

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Badji Mokhtar Annaba University
Université Badji Mokhtar – Annaba
Faculté des Sciences



جامعة باجي مختار – عنابة

كلية العلوم

Département de Biologie

قسم البيولوجيا

Thèse

Présentée pour obtenir le diplôme de

Doctorat En-Sciences

Spécialité : Biologie Végétale

Par :

RACHEDI -BOUKHEDIR Sameh

Thème :

Ethnopharmacologie et étude *in vivo* du pouvoir anti-cancéreux des flavonoïdes extraits de l'*Agave americana* L. du Nord-est algérien

Thèse soutenue le date de soutenance devant le jury composé de :

N°	Nom et prénom	Grade	Etablissement	Qualité
01	HASSAINE Amina	MCA.	Université Badji Mokhtar -Annaba	Président
02	SERIDI Ratiba	Prof.	Université Badji Mokhtar -Annaba	Rapporteur
03	OUALI Kheireddine	Prof.	Université Badji Mokhtar -Annaba	Co-rapporteur
04	DRAIAIA Radia	Prof.	Université Mohamed Cherif Messaidia Souk Ahras	Examineur
05	GACEM Habiba	MCA	Ecole Supérieure de l'Enseignement Technologique de Skikda	Examineur
06	SELLES Chaouki	Prof.	Université Abou Bekr Belkaid - Tlemcen	Examineur

RÉSUMÉS

RESUME

Cette thèse explore l'ethnopharmacologie de l'*Agave americana* L. dans le Nord-est algérien, en évaluant son potentiel anti-cancéreux via une étude *in vivo*. L'étude a été réalisée dans le but de rechercher de nouvelles drogues d'origine végétale et de fournir à la thérapeutique de nouvelles substitutions naturelles. Une enquête ethnobotanique a été réalisée auprès de 100 participants, révélant que 58 % connaissent la plante, principalement utilisée en cosmétique (44,82 %) et comme cataplasme pour diverses maladies, notamment le rhumatisme (18,96 %).

Des analyses chimiques ont identifié des principes actifs tels que les flavonoïdes, les tanins galliques et les alcaloïdes. Les dosages quantitatifs ont montré une teneur significative en polyphénols (530,8 mg EAG/100g) et en flavonoïdes (0,95085 mg EC/100g MS). L'analyse HPLC a mis en évidence l'acide gallique comme le composé majoritaire (42,77 %).

Les tests d'activité antioxydante ont démontré que l'extrait brut avait une capacité antioxydante supérieure à celle des flavonoïdes, avec des résultats prometteurs dans les tests ABTS, DPPH et FRAP. L'activité antibactérienne a été testée sur cinq souches, montrant une sensibilité générale, particulièrement chez les bactéries à Gram positif.

Enfin, les résultats *in vivo* suggèrent que les flavonoïdes d'*Agave americana* L. ont un effet protecteur contre l'évolution cancérigène induite par le DMH, principalement en préventif. Une augmentation du GSH et une restauration des activités enzymatiques antioxydantes chez les rats traités confirment l'effet bénéfique des flavonoïdes contre le stress oxydatif.

Mots clés : Ethnopharmacologie, Flavonoïdes, *Agave americana* L., Anti-cancéreux, Antioxydant, Enquête ethnobotanique, HPLC, Activité antibactérienne, DMH

SUMMARY

This thesis explores the ethnopharmacology of *Agave americana* L. in northeastern Algeria, evaluating its anti-cancer potential through an in vivo study. The study was conducted with the aim of discovering new plant-based drugs and providing new natural alternatives for therapy. An ethnobotanical survey was carried out with 100 participants, revealing that 58% are familiar with the plant, which is primarily used in cosmetics (44.82%) and as a poultice for various ailments, notably rheumatism (18.96%).

Chemical analyses identified active compounds such as flavonoids, gallic tannins, and alkaloids. Quantitative assays showed significant levels of polyphenols (530.8 mg EAG/100g) and flavonoids (0.95085 mg EC/100g MS). HPLC analysis highlighted gallic acid as the major compound (42.77%).

Antioxidant activity tests demonstrated that the crude extract had a higher antioxidant capacity than the flavonoids, with promising results in ABTS, DPPH, and FRAP tests. Antibacterial activity was tested on five strains, showing general sensitivity, particularly in Gram-positive bacteria.

Finally, in vivo results suggest that flavonoids from *Agave americana* L. have a protective effect against cancer progression induced by DMH, primarily in a preventive manner. An increase in GSH and a restoration of antioxidant enzyme activities in treated rats confirm the beneficial effect of flavonoids against oxidative stress.

Keywords:

Ethnopharmacology, Flavonoids, *Agave americana* L., Anti-cancer, Antioxidant, Ethnobotanical survey, HPLC, Antibacterial activity, DMH.

المخلص

تستكشف هذه الأطروحة علم الأعشاب الشعبية لنبات الأغاف الأمريكي (*Agave americana L.*) في شمال شرق الجزائر، من خلال تقييم إمكانياته المضادة للسرطان عبر دراسة حية. تم إجراء الدراسة بهدف البحث عن أدوية جديدة ذات أصل نباتي وتوفير بدائل طبيعية جديدة للعلاج. تم إجراء مسح أعشاب شعبية مع 100 مشارك، حيث أظهر أن 58% منهم يعرفون النبات، الذي يُستخدم بشكل رئيسي في مستحضرات التجميل (44.82%) وكمادات لمختلف الأمراض، وخاصة الروماتيزم (18.96%).

حددت التحليلات الكيميائية المركبات الفعالة مثل الفلافونويدات، والتانينات الجالينية، والقلويدات. أظهرت الاختبارات الكمية مستويات كبيرة من البوليفينولات (530.8 ملغ EAG/100 غ (والفلافونويدات 0.95085 ملغ/EC غ (MS). وأبرز تحليل HPLC حمض الجاليك كالمركب الرئيسي 42.77%.

أظهرت اختبارات النشاط المضاد للأكسدة أن المستخلص الخام كان له قدرة مضادة للأكسدة أعلى من الفلافونويدات، مع نتائج مشجعة في اختبارات ABTS و DPPH و FRAP. تم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا على خمسة سلالات، حيث أظهرت حساسية عامة، خاصة في البكتيريا الموجبة الجرام.

أخيراً، تشير النتائج الحية إلى أن الفلافونويدات المستخرجة من الأغاف الأمريكي (*Agave americana L.*) لها تأثير وقائي ضد تطور السرطان الناتج عن DMH، بشكل أساسي بطريقة وقائية. ويؤكد زيادة مستويات GSH واستعادة نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة في الفئران المعالجة التأثير المفيد للفلافونويدات ضد الإجهاد التأكسدي.

الكلمات المفتاحية:

علم الأعشاب الشعبية، الفلافونويدات، أغاف أمريكي، مضاد للسرطان، مضاد للأكسدة، مسح أعشاب شعبية، HPLC، نشاط مضاد للبكتيريا، DMH

REMERCIEMENTS

Remerciements

Ce travail marque la conclusion de plusieurs années de recherche, durant lesquelles j'ai eu l'opportunité d'acquérir bien plus qu'un simple savoir scientifique. J'ai appris des valeurs essentielles telles que la rigueur, la discipline et la responsabilité. Ces qualités m'ont été transmises grâce à l'encadrement et au soutien de nombreuses personnes qui ont largement contribué à ma formation ainsi qu'à l'élaboration de cette thèse. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à chacun d'entre eux.

Tout d'abord, je remercie Allah pour m'avoir doté de la capacité d'écrire et de réfléchir, pour la force qu'il m'a donnée de croire en moi et pour la patience qui m'a permis de mener mes études à bien.

Je souhaite adresser des remerciements sincères à Pr. SERIDI Ratiba, ma directrice de thèse. Sa compétence, sa patience et sa rigueur scientifique ont été des atouts précieux tout au long de ce parcours. Ses conseils avisés ont joué un rôle déterminant dans la réalisation de ce mémoire, et je lui en suis extrêmement reconnaissante.

Je veux également exprimer ma gratitude au professeur OUALI Kheireddine pour son accueil chaleureux au sein de son Laboratoire de Bio-surveillance Environnementale. Son soutien en tant que co-directeur de ma recherche a été un honneur et une source d'inspiration. Je lui adresse ici mes remerciements les plus sincères.

Je remercie également les membres du jury pour le temps précieux qu'ils ont consacré à l'examen de ce travail. Leur expertise et leurs retours constructifs sont d'une grande importance pour moi.

Un remerciement particulier pour Dr. SLIMANI Abderrachid, Dr. TREA Saliha pour leur aide leur présence et leur soutien tout au long de la réalisation de ce travail

Mes remerciements vont aussi à toute l'équipe du laboratoire de Biologie Végétale et Environnement, avec qui j'ai partagé de nombreux moments enrichissants. Ces échanges ont non seulement été professionnels mais aussi amicaux, créant ainsi un environnement de travail agréable et stimulant.

Enfin, je souhaite remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce modeste travail. Votre soutien, vos encouragements et votre aide ont été inestimables tout au long de cette aventure.

Merci à toutes et à tous.

DEDICACES

Dédicaces

Je dédie cette thèse à mes parents, dont l'amour inconditionnel et le soutien éternel ont été les fondations de mon parcours. Leur encouragement m'a toujours motivée à atteindre mes rêves.

À mon mari Zinou, Je dédie cette thèse à toi, dont le soutien indéfectible a été une ancre tout au long de cette aventure. Ta patience et ta compréhension m'ont permis de traverser les moments les plus éprouvants de mon parcours doctoral. Chaque fois que j'ai ressenti le doute ou la fatigue, ta présence reconfortante a su me redonner force et motivation. Tu as toujours cru en moi, même lorsque j'avais des hésitations sur mes capacités. Tes encouragements m'ont permis de surmonter les obstacles et de rester concentrée sur mon objectif.

Je me souviens des longues nuits passées à travailler, où tu as su trouver les mots justes pour me remonter le moral, ou des moments où tu as pris le temps de m'écouter, me permettant ainsi de partager mes réflexions et mes inquiétudes. Ta capacité à me soutenir sans faille, tout en jonglant avec tes propres engagements, est un véritable témoignage de ton amour et de ta générosité.

Merci d'avoir été mon partenaire dans cette aventure, de m'avoir soutenue de manière inconditionnelle et d'avoir cru en moi à chaque étape. Cette thèse n'est pas seulement le fruit de mes efforts, mais aussi le reflet de notre amour et de notre collaboration. Je suis impatiente de partager avec toi les prochaines étapes de notre vie ensemble, avec la même passion et le même engagement que nous avons investis dans ce parcours. Avec toute ma gratitude et mon amour.

À ma sœur Nouna et son mari Nadir, pour leur soutien constant. Vous avez toujours cru en moi et m'avez encouragée à poursuivre mes ambitions.

À mes frères Djamel et sa femme Soumeya, ainsi qu'à mon frère Younes et sa fiancée Assia.

Sans oublier mes neveux Anis, Douđa, Tawba et Neni, pour leur joie de vivre et leur innocence. Vous êtes la lumière de ma vie et ma plus grande motivation.

Je dédie cette thèse à toutes mes amies spécialement à Faïfou, Soumeya, Saoussene, Labiba et Aminettes, Chahira, Mimí, Salima, qui ont été des piliers de soutien tout au long de ce parcours. Votre amitié, vos encouragements et vos rires ont rendu cette aventure bien plus enrichissante. Vous avez toujours été là pour m'écouter, me soutenir et me motiver, même dans les moments les plus difficiles.

Cette thèse est dédiée à chacun d'entre vous, qui avez contribué à ce parcours d'une manière ou d'une autre. Merci pour tout.

LISTES

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
01	La grande famille des Polyphénols	04
02	Différents systèmes de solvants et agents de pulvérisation des tests de confirmation utilisés pour le profilage CCM des substances phytochimiques	53
03	Gradient d'éluion pour l'analyse chromatographique des flavonoïdes	58
04	Récapitulatif des différents tests antioxydants in vitro	60
05	Dilutions en cascade des solutions mère utilisées	66
06	Classement des bactéries selon le diamètre d'inhibition	66
07	Gamme d'étalonnage des protéines	71
08	Protocole du dosage de l'activité GST	75
09	Récapitulatif des résultats des tests phytochimiques réalisés sur tube	86
10	Récapitulatif des résultats des tests phytochimiques réalisés sur CCM	86
11	Tableau récapitulatif des résultats de l'analyse qualitative des flavonoïdes extraits.	100
12	Analyse des propriétés ADMET des composés identifiés	104
13	Prédiction in silico des profils de toxicité des composés identifiés	106
14	Comparaison des extraits testés par le test FRAP	117
15	Comparaison des tests antioxydants en fonction de leur sensibilité	119
16	Effet Antibactérien des flavonoïdes de l' <i>Agave americana</i> L.	120
17	AV2 des Diamètres dose/bactérie.	122
18	Comparaison Multiple par le test Tukey	122
19	Variation du poids corporel en grammes chez les rattes témoins et traitées	127
20	Variation du poids absolu et relatif du foie en gramme chez les rattes témoins et traitées	129
21	Variation du poids de la rate en gramme chez les rattes témoins et traitées	132
22	Variation du poids des reins en gramme chez les rattes témoins et traitées	134
23	Variation de la longueur des colons en cm chez les rattes témoins et traitées.	136
24	Variation du nombre des AFC chez les rattes témoins et traitées	141
25	Analyse comparative histopathologique des groupes expérimentaux	146
26	Variation de la teneur en Glutathion chez les rattes témoins et traitées	148
27	Variation de l'activité de la GST chez les rattes témoins et traitées	150

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
01	Squelette de base commun aux flavonoïdes	06
02	Les différentes classes de flavonoïdes	07
03	Les différentes parties de l' <i>Agave americana</i> var <i>americana</i> L.	10
04	Cycle biologique de l'Agave	11
05	Schéma des différentes formes de ROS	22
06	Origines extra- et intracellulaires des radicaux libres dérivés de l'oxygène	23
07	La balance d'équilibre entre les systèmes pro-oxydants et antioxydants	24
08	Réseaux des antioxydants	26
09	Incidence mondiale du cancer	33
10	<i>Agave sisalana</i> Perr.	38
11	<i>Agave americana</i> var. <i>americana</i> L. (Lac Tonga PNEK)	40
12	Localisation géographique de la zone d'étude par image satellite	41
13	Mise en cages des rates	42
14	Dispositif expérimental mis en œuvre	43
15	Situation géographique et découpage administratif de l'aire d'étude	45
16	Pointe terminale de la feuille d'Agave	45
17	Protocole expérimental d'extraction des flavonoïdes	56
18	Mécanisme d'action du DPPH	61
19	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe ferricyanide ferrique Fe (III) et un antioxydant (AH)	63
20	Formation du radical cation ABTS ⁺ à partir de l'ABTS	64
21	Structure chimique du DMH	68
22	Protocole expérimental des différents traitements	68
23	Dissection et mise en évidence du côlon	69
24	Structure du GSH	72
25	Réaction CDNB (1-Chloro- 2,4-di nitrobenzène) avec le Glutathion réduit (GSH) en présence de l'enzyme Glutathion -STransférase	74
26	Distribution des enquêtés selon le genre	76
27	Distribution des enquêtés selon l'âge.	76
28	Répartition des enquêtés en fonction de leur connaissance de la plante	77
29	Les différents noms vernaculaires de l'Agave utilisés par la population.	77
30	Répartition des participants selon les domaines d'utilisation de l'Agave.	78
31	Distribution des enquêtés selon la forme d'utilisation de l'Agave.	78
32	Répartition des participants selon la partie de l'Agave utilisée.	79
33	Distribution des enquêtés selon les maladies traitées par l'Agave.	80
34	Distribution des enquêtés selon l'efficacité de l'Agave.	80
35	Histologie de la tige de l'Agave	84
36	Courbe d'étalonnage de l'Acide Gallique	89

37	Courbe d'étalonnage de la Catéchine	92
38	Flavonoïdes extraits de l' <i>Agave americana</i> L.	96
39	Rendement d'extraction des flavonoïdes d' <i>Agave americana</i> L.	96
40	Chromatogramme des flavonoïdes extraits à 280 nm	99
41	Proportions des composants séparés et identifiés dans les flavonoïdes extraits	100
42	La connexion entre le composé sélectionné et les activités prédites	105
43	Graphique "Boiled-egg" des composés identifiés	107
44	Radars de biodisponibilité pour les flavonoïdes sélectionnés	108
45	Les étapes du test de l'activité anti-oxydante sur C.C.M	110
46	Courbe d'étalonnage de la VC pour le test ABTS	110
47	Capacité antioxydante exprimée en Vit C selon le test ABTS	111
48	Pourcentage d'inhibition des deux extraits testés par le test ABTS	112
49	% d'inhibition du DPPH des extraits testés	114
50	Pouvoir réducteur du fer des extraits testés	117
51	Relation dose-réponse pour les bactéries de référence testées.	124
52	Variation du poids corporel en grammes chez les rattes témoins et traitées	128
53	Variation du poids absolu et relatif du foie en gramme chez les rattes témoins et traités.	130
54	Variation du poids de la rate en grammes chez les rattes témoins et traitées.	132
55	Variation du poids des reins en grammes chez les rattes témoins et traitées.	134
56	Variation de la longueur des colons en cm chez les rattes témoins et traitées.	136
57	Vue microscopique des colons colorés au bleu de méthylène selon Bird,	138
58	Vue macroscopique des colons des rattes traitées par Le DMH (B) traitées par les flavonoïdes (A)	139
59	Variation du nombre des AFC chez les rattes témoins et traitées.	141
60	Coupes longitudinales du colon des rats témoins colorés à l'HE	144
61	Variation la teneur en GSH chez les rattes témoins et traitées.	149
62	Variation l'activité de la GST chez les rattes témoins et traitées.	151

TABLE DES

MATIÈRES

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

DEDICACES

RESUMES

LISTES

1. INTRODUCTION GENERALE.....	P01
2. MATERIELS ET METHODES	P40
2.1.MATERIELS	P40
2.1.1. Matériel végétal	P40
2.1.2. Matériels Biologiques	P41
2.2. METHODES	P43
2.2.1. Enquête Ethnobotanique	P43
2.2.2. Essai botanique	P45
2.2.3. Essai physico-chimique	P46
2.2.3.1. Tests Qualitatifs – Screening phytochimique-	P46
2.2.3.2. Tests quantitatifs	P53
A- Dosages des métabolites secondaires	P53
B- Extraction des flavonoïdes	P55
C- Analyse Chromatographique par HPLC	P57
D- Évaluation des propriétés médicamenteuses et de l'ADMET des composés identifiés <i>in Silico</i>	P58
2.2.4. Essai physiologique	P59
2.2.4.1. Étude des activités biologiques <i>in vitro</i> (tests chimiques)	P59
A- Evaluation de l'activité antioxydante	P59
B- Activité antibactérienne des flavonoïdes extraits	P65
2.2.4.2. Étude des activités biologiques <i>in vivo</i>	P67
3. RESULTATS ET DISCUSSIONS	P76
3.1. Résultats de l'enquête ethnobotanique.....	P76
3.2. Résultats de l'étude histologique	P82
3.3. Résultats du test phytochimiques	P86
3.4. Résultats du test quantitatif	P89
3.4.1. Résultats des dosages des métabolites secondaires.....	P89

3.4.1.1. Dosage des Polyphénols totaux	P89
3.4.1.2. Dosage des flavonoïdes	P92
3.4.2. Résultat de l'extraction des flavonoïdes et calcul du rendement	P94
3.4.3. Résultats de l'analyse Chromatographique par HPLC.....	P98
3.4.4. Résultats de l'étude <i>in Silico</i>	P103
3.5. Résultats de l'essai physiologique	P109
3.5.1. Résultats des tests biologiques <i>in vitro</i>	P109
3.5.1.1. Résultats de l'activité antioxydantes	P109
A- Test de l'activité antioxydante sur CCM	P109
B- Résultats du test de l'ABTS	P110
C- Résultats du test de DPPH	P114
D- Résultats du test FRAP	P116
3.5.1.2. Résultats de l'activité antibactérienne des flavonoïdes extraits	P120
3.5.2. Résultats des tests biologiques <i>in vivo</i>	P127
3.5.2.1. Résultats de l'étude pondérale	P127
A- Variation du poids corporel.....	P127
B-Variation du poids hépatique	P129
C - Variation du poids de la rate.....	P131
D - Variation du poids des reins	P133
3.5.2. Résultats de l'étude morphométrique du colon	P135
A- Variation de la longueur du colon.....	P135
B-Variation du nombre des AFC induites par le DMH	P137
C-Résultats de l'étude histologique du colon	P143
3.5.3. Résultats de l'analyse du stress oxydatif	P147
A- Teneur en Glutathion colique	P147
B- Activité du Glutathion –S- Transférase colique	P150

CONCLUSION ET PERSPECTIVES.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

ANNEXES.

INTRODUCTION

GÉNÉRALE



1. INTRODUCTION GENERALE :

Depuis sa création, l'Homme a toujours eu pour principale préoccupation de répondre à ses besoins en nourriture (VOLAK & STODOLA, 1983). Les plantes ont toujours joué un rôle crucial dans la vie car elles constituent une source immense de nourriture, de fibres et d'autres besoins essentiels (RASOOL et al., 2020). Rapidement, confronté à la maladie, il a dû chercher par ses propres moyens et a trouvé une solution à ses souffrances dans les plantes. Selon VOLAK et STODOLA (1983). De plus, certaines plantes connues sous le nom de Plantes Médicinales ont été employées par l'humanité pour soigner diverses infections et soulager les douleurs (RASOOL et al., 2020).

Les traditions humaines ont toujours été conscientes des vertus apaisantes et analgésiques des plantes, ce qui a conduit à l'essor de la connaissance et de l'utilisation des Plantes Médicinales (GURIB-FAKIM, 2006). De plus, ces Plantes Médicinales sont perçues comme une ressource essentielle dans la médecine traditionnelle, mais elles constituent également une source d'inspiration majeure pour l'élaboration de nouveaux médicaments dans la médecine moderne (RASOOL et al., 2020). 2. Pendant longtemps, ces remèdes traditionnels ont été le principal moyen de soigner différentes maladies, et sont utilisés comme matière première pour la médecine moderne (OULD EL HADJ, HADJ-MAHAMMED & ZABEIROU, 2003). La majorité des plantes renferment des composés susceptibles d'agir, à un niveau ou à un autre, sur l'être humain et animal ; ils sont utilisés à la fois en médecine traditionnelle et en phytothérapie. En effet, elles offrent des bénéfices que les médicaments ne présentent souvent pas (VERDRAGER, 1978).

Selon ELQAJ et al. (2007), malgré les efforts des chimistes, plus de 25% des médicaments prescrits dans les pays développés proviennent directement ou indirectement de végétaux. La raison principale de ce regain d'intérêt pour les Plantes Médicinales et leurs extraits réside dans la prise de conscience des patients et leur profond désir de revenir aux méthodes naturelles. Puisque les plantes ont toujours été efficaces dans la guérison des maladies anciennes, elles continuent de donner un espoir de guérison dans le domaine des maladies modernes. Selon Bernardet (2000), les individus ont tendance à éviter les substances chimiques et à se tourner vers des remèdes naturels. On considère que les médicaments à base de plantes sont moins toxiques et plus doux que les médicaments traditionnels. L'étude ethnobotanique des plantes est de plus en plus intéressante pour les industries pharmaceutiques (DIBONG et al., 2011). Selon ISERIN et al. (2001), les Plantes



Médicinales jouent un rôle crucial dans la recherche pharmaceutique et l'élaboration des médicaments, que ce soit en tant qu'agents thérapeutiques directs ou en tant que matière première pour la synthèse des médicaments ou en tant que modèle pour les composés pharmaceutiques actifs. En outre, les conséquences néfastes des médicaments préoccupent les utilisateurs qui se tournent vers des traitements moins agressifs pour le corps. Cependant, la résistance et l'adaptation des microorganismes aux médicaments diminuent l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (ISERIN et al., 2001 ; SVETAZ et al., 2010).

L'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie travaillent ensemble pour identifier, à travers le monde, des plantes considérées comme actives et dont il incombe à la recherche contemporaine de déterminer les caractéristiques et de confirmer les utilisations. Selon Bourobou (2004) et Gurib-Fakim (2006), les travaux de laboratoire visent à deux objectifs : évaluer la validité de l'utilisation d'une plante spécifique en démontrant les effets biologiques par des techniques pharmacologiques, et orienter les travaux chimiques ultérieurs vers une fraction chimique spécifique des plantes.

L'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie établissent un lien entre les connaissances ancestrales des traditionnels praticiens et les avancées scientifiques contemporaines. Les domaines de recherche interdisciplinaire sont principalement situés à l'intersection des sciences de l'Homme, telles que l'ethnologie, l'histoire, la linguistique, et des sciences de la nature, telles que la botanique, la pharmacologie, la pharmacognosie et la médecine (GURIB-FAKIM, 2006).

Les données locales collectées auprès des populations témoignent d'une vision culturelle de la maladie. Le traitement diffère en fonction du comportement du patient, de ses paroles et de son statut social, en prenant en considération son histoire familiale. L'objectif principal de l'ethnopharmacologie et de l'ethnobotanique est donc de comprendre les pratiques et les représentations liées à la santé et aux maladies. Selon Neuwinger (1996), ces sciences visent également à décrire et évaluer les propriétés thérapeutiques des plantes utilisées dans les pharmacopées traditionnelles.

Il est donc essentiel d'utiliser empiriquement les diverses préparations traditionnelles à base de plantes pour une sélection efficace des espèces, car la majorité des métabolites secondaires de plantes utilisés en médecine moderne ont été découverts grâce à des recherches ethnobotaniques (GURIB-FAKIM, 2006).



Selon DIBONG et al. (2011), l'Afrique possède une grande variété de Plantes Médicinales, qui sont des ressources précieuses pour la plupart des populations rurales en Afrique. Plus de 80% de cette population s'en sert pour leur soin de santé (JIOFACK et al., 2010). Les Plantes Médicinales forment un large ensemble de plantes économiquement significatives. D'après l'OMS, environ 6377 espèces de plantes sont employées en Afrique, dont plus de 4000 sont des plantes médicinales, ce qui représente 60 % de la médecine traditionnelle africaine (OMS, 2003).

Environ 4000 taxons sont présents dans la flore algérienne, répartis dans 131 familles et 917 genres. Selon RADFORD, CATULLO & DE MONTMOLLIN (2011), il y a 464 espèces endémiques nationales (387 espèces, 53 sous-espèces et 24 variétés présentes). En raison de sa position géographique, l'Algérie possède un climat très varié, avec une abondance de plantes dans les régions côtières, montagneuses et même sahariennes. Selon MAHMOUDI (1987) et BELOUAD (1998), ces plantes peuvent être employées comme des remèdes naturels potentiels pour traiter et prévenir les maladies.

