

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1

Faculté des Sciences de la

Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Biochimie N°...../SNV/2023

Thèse

Présentée par :

GUETTAF Sofiane

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière : **BIOLOGIE**

Spécialité : **BIOCHIMIE**

THÈME

Valorisation pharmacologique des métabolites secondaires d'*Arctium minus (Hill) Bernh. Ssp. Atlanticum (Pomel) Maire*

Soutenu publiquement le 21/03/2023

DEVANT LE JURY

Président	BENZIDANE NADIA	MCA	UFA Sétif 1
Directeur	HARZALLAH Daoud	Pr	UFA Sétif 1
Co-directeur	BAGHIANI Abderrahmane	Pr	UFA Sétif 1
Examineurs	BENKHALED Abderrahim	MCA	UMB M'sila
	BENCHEIKH Dalila	MCA	UMB M'sila
	TIGRINE Chafia	MCA	ENS Kouba -Alger

Je dédie ce travail à

Mes parents ; aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de leurs sacrifices consentis. Qu'ils reçoivent à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude

Mon cher frère Fares ; les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour toi

*Ma petite famille ; ma chère épouse et mes enfants Haroun, Imran, et Suleyman qui m'ont apporté la force, la joie, le bonheur, ils m'ont toujours comblé avec leurs présences, et
Amour
A toute la famille....*

SOFIANE

REMERCIEMENTS

Au terme de cette étude, je remercie avant tout **ALLAH** le Tout Puissant, de m'avoir donné la foi et le courage et de m'avoir guidé pour l'accomplissement de ce travail.

Cette thèse n'aurait jamais pu voir le jour sans le soutien que j'ai reçu de la part de nombreuses personnes. C'est avec un grand plaisir que je tiens donc à remercier :

Tout d'abord, j'exprime ma profonde gratitude envers le Pr. **HARZALLAH DAOUD** qui m'a si formidablement encadré, soutenu et éclairé de ses lumières pendant ces six années et qui m'a fait bénéficier de son savoir et de ses conseils éclairés afin de perfectionner ce travail. Je la remercie pour sa disponibilité et son encouragement durant toute la période de la réalisation de cette thèse.

De même, j'exprime ma reconnaissance envers le Pr. **BAGHIANI ABDERRAHMANE**, je le remercie pour son intérêt à mon travail, pour ses conseils et le co-encadrement de haut niveau qu'il m'a offert.

Ma reconnaissance s'adresse au Pr **BENZIDANE NADIA** d'avoir accepté de présider ce travail, pour sa gentillesse et ses qualités humaines.

Ma reconnaissance va également aux Professeurs Dr.**BENKHALED ABDERAHIM**, Dr. **BENCHEIKH DALILA** et Dr. **TIGRINE CHAFIA** d'avoir accepté de consacrer leur temps en tant qu'examineurs de cet humble travail en l'enrichissant de leurs remarques constructives.

Ma gratitude est exprimée pour Dr. **BENSOUISSI CHAWKI**, directeur de laboratoire de biochimie(CRBT) qui a veillé sur le bon déroulement de mon travail. Je le remercie pour son importante contribution dans cette étude.

De même, mes remerciements vont vers Pr.**DAHAMNA SALIHA** et Pr. **AKKAL SALAH** pour tous leurs conseils, encouragements et précieuse aide. Ce fut un véritable plaisir d'avoir travaillé ensemble.

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance et mes profonds remerciements à mes frères et soeurs Dr. **BENMERZOUG ABDELMOUMEN**, Dr. **LAADEL NOUREDDINE**, Dr. **MOKHNACHE MOUHAMED** et Dr. **KADA SEOUSSEN**, pour leur soutien, aussi pour leur amabilité, leurs conseils et leurs encouragements, qu'ils trouvent ici ma gratitude.

RESUME

La présente étude a été désignée pour l'évaluation des vertus thérapeutiques et les effets toxiques des différentes parties aériennes (feuilles et fleurs) et racinaires des extraits aqueux (BFq, BFRq et BRq, respectivement), hydrométhanoliques (BFm, BFRm et BRm, respectivement) et ceux d'éthyle acétate (BFt, BFRt et BRt, respectivement) de la plante endémique de l'Algérie et du Maroc : *Arctium minus*. ssp. *Atlanticum*, appelée communément "la petite bardane" et connue en Algérie sous le nom d'Arkatioune. Les dosages ont montré que les différents organes étudiés sont riches en polyphénols, flavonoïdes et en tannins condensés, notamment leurs extraits hydro-alcooliques. D'autre part, l'analyse par HPLC-DAD a montré la prédominance des flavan-3-ols, notamment la catéchine et son isomère l'épicatéchine. *In vitro* : le potentiel du piégeage a été évalué par DPPH et GOR ; tous les extraits hydro-alcooliques, aqueux et le BRt ont montré une activité antiradicalaire considérable. L'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique n'a été obtenue que par des concentrations élevées ($CI_{50} > 76,30 \pm 1,66 \mu\text{g/mL}$). Le pouvoir réducteur du cuivre CUPRAC du BFRm était le plus puissant ($CI_{50} = 31,13 \pm 2,29 [\mu\text{g/mL}]$). Tous les extraits ont prévenu considérablement la dénaturation du BSA avec 47,45-67,44 %. L'activité anti-*Alzheimer* a été estimée par inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BuChE) : la plupart des extraits ont montré une faible activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE) et une activité inhibitrice modérée à élevée de la butyrylcholinestérase (BChE), tandis que le BFt avait l'activité inhibitrice la plus élevée sur la BChE ($72,87 \pm 6,48\%$) par rapport aux autres extraits. L'activité antidiabétique a été évaluée par inhibition de l'alpha-amylase : le BRt était le plus puissant et même plus puissant que l'acarbose utilisé comme standard ($CI_{50} = 370,96 \pm 43,23$ et $3650,93 \pm 10,70 \mu\text{g/mL}$, respectivement). *In vivo* : l'évaluation de la toxicité aiguë est réalisée sur des souris en suivant les signes de toxicité pendant 14 jours (Essai limite) : l'administration orale de 5g/ Kg des différents extraits a montré très faible toxicité ($DL_{50} > 5\text{g/Kg}$). Ces données permettent de classer la plante dans la catégorie des plantes non toxiques dont l'administration orale est sûre. L'ensemble des résultats a mis en évidence des nouveaux effets pharmacologiques qui n'ont pas été évoqués par la littérature de la médecine traditionnelle. En conclusion, la plante étudiée montre des effets pharmacologiques intéressants qui justifient leur utilisation dans la médecine traditionnelle et que des études complémentaires restent nécessaires.

Mots clés : Anti-*Alzheimer*, Anti-diabétique, anti-inflammatoire, antioxydant, *Arctium* Bardane, thérapeutique, toxicité.

المخلص:

خصت الدراسة الحالية لتقييم التأثيرات العلاجية والسمية للمستخلصات الأجزاء الهوائية المختلفة (الأوراق والأزهار) وجذور المستخلصات المائية (BFq، BFRq، BRq، على التوالي)، المستخلصات المائية الكحولية (BFm، BFRm، و BRm، على التوالي) وتلك الخاصة بخلات الإيثيل (BFt، BFRt، و BRt، على التوالي) للنبات المستوطن في الجزائر والمغرب: *Arctium minus. ssp. Atlanticum*. يطلق على هذا النبات عادة "الأرقيطون الصغير" ويعرف في الجزائر باسم الأرقيطون. أظهرت الاختبارات أن الأعضاء المدروسة غنية بالمركبات الفينولية والفلافونويد والتانينات المكثفة، خاصة المستخلصات المائية الكحولية منها. من ناحية أخرى، أظهر التحليل بواسطة HPLC-DAD سيادة المركبات flavan-3-ols، ولا سيما الـ catechin ونظيره الـ epicatechin. الدراسة المخبرية: تم تقييم القدرة الارجاعية بواسطة DPPH و GOR؛ أظهرت جميع المستخلصات المائية الكحولية والمائية و BRt نشاطاً كبيراً مضاداً للجذور الحرة. تم الحصول على النشاط المثبط لأوكسدة الدهون فقط بتركيز عالية (ميكروغرام / مل 76.30 ± 1.66 IC₅₀). كانت قدرة ارجاع النحاس CUPRAC لـ BFRm هي الأكثر فاعلية (ميكروغرام / مل 31.13 ± 2.29 IC₅₀). جميع المستخلصات منعت تحلل الـ BSA بشكل ملحوظ بنسبة 47.45-67.44%. تم تقدير النشاط المضاد للزهايمر بواسطة اختبار تثبيط كل من acetylcholinesterase (AChE)، وbutyrylcholinesterase (BuChE): أظهرت معظم المستخلصات ضعف النشاط المثبط للأستيل كولين استراز (AChE)، ونشاط مثبط معتدل إلى مرتفع لـ butyrylcholinesterase (BChE)، بينما كان لـ BFt أعلى نشاط مثبط لـ BChE (72.87 ± 6.48 %). مقارنة بالمستخلصات الأخرى. تم تقييم النشاط المضاد لمرض السكري عن طريق تثبيط α -amylase: كان BRt هو الأقوى والأكثر فعالية حتى من الأكاربوز المستخدم كمرجع (ميكروغرام / مل 370.96 ± 43.23 ، IC₅₀ = 3650.93 ± 10.70 ، على التوالي). في الجسم الحي تم تقييم السمية الحادة على الفئران باتباع علامات السمية لمدة 14 يوماً (اختبار الحد الأقصى): أظهر تناول 5 غ/كغ من المستخلصات المختلفة عن طريق الفم سمية منخفضة جداً ($LD_{50} > 5g / Kg$). تمكن هذه البيانات من تصنيف النبتة المدروسة في فئة النباتات غير السامة التي يكون تناولها عن طريق الفم آمناً. أبرزت النتائج التي تم الحصول عليها وجود تأثيرات دوائية جديدة لم يتم ذكرها في الدراسات الطب التقليدي السابقة. في الختام، أظهرت النبتة المدروسة تأثيرات دوائية مثيرة للاهتمام تبرر استخدامها في الطب التقليدي، كما أن إجراء دراسات تكميلية يعتبر ضرورياً.

الكلمات المفتاحية: دوائية، السمية، مضادات الأوكسدة، الزهايمر، مضادات الالتهاب، داء السكري، الأرقيطون.

ABSTRACT

The present study was designated for the evaluation of the therapeutic and toxic effects of the aqueous extracts of different aerial parts (leaves and flowers) and roots (BFq, BFRq, and BRq, respectively), hydromethanolic extracts (BFm, BFRm, and BRm, respectively) and those of ethyl acetate (BFt, BFRt, and BRt, respectively) of the plant endemic to *Algeria* and *Morocco*: *Arctium minus*. ssp. *Atlanticum*, commonly called "little burdock" and known in *Algeria* as *Arkatioune*. The assays showed that the different studied organs are rich in polyphenols, flavonoids, and condensed tannins, in particular their hydro-alcoholic extracts. On the other hand, analysis by HPLC-DAD showed the predominance of flavan-3-ols, in particular catechin and its isomer epicatechin. *In vitro*: scavenging potential was assessed by DPPH and GOR; all hydro-alcoholic, aqueous, and BRt extracts showed considerable antiradical activity. Lipid peroxidation inhibitory activity was obtained only at high concentrations ($IC_{50} > 76.30 \pm 1.66$ [$\mu\text{g/mL}$]). The copper reducing power CUPRAC of BFRm was the most potent ($IC_{50} = 31.13 \pm 2.29$ [$\mu\text{g/mL}$]). All extracts prevented BSA denaturation significantly with 47.45-67.44%. Anti-Alzheimer activity was estimated by acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) inhibition: Most of the extracts showed weak acetylcholinesterase (AChE), and moderate to high butyrylcholinesterase (BChE) inhibitory activity, while BFt had the highest inhibitory activity on BChE (72.87 ± 6.48 %) compared to the other extracts. Antidiabetic activity was assessed by alpha-amylase inhibition: BRt was the most potent and even more potent than acarbose used as standard ($IC_{50} = 370.96 \pm 43.23$ and 3650.93 ± 10.70 $\mu\text{g/mL}$, respectively). *In-vivo*: the evaluation of acute toxicity is carried out on mice by following the signs of toxicity for 14 days (limit test): oral administration of 5g/Kg of the various extracts showed very low toxicity ($LD_{50} > 5\text{g/Kg}$). These data make it possible to classify the plant in the category of non-toxic plants whose oral administration is safe. Obtained results highlighted new pharmacological effects that have not been mentioned in the literature on traditional medicine. In conclusion, the studied plant shows interesting pharmacological effects which justify their use in traditional medicine and that complementary studies remain necessary.

Keywords: Anti-Alzheimer, anti-diabetic, anti-inflammatory, antioxidant, *Arctium Burdock*, therapeutics, toxicity.

LISTE DES ABREVIATIONS

A	Absorbance
ADN	Acide désoxyribonucléique
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AIS	Anti-inflammatoires stéroïdiens
Al	Aluminium
ARN	Acide ribonucléique
Aβ	Bêta-amyloïde
ACh	Acétylcholine
ACE	Équivalent d'acarbose
APG	Groupe de phylogénie des angiospermes
APR	Pouvoir antiradicalaire
ASB	Albumine du sérum bovin
AChE	Acétylcholinestérase
ACI	iodure d'acétylthiocholine
BuChE	Butyrylcholinestérase
BHA	Butyl hydroxyl anisole
BuCI	iodure de butyrylthiocholine
CAT	Catalase
CE₅₀	Concentration effectrice à 50%
CI₅₀	Concentration inhibitrice de 50%
COX	Cyclooxygénase
Cu	Cuivre
CUPRAC	Capacité antioxydante de réduction des ions cuivriques
DTNB	5,5 0- dithiobis-2- acide nitrobenzoïque
EMA	Agence Européenne des Médicaments
ES COP	Coopérative Scientifique Européenne de Phytothérapie
EqAG	Équivalent d'acide gallique
EqC	Équivalent de catéchine
EqQ	Équivalent de quercétine
GOR	Radical galvinoxyl
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion réduit
HPLC-DAD	Chromatographie liquide haute performance à barrette de diode
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
ICAM	Molécule d'adhésion intercellulaire
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF-κB	Factor nucléaire <i>kappa</i> B

N	Concentration équivalent (normalité)
Nc	Néocuproïne
NO[•]	Monoxyde de nitrogène
O₂^{•-}	Superoxyde
OCDE	Organisation pour la Coopération et le Développement Economique
OH[•]	Radical hydroxyle
ONOO⁻	Peroxynitrite
Q	Coenzyme
PAF	Facteur d'activation plaquettaire
PMN	Polynucléaires neutrophiles
RNS	Reactive nitrogen species (Espèce réactive d'azote)
ROS	Reactive oxygen species (Espèce réactive d'oxygène)
SOD	Superoxyde dismutase
SD	Écart type
SEM	Erreur standard de la moyenne
UV	Ultraviolet
VCAM	Molécule d'adhésion vasculaire
Vit	Vitamine
XO	Xanthine oxydase
BFm	Extrait méthanolique des feuilles de la Bardane
BFRm	Extrait méthanolique des fleurs de la Bardane
BRm	Extrait méthanolique des racines de la Bardane
BFq	Extrait aqueux des feuilles de la Bardane
BFRq	Extrait aqueux des fleurs de la Bardane
BRq	Extrait aqueux des racines de la Bardane
BFt	Extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de la Bardane
BFRt	Extrait d'acétate d'éthyle des fleurs de la Bardane
BRT	Extrait d'acétate d'éthyle des racines de la Bardane

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Biosynthèse des Métabolites secondaires.....	5
Figure 2. Structure de quelques terpénoïdes.....	6
Figure 3. Structure de base typique des alcaloïdes.....	6
Figure 4. Différents catégories de polyphénols.....	8
Figure 5. Structure basique des flavonoïdes.....	10
Figure 6. Illustration botanique de la partie aérienne d' <i>Arctium minus</i> (Hill).....	14
Figure 7. Les maladie liées au stress oxydatif.....	20
Figure 8. La réaction inflammatoire aigue.....	26
Figure 9. Processus inflammatoire aigu à auto-résolution.....	27
Figure 10. Les médiateurs cellulaires et vasculaires de l'inflammation.....	28
Figure 11. Les implications pathologiques de l'inflammation chronique.....	29
Figure 12. Principales étapes pharmacocinétiques.....	35
Figure 13. Formes d'intoxication.....	35
Figure 14. Photographies d' <i>Arctium minus</i> . ssp. <i>Atlanticum</i>	37
Figure 15. Droites d'étalonnages de l'acide gallique, la quercétine et de la catéchine.....	43
Figure 16. La forme radicalaire et la forme réduite de DPPH.....	44
Figure 17. Structure chimique de la forme radicalaire du galvinoxyl.....	45
Figure 18. Mécanisme de réaction de la capacité antioxydante réductrice du cuivre (CUPRAC).....	47
Figure 19. Chromatogrammes HPLC de l'extrait aqueux des racines d' <i>A.minus</i> à différentes longueurs d'ondes.....	60
Figure 20. Chromatogrammes HPLC de l'extrait hydrométhanolique des racines d' <i>A.minus</i> à différentes longueurs d'ondes.....	61
Figure 21. Chromatogrammes HPLC de l'extrait aqueux des feuilles d' <i>A.minus</i> à différentes longueurs d'ondes.....	62
Figure 22. Chromatogrammes HPLC de l'extrait hydrométhanolique des feuilles d' <i>A.minus</i> à différentes longueurs d'ondes.....	63
Figure 23. Chromatogrammes HPLC de l'extrait aqueux des fleurs d' <i>A.minus</i> à différentes longueurs d'ondes.....	64
Figure 24. Chromatogrammes HPLC de l'extrait hydrométhanolique des fleurs d' <i>A.minus</i> à différentes longueurs d'ondes.....	65

Figure 25. Activité du piégeage du radical libre DPPH	75
Figure 26. Activité du piégeage du radical libre GOR.....	78
Figure 27. Activité antioxydante dans le système β -carotène/acide linoléique.....	80
Figure 28. Capacité antioxydante réductrice du cuivre (CUPRAC).....	84
Figure 29. Activité d'inhibitrice de la dénaturation de l'albumine du sérum bovin (ASB).....	86
Figure 30. Activité inhibitrice de l'alpha-amylase	89
Figure 31. Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE)	93
Figure 32. Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase (BuChE)	93

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Cytokines impliquées dans différentes pathologies.....	30
Tableau 2. Données des composée étalons utilisés pour l'identification HPLC-DAD-UV.....	40
Tableau 3. Classes de toxicité selon l'échelle de <i>Diezi</i> chez les souris de laboratoire.....	51
Tableau 4. Rendement d'extraction des différents extraits testés d' <i>Arctium minus</i> . ssp. <i>atlanticum</i>	54
Tableau 5. Composés polyphénoliques dans les différents extraits bruts étudiés d' <i>Arctium minus</i> . ssp. <i>atlanticum</i> , identifiés et quantifiés par HPLC.....	56
Tableau 6. Teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés des différents extraits d' <i>Arctium. Minus</i>	70
Tableau 7. Activité du piégeage du radical libre DPPH	74
Tableau 8. Valeurs des CI50, CE50 et PAR des différents extraits et standards relatives au test DPPH.....	75
Tableau 9. Activité du piégeage du radical libre GOR	77
Tableau 10. Activité antioxydante dans le système β -carotène/acide linoléique,.....	79
Tableau 11. Capacité antioxydante réductrice du cuivre (CUPRAC)	82
Tableau 12. Activité d'inhibitrice de la dénaturation de l'albumine du sérum bovin (ASB).....	86
Tableau 13. Activité inhibitrice de l'alpha-amylase	89
Tableau 14. Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BuChE)	92
Tableau 15. Taux de mortalité des souris traitées par les différents extraits aqueux d' <i>Arctium minus</i>	96

SOMMAIRE

Dédicaces.....	i
Remerciements.....	ii
Résumé.....	iii
ملخص.....	iv
Abstract.....	v
Abréviations.....	vi
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux.....	x
INTRODUCTION.....	1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. MÉTABOLISME SECONDAIRE.....	4
1.1. Définition et fonctions	4
1.2. Classification.....	5
1.2.1. Terpénoïdes.....	5
1.2.2. Alcaloïdes.....	6
1.2.3. Polyphénols.....	7
1.2.3.1. Classification des polyphénols.....	8
1.2.3.2. Activités biologiques des polyphenols.....	11
2. MONOGRAPHIE D'ARCTIUM MINUS. ssp. ATLANTICUM... ..	13
2.2. Caractéristiques botaniques.....	13
2.2.1. Nomenclature	13

2.2.2. Description botanique	13
2.2.3. Classification taxonomique.....	14
2.3. Habitat et répartition géographique.....	15
2.4. Utilisation en médecine traditionnelle.....	15
2.5. Activités biologiques.....	16
2.6. Phytochimie.....	17
2.7. Toxicité de la plante.....	17
3. STRESS OXYDANT	18
3.1. Définition.....	18
3.2. Formes de ROS et de RNS	18
3.3. Sources de ROS et RNS	19
3.3.1. Sources exogènes.....	19
3.3.2. Sources endogènes.....	19
3.4. Rôles biologiques des ROS et RNS.....	19
3.5. Cibles moléculaires des ROS et RNS.....	20
3.6. Implications pathologiques du stress oxydatif.....	20
3.6.1. Alzheimer.....	21
3.6.2. Diabète.....	22
3.6.2.1 Principaux types de diabète.....	22
3.6.2.2 Traitement du diabète.....	22
3.7. Système de défense contre le stress oxydatif.....	23
3.7.1. Antioxydants enzymatiques.....	24
3.7.1.1. Superoxyde dismutase (SOD).....	24
3.7.1.2. Catalase (CAT).....	24

3.7.1.3. Glutathion peroxydase (GPx).....	24
3.7.2. Antioxydants non-enzymatiques.....	24
4. INFLAMMATION.....	24
4.1. Inflammation aigue	25
4.1.1. Phase vasculaire.....	25
4.1.2. Phase cellulaire	25
4.1.3. Phase de résolution.....	25
4.2. Inflammation chronique	26
4.3. Médiateurs de l'inflammation.....	28
4.4. Pathologies inflammatoires.....	29
4.5. Traitement de l'inflammation.....	29
4.5.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	30
4.5.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens.....	31
4.5.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale.....	31
5. TOXICITÉ.....	32
5.1. Substances toxiques.....	32
5.2. Effet toxique.....	33
5.3. Formes d'intoxication.....	33
5.3.1. La toxicité aiguë (court durée).....	33
5.3.1.1. Dose létale DL50.....	34
5.3.1.2. Détermination de DL50.....	34
5.3.1.3. Différentes méthodes de détermination de la DL50.....	34
5.3.2. La toxicité subaiguë.....	34
5.3.3. La toxicité à long terme.....	34

Matériel et méthodes

1. MATERIEL	36
1.1. Matériel végétal	36
1.2. Animaux	36
1.3. Réactifs chimiques et équipements	37
1.3.1. Réactifs chimiques	37
1.3.2. Équipements.....	38
2. METHODES	38
2.1. Étude phytochimique	38
2.1.1. Préparation des extraits aqueux bruts	38
2.1.2. Préparation des extraits hydrométhanoliques bruts.....	38
2.1.3. Extraction des flavonoïdes.....	39
2.1.4 . Calcul de rendement.....	39
2.1.5. Analyse quantitative.....	39
2.1.5.1. Caractérisation phytochimique par chromatographie analytique (HPLC-DAD-UV).....	39
2.1.5.2. Dosage des polyphénols totaux	41
2.1.5.3. Dosage de flavonoïdes.....	41
2.1.5.4. Dosage des tanins.....	42
2.2. Étude des propriétés biologique	43
2.2.1. Évaluation de l'activité antioxydante	43
2.2.1.1. Effet piègeur du radical libre DPPH•.....	43
2.2.1.2. Effet piègeur du radical libre galvinoxyl (GOR)	44
2.2.1.3. Test de blanchiment du β carotène.....	46

2.2.1.4. Capacité antioxydante de réduction des ions cuivriques (CUPRAC).....	46
2.2.2. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro	48
2.2.3. Évaluation de l'activité anti-Alzheimer in vitro.....	48
2.2.4. Évaluation de l'activité antidiabétique in vitro.....	49
2.3. Étude toxicologique (toxicité aiguë par l'essai limite).....	50
2.4. Analyses statistiques.....	52

Résultats et discussion

1. Analyse phytochimique.....	53
1.1. Rendement d'extraction.....	53
1.2. Profilage chromatographique des composés phénoliques des extraits bruts.....	56
1.2.1. Profile chimique de l'extrait aqueux des racines d'A.minus (BRq)	57
1.2.2. Profile chimique de l'extrait hydrométhanolique des racines d'A.minus (BRm).....	57
1.2.3. Profile chimique de l'extrait aqueux des feuilles d'A.minus (BFq).....	58
1.2.4. Profile chimique de l'extrait hydrométhanolique des feuilles d'A.minus (BFm).....	58
1.2.5. Profile chimique de l'extrait aqueux des fleurs d'A.minus (BFRq).....	59
1.2.6. Profile chimique de l'extrait hydrométhanolique des fleurs d'A.minus (BFRm).....	59
1.3. Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés.....	69
2. Étude de l'activité biologique	72
2.1. Évaluation de l'activité antioxydante	72
2.1.1. Effet piègeur du radical libre DPPH•	74
2.1.2. Effet piègeur du radical libre Galvinoxyl•.....	76
2.1.3. Test de blanchissement du β carotène	78
2.1.4. Pouvoir réducteur.....	82

2.2. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire (Test d'inhibition de la dénaturation des protéines).....	85
2.3. Evaluation de l'activité inhibitrice de l'alpha-amylase.....	88
2.4. Evaluation de l'effet neuroprotecteur	92
3. Étude toxicologique (Étude de la toxicité aiguë par l'essai limite).....	95
Conclusion.....	98
Références.....	100
Annexe	

INTRODUCTION

La diversité des molécules biologiques des organismes naturels représente toujours une référence de départ pour promouvoir les nouvelles formulations thérapeutiques, et c'est justement que dans cette logique que la gestion durable des ressources naturelles telle que les plantes médicinales traditionnelles s'impose de plus en plus comme étant une alternative prometteuse. En effet, la littérature thérapeutique ne cesse de témoigner le rôle inéluctable des plantes dans la conception des nouvelles thérapies. En plus, l'expérience de la médecine ancestrale s'avère précieuse quant à l'identification d'éventuelles espèces végétales ciblées ou des parties particulières de celles-ci (Newman et Cragg, 2007).

La recherche des biomolécules naturelles et en particulier celles de nature phénolique est très accentuées dans ces dernières années grâce à leur caractère économique et les vertus thérapeutiques qu'elles procurent en mettant en œuvre un large panel de molécules bioactives élaborées par la plante. D'autre part, cette recherche est motivée plus que jamais grâce à leur faible toxicité en comparaison avec les médicaments conventionnels (de synthèse) ayant souvent des effets secondaires et qui pourraient entraîner des séquelles néfastes et irréversibles, en citant, à titre d'exemple : l'acide acétylsalicylique, Diclofénac, Butyl-hydroxy-anisole (BHA), Butyl-hydroxytoluène (BHT)...etc. (Auddy et *al.*, 2003). En effet, L'échec des approches chimiques conventionnelles, la multiplicité des effets secondaires qui leur sont associés, le coût parfois exorbitant des médicaments et le déficit en infrastructures adéquates à la bonne prise en charge sanitaires, font qu'une bonne partie de la population mondiale dépend essentiellement de la phytothérapie pour se soigner. Ces avantages font que cette dernière devient décidément, une médecine naturelle par excellence (Eddouks et *al.*, 2007).

Le stress oxydant et l'inflammation sont à l'origine de plusieurs maladies humaines. En effet, il est actuellement admis que de nombreuses maladies sont dues à un stress oxydatif qui résulte d'un déséquilibre entre la formation et la détoxification des pro-oxydants. Une production excessive ou incontrôlée d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'espèces réactives de l'azote (RNS) peut endommager les acides nucléiques, les protéines et les lipides, ce qui est étroitement associé à la pathogenèse de maladies humaines telles que le cancer, les maladies auto-immunes telle que le diabète type I, la polyarthrite rhumatoïde, le vieillissement, les troubles cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives, en l'occurrence l'Alzheimer. Dans des conditions physiologiques, l'accumulation cellulaire de ROS et de RNS est contrôlée par une batterie de systèmes de défense antioxydants endogènes redondants, à la fois enzymatiques et non enzymatiques. Pour renforcer le système antioxydant spontané qui peut

échouer dans certaines conditions, la consommation d'antioxydants naturels provenant de divers compléments alimentaires et de médicaments traditionnels est nécessaire. Dans ce contexte justement, les plantes médicinales pourraient avoir un potentiel antioxydant considérable pour la protection contre le stress oxydatif (Aouachria, 2018).

L'inflammation est un fléau qui entraîne de nombreuses maladies. Le processus inflammatoire implique de nombreux médiateurs chimiques pro ou anti-inflammatoires qui peuvent entretenir ou modifier la réponse inflammatoire. Les cytokines pro-inflammatoires initient une cascade de production d'un grand nombre d'autres médiateurs impliqués dans le maintien du processus inflammatoire. Une production excessive de ces médiateurs conduit le plus souvent à une activation inappropriée des cellules inflammatoires, générant alors des lésions tissulaires graves associées avec le développement de plusieurs pathologies inflammatoires et auto-immunes. Les maladies inflammatoires chroniques sont la troisième cause de la mortalité, après les affections cardiovasculaires et les cancers. Une modulation thérapeutique à différentes étapes de l'inflammation et de la production de ses médiateurs, afin d'empêcher l'activation inappropriée des cellules inflammatoires, a été envisagée et constitue la cible privilégiée de plusieurs molécules anti-inflammatoires. Tenant compte des inconvénients que le traitement anti-inflammatoire synthétique pourrait avoir, la phytothérapie s'y impose comme une alternative avec des effets secondaires moindres (Kernouf, 2019).

La flore algérienne compte plus de 3000 espèces de plantes dont 15% sont endémiques (Quezel et Santa, 1962). Ce potentiel floristique, d'intérêt thérapeutique a encouragé les scientifiques à explorer ces ressources sur le plan phytochimique ainsi que sur le plan pharmacologique (Arunkumar et al., 2009). En effet, les métabolites secondaires étant un axe de recherche d'actualité, font l'objet de plusieurs recherches. A titre indicatif, ces biomolécules sont dotés de propriétés pharmacologiques impressionnantes. Par ailleurs, les polyphénols, constituent un groupe très diversifié de biomolécules dont plusieurs sont thérapeutiquement hyperactives étant qu'antioxydants et anti-inflammatoires pour contrer les répercussions des radicaux libres responsables de plusieurs affections chroniques (Bouden, 2019).

L'identification des substances biologiquement actives et la mise en évidence des propriétés pharmacologiques des plantes Algériennes utilisées dans la médecine traditionnelle est un sujet d'intérêt pour notre groupe de recherche. Il s'agit de la plante endémique de l'Algérie et du Maroc: *Arctium minus* (Hill) Bernh. ssp. *atlanticum* (Pomel) Maire. L'espèce choisie est appelée communément "la petite bardane" connue en Algérie sous le nom d'*Arkatioune* et appartient à la famille des Astéracées.

Le choix de l'espèce étudiée ne résulte pas du hasard, mais découle de divers critères. Le plus important est celui de la pénurie voir l'absence des études phytochimiques et/ou biologiques sur ladite plante. En effet, La pharmacopée a signalé l'utilisation fréquente de l'espèce *Arctium lappa*, communément appelée "grande bardane" et dans une moindre mesure, *Arctium minus* dite "petite bardane"(Wang et *al.*, 2019). En revanche, aucune recherche portant sur les effets biologiques n'a été menée sur la sous-espèce *atlanticum* d'*A.minus*. Par conséquent, nous avons jugé indispensable d'explorer cette variété d'*A.minus* par rapport à sa composition chimique et à ses effets biologiques.

Sur la base de cette hypothèse, cette étude s'est attelée à :

- Investigation phytochimique ;
 - Préparation des extraits des différentes parties de la plante et calcul du rendement.
 - Caractérisation du profil des polyphénols des extraits par chromatographie liquide à haute performance-détecteur à barrette de diodes/ (HPLC DAD).
 - Evaluation de la teneur totale en polyphénols, en flavonoïdes et en tannins.
- Etude de l'activité biologique ;
 - Evaluation du potentiel antioxydant par différentes méthodes.
 - Evaluation de l'effet anti-inflammatoire *in vitro*.
 - Evaluation de l'effet neuroprotecteur *in vitro* ;
 - ✓ Le potentiel Anticholinestérasique.
 - Evaluation de l'effet antidiabétique *in vitro* ;
 - ✓ L'activité inhibitrice de l' α -amylase.
- Etude toxicologique ;
 - Etude de la toxicité aigüe par l'essai limite.

Nous couronnons notre travail par une conclusion dans laquelle nous situons notre contribution par rapport aux travaux antérieurs.

REVUE

BIBLIOGRAPHIQUE

1. MÉTABOLISME SECONDAIRE

Dans la nature, deux principaux groupes de métabolites peuvent être rencontrés : les métabolites primaires et secondaires. Les métabolites primaires sont des composés universels qu'on trouve chez tous les organismes vivants sans exception. En l'occurrence, les glucides, les lipides, les protéines et les acides nucléiques. Par contre, les métabolites secondaires se trouvent uniquement chez certains organismes, les plantes médicinales en font parties. En effet, les plantes dites "médicinales" possèdent des caractéristiques thérapeutiques et des propriétés médicinales remarquables. Compte tenu de leur diversité en matière de métabolites secondaires et du large spectre d'effets pharmacologiques qu'elles présentent, les plantes médicinales sont vues comme mine d'or biochimiques (Bakkali et *al.*, 2008). Ce processus de synthèse des métabolites secondaires est lié aux conditions mêmes de vie de la plante, la plante étant obligée à contrer plusieurs agressions provenant de son environnement : prédateurs, microorganismes pathogènes, etc. On spéculé donc que la plante est en mesure de concevoir un métabolisme spécifique lui permettant d'élaborer les composés les plus variés pour se protéger (Kansole, 2009).

1.1. Définition et fonctions

Le terme "métabolite secondaire" désigne différentes molécules organiques complexes synthétisées par les plantes autotrophes (Guillaume et Charrouf, 2005 ; Boudjouref, 2008). Le métabolisme secondaire qui semble être une exclusivité du monde végétal est très dispersé et très diversifié chez les différentes espèces. Il désigne un métabolisme dont la distribution taxonomique serait restreinte et dont la contribution au fonctionnement cellulaire ou au développement des plantes serait insignifiante. Autrement dit, les métabolites secondaires ne sont pas vitaux pour l'organisme mais jouent nécessairement un rôle important de par la machinerie enzymatique complexe nécessaire à leur production (Guignard, 1996).

En effet, bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires (Krief, 2003). Ces derniers représentent donc une grande source potentielle d'agents thérapeutiques. Ils pourraient jouer plusieurs rôles dont la défense contre les herbivores ravageurs et les agents pathogènes, l'allopathie (compétition plante-plante), la symbiose plante-microbe au niveau des nodules racinaires et même la couleur, l'odeur et le

gout. Ils peuvent donc servir d'attractifs pour les pollinisateurs (**Figure 1**). Il en existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique (Thomas, 2009).

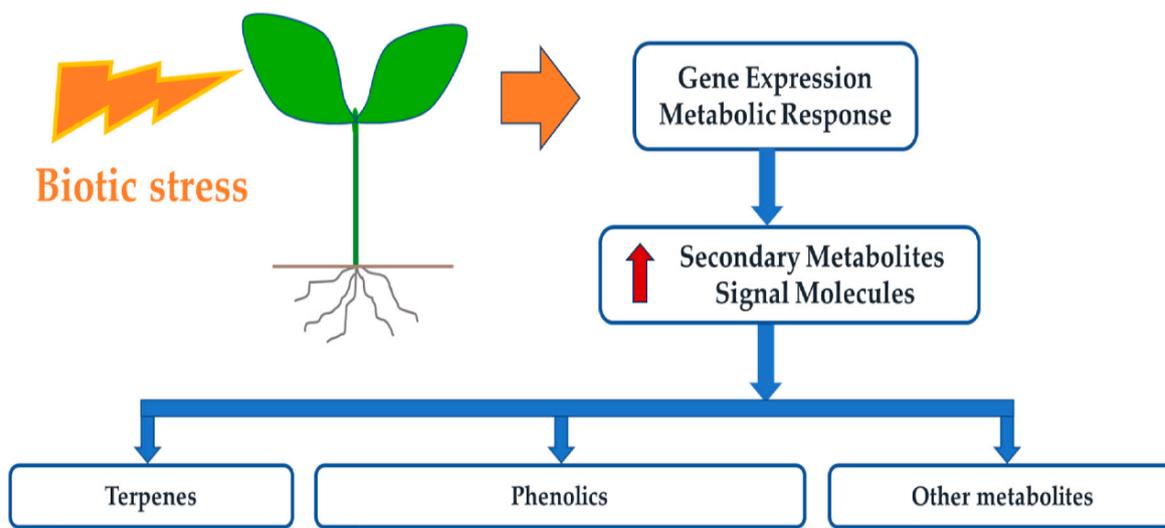


Figure 1. Biosynthèse des métabolites secondaires (Vergine et *al.*, 2020)

1.2. Classification

Les métabolites secondaires sont composés de trois principales catégories qui sont les terpénoïdes, les alcaloïdes (ou composés azotés) et les composés phénoliques. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (Havsteen et *al.*, 2002).

1.2.1. Terpénoïdes

Le terme terpène inventé par *Kekulé*, vient de leur origine historique de l'arbre de *terebinth* : "*Pistacia Terebinthus*" (Ayad, 2008). Le terme de terpénoïde est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène (**Figure 2**). Avec plus de 25 000 composés, les terpènes sont la classe la plus nombreuse de métabolites secondaires. Ils sont caractérisés par une nature volatile et une forte odeur. Ils vont donner aux fleurs les parfums qui les caractérisent. De plus, ils ont beaucoup d'autres fonctions au niveau de la photosynthèse (constituant de la chlorophylle), de la photoprotection (caroténoïde) ou encore au niveau de la pigmentation et de la capacité antioxydante en tant que constituant de la vitamine A. Certaines études ont montré la relation entre la lumière et la synthèse de terpène. La voie de biosynthèse des terpénoïdes donne naissance à de très nombreux métabolites secondaires, mais participe également à la synthèse de composés comme le β - carotène, les chlorophylles, l'ubiquinone ou la plastoquinone, qu'on ne positionne généralement pas dans le métabolisme secondaire (Bruneton, 1991).

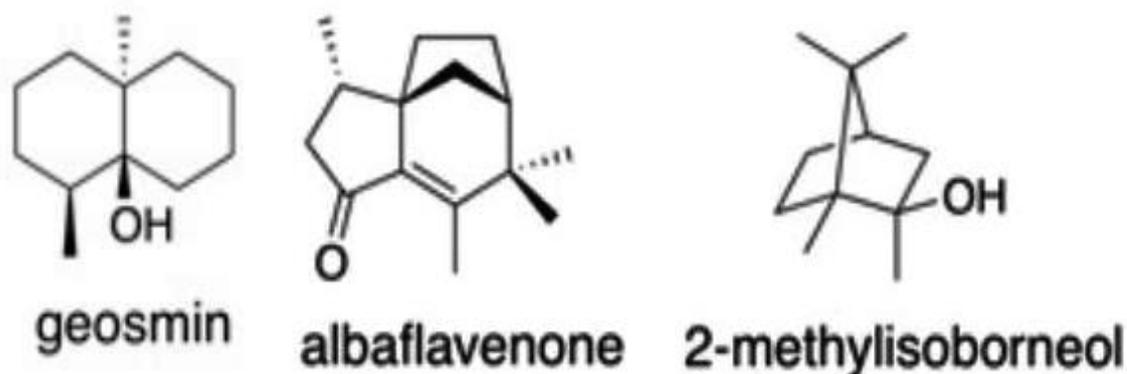


Figure 2. Structure de quelques terpénoïdes (Yamada et *al.*, 2015)

1.2.2. Alcaloïdes

Le terme "alcaloïde" a été introduit par *W. Meisner* au début du XIX^{ème} siècle. Un alcaloïde est une substance organique azotée d'origine végétale à caractère alcalin et présentant une structure moléculaire hétérocyclique complexe (Badiaga, 2011) Les alcaloïdes sont des composés azotés et faiblement basiques issus principalement des végétaux (**Figure 3**). Ils présentent des réactions communes de précipitation. Après extraction, ils sont détectés par des réactions générales de précipitation fondées sur leur capacité de se combiner avec des métaux. Les propriétés médicamenteuses des alcaloïdes font de ce groupe de métabolites secondaires un intérêt particulier. Au niveau du système nerveux central ils agissent comme dépresseurs (morphine, scopolamine) ou comme stimulants (caféine, strychnine,...etc.). Au niveau du système nerveux autonome comme sympathomimétiques (éphédrine), anticholinergiques (atropine). Certains jouent le rôle d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'antipaludiques (quinine) (Kansole, 2009).

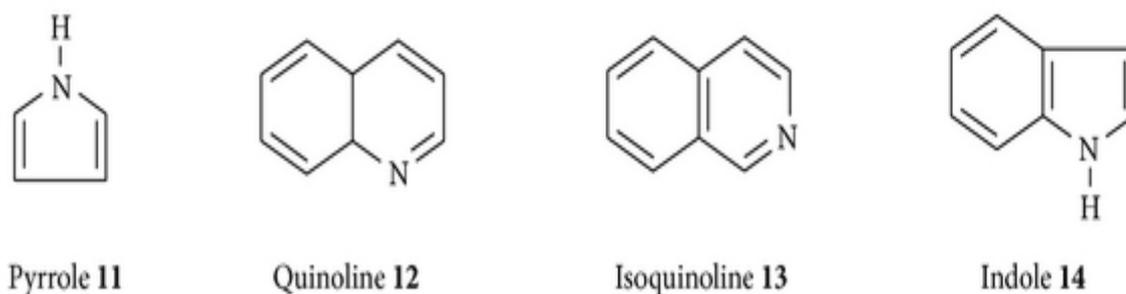


Figure 3. Structure de base typique des alcaloïdes (Achilonu et Umesiobi, 2015)

1.2.3. Polyphénols

Les polyphénols constituent l'un des groupes les plus importants de métabolites secondaires des plantes. Ils sont largement répandus dans le règne végétal. Environ 10 000 composés naturels appartiennent à la catégorie des "phénoliques", qui possèdent tous une caractéristique structurale commune : un cycle aromatique portant au moins un substituant hydroxyle. À partir de cette structure de base, plusieurs milliers de composés d'origine naturelle ont été décrits, des simples acides phénoliques aux composés hautement polymérisés tels que les tanins (Ramawat et Mérillon, 2013). Les polyphénols sont définis en fonction de la nature de leur squelette carboné, des schémas d'hydroxylations, de l'existence de stéréoisomères et des états d'oxydation, de glycosylation (des flavonoïdes) et d'acylation (des acides phénoliques) des cycles hétérocycliques. La teneur en polyphénols des plantes varie entre 1 et 3 mg/kg et est influencée par le cultivar, la maturité, la partie de la plante, les conditions de culture, la transformation et le stockage (Martinez et *al.*, 2014).

Les polyphénols sont synthétisés sous forme de composés solubles ou liés aux parois cellulaires pendant la croissance des plantes et surtout en réponse à des conditions telles que les infections, les blessures, les rayons UV, etc. (Ramawat et Mérillon, 2013). Ils sont biosynthétisés par plusieurs voies différentes dont deux voies de base sont impliquées : la voie de l'acide shikimique et celle de l'acide malonique (Mandal et *al.*, 2010).

Les polyphénols assurent de multiples fonctions intracellulaires. Ils protègent les plantes contre le rayonnement UV, en agissant comme un écran à l'intérieur de la couche cellulaire épidermique, et en effectuant des ajustements aux systèmes antioxydants à la fois au niveau des cellules et de l'organisme entier (Agati et Tattini, 2010). Ils influencent également les pools et les flux de nutriments inorganiques et organiques du sol (Ramawat et Mérillon, 2013). Les polyphénols jouent un rôle important en servant de signaux visuels en agissant comme des pigments dans les fruits et les fleurs, d'abord pour attirer les animaux en tant que pollinisateurs dans les fleurs, et ensuite pour attirer les animaux à manger les fruits et ainsi aider à la dispersion des graines (Latanzio et *al.*, 2009).

Les substances phénoliques participent souvent à la croissance des plantes. Cela peut être dû à leurs rôles dans les lignifications, dans le développement fonctionnel du pollen, dans la germination et la dormance des graines (Taylor et Grotewold, 2005). Une des fonctions incontestées des polyphénols est leur rôle dans la protection des plantes contre l'invasion microbienne (Mandal et *al.*, 2010). En outre, ils jouent un rôle dans la protection des plantes de l'herbivorie des insectes et des mammifères (Pietta, 2000).

1.2.3.1. Classification des polyphénols

Il existe trois grandes classes de polyphénols : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les autres composés phénoliques (**Figure 4**).

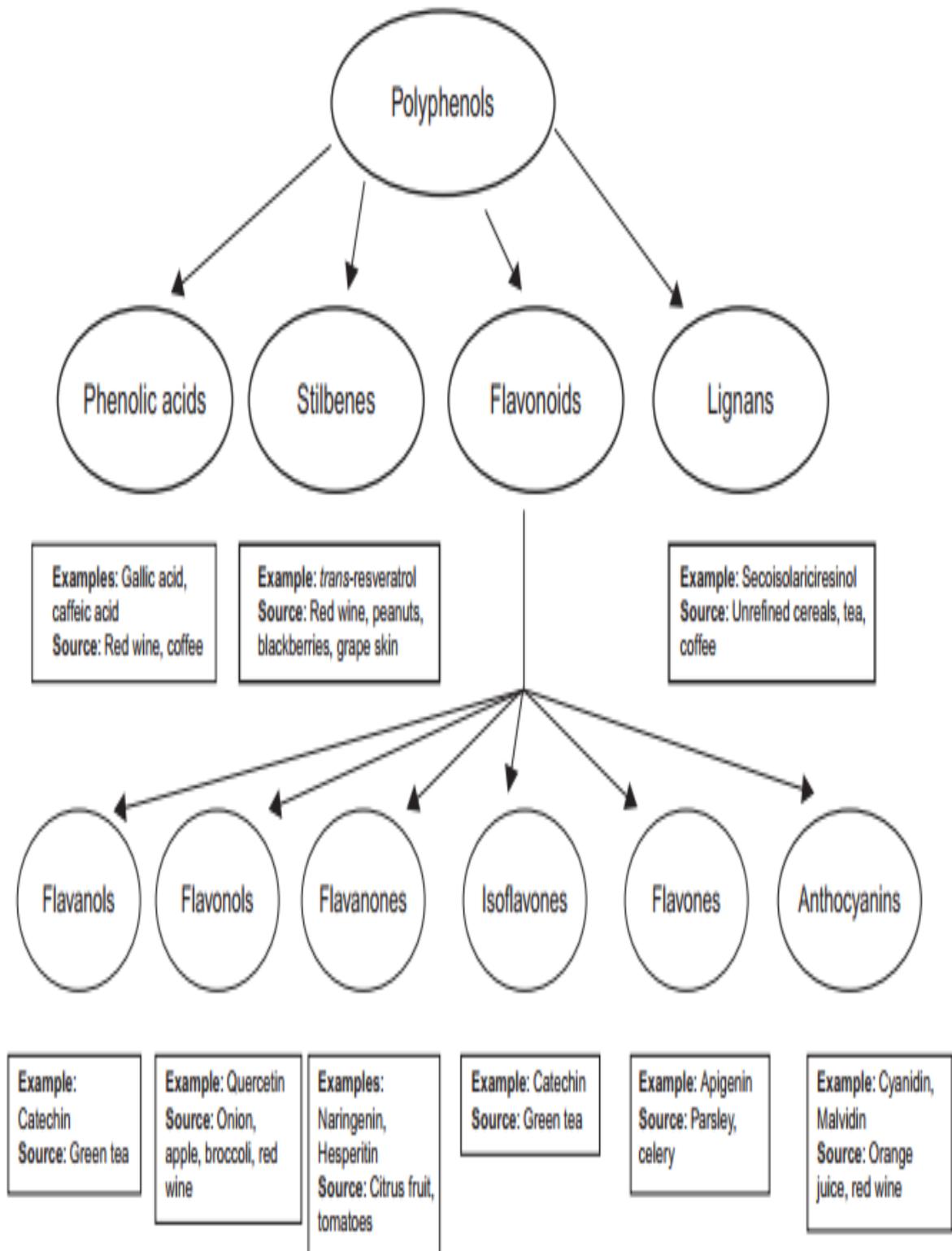


Figure 4. Différentes catégories de polyphénols (Martinez *et al.*, 2014)

A. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont une sous-classe de la catégorie plus large des composés phénoliques, présents dans les plantes alimentaires sous forme d'esters ou de glycosides conjugués à d'autres composés naturels tels que les flavonoïdes, les alcools, les acides gras hydroxylés, les stérols et les glucosides. Du point de vue structurel, les acides phénoliques sont des phénols qui possèdent un fragment d'acide carboxylique qui peut être directement attaché soit au cycle aromatique (dérivés de l'acide benzoïque), soit à un résidu alkyle (dérivés de l'acide hydroxy-cinnamique). Bien que le squelette de base reste le même, les acides phénoliques diffèrent par le nombre et la position des groupes hydroxyle sur le cycle aromatique (Losada-Barreiro et Bravo-Díaz, 2017).

La majorité des acides phénoliques sont liés par des liaisons ester, éther ou acétal soit à des composants structurels de la plante (cellulose, protéines, lignine), soit à des polyphénols plus importants (flavonoïdes), soit à des molécules organiques plus petites (glucose, acides quinique, maléique ou tartrique) ou à d'autres produits naturels (terpènes) (Ramawat et Mérillon, 2013).

B. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent la classe la plus abondante de polyphénols végétaux avec plus de 9000 structures chimiques identifiées. (Wang *et al.*, 2018). Ils partagent un squelette carboné composé de diphenyl-propanes, deux cycles benzéniques (A et B) reliés par une chaîne linéaire à trois carbones. Cette chaîne centrale forme généralement un cycle pyranne fermé (C) avec l'un des cycles benzéniques (**Figure 5**). Selon le degré d'oxydation du cycle C, le schéma d'hydroxylation du noyau, et le substituant du carbone 3, les flavonoïdes peuvent ainsi être classés en différentes sous-classes : les flavones, les isoflavones, les flavanols (catéchines), les flavonols, les flavanones, les anthocyanines et les proanthocyanidines. proanthocyanidines (Losada-Barreiro et Bravo-Díaz, 2017).

Les flavonoïdes sont la classe de polyphénols la plus étudiée. Bien qu'il s'agisse de métabolites secondaires de faible poids moléculaire, leur diversité chimique, leur taille, leur forme tridimensionnelle et leurs propriétés physiques et biochimiques leur permettent d'interagir avec de multiples cibles pour influencer l'activité biologique des plantes, des animaux, des humains et des microbes. Par conséquent, de nombreuses propriétés thérapeutiques ont été attribuées aux flavonoïdes (Francisco *et al.*, 2010).

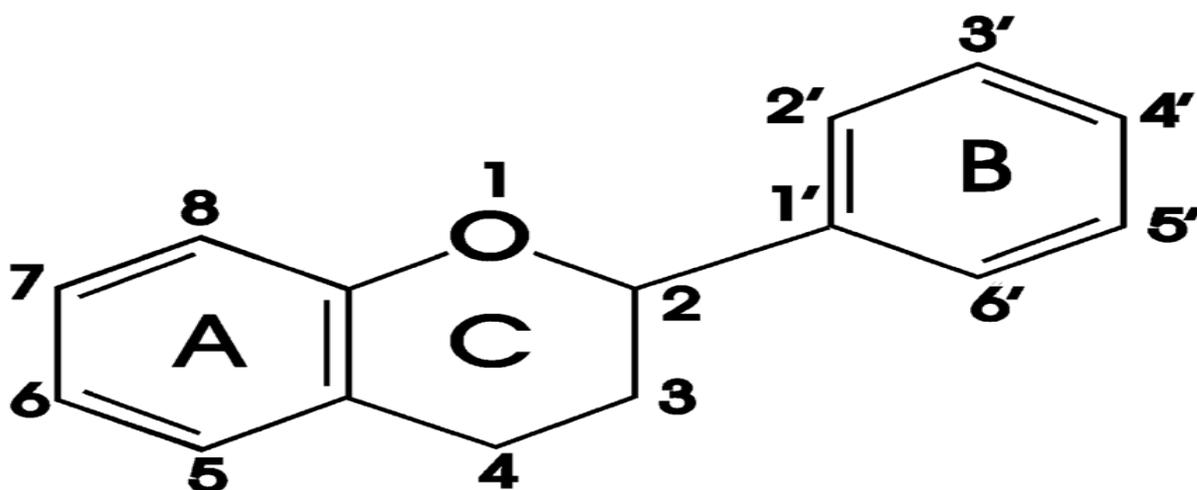


Figure 5. Structure basique des flavonoïdes (Redrejo-Rodriguez et al., 2004)

C. Autres substances phénoliques

Il existe au moins deux grandes classes de tanins : les tanins hydrolysables et non hydrolysables (également appelés condensés), les proanthocyanidines et les procyanidines. Structurellement, les tanins hydrolysables et non hydrolysables sont des oligomères ou des polymères richement hydroxylés d'acides hydroxybenzoïques tels que l'acide gallique ou de flavan-3-ols tels que la catéchine, respectivement. Les tanins condensés de poids moléculaire élevé peuvent contenir 50 sous-unités de flavan-3-ols ou plus attachées par des liaisons carbone-carbone (Selma et al., 2009). Ils sont très astringents et se remarquent dans les fruits non mûrs.

Les stilbènes sont une classe bien connue de substances phytochimiques naturelles. Ils ont une structure classique C6-C2-C6 avec deux groupes hydroxyle sur le cycle A et un sur le cycle B. Les stilbènes sont caractérisés par une odeur et un goût particuliers. Les stilbènes sont caractérisés par une double liaison reliant les cycles phénoliques. Ces composés sont des métabolites de stress produits en réponse à une infection fongique. Bien que connus comme des composés de défense des plantes, les stilbènes ont une énorme diversité d'effets bénéfiques sur la santé humaine. L'un des stilbènes les plus pertinents et les plus étudiés est le resvératrol que l'on trouve en grande partie dans le raisin (Martinez et al., 2014 ; Losada-Barreiro et Bravo-Díaz, 2017).

