ACAT inhibitor CP-113,818 markedly reduces amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. Neuron, 44, 227-238.
- Ihara Y., Nukina N., Miura R. et Ogawara M., 1986. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. Journal of Biochemistry, 99, 1807-1810.
- Inbar M., 2008. Systematics of *Pistacia*: Insights from specialist parasitic aphids. Taxon, 57, 238-242.
- Inestrosa N.C., Roberts W.L., Marshall T.L. et Rosenberry TL., 1987. Acetylcholinesterase from bovine caudate nucleus is attached to membranes by a novel subunit distinct from those of acetylcholinesterases in other tissues. Journal of Biological Chemistry, 262, 4441-4444.
- Ingkaninan K., de Best C.M., van der Heijden R., Hofte A.J.P., Karabatak B., Irth H. *et al.*, 2000. High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products. Journal of Chromatography A, 872, 61-73.
- Ingkaninan K., Temkitthawon P., Chuenchom K., Yuyaem T. et Thongnoi W., 2003. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. Journal of Ethnopharmacology, 89, 261-264.
- Inouye H., Matsumura H., Kawasaki M., Inoue K., Tsukada M. et Tabata M., 1981. Two quinones from callus cultures of *Echium lycopsis*. Phytochemistry, 20, 1701-1705.
- Inui A., 2002. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. CA Cancer Journal for Clinicians, 52, 72-91.
- Iqbal K., Alonso Adel C., El-Akkad E., Gong C.X., Haque N., Khatoon S. *et al.*, 2003. Alzheimer neurofibrillary degeneration: therapeutic targets and high-throughput assays. Journal of Molecular Neurobiology, 20, 425-429.

Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Zaidi T., Merz P.A., Wen G.Y., Shaikh S.S. *et al.*, 1986. Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease. *Lancet*, 2, 421-426.

Itzhaki R.F., Lin W.R., Shang D., Wilcock G.K., Faragher B. et Jamieson G.A., 1997. Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet*, 349, 341-344.

Iversen L.L., Mortishire-Smith R.J., Pollack S.J. et Shearman M.S., 1995. The toxicity in vitro of beta-amyloid protein. *Biochemistry Journal*, 311, 1-16.

Iwatsubo T., Odaka A., Suzuki N., Mizusawa H., Nukina N. et Ihara Y., 1994. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*, 13, 45-53.

Jansen A., de Raadt J.L., van Toorenenbergen A.W. et van Wijk R.G., 1992. Allergy to pistachio nuts. *Allergy Proceedings*, 13, 255-258.

Jazayeri S.B., Amanlou A., Ghanadian N., Pasalar P. et Amanlou M., 2014. A preliminary investigation of anticholinesterase activity of some Iranian medicinal plants commonly used in traditional medicine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22, 17.

Jeremic B., Milicic B., Dagovic A., Aleksandrovic J. et Nikolic N., 2003. Pretreatment clinical prognostic factors in patients with stage IV non-small-cell lung cancer (NSCLC) treated with chemotherapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 109, 114-22.

Jiang W.-W., Liu F., Gao X., He J., Cheng X., Peng L.-Y. *et al.*, 2014. Huperserines A-E, *Lycopodium* alkaloids from *Huperzia serrata*. *Fitoterapia*, 99, 72-77.

Jick H., Zornberg G.L., Jick S.S., Seshadri S. et Drachman D.A., 2000. Statins and the risk of dementia. *Lancet*, 356, 1627-1631.

Jin L.W., Ninomiya H., Roch J.M., Schubert D., Masliah E., Otero D.A. *et al.*, 1994. Peptides containing the RERMS sequence of amyloid beta/A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension. *Journal of Neuroscience*, 14, 5461-5470.

Johnson I., 1999. Antioxydants et anticancéreux. *Biofutur*, 186, 14-17.

Johnson R., Baer H., Kirkpatrick C., Dawson C. et Khurana R., 1972. Comparison of the contact allergenicity of the four pentadecylcatechols derived from poison ivy urushiol in humans. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 49, 27-35.

Johnston I.M., 1953. Studies in the Boraginaceae XXV. A revaluation of some genera of the Lithospermeae. *Journal of the Arnold Arboretum*, 34, 258-299.

Kadokura K., Suruga K., Tomita T., Hiruma W., Yamada M., Kobayashi A. *et al.*, 2015. Novel urushiols with human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitory activity from the leaves of *Rhus verniciflua*. *Journal of Natural Medicines*, 69, 148-153.

Kafkas S. et Perl-Treves R., 2001. Morphological and molecular phylogeny of *Pistacia* species in Turkey. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 908-915.

Kafkas S. et Perl-Treves R., 2002. Interspecific relationships in *Pistacia* based on RAPD fingerprinting. *HortScience*, 37, 168-171.

Kafkas S., 2006. Phylogenetic analysis of the genus *Pistacia* by AFLP markers. *Plant Systematics and Evolution*, 262, 113-124.

Kafkas S., Kaska N., Perl-Treves R., Gucluturk H., Karaca S. et Cetiner M.S., 2001. Monoecious *P. atlantica* trees in the Yunt Montains of Manisa province of Turkey. 11ème colloque du GREMPA sur le pistachier et l'amandier Zaragoza. *Cahiers options Méditerranéennes*, 56, 416.

Kafkas S., Kaska N., Wassimi A.N. et Padulosi S., 2006. Molecular characterisation of Afghan pistachio accessions by amplified fragment length polymorphisms (AFLPs). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 81, 864-868.

Kafkas S., Perl-Treves R. et Kaska N., 2000. Unusual *Pistacia atlantica* Desf. (Anacardiaceae) monoecious sex type in the Yunt Mountains of the Manisa Province of Turkey. *Israel Journal of Plant Sciences*, 48, 277-280.

Kamino K., Orr H.T., Payami H., Wijsman E.M., Alonso M.E., Pulst S.M. *et al.*, 1992. Linkage and mutational analysis of familial Alzheimer disease kindreds for the APP gene region. *American Journal of Human Genetics*, 51, 998-1014.

Kamo T., Imura Y., Hagio T., Makabe H., Shibata H. et Hirota M., 2004. Anti-inflammatory cyathane diterpenoids from *Sarcodon scabrosus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 68, 1362-1365.

Kasabri V., Abu-Dahab R., Afifi F.U., Naffa R. et Majdalawi L., 2012. Modulation of pancreatic MIN6 insulin secretion and proliferation, and extrapancreatic glucose absorption with *Achillea santolina*, *Eryngium creticum* and *Pistacia atlantica* extracts: *in vitro* evaluation. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, 2, 245-254.

Kasabri V., Afifi F.U. et Hamdan I., 2011. In vitro and in vivo acute antihyperglycemic effects of five selected indigenous plants from Jordan used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 888-896.

Katona G., Berglund G.I., Hajdu J., Graf L. et Szilagyi L., 2002. Crystal structure reveals basis for the inhibitor resistance of human brain trypsin. *Journal of Molecular Biology*, 315, 1209-1218.

Katsiotis A., Hagidimitriou M., Drossou A., Pontikis C. et Loukas M., 2003. Genetic relationships among species and cultivars of *Pistacia* using RAPDs and AFLPs. *Euphytica*, 132, 279-286.

Kavak D.D., Altioek E., Bayraktar O. et Ulku S., 2010. *Pistacia terebinthus* extract: As a potential antioxidant, antimicrobial and possible beta-glucuronidase inhibitor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64, 167-171.

- Kawas C., Resnick S., Morrison A., Brookmeyer R., Corrada M., Zonderman A. *et al.*, 1997. A prospective study of estrogen replacement therapy and the risk of developing Alzheimer's disease: the Baltimore longitudinal study of aging. *Neurology*, 48, 1517-1521.
- Kawashty S.A., Mosharrafa S.A.M., El-Gibali M. et Saleh N.A.M., 2000. The flavonoids of four *Pistacia* species in Egypt. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28, 915-917.
- Keck S., Nitsch R., Grune T. et Ullrich O., 2003. Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 85, 115-122.
- Kelly E.B., 2008. *Genes & Disease. Alzheimer's Disease*. Infobase Publishing, ed., New York. p. 54.
- Kesavapany S., Banner S.J., Lau K.F., Shaw C.E., Miller C.C., Cooper J.D. *et al.*, 2002. Expression of the Fe65 adapter protein in adult and developing mouse brain. *Neuroscience*, 115, 951-960.
- Khan I., Nisar M., Khan N., Saeed M., Nadeem S., Fazal-ur-Rehman *et al.*, 2010. Structural insights to investigate Conyopodioid as a dual cholinesterase inhibitor from *Asparagus adscendens*. *Fitoterapia*, 81, 1020-1025.
- Khaw K.Y., Choi S.B., Tan S.C., Waha H.A., Chan K.L. et Murugaiyaha V., 2014. Prenylated xanthenes from mangosteen as promising cholinesterase inhibitors and their molecular docking studies. *Phytomedicine*, 21, 1303-1309.
- Kiely J.S., Moos W.H., Pavia M.R., Schwarz R.D. et Woodard G.L., 1991. A silica gel plate-based qualitative assay for acetylcholinesterase activity: a mass method to screen for potential inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 196, 439-442.
- Kim D.K., Lee K.T., Baek N.-I., Kim S.-H., Park H.W., Lim J.P. *et al.*, 2004. Acetylcholinesterase inhibitors from the aerial parts of *Corydalis speciosa*. *Archives of Pharmacal Research*, 27, 1127-1131.
- Kim D.-O., Chun O.K., Kim Y.J., Moon H.-Y. et Lee C.Y., 2003. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6509-6515.
- Kim K.H., Moon E., Choi S.U., Pang C., Kim S.Y. et Lee K.R., 2015. Identification of cytotoxic and anti-inflammatory constituents from the bark of *Toxicodendron vernicifluum* (Stokes) F.A. Barkley. *Journal of Ethnopharmacology*, x, x-x.
- Kindervater R., Künnecke W. et Schmid R.D., 1990. Exchangeable immobilized enzyme reactor for enzyme inhibition tests in flow-injection analysis using a magnetic device. Determination of pesticides in drinking water. *Analytica Chimica Acta*, 234, 113-117.
- Kinoshita A., Whelan C.M., Smith C.J., Berezovska O. et Hyman B.T., 2002. Direct visualization of the gamma secretase-generated carboxyl-terminal domain of the amyloid precursor protein: association with Fe65 and translocation to the nucleus. *Journal of Neurochemistry*, 82, 839-847.