En Algérie, l'industrie pharmaceutique dans son ensemble, ainsi que des médecins et des chimistes, sont à la recherche d'une meilleure compréhension du patrimoine des espèces spontanées utilisées dans la médecine traditionnelle. Depuis plusieurs années, des études sont menées sur leurs utilisations, leurs indications dans différentes pathologies et les principes actifs (OULD EL HADJ et al., 2003).

Les végétaux produisent de multiples composés connus sous le nom de métabolites primaires qui sont essentiels à leur survie, ainsi qu'une variété extraordinaire d'autres composés appelés métabolites subsidiaires. Ils ont pour objectif principal de préserver les plantes contre les microorganismes, les animaux et même d'autres plantes. COX & BALICK (1994 ; JUNIO et al., 2011). Ainsi, ces métabolites jouent un rôle essentiel dans la lutte contre différentes maladies et herbivores. Ainsi, les plantes génèrent constamment des métabolites primaires pour leur métabolisme, ce qui leur permet de survivre dans des conditions favorables. Toutefois, en période de stress, d'attaque de prédateurs ou pour s'ajuster aux conditions de l'environnement, elles produisent des métabolites secondaires. Selon TEWARI et TIWARI (2018), DIAS, URBAN et ROESSNER (2012).



Les intermédiaires biosynthétiques tels que l'acétyl coenzyme A, l'acide shikimique, l'acide mévalonique et le 1-déoxyxylulose-5-phosphate sont issus des procédés fondamentaux de la photosynthèse, de la glycolyse et du cycle de Krebs. DIAS et ses collègues (2012) et KRISHNAPRABU (2020).

Différentes catégories de composés sont regroupées dans les métabolites secondaires, tels que les terpènes comme le Limonène (RASOOL et al., 2020), les alcaloïdes comme la Caféine (TEWARI & TIWARI, 2018) et les glycosides comme la Salicyline (DIAS et al., 2012) ; ainsi que les composés phénoliques comme l'Acide parahydroxybenzoïque (VAN DER KOOY & SULLIVAN, 2013).

Les composés phénoliques sont classés en sous-familles qui regroupent plusieurs centaines de molécules distinctes. La couleur des fruits et légumes est plus ou moins caractéristique de ces sous-familles : rouge, vert, jaune, bleu et blanc. Le tableau numéro 01 résume les diverses catégories de flavonoïdes.

TAB. 01 : La grande famille des Polyphénols (DEFRAIGNE & PINCEMAIL, 2008).

Famille	Principaux composés	Origine
Acide hydroxy-benzoïque	Acide vanillique Acide gallique	Vanille feuilles de thé
Acides hydro-cinnamiques	Acide caféique Acides férulique Acides chlorogénique Resvératol (stilbène)	Café Riz, blé, asperges Pelure de pomme de terre, pomme, artichaut, raisin, vin
Flavonoïdes - Flavonols - Flavones - Flavones-3-ols - Isoflavones - anthocyanidines	Quercétine, kaempférol, lutéoline, apigénine, naringénine, catéchine, épicatechine, génistéine, diadzéine, cyanidine	Oignon, brocoli, céleri, agrumes, raisin, thé vert, chocolat, soja, fruits rouges, raisin
Tannins hydrosolubles ou non	Polyphénols de haut poids moléculaire	
lignines	lignanes	bois



Selon PARIS & HURABIELLE (1981), les flavonoïdes sont des pigments jaunes au sens strict (stricto sensu). Le mot flavonoïde fait référence à une variété très étendue de composés naturels de la famille des polyphénols. Selon MOUFFOK (2011) et MOHAMMEDI (2011), ils sont considérés comme des pigments presque universels présents dans les végétaux. Les flavonoïdes sont présents dans de nombreuses plantes, en particulier chez les plantes supérieures (BRUNETON, 1993). Ils sont présents, de façon très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être trouvés dans différents organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits, ainsi que dans le miel (VAN ACKER et al., 1996). On les retrouve principalement dans les familles des Polygonacées, Rutacées, Astéracées, Apiacées et des Légumineuses (BRUNETON, 1993).

Les flavonoïdes sont des substances cristallisées d'une couleur allant du blanc ivoire au jaune vif (PARIS & HURABIELLE, 1981). Ces composés phénoliques jouent un rôle dans la coloration des organes (BRUNETON, 2006). Ils se trouvent dans tous les organes aériens, en particulier les organes jeunes (jeunes feuilles, boutons floraux), où ils se trouvent dans les tissus superficiels (assise palissadique) et parfois dans les racines (ROUX, 2007). Les flavonoïdes hétérosides sont dissous au niveau cellulaire dans le suc vacuolaire des fleurs, des feuilles, des tiges ou des racines. Dans les feuilles, les écorces et les bourgeons floraux, les flavonoïdes aglycones sont principalement présents sous forme de cires (PARIS & HURABIELLE, 1981).

Les flavonoïdes jouent un rôle essentiel dans la couleur des plantes, en particulier celle des fleurs, ce qui attire les insectes et les oiseaux pollinisateurs, ce qui favorise la reproduction des espèces. Les flavonoïdes ont également un effet protecteur en dissuadant certains insectes en raison de leur goût désagréable. Ils ont aussi la capacité de réguler la croissance et le développement des plantes en collaborant de manière complexe avec différentes hormones végétales de développement. Certains sont des phytoalexines synthétisées par la plante en grande quantité en cas d'infection par des champignons ou des bactéries (CHEBIL, 2006).

Ces molécules ont un faible poids moléculaire, se présentant sous la forme de 15 atomes de carbone disposés de la manière suivante : Les composantes C₆-C₃-C₆ sont formées de deux noyaux aromatiques A et B, reliés par un pont de 3 carbones, généralement organisé en un hétérocycle (Fig. 01). En termes structuraux, les flavonoïdes sont classés en différentes catégories de molécules (MOUFFOK, 2011 ; MOHAMMEDI, 2011). On retrouve ces différentes substances à la fois sous



forme libre ou sous forme de glycosides (VAN ACKER et al., 1996). Les hétérosides ou flavonoïdes sont généralement présents sous forme de génines dérivées de la phénylchromone (flavones vraies) (PARIS & HURABIELLE, 1981).

Au sens large (*lato sensu*), les flavonoïdes englobent tous les composés en C₆ - C₃ - C₆, y compris les dérivés du phényl-chromane ou des flavannes. Ces composés incluent :

- Les catéchols (catéchines) ou les dérivés de l'hydroxy-3 flavanne.
- Les pro-anthocyanidols (anciennement connus sous le nom de leuco-anthocyanes) ou les dérivés de la flavanne di-hydroxy-3,4. Paris et Hurabielle, 1981.

À ce jour, plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés. Ces composés partagent une origine biosynthétique commune et possèdent tous un squelette de base constitué de quinze atomes de carbone, formé de deux unités aromatiques, avec deux cycles en C₆ (A et B) reliés par une chaîne en C₃ (BRUNETON, 1999).

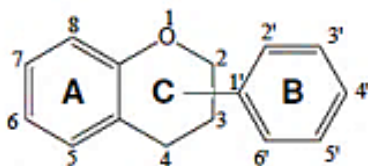


FIG. 01 : Squelette de base commun aux flavonoïdes (ANTHONI, 2007).

Un intermédiaire commun à tous les flavonoïdes est la 2',4,4',6'-tétrahydroxychalcone. Ce précurseur est le résultat de la condensation de trois molécules d'acétylcoenzyme A, qui constitueront le cycle A, et d'une molécule de 4-hydroxycinnamatecoenzyme A, qui forme les cycles B et C. La chalcone synthase catalyse ce mécanisme. Selon CHEBIL (2006), la chalcone isomérase cyclise cette chalcone pour former la (S)-4', 5, 7-trihydroxyflavanone, ce qui constitue le squelette de base des flavonoïdes.

Ces composés phénoliques se caractérisent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles) présents sur les deux cycles aromatiques ainsi que sur la chaîne en C₃ intermédiaire ou l'hétérocycle (CHEBIL, 2006).



En fonction du degré d'oxydation du noyau pyranique central (Fig. 02), les flavonoïdes peuvent être classés comme suit : flavones, flavonols, flavanones, dihydroflavonols, isoflavones, isoflavons, flavanes, flavanols et anthocyanines. De plus, le noyau pyranique central peut être ouvert pour former une chalcone, puis recyclisé en un noyau furanique, connu sous le nom d'aurone (BRUNETON, 1999).

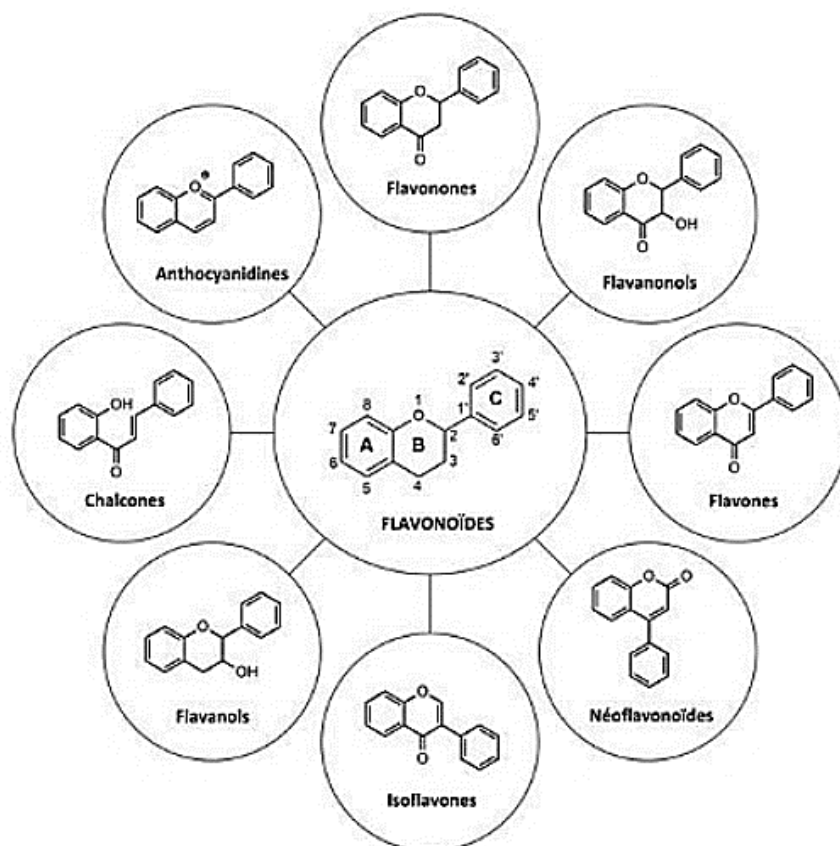


FIG. 02 : Les différentes classes de flavonoïdes (ROUSSERIE, 2019).

Les hétérosides sont solubles dans l'eau, l'alcool et d'autres solvants organiques polaires, mais insolubles dans les solvants organiques apolaires. Les génines, quant à elles, présentent une faible solubilité dans l'eau et sont solubles dans l'éther. Les flavonoïdes se dissolvent dans des solutions alcalines (comme l'ammoniac ou la potasse), produisant une coloration jaune qui disparaît avec l'ajout d'un acide. Ils présentent également un spectre d'absorption dans l'ultraviolet (PARIS & HURABIELLE, 1981).



Les flavonoïdes suscitent un intérêt thérapeutique qui remonte à la découverte de la vitamine C par Szent Györgyi (Prix Nobel, 1937), chercheur à l'Université de Szeged (Hongrie). Ce dernier a observé que les symptômes hémorragiques du scorbut, liés à la fragilité ou à l'hyperperméabilité des vaisseaux, étaient soulagés par des extraits de paprika ou de jus de citron, riches en vitamine C et en flavonoïdes. Cette action a été désignée sous le nom de propriété vitaminique P (P pour "perméabilité") (HEIM, TAGLIAFERRO & BOBILYA, 2002).

Ces dernières années, une attention particulière a été portée aux propriétés antioxydantes des flavonoïdes, qui sont attribuées à leur capacité à piéger directement les radicaux libres, à chélater les ions métalliques impliqués dans la production d'espèces oxygénées réactives (EOR) via les réactions de Fenton et Haber-Weiss, à inhiber certaines enzymes, notamment les oxydases, à activer les enzymes antioxydantes et à réduire les radicaux α -tocophéryl (COTELLE, 2001 ; LIN & WENG, 2006 ; HEIM et al., 2002).

D'autres études ont démontré que les flavonoïdes sont de bons inhibiteurs d'enzymes responsables de la production de radicaux libres, telles que la xanthine oxydase, la cyclooxygénase et la lipooxygénase (COS et al., 1998 ; LANDOLFI, MOWER & STEINER, 1984). Les flavonoïdes (Fl-OH) possèdent également la capacité thermodynamique de réduire des radicaux libres oxydants tels que le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène (COS et al., 1998).

L'activité antimicrobienne des flavonoïdes a été confirmée par de nombreuses études. Cette activité est principalement attribuée à la capacité de ces molécules à inhiber l'expression de l'ADN ainsi que la synthèse de certaines enzymes et protéines membranaires des microorganismes, tels que les champignons, les bactéries et les virus. Ainsi, les flavonoïdes jouent un rôle important dans la lutte contre les maladies infectieuses qui ont décimé des populations pendant des décennies (PARIS & HURABIELLE, 1981).

Les plantes contenant des roténoïdes, notamment la roténone, ont été utilisées depuis longtemps pour lutter contre les parasites. La roténone est un principe actif employé par les vétérinaires dans certaines formulations acaricides destinées à un usage externe pour les chats, les chiens, les ruminants et les porcs (PARIS & HURABIELLE, 1981).



Les flavonoïdes exercent également un effet bénéfique contre la dégénérescence neuronale. Ils protègent les neurones du stress oxydatif en inhibant l'activation de la microglie et des astrocytes, qui sont impliqués dans la neuro-inflammation. Par conséquent, ils contribuent à la lutte contre diverses maladies dégénératives, telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (AKROUM, 2011).

Au niveau cardiovasculaire, ce sont principalement les anthocyanes, et non les autres flavonoïdes, qui exercent un effet protecteur (TAVANI et al., 2006). Plusieurs études épidémiologiques indiquent que l'apport en flavanones, présents dans les agrumes, réduit l'incidence du cancer de l'œsophage (ROSSI et al., 2007). En revanche, ce sont surtout les flavones et les flavanols qui jouent un rôle actif dans la prévention du cancer du rein (BOSETTI et al., 2007).

Parmi les flavonoïdes les plus efficaces sur les cellules tumorales figurent la quercétine et la catéchine, qui se retrouvent en grande quantité dans les aliments. La quercétine contribue à prévenir la cancérogénèse, en particulier pour le cancer de la peau et du côlon. La catéchine, pour sa part, agit comme un inhibiteur de certaines réactions d'oxydation qui génèrent de l'ADN anormal (AKROUM, 2011).

Le terme "Agave", dérivé du grec « agauê », signifie l'admirable. Carlos Linnaeus est le premier à décrire le genre Agave en 1753, dans son ouvrage « Espèce Agave americana » (VALENZUELA, 2003).

Dans la Grèce antique, Agavé était la mère du roi de Thèbes. Ce dernier emprisonna Dionysos, qui parvint à s'échapper. Pour se venger, Dionysos frappa Agavé de folie. Sous cette influence, Agavé tua son fils en le déchiquetant. En punition, elle fut transformée en cette plante qui meurt à la naissance de son unique fils (VALENZUELA, 2003).

L'Agave, également connu sous les noms d'Agave américaine, d'Aloès américain, de Pita, de Maguey ou encore de Century plant (HAMMUEL et al., 2011), est une plante monocotylédone actuellement classée dans la famille des Agavacées (GARCIA & GALVAN, 1995 ; OJEDA REVAH & LUDLOW, 1995 ; EGUIARTE, 1995).



Les Agavacées (Agavaceae) constituent une famille de plantes pérennes (CONZATTI, 1947 ; GENTRY, 1978, 1982) qui peuvent être subligneuses ou charnues, ainsi que des arbustes monocaules avec un stipe lignifié portant une rosette de grandes feuilles terminales, souvent fibreuses et terminées par une épine (Fig. 03), (STARR, 2012 ; CONZATTI, 1947 ; GENTRY, 1978, 1982). Fréquemment, des xérophytes rhizomateuses, Selon STARR (2012), les roses basales ou stipitées peuvent être sessiles, rigides, rubanées ou linéaires, souvent succulentes, inermes et barbelées, et elles restent persistantes. Les fleurs sont situées à la fin de la tige, sous forme de rhizome, de couleur jaune-vert, ovaires infères (CONZATTI, 1947 ; GENTRY 1978, 1982).

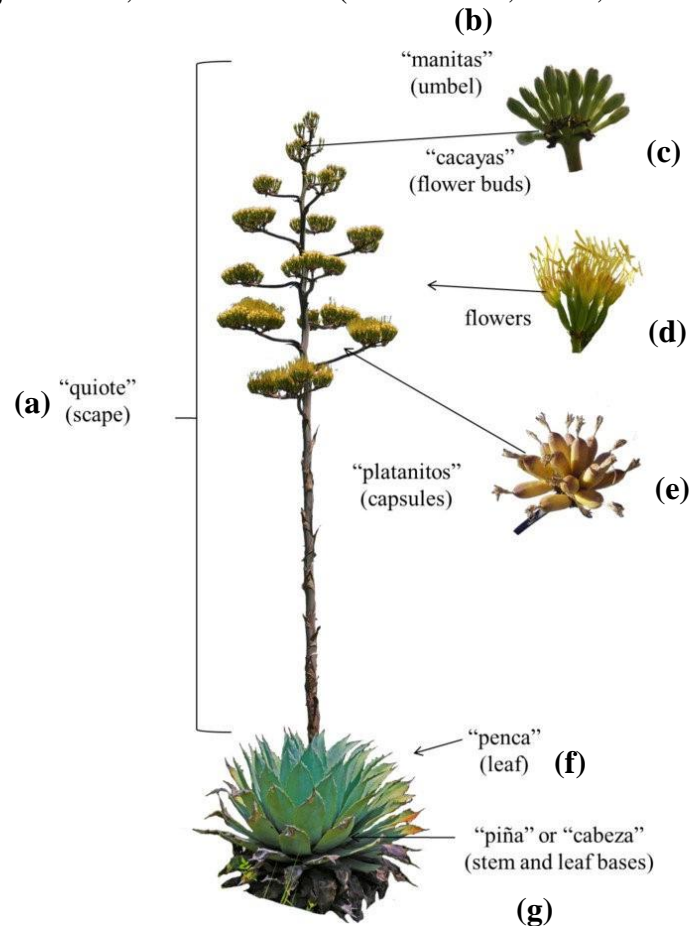


FIG.03: Les différentes parties de l'*Agave americana var americana* L. (DELGADO-LEMUS et al., 2014).

(a) : Pédoncule floral ; (b) : Ombelle ; (c) : Boutons floraux ; (d) : Fleurs ;
(e) : Capsules ; (f) : Feuilles ; (g) : Rosette de grandes feuilles terminales.



Les espèces d'Agave sont généralement fleuries à environ sept à dix ans et meurent peu après (Fig. 04). Selon GENTRY (1982), les inflorescences de ces espèces sont parmi les plus grandes du règne végétal, pouvant atteindre 10 m au-dessus du sol et mesurant 8 cm de long. Elles produisent, comme les autres espèces d'Agave, de grandes quantités de pollen et de nectar.

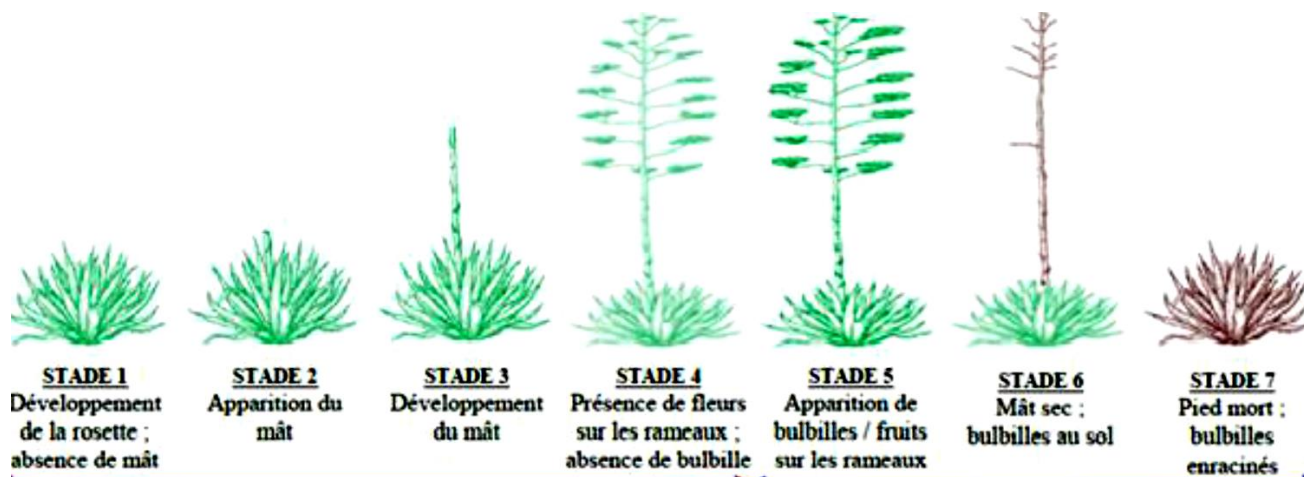


FIG. 04: Cycle biologique de l'Agave (HIVERT ,2012)

Toutefois, l'inflorescence est fréquemment un long racème ou d'une panicule terminale. Les fleurs sont trimères, actinomorphes, diplostémones, et peuvent être hypo- ou épigynes, bisexuées. Les tépales pétaloïdes sont soudés en un tube plus ou moins long, et les anthères présentent une déhiscence longitudinale. L'ovaire peut être infère ou supère, triloculaire, avec parfois un style absent, et comporte trois stigmates. La placentation est axile, avec plusieurs ovules par loge. Le fruit est une capsule loculicide ou une baie, et les graines possèdent un albumen abondant (STARR, 2012).

Le cycle de floraison est hapaxanthique et se déroule en été, avec une pollinisation principalement par les chauves-souris. La reproduction des Agaves peut se faire soit par rejets (reproduction asexuée), soit par des graines (reproduction sexuée) (SPICNIGER et al., 2004).

Les Agaves cultivées au Mexique sont généralement très volumineuses par rapport à la surface foliaire et leurs feuilles contiennent un tissu parenchymateux chlorophyllien (chlorenchyme épais). La cuticule cireuse externe est épaisse et présente une faible densité de stomates. Les tissus charnus, qualifiés de succulents, sont riches en eau. De plus, les racines se trouvent principalement



dans les premiers centimètres du sol, ce qui leur permet d'absorber rapidement l'humidité. Elles possèdent également des rejetons succulents (NOBEL et al., 2002).

Il existe environ 300 espèces d'Agave, mais leur classification soulève des difficultés en matière de caractérisation et de nomenclature. Le Mexique est le territoire où il y a la plus grande diversité d'Agavacées, avec près des trois quarts de ses variétés botaniques. Certaines d'entre elles sont cultivées, principalement dans les régions de Jalisco, Veracruz, Guerrero et Oaxaca (AGUIRRE, CHASCAS & FLORES, 2001).

Les origines des Agavacées remontent à près de 14 millions d'années, et cette famille a connu de nombreux changements dans sa classification. Parmi les 342 espèces d'Agavacées reconnues dans le monde, 258 se trouvent au Mexique. Le genre *Agave* comprend 207 variétés, dont 161 sont présentes au Mexique. Différentes nomenclatures existent pour classer ces variétés (VALENZUELA, 2003).

ENDLICHER, un botaniste autrichien, a suggéré la famille des Agavacées en (1836) (GARCIA & GALVAN, 1995).

Bentham et Hooker, de 1883 à 1930, se basent sur la classification traditionnelle et classifient les espèces avec un ovaire infère, dont le genre *Agave*, dans la famille des Amaryllidacées, tandis que celles à ovaire supère sont placées dans la famille des Liliacées (GARCIA & GALVAN, 1995).

En 1934, Hutchinson crée l'ordre des Agavales et étend la famille des Agavacées à 19 genres regroupés en six tribus, dont l'une est celle de l'*Agave* (IRISH M. & IRISH G., 2000).

Position systématique classique selon Cronquist (HAMMUEL, et al., 2011).

- **Règne :** Plantae.
- **Division :** Magnoliophyta
- **Classe :** Liliopsida
- **Sous/Classe :** Liliidae
- **Ordre :** Liliales
- **Famille :** Agavaceae
- **Genre:** *Agave*
- **Espèce:** *americana*
- **Variétés:** *Agave americana* var. *americana* L.



Dans la classification botanique traditionnelle, certains auteurs classent les Agaves dans l'ordre des Liliales, sous-l'ordre des Liliées, aux côtés d'autres familles telles que les Liliacées et les Amaryllidacées (ALONSO GUTIÉRREZ, 2005).

- **Règne :** Eucaryotae
- **Sous-règne :** Plantae
- **Phylum (Division) :** Spermatophyta
- **Sous-phylum :** Angiospermae
- **Classe :** Monocotylédones
- **Ordre :** Liliales
- **Famille :** Amaryllidacées ou Agavacées
- **Genre :** Agave
- **Espèce:** *Agave americana* L. (ALONSO GUTIÉRREZ, 2005).

Après 1960, les scientifiques ont proposé divers arrangements pour les familles des Liliacées, Amaryllidacées et Agavacées. Sato (1935, 1942) ainsi que Gomez-Pompa, Villalobos-Pietrini et Chimal (1971) ont suggéré l'unification des familles Liliacées et Amaryllidacées au sein de la famille Amaryllidacées. Cronquist (1968, 1981) a également proposé cette union, mais sans inclure les Agavacées. Porter (1979) et Benson (1967) ont recommandé de séparer les Amaryllidacées et Liliacées, en excluant les Agavacées (HAMMUEL et al., 2011).

Dans un nouveau système de classification, Dahlgren et al. (1985) ont proposé un arrangement plus strict des Agavacées, les regroupant en deux sous-familles : les Yuccoïdes, avec un ovaire supère, et les Agavoidées, avec un ovaire infère, comprenant le genre Agave. Ainsi, la classification des espèces d'Agave a évolué, et il est désormais largement reconnu que le genre Agave appartient à la famille des Agavacées (GARCIA & GALVAN, 1995).

Au début de ce siècle, les Agavacées étaient encore reconnues (EGUIARTE et al., 2000 ; APG System II, 2003). Cependant, elles ont ensuite été intégrées dans une famille plus large, les Asparagacées Juss. (APG System III, 2009 ; APG System IV, 2016). Par ailleurs, le concept d'Agave a été élargi pour inclure plusieurs genres traditionnellement considérés comme morphologiquement distincts, tels que Manfreda, Polianthes et Prochnyanthes (THIEDE & EGGLI, 2020).