Les lignanes sont présents dans toutes les plantes et présentent une énorme diversité structurelle, leur squelette moléculaire étant constitué de deux unités phénylpropane (C3-C6). Il existe une très bonne revue récente des effets des lignanes sur la santé. Les lignanes les plus intéressants en raison de leurs nombreux et puissants avantages pour la santé sont le tétrahydrofurofurane et la sésamine (Martinez et al., 2014).

1.2.3.2. Activités biologiques des polyphénols

A. Activité antioxydante

Parmi les bioactivités notables des composés phénoliques, les activités antioxydantes ont été largement étudiées, en particulier leur capacité reconnue à piéger les ROS et les RNS. Cette activité est fréquemment citée comme étant la propriété clé qui procure la prévention et/ou l'allègement des effets nocifs des maladies chroniques liées au stress oxydatif et des troubles liés à l'âge (Quideau et *al.*, 2011).

Les substances phénoliques peuvent également interrompre l'étape de propagation des réactions en chaîne d'autoxydation des lipides en tant que piègeurs de radicaux efficaces ou agir comme chélateurs de métaux pour convertir les hydroperoxydes ou les pro-oxydants métalliques en composés stables. Les polyphénols végétaux peuvent également agir comme antioxydants en chélatant les ions métalliques tels que les ions fer et cuivre qui sont impliqués dans la formation de $\cdot\text{OH}$ par des réactions de type Haber-Weiss/Fenton (Procházková et *al.*, 2011). Ils peuvent réduire l'activité catalytique des enzymes impliquées dans la génération de ROS et de RNS. Enfin, les polyphénols peuvent stimuler les activités antioxydantes d'autres enzymes comme la CAT (Quideau et *al.*, 2011).

Si les composés phénoliques sont de puissants antioxydants, il convient de souligner que lorsqu'une molécule phénolique perd un électron ou lorsqu'elle agit comme agent réducteur, la molécule elle-même devient un radical ; ses intermédiaires oxydés peuvent également devenir des pro-oxydants. L'interaction entre les polyphénols et les ions de métaux de transition peut également entraîner la formation de pro-oxydants (Zhang et Tsao, 2016). Les polyphénols peuvent donc être une arme à double tranchant ; d'une part, lorsqu'ils sont utilisés correctement sous forme d'aliments ou d'aliments fonctionnels, ils sont de puissants antioxydants contre l'excès de stress oxydatif tel que les ROS, donc bénéfiques pour la santé, d'autre part ; ils peuvent présenter une activité pro-oxydante lorsqu'ils sont consommés à haute dose en prenant des suppléments (Bouayed et Bohn, 2010). Le potentiel antioxydant du composé phénolique dépend de l'existence d'une double liaison $\text{C}2=\text{C}3$ en conjugaison avec un groupe $\text{C}4$ -carbonyle, du nombre et de la position des groupes hydroxyles dans la molécule, de la présence de groupes méthoxyles et de la moindre connexion des saccharides (Wang et *al.*, 2018).

B. Activité anti-inflammatoire

Diverses recherches ont montré que différents polyphénols modulent l'activité des enzymes métabolisant l'acide arachidonique comme la cyclooxygénase, la lipoxygénase et la NOS. L'inhibition de ces enzymes réduit la production d'acides aminés, de prostaglandines, de

leucotriènes et de NO qui sont parmi les médiateurs clés de l'inflammation (Hussain et *al.*, 2016). De plus, un grand nombre de polyphénols ont été rapportés pour inhiber l'expression des cytokines pro-inflammatoires, ce qui est couplé dans certains cas à l'augmentation des cytokines anti-inflammatoires. Les polyphénols exercent également leur action bénéfique en modulant l'adhésion des monocytes au cours du processus inflammatoire. Les flavonoïdes peuvent moduler la cascade d'événements moléculaires conduisant à la surexpression des médiateurs inflammatoires. Il s'agit notamment de l'inhibition des facteurs de transcription, des molécules nucléaires, des protéines kinases et des protéines kinases activées par des agents mitogènes (Kim et *al.*, 2014).

C. Activité neuroprotectrice

Récemment, un nombre rapidement croissant de composés polyphénoliques ayant des effets neuroprotecteurs a été décrit. Les effets neuroprotecteurs des polyphénols peuvent être répartis dans les catégories suivantes : **i** : action neuroprotectrice par les voies antioxydantes, **ii** : interaction avec les voies de signalisation, **iii** : neuroprotection par la modulation des médiateurs neuraux et des enzymes comme butyrylcholinestérase et l'acétylcholinestérase, **iv** : inhibition de la neurotoxicité du N-méthyl-D-aspartate et **v** : effet anti-amyloïdogène (Ebrahimi et Schluesener, 2012).

D. Autres activités biologiques

Des preuves croissantes provenant de nombreuses études *in vivo* et *in vitro* soutiennent l'implication des polyphénols, telles que dans l'activité antidiabétique (Kim et *al.*, 2016), la prévention de l'obésité et des maladies chroniques liées à l'obésité (Wang et *al.*, 2014), l'amélioration des lésions hépatiques (Janel et Noll, 2014), l'atténuation de la détérioration de la microarchitecture osseuse (Shen et *al.*, 2014), l'activité protectrice cardiovasculaire (Quinones et *al.*, 2012), les activités anticancéreuses contre un large éventail de cancers (Abdal Dayem et *al.*, 2016), les activités antimicrobiennes et antifongiques (Carvalho et *al.*, 2013).

2. MONOGRAPHIE D'ARCTIUM MINUS. ssp. ATLANTICUM

Arctium minus (Hill) Bernh. ssp. *Atlanticum* (Pomel) Maire, est une plante herbacée bisannuelles de la famille des Astéracées. Ces dernières forment la plus grande famille de plantes à fleurs, avec plus de 900 genres et 14 000 espèces. De nombreux membres des Astéracées sont cultivés depuis plus de 3000 ans comme plantes comestibles, légumes, plantes culinaires et/ou médicinales (Deans et Simpson, 2003). La plupart des membres des Astéracées sont des herbacées, mais un nombre important d'entre eux sont également des arbustes, des vignes ou des arbres. La famille à une distribution mondiale, des régions polaires aux tropiques, colonisant une grande variété d'habitats (Dinde et al., 2000).

La plante étudiée a été choisie selon trois critères : son endémisme (*Algérie, Maroc*) (Bouchibane et al., 2017), l'utilisation en médecine traditionnelle et l'absence des recherches sur cette sous-espèce.

2.2. Caractéristiques botaniques

2.2.1. Nomenclature

L'*Arctium minus* possède plusieurs appellations communes ou vernaculaires à savoir : *Bardane mineure, Artichaut, Rhubarbe sauvage, Rapace, Tabac du diable, Graquias, Toques, Herbe aux teigneux....etc.*

2.2.2. Description botanique

L'*Arctium minus* connue communément sous le nom de "petite bardane" est appelée par les herboristes locaux "*Arkatioune*". Le nom du genre vient du grec "*arcteion*" qui signifie "ours", faisant allusion à l'habitus de la plante caractérisé par une pilosité prononcée (Wang et al., 2019). Elle caractérisée par de petites capitules homogames solitaires ou en corymbe ovoïdes-coniques à sphériques à fleurs tubuleuses, purpurins (rarement blancs), toutes hermaphrodites et semblables, pédonculés, constituant une grappe composée au sommet des rameaux. Les involucre sont subglobuleux à bractées imbriquées sur plusieurs rangs, rigides, se terminant (chez les externes et les moyennes) par un acumen crochu ; les internes scariées à sommet dressé. Les réceptacles sont faits d'écailles nombreuses et dures densément fimbrié. Les akènes noirs tachés de fauve, oblongs, subtriquètres, à aigrette courte de soies inégales et serrulées, jaunes, très caduques et disposées sur plusieurs rangs. Les feuilles sont entières, alternes et inermes (**Figure 6**). L'espèce *Minus* est moins puissante que l'espèce *Lappa*, elle est vivace, à grosse tige striée et rameuse, érigée, cannelée, et rougeâtre. Feuilles pétiolées, blanches-aranéuses en dessous et vertes en dessus ; les radicales cordiformes, les caulinaires largement ovales cordiformes, plus au moins tronquées, mucronées au sommet. La racine est pivotante robuste et érigée (Quézel et Santa, 1962).



Figure 6. Illustration botanique de la partie aérienne d'*Arctium minus*(Hill) (Marie-Victorin, 1964)

2.2.3. Classification taxonomique

Le genre *Arctium* comprend 18 espèces reconnues dont cinq sont considérées comme des espèces hybrides en raison de la reproduction fréquente entre ses représentants allogames. *Arctium.L* est très polymorphe en raison de la variabilité de la pilosité des feuilles et des capitules, de la longueur des pédoncules floraux et de la couleur des capitules et des fleurons. En conséquence, une distinction nette entre ses membres ne peut parfois pas être définie. (Lopez Vinyallonga et *al.*, 2010).

Dans la zone euro-méditerranéenne, on trouve six espèces principales : *A. atlanticum* (Pomel) H. Lindb., *A. lappa* L., *A. minus* (Hill) Bernh., *A. nemorosum* Lej., *A. palladini* (Marcow) R.E.Fr. & Soderb. et *Arctium tomentosum* Mill. (Coopérative Scientifique Européenne de Phytothérapie, 2003).

Selon la classification "*Angiosperm Phylogeny Group IV*" (APG IV) 2016, la position systématique d'*Arctium minus*. Ssp. *Atlanticum* est la suivante :

- Clade : *Spermatophyta*
- Clade : Angiospermes
- Clade : Dicotylédones vraies
- Clade : Asteridées
- Clade : Euastéridées II
- Ordre : Asterales
- Famille : Asteracées
- Genre : *Arctium*
- Espèce : *Minus* (Hill) Bernh
- Sous-espèce : *Atlanticum* (Pomel) Maire

2.3. Habitat et répartition géographique

La plante d'*A. minus*. ssp. *Atlanticum* semble bien adaptée au climat chaud et sec de la région méditerranéenne où elle y pousse à l'état sauvage. Comme c'est une variété endémique de l'*Algérie* et du *Maroc*, elle est répandue essentiellement dans les régions méditerranéenne en l'occurrence : la grande *Kabylie*, la petite *Kabylie* et le sous-secteur de l'*Atlas Tellien* et, à un degré moindre dans la *Numidie* (Quézel et Santa, 1962).

L'*A. minus* est rencontrée au niveau des forêts, lieux ombragés, les terrains vagues, les cours d'eau et les bords de route, (ESCOP, 2003).

2.4. Utilisation en médecine traditionnelle

À notre connaissance, les espèces les plus utilisées à des fins thérapeutiques sont en premier lieu l'*A. lappa*, et dans une moindre mesure, l'*A. minus*. En effet, ces deux espèces sont appréciées depuis des siècles pour leurs propriétés médicinales et/ou dans le cadre d'un régime alimentaire sain, tant dans les cultures occidentales qu'orientales. Ces plantes amères sont utilisées comme sudorifiques, antipyrétiques, antirhumatismales. La décoction, utilisée contre les affections chroniques de la peau et du cuir chevelu, l'a fait appeler en *France* "*Herbe aux teigneux*" (Marie-Victorin, 1964). Les feuilles sont appliquées en compresses sur les blessures ou les abcès (Martin, 1964). Aux États-Unis, la bardane est utilisée pour traiter les brûlures par les praticiens de la médecine holistique (c'est-à-dire les communautés *Amish*), car elle est censée soulager la douleur, réduire les cicatrices, prévenir les infections, accélérer la guérison et minimiser le besoin de narcotiques, d'antibiotiques et de greffes de peau (Robbins, 2013).

Précisément, les feuilles d'*A. minus* sont utilisées pour traiter les plaies, les infections générales, les inflammations de la peau et du corps, l'alopecie et les maladies de la vessie (De-Souza et al., 2004; Neves et al., 2009). Ils sont également disposés au-dessus du corps du patient, mouillés avec du vinaigre ou du lait, pour stimuler la transpiration (Sezik et al., 2001). Les racines et les feuilles, en infusion, sont également utilisées contre les morsures de serpent et de scorpion et pour purifier le sang (Mosaddegh et al., 2012). Les feuilles basales et les tiges sont également consommées crues ou en ragoût. En raison de leur goût amer, elles sont également utilisées pour stimuler l'appétit et les fonctions hépatiques (Tardio et al., 2005), pour purifier le sang et comme diurétique (Saric-Kundalic et al., 2010). Dans la médecine populaire turque, les feuilles d'*A. minus* ssp. *minus*, sont utilisées contre les douleurs rhumatismales, la fièvre et l'insolation, en externe. Les feuilles fraîches sont traitées avec du sel et appliquées sur les articulations ou un cataplasme préparé en faisant bouillir les feuilles dans l'eau sont également utilisées pour soulager les douleurs rhumatismales. En outre, les feuilles fraîches peuvent être appliquées directement sur les parties inflammées du corps en application externe. En cas de forte fièvre, le corps nu du patient peut être recouvert de feuilles fraîches pour faire baisser la fièvre. (Fujita et al., 1995 ; Kenny et al., 2014)

2.5. Activités biologiques

Conformément à leur utilisation en médecine traditionnelle, *A. lappa* et *A. minus* contiennent des antioxydants, des composants antibactériens, antiviraux, fongicides, anti tumoraux, antidiabétiques et antiinflammatoires, utilisés pour le traiter les différentes pathologies telles que l'asthme, les troubles sanguins et des affections cutanées....etc. On pense également qu'ils servent de détoxifiants pour le corps, de préventifs contre le cancer et de soulageurs de la douleur de l'arthrite rhumatoïde (Gross et al., 1980) , à renforcer le système immunitaire de l'organisme et à améliorer le métabolisme (Lin et al., 2002).

Selon les institutions internationales qui travaillent à la validation des médicaments traditionnels à base de plantes, comme l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) et l'European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP), l'*A. minus* est recommandée et approuvée pour différentes indications. Par exemple, la monographie de l'EMA approuve l'utilisation des racines d'*A. minus* comme adjuvant dans les atteintes mineures des voies urinaires, dans la perte temporaire d'appétit et dans les affections séborrhéiques de la peau (EMA, 2011). Toutes ces indications sont basées sur une utilisation de longue date.

En 2016, l'ESCOP a publié une monographie dans laquelle les racines d'*A. minus* sont indiquées en usage interne et externe pour la peau séborrhéique, l'eczéma, les furoncles, l'acné, le psoriasis et en usage interne pour les troubles mineurs des voies urinaires (European

Scientific Cooperative on Phytotherapy-The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products, 2016). Pour l'administration orale et interne, le médicament à base de plantes peut être utilisé sous forme d'infusion, d'extrait, de teinture ou de décoction, mais la pulpe fraîche des racines ou une décoction peut également être appliquée directement sur la peau.

2.6. Phytochimie

Jusqu'à présent, plus de trois cents composés ont été isolés du genre *Arctium*. Ces composés chimiques comprennent des lignanes, des terpénoïdes, des stérols, des flavonoïdes, des composés phénoliques, des lactones, des polyacétylènes, des acides quiniques et des sucres (polysaccharides)...etc. En particulier, les lignanes sont les composants les plus caractéristiques du genre *Arctium* (Wang et al., 2019).

L'espèce *A. minus* a fait l'objet de rares investigations chimiques telles que celle démontrant la présence de xyloglucane qui comprend une unité répétée d'oligosaccharides d'hepta-(Glc-Xyl = 4:3), de déca-(Glc-Xyl-Gal-Fuc = 4:3:2:1) et de nona-(Glc-Xyl-Gal-Fuc = 2:1). nona-(Glc-Xyl-Gal-Fuc = 4:3:1:1) saccharides dans le rapport de 14:5:12 (Kato et Watanabe, 1993). Une autre étude sur les extraits éthanoliques des feuilles de *A. minus*, a rapporté la présence d'autres composés chimiques non volatils hautement bioactifs tels que les flavonoïdes. Ces derniers comprennent les flavonols, les flavones et leurs glycosides. Deux constituants majeurs, à savoir la rutine et l'isoquercétine, ainsi que quelques autres flavonoïdes mineurs dont le kaempferol-3-O-rhamnoglucoside, quercimeritrin et astragalin ont été identifiés (Saleh et Bohm, 1971). Cette étude reste de loin l'étude de référence sur la composition chimique de l'espèce *A. minus*. En revanche, il n'y a pas de littérature disponible sur l'identification des composants volatils dans l'espèce *A. minus*.

2.7. Toxicité de la plante

La monographie ultérieure révèle que les préparations d'*A. lappa* ne doivent pas être ingérées pendant la grossesse, l'allaitement ou en cas de d'hypersensibilité aux composées et chez les patients souffrant d'un œdème dus à une insuffisance cardiaque ou rénale. Bien que certaines études précliniques puissent être trouvées dans la littérature, les essais cliniques ne sont pas disponibles pour ces indications approuvées par l'ESCOP et l'EMA (Robbins, 2013). Cependant, aucune étude n'a été rapportée sur la toxicité de l'espèce *A. minus*.

3. STRESS OXYDANT

3.1. Définition

Le stress oxydatif/nitrosatif résulte d'un déséquilibre entre la formation de ROS/RNS et l'incapacité d'un organisme à détoxifier ces intermédiaires réactifs ou à réparer les dommages qu'ils causent (Poprac et *al.*, 2017).

3.2. Formes de ROS et de RNS

Dans le processus aérobie, les cellules métabolisent environ 95% de l'oxygène (O_2) en eau, sans formation d'intermédiaires toxiques. Cependant, un minimum de 5 % de l' O_2 est progressivement réduit en une série d'espèces intermédiaires produisant des ROS (Ye et *al.*, 2015). A travers ces étapes, trois espèces hautement toxiques sont formées, dont deux sont des radicaux libres : le superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle (OH^{\bullet}). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) reste un composé hautement réactif, mais pas un radical au sens strict (Pisoschi et Pop, 2015).

Le $O_2^{\bullet-}$ est considéré comme le ROS primaire. Il résulte de la réduction à un électron de O_2 par diverses oxydases telles que la NADPH oxydase, la xanthine oxydase (XO), l'acide aminé oxydase et la cyclooxygénase. Il peut également être formé dans la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, au cours de la phosphorylation oxydative (Lanciano et *al.*, 2013).

Le H_2O_2 résulte de la conversion de $O_2^{\bullet-}$ soit spontanément, soit par le superoxyde dismutase (SOD). Il peut être généré par tout système produisant de l' $O_2^{\bullet-}$, car l'anion radicalaire est facilement disproportionné (Lanciano et *al.*, 2013).

Le H_2O_2 est capable de produire des radicaux hautement réactifs en raison de son interaction avec les ions métalliques par la réaction de Fenton. Le H_2O_2 est décomposé en un ion hydroxyde et un OH^{\bullet} . De même, la réduction à un électron de H_2O_2 par $O_2^{\bullet-}$ a également été invoquée comme une source potentielle de OH^{\bullet} en présence d'un catalyseur métallique comme le fer ou le cuivre par la réaction de *Haber-Weiss* (Toro et Rodrigo, 2009). Le OH^{\bullet} a été signalé comme étant le radical oxydant le plus puissant qui peut interagir au niveau de l'organisme sur le site de sa génération avec la plupart des molécules organiques et inorganiques : ADN, protéines, lipides, acides aminés, sucres et métaux (Toro et Rodrigo, 2009).

Le NO^{\bullet} endogène est biosynthétisé à partir de la L-arginine, de l'oxygène et du NADPH, par des enzymes appartenant au groupe de la synthase de l'oxyde nitrique (NOS) ou par réduction du nitrate inorganique. Il réagit avec $O_2^{\bullet-}$, donnant une espèce hautement réactive, à savoir le peroxydinitrite ($ONOO^-$), un oxydant puissant contre de nombreuses molécules

biologiques. L'ONOO⁻ peut être décomposé pour donner OH[•], indépendamment de la présence de métaux de transition (Pisoschi et Pop, 2015).

3.3. Sources de ROS et RNS

Les sources endogènes et exogènes contribuent aux niveaux de ROS/RNS intracellulaires.

3.3.1. Sources exogènes

Les ROS sont également produits dans les systèmes biologiques par diverses sources exogènes. La fumée de cigarette contient de nombreux oxydants, radicaux libres et composés organiques, tels que O₂^{•-} et NO[•] (Lanciano et al., 2013).

L'exposition à l'ozone peut provoquer une peroxydation lipidique dans le fluide de la muqueuse épithéliale où des aldéhydes et des hydroperoxydes réactifs sont produits. (Hiraiwa et van Eeden, 2013).

L'hyperoxie fait référence à des conditions de niveaux d'oxygène plus élevés que la pression partielle normale de l'O₂ dans les poumons ou d'autres tissus du corps. Elle entraîne une plus grande production de ROS et de RNS (Berkelhamer et al., 2013).

Les rayonnements ionisants, en présence d'O₂, convertissent les radicaux OH[•], O₂^{•-} et organiques en H₂O₂ et en hydroperoxydes organiques. Ces espèces d'hydroperoxydes réagissent avec des ions de métaux lourds redox actifs, tels que le fer, le cuivre, le cadmium, le mercure, le nickel, le plomb et l'arsenic, et peuvent induire la génération de radicaux réactifs via une réaction de type Fenton (Shahid et al., 2014).

3.3.2. Sources endogènes

Les Mitochondries, réticulums endoplasmiques, réticulums endoplasmiques, NADPH oxydases, Xanthines oxydases (XO), oxydes nitriques synthases (NOS), enzymes de la cascade des arachidonates, molécules auto-oxydables (dopamine, adrénaline, flavines et hydroquinones) peuvent générer ou impliquer dans l'augmentation de la concentration intracellulaire des ROS/RNS (Aouachria, 2018).

3.4. Rôles biologiques des ROS et RNS

Selon la concentration, la localisation et le contexte moléculaire, les ROS peuvent être bénéfiques ou nocifs pour les cellules. Des preuves croissantes indiquent que des concentrations faibles à modérées de ROS sont indispensables à la régulation des processus cellulaires (Aouachria, 2018).

Les espèces réactives d'oxygène sont impliqués dans la fonction des canaux/transporteurs ioniques, l'activation des protéines kinases/phosphatases et en

coordination avec la SOD initie la mort cellulaire (Son et *al.*, 2011). Les ROS sont également impliqués dans le mécanisme de défense antimicrobienne incorporé par les macrophages et les neutrophiles (Slauch, 2011).

D'autre part, les RNS produits par les neurones agissent comme des neurotransmetteurs et ceux générés par les phagocytes (monocytes, macrophages et neutrophiles) agissent comme médiateurs de l'immunité. Ces sont également responsables de l'adhésion des leucocytes, de la thrombose, de l'angiogenèse, du tonus vasculaire et de la modulation de l'activité enzymatique (Madamanchi et Runge, 2013).

3.5. Cibles moléculaires des ROS et RNS

Comme ces espèces sont très réactives, elles peuvent endommager les trois classes importantes de molécules biologiques : les protéines, les lipides et notamment les acides nucléiques.

3.6. Implications pathologiques du stress oxydatif

De plus en plus d'articles confirment le rôle crucial des ROS et des RNS dans la pathogenèse de nombreuses maladies (**Figure 7**).

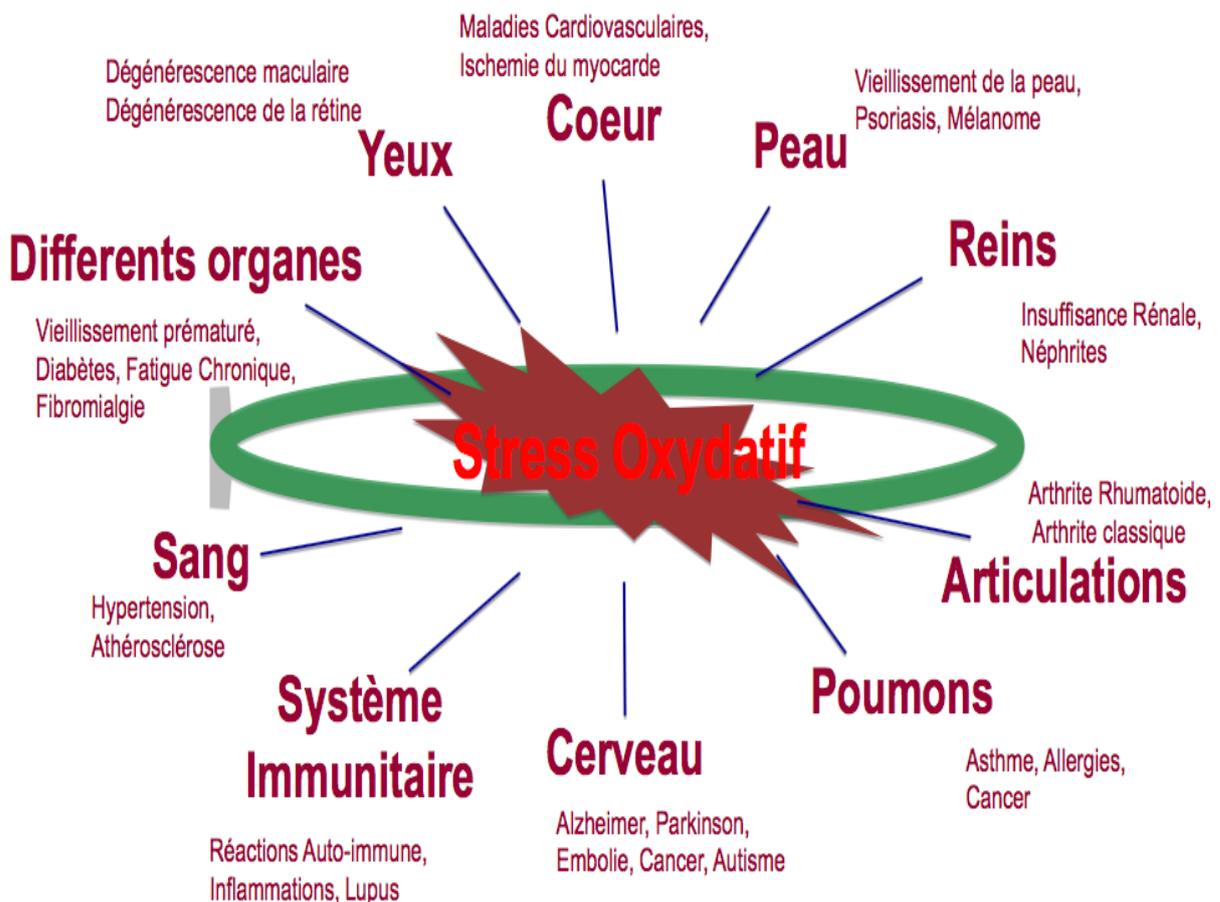


Figure 7. Les maladies liées au stress oxydatif (Nathan et Cunningham-Bussel, 2013)

3.6.1. *Alzheimer*

La maladie d'*Alzheimer* (MA) se caractérise par un déclin progressif de la fonction cognitive. Cette maladie est considérablement accrue chez les personnes âgées de 65 ans et plus, avec un déclin progressif de la mémoire, de la pensée, de la langue et de la capacité d'apprentissage. La MA devrait être différenciée du déclin normal de la fonction cognitive lié à l'âge, qui est plus graduel et associé à moins d'incapacité. La maladie commence souvent par des symptômes bénins et se termine par de graves lésions cérébrales (Mattson, 2008).

Les personnes atteintes de démence perdent leurs capacités à des rythmes différents (Benabdallah, 2021). La maladie d'*Alzheimer* est une maladie neurodégénérative chronique caractérisée par des mécanismes physiopathologiques bien définis, touchant principalement le lobe temporal interne et les structures néocorticales associatives. Les plaques neuritiques et les enchevêtrements neurofibrillaires représentent les caractéristiques pathologiques de la MA, sont respectivement liés à l'accumulation du peptide bêta-amyloïde ($A\beta$) dans les tissus cérébraux et aux modifications cytosquelettiques résultant de l'hyperphosphorylation de la protéine "*Tau*" associée aux microtubules dans les neurones (De-Paula et al., 2012).

Dans 95 % des cas, la MA est de forme sporadique, sans antécédents familiaux et à l'étiologie inconnue. Comme c'est le cas dans la plupart des autres maladies liées à l'âge (diabète, maladie de Parkinson, maladie cardiovasculaire...etc.), l'âge, l'environnement et d'autres facteurs s'y rattachant jouent un rôle non négligeable. Le cerveau est riche en phospholipides, qui sont essentiels aux processus de neurotransmission et à la base des interactions neuronales et de la cognition (Rocchi et al., 2003).

La modification oxydative de l'ARN est également augmentée dans le cerveau atteint de MA (Nunomura et al., 1999). Les ROS peuvent être produites par la perturbation de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries ou par d'autres réactions. Par exemple, un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire peut conduire à la libération de radicaux libres, y compris de ROS (Yan et al., 2013, Zhao et al., 2013). Pour éliminer ces radicaux libres, les neurones peuvent initier des mécanismes de prévention des dommages oxydatifs. Il est intéressant de noter que certaines études suggèrent que l' $A\beta$ est initialement une compensation pour les concentrations écrasantes de ROS (Paola et al., 2000, Castegna et al., 2002).

L'Acétylcholine (ACh) est le neurotransmetteur utilisé par tous les neurones cholinergiques, qui joue un rôle très important dans les systèmes nerveux périphérique et central. Tous les neurones parasympathiques pré- et post-ganglionnaires et tous les neurones sympathiques pré-ganglionnaires utilisent l'ACh comme neurotransmetteur. De plus, une partie des neurones sympathiques post-ganglionnaires utilise également l'ACh comme

neurotransmetteur (Ferreira-Vieira, 2016). Compte tenu de sa large distribution dans le cerveau, il n'est pas surprenant que la neurotransmission cholinergique soit responsable de la modulation de fonctions neurales importantes. Le système cholinergique est impliqué dans des processus physiologiques critiques, tels que l'attention, l'apprentissage, la mémoire, la réponse au stress, la veille et le sommeil et les informations sensorielles.

Des données expérimentales utilisant des primates non humains et des rongeurs ont démontré que les lésions introduites dans les neurones cholinergiques basaux du cerveau antérieur qui innervent le cortex entraînent un déficit de l'attention (Voytko et *al.*, 1994 ; Bucci et *al.*, 1998). De plus, les données publiées indiquent que ACh est impliqué dans la mémoire (Dunnett et *al.*, 1991 ; Sarter et *al.*, 1996).

La stratégie thérapeutique prédominante dans la prise en charge de la maladie d'*Alzheimer* repose sur le rétablissement de la fonction cholinergique au moyen de composés bloquant les enzymes qui dégradent l'acétylcholine (Massoud et Gauthier, 2010) comme la tacrine, le donepezil, la galantamine. Les inhibiteurs de l'activité cholinestérase induisent malheureusement aussi des états dépressifs, ainsi des effets secondaires toxiques (Bachurin, 2003).

3.6.2. Diabète

3.6.2.1 Principaux types de diabète

A. Le diabète de type I (DTI)

Le diabète de type I (DTI) est représenté par 5 à 10% des diabétiques. Les enfants et les adolescents sont fréquemment touchés, mais il peut également survenir à tout âge, y compris chez les personnes âgées (Griffin, 2014). Le DTI est caractérisé par la destruction plus ou moins rapide des cellules β de Langerhans (Concannon et *al.*, 2009).

B. Le diabète de type II (DTII)

Le diabète de type II (DTII) est plus répandu, il représente 90 à 95% des personnes atteintes de diabète (Griffin, 2014). Le DTII qui est lié à des facteurs génétiques et environnementaux, est caractérisé par une résistance à l'insuline et un déficit relatif de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques (Stumvoll et *al.*, 2005).

3.6.2.2 Traitement du diabète

A. Traitement de synthèse

L'insuline reste le moyen le plus efficace pour obtenir une glycémie naturelle et bien régulée. La fonction de l'insuline administrée au patient est de remplacer l'insuline de l'organisme. Les principaux effets attendus sont d'améliorer l'utilisation du glucose périphérique

et d'activer la glycolyse, la glycogénèse, la lipogénèse et la synthèse des protéines. De plus, l'insuline tente de prévenir la lipolyse et la néoglucogénèse (Goodpaster et Kelley, 2001).

Cependant, l'utilisation continue de ces agents synthétiques devrait être réduite car ces inhibiteurs sont connus pour provoquer de nombreux effets secondaires, tels que des symptômes gastro-intestinaux indésirables (gaz, ballonnements, crampes abdominales, vomissements, distension abdominale et diarrhée). En outre, certains d'entre eux peuvent augmenter l'incidence des tumeurs rénales, des troubles hépatiques (lésions hépatiques et hépatite aiguë). Ces effets secondaires peuvent avoir été causés par une inhibition excessive de l' α -amylase pancréatique, entraînant une fermentation bactérienne des glucides non digérés dans le côlon. Ces médicaments présentent d'autres inconvénients tels que la toxicité hépatique et augmentent les symptômes et les facteurs de risque de maladies cardiaques (Arulselvan et *al.*, 2014).

Le comité d'experts en diabète de l'Organisation Mondiale de la Santé a recommandé l'orientation des recherches vers les plantes médicinales traditionnelles, car elles sont souvent considérées comme exemptes de toxicité et d'effets secondaires. Par conséquent, la recherche d'agents bioactifs plus sûrs et plus efficaces a continué à être une importante recherche de développement de médicaments biomédicaux (Arulselvan et *al.*, 2014).

B. Traitement naturel

L'utilisation de plantes médicinales pour gérer le diabète est l'une des applications de la médecine naturelle. La communauté utilise donc diverses plantes pour maintenir le taux de glycémie dans les normes. Cette pratique a attiré les chercheurs à effectuer des expériences pour clarifier le mécanisme d'action de ces remèdes naturels (Senyange et *al.*, 2015).

Les plantes fonctionnent de trois façons pour traiter le diabète sucré. La première façon est de diminuer l'apport de glucose dans le sang en inhibant la production hépatique de glucose (sources endogènes de glucose). Ou en réduisant l'absorption intestinale du glucose (origine exogène du glucose). La deuxième stratégie consiste à augmenter l'absorption de glucose par les tissus périphériques, en particulier les muscles. La troisième stratégie consiste à stimuler la sécrétion d'insuline (Ma et *al.*, 2009).

3.7. Système de défense contre le stress oxydatif

Le concept d'antioxydant biologique fait référence à tout composé qui, lorsqu'il est présent à une concentration plus faible par rapport à celle d'un substrat oxydable, est capable de retarder ou d'empêcher l'oxydation du substrat (Godic et *al.*, 2014).

Après une exposition aux ROS et RNS provenant de différentes sources, les organismes vivants disposent d'une série de mécanismes de défense contre le stress oxydatif, notamment :

des mécanismes de prévention, des mécanismes de réparation, des défenses physiques et des défenses antioxydantes. Les mécanismes de défense antioxydants peuvent être divisés en défenses enzymatiques et non enzymatiques.

3.7.1. Antioxydants enzymatiques

3.7.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Elle est considérée comme une première ligne de défense contre les ROS. La SOD catalyse la conversion de $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 et O_2 . La SOD réagit très rapidement avec le NO^{\cdot} , réduisant ainsi la bioactivité de ce dernier et produisant l'ONOO- (Fukai et Ushio-Fukai, 2011).

3.7.1.2. Catalase (CAT)

La CAT maintient la concentration physiologique de H_2O_2 . Elle convertit catalytiquement le H_2O_2 en H_2O et O_2 et le neutralise ainsi (Asmat et al., 2016).

3.7.1.3. Glutathion peroxydase (GPx)

La GPx est une sélénoenzyme dont la fonction catalytique dépend de la présence du minéral dans l'enzyme. Elle est connue pour catalyser la réduction de H_2O_2 (Brigelius-Flohé et Maiorino, 2013).

3.7.2. Antioxydants non-enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques comprennent différents composés chimiques tels que le tocophérol (Vit E), l'acide ascorbique (Vit C), les caroténoïdes, le glutathion réduit (GSH), les composés phénoliques, l'ubiquinol (Q10), les phospholipides (protéoglycanes et acide hyaluronique), acide lipoïque, protéines liant le fer et le cuivre libres (céruloplasmine, transferrine, taurine, albumine), hydrolysats de protéines, bilirubine, mélatonine, acide urique, mucine, surfactant, acides aminés, peptides et phytates (Mirończuk-Chodakowska et al., 2017).

4. INFLAMMATION

L'inflammation est un mécanisme physiologique de défense de l'hôte contre l'invasion par des agents pathogènes. Cependant, elle peut avoir des effets indésirables si la modération n'est pas respectée. L'inflammation peut être aiguë ou chronique. La première c'est la réponse d'urgence, habituellement, elle se dissipe de façon spontanée. Toutefois, il y a une possibilité qu'elle se transforme en une inflammation chronique à laquelle plusieurs affections sont liées (Noack et al., 2018).

4.1. Inflammation aigue

L'inflammation aigue est la réponse immédiate, traduite par quatre symptômes majeurs : œdème, rougeur, douleur et chaleur (**Figure 8**). Cependant, une défaillance dans le processus mènerait à une infiltration incontrôlée et persistante des cellules inflammatoires, conduisant ainsi à une durabilité inflammatoire (Rathinam et Fitzgerald, 2016). La réponse inflammatoire aiguë renferme 4 phases.

4.1.1. Phase vasculaire

La réponse vasculaire (Phase d'initiation) inclue une vasoconstriction suivie d'une vasodilatation, ce qui provoque une exsudation de liquide plasmatique et donc la formation d'œdème (Dorword *et al.*, 2012). L'augmentation de la perméabilité entraîne aussi la diapédèse et la migration extravasculaire des leucocytes. La brève vasoconstriction de quelques secondes va perturber le mouvement des plaquettes dans la circulation sanguine et entraîner leur activation. Les plaquettes activées produisent la libération de médiateurs comme la sérotonine et l'histamine. La libération de ces facteurs vasoactifs entraînent une vasodilatation et augmentent la perméabilité vasculaire et par conséquent l'exsudation plasmatique (Buckley *et al.*, 2014).

4.1.2. Phase cellulaire

Cette phase fait suite à la réponse vasculaire, elle implique surtout les cellules endothéliales et les leucocytes circulants. Elle est caractérisée par un afflux extravasculaire interstitiel de leucocytes, les polynucléaires neutrophiles (PMNs) dans un premier temps puis les monocytes. L'accumulation des neutrophiles atteint son maximum à la 4^{ème} heure puis décline rapidement, alors que le nombre de monocytes augmente après la 4^{ème} heure et atteint son maximum entre 18 et 24 heures. Les polynucléaires circulants sont attirés vers le foyer inflammatoire par des facteurs chimiotactiques (Rathinam et Fitzgerald, 2016).

4.1.3. Phase de résolution

Certains lipides, telles que les lipoxines, les protectines et les résolvines jouent un rôle majeur dans la promotion de la résolution du processus inflammatoire (**Figure 9**) et de la réparation tissulaire (Serhan, 2007). Les lipoxines, sécrétées par les macrophages bloquent l'influx des neutrophiles, facilitent la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages et permettent le recrutement de monocytes afin d'éliminer les cellules apoptotiques et les débris cellulaires (Serhan et Savill, 2005).

4.2. Inflammation chronique

L'inflammation chronique est une inflammation qui pourrait évoluer perpétuellement. Ainsi, les phases vasculaires et cellulaires coexistent. L'inflammation chronique pourrait causer une perte tissulaire et fonctionnelle (Park *et al.*, 2014).

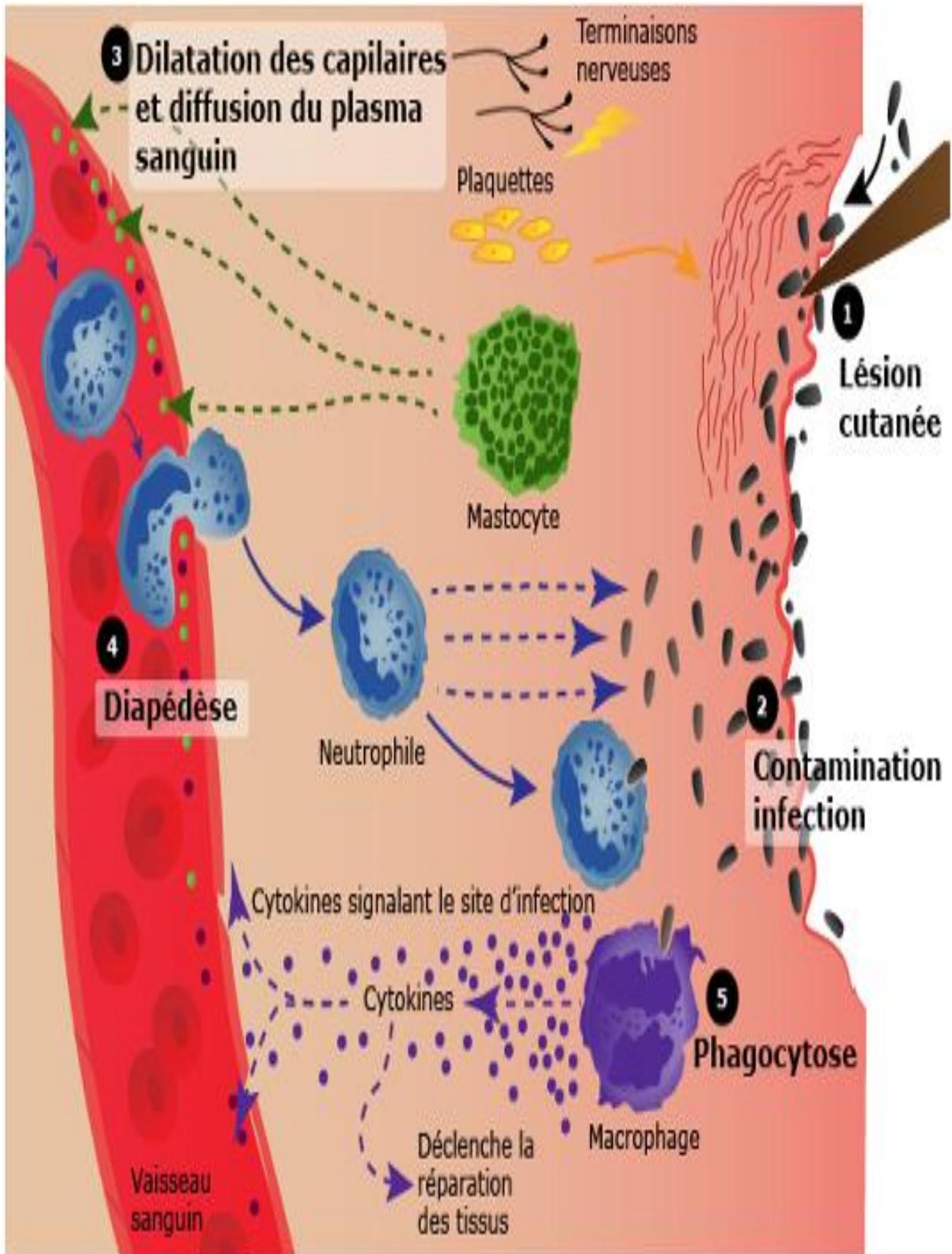


Figure 8. La réaction inflammatoire aiguë (Bruchard, 2013)

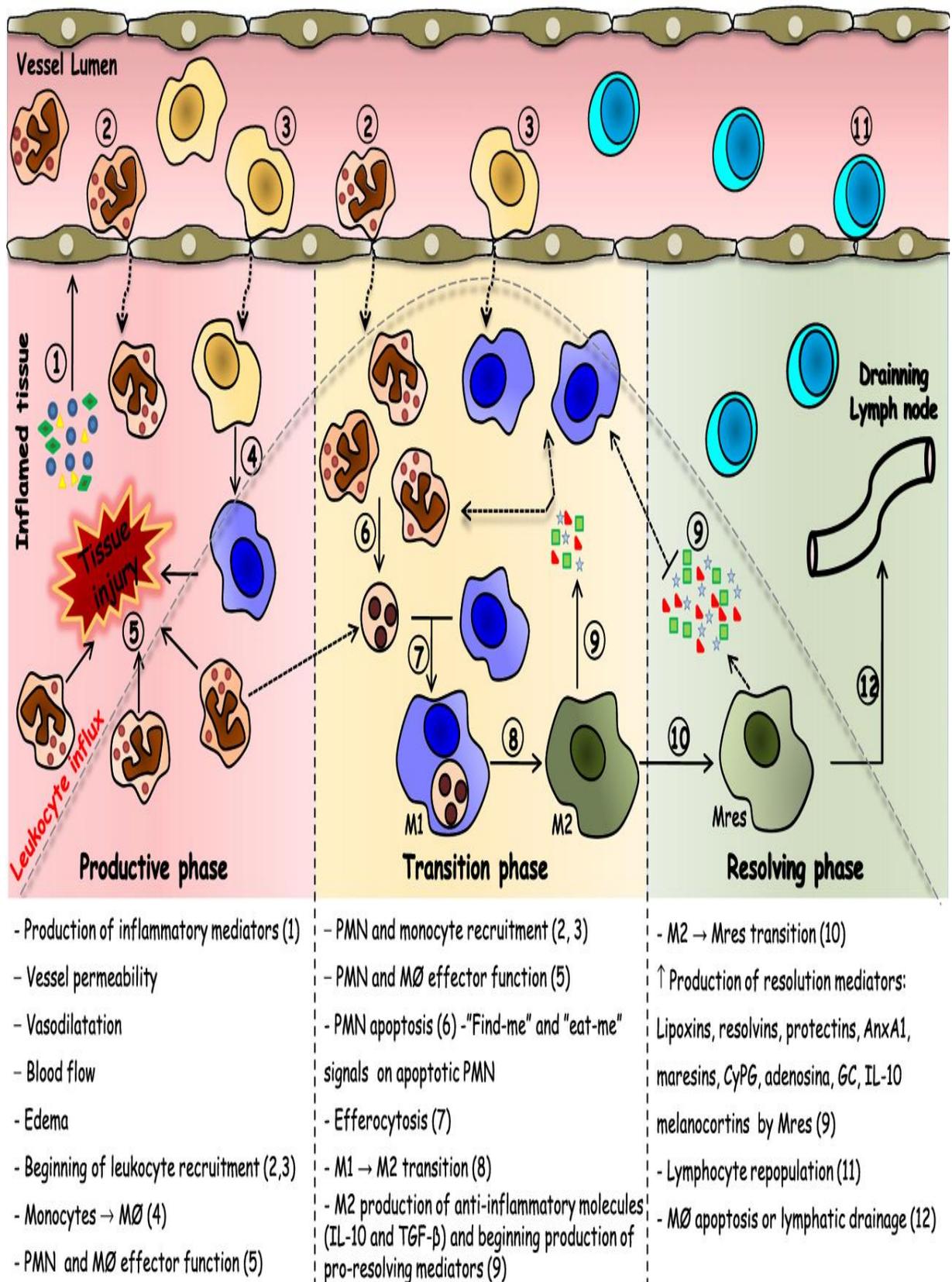


Figure 9. Processus inflammatoire aigu à auto-résolution (Alessandri et al., 2013)

PMN : Polynucléaire neutrophile ; MØ : Macrophage ; TGF-β : Facteur de croissance transformant beta ;
 IL : Interleukine ; CyPG : Prostaglandine cyclique ; GC : Glucocorticoïde ;
 AnxA1 : Inhibiteur anti-annexine A1 ; M1, M2 et Mres : Macrophages en plusieurs stades.

4.3. Médiateurs de l'inflammation

Le déclenchement de l'inflammation fait intervenir plusieurs agents : Amines vasoactives (histamines et sérotonine), eicosanoïdes (leucotriènes, thromboxanes et prostaglandines), molécules d'adhésion, facteur d'activation plaquettaire (PAF), kinines, complément (protéines sériques et protéases activées), système de coagulation/fibrinolyse, neuropeptides (la substance P) et les cytokines et chimiokines (**Figure 10**). Ces dernières sont des pro-inflammatoires et largement impliquées dans des affections chroniques (Judy *et al.*, 2014).

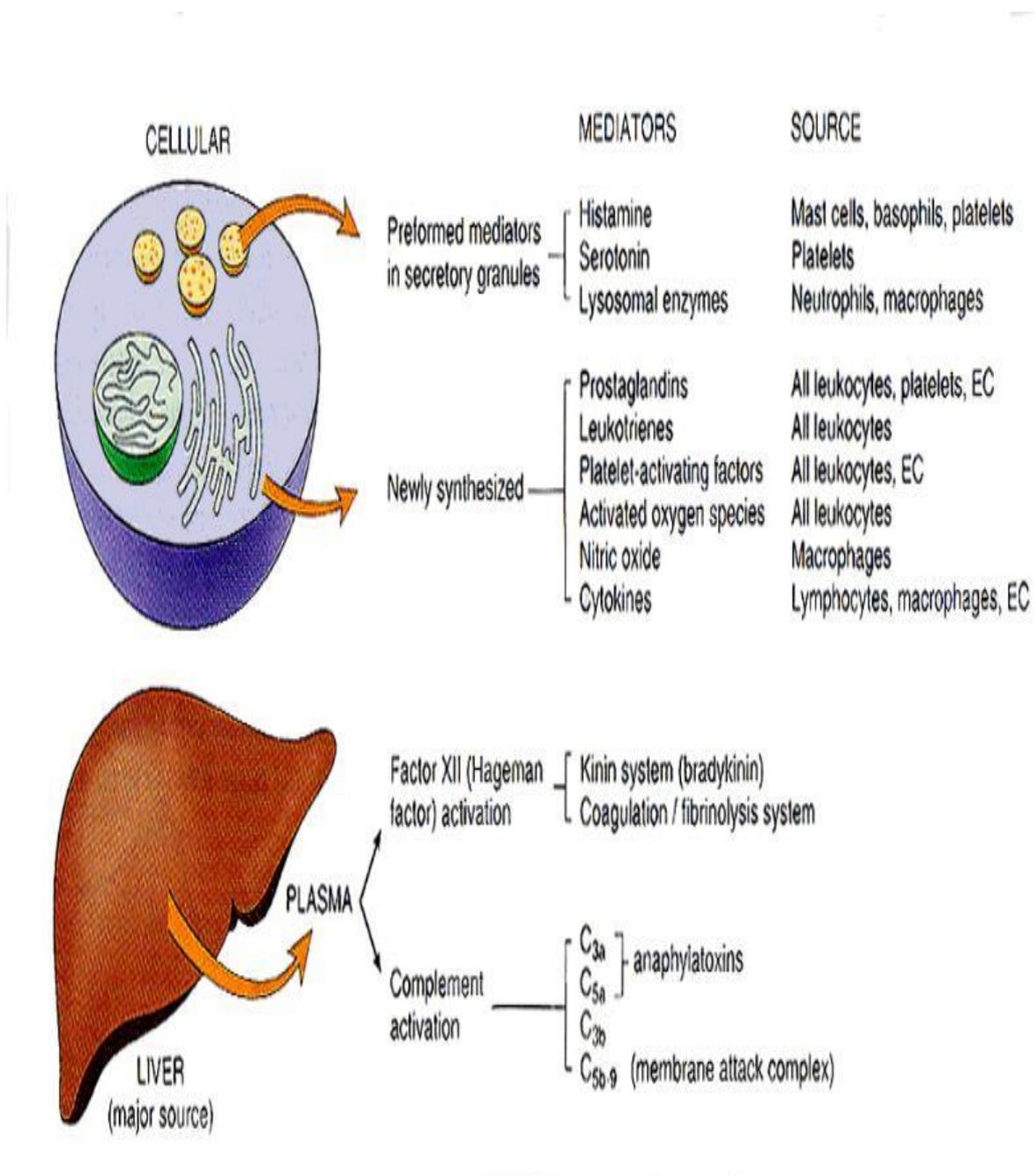


Figure 10. Les médiateurs cellulaires et vasculaires de l'inflammation (Ayroud, 2015)
 C : Complément ; EC : Cellules épithéliales.

4.4. Pathologies inflammatoires

L'inflammation conduit à une multitude d'affections aux degrés variables de gravité (**Figure 11**) (Roussel, 2016). Les cytokines pro-inflammatoires sont les plus impliquées (Noack *et al.*, 2018). La production de cytokines et de chimiokines maintient activement le caractère chroniques de l'inflammation (**Tableau 1**) (Lowe *et al.*, 2011).