- Klafki H.W., Staufenbiel M., Kornhuber J. et Wiltfang J., 2006. "Therapeutic approaches to Alzheimer's disease". *Brain*, 129, 2840-2855.
- Kokwaro J.O. et Gillett J.B., 1980. Notes on the Anacardiaceae of Eastern Africa. *Kew Bulletin*, 34, 745-760.
- Kosik K.S., Bakalis S.F., Selkoe D.J., Pierce M.W. et Duffy L.K., 1986. High molecular weight microtubule-associated proteins: purification by electro-elution and amino acid compositions. *Journal of Neuroscience Research*, 15, 543-551.
- Koutnik D., 1985. Lectotypification in the genus *Lobostemon* (Boraginaceae). *Taxon*, 34, 525-528.
- Kubo I., Ochi M., Vieira P.C. et Komatsu S., 1993. Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1012-1015.
- Kuo Y.M., Emmerling M.R., Bisgaier C.L., Essenburg A.D., Lampert H.C., Drumm D. *et al.*, 1998. Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain A $\beta$  1-42 levels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 252, 711-715.
- Kuruuzum-Uz A., Guvenalp Z., Stroch K., Demirezer L.O. et Zeeck A., 2004. Phytochemical and antimicrobial investigation of *Echium vulgare* growing in Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 833-836.
- Lalowski M., Golabek A., Lemere C.A., Selkoe D.J., Wisniewski H.M., Beavis R.C. *et al.*, 1996. The "nonamyloidogenic" p3 fragment (amyloid beta17-42) is a major constituent of Down's syndrome cerebellar preamyloid. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 33623-33631.
- Lam C.W., Wakeman A., James A., Ata A., Gengan R.M. et Ross S.A., 2015. Bioactive steroidal alkaloids from *Buxus macowanii* Oliv. *Steroids*, 95, 73-79.
- Lambert J.C., Heath S., Even G., Champion D., Sleegers K., Hiltunen M. *et al.*, 2009. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 41, 1094-1099.
- Lambert J.C. et Amouyel P., 2007. Genetic heterogeneity of Alzheimer's disease: complexity and advances. *Psychoneuroendocrinology*, 32, 62-70.
- Langstrom E. et Chase M.W., 2002. Tribes of Boraginoideae (Boraginaceae) and placement of *Antiphytum*, *Echiochilon*, *Ogastemma* and *Sericostoma*: a phylogenetic analysis based on atpB plastid DNA sequence data. *Plant Systematics and Evolution*, 234, 137-153.
- Laumonnier F., Bonnet-Brilhaut F., Gomot M., Blanc R., David A., Moizard M.P. *et al.*, 2004. X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *American Journal of Human Genetics*, 47, 552-557.
- Launer L.J., Ross G.W., Petrovitch H., Masaki K., Foley D., White L.R. *et al.*, 2000. Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu-Asia aging study. *Neurobiology of Aging*, 21, 49-55.

- Layer P.G., 1991. Cholinesterases during development of the avian nervous system. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 11, 7-33.
- Lee J.-H., Kim M., Chang K.-H., Hong C.Y., Na C.-S., Dong M.-S. *et al.*, 2014. Antiplatelet Effects of *Rhus verniciflua* Stokes Heartwood and Its Active Constituents—Fisetin, Butein, and Sulfuretin—in Rats. *Journal of Medicinal Food*, 18, 1-10.
- Lehmann J.G.C., 1830. Plantas quasdam novas in horto hamburgensuim botanico cultas. *Linnaea*, 5, 371-387.
- Lejeune A. et Maury-Rouan C., 2007. Résilience, vieillissement et maladie d'Alzheimer. SOLAL, ed., Marseille. p. 23.
- Leone P., Comoletti D., Taylor P., Bourne Y. et Marchot P., 2010. Structure-function relationships of the alpha/beta-hydrolase fold domain of neuroligin: a comparison with acetylcholinesterase. *Chemico-Biological Interactions*, 187, 49-55.
- Leon-Gonzalez M.E. et Townshend A., 1991. Determination of organophosphorus and carbamate pesticide standards by liquid chromatography with detection by inhibition of immobilized acetylcholinesterase. *Journal of Chromatography A*, 539, 47-54.
- Lesser G., Kandiah K., Libow L.S., Likourezos A., Breuer B., Marin D. *et al.*, 2001. Elevated serum total and LDL cholesterol in very old patients with Alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 12, 138-145.
- Letenneur L., Commenges D., Dartigues J.F. et Barberger-Gateau P., 1994. Incidence of dementia and Alzheimer's disease in elderly community residents of south-western France. *International Journal of Epidemiology*, 23, 1256-1261.
- Letenneur L., Gilleron V., Commenges D., Helmer C., Orgogozo J.M. et Dartigues J.F., 1999. Are sex and educational level independent predictors of dementia and Alzheimer's disease? Incidence data from the PAQUID project. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 66, 177-183.
- Letthimaki T., Pirtilla T., Mehta P.D., Wisniewski H.M., Frey H. et Nikkari T., 1995. Apolipoprotein E (ApoE) polymorphism and its influence on ApoE concentrations in the cerebrospinal fluid in Finish patients with Alzheimer's disease. *Human Genetics*, 95, 39-42.
- Lev E. et Amar Z., 2002. Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in the Kingdom of Jordan. *Journal of Ethnopharmacology*, 82, 131-145.
- Lev-Lehman E., Deutsch V., Eldor A. et Soreq H., 1997. Immature human megakaryocytes produce nuclear-associated acetylcholinesterase. *Blood*, 89, 3644-3653.
- Levyns M.R., 1934. A revision of *Lobostemon* Lehm. and a discussion of the species problem. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 49, 393-451.
- Li B., Stribley J.A., Ticu A., Xie W., Schopfer L.M., Hammond P. *et al.*, 2000. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *Journal of Neurochemistry*, 75, 1320-1331.

Li J.L., Huang L., Liu J., Song Y., Gao J., Jung J.H. *et al.*, 2015. Acetylcholinesterase inhibitory dimeric indole derivatives from the marine actinomycetes. *Rubrobacter radiotolerans*. *Fitoterapia*, 102, 203-207.

Li W., Cai C.-H., Dong W.-H., Guo Z.-K., Wang H., Mei W.-L. *et al.*, 2014. 2-(2-Phenylethyl)chromone derivatives from Chinese agarwood induced by artificial holing. *Fitoterapia*, 98, 117-123.

Liang X.-T. *et Fang* W.-S., 2006. *Medicinal Chemistry of Bioactive Natural Products*. John Wiley and Sons, ed., New York. p. 143-173.

Liang Y.Q. *et X.C.*, 2004. Tang, Comparative effects of huperzine A, donepezil and rivastigmine on cortical acetylcholine level and acetylcholinesterase activity in rats. *Neuroscience Letters*, 361, 56-59.

Lim G.P., Yang F., Chu T., Chen P., Beech W., Teter B. *et al.*, 2000. Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *Journal of Neurosciences*, 20, 5709-5714.

Lin T.S., Crane J.C., Ryugo K., Polito V.S. *et DeJong* T.M., 1984. Comparative study of leaf morphology, photosynthesis and leaf conductance in selected *Pistacia* species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 109, 325-330.

Lin X., Koelsch G., Wu S., Downs D., Dashti A. *et Tang* J., 2000. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 97, 1456-1460.

Lipton S.A., 2006. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. *Nature Review Drug Discovery*, 5, 160-170.

Litz R.E., 2005. *Biotechnology in Agriculture No. 29. Biotechnology of Fruit and Nut Crops*. CABI, ed., Oxfordshire. p. 29.

Liu J.J., Geng C.A. *et Liu* X.K., 2008. A new pyrrolidone derivative from *Pistacia chinensis*. *Chinese Chemical Letters*, 19, 65-67.

Liu W., Yang Y., Cheng X., Gong C., Li S., He D. *et al.*, 2014. Rapid and sensitive detection of the inhibitive activities of acetyl- and butyryl-cholinesterases inhibitors by UPLC-ESI-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 94, 215-220.

Lockridge O. *et Masson* P., 2000. Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. *Neurotoxicology*, 21, 113-126.

Lockridge O., Mottershaw-Jackson N., Eckerson H.W. *et La Du* B.N., 1980. Hydrolysis of diacetylmorphine (heroin) by human serum cholinesterase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 215, 1-8.

Loev B., 1952. *The active constituents of poison ivy and related plants. Structure and synthesis*. Thèse de doctorat, Columbia University, New York.

Logie C.G., Grue M.R. et Liddell J.R., 1994. Proton nmr spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry*, 37, 43-109.

Longo L., Scardino A. et Vasapollo G., 2007. Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 360-364.

López-Lázaro M., 2009. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 9, 31-59.

Lovell M.A., Robertson J.D., Teesdale W.J., Campbell J.L. et Markesbery W.R., 1998. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *Journal of Neurological Sciences*, 158, 47-52.