**Classification moderne selon Tela-Botanica** (Version : 01 juin 2024):

- **Cladus :** Plantae
- **Cladus :** Plasmodesmophytes
- **Cladus :** Embryophytes
- **Cladus :** Stomatophytes
- **Cladus :** Hemitracheophytes
- **Cladus :** Tracheophytes
- **Cladus :** Euphyllophytes
- **Cladus :** Spermaphytes
- **Cladus :** Angiospermes
- **Cladus :** Monocotyledones
- **Ordre :** Asparagales
- **Famille :** Asparagaceae
- **Genre :** Agave
- **Espèces :** *Agave americana* L.
- **Variété :** *Agave americana* L. var. *americana*

Le Mexique est le centre d'origine et de diversité de la famille des Agavacées (GARCIA & GALVAN, 1995), à laquelle appartient le genre Agave. Parmi les 166 espèces du genre Agave, 125 sont naturellement présentes dans les régions arides et semi-arides du Mexique (GOOD-ÁVILA et al., 2006). Toutefois, certaines de ces espèces ont été introduites dans plusieurs pays à travers le monde (ÁVILA-REYES et al., 2010).

Cette plante se trouve également en Europe, où elle a été introduite intentionnellement pour ses caractéristiques ornementales, et elle s'est naturalisée dans les pays du pourtour méditerranéen ainsi qu'en Afrique. Endémique au continent américain, elle s'étend du sud du Canada jusqu'au nord de l'Amérique du Sud, y compris les îles Caraïbes, en particulier au Mexique et dans toute l'Amérique centrale (GARCIA & GALVAN, 1995).

Le développement des Agaves se fait sur des sols argileux, calcaires et rocheux, et ils se développent principalement sur des sols bien drainés (HAMMUEL et al., 2011). Ces sols sont riches en nutriments, notamment en azote, ce qui semble être le facteur limitant pour l'activité métabolique de certains Agaves (WALTER, 1997).

Ces plantes sont relativement sensibles à la salinité, mais peu affectées par des concentrations élevées de calcium, de cuivre ou de zinc dans les sols. Leur adaptation aux sols riches en calcium



se traduit par une accumulation d'oxalate de calcium, similaire à celle observée chez d'autres plantes succulentes (WALTER, 1997).

L'Agave peut s'épanouir dans une grande variété de sols, y compris dans des environnements arides, grâce à sa résistance à la sécheresse. Elle colonise également les terrains vagues et les bords de routes, et est capable de se propager dans les oliveraies et les garrigues (HAMMUEL et al., 2011).

Selon SCHMELZER & GUIB-FAKIM (2008), l'Agave américaine renferme des saponines, des saponines stéroïdales, de l'acide oxalique, des fructanes et des vitamines telles que la vitamine pro-A, B, C, D et K.

Pendant de nombreux siècles, les Amérindiens ont exploité les Agaves à diverses fins, notamment comme fourrage, nourriture et boissons, médicaments, matériaux de construction, tissage et fabrication de papier, entre autres. Aujourd'hui, ces plantes sont appréciées pour leurs valeurs ornementales, économiques et médicinales (STARR, 2012).

Riche en fibres et en saponines, l'Agave américaine est utilisée pour produire de la fibre végétale et des savons (HAMMUEL et al., 2011). On en extrait également un sirop appelé nectar d'Agave, qui sert d'édulcorant pour les diabétiques en raison de son pouvoir sucrant et de son faible index glycémique (STARR, 2012).

Les feuilles de l'Agave sont employées pour traiter la constipation et les gaz excessifs, ainsi que comme diurétiques. Elles contiennent des enzymes qui convertissent l'angiotensine, offrant un remède puissant contre l'hypertension. Le jus des feuilles peut être appliqué sur les plaies et les coupures pour favoriser la cicatrisation. Des études ont également révélé des effets molluscicides et insecticides (STARR, 2012).

Les racines de l'Agave sont utilisées pour traiter les articulations arthritiques et peuvent servir de substitut à la salsepareille dans le traitement de la syphilis (STARR, 2012).

Quasiment toutes les espèces d'Agave ont servi de source de matériaux de construction, de substances médicinales, d'éléments rituels et de produits comestibles pour les différentes cultures anciennes et modernes de la Més-Amérique (GENTRY, 1982).



Actuellement, les produits économiques les plus significatifs dérivés de l'Agave incluent des boissons alcoolisées distillées telles que le mescal, la tequila et la bacanora (ALMARAZ-ABARCA et al., 2011 ; CASTILLO & COELHO, 2007 ; GUTIÉRREZ, ACEDO, & VALENZUELA, 2007).

Pour les cultures du continent Amérindien, les Agaves étaient, avant que le maïs ne devienne l'aliment indispensable, la principale source d'hydrates de carbone (ZIZUMBO-VILLAREAL & COLUNGA-GARCÍA MARÍN, 2008).

Les pédoncules d'inflorescence de plusieurs espèces d'Agave sont encore consommées comme aliment sucré dans de nombreuses régions du Mexique (GENTRY, 1982). Par ailleurs, certaines recherches ont été réalisées sur leurs propriétés comestibles (COLUNGA-GARCÍA MARÍN et al., 1993).

VAUGHN (1974) a signalé des espèces d'Agave parmi les restes floraux des coprolithes trouvés dans des sites archéologiques américains, car la plupart des espèces de ce genre sont également comestibles (GENTRY, 1982)

Afin de caractériser les stades de l'Agave et comparer sa productivité, NOVEL et VALENZUELA en (1987) ont étudié l'évolution de la répartition pondérale des matières sèches de cinq parties de la plante : les feuilles vivantes (cône central), les feuilles sèches, la tige, les racines et les rejetons ou rhizomes. Il est évident que le poids de la tige augmente avec l'âge de la plante ; et la qualité de l'Agave mûre est liée à la concentration en sucre ainsi qu'à l'augmentation de la matière sèche dans la tige (AGUIRRE et al., 2001).

Cependant, la sève de l'*Agave americana* L. peut provoquer une dermatite de contact irritante, entraînant des rougeurs et des cloques dans un délai d'une à deux semaines. Les épisodes de démangeaisons peuvent se reproduire pendant un an par la suite, même sans trace visible d'éruption cutanée. Cette irritation est en partie due à l'oxalate de calcium, qui, en pénétrant à travers la peau, cause des dommages vasculaires. En revanche, les parties séchées de la plante peuvent être manipulées sans danger. Il convient de noter que les épines, en particulier celles situées à la pointe, peuvent causer des blessures (CHERPELIS & FENSKE, 2000 ; GENILLIERFOIN & AVENEL AUDRAN 2007).



Les infections microbiennes sont des maladies causées par le développement de bactéries ou de levures chez l'Homme ou les animaux, certaines espèces étant pathogènes. Au cours de la dernière décennie, l'étude des microbes a suscité un grand intérêt, tant sur les plans biologique, nosologique que thérapeutique. Cet intérêt accru pour les maladies microbiennes est en grande partie dû à l'émergence de souches résistantes aux médicaments couramment utilisés (BALKIS et al., 2002 ; JUJ et al., 2002 ; RAMAGE et al., 2002 ; RODERO et al., 2002), ainsi qu'aux complications que ces germes peuvent engendrer chez des patients présentant des profils cliniques spécifiques (HIRSCH & GYNAKOL, 1985).

Ainsi, les infections microbiennes, autrefois considérées comme banales, sont désormais classées parmi les infections graves, pouvant entraîner un taux élevé de mortalité et de morbidité chez les personnes immunodéprimées et les diabétiques. Bien que la chimiothérapie antimicrobienne ait démontré une grande efficacité contre les infections superficielles, les infections profondes restent les plus difficiles à traiter en raison de la cytotoxicité des antimicrobiens systémiques. Les microorganismes les plus fréquemment rencontrés incluent *E. coli*, ainsi que les genres *Shigella*, *Salmonella* et *Yersinia*, tandis que *Vibrio cholerae* est rarement observé et se trouve uniquement dans des zones spécifiques (STEPHEN, 2001).

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car elles ne possèdent pas de membrane nucléaire. Cette caractéristique les distingue des autres organismes unicellulaires, qui appartiennent aux eucaryotes (champignons, algues, protozoaires). Les bactéries se divisent en deux groupes : les bactéries véritables (Bacteria) et les bactéries primitives (Archaea). Toutes les bactéries impliquées dans des pathologies appartiennent au groupe des Bacteria.

Généralement, les bactéries ont un diamètre inférieur à 1 μm et peuvent être observées au microscope optique, soit à l'état frais, soit après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'à l'aide de la microscopie électronique (NAUCIEL & VILDE, 2005).

Les bactéries sont ubiquitaires et se trouvent dans tous les types de biotopes : sol, air, eau, ainsi que sur les végétaux et les animaux. Cependant, parmi ces nombreuses espèces bactériennes,



certaines sont pathogènes et responsables de maladies infectieuses telles que le choléra, la syphilis et la tuberculose (HAHN et al., 2003 ; ATI, 2010).

Les antibiotiques ont vu le jour dans les années 1930, notamment avec la découverte de la pénicilline par ALEXANDER FLEMING en 1928 et de la streptomycine par SELMAN WAKSMAN en 1943. Leur utilisation s'est rapidement répandue, allant jusqu'à devenir abusive (AFSSAPS, 1999). Les antibiotiques sont des molécules produites par des champignons, des bactéries ou synthétisées chimiquement, capables d'inhiber la réplication d'une bactérie (antibiotique bactériostatique) ou de la tuer (antibiotique bactéricide) (GRAS & CHOUTET, 2010).

Les principales cibles des antibiotiques incluent la paroi bactérienne (bêta-lactamines, glycopeptides), la synthèse de l'ADN (quinolones, nitro-imidazolés), la synthèse protéique (macrolides, aminosides, cyclines) et l'inhibition compétitive (sulfaméthoxazole et triméthoprime) (GRAS & CHOUTET, 2010).

Ainsi, les antibiotiques ont été classés selon leur mode d'action en:

- Antibiotiques inhibiteurs des synthèses du peptidoglycane.
- Antibiotiques actifs sur les enveloppes membranaires.
- Antibiotiques inhibiteurs des synthèses protéiques.
- Antibiotiques inhibiteurs des acides nucléiques (LEMINOR & VERON, 1998).

L'utilisation des antibiotiques entraîne, dans la grande majorité des cas, la sélection de populations microbiennes résistantes. Cette résistance résulte de mutations chromosomiques ou de l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, les phages, les transposons et les intégrons. Face à ces résistances, des recherches ont été menées pour trouver de nouveaux agents antimicrobiens plus efficaces que les médicaments synthétiques, tout en étant mieux tolérés par l'organisme et sans effets délétères sur la santé humaine (GARCIA-RUIZ et al., 2008 ; KEMPF & ZEITOUNI, 2009).

Face aux préoccupations concernant les effets indésirables des molécules synthétiques utilisées pour lutter contre les infections bactériennes, il est crucial de trouver une alternative aux



antibiotiques classiques. Une approche courante consiste à rechercher des substances biologiquement actives d'origine végétale, ce qui représente une alternative prometteuse dans les soins primaires et pour le développement de médicaments traditionnellement améliorés.

De nombreux chercheurs s'intéressent tout particulièrement aux plantes médicinales, reconnues pour leur richesse en antioxydants naturels, tels que les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins, qui possèdent des activités antimicrobiennes. Ainsi, l'exploitation de nouvelles molécules bioactives aux effets secondaires limités ou inexistantes, issues de sources naturelles, et leur adoption comme alternatives thérapeutiques aux molécules synthétiques sont devenues des objectifs prioritaires pour la recherche scientifique ainsi que pour les industries alimentaire et pharmaceutique (PRASAD & SEENAYYA, 2000).

De nombreux groupes de recherche ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales telles que le fenouil (*Foeniculum vulgare*), la menthe poivrée (*Mentha piperita*) et le thym (*Thymus vulgaris*). Ils ont constaté que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries, mais aussi contre les champignons, les levures et les virus (JÜRGEN et al., 2009).

D'autres chercheurs ont franchi une étape supplémentaire en isolant et en identifiant les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes. Cette avancée constitue une plateforme pour de nombreuses applications, notamment dans l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative et la thérapie naturelle (HUANG et al., 2008).

Les extraits de plantes présentent plusieurs modes d'action sur différentes souches bactériennes et sont efficaces contre un large éventail de microorganismes pathogènes et non pathogènes (DORMAN, 2000). En général, leur action se déroule en trois phases:

- Attaque de la paroi bactérienne par l'extrait végétal, entraînant une augmentation de la perméabilité et la perte des constituants cellulaires.
- Acidification de l'intérieur de la cellule, ce qui bloque la production d'énergie cellulaire et la synthèse des composants structurels.
- Destruction du matériel génétique, menant à la mort de la bactérie (HAMMER, 1999).



L'activité biologique d'un extrait végétal est déterminée par sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) ainsi que par leurs effets synergiques (DORMAN, 2000).

Plusieurs méthodes sont employées pour évaluer le pouvoir antibactérien des extraits de plantes, parmi lesquelles :

- La méthode de diffusion à partir de disques imprégnés (Méthode de Kirby–Bauer) : Cette méthode consiste à imprégner des disques de papier avec une quantité définie d'agent antibactérien, puis à les placer sur un milieu de gélose uniformément ensemencé avec l'organisme cible. Un gradient de concentration de l'antibiotique se forme par diffusion à partir du disque, et la croissance de l'organisme est inhibée à une distance du disque, ce qui est lié à la sensibilité de ce dernier.
- La méthode de diffusion à partir des puits : Le principe de cette méthode est similaire à celui de la méthode des disques. Elle consiste à réaliser des puits de 2,5 mm de profondeur dans la gélose, qui sont ensuite remplis d'extraits ou d'antibiotiques à tester (CARBONNELLE, 1988 ; COLLINS, 1976 ; VANDEPITTE et al., 1994).
- La méthode de dilution : Les techniques de dilution peuvent être appliquées en milieu solide ou liquide. Leur principe consiste à mettre en contact un inoculum bactérien standardisé avec des concentrations croissantes de la substance antibactérienne testée, selon une progression bien définie, afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de cette substance (BURNICHON & TEXIER, 2003).

A côté des infections microbiennes, les radicaux libres sont associés à l'étiologie d'un grand nombre de pathologies, devenant ainsi l'un des principaux problèmes de santé publique (TIWARI, 2005). Les termes espèces réactives d'oxygène (ERO), stress oxydatif et antioxydants sont de plus en plus courants, tant parmi les professionnels que dans le grand public. Parmi toutes les espèces radicalaires qui peuvent se former dans les cellules, il est important de distinguer un groupe restreint de composés jouant un rôle particulier en physiologie, que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, appelés radicaux secondaires, se forment par la réaction de ces radicaux primaires avec des composés biochimiques de la cellule (FAVIER, 2003).



L'oxygène (O_2) est l'élément primordial pour les organismes multicellulaires, jouant un rôle essentiel dans le fonctionnement normal de tout le système aérobie (DALTON, 1995). Au milieu des années 1950, GERSCHMAN et al. (1954) ont été parmi les premiers à démontrer que l'oxygène, bien que crucial pour la vie, peut également être toxique pour l'organisme (DEFRAIGNE & PINCEMAIL, 2008). Il est impliqué dans divers processus d'oxydation pouvant entraîner des effets néfastes, tels que le stress oxydatif (SANCHEZ-MORENO, 2002). Inspiré par ces travaux, HARMAN (1956) a proposé la "Free Radical Theory of Ageing", suggérant que la production de radicaux libres—des entités chimiques très instables et réactives en raison d'un électron libre dans leur structure—est à l'origine du processus de vieillissement cellulaire (DEFRAIGNE & PINCEMAIL, 2008).

En 1991, SIES a défini le stress oxydant comme « l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées activées, résultant d'un déséquilibre dû soit à une production accrue d'espèces oxygénées activées (EOA), soit à une diminution de la capacité de défense antioxydante » (SIES, 1991). Cependant, SANCHEZ-MORENO (2002) le décrit comme « un déséquilibre entre la production et l'élimination des métabolites réactifs de l'oxygène et de l'azote, en faveur de leur production, entraînant des dommages potentiels et des dégâts cellulaires irréversibles » (SANCHEZ-MORENO, 2002).

Les radicaux libres sont des sous-produits métaboliques des processus oxydatifs et représentent des espèces chimiques hautement réactives et potentiellement nuisibles (HALLIWELL & GUTERIDGE, 1999). Ils se définissent comme tout atome, groupe d'atomes ou molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés, dits « célibataires », sur la couche périphérique du squelette moléculaire. Ces électrons sont générés par un apport d'énergie suffisant pour se dépareiller, ce qui les pousse à attirer les électrons d'autres atomes et molécules afin de gagner en stabilité. Ce processus déstabilise d'autres molécules et initie une réaction en chaîne, comme cela se produit typiquement lors de la peroxydation lipidique (FAVIER, 2003).

Les radicaux libres sont considérés comme des déchets du métabolisme cellulaire (Fig. 05). Les espèces réactives de l'oxygène comprennent des ERO, tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) produit lors du métabolisme mitochondrial, ainsi que le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), qui réagit avec diverses molécules, y compris l'ADN, les glucides, les nucléotides et les protéines, pouvant causer des lésions de nécrose. Ce dernier est un dérivé de l'anion superoxyde. D'autres radicaux incluent le



radical hydroperoxyde (HO_2^\bullet), le radical peroxyde (RO^\bullet) et le radical alkoxyde (RO°) (FAVIER, 2003).

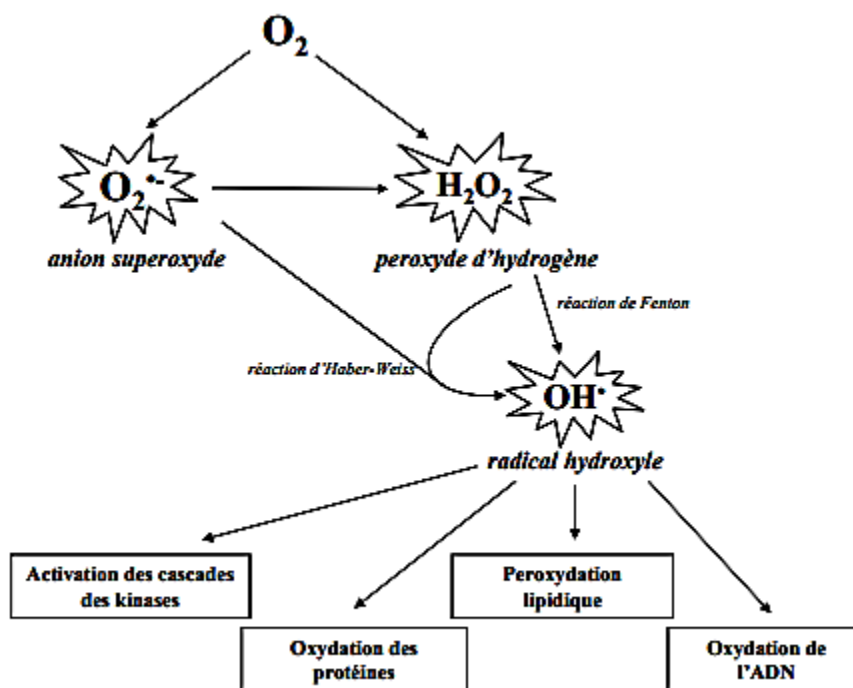


FIG.05: Schéma des différentes formes de ROS (Garait, 2006).

D'autres espèces dérivées de l'oxygène sont non radicalaires, comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochloreux (HOCl), l'ozone (O_3), l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) et le peroxydinitrite (ONOO^-). Bien que ces composés ne soient pas réactifs, ils peuvent servir de précurseurs pour la formation de radicaux (DESCEEMAERKER, 2004).

Par ailleurs, tous les radicaux libres ne proviennent pas de l'oxygène ; les espèces libres non oxygénées résultent de réactions entre certaines molécules et les ERO. Ces espèces peuvent, à leur tour, réagir avec d'autres molécules, entraînant une multiplication des réactions d'oxydation et la propagation de dommages oxydatifs (DESCEEMAERKER, 2004).

On distingue deux types de production de radicaux libres (Fig. 06) :

- Production endogène : Cela inclut les réactions enzymatiques (comme celles impliquant la NADPH oxydase, la lipoxygénase et la xanthine oxydase, une enzyme présente dans le



foie), ainsi que des processus tels que la respiration mitochondriale, la phagocytose, l'activité des peroxysomes, l'action des métaux de transition, l'exercice physique, l'inflammation et le choc, entre autres.

- Production exogène : Cela englobe des facteurs externes tels que la pollution, l'alcool, les médicaments, l'exposition au soleil, la fumée de tabac, les rayons UV et divers produits chimiques (FAVIER, 2003).

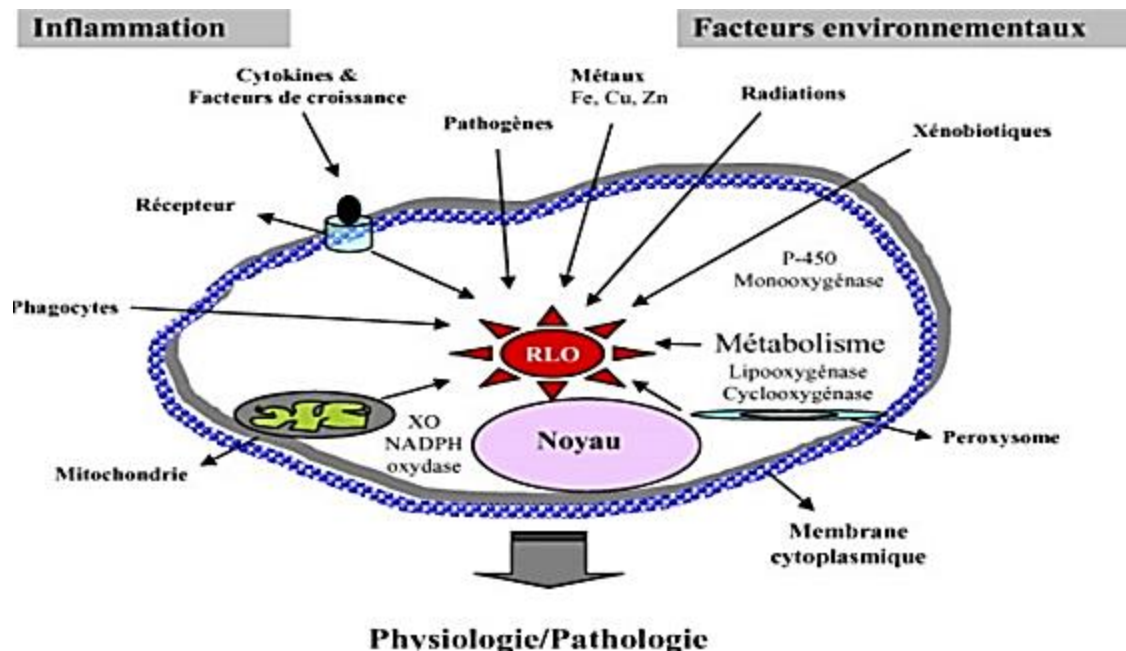


FIG.06: Origines extra- et intracellulaires des radicaux libres dérivés de l'oxygène (AFONSO et al., 2007).

Cependant, les radicaux libres ne sont pas toujours nuisibles (RAHMAN, 2002). Les phénomènes radicalaires de base jouent un rôle essentiel dans le bon fonctionnement de l'organisme humain (VALKO et al., 2006). En effet, ils aident le corps à contrôler la tonicité des muscles lisses, à combattre l'inflammation et à lutter contre les bactéries (RAHMAN, 2002). L'altération des composants cellulaires et des structures tissulaires se produit lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente de manière anormale, dépassant ainsi la capacité des antioxydants disponibles (VALKO et al., 2006).



L'effet bénéfique des radicaux libres repose sur un équilibre délicat (Fig. 07), qui peut être perturbé par de nombreux facteurs endogènes et exogènes (RAHMAN, 2002). Ce déséquilibre peut entraîner une agression connue sous le nom de "stress oxydatif" (VALKO et al., 2006).

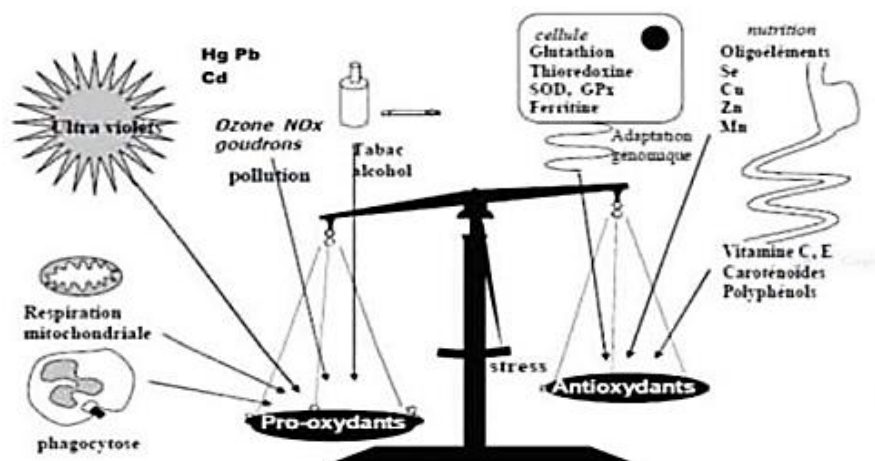


FIG.07: La balance d'équilibre entre les systèmes pro-oxydants et antioxydants (Wen et al., 2018).

Lors d'un stress oxydatif, les radicaux libres non neutralisés entraînent des dommages aux tissus, affectant tous les types de tissus et leurs composants : lipides, protéines, glucides et ADN. Ces altérations augmentent le risque de plus de 30 processus associés à diverses maladies (SMITH et al., 1996). Parmi celles-ci, on trouve les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Creutzfeldt-Jakob et les méningoencéphalites (JHA et al., 1995), ainsi que les maladies inflammatoires et cardiovasculaires (GEORGETTI et al., 2003), les œdèmes, le vieillissement prématuré de la peau, le diabète sucré et le cancer (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990 ; DEFRAIGNE & PINCEMAIL, 2008).

De nombreuses études soutiennent l'hypothèse que le stress oxydatif joue un rôle dans les mécanismes et processus pathologiques, notamment le cancer (MELVIN & SURESH, 2002 ; BAYNES & THORPE, 1999 ; WILLIAMSON & KILO, 1989). Cependant, les cellules peuvent se protéger grâce à une variété d'enzymes et de substances chimiques endogènes capables de piéger les radicaux libres (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



En 1969, une date clé dans l'histoire du stress oxydatif, les chercheurs américains MC-CORD et FRIDOVICH ont isolé, à partir de globules rouges humains, un système enzymatique antioxydant la Superoxyde Dismutase (SOD). Cette enzyme élimine le radical libre anion superoxyde, produit par réduction univalente de l'oxygène. Cette découverte fondamentale démontre indirectement la production de radicaux libres dans notre organisme, marquant ainsi le début d'une vaste série de recherches sur les sources de production de l'anion superoxyde et sur ses rôles pathologiques et physiologiques.