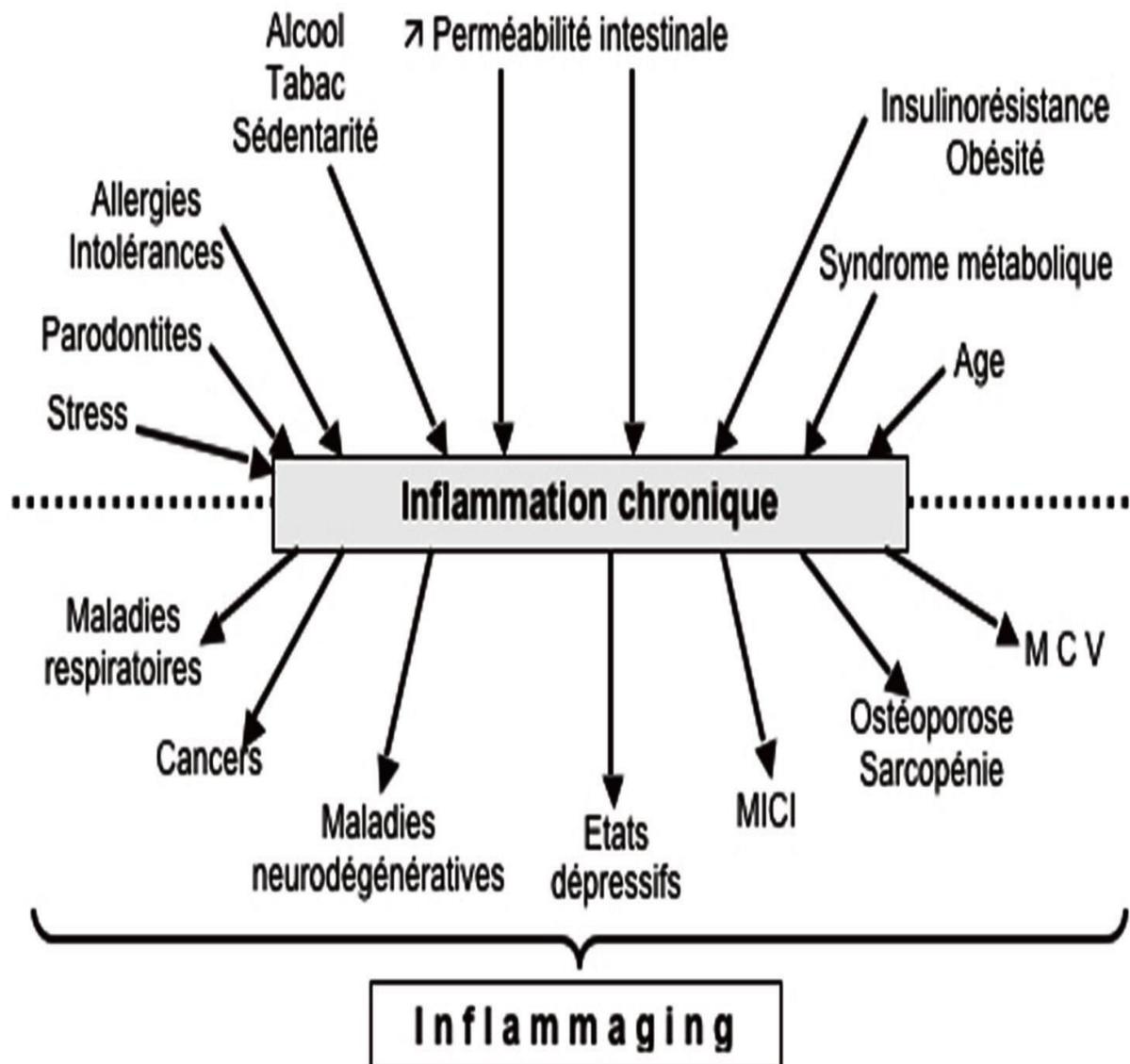


Figure 11. Les implications pathologiques de l'inflammation chronique (Roussel, 2016)

MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ;

MCV : Maladies cardiovasculaires.

4.5. Traitement de l'inflammation

De nombreux anti-inflammatoires sont mis à disposition des praticiens de la santé. Toutefois, ils présentent plusieurs des effets néfastes. Or, les substances naturelles restent la meilleure option compte tenu, entre autres, leur innocuité (Farahpour et Habibi, 2012).

Tableau 1. Cytokines impliquées dans différentes pathologies (Kada, 2018)

Maladies	Cytokines exprimées
SIDA	TNF- α , IL-6, IL-1 β
Infection aigue	IL-6
Infections parasitaires	TNF- α
Asthme	l'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13
Cancer	IL-6
Maladies cardiovasculaires	TNF- α , IL-6
Athérosclérose	IL-1 β , TNF- α , IL-6
Vieillessement	IL-1, TNF- α , IL-6
Fièvre	IL-1 α , l'IL-1 β , IL-6
Maladie de <i>Corohn</i>	IL-1 et IL-12
Ulcère peptique	IL-1, TNF- α , IL-8
<i>Alzheimer</i>	l'IL-1 β , TNF- α , IL-6
Sclérose	TNF- α
Diabètes	Les médiateurs de Th-1 et Th-2
Douleur	TNF- α , IL-1 et β et IL-6
dépression	TNF- α , IL-1, β et IL-6, IL-1ra, IFN- γ , IL-6
<i>Schizophrénie</i>	TNF- α , IL-1 et β et IL-6
Maladies de sommeil	TNF- α , IL-6
Polyarthrite rhumatoïde	TNF- α , IL-1, IL-6, GM-CSF et IL-8

IL : Interleukine ; TNF α : Facteur de nécrose tumoral alpha ; Th : Lymphocyte T auxiliaire ; IFN- γ : Interféron gamma ; GM-CSF : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages.

4.5.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde. Ces médicaments ont un effet antalgique et antipyrétique associé à un effet anti-inflammatoire. Les effets des AINS résultent principalement de l'inhibition de la cyclooxygénase et ainsi de la synthèse des prostaglandines. Cette inhibition peut être irréversible, avec les AINS salicylés, ou non avec les autres AINS (Tréchet et Jouzeau, 2014). Les bons effets des AINS sont cependant limités par leurs effets indésirables graves, principalement digestifs (ulcères gastroduodénaux) et à un moindre degré rénal (Lahmidani *et al.*, 2012). L'impossibilité de dissocier les effets thérapeutiques des AINS de leurs effets indésirables s'explique par leur mécanisme d'action.

4.5.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes pourraient dériver de la cortisone, cortisol et d'extraits animaux ou végétaux (Dangoumau, 2006). Les AIS bloquent l'activation de la phospholipase A2 (Mallem et Gogny, 2014). Les glucocorticoïdes constituent l'alternative thérapeutique de choix vis-à-vis des maladies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde et les maladies auto-immunes (Kessel *et al.*, 2014). Ils ont néanmoins l'inconvénient de diminuer l'immunité de l'organisme en favorisant toutes sortes d'affections chroniques (Strehl *et al.*, 2011).

4.5.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale

Grace à leurs multiples effets biologiques, les plantes médicinales sont souvent utilisées par les thérapeutes ancestraux. La richesse en métabolites secondaires serait à l'origine des vertus constatées.

Beaucoup d'extraits de plantes riches en flavonoïdes possèdent des activités antiinflammatoires. Des travaux menés *in vitro* ont montré que les flavonoïdes (Lutéoléine, apigénine, kampferol, quercétine, myricétine, naringénine, catéchine, phlorétine, buteine, pelargonidine) sont de puissants inhibiteurs de la production de TNF- α (Muzamal *et al.*, 2013). Récemment, Zeinali et ses collaborateurs (2017) ont montré que la chryisine est un puissant antiinflammatoire qui agit sur NF-kB qui contrôle l'expression des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α), les enzymes inductibles COX2 et iNOS et les molécules d'adhésion ICAM, VCAM et E-sélectine.

5. TOXICITÉ

Le concept de la toxicité ne se limite pas à des domaines bien précis. Au contraire, il s'étend des médicaments aux armes chimiques en passant par les végétaux, les animaux, les produits industriels et bien d'autres. L'homme est constamment exposé à la toxicité, tandis que d'autres études montraient que les intoxications aiguës représentent la première cause d'hospitalisation des pays développés et la deuxième cause de mortalité des individus dans les pays en voie de développement (Viala et Botta., 2005).

La toxicité est un caractère de toute substance qui au contact ou après présentation dans un organisme, ont la propriété de causer un dysfonctionnement à l'échelle moléculaire, cellulaire ou organique (Bismuth et *al.*, 1987) est un excellent critère d'orientation de la recherche d'activité pharmacologique.

L'évaluation de la toxicité s'appuie sur des études qualitatives (non mesurables) ou quantitatives (mesurables) adéquates. Il existe plusieurs types d'études qui nous permettent d'évaluer les effets d'un toxique : les études épidémiologiques, qui comparent plusieurs groupes d'individus ou les études de cas, ainsi que les études *in vitro* effectuées sur des cultures de tissus ou des cellules (Gérin et *al.*, 2003).

5.1. Substances toxiques

Les toxiques sont des substances capables de perturber le fonctionnement normal d'un organisme vivant et peuvent agir au point de contact (effet local) ou pénétrer dans l'organisme. Ils sont de source naturelle (ex : poussières, pollen) ou artificielle (ex : urée formaldéhyde), ou de nature chimique (ex : acétone) ou biologique (ex : aflatoxines) (Gilles, 2004). Les principales façons de les absorber sont :

- l'inhalation (voie respiratoire)
- l'absorption par la peau (voie cutanée)
- l'ingestion (voie digestive)

L'action toxique d'une substance chimique pour les organismes animaux est conditionnée par sa toxicocinétique et par la sensibilité des différentes espèces animales ;

- Les toxiques non résorbés par voie orale ou par voie percutanée auront une action localisée.
- Les toxiques capables de pénétrer dans l'organisme auront une action plus diversifiée.

Cette action dépend des biotransformations subies qui peuvent donner naissance à des métabolites plus toxiques et également de la localisation et de l'accumulation de la substance et de ces métabolites dans l'organisme (**Figure 12**). L'élimination d'une substance toxique joue

un rôle essentiel dans sa toxicité, quand une substance toxique ou ses métabolites sont rapidement excrétés, ils ne se concentrent pas et n'endommagent pas des cellules (Gilles, 2004).

5.2. Effet toxique

L'effet toxique est le résultat d'un processus souvent complexe suite à une interaction entre le toxique et l'organisme, il est lié à la voie d'absorption, à la gravité, au temps d'apparition et au type des lésions, et il peut entraîner une série de réaction physiologique et métabolique. Certains effets toxiques sont réversible, ils disparaissent plus ou moins rapidement après l'arrêt de l'exposition, tandis que d'autre sont irréversibles, ils persistent ou même s'intensifient après l'arrêt de l'exposition.

Un effet aigu ou immédiat se fait sentir dans un temps relativement court (minutes, heures, jours), tandis qu'un effet chronique ou retardé ne se manifeste qu'après un temps d'exposition relativement long et de façon permanente (semaines, mois, années) (Vaubaudolle, 2007).

Un effet morphologique aboutis a un changement de la morphologie d'un tissus visible en microscopie optique ou électronique, tandis qu'un effet fonctionnel détermine un changement dans les fonctions d'un organe (foie, rein) (Gara *et al.*, 2017).

5.3. Formes d'intoxication

La toxicité est classée selon la fréquence d'administration et la durée d'exposition en différentes formes (**Figure 13**).

5.3.1. La toxicité aiguë (court durée)

La toxicité aiguë résulte d'une exposition au toxique sur un temps court par rapport à la durée de vie de l'organisme. Elle est généralement liée à une forte dose mais peut également être associée à une concentration plus faible d'une substance très toxique. Elle conduit à de graves troubles physiologiques voire à la mort des organismes. Les pathologies considérées sont nécessairement à développement rapide car elles sont détectées en employant des essais de courte durée (Fleuretine *et al.*, 1990).

La toxicité aiguë peut être mesurée par la concentration létale (CL_{50}) pour un pourcentage de la population exposée pour une durée déterminée. La concentration effectrice (CE) est celle provoquant un effet observé. Ainsi, la CL_{50} (48 h) définit la dose qui provoque la mort de 50 % des organismes exposés à un toxique pendant 48 heures. La dose létale (DL_{50}) est la dose transférée dans l'organisme par ingestion, inhalation ou contact, provoquant la mort de 50 % des individus (Fleuretine *et al.*, 1990).

5.3.1.1. Dose létale DL₅₀

La dose létale médiane (DL₅₀) est la dose unique déduite statistiquement, censée provoquer la mort de 50 % des animaux auxquels la substance a été administrée (Gourlay-Francé *et al.*, 2011). On administre généralement le produit à des rats ou à des souris répartis en plusieurs groupes, et ce, à des doses croissantes suffisantes pour obtenir un pourcentage de mortalité s'échelonnant entre 0 % et 100 %.

L'indice DL₅₀ sert fréquemment pour exprimer la toxicité aiguë ainsi que pour classer et comparer les toxiques, Il a cependant une valeur très limitée, car il ne concerne que la mortalité et ne donne aucune information sur les mécanismes en jeu et la nature des lésions (Vaubaudolle, 2007). Elle s'exprime en mg de produit par kg de poids vif, La DL pour une substance chimique doit toujours être indiquée pour une espèce animale donnée et pour une voie d'administration déterminée (Lecoq *et al.*, 2009).

5.3.1.2. Détermination de DL₅₀

Le produit testé est administré chez une espèce connue à différentes doses, les animaux sont observés pendant une période de 14 jours suivant l'administration, on notera tout signe de toxicité, La construction d'une courbe donnant le pourcentage de mortalité en fonction de la dose conduit à déterminer la dose qui serait la DL₅₀ (Gare *et al.*, 2017).

5.3.1.3. Différentes méthodes de détermination de la DL₅₀

Les méthodes les plus couramment utilisés pour calculer la DL₅₀ sont la méthode graphique de Litchfield et Wilcoxon (1949), le tracé sur papier gaucho-logarithmique de Miller et Tainter (1944), et la méthode moyennes mobiles de Thomson (1947) et Weil (1952) (Gare *et al.*, 2014). Cependant, pour estimer la toxicité orale aiguë des substances peu toxiques ou dont les données toxicologiques faisant défaut, les lignes directrices pour les essais des produits chimiques décrites par l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques OCDE 425, (2008) sont désormais largement utilisés.

5.3.2. La toxicité subaiguë

Elle correspond à l'administration répétée d'un produit, sur une période n'excédant pas 3 mois. Elle permet d'identifier l'organe ou le système sur lequel le toxique agit préférentiellement (Vaubaudolle, 2007).

5.3.3. La toxicité à long terme

Comme la précédente, elle s'évalue après exposition répétée à de faibles concentrations à un produit chimique donné, mais par contre pendant toute la durée de vie de l'animal (2 ans chez des rongeurs comme les rats ou les souris). Elle permet de déterminer les effets à long terme d'un produit donné en fonction de la dose totale absorbée, ce qui permet de fixer des

doses-seuils (ou valeurs limites d'exposition, s'il s'agit du milieu de travail) (Vaubaudolle, 2007).

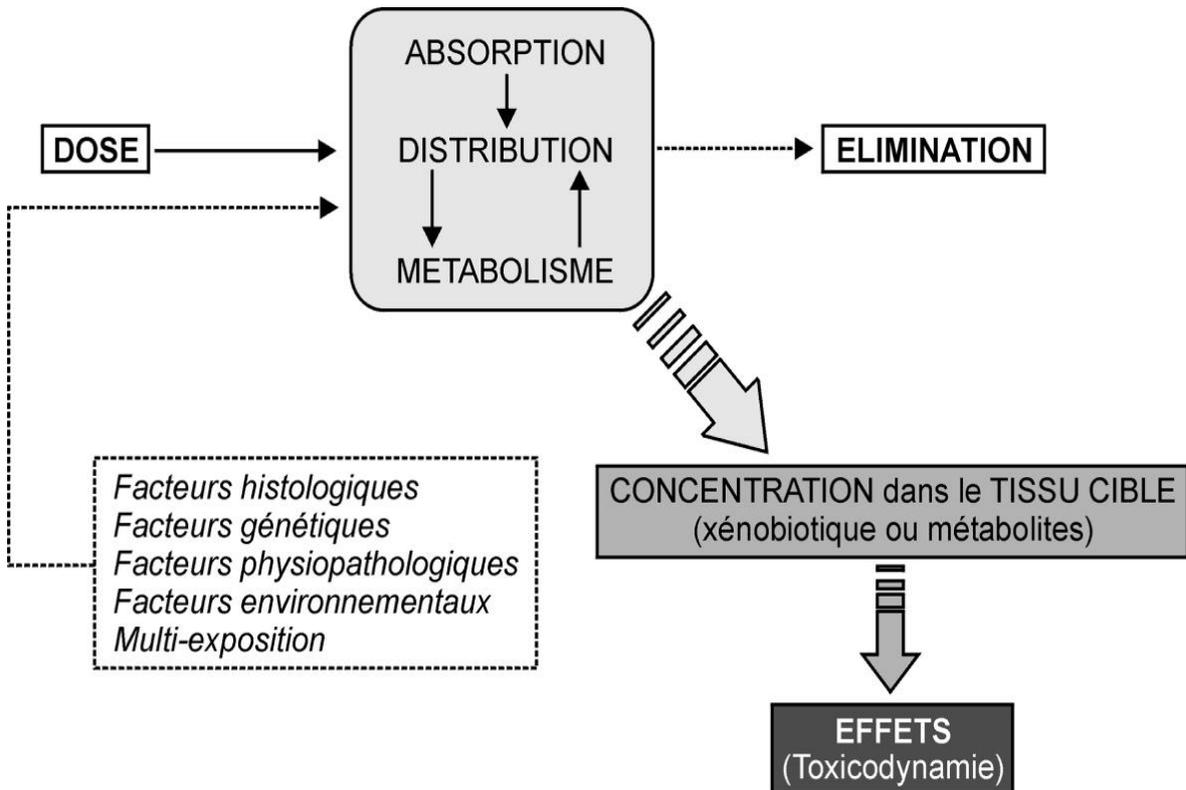


Figure 12. Principales étapes pharmacocinétiques (Clewell et Andersen, 1994)

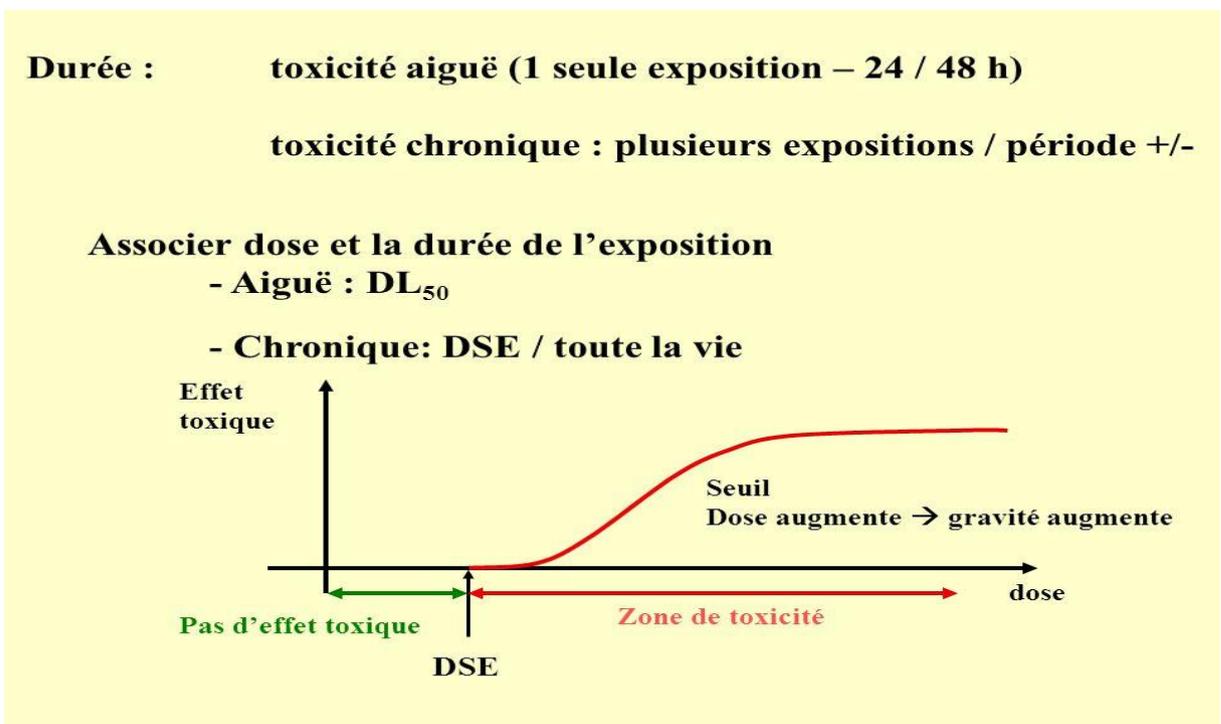


Figure 13. Formes d'intoxication (Gilles, 2004).
 DL₅₀ : Dose létale pour 50% de la population étudiée ;
 DSE : Dose sans effet.

TRAVAIL

EXPÉRIMENTAL

MATÉRIEL
ET
MÉTHODES

Le présent travail a pour but de valoriser le potentiel thérapeutique, en l'occurrence ; antioxydant, anti-inflammatoire, anti-*Alzheimer* (*in vitro*) et antidiabétique (*in vitro*), ainsi que l'estimation du niveau de sécurité (évaluation de la toxicité par l'essai limite) des différents extraits préparés à partir des différentes parties de la plante médicinale endémique de l'Algérie: *Arctium minus* (Hill) Bernh. ssp. *atlanticum* (Pomel) Maire, communément connue sous le nom de la « petite bardane ». Tout d'abord, un criblage phytochimique général (qualitatives et quantitatives) a été réalisée pour identifier quelques familles chimiques contenus dans ces extraits, suivie d'une caractérisation du profil des quelques molécules bioactives par chromatographie en phase liquide à haute performance. La partie expérimentale a été réalisée au niveau des laboratoires de microbiologie appliquée et celui de phytothérapie appliquée aux maladies chroniques de l'UFAS-1-, laboratoire de biochimie du centre de recherche en biotechnologie –Constantine- et au laboratoire de perspective biologique à la science des matériaux de l'université d'Aksaray-Turquie-.

1. MATERIEL

1.1. Matériel végétal

L'*Arctium minus*. ssp. *atlanticum* a été récolté pendant la saison de floraison à Sétif, dans l'est de l'Algérie, situé à une longitude 5°40' Est et une latitude 36°34' Nord (**Figure 14**). L'identification taxonomique de l'échantillon végétal a été réalisée par le Pr RAMDANI Messaoud du Laboratoire de Valorisation des Ressources Biologiques Naturelles (LVRBN) de l'Université de Sétif.

Les différentes parties aériennes (feuilles et fleurs) et racinaires de la plante ont été soigneusement nettoyées, puis séchées à l'abri de la nuisance potentielle de l'humidité et de la lumière du soleil pendant un mois. Ensuite, elles ont été pulvérisées à l'aide d'un broyeur. Les poudres fines issues du procédé susmentionné ont été stockées dans des récipients opaques pour s'en servir ultérieurement.

1.2. Animaux

Des souris *Balb C* des deux sexes, de poids oscillant entre 30 et 35 g ont été utilisées dans cette étude et qui sont obtenu de l'Institut Pasteur d'Alger. Ces souris sont hébergées dans des cages de plastique aérée à une température ambiante, avec accès libre à l'eau et à une alimentation standard fournie par l'Office National des Aliments de Bétails de Béjaïa. Après une période d'adaptation de 20 jours, elles sont pesées et réparties en groupes de façon homogène.

Les expériences ont été menées conformément aux directives internationalement acceptables pour l'évaluation de la sécurité et de l'efficacité des plantes médicinales (Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), 2008).



Figure 14. Photographies d'*Arctium minus*. ssp. *Atlanticum* (Photos personnelles, 2019)
À gauche : L'aspect de la plante poussant spontanément à *Laoumer* au nord de *Sétif* ;
À droite : La forme des feuilles et des fleurs à l'état frais.

1.3. Réactifs chimiques et équipements

1.3.1. Réactifs chimiques

Sauf indication contraire, tous les réactifs et solvants étaient de qualité analytique et utilisés sans autre purification. Le méthanol et l'eau distillée étaient de qualité chromatographie liquide à haute performance (HPLC), chlorure de sodium (NaCl), α -amylase (d'origine porcine), potassium acétate ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$), galvinoxyl (GOR), acide chlorhydrique (HCl), acide acétique (CH_3COOH), amidon (de pomme de terre), iode de potassium (IKI), galantamine, acarbose, chlorure de cuivre (CuCl_2), eau oxygénée (H_2O_2), néocuproïne (Nc), acétylcholinestérase (AChE), butyrylcholinestérase (BuChE), iodure d'acétylthiocholine (ACI), iodure de butyrylthiocholine (BuCI), trichlorure d'aluminium (AlCl_3), nitrate d'aluminium $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, acide gallique, quercétine, méthanol CH_3OH , acide 5,5-dinitro-bis-nitrobenzoïque

(DTNB), 1 diphényle-2,2 picryle-1 hydrazyle (DPPH•), albumine de sérum bovin (ASB), hydroxy toluène butylé (BHT), hydroxy-anisole butylé (BHA), diclofénac de sodium, acétate d'ammonium (ACNH₄), réactif du *Folin-Ciocalteu*, vanilline, catéchine, carbonate de sodium (Na₂CO₃), β -carotène, acide linoléique, Tween 40, phosphate monopotassique (KH₂PO₄) et phosphate dipotassique (K₂HPO₄). Presque la quasi-totalité des produits proviennent des laboratoires *Sigma-Aldrich (Allemagne)*, *Fluk a(France)*, *Riedel-de Haén et Prolabo*.

1.3.2. Équipements

HPLC HP-Agilent 1290 Infinity équipé d'une colonne C18 et d'un détecteur à barrette de diodes (DAD) comme détecteur, lecteur de microplaques Victor X3 (*Perkin Elmer*), chambre d'observation UV « 264/365 nm » (*VILBER COURMAT*), bain Marie (*MEMMERT*), pH mètres (*Hanna*), agitateur magnétique (*SCIOLOGEX*), vortex (*VELP*), centrifugeuse réfrigérée (*ROTINA 420 R – HETTICH*), Balance (*OHAUS*), Rotavapeur (*BUCHI R.200*).

2. METHODES

2.1. Étude phytochimique

2.1.1. Préparation des extraits aqueux bruts

Afin d'obtenir les extraits aqueux bruts des différentes parties de la plante étudiée, la poudre fine obtenue après nettoyage, séchage puis broyage, a fait l'objet d'une extraction par décoction selon la méthode décrite par Ferreira et *al.*, (2013) avec une légère modification. Brièvement, 100 g de poudre des différentes parties aériennes et racinaires de la plantes sont mises à bouillir pendant 20 minutes dans 1000 mL d'H₂O. Après filtration à trois reprises sur papier filtre de type *Whatman* n°=4, une centrifugation à 3000 tour par minute pendant 15 minutes est réalisée. Le surnageant obtenu est évaporé sous vide en utilisant un rotavapeur (*Büchi*), puis a été davantage concentré en le laissant reposer dans un four à 40°C jusqu'à l'obtention d'une poudre brune qui sera conservée à -4°C jusqu'à son utilisation.

2.1.2. Préparation des extraits hydrométhanoliques bruts

Le processus est réalisé par la méthode de macération dont le principe est basé sur l'extraction solide-liquide la plus simple. Cette dernière consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec agitation (Leybros et Fremeaux, 1990). Brièvement, 100 g de poudre des différentes parties aérienne et racinaires de la plante sont émergés dans 700 mL de méthanol ajusté avec 300 mL d'eau pendant 24 heures à une température ambiante. Ensuite, la filtration est réalisée sur papier filtre de type *Whatman* n°=4. Le solvant a été récupéré du filtrat par évaporation dans un rotavapeur à une température de

39°C, puis a été davantage concentré en le laissant reposer dans un four à 40 °C jusqu'à l'obtention d'une poudre brune qui sera conservée à -4°C jusqu'à son utilisation.

2.1.3. Extraction des flavonoïdes

Une partie du filtrat obtenu de la macération hydrométhanolique a été soumise à un fractionnement par extraction liquide-liquide. L'acétate d'éthyle qui est moins polaire est utilisé comme solvant d'extraction des flavonoïdes glycosides (Markhem, 1982). La couche organique obtenue a été évaporée sous pression réduite à sec sur un rotavapeur en dessous de 45 ° C pour donner la fraction d'acétate d'éthyle.

2.1.4 .Calcul de rendement

Le rendement d'extraction est calculé selon la formule suivante (Falleh et *al.*, 2008) :

$$\text{Pourcentage de rendement \%} = (\text{Ma} / \text{Mb}) \times 100$$

Ma : La masse de l'extrait après évaporation du solvant [mg] ;

Mb : La masse sèche de l'échantillon végétal [mg].

2.1.5. Analyse quantitative

2.1.5.1. Caractérisation phytochimique par chromatographie analytique (HPLC-DAD-UV)

Les solutions des extraits aqueux et hydrométhanoliques de la plante étudiée ont été préparés dans de méthanol. Tous les échantillons ont été préparés et utilisés soit immédiatement pour l'analyse, soit conservés à 4 °C s'ils n'ont pas été analysés pendant plus d'une heure (Tzima et *al.*, 2018).

L'analyse chromatographique a été effectuée selon la méthode de Caponio et *al.*, (1999) avec de légères modifications en se servant d'un appareil HPLC-DAD équipé d'une colonne C18 et d'un détecteur UV / DAD, d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur en ligne et d'un injecteur automatique. Le détecteur à barrette de diodes (DAD) fixé avec la colonne analytique *Hypersil (BDS-C18, 5 µm, 250 × 4,6 mm)* constituant la phase stationnaire.

La phase mobile utilisée est un mélange de deux solvants, le premier est de l'acide acétique à 3 % dans le solvant (A), de l'eau et du méthanol dans le solvant (B). Les deux solvants sont utilisés dans un gradient d'élution linéaire pendant 30 minutes à 0.8 mL/min, en commençant par 93% de solvant A et en terminant par 100% de solvant B.

Le gradient d'élution appliqué était comme suit : 93 % A-7 % B (0,1 min), 72 % A-28 % B (20 min), 75 % A-25 % B (8 min) , 70 % A30 % B (7 min) et le même gradient pendant 15 min était de 67 % A-33 % B (10 min), 58 % A-42 % B (2 min), 50 % A-50 % B (8 min), 30% A70% B (3 min), 20% A-80% B (2 min) et 100% B en 5 min jusqu'à la fin de l'élution.

Le débit est de 1,5 mL /min, le volume d'injection de 20 µL et les longueurs d'ondes du détecteur sont fixées à plusieurs longueurs à savoir : 278nm (DAD A), 254nm (DAD B), 330nm (DAD C), 230nm (DAD D), 260nm (DAD E), 273nm (DAD F), 280nm (DAD G), 250nm (DAD H). Le choix des longueurs d'ondes est basé sur la convenance avec les absorbances maximales des molécules identifiées.

L'identification des composés séparés a été effectuée en comparant les temps de rétention des pics du chromatogramme de l'échantillon obtenu avec les temps de rétention et les spectres UV des pics des étalons précédemment analysés dans les mêmes conditions opératoires enregistrés dans la banque de données de l'HPLC (Tzima et *al.*, 2018). L' Acide gallique, (+)-catéchine, acide chlorogénique, Acide caféique, acide hydroxybenzoïque, (-) épicatechine, acide syringique, Ac p-coumarique , acide férulique, acide sinapinique, acide benzoïque, hespéridine, acide rosmarinique, acide trans-cinnamique et quercétine ont été utilisés comme normes. La quantité de chaque composé phénolique a été exprimée en µg par gramme d'extrait à l'aide de courbes d'étalonnage externes, qui ont été obtenues pour chaque étalon phénolique.

Les composés étalons utilisés pour l'identification, leur temps de rétention et la longueur d'onde sont mentionnés dans le **tableau 2**.

Tableau 2. Données des composée étalons utilisés pour l'identification HPLC-DAD-UV

Composé	Temps de rétention [min]	Signal [nm]
Acide gallique	5,400	DAD A
Catéchine	12,430	DAD B
Acide chlorogénique,	15,745	DAD E
Acide caféique	18,336	DAD C
Acide hydroxybenzoïque	18,917	DAD B
Epicatechine	19,165	DAD D
Acide syringique	21,250	DAD D
Acide p-coumarique	26,385	DAD G
Acide férulique	31,265	DAD H
Acide sinapinique	33,416	DAD E
Acide benzoïque	38,571	DAD C
Hespéridine	54,719	DAD F
Acide rosmarinique	59,326	DAD G
Acide trans-cinnamique	68,506	DAD H
Quercétine	71,045	DAD F

2.1.5.2. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux est basé sur la quantification de la concentration totale des groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le réactif de *Folin-Ciocalteu*, en milieu alcalin, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ces hétéropolyacides, d'où la formation d'un complexe molybdotungstique bleu. La coloration bleue obtenue est mesurée au spectrophotomètre à 765 nm et l'absorption est proportionnelle à la quantité de phénols présents (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1968).

Brièvement, 20 µL d'extrait dilué à 1 mg/mL dans le MeOH sont ajoutés à 100 µL de réactif de *Folin-Ciocalteu* 0.1N. On additionne 75 µL d'une solution de Na₂CO₃ à 7.5%. Le mélange est laissé au repos pendant 2 heures à l'obscurité. La lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'ondes de 765 nm. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (MeOH). Une droite d'étalonnage est réalisée avec de l'acide gallique dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser (Bahorun *et al.*, 1996). La concentration en polyphénols dans chaque extrait est exprimée en µg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (µg EqAG/mg d'extrait), et calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Figure 15 A**).

2.1.5.3. Dosage de flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes totaux est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl₃) avec lequel ils forment des complexes acides stables soit avec le carbonyle (C=O) en position C-4, soit avec le groupe hydroxyle en C-3 ou C-5 des flavones et des flavonols (Chang *et al.*, 2002). Ces complexes colorés avec le chlorure d'aluminium forment un complexe jaunâtre par des chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons. Par ailleurs, AlCl₃ peut également former des complexes acides labiles avec les groupements orthodihydroxyles éventuellement présents sur le noyau A et/ou B des flavonoïdes (Chang *et al.*, 2002).

Brièvement, 50 µL d'extrait (préparé dans le MeOH) sont ajoutés aux 130 µL de méthanol (MeOH) puis 10 µL d'acétate potassium (CH₃CO₂K) et 10 µL nitrate d'aluminium Al(NO₃)₃, l'ensemble est incubé à l'ombre à la température ambiante pendant 40 minutes. L'absorbance est lue à 430 nm. La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard : Quercétine. Un blanc est préparé en remplaçant les réactifs par le MeOH (50 µL extrait + 150 µL MeOH) (Topçu *et al.*, 2007).

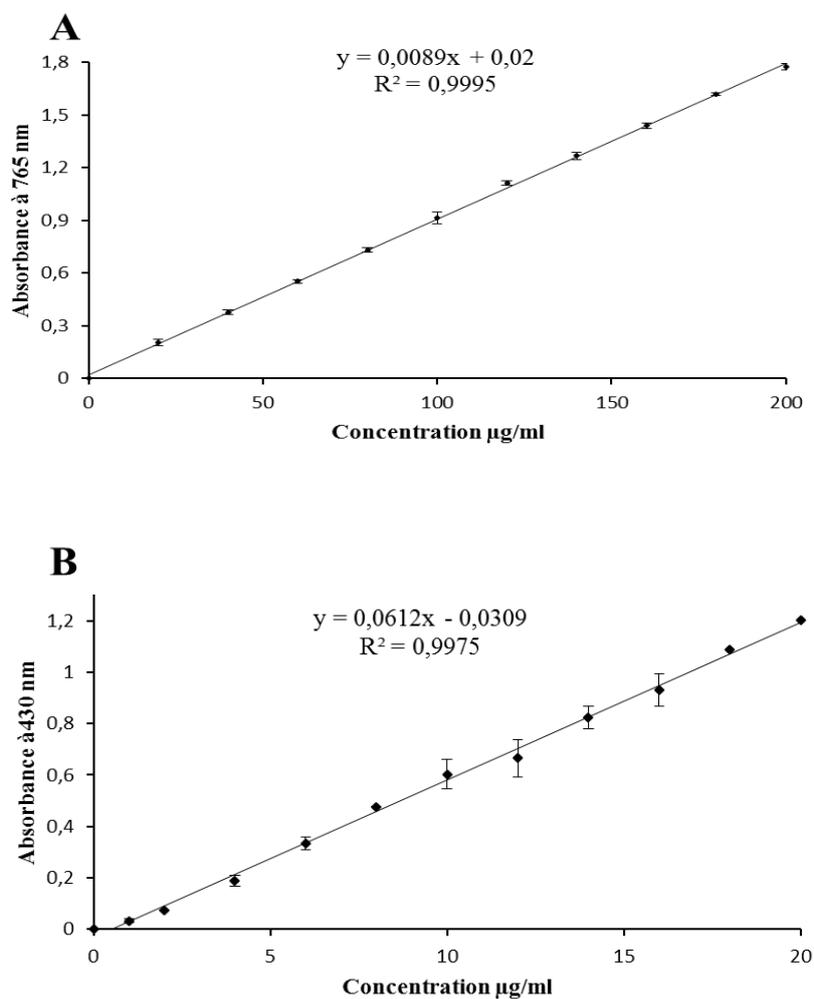
Le résultat est exprimé en µg d'équivalent de quercétine par mg d'extrait (µg EqQ/mg d'extrait) (**Figure 15 B**).

2.1.5.4. Dosage des tanins

Le principe de la méthode est basé sur le fait que la vanilline réagit avec les flavan3-ols libres et les unités terminales des proanthocyanidines donnant une coloration rouge dont l'intensité est proportionnelle aux taux de flavanols présents dans le milieu et qui présente un maximum d'absorption à 500 nm de longueur d'onde.

Brièvement, dans chaque puits de la microplaque 16 μ L de chaque échantillon sont ajoutés à 80 μ L du réactif d'analyse (2,5 mL de la solution de vanilline à 1% mélangée à 2,5 mL de la solution du HCl à 8%) (8 mL HCl complétés à 100 mL avec du MeOH), puis le mélange est vigoureusement agité. Après 1 minute ; 80 μ L de la solution HCl à 4% sont additionnés. L'erenmeyer est ensuite introduit au bain marie à 30°C et laissés pendant 20 minutes. La lecture des absorbances est lue à 500 nm en respectant l'intervalle d'une minute (Hagerman, 2002).

Une courbe d'étalonnage établie par la catéchine servira à la quantification des tanins condensés. La teneur en tanins condensés est exprimée en microgramme d'équivalent de catéchine par un milligramme d'extrait (μ g EqC/mg d'extrait) (**Figure 15 C**).



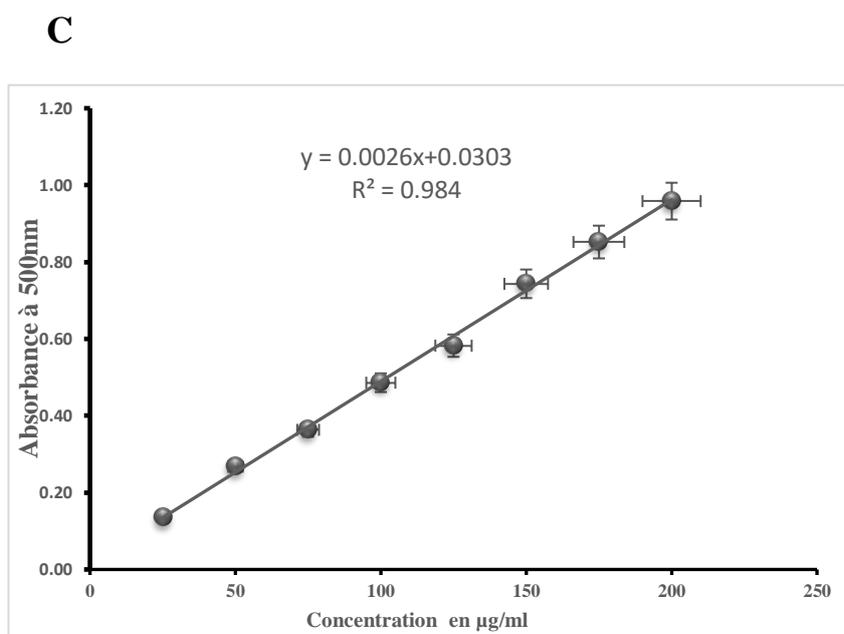


Figure15. Droites d'étalonnages de l'acide gallique (A) de la quercétine (B) et de la catéchine (C)

2.2. Étude des propriétés biologiques

2.2.1. Évaluation de l'activité antioxydante

2.2.1.1. Effet piègeur du radical libre DPPH•

L'activité de piégeage des radicaux libres de différents échantillons a été évaluée par le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH•). Une technique colorimétrique mise au point par Blois (1958) est utilisée. En présence des échantillons à évaluer, une longueur d'onde caractéristique a été utilisée pour estimer avec précision le taux de blanchiment du radical libre stable DPPH•. Sous sa forme réactive. Ce dernier a une importante capacité d'absorption à 517nm. En revanche, lors de la réduction par un antioxydant ou une espèce radicalaire, l'absorption diminue sensiblement. En effet, les molécules à pouvoir antioxydant réduisent le radical DPPH•, ayant une couleur violette, en radical diphényl picryl hydrazine avec une couleur jaune dont l'intensité est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu (Cuendet *et al.*, 1997 ; Burits et Bucar, 2000). (**Figure 16**).

Brièvement, dans un endroit sombre, une solution au dixième de mM de DPPH• a été préparée dans de l'éthanol. 160 µL de cette dernière ont été placés dans chaque puits de la microplaque, puis, un volume de 40 µL de chaque extrait à différentes concentrations ont été ajoutés. Après 30 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 570 nm. Une activité élevée de piégeage des radicaux libres implique une diminution de la capacité d'absorption du mélange réactionnel. Une courbe d'étalonnage a été utilisée pour évaluer la concentration de DPPH• dans le milieu réactionnel (Gülçin, 2007).

L'équation suivante quantifie le pouvoir de piégeage du radical DPPH• ;

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = \frac{[Ac - At]}{Ac} \times 100$$

Ac : Absorbance du contrôle (réaction témoin) ;

At : Absorbance du test (différents extraits d'*A.minus* ou de standards).

La concentration inhibitrice de 50% de l'activité DPPH (CI₅₀) des différents échantillons a ensuite été calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'inhibiteur. Elle a été exprimée en µg/mL et comparée à celle du BHA, du BHT et de l'α tocophérol (Guettaf, 2016).

Pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire, 2 autres paramètres peuvent être calculés : la concentration effectrice à 50% (CE₅₀ = CI₅₀/mg de DPPH/mL) et le pouvoir antiradicalaire (APR) qui n'est que l'inverse de l'EC₅₀ (APR = 1/CE₅₀).

N.B : Le CE₅₀ prend en considération la concentration de DPPH• présente dans le milieu réactionnel (Prakash *et al.*, 2007).

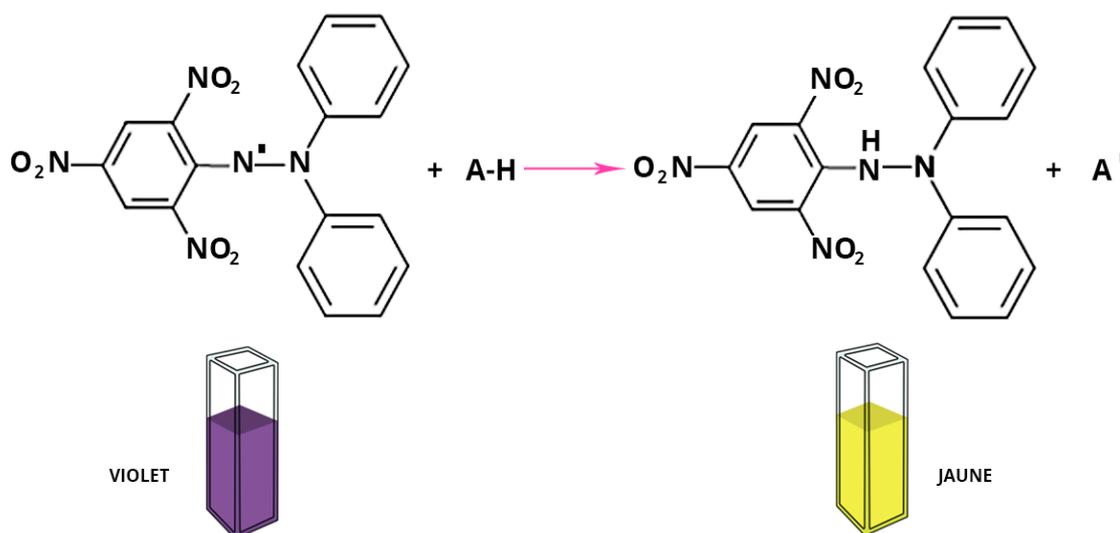


Figure 16. La forme radicalaire et la forme réduite de DPPH (Shivaprasad *et al.*, 2005)

2.2.1.2. Effet piègeur du radical libre galvinoxyl (GOR)

L'efficacité du pouvoir donneur d'hydrogène des phénols potentiels présents dans les extraits étudiés a été mesurée à l'aide du radical libre stable galvinoxyl (Galv-O•) (**Figure 17**). Malgré le potentiel démontré de cette molécule à accepter un électron ou un radical hydrogène pour gagner en stabilité, le galvinoxyl est une molécule considérée comme stable.

Par conséquent, il peut être réduit de manière irréversible. La présence d'un électron impair fait du galvinoxyl une molécule à forte affinité d'absorption à 428 nm ; dans des conditions normales, la solution de galvinoxyl apparaît jaunâtre. Cependant, l'absorption a tendance à diminuer ou même à disparaître lorsque l'électron est apparié, de sorte que la décoloration qui en résulte est relativement proportionnelle au nombre d'électrons absorbés. Globalement, la dynamique de l'activité antioxydante et de l'activité donneuse d'hydrogène peut être mesurée en tirant parti du changement de couleur du galvinoxyl en présence d'un antioxydant (Shi et *al.*, 2001). Lorsque les antioxydants interagissent avec le radical Galv-O • stable, la réaction de piégeage produite obéit à la formule suivante ; $\text{Galv-O} \bullet + \text{A-OH} \leftrightarrow \text{Galv-OH} + \text{A-O} \bullet$. Où A-OH est un composé donneur d'hydrogène tel que les polyphénols et A-O • les radicaux instables résultants (Papadimitriou et *al.*, 2006). En bref, 40 μL de différentes concentrations d'échantillons ont été ajoutés à 160 μL de solution de galvinoxyl 0,1 mM dans chaque puits de la microplaque. Après incubation dans l'obscurité à température ambiante pendant 2 heures, l'absorbance a été mesurée à 428 nm. Un contrôle négatif contient 40 μL de méthanol au lieu d'échantillons a été utilisé (Amrani et *al.*, 2019). L'équation suivante est utilisée pour quantifier le pouvoir de piégeage du radical GOR ;

$$\text{Effet de piégeage GOR (\%)} = [(\text{Ac} - \text{At})/\text{Ac}] \times 100$$

Ac : Absorbance du contrôle (réaction témoin) ;

At : Absorbance du test (différents extraits d'*A.minus* ou de standards).

La concentration inhibitrice de 50% de l'activité GOR (CI₅₀) de différents échantillons a ensuite été calculée et comparée à celle du BHA et du BHT.

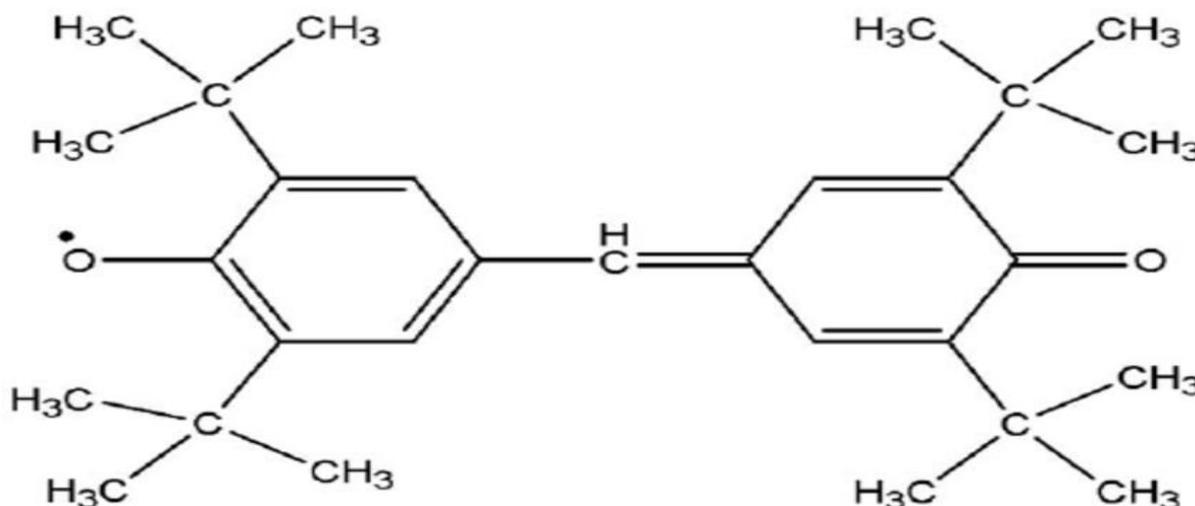


Figure 17. Structure chimique de la forme radicalaire du galvinoxyl (Barzegar et Moosavi-Movahedi, 2011)

2.2.1.3. Test de blanchiment du β carotène

La capacité des extraits aqueux des deux plantes de prévenir le blanchiment du β -carotène est déterminée selon la méthode décrite par Marco *et al.*, (1968). Cette méthode est largement utilisée dans le domaine de la chimie alimentaire. Le principe de la méthode repose sur la décoloration de la couleur jaunâtre d'une solution de β -carotène due à la rupture de la π -conjugaison par réaction d'addition du radical peroxyde lipidique ou lipidique ($L\bullet$ ou $LOO\bullet$) à une double liaison $C=C$ du β -carotène. L'espèce radicalaire est générée à partir de l'autoxydation de l'acide linoléique par chauffage sous atmosphère d'air. Lorsque l'antioxydant approprié est ajouté à la solution, la décoloration peut être retardée par la réaction concurrente entre le β -carotène et l'antioxydant avec les radicaux soumis (Al-Saikhan, M. S. et al., 1995).

Brièvement, dix milligrammes de β -carotène ont été dissous dans 100 mL de chloroforme. À partir de cette solution on prélève 1 mL qu'on introduit dans un ballon contenant 20 mg d'acide linoléique et 100 mg de Tween 40. Le chloroforme a été éliminé à l'aide d'un rotavapeur à 40°C et au résidu, 50 mL d'eau oxygénée ont été ajoutés lentement, sous agitation vigoureuse pour former l'émulsion (**A**). Ensuite, 200 μ L de chaque extrait, à différentes concentrations ont été mélangés avec 5 mL de l'émulsion (**A**). Une solution se composant de 200 μ L d'éthanol et de 5 mL d'émulsion (**A**) à été préparée (contrôle négatif).

Une deuxième émulsion (**B**) se composant de 20 mg de l'acide linoléique, 100 mg de Tween 40 et 50 mL d'eau distillée a été également préparée. 200 μ L d'éthanol sont ajoutés à 5 mL de l'émulsion (**B**) pour étalonner à zéro le spectrophotomètre.

Le mélange est placé dans un bain-marie et incubé à 50°C pendant 2 heures. L'oxydation de l'émulsion précédente est suivie par la mesure de l'absorbance de chaque échantillon juste après sa préparation ($t = 0$ min) et à la fin de l'expérience ($t = 120$ min) à 470 nm. Le BHA et le BHT sont utilisées comme des antioxydants standards. L'activité antioxydante (%) est exprimée en pourcentage d'inhibition par rapport au contrôle négatif selon l'équation suivante :

$$\text{Activité antioxydante \%} = \left[\frac{1 - (At_0 - At_{120})_{\text{test}}}{(At_0 - At_{120})_{\text{contrôle}}} \right] \times 100$$

At 0: absorbance au temps $t = 0$;

At 120 : absorbance au temps $t = 120$ min.

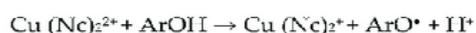
2.2.1.4. Capacité antioxydante de réduction des ions cuivriques (CUPRAC)

Pour évaluer le pouvoir réducteur des ions cuivre de différents extraits d'*A.minus*, le test CUPRAC a été réalisé. Ce test est basé sur la réduction de Cu (II) en Cu (I) par les antioxydants présents dans les échantillons. En effet, la conversion des hydroxyles phénoliques

en quinones à travers la réduction du complexe Cu(II) Nc, produisant ainsi un complexe chromogène de Cu (I) avec la néocuproïne (2,9-diméthyl-1,10-phénanthroline) Cu(I)Nc qui absorbe à 450 nm (**Figure 18**). Le réactif CUPRAC est relativement préférable car il est beaucoup plus stable que d'autres radicaux comme le DPPH•. De plus, la réaction d'oxydoréduction, qui donne naissance à un chélate coloré de Cu (I) -Nc, est relativement insensible à plusieurs paramètres tels que l'air, la lumière du soleil, l'humidité et le pH, ce qui fait de ce test un choix de première intention (Ioannou, 2015).

Pour procéder au test de CUPRAC, nous avons opté pour l'approche d'Apak et *al.*, (2004). Brièvement, dans chaque puits de la microplaque, 40 μL d'extraits de différentes concentrations, 50 μL de CuCl_2 (10 mM), 50 μL de néocuproïne (7,5 mM) et 60 μL de tampon ACNH_4 (1 M, pH 7,0) ont été ajoutés (volume total de 200 μL dans chaque puits de la microplaque) et bien mélangés. L'absorbance a été mesurée à 450 nm après 30-60 min. En suivant les mêmes étapes et sans l'échantillon testé, le BHA et le BHT à différentes concentrations ont été utilisés comme standards. La concentration de l'extrait fournissant une absorbance de 0,5 ($A_{0,5}$) a été déterminée à partir du graphique de l'absorbance en fonction de la concentration de chaque extrait.