Luo Y., Bolon B., Kahn S., Bennett B.D., Babu-Khan S., Denis P. *et al.*, 2001. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nature Neurosciences*, 4, 231-232.

Foddai M., Kasabri V., Afifi F.U., Azara E., Petretto G.L. et Pintore G., 2015. *In vitro* inhibitory effects of Sardinian *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia terebinthus* L. on metabolic enzymes: Pancreatic lipase,  $\alpha$ -amylase, and  $\alpha$ -glucosidase. *Starch/Stärke*, 67, 204-212.

Ma Q., Wan Q., Huang S., Dai H., Wu Y., Zhou J. *et al.*, 2015. Phenolic Constituents With Inhibitory Activities On Acetylcholinesterase From The Rhizomes Of *Gastrodia elata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 51, 158-160.

Malchiodi-Albedi F., Domenici M.R., Paradisi S., Bernardo A., Ajmone-Cat M.A. et Minghetti L., 2001. Astrocytes contribute to neuronal impairment in beta A toxicity increasing apoptosis in rat hippocampal neurons. *Glia*, 34, 68-72.

Mallender W.D., Szegletes T. et Rosenberry T.L., 2000. Acetylthiocholine binds to asp74 at the peripheral site of human acetylcholinesterase as the first step in the catalytic pathway. *Biochemistry*, 39, 7753-7763.

Mandić B.M., Simić M.R., Vučković I.M., Vujisić L.V., Novaković M.M., Trifunović S.S. *et al.*, 2013. Pyrrolizidine Alkaloids and Fatty Acids from the Endemic Plant Species *Rindera umbellata* and the Effect of Lindelofine-*N*-oxide on Tubulin Polymerization. *Molecules*, 18, 10694-10706.

Mantyh P.W., Ghilardi J.R., Rogers S., DeMaster E., Allen C.J., Stimson E.R. *et al.*, 1993. Aluminum, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of beta-amyloid peptide. *Journal of Neurochemistry*, 61, 1171-1174.

Marinou K.A., Georgopoulou K., Agrogiannis G., Karatzas T., Iliopoulos D., Papalois A. *et al.*, 2010. Differential effect of *Pistacia vera* extracts on experimental atherosclerosis in the rabbit animal model: an experimental study. *Lipids in Health and Disease*, 73, 1-9.

Markowski W. et Waksmundzka-Hajnos M., 2011. Photodiode Array (PDA) and Other Detection Methods in HPLC of Plant Metabolites. In Waksmundzka-Hajnos M. et Sherma J.



High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. CRC Press, Taylor & Francis Group, ed., Boca Raton. p. 340.

Marques W.B., dos Santos H.S., Pessoa O.D.L., Braz-Filho R. et Lemos T.L.G., 2000. Anthracene derivatives from *Auxemma onocalyx*. *Phytochemistry*, 55, 793-797.

Marston A., Kissling J. et Hostettmann K., 2002. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis*, 13, 51-54.

Mason R.P., Shoemaker W.J., Shajenko L., Chambers T.E. et Herbette L.G., 1992. Evidence for changes in the Alzheimer's disease brain cortical membrane structure mediated by cholesterol. *Neurobiology of Aging*, 13, 413-419.

Masson P., 1989. A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 998, 258-266.

Masson P., Froment M.T., Bartels C.F. et Lockridge O., 1996. Asp70 in the peripheral anionic site of human butyrylcholinesterase. *European Journal of Biochemistry*, 235, 36-48.

Masson P., Froment M.T., Fortier P.L., Visicchio J.E., Bartels C.F. et Lockridge O., 1998. Butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirinrelated neutral esters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1387, 41-52.

Masson P., Legrand P., Bartels C.F., Froment M.T., Schopfer L.H. et Lockridge O., 1997. Role of aspartate 70 and tryptophan 82 in binding of succinylthiocholine to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*, 36, 2266-2277.

Massoulie J., 2002. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals*, 11, 130-143.

Massoulie J., Anselmet A., Bon S., Krejci E., Legay C., Morel N. *et al.*, 1998. Acetylcholinesterase: C-terminal domains, molecular forms and functional localization. *Journal de Physiologie (Paris)*, 92, 183-190.

Massoulie J., Pezzementi L., Bon S., Krejci E. et Vallette FM., 1993a. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*, 41, 31-91.

Massoulie J., Sussman J., Bon S. et Silman I., 1993b. Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Progress in Brain Research*, 98, 139-146.

Mattson M.P., Cheng B., Culwell A.R., Esch F.S., Lieberburg I. et Rydel R.E., 1993. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron*, 10, 243-254.

Mattson M.P. et Chan S.L., 2003. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium*, 34, 385-397.

Mattson M.P., 1997. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiological Reviews*, 77, 1081-1132.

- Mattson M.P., 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 430, 631-639.
- Maurer K., Volk S. et Gerbaldo H., 1997. Auguste D. and Alzheimer's disease. *The Lancet*, 349, 1546-1549.
- Mayeux R., Ottman R., Tang M., Noboa-Bauza L., Marder K., Gurland B. *et al.*, 1993. Genetic susceptibility and head injury as risk factors for Alzheimer's disease among community-dwelling elderly persons and their first-degree relatives. *Annals of Neurology*, 33, 494-501.
- McEwen B.S., 1999. Clinical review 108: the molecular and neuroanatomical basis for estrogen effects in the central nervous system. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84, 1790-1797.
- McKee A.C., Carreras I., Hossain L., Ryu H., Klein W.L., Oddo S. *et al.*, 2008. Ibuprofen reduces Abeta, hyperphosphorylated tau and memory deficits in Alzheimer mice. *Brain Research*, 1207, 225-236.
- McKeith I.G., Burn D.J., Ballard C.G., Collerton D., Jaros E., Morris C.M. *et al.*, 2003. Dementia with Lewy bodies. *Seminars in Clinical Neuropsychiatry*, 8, 46-57.
- McLean C.A., Cherny R.A., Fraser F.W., Fuller S.J., Smith M J., Beyreuther K. *et al.*, 1999. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 46, 860-866.
- Medina J.C.M., Gauze G.F., Vidotti G.J., Sarragiotto M.H., Basso E.A. et Peixoto J.L.B., 2009. Structural characterization of saturated pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* Vell by NMR spectroscopy and theoretical calculations. *Tetrahedron Letters*, 50, 2640-2642.
- Meneilly G.S., Cheung E., Tessier D., Yakura C. et Tuokko H., 1993. The effect of improved glycemic control on cognitive functions in the elderly patient with diabetes. *Journal of Gerontology*, 48, 117-121.
- Mesulam M.M. et Geula C., 1994. Butyrylcholinesterase reactivity differentiates the amyloid plaques of aging from those of dementia. *Annals of Neurology*, 36, 722-727.
- Mesulam M.M., Guillozet A., Shaw P. et Quinn B., 2002a. Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. *Neurobiology of Disease*, 9, 88-93.
- Mesulam M.M., Guillozet A., Shaw P., Levey A., Duysen E.G. et Lockridge O., 2002b. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*, 110, 627-639.
- Miller A.J., Young D.A. et Wen J., 2001. Phylogeny and biogeography of *Rhus* (Anacardiaceae) based on ITS sequences. *International Journal of Plant Sciences*, 162, 1401-1407.

- Milward E.A., Papadopoulos R., Fuller S.J., Moir R.D., Small D., Beyreuther K. *et al.*, 1992. The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron*, 9, 129-137.
- Minami K., Nakasugi T., Sun H.-D., Hou A.-J., Ihara M., Morimoto M. *et al.*, 2006. Isolation and identification of histamine-release inhibitors from *Pistacia weinmannifolia*. *J. Pisson ex. Franch. Journal of Natural Medicines*, 60, 138-140.
- Minkeviciene R., Banerjee P. et Tanila H., 2004. Memantine improves spatial learning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311, 677-682.
- Mitchell J.D. et Mori S.A., 1987. The Cashew and Its Relatives (*Anacardium*: Anacardiaceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 42, 1-76.
- Mitchell J.D., 1990. The poisonous Anacardiaceae genera of the world. *Advances in Economic Botany*, 8, 103-129.
- Mitchell J.D., 2004. Anacardiaceae. In Smith N., Mori S., Henderson A.A., Stevenson D.W., et Heald S.V. *Flowering plants of the Neotropics*. Princeton University Press, ed., Princeton, NJ. p. 1-616.
- Mitchell J.D., Daly D., Pell S.K. et Randrianasolo A., 2006. *Poupartiosis* gen. nov. and its context in Anacardiaceae classification. *Systematic Botany*, 31, 337-348.
- Moffett R.O., 2007. Name changes in the Old World *Rhus* and recognition of *Searsia* (Anacardiaceae). *Bothalia*, 37, 165-175.
- Moodley R., Koorbanally N.A., Islam M.D.S. et Jonnalagadda S.B., 2014. Structure and antioxidant activity of phenolic compounds isolated from the edible fruits and stem bark of *Harpephyllum caffrum*. *Journal of Environmental Science and Health*, 49, 938-944.
- Morán M.A., Mufson E.J. et Gómez-Ramos P., 1994. Cholinesterases co-localize with sites of neurofibrillary degeneration in aged and Alzheimer's brains. *Acta Neuropathologica*, 87, 284-292.
- Moreira P.I., Zhu X., Nunomura A., Smith M.A. et Perry G., 2006. Therapeutic options in Alzheimer's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 6, 897-910.
- Moret V., Laras Y., Pietrancosta N., Garino C., Quelever G., Rolland A. *et al.*, 2006. 1,1'-Xylyl bis-1,4,8,11-tetraaza cyclotetradecane: A new potential copper chelator agent for neuroprotection in Alzheimer's disease. Its comparative effects with clioquinol on rat brain copper distribution. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16, 3298-3301.
- Morgan D.P., Epstein L. et Ferguson L., 1992. Verticillium wilt resistance in pistachio rootstock cultivars - assays and an assessment of 2 interspecific hybrids. *Plant Disease*, 76, 310-313.