Cependant, des doutes ont perduré pendant longtemps quant à l'existence réelle des radicaux libres et à leurs effets *in vivo*. Ce n'est qu'au début des années 1990 que cette incertitude a été levée de manière irréfutable grâce à l'utilisation de la résonance paramagnétique électronique (RPE) associée au spin trapping (piégeur de spin) dans des modèles de stress oxydatif *in vivo* (DEFRAIGNE & PINCEMAIL, 2008).

Suite à la découverte de la SOD, les scientifiques ont également mené de nombreuses expériences *in vitro*, démontrant la toxicité des radicaux libres, responsables de dommages cellulaires significatifs. Ces dommages se manifestent par des cassures et des mutations de l'ADN, l'inactivation de diverses enzymes, la modification des structures protéiques, l'oxydation des sucres et l'induction de la peroxydation lipidique (DEFRAIGNE & PINCEMAIL, 2008).

Ce n'est que plus tard, avec l'identification des vitamines C (SZENT-GYORGYI, 1928) et E (EVANS et BISHOP, 1922) durant l'entre-deux-guerres, que l'importance des antioxydants en biochimie a été mise en évidence (DEFRAIGNE & PINCEMAIL, 2008).

Dès le début du XXe siècle, l'industrie a porté un intérêt marqué aux antioxydants (ou antioxygènes), des molécules capables de réduire les effets de l'oxygène sur la corrosion des métaux. En biologie, les premières recherches sur les antioxydants ont révélé leur capacité à diminuer l'oxydation des acides gras insaturés, ce qui prévient leur rancissement (DEFRAIGNE & PINCEMAIL, 2008).

L'organisme possède un vaste réseau d'antioxydants ou de mécanismes de défense (Fig. 08), qui ne se limite pas aux seules vitamines C et E. D'une part, de nombreux antioxydants sont synthétisés



par l'organisme ou, plus souvent, apportés par notre alimentation. D'autre part, des systèmes enzymatiques extrêmement complexes sont responsables de la réparation des dommages oxydatifs sur les protéines ou l'ADN. En outre, certains oligoéléments, tels que le sélénium, le cuivre et le zinc, agissent comme cofacteurs pour diverses enzymes à activité antioxydante (DEFRAIGNE & PINCEMAIL, 2008).

Le glutathion (GSH) joue un rôle unique et essentiel dans le maintien des formes actives de divers antioxydants de petite taille, tels que les vitamines C et E, l'ubiquinone et les polyphénols. En ce sens, le GSH est le principal antioxydant de l'organisme, d'autant plus qu'il agit également comme cofacteur pour une série d'enzymes antioxydantes, notamment les glutathion peroxydases, la glutathion réductase, les thiorédoxines et les peroxyrédoxines. (DEFRAIGNE & PINCEMAIL, 2008).

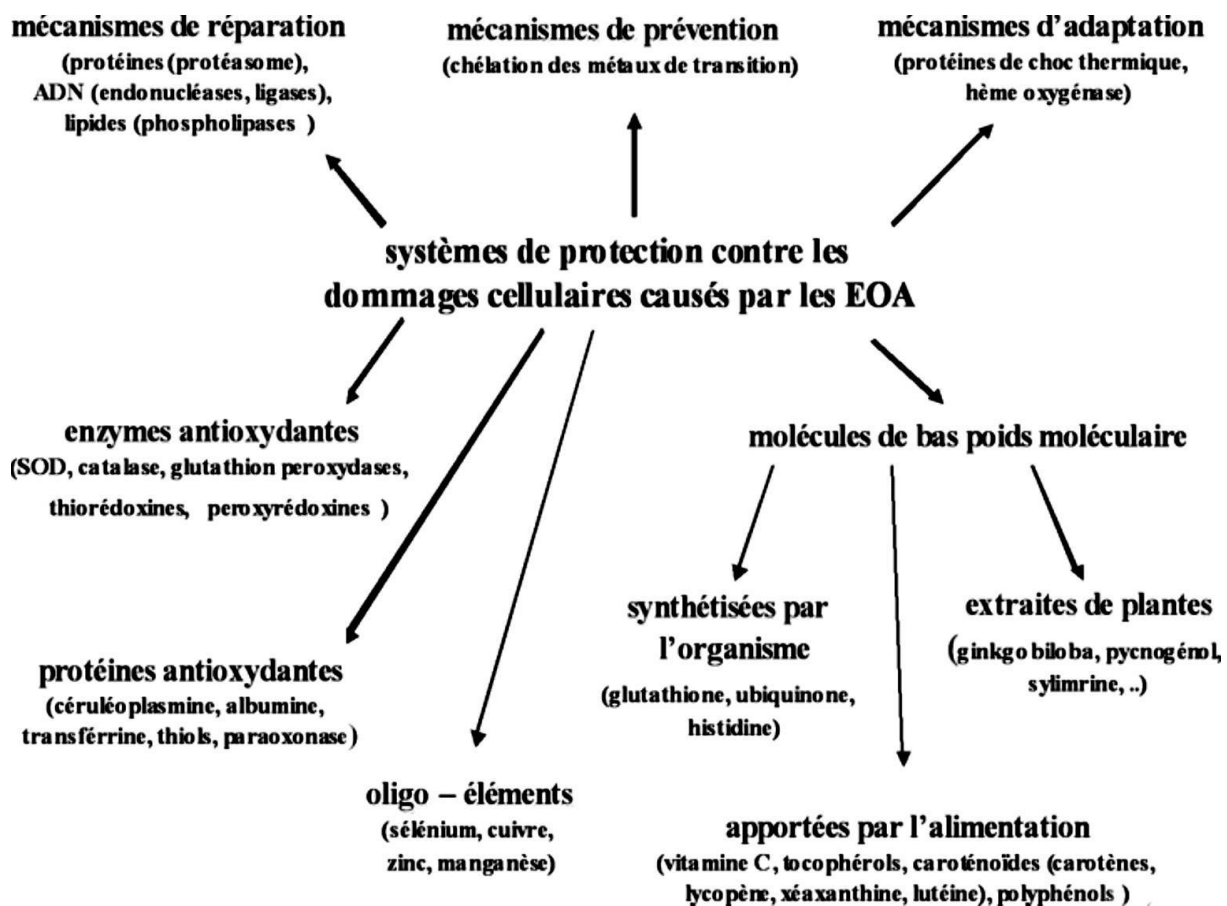


FIG.08: Réseaux des antioxydants (KOHEN & NYSKA, 2002).



Récemment, il a été démontré que les espèces oxygénées actives (EOA) sont généralement capables d'activer l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires et des protéines d'adhésion. Il est donc important de ne pas sous-estimer le fait que les antioxydants influencent également la régulation de divers gènes, et nous n'avons pas encore pleinement compris tous leurs mécanismes d'action (AZZI, RICCIARELLI & ZINGG, 2002).

Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à des concentrations relativement faibles, de rivaliser avec d'autres substrats oxydables, permettant ainsi de retarder, prévenir, neutraliser ou réduire les dommages causés par l'oxydation de ces substrats. Cela contribue à maintenir des concentrations non cytotoxiques d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) au niveau cellulaire (RICE-EVANS et al., 1996).

Les antioxydants sont largement utilisés et englobent un large éventail de molécules et de secteurs variés, incluant l'alimentation, l'industrie chimique et l'industrie pharmaceutique. Ils peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (RICE-EVANS et al., 1996).

Les modes d'action d'un antioxydant peuvent inclure le piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (ERO), l'inhibition des enzymes et la chélation des métaux traces responsables de la production d'ERO (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990). Dans l'organisme, il existe plusieurs types de molécules à activité antioxydante, dont les mécanismes d'action varient :

- Défenses non enzymatiques : Cela inclut des composés tels que les vitamines E (α -tocophérol) et C (acide ascorbique), ainsi que les polyphénols d'origine végétale (flavonoïdes, xanthones, coumarines, caroténoïdes, dérivés d'acides phénoliques, tanins, anthocyanines, etc.). La plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être obtenus par l'alimentation (FAVIER, 2003).
- Défenses enzymatiques : Ces systèmes de défense sont très efficaces, car les enzymes ont la capacité de fonctionner de manière continue. Cette ligne de défense comprend des enzymes telles que la superoxyde dismutase (qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde), la catalase (qui métabolise le H_2O_2) et la glutathion peroxydase (qui exerce



une action réductrice sur l'hydrogène et transforme les hydroperoxydes organiques, notamment lipidiques, de type ROOH en ROH) (FAVIER, 2003).

D'autre part, selon leur mode d'action, les antioxydants se classent en deux catégories :

- Système de défense primaire : Comprend des composés tels que la catalase et le glutathion. Ces antioxydants préviennent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation, agissant ainsi en prévention (FAVIER, 2003).
- Système de défense secondaire : Inclut des molécules comme les tocophérols. Ces antioxydants sont qualifiés de « chain-breaking » car ils réagissent avec les radicaux peroxyde (ROO°) et/ou les radicaux (R°), bloquant ainsi les réactions de propagation. Ce type d'antioxydant permet d'éviter la conversion de formes peu réactives (O_2^-) en formes très réactives (OH°) (FAVIER, 2003).

Les antioxydants peuvent être classés en molécules liposolubles ou hydrosolubles. En fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques, ils auront une localisation cellulaire préférentielle : les substances liposolubles se trouvent principalement dans les membranes cellulaires, tandis que les substances hydrosolubles se situent dans le cytosol et/ou le milieu extracellulaire. Ils seront particulièrement efficaces contre les radicaux libres présents dans chaque type de milieu respectif (FAVIER, 2003).

Selon leur origine, les antioxydants peuvent être classés en deux catégories :

- Enzymes antioxydantes directement synthétisées par l'organisme : Cela inclut des enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase, la catalase, la lipase, la protéase et l'endonucléase (qui éliminent les molécules oxydées), ainsi que l'albumine et la ferritine (qui complexent les ions divalents) (FAVIER, 2003).
- Nutriment antioxydants dont les apports sont nécessaires par l'alimentation : Ces nutriments comprennent la vitamine E, la taurine, la vitamine C, les caroténoïdes (comme le lycopène et la lutéine), les polyphénols, ainsi que divers minéraux et oligo-éléments (FAVIER, 2003).



- Antioxydants synthétiques : Ces composés sont largement utilisés en raison de leur efficacité et de leur coût réduit, tels que le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), le gallate propylé et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ). Cependant, leur sécurité est souvent remise en question, ce qui soulève la nécessité de recherches visant à les substituer par des antioxydants d'origine naturelle dans l'alimentation (FAVIER, 2003).

Une alimentation pauvre en fruits et légumes, qui sont les principales sources d'antioxydants nécessaires (comme les vitamines C et E, les caroténoïdes et les polyphénols), favorise une diminution de la capacité antioxydante. Bien que le stress oxydatif ne soit pas une maladie en soi, il crée un environnement propice au développement de diverses pathologies (PINCEMAIL et al., 2007).

Contrairement aux résultats des études de supplémentation, toutes les études longitudinales indiquent qu'un taux élevé d'antioxydants, obtenu par une alimentation riche en fruits et légumes, réduit le risque relatif de mortalité associé à diverses pathologies, telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires et les bronchopneumopathies, par exemple (PINCEMAIL et al., 2007).

Récemment, l'intérêt pour les antioxydants naturels, en lien avec leurs propriétés thérapeutiques, a considérablement augmenté. Des recherches scientifiques dans diverses disciplines se sont intensifiées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés issus de plusieurs sources naturelles, notamment des plantes médicinales et des produits agroalimentaires (Dupont & Guignard, 2007).

Les végétaux possèdent un potentiel anti-radicalaire qui leur permet de jouer un rôle bénéfique en matière de prévention, ce qui est crucial pour la santé humaine et animale. L'activité anti-radicalaire des plantes a été démontrée *in vitro*, ouvrant la voie à l'établissement de nouvelles drogues anti-radicalaires. Ces dernières années, on observe un regain d'intérêt pour les plantes médicinales et aromatiques ainsi que pour leurs extraits (SABU & KATTAN, 2002). Parmi les moyens de défense naturels, les composés phénoliques sont particulièrement notables, car ils sont largement utilisés en médecine traditionnelle et moderne pour leurs activités antioxydantes (RICE-EVANS et al., 1995).



En raison de leurs propriétés redox élevées, les polyphénols agissent comme des agents réducteurs et donateurs d'hydrogène (SMITH et al., 1996 ; ALI et al., 2008). Ils peuvent piéger des radicaux libres et inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxyles. De plus, ils ont la capacité de chélater des ions métalliques grâce à leurs propriétés chélatrices (FAVIER, 2003).

La capacité antioxydante des molécules peut être évaluée de manière *in vivo* ou *in vitro* à l'aide de diverses méthodes. Plusieurs techniques sont disponibles pour mesurer l'activité antioxydante des aliments et des systèmes biologiques (SANCHEZ-MORENO & LARRAURI, 1998).

Les techniques d'évaluation de la capacité antioxydante peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes : le transfert d'atome d'hydrogène et le transfert d'un simple électron (DUPONT, 2007).

Les méthodes du premier groupe sont utilisées pour évaluer la peroxydation lipidique, en se basant sur un substrat lipidique ou lipoprotéique. La quantification de cette propriété s'exprime par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation (MILLER et al., 1993).

En revanche, les méthodes du deuxième groupe mesurent la capacité de piégeage des radicaux libres. Elles incluent le balayage de divers radicaux tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochloreux (HOCl), l'hydroxyle (-OH), les anions superoxyde (O_2°), les radicaux peroxyles (ROO°) et l'oxyde nitrique (NO°) (DUPONT, 2007).

Ces techniques se distinguent par les réactifs utilisés, les conditions d'application, les protocoles, ainsi que par le mécanisme d'action par lequel l'extrait ou la molécule testée se manifeste dans le milieu et la forme de présentation des résultats (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

Étant donné la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique capable de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. Il est donc nécessaire de combiner les réponses obtenues à partir de tests différents et complémentaires, tels que DPPH•, ABTS•+, CUPRAC, la chélation des métaux, la phénanthroline, le galvinoxyle et le blanchiment de β -carotène. Les techniques mentionnées témoignent de la capacité d'une molécule ou d'un extrait naturel à



neutraliser les radicaux libres par transfert d'électron et/ou de proton issus de phénomènes d'oxydation (PRIOR et al., 2005).

Les résultats des activités antioxydantes sont généralement exprimés par rapport à une molécule de référence ayant de fortes propriétés antioxydantes, telles que le BHA, la quercétine, le BHT ou la rutine (PRIOR et al., 2005).

La recherche biomédicale accorde une attention particulière au traitement du cancer depuis plusieurs décennies. Cette maladie est difficile à traiter par rapport à une infection causée par un pathogène, car il est nécessaire de s'attaquer aux cellules du patient elles-mêmes. Le défi consiste à détruire les cellules tumorales sans endommager les cellules saines, ce qui est très complexe. En effet, il existe peu de différences entre ces deux types de cellules qui permettraient de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses, contrairement aux bactéries infectieuses pour lesquelles des antibiotiques sont disponibles (JONCAS, 2017).

Un cancer se compose de cellules qui prolifèrent de manière désorganisée, ce qui peut nuire au bon fonctionnement des organes et entraîner la mort (HANAHAN & WEINBERG, 2000 ; FEITELSON et al., 2015). Chaque organe et chaque tissu contiennent plusieurs types de cellules bien définies, organisées de manière structurée (FEITELSON et al., 2015).

Normalement, les signaux échangés entre les cellules maintiennent l'équilibre des tissus, garantissant que chaque cellule est à sa place et remplit son rôle. Dans le cas contraire, ces cellules sont éliminées pour éviter de nuire à leur hôte. Cependant, les cellules cancéreuses ne répondent plus aux signaux qui régulent cet équilibre (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

Les cellules cancéreuses commencent à se multiplier de manière excessive, même dans des endroits inappropriés. Elles envahissent ainsi les tissus des organes essentiels sans en remplir les fonctions. À terme, selon la localisation de la tumeur, cela peut entraver le fonctionnement des organes touchés et éventuellement entraîner la mort. Un cancer peut naître d'une seule cellule qui acquiert des caractéristiques favorisant sa survie et sa division (HANAHAN & WEINBERG, 2000 ; WITSCH, SELA & YARDEN, 2010). Cette cellule forme alors une masse de tissu intrus, appelée tumeur, qui s'étend à travers les tissus sains à mesure que le cancer progresse.



La formation de métastases se produit lorsque certaines cellules se détachent de la tumeur d'origine, appelée tumeur primaire, et pénètrent dans la circulation sanguine pour former des tumeurs secondaires. Ce phénomène complique considérablement le traitement du cancer, car les thérapies localisées, moins dommageables, deviennent souvent inefficaces (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

Le cancer est la deuxième cause de décès dans le monde (Fig. 09), avec près de 10 millions de morts par an (FERLAY et al., 2020). Entre 1980 et 2005, bien que le taux d'incidence ait augmenté à l'échelle mondiale, le taux de mortalité a diminué grâce à des diagnostics plus précoces, réalisés à des stades où les traitements sont plus efficaces. Depuis 2005, l'incidence mondiale a diminué chez les hommes, en grande partie en raison d'une baisse de la consommation d'alcool et de tabac, tandis qu'elle reste stable chez les femmes. Pour les deux sexes, les taux de mortalité continuent de diminuer (ARC, 2021).

En Algérie, le cancer est l'une des principales causes de mortalité depuis 1996, représentant un tiers des décès en Europe. Le mode de vie semble avoir une influence significative sur l'origine et le développement des cancers, mais aucune théorie unique ne peut expliquer à elle seule l'étiologie des cancers (CORPET, 1996).



Incidence mondiale du cancer

Répartition des 12,7 millions de nouveaux cas estimés, taux d'incidence standardisés sur l'âge et cancers les plus fréquemment diagnostiqués dans les différentes régions du monde, 2008

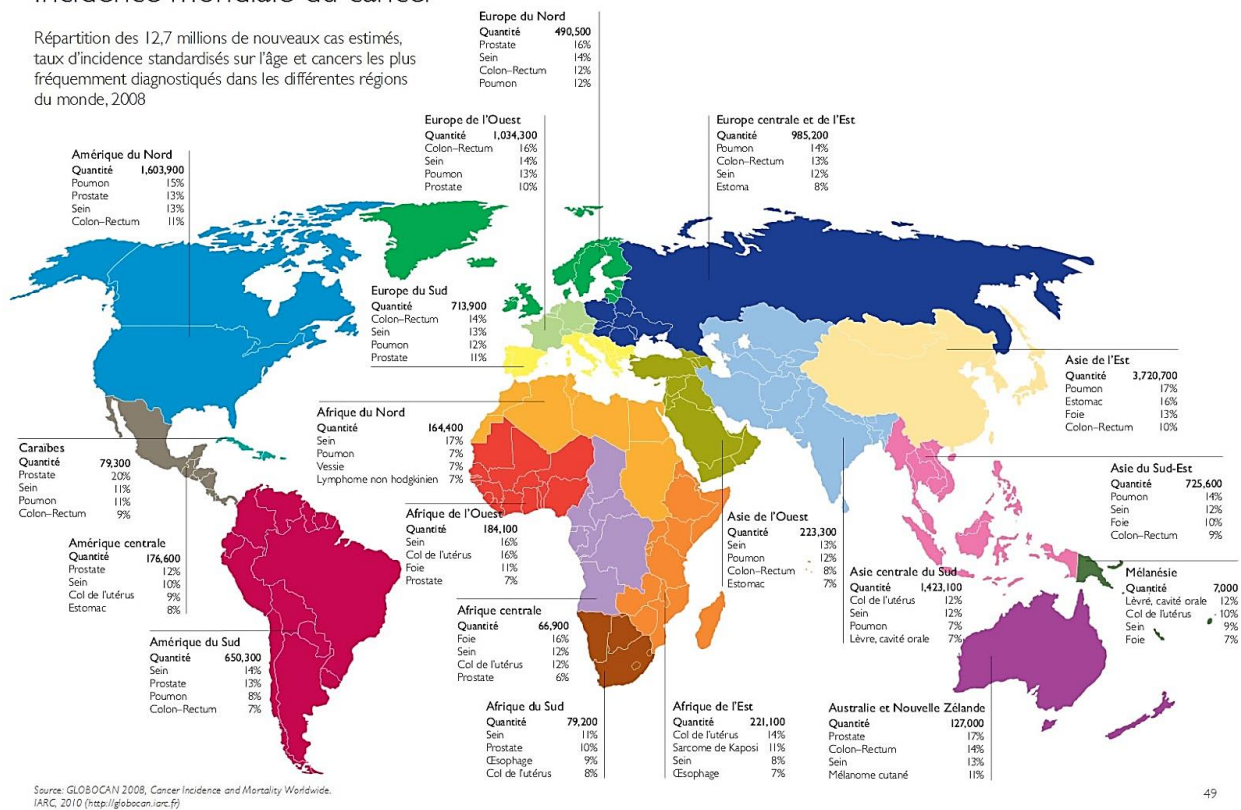


FIG. 09: Incidence mondiale du cancer (GLOBOCAN, 2008).

Il est difficile d'identifier les causes précises d'un cancer, car celles-ci varient d'un individu à l'autre. Plusieurs facteurs environnementaux sont bien établis (TORRE et al., 2012 ; BLACKADAR, 2016), tout comme certains facteurs génétiques (RAHMAN, 2014 ; BISHOP, 1987).

Cependant, le rôle de la génétique dans le développement du cancer n'est pas unanime ; il semble varier d'un type de cancer à l'autre et en fonction des gènes mutés. De nombreuses variations génétiques ne constitueraient qu'une prédisposition. Parmi les facteurs environnementaux, plusieurs éléments liés à notre mode de vie, tels que la qualité de l'alimentation et le niveau d'activité physique, sont également importants (SCHWINGSHACK, 2015).

Bien qu'il soit prouvé que certaines tumeurs surviennent plus fréquemment chez des individus génétiquement prédisposés, et que dans certains cas, l'environnement n'influence probablement



pas le développement du cancer (comme pour les tumeurs pédiatriques), il est également probable que pour la majorité des personnes, le cancer résulte d'une interaction entre la génétique et l'environnement (CORPET, 1996).

De nombreux arguments indiquent que l'alimentation influence le développement des cancers, et cette influence s'ajoute à d'autres causes bien établies (CORPET, 1996). Certaines infections chroniques, principalement causées par des virus affectant un organe spécifique, peuvent également favoriser l'apparition de tumeurs dans cet organe. Par exemple, le papillomavirus humain est connu pour causer le cancer du col de l'utérus, tandis que les virus hépatiques sont associés au cancer du foie (TORRE et al., 2012).

La fumée de tabac est un facteur de risque bien documenté pour les cancers du poumon et du larynx (CORPET, 1996). De plus, la consommation d'alcool et le tabagisme sont des facteurs importants dans le développement du cancer (TORRE et al., 2012). L'obésité est responsable d'environ 4 % des cancers à l'échelle mondiale, mais son implication peut atteindre jusqu'à 50 % dans certains types de cancers (BYERS & SEDJO, 2015).

Enfin, certaines substances chimiques industrielles et des radiations, comme les rayons ultraviolets, peuvent également provoquer des cancers, notamment du cancer de la peau, en fonction du degré d'exposition (BLACKADAR, 2016 ; CORPET, 1996). D'autres produits chimiques, tels que le chlorure de vinyle (qui est lié au cancer du foie), les amines aromatiques (associées au cancer de la vessie) et le diéthylstilbestrol (qui affecte le col de l'utérus), sont également préoccupants (CORPET, 1996).

Certains de ces facteurs environnementaux induisent des modifications directes dans notre ADN, qui s'accumulent avec l'âge et ressemblent fortement aux modifications observées dans les tumeurs (TORRE et al., 2012).

Avec le vieillissement de la population et l'industrialisation, l'incidence du cancer a considérablement augmenté. Malgré les avancées dans les techniques de diagnostic et les traitements, le cancer demeure une cause majeure de décès à travers le monde (TORRE et al., 2012).



Le vieillissement de la population accentue l'accumulation de mutations et de modifications épigénétiques. Ces dernières affectent les régions non codantes des gènes. Il semble donc que chacun d'entre nous ait un certain contrôle sur les risques de développer un cancer à long terme (ZANE, SHANNA & MISTELI, 2014).

Pour établir le lien entre l'environnement et le cancer, notamment entre l'alimentation et le cancer, l'épidémiologie à elle seule ne suffit pas ; l'expérimentation animale est également nécessaire pour préciser ce lien. De nombreuses études soutiennent l'hypothèse selon laquelle le stress oxydatif joue un rôle dans les mécanismes et les processus pathologiques, y compris le cancer (MELVIN & SURESH, 2002 ; BAYNES & THORPE, 1999 ; WILLIAMSON & KILO, 1989).

De plus, la persistance du stress oxydatif est pathologiquement impliquée dans les dommages à l'ADN, résultant de la surproduction cellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'espèces réactives de l'azote (RNS), qui jouent également un rôle dans le développement du cancer. Cette thématique vise à intégrer ces interactions dans le domaine de la cancérologie, où de nombreuses études s'attachent à établir les relations entre le cancer et les variations environnementales, tout en expliquant les mécanismes sous-jacents (BARTSCH & NAIR, 2002).

Le cancer du grand intestin et de l'intestin grêle sont parmi les principaux cancers responsables de morbidité et de mortalité à l'échelle mondiale (GREENLEE et al., 2000). Le cancer colorectal est une maladie grave et fréquente ; il est considéré comme l'un des cancers les plus souvent diagnostiqués dans les pays riches, se classant au deuxième rang chez les femmes (après le cancer du sein) et au troisième rang chez les hommes (après les cancers du poumon et de la prostate) (BASTIDE, PIERRE & CORPET, 2011 ; JEMAL et al., 2011). Ce cancer est l'une des principales causes de décès par cancer chez les hommes et les femmes (GREENLEE et al., 2000 ; YAMAMOTO, 2000).

La consommation de viande rouge et de charcuterie est associée à un risque accru de développer ce type de cancer (BASTIDE et al., 2011). Les études épidémiologiques et expérimentales suggèrent que le cancer du côlon est fortement influencé par la nutrition, les facteurs alimentaires, et notamment par la composition des graisses alimentaires (WILLET et al., 1990 ; WYNDER, 1975 ; REDDY, 1995). Les différences dans les habitudes alimentaires ont été évoquées pour



expliquer la distribution géographique disparates des taux de cancer du côlon à travers le monde (DOL & PETO, 1987 ; HAENSZEL & KURIHARA, 1968).