Chemical reaction:



Scheme 13

Mechanism of reaction:

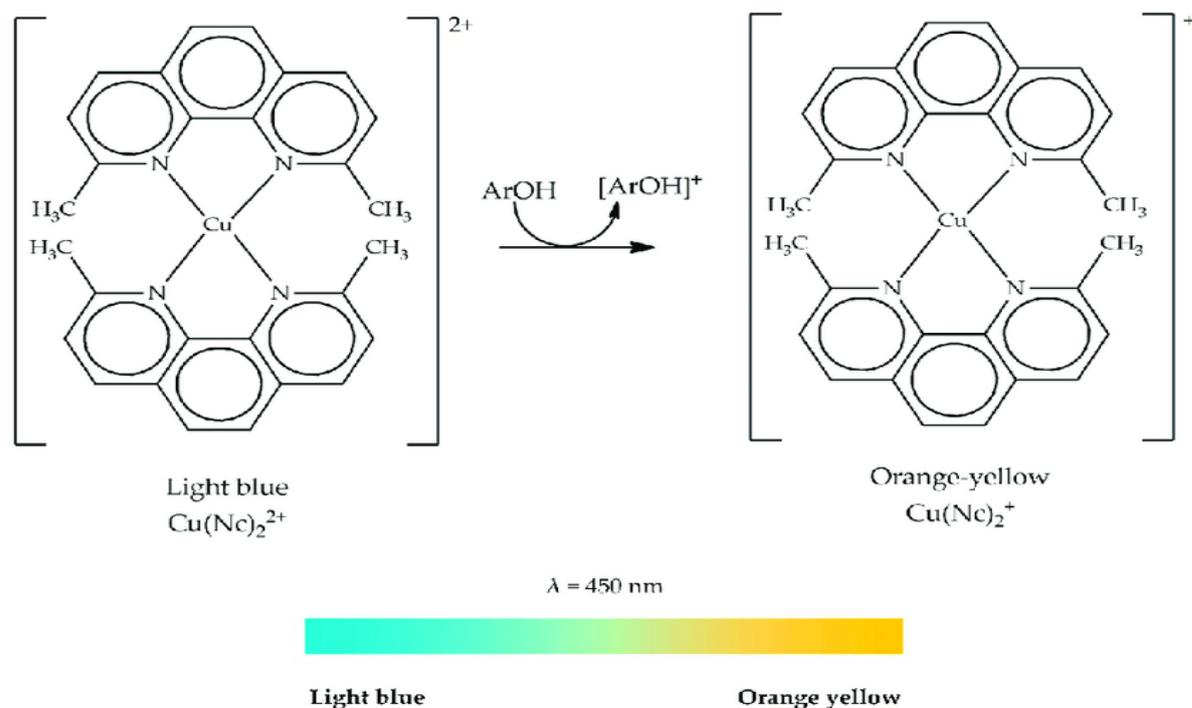


Figure 18. Mécanisme de réaction de la capacité antioxydante réductrice du cuivre (CUPRAC) (Bibi Sadeer et *al.*, 2020)

2.2.2. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits a été effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines décrite par Ghosh et *al.*, (2015). Cette méthode consiste à préparer quatre solutions :

- **La solution de test**; se compose de 0,45 mL de la solution aqueuse de l'albumine du sérum bovin (ASB) 0,5 % et 0,05 mL de chaque extrait avec des concentrations de 250, 500, 1000 et 1500 µg/mL.
- **La solution contrôle témoin** ; se compose de 0,45 mL de la solution aqueuse d'ASB 0,5 % et 0,05 mL d'eau distillée.
- **La solution contrôle produit** ; se compose de 0,45 mL d'eau distillé et 0,05 mL de chaque extrait avec des concentrations de 250, 500, 1000 et 1500 µg/mL .
- **La solution standard** ; se compose de 0,45 mL de la solution aqueuse d'ASB 0,5 % et 0,05 mL de la solution de l'anti-inflammatoire de référence, le Diclofénac de sodium avec des concentrations de 250, 500, 1000 et 1500 µg/mL.

Les pH de toutes les solutions citées précédemment sont ajustés à 6,3 par une solution du HCl (1N), puis, incubées à 37°C pendant 20 min. Ensuite, la température est augmentée à 57°C pendant 3 min suivie d'un refroidissement des tubes. Puis, 2,5 ml de la solution saline tampon phosphate (pH 6,3) ont été ajoutés aux solutions ci-dessus.

L'absorbance a été lue par un spectrophotomètre UV-visible à 255 nm, et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit :

$$\text{Inhibition de la dénaturation (\%)} = [100 - (\text{At} - \text{Acp}) / \text{Act}] \times 100$$

At : Absorbance du test (différents extraits d'*A.minus* ou de standards);

Acp : Absorbance du contrôle produit ;

Act : Absorbance du contrôle témoin (contrôle négatif).

Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées et les résultats sont comparés avec le Diclofénac sodique à différentes concentrations (Williams *et al.*, 2008).

2.2.3. Évaluation de l'activité anti-*Alzheimer* *in vitro*

Plusieurs enzymes sont impliquées dans des processus liés aux déclenchements et de développement de certaines pathologies, c'est le cas par exemple de l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase et la maladie d'*Alzheimer*.

Les activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BuChE) de différents extraits d'*A.minus* ont été déterminées à l'aide de la méthode d'*Ellman* avec des modifications (Ellman et *al.*, 1961). Il s'agit d'une méthode colorimétrique basée sur

la quantification de la variation de l'absorbance par minute ($\Delta A / \text{minute}$) due à la formation de l'anion jaune 5-thio-2-nitrobenzoate, qui reflète la vitesse d'hydrolyse de l'iodure d'acétylthiocholine (ACI) ou de l'iodure de butyrylthiocholine (BuCI) (Elufioye et *al.*, 2019). L'extrait végétal a été préparé dans l'eau ou le méthanol. D'autre part, l'enzyme a été préparée dans un tampon phosphate de sodium (pH 8,0). La galantamine a été utilisée comme référence (contrôle positif).

Brièvement, 150 μL de tampon phosphate de sodium (pH 8,0) ont été ajoutés à 10 μL de solution d'extrait et 20 μL de solution d'AChE ou de BChE puis le mélange a été incubé à 25 °C. Après 15 min, 10 μL d'acide 5,5-dinitro-bis-nitrobenzoïque (DTNB) et 10 μL d'ACI ou de BuCI ont été ajoutés. Immédiatement, une première lecture a été faite à 412 nm suivie d'une seconde 15 min plus tard. Les réactions de dosage avec les différents extraits de la plante ont toutes été réalisées en triplicatas à des concentrations de 100 et 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Une solution tampon a été utilisée comme contrôle négatif. Le pourcentage d'inhibition de l'AChE / BChE par les différents extraits a été calculé par rapport à l'inhibition par la galantamine. La concentration de l'extrait produisant une inhibition de 50 % (CI_{50}) a ensuite été calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur (Elufioye et *al.*, 2019).

Le pourcentage d'inhibition (I%) des extraits de plantes a été obtenu à l'aide de la formule suivant ;

$$\text{Inhibition (\%)} = [(V_o - V_i) / V_o] \times 100$$

V_o : Activité enzymatique en l'absence des différents extraits d'*A.minus* ;

V_i : Activité enzymatique en présence des différents extraits d'*A.minus* ou le standard.

2.2.4. Évaluation de l'activité antidiabétique *in vitro*

Au même titre que l'AChE et BChE, α -amylase est une enzyme dont l'implication dans le diabète type II est bien démontrée. L'activité inhibitrice de l' α -amylase a été réalisée en utilisant la méthode de l'iode/potassium (IKI) de *Caraway Somogyi* (Yang et *al.*, 2012) avec quelques modifications. La solution d'échantillon (25 μL) a été mélangée à une solution d' α -amylase (50 μL) dans un tampon phosphate (pH 6,9 avec 6 mM de chlorure de sodium) dans une microplaque à 96 puits et incubée pendant 10 min à 37 °C.

Après la pré-incubation, la réaction a été initiée par l'ajout d'une solution d'amidon (50 μL , 0,05%). De même, un blanc a été préparé en ajoutant la solution d'échantillon à tous les réactifs de réaction sans solution d'enzyme (α -amylase). Le mélange réactionnel a été incubé

pendant 10 minutes à 37 °C. La réaction a ensuite été arrêtée par l'ajout de HCl (25 µL, 1 M). On a ensuite ajouté la solution d'iodure de potassium et d'iode (100 µL).

Les absorbances de l'échantillon et du blanc ont été lues à 630 nm à l'aide d'un lecteur à microplaques. En présence d'un inhibiteur d' α -amylase, moins d'amidon serait hydrolysé en maltose ou en glucose, et la valeur d'absorbance serait diminuée.

L'absorbance du blanc a été soustraite de celle de l'échantillon et l'activité inhibitrice de l' α -amylase a été exprimée en équivalent acarbose (mg ACE/g d'extrait) et la formule appliquée pour en extraire le pourcentage de l'inhibition est la suivante ;

$$\text{Inhibition (\%)} = [(At - Ac) / (Am - Ac)] \times 100$$

Ac : Absorbance du contrôle (réaction témoin) ;

At : Absorbance du test (différents extraits d'*A.minus* ou de standards) ;

Am : Absorbance du mélange amidon+IKI.

2.3. Étude toxicologique (toxicité aiguë par l'essai limite)

Afin d'évaluer tout éventuel risque de toxicité lors des tests biologiques, il était nécessaire de réaliser des essais de toxicité des extraits aqueux des différentes parties d'*A.minus*. Car, on ne peut guère évoquer la pharmacologie au sens large sans pour autant qu'on sache le degré de la sûreté du produit en question. Cela peut être déterminé par plusieurs méthodes dont nous citons à titre d'exemple : méthode de *Dragstedt et Lang*, la méthode de *Karber et Behrens* (Stowtchiva, 1988), la méthode de *Litchfield et Wilcoxon* (Litchfield et Wilcoxon, 1949).....etc. Cependant, lesdites méthodes nécessitent un nombre élevé d'animaux.

Dans notre approche, nous avons adopté les lignes directrices pour les essais des produits chimiques OCDE 425. (2008) qui repose sur la méthode de *Bruce* qui consiste à étudier la toxicité orale aiguë et les méthodes de l'ajustement des doses. Ce mode opératoire décrit par l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE), concourt à ramener à un minimum le nombre d'animaux nécessaires pour estimer la toxicité orale aiguë. D'autre part, l'essai limite offre un moyen efficace d'identifier les substances susceptibles d'être peu toxiques ou dont les données toxicologiques sont indisponibles comme dans notre cas.

En plus de l'observation des signes de toxicité physiologiques et/ou comportementaux, l'essai permet d'estimer la dose létale 50 (DL₅₀) qui représente la dose d'une substance qui, administrée à des animaux de laboratoire provoque la mort de la moitié d'entre eux.

La DL₅₀ permet de mesurer la toxicité d'une substance et d'établir des classes de toxicité (Stowtchiva, 1988 ; Oduola *et al.*, 2007). En général, plus la DL₅₀ est petite, plus la substance est toxique. Le contraire est également vrai : plus la DL₅₀ est élevée, plus la toxicité est faible comme le montre le **Tableau 3**.

Pratiquement, deux doses de chaque extrait aqueux (2 et 5 g/kg) ont été testées sur des lots de cinq souris au maximum de poids homogène. Tout d'abord, les souris sont réparties en 7 lots comme suit : (Lot A : Placebo, Lot B1, 2 et 3 : 2g/kg de chaque extrait aqueux, Lot C1,2 et 3 : 5g/kg de chaque extrait aqueux) (OCDE 425, 2008). Les souris du groupe placebo ont reçu un même volume et de la même manière de l'eau distillée. Les doses sont administrées per os (dose unique) et ce de façon séquentielle. Si au moins trois animaux meurent, on suppose que la DL₅₀ est inférieure à la dose administrée et on réalise l'essai principal afin de déterminer la DL₅₀. Sinon, le test de toxicité est achevé et on se contente de constater que la DL₅₀ est supérieure aux doses administrées.

Tableau 3. Classes de toxicité selon l'échelle de Diezi chez les souris de laboratoire (Diezi, 1989).

DL50 orale	Indice de toxicité
DL50 < 5 mg/kg	très toxique
5 mg/kg < DL50 < 500 mg/kg	toxique
500 mg/kg < DL50 < 5000 mg/kg	faiblement toxique
DL50 > 5000 mg/kg	pas toxique (inoffensive)

Les sept lots ont été mis en observation individuelle (différentes perturbations comportementales et physiologiques des animaux en comparaison avec celui du groupe non traité, comme l'agitation, la respiration, l'asthénie et les décès) au moins une fois au cours des 30 premières minutes suivant l'administration du produit et régulièrement durant les premières

24 heures (avec une attention particulière pendant les 4 premières heures), puis quotidiennement par la suite pour permettre d'enregistrer les effets tardifs y compris le nombre de morts. De ce fait, l'appréciation des effets toxiques est faite sur la base de l'examen du comportement et du taux de mortalité. La période d'observation totalisant est de 14 jours. Les animaux sont maintenus à température ambiante avec accès libre en eau et en nourriture

2.4. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés sous forme de moyenne \pm SD et moyenne \pm SEM, pour les tests *in vivo*. Les CI_{50} sont calculées par la régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)].

La signification des différences entre le contrôle et les différents tests est déterminée par le test *ANOVA* univarié suivi du test de *Dunnnett/Tukey* pour les comparaisons multiples. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05 ($p \leq 0,05$).

RÉSULTATS

ET

DISCUSSION

Le processus général de caractérisation de nouvelles molécules bioactives à partir de matrices complexes, telles que les plantes, fait intervenir différentes étapes, dont les trois principales sont l'extraction, le fractionnement et l'identification des composés d'intérêt, toutes guidées par des analyses phytochimiques et des tests biologiques (Bouden,2019).

Probablement, nous pouvons dire que jusqu'au moment de la rédaction de ce manuscrit, il existe très peu d'informations, voire aucune, dans les références bibliographiques sur les activités antioxydantes, anti-inflammatoires et enzymatiques d'*Arctium minus (Hill) Bernh. ssp. Atlanticum*. En effet, presque la majorité des travaux de recherche sur les activités biologiques du genre *Arctium* ont été orientés vers l'étude de l'espèce *Arctium lappa*. Par conséquent (en tenant compte de la relation génétique entre les espèces *A.lappa* et *A.minus*), l'espèce *Minus* a été très peu étudiée et encore moins la sous-espèce *Atlaticum*, et ce au profit de l'espèce *Lappa*. Ainsi, et en cas d'absence de données relatives à notre espèce étudiée, nous procédons dans notre discussion en comparant nos résultats principalement avec ceux relatifs à l'espèce *A.lappa*.

1. Analyse phytochimique

1.1. Rendement d'extraction

L'extraction est une étape clé dans l'isolement, l'identification et l'utilisation des composés phénoliques. Hélas, il n'existe pas de méthode d'extraction parfaite. L'extraction par solvant est la technique la plus couramment utilisée pour l'extraction des composés phénoliques en raison de sa facilité d'utilisation, de son efficacité et de sa large applicabilité. En fonction de l'état de la biomasse, elle peut être une extraction solide-liquide ou une extraction liquide-liquide (Ignat et al., 2011).

On sait que l'efficacité de l'extraction dépend des conditions du procédé adopté. En effet, plusieurs facteurs affectent la concentration des composants souhaités dans l'extrait : les types de solvant, la force du solvant, le temps d'extraction, la vitesse d'agitation, le rapport échantillon-solvant, la température et la taille des particules. Cependant, il est rapporté que le facteur le plus influent est le type de solvant (Azwanida, 2015). Afin d'extraire différents polyphénols (étant plutôt hydrosolubles) avec une grande fiabilité, les spécialistes en la matière ont découvert que, à côté de l'eau, l'utilisation de solvants hautement polaires, tels que le méthanol et les mélange eau/méthanol, constitue l'extraction la plus efficace (Altemimi et al., 2017). De plus, il est rapporté que le méthanol était plus sélectif que l'éthanol pour extraire les polyphénols (Barla et al., 2007). Dans cette logique et suivant les procédures de la littérature,

nous avons opté pour des extraits bruts obtenus par l'eau ou un mélange eau/alcool (Extraction solide-liquide). De plus, nous avons choisi l'acétate d'éthyle comme solvant pour une troisième extraction (Extraction liquide-liquide). En effet, notre choix a été guidé par : **i** : la contribution potentielle des molécules bioactives hydrophiles aux effets pharmacologique (Scalzo et al., 2005) ; **ii** : la teneur élevée des extraits méthanoliques en flavonols et **iii** : l'activité antioxydante considérable des extraits de polarité égale à celle de l'acétate d'éthyle (Kallithraka et al., 1995). Ceci peut conduire à la séparation d'une sous classe hautement bioactive contenant les flavonoïdes de type glycosides.

Le rendement de chaque type d'extrait des trois organes d'*A.minus* par rapport au poids de la poudre est indiqué dans le **tableau 4**.

Tableau 4. Rendement d'extraction des différents extraits testés d'*Arctium minus* .ssp. *atlanticum*.

Organe d' <i>A.minus</i>	Solvant	Acronyme	Rendement d'extraction (%)
Racines	Eau	BRq	7,54
	Eau/méthanol (20/80)	BRm	8,56
	Acétate d'éthyle	BRt	0,59
Feuilles	Eau	BFq	18,65
	Eau/méthanol (20/80)	BFm	20,23
	Acétate d'éthyle	BFt	5,21
Fleurs	Eau	BFRq	10,85
	Eau/méthanol (20/80)	BFRm	11,65
	Acétate d'éthyle	BFRt	3,95

En comparant les différentes parties (aériennes et racinale) en termes de rendement, les résultats obtenus montrent que les extraits bruts hydro-alcooliques des feuilles et des fleurs ont donné les meilleurs rendements à raison de : 20,23 et 8,56 %, respectivement, suivis par les racines qui ont donné un rendement de 8,56 %. Selon Markham (1982), les extraits hydro-alcooliques contiennent des flavonoïdes, des aminoacides, des terpènes, des cires et des tannins.

Quant à la nature du solvant, l'extrait aqueux vient en deuxième position avec des différences de rendement plus au moins légères (18,65, 10,85 et 7,54 % relatifs aux feuilles, fleurs et racines, respectivement). Le bon rendement enregistré par la méthode de décoction qui correspond à l'usage ancestral, permet d'extraire préférentiellement les composés polaires, comme, elle peut aussi extraire quelques composés amphiphiles (Jones et Kingdon, 2005). Selon Markham (1982), l'extrait aqueux contient des flavonoïdes glycosylés et des tannins.

Cependant, les extraits d'acétate éthyle présentent les rendements les plus faibles en admettant qu'ils ne sont que des fractions et pas des extraits bruts.

L'ensemble des résultats présentés ci-dessous peuvent être expliqué par le fait que l'addition de l'eau au solvant organique augmente la solubilité des composés par modulation de la polarité de ces derniers, probablement à cause de l'affaiblissement des liaisons d'hydrogène dans les solutions aqueuses et la solubilisation des molécules (Albano et Miguel, 2010). En effet, les solvants alcooliques étant plus capables d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules polaires, de moyenne et de faible polarité (Seidel, 2005). De plus, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'obtenir le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction. Néanmoins, l'extraction par méthode traditionnelle est faite par décoction à température élevée pendant 20 min. En fait, Su et *al.*, (2006) ont rapporté que le rendement des extractions aqueuses augmente avec la température. Cela est expliqué par le fait que l'eau à haute température provoque la perturbation des cellules facilitant la pénétration du solvant et la solubilisation des molécules (Albano et Miguel, 2010). La chaleur peut, cependant, conduire à la dégradation des molécules thermolabiles (Seidel, 2005), c'est la raison pour laquelle, la décoction a été effectuée pendant un temps réduit.

Cependant, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie car en partie, aucune étude n'est disponible sur la sous espèce étudiée, et d'autre part les conditions d'extraction appliquées étaient différentes, notamment la température, la durée d'extraction, le rapport solide/liquide, et les solvants utilisés. En effet, la seule étude relatant le rendement des feuilles de l'espèce *A. minus* ssp. *minus*, rapportait des valeurs de l'ordre de : 17,6 et 14,5%, pour les extraits aqueux et éthanolique, respectivement (Erdemoglu et *al.*, 2009). Bien que ces valeurs semblent être proches de celles obtenues dans notre étude, l'ordre de fiabilité des solvants est manifestement inversé. Cela peut être expliqué par notre utilisation du méthanol qui est plus fiable que l'éthanol utilisée par les auteurs cis-mentionnés (Barla et *al.*, 2007).

Une autre étude menée sur, les racines de l'espèce *Lappa* présente des valeurs de rendement proches de nos résultats, à savoir : 10.56 et 10.25%, pour les extraits aqueux et hydrométhanolique, respectivement. Cette similitude peut être expliquée par la parenté génétique entre la grande et la petite bardane (Predes et *al.*, 2011).

1.2. Profilage chromatographique des composés phénoliques des extraits bruts

La méthode d'analyse par HPLC-DAD-UV étant qualitative et quantitative a été mise au point afin d'évaluer la composition en polyphénols des extraits aqueux et hydrométhanolique des trois organes de la plante étudiée. L'identification des composés phénoliques dans les différents échantillons a été faite en comparant les temps de rétentions avec les temps de rétentions de 15 standards disponibles. La teneur en composés phénoliques dans les extraits a été estimée à partir de courbes d'étalonnage (**Tableau 5**).

Tableau 5. Composés polyphénoliques dans les différents extraits bruts étudiés d'*Arctium minus*. ssp. *atlanticum*, identifiés et quantifiés par HPLC-DAD-UV.

Composé chimique	Extrait analysé [$\mu\text{g/g}$ d'extrait sec]					
	BRq	BRm	BFq	BFm	BFRq	BFRm
Acide gallique	49.84 ^e	92.55 ^e	210.96 ^e	219.69 ^e	997.47^a	53.64 ^e
Catéchine	4916.22^a	4227.89^e	2347.32^e	880.50 ^e	869.59 ^e	628.46^e
Acide chlorogénique,	60.44 ^e	41.56 ^e	151.86 ^a	119.24 ^e	38.41 ^e	138.17 ^e
Acide caféique	81.35 ^e	152.67 ^a	91.89 ^e	13.34 ^e	25.38 ^e	14.07 ^e
Acide hydroxybenzoïque	217.66 ^e	1113.15 ^e	441.38 ^e	2086.4^a	292.42 ^e	423.06 ^e
Epicatéchine	189.48 ^e	304.53 ^e	286.85 ^e	320.85 ^e	76.55 ^e	417.78 ^a
Acide syringique	41.28 ^e	13.22 ^e	40.81 ^e	21.74 ^e	9.59 ^e	94.87 ^a
Acide p-coumarique	166.53 ^e	92.36 ^e	238.59 ^a	119.23 ^e	36.72 ^e	175.60 ^e
Acide férulique	114.22 ^e	267.81 ^a	70.01 ^e	170.16 ^e	64.20 ^e	76.22 ^e
Acide sinapinique	28.93 ^e	41.19 ^e	62.08 ^e	40.00 ^e	42.43 ^e	67.69 ^a
Acide benzoïque	257.58 ^e	1627.38 ^a	667.98 ^e	1283.23 ^e	184.00 ^e	469.91 ^e
Hespéridine	234.49 ^e	491.10 ^a	92.14 ^e	28.39 ^e	55.47 ^e	235.48 ^e
Acide rosmarinique	Nd	50.23 ^e	327.72 ^e	427.51 ^a	216.41 ^e	208.52 ^e
Acide trans-cinnamique	202.29 ^a	77.47 ^e	45.47 ^e	149.89 ^e	Nd	115.98 ^e
Quercétine	27.04 ^e	144.51 ^e	36.11 ^e	194.10 ^a	Nd	Nd

Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (**a** et **e**) dans la même ligne sont significativement ($P < 0,05$) différentes (La valeur la plus grande du composé chimique est retenue comme référence dans la comparaison) ; Nd : non identifié (au-dessous du seuil de détection) ; Valeur en **gras** correspond au composé prédominant dans chaque extrait.

Le profilage chimique HPLC-DAD-UV des extraits étudiés a permis d'identifier plusieurs composés phénoliques tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes.

Les composés identifiés sont montrés dans le **tableau 5**. Les valeurs données à chaque composé représentent sa teneur dans 1 gramme d'extrait sec de l'échantillon étudié dans la même longueur d'onde où elle représente son absorption maximale. Par contre, les composés non identifiés représentent soit des composés non phénoliques contenus dans les extraits comme des protéines, sucres ou autre, soit des composés phénoliques qui non pas pu être identifiés à cause de l'absence des standards d'identification correspondants.

1.2.1. Profile chimique de l'extrait aqueux des racines d'*A.minus* (BRq)

Selon l'analyse HPLC-UV effectuée, Le BRq a montré des pics remarquables dans un intervalle de temps entre 3 min et 18 min (**Figure 19**), Les spectres UV comparés avec ceux des standards ont montré la présence de 14 composés phénoliques des 15 disponible dans la banque des données (**Tableau 5**). Le composant phénolique majeur de cet extrait a été déterminé à un temps de rétention de 12,4 min qui correspond à une teneur de 4916.22 µg/g. Précisément, il s'agit de la catéchine, un flavanol monomérique (flavan-3-ols) qui fait partie tanins condensés (anthocyanidols). Ils sont considérés comme des isoflavonoïdes. Par contre, l'acide rosmarinique qui dérive de l'acide cinnamique était complètement absent, tandis que le quercétine (Flavonol) et deux dérivés de l'acide hydrobenzoïque et celui de cinnamique ; acide sinapinique et syringique, respectivement, ont été minoritaires dans l'extrait (27.04, 28.93 et 41.28 µg/g, respectivement). Or, l'acide hydroxybenzoïque, épicatechine, acide p-coumarique acide benzoïque, hespéridine et acide trans-cinnamique montre des teneurs moyennes qui oscillent entre 160 et 260 µg/g. Les profils des chromatogrammes HPLC de l'extrait BRq ont été illustrés dans la **figure 19**.

1.2.2. Profile chimique de l'extrait hydrométhanolique des racines d'*A.minus* (BRm)

Bien qu'aucun composé chimique n'enregistre une intensité aussi élevée que la catéchine dans l'extrait aqueux, l'analyse chromatographique effectuée indique une richesse en polyphénols relativement plus importante que celle observée dans l'extrait aqueux du même organe de la plante étudiée. Un aperçu sur le **tableau 5** vient confirmer cette supériorité quantitative et qualitative presque totale. En effet, sur les 15 composés chimiques recherchés, le BRm les renferme tous même l'acide rosmarinique et avec des teneurs nettement supérieures à celles dans l'extrait aqueux, à l'exception de la catéchine qui présente une valeur plus au moins proche. Néanmoins, la catéchine reste le composé le produit majeur dans les racines des deux extraits.

Le BRm a montré des pics remarquables vers les minutes 12.40, 38.54 et 18.54, qui correspondent au temps de rétention de la catéchine, acide benzoïque et hydroxybenzoïques, respectivement, lesquels montrent des teneurs de 4227.89, 1627.38 et 1113.15 µg/g, respectivement (**Figure 20 et tableau 5**). Au même titre que dans le BRq, l'acide syringique et l'acide sinapinique de l'extrait BRm restent minoritaires avec 13,22 et 41,19 µg/g, respectivement. Les profils des chromatogrammes HPLC de l'extrait BRm ont été illustrés dans la **figure 20**.

1.2.3. Profile chimique de l'extrait aqueux des feuilles d'*A.minus* (BFq)

Selon l'analyse HPLC-UV obtenue, Le BFq a enregistré des pics remarquables au niveau de deux principaux intervalles : 5 à 12 minutes et 26 à 39 minutes. En plus on remarque même un pic distinguable vers les 59^{èmes} minutes (**Figure 21**), Les spectres UV comparés avec ceux des standards ont montré une richesse importante, incarnée par la présence de l'intégralité des 15 composés de références (**Tableau 5**). A l'instar des BRq et BRm, le composant phénolique majeur de cet extrait a été déterminé à un temps de rétention de 12,4 min qui correspond à la catéchine dont la teneur est de 2347.32 µg/g. De même, l'acide sinapinique et l'acide syringique ont enregistré des faibles taux proches des ceux vus avec les deux extraits précédents (62,08 et 40,81 µg/g, respectivement).

Par contre, l'acide rosmarinique qui a été élu à la minute 59.32, était relativement abondant dans le BFq contrairement à ce qui a été observé dans le BRq et BRm (327.72, Non détecté, 50.23 µg/g, respectivement). L'Hespéridine enregistre une teneur relativement faible (92,14 µg/g). Tandis que les 3 acides phénoliques : gallique (5,54 min), chlorogénique (15,74 min) et p-coumarique (26,38 min) témoignent les teneurs les plus grandes par rapport aux extraits précédents (210.96, 151,86 et 238.59 µg/g, respectivement). L'acide benzoïque à son tour présente un teneur relativement bonne (667,59 µg/g) dont le pic peut être aisément observé vers la minute 38,57. Les profils des chromatogrammes HPLC de l'extrait BFq ont été illustrés dans la **figure 21**.

1.2.4. Profile chimique de l'extrait hydrométhanolique des feuilles d'*A.minus* (BFm)

Selon l'analyse chromatographique menée sur l'extrait BFm, nous avons constaté la présence de tous les composés que nous avons pu détecter et identifier, et ce avec des teneurs relativement bonnes. En effet, les chromatogrammes de l'HPLC-UV obtenus montrent de multiples pics éparpillés sur toute la longueur de l'axe exprimant le temps de rétention (**Figure 22**).

A la minute 18,91, le BFm enregistre le pic le plus intense jamais enregistré durant notre étude. Ainsi, le composé relatif constitue la partie majeure et qui correspond belle et bien à

l'acide hydroxybenzoïque avec une teneur de 2086,4 µg/g (**Tableau 5**). Par contre, le catéchine a vu diminuer sensiblement sa teneur par rapport aux précédents extraits étudiés (880,5 µg/g), mais qui reste relativement présent en quantité considérable. D'autre part, nous avons constaté un pic remarquable vers la minute 38,57, correspondant à l'acide benzoïque avec une teneur relativement grande (1283,23 µg/g).

Bien que tous les pics correspondant à l'acide rosmarinique et à la quercétine n'aient montré pas une intensité remarquable, ces deux composés ont enregistré aux minutes 59,32 et 71,04, respectivement, les teneurs les plus grandes parmi tous les extraits étudiés avec des valeurs de 427,55 et 194,10 µg/g, respectivement. Cependant, l'acide caféique et l'héspéridine ont montré une présence très timide à raison de 13,34 et 28,39 µg/g. Or, l'acide syringique et l'acide sinapique ont montré au même titre que des extraits précédemment étudiés, des valeurs minoritaires (21,74 et 40,00 µg/g, respectivement). Les profils des chromatogrammes HPLC de l'extrait BFm ont été illustrés dans la **figure 22**.

1.2.5. Profile chimique de l'extrait aqueux des fleurs d'*A.minus* (BFRq)

Selon les données obtenues par HPLC-UV, les pics les plus remarquables s'étendent entre la 5^{ème} et la 13^{ème} minute. L'extrait BFRq a révélé la présence de 13 composés phénoliques des 15 disponible dans la banque des données (**Tableau 5**). En effet, la quercétine et l'acide trans-cinnamique étaient complètement absents, ce qui fait de cet extrait l'échantillon le moins varié en termes de polyphénols recherchés. Cependant, cet extrait est le plus riche parmi tous les extraits étudiés en acide gallique. Ce dernier constitue même le composé le majeur dans le BFRq à raison de 997,4 µg/g, et a été détecté à la minute 5,40. En plus, le catéchine élu à la minute 12,34 est présent en quantité considérable (869,59 µg/g). Un autre composé volatil dérivé de l'acide cinnamique : l'acide rosmarinique, est présent en quantité relativement bonne (216,41 µg/g).

Par contre, nous avons constaté que les teneurs des autres acides phénoliques tels que l'acide chlorogénique, p-coumarique et caféique, sont les plus faibles jamais enregistrés lors de notre étude sur l'*A.minus* (38,41, 14,07 et 36,72 µg/g, respectivement). Les profils des chromatogrammes HPLC de l'extrait BRq ont été illustrés dans la **figure 23**.

1.2.6. Profile chimique de l'extrait hydrométhanolique des fleurs d'*A.minus* (BFRm)

Bien que l'intensité des pics chromatographiques ne soit pas clairement observée lors de l'analyse HPLC-UV relative à l'extrait BFRm, nous avons constaté qu'il existe plusieurs pics s'étalant sur toute la longueur de l'axe des abscisses, allant de la 5^{ème} minute à 68^{ème} (**Figure 24**).

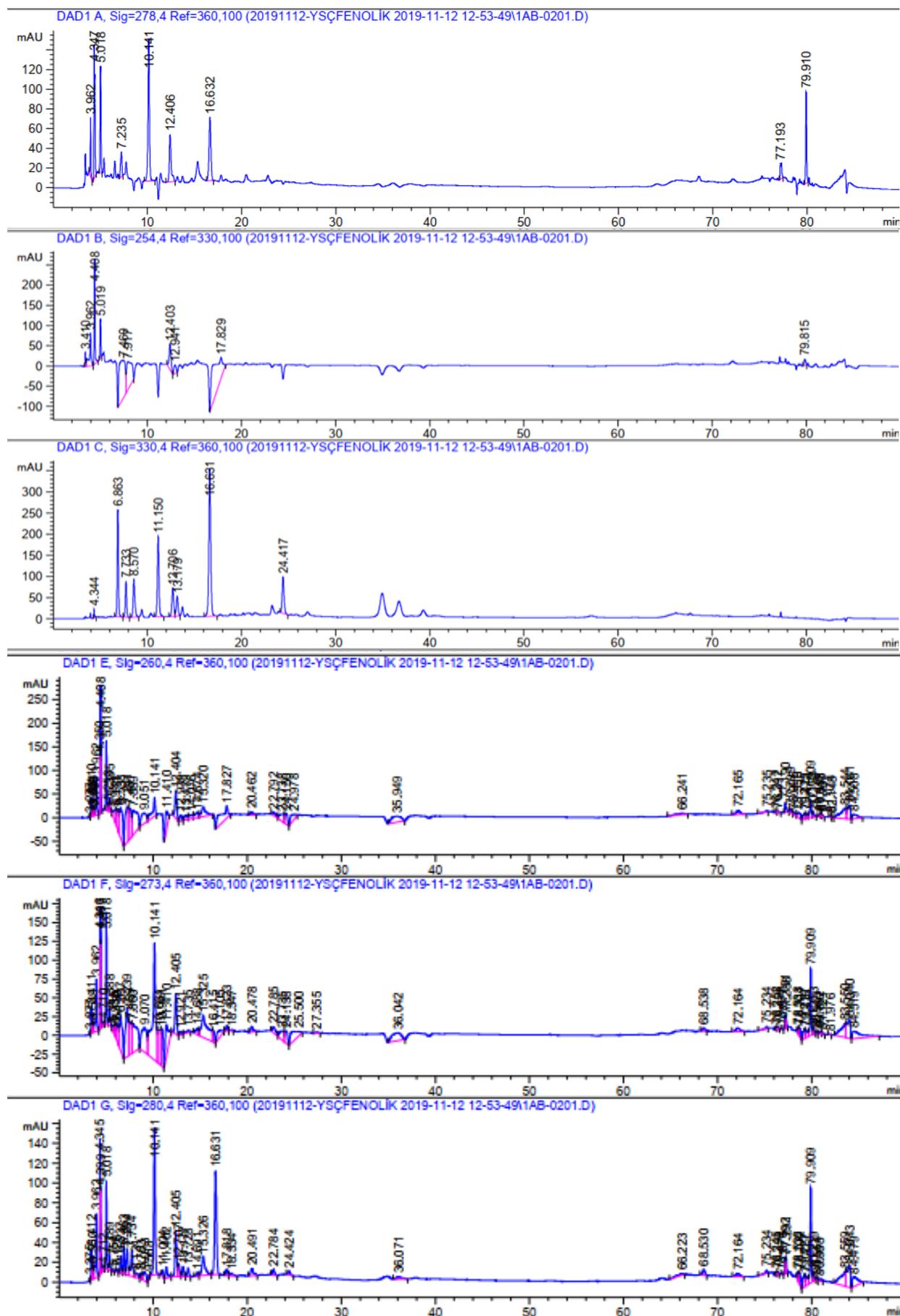


Figure 19. Chromatogrammes HPLC de l'extrait aqueux des racines d'*A.minus* à différentes longueurs d'ondes

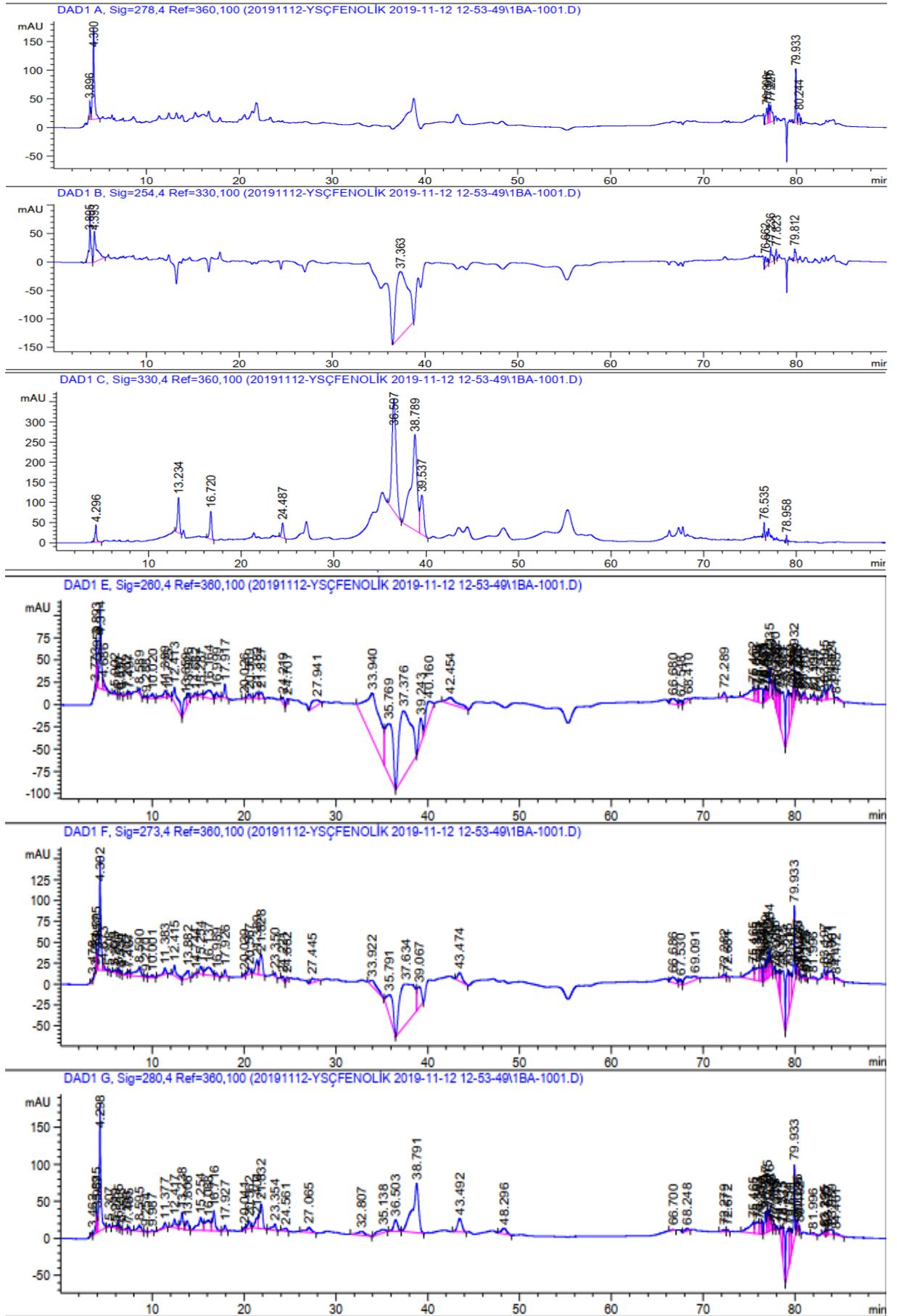


Figure 20. Chromatogrammes HPLC de l'extrait hydrométhanolique des racines d'*A.minus* à différentes longueurs d'ondes

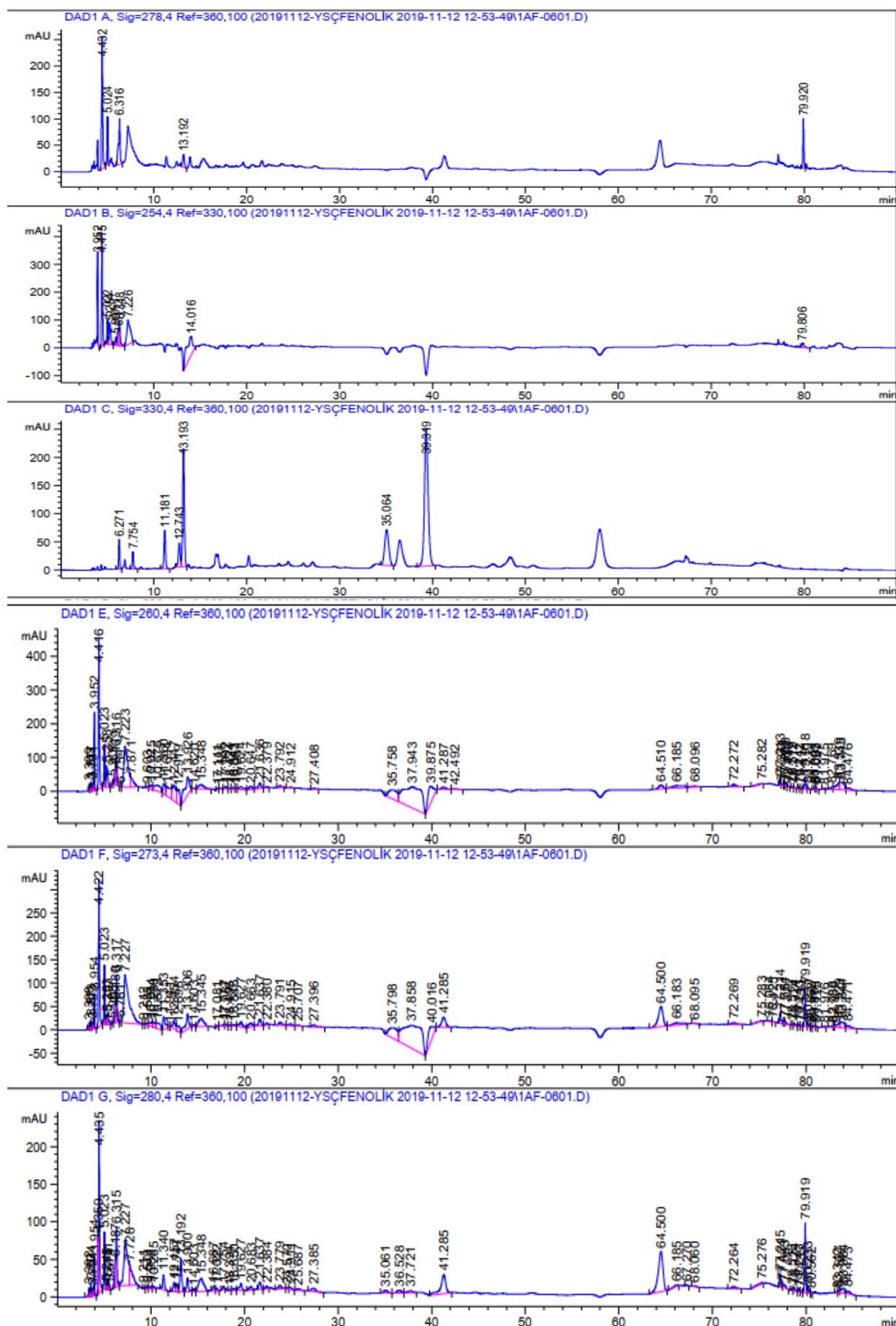


Figure 21. Chromatogrammes HPLC de l'extrait aqueux des feuilles d'*A. minus* à différentes longueurs d'ondes

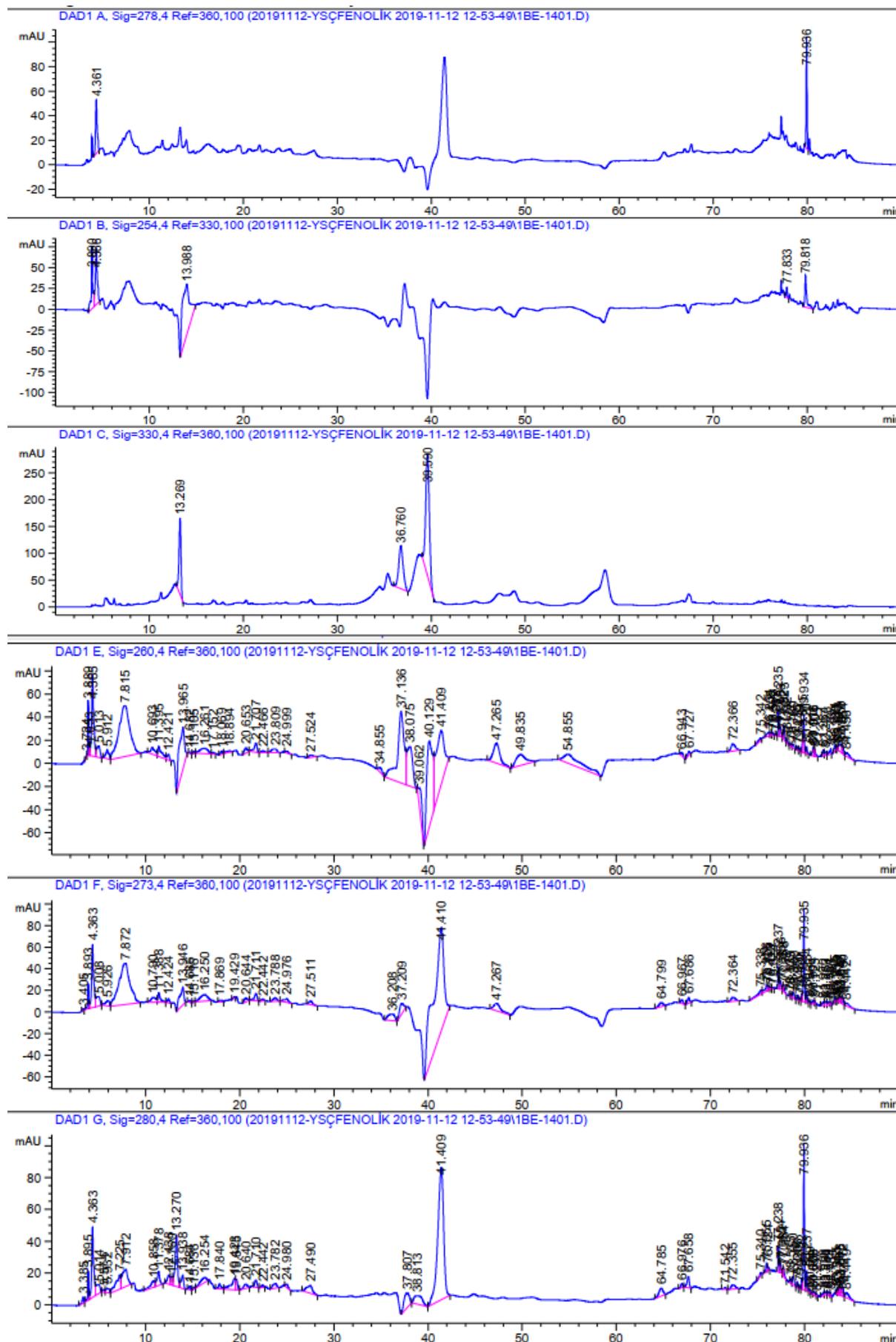


Figure 22. Chromatogrammes HPLC de l'extrait hydrométhanolique des feuilles d'*A. minus* à différentes longueurs d'ondes

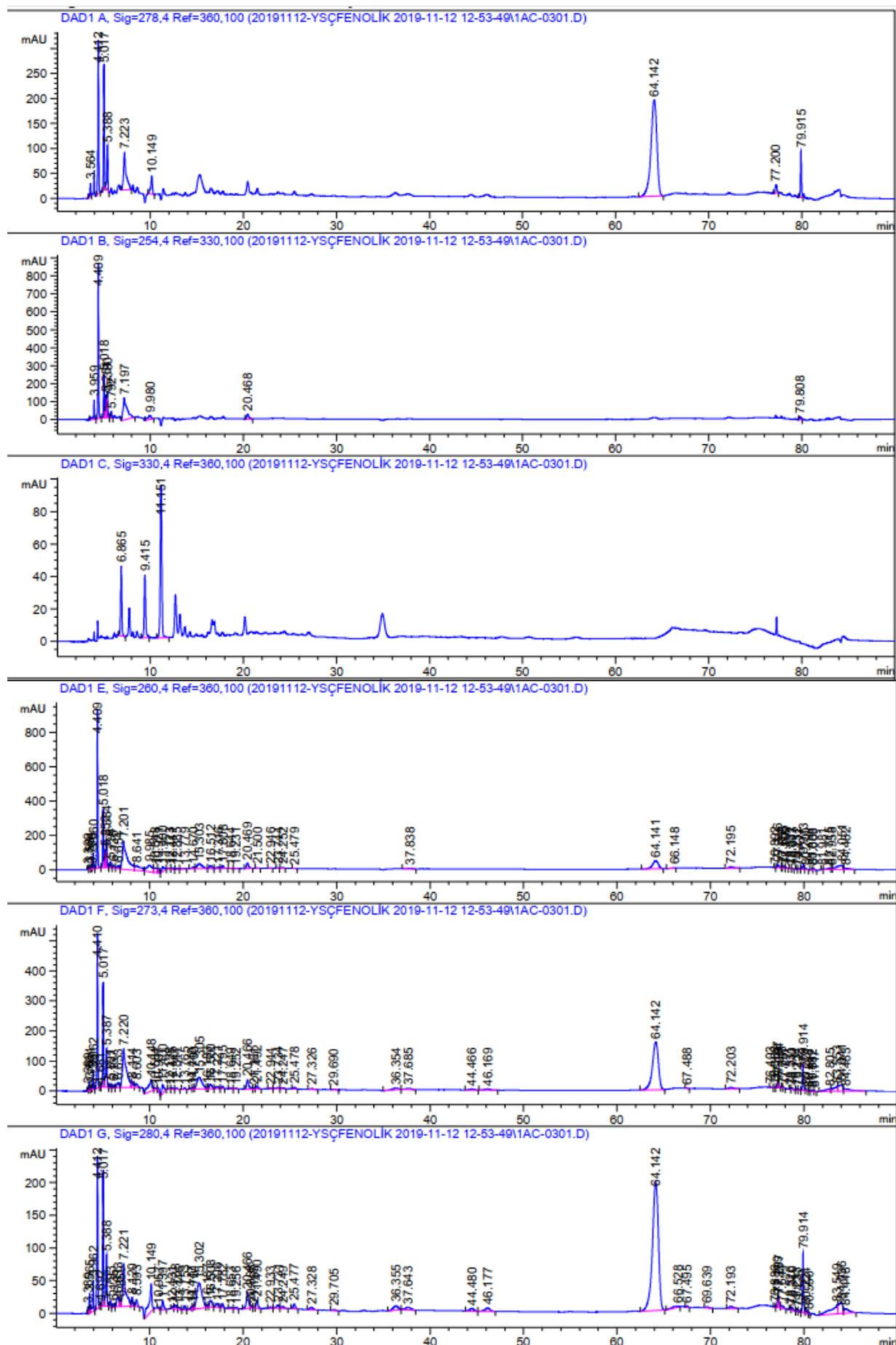


Figure 23. Chromatogrammes HPLC de l'extrait aqueux des fleurs d'*A.minus* à différentes longueurs d'ondes

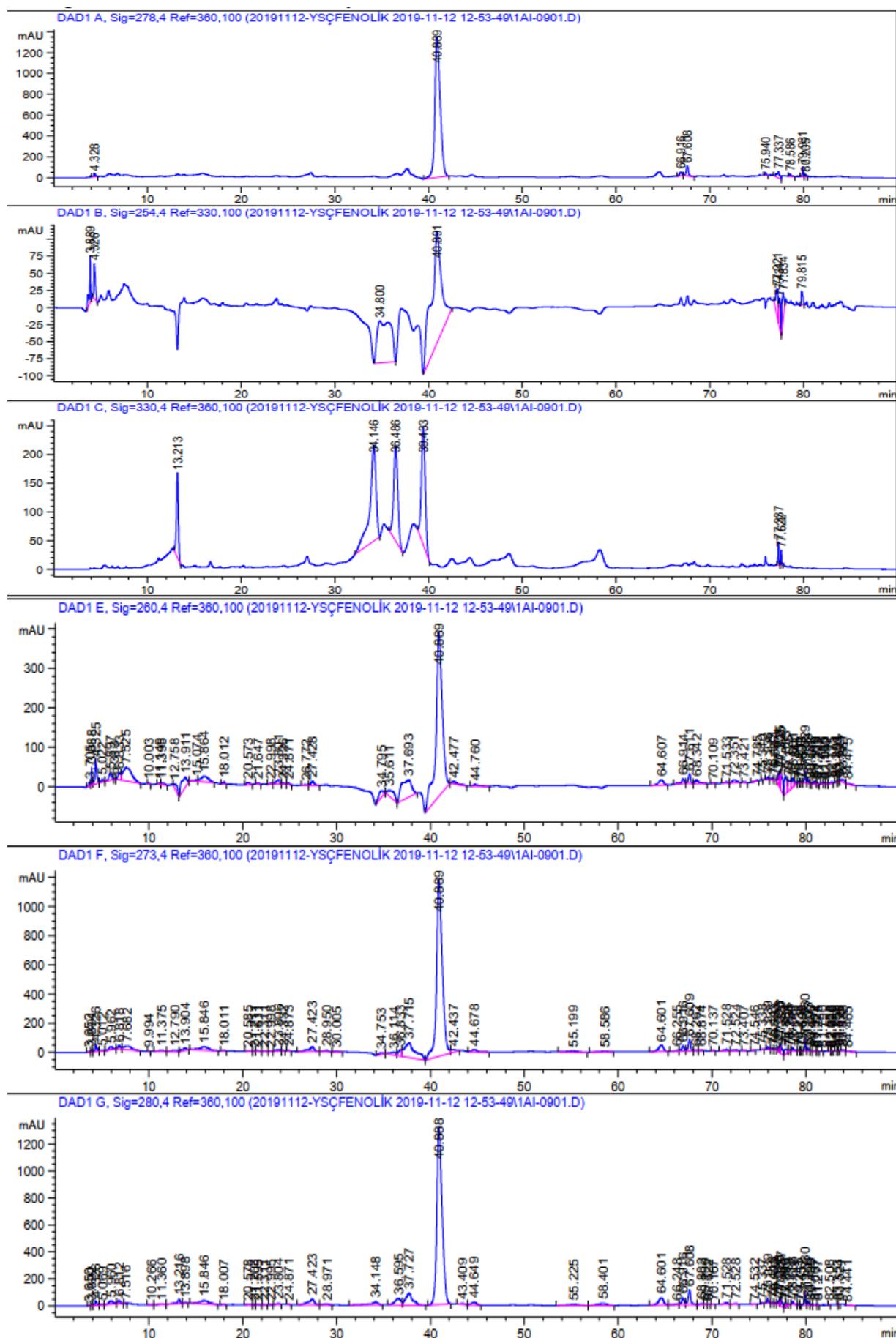


Figure 24. Chromatogrammes HPLC de l'extrait hydrométhanolique des fleurs d'*A. minus* à différentes longueurs d'ondes

Contrairement à ce qui a été observé avec le BFRq, l'acide gallique présentait la valeur la plus faible parmi tous les extraits étudiés (53,64 µg/g) (**Tableau 5**). En plus, il est vu comme étant le composé minoritaire de l'extrait BFRm. Cependant, le composé majeur dans le même extrait est le catéchine présent à raison de 628,46 µg/g.