- Morteza-Semnani K. et Saeedi M., 2005. Essential Oil Composition of *Echium amoenum* Fisch. & C.A. Mey. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 8, 61-64.
- Morteza-Semnani K., Saeedi M. et Akbarzadeh M., 2009. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Echium italicum* L. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 12, 557-561.
- Morton J.F., 1981. Atlas of medicinal plants of Middle America - Bahamas to Yucatan. C.C. Thomas, ed., Springfield. p. 1-1420.
- Mroczek T., 2009. Highly efficient, selective and sensitive molecular screening of acetylcholinesterase inhibitors of natural origin by solid-phase extraction-liquid chromatography/electrospray ionisation-octopole-orthogonal acceleration time-of-flight-mass spectrometry and novel thin-layer chromatography-based bioautography. Journal of Chromatography A, 1216, 2519-2528.
- Muroi H. et Kubo I. 1993. Bacterial activity of anacardic acids against *Streptococcus mutans* and their potentiation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41, 1780-1783.
- Nachmansohn D. et Rothenberg M.A., 1945. Studies on Cholinesterase. I. On the Specificity of the Enzyme in Nerve Tissue. Journal of Biological Chemistry, 158, 653-666.
- Nag G., Das S., Das S., Mandal S. et De B., 2015. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and anti-glycosidase properties of three species of *Swertia*, their xanthenes and amarogentin: A comparative study. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 7, 117-123.
- Nair J.J., Aremu A.O. et van Staden J., 2011. Isolation of narciprimine from *Cyrtanthus contractus* (Amaryllidaceae) and evaluation of its acetylcholinesterase inhibitory activity. Journal of Ethnopharmacology, 137, 1102-1106.
- Nakagami Y., Nishimura S., Murasugi T., Kaneko I., Meguro M., Marumoto S. *et al.*, 2002. A novel  $\beta$ -sheet breaker, RS-0406, reverses amyloid  $\beta$ -induced cytotoxicity and impairment of long-term potentiation *in vitro*. British Journal of Pharmacology, 137, 676-682.
- Navas Díaz A., García Sánchez F., Bracho V., Lovillo J. et Aguilar A., 1997. Enzymatic determination of fenitrothion by cholinesterase and acetylcholinesterase on fluorogenic substrates. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 357, 958-961.
- Neuwinger H.D., 2000. African traditional medicine. A dictionary of plant use and applications. Medpharm Scientific Publishers, ed., Stuttgart. p. 1-589.
- Neville L.F., Gnatt A., Loewenstein Y. et Soreq H., 1990. Aspartate-70 to glycine substitution confers resistance to naturally occurring and synthetic anionic-site ligands on in-ovo produced human butyrylcholinesterase. Journal of Neurosciences Research, 27, 452-460.
- Niciforovic N., Mihailovic V., Maškovic P., Solujic S., Stojkovic A. et Muratspahic D.P., 2010. Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. Food and Chemical Toxicology, 48, 3125-3130.

- Nikita G., Vivek P. et Chhaya G., 2015. Wound-healing activity of an oligomer of alkannin/shikonin, isolated from root bark of *Onosma echioides*. *Natural Product Research*, 29, 1584-1588.
- Ninomiya H., Roch J.M., Sundsmo M.P., Otero D.A. et Saitoh T., 1993. Amino acid sequence RERMS represents the active domain of amyloid beta/A4 protein precursor that promotes fibroblast growth. *Journal of Cell Biology*, 121, 879-886.
- Nordberg A., 2001. Nicotic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Biological Psychiatry*, 49, 200-210.
- Nunan J. et Small D. H., 2002. Proteolytic processing of the amyloid-beta protein precursor of Alzheimer's disease. *Essays Biochemistry*, 38, 37-49.
- Ohsawa I., Takamura C. et Kohsaka S., 1997. The amino-terminal region of amyloid precursor protein is responsible for neurite outgrowth in rat neocortical explant culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236, 59-65.
- Ollis D.L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken S.M. *et al.*, 1992. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Engineering*, 5, 197-211.
- Ono K., Yoshiike Y., Takashima A., Hasegawa K., Naiki H. et Yamada M., 2003. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols *in vitro*: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 87, 172-181.
- Opazo C., Huang X., Cherny R.A., Moir R.D., Roher A.E., White A.R. *et al.*, 2002. Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease beta-amyloid. Cu-dependent catalytic conversion of dopamine, cholesterol, and biological reducing agents to neurotoxic H(2)O(2). *Journal of Biological Chemistry*, 277, 40302-40308.
- Orhan I., Kupeli E., Aslan M., Kartal M. et Yesilada E., 2006. Bioassay-guided evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of pistachio, *Pistacia vera* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 105, 235-240.
- Orhan I.E., Guner E., Ozturk N., Senol F.S., Aslan Erdem S., Kartal M. *et al.*, 2012. Enzyme inhibitory and antioxidant activity of *Melia azedarach* L. naturalized in Anatolia and its phenolic acid and fatty acid composition. *Industrial Crops and Products*, 37, 213-218.
- Ozbek S. et Ayfer M., 1958. An hermaphrodite *Pistacia* found in the vicinity of Antep, Turkey. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 72, 240-241.
- Ozgen U., Coskun M., Kazaz C. et Secen H., 2004. Naphthoquinones from the Roots of *Onosma argentatum* Hub.-Mor. (Boraginaceae). *Turk Journal of Chemistry*, 28, 451-454.
- Quezel P. et Santa S., 1963. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, ed., Paris. Tome II. p. 571-1170.
- Pacifico S., Piccolella S., Marciano S., Galasso S., Nocera P., Piscopo V. *et al.*, 2014. LC-MS/MS Profiling of a Mastic Leaf Phenol Enriched Extract and Its Effects on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and

A $\beta$ (25–35) Oxidative Injury in SK-B-NE(C)-2. Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 11957-11966.

Panthong K., Sompong R., Rukachaisirikul V., Hutadilok-Towatana N., Voravuthikunchai S.P. et Saising J., 2015. Two new triterpenes and a new coumaroyl glucoside from the twigs of *Mangifera foetida* Lour. *Phytochemistry Letters*, 11, 43-48.

Paraoanu L.E. et Layer P.G., 2008. Acetylcholinesterase in cell adhesion, neurite growth and network formation. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 275, 618-624.

Parfitt D.E. et Badenes M.L., 1997. Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 94, 7987-7992.

Parvari R., Pecht I. et Soreq H., 1983. A microfluorometric assay for cholinesterases, suitable for multiple kinetic determinations of picomoles of released thiocholine. *Analytical Biochemistry*, 133, 450-456.

Paterson D. et Nordberg A., 2000. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Progress in Neurobiology*, 61, 75-111.

Peksel A., Arisan I. et Yanardag R., 2013. Radical Scavenging and Anti-acetylcholinesterase Activities of Aqueous Extract of Wild Pistachio (*Pistacia atlantica* Desf.) Leaves. *Food Science and Biotechnology*, 22, 515-522.

Peksel A., Arisan-Atac I. et Yanardag R., 2010. Evaluation of antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of the extracts of *Pistacia atlantica* Desf. Leaves. *Journal of Food Biochemistry*, 34, 451-476.

Pell S.K., 2004. Molecular systematics of the cashew family (Anacardiaceae). Thèse Doctorat, Louisiana State University, Baton Rouge.

Pell S.K., Mitchell J.D., Lowry P.P., Randrianasolo A. et Urbatsch L.E., 2008. Phylogenetic split of Malagasy and African taxa of *Protorhus* and *Rhus* (Anacardiaceae) based on cpDNA trnL-trnF and nrDNA ETS and ITS sequence data. *Systematic Botany*, 33, 375-383.

Pell S.K., Mitchell J.D., Miller A.J. et Lobova T.A., 2011. Anacardiaceae. In Kubitzki K. *The Families and Genera of Vascular Plants. Flowering Plants - Eudicots, Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae*. Springer-Verlag, ed., Berlin. p. 7-50.

Pendota S.C., Aderogba M.A., Ndhlala A.R. et VanStaden J., 2013. Antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Buddleja salviifolia* (L.) Lam. Leaf extracts and isolated compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 515-520.

Perrier A.L., Massoulie J. et Krejci E., 2002. PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron*, 33, 275-285.

Perrier N.A., Salani M., Falasca C., Bon S., Augusti-Tocco G. et Massoulie J., 2005. The readthrough variant of acetylcholinesterase remains very minor after heat shock,

organophosphate inhibition and stress, in cell culture and in vivo. *Journal of Neurochemistry*, 94, 629-638.

Perry C. et Soreq H., 2004. Organophosphate risk of leukemogenesis. *Leukemia Research*, 28, 905-906.

Perry E.K., Perry R.H., Blessed G. et Tomlinson E., 1978. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 4, 273-277.

Petrovitch H., White L.R., Izmirlian G., Ross G.W., Havlik R.J., Markesbery W. *et al.*, 2000. Midlife blood pressure and neuritic plaques, neurofibrillary tangles, and brain weight at death: the HAAS. Honolulu-Asia aging Study. *Neurobiology of Aging*, 21, 57-62.

Pike C.J., Walencewicz A.J., Glabe C.G. et Cotman C.W., 1991. In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Research*, 563, 311-314.

Poirier J., 2002. Evidence that the clinical effects of cholinesterase inhibitors are related to potency and targeting of action. *International Journal of Clinical Practice*. Supplement, 127, 6-19.

Poirier J., 2003. Apolipoprotein E and cholesterol metabolism in the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *International Journal of Clinical Practice*. Supplement, 9, 94-101.