Bien que le cancer du côlon ait été bien étudié, les progrès réalisés dans sa prévention ou sa guérison n'ont pas été significatifs. La cancérogenèse du côlon est un processus qui se développe en plusieurs étapes, comprenant trois phases distinctes : l'initiation, qui modifie le message moléculaire d'une cellule normale, suivie de la promotion et de la progression, qui aboutissent finalement à un phénotype transformé modifiant les mécanismes cellulaires (PITOT, 1986).

Le cancer du côlon est souvent la conséquence d'un stress oxydatif persistant, entraînant des lésions de l'ADN et des mutations dans les gènes associés au cancer. Ce processus est caractérisé par un cycle de mort et de régénération cellulaires, où la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'espèces réactives de l'azote (RNS) joue un rôle crucial (BARTSCH & NAIR, 2002).

Il est établi que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) augmentent dans les maladies chroniques de l'appareil gastro-intestinal (GIRGIN et al., 2000), mais les mécanismes précis par lesquels le stress oxydant induit des cellules cancéreuses colorectal restent encore peu clairs. Des modifications au niveau de certains paramètres du système antioxydant dans le cancer colique ont été rapportées (SKRZYDLEWSKA et al., 2003).

Au cours de la carcinogénèse, deux points essentiels ont été observés : des niveaux élevés de peroxydation des lipides (LPO) et un épuisement des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (MANJU & NALINI, 2005).

Les agents chimiopréventifs sont conçus pour exercer leur action anticancéreuse en modulant la peroxydation des lipides (LPO) et le statut antioxydant dans le foie (STADLER et al., 1994 ; VAN LEISHOUT et al., 1996). Plusieurs études suggèrent que les composés phénoliques peuvent également agir comme adjuvants chimiopréventifs en piégeant les agents cancérogènes induits par le stress oxydatif (TANAKA et al., 1998 ; THRESIAMMA et al., 1998).

Les flavonoïdes, qui sont des composés polyphénoliques naturels (ROSS & KASUM, 2002) et sont largement présents dans le règne végétal ont récemment été reconnus comme des substances préventives contre le cancer en raison de leur forte activité antioxydante et de leur capacité à piéger



les radicaux libres (WATTENBERG, 1985 ; HUSAIN et al., 1987). Ils possèdent un large éventail de propriétés pharmacologiques, notamment des effets anticancéreux et anti-inflammatoires (ROSS & KASUM, 2002 ; DESCHNER et al., 1991 ; FUJIKI, 1986).

Des composés tels que l'héspéridine et la lutéoline, ainsi que d'autres polyphénols, sont connus pour leur action chimiopréventive contre les tumeurs malignes *in vivo*, sans effets secondaires ni toxicité. Ils présentent également des propriétés antimutagènes (EDENHARDER et al., 1993 ; NISHINO et al., 1987) et anti-inflammatoires (MIDDLETON & KANDASWAMI, 1992) en inhibant la production de monoxyde d'azote (SHIMOI et al., 1994).

Des études épidémiologiques sur la consommation alimentaire quotidienne et l'incidence des tumeurs montrent que les légumes verts et les fruits frais contiennent plusieurs composants protecteurs contre le cancer chez l'Homme (STEINMETZ & POTTER, 1991). De plus, l'amélioration des lésions oxydatives en piégeant les radicaux libres générés lors du stress oxydant (OSS) pourrait protéger les cellules contre la cancérogénicité (KETTERER et al., 1990).

C'est dans cette perspective que s'inscrit ce travail, dont l'objectif principal est la recherche de nouvelles drogues d'origine végétale. Ce projet vise à fournir à la thérapeutique de nouvelles Plantes Médicinales et/ou de nouvelles molécules bioactives susceptibles d'être exploitées dans le domaine médical, en vue de la production de phyto-médicaments aux propriétés antibactériennes, antioxydantes ou anticancéreuses.

La thématique de cette étude s'est appuyée sur les fondements des méthodes de recherche en Pharmacognosie ; la plante choisie l'Agave américaine *Agave americana* L. variété *americana* a été étudiée selon la méthode systématique de recherche en Pharmacognosie, un screening botanique a été entrepris en procédant à un criblage avec une Plante Médicinale du même genre La Sisal, *Agave sisalana* Perr. (Fig. 10), qui est une plante cultivée pour sa fibre, ainsi que pour sa valeur ornementale et médicinale (DEBNATH, 2010).



FIG. 10: *Agave sisalana* Perr. (QUEIROGA, 2021)

D'un point de vue médical, la Sisal est utilisée dans le traitement de certaines maladies infectieuses et de dysfonctionnements corporels (BOWN, 1995). Elle est employée en interne comme antiseptique de l'estomac et de l'intestin, antihypertenseur (NOBEL, 1994), et dans le traitement de l'indigestion, des flatulences, de la constipation et de la jaunisse (BOWN, 1995).

Sa sève est utilisée pour fabriquer de la gomme arabique (un agent liant) et des résines pour l'industrie pharmaceutique (BOWN, 1995). Elle peut également être prise en interne pour traiter la diarrhée et la dysenterie (CHEVELLIER, 1996). La gomme extraite de sa racine est utilisée pour soulager les maux de dents, tandis que la racine elle-même possède des propriétés diurétiques et diaphorétiques. Elle est également utilisée pour traiter la Syphilis, les inflammations locales et les tumeurs (DUKE & AYENSU, 1985).



Cependant, cette plante est considérée comme une source prometteuse de biomolécules ayant un potentiel pour des applications alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Parmi ces biomolécules, les saponines sont les plus couramment étudiées (SIDANA, SINGH & SHARMA, 2016) ; elles sont utiles pour la fabrication de savon et possèdent une grande importance pharmacologique (DEBNATH, 2010). D'autres composés phénoliques, tels que les flavonoïdes, les homoisflavonoïdes et les acides phénoliques, sont également notables (ALMARAZ-ABARCA et al., 2013).

Le développement de cette étude à travers nos travaux de thèse s'échelonne sur trois chapitres : D'abord le premier étant une Introduction générale est abordé à travers une revue de la littérature faisant état de ce qui est connu sur la thématique de recherche ; il en découle, l'hypothèse ainsi que les différents objectifs de cette étude. Ensuite le deuxième chapitre illustre les Matériels et Méthodes utilisés dans les différentes manipulations : l'étude ethnobotanique, l'étude physico-chimique comportant le screening chimique qualitatif, l'extraction, les dosages, l'identification et les quantifications l'étude *in Silico*, ainsi que l'étude pharmacologique permettant d'évaluer les activités biologiques *in vitro* des pouvoirs antioxydants et antibactériens, de même que les manipulations *in vivo* du test antitumoral des flavonoïdes extraits. Le troisième chapitre est consacré à la présentation, l'analyse et l'interprétation des résultats obtenus au regard de la littérature. Au bout du compte, notre manuscrit est ponctué d'une Conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus et des Perspectives envisageables.

PARTIE PRATIQUE

MATERIELS MÉTHODES



2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Matériels

2.1.1. Matériel végétal

Dans notre étude expérimentale nous avons étudié les feuilles de l'Agave américaine : *l'Agave americana* var. *americana* L. prélevée le mois de janvier 2016 du lac Tonga (Parc National d'El Kala) (Fig.11). Les feuilles d'Agave ont été découpées en petits morceaux, rincées à l'eau, séchées pendant 72 heures à l'étuve à 35°C, et broyées deux fois pour obtenir une poudre fine permettant la réalisation des tests en laboratoire.



FIG. 11: *Agave americana* var. *americana* L. (Lac Tonga PNEK)

○ Description de la zone d'étude

Le lac Tonga (voir Fig. 12), d'une superficie de 2700 hectares, est situé à 36° 53' Nord et 8° 31' Est, à l'extrême nord-est du Parc National d'El Kala, dans la Wilaya d'El Taref, au sein de la commune d'Oum Teboul. Il se trouve à 70 km à l'est de la ville d'Annaba. Ce lac occupe une vaste dépression côtière de 2700 hectares, s'étendant sur 7,5 km de long et 4 km de large, avec une profondeur moyenne de 2 mètres. Le lac Tonga est séparé au nord de la mer par des crêtes dunaires dont l'altitude varie entre 75 et 100 mètres, et au nord-ouest, il est bordé par un djebel culminant à 167 mètres. À l'est et au sud, ses limites sont définies par les montagnes de la



Kroumirie, qui longent la frontière Algéro-tunisienne, tandis qu'à l'ouest, il est délimité par le bassin versant du lac Oubeira (BOULAHBEL, 1999).

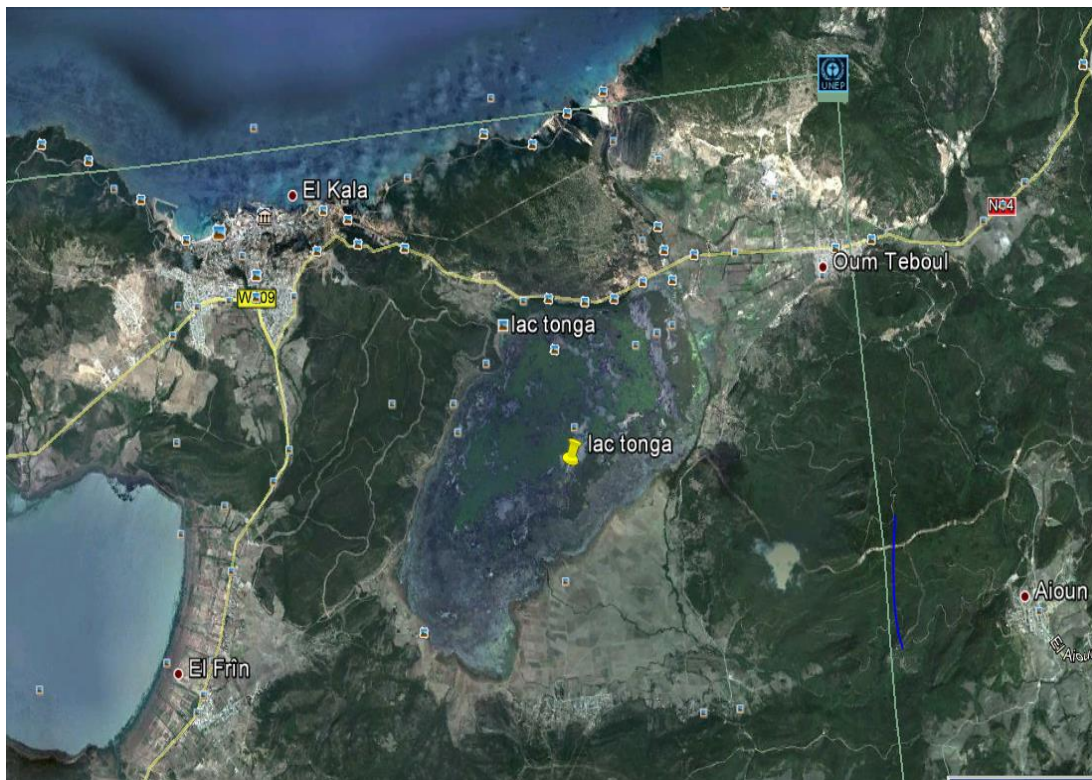


FIG. 12: Localisation géographique de la zone d'étude par image satellite (Google Earth Version 7.1.7.2600)

2.1.2. Matériels Biologiques

▪ Souches bactériennes testées

Les souches bactériennes utilisées sont des souches de référence American Type Culture Collection (ATCC), obtenues du Département de Biochimie, laboratoire de Microbiologie, il s'agit de : *Staphylococcus aureus* ATCC 259230, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 7006030, *Escherichia coli* ATCC 259229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

○ Rats Wistar

Présentation

Les traitements et protocoles expérimentaux ont été réalisés conformément aux principes et recommandations en matière de santé animale, tels que stipulés dans la publication NIH No. 85-23 révisée en 1985.



Le matériel biologique utilisé dans cette étude est constitué de rates albinos de la souche Wistar, spécifiquement des *Rattus norvegicus*, obtenues à l'Institut Pasteur d'Alger le 13 janvier 2016, âgées de 2 mois. Ces rongeurs sont des mammifères nocturnes. La puberté se manifeste entre 50 et 60 jours après la naissance pour les deux sexes. L'espérance de vie d'un rat varie de 2,5 à 3 ans, en fonction de la souche, du sexe, des conditions environnementales et d'autres facteurs (BAKER, LINDSEY & WEISBROTH, 1980).

À leur arrivée, ces rates pesaient entre 110 et 130 grammes. Au moment de l'expérimentation, leur poids moyen était de 180 ± 20 grammes. Elles étaient maintenues dans des conditions d'élevage optimales au sein de l'animalerie du Département de Biologie, à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université BADJI Mokhtar d'Annaba. Les taux de température variaient entre 25 et 30 °C, avec un taux d'humidité de 60 à 70 %. La photopériode était de 12 heures de jour et 12 heures de nuit. De plus, une période d'acclimatation de 10 jours a été accordée aux rates avant le début des manipulations.

Lieu d'élevage et conditions expérimentales

Les animaux ont été élevés dans des cages translucides en polyéthylène conçues pour offrir un environnement propice à leur bien-être (voir Fig. 13), qui étaient nettoyées régulièrement pour maintenir une bonne hygiène. La litière, constituée de copeaux de bois, était remplacée tous les deux jours afin d'assurer un cadre de vie confortable. Ces rates sont dociles et faciles à manipuler. Elles ont été réparties en cinq lots expérimentaux de dix rates chacun, chaque lot étant divisé sur deux cages (voir Fig. 14).



FIG.13: Mise en cages des rates.

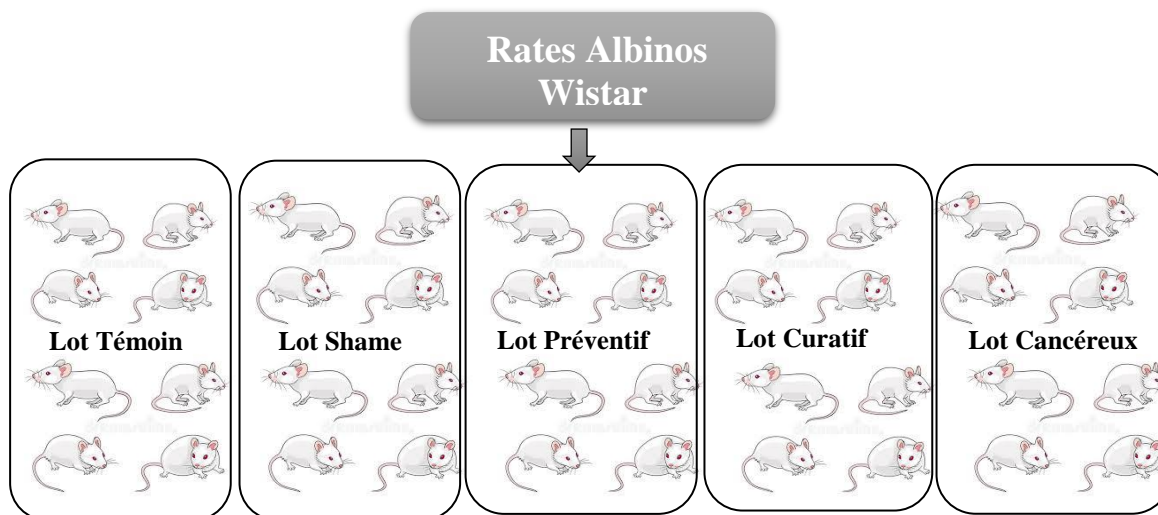


FIG.14: Dispositif expérimental mis en œuvre.

Les animaux ont été manipulés par le même expérimentateur afin de minimiser le stress. L'alimentation fournie aux rates provient du Groupe Sidi Ibrahim, à El Chorfa, et se compose de maïs, de tourteaux de soja, d'huile de soja, de carbonate de calcium, de phosphate, de polyvitamines (A, D3, E), d'oligo-éléments, d'acides aminés et de sel. De l'eau de robinet est disponible en libre-service dans des biberons *ad Libitum*.

2.2. Méthodes

2.2.1. Enquête Ethnobotanique

L'enquête ethnobotanique a été réalisée entre novembre 2016 et mai 2017 ; avant de commencer l'étude ethnobotanique sur le terrain, nous avons d'abord identifié les différents milieux d'enquête dans la zone d'étude, en utilisant des techniques d'échantillonnage. Par la suite, nous avons mené des enquêtes basées sur des entretiens directs avec la population locale, portant sur la connaissance et les usages de l'Agave. Pour établir un inventaire ethnobotanique varié et aussi complet que possible d'une zone à l'autre dans la région, l'enquête a été réalisée à l'aide d'une fiche dédiée (voir Annexe 01) et de photographies de l'Agave.

- **Echantillonnage** Selon le découpage administratif, la wilaya d'Annaba est divisée administrativement en douze communes urbaines (voir Fig. 15). Pour cette étude, l'échantillon a été constitué selon un mode d'échantillonnage probabiliste (aléatoire), organisé en strates. Quatre strates ont été définies, correspondant à des groupes de communes urbaines regroupées selon leur convergence :



- Groupe A : comprend les communes d'Annaba et de Séraïdi.
- Groupe B : inclut les communes d'El Bouni, Sidi Amar et El Hadjar, jusqu'à Chebaita Mokhtar.
- Groupe C : regroupe Berrahel, Oued El Aneb, Treat et Chétaïbi.
- Groupe D : rassemble Ain Berda, Cheurfa et El Eulma.

▪ **Outil de recherche utilisé** Pour garantir une meilleure représentativité de la région, nous avons adopté un échantillonnage aléatoire stratifié proportionnel. Des échantillons de 25 personnes ont été constitués pour chacune des quatre strates, ce qui a permis de former un échantillon global de 100 personnes, représentant les principales caractéristiques de la population de la wilaya d'Annaba (répartition selon le genre, l'âge, etc.).

Afin d'assurer une grande objectivité dans les données recueillies, l'enquête a été réalisée à l'aide d'une fiche d'enquête ou d'un questionnaire, accompagnée d'une photographie de l'Agave. Ce questionnaire, préétabli, se concentre sur quatre axes principaux:

- **Profil de l'informateur** : informations sur l'âge et le genre.
- **Connaissance et noms vernaculaires de l'Agave.**
- **Utilisation de la plante** : maladies traitées, parties utilisées et efficacité.

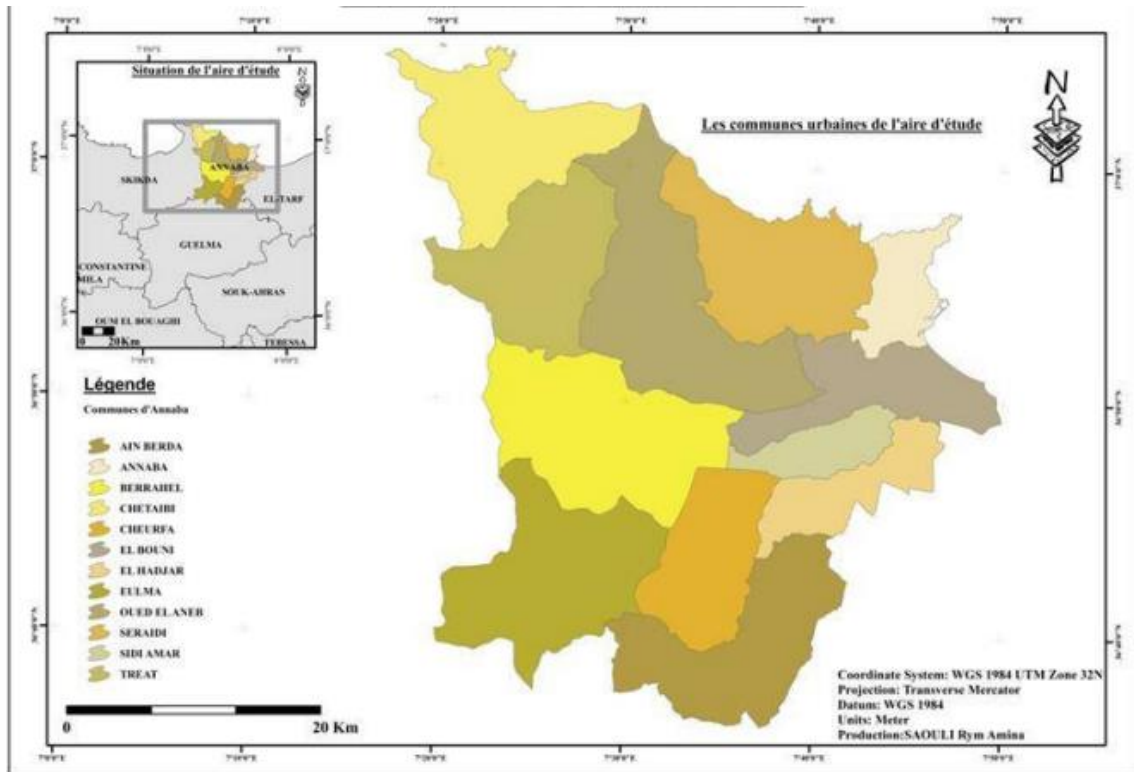


FIG. 15: Situation géographique et découpage administratif de l'aire d'étude (SAOULI, 2018).

2.2.2. Essai botanique

Pour identifier les différents tissus constituant la feuille d'*Agave americana* L. var. *americana*, une coupe transversale a été réalisée au niveau des pointes terminales des feuilles en raison de leur taille et rigidité (Fig. 16). La technique d'observation vitale a été appliquée, utilisant une double coloration avec le Rouge Congo et le Vert de Méthyle. Cette méthode permet de visualiser distinctement les différents types de tissus présents dans la feuille, facilitant ainsi l'étude de leur structure et de leur fonction.

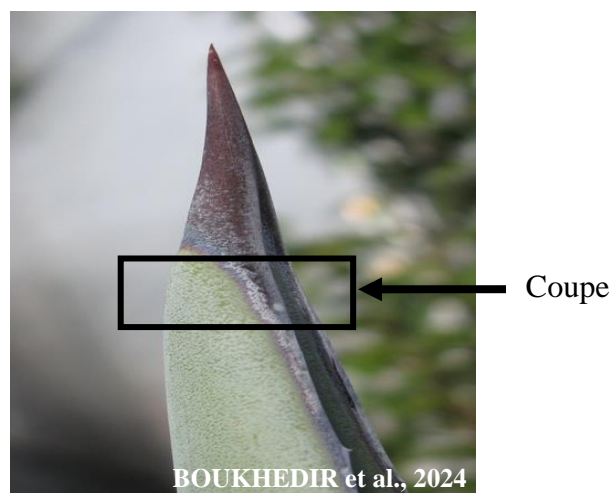


FIG.16: Pointe terminale de la feuille d'Agave.



Principe

Cette technique consiste à réaliser des coupes aussi fines que possible, après avoir immergé les organes de la plante dans de l'éthanol à 75 %, qui sert à la fois de fixateur et à éliminer la chlorophylle. Les coupes sont ensuite traitées successivement avec des solutions diluées d'hypochlorite de sodium et d'hydroxyde de sodium, ce qui permet de détruire le contenu cellulaire et de bien délimiter les parois.

En appliquant successivement le Vert de Méthyle et le Rouge Congo (voir Annexe 02), les parois celluloses se colorent en rose, tandis que les parois lignifiées ou sclérifiées prennent une teinte verte (LANGERON, 1934)

Les coupes ont été préparées en les plaçant dans un verre de montre et en les traitant successivement. Tout d'abord, elles ont été immergées pendant 15 à 20 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium dilué au 1/2, ce qui a permis de détruire le contenu cellulaire et de blanchir les membranes. Après ce traitement, les coupes ont été lavées une fois à l'eau distillée.

Ensuite, elles ont été plongées dans un bain de solution d'hydroxyde de sodium à 5 % pendant 3 minutes pour éliminer l'amidon, puis lavées deux fois à l'eau distillée. Pour éliminer les traces d'hypochlorite et faciliter la fixation des colorants, les coupes ont été lavées une fois dans un bain d'eau additionnée de quelques gouttes d'acide acétique. Les coupes ont ensuite été traitées avec du Vert de Méthyle pendant 1 à 3 minutes, ce qui a permis de colorer les tissus lignifiés en vert et les tissus subérifiés en marron. Elles ont été rapidement lavées à l'eau distillée après ce traitement. Enfin, les coupes ont été colorées avec le Rouge Congo pendant 15 minutes. Ce réactif a coloré en rose ou en rouge les tissus celluloses, selon l'intensité de la cellulose présente. Après un dernier lavage à l'eau distillée, les coupes ont été montées entre une lame et une lamelle pour observation microscopique (LANGERON, 1934).

2.2.3. Essai physico-chimique

2.2.3.1. Tests Qualitatifs -Screening phytochimique –

Le screening chimique est une technique utilisée pour identifier les groupes chimiques présents dans un organe végétal par le biais de réactions physico-chimiques. Les tests préliminaires visant à déterminer les principaux groupes chimiques ont été réalisés selon les méthodes décrites par Harborne en (1973).



A- Criblage phytochimique par des réactions en solution

- **Tests préliminaires sur l'infusé**

Recherche des Tanins Les tanins sont des composés phénoliques hydrosolubles qui se divisent en deux catégories. Les tanins galliques ou ellagiques sont des esters de l'acide gallique et du glucose, et ils sont considérés comme des composés hydrolysables. En revanche, les tanins catéchiques, également appelés tanins condensés, sont non hydrolysables. L'importance des drogues contenant des tanins réside dans leurs propriétés tannantes, leur permettant de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections (BRUNETON, 2002).

- **Caractérisation**

A 5ml de l'infusé à 10% (voir Annexe 03), 1mL d'une solution de Chlorure ferrique (FeCl_3) à 1% (voir Annexe 03) a été ajouté goutte à goutte → l'apparition d'une coloration verdâtre indique la présence des Tanins Catéchiques, bleue noirâtre indique la présence de Tanins Galliques (HARBORNE, 1973).

- **Test de confirmation**

A 30ml de l'infusé à 10%, 15mL de réactif de STIASNY ont été ajoutés (voir Annexe 03), après chauffage de 30mn au bain-marie, l'observation d'un précipité orange indique la présence des Tanins Catéchiques (HARBORNE, 1973).

Recherche des Anthocyanes Ce sont des composés qui existent sous forme d'hétérosides formés par la condensation d'une molécule non glucidique (appelé aglycone) et d'oses et souvent, de groupes acyles. L'aglycone qui les caractérise est un anthocyanidol de la classe des flavonoïdes. En 2006, 539 Anthocyanosides ont été recensés (BRUNETON, 2002).

- **Caractérisation**

La recherche des Anthocyanes repose sur le changement de la couleur de l'infusé à 10% (voir Annexe 03), avec le changement de pH.

A l'infusé à 10% quelques gouttes d'HCl pur ont été ajoutées le changement de la couleur a été observé et suivi par l'ajout de quelques gouttes de NH_4OH → le changement de la première couleur indique la présence des Anthocyanes (HARBORNE, 1973).