D'autres composés phénoliques tels que l'épicatéchine, l'acide synergique, et l'acide sinapinique enregistrent les meilleurs teneurs en comparaison avec les autres extraits étudiés (417,78, 94,87 et 67,69 µg/g, respectivement). De même, l'acide benzoïque et l'acide chlorogénique sont relativement abondants (469,91 et 138,17 µg/g, respectivement), et ce contrairement à ce qui a été enregistré dans l'extrait aqueux du même organe végétal. Au même titre que dans le BFRq, la quercétine était absente dans le BFRm. Les profils des chromatogrammes HPLC de l'extrait BRq ont été illustrés dans la **figure 24**.

Rendant compte que la polarité de la phase mobile était décroissante (en augmentant le pourcentage de méthanol) et en comparant les chromatogrammes d'*A.minus*, on a pu constater que les différents extraits contiennent des molécules phénoliques à différente polarité. Il en ressort que presque la quasi-totalité des composés recherchés sont présents dans tous les extraits étudiés ;

- **La catéchine** ; était omniprésente dans les extraits étudiés. Elle constitue même le favan-3-ol monomérique polaire prédominant dans : les 2 extraits bruts des racines, BFq et BFm. En plus dans le reste des extraits elle est relativement abondante (**Tableau 5**).
- **L'acide hydroxybenzoïque et l'acide benzoïque** ; ces deux acides phénoliques occupaient la deuxième et la troisième position en termes de teneurs, respectivement. Ils sont omniprésents, notamment dans les extraits méthanoliques des trois organes végétaux étudiés (**Tableau 5**).
- **L'épicatéchine** ; est un autre favan-3-ol monomérique omniprésents dans les extraits étudiés, notamment les extraits méthanoliques (**Tableau 5**).
- **L'acide gallique** ; a montré une présence ubiquitaire dans les extraits, mais à des teneurs variables et plus ou moins moyennes, sauf dans l'extrait aqueux des fleurs où il était abondant et même majoritaire (997,47 µg/g) (**Tableau 5**).
- **L'acide chlorogénique, syringique et sinapinique** ; ces trois dérivées de l'acide hydroxycinnamique ont marqué une présence plus ou moins moyennes, mais étaient omniprésents dans tous les extraits, notamment les 3 extraits méthanoliques (**Tableau 5**).

- **L'acide trans-cinnamique, p-coumarique, férulique et caféique** ; eux également dérivés de l'acide hydroxycinnamique, étaient présents principalement au niveau des extraits des feuilles et des racines d'*A.minus*. Cependant, ils ont montré des teneurs faibles dans les extraits racinaux, voire indétectables, comme le cas de l'acide trans cinnamique dans le BFRq (**Tableau 5**).
- **L'hespéridine** ; a marqué une présence considérable dans les extraits méthanoliques des racines et des fleurs. Par contre, il avait une faible teneur dans les feuilles (**Tableau 5**).
- **L'acide rosmarinique** ; était présents à des teneurs considérable dans les extraits des feuilles, moyennes dans ceux des fleurs et faibles voire indétectable dans les racines (**Tableau 5**).
- **La quercétine** ; était indétectable au niveau des fleurs. Par contre, elle était présente uniquement dans les extraits des racines et feuilles, notamment dans les extraits méthanoliques. Cependant ce flavonol avait des teneurs faibles dans les extraits aqueux (**Tableau 5**).

Les données phytochimiques sur les composés phénoliques d'*Arctium. minus. ssp. atlanticum* sont difficiles à comparer en raison du manque d'études. En effet, aucune analyse chimique n'a été faite sur les composés volatils (Wang et al., 2019). Quant aux composés non volatils, l'unique étude de référence sur l'espèce *A.minus* reste celle de Saleh et Böhm (1971).

Saleh et Böhm (1971), ont signalé la présence des flavonoïdes comprenant les flavonols, les flavones et leurs glycosides. Deux constituants majeurs, à savoir la rutine et l'isoquercétine, ainsi que quelques autres flavonoïdes mineurs, dont le kaempferol-3-O-rhamnoglucoside, la quercimeritrine et l'astragaline, ont été identifiés dans les extraits éthanoliques des feuilles d'*A. minus*. Cependant cette étude ne relatait ni les teneurs exactes de chaque composé, ni l'éventuelle présence des acide phénoliques et les autres sous-classes des flavonoïdes telles que les flavanones et les flavan-3-ols, notamment la catéchine et son isomère l'épicatéchine. Ainsi, la comparaison entre cette étude et la nôtre, ne peut être objective du moment que Saleh et Bohm (1971) se sont servi d'un nombre limité de composés phénoliques utilisés comme normes dans cette étude. Néanmoins, ces auteurs ont rapporté le présence mineure d'un dérivé de la quercétine, en l'occurrence : la quercimeritrine dans les feuilles de l'extrait alcoolique. Cela vient étayer nos résultats qui ont conclu la présence de la quercétine dans les extraits alcooliques des feuilles et même des racine d'*A.minus*.

Jusqu'à présent, des centaines de composés ont été isolés du genre *Arctium*. Ces composés chimiques comprennent des lignanes (Polymère de la catéchine), des terpénoïdes, des stérols, des flavonoïdes, des composés phénoliques, des lactones, des polyacétylènes, des acides quiniques et des sucres (polysaccharides). En particulier, les lignanes sont les composants les plus caractéristiques du genre *Arctium* (Wang et al., 2019).

Les principaux lignanes biologiquement actifs comprennent principalement l'arctigénine (un phytoestrogène alimentaire) et son glycoside, l'arctiine (lignanolidés) que l'on trouve notamment dans les graines, les fruits d'*A. lappa* et *A. tomentosum* (Su et al., 2015 ; Lou et al., 2016). Or, nous n'avons pas pu détecter la présence de ces composés, faute de standards utilisés. En plus, et vu la période de récolte de la plante étudiée (Au début de la floraison), il n'était pas possible d'avoir les fruits et les graines avec le matériel récolté. Par contre, nos données par rapport à la richesse constatée d'*A. minus* ssp. *atlanticum* en catéchine, laisse suggérer que cette catéchine étant précurseur de lignanes, pourrait se transformer en tanins condensés ou complexe, tels que l'arctigénine ou arctiine. Ces deux derniers composés et le (-)-matairesinol et la (+)-7,8-didéhydroarctigénine, sont supposés contribuer à la bioactivité médicinale à effet antiprolifératif sur les cellules cancéreuses via l'induction de l'apoptose (Matsumoto et al., 2006).

En outre, les acides caféoylquiniques sont les principaux composés phénoliques bioactifs des espèces *Arctium* considérés comme antioxydants phénylpropanoïdes. Les racines d'*A. lappa* ont été signalées comme contenant des dérivés de l'acide caféoylquinique (Maruta et al., 1995). La teneur en acide chlorogénique est beaucoup plus élevée que celle de l'acide caféique et les deux se trouvent principalement dans la peau des racines d'*A. lappa* (Chen et al., 2004). La teneur était comprise entre 0,107 et 0,140%. Ces données sont partiellement en concordance avec celles de notre étude. En effet, nous avons également constaté la présence de l'acide caféique principalement au niveau des racines (152,67 µg/g). Cependant, l'acide cholinergique était relativement plus abondant dans les feuilles d'*A. minus*.

De même, la présence d'autres composés phénoliques tels que la quercétine a été signalée dans les feuilles et les racines de *A. lappa* (Liu et al., 2012 ; Tang et al., 2014). Cela est valable aussi pour nos extraits. En effet, nous avons constaté que la quercétine est abondante dans les extraits méthanoliques des feuilles et des racines avec des teneurs de 194,52 et 144,55 µg/g, respectivement.

De plus, une autre analyse chimique a révélé la présence de l'acide benzoïque, l'acide p-coumarique et l'acide cinnamique dans les feuilles d'*A. lappa* (Tardio et al., 2005). Ces

données concordent parfaitement avec nos résultats, et renforcent la théorie de l'apparenté chimique des deux espèces. Ces composés ont été signalés comme étant des agents antibactériens et antioxydants (Lou *et al.*, 2010)

Tout compte fait, l'analyse phytochimique par HPLC-UV des extraits des trois organes végétaux d'*A.minus* a permis de caractériser les principaux composés phénoliques. Deux grandes familles de composés ont été mises en évidence, il s'agit des acides phénoliques et des flavonoïdes. Ces derniers sont représentés principalement par la sous-classe des flavan-3-ol, notamment la catéchine et son isomère l'épicatéchine. Ces composés appelés autrement "tanins catéchiques", et suite à une polymérisation, donneront les tanins condensés et les tanins complexes, lesquels connus communément sous l'appellation de "lignanes"(Chen *et al.*, 2002).

En outre, cette étude étant comparative, a montré l'existence de différences chimiques qualitative et quantitatives au sein des différents organes d'*A. minus*. Un constat déjà établi chez l'espèce *A. lappa* par Ferracane *et al.*, (2010).

Enfin, notre étude a conclu pour la première fois la présence de plusieurs acides phénoliques et flavonoïdes chez l'espèce *A.minus*, à savoir : la Catéchine, l'épicatéchine, l'héspéridine, l'Acide gallique, l'acide hydroxybenzoïque, l'acide syringique, l'acide férulique, l'acide sinapinique et l'acide rosmarinique. Également, nous avons pu identifier des acides phénoliques déjà détectés chez l'espèce *A.lappa* tels que l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide p-coumarique, l'acide benzoïque et l'acide trans-cinnamique.

1.3. Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés

La teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés des extraits aqueux, hydrométhanoliques et d'acétate d'éthyle des différentes parties racinales et aériennes (Feuilles et fleurs) d'*A. minus*, ont été déterminées par des méthodes colorimétriques. Le dosage des polyphénols par la méthode de Folin-Ciocalteu est recommandé (Djeridane *et al.*, 2010) car elle est standardisée, simple, reproductible et les interférences avec la matrice de l'échantillon (qui est souvent coloré) sont minimisées à 765 nm (Huang *et al.*, 2005). Les flavonoïdes étant les composés les plus intéressants des polyphénols, ils ont été déterminés dans ce travail par la méthode au trichlorure d'aluminium. Quant aux tannins, la sous classe des ceux condensés, appelée aussi les anthocyanes, a été estimée par le test de vanilline basé sur la réaction des unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 550 nm (Ba *et al.*, 2010).

D'une façon générale, on constate que tous les extraits de la plante sont riches en polyphénols mais avec des quantités différentes en fonction de la nature du solvant et de l'organe considéré. Le **tableau 6** montre que les extraits hydroalcooliques contiennent relativement les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux suivi par les extraits aqueux des trois organes étudiés, tandis que les extraits d'éthyle acétate présentent les teneurs les moins élevées. En effet, La quantité totale de composés phénoliques varie considérablement et oscille entre 144,01 et 39,59 µg EAG/mg d'extrait (**Tableau 6**). La teneur en composés phénoliques la plus élevée a été trouvée dans l'extrait hydrométhanolique des fleurs de la petite bardane étudiée (BFRm) avec une valeur de 144,01±8,26 µg EAG /mg, suivi par celui du BFm avec une valeur de 135,67±7,83 µg EAG /mg d'extrait. Par contre, l'extrait d'éthyle acétate des feuilles (BFt) a enregistré une valeur minimale de 39,59±3,57 µg EAG /mg d'extrait. Cependant, les extraits aqueux ont enregistré des valeurs relativement moyennes oscillant entre 52,29±8,41 et 134,59±18,09 µg EAG /mg d'extrait.

Tableau 6 : Teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés des différents extraits d'*Arctium. minus*.

	Polyphénols totaux µg d'équivalent d'acide gallique / mg d'extrait	Flavonoïdes µg d'équivalent de quercétine / mg d'extrait	Tanins condensés µg d'équivalent de catéchine / mg d'extrait
BRq	52,29±8,41 ^e	44,98±0,74 ^e	5,22±0,23^a
BFq	105,37±5 ^e	61,87±6,92 ^e	3,24±0,58 ^e
BFRq	134,59±18,09 ^a	101,39±2,95^a	2,17±0,26 ^e
BRm	117,82±6,55 ^c	77,08± 3,54 ^e	4,56±0,07 ^c
BFm	135,67±7,83 ^a	77,99±1,03 ^e	1,30±0,03 ^e
BFRm	144,01±8,26^a	59,65±0,5 ^e	1,25±0,02 ^e
BRt	113,02±3,28 ^d	15,14± 2,65 ^e	1,10±0,03 ^e
BFt	39,59± 3,57 ^e	24,23±1,77 ^e	2,75±0,07 ^e
BFRt	42,73± 4,00 ^e	22,22±0,15 ^e	1,16±0,12 ^e

Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (**a-e**) dans la même colonne sont significativement ($P < 0,05$) différentes (La teneur la plus grande entre les différents extraits est retenue comme référence dans la comparaison) ; Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais ± SD.

D'après les résultats sus-cités on peut constater qu'à côté de la partie considérée de la plante, le solvant d'extraction a affecté considérablement la teneur en polyphénols. En effet, il en ressort que les parties aériennes d'*A. minus* présentent plus de phénols que la partie racinale, D'autre part, les extraits hydrométhanolique semblent être plus fiable quantitativement parlant

que l'eau et l'éthyle acétate. Selon Siddhuraju et Becker (2003), le méthanol et l'éthanol sont les meilleurs solvants pour l'extraction des composés phénoliques des extraits en raison de leur polarité et de leur bonne solubilité pour les polyphénols provenant de matières végétales. Ainsi, grande différence de teneur constatée en faveur des extraits hydroalcooliques est logique car l'eau n'est pas un bon solvant pour les composés phénoliques contrairement aux solvants alcooliques. En fait, la solubilité des polyphénols dépend de plusieurs facteurs parmi lesquels le type du solvant utilisé, leur degré de polymérisation ainsi que leur degré d'interaction avec les autres constituants et la formation de complexes insolubles (Marston et Hostettmann, 2006). Par ailleurs, l'alcool est le solvant le plus approprié pour une meilleure récupération de polyphénols (Falleh *et al.*, 2008). D'une part, l'alcool montre une grande capacité de pénétration dans la membrane cellulaire pour extraire les composants intracellulaires à partir de la matière végétale (Wang et al., 2010). D'autre part, la méthode d'extraction affecte également le contenu total en phénol et flavonoïdes (Lee *et al.*, 2003).

Par ailleurs, l'abondance des composés polyphénoliques selon Mekkiou *et al.* (2005) et Boumaza *et al.* (2006) est caractéristique de certaines familles. Cela pourrait être lié aux conditions climatiques des endroits où elles poussent (Zone semi-aride). En effet, de telles conditions climatiques stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires comme les polyphénols (Falleh *et al.*, 2008).

Compte tenu la pénurie des travaux concernant les teneurs en composés phénoliques, en flavonoïdes et en tannins de l'espèce étudiée, nos résultats sont comparés principalement avec ceux d'*A. lappa*, Selon Tian *et al.*, 2014, la teneur total en polyphénol de l'extrait des racines d'*A. lappa* est égale à 88.90 ± 1.63 mg/g. Cette valeur étant relativement proche de celles obtenues par notre étude, est en concordance avec nos résultats (117.82 ± 6.55 , 113.02 ± 3.28 et 52.29 ± 8.41 µg EAG /mg pour le BRm, BRq et BRt respectivement). Une autre étude menée par Robbins (2013) a mettait en comparaison la teneur totale en polyphénols des deux plantes *A. lappa* et *A. minus* a conclu que les extrait obtenus par un procédé impliquant la chaleur, présente une teneur plus élevée chez l'espèce *Lappa*.

Les phénols sont des constituants majeurs du système végétal qui sont dispersés sous forme de métabolites secondaires, jouant un rôle clé en tant qu'antioxydants, protection contre le stress, croissance des plantes et synthèse des pigments. le profil polyphénoliques des extraits de plantes peut varier sous l'influence de divers facteurs parmi lesquels la variété, le climat, la localisation géographique (Anusuya et Manian, 2013), les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante, la température et le solvant d'extraction (Conde et

al., 2009). Selon Robbins, (2013), le profil phénolique d'*Arctium minus* contient les mêmes composés que ceux trouvés dans l'*Arctium lappa*. Ainsi, et vu la parenté génétique entre l'espèce *Lappa* et *Minus* (Robbins, 2013), les valeurs obtenues semblent être en concordance avec celles de la littérature. Or, la somme des composés phénoliques individuels identifiés précédemment par HPLC pour les différents extraits de plantes était supérieure à la teneur phénolique totale calculée par dosage spectrophotométrique. Cependant une concordance peut être observée entre d'une part, la nature du solvant utilisé et l'organe considéré et de l'autre part, l'ordre des extraits en termes de teneurs en polyphénols totaux.

Un aperçu général sur la détermination quantitative des flavonoïdes a révélé des valeurs plus au moins proches entre les différents extraits aqueux et ceux hydroalcooliques. Cependant les extraits d'éthyle acétate semblaient enregistrer les valeurs les plus petites (**Tableau 6**). En effet, le BFRq s'est avéré l'extrait le plus riche en flavonoïdes avec une teneur de $101,39 \pm 2,95$ $\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait suivi par le BFm ou la valeur était égale à $77,99 \pm 1,03$ $\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait). Cependant, le BRt a représenté une teneur assez faible qui avoisinait $15,14 \pm 2,65$ $\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait. Néanmoins, l'ensemble des résultats sus-cités ont démontré que les extraits d'*A. minus* ssp. *Atlanticum* sont relativement riches en flavonoïdes. Selon Robbins (2013) la plante *A. minus* présentait une production plus élevée de composés phénoliques que l'*A. lappa*, mais les deux espèces contenaient des concentrations élevées de composés phénoliques.

A l'instar des polyphénols totaux, la comparaison des teneurs en flavonoïdes d'*A. minus* analysée dans cette étude avec celles rapportées par des études antérieures n'est pas évidente en raison de l'absence totale de données quant à l'espèce *Minus*. Cependant, la comparaison des résultats permet de mettre en évidence la corrélation entre le pourcentage des flavonoïdes et le solvant utilisé, expliquant ainsi la teneur relativement moyenne des extraits aqueux en flavonoïdes ($44,98 \pm 0,74$ et $61,87 \pm 6,92$ $\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait, pour le BRq et LE BFq, respectivement). En fait, l'eau montre une grande capacité d'extraction pour les flavonoïdes glycosylés, tandis que les flavonoïdes aglycones sont plutôt extraits par les alcools ou les mélanges eau-alcool (Marston et Hostettmann, 2006). Force est de constater que les concentrations les plus élevées de composés flavonoïdes plus bioactifs ont été détectés avec de l'éthanol à 70% à cause de sa polarité plus élevée que l'éthanol pur (Bimkr *et al.*, 2011).

Selon les découvertes récentes, les composés phénoliques du groupe des flavonoïdes (principalement quercétine et ses glycosides), hydroxy-cinnamate et les lactones sesquiterpéniques sont communes à la famille des Astéracées (El-Karemy *et al.*, 1987 ; Jaiswal *et al.*, 2011). L'acide rosmarinique, l'ester de l'acide caféique et du 3-(3,4-l'acide dihydroxyphényl) lactique, est l'un des acides naturels les plus abondants composés

phénoliques présents dans les plantes. Une multitude d'activités biologiques car ce composé a déjà été prouvé et décrit. Bien que la présence de nombreux dérivés de l'acide caféique (acides caféoylquiniques) chez les espèces d'Astéracées soit bien documentée, la teneur en acide rosmarinique, à notre connaissance, est mal enquêtée. (Mekinić et *al.*, 2013).

Finalement, La teneur en tannins condensés a montré des valeurs supérieures pour les extraits BRq, BRm et BFq (5.22 ± 0.23 , 4.56 ± 0.07 et 3.24 ± 0.58 μg d'équivalent de vanilline / mg d'extrait, respectivement) (**Tableau 6**). Par ailleurs, la somme des teneurs des extraits aqueux des trois organes étudiés s'est avéré la plus riche en tannins de haut poids moléculaire. Ceci est logique car l'eau extrait particulièrement les tannins (Marston et Hostettmann, 2006). La capacité des tannins de former des complexes avec les protéines est gouvernée par leur poids moléculaire et fait intervenir des liaisons hydrogène entre les atomes d'oxygène des groupements peptidiques et les groupements hydroxyles des polyphénols (McManus et *al.*, 1981; Hagerman et Butler, 1989).

On signale qu'il n'y a pas des travaux concernant les teneurs en composés les tannins de l'espèce étudiée. Or, les tanins sont également des composés importants dans le genre d'*Arctium*, qui existent principalement sous forme condensée. Il a été prouvé que les tanins, principalement les proanthocyanidines, sont présents dans de nombreuses plantes du genre *Arctium* (Wang et *al.*, 2019). En comparant les teneurs en tannins des différents extraits avec les données antérieurement effectuées par l'HPLC-DAD, on a constaté qu'il y a une concordance parfaite entre le type du solvant et la teneur. En effet, ces résultats ont permis de classer les extraits selon leur richesse en tanins condensés comme suit : Extraits aqueux, hydroalcooliques et finalement ceux d'éthyle acétate. A signaler que le BRq a enregistré le taux le plus élevé de catéchine (Tanins prédominant) avec une valeur de 4916.22 $\mu\text{g/g}$ d'extrait.

2. Étude de l'activité biologique

2.1. Évaluation de l'activité antioxydante

Les espèces réactives de l'oxygène sont connues pour leurs implications de pathogénèse. Cependant, les mécanismes endogènes interviennent timidement pour surmonter cette menace. Ainsi, une alimentation antioxydante exogène (comme les plantes médicinales par exemple) aurait un effet d'amélioration sur la gestion du stress oxydatif (Reilly et *al.*, 1991). La détermination des biomolécules avec un pouvoir antioxydant contribuera au développement de médicaments efficaces contre les pathologies impliquant le stress oxydatif. Par conséquent, et afin d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits, il est important de combiner plusieurs tests antioxydants (Erdemoglu et *al.*, 2009).. Or, l'activité antioxydante peut être attribuée à

différents mécanismes tels que le piégeage des radicaux libres, la prévention de l'initiation de la chaîne de réactions productrice des ERO, la liaison avec des catalyseurs d'ions de métal de transition, la décomposition des peroxydes, la capacité de réduction et la capacité de piégeage des radicaux (Liu *et al.*, 2007). Notre présente étude tâche de tester l'activité antioxydante par trois méthodes : la capacité de piégeage des radicaux DPPH et galvinoxyl (GOR), le pouvoir réducteur des ions de cuivre (CUPRAC) et l'inhibition du blanchiment du β -carotène.

2.1.1. Effet piégeur du radical libre DPPH*

Les résultats obtenus pour les différents extraits et les standards (Contrôles positifs) sont présentés en pourcentage d'inhibition et indiqués dans le **tableau 7**, tandis que Le **tableau 8** et la **figure 25** rapportent les concentrations inhibitrices à 50% (CI₅₀) de des différents extraits et du BHT, ainsi que la concentration effective à 50% (CE₅₀) et le pouvoir antiradicalaire (PAR).

Tableau 7. Activité du piégeage du radical libre DPPH exprimée en pourcentage d'inhibition (%)

Concentra \emptyset [μ g/mL]	Taux d'inhibition [%]									
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	1600
BRq	na	na	4,87 \pm 1,27	9,70 \pm 1,1	19,5 \pm 1,9	40,89 \pm 0,9	69,34 \pm 0,49	89,45 \pm 0,45	nt	nt
BFq	na	2,84 \pm 0,2	4,56 \pm 4,48	11,96 \pm 2,64	25,90 \pm 0,77	54,71 \pm 5,10	68,01 \pm 1,61	92,12 \pm 0,25	nt	nt
BFRq	nt	4,33 \pm 1,21	8,35 \pm 1,59	19,18 \pm 3,40	37,65 \pm 1,05	66,99 \pm 2,55	80,68 \pm 3,24	nt	nt	nt
BRm	nt	7,25 \pm 00	14,05 \pm 2,59	22,49 \pm 2,03	43,69 \pm 2,10	81,11 \pm 1,04	nt	nt	nt	nt
BFm	nt	nt	13,99 \pm 0,84	25,59 \pm 3,52	43,63 \pm 1,59	81,84 \pm 1,46	nt	nt	nt	nt
BFRm	nt	nt	14,72 \pm 1,01	19,64 \pm 0,66	42,36 \pm 1,57	76,22 \pm 0,64	92,54 \pm 0,45	nt	nt	nt
BRt	nt	nt	8,05 \pm 1,66	15,60 \pm 2,68	35,65 \pm 0,29	69,38 \pm 4,18	89,20 \pm 0,82	nt	nt	nt
BFt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	6,45 \pm 0,45	14,42 \pm 1,52	35,45 \pm 0,54	59,12 \pm 12
BFRt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	12,45 \pm 2,45	30,89 \pm 2,66	58,54 \pm 0,28	79,45 \pm 2,25
BHA*	28,95 \pm 1,16	54,33 \pm 1,59	75,55 \pm 0,48	78,89 \pm 0,26	80,73 \pm 0,10	82,18 \pm 0,10	86,13 \pm 0,17	88,36 \pm 0,19	nt	nt
BHT*	0,16 \pm 0, 00	0,22 \pm 0,01	48,09 \pm 0,76	71,63 \pm 2,06	87,73 \pm 0,89	93,00 \pm 0,31	93,97 \pm 0,08	94,38 \pm 0,41	nt	nt
α- Tocophérol*	nt	nt	36,21 \pm 1,82	80,53 \pm 1,51	88,23 \pm 0,12	88,38 \pm 0,19	88,45 \pm 0,22	88,99 \pm 0,23	nt	nt

Les valeurs exprimées sont les moyennes \pm S.D. de trois mesures parallèles ; * : Composés de référence ; nt : non testé ; na : non-actif.

De façon générale, le tableau ci-dessus montré un potentiel antioxydant dose-dépendant exercé par tous les échantillons sans exception. Les différents extraits hydrométhanoliques, aqueux et l'extrait d'éthyle acétate des fleurs d'*A. minus* (BFRq) ont enregistré les valeurs les plus élevées en termes de taux d'inhibition. A titre d'exemple, le BFm a exercé une activité anti

radicalaire égale à $81,84 \pm 1,46 \%$ à une concentration de $100 \mu\text{g/mL}$. Cet effet est similaire à celui du BHA (Utilisé comme antioxydant standard) qui a montré un taux d'inhibition de $82,18 \pm 0,10 \%$ à la même concentration. Le même extrait (BFm) a montré la CI_{50} la plus basse ($59,38 \pm 2,51 \mu\text{g/mL}$), signifiant ainsi la valeur la plus élevée en termes d'activité antioxydante. Par ailleurs, le cinq extraits sus-cités avaient une différence d'effet scavenger statistiquement non significatifs en comparaison avec les différents contrôles positifs (Figure 25 ; Tableau 8).

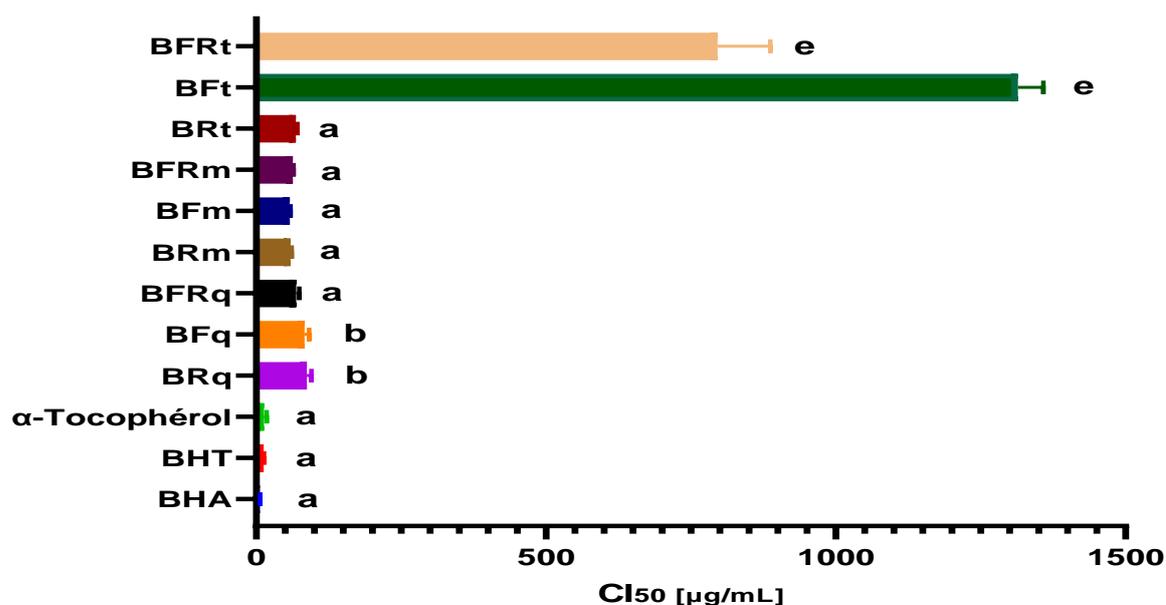


Figure 25. Activité du piégeage du radical libre DPPH exprimée concentration inhibitrice à 50% (IC_{50})
 Les valeurs exprimées sont les moyennes \pm S.D. de trois mesures parallèles ; Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a-e) dans la même colonne sont significativement ($P < 0,05$) différentes (La valeur la plus petite de la CI_{50} est retenue comme référence dans la comparaison).

Tableau 8. Valeurs des CI_{50} , CE_{50} et PAR des différents extraits et standards relatives au test DPPH

	CI_{50} [$\mu\text{g/mL}$]	CE_{50} [$\mu\text{g/mg DPPH/mL}$]	APR [$\mu\text{g/mL}$]
BRq	$91,91 \pm 0,89^b$	$1,11 \pm 0,01$	$0,91 \pm 0,08$
BFq	$83,73 \pm 7,57^b$	$1,06 \pm 0,10$	$0,95 \pm 0,09$
BFRq	$67,09 \pm 4,30^a$	$0,88 \pm 0,06$	$1,14 \pm 0,08$
BRm	$59,38 \pm 2,51^a$	$0,75 \pm 0,02$	$1,33 \pm 0,04$
BFm	$57,77 \pm 1,65^a$	$0,73 \pm 0,02$	$1,37 \pm 0,04$
BFRm	$63,69 \pm 1,20^a$	$0,80 \pm 0,02$	$1,25 \pm 0,02$
BRt	$68,05 \pm 3,51^a$	$0,87 \pm 0,03$	$1,15 \pm 0,05$
BFt	$1291,11 \pm 25,91^e$	$16,64 \pm 0,56$	$0,06 \pm 0,00$
BFRt	$796,43 \pm 90,82^e$	$10,08 \pm 1,15$	$0,10 \pm 0,01$
BHA*	$6,14 \pm 0,41^a$	$0,078 \pm 0,00$	$12,88 \pm 0,84$
BHT*	$12,99 \pm 0,41^a$	$0,16 \pm 0,00$	$6,08 \pm 0,17$
α-Tocophérol*	$13,02 \pm 5,17^a$	$0,167 \pm 0,06$	$6,66 \pm 2,67$

Les valeurs exprimées sont les moyennes \pm S.D. de trois mesures parallèles ; * : Composés de référence ; Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a-e) dans la même colonne sont significativement ($P < 0,05$) différentes (La valeur la plus petite de la CI_{50} est retenue comme référence dans la comparaison).

Cependant, le BRq et BFq n'atteignent le même taux d'activité qu'à une concentration plus élevée estimée à 400 µg/mL (**Tableau 7**). Par contre, les deux extraits d'éthyle acétate de la partie aérienne de la petite bardane étudiés ont montré une activité anti radicalaire beaucoup moindre que celle exercée par les standards dont la différence statistique est hautement significative (e ; $p < 0,001$) (**Tableau 8**).

L'activité anti-radicalaire est très importante du fait du rôle délétère des radicaux libres dans le domaine alimentaire et dans les systèmes biologiques (Gulçin et al., 2010). Les résultats obtenus s'alignent, en partie, sur ceux de la littérature, concernant le potentiel d'activité de piégeage du DPPH radical libre exercé par l'espèce *A. minus* (Ahmet Başaran et al., 1997). En effet, l'étude réalisée par Kenny et al. (2014), a été portée sur l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits d'eau et d'alcool (éthanol) de l'intégralité des organes d'*A. minus*. Cette dernière est venue corroborer nos résultats. L'extrait d'éthanol avait une valeur équivalente de Trolox (ET) la plus élevée pour le test DPPH ($262,775 \pm 2,196$ mg d'extrait ET / gramme d'extrait), tandis que l'extrait aqueux d'*A. minus* a montré la valeur ET la plus faible (DPPH ; $3,063 \pm 0,238$ mg d'extrait ET / gramme d'extrait), ce qui implique une activité antioxydante plus grande par rapport à son homologues d'extrait d'eau. Une autre étude de Predes et al. (2014) ont conclu conformément à nos travaux, que l'extrait méthanolique des racines d'*A. lappa*, avait la capacité de piégeage la plus élevée de DPPH par rapport aux autres fractions ($EC_{50} = 4,79 \pm 0,15 \mu\text{g} / \text{ml}$). Par ailleurs, Erdemoglu et al. (2009) avaient signalé une valeur de «BHT équivalent» (CI_{50} BHT / CI_{50} de l'échantillon) des feuilles de la petite bardane proches de celles obtenues dans notre étude sur la sous espèce *Atlanticum*. A savoir que la CI_{50} de BHT et du BRq obtenues étaient respectivement de $12,99 \pm 0,41$ et $68,34 \pm 3 \mu\text{g} / \text{mL}$ contre $0,51 \pm 0,01$ et $5,33 \pm 0,62 \mu\text{g} / \text{mL}$, obtenus par les auteurs susmentionnés. Cependant, certaines des investigations précédentes ont montré que l'activité antioxydante la plus prononcée pourrait être attribuée aux extraits aqueux d'*A. minus* et non aux extraits impliquant des alcools comme dans notre cas (Ahmet Başaran et al., (1997) ; Erdemoglu et al. (2009)). Cela pourrait s'expliquer par la dégradation possible des molécules de labile thermique pendant notre processus d'extraction (40°C) [39]. En effet, Erdemoglu et al. (2009) avaient effectué l'extraction sans soumettre la préparation à l'ébullition.

2.1.2. Effet piègeur du radical libre Galvinoxyl

Afin d'évaluer la relation entre le type de radical libre et l'activité antioxydante relative, nous avons introduit le galvinoxyl en tant que radical libre stable. Comme le montre le **tableau 9**, les taux d'inhibition concernant le pouvoir antioxydant exercé par l'ensemble des

échantillons étudiés contre le galvinoxyl ont montré des valeurs dose-dépendantes mais différentes d'un organe à un autre et d'un solvant à un autre. Or, les résultats obtenus ont montré entre autre, qu'à une concentration de 50 µg/mL, le pouvoir de piégeage de l'extrait d'acétate d'éthyle des racines d'*A.minus* et celui du BHT étaient presque similaires. En effet, les pourcentages d'inhibition du BRt et BHT étaient respectivement de l'ordre de $65,11 \pm 1,25$ et $69,49 \pm 0,55$ % (Tableau 9). En conséquence, les valeurs CI_{50} étaient respectivement de $25,93 \pm 0,93$ et $3,32 \pm 0,18$ µg/mL (Figure 26).

Tableau 9. Activité du piégeage du radical libre GOR exprimée en pourcentage d'inhibition (%)

ConcentraØ [µg/mL]	Taux d'inhibition [%]							
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400
BRq	na	nt	12,93 ±1,26	33,70 ±3,30	69,34 ±1,42	90,85 ±0,9	92,34 ±0,48	nt
BFq	na	8,25 ±0,25	16,14 ±4,09	39,90 ±4,22	67,90 ±0,62	88,71 ±6,11	nt	nt
BFRq	nt	9,33 ±1,31	19,36 ±0,83	52,89 ±3,20	69,21 ±0,18	86,96 ±2,45	92,54 ±2,25	nt
BRm	na	8,25 ±0,45	12,83 ±3,38	29,57 ±3,50	60,83 ±2,57	85,11 ±1,14	nt	nt
BFm	na	6,25 0,12	13,82 ±1,13	40,79 ±2,94	65,09 ±0,68	89,84 ±1,46	nt	nt
BFRm	na	5,42 ±0,45	10,93 ±1,73	31,78 ±4,37	56,44 ±1,40	72,23 ±0,54	86,52 ±2,12	nt
BRt	nt	15,23± 0,34	31,25 ±0,45	54,24 ±0,85	78,24 ±1,25	82,01 ±1,25	nt	nt
BFt	nt	nt	na	6,77 ±2,33	14,83 ±1,41	30,12 ±4,97	75,08 ±2,20	89,21 ±2,78
BFRt	nt	nt	nt	13,37±1 ,42	20,23 ±2,29	42,48 ±1,75	82,90 ±1,24	nt
BHT*	48,23 ±0,77	60,29 ±0,69	67,89 ±0,26	69,02 ±0,50	69,49 ±0,55	70,13 ±0,74	nt	nt
BHA*	38,15 ±0,88	53,16 ±0,27	64,02 ±1,26	69,19 ±0,51	69,32 ±0,65	69,60 ±0,10	nt	nt

Les valeurs exprimées sont les moyennes ± S.D. de trois mesures parallèles ; * : Composés de référence ; nt : non testé ; na : non-actif.

Cependant, la différence des CI_{50} du BRt et BRq est statistiquement non significative ($25,93 \pm 0,93$ Vs $30,25 \pm 1,73$ µg/mL, respectivement). Par ailleurs, le BFt et le BFRt semblent avoir un effet anti-radicalaire faible.

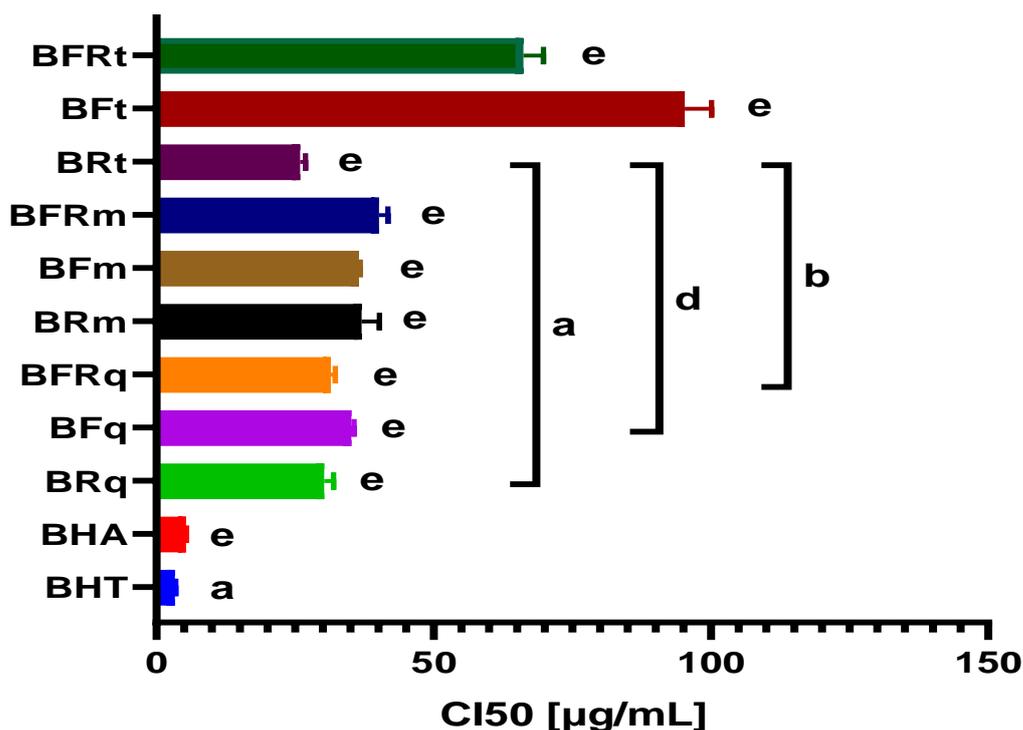


Figure 26. Activité du piégeage du radical libre GOR exprimée concentration inhibitrice à 50% (IC₅₀)
 Les valeurs exprimées sont les moyennes ± S.D. de trois mesures parallèles ; * : Composés de référence ; Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a-e) sont significativement (P < 0,05) différentes.

De toute évidence, entre les tests de DPPH et GOR, la corrélation n'était pas vérifiable quant à l'ordre des échantillons en termes de puissances d'activité antioxydante. Cela peut être dû soit au fait que deux types de radicaux différents ont été adoptés, soit au fait que l'efficacité du piégeage des radicaux est déterminée par la cinétique de réaction d'un radical spécifique bien déterminé compte tenu de la particularité de chaque système biologique où une grande variété des composés donneurs d'hydrogène existent (Papadimitriou et al., 2006).

2.1.3. Test de blanchissement du β carotène

L'oxydation des lipides dans les aliments pose de sérieux problèmes pour l'industrie alimentaire car elle entraîne des altérations qualitatives (rancissement) et nutritionnelles (perte de vitamines). Elle est à l'origine des mauvais goûts, odeurs et produits toxiques (peroxydes,

aldéhydes) qui touchent aussi bien aux valeurs nutritionnelles des aliments qu'à la santé des consommateurs (Gulcin et al., 2010). L'oxydation lipidique peut aussi avoir lieu in vivo et elle est associée à plusieurs pathologies à savoir les maladies cardiovasculaires, le vieillissement et le cancer (Ramarathnam et al., 1995). Ainsi, il est très important de chercher des inhibiteurs de la peroxydation lipidique aussi bien dans les denrées alimentaires que dans l'organisme (Bougatef et al., 2009). Dans la présente étude, le test de blanchissement du β -carotène a été effectué pour évaluer l'activité inhibitrice de l'oxydation lipidique des extraits aqueux d'A. minus.

L'activité antioxydante de différents extraits étudiés d'A. minus dans le système d'acide linoléique β -carotène est exprimée en pourcentage d'inhibition dans les **tableau 10**. Tandis que la **figure 27** résume les CI_{50} des différents extraits en les comparant avec celles des contrôles positifs (BHT et BHA).

Tableau 10. Activité antioxydante dans le système β -carotène/acide linoléique, exprimée en pourcentage d'inhibition (%)

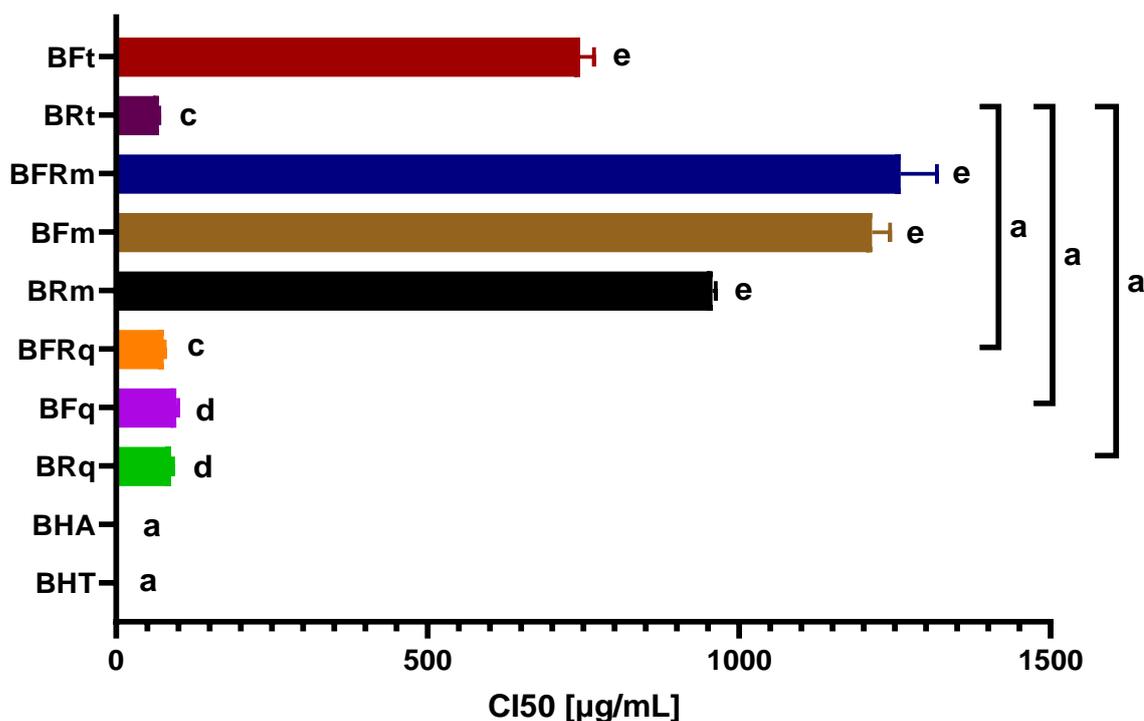
ConcentraØ [µg/mL]	Taux d'inhibition [%]									
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	1600
BRq	na	na	10,56 ±4,48	22,96 ±2,64	43,90 ±0,77	54,71 ±5,10	78,01 ±1,61	92,12 ±025	nt	nt
BFq	na	na	7,43± 4,38	18,82 ±2,55	32,80 ±0,68	50,61 ±3,20	68,02 ±1,61	82,13 ±035	nt	nt
BFRq	nt	4,33± 1,21	11,35 ±1,59	22,18 ±3,40	40,65 ±1,05	60,99 ±2,55	80,68 ±3,24	nt	nt	nt
BRm	nt	nt	nt	na	na	7,25 ±00	14,05 ±2,59	28,49 ±2,03	45,69 ±2,10	73,11 ±1,04
BFm	nt	nt	nt	na	na	4,54 ±0,9	12,99 ±0,84	30,59 ±3,52	43,63 ±1,59	57,84 ±1,46
BFRm	nt	nt	nt	na	na	na	12,72 ±1,01	23,36 ±1,57	43,22 ±4,64	56,54 ±6,45
BRt	nt	nt	17,05 ±1,66	30,60 ±2,68	45,65 ±0,29	62,38 ±4,18	89,20 ±0,82	nt	nt	nt
BFt	nt	nt	nt	nt	na	6,45± 0,45	17,42 ±1,52	31,45± 0,54	54,12 ±12	68,22 ±4,64
BFRt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	na	nt	nt	nt
BHT*	80,14 ±0,84	85,09 ±1,04	87,29 ±0,10	90,70 ±0,36	92,65 ±0,30	92,68 ±0,46	93,49 ±0,07	93,88 ±0,0	nt	nt
BHA*	83,23 ±1,14	91,11 ±0,68	92,48 ±0,44	94,52 ±0,33	95,34 ±0,55	96,56 ±0,19	96,64 ±2,22	96,85 ±0,32	nt	nt

Les valeurs exprimées sont les moyennes ± S.D. de trois mesures parallèles ; * : Composés de référence ; nt : non testé ; na : non-actif.

Les résultats sus-cités montrent qu'à la concentration de 200 µg/mL, les trois extraits aqueux possèdent une bonne activité antioxydante atteignant pour le BFRq par exemple un taux de 80,68%, qui est bien supérieur à celui des extraits hydrométhanoliques et d'éthyle acétate qui ne dépassent pas le taux de 14,05±2,59% (**Tableau 10**). Cependant, le BRt semble avoir le meilleur effet protecteur contre la peroxydation avec un taux de 89,20±0,82 % à la même

concentration. Par contre le BFt et BFRt ont montré une faible activité antioxydante, voir absente pour le BFRt.

L'extrait d'acétate d'éthyle des racines d'A.minus a traduit sa forte activité inhibitrice de la peroxydation lipidique par une valeur d'inhibition égale à une IC₅₀ de 69,02±0,41e µg/mL (Figure 27).



	IC ₅₀ [µg/mL]		IC ₅₀ [µg/mL]
BRq	88,57±2,74 ^e	BRt	69,02±0,41 ^e
BFq	96,86±2,64 ^e	BFt	744,95±22,22 ^e
BFRq	76,30±1,66 ^e	BFRt	nd
BRm	957,31±5,50 ^e	BHT*	0.91±0.01 ^a
BFm	1213,61±28,70 ^e	BHA*	1.05±0.03 ^a
BFRm	1259,67±58,13 ^e		

Figure 27. Activité antioxydante dans le système β-carotène/acide linoléique exprimée concentration inhibitrice à 50% (IC₅₀)

Les valeurs exprimées sont les moyennes ± S.D. de trois mesures parallèles ; * : Composés de référence ; nd : Non déterminée ; Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (**a-e**) sont significativement (P < 0,05) différentes.

Une concordance relative est constatée en comparant nos résultats avec les ceux des autres chercheurs. Dhuh et al, (1998) ont rapporté que les extraits aqueux et méthanoliques de la grande bardane (*A.lappa*), ont montré des valeurs remarquables dans l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique (extrait aqueux : 96,3 ± 1,63% et méthanolique extrait : 94,4 ± 1,52 %). Dans une autre étude, l'extrait éthanolique d'A. minus d'origine espagnole, avait

démontré une excellente prévention de la peroxydation des lipides (Local Food-Nutraceuticals Consortium, 2005). En accord avec les résultats obtenus par notre expérience, Lou *et al.*, (2010) ont rapporté que l'extrait d'éthyle acétate des feuilles d'*A. lappa* présentait la peroxydation inhibitrice la plus élevée parmi les autres extraits. Les valeurs IC₅₀ de ce dernier et de la butylhydroquinone tertiaire (TBHQ ; utilisée comme contrôle positif) étaient de 134 ± 4 et 82 ± 2 µg/mL, respectivement.

La bonne activité inhibitrice exercée par les trois extraits aqueux, reflète la solubilité des composés antioxydants dans l'eau. Les composés qui possèdent cette caractéristique peuvent être utilisés dans les systèmes alimentaires (Moure *et al.*, 2001). Selon Murcia et ses collaborateurs (2009), l'activité antioxydante d'un composé est très souvent reliée à la présence de portions facilement oxydables telles qu'un groupement hydroxyle sur un hydrocarbure. Les flavonoïdes inhibent la peroxydation lipidique en un stade précoce par l'activité scavenger des radicaux peroxydes comme ils peuvent interrompre une chaîne de réactions radicalaires par la propriété de donation d'hydrogène (Sandhar *et al.*, 2011).

Le test du β-carotène est largement utilisé pour mesurer l'activité antioxydante des composés bioactifs, du moment que le β-carotène est extrêmement susceptible aux radicaux libres résultant de l'oxydation de l'acide linoléique (Kumazawa *et al.*, 2002). Cela est dû à l'aptitude des caroténoïdes à neutraliser les radicaux libres tout en perdant leur coloration, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à 470 nm (Barros *et al.*, 2007). L'importance de ce test, réside dans l'utilisation du β-carotène comme agent colorant dans les boissons, ainsi sa décoloration sera nettement à l'origine de la réduction de la qualité de ces produits (Bougatef *et al.*, 2009). Durant l'oxydation lipidique, les antioxydants agissent de différentes façons à savoir le balayage des radicaux libres, la décomposition des peroxydes et la chélation des ions métalliques. Souvent, plus d'un seul mécanisme est impliqué pour avoir un effet en synergie (Moure *et al.*, 2001). La capacité du BRq de modifier la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres est reliée non seulement aux caractéristiques structurales des agents antioxydants, mais aussi à leur capacité d'interagir avec et pénétrer dans les bicouches lipidiques (Antonella *et al.*, 1995). Il a été montré que la structure et la lipophilie des polyphénols sont des facteurs déterminants dans la propriété antioxydative, probablement affectant la profondeur de l'incorporation de ces composés dans la phase lipidique de la membrane (Djeridane *et al.*, 2010). Par ailleurs, la capacité à inhiber la peroxydation lipidique repose sur la conjugaison du fer sous une forme catalytiquement particulière. La terminaison de la chaîne par piégeage des radicaux peroxydes peut être à l'origine d'activités inhibitrices de

la peroxydation des lipides (Kulkarni, et *al.*, 2004). Ainsi, les extraits pourraient exercer leur activité antioxydante principalement en donnant des électrons (Lou et *al.*, 2010).

Tout compte fait, la richesse des extraits étudiés et notamment ceux aqueux en polyphénols totaux, laisse constater la forte corrélation entre le contenu en polyphénols totaux des extraits et leurs activités antioxydantes. En effet, l'activité antioxydante est due à la présence d'acides phénoliques. Par ailleurs, cette corrélation pourrait s'appliquer au contenu en flavonoïdes.

2.1.4. Pouvoir réducteur

Enfin, pour bien élucider le profil anti-radicalaire contre différents types de radicaux libres, il a été nécessaire d'utiliser des méthodes de mesure du potentiel antioxydant basées sur la réduction des métaux par transfert d'électrons. Le test CUPRAC a été adopté et les données sont rapportées sous forme d'absorbance et de concentration correspondant à 0,5 d'absorbance ($A_{0,5}$) (tableau 11 et figure 28).