Porat Y., Abramowitz A. et Gazit E., 2006. Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chemical Biology & Drug Design*, 67, 27-37.

Pritchard T.C. et Alloway K.D., 2002. *Neurosciences médicales. Les bases neuroanatomiques et neurophysiologiques*. De boek Université, ed., Bruxelles. p.22-62.

Pukhal'skaya A.C., Petrova M.F. et Man'ko IV., 1959. Investigation of the action of six alkaloids derived from 1-methylpyrrolizidine on the growth of hepatoma and other transplanted animal tumors. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 48, 1112-1114.

Purich D.L., 2010. *Enzyme kinetics: catalysis & control*. Academic Press, ed., London. 1<sup>ère</sup> édition. p. 181.

Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Hall W.C., LaMantina A.-S. et McNamara J.O., 2005. *Neurosciences*. De boeck Université, ed., Bruxelles. 3<sup>ème</sup> édition. p. 3-97.

Queiroz M.M.F., Queiroz E.F., Zeraik M.L., Marti G., Favre-Godal Q., Simoes-Pires C. *et al.*, 2014. Antifungals and acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Croton heliotropiifolius*. *Phytochemistry Letters*, 10, lxxxviii-xciii.

Quinn D.M., 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews*, 87, 955-979.

Rabbania M., Sajjadib S.E., Vaseghia G. et Jafariana A., 2004. Anxiolytic effects of *Echium amoenum* on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Fitoterapia*, 75, 457-464.

- Radic Z., Duran R., Vellom D.C., Li Y., Cervenansky C. et Taylor P., 1994. Site of fasciculin interaction with acetylcholinesterase. *Journal of Biological Chemistry*, 15, 11233-11239.
- Radic Z., Reiner E. et Taylor P., 1991. Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives. *Molecular Pharmacology*, 39, 98-104.
- Ramirez B.G., Blazquez C., Gomez del Pulgar T., Guzman M. et de Ceballos M.L., 2005. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *Journal of Neurosciences*, 25, 1904-1913.
- Ramli R.A., Pudjiastuti P., Tjahjandari T.S., Lie W., Rattanajak R., Kamchonwongpaisan S. *et al.*, 2015. Alkaloids from the roots of *Stemona javanica* (Kunth) Engl. (Stemonaceae) and their anti-malarial, acetylcholinesterase inhibitory and cytotoxic activities. *Phytochemistry Letters*, 11, 157-162.
- Rauf A., Uddin G., Latif A. et Muhammad N., 2014. Pistagremic Acid, A Novel Antimicrobial And Antioxidant Isolated From *Pistacia integerrima*. *Chemistry of Natural Compounds*, 50, 97-98.
- Raynaud-Simon A., 2004. Nutrition, vascular dementia and Alzheimer's disease. *Nutrition clinique et métabolisme*, 18, 181-188.
- Reeves M.M., Battistutta D., Capra S., Bauer J. et Davies P.S., 2006. Resting energy expenditure in patients with solid tumors undergoing anticancer therapy. *Nutrition*, 22, 609-615.
- Reid R.G. et Sarker S.D. 2012. Isolation of Natural Products by Low-Pressure Column Chromatography. In Sarker S.D. et Nahar L. *Natural Products Isolation*. Springer, ed., New York . 3<sup>ème</sup> édition. p. 155-156.
- Remila S., Atmani-Kilani D., Delemasure S., Connat J.-L., Azib L., Richard T. *et al.*, 2015. Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. *European Journal of Integrative Medicine*, 7, 274-286.
- Retief E. et VanWyk A.E., 1998. The genus *Echium* (Boraginaceae) in Southern Africa. *Bothalia*, 28, 167-177.
- Rhee I.K., Van De Meent M., Ingkaninan K. et Verpoorte R., 2001. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, 915, 217-223.
- Rhee I.K., van Rijn R.M. et Verpoorte R., 2003. Qualitative determination of falsepositive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography. *Phytochemical Analysis*, 14, 127-131.
- Rhouma A., Ben Daoud H., Ghanmi S., Ben Salah H., Romdhane M. et Demak M., 2009. Antimicrobial activities of leaf extracts of *Pistacia* and *Schinus* species against some plant pathogenic fungi and bacteria. *Journal of Plant Pathology*, 91, 339-345.



- Riederer P., Danielczyk W. et Grünblatt E., 2004. Monoamine oxidase-B inhibition in Alzheimer's disease. *Neurotoxicology*, 25, 271-277.
- Riedl H., 1997. Boraginaceae. In Kalkmann C., Kirkup D.W., Nootboom H.P., Stevens P.F. et Wilde W.J.J.O. 'Flora Malesiana'. Rijksherbarium/Hortus Botanicus, ed., Leiden. Volume 13. p. 43-144.
- Rivero-Cruz J.F., Chavez D., Hernandez B., Anaya A.L. et Mata R., 1997. Separation and characterization of *Metopium brownei* urushiol components. *Phytochemistry*, 45, 1003-1008.
- Roberts W.L., Doctor B.P., Foster J.D. et Rosenberry T.L., 1991. Bovine brain acetylcholinesterase primary sequence involved in intersubunit disulfide linkages. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 7481-7487.
- Robertson R.T. et Mostamand F., 1988. Development of 'non-specific' cholinesterase-containing neurons in the dorsal thalamus of the rat. *Brain Research*, 469, 43-60.
- Rodríguez-Pérez C., Quirantes-Pinéa R., Amessis-Ouchemoukh N., Madani K., Segura-Carretero A. et Fernández-Gutierrez A., 2013. A metabolite-profiling approach allows the identification of new compounds from *Pistacia lentiscus* leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 77, 167-174.
- Roeder E., Breitmaier E., Birecka H., Frohlich W. et Badzies-Crombach A., 1991. Pyrrolizidine alkaloids of *Heliotropium spathulatum*. *Phytochemistry*, 30, 1703-1706.
- Rogers S.L., Farlow M.R., Doody R.S., Mohs R. et Friedhoff L.T., 1998. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil Study Group. *Neurology*, 50, 136-145.
- Romani A., Pinelli P., Galardi C., Mulinacci N. et Tattini M., 2002. Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides, and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochemical Analysis*, 13, 79-86.
- Rosenberry T.L., 1975. Catalysis by acetylcholinesterase: evidence that the rate-limiting step for acylation with certain substrates precedes general acidbase catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 72, 3834-3838.
- Rowshan V., Bahmanzadegan A. et Tarakemeh A., 2013. Volatile compounds of *Pistacia atlantica* Desf. galls and leaves by Combi-PAL system technique. *Journal of Applied Science & Engineering Technology*, 3, 796-798.
- Ryu H.W., Curtis-Long M.J., Jung S., Jeong I.Y., Kim D.S. et Kang K.Y., 2012. Anticholinesterase potential of flavonols from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) and their kinetic studies. *Food Chemistry*, 132, 1244-1250.
- Sabbagh M., Zahiri H.R., Ceimo J., Cooper K., Gaul W., Connor D. *et al.*, 2004. Is there a characteristic lipid profile in Alzheimer's disease? *Journal of Alzheimer Disease*, 6, 585-589.

- Said S.A., Fernandez C., Greff S., Derridj A., Gauquelin T. et Mevy J.-P., 2011. Inter-population variability of leaf morpho-anatomical and terpenoid patterns of *Pistacia atlantica* Desf. ssp. *atlantica* growing along an aridity gradient in Algeria. *Flora*, 206, 397-405.
- Saitoh T., Sundsmo M., Roch J.M., Kimura N., Cole G., Schubert D. *et al.*, 1989. Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell*, 58, 615-622.
- Saitta M., Giuffrida D., La Torre G.L., Potorti A.G. et Dugo G., 2009. Characterisation of alkylphenols in pistachio (*Pistacia vera* L.) kernels. *Food Chemistry*, 117, 451-455.
- Saleem M., Lee L.P. et Lee K.H., 2014. Photoluminescent Sensor for Acetylcholinesterase Inhibitor Determination. *Journal of Materials Chemistry B*, 2, 6802-6808.
- Sambamurti K., Greig N.H. et Lahiri D. K., 2002. Advances in the cellular and molecular biology of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Medicine*, 1, 1-31.
- Sambamurty A.V.S.S., 2005. Taxonomy of Angiosperms. I.K. International Pvt. Ltd. ed., New Delhi. p. 441.
- Sannomiya N.M., Montoro P., Piacente S., Pizza C., Brito A.R.M.S. et Vilegas W., 2005. Application of liquid chromatography/électrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19, 2244-2250.
- Santanaa O., Reinac M., Fragac B.M., Sanzd J. et Gonzalez-Coloma A., 2012. Antifeedant Activity of Fatty Acid Esters and Phytosterols from *Echium wildpretii*. *Chemistry & Biodiversity*, 9, 567-576.
- Sarker S.D. et Nahar L., 2006. Hyphenated Techniques. In Sarker S.D., Latif Z. et Gray A.I. *Natural Products Isolation*. Humana Press Inc, ed., Totowa, New Jersey. 2<sup>ème</sup> édition. p. 237.
- Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D., George-Hyslop P.H., Periaack-Vance M.A., Joo S.H. *et al.*, 1993. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 43, 1467-1472.
- Savolainen V., Chase M.W., Hoot S.B., Morton C.M., Soltis D.E., Bayer C. *et al.*, 2000a. Phylogenetics of flowering plants based on combined analysis of plastid atpB and rbcL sequences. *Systematic Biology*, 49, 306-362.
- Savolainen V., Fay M.F., Albach D.C., Backlund A., van der Bank M., Cameron K.M. *et al.*, 2000b. Phylogeny of the eudicots: a nearly complete familial analysis based on rbcL gene sequences. *Kew Bulletin*, 55, 257-309.
- Saxena G., McCutcheon A.R., Farmer S., Towers G.H.N. et Hancock R.E.W., 1994. Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*. *Journal of Ethnopharmacology*, 42, 95-99.