Recherche des Leuco-anthocyanes Comme les flavonoïdes, les Leucoanthocyanes sont des pigments qui contiennent des principes actifs permettant de maintenir les vaisseaux sanguins en bon état (BRUNETON, 2002).



○ **Caractérisation**

Après un chauffage au bain marie à 50°C pendant quelques minutes de 05mL de l'infusé, mêlé à 04mL d'alcool Chlorhydrique (voir Annexe 03) → l'apparition d'une couleur rouge cerise indique la présence des Leuco-anthocyanes (HARBORNE,1973).

● **Tests préliminaires sur le décocté**

Recherche des Saponosides Ce sont des hétérosides de stérols et de triterpènes très répandus chez les végétaux. Les Saponosides sont caractérisés par leurs propriétés tensions actives (abaisse la tension superficielle). Ils se dissolvent dans l'eau en formant une solution moussante (aphrogènes) (BRUNETON, 2002).

○ **Caractérisation**

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse - degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées-

02 g de matériel végétal sec broyé sont utilisés pour préparer une décoction avec 100mL d'eau (voir Annexe 03).

A partir de cette solution mère, 10 tubes à essais (1,3cm de diamètre interne) ont été préparés dans lesquels un volume croissant de 1, 2,..., 10mL, a été déposé et le volume finale de chaque tube à essais a été ajusté à 10ml avec l'eau distillée, chacun des tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15min en position verticale, la hauteur de la mousse persistante a été relevée en cm. Si elle est proche de 1cm dans le X^{ème} tube, alors l'indice de la mousse est calculé par la formule suivante :

$$I = \frac{\text{Hauteur de mousse (en cm) dans le x tube} \times 5}{0,0x}$$

La présence des Saponosides dans la plante est confirmée avec l'indice I est supérieur à 100 (HARBORNE,1973).

● **Tests préliminaires sur la poudre**

Recherche des Alcaloïdes La majorité des principes actifs des Plantes Médicinales est issue des Alcaloïdes et des Hétérosides. Les Alcaloïdes sont des substances organiques azotées, qui se comportent comme des bases donnant des réactions de précipitations avec certains réactifs (BRUNETON, 2002).



○ **Caractérisation**

05g de la plante séchée et broyée sont mélangés avec 50mL d'HCl à 1% (voir Annexe 03) dans un récipient, après une macération et filtration du mélange quelques gouttes de réactif de *Draguendorff* ont été additionnées au filtrat → l'apparition d'un précipité orangé indique la présence des Alcaloïdes (HARBORNE,1973).

Recherche des flavonoïdes Ce groupe est très répandu chez les végétaux. Ils sont responsables de la coloration jaune de certaines fleurs et de certains fruits. Ils se trouvent le plus souvent sous la forme d'hétérosides ou de flavonosides dont la génine est un dérivé de la phénylchromone (flavone vraie) Les flavonoïdes sont essentiellement employés comme des médicaments de l'insuffisance veineuse (BRUNETON, 2002).

○ **Caractérisation**

10g de drogue pulvérisée sont macérés dans 150mL d'HCl à 1% pendant 24h, après avoir filtré le mélange, test suivant a été réalisé : 10mL du filtrat ont été pris et rendus basique par l'ajout du NH_4OH , après un repos de 3h → l'apparition d'une couleur jaune claire dans la partie supérieure du tube indique la présence des Flavonoïdes (HARBORNE,1973).

Recherche des Cardinolides Ce sont des structures de saponosides stéroïdiques, Ils se présentent sous forme glycosylée ou sous forme aglycone (génine) (BRUNETON, 2002).

○ **Caractérisation**

01g de poudre sèche est macéré dans 20mL d'eau distillée pendant 3h, après filtration 10mL de filtrat ont été prélevés et mélangés à une solution de 10mL de Chloroforme (CHCl_3) et d'Ethanol pur ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), la phase organique a été évaporée dans un bain de sable à 90°C , le précipité est ensuite dissout dans 03mL d'Acide Acétique glacial, en ajoutant quelques gouttes de FeCl_3 suivi de 01mL d' H_2SO_4 concentré sur les parois du tube. L'apparition d'une couleur verte bleue dans la phase acide indique la présence des Cardinolides (HARBORNE,1973).

Recherche des Terpènes et Stérols La structure des terpènes est formée dans la majorité des cas de l'union de deux ou de plusieurs molécules d'Isoprènes C_5H_8 . Ce sont des constituants odorants des essences végétales : l'Ascaridiose est le seul peroxyde terpénoïde de nature connue. Il possède des propriétés pharmacodynamiques très variées en relation avec les différentes fonctions liées au squelette terpénique (BRUNETON, 2002).



○ **Caractérisation**

05g de poudre sont macérés dans 20mL d'Ether de Pétrole, après avoir filtré et évaporé la phase organique dans un bain de sable à 90°C, le résidu est dissout dans 05mL d'Acide Acétique en ajoutant 01mL d'Acide Sulfurique concentré. Dans la zone de contact entre les deux liquides il se forme un cercle marron ou violet ensuite il vire vers le gris, ce changement du cercle indique la présence des Stéroïdes et Terpènes (HARBORNE,1973).

Recherche de l'Amidon C'est un glucide complexe (polyoside) composé de chaînes de molécules de D-Glucose. Il s'agit d'une molécule de réserve énergétique pour les végétaux supérieurs et un constituant essentiel de l'alimentation humaine (BRUNETON, 2002).

○ **Caractérisation**

01g de poudre de matière végétale est macéré dans 03mL d'eau distillée chaude pendant 01h, après filtration, quelques gouttes de réactif d'amidon (liqueur de *Fehling*) ont été ajoutées à la solution aqueuse. L'apparition d'une couleur bleue violacée indique la présence d'Amidon (HARBORNE,1973).

Recherche des dérivés Anthracéniques Ce sont des hétérosides anthracéniques ayant en commun un noyau de base anthracène, nous avons les Anthracéniques libres (les Quinones) et les Anthracéniques combinés (les O-hétéroside, les Hétérosides à génine réduite et les C-hétérosides (BRUNETON, 2002).

○ **Caractérisation**

Dans un tube à essai, 01 g de poudre a été introduit avec 10 mL de CHCl_3 , puis chauffé au bain-marie bouillant pendant 01 minute, après une filtration sur papier buvard le volume a été complété à 10 mL avec du Chloroforme ce qui a constitué l'extrait Chloroformique.

Hydrolysât a été préparé à partir du résidu de poudre épuisé par le Chloroforme est additionné à 10 mL d'eau et 01 mL de HCl concentré. Après un chauffage au bain-marie bouillant pendant 15 minutes, la solution a été refroidie sous un courant d'eau et filtrée. Le filtrat a été complété à 10 mL avec de l'eau distillée.

Les Anthracéniques libres (les Quinones) Elles sont de nature anthracénique plus ou moins oxydée (anthrone, anthranol, anthraquinone).

La coloration plus ou moins rouge de l'extrait chloroformique (01 mL) additionné de NH_4OH dilué au $\frac{1}{2}$ indique la présence d'antraquinones libres (HARBORNE,1973).



Les Anthracéniques combinés

Les O-Hétéroside C'est une substance qui résulte de la condensation d'un ou de plusieurs sucres avec de la génine par un groupement d'hydroxyle, alcoolique ou phénolique (BRUNETON, 2002).

○ Caractérisation

Un mélange à volume égal de 01mL d'hydrolysate et de CHCl_3 a été préparé et agité, après une décantation de la solution la phase organique a été soutirée et mise dans un tube à essai puis agitée avec 01 mL de NH_4OH dilué au $\frac{1}{2}$. La présence d'Anthraquinone est révélée par la coloration rouge plus ou moins intense (HARBORNE,1973).

Les Hétérosides à génine réduite

05 mL d'hydrolysate et 03 à 04 gouttes de FeCl_3 à 10% ont été introduit dans un tube à essai, le tout a été porté au bain-marie bouillant pendant 05 minutes puis refroidit sous courant d'eau. Après refroidissement, la solution a été agitée avec 05 mL de Chloroforme et la phase chloroformique a été ensuite soutirée et agitée avec 01mL de NH_4OH dilué au $\frac{1}{2}$. En présence de produit d'oxydation anthranol, anthrone, la coloration rouge sera plus intense que précédemment (HARBORNE,1973).

Les C-Hétérosides Ce sont des Anthracénosides combinés qui correspondent à l'union d'un sucre avec une génine par une liaison C-C (BRUNETON, 2002).

○ Caractérisation

La phase aqueuse a été additionnée à 01 mL de FeCl_3 à 10% puis chauffée au bain-marie pendant 30 minutes. Après refroidissement sous courant d'eau, cette solution a été agitée avec 05 mL de Chloroforme. La phase chloroformique soutirée a été agitée à son tour avec 01 mL de NH_4OH dilué. L'existence des C-hétérosides est confirmée par la coloration plus ou moins rouge après agitation (HARBORNE,1973).

Recherche des Coumarines Les coumarines viennent du mot – Coumarou- nom vernaculaire de la fève de Tonka (*Coumarouna odorata*). Ce sont des dérivés de la benzo_pyrone ou la lactone de l'acide O hydroxy-cinnamiques. Les propriétés chimiques sont principalement dues à la fonction lactone insaturée notamment l'ouverture de l'anneau lactonique en milieu alcalin (BRUNETON, 2002).

○ Caractérisation

La poudre de la plante a été macérée pendant 24 heures dans l'éther de pétrole. 05 mL de cet extrait a été évaporé à l'air libre. Le résidu a été repris par 02 mL d'eau chaude puis divisé entre deux tubes à essai.



Dans un des tubes 0,5 mL de NH_4OH à 25% a été introduit. L'observation d'une fluorescence intense sous UV à 366 nm dans le tube où il a été ajouté le NH_4OH indique la présence de Coumarines (HARBORNE, 1973).

Recherche des Iridoïdes Les iridoïdes, au sens strict, sont des monoterpènes irréguliers particulièrement instables. Leur dégradation est à l'origine du brunissement rapide des plantes les renfermant, une fois récoltées. Ils prédominent sous une forme hétérosidique. Ils peuvent être extraits par des solvants polaires (BRUNETON, 2009).

○ **Caractérisation**

Une décoction a été réalisée en ajoutant 01 g de matière végétale à 20 mL d'eau distillée. Le tout est a été porté à ébullition pendant une heure. Après refroidissement, le filtrat a été évaporé, et 01 mL de HCl concentré a été ajouté au résidu. La présence d'un précipité noirâtre après chauffage de la solution indique un résultat positif (NAJJAA et al., 2011).

B- Screening phytochimique par Chromatographie sur Couche Mince

La Chromatographie sur Couche Mince est une technique physique de séparation des constituants d'un mélange complexe, utilisant une phase mobile liquide (éluant) constituée par un mélange de solvants qui migre le long d'une phase stationnaire et en se basant sur les phénomènes d'adsorption et de partage (TREASE et AVANS, 1972). L'analyse séparative, notamment par Chromatographie sur Couche Mince (CCM), complète la caractérisation obtenue par criblage phytochimique. Des plaques CCM (gel de silice sur support aluminium 60 F254 Merck Allemagne) de dimensions 7,5 cm x 10 cm ont été utilisées comme phase stationnaire, avec différents solvants et réactifs comme éluants et révélateurs (Tab. 02). Si nécessaire, une lampe UV est utilisée pour identifier les composants. Les extraits ont été préparés dans les solvants respectifs à une concentration de 100 mg/mL. Des volumes de 10 μL des extraits ont été appliqués manuellement sur la plaque à l'aide des capillaires, placée à 01 cm du bas et à 01,5 cm du bord de la plaque, des spots circulaires de diamètre inférieur à 04 mm ont été réalisés et la distance entre deux spots était de 01 cm. Les plaques ont été séchées à l'air ambiant et placées dans les cuves de migration en verre saturées par les phases mobiles appropriées. La distance de parcours de l'éluant a été de 08 cm à partir du point de dépôt des spots. Après migration, les plaques ont été retirées, séchées, examinées sous UV254 nm et UV365 nm, et ensuite révélées avec un réactif spécifique pour l'identification des groupes



chimiques. Les taches obtenues ont été repérées, les distances de migration de celles-ci mesurées et les rapports frontaux R_f ont été calculés comme suit :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par la tache}}{\text{La longueur totale}}$$

TAB. 02: Différents systèmes de solvants et agents de pulvérisation des tests de confirmation utilisés pour le profilage CCM des substances phytochimiques

Métabolites secondaires	Solvants d'extraction	Phase mobile	Révélation	Références
Flavonoïdes	Méthanol	Acide acétique 15% dans l'eau	AlCl ₃ à 05% dans un mélange eau/ Méthanol (1 :1)	(DOHOU et al., 2003)
Tanins	Acétone	Acétate d'éthyle / Méthanol/ eau (40 :8 :5)	FeCl ₃ / Acide Acétique / eau (2 :2 :96)	(SY et al., 2008)
Phénols	Méthanol	Méthanol/ eau (2 :1)	FeCl ₃ à 10%	(MEHTA et al., 2017)
Coumarines	Chloroforme	Acétate d'éthyle/ Toluène (10 :93)	Ammoniaque NH ₃	(DOHOU et al., 2003 ; ALILOU et al., 2014)
Anthraquinones	Méthanol	Acétate d'éthyle/ Méthanol/ eau (81 :11 :8)	KOH à 10% dans l'éthanol	(OKOMBE EMBEYA, 2011)
Alcaloïdes	Méthanol	Acétate d'éthyle/ Chloroforme/ eau (5 :3 :1)	Draguendorff	(MEHTA et al., 2017)
Iridoïdes	Ethanol à 60°	Chloroforme Ethanol-Eau (50 : 35 : 10)	HCl au 1/10 et un séjour à l'étuve à 100 C° pendant quelques minutes	KOOIMAN (1969) et d'INOUYE et al., (1969)

2.2.3.2. Tests quantitatifs

A- Dosages des métabolites secondaires-

○ Dosage des Flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par spectrophotométrie UV-visible à 510 nm selon la méthode d'AlCl₃ qui forme un complexe jaune avec les flavonoïdes (TSHIBANGU et al.,



2016), en utilisant comme standard la Catéchine, les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en $\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait.

▪ Préparation des extraits

0,5 g de la matière sèche est extrait avec 10 mL de (Me-OH/H₂O ; 7 : 3 ; V/V) pendant 24 heures dans l'obscurité. Le filtrat obtenu est utilisé pour l'analyse.

▪ Méthode

01mL de l'extrait convenablement dilué et de la solution du composé étalon, Catéchine (20, 40, 60, 80, 100 mg/L) a été introduit dans une fiole jaugée de 10 mL contenant au préalable 4 mL d'eau distillée. A l'instant $t = 0$, on y introduit 0,3 mL de NaNO₂ à 5 % (P/v). A $t = 5\text{mn}$ on y ajoute 0,3 mL de AlCl₃ à 10 % ; 6 minutes après, on y ajoute 02 ml de NaOH à 1M. Immédiatement le mélange réactionnel a été dilué avec 2,4 mL d'eau distillée et agité vigoureusement.

L'absorbance de la solution rose est déterminée à 510 nm contre un blanc (contenant du Méthanol) à l'aide d'un spectrophotomètre (WPA UV-Visible) (LAMAISON & CARNET, 1990 ; HUANG et al., 2004).

○ Dosage des Polyphénols

Les Polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie en utilisant la méthode de *Folin Ciocalteu*.

▪ Préparation des extraits

0,5 g de la matière sèche est extrait avec 10 mL de (MeOH/H₂O; 7:3; V/V) pendant 24 heures dans l'obscurité. Le filtrat obtenu est utilisé pour l'analyse.

▪ Méthode

01mL d'extrait de plante ou de la solution d'Acide Gallique (10, 20, 40, 60, 80, 100 mg/L) convenablement dilué a été introduit dans une fiole jaugée de 25 mL contenant initialement 09 mL d'eau distillée. Ensuite 01 mL du réactif de *Folin Ciocalteu* a été ajouté et agité vigoureusement.

Après 5 minutes, une solution de Na₂CO₃ à 7% (10 mL) a été ajoutée tout en agitant. La solution est immédiatement diluée et ajustée au trait de jauge avec de l'eau distillée et le mélange a été agité vigoureusement.



Après une incubation de 90 min dans l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 750 nm en utilisant le Méthanol comme blanc à l'aide d'un spectrophotomètre (WPA UV-Visible).

La teneur en polyphénols totaux est exprimée en équivalents de mg de l'Acide Gallique par gramme de plante sèche en se référant à la courbe d'étalonnage de l'Acide Gallique. Tous les essais sont reproduits en triplicata et la teneur en polyphénols des échantillons analysés ont été déterminées par la relation suivante : (SINGLETON et al., 1999 ; HEILEROVA et al., 2003)

$$\text{Teneur en polyphénols (mg / 100 g)} = 100 (C.V) / m$$

C : Concentration de l'extrait.

V : Volume de solvant utilisé pour l'extraction (en litres)

m : Masse en grammes de la prise d'essai.

B- Extraction des flavonoïdes

▪ Protocole

Afin d'extraire l'ensemble des flavonoïdes (aglycones et glycosylés), nous avons suivi la méthode décrite par Harborne (1989), illustrée à la (Fig. 17). Un poids de 100 g de poudre végétale (feuilles) a été mis en macération dans 500 mL d'un mélange de méthanol et d'eau (7/3, v/v) pendant 24 heures, puis filtré à l'aide d'un papier filtre. Cette étape a été répétée quatre fois avec le même mélange de solvants, et la quatrième macération a été chauffée. Le filtrat total obtenu a été évaporé à moins de 70 °C jusqu'à obtenir un résidu sec. Ce résidu a ensuite été macéré dans de l'eau bouillante pendant une nuit, puis filtré à l'aide d'un papier filtre n° 589. La deuxième étape consiste à l'affrontement de la phase aqueuse obtenue avec du n-butanol. Dans une ampoule à décanter, le filtrat a été mélangé avec du n-butanol. Après agitation et décantation, deux phases ont été formées : une phase organique (butanolique) en haut et une phase aqueuse, plus dense, en bas. Les deux phases ont été séparées, et la phase aqueuse a été soumise à deux autres extractions avec le même solvant, le n-butanol, afin d'extraire un maximum de substances flavonoïdiques.

Enfin, la phase organique totale obtenue a été évaporée à sec à 65 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif (BUCHI Rotavapor R-114, équipé d'un bain-marie BUCHI Waterbath B-480). Le résidu d'évaporation représente donc l'extrait total de flavonoïdes qui sera utilisé dans cette étude.

▪ Calcul de rendement

Le poids de l'extrait sec a été déterminé par la différence entre le poids du ballon plein et celui du ballon vide. L'extrait butanolique, récupéré après évaporation à sec et sous pression réduite,



a été pesé pour obtenir le poids sec résultant. Le rendement a ensuite été calculé par rapport à 100 g de matériel végétal sec, et le résultat a été exprimé en pourcentage (p/p).

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

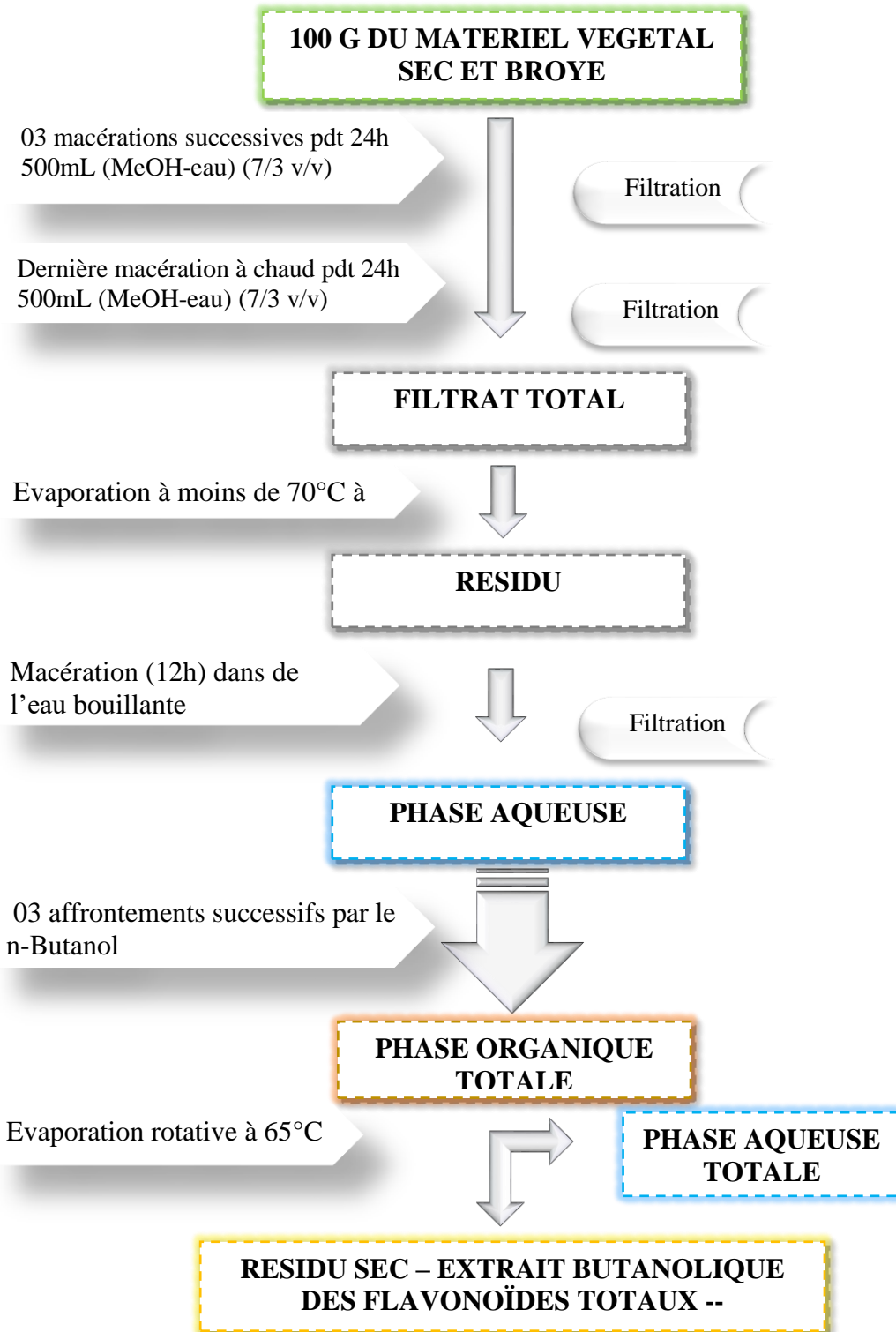


FIG.17 : Protocole expérimental d'extraction des flavonoïdes (HARBORNE 1989).



C- Analyse Chromatographique par HPLC

Pour déterminer la composition chimique des flavonoïdes extraits, une analyse chromatographique en phase liquide (HPLC) a été réalisée. Cette analyse a été effectuée au Laboratoire de Nutrition, Alimentation Fonctionnelle et Santé Vasculaire, à la Faculté de Médecine de l'Université de Monastir, en Tunisie.

La Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) est considérée comme la technique chromatographique la plus puissante. Elle est dérivée de la Chromatographie Liquide (LC) et repose sur l'application des théories et de l'instrumentation initialement développées pour la Chromatographie en Phase Gazeuse (GC) (SANDY, 1991).

La Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (HPLC) repose sur la pression de la phase mobile, ou éluant, pour effectuer les séparations. Contrairement à la Chromatographie sur Colonne, où l'élution se fait de manière gravitationnelle, la HPLC utilise une pompe pour appliquer une forte pression, ce qui favorise la séparation des composés (SNYDER et al., 2011). Cette méthode est largement utilisée, en particulier dans le domaine de la chimie des substances naturelles, pour la séparation et l'identification de divers composés. Elle est souvent associée à la Spectrométrie de Masse ou à la Spectrométrie UV-visible. De plus, la HPLC est également employée pour l'identification, la séparation et la quantification de certaines familles de molécules présentes dans les extraits de plantes (BOBZIN et al., 2000; CHANDRA et al., 2001).

○ Appareillage

Lors du dosage des composés phénoliques, nous avons utilisé un chromatographe de la marque Hewlett Packard (Waldbronn, Allemagne) équipé d'un injecteur de modèle Rheodyne 7725 (Cotati, CA, USA). Cet appareil comprend un réservoir pour la phase mobile, une pompe de type HP-1100 et un détecteur UV réglé à 280 nm. La colonne utilisée est une Technochrom Eurosphère 100 (gel de silice-C18, 250 x 8 mm). Les données recueillies ont été analysées à l'aide du logiciel de chromatographie HPCHEM.

○ Conditions opératoires

Le volume d'injection des flavonoïdes était de 20 μ L. La phase mobile était constituée d'acétonitrile (Phase A) et d'une solution d'acide sulfurique mélangée à de l'eau ultra pure dans un rapport de 2/98 (v/v) (Phase B). Le débit d'écoulement de la phase mobile était fixé à 0,8 ml/min. Le programme d'analyse a été récapitulé dans le tableau suivant (Tab. 03) :

**TAB. 03:** Gradient d'élution pour l'analyse chromatographique des flavonoïdes.

<i>Temps (min)</i>	<i>% de la phase mobile (A)</i>
0	15
12	40
14	60
18	80
20	90
24	100
28	100

D- Évaluation des propriétés médicamenteuses et de l'ADMET des composés identifiés *in Silico*

L'évaluation des propriétés similaires à celles des médicaments (Drug-likeness) d'un composé médicinal est essentielle pour déterminer sa biodisponibilité orale, étant donné que de nombreux médicaments sont administrés par voie orale. La **règle des cinq de Lipinski** a été utilisée pour évaluer les ligands naturels les plus importants selon ce critère fondamental.

La prédiction des propriétés **ADME** (Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion) des composés identifiés, ainsi que leurs caractéristiques pharmacocinétiques et leurs propriétés de type médicamenteux, a été réalisée à l'aide du serveur web **SwissADME**.

Le site **ProTox-II** a été utilisé pour analyser le profil de toxicité. Il effectue des prédictions basées sur de nombreux paramètres, notamment la **toxicité des organes** (hépatotoxicité) et les **effets toxiques** (cytotoxicité, cancérogénicité et immunotoxicité).