Tableau 11. Capacité antioxydante réductrice du cuivre (CUPRAC) exprimée en absorbance (A)

ConcentraØ [µg/mL]	ABSORBANCE [A]							
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400
BRq	nt	na	0,16 ±0,00	0,22 ±0,01	0,34 ±0,01	0,52 ±0,01	0,86 ±0,05	1,52 ±0,02
BFq	nt	0,10 ±0,00	0,20± 0,00	0,31± 0,02	0,49 ± 0,02	0,86 ± 0,01	1,49 ± 0,02	2,48 ±0,08
BFRq	nt	0,12 ±0,00	0,24± 0,00	0,37 ± 0,00	0,60 ± 0,02	1,02 ± 0,02	1,22 ± 0,61	2,69 ±0,07
BRm	na	0,13 ±0,00	0,22 ±0,01	0,35 ±0,02	0,62 ±0,04	1,08 ±0,01	2,29 ±0,08	nt
BFm	na	0,11 ±0,00	0,20 ±0,00	0,31 ±0,02	0,52 ±0,02	0,99 ±0,02	1,98 ± 0,61	nt
BFRm	nt	0,16 ±0,00	0,29 ±0,01	0,45 ±0,02	0,72 ±0,04	1,18 ±0,02	2,07 ±0,04	3,03± 0,32
BRt	nt	0,09 ±0,00	0,20 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,64 ± 0,02	1,16 ± 0,07	1,95 ± 0,17	3,55 ± 0,22
BFt	nt	na	0,15± 0,00	0,21 ± 0,01	0,30 ± 0,00	0,43 ± 0,01	0,61 ± 0,08	1,01 ± 0,02
BFRt	nt	na	0,16± 0,01	0,23 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,52 ± 0,01	0,74 ±0,05	1,04 ±0,08
BHA*	0.46± 0.00	0.78± 0.01	1,12± 0,05	1,95± 0,31	3,14± 0,46	3,58± 0,42	3,35± 0,20	3,77± 0,19
BHT*	0.19± 0.01	0.33± 0.04	1.41± 0.03	2.22± 0.05	2.42± 0.02	2.50± 0.01	2.56± 0.05	2.86± 0.07

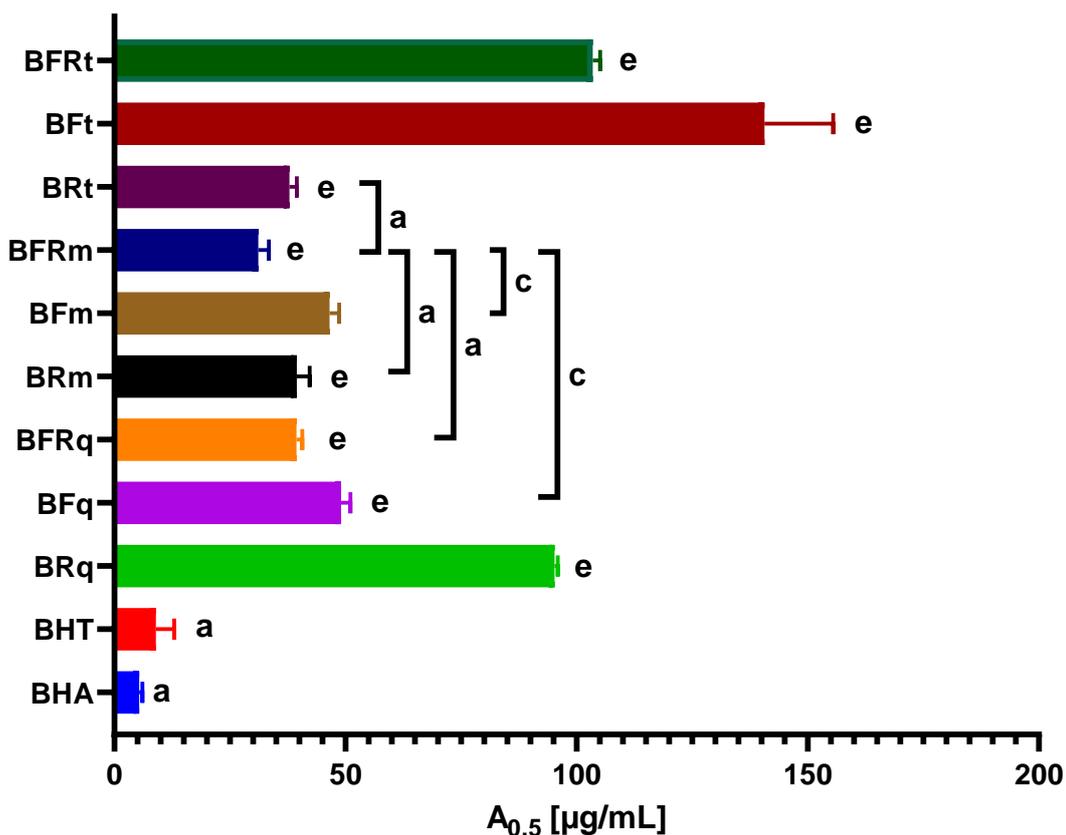
Les valeurs exprimées sont les moyennes ± S.D. de trois mesures parallèles ; * : Composés de référence ; nt : non testé ; na : non-actif.

Comme pour les tests antérieurement effectués, en l'occurrence celui du DPPH, GOR et β -carotène, le pouvoir réducteur des extraits hydroalcooliques semblent être les plus puissants par rapport aux extraits étudiés, à l'exception du BRt. En effet, à une concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$, l'intensité d'absorbance du BFRm était de $0,72 \pm 0,04$. Alors que l'ensemble des autres extraits ont montré des intensités d'absorbance oscillant entre $0,30 \pm 0,00$ et $0,64 \pm 0,02$ (**Tableau 11**). Par ailleurs, l' $A_{0,5}$ du BFRm correspondait à une concentration de $31,13 \pm 2,29$ $\mu\text{g/mL}$. Cette valeur impliquait un pouvoir réducteur considérable est comparable à celles de BRt par exemple qui présentaient une valeur $A_{0,5}$ de $37,92 \pm 1,56$ $\mu\text{g/mL}$ (**Figure 28**). Les $A_{0,5}$ des deux derniers extraits est statistiquement similaire.

Cependant, les trois extraits aqueux ont montré un pouvoir réducteur plus au moins faible de celui du BFRm ($A_{0,5}$: $39,39 \pm 1,26$, $49,05 \pm 2,05$ et $95,26 \pm 0,69$ $\mu\text{g/mL}$, pour le BFRq, BFq et BRq, respectivement). Par contre, le BFt et BFRt ont enregistré les $A_{0,5}$ plus faible à raison de $140,69 \pm 14,82$ et $103,52 \pm 1,62$ $\mu\text{g/mL}$, respectivement (**Figure 28**).

Le faible relatif pouvoir réducteur des extraits aqueux peut être dû au fait que les complexes de phénanthroline formés au cours de la réaction sont réputés pour leur solubilité limitée dans l'eau (Özyürek et al., 2011). Par conséquent, il est plutôt préférable d'utiliser un solvant organique. Conformément à notre observation, Kenny et al., (2014) ont rapporté la même différence relative de pouvoir de réduction des métaux entre l'extrait alcoolique et aqueux d'*A.minus*. En effet, cette étude qui s'est porté sur pouvoir antioxydant réducteur ferrique, a révélé que la plus grande valeur équivalente de trolox (ET) était observée dans l'extrait éthanolique ($626,783 \pm 0,031$ mg ET/g d'extrait), alors que l'extrait aqueux présentait la valeur la plus faible ($12,083 \pm 0,037$ mg ET/g d'extrait).

Selon certains chercheurs, nous aurions pu avoir un meilleur effet réducteur si nous avons utilisé une combinaison d'hydrolyse et d'incubation. Précisément, Apak et al., (2009) avaient rapporté que pour exhiber pleinement le pouvoir réducteur d'un mélange contenant divers antioxydants, certaines molécules nécessitaient un processus d'incubation après l'hydrolyse acide utilisant le principe d'additivité des absorbances. Par contre, et de manière générale, il existe une différence remarquable dans le pouvoir réducteur enregistré par les deux méthodes CUPRAC et FRAP. Selon Prior et al., (2005), cela peut être dû au fait que le test CUPRAC est nettement plus sélectif que celui du FRAP en raison du potentiel redox plus faible. En effet, la présence potentielle d'acide citrique et de sucres diminue l'effet réducteur car ils ne peuvent pas être oxydés.



	$A_{0,5}$ [$\mu\text{g/mL}$]		$A_{0,5}$ [$\mu\text{g/mL}$]
BRq	95,26±0,69 ^e	BRt	37,92±1,56 ^e
BFq	49,05±2,05 ^e	BFt	140,69±14,82 ^e
BFRq	39,39±1,26 ^e	BFRt	103,52±1,62
BRm	39,51±2,74 ^e	BHT*	8,97 ± 3,94 ^a
BFm	46,55±2,09 ^e	BHA*	5,35±0,71 ^a
BFRm	31,13±2,29 ^e		

Figure 28. Capacité antioxydante réductrice du cuivre (CUPRAC) exprimée en concentration correspondant à une absorbance de 0,5 ($A_{0,5}$)

Les valeurs exprimées sont les moyennes \pm S.D. de trois mesures parallèles ; * : Composés de référence ; Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a-e) sont significativement ($P < 0,05$) différentes.

Selon Özyürek et al., (2011), le test CUPRAC présente de nombreux avantages. Bien que le test CUPRAC soit similaire au test de pouvoir antioxydant réducteur ferrique (avec Fe remplacé par Cu), les valeurs CUPRAC montrent souvent une similitude avec la capacité antioxydante équivalente au trolox (trolox ; utilisé comme standard). Alors que le pouvoir antioxydant réducteur ferrique a des valeurs relativement plus faibles (Ioannou et al., 2015).

Contrairement à *A.minus*, le pouvoir antioxydant d'*A.lappa* a été évalué par plusieurs chercheurs. Dans laquelle, l'espèce *Lappa* étaient riches en composés phénoliques et flavonoïdes tels que : dérivés chlorogéniques, caféique, acide caféoylquinique, arctigénine,

quercétine et rutine. (Nakagawa et Matsugo , 2004 ; Marutaet *al.*, 1995 ; Chen et *al.*, 2004) Par conséquent, nos données suggèrent que le pouvoir reducteur d'*Arctium minus* subsp. *atlanticum* détecté pourrait être attribuer aux composés phénoliques susmentionnés et en particulier aux flavonoïdes qui ont déjà été décrits chez les espèces *Minus* par l'analyse phytochimique de Saleh et Bohm (1971), et laquelle a été corroborée par la présente étude. Par ailleurs, Le *et al.*, (2007) attribuaient le pouvoir réducteur à la présence de flavonoïdes qui sont des principaux donneurs d'électrons, d'une part. Or, une corrélation entre leur contenu en flavonoïdes et leurs activités réductrices pourrait être établie (**Tableau 6**). Cependant, cette corrélation ne s'applique pas au contenu en tannins (Ksouri *et al.*, 2009). En effet, les extraits qui étaient pauvres en termes de composés responsables du pouvoir réducteur (flavonoïdes) avaient le meilleur pouvoir réducteur. Ainsi, les résultats obtenus étaient justifiées. En outre, les interférences dues à la présence d'autres composés dans l'extrait, sont souvent un facteur limitant du test de pouvoir réducteur.

En somme, la corrélation entre le contenu en polyphénols et le pouvoir réducteur est vérifiable et les résultats concordent parfaitement avec les tests précédents concernant la quantité de flavonoïdes et le pouvoir réducteur constaté.

2.2. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire (Test d'inhibition de la dénaturation des protéines)

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation (Bagad et *al.*, 2011). La production d'auto-antigènes dans les maladies inflammatoire peut être due à la dénaturation des protéines *in vivo*. Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à l'altération des liaisons électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintiennent la structure tridimensionnelle des protéines (Sangeetha et *al.*, 2011). Il est prouvé que les anti-inflammatoires non stéroïdiens comme le phénylbutazone et l'indométacine n'inhibent pas seulement la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires, mais inhibent aussi la dénaturation des protéines (Adarshvm et *al.*, 2011). Ils empêchent de ce fait la dénaturation d'albumine traitée par la chaleur à pH physiologique (pH : 6.2 à 6.5).

Le **tableau 12** et la **figure 29** montrent les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des différents extraits d'*Arctium minus* et un anti inflammatoire de référence (Diclofénac sodium). Ce test consiste à évaluer les pourcentages d'inhibition de la dénaturation de l'albumine du sérum bovin (BSA).

Tableau 12. Activité d'inhibitrice de la dénaturation de l'albumine du sérum bovin (ASB), exprimée en pourcentage d'inhibition (%)

ConcentraØ [µg/mL]	Taux d'inhibition [%]			
	250	500	1000	1500
BRq	11,23 ± 1,42	17,45 ± 3,45	28,45 ± 2,23	47,45 ± 3,04 ^e
BFq	14,14 ± 1,87	21,12 ± 2,99	32,12 ± 4,25	50,55 ± 2,37 ^e
BFRq	15,45 ± 1,78	25,45 ± 2,12	35,45 ± 3,45	59,01 ± 4,48 ^d
BRm	16,12 ± 1,45	27,25 ± 3,12	34,24 ± 4,14	61,36 ± 3,00 ^d
BFm	20,25 ± 3,87	30,42 ± 3,42	39,54 ± 5,45	63,34 ± 1,97 ^c
BFRm	23,12 ± 0,12	31,21 ± 6,12	42,45 ± 2,42	67,44 ± 5,01 ^a
BRt	4,12 ± 1,12	13,12 ± 2,58	21,21 ± 3,45	45,34 ± 2,04 ^e
BFt	na	7,12 ± 2,12	18,45 ± 3,45	38,35 ± 1,01 ^e
BFRt	na	10,26 ± 1,12	23,21 ± 5,45	40,41 ± 5,04 ^e
Diclofénac*	10,32 ± 0,70	16,15 ± 1,58	45,57 ± 1,65	74,40 ± 2,21 ^a

Les valeurs exprimées sont les moyennes ± S.D. de trois mesures parallèles ; * : Composés de référence ; Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a-e) sont significativement (P < 0,05) différentes ; na : non-actif.

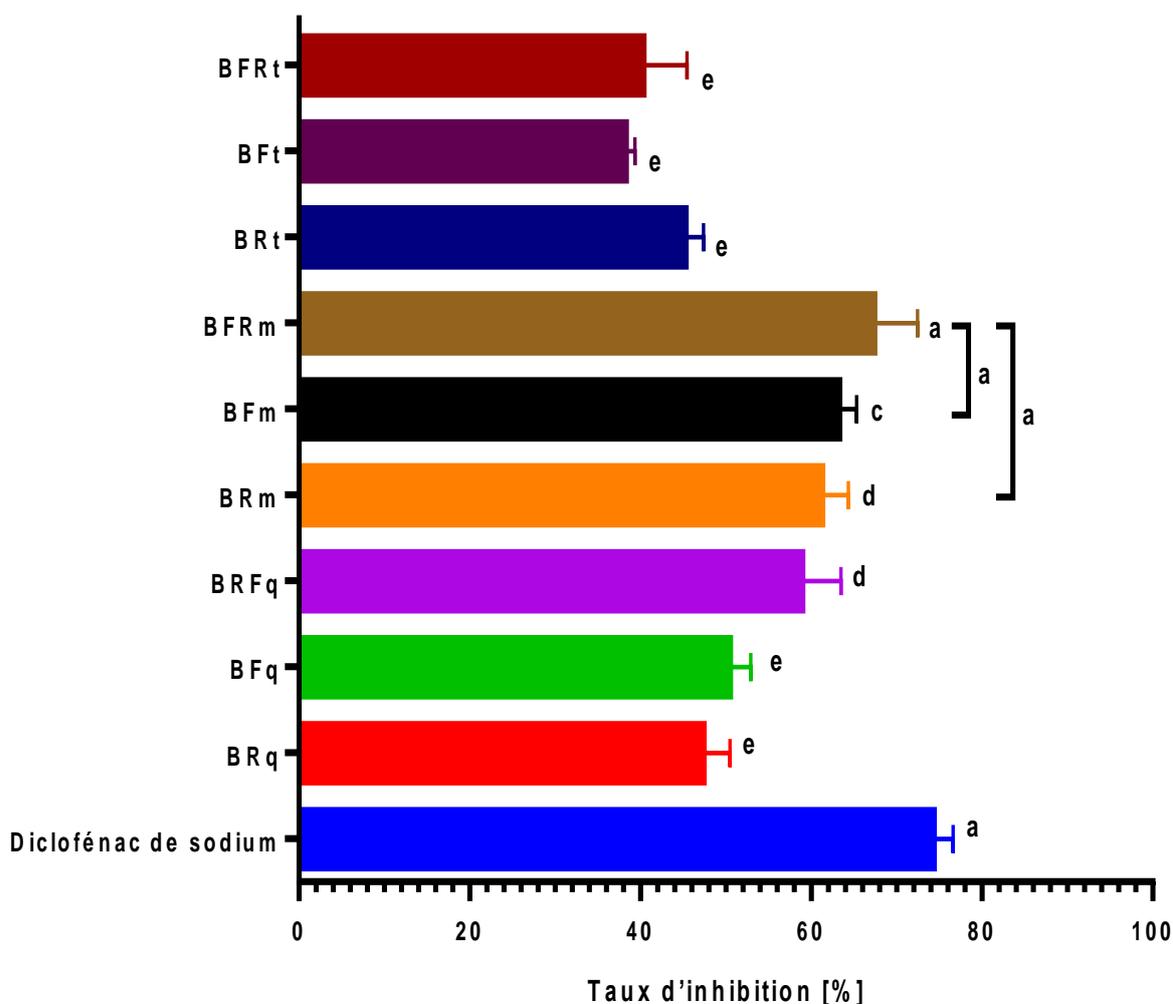


Figure 29. Activité d'inhibitrice de la dénaturation de l'albumine du sérum bovin (ASB), exprimée en pourcentage d'inhibition (%)

Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (a, e) sont significativement (P < 0,05) différentes.

D'après les résultats obtenus, les différents extraits étudiés sont capables de contrôler la production d'auto-antigène par l'inhibition de la dénaturation des protéines de manière dose - dépendante, mais à des taux différents. Cependant, les mêmes chiffres permettent le classement des extraits en termes d'activité inhibitrice comme suit : les extraits bruts hydrométhanoliques, aqueux et enfin les extraits d'éthyle acétate. En effet, à la concentration de 1500 $\mu\text{g/mL}$, les pourcentages d'inhibition de la dénaturation de BSA étaient de 61.36 ± 3.00 , 63.34 ± 1.97 et 67.44 ± 5.01 %, respectivement, pour le BRq, BFq et BFRq, respectivement, dont la différence statistique entre ces trois extraits est non significatives (**Figure 29**). Or, on constate que le taux d'inhibition du BFRq est proche de celui obtenu pour le diclofénac sodium, un médicament anti-inflammatoire utilisé comme standard dont le pourcentage d'inhibition avoisine $74,40 \pm 2,21$ % à la même concentration. La différence entre ces deux échantillons est statistiquement similaire (**Figure 29**).

Par ailleurs, ces données permettent aussi de mettre en ordre les différents extraits en se basant sur l'organe considéré. En effet, que ce soit pour les extraits hydroalcooliques ou aqueux et relativement ceux d'éthyle acétate, les fleurs semblaient être plus actives que les feuilles. Par contre, les racines avaient l'effet le plus faible parmi les parties étudiées.

Nos résultats sont relativement en accord avec ceux de Erdemoglu et *al.*, (2009) qui ont rapporté un considérable effet anti-inflammatoire *in vivo* de l'extrait éthanolique des feuilles de l'espèce *A. minus*. sp. *minus* par l'inhibition de la libération des prostaglandines, protéases et lysosomes impliqués dans la formation de l'œdème induit par la carragénine chez la souris. Cependant, la même étude a rapporté l'inactivité de l'extrait aqueux.

Dans le même sillage, Fisher et *al.*, (2018) ont étudié l'effet antinociceptif et anti-oedématogène de l'extrait brut des graines d'*A. minus* dans un modèle d'attaque de goutte aiguë induite par injection intra-articulaire chez la souris. A une dose de 100 mg/kg, les résultats ont montré une réduction de l'allodynie mécanique et une inhibition de l'activité de la xanthine oxydase. Par ailleurs, Yang et *al.*, (2019) ont démontré que le prétraitement des cellules RAW 264.7 avec l'*A. minus* a considérablement inhibé et réduit la production d'oxyde nitrique (NO) et de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interleukine (IL)-6 et le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α).

Or, l'activité antioxydante peut être responsable de l'activité anti-inflammatoire (Kar et *al.*, 2012),. Cette hypothèse est concordante avec celle obtenue dans notre étude qui montre une corrélation entre la relative puissante activité antioxydante et celle anti-inflammatoire notamment des extraits hydrométhanolique et aqueux. Ainsi, l'activité inhibitrice de la

dénaturation de BSA est peut être attribuée à la présence de différents composés bioactifs tels que les flavonoïdes et les tannins ayant la capacité de lier les cations et les autres biomolécules, attribuant ainsi la capacité de protéger les protéines de la dénaturation (Oyedapo, 2001). Cependant, et étant donné la forte teneur en flavonoïdes et tannins des extraits hydrométhanolique et aqueux par rapport aux extraits d'éthyle acétate, la corrélation entre le contenu de ces derniers en composés bioactifs et l'activité inhibitrice est vérifiable.

2.3. Evaluation de l'activité inhibitrice de l'alpha-amylase

La prévalence des maladies métaboliques et liées au mode de vie a atteint un taux alarmant au cours des dernières décennies. Le diabète est un problème de santé mondial. La prévalence du diabète sucré a considérablement augmenté ces dernières années et on estime qu'environ 430 millions de personnes étaient touchées par le diabète en 2014 (OMS, 2016).

L'essor récent des médicaments antidiabétiques sur le marché exploite un large éventail de cibles thérapeutiques en raison de la variété des anomalies pathogènes associées au diabète et à ses complications associées. Différentes classes de médicaments oraux utilisés dans le traitement de première ligne du diabète comprennent les inhibiteurs de la digestion des glucides, qui retardent l'absorption postprandiale des monosaccharides (inhibiteurs de l' α -glucosidase et de l' α -amylase) (Gonçalves et Romano, 2017).

La théorie de l'inhibition des enzymes clés est l'une des théories les plus acceptées pour le diabète sucré. L' α -amylase est un enzyme clés dans le catabolisme des glucides. L'enzyme catalyse l'hydrolyse de la liaison α -(1,4) dans les glucides et, par conséquent, le taux de glucose sanguin augmente. À ce stade, l'inhibition de cet enzyme pourrait être considérée comme un outil important pour la gestion de la glycémie chez les patients atteints de diabète sucré (Wang et al., 2012).

Plusieurs inhibiteurs enzymatiques (acarbose et voglibose pour l'amylase) ont été produits chimiquement, cependant, l'utilisation d'inhibiteurs synthétiques peut s'accompagner d'effets secondaires tels que des troubles gastro-intestinaux et une hépatotoxicité (Annamalai et al., 2017 ; Sang et al., 2017). Il a été rapporté que les métabolites secondaires des plantes présentent un grand potentiel pour agir comme inhibiteurs enzymatiques avec des effets secondaires moins prononcés (Pereira et al., 2017).

Les potentiels antidiabétiques des extraits d'*A. minus*. sp. atlanticum ont été testés contre l' α -amylase. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition et indiqués dans le **tableau 13**, tandis que la **figure 30** rapporte les concentrations inhibitrices à 50% (CI₅₀) des différents extraits et d'acarbose (Contrôle positif).

Tableau 13. Activité inhibitrice de l'alpha-amylase exprimée en pourcentage d'inhibition (%) et en concentration inhibitrice à 50% (CI₅₀)

ConcentraØ [µg/mL]	Taux d'inhibition [%]						CI ₅₀ [µg/mL]
	50	100	200	400	800	1600	
BRq	na	na	5,26 ±1,24	11,24 ±1,20	22,66 ±0,34	39,5 ±1,57	nd (<1600)
BFq	na	na	3,24 ±0,23	10,19 ±1,85	21,13 ±1,74	35,21 ±1,97	nd (<1600)
BFRq	na	na	na	7,17 ±0,98	17,77 ±1,63	31,21 ±1,99	nd (<1600)
BRm	nt	5,24 ±0,32	11,24 ±2,12	17,25 ±1,63	27,19 ±1,34	51,35 ±2,45	1570,38±86,97 ^e
BFm	nt	12,11 ±1,21	16,21 ±2,21	25,17 ±1,33	36,22 ±3,37	59,68 ±2,33	1271,37±59,88 ^e
BFRm	na	8,45 ±1,58	19,15 ±2,32	28,35 ±1,69	39,03 ±2,40	63,45 ±3,95	1154,20±57,32 ^e
BRt	8,47 ±1,66	18,92 ±0,49	31,41 ±2,82	53,57 ±5,17	72,21 ±5,325	78,36 ±6,32	370,96±43,23 ^e
BFt	nt	na	7,35 ±0,35	12,55 ±0,49	22,43 ±4,12	41,19 ±1,90	nd (<1600)
BFRt	nt	na	9,54 ±0,54	18,67 ±1,57	30,64 ±3,24	49,93 ±2,14	1592,44±68,62 ^e
Acarbose *	5,76 ±0,17	5,08 ±0,30	5,46 ±0,11	9,70 ±0,96	25,81 ±2,89	33,21 ±3,54	3650,93±10,70 ^a

Les valeurs exprimées sont les moyennes ± S.D. de trois mesures parallèles ; * : Composé de référence ; Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (**a**, **e**) sont significativement (P < 0,05) différentes ; nt : non testé ; nd : non déterminée ; na : non-actif.

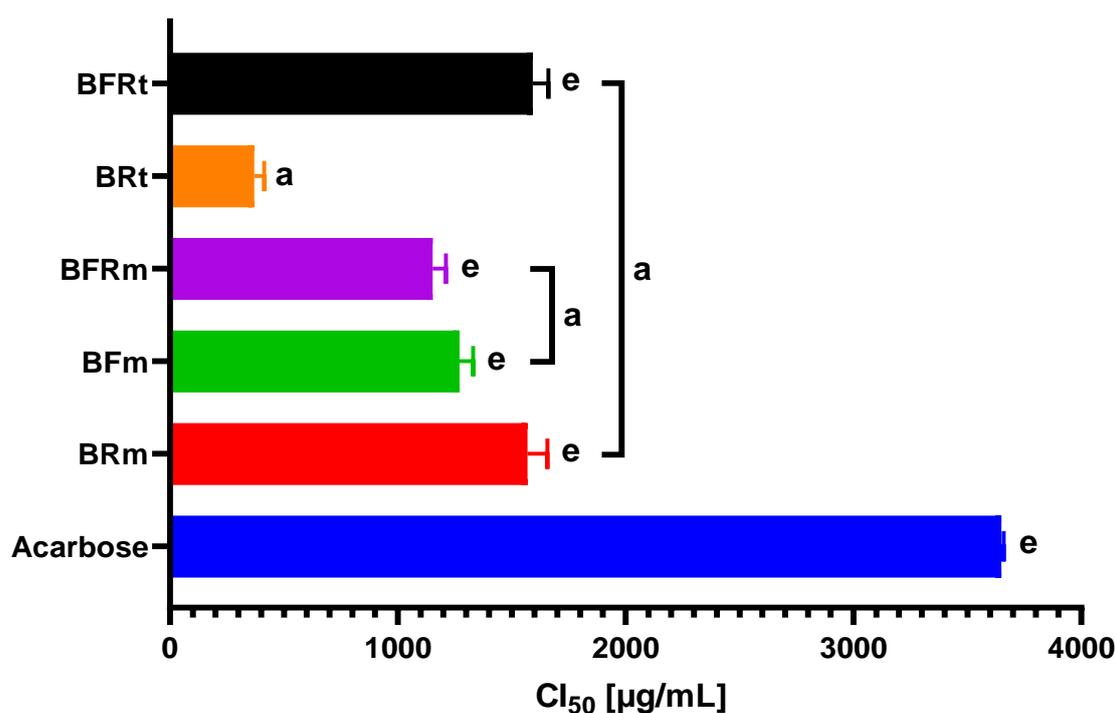


Figure 30. Activité inhibitrice de l'alpha-amylase exprimée en concentration inhibitrice à 50% (CI₅₀)
Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (**a**, **e**) sont significativement (P < 0,05) différentes.

Les extraits étudiés d'*A. minus* ont démontré une activité inhibitrice dose dépendante contre l'enzyme α -amylase. Cependant, et en fonction de l'extrait considéré, la différence entre les taux d'inhibition était considérablement contrastée. En effet, le BRt a distinctement présenté l'effet inhibiteur de l'enzyme le plus fort à raison de $78,36 \pm 6,32$ % à une concentration de $1600 \mu\text{g/mL}$ (**Tableau 13**). Ce taux d'inhibition correspond à une CI_{50} égale à $370,96 \pm 43,23 \mu\text{g/mL}$, laquelle étant statistiquement hautement active (e : $P \leq 0,001$) en comparaison avec celle d'acarbose utilisé comme contrôle positif (CI_{50} : $3650,93 \pm 10,70 \mu\text{g/mL}$) (**Tableau 13 ; Figure 30**). Par ailleurs, les extraits hydroalcooliques ont montré aussi une bonne activité à côté du BFRt (CI_{50} : 1154.20 ± 57.32 , 1271.37 ± 59.88 , 1570.38 ± 86.97 et $1592.44 \pm 68.62 \mu\text{g/mL}$, respectivement, pour le BFRm, BFm, BRm et BFRt, respectivement. Par contre, les extraits aqueux et le BFt ont enregistré des taux d'inhibition relativement faibles dont les CI_{50} n'ont pas pu être déterminées par défaut de dissolution à des concentrations supérieures à $1600 \mu\text{g/mL}$ (**Tableau 13**).

Les résultats sus-cités concordaient avec le contenu phénolique total et l'activité antioxydante des extraits étudiés. En effet, les mêmes extraits qui présentaient une activité anti-enzymatique élevée, en l'occurrence le BRt et les extraits hydrométhanoliques, contiennent plus de phénols totaux et montrent un pouvoir antioxydant plus important. Ainsi, la bioactivité anti-enzymatique constatée est probablement liée à des inhibiteurs phénoliques. Par contre, cette corrélation n'était pas vérifiable quant au contenu des flavonoïdes et tanins condensés.

D'autre part, l'acide hydroxybenzoïque et épicatechique, qui étaient les composants dominants dans les extraits étudiés, ont probablement contribué aux effets inhibiteurs enzymatiques. En effet, Ozer et *al.*, (2018) ont rapporté une forte corrélation entre les acides protocatechiques et p-hydroxybenzoïques et les activités inhibitrices enzymatiques contre l' α -amylase.

Nos résultats viennent confirmer la seule étude ayant vérifié l'activité hypoglycémiant de l'espèce *A. minus*, en l'occurrence celle de Cavalli et *al.*, (2007). Cette étude a été menée sur des rats dont le diabète a été induit par l'alloxane. Les résultats ont révélé des réductions des niveaux glycémiques de $34,6 \pm 5,8$ et $22,9 \pm 6,2$ %, chez les groupes traités par les racines et les feuilles, respectivement. Cependant, le Glibenclamide (Contrôle positif) avait un taux de réduction de $34,5 \pm 6,2\%$. Cette étude suggère que l'extrait pur d'*Arctium minus*, principalement l'extrait de racine, est capable de réduire les taux de glucose, avec un pouvoir similaire à la médecine synthétique de référence Glibenclamide. (Otenio et *al.*, 2020).

Les racines de l'espèce *A. lappa* s'est avérée à son tour médiatrice des activités hypoglycémiques, ce qui en fait un choix populaire pour être utilisé comme médicament traditionnel contre le diabète. L'administration orale d'extrait éthanolique chez des rats diabétiques a considérablement réduit la glycémie et augmenté le taux d'insuline chez les rats diabétiques par rapport au groupe témoin (Cao et al., 2012 ; Ahangarpour et al., 2017) .Ces auteurs ont suggéré que l'effet enregistré est exercé par le biais de propriétés hypolipidémiques et insulinothropes .De plus, le sitostérol-b-D-glucopyranoside de la racine de bardane agit comme un puissant inhibiteur des alpha-glucosidases, ayant ainsi le potentiel de réduire la glycogénolyse et d'aider à diminuer le taux de glucose sanguin (Tousch et al., 2014). Par ailleurs, Zhao et Zhou (2015) ont démontré que les oligo-éléments (par exemple, Na, K, Mn, Fe et Mg) présents dans les extraits de racine et de fruit d'*A. lappa* présentent des effets antidiabétiques. Bien que les constituants d'*A. lappa* réduisent l'absorption du glucose, ils élèvent également la teneur en inuline dans le sang et ralentissent la digestion des glucides pour conférer ses activités antidiabétiques. D'autre part, certains auteurs tels que Miyazawa et al., (2005) ont suggéré que les molécules bioactives responsable de l'effet antidiabétique sont principalement les acides gras. En effet, en recherchant les composés inhibiteurs de l'a-glucosidase, les dits auteurs ont trouvé 11 composés dans l'extrait de méthanol d'*A. lappa*. Parmi eux, 10 composés appartenaient aux acides gras. Les composés identifiés étaient l'acide linoléique, l'acide linoléique, le linoléate de méthyle, l'oléate de méthyle, le linoléate de méthyle, l'acide oléique, l'acide palmitique, le palmitate de méthyle, le stéarate de méthyle et l'acide stéarique. L'extrait de méthanol d'*Arctium lappa*, qui contenait du sitostérol-b-D-glucopyranoside, du palmitate de méthyle, du linoléate de méthyle et du linoléate de méthyle, a montré une activité inhibitrice contre l'a-glucosidase à 97.3, 73.4, 66.5 et 68.5 %, respectivement, à une concentration de 200 mM (Miyazawa et al., 2005).

Selon nos connaissances, l'activité inhibitrice de l'alpha amylase d'*A. minus* n'a pas été rapportée auparavant. Par conséquent, notre recherche peut être considérée comme un premier rapport sur les activités inhibitrices enzymatiques *in vitro* d'extraits de la plante étudiée. Par ailleurs, et compte tenu du fait que les extraits les plus actifs ont été préparés en utilisant les solvants organiques, l'étape de leur purification ultérieure ne peut être évitée, et en raison de l'insécurité des solvants organiques, ces extraits ne conviennent pas aux formulations fonctionnelles orales.

2.4. Evaluation de l'effet neuroprotecteur

La pathogenèse de la maladie d'*Alzheimer* semble être due à une activité accrue de différents types d'esters à base de choline (enzymes hydrolysantes) tels que l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). Précisément, notre approche d'évaluation de l'effet neuroprotecteur potentiel a été réalisée en mesurant le pouvoir inhibiteur de des extraits des différentes parties d'*Arctium minus* sp. *Atlanticum* contre l'AChE et la BChE. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition enzymatique, et en concentration inhibitrice de 50% des enzymes étudiées (**Tableau 14 ; figure 30 ; figure 31**).

Tableau 14. Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BuChE) exprimée en pourcentage d'inhibition (%) et en concentration inhibitrice à 50% (CI₅₀)

ConcentraØ [µg/mL]	AChE				BChE			
	Taux d'inhibition [%]			CI ₅₀ [µg/mL]	Taux d'inhibition [%]			CI ₅₀ [µg/mL]
	100	200	400		100	200	400	
BRq	na	na	nd	nd	na	na	nd	nd
BFq	na	na	nd	nd		5,12 ±1,03	11,36 ±2,87	<400
BFRq	na	na	nd	nd	23,46 ±2,71	44,69 ±3,65	69,36 ±4,78	262,06 ±26,68 ^e
BRm	16,99 ±0,88	27,23 ±1,56	49,22 ±3,14	409,91 ±24,86 ^e	0,56 ±0,58	5,58 ±0,59	12,54 ±2,48	<400
BFm	na	na	nd	nd	8,61 ±0,78	18,31 ±2,47	31,62 ±6,45	<400
BFRm	14,14 ±1,45	26,33 ±2,21	46,15 ±3,14	434,88 ±32,47 ^e	14,68 ±1,87	24,71 ±3,74	45,74 ±3,41	483,28 ±38,85 ^e
BRt	27,47 ±1,87	41,39 ±1,24	64,65 ±4,98	280,88 ±21,03 ^e	29,18 ±0,86	40,20 ±1,12	65,47 ±3,98	276,73 ±24,46 ^e
BFt	8,14 ±1,08	15,89 ±1,54	27,45 ±2,45	<400	47,86 ±4,54	72,87 ±6,48	nd	107,44 ±16,32 ^a
BFRt	16,54 ±0,87	25,45 ±2,76	45,99 ±4,91	447,86 ±50,81 ^e	21,41 ±1,47	48,45 ±5,45	73,45 ±8,45	248,76 ±2,93 ^e
Galanta- mine*	91,80 ± 0,20	94,77 ± 0,34	nd	6,27 ±1,2 ^a	73,57 ± 0,77	78,95 ± 0,58	nd	34,75 ±1,99 ^a

Les valeurs exprimées sont les moyennes ± S.D. de trois mesures parallèles ; * : Composé de référence ; Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (**a, e**) sont significativement (P < 0,05) différentes ; nt : non testé ; nd : non déterminée ; na : non-actif.

Globalement, les différents extraits étudiés ont exhibé une activité inhibitrice dose dépendante, à l'exception de l'extrait aqueux des racines qui était totalement inactif vis-à-vis des deux enzymes, l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase. Par ailleurs, l'ensemble des résultats laisse constater que l'activité inhibitrice vis-à-vis de la butyrylcholinestérase (BChE), était plus importante en termes d'intensité et de nombre d'extraits actif que celle dirigé contre l'acétylcholinestérase (AChE).

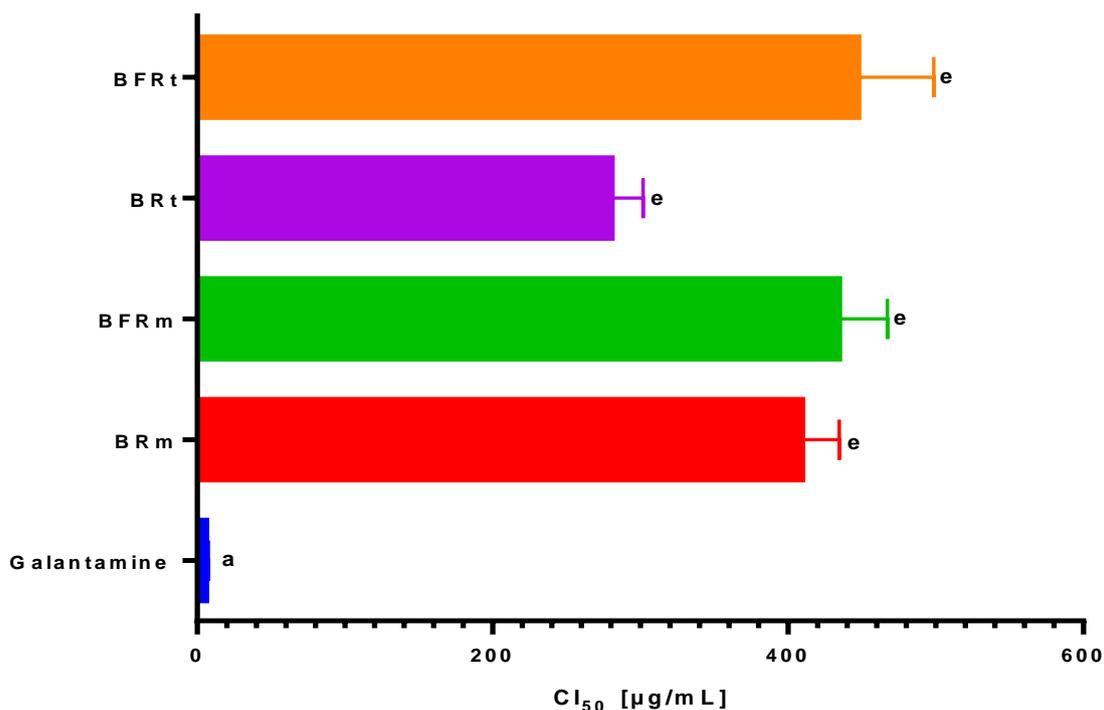


Figure 31. Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE) exprimée en concentration inhibitrice à 50% (CI₅₀)

Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (**a**, **e**) sont significativement ($P < 0,05$) différentes.

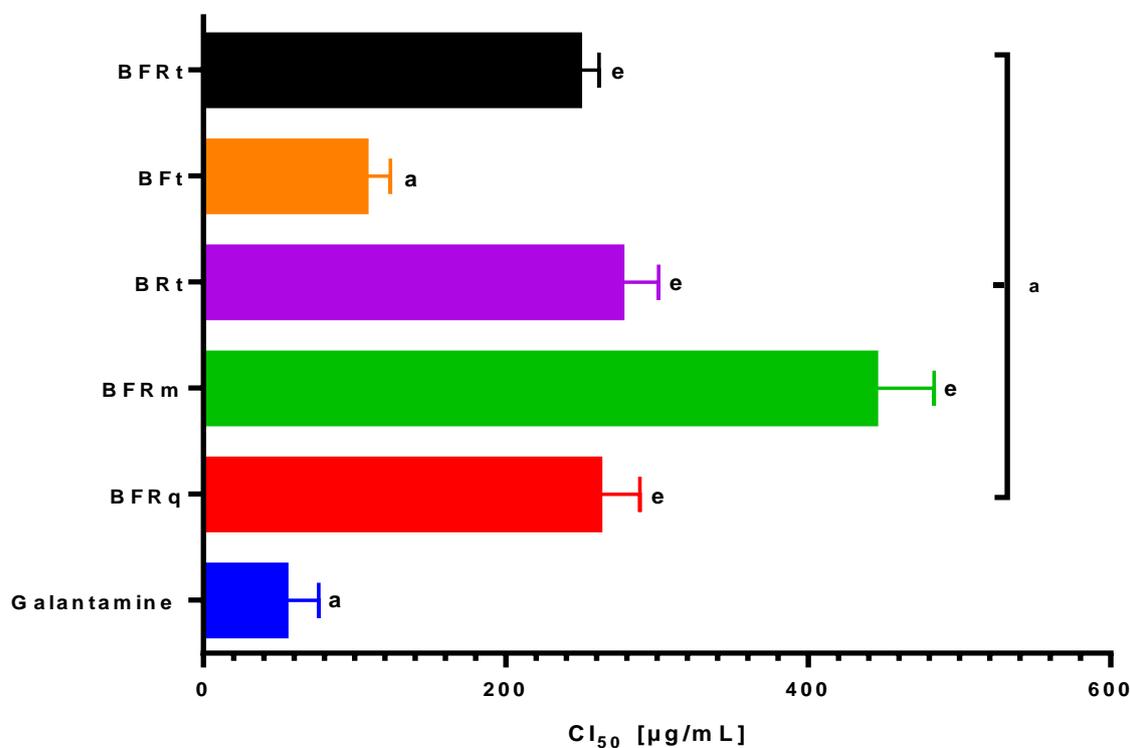


Figure 32. Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase (BuChE) exprimée en concentration inhibitrice à 50% (CI₅₀)

Les valeurs avec des lettres différentes en exposant (**a**, **e**) sont significativement ($P < 0,05$) différentes.

En ce qui est de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase, les trois extraits aqueux et le BFM étaient totalement inactifs. Par contre, le BRt a présenté à la concentration de 400 µg/mL, le potentiel inhibiteur le plus puissant avec un taux d'inhibition de $64,65 \pm 4,98 \%$, lequel correspond à une CI_{50} égale à $280,88 \pm 21,03$ µg/mL (**Tableau 14**). En comparant cette dernière valeur avec la CI_{50} du galantamine (standard utilisé comme contrôle positif) dont la valeur est de $6,27 \pm 1,2$ µg/mL, on constate que la différence est statistiquement significative ($^{\circ} : P \leq 0,001$) (**Figure 31**). Cependant, le BRm, BFRm et BFRt avaient des CI_{50} relativement faibles avec des valeurs de $409,91 \pm 24,86$, $434,88 \pm 32,47$ et $447,86 \pm 50,81$ µg/mL, respectivement. En revanche, le BFt a enregistré le taux d'inhibition le plus faible, lequel n'excédait pas $27,45 \pm 2,45 \%$ à la plus grande concentration testée (400 µg/mL).

Quant à l'activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase, les résultats étaient plus concluants. En effet, la différence entre la CI_{50} du galantamine et celle du BFt était statistiquement non significative ($CI_{50} : 34,75 \pm 1,99$ et $107,44 \pm 16,32$ µg/mL, respectivement) (**Tableau 14 ; figure 32**). Cependant, l'effet neuroprotecteur du BFt est suivi par celui du BRt dont la CI_{50} est de $276,73 \pm 24,46$ µg/mL. Par ailleurs, les trois extraits des fleurs ont présenté un effet neuroprotecteur moyen dont les valeurs de CI_{50} étaient statistiquement similaires ($CI_{50} : 248,76 \pm 2,93$, $262,06 \pm 26,68$ et $483,28 \pm 38,85$ µg/mL, respectivement, pour le BFRt, BFRq et BFRm, respectivement) (**Tableau 14**). Par contre, le BRq n'a montré aucune activité.

Tout compte fait, les extraits d'éthyle acétate semblaient avoir la supériorité dans l'activité inhibitrice constatée, notamment celle enregistrée vis-à-vis de la butyrylcholinestérase.

En raison de leurs polarités relativement faibles, on pense que les extraits d'éthyle acétate contiennent la majeure partie des composés neuroprotecteurs. Ces composés ont une polarité relativement moyenne (moins polaire que l'eau et le méthanol).

Selon la littérature, la seule étude antérieure sur la même espèce (*A. minus*) portant sur l'activité anticholinestérasique était celle de Hajimehdipoor et *al.*, (2016). En revanche, les résultats de cette étude ont rapporté une absence totale d'activité inhibitrice contre l'AChE de l'espèce *Minus* (dont la sous-espèce est inconnue). Cette contradiction peut être due à la divergence du type de sous-espèce concernée, et solvant utilisé.

Néanmoins, d'autres travaux ont présenté des données en accord avec les nôtres, en l'occurrence celles de Mekinić et *al.*, (2013), qui ont démontré que les extraits hydroéthanoliques de l'espèce *Lappa* possédaient *in vitro* un taux d'inhibition de l'AChE pouvant atteindre une valeur de 20 %. D'autres études *in vivo* ont démontré un puissant effet

neuroprotecteur de l'espèce *Lappa* contre les neuropathologies induites par la scopolamine, la bêta-amyloïde et le glutamate (Lee et al., 2011; Kwon et al., 2016 ; Tian et al., 2014).

Plusieurs auteurs ont rapporté la relation relative entre les propriétés antioxydantes et inhibitrices de l'AChE et de la BChE, et même avec le contenu en acide rosmarinique des extraits (Mekinić et al., 2013; Amrani et al., 2019). Il ressort de notre étude que l'on peut attribuer l'effet anticholinestérasique aux mêmes molécules que l'on pense être responsables de l'activité antioxydante, telles que les flavonoïdes (isoquercitrine et rutine) (Saleh et Bohm, 1971), les lignanes dibenzylbutyrolactone (qui sont très fréquentes chez les espèces d'*Arctium*) (Park et al., 2007), l'arctiopicine (Suchy et al., 1956) et en particulier l'arctiine qui est présente dans les deux espèces d'*Arctium lappa* et *minus* (Lindner, 1948).

A défaut d'analyse phytochimique des extraits d'éthyle acétate de la plante étudiée par HPLC-DAD, la corrélation entre le contenu des composés phénolique et l'activité anticholinestérasique ne pourrait être établie. De même, la corrélation avec les contenus en polyphénols et en flavonoïdes n'était pas vérifiable.

3. Étude toxicologique (Étude de la toxicité aiguë par l'essai limite)

Malgré les effets thérapeutiques rapportés par la bibliographie et corroborés par nos travaux, nous savons peu de données sur l'*A. minus* quant aux possibles effets toxiques. Par le biais d'une utilisation simple de plantes, les utilisateurs ne reconnaissent généralement pas le potentiel des risques de la phytothérapie, car les plantes sont des produits « naturelles ». Néanmoins, l'ingestion d'extraits de plantes peut avoir des effets indésirables ou une toxicité potentielle (Pepato et al., 2004). Dans cette optique, nous avons procédé à l'étude de la toxicité aiguë en d'identifiant une seule dose provoquant de majeures effets indésirables ou de toxicité menaçant la vie, ce qui implique souvent une estimation de la dose minimale qui peut provoquer une létalité.

Après l'administration des extraits aqueux par voie orale à des souris, les observations étaient approximativement identiques pour les trois extraits (**Tableau 15**). En effet, on remarque qu'il n'y a pas de signes d'intoxication ou de mortalité supérieure à 25% en liaison avec la première dose injectée (2000 mg/kg). Pendant les premier six heures d'observation aucune mortalité n'a été remarquée chez les souris traitée par cette dose, mais des signes plutôt réconfortants par rapport aux témoins tels que l'hyperactivité et l'accélération du rythme cardiaque ont été observés.

Les signes observés auparavant ont disparus vers le 2^{ème} jour et des signes plus au moins grave ont pris la relève ; l'isolement, la perte d'appétit, une faible activité, une légère

somnolence. Les signes observés lors du 2^{ème} jour ont disparue vers le 3^{ème} jour et ils n'ont pas été reconstatés pendant les 12 jours restant. Ces résultats suggèrent que la DL₅₀ est située bien au-dessus de 2g/kg.

Etant donné l'absence d'un côté des signes graves de toxicité (la respiration coupée, la perte d'équilibre, les contractions musculaires, la paralysie partielle ou totale...etc.), et de l'autre côté, une mortalité minimale constatée ou bien aucune mortalité n'ayant été observée avec la dose 2000mg/kg, nous sommes passés à la dose 5000mg/kg recommandée par l'OCDE 425. (2008). Les observations étaient quasiment les mêmes que celles de la dose 2000mg/kg durant les 14 jours de l'expérience (1^{ère}jour : hyperactivité et augmentation du rythme cardiaque, 2^{ème}jour : isolement, perte d'appétit, faible activité et une légère somnolence. Les signes observés lors du 2^{ème} jour ont disparue vers le 3^{ème} jour et ils n'ont pas été reconstatés pendant les 12 jours restant). Concernant la mortalité, un seul décès a été enregistré lors de la 7^{ème} journée (**Tableau 15**). Il s'agit d'une souris gavée par le BFq à la dose de 5000 mg/kg. Le nombre d'animaux décédés au total est inférieur à trois donc l'essai est terminé (à l'issue d'une période d'observation de 14 jours au cours de laquelle aucune dose supplémentaire n'a été administrée) et la DL₅₀ des extraits aqueux est déterminée comme étant supérieure à 5000mg/kg (OCDE 425, 2008).

Tableau 15. Taux de mortalité des souris traitées par les différents extraits aqueux d'*Arctium minus*

ConcentraØ [mg/Kg]	BRq		BFq		BFRq		ΔH ₂ O
	2000	5000	2000	5000	2000	5000	0,5 mL/Kg
Lot	B1	C1	B2	C2	B3	C3	A
Nombre total de souris	4	3	3	4	3	3	5
Nombre de souris mortes	1	0	0	1	0	0	0
Taux de mortalité (%)	25	0	0	25	0	0	0

Bien que l'A. minus soit largement utilisée en raison de ses propriétés thérapeutiques) (Li et *al.*, 2004), les études portant sur les différents aspects toxicologiques demeurent insuffisantes. Or, seul Francisco et *al.*, (2010) ont abordé la toxicité chronique d'A.minus dans le traitement des rats diabétiques par administration orale répétée de l'extrait décocté. Les résultats de cette étude ont rapporté une forte diminution de l'activité respiratoire par diminution de la consommation d'oxygène. Cela concorde étroitement avec nos observations relatives au 2^{ème} jour après l'administration de la dose unique. Selon les mêmes auteurs, les métaux lourds seraient à l'origine de cette défaillance. En effet, la plupart des plantes aromatiques et médicinales ont la capacité de bio-accumuler plusieurs métaux lourds (Broadley et *al.*, 2001). L'ingestion d'ions métalliques comme le cadmium entraînera une accumulation dans le foie et les reins (Lind et *al.*, 1997). L'étendue de l'accumulation des ions métalliques dépend à la fois

du temps et de la concentration. Ainsi, la dose unique administré au cours de notre expérimentation (contenait peu de métaux lourd) ne suffisait pas à produire un effet délétère durable et les souris se sont vu rétablit au terme du 3^{ème} jour. Cela semble être une explication plausible aux résultats de notre étude. L'étude sus-cité a conclu que les traitements à long terme avec l'*A. minus* peuvent induire des effets délétères sur le métabolisme cellulaire et doivent donc être évités dans le traitement à long terme. Par ailleurs, la présence de certains métaux lourds comme le nickel et le cadmium, peut se superposer aux effets bénéfiques des composés phytochimiques présents dans la plante (Francisco et *al.*, 2010).

D'après la classification de Diezi (1989) les extraits aqueux d'*Arctium minus* ne sont pas toxiques ; car la DL₅₀ des trois organes de la plante étudiée est supérieure à 5000mg/kg. Ainsi, *Arctium minus* peut être considéré comme sûr administrée par voie orale à moins que des études ultérieures prouvent le contraire en évaluant d'autres paramètres à savoir ; la croissance pondérale, la formule sanguine (hématologique et biochimiques) et des épreuves fonctionnelles particulièrement celles qui se rapportent aux organes extérieurs ainsi que la base des comptes rendus nécrosiques, accompagnés des examens histologiques qui s'y rattachent (Diallo, 2005).

CONCLUSION

Dans cette étude, l'effet thérapeutique de la plante endémique algérienne *Arctium minus* (Hill) Bernh. ssp. *Atlanticum* (Pomel) Maire aux propriétés médicinales a été évalué. Le rendement d'extraction par l'eau, eau/alcool et l'acétate d'éthyle, la teneur en polyphénols, flavonoïdes et tannins des différentes parties (aériennes et racinales) de cette plante a été déterminée. Les résultats obtenus montrent que les extraits bruts hydroalcooliques des feuilles et des fleurs ont été les plus rentables, suivis par les racines.

Le profil chimique des extraits aqueux et hydrométhanolique des trois organes de la plante étudiée défini par HPLC-DAD-UV, a montré la présence de plusieurs acides phénoliques et flavonoïdes chez l'espèce *A. minus*, à savoir : la catéchine, l'épicatéchine, l'hésperidine, l'acide gallique, l'acide hydroxybenzoïque, l'acide syringique, l'acide férulique, l'acide sinapinique et l'acide rosmarinique. Par ailleurs, nous avons pu identifier des acides phénoliques ayant déjà été détectés chez l'espèce *A. lappa* tels que l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide p-coumarique, l'acide benzoïque et l'acide trans-cinnamique.

Tous les organes étudiés sont avérés riches en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés, en particulier leurs extraits hydroalcooliques. Ainsi, tous les extraits hydrométhanoliques, aqueux et le BRt ont montré un bon potentiel de piégeage des radicaux libres. Cependant, l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique n'a été obtenue qu'à des concentrations relativement élevées. Quant au pouvoir réducteur du cuivre CUPRAC, l'extrait du BFRm était le plus puissant. L'activité neuroprotectrice a été évaluée contre l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BuChE), où l'extrait du BFt avait l'activité inhibitrice la plus élevée sur la BuChE par rapport aux autres extraits. Les extraits testés ont démontré des effets inhibiteurs contre l' α -amylase, le BRt a montré un effet inhibiteur enzymatique plus fort que l'acarbose utilisé comme standard. L'étude de l'activité anti-inflammatoire des extraits *in vitro* réalisée par la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines révèle une remarquable capacité d'inhibition, notamment des extraits d'éthyle acétate.

L'étude de toxicité aiguë a classé la plante étudiée dans la catégorie des plantes inoffensives avec une DL_{50} supérieure à 5000 mg/Kg.