- Sayre L.M., Perry G., Harris P.L., Liu Y., Schubert K.A. et Smith M.A., 2000. In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. *Journal of Neurochemistry*, 74, 270-279.
- Sayyah M., Sayyah M. et Kamalinejad M., 2006. A preliminary randomized double blind clinical trial on the efficacy of aqueous extract of *Echium amoenum* in the treatment of mild to moderate major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 30, 166-169.
- Scarpini E., Scheltens P. et Felldman H., 2003. "Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives". *Lancet Neurology*, 2, 539-547.
- Schenk D., Barbour R., Dunn W., Gordon G., Grajeda H., Guido T. *et al.*, 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, 400, 173-177.
- Schiele F., De Bacquer D., Vincent-Viry M., Beisiegel U., Ehnholm C., Evans A. *et al.*, 2000. Apolipoprotein E serum concentration and polymorphism in six European countries: the ApoEurope Project. *Atherosclerosis*, 152, 475-488.
- Scholl F.G. et Scheiffele P., 2003. Making connections: cholinesterase-domain proteins in the CNS. *Trends Neurosciences*, 26, 618-624.
- Selkoe D.J., 2001a. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews*, 81, 741-766.
- Selkoe D.J., 2001b. Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 98, 11039-11041.
- Sen N., Kar Y. et Tekeli Y., 2010. Antioxidant Activities Of Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Seeds Cultivating In Different Regions Of Turkey. *Journal of Food Biochemistry*, 34, 105-119.
- Seron X. et Jeannerod M., 1998. *Neuropsychologie humaine*. Pierre Mardaga, ed., Sprimont. p. 542.
- Seubert P., Vigo-Pelfrey C., Esch F., Lee M., Dovey H., Davis D. *et al.*, 1992. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature*, 359, 325-327.
- Sezik E., Yesilada E., Tabata M., Honda G., Takaishi Y., Tetsuro F. *et al.*, 1997. Traditional Folk Medicine in Turkey. VIII. Folk medicine in east Anatolia; Erzurum, Erzincan, Ağrı, Kars, Iğdır Provinces. *Economic Botany*, 51, 195-211.
- Shaddel R., Maskooki A., Haddad-Khodaparast M.H., Azadmard-Damirchi S., Mohamadi M. et Fathi-Achachlouei B., 2014. Optimization of Extraction Process of Bioactive Compounds from Bene Hull Using Subcritical Water. *Food Science and Biotechnology*, 23, 1459-1468.

- Shafferman A., Kronman C., Flashner Y., Leitner M., Grosfeld H., Ordentlich A. *et al.*, 1992. Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 17640-17648.
- Shah S.M., Shah A.-u.-H.A., Ullah F., Hussain S., Khan S.B., Asiri A.M. *et al.*, 2013. A new trypsin inhibitory phthalic acid ester from *Heliotropium strigosum*. *Medicinal Chemistry Research*, 23, 2712-2714.
- Sharayei P., Farhoosh R., Poorazrang H. et Khodaparast M.H.H., 2011. Effect of Bene Kernel Oil on the Frying Stability of Canola Oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 88, 647-654.
- Sharma K.V., Koenigsberger C., Brimijoin S. et Bigbee J.W., 2001. Direct evidence for an adhesive function in the noncholinergic role of acetylcholinesterase in neurite outgrowth. *Journal of Neuroscience Research*, 63, 165-175.
- Sharma O.P., 2011. *Plant Taxonomy*. Tata McGraw-Hill, ed., New Delhi. 2<sup>ème</sup> édition. p. 393-394.
- Sharma R.A., Singh B., Singh D. et Chandrawat P., 2009. Ethnomedicinal, pharmacological properties and chemistry of some medicinal plants of Boraginaceae in India. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3, 1153-1175.
- Shen Y., Lue L., Yang L., Roher A., Kuo Y., Strohmeyer R. *et al.*, 2001. Complement activation by neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 305, 165-168.
- Sheng R., Lin X., Li J., Jiang Y., Shang Z. et Hu Y., 2005. Design, synthesis, and evaluation of 2-phenoxy-indan-1-one derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15, 3834-3837.
- Shi J., Mazza G. et Le Maguer M., 2002. *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects*. CRC Press, ed., Florida. Volume 2. p. 374.
- Shimshoni J.A., Mulder P.P.J., Bouznach A., Edery N., Pasval I., Barel S. *et al.*, 2015. *Heliotropium europaeum* Poisoning in Cattle and Analysis of Its Pyrrolizidine Alkaloid Profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 1664-1672.
- Shobab L.A., Hsiung G.Y. et Feldman H.H., 2005. Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurology*, 4, 841-852.
- Shoji M., Golde T.E., Ghiso J., Cheung T.T., Estus S., Shaffer L.M. *et al.*, 1992. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science*, 258, 126-129.
- Silverstein R.M., Basler G.C. et Morill T.C., 1998. *Identification Spectrométrique de Composés Organiques*. De Boeck & Larcier, ed., Paris. p. 3-89.

- Singh B., Sidiq T., Joshi P., Jain S.K., Lawaniya Y., Kichlu S. *et al.*, 2013. Anti-inflammatory and immunomodulatory flavones from *Actinocarya tibetica* Benth. *Natural Product Research*, 27, 2227-2230.
- Singh G., 2010. *Plant Systematics*. CRC press, ed., New Hampshire. 3<sup>ème</sup> édition. p. 1-780.
- Singleton V.L., Orthofer R. et Lamuela-Raventos R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Small D.H., Michaelson S. et Sberna G., 1996. Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 28, 453-483.
- Small D.H., Reed G., Whitefield B. et Nurcombe V., 1995. Cholinergic regulation of neurite outgrowth from isolated chick sympathetic neurons in culture. *Journal of Neurosciences*, 15, 144-151.
- Smith D.G., Cappai R. et Barnham K.J., 2007. The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid  $\beta$  peptide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768, 1976-1990.
- Smith M.A., Rottkamp C.A., Nunomura A., Raina A.K. et Perry G., 2000. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1502, 139-144.
- Solfrizzi V., D'Introno A., Colacicco A.M., Capurso C., Todarello O., Pellicani V. *et al.*, 2006. Circulating biomarkers of cognitive decline and dementia. *Clinica Chimica Acta*, 364, 91-112.
- Somani G., Kulkarni C., Shinde P., Shelke R., Laddha K. et Sathaye S., 2015. *In vitro* acetylcholinesterase inhibition by psoralen using molecular docking and enzymatic studies. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 7, 32-36.
- Song M.-C., Yang H.-J., Kim D.-K. et Baek N.-I., 2008. A New Acyclic Diterpene from *Trigonotis peduncularis*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 29, 2267-2269.
- Soreq H. et Seidman S., 2001. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2, 294-302.
- Soreq H. et Zakut H., 1993. *Human cholinesterases and anticholinesterases*. Academic Press, ed., San Diego, California. p. 1-314.
- Sortino M.A., Frasca G., Chisari M., Platania P., Chiechio S., Vancheri C. *et al.*, 2004. Novel neuronal targets for the acetylcholinesterase inhibitor donépézil. *Neuropharmacology*, 47, 1198-1204.
- Soto C., Sigurdsson E.M., Morelli L., Kumar A., Castano E.M. et Frangione B., 1998.  $\beta$ -sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: Implications for Alzheimer's therapy. *Nature Medicine*, 4, 822-826.

Souri E., Amin G., Dehmobed-Sharifabadi A., Nazifi A. et Farsam H., 2004. Antioxidative Activity of Sixty Plants from Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 3, 55-59.

Sousa C., Moita E., Valentão P., Fernandes F., Monteiro P. et Andrade P.B., 2015. Effects of Colored and Noncolored Phenolics of *Echium plantagineum* L. Bee Pollen in Caco-2 Cells under Oxidative Stress Induced by tert-Butyl Hydroperoxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 2083-2091.

Souza da Silva S.A.S., Souto A.L., de Fátima Agra M., da-Cunha E.V.L., Barbosa-Filho J.M., da Silva M.S. *et al.*, 2004. A new aryl-naphthalene type lignan from *Cordia rufescens* A. DC. (Boraginaceae). *Arkivoc*, vi, 54-58.

Stahl E., Keller K. et Blinn C., 1983. Cardanol, a skin irritant in pink pepper (*Schinus terebinthifolius*). *Planta Medica*, 48, 5-9.

Stecher G., Mayer R., Ringer T., Hashir M.A., Kasemsook S., Qureshi M.N. *et al.*, 2011. LC-MS as a Method of Identification and Quantification of Plant Metabolites. In Waksmondzka-Hajnos M. et Sherma J. *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis*. CRC Press, Taylor & Francis Group, ed., Boca Raton. p. 258-259.

Storey E., Beyreuther K. et Masters C.L., 1996. Alzheimer's disease amyloid precursor protein on the surface of cortical neurons in primary culture co-localizes with adhesion patch components. *Brain Research*, 735, 217-231.

Suh S.W., Jensen K.B., Jensen M.S., Silva D.S., Kesslak P.J., Danscher G. *et al.*, 2000. Histochemically-reactive zinc in amyloid plaques, angiopathy, and degenerating neurons of Alzheimer's diseased brains. *Brain Research*, 852, 274-278.

Suh Y.-H. et Checler F., 2002. Amyloid precursor protein, presenilins, and  $\alpha$ -synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacological Reviews*, 54, 469-525.

Suh Y.H., 1997. An etiological role of amyloidogenic carboxyl-terminal fragments of the beta-amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 68, 1781-1791.