La prédiction de la toxicité des composés a été classée en **six catégories** :

- **Classe 1** : extrêmement létale ($DL50 \leq 5$ mg/kg)
- **Classe 2** : mortelle ($5 < DL50 \leq 50$ mg/kg)
- **Classe 3** : toxique ($50 < DL50 \leq 300$ mg/kg)
- **Classe 4** : nocive ($300 < DL50 \leq 2000$ mg/kg)
- **Classe 5** : potentiellement dangereuse ($2000 < DL50 \leq 5000$ mg/kg)
- **Classe 6** : non toxique ($DL50 > 5000$ mg/kg)

2.2.4. Essai Physiologique

2.2.4.1. Étude des activités biologiques *in vitro* (tests chimiques)

A- Evaluation de l'activité antioxydante

Étant donné la complexité des processus d'oxydation et la diversité des antioxydants, qui comprennent des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'existe pas de méthode unique pour représenter le profil antioxydant d'un échantillon. Pour évaluer sa capacité antioxydante, il est essentiel de combiner les résultats obtenus à partir de différents tests complémentaires (TABART et al., 2009; DE GAULEJAC et al., 1999; HUA LI, 2008). Selon PRIOR et al. (2005), les méthodes combinées (Tab. 04) montrent que les molécules ou extraits naturels peuvent neutraliser les radicaux libres en transférant des électrons et/ou des protons issus des réactions d'oxydation (PRIOR et al., 2005).

Pour évaluer l'activité antioxydante, trois méthodes ont été employées afin de caractériser le profil antioxydant de l'Agave : le test de piégeage du radical libre DPPH, le test de réduction du fer (FRAP) et le test ABTS. Deux extraits ont été analysés : le premier est un extrait brut de la plante, obtenu par macération de 1 g de poudre de la plante dans 10 mL de méthanol/eau (7:3) (v:v) pendant 24 heures. Le second extrait a été préparé en macérant 10 mg de flavonoïdes dans 10 mL de méthanol/eau (7:3) (v:v).



TAB. 04: Récapitulatif des différents tests antioxydants *in vitro* (PRIOR et al.,2005).

Tests	DPPH	ABTS ou TEAC	FRAP	ORAC
Mécanismes réactionnels	• transfert d'électron majoritaire	• transfert d'électron et de proton	•transfert d'électron	• transfert de proton
Nature des molécules testées	• hydrophiles et lipophiles	• hydrophiles et lipophiles	•hydrophiles	•hydrophiles et lipophiles
Expression des résultats	• CI ₅₀ et/ou en mg ou µmol équivalent Trolox [®]	• CI ₅₀ et/ou en mg ou µmol équivalent Trolox [®]	•en mg ou µmol équivalent Fe ²⁺	• CI ₅₀ et/ou en mg ou µmol équivalent Trolox [®]
Avantages	•très facile à mettre en œuvre • peu couteux	• très facile à mettre en œuvre • cinétique de réaction très rapide • peu couteux	• très facile à mettre en œuvre •peu couteux	•facile à mettre en œuvre •couteux (nécessité d'un fluorimètre) • Utilisation d'un générateur de radicaux (ROO [•])
Inconvénients	• encombrement stérique de molécules à hauts poids moléculaires •interférences possibles à 515 nm •forte dépendance au pH et au solvant • radical inexistant <i>in vivo</i>	• produits de dégradation antioxydants radical inexistant <i>in vivo</i>	•pH utilisé non physiologique •interférences possibles à 595 nm •interférences avec composés possédant E°< 0,77 V	• mécanismes de génération des ROO [•] non physiologique • interférences possibles des protéines
Références	[Brand-Williams <i>et al.</i> , 1995; Pinelo <i>et al.</i> , 2004]	[Awika <i>et al.</i> , 2003; Arts <i>et al.</i> , 2004; Osman <i>et al.</i> , 2006]	[Benzie et Strain, 1996; Ou <i>et al.</i> , 2002]	[Ou <i>et al.</i> , 2001; Lopez <i>et al.</i> , 2003]
[Prior <i>et al.</i> , 2005]				



○ Test de piégeage du radical libre DPPH

D'un point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH• est recommandé pour les composés contenant des groupes SH-, NH- et OH- (SALAH et al., 1995). Ce test s'effectue à température ambiante, ce qui permet d'éviter tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles. Il est largement utilisé pour évaluer l'évolution des extraits hydrophiles provenant de thé vert, de jus de fruits, ainsi que de pépins et de pulpes de raisins, qui sont particulièrement riches en composés phénoliques (YI-ZHONG et al., 2006 ; HATZIDIMITRIOU et al., 2007).

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (également connu sous le nom d' α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fût l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation entre la structure et l'activité antioxydante des composés phénoliques (BLOIS, 1958 ; BRAND-WILLIAMS, 1995). Le DPPH• possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Fig. 18). En raison de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas de dimères, et le DPPH• reste sous sa forme monomère relativement stable à température ambiante. Cette délocalisation est également responsable de la couleur bleue caractéristique de la solution de DPPH•. L'efficacité d'un antioxydant est mesurée en observant la diminution de cette coloration bleue, résultant de la recombinaison des radicaux DPPH•, ce qui peut être quantifié par spectrophotométrie à 515-518 nm (POPOVICI et al., 2009).

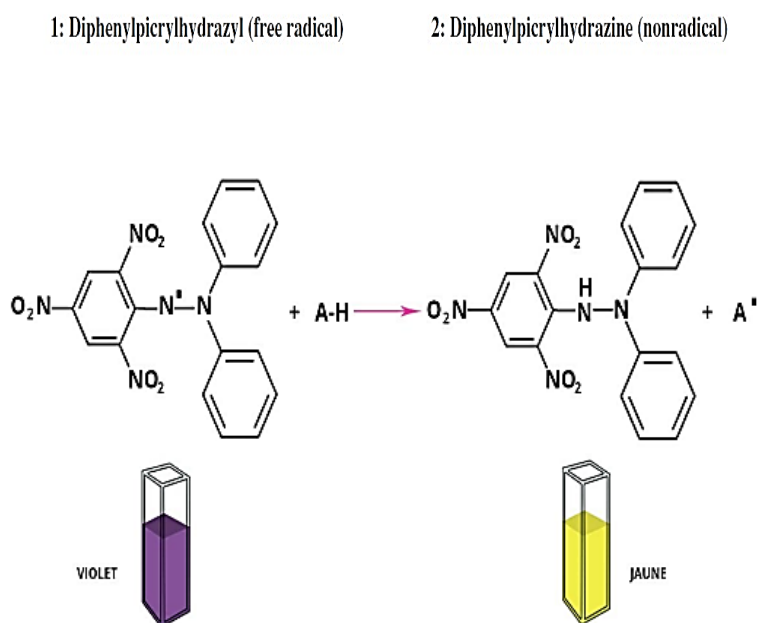


FIG.18: Mécanisme d'action du DPPH (MOLYNEUX, 2004).



• Test préliminaire sur CCM

Une plaque de gel de silice (60 F254 Merck Allemagne) possédant un support en aluminium a été utilisée comme phase stationnaire, pour le système de migration, un mélange de n-Butanol, Acétate d'Éthyle et Eau (B.A.W) dans un rapport de 4/1/5 (v/v/v) a été utilisé. Un volume de 5 μL d'extrait flavonoïque (100 mg/mL) et de standard (5 mg/mL) a été déposé sur la plaque, qui a ensuite été introduite dans une chambre de migration préalablement saturée par les vapeurs de la phase mobile. Après le développement, la plaque a été séchée sous une hotte et révélée à l'aide d'une solution méthanolique de DPPH à 2 % pour détecter les composés présentant une activité antioxydante ; les constituants de l'extrait présentant une activité antiradicalaire apparaissent sous forme de spots de couleur Jaune-blanc sur fond violet (JUMA & MAJINDA, 2004).

• Test Spectrophotométrique

Cette partie a été réalisée au Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO) à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen. Le test repose sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH●). Ce radical est réduit à sa forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est évalué selon la procédure décrite par SANCHEZ-MORENO et al. (1999).

Un volume de 50 μL de chaque solution méthanolique des extraits, à différentes concentrations, a été ajouté à 1950 μL de la solution méthanolique de DPPH (0,025 g/L). Parallèlement, un contrôle négatif a été préparé en mélangeant 50 μL de méthanol avec 1950 μL de la solution de DPPH. L'absorbance est mesurée à 517 nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, en utilisant un blanc préparé pour chaque concentration. Le contrôle positif a été représenté par une solution d'acide ascorbique, un antioxydant standard, dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que pour les échantillons. Pour chaque concentration, le test a été répété trois fois. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition. (I %)

$$I\% = \left[\frac{\text{Abs contrôle} - \text{Abs test}}{\text{Abs contrôle}} \right] \times 100$$

La CI50 est la concentration d'extrait qui provoque l'inhibition de 50 % des radicaux DPPH. Elle est déterminée graphiquement par régression linéaire à partir des graphes représentant le pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations. Les résultats peuvent



également être exprimés en termes de puissance antiradicalaire (ARP) (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

○ **Test de la réduction du Fer : Méthode FRAP**

Cette partie a été réalisée au Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO) à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen. La méthode FRAP repose sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}), permettant d'évaluer le pouvoir réducteur des composés (OU et al., 2001). La présence de réducteurs (AH) dans les extraits végétaux entraîne la réduction du complexe Fe^{3+} /ferricyanide à sa forme ferreuse (Fig. 19). Ainsi, le Fe^{2+} peut être quantifié en mesurant l'augmentation de la densité de la couleur bleu cyanée dans le milieu réactionnel à 700 nm (CHUNG et al., 2002). Le système $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ confère à cette méthode une sensibilité particulière pour la détermination semi-quantitative des concentrations d'antioxydants participant à la réaction redox (AMAROWICZ et al., 2004).

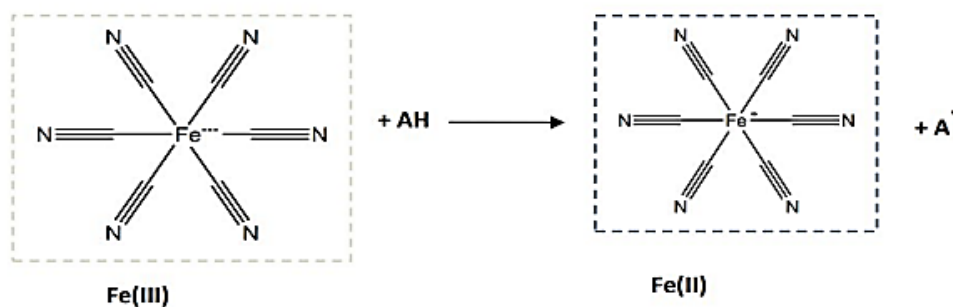


FIG.19: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe Ferricyanide Ferrique Fe (III) et un antioxydant (AH) (AMAROWICZ et al., 2004).

Le pouvoir réducteur des flavonoïdes extraits est déterminé selon la méthode décrite par OYAIZU en 1986. Pour ce faire, 1 mL de l'extrait à différentes concentrations (de 1 à 10 mg/mL) est mélangé avec 2,5 mL d'une solution tampon phosphate à 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1 %. Ce mélange est ensuite incubé au bain-marie à 50 °C pendant 20 minutes.

Après incubation, 2,5 mL d'acide trichloroacétique à 10 % sont ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes à essai sont ensuite centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes. Une aliquote de 2,5 mL du surnageant est combinée avec 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 0,1 %.



L'absorbance du milieu réactionnel est mesurée à 700 nm contre un blanc préparé de manière similaire, où l'extrait est remplacé par de l'eau distillée pour calibrer le spectrophotomètre UV-VIS. Le contrôle positif est représenté par une solution d'acide ascorbique, un antioxydant standard, dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que pour les échantillons. Une augmentation de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (SINGLETON, 1965).

○ ABTS test

Cette partie a été réalisée au Laboratoire de Synthèse et de Biocatalyse Organique, Département de Chimie, à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba. Dans le cadre de ce test, l'ABTS incolore est d'abord oxydé avec du persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) pour former le radical cationique $ABTS^{+\bullet}$, qui présente une coloration bleu-vert (Fig. 20). L'ajout d'un composé antioxydant entraîne la réduction du radical $ABTS^{+\bullet}$ en ABTS. L'activité antioxydante est évaluée par la décoloration de la solution, exprimée en pourcentage d'inhibition (PI) de l'absorbance à 734 nm, longueur d'onde à laquelle le radical $ABTS^{+\bullet}$ affiche une bande d'absorption caractéristique (OSMAN et al., 2006 ; MOON & SHIBAMOTO, 2009).

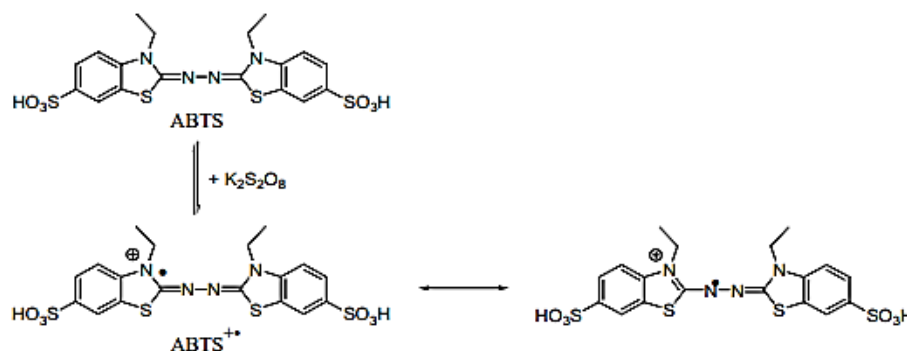


FIG.20: Formation du radical cation $ABTS^{+\bullet}$ à partir de l'ABTS (SARR, 2015).

Le test ABTS a été réalisé selon la méthode décrite par RE et al. (1999). Pour cela, 0,1 g de la plante est extrait avec 20 mL de mélange méthanol/eau (14:6, V/V) pendant 24 heures dans l'obscurité. Le filtrat obtenu est ensuite utilisé pour l'analyse. Une solution d'ABTS à 7 mmol réagit avec 2,45 mmol de $(NH_4)_2S_2O_8$, puis est conservée pendant 12 à 16 heures dans l'obscurité pour obtenir une couleur sombre contenant les radicaux $ABTS^{+\bullet}$. L'absorbance est mesurée à la longueur d'onde maximale de 734 nm. Cette solution mère est ensuite diluée avec du méthanol pour atteindre une absorbance finale de $0,70 \pm 0,02$. L'extrait de plante (0,1 mL) est ajouté à 4,9 mL de la solution radicalaire d'ABTS. Le mélange est incubé à 37 °C dans un bain-marie à l'abri de la lumière pendant 20 minutes. Un contrôle, constitué de 0,1 mL de



méthanol et de 4,9 mL de la solution d'ABTS, est mesuré avec chaque série d'extraits à 734 nm. La capacité antioxydante totale des extraits de plante est exprimée en mg de vitamine C équivalent (mg VCE) par 100 g de matière sèche. La solution radicalaire d'ABTS est préparée fraîchement, et tous les tests sont reproduits au moins trois fois.

À partir d'une solution mère standard de 20 mg/L, des solutions filles de concentrations respectives (2, 5, 10, 15 mg/L) sont préparées. En suivant le protocole décrit ci-dessus, les absorbances correspondantes à chaque concentration sont obtenues, ce qui permet de tracer la courbe d'étalonnage (BÖHM et al., 2002 ; RE et al., 1999).

B- Evaluation de l'activité antibactérienne des flavonoïdes extraits

L'évaluation de la sensibilité aux flavonoïdes extraits a été déterminée par la méthode standard de diffusion en milieu gélosé de Mueller-Hinton selon *Kirby-Bauer* et interprétée selon les recommandations du Comité International pour les Normes de Laboratoire Clinique NCCLS de (1997) et précédemment décrite par RAHAL et al. (2005).

Le principe de cette méthode, largement utilisée en microbiologie pour les antibiogrammes et antifongigrammes, repose sur la diffusion d'un composé antimicrobien dans un milieu solide, dans une boîte de Pétri. À partir d'un point précis, un gradient de concentration se crée après un temps de contact déterminé entre le produit et le microorganisme. L'effet de ce produit sur la cible est évalué par la mesure d'une zone d'inhibition. Selon le diamètre de cette zone, la souche du microorganisme est classée comme sensible, intermédiaire ou résistante. Cette technique implique une compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit testé. L'ensemble de l'activité antibactérienne a été réalisée conformément aux recommandations du Comité International pour les Normes de Laboratoire Clinique (NCCLS, 1997 ; RAHAL et al., 2005).

Pour évaluer l'activité antibactérienne des flavonoïdes extraits de l'Agave, nous avons préparé deux solutions mères à des concentrations de 20 mg/mL et 200 mg/mL. Ces solutions ont été obtenues en dissolvant respectivement 20 mg et 200 mg de flavonoïdes extraits dans 01 mL de DMSO (Diméthyl Sulfo-Oxyde). Par la suite, des dilutions en cascade ont été réalisées à partir de chaque solution mère pour obtenir les concentrations indiquées dans le tableau (05).



TAB. 05: Dilutions en cascade des solutions mère utilisées

20 mg/mL	200 mg/mL
10 mg/mL	100 mg/mL
05 mg/mL	50 mg/mL
2.5 mg/mL	25 mg/mL
1.25 mg/mL	12.5 mg/mL

Un antibiotique commercial, le Cefixime (CFM), a été testé dans les mêmes conditions et sur les mêmes souches. Les manipulations ont été réalisées sous un bec benzène pour prévenir toute contamination.

Les bactéries ont été incubées à 37 °C pendant 18 à 20 heures sur une gélose nutritive pour leur réactivation. Des suspensions bactériennes à une concentration de 1×10^8 CFU/mL (Unité Formant Colonie) ont été préparées, avec une opacité équivalente à 0,5 McFarland, correspondant à une densité de 0,08 à 0,10 mesurée à 625 nm, dans une solution saline à 0,9 %.

Des disques de papier stériles ont été chargés avec 10 µl de chaque dilution de flavonoïdes, tandis que des disques de Cefixime (Sigma-Aldrich) ont été utilisés comme contrôle positif. La gélose Mueller-Hinton a été versée dans des boîtes de Pétri, qui ont été incubées à 37 °C pendant 18 heures. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés avec précision à l'aide d'un pied à coulisse, et la sensibilité des bactéries aux flavonoïdes a été classée selon le diamètre des zones d'inhibition (Tab. 06), suivant la méthode décrite par DURAFFOURD et al. (1997).

TAB.06 : Classement des bactéries selon le diamètre d'inhibition (DURAFFOURD et al. 1997).

Diamètre d'inhibition :	Inferieur à 8mm	De 8à 14mm	De 14à20mm	Supérieur à 20mm
Sensibilité du germe :	résistante	Sensibilité limitée	Sensibilité moyenne	Très sensible
Degré d'activité :	(-)	(+)	(++)	(+++)



Les résultats de cette section ont été présentés sous forme de moyenne \pm écart type (Moyenne \pm SD). L'analyse statistique des données a été réalisée en utilisant le test de Tukey pour comparer les moyennes entre elles et celles des témoins, à l'aide du logiciel IBM SPSS® Statistics V.25 (2017). Les différences sont considérées comme :

- Significatives lorsque ($P < 0,05$).
- Hautement significatives lorsque ($P < 0,01$).
- Très hautement significatives lorsque ($P < 0,001$).

2.2.4.2. Étude des activités biologiques *in vivo*

Après une période d'adaptation d'un mois les rates ont été soumises aux traitements suivants :

○ Induction du cancer du côlon

Le D.M.H a été dilué dans de l'huile d'olive en raison de 30 mg/kg en se référant aux travaux de DE JONG et al. en (2000), puis administré par voie orale par gavage. Un rappel a été effectué sept jours après la première induction, à la même dose de 30 mg/kg.

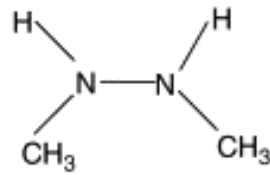
La 1,2-diméthylhydrazine (DMH) (Fig.21) est un puissant cancérigène qui induit le cancer du côlon chez les animaux de laboratoire (FRAZIER et al., 1991 ; NEWELL & HEDDLE, 2004 ; SAINI et al., 2009). Il constitue le modèle le plus largement utilisé de carcinogénèse du côlon induit chimiquement (IONOV et al., 1993). Le cancer expérimental du côlon induit par le DMH chez le rat est un processus prolongé en plusieurs étapes, qui présente un grand nombre de caractéristiques cinétiques cellulaires, histopathologiques et moléculaires de la tumorigénèse qui imite le cancer du côlon chez l'Homme (HALLINE et al., 1989). C'est un processus à plusieurs étapes impliquant une série d'altérations pathologiques, telles que la formation de foyers cryptiques aberrants (lésion microscopique discrète ; (IONOV et al., 1993).

Le DMH est métabolisé dans le foie, ce qui entraîne la production d'un ion diazonium électrophile, connu pour provoquer un stress oxydatif (FIALA, 1977 ; FIALA et al., 1987).

FIALA en (1975) a déjà signalé que le métabolite actif du DMH est excrété par la bile et est responsable de son effet cancérigène sur le côlon lors de son passage dans le tube digestif. Le DMH est métabolisé dans le foie pour former de l'azoxyméthane et du méthylazoxyméthanol qui sont ensuite transportés vers le côlon via la bile ou le sang pour générer son métabolite cancérigène ultime, l'ion diazonium, qui provoque un stress oxydatif en méthylant les biomolécules des cellules épithéliales du côlon et conduit à des événements promutagènes résultant de l'inflammation et de la promotion des tumeurs (FIALA, 1975).



L'Homme est exposé au DMH et à d'autres hydrazines par le biais de l'environnement (FRAZIER et al., 1991) et de l'alimentation (TOTH, 1991 ; TOTH & GANNETT, 1990).



Dimethylhydracine - DMH

FIG.21 : Structure chimique du DMH (Marian, 2004).

○ **Traitement par les flavonoïdes**

Les flavonoïdes ont été dilués dans de l'éthanol à 10 % et administrés par voie orale par gavage à raison de 30 mg/kg pendant 10 jours. Cette administration a eu lieu avant l'administration du DMH pour le groupe préventif, et après pour le groupe curatif. En revanche, le groupe shame a reçu uniquement les flavonoïdes à la même dose de 30 mg/kg pendant 10 jours. Les différentes étapes du protocole sont résumées dans la figure (Fig. 22).

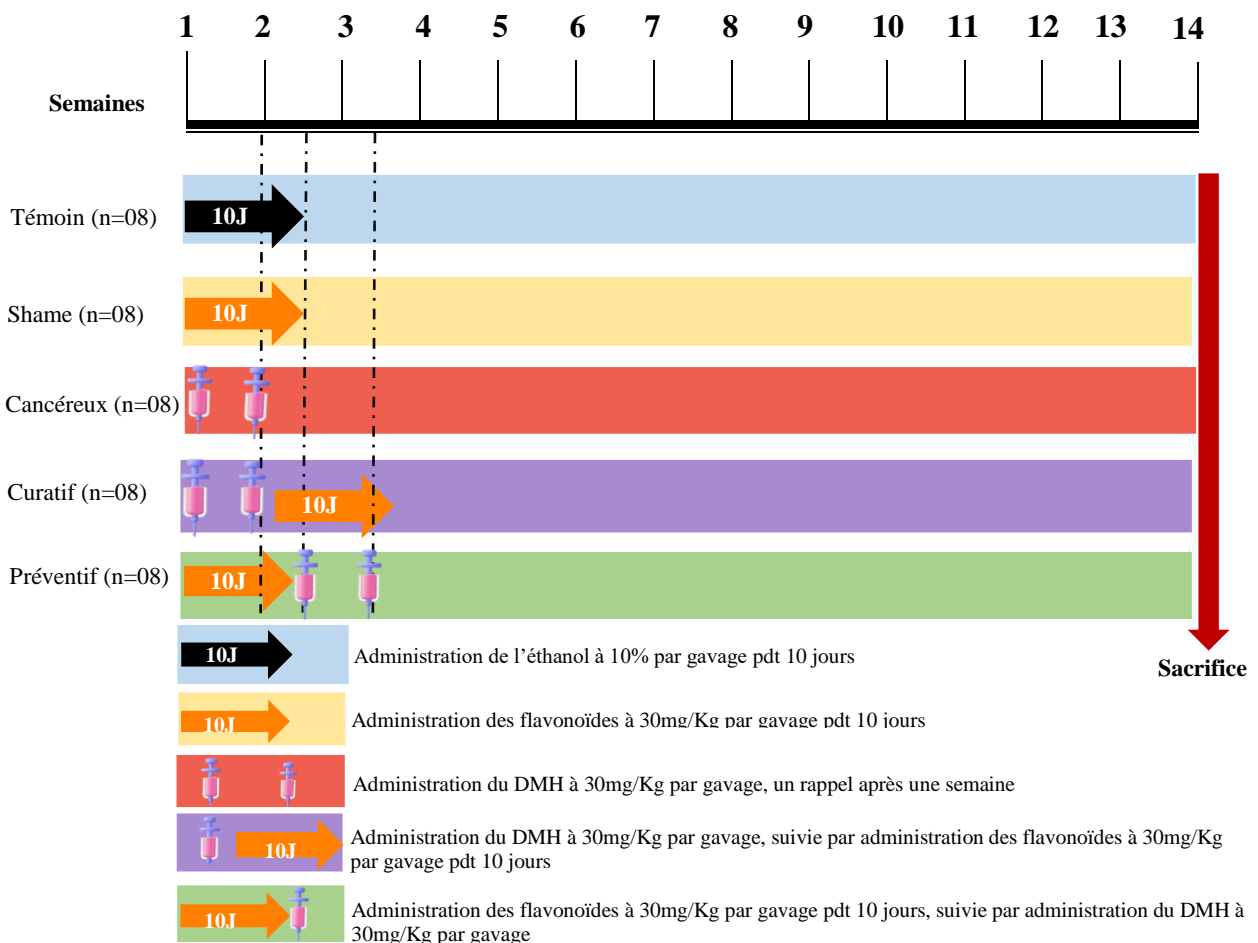


FIG.22: Protocole expérimental des différents traitements.



○ Protocole de Sacrifice et de Prélèvement des Organes

Le sacrifice des animaux a été réalisé par décapitation après un traitement de 14 semaines. Avant le sacrifice, chaque rate a été pesée. Les animaux ont été par la suite placés en décubitus dorsal sur une plaque en liège. Une incision a été effectuée, allant de l'orifice uro-génital jusqu'au cou (Fig.23). Les organes tels que le foie, les reins et la rate ont été prélevés à l'aide d'une pince fine, sous glace, puis pesés avec une balance de précision. Les colons ont été retirés et mesurés sur du papier millimétrique. Ils ont ensuite été rincés à l'aide d'une solution de NaCl à 9%. Finalement, les colons ont été ouverts longitudinalement de l'anus au cæcum et divisés en deux sections : la première section a été fixée dans une solution de formaldéhyde à 10 % pendant 24 heures pour une observation microscopique, tandis que la deuxième section a été broyée dans une solution T.B.S pour le dosage des biomarqueurs.

Ce protocole assure une collecte rigoureuse et précise des échantillons pour les analyses ultérieures.



FIG.23: Dissection et mise en évidence du côlon.