Compte tenue la sécurité de la plante et l'excellent rendement en composés bioactifs, une corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et du bon pouvoir pharmacologique présenté par la plante étudiée pourrait être établi corroborant ainsi son utilisation traditionnelle

dans la gestion de diverses pathologies. La plante pourrait même être utilisée dans l'industrie pharmaceutique.

Tout compte fait, les résultats obtenus sont d'un grand intérêt mais ne constituent qu'une première étape dans la recherche de substances et de sources naturelles biologiquement actives. Par conséquent, des études complémentaires, précises et approfondies restent nécessaires pour pouvoir confirmer les résultats mis en évidence. De nombreuses perspectives peuvent être envisagées qui peuvent être résumées dans les points suivants :

- Utilisation de techniques avancées pour l'isolement et l'identification des principes actifs responsables des effets thérapeutiques.

- Utiliser des cultures cellulaires et des cellules isolées *in vitro* pour estimer l'activité antioxydante et anti-inflammatoire afin de confirmer les résultats précédents.

- Pour pouvoir mettre en évidence une éventuelle synergie entre différents composés bioactifs, des investigations *in vivo* seraient nécessaires pour déterminer les cibles biologiques, et comprendre le mécanisme tissulaire et moléculaire mis en jeu.

- Des études toxicologiques approfondies sur l'espèce *Arctium minus*, afin de déterminer les effets à long terme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Abdal Dayem, A., Choi, H. Y., Yang, G. M., Kim, K., Saha, S. K., & Cho, S. G. (2016). The anti-cancer effect of polyphenols against breast cancer and cancer stem cells: molecular mechanisms. *Nutrients*, 8(9), 581, 1-37.
- Achilonu, M. C., & Umesiobi, D. O. (2015). Bioactive phytochemicals: bioactivity, sources, preparations, and/or modifications via silver tetrafluoroborate mediation. *Journal of Chemistry*.
- Adarshvm A, Kavitha D, Anurag K. (2001). Anti denaturation and antioxidant activities of annonacherimola in-vitro. *International Journal of pharma and Bio Sciences* 2011 ; 2(2) 929-975.
- Agati, G., & Tattini, M. (2010). Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *The New Phytologist*, 186(4), 786-793.
- Ahangarpour, A., Heidari, H., Oroojan, A. A., Mirzavandi, F., Nasr Esfehiani, K., and Dehghan Mohammadi, Z. (2017). Antidiabetic, hypolipidemic and hepatoprotective effects of *Arctium lappa* root's hydro-alcoholic extract on nicotinamide-streptozotocin induced type 2 model of diabetes in male mice. *Avicenna J. Phytomed.* 7, 169–179.
- Ahmet Başaran, A.; Ceritoğlu, I.; Ündeğer, Ü.; Başaran, N. (1997). Immunomodulatory Activities of Some Turkish Medicinal Plants. *Phytother. Res.* 11 (8), 609–611.
- Albano, S. M., & Miguel, M. G. (2011). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*, 33(2), 338-343.
- Alessandri, A. L., Sousa, L. P., Lucas, C. D., Rossi, A. G., Pinho, V., & Teixeira, M. M. (2013). Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology & therapeutics*, 139(2), 189-212.
- Al-Saikhan, M. S., Howard, L. R., & Miller Jr, J. C. (1995). Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum*, L.). *Journal of food science*, 60(2), 341-343.
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G., & Lightfoot, D. A. (2017). Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*, 6(4), 1-23.
- Amrani, A., Mecheri, A., Bensouici, C., Boubekri, N., Benaissa, O., Zama, D., Benayache, F., Benayache, S. (2019). Evaluation of Antidiabetic, Dermatoprotective, Neuroprotective and Antioxidant Activities of *Chrysanthemum Fontanesii* Flowers and Leaves Extracts. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 20 (101209).
- Annamalai, S., Mohanam, L., Raja, V., Dev, A., & Prabhu, V. (2017). Antiobesity, antioxidant and hepatoprotective effects of Diallyl trisulphide (DATS) alone or in combination with Orlistat on HFD induced obese rats. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 93, 81-87.

- Antonella S, Mario S, Maria L, Daniela M, Francesco B, Francesco C. (1995). Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembrane. *Free Radical Biology and Medicine*, 19, 481-486.
- Anusuya N. and Manian S. (2013). Antioxidant and free radical scavenging potential of different solvent extracts of *Indigoferatinctoria* l. leaves. *International Journal of Pharma-cy and Pharmaceutical Sciences*. 1, 142-147.
- Aouachria, S. (2018). Contribution to the phytochemical study and evaluation of the in vitro and in vivo antioxidant activity of *Reichardia picroides* (*Doctoral dissertation*), 5-15.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Arulselvan, P., Ghofar, H. A. A., Karthivashan, G., Halim, M. F. A., Ghafar, M. S. A., & Fakurazi, S. (2014). Antidiabetic therapeutics from natural source: A systematic review. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4(4), 607-617.
- Arunkumar, S., and Muthuselvam, M. (2009). Analysis of phytochemical constituents and antimicrobial activities of *Aloe vera* L. against clinical pathogens. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5(5), 572-576.
- Asmat, U., Abad, K., & Ismail, K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi pharmaceutical journal*, 24(5), 547-553.
- Auddy B, Ferreira M., Blasina F., Lafon L., Arredondo F., Dajas F., Tripathi P.C., Seal T., Mukherjee B. (2003). Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 84 (2003) 131_138.
- Ayad, R. (2008). Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce: *Zygophyllum cornutum* (Zygophyllaceae). *Mémoire de magister, Université Mentouri. Constantine*, 37-45.
- Ayroud, Y. (2015). Introduction à l'inflammation (*Cours, Hôpital D'Ottawa*). Available : <https://slideplayer.fr/slide/8585689/>.(accessed Mars 20, 2022).
- Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*, 4(196), 1-6.
- Ba, K. (2010). Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Base*, 14:1-14.
- Bachurin, S. O. (2003). Medicinal chemistry approaches for the treatment and prevention of Alzheimer's disease. *Medicinal Research Reviews*, 23(1), 48-88.

- Badiaga, M. (2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali (*Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II*), 10.
- Bagad YM, Umarmkar AR, Tatiya AU, Surana SJ. (2011). Investigation of anti-inflammatory and analgesic activity of *Bridelia airyshawii* (Euphorbiaceae). *J Pharm Res*, 4(5), 1132-1326.
- Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin JC, Pinkas M, Luycky M, Gazin M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittelforschung*, 46, 1086-1089.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Barla, A., Öztürk, M., Kültür, Ş., & Öksüz, S. (2007). Screening of antioxidant activity of three *Euphorbia* species from Turkey. *Fitoterapia*, 78(6), 423-425.
- Barros L, Ferreira MJ, Queiros B, Ferreira IC, Baptista P. (2007). Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 103, 413-419.
- Barzegar, A., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2011). Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin. *PloS one*, 6(10), e26012.
- Benabdallah, F. Z. (2021). Investigation des extraits à activités pharmacologiques de quelques espèces qui poussent dans les zones arides et semi arides, (*Doctoral dissertation, Sétif I*), 10-12.
- Berkelhamer, S. K., Kim, G. A., Radder, J. E., Wedgwood, S., Czech, L., Steinhorn, R. H., & Schumacker, P. T. (2013). Developmental differences in hyperoxia-induced oxidative stress and cellular responses in the murine lung. *Free Radical Biology and Medicine*, 61, 51-60.
- Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The versatility of antioxidant assays in food science and safety—Chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709.
- Bimkr M, Rahman RA, Taip FS, Ganjloo A, Salleh LM, Selamat J, Bisby F. (1994). *Phytochemical dictionary of the Leguminosae*. CRC Press.
- Bismuth, C., Scherrmann, J. M., Garnier, R., Baud, F. J., & Pontal, P. G. (1987). Elimination of paraquat. *Human toxicology*, 6(1), 63-67.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181 (4617), 1199–1200.
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 3(4), 228-237.

- Bouchibane, M., Véla, E., Bougaham, A. F., Zemouri, M., Mazouz, A., & Sahnoune, M. (2017). Étude phytogéographique des massifs forestiers de Kéfrida, un secteur méconnu de la zone importante pour les plantes des Babors (Nord-Est algérien). *Revue d'Ecologie, Terre et Vie*, 72(4), 374-386.
- Bouden, I. (2019). Etude de l'activité antiarthritique, antioxydante et antimicrobienne des extraits de *Matricaria pubescens* (*Doctoral dissertation*).
- Boudjouref, M. (2018). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L (*Doctoral dissertation*).
- Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y, Nasri M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114, 1198-1205.
- Boumaza O, Mekkiou R, Seghiri R, Sarri D, Benayache S, Garcia VP, Bermejo J, Benayache F. (2006). Flavonoids and isoflavonoids from *Genista tricuspidata*. *Chem. Nat. Compd.* 42, 730–731.
- Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3289-3303.
- Broadley MR, Willey NJ, Wilkins JC, Baker AJM, Mead A, White PJ. (2001). Phylogenetic variation in heavy metal accumulation in angiosperms. *New Phytol.* 152: 9-27.
- Bruchard, M. (2013). Etude de NLRP3 dans les cellules myéloïdes immunosuppressives et les lymphocytes TCD4 dans un contexte de cancer (*Doctoral dissertation, Dijon*), 16.
- Bruneton, J. (1991). Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2eme édition, Paris: Editions médicales internationales. *Tec et Doc Lavoisier*, 1120.
- Bucci, D. J., Holland, P. C., & Gallagher, M. (1998). Removal of cholinergic input to rat posterior parietal cortex disrupts incremental processing of conditioned stimuli. *Journal of Neuroscience*, 18(19), 8038-8046.
- Buckley, C. D., Gilroy, D. W., & Serhan, C. N. (2014). Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity*, 40(3), 315-327.
- Burits M & Bucar F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research* 14, 323-328.
- Cao, J., Li, C., Zhang, P., Cao, X., Huang, T., Bai, Y., et al. (2012). Antidiabetic effect of burdock (*Arctium lappa* L.) root ethanolic extract on streptozotocin-induced diabetic rats. *Afr. J. Biotechnol.* 11, 9079–9085.
- Caponio F, Alloggio V, & Gomes T.(1999). Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*, 64(2), 203-209.
- Carvalho, O. V., Botelho, C. V., Ferreira, C. G. T., Ferreira, H. C. C., Santos, M. R., Diaz, M. A. N., ... & Junior, A. S. (2013). In vitro inhibition of canine distemper virus by

- flavonoids and phenolic acids: implications of structural differences for antiviral design. *Research in Veterinary Science*, 95(2), 717-724.
- Castegna, A., Aksenov, M., Thongboonkerd, V., Klein, J. B., Pierce, W. M., Booze, R., ... & Butterfield, D. A. (2002). Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, α -enolase and heat shock cognate 71. *Journal of neurochemistry*, 82(6), 562-571.
- Cavalli, V. L. D. L. O., Sordi, C., Tonini, K., Grando, A., Muneron, T., Guigi, A., & Roman Júnior, W. A. (2007). Avaliação in vivo do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill.) Bernh. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, 64-70.
- Chang WC, Sei CK, Soon SH, Bong KC, Hye JA, Min YL, Sang HP. and Soo KK. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*. 163(6), 1161-1168.
- Chen, F. A., Wu, A. B., & Chen, C. Y. (2004). The influence of different treatments on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its active components. *Food chemistry*, 86(4), 479-484.
- Chen, L., Yang, X., Jiao, H., & Zhao, B. (2002). Tea catechins protect against lead-induced cytotoxicity, lipid peroxidation, and membrane fluidity in HepG2 cells. *Toxicological sciences*, 69(1), 149-156.
- Clewell III, H. J., & Andersen, M. E. (1994). Physiologically-based pharmacokinetic modeling and bioactivation of xenobiotics. *Toxicology and Industrial Health*, 10(1-2), 1-24.
- Concannon, P., Rich, S. S., & Nepom, G. T. (2009). Genetics of type 1A diabetes. *New England Journal of Medicine*, 360(16), 1646-1654. , 1837.
- Conde E., Cara C., Moure A., Ruiz E., Castro E. and Dominguez H. (2009). Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chemistry*. 114 (3), 806 -812.
- Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O. (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta* 80, 1144-1152.
- Dangoumau, J. (2006). Pharmacologie Générale. Edition 2006. Département de pharmacologie-Université Victor Segalen Bordeaux 2.
- De Souza, G. C., Haas, A. P. S., Von Poser, G. L., Schapoval, E. E. S., & Elisabetsky, E. (2004). Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of ethnopharmacology*, 90(1), 135-143.
- Deans, S.G., Simpson, E.J.M. (2003) Herbs of the Compositae. In *Encyclopedia of Foods Sciences and Nutrition*. Caballero, B. (Ed). Academic Press, New York, 3077–3081.
- De-Paula, V. J., Radanovic, M., & Diniz, B. S. (2012). *Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease*, 65, 329-352.

- Diallo A. (2005). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Wild (*Myrtaceae*). Thèse de doctorat en Pharmacie. Université de Bamako, Mali. pp : 31-35.
- Diezi J. (1989). Toxicologie : principes de base et répercussions cliniques. In "pharmacologie. Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques". Ed Slatkine, Genève, p. 33-44.
- Dinde, A. V., Lokhande, P. B., & Mujawar, H. A. (2017). Essential oil extraction, characterization and anti microbial study of *Cythocline purpurea* from Konkan region. *Journal of Pharmacy Research*, 11(5), 424-429.
- Djeridane A, Yousfi M, Brunel J M, Stocker P. (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2599-2606.
- Dorward, D. A., Lucas, C. D., Rossi, A. G., Haslett, C., & Dhaliwal, K. (2012). Imaging inflammation: molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. *Pharmacology & therapeutics*, 135(2), 182-199.
- Duh, P. D. (1998). Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* Linne): its scavenging effect on free-radical and active oxygen. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(4), 455-461.
- Dunnett, S. B., Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (1991). The basal forebrain-cortical cholinergic system: interpreting the functional consequences of excitotoxic lesions. *Trends in neurosciences*, 14(11), 494-501.
- Ebrahimi, A., & Schluesener, H. (2012). Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: potentials and pitfalls. *Ageing research reviews*, 11(2), 329-345.
- Eddouks, M., Ouahidi, M. L., Farid, O., Moufid, A., Khalidi, A., & Lemhadri, A. (2007). L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie*, 5(4), 194-203.
- El-Karemy ZAR, Mansour RMA, Fayed AA, Saleh AM. (1987). The flavonoids of local member of Asteraceae (Compositae). *Biochemical Systemetics & Ecology*, 15, 53-55.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Elufioye, T. O., Unachukwu, C. C., & Oyedeji, A. O. (2019). Anticholinesterase and antioxidant activities of *spilanthes filicaulis* whole plant extracts for the management of alzheimer's disease. *Current Enzyme Inhibition*, 15(2), 103-113.
- Erdemoglu, N., Turan, N. N., Akkol, E. K., Sener, B., & Abacıoglu, N. (2009). Estimation of anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant activities on *Arctium minus* (Hill) Bernh. ssp. minus. *Journal of ethnopharmacology*, 121(2), 318-323.

- European Medicines Agency (2011). Community Herbal Monograph on *Actium lappa* L., Radix. EMA/HMPC/246763/2009.
- European Scientific Cooperative on Phytotherapy (2003). ESCOP Monographs: The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. Exeter: European Scientific Cooperative on Phytotherapy.
- European Scientific Cooperative on Phytotherapy-The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products (2016). ESCOP Monograph on *Arctii radix* (Burdock Root). Available: <http://escop.com/downloads/arctii/> (accessed Mars 15, 2019).
- Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdely C, (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 372-379.
- Farahpour, M. R., & Habibi, M. (2012). Evaluation of the wound healing activity of an ethanolic extract of Ceylon cinnamon in mice. *Vet Med*, 57(1), 1-5.
- Ferracane, R., Graziani, G., Gallo, M., Fogliano, V., & Ritieni, A. (2010). Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (*Arctium lappa*) seeds, roots and leaves. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51(2), 399-404.
- Ferreira LE, Castro PM, Chagas AC, França SC, Belebony RO. (2013). In vitro anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. *Experimental parasitology*, 134(3): 327.
- Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. *CRC Taylor & Francis (London)*. pp: 1-32.
- Fischer, S. P. M., Brusco, I., Camponogara, C., Piana, M., Faccin, H., Gobo, L. A., ... & Oliveira, S. M. (2018). *Arctium minus* crude extract presents antinociceptive effect in a mice acute gout attack model. *Inflammopharmacology*, 26(2), 505-519.
- Fleuretine J, Cabalion P, Mazars G, Dos sentos J, Youno C, (1990). Ethanopharmacologie, source, méthodes, objective. *Orfestom*, Paris: 49.
- Francisco, P. P., Elsa, N., Cristina, S., & Raquel, S. A. (2010). Inhibitory effect of *Arctium minus* on mitochondrial bioenergetics in diabetic Goto-Kakizaki rats. *Scientific Research and Essays*, 5(16), 2136-2142.
- Francisco, V., Costa, G., Neves, B. M., Cruz, M. T., & Batista, M. T. (2018). Antiinflammatory activity of polyphenols on dendritic cells. *Polyphenols: Prevention and treatment of human disease*, 372-393.
- Fujita, T., Sezik, E., Tabata, M., Yes, ilada, E., Honda, G., Takeda, Y., Tanaka, T., Takaishi, Y., 1995. Traditional medicine in Turkey VII. Folk medicine in Middle and West Black Sea regions. *Economic Botany* 49, 406–422.
- Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & redox signaling*, 15(6), 1583-1606.

- Gara, A. B., Kolsi, R. B. A., Chaaben, R., Hammami, N., Kammoun, M., Patti, F. P., ... & Belghith, K. (2017). Inhibition of key digestive enzymes related to hyperlipidemia and protection of liver-kidney functions by *Cystoseira crinita* sulphated polysaccharide in high-fat diet-fed rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 85, 517-526.
- Gérin M, Gosselin P, Cordier S, Viau C, Quénel P, Dewailly É, (2003). Environnement et santé publique-Fondements et pratiques. *Édisem/Tec & Doc*.
- Ghosh, S., Saha, K., Dasgupta, S. C., & Gomes, A. (2015). In vitro and in vivo anti-arthritic and anti-inflammatory activity of *Bungarus fasciatus* venom. *J. Toxins*, 2(1), 5-8.
- Gilles L, (2004). Notion de toxicologie. 2eme Ed Québec, *Canada* : 69.
- Godic, A., Poljšak, B., Adamic, M., & Dahmane, R. (2014). The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 1-6.
- Goncalves, S., & Romano, A. (2017). Inhibitory properties of phenolic compounds against enzymes linked with human diseases. *Phenolic compounds-biological activity*, 40(5), 100-120.
- Goodpaster, B. H., He, J., Watkins, S., & Kelley, D. E. (2001). Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(12), 5755-5761.
- Gourlay-Francé C, Vincent-Hubert F, Tusseau-Vuillemin M, Sanchez W, Geffard A, Lévi Y, Oziol L, Labadie P, Mouchel J, Raguet M, Théry S. (2011). Risque éco toxicologique Dans le bassin de la seine, *Université pière et marie curi*, Paris, p. 53.
- Griffin, P., & Care, E. (Eds.). (2014). Assessment and teaching of 21st century skills: Methods and approach. *Springer*.
- GROSS, R. S., WERNER, P. A., & HAWTHORN, W. R. (1980). The biology of Canadian weeds. 38. *Arctium minus* (Hill) Bernh. and *A. lappa* L. *Canadian Journal of Plant Science*, 60(2), 621-634.
- Guettaf, S. ; Abidli, N. ; Kariche, S. ; Bellebcir, L. ; Bouriche, H, (2016). Evaluation of antioxidant potential and Phytochemical studies of *Ononis angustissima* L. (*fabaceae*). *World J Pharm Res.*, 5,1793–1815.
- Guignard, J. L. (1996). Biochimie végétale : *Jean-Louis Guignard*. Masson, 274.
- Guillaume, D., & Charrouf, Z. (2005). Saponines et métabolites secondaires de l'arganier (*Argania spinosa*). *Cahiers Agricultures*, 14(6), 509-516.
- Gulçin I, Huyut Z, Elmastas M and Aboul-Enein H Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3, 43-53.
- Gülçin, I. (2007). Comparison of in Vitro Antioxidant and Antiradical Activities of L-Tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids*, 32 (3), 431–438.
- H Ferreira-Vieira, T., M Guimaraes, I., R Silva, F., & M Ribeiro, F. (2016). Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system. *Current neuropharmacology*, 14(1), 1-15.

- Hagerman AE & Butler LG. (1989). Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *J Chem Ecol*, 15, 1795-1810.
- Hagerman, AE. (2002). Tannin Handbook. Miami University. *Oxford OH*, 45056, 78.
- Hajimehdipoor, H., Ara, L., Moazzeni, H., & Esmaeili, S. (2016). Evaluating the antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of some plants from Kohgiluyeh va Boyerahmad province, Iran. *Research Journal of Pharmacognosy*, 3(4), 1-7.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 96(2-3), 67-202.
- Hiraiwa, K., & van Eeden, S. F. (2013). Contribution of lung macrophages to the inflammatory responses induced by exposure to air pollutants. *Mediators of inflammation*, 1-10.
- Huang D, Ou B, Prior RL. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C., & Rahu, N. (2016). Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 1-9.
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry*, 126(4), 1821-1835.
- Ioannou, I., Chaaban, H., Slimane, M., & Ghou, M. (2015). Origin of the variability of the antioxidant activity determination of food material. *Biotechnology*, 4, 77-92.
- Ismail, A., Jr; Tan, S. (2002). Antioxidant Activity of Selected Commercial Seaweeds. *Malays. J. Nutr.* 8 (2), 167–177.
- Jaiswal R, Kiprotich J, Kuhner N. (2011). Determination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the Asteraceae family. *Phytochemistry*, 72, 781–790.
- Janel, N., & Noll, C. (2014). Protection and reversal of hepatic fibrosis by polyphenols. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 680.
- Jones, W. P., & Kinghorn, A. D. (2006). Extraction of plant secondary metabolites. In *Natural products isolation*. Humana Press, 323-411.
- Judy O, Jenni P, Sharon S. (2014). Immunologie. 7ème Ed Dunod, Paris: 800p.
- Kada, S. (2018). Recherche d'extraits de plantes médicinales doués d'activités biologiques (*Doctoral dissertation*), 12.
- Kallithraka, S., Garcia-Viguera, C., Bridle, P., & Bakker, J. (1995). Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. *Phytochemical analysis*, 6(5), 265-267.
- Kansole, M. M. R. (2009). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposstavahlet Orthosiphon pallidus royle ex benth.*

- Kar B, Kumar RS, Karmakar I, Dola N, Bala A, Mazumder UK, Hadar PK, (2012). Antioxidant and in vitro anti-inflammatory activities of *Mimusops elengi* leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), S976-S980.
- Kato, Y., & Watanabe, T. (1993). Isolation and characterization of a xyloglucan from gobo (*Arctium lappa* L.). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 57(9), 1591-1592.
- Kenny, O., Smyth, T. J., Walsh, D., Kelleher, C. T., Hewage, C. M., & Brunton, N. P. (2014). Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. *Food Chemistry*, 161, 79-86.
- Kernouf, N. (2019). Effet des extraits de *Capparis spinosa* sur la production des médiateurs inflammatoires des neutrophiles et des monocytes (*Doctoral dissertation*).
- Kessel, L., Tendal, B., Jørgensen, K. J., Erngaard, D., Flesner, P., Andresen, J. L., & Hjortdal, J. (2014). Post-cataract prevention of inflammation and macular edema by steroid and nonsteroidal anti-inflammatory eye drops: a systematic review. *Ophthalmology*, 121(10), 1915-1924.
- Kim, J., Lee, K. W., & Lee, H. J. (2014). Polyphenols suppress and modulate inflammation: possible roles in health and disease. *Polyphenols in human health and disease*, 393-408.
- Kim, Y., Keogh, J. B., & Clifton, P. M. (2016). Polyphenols and glycemic control. *Nutrients*, 8(1), 1-27.
- Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées (*Doctoral dissertation, Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS*), 17-32.
- Ksouri R, Falleh H, Megdiche W, Trabelsi N, Mhamdi B, Chaieb K, Bakrouf A, Magné C, Abdelly C. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food Chem Toxicol*, 47, 2083-2091.
- Kulkarni, A. P., Aradhya, S. M., & Divakar, S. (2004). Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant-punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. *Food chemistry*, 87(4), 551-557.
- Kumazawa S, Hayashi K, Kajiya K, Ishii T, Hamasaka T and Nakayama T. (2002). Studies of the constituents of Uruguayan propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4777-4782.
- Kwon, Y. K.; Choi, S. J.; Kim, C. R.; Kim, J. K.; Kim, Y.-J.; Choi, J. H.; Song, S.-W.; Kim, C.-J.; Park, G. G.; Park, C.-S.; Shin, D.-H. (2016). Antioxidant and Cognitive-Enhancing Activities of *Arctium Lappa* L. Roots in A β 1-42-Induced Mouse Model. *Appl. Biol. Chem.* 59 (4), 553–565.

- Lahmidani, N., Zerhoune, W., Mellouki, I., El Yousfi, M., Aqodad, N., El Abkari, M., ... & Benajah, D. (2012). L'ulcère bulbaire hémorragique et les anti-inflammatoires non stéroïdiens : quelle gravité de l'accident hémorragique?. *Journal Africain d'Hépatogastroentérologie*, 6(3), 193-195.
- Lanciano, P., Khalfaoui-Hassani, B., Selamoglu, N., Ghelli, A., Rugolo, M., & Daldal, F. (2013). Molecular mechanisms of superoxide production by complex III: a bacterial versus human mitochondrial comparative case study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1827(11-12), 1332-1339.
- Lattanzio, V., Kroon, P. A., Quideau, S., & Treutter, D. (2009). Plant phenolics—secondary metabolites with diverse functions. *Recent advances in polyphenol research*, 1, 1-35.
- Lavanya, R., Maheshwari, S. U., Harish, G., Raj, J. B., Kamali, S., Hemamalani, D., ... & Reddy, C. U. (2010). Investigation of in-vitro anti-inflammatory, anti-platelet and anti-arthritic activities in the leaves of *Anisomeles malabarica* Linn. *Research journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences*, 1(4), 745-752.
- Le K, Chiu F, Ng K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chem*, 105, 353-363.
- Lecoq P, Dor F, Kairo C, (2009). Description des valeurs repères toxicologiques utilisées lors d'expositions aiguës par inhalation des populations Santé environnement, *institut de veille sanitaire*.
- Lee KW & Kim YJ. (2003). Cacao has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine, *J Agric Food chem.*, 51,7292-7295.
- Lee, I.-A.; Joh, E.-H.; Kim, D.-H. (2011). Arctigenin Isolated from the Seeds of *Arctium Lappa* Ameliorates Memory Deficits in Mice. *Planta Med.* 77 (13), 1525–1527.
- Leybros J, Fremeaux P., (1990). Extraction solide-liquide aspects théoriques. Techniques de l'ingénieur, *Génie des procédés*. Vol. (2J2780): J2780.1-J2780.22.
- Li WL, Zheng HC, Bukuru J, De Kimpe N. (2004). Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *J. Ethnopharmacol.*, 92: 1-21.
- Lin, S. C., Lin, C. H., Lin, C. C., Lin, Y. H., Chen, C. F., Chen, I. C., & Wang, L. Y. (2002). Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* Linne on liver injuries induced by chronic ethanol consumption and potentiated by carbon tetrachloride. *Journal of biomedical science*, 9(5), 401-409.
- Lind Y, Engman J, Jorhem L, Glynn AW. (1997). Cadmium accumulation in liver and kidney of mice exposed to the same weekly cadmium dose continuously or once a week. *Food Chem. Toxicol.*, 35: 891- 895.
- Lindner, M.W. (1948). Burdock fruit. *Pharmazeutische Zentralhalle fuer Deutschland*, 87, 65–73.

- Litchfield, J. J., & Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 96(2), 99-113.
- Liu, J., Cai, Y. Z., Wong, R. N. S., Lee, C. K. F., Tang, S. C. W., Sze, S. C. W., ... & Zhang, Y. (2012). Comparative analysis of caffeoylquinic acids and lignans in roots and seeds among various burdock (*Arctium lappa*) genotypes with high antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(16), 4067-4075.
- Local Food-Nutraceuticals Consortium. (2005). Understanding local Mediterranean diets: a multidisciplinary pharmacological and ethnobotanical approach. *Pharmacological Research*, 52(4), 353-366.
- López-Vinyallonga, S., Arakaki, M., Garcia-Jacas, N., Susanna, A., Gitzendanner, M. A., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (2010). Isolation and characterization of novel microsatellite markers for *Arctium minus* (Compositae). *American journal of botany*, 97(2), 4-6.
- Losada-Barreiro, S., & Bravo-Diaz, C. (2017). Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *European journal of medicinal chemistry*, 133, 379-402.
- Lou, Z., Li, C., Kou, X., Yu, F., Wang, H., Smith, G. M., & Zhu, S. (2016). Antibacterial, antibiofilm effect of Burdock (*Arctium lappa* L.) leaf fraction and its efficiency in meat preservation. *Journal of food protection*, 79(8), 1404-1409.
- Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Zhang, M., Gao, Y., Ma, C., & Wang, Z. (2010). Improved extraction and identification by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry of phenolic compounds in burdock leaves. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2441-2446.
- Lou, Z.; Wang, H.; Li, J.; Chen, S.; Zhu, S.; Ma, C.; Wang, Z. (2010). Antioxidant Activity and Chemical Composition of the Fractions from Burdock Leaves. *J. Food Sci.* 75 (5), C413-9.
- Lowe, D. B., & Storkus, W. J. (2011). Chronic inflammation and immunologic-based constraints in malignant disease. *Immunotherapy*, 3(10), 1265-1274.
- Ma, X., Hui, H., Liu, Z., He, G., Hu, J., Meng, J., Luo, X. (2009). Poly-GLP-1, a novel long-lasting glucagon-like peptide-1 polymer, ameliorates hyperglycaemia by improving insulin sensitivity and increasing pancreatic beta-cell proliferation. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 11(10), 953-965.
- Madamanchi, N. R., & Runge, M. S. (2013). Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 61, 473-501.
- Mallem, Y., & Gogny, M. (2014). Anti-inflammatoires en médecine vétérinaire. *J EMC Vet*, 1-12.
- Mandal, S. M., Chakraborty, D., & Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant signaling & behavior*, 5(4), 359-368.

- Marco, G. J. (1968). A Rapid Method for Evaluation of Antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45 (9), 594–598.
- Marie-Victorin, F. (1964). *Flore laurentienne* (No. Sirsi ; a81626),567.
- Markham K R, (1982). Techniques of flavonoid identification. *Academic press*.1-13.
- Marston A & Hostettmann K. (2006). Separation and quantification of flavonoids. *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*, 1-36.
- Martínez, V., Mitjans, M., & Vinardell, M. P. (2014). Cytoprotective effects of polyphenols against oxidative damage. *Polyphenols in human health and disease*, 275-288.
- Maruta, Y., Kawabata, J., & Niki, R. (1995). Antioxidative caffeoylquinic acid derivatives in the roots of burdock (*Arctium lappa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(10), 2592-2595.
- Massoud, F., & Gauthier, S. (2010). Update on the pharmacological treatment of Alzheimer's disease. *Current neuropharmacology*, 8(1), 69-80.
- Matsumoto, T., Hosono-Nishiyama, K., & Yamada, H. (2006). Antiproliferative and apoptotic effects of butyrolactone lignans from *Arctium lappa* on leukemic cells. *Planta medica*, 72(03), 276-278.
- Mattson, M. P. (2008). Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1144(1), 97-112.
- McManus JP, Davis KG, Lilley TH, Haslam E. (1981). The association of proteins withpolyphenols. *Chem Commun*, 309-311.
- Mekinić, I. G.; Burcul, F.; Blazević, I.; Skroza, D.; Kerum, D.; Katalinić, V. (2013). Antioxidative/Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Some Asteraceae Plants. *Nat. Prod. Commun.* , 8 (4), 471–474.
- Mekkiou R, Touahar H, Dijoux-Franca MG, Mariotte AM, Benayache S, Benayache F. (2005). A new isoflavone from *Genista saharae* (Fabaceae), *Biochem Syst Ecol* 33: 635-638
- Miller LC & Tainter ML, (1944). Estimation of ED50 and its error by means of logarithmic. Probit paper *Society for Experimental Biology and Medicine* 57: 261-4.
- Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., & Zujko, M. E. (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in medical sciences*, 63(1), 68-78.
- Miyazawa, M., Yagi, N., and Taguchi, K. (2005). Inhibitory compounds of alpha; glucosidase activity from *Arctium lappa* L. *J. Oleo Sci.* 54, 589–594.
- Mosaddegh, M., Naghibi, F., Moazzeni, H., Pirani, A., & Esmaeili, S. (2012). Ethnobotanical survey of herbal remedies traditionally used in Kohghiluyeh va Boyer Ahmad province of Iran. *Journal of ethnopharmacology*, 141(1), 80-95.

- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., ... & Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food chemistry*, 72(2), 145-171.
- Murcia, M. A., Jiménez-Monreal, A. M., García-Diz, L., Carmona, M., Maggi, L., & Martínez-Tomé, M. (2009). Antioxidant activity of minimally processed (in modified atmospheres), dehydrated and ready-to-eat vegetables. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), 2103-2110.
- Muzamal, I., Robert, V., & HENRIE, A. (2013). Phytochemicals as a potential source for TNF- α inhibitors. *Phytochem. Rev*, 12, 65-93.
- Nakagawa, Y.; Matsugo, S. (2004). Antioxidant Activity of Flavonoids in Burdock Leaf Extracts and Their Preventive Effect on Soybean Oil Oxidization. *New Technologies & Medicine*, 5, 487-491.
- Nathan, C., & Cunningham-Bussel, A. (2013). Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nature Reviews Immunology*, 13(5), 349-361.
- Neves, J. M., Matos, C., Moutinho, C., Queiroz, G., & Gomes, L. R. (2009). Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 124(2), 270-283.
- Newman DJ and Cragg GM (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70: 461-477.
- Noack, M., & Kolopp-Sarda, M. N. (2018). Cytokines et inflammation : physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2018(499), 28-37.
- Nunomura, A., Perry, G., Pappolla, M. A., Wade, R., Hirai, K., Chiba, S., & Smith, M. A. (1999). RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 19(6), 1959-1964.
- Oduola T, Adeniyi F, Ogunyemi E, Bello IS, Idowu T, Subair H, (2007). Toxicity studies on an unripe *Carica papaya* aqueous extract : biochemical and haematological effects in wistar albino rats. *J.Medicinal Plants Res.*1(1) :001-004.
- Organisation de Coopération et de Développement Economiques. (2008). Les lignes directrices pour les essais des produits chimiques. Toxicité orale aigue-Méthode de l'ajustement des doses OCDE/OECD 425.
- Otenio, J. K., de Oliveira, G. K., Baisch, R. G., Donadel, G., Lourenço, E. L. B., Alberton, O., ... & Jacomassi, E. (2020). Plants with Hypoglycemic Effect Cultivated in Medicinal Garden from Umuarama, Paraná-Brazil: A Review. *Journal of Agricultural Studies*, 8(4), 153-175.
- Oyedapo OO, (2001). Biological activity of *Plyllanthus amarus* extracts on pragraow-Dawley rats. *Nig. J. Biochem. Mol. Biol.*, 83-86.

- Ozer, M. S., Kirkan, B., Sarikurkcu, C., Cengiz, M., Ceylan, O., Atılğan, N., & Tepe, B. (2018). *Onosma heterophyllum*: Phenolic composition, enzyme inhibitory and antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, *111*, 179-184.
- Özyürek, M.; Güçlü, K.; Tütem, E.; Başkan, K. S.; Erçağ, E.; Esin Çelik, S.; Baki, S.; Yıldız, L.; Karaman, Ş.; Apak, R. (2011). A Comprehensive Review of CUPRAC Methodology. *Anal. Methods*, *3* (11), 2439.
- Paola, D., Domenicotti, C., Nitti, M., Vitali, A., Borghi, R., Cottalasso, D., ... & Pronzato, M. A. (2000). Oxidative stress induces increase in intracellular amyloid beta-protein production and selective activation of beta I and beta II PKCs in NT2 cells (vol 268, pg 642, 2000). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *272*(1), 642-646.
- Papadimitriou, V.; Sotiroudis, T. G.; Xenakis, A.; Sofikiti, N.; Stavviannoudaki, V.; Chaniotakis, N. A. (2006). Oxidative Stability and Radical Scavenging Activity of Extra Virgin Olive Oils: An Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy Study. *Anal. Chim. Acta*, *573–574*, 453–458.
- Park, M. H., Kim, D. H., Lee, E. K., Kim, N. D., Im, D. S., Lee, J., ... & Chung, H. Y. (2014). Age-related inflammation and insulin resistance: a review of their intricate interdependency. *Archives of pharmacal research*, *37*(12), 1507-1514.
- Park, S. Y.; Hong, S. S.; Han, X. H.; Hwang, J. S.; Lee, D.; Ro, J. S.; Hwang, B. Y. (2007). Lignans from *Arctium Lappa* and Their Inhibition of LPS-Induced Nitric Oxide Production. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, *55* (1), 150–152.
- Pereira, D. M., Andrade, C., Valentão, P., & Andrade, P. B. (2017). Natural products as enzyme inhibitors. *Natural Products Targeting Clinically Relevant Enzymes*, *1*.
- Pietta PG, (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, *63*(7) :1035-1042.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, *97*, 55-74.
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2017). Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in pharmacological sciences*, *38*(7), 592-607.
- Prakash D, Upadhyay G, Brahma N, Singh HB, (2007). Singh antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food Chemistry*. *104*: 783-790.
- Predes, F. S., Ruiz, A. L., Carvalho, J. E., Foglio, M. A., & Dolder, H. (2011). Antioxidative and in vitro antiproliferative activity of *Arctium lappa* root extracts. *BMC complementary and alternative medicine*, *11*(1), 1-5.
- Predes, F.; Ruiz, A.; Carvalho, J.; Foglio, M.; Dolder, H. (2014). Antioxidative and in Vitro Antiproliferative Activity of *Arctium Lappa* Root Extracts. In *Recent Advances in Plant-Based, Traditional, and Natural Medicines*; Apple Academic Press, 27–37.

- Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53 (10), 4290–4302.
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-523.
- Quezel P & Santa S, (1962-1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. 1, Vol., CNRS Paris, 1003.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(3), 586-621.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2013). Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological research*, 68(1), 125-131.
- Ramarathnam N, Osawa T, Ochi H, Kawakishi S. (1995). The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends in Food Sciences and Technology*, 6, 75.
- Ramawat, K. G., & Mérillon, J. M. (Eds.). (2013). Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes (pp. 1541-2662). Berlin, Germany: Springer.
- Rathinam, V. A., & Fitzgerald, K. A. (2016). Inflammasome complexes : emerging mechanisms and effector functions. *Cell*, 165(4), 792-800.
- Redrejo-Rodriguez, M., Tejada-Cano, A., del Carmen Pinto, M., & Macías, P. (2004). Lipoygenase inhibition by flavonoids: semiempirical study of the structure–activity relation. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 674(1-3), 121-124.
- Reilly, P. M.; Schiller, H. J.; Bulkley, G. B. (1991). Pharmacologic Approach to Tissue Injury Mediated by Free Radicals and Other Reactive Oxygen Metabolites. *Am. J. Surg.* 161 (4), 488–503.
- Ribéreau-Gayon J, Peynaud E, Sudraud P and Ribéreau-Gayon P. (1968). Sciences et techniques du vin. Tome 1. Edition. Dunod, Pari, p 671.
- Robbins, L. R. (2013). Natural variability in phenolic and sesquiterpene constituents among burdock (*Arctium lappa* L. and *Arctium minus* L.) leaves for potential medicinal interests (*Doctoral dissertation, The Ohio State University*).
- Rocchi, A., Pellegrini, S., Siciliano, G., & Murri, L. (2003). Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain research bulletin*, 61(1), 1-24.
- Roussel, A. M. (2016). Inflammation chronique de bas grade : la prise en charge micronutritionnelle comme alternative aux traitements médicamenteux. *L'institut eropéen de physionutrition et phytothérapie*, (23), 2.
- Saleh, N. A. M., & Bohm, B. A. (1971). Flavonoids of *Arctium minus* (Compositae). *Experientia*, 27(12), 1494-1494.

- Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P. (2011). A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1 (1) : 25-41.
- Sang, Z., Pan, W., Wang, K., Ma, Q., Yu, L., Yang, Y., ...& Liu, W. (2017). Design, synthesis and evaluation of novel ferulic acid-O-alkylamine derivatives as potential multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. *European journal of medicinal chemistry*, 130, 379-392.
- Sangeetha, M., Soni, B. K., Singh, T., Bhalgal, C. M., & Mudshinge, S. R. (2011). Invitro Anti Inflammatory Studies of 3-(1-Benzofuran-2-yl)-5-(substituted aryl) isoxazole. *IJRPBS*, 2(3), 1203-1205.
- Šarić-Kundalić, B., Dobeš, C., Klatte-Asselmeyer, V., & Saukel, J. (2010). Ethnobotanical study on medicinal use of wild and cultivated plants in middle, south and west Bosnia and Herzegovina. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(1), 33-55.
- Sarter, M., & Bruno, J. P. (1997). Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. *Brain Research Reviews*, 23(1-2), 28-46.
- Scalzo, J., Politi, A., Pellegrini, N., Mezzetti, B., & Battino, M. (2005). Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*, 21(2), 207-213.
- Seidel, V. (2005). Initial and bulk extract. *Natural product research, 2nd edn. Humana Press, Totowa*, 27-37.
- Selma, M. V., Espin, J. C., & Tomas-Barberan, F. A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(15), 6485-6501.
- Serhan, C. N. (2007). Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu. Rev. Immunol.*, 25, 101-137.
- Serhan, C. N., & Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology*, 6(12), 1191-1197.
- Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., & Tanaka, T. (2001). Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in central Anatolia. *Journal of ethnopharmacology*, 75(2-3), 95-115.
- Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M., & Pinelli, E. (2014). Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 232*, 1-44.
- Shen, C. L., Mo, H., Smith, B. J., Chen, C. H., Chen, L., Chyu, M. C., & Kwun, I. S. (2014). Green Tea and other Fruit Polyphenols Attenuate Deterioration of Bone Microarchitecture. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 681-693.
- Shi, H.; Noguchi, N.; Niki, E. (2001). Galvinoxyl Method for Standardizing Electron and Proton Donation Activity. *Methods Enzymol.* 335, 157-166.

- Shivaprasad, H.N., Mohan, S., Kharya, M.D., Shiradkar, M.R., Lakshman, K. (2005): In Vitro Models For Antioxidant Activitz Evaluation: A Review: *Pharmaceutical Reviews*, 3(4).
- Siddhuraju P et Becker K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of Drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J. Agric. Food Chem*, 51(8): 2144- 2155.
- Slauch, J. M. (2011). How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Molecular microbiology*, 80(3), 580-583.
- Son, Y., Cheong, Y. K., Kim, N. H., Chung, H. T., Kang, D. G., & Pae, H. O. (2011). Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species: how can ROS activate MAPK pathways?. *Journal of signal transduction*, 1-6.
- Ssenyange, C. W., Namulindwa, A., Oyik, B., & Ssebuliba, J. (2015). Plants used to manage type II diabetes mellitus in selected districts of central Uganda. *African health sciences*, 15(2), 496-502.
- Stowchiva, S. (1988). Guide Manuel de pharmacologie et toxicologie. *Sofia: Bulgaria Editeur: Medicinal et phys-cultura*, 15.
- Strehl, C., Spies, C. M., & Buttgerit, F. (2011). Pharmacodynamics of glucocorticoids. *Clinical and Experimental Rheumatology-Incl Supplements*, 29(5), 13-18.
- Stumvoll, M., Goldstein, B. J., & Van Haeften, T. W. (2005). Type 2 diabetes : principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*, 365(9467), 1333-1346.
- Su, S., Cheng, X., & Wink, M. (2015). Natural lignans from *Arctium lappa* modulate P-glycoprotein efflux function in multidrug resistant cancer cells. *Phytomedicine*, 22(2), 301-307.
- Su, X., Duan, J., Jiang, Y., Shi, J., & Kakuda, Y. (2006). Effects of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(4), 348-353.
- Suchy, M.; Herout, V.; Sorm, F. (1956). Terpenes. LXXVI. The Nature of Arctiopicrin, an Unsaturated Lactone from *Arctium Minus*. *Chemicke Listy pro Vedu a Prumysl*, 50, 1827-1833.
- Tang, Y., Lou, Z., Rahman, M. R. T., Al-Hajj, N. Q., & Wang, H. (2014). Chemical composition and anti-biofilm activity of burdock (*Arctium lappa* L Asteraceae) leaf fractions against *Staphylococcus aureus*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(11), 1933-1939.
- Tardío, J., Pascual, H., & Morales, R. (2005). Wild food plants traditionally used in the province of Madrid, Central Spain. *Economic Botany*, 59(2), 122-136.
- Taylor, L. P., & Grotewold, E. (2005). Flavonoids as developmental regulators. *Current opinion in plant biology*, 8(3), 317-323.

- Thomas, O. P. (2009). Métabolisme secondaire et Biosynthèse.
- Thomson, R. M. (1947). The effects of house spraying with pyrethrum and with DDT on *Anopheles gambiae* and *A. melas* in West Africa. *Bulletin of entomological research*, 38(3), 449-464.
- Tian, X., Sui, S., Huang, J., Bai, J. P., Ren, T. S., & Zhao, Q. C. (2014). Neuroprotective effects of *Arctium lappa* L. roots against glutamate-induced oxidative stress by inhibiting phosphorylation of p38, JNK and ERK 1/2 MAPKs in PC12 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38(1), 189-198.
- Topçu G, Ay A, Bilici A, Sarikürkcü C, Öztürk M., and Ulubelen A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistaciaterebinthus*. *Food Chemistry* 103: 816–822.
- Toro, J., & Rodrigo, R. (2009). Oxidative stress: Basic overview. *Oxidative Stress and Antioxidants-Their Role in Human Disease*. New York: Nova Biomedical Books, 1-24.
- Tousch, D., Bidel, L. P. R., Cazals, G., Ferrare, K., Leroy, J., Faucanie, M., et al. (2014). Chemical analysis and antihyperglycemic activity of an original extract from burdock root (*Arctium lappa*). *J. Agric. Food Chem.* 62, 7738–7745.
- Tréchet, P., & Jouzeau, J. Y. (2014). Bases chimiques et pharmacologiques des AINS. *Revue Française d'Allergologie*, 54(3), 212-217.
- Tzima K, Brunton NP, & Rai DK. (2018). Qualitative and quantitative analysis of polyphenols in Lamiaceae plants. A review. *Plants*, 7(2), 25.
- Vaubaudolle M, (2007). Toxicologie science mathématique physique et chimique, 3eme Ed, *Walters Kluwers SA*, Paris.
- Vergine, M., Nicoli, F., Sabella, E., Aprile, A., De Bellis, L., & Luvisi, A. (2020). Secondary Metabolites in *Xylella fastidiosa*–Plant Interaction. *Pathogens*, 9(9), 675.
- Viala A & Botta A, (2005). Toxicologie, 2eme Ed, *Lavoisier*, Parie : 3-10.
- Voytko, M. L., Olton, D. S., Richardson, R. T., Gorman, L. K., Tobin, J. R., & Price, D. L. (1994). Basal forebrain lesions in monkeys disrupt attention but not learning and memory [published erratum appears in *J Neurosci* 1995 Mar; 15 (3): following table of contents]. *Journal of Neuroscience*, 14(1), 167-186.
- Wang GX, Zhou Z, Jiang DX, Han J, Wang JF, Zhao LW, Li J. (2010). In vivo anthelmintic activity of five alkaloids from *Macleaya microcarpa* (Maxim) Fedde against *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus*. *Veterinary parasitology*, 171(3) : 305-313.
- Wang, D.; Bădăraș, A. S.; Swamy, M. K.; Shaw, S.; Maggi, F.; da Silva, L. E.; López, V.; Yeung, A. W. K.; Mocan, A.; Atanasov, A. G (2019). *Arctium* Species Secondary Metabolites Chemodiversity and Bioactivities. *Front. Plant Sci.*, 10, 834.

- Wang, S. Y., Camp, M. J., & Ehlenfeldt, M. K. (2012). Antioxidant capacity and α -glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium* spp.) cultivars. *Food Chemistry*, 132(4), 1759-1768.
- Wang, T. Y., Li, Q., & Bi, K. S. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 13(1), 12-23.
- Weil, C. S. (1952). Tables for convenient calculation of median-effective dose (LD 50 or ED 50) and instructions in their use. *Biometrics*, 8(3), 249-263.
- WHO (2016). Global report on diabetes, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Williams LAD, O'connar A, latore L, Dennis O, Ringer S. (2008). Anti-inflammatory. *Westindian Med j* ; 57:327-331.
- Wollenwebera E, Riverab D, Roitmanc JN. (1986). Verlag der Zeitschrift für Naturforschung Tübingen • <http://www.znaturforsch.com> •D.
- Yamada, Y., Kuzuyama, T., Komatsu, M., Shin-Ya, K., Omura, S., Cane, D. E., & Ikeda, H. (2015). Terpene synthases are widely distributed in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(3), 857-862.
- Yan, M. H., Wang, X., & Zhu, X. (2013). Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 90-101.
- Yang, H. J., Jang, M. H., & Kang, Y. J. (2019). Anti-inflammatory effect of *Arctium minus* on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. In *Proceedings of the Plant Resources Society of Korea Conference* (pp. 115-115). The Plant Resources Society of Korea.
- Yang, X. W., Huang, M. Z., Jin, Y. S., Sun, L. N., Song, Y., & Chen, H. S. (2012). Phenolics from *Bidens bipinnata* and their amylase inhibitory properties. *Fitoterapia*, 83(7), 1169-1175.
- Ye, Z. W., Zhang, J., Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2015). Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850(8), 1607-1621.
- Yoon, J. H., & Baek, S. J. (2005). Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei medical journal*, 46(5), 585-596.
- Zeinali, M., Rezaee, S. A., & Hosseinzadeh, H. (2017). An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92, 998-1009.
- Zhang H. and Tsao R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and antiinflammatory effects. *Curr Opin Food Sci* 8, 33-42.
- Zhao, Y., & Zhao, B. (2013). Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.

Zhao, Y., and Zhou, X. (2015). “Arctium lappa L. (Niubangzi, Great Burdock),” in *Dietary Chinese Herbs: Chemistry, Pharmacology and Clinical Evidence* 301–305.

ANNEXE

RESEARCH ARTICLE

Contribution to Pharmacological Valorisation of Algerian *Arctium minus* (Hill) Bernh. Subsp. *Atlanticum* (Pomel) Maire; Antioxidant and Acetylcholinesterase Inhibitory Activities

Sofiane Guettaf^{1,*}, Abdelmoumen Benmerzoug¹, Bensouici Chawki², Yavuz Selim Çakmak³, Saliha Dahamna⁴, Abderrahmane Baghiani⁵ and Daoud Harzallah¹

¹Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Nature and Life Sciences, Ferhat Abbas University, Sétif, Algeria;

²Biotechnology Research Center (CRBT), Ali Mendjli New Town UV 03, BP E73, Constantine, Algeria; ³Department of Biotechnology and Molecular Biology, Faculty of Science and Letters, Aksaray University, 68100 Aksaray, Turkey;

⁴Laboratory of Phytotherapy Applied to Chronic Diseases, Faculty of Nature and Life Sciences, Ferhat Abbas University, Sétif, Algeria; ⁵Laboratory of Applied Biochemistry, Faculty of Nature and Life Sciences, Ferhat Abbas University, Sétif, Algeria

Abstract: Background: The traditional pharmacopoeia is full of potential resources for molecules with therapeutic effects involving the inhibition of enzymes linked to some diseases.

Objective: This work aimed to test *in vitro* neuroprotective activity against Alzheimer's disease (AD) combined with the antioxidant effect of root extracts obtained by water, water/methanol, and ethyl acetate of the endemic *Arctium minus* subsp. *Atlanticum*, a native of Algeria.

Methods: The different extracts of the root of the studied plant were obtained by decoction or maceration. The inhibitory effect of acetyl/butyrylcholinesterase (AChE/BChE) was achieved by a colorimetric method. Similarly, the antioxidant activity was measured based on several mechanisms: 1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) and galvinoxyl (GOR) radicals free scavenging assays, β -carotene bleaching inhibition activity, and cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC).

Results: In the various tests carried out, the ethyl acetate extract (EAE) possessed the most powerful antioxidant and anticholinesterase activities compared to the other samples. The IC₅₀ and A_{0.5} values of DPPH, GOR, β -carotene, CUPRAC, anti-AChE, and anti-BChE assays were 69.45±5.49, 28.87±0.18, 121.58±16.76, 37.41±1.59, 265±21, and 240±6.3 μ g / mL, respectively. Likewise, a correlation could be deduced between the type of extract and the potent antioxidant/anticholinesterase potential.

Conclusion: This work examines for the first time the anticholinesterase potential combined with the antioxidant effect of Algerian *Arctium minus* subsp. *atlanticum*. This association between the two effects could be effective in the fight against AD, and therefore, the use of this natural resource may be possible in combating this aspect of neurodegeneration.

Keywords: Alzheimer's disease, anticholinesterase, antioxidant, *Arctium minus*, subsp. *atlanticum*, enzyme inhibition, pharmacological valorisation, acetylcholinesterase inhibitory activities.