Sun H., El Yazal J., Lockridge O., Schopfer L.M., Brimijoin S. et Pang Y.P., 2001. Predicted Michaelis-Menten complexes of cocaine-butyrylcholinesterase. Engineering effective butyrylcholinesterase mutants for cocaine detoxication. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 9330-9336.

Sundarama R., Muthu K., Nagaraj S., Shanthid P. et Sachdanandam P., 2014. Isolation and characterization of catechol derivatives from *Semecarpus anacardium* seeds and their antibacterial potential in in vitro. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4, 177-180.

Suresh M. et Raj R.K., 1990. Cardol: the antifilarial principle from *Anacardium occidentale*. *Current Science*, 59, 477-479.

Sussman J.L., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Toker L. *et al.*, 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253, 872-879.

Svennerholm L. et Gottfries C.G., 1994. Membrane lipids, selectively diminished in Alzheimer brains, suggest synapse loss as a primary event in early-onset form and demyelination in late-onset form. *Journal of Neurochemistry*, 62, 1039-1047.

Takada-Takatori Y., Kume T., Sugimoto M., Katsuki H., Sugimoto H. et Akaike A., 2006. Acetylcholinesterase inhibitors used in treatment of Alzheimer's disease prevent glutamate neurotoxicity via nicotinic acetylcholine receptors and phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Neuropharmacology*, 51, 474-486.

Takhtajan A., 1987. *Systema Magnoliophytorum*. Nauka, ed., Leningrad. p. 1-440.

Takhtajan A., 2009. *Flowering Plants*. Springer, ed., Netherlands. 2<sup>ème</sup> édition. p. 1-750.

Tan W.-N., Khairuddean M., Wong K.-C., Khaw K.-Y. et Vikneswaran M., 2014. New cholinesterase inhibitors from *Garcinia atroviridis*. *Fitoterapia*, 97, 261-267.

Tang G., Minemoto Y., Dibling B., Purcell N.H., Li Z., Karin M. *et al.*, 2001. Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature*, 414, 313-317.

Tang L.-L. et Tang X.C., 2005. Effects of huperzine A on secretion of nerve growth factor in cultured rat cortical astrocytes and neurite outgrowth in rat PC12 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26, 673-678.

Tang M.X., Jacobs D., Stern Y., Marder K., Schofield P., Gurland B. *et al.*, 1996. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet*, 348, 429-432.

Taran M., Mohebbali M. et Esmaeli J., 2010. In Vivo Efficacy of Gum Obtained *Pistacia atlantica* in Experimental Treatment of *Cutaneous Leishmaniasis*. *Iranian Journal of Public Health*, 39, 36-41.

Tariot P.N., Farlow M.R., Grossberg G.T., Graham S.M., McDonald S. et Gergel I., 2004. Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving Donepezil: A randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*, 291, 317-324.

Tasso B., Novelli F., Sparatore F., Fasoli F. et Gotti C., 2013. (+)-Laburnamine, a natural selective ligand and partial agonist for the  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptor subtype. *Journal of Natural Products*, 76, 727-731.

Taylor P. et Radic Z., 1994. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 34, 281-320.

Tenner A.J., 2001. Complement in Alzheimer's disease: opportunities for modulating protective and pathogenic events. *Neurobiology of Aging*, 22, 849-861.

- Terrazas T., 1994. Wood anatomy of the Anacardiaceae: ecological and phylogenetic interpretation. Thèse doctorat, NC: University of North Carolina, Chapel Hill.
- Terry Jr. A.V. et Buccafusco J.J., 2003. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306, 821-827.
- Thorne R.F., 1992. Classification and geography of the flowering plants. *Botanical Review*, 58, 225-348.
- Thorne R.F., 2003. An Updated Classification of the Class Angiospermae. [www.rsabg.org/publications/angiosp.htm](http://www.rsabg.org/publications/angiosp.htm)
- Thorne R.F., 2006. An updated classification of the class Magnoliopsida ("Angiospermae"). <http://rsabg.org/angio-sperms.angiosperms.pdf>
- Thorne R.F., 2007. An Updated Classification of the Class Magnoliopsida ("Angiospermae"). *The Botanical Review*, 73, 67-182.
- Tian F., Li B., Ji B., Yang J., Zhang G., Chen Y. *et al.*, 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: the polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*, 113, 173-179.
- Tiraboschi P., Hansen L.A., Alford M., Sabbagh M.N., Schoos B., Masliah E. *et al.*, 2000. Cholinergic dysfunction in diseases with Lewy bodies. *Neurology*, 54, 407-411.
- Tjernberg L.O., Näslund J., Lindqvist F., Johansson J., Karlström A.R., Thyberg J. *et al.*, 1996. Arrest of  $\beta$ -amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 8545-8548.
- Tohgi H., Abe T., Kimura M., Saheki M. et Takahashi S., 1996. Cerebrospinal fluid acetylcholine and choline in vascular dementia of Binswanger and multiple small infarct types as compared with Alzheimer-type dementia. *Journal of Neural Transmission*, 103, 1211-1220.
- Tomaino A., Martorana M., Arcoraci T., Monteleone D., Giovinazzo C. et Saija A., 2010. Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins. *Biochimie*, 92, 1115-1122.
- Topal M., Gocer H., Topal F., Kalin P., Köse L.P., Gülçin İ. *et al.*, 2015. Antioxidant, antiradical, and anticholinergic properties of cynarin purified from the Illyrian thistle (*Onopordum illyricum* L.). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20, 1-10.
- Topçu G., Ay M., Bilici A., Sarıkürkcü C., Öztürk M. et Ulubelen A., 2007. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103, 816-822.
- Trujillo-Ferrara J., Montoya Cano L. et Espinoza-Fonseca M., 2003. Synthesis, anticholinesterase activity and structure-activity relationships of maminobenzoic acid derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13, 1825-1827.



- Tsien J.Z., Heurta P.T. et Tonegawa S., 1996. The essential role hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*, 87, 1327-1338.
- Tyman J.H. et Morris L.J., 1967. The composition of cashew nut-shell liquid (CNSL) and the detection of a novel phenolic ingredient. *Journal of Chromatography*, 27, 287-288.
- Tzakou O., Bazos I. et Yannitsaros A., 2007. Volatile metabolites of *Pistacia atlantica* Desf. from Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 358-362.
- Ullah Z., Mehmood R., Imran M., Malik A. et Afzal R.A., 2013. New acylated oligosaccharides from *Pistacia integerrima*. *Natural Product Research*, 27, 2027-2032.
- Uysal H., Kızılet H., Ayar A. et Taheri A., 2015. The use of endemic Iranian plant, *Echium amoenum*, against the ethyl methanesulfonate and the recovery of mutagenic effects. *Toxicology and Industrial Health*, 31, 44-51.
- Vaya J. et Mahmood S., 2006. Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) and pistachio (*Pistacia lentiscus* L.). *Biofactors*, 28, 169-75.
- Venter P.B., Sisa M., van der Merwe M.J., Bonnet S.L. et van der Westhuizen J.H., 2012. Analysis of commercial proanthocyanidins. Part 1: The chemical composition of quebracho (*Schinopsis lorentzii* and *Schinopsis balansae*) heartwood extract. *Phytochemistry*, 73, 95-105.
- Viana G.S.B., Bandeira M.A.M., Moura L.C., Souza-Filho M.V.P., Matos F.J.A. et Ribeiro R.A., 1997. Analgesic and anti-inflammatory effects of the tannin fraction from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. *Phytotherapy Research*, 11, 118-122.
- Vieiraa M.N., das Neves Costa F., Leitão G.G., Garrard I., Hewitson P., Ignatova S. *et al.*, 2015. *Schinus terebinthifolius* scale-up countercurrent chromatography (Part I): High performance countercurrent chromatography fractionation of triterpene acids with off-line detection using atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1389, 39-48.
- Vigo-Pelfrey C., Lee D., Keim P., Lieberburg I. et Schenk D.B., 1993. Characterization of beta-amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. *Journal of Neurochemistry*, 61, 1965-1968.
- Villanueva-Cañongo C., Pérez-Hernández N., Hernández-Carlos B., Cedillo-Portugal E., Joseph-Nathan P. et Burgueño-Tapia E., 2014. Complete <sup>1</sup>H NMR assignments of pyrrolizidine alkaloids and a new eudesmanoid from *Senecio polypodioides*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 52, 251-257.
- Vlad S.C., Miller D.R., Kowall N.W. et Felson D.T., 2008. Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology*, 70, 1672-1677.
- Wagner H., Bauer R., Melchart D., Xiao P.-G. et Staudinger A., 2011. Chromatographic Fingerprint Analysis of Herbal Medicines. Thin-layer and High Performance Liquid Chromatography of Chinese Drugs. Springer-Verlag/Wien, ed., New York. 2<sup>ème</sup> edition, volume 1. p. 1-1013.

Wagner H. et Bladt S., 1996. Plant drug analysis, a thin layer chromatography atlas. Springer-Verlag, ed., Berlin. 2<sup>ème</sup> édition. p. 1-364.

Wall D.B., Finch J.W. et Cohen S.A., 2004. Comparison of desorption/ionization on silicon (DIOS) time-of-flight and liquid chromatography/tandem mass spectrometry for assaying enzyme-inhibition reactions. *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, 18, 1482-1486.

Walsh D.M., Townsend M., Podlisny M.B., Shankar G.M., Fadeeva J.V., El-Agnaf O. *et al.*, 2005. Certain inhibitors of synthetic amyloid  $\beta$ -peptide (A $\beta$ ) fibrillogenesis block oligomerization of natural A $\beta$  and thereby rescue long-term potentiation. *Journal of Neurosciences*, 25, 2455-2462.

Wang B., Wang H., Wang F., Zhou G., Wang Y., Kambam S. *et al.*, 2014. Colorimetric and fluorometric assays for acetylcholinesterase and its inhibitors screening based on a fluorescein derivate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24, 552-555.

Wang R., Zhang H.Y. et Tang X.C., 2001. Huperzine A attenuates cognitive dysfunction and neuronal degeneration caused by  $\beta$ -amyloid protein-(1-40) in rat. *European Journal of Pharmacology*, 421, 149-156.

Wannan B.S. et Quinn C., 1990. Pericarp structure and generic affinities in the Anacardiaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 102, 225-252.

Wannan B.S. et Quinn C., 1991. Floral structure and evolution in the Anacardiaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 107, 349-85.

Wannan B.S., 1986. Systematics of the Anacardiaceae and its allies. Thèse doctorat, University of New South Wales, Sydney.

Wannan B.S., Waterhouse J.T., Gadek P.A. et Quinn C.J., 1985. Biflavonyls and the affinities of *Blepharocarya*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 13, 105-108.

Watson G.S. et Craft S., 2003. The role of insulin resistance in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for treatment. *CNS Drugs*, 17, 27-45.

Watson L. et Dallwitz M.J., 1992. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information retrieval. Version 14. December 2000. <http://biodiversity.uno.edu/delta/>

Weins C. et Jork H., 1996. Toxicological evaluation of harmful substances by in situ enzymatic and biological detection in high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 750, 403-407.

Weitnauer E., Ebert C., Hucho F., Robitzki A., Weise C. et Layer P.G., 1999. Butyrylcholinesterase is complexed with transferrin in chicken serum. *Journal of Protein Chemistry*, 18, 205-214.

Weston P.A., Weston L.A. et Hildebrand S., 2013. Metabolic profiling in *Echium plantagineum*: presence of bioactive pyrrolizidine alkaloids and naphthoquinones from accessions across southeastern Australia. *Phytochemistry Reviews*, 12, 831-837.

Wettasinghea M., Shahidia F., Amarowicza R. et Abou-Zaidb M.M., 2001. Phenolic acids in defatted seeds of borage (*Borago officinalis* L.). *Food Chemistry*, 75, 49-56.

Whitehouse P.J., Price D.L., Struble R.G., Clark A.W., Coyle J.T. et Delon M.R., 1982. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*, 215, 1237-1239.

Whitehouse W.E., 1957. The pistachio nut - a new crop for the western United States. *Economic Botany*, 11, 281-321.

Whitnall M. et Richardson R., 2006. Iron: A New Target for Pharmacological Intervention in Neurodegenerative Diseases. *Seminars in Pediatric Neurology*, 13, 186-497.

Wink M., 2013. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African Journal of Botany*, 89, 164-175.

Wischnik C.M., Bentham P., Wischnik D.J. et Seng K.M., 2008. Tau aggregation inhibitor (TAI) therapy with rember arrests disease progression in mild and moderate Alzheimer's disease over 50 weeks. *Alzheimer's and Dementia*, 4, T167.

Wolozin B., Kellman W., Ruosseau P., Celesia G.G. et Siegel G., 2000. *Archives of Neurology*, 57, 1439-1443.

Wood J.G., Mirra S.S., Pollock N.J. et Binder L.I., 1986. Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 83, 4040-4073.

Wright C.I., Geula C. et Mesulam M.-M., 1993. Neuroglial cholinesterases in the normal brain and in Alzheimer's disease: relationship to plaques, tangles, and patterns of selective vulnerability. *Annals of Neurology*, 34, 373-384.

Xu H., Gouras G.K., Greenfield J.P., Vincent B., Naslund J., Mazzarelli L. *et al.*, 1998. Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer betaamyloid peptides. *Annals of Neurology*, 4, 447-451.

Xu J.R., Wang H. et Chen H.Z., 2013. Muscarinic acetylcholine receptor modulators derived from natural toxins and diverse interaction modes. *Science China Chemistry*, 56, 1333-1343.

Yaffe K., Sawaya G., Lieberburg I. et Grady D., 1998. Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. *Journal of the American Medical Association*, 279, 688-695.

Yang F., Lim G.P., Begum A.N., Ubeda O.J., Simmons M.R., Ambegaokar S.S. *et al.*, 2005. Curcumin inhibits formation of amyloid  $\beta$  oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 5892-5901.

Yang Y., Zhao D., Yuan K., Zhou G., Wang Y., Xiao Y. *et al.*, 2014. Two new dimeric naphthoquinones with neuraminidase inhibitory activity from *Lithospermum erythrorhizon*. *Natural Product Research*, 29, 908-913.

Yankner B.A., Dawes L.R., Fisher S., Villa-Komaroff L., Oster-Granite M.L. et Neve R.L., 1989. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science*, 245, 417-420.

Yankner B.A., Duffy L.K. et Kirschner D.A., 1990. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*, 250, 279-282.

Ye Y.-H., Li C., Yang J., Ma L., Xiao Y., Hu J. *et al.*, 2015. Construction of an immobilized acetylcholinesterase column and its application in screening insecticidal constituents from *Magnolia officinalis*. *Pest Management Science*, 71, 607-615.

Yi T. et Wen J., 2008. Phylogenetics and reticulate evolution in *Pistacia* (Anacardiaceae). *American Journal of Botany*, 95, 241-251.

Yi T., Miller A.J. et Wen J., 2004. Phylogenetic and biogeographic diversification of *Rhus* (Anacardiaceae) in the Northern Hemisphere. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33, 861-879.

Yi T., Miller A.J. et Wen J., 2007. Phylogeny of *Rhus* (Anacardiaceae) based on sequences of nuclear *Nia-13* intron and chloroplast *trnC-trnD*. *Systematic Botany*, 32, 379-391.

Yi T., Wen J., Golan-Goldhirsh A. et Parfitt D.E., 2008. Phylogenetics and reticulate evolution in *Pistacia* (Anacardiaceae). *American Journal of Botany*, 95, 241-251.

Yousfi M., Djeridane A., Bombarda I., Chahrazed-Hamia, Duhem B. et Gaydo E.M., 2009. Isolation and Characterization of a New Hispolone Derivative From Antioxidant Extracts of *Pistacia atlantica*. *Phytotherapy Research*, 23, 1237-1242.

Yousfi M., Nadjemi B., Belal R., Bombarda I. et Gaydou E.M., 2005. Triacylglycerol Composition of Oil from *Pistacia atlantica* Fruit Growing in Algeria. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82, 93-96.

Yousfi M., Nadjemi B., Bellal R., Ben Bertal D. et Palla G., 2002. Fatty acids and sterols of *Pistacia atlantica* fruit oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79, 1049-1050.

Yu H., Saura C.A., Choi S.Y., Sun L.D., Yang X., Handler M. *et al.*, 2001. APP processing and synaptic plasticity in presenilin-1 conditional knockout mice. *Neuron*, 31, 713-26.

Yun X.-j., Shu H.-m., Chen G.-y., Ji M.-h. et Ding J.-y., 2014. Chemical Constituents from Barks of *Lannea coromandelica*. *Chinese Herbal Medicines*, 6, 65-69.

Zandi P.P., Carlson M.C., Plassman B.L., Thal L., Wallace R.B., Ockene J.K. *et al.*, 2002. Hormone replacement therapy and the incidence of Alzheimer disease in older women. The Cache County study. *Journal of the American Medical Association*, 288, 2123-2129.

Zare K., Nazemiyeh H., Movafeghi A., Khosrowshahli M., Motallebi-Azar A., Dadpour M. *et al.*, 2010. Bioprocess engineering of *Echium italicum* L.: induction of shikonin and alkannin derivatives by two-liquid-phase suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100, 157-164.

Zhang C., Milunsky J.M., Newton S., Ko J., Zhao G., Maher T.A. *et al.*, 2009. A neuroligin-4 missense mutation associated with autism impairs neuroligin-4 folding and endoplasmic reticulum export. *Journal of Neurosciences*, 29, 10843-10854.

Zhang D.-B., Chen J.-J., Zhang L., Song Q.-Y. et Gao K., 2014. Bioactive alkaloids from *Palhinhaea cernua*. *Phytochemistry Letters*, 10, 76-79.

Zhang H.Y. et Tang X.C., 2006. Neuroprotective effects of huperzine A: new therapeutic targets for neurodegenerative disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27, 619-625.

Zhao X., Sun H., Hou A., Zhao Q., Wei T. et Xin W., 2005. Antioxidant properties of two gallotannins isolated from the leaves of *Pistacia weinmannifolia*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1725, 103-110.

Zhou D.F., Wu C.S., Qi H., Fan J.H., Sun X.D., Como P. *et al.*, 2006. Prevalence of dementia in rural China: impact of age, gender and education. *Acta Neurologica Scandinavica*, 114, 273-280.

Zohary M., 1952. A monographical study of the genus *Pistacia*. *Palestine Journal of Botany*, 5, 187-228.

Zohary M., 1972a. *Flora Palaestina*. The Israel Academy of Sciences and Humanities. Goldberg's Press, ed., Jerusalem. Volume 2. p. 297 & 435.

Zohary M., 1972b. *Pistacia* L. *Flora Palestina*, 2, 297-300.

<sup>1</sup> <http://www.alz.co.uk> (visité en mai 2011)

<sup>2</sup> <http://www.nia.nih.gov/Alzheimers> (visité en mai 2011)

<sup>3</sup> <http://www.inserm.fr> (visité en mai 2011)

<sup>4</sup> <http://www.alzheimer.ca> (visité en mars 2007)

<sup>5</sup> <http://sites.google.com/site/antargrandeurnature/photosflore-p> (visité en novembre 2013)