1. INTRODUCTION

In recent decades, neurodegeneration has emerged as a public health problem that is exponentially attracting the attention of researchers around the world. In fact, disorders causing neurodegeneration, such as Alzheimer's disease (AD), affect nearly 35 million people worldwide. This number is estimated to increase every twenty years, reaching more than one hundred million by 2050 [1]. The pathogenesis of AD

involves neuronal degeneration progressively and often leads to death [2]. The pathological tissues of the central encephalic nervous system, mainly the cerebral cortex and hippocampus, are subjected to two types of lesions: senile plaques (or amyloid deposits) formed mainly of an amyloid peptide called "A β " and neurofibrillary degeneration reflected by the presence of protein "Tau" [3]. These disorders involve a decrease in the number of functional synapses and the growth of neuritis, in particular relating to that of the neurotransmitter, such as acetylcholine [2]. Clinically, these tissue disorders appear to be related to cognitive, communication, and memory impairments [4]. By looking for causal links, the brain cells of Alzheimer's victims are subjected, on the one

*Address correspondence to this author at Faculty of Nature and Life Sciences, Ferhat Abbas University, P.O. Box: 19137, El Bez Campus, Sétif, Algeria.; Tel: (213) 036-62-01-40; E-mail: sofiane.guettaf@univ-setif.dz

hand, to significant intensity of oxidative stress and, on the other hand, to an unusual reduction in the levels of acetylcholine neurotransmitter, thus playing a major role in neuronal damage [5]. Therefore, tackling the direct causes of the decrease in normal levels of acetylcholine may be an appropriate approach to dealing with AD. Indeed, the exaggerated involvement of acetylcholinesterase (AChE) seems to be the direct factor responsible for the hydrolysis of acetylcholine [6]. Consequently, a strategy based on an efficient and safe inhibition of AChE may prove successful [7], especially because conventional anti-AChE, such as donepezil, tacrine, rivastigmine, and galanthamine, is often linked to serious collateral damage [8]. As a result, the need for an effective, cheap alternative, and above all, with minor or no side effects, is on the agenda for scientists in the field [9]. Moreover, medicinal plants with antioxidant power are promising research resources for biomolecules, potentially active against AChE [10]. *Arctium* species are known for their biological virtues, such as anti-inflammatory, anticancer, anti-diabetic, gastroprotective, hepatoprotective, antibacterial, antimicrobial, antiviral, anti-allergic, and in particular, antioxidant [11]. The traditional pharmacopoeia has reported the frequent use of the species *Arctium lappa*, commonly called "greater burdock," and to a lesser extent, *Arctium minus*, known as "lesser burdock" [12]. Specifically, the antioxidant potential associated with the anti-Alzheimer effect of *Arctium lappa* has been well documented by several authors, including Mekinić *et al.* [13], Lee *et al.* [14], Kwon *et al.* [15], and Tian *et al.* [16]; however, few experimental studies have been carried out on *Minus* species to date on the aforementioned effect [17]. In contrast, and to our knowledge, no research focusing on the above effects has been conducted on the *Atlanticum* subspecies of *Arctium minus*; a species endemic to *Algeria* and *Morocco* [18], locally referred to as "*Arkatioun*". To explore the potential medicinal uses of this variety, we describe the AChE and BuChE inhibitory and antioxidant activities of the plant collected from *Algeria*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Drugs and Chemicals

The stable free radical 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH[•]), galvinoxyl radical (Galv-O[•]), β -carotene, polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween-40), chloroform, hydrogen peroxide, ethanol, linoleic acid, copper (II) chloride dihydrate, neocuproine, ammonium acetate, human acetylcholinesterase enzyme (AChE), human butyrylcholinesterase enzyme (BChE), 5,5-dinitro-bis-nitrobenzoic acid (DNTB), acetylthiocholine iodide (ACI), and butyrylthiocholine iodide (BuCI) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and Honeywell International Inc (Minneapolis, USA).

α -tocopherol, butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), and galantamine were used as positive standards. Authentic standards were purchased from Sigma-Aldrich, Fluka, and Merck. All other used chemicals were of analytical grade.

2.2. Plant Material

The roots of *Arctium minus* subsp. *atlanticum* were collected during the flowering season from Setif, eastern Algeria, located at a longitude of 5°40' East and latitude of 36°34' North. Taxonomic identification of the plant sample was carried out by the Laboratory of Development of Natural Biological Resources (LVRBN) at the University of Sétif. Voucher specimens were stored in the herbarium at the Faculty of Biology at the same university.

2.3. Preparation of Extracts

In order to obtain different extracts of the studied plant, the roots of the *Arctium minus* were kept away from moisture and sunlight for 2 months after being cleaned meticulously. After being well dried, the roots were grounded to obtain a fine powder that will be subsequently utilized.

2.3.1. Aqueous Extract

The decoction approach described by Ferreira *et al.* [19] was adopted with slight modifications. Typically, 50 g of the roots powder was hydrated by 500 mL of distilled water. The mixture was heated onto a hot plate by stirring at 35 °C for 20 minutes. Then, the water extract was filtered using Whatman Grade 3 filter paper and centrifuged at 4000 rpm for 20 min. Finally, the dehydration of the supernatant was done by lyophilization (Christ Gamma 2-16 LSC Plus) until a brunette powder was formed, which was kept away from light at 4 °C. At the time of the experiment, the powder was dissolved in distilled water at a rate of 4 g / 10 mL and used as the stock solution.

2.3.2. Organic Extracts

The powder sample has been subjected to sequential extraction by maceration with 50 mL of increasing polarity solvents for 72 hours using ethyl acetate and hydromethanolic solvent (80:20 V/V). The obtained fractions were evaporated by a rotary evaporator at 35 °C. The dried residue was dissolved in 10 ml of methanol and stored at 4 °C until analysis [20].

2.4. Antioxidant Activities

2.4.1. DPPH Radical Scavenging Assay

The free radical scavenging activity of different samples was evaluated by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]). A colorimetric technique developed by Blois was used [21]. In the presence of the evaluated sample, a characteristic wavelength was used to accurately estimate the rate of bleaching of the stable free radical DPPH[•]. In its reactive form, this latter has an important absorption capacity at 517nm. On the other hand, during the reduction by an antioxidant or a radical species, the absorption capacity declined noticeably. Briefly, in a dark place, a one-tenth mM solution of DPPH[•] was prepared in ethanol. A total of 160 μ L of the prepared DPPH[•] solution was placed in each well of the microplate, then a volume of 40 μ L of each extract at different concentrations (200-3,125 μ g / mL) was added. After 30 min of

incubation at room temperature, the absorbance was measured at 570 nm. High free radical scavenging activity implies a decrease in the absorbency of the reaction mixture. A calibration curve was used to evaluate the concentration of DPPH• in the reaction medium. The following equation quantifies the scavenging power of the DPPH• radical;

$$\text{DPPH}^{\bullet} \text{ scavenging effect (\%)} = (A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}} / A_{\text{Control}}) \times 100.$$

Where A_{Control} is the absorbance of the control reaction and A_{Sample} is the absorbance in the presence of different extracts of *Arctium minus* roots or standards [22]. The inhibitory concentration of 50% of the DPPH activity (IC_{50}) of different samples was thereafter calculated from the equation determining the percentage inhibition versus concentration of inhibitor by plotting x-y and fitting the data with a straight line (linear regression). IC_{50} value was then estimated using the fitted line, i.e., $Y = a * X + b$, $IC_{50} = (0.5 - b)/a$. It was expressed as $\mu\text{g} / \text{mL}$ and compared with that of BHA, BHT, and α tocopherol [23].

2.4.2. Galvinoxyl Free Radical (GOR) Scavenging Assay

The efficiency of the hydrogen donating capacity of the potential phenols present in the extracts was measured using the stable free radical galvinoxyl (Galv-O•). Despite the demonstrated potential of this molecule to accept an electron or hydrogen radical to gain stability, galvinoxyl is a molecule considered stable. Therefore, it can be reduced irreversibly. The presence of an odd electron makes galvinoxyl a molecule with high absorption affinity at 428 nm; under normal conditions, the galvinoxyl solution appears yellowish. However, the absorption tends to decrease or even disappear as the electron is paired, so the resulting discoloration is relatively proportional to the number of electrons absorbed. Overall, the dynamics of antioxidant activity and hydrogen donor activity can be measured by taking advantage of the color change of galvinoxyl in the presence of an antioxidant [24]. When antioxidants interact with the stable Galv-O• radical, the scavenging reaction produced obeys the following formula;



Where A-OH is a hydrogen donor compound, such as polyphenols and A-O•, the resulting unstable radicals [25]. In short, 40 μL of different concentrations (200-3.125 $\mu\text{g} / \text{mL}$) of samples was added to 160 μL of 0.1 mM galvinoxyl solution in each well of the microplate. After incubation in the dark at room temperature for 2 hours, the absorbance was measured at 428 nm. A negative control containing 40 μL of methanol instead of samples was used [26]. The following equation is used to quantify the scavenging power of the GOR radical;

GOR scavenging effect (%) = $(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}} / A_{\text{Control}}) \times 100$. Where A_{Control} is the absorbance of the control reaction and A_{Sample} is the absorbance in the presence of different extracts of the *Arctium minus* roots or standards. The inhibitory concentration of 50% of the GOR activity (IC_{50}) of different samples was thereafter calculated and compared with that of BHA and BHT.

2.4.3. β -carotene Bleaching Inhibition Activity

The β -carotene bleach test was used to predict the potential of different extracts of *Arctium minus* roots, which interfered with the oxidation of linoleic acid in the presence of oxygen peroxide [27]. In this logic, chloroform solutions (1 mL) of 0.5 mg of β -carotene, 5 μL of linoleic acid, and 200 mg of Tween 40 were mixed, and the whole was dried using a rotator evaporator. Then, 100 mL of hydrogen peroxide was added to the mixture with vigorous stirring. Immediately, 160 μL of the residual emulsion was added to 40 μL of samples (at different concentrations) in each well of the microplate. The first measurement was done at 470 nm. Afterward, the mixtures were heated at 50 °C for 2 h, and then the absorbances were re-measured at the same wavelength. Eventually, the percent of whitening inhibition can be quantified with the following formula:

$$\text{AA (\%)} = [1 - (A_{\text{Ht}} - A_{\text{Ht}}) / (A_{\text{C0}} - A_{\text{Ct}})] \times 100$$

AA (%): Antioxidant activity;

A_{H0} : absorbance value of β -carotene in the presence of the extract measured at $t = 0$;

A_{C0} : absorbance value of β -carotene in the presence of negative control measured at $t = 0$;

A_{Ht} : absorbance value of β -carotene in the presence of the extract measured at $t = 120$ min;

A_{Ct} : absorbance value of β -carotene in the presence of negative control measured at $t = 120$ min [28]. The inhibitory concentration of 50% of the β -carotene bleaching (IC_{50}) of different samples was thereafter calculated and compared with that of BHA and BHT.

2.4.4. Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC)

To evaluate the reducing power of copper ions of different extracts of *Arctium minus* roots, the CUPRAC test was performed. This assay is based on the reduction of Cu (II) to Cu (I) by the antioxidants present in the samples. Cu (I) forms a complex with neocuproine (2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline). The CUPRAC reagent is relatively preferable because it is much more stable than other radicals, such as DPPH. Moreover, the redox reaction giving rise to a colored chelate of Cu (I) -Nc is relatively insensitive to several parameters, such as air, sunlight, humidity, and pH, making this test a first-line choice [29]. Briefly, in each well of the microplate, 40 μL of extracts with different concentrations, 50 μL of CuCl_2 (10 mM), 50 μL of neocuproine (7.5 mM), and 60 μL of NH_4Ac buffer (1 M, pH 7.0) were added (total volume of 200 μL) and well mixed. The absorbance was measured at 450 nm after 30-60 min [30]. Following the same steps and without the test sample, BHA and BHT at various concentrations were used as standards. The concentration of extract providing 0.5 absorbance ($A_{0.5}$) was determined from the graph of absorbance versus extract concentration.

2.5. Acetylcholinesterase (AChE) and Butyrylcholinesterase (BChE) Inhibitory Activities

The acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) inhibitory activities of different extracts of *Arctium minus* roots were determined using a modified Ellman method [31]. A colorimetric method based on the quantification of the change in absorbance per minute ($\Delta A / \text{min}$) due to the formation of yellow anion 5-thio-2-nitrobenzoate was used, reflecting the rate of hydrolysis of acetylthiocholine iodide (ACI) or butyrylthiocholine iodide (BuCI) [32]. The plant extract was prepared in water or methanol. On the other hand, the enzyme was prepared in sodium phosphate buffer (pH 8.0). Galantamine was used as a reference (positive control). Typically, 150 μL of sodium phosphate buffer (pH 8.0) was added to 10 μL of extract solution and 20 μL of AChE or BChE solution then the mixture was incubated at 25 °C. After 15 min, 10 μL of 5,5-dinitro-bis-nitrobenzoic acid (DTNB) and 10 μL of ACI or BuCI were added. Immediately, a first reading was recorded at 412 nm, followed by a second one 15 min later. The assay reactions with plant extracts were all performed in triplicate at concentrations of 100 and 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$. A buffer solution was used as a negative control. The percentage of inhibition of AChE / BChE by various extracts was calculated relatively to inhibition by galantamine. The concentration of the extract producing 50% inhibition (IC_{50}) was thereafter calculated from the equation determining the percentage inhibition versus concentration of inhibitor [32].

The percentage of inhibition (I%) of plant extracts was obtained using the formula:

$$I (\%) = [(V_o - V_i) / V_o] \times 100.$$

Where I (%) = Percentage of inhibition.

V_i = enzymatic activity in the presence of the extract.

V_o = enzymatic activity in the absence of the extract.

2.6. Statistical Analysis

All experiments were performed in triplicate, and data were expressed as mean value \pm SD ($n = 3$) of at least three independent experiments. Statistical analysis of parametric data for IC_{50} was performed using GraphPad Prism 6 software by one-way ANOVA followed by Turkey's post hoc test for multiple comparisons. The differences with $P < 0.05$ were considered statistically significant.

3. RESULTS

In order to reach the maximum extraction yield of bioactive compounds from *Arctium minus* roots, decoction and maceration were adopted as methods of extraction. Likewise, three types of organic solvents with different polarities were used, scaling from the most to the least polar, namely: water, water/methanol, and ethyl acetate.

3.1. Antioxidant Activities

To evaluate the potential of reducing power and antioxidant activity of *Arctium minus* roots, several approaches with different reaction principles were adopted, including the DPPH radical scavenging assay, galvinoxyl free radical scavenging assay, β -carotene bleaching inhibition activity, and cupric ion reducing antioxidant capacity. The percentage inhibition or absorbance of the various extracts and standards are shown in Table 1, while the IC_{50} and $A_{0.5}$ values are reported in Table 2.

3.1.1. DPPH Radical Scavenging Assay

The obtained results revealed almost similar scavenging activity with IC_{50} values that oscillated between 55.49 ± 1.06 and 69.45 ± 5.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Table 2). However, it was noticed that at the concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the ethyl acetate extract (EAE) exhibited the strongest anti-free radical potential, followed by that of the hydromethanolic extract (HME), then the aqueous extract (AqE) (89.20 ± 0.81 , 86.03 ± 0.58 , and $84.53 \pm 1.87\%$, respectively) (Table 2).

3.1.2. Galvinoxyl Free Radical (GOR) Scavenging Assay

As shown in Table 2, the recorded results concerning the antioxidant power exerted by the studied samples against galvinoxyl showed roughly similar values of IC_{50} among different extracts (30.25 ± 1.73 , 37.04 ± 3.20 , and 28.87 ± 0.18 $\mu\text{g}/\text{mL}$), corresponding to AqE, HME, and EAE, respectively. However, relatively, the EAE exhibited the highest anti-free radical power at the concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($54.45 \pm 3.10\%$). Whereas, AqE and HME exhibited a percentage of inhibition equivalent of 33.70 ± 3.30 and $29.57 \pm 3.50\%$, respectively (Table 1).

3.1.3. β -carotene Bleaching Inhibition Activity

The ethyl acetate extract showed a strong inhibitory lipid peroxidation activity compared to other extracts. Moreover, at a concentration of 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$, EAE exhibited an inhibition value equal to $55.25 \pm 5.21\%$, corresponding to an IC_{50} of 121.58 ± 16.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tables 1 and 2).

3.1.4. Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC)

As for the DPPH, GOR, and β -carotene assays, the reducing power of EAE appeared to be the most potent compared to the other extracts. Indeed, at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the absorbance intensity of EAE was 1.16 ± 0.07 . While AqE and HME showed an absorbance intensity of 0.52 ± 0.01 and 1.08 ± 0.01 , respectively (Table 1). Likewise, the $A_{0.5}$ of the EAE corresponded to a concentration of 37.41 ± 1.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$. This value implied a considerable reducing power compared to AqE and HME, which presented $A_{0.5}$ values of 95.26 ± 0.69 and 39.51 ± 2.74 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively (Table 2).

Table 1. Antioxidant activity (Percentage Inhibition) and reducing power (Absorbance) of different extracts of *Arctium minus*.

Sample	DPPH Assay (% Inhibition)							
	3.125 µg/mL	6.25 µg/mL	12.5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	400 µg/mL
Aqueous extract ^a	na	na	1,84±1,17	4,74±1,17	19,46±1,97	49,89±0,92	84,53±1,87	nt
Hydromethanolic extract ^a	1.24±0.11	7.25±0.35	14,05±2,58	22,49±2,03	43,69±2,10	81,11±1,03	86,03±0,58	nt
Ethyl acetate extract ^a	na	3.98±0.25	8,05±1,66	15,60±2,68	35,65±0,29	69,38±4,17	89,20±0,81	90,05±0,67
BHA ^b	28,95±1,16	54,33±1,59	75,55± 0,48	78,89± 0,26	80,73±0,10	82,18±0,10	86,13±0,17	88,36±0,19
BHT ^b	0,16±0,00	0,22±0,01	48,09± 0,76	71,63± 2,06	87,73±0,89	93,00±0,31	93,97±0,08	94,38±0,41
α-Tocopherol ^b	nt	nt	36,21±1,82	80,53±1,51	88,23±0,12	88,38±0,19	88,45±0,22	88,99±0,23
GOR Scavenging Activity (%Inhibition)								
Aqueous extract ^a	nt	6.25±1.23	12,93±1,26	33,70±3,30	69,34±1,42	nt	nt	nt
Hydromethanolic extract ^a	nt	5.21±0.23	12,83±3,38	29,57±3,50	60,83±2,57	nt	nt	nt
Ethyl acetate extract ^a	nt	19.35±3.21	31,04±1,31	54,45±3,10	65,11±1,25	nt	nt	nt
BHT ^b	48,23±0.77	60,29±0.69	67,89±0,26	69,02±0.50	69,49±0,55	70,13±0,74	nt	nt
BHA ^b	38.15±0.88	53.16±0.27	64.02±1,26	69,19±0.51	69.32±0.65	69.60±0,10	nt	nt
β-carotene Linoleic Acid Bleaching Assay (%Inhibition)								
Aqueous extract ^a	na	5.65±0.12	11,64±1,67	22,47±1,30	26,64±1,29	34,12±1,76	42,24±0,66	nt
Hydromethanolic extract ^a	1.66±	8.78±0.15	13,80±4,86	17,45±2,72	18,87±4,40	24,71±4,70	31,92±6,37	37,85±7,04
Ethyl acetate extract ^a	na	4.21±0.99	11,97±0,62	16,50±0,65	23,45±3,15	40.25±1.25	55.25±5.21	nt
BHT ^b	80.14±0.84	85.09±1.04	87.29±0.10	90.70±0.36	92.65±0.30	92.68±0.46	93.49±0.07	93.88±0.10
BHA ^b	83.23±1.14	91.11±0.68	92.48±0.44	94.52±0.33	95.34±0.55	96.56±0.19	96.64±2.22	96.85±0.32
CUPRAC Antioxidant Capacity (Absorbance)								
Aqueous extract ^a	nt	nt	0,16±0,00	0,22±0,01	0,34±0,01	0,52±0,01	0,86±0,05	1,52±0,02
Hydromethanolic extract ^a	nt	nt	0,22±0,01	0,35±0,02	0,62±0,04	1,08±0,01	nt	nt
Ethyl acetate extract ^a	nt	nt	0,20±0,01	0,36±0,02	0,64±0,02	1,16±0,07	1,95±0,17	3,55±0,22
BHA ^b	0.46±0.00	0.78±0.01	1,12±0,05	1,95±0,31	3,14±0,46	3,58±0,42	3,35±0,20	3,77±0,19
BHT ^b	0.19±0.01	0.33±0.04	1.41±0.03	2.22±0.05	2.42±0.02	2.50±0.01	2.56±0.05	2.86±0.07

^aValues expressed are means ± S.D. of three parallel measurements; ^b Reference compounds; BHA=Butylated hydroxyanisole ; BHT=Butylated hydroxytoluene ; nt = not tested; na = not active.

Table 2. The IC₅₀ and A_{0.5} values for DPPH, GOR, β-carotene and CUPRAC assays of different extracts of *Arctium Minus* roots.

Sample	Radical Scavenging Activity IC ₅₀ (µg/mL)			Reducing Power A _{0.5} (µg/mL)
	DPPH	GOR	β-carotene	CUPRAC
Aqueous extract	55,49±1,06 ^e	30.25±1.73 ^e	<400	95,26±0,69 ^e
Hydromethanolic extract	59,38±2,51 ^e	37.04±3.20 ^e	<400	39,51±2,74 ^e
Ethyl acetate extract	69,45±5,49 ^e	28,87± 0,18 ^e	121,58±16,76 ^b	37,41±1,59 ^e
BHA	6.14±0.41 ^a	5.38 ±0,06 ^a	1.05±0.03 ^a	5,35±0,71 ^a
BHT	12.99±0.41 ^a	3.32±0,18 ^a	0.91±0.01 ^a	8.97±3.94 ^a
α-Tocopherol	13.02±5,17 ^a	nt	nt	nt

Values expressed are means ± S.D. of three parallel measurements; values with different superscript letters (a-e) in the same column are significantly ($P < 0.05$) different; BHA=Butylated hydroxyanisole ; BHT=Butylated hydroxytoluene ; nt = not tested.

Table 3. The percentage enzyme inhibition and IC₅₀ values for AChE and BuChE of different extracts of *Arctium Minus* roots.

Sample	AChE			BChE		
	% Inhibition at 100 µg/mL	% Inhibition at 200 µg/mL	IC ₅₀ (µg/mL)	% Inhibition at 100 µg/mL	% Inhibition at 200 µg/mL	IC ₅₀ (µg/mL)
Aqueous extract	na	na	nd	na	na	nd
Hydromethanolic extract	16.99±0.88	27.23±1.56	<200	0.56±0.58	5.58±0.59	<200
Ethyl acetate extract	27.47±1.87	41.39±1.24	<200	29.18 ±0.86	40.20 ±1.12	<200
Galantamine	91.80 ± 0.20	94.77 ± 0.34	6.27±1.2	73.57± 0.77	78.95± 0.58	34.75±1.99

Values expressed are means ± S.D. of three parallel measurements; na = not active; nd = not determined.

3.2. Acetylcholinesterase (AChE) and Butyrylcholinesterase (BChE) Inhibitory Activity

The neuroprotective potential of *Arctium minus* roots extracts has been studied on two important enzymes, such as acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). Obtained results are expressed as a percentage of enzymatic inhibition and as an inhibitory concentration of 50% of the enzymes studied (Table 3). Generally, the best inhibitory potential was observed with EAE, which exhibited inhibition values of 41,39±1,24 and 40,20±1,12 % against AChE and BuChE, respectively, at a concentration of 200 µg/mL (Table 3). On the other hand, AqE did not exhibit any anti-enzymatic effect (Table 3).

4. DISCUSSION

Following the procedures in the literature, we have opted for crude extracts obtained by water or a water/alcohol mixture. In addition, ethyl acetate as a solvent was chosen for a third extraction. In fact, our choice was guided by the potential contribution of hydrophilic bioactive molecules to antioxidant power [33], the high content of methanolic extracts in flavonols, and the considerable antioxidant activity of extracts with a polarity equal to that of ethyl acetate [34]. Fundamentally, it can be concluded that up to the time of this writing, there is very little information, if at all, in the literature references regarding the antioxidant or enzymatic activities of *Arctium minus* (Hill) Bernh. subsp. *atlanticum*. In fact, almost the majority of research work on the biological activities of the genus *Arctium* has been directed towards the study of the *Arctium lappa* (*A. lappa*) species. Consequently (taking into account the genetic relationship between the species *A. lappa* and *A. minus*), for the benefit of the *Lappa* species, the *Minus* species has been very little studied and even less the *Atlaticum* subspecies. Thus, we compared our results mainly with those related to the species *A. lappa*.

4.1. Antioxidant Activities

Reactive oxygen species have been known for their pathogenesis implications. However, endogenous mechanisms intervene timidly to overcome this threat. Thus, an exogenous antioxidant supply, such as medicinal plants, would have an improving effect on the management of oxidative stress [35]. Determination of biomolecules with antioxidant

power will contribute to the development of effective drugs against pathologies involving oxidative stress. Therefore, in the present study, we investigated this aspect by several experimental methods [36]. The results of the antioxidant activity, expressed in terms of inhibition percentage, showed dose-dependent antioxidant potential exerted by all samples.

For DPPH radical-scavenging activity, the AqE has shown to have the lowest IC₅₀ value (55.49±1.03 µg/mL), implying the highest value in terms of antioxidant activity. On the other hand, at a concentration of 100 µg / mL, the HME exhibited the best percentage inhibition (81,11±0.81%) compared to those of AqE and EAE (49.89±0.92, and 69.38±4.17%, respectively) (Tables 1 and 2). These results, in part, align with those of the literature concerning the scavenging activity potential of the free radical DPPH exerted by the *Minus* species [37]. Indeed, the study carried out by Kenny *et al.* [38] described the antioxidant activity of water and alcohol (ethanol) extracts of the wholeness of *A. minus*, which corroborated our results. The ethanol extract had the highest Trolox equivalent (TE) values for the DPPH assay (262.775 ± 2.196 mg TE/g extract), while the AqE of *A. minus* showed the lowest TE values (DPPH; 3.063 ± 0.238 mg TE/g extract), implying greater antioxidant activity compared to their water extract counterparts. Another study by Predes *et al.* [39] concluded, which was in accordance with our work, that the HME from *A. lappa* roots had the highest scavenger capacity for DPPH compared to other fractions (EC₅₀=4,79±0,15µg/mL).

Additionally, Erdemoglu *et al.* [36] reported a value of "BHT equivalent" (IC₅₀ BHT / IC₅₀ sample) of the leaves close to that obtained in our study involving the *minus* species with the IC₅₀ of BHT and AqE obtained were 12,99±0.41 and 55,49±1,03 µg/mL against 0.51 ± 0.01 and 5.33 ± 0.62 µg/mL, respectively. However, few authors [36], including Ahmet Başaran *et al.* [37], have shown that the most pronounced antioxidant activity could be attributed to AqE of *A. minus* and not to the HME as found in our case. This could be explained by the possible degradation of heat-labile molecules during our extraction process (40°C) [39]. Indeed, Erdemoglu *et al.* [36] carried out the extraction without subjecting the preparation to boiling.

In order to assess the relationship between the free radical type and the relative antioxidant activity, we introduced galvinoxyl as a stable free radical. The results obtained

showed that at a concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the scavenging power of ethyl acetate extract and BHT were almost equal. As a matter of fact, the inhibition percentages of *A. minus* EAE and BHT were $65,11 \pm 1,25$ and $69,49 \pm 0,55\%$, respectively. Correspondingly, the IC_{50} values were $28,87 \pm 0,18$ and $3,32 \pm 0,18 \mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Obviously, between DPPH and GOR, the correlation was not satisfactory as to the order of the samples in terms of potencies of antioxidant activity. This may be due to several factors, such as the different types of radicals that have been adopted or the difference in radical scavenging efficiency, which is determined by the reaction kinetics of a specific well determined radical (taking into account the peculiarity of each biological system where a wide variety of hydrogen donor compounds exist) [40].

The antioxidant activity of different *A. minus* extracts in the β carotene linoleic acid system, summarized in Tables 1 and 2, shows the lowest IC_{50} value for EAE ($121,58 \pm 16,76 \mu\text{g}/\text{mL}$), indicating that the bleaching inhibitory activity of β carotene of EAE is the highest in comparison to other extracts. Compared to the finding of other researchers, Dhuh [41] reported that both aqueous and methanolic extracts of greater burdock (*A. lappa*) showed remarkable inhibitory values of the peroxidation of linoleic acid (Aqueous extract; $96.3 \pm 1.63\%$ and methanolic extract; $94.4 \pm 1.52\%$). In another study, the ethanolic extract of Spanish *A. minus* demonstrated excellent prevention of lipid peroxidation [42]. Furthermore, Lou *et al.* [43] reported that EAE from *A. lappa* leaves exhibited the highest inhibitory peroxidation among the other extract, which was in agreement with our findings. The IC_{50} values of EAE and tertiary butylhydroquinone (TBHQ; used as positive control) were 134 ± 4 and $82 \pm 2 \mu\text{g} / \text{mL}$, respectively. The ability to inhibit lipid peroxidation is based on the conjugation of iron in a catalytically silent form. The termination of the chain by scavenging peroxyl radicals may be the cause of lipid peroxidation inhibitory activities [44]. Thus, the fractions could exert their antioxidant activity mainly by donating electrons [43].

Finally, to fully elucidate the anti-free radical profile against different types of free radicals, it was necessary to measure the antioxidant potential based on the reduction of metals by electron transfer. CUPRAC assay was adopted, and the data were reported as absorbance versus concentration, corresponding to 0.5 of absorbance (Tables 1 and 2). According to Özyürek *et al.* [45], the CUPRAC assay has many advantages. Although the CUPRAC test is similar to the ferric reducing antioxidant power test (With Fe replaced by Cu), the CUPRAC values often show similarity to the Trolox equivalent antioxidant capacity (Trolox; used as a standard). The ferric reducing antioxidant power has relatively lower values [29]. Like the three previous assays: DPPH, GOR, and β carotene, the obtained data regarding the reducing power revealed a strong reducing power of EAE ($A_{0,5}$; $37.41 \pm 1.59 \mu\text{g}/\text{mL}$), whereas the AqE presented the lowest one ($A_{0,5}$; $95.26 \pm 0.69 \mu\text{g}/\text{mL}$). This low, reducing power of the AqE may be due to the fact that the complexes of phenanthroline formed during the reaction are famous for their limited water solubility [45]. Consequently, it is prefer-

able to use an organic solvent. In accordance with our observation, Kenny *et al.* [38] reported the same relative difference in metal reduction power between the alcoholic and aqueous extract of *A. minus*. Indeed, this study which adopted the ferric reducing antioxidant power assay, revealed that the greatest Trolox equivalent value (TE) was observed in the ethanolic extract ($626.783 \pm 0.031 \text{ mg TE}/\text{g extract}$), whereas the aqueous extract exhibited the lowest one ($12.083 \pm 0.037 \text{ mg TE}/\text{g extract}$).

According to some researchers, we could have had a better reducing effect if we had used a combination of hydrolysis and incubation. Precisely, Apak *et al.* [30] reported that to fully exhibit the reducing capacity of a mixture containing various antioxidants, certain molecules require an incubation process after the acid hydrolysis using the principle of additivity of absorbances. On the other hand, and in general, there is a remarkable difference in the reducing capacity recorded by the two methods, CUPRAC and FRAP. According to Prior *et al.* [46], this may be due to the fact that the CUPRAC assay is clearly more selective than that of FRAP because of the lower redox potential. In fact, the potential presence of citric acid and sugars decreases the reducing effect because they cannot be oxidized.

Unlike *A. minus*, the antioxidant power of *A. lappa* has been evaluated by several researchers, in which the *A. lappa* species were found to be rich in phenolic and flavonoid compounds, such as quercetin, rutin [47], caffeic, caffeoylquinic acid [48], arctigenin, and chlorogenic derivatives [49]. Consequently, our data suggested that the antioxidant activity of *Arctium minus* subsp. *atlanticum* could be attributed to the aforementioned phenolic compounds and, in particular, flavonoids which were already described in *Minus* species by the phytochemical analysis of Saleh and Bohm [50].

4.2. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Activities

The pathogenesis of Alzheimer's disease appears to be due to the increased activity of different types of choline-based esters (enzymes hydrolyzing), such as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Precisely, our approach to evaluating the potential neuroprotective effect was achieved by measuring the inhibitory power of our samples against AChE and BChE. As summarized in Table 3, the percentages of inhibition increased with the increase of concentrations in a dose-dependent manner except for the AqE, which was shown to be totally inactive. The EAE seemed to possess the most relatively potent neuroprotective power. Indeed, at concentrations of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, EAE inhibition rates were 41.39 ± 1.24 and $40.20 \pm 1.12\%$ for AChE and BuChE, respectively, followed by HME having levels of 27.23 ± 1.56 and $5.58 \pm 0.59\%$ for AChE and BuChE, respectively. According to the literature, the only previous study on the same species (*A. minus*) having the anticholinesterase activity was conducted by Hajimehdiipoor *et al.* [17]. In contrast, the results of this study reported a total absence of inhibitory activity against AChE of the *Minus* species (of which the subspe-

cies are unknown). This contradiction can be due to the divergence of part of the plant studied (leaves vs. roots), the type of subspecies concerned, and the solvent used. However, the findings of other works were in agreement with ours, like that of Mekinić *et al.* [13], which demonstrated that the HME of *Lappa* species possessed *in vitro* AChE inhibition rate equal to 20%. Other *in vivo* studies have demonstrated a powerful neuroprotective effect of the *lappa* species against neuropathologies induced by scopolamine [14], beta-amyloid [15], and glutamate [16]. Due to its relatively low polarity, EAE is believed to contain the major content of neuroprotective compounds. These compounds have a relatively medium polarity (less polar than water and methanol). Mekinić *et al.* [13] and Amrani *et al.* [26] reported the relative relationship between antioxidant and inhibitory properties of AChE and BChE [13, 26]. We can attribute the anticholinesterase effect to the same molecules thought to be responsible for the antioxidant activity, such as flavonoids (isoquercitrin and rutin) [50], dibenzylbutyrolactone lignans (which are very common in *Arctium* species) [51], arctiopicrin [52] and, in particular, arctiin compound, which is present in both species of *Arctium lappa* and *minus* [53].

CONCLUSION

Almost the majority of pharmacological research on the *Arctium* genus has mainly concerned the *lappa* species and, to a lesser extent, the *minus* species. subsp. *minus*. However, the present investigation is the first study on the effect of different extracts of *Arctium minus* (Hill) Bernh. subsp. *atlanticum* (Pomel) Maire, native to *Algeria*, relative to the neuroprotective effect associated with the antioxidant effect. The present research suggested that the tested samples possessed relatively different power levels of anti-enzymatic and antioxidant activities, but all in a dose-dependent manner. In the various antioxidant and anticholinesterase assays, ethyl acetate extract was the most effective compared to the other samples. Similarly, a correlation (non-statistical) can be deduced between the two effects. We can attribute this biological effect to flavonoids, in general, and, in particular, to the arctiin compound. However, further *in vivo* studies establishing the relationship between each ingredient and the effect studied need to be conducted. Likewise, actual concentrations in human tissues after ingestion can achieve physiologically relevant reaction rates, and their toxicological potential remains to be determined. Especially since the protective function of the brain remains the major problem that complicates the drug treatment of a large number of neurological diseases as many active molecules cannot cross the blood-brain barrier. Considering all the aforementioned perspectives and within the limits of the present work, we can postulate that the association between the antioxidant potential and that of the anticholinesterase of biomolecules could be effective in the fight against Alzheimer's disease.

LIST OF ABBREVIATIONS

A_{0.5} = Concentration Corresponding to 0.5 of Absorbance

AChE	=	Acetylcholinesterase Enzyme
ACI	=	Acetylthiocholine Iodide
AqE	=	Aqueous Extract
BHA	=	Butylated Hydroxyanisole
BHT	=	Butylated Hydroxytoluene
BChE	=	Butyrylcholinesterase Enzyme
BuCI	=	And Butyrylthiocholine Iodide
HME	=	Hydromethanolic Extract
CUPRAC	=	Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity
Cu (I)	=	Copper(I) Oxide(Cu ₂ O)
Cu (II)	=	Copper(II) Oxide(CuO)
CuCl ₂	=	Copper(II) Chloride
DPPH•	=	1,1-Diphenyl-2-Picryl-Hydrazyl
DNTB	=	5,5-Dinitro-Bis-Nitrobenzoic Acid
EAE	=	Ethyl Acetate Extract
EC ₅₀	=	half-maximal Effective Concentration
FRAP	=	Ferric Reducing Antioxidant Power
Galv-O•	=	Galvinoxyl Radical
GOR	=	Galvinoxyl Radical Assay
IC ₅₀	=	Inhibition Concentration of 50%
NH ₄ Ac	=	Ammonium Acetate
Nc	=	Neocuproine
TBHQ	=	Tertiary Butylhydroquinone
TE	=	Trolox Equivalent
Tween-40	=	Polyoxyethylenesorbitan monolaurate

ETHICAL APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No humans/animals were used in the studies that are the basis of this research.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

The data supporting the findings of the article is available with the corresponding author upon request.

FUNDING

This project was funded by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS) for the PRFU Project (DOOL05UN190120200001).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

Biotechnology Research Center, Ali Mendjli, Constantine, Algeria, is also acknowledged for donating most of the polyphenolic and enzymatic compounds used in this work.

The authors would like to thank M. Messaoud ME-RABET and M. Laid CHENITI for contributing to the collection of plant material.

REFERENCES

- [1] Ferri CP, Sousa R, Albanese E, Ribeiro WS, Honyashiki M. World Alzheimer Report 2009 – Executive Summary. London 2009; pp. 1-22.
- [2] Budimir A. Metal ions, Alzheimer's disease and chelation therapy. *Acta Pharm* 2011; 61(1): 1-14.
<http://dx.doi.org/10.2478/v10007-011-0006-6> PMID: 21406339
- [3] LaFerla FM, Oddo S. Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med* 2005; 11(4): 170-6.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2005.02.009> PMID: 15823755
- [4] Hoogenraad TU. Paradigm shift in treatment of Alzheimer's disease: Zinc therapy now a conscientious choice for care of individual patients. *Int J Alzheimers Dis* 2011; 2011: 492686.
<http://dx.doi.org/10.4061/2011/492686> PMID: 21949909
- [5] Tetu D. Facteurs génétiques et stress oxydatif impliqués dans la maladie d'Alzheimer. Grenoble: PhD Thesis, pharmacy Faculty 2005.
- [6] Alzheimer's Association. 2008 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 2008; 4(2): 110-33.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2008.02.005> PMID: 18631956
- [7] Cummings JL. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2004; 351(1): 56-67.
<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra040223> PMID: 15229308
- [8] Chattipakorn S, Pongpanparadorn A, Pratchayasakul W, Pongchaidacha A, Ingkaninan K, Chattipakorn N. *Tabernaemontana divaricata* extract inhibits neuronal acetylcholinesterase activity in rats. *J Ethnopharmacol* 2007; 110(1): 61-8.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.007> PMID: 17023131
- [9] Gholamhoseinian A, Moradi MN, Sharifi-Far F. Screening the methanol extracts of some Iranian plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Res Pharm Sci* 2009; 4(2): 105-12.
[PMID: 21589805]
- [10] Ali M, Muhammad S, Shah MR, *et al.* Neurologically potent molecules from *Crataegus oxyacantha*; isolation, anticholinesterase inhibition, and molecular docking. *Front Pharmacol* 2017; 8: 327.
<http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2017.00327> PMID: 28638340
- [11] Wang D, Bădărau AS, Swamy MK, *et al.* *Arctium* species secondary metabolites chemodiversity and bioactivities. *Front Plant Sci* 2019; 10: 834.
<http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.00834> PMID: 31338098
- [12] Chan Y-S, Cheng L-N, Wu J-H, *et al.* A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (*Burdock*). *Inflammopharmacology* 2011; 19(5): 245-54.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10787-010-0062-4> PMID: 20981575
- [13] Mekinić IG, Burcul F, Blazević I, Skroza D, Kerum D, Katalinić V. Antioxidative/acetylcholinesterase inhibitory activity of some asteraceae plants. *Nat Prod Commun* 2013; 8(4): 471-4.
<http://dx.doi.org/10.1177/1934578X1300800416> PMID: 23738456
- [14] Lee IA, Joh EH, Kim DH. Arctigenin isolated from the seeds of *Arctium lappa* ameliorates memory deficits in mice. *Planta Med* 2011; 77(13): 1525-7.
<http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1270746> PMID: 21308615
- [15] Kwon YK, Choi SJ, Kim CR, *et al.* Antioxidant and cognitive-enhancing activities of *Arctium lappa* L. roots in Aβ1-42-induced mouse model. *Appl Biol Chem* 2016; 59(4): 553-65.
<http://dx.doi.org/10.1007/s13765-016-0195-2>
- [16] Tian X, Sui S, Huang J, Bai J-P, Ren T-S, Zhao Q-C. Neuroprotective effects of *Arctium lappa* L. roots against glutamate-induced oxidative stress by inhibiting phosphorylation of p38, JNK and ERK 1/2 MAPKs in PC12 cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 2014; 38(1): 189-98.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2014.05.017> PMID: 24956398
- [17] Hajimehdipoor H, Ara L, Moazzeni H, Esmaili S. Evaluating the antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of some plants from *Kohgiluyeh va Boyer-Ahmad* province, Iran. *Res J Pharm* 2016; 3(4): 1-7.
- [18] Zemouri M. Etude Cytogénétique de Quelques Espèces Végétales de La Flore de Kéfrida (Wilaya de Bejaia) Avec Un Accent Sur Les Endémiques. PhD Thesis, University of Bouira, Algeria, 2017.
- [19] Ferreira LE, Castro PMN, Chagas ACS, França SC, Belebani RO. *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (*Annonaceae*) against *Haemonchus contortus* from sheep. *Exp Parasitol* 2013; 134(3): 327-32.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.032> PMID: 23583362
- [20] Bekhaoua A, Khacheba I, Boussoussa H, Yousfi M. A-Glucosidase and α-amylase inhibitory effect and antioxidant activity of aerial part from *Linaria Aegyptiaca* L. *Curr Enzym Inhib* 2019; 15(1): 22-7.
<http://dx.doi.org/10.2174/1573408014666181022115524>
- [21] Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 181(4617): 1199-200.
<http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0>
- [22] Gülçin I. Comparison of *in vitro* antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids* 2007; 32(3): 431-8.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00726-006-0379-x> PMID: 16932840
- [23] Guettaf S, Abidli N, Kariche S, Bellebcir L, Bouriche H. Evaluation of antioxidant potential and phytochemical studies of *Ononis angustissima* L. (*fabaceae*). *World J Pharm Res* 2016; 5: 1793-815.
- [24] Shi H, Noguchi N, Niki E. Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. *Methods Enzymol* 2001; 335: 157-66.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(01\)35240-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(01)35240-0) PMID: 11400365
- [25] Papadimitriou V, Sotiropoulos TG, Xenakis A, Sofikiti N, Stavriyanoudaki V, Chaniotakis NA. Oxidative stability and radical scavenging activity of extra virgin olive oils: An electron paramagnetic resonance spectroscopy study. *Anal Chim Acta* 2006; 573-574: 453-8.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2006.02.007> PMID: 17723560
- [26] Amrani A, Mecheri A, Bensouici C, *et al.* Evaluation of antidiabetic, dermatoprotective, neuroprotective and antioxidant activities of *Chrysanthemum fontanesii* flowers and leaves extracts. *Biocatal Agric Biotechnol* 2019; 20(101209): 101209.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101209>
- [27] Marco GJ. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 1968; 45(9): 594-8.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02668958>
- [28] Ismail A Jr, Tan S. Antioxidant activity of selected commercial seaweeds. *Malays J Nutr* 2002; 8(2): 167-77.
PMID: 22692475
- [29] Ioannou I, Chaaban H, Slimane M, Ghouli M. Origin of the variability of the antioxidant activity determination of food material. In: *Biotechnology*. InTech: London, 2015.
- [30] Apak R, Güçlü K, Ozyürek M, Karademir SE. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem* 2004; 52(26): 7970-81.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf048741x> PMID: 15612784

- [31] Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7(2): 88-95. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9) PMID: 13726518
- [32] Elufioye TO, Unachukwu CC, Oyediji AO. Anticholinesterase and antioxidant activities of *Spilanthes filicaulis* whole plant extracts for the management of Alzheimer's disease. *Curr Enzym Inhib* 2019; 15(2): 103-13. <http://dx.doi.org/10.2174/1573408015666190730113405>
- [33] Scalzo J, Politi A, Pellegrini N, Mezzetti B, Battino M. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition* 2005; 21(2): 207-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2004.03.025> PMID: 15723750
- [34] Kallithraka S, Garcia-Viguera C, Bridle P, Bakker J. Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. *Phytochem Anal* 1995; 6(5): 265-7. <http://dx.doi.org/10.1002/pca.2800060509>
- [35] Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991; 161(4): 488-503. [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9610\(91\)91120-8](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9610(91)91120-8) PMID: 2035771
- [36] Erdemoglu N, Turan NN, Akkol EK, Sener B, Abacioglu N. Estimation of anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant activities of *Arctium minus* (hill) Bernh. ssp. minus. *J Ethnopharmacol* 2009; 121(2): 318-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2008.11.009> PMID: 19061945
- [37] Ahmet Başaran A, Ceritoğlu I, Ündeğer Ü, Başaran N. Immunomodulatory activities of some Turkish medicinal plants. *Phytother Res* 1997; 11(8): 609-11. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199712\)11:8<609::AID-PTR165>3.0.CO;2-0](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199712)11:8<609::AID-PTR165>3.0.CO;2-0)
- [38] Kenny O, Smyth TJ, Walsh D, Kelleher CT, Hewage CM, Brunton NP. Investigating the potential of under-utilised plants from the *Asteraceae* family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. *Food Chem* 2014; 161: 79-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.126> PMID: 24837924
- [39] Predes F, Ruiz A, Carvalho J, Foglio M, Dolder H. Antioxidative and *in vitro* antiproliferative activity of *Arctium lappa* root extracts. In: *Recent Advances in Plant-Based, Traditional, and Natural Medicines*. Apple Academic Press, Florida, 2014; pp. 27-37. <http://dx.doi.org/10.1201/b16611-4>
- [40] Guettaf S, Abidli N, Kariche S, Bellebcir L, Bouriche H. Phytochemical screening and antioxidant activity of aqueous extract of *Genista saharae* (Coss. & Dur.). *Pharm Lett* 2016; 8(1): 50-60.
- [41] Duh PD. Antioxidant activity of *Burdock* (*Arctium lappa* Linne): Its scavenging effect on free-radical and active oxygen. *J Am Oil Chem Soc* 1998; 75(4): 455-61. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-998-0248-8>
- [42] Local Food-Nutraceuticals Consortium. Understanding local Mediterranean diets: A multidisciplinary pharmacological and ethnobotanical approach. *Pharmacol Res* 2005; 52(4): 353-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2005.06.005> PMID: 16051496
- [43] Lou Z, Wang H, Li J, et al. Antioxidant activity and chemical composition of the fractions from *Burdock* leaves. *J Food Sci* 2010; 75(5): C413-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01616.x> PMID: 20629861
- [44] Kulkarni AP, Aradhya SM, Divakar S. Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant-punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. *Food Chem* 2004; 87(4): 551-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.006>
- [45] Özyürek M, Güçlü K, Tütem E, et al. A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Anal Methods* 2011; 3(11): 2439. <http://dx.doi.org/10.1039/c1ay05320e>
- [46] Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 2005; 53(10): 4290-302. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0502698> PMID: 15884874
- [47] Nakagawa Y, Matsugo S. Antioxidant activity of flavonoids in *Burdock* leaf extracts and their preventive effect on soybean oil oxidation. *New Technologies Medicine* 2004; 5: 487-91.
- [48] Maruta Y, Kawabata J, Niki R. Antioxidative caffeoylquinic acid derivatives in the roots of burdock (*Arctium Lappa* L.). *J Agric Food Chem* 1995; 43(10): 2592-5. <http://dx.doi.org/10.1021/jf00058a007>
- [49] Chen FA, Wu AB, Chen CY. The influence of different treatments on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its active components. *Food Chem* 2004; 86(4): 479-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.020>
- [50] Saleh NA, Bohm BA. Flavonoids of *Arctium minus* (*compositae*). *Experientia* 1971; 27(12): 1494. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02154314> PMID: 5144881
- [51] Park SY, Hong SS, Han XH, et al. Lignans from *Arctium lappa* and their inhibition of LPS-induced nitric oxide production. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2007; 55(1): 150-2. <http://dx.doi.org/10.1248/epb.55.150> PMID: 17202721
- [52] Suchy M, Herout V, Sorm F. The nature of arctiopicrin, an unsaturated lactone from *Arctium minus*. *Chem Listy Vedu Prum* 1956; 50: 1827-33.
- [53] Lindner MW. *Burdock* fruit. *Pharm Zentralhalle Deutsch* 1948; 87: 65-73.

DISCLAIMER: The above article has been published, as is, ahead-of-print, to provide early visibility but is not the final version. Major publication processes like copyediting, proofing, typesetting and further review are still to be done and may lead to changes in the final published version, if it is eventually published. All legal disclaimers that apply to the final published article also apply to this ahead-of-print version.

خصصت الدراسة الحالية لتقييم التأثيرات العلاجية والسمية للمستخلصات الأجزاء الهوائية المختلفة (الأوراق والأزهار) وجذور المستخلصات المائية (BFq، BFRq، BRq، على التوالي)، المستخلصات المائية الكحولية (BFm، BFRm، BRm، على التوالي) وتلك الخاصة بخلات الإيثيل (BFt، BFRt، BRt، على التوالي) للنبات المستوطن في الجزائر والمغرب: *Arctium minus. ssp. Atlanticum*. يطلق على هذا النبات عادة "الأرقطيون الصغير" ويعرف في الجزائر باسم الأرقطيون. أظهرت الاختبارات أن الأعضاء المدروسة غنية بالمركبات الفينولية والفلافونويد والتانينات المكثفة، خاصة المستخلصات المائية الكحولية منها. من ناحية أخرى، أظهر التحليل بواسطة HPLC-DAD سيادة المركبات flavan-3-ols، ولا سيما ال-catechin ونظيره ال-epicatechin. الدراسة المخبرية: تم تقييم القدرة الرجعية بواسطة DPPH و GOR؛ أظهرت جميع المستخلصات المائية الكحولية والمائية و BRT نشاطًا كبيرًا مضادًا للجذور الحرة. تم الحصول على النشاط المثبط لأكسدة الدهون فقط بتركيز عالية (ميكروغرام / مل $IC_{50} > 76.30$ ± 1.66). كانت قدرة ارجاع النحاس CUPRAC لـ BFRm هي الأكثر فاعلية (ميكروغرام / مل $IC_{50} = 31.13 \pm 2.29$). جميع المستخلصات منعت تحلل ال-BSA بشكل ملحوظ بنسبة 47.45-67.44%. تم تقدير النشاط المضاد للزهايمر بواسطة اختبار تثبيط كل من (AChE) acetylcholinesterase، و (BuChE) butyrylcholinesterase: أظهرت معظم المستخلصات ضعف النشاط المثبط للأستيل كولين استراز (AChE)، ونشاط مثبط معتدل إلى مرتفع لـ (BChE) butyrylcholinesterase، بينما كان للـ BFt أعلى نشاط مثبط للـ (BChE) (72.87 ± 6.48 %) مقارنة بالمستخلصات الأخرى. تم تقييم النشاط المضاد لمرض السكري عن طريق تثبيط α -amylase: كان BRt هو الأقوى والأكثر فعالية حتى من الأكاربوز المستخدم كمرجع (ميكروغرام / مل $IC_{50} = 370.96 \pm 43.23$ ، 3650.93 ± 10.70 ، على التوالي). في الجسم الحي تم تقييم السمية الحادة على الفئران باتباع علامات السمية لمدة 14 يومًا (اختبار الحد الأقصى): أظهر تناول 5 غ/كغ من المستخلصات المختلفة عن طريق الفم سمية منخفضة جدًا ($LD_{50} > 5$ غ/كغ). تمكن هذه البيانات من تصنيف النبتة المدروسة في فئة النباتات غير السامة التي يكون تناولها عن طريق الفم آمنًا. أبرزت النتائج التي تم الحصول عليها وجود تأثيرات دوائية جديدة لم يتم ذكرها في الدراسات الطب التقليدي السابقة. في الختام، أظهرت النبتة المدروسة تأثيرات دوائية مثيرة للاهتمام تبرر استخدامها في الطب التقليدي، كما أن إجراء دراسات تكميلية يعتبر ضروريًا.

الكلمات المفتاحية: دوائية، السمية، مضادات الأكسدة، الزهايمر، مضادات الالتهاب، داء السكري، الأرقطيون.

ABSTRACT

The present study was designated for the evaluation of the therapeutic and toxic effects of the aqueous extracts of different aerial parts (leaves and flowers) and roots (BFq, BFRq, and BRq, respectively), hydromethanolic extracts (BFm, BFRm, and BRm, respectively) and those of ethyl acetate (BFt, BFRt, and BRt, respectively) of the plant endemic to Algeria and Morocco: *Arctium minus. ssp. Atlanticum*, commonly called "little burdock" and known in Algeria as *Arkatioune*. The assays showed that the different studied organs are rich in polyphenols, flavonoids, and condensed tannins, in particular their hydro-alcoholic extracts. On the other hand, analysis by HPLC-DAD showed the predominance of flavan-3-ols, in particular catechin and its isomer epicatechin. *In vitro*: scavenging potential was assessed by DPPH and GOR; all hydro-alcoholic, aqueous, and BRt extracts showed considerable antiradical activity. Lipid peroxidation inhibitory activity was obtained only at high concentrations ($IC_{50} > 76.30 \pm 1.66$ [μ g/mL]). The copper reducing power CUPRAC of BFRm was the most potent ($IC_{50} = 31.13 \pm 2.29$ [μ g/mL]). All extracts prevented BSA denaturation significantly with 47.45-67.44%. Anti-Alzheimer activity was estimated by acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) inhibition: Most of the extracts showed weak acetylcholinesterase (AChE), and moderate to high butyrylcholinesterase (BChE) inhibitory activity, while BFt had the highest inhibitory activity on BChE (72.87 ± 6.48 %) compared to the other extracts. Antidiabetic activity was assessed by α -amylase inhibition: BRt was the most potent and even more potent than acarbose used as standard ($IC_{50} = 370.96 \pm 43.23$ and 3650.93 ± 10.70 μ g/mL, respectively). *In-vivo*: the evaluation of acute toxicity is carried out on mice by following the signs of toxicity for 14 days (limit test): oral administration of 5g/Kg of the various extracts showed very low toxicity ($LD_{50} > 5$ g/Kg). These data make it possible to classify the plant in the category of non-toxic plants whose oral administration is safe. Obtained results highlighted new pharmacological effects that have not been mentioned in the literature on traditional medicine. In conclusion, the studied plant shows interesting pharmacological effects which justify their use in traditional medicine and that complementary studies remain necessary.

Keywords: therapeutics, toxicity, antioxidant, anti-Alzheimer, anti-inflammatory, anti-diabetic, Burdock, Arctium.