○ **Mise en évidence de foyers de cryptes aberrantes (Aberrant Crypt Foci)**

A.F.C

Découverts par BIRD en 1987, les ACF (les lésions adénomateuses atypiques) sont considérées comme des lésions paranéoplasiques du cancer du côlon, pouvant prédire l'apparition de tumeurs. Depuis cette découverte, les ACF ont été largement utilisées à des fins biologiques pour évaluer l'induction ou la modulation de la carcinogenèse colique chez le rat et la souris.

Les colons, fixés à plat dans de la formaline à 10 %, sont divisés en trois sections : proximale, médiane et rectale. Ils sont ensuite colorés au Bleu de Méthylène pour permettre l'observation microscopique (avec un grossissement de 4x10) de l'ensemble de la surface de la muqueuse colique, ainsi que pour le comptage des ACF et des cryptes qui les composent (BIRD, 1987).

▪ **Mode opératoire**

Les colons sont d'abord rincés à l'eau distillée pour éliminer le formol. Ensuite, ils sont placés sur une lame de verre, avec la muqueuse (côté bombé) orientée vers le haut, puis colorés avec deux à trois gouttes de Bleu de Méthylène à 0,05 % (voir annexe 04). Ce colorant commence par colorer les noyaux avant de s'étendre à l'ensemble des tissus ; il est crucial de s'assurer que tous les ACF sont bien colorés. Les colons sont ensuite examinés au microscope avec un grossissement de G4x10, permettant ainsi de couvrir toute la surface du côlon.

Pour différencier les ACF des cryptes normales, plusieurs critères sont observés :

- **Coloration** : plus intense.
- **Forme** : allongée, avec une lumière des cryptes souvent dilatée et parfois tortueuse.
- **Paroi** : épaisse.
- **Taille** : 2 à 3 fois supérieure à celle des cryptes normales.
- **Structure** : surélevée (BIRD, 1987).

○ **Exploration du statut antioxydant**

▪ **Dosage des protéines tissulaires**

Principe La quantification des protéines a été déterminée selon la méthode de BRADFORD (1976), les ions cuivriques dans un milieu alcalin interagissent avec les ions Peptidiques des protéines formant un complexe coloré (WEICHSELBAUM & AMER, 1946 ; GORNALL et al., 1949).



Mode opératoire

Un volume de 100 μ l du surnageant du colon a été mélangé avec 4 ml de bleu brillant de Comassie (BBC) (G250, Merck) en tant que réactif.

Le mélange a été agité et laissé à température ambiante pendant 5 minutes pour permettre la stabilisation de la couleur (de l'eau distillée a été utilisée à la place du surnageant pour le blanc). La lecture a été effectuée à une longueur d'onde de 595 nm (BRADFORD,1976).

Pour la gamme d'étalonnage, le sérum albumine de bœuf (Sigma, France) a été utilisé comme standard selon les indications mentionnées dans le tableau (07) :

TAB.07 : Gamme d'étalonnage des protéines (BRADFORD,1976)

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution d'Albumine (BSA μl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillé (μl)	100	80	60	40	20	0
Réactifs BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

▪ Dosage de l'activité du Glutathion (GSH)

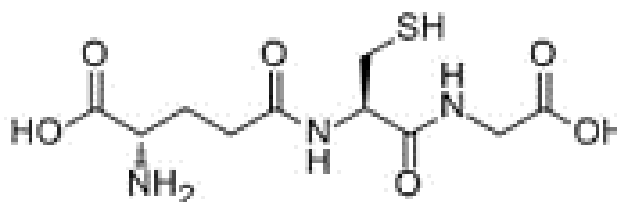
Le glutathion (GSH) est un tripeptide constitué de trois acides aminés : la glycine, la cystéine et le glutamate. Ce tripeptide est présent en grande quantité dans les cellules d'un large éventail d'espèces et joue des rôles fonctionnels essentiels. Le groupe nucléophile cystéine-thiol est considéré comme le principal acteur de la molécule, servant de médiateur pour ses diverses activités biologiques. Parmi les petites molécules peptidiques, la structure du GSH est unique, car les résidus N-terminaux de l'acide glutamique et de la cystéine sont reliés par une liaison peptidique atypique, impliquant le groupe γ -carboxyle de la fraction glutamyle plutôt que le groupe α -carboxyle, comme c'est le cas dans les liaisons peptidiques conventionnelles (LU, 2013) (Fig.24). Par conséquent, le glutathion est considéré comme le thiol cellulaire non protéique le plus abondant, car cette liaison γ unique confère au glutathion une stabilité relative et une résistance à la dégradation intracellulaire par les protéases (LU, 2013).

Le glutathion est trouvé à des concentrations variant de 1 mM à 10 mM dans le compartiment cytosolique de la plupart des cellules (FORMAN, 2009), mais il est également observé à des



concentrations plus faibles dans les organites subcellulaires (réticulum endoplasmique, mitochondries et noyau). Dans le cytosol, la molécule existe principalement sous sa forme réduite (GSH), tandis qu'une petite quantité est présente sous sa forme oxydée (disulfure de glutathion, GSSG) ; la diminution du rapport GSH/GSSG est utilisée comme biomarqueur du stress oxydatif (HWANG et al., 1992).

Le GSH est impliqué dans de nombreuses fonctions homéostatiques et régulatrices essentielles au sein des cellules, notamment le maintien d'un environnement redox équilibré (potentiel redox), la défense contre le stress oxydant, le piégeage nucléophile des électrophiles réactifs, la médiation de la signalisation redox et la régulation de la croissance cellulaire par rapport à la mort cellulaire (PIRIE & PINHEY, 1929).



Reduced Glutathione
(GSH)

FIG.24: Structure du GSH (CHAI & MIEYAL, 2023)

Principe Le principe de ce dosage est fondé sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro 5-mercaptopurique, qui résulte de la réduction de l'acide 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (réactif d'Ellman DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Le dosage du glutathion colique a été réalisé selon la méthode de WECKBECKER & CORY (1988).

Mode opératoire

La procédure expérimentale pour le dosage du glutathion (GSH) est décrite comme suit. Tout d'abord, un volume de 0,8 ml de l'homogénat a été prélevé. À ce volume, 0,2 ml d'une solution d'acide sulfosalicytique (SSA) à 0,25 % a été ajouté. Le mélange a été ensuite agité et laissé pendant 15 minutes dans un bain de glace.



Après cette période, le mélange a été centrifugé à 1000 tours/min pendant 5 minutes. Un volume de 0,5 ml du surnageant a été prélevé et mélangé avec 1 ml d'un tampon Tris-EDTA, contenant 0,02 M d'EDTA à pH 9,6.

À ce mélange, 0,025 ml d'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0,01 M, préalablement dissous dans du méthanol absolu à 99 %, a été ajouté. La solution a été laissée à température ambiante pendant 5 minutes pour permettre la stabilisation de la couleur, la réaction colorimétrique se développant instantanément.

Enfin, l'absorbance optique a été mesurée à 412 nm. La concentration du glutathion a été ensuite déterminée à l'aide de la formule suivante (WECKBECKER & CORY, 1988).

$$(\text{GSH}) \text{ nmol GSH/mg de protéines} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1,525}{13100 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg de protéines}}$$

Où:

DO : Densité Optique.

I: Le volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8 ml Homogénat + 0.2 ml SSA).

1.525 : Le volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant + 1ml Tris EDTA + 0.025 ml DTNB).

13100 : Coefficient d'absorbance (concernant le groupement –SH à 412nm).

0.8 : le volume de l'homogénat trouvé dans 1 ml.

0.5 : le volume du surnageant trouvé dans 1.525 ml.

On peut remarquer que la concentration du GSH est mesurée toujours par rapport à 1 mg de protéines. C'est pour cela que ce dosage doit être accompagné par le dosage des protéines.

▪ Dosage de l'activité des GSTs

Les glutathion-S-transférases constituent une famille d'enzymes multifonctionnelles, principalement cytosoliques, qui sont impliquées dans plusieurs processus de transport et de biosynthèse intracellulaire (POONKUZHALI et al., 2001).

Les GSTs forment une importante famille d'enzymes dont la fonction consiste à conjuguer le glutathion réduit (GSH) à des composés électrophiles, créant ainsi un pont thioéther. Les produits de cette réaction sont ensuite métabolisés en acides mercapturiques et excrétés dans les déchets liquides tels que la bile et l'urine. La fonction des GSTs, particulièrement étudiée



dans le contexte de la prévention de la pollution environnementale, est leur capacité à catalyser des réactions de conjugaison entre le peptide glutathion et des macromolécules comme les acides nucléiques (ARN, ADN). Ainsi, la conjugaison du glutathion avec certains substrats constitue une étape essentielle dans la formation de composés moins toxiques et plus hydrosolubles que les molécules d'origine (CHATTERJEE et al., 1984).

Principe

La mesure de l'activité des GSTs implique l'utilisation d'un substrat, généralement du Chlorodinitrobenzène (CDNB), qui réagit facilement avec de nombreuses variantes de GST et du Glutathion. La réaction de conjugaison entre ces deux composants produit une nouvelle molécule qui absorbe la lumière à une longueur d'onde de 340 nm (Fig.25). Cette absorption peut être quantifiée à l'aide d'un spectrophotomètre, et la valeur de la densité optique mesurée à 340 nm est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formée, ce qui est également lié à l'intensité de l'activité des GST (HABIG et al., 1984).

Les mesures de l'activité globale des GST ont été effectuées en utilisant le CDNB (1-Chloro, 2,4-Dinitrobenzène), qui sert de substrat pour les différentes isoenzymes de la GST, permettant ainsi une évaluation globale des activités des GST (STEIN, 1998).

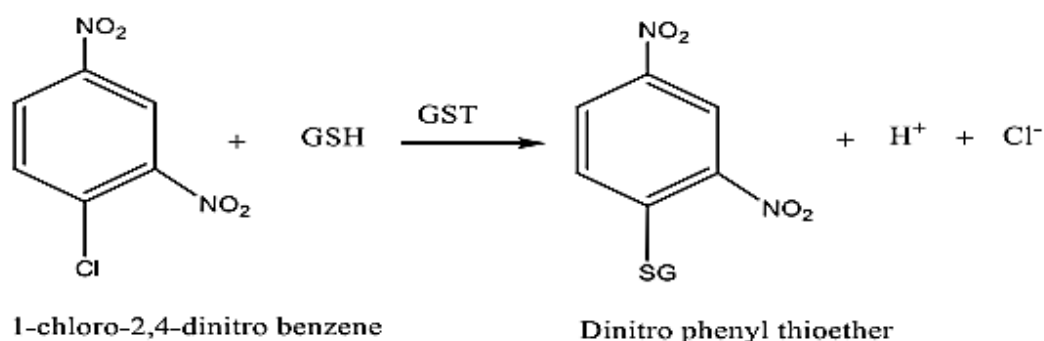


FIG.25: Réaction CDNB (1-Chloro- 2,4-di nitrobenzène) avec le Glutathion réduit (GSH) en présence de l'enzyme Glutathion -STransférase (YILDIZ & KUMAN, 2004).

Mode opératoire

La méthode employée dans cette étude pour doser les GSTs est celle de Habig et al. (1984). Elle consiste à faire réagir les GST présentes dans le cytosol avec un mélange de GSH et de CDNB à 37 °C et à un pH de 6,5 (Tab. 08). La variation de la densité optique, résultant de la formation du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant une minute à 340 nm.



TAB.08 : Protocole du dosage de l'activité GST

Réactifs	Blanc (µl)	Essai (µl)
Tampon phosphate pH=6.5	850	830
CDNB (20mM)	50	50
GSH (100mM)	100	100
Homogénat	-	20

Le protocole de dosage est réalisé dans des cuves en quartz, qui ont été incubées à 37 °C pendant toute la manipulation. La valeur de la densité optique correspondant au blanc (conjugaison spontanée du substrat) a ensuite été soustraite de la valeur de chaque essai, permettant ainsi de mesurer la variation due uniquement à l'activité de l'enzyme. Étant donné que le coefficient d'extinction du complexe GSH-CDNB est de 9,6 mM⁻¹, l'activité de la GSH a été déterminée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Activité GST } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta DO \text{ essai} - \Delta DO \text{ Blanc}}{9,6 \times \text{mg de protéines}}$$

Analyse statistique

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de moyenne ± écart type (Moyenne ± SD). L'analyse statistique des données a été réalisée en appliquant le test de Tukey pour comparer les moyennes, tant entre elles qu'avec celles des témoins, en utilisant le logiciel MINITAB (Version 17). Les différences sont considérées comme:

- Significatives : lorsque P < 0,05.
- Hautement significatives : lorsque P < 0,01.
- Très hautement significatives : lorsque P < 0,001.

PARTIE PRATIQUE

RÉSULTATS ET DISCUSSION



3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Résultats de l'enquête ethnobotanique

À travers l'enquête ethnobotanique réalisée auprès de la population de la ville d'Annaba, et effectuée selon un mode d'échantillonnage probabiliste, les résultats suivants ont été obtenus, présentés à l'aide des graphes ci-dessous :

La fiche technique d'enquête ethnobotanique a été complétée auprès de 100 personnes, parmi lesquelles 66 étaient de sexe féminin (soit 66 %) et 34 de sexe masculin (soit 34 %) (voir Fig. 26). Les informateurs appartiennent à une tranche d'âge allant de moins de 20 ans à plus de 60 ans, avec des niveaux intellectuels variés (Fig. 27). Les personnes enquêtées ont été réparties en différentes tranches d'âge. La tranche la plus représentée est celle des 20-29 ans, avec un pourcentage de 29 %, suivie de celle des 30-39 ans à 22 %. Ensuite, les tranches de 40-49 ans et de plus de 60 ans représentent chacune 16 %. Le pourcentage le plus faible, à 2 %, correspond à la tranche des moins de 20 ans.

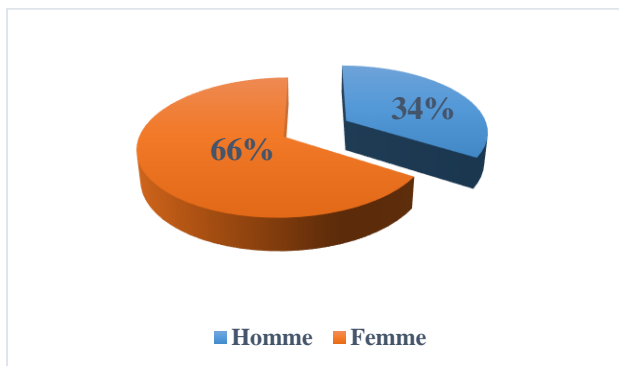


FIG.26: Distribution des enquêtés selon le genre.

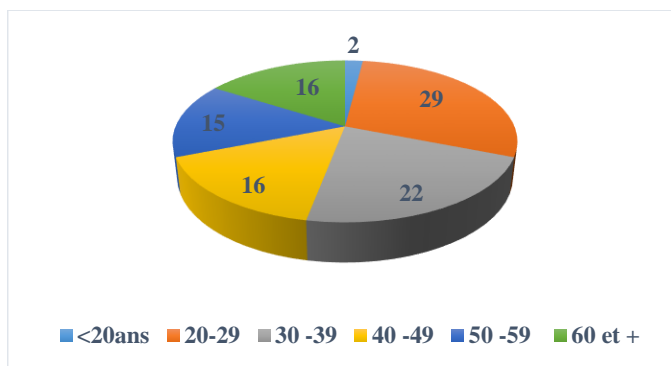


FIG.27: Distribution des enquêtés selon l'âge.

Concernant la connaissance de l'Agave, 58 % des personnes interrogées se sont déclarées familiarisées avec la plante, tandis que 42 % ont indiqué ne pas la connaître (Fig. 28).

Les différents noms vernaculaires révélés par l'enquête sont illustrés dans la (Fig. 29). Le nom vernaculaire le plus courant est Sabar, mentionné par 50 % des répondants. Il est suivi par Agave et Agave d'Amérique, chacun représentant 10,34 % des réponses. Les autres noms vernaculaires, tels que Choka bleu, Kirch et Chouk Nessara, sont moins répandus, cumulant un pourcentage de 1,72 %. Ces pourcentages sont calculés par rapport aux 58 % de personnes ayant déclaré connaître l'Agave.

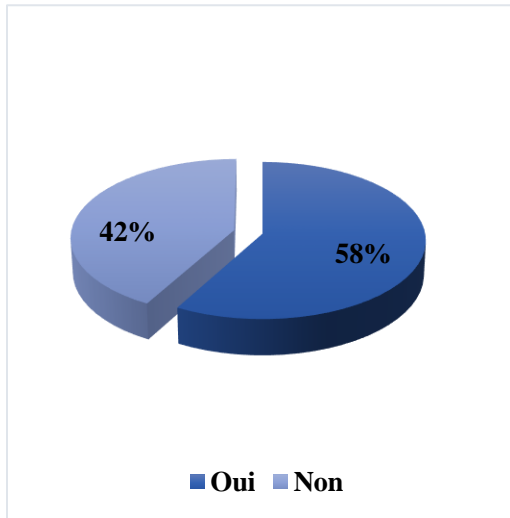


FIG.28: Répartition des enquêtés en fonction de leur connaissance de la plante.

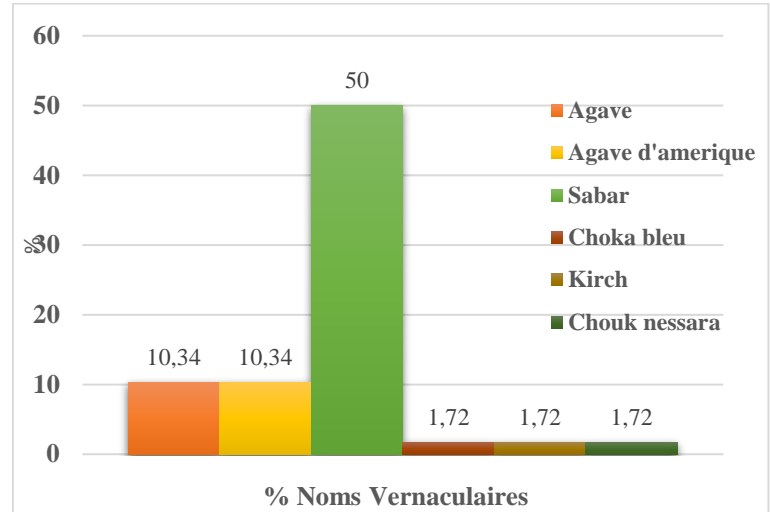


FIG.29: Les différents noms vernaculaires de l'Agave utilisés par la population.

Les pourcentages d'utilisation sont calculés par rapport aux 58 % de personnes connaissant la plante. Selon la population, les domaines d'utilisation de l'Agave sont très variés (Fig. 30), allant du secteur cosmétique à l'industrie. L'Agave est principalement utilisée dans le domaine cosmétique, avec un pourcentage de 44,82 %. Le domaine thérapeutique et médicinal se classe en deuxième position, représentant 41,37 %. Ensuite, le domaine ornemental est noté à 34,48 %. En revanche, l'utilisation industrielle de l'Agave reste faible, avec un pourcentage de seulement 3,44 %.

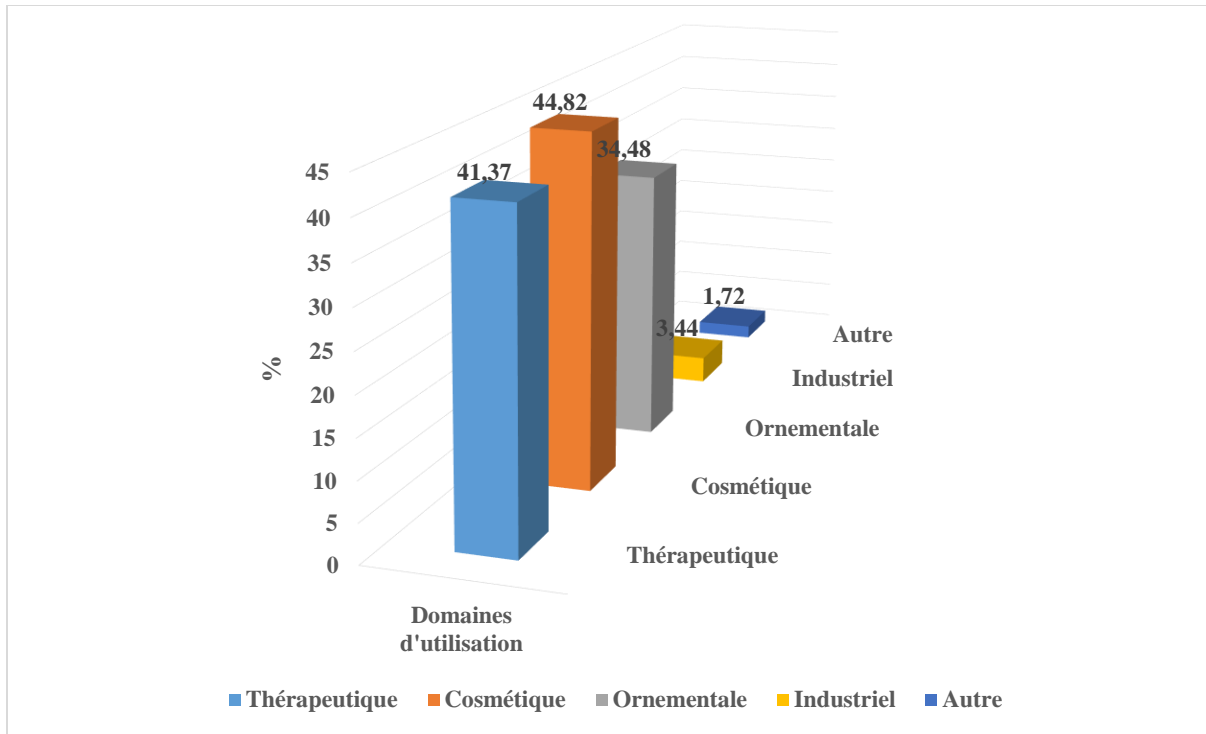


FIG.30: Répartition des participants selon les domaines d'utilisation de l'Agave.

Parmi les 58 % de personnes connaissant l'Agave, 25,86 % l'utilisent comme cataplasme, tandis que 6,89 % l'emploient sous forme de macération. En outre, 5,17 % l'utilisent en décoction (Fig. 31).

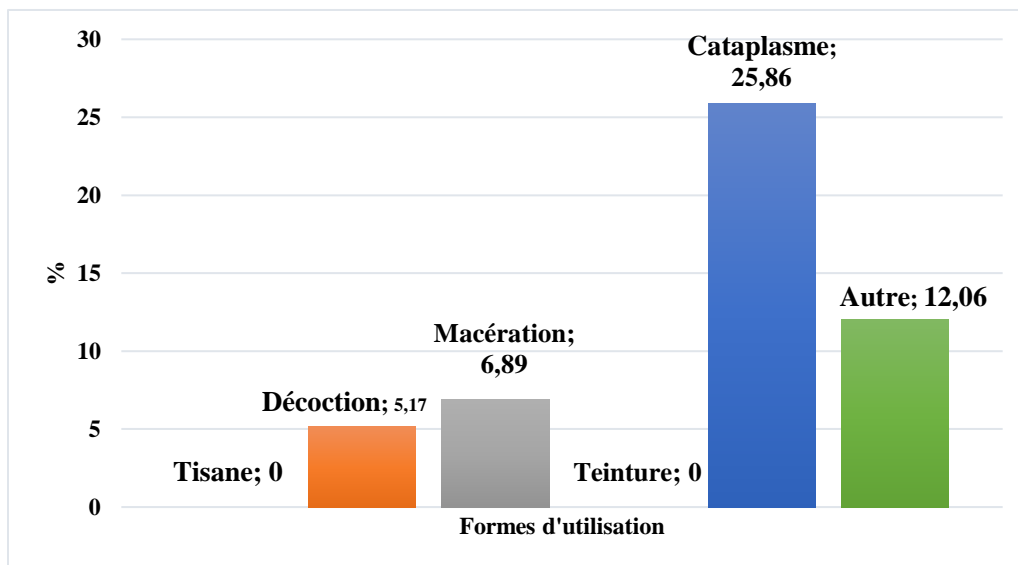


FIG.31: Distribution des enquêtés selon la forme d'utilisation de l'Agave.



Parmi les 58 % de personnes connaissant l'Agave, la partie la plus utilisée est la feuille, représentant 53,45 %. Ensuite, 13,79 % des répondants utilisent la plante entière, tandis que 3,45 % exploitent le suc. La fleur n'est utilisée que par 1,72 % de la population. En revanche, la racine de l'Agave n'est plus utilisée par la population (Fig. 32).

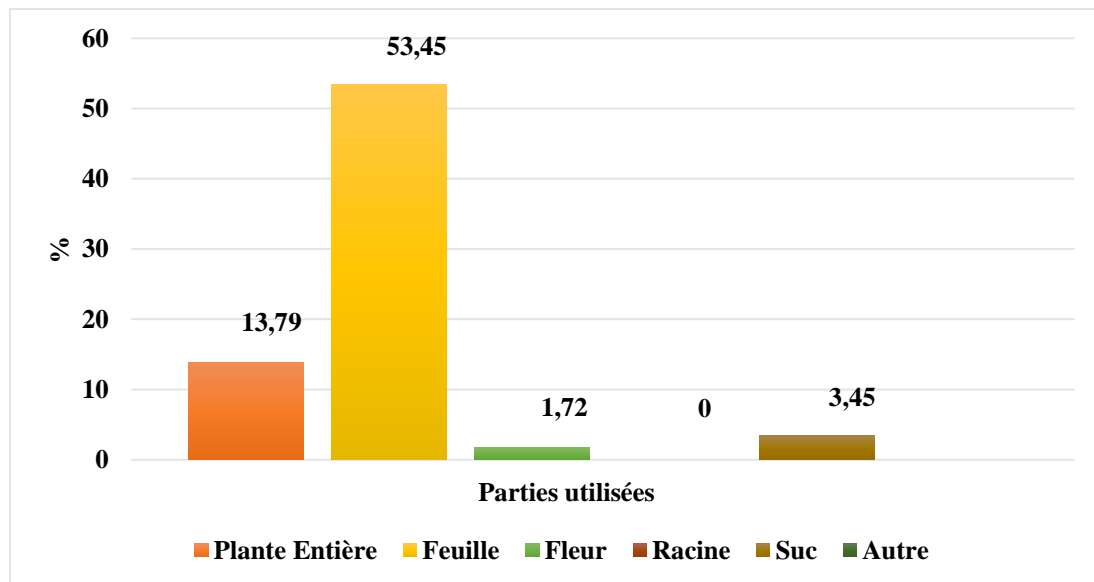


FIG.32: Répartition des participants selon la partie de l'Agave utilisée.

Selon la population connaissant l'Agave, plusieurs maladies sont traitées par cette plante (Fig. 33). Le rhumatisme est en tête de liste, avec un pourcentage de 18,96 %. La chute de cheveux suit en deuxième position, représentant 12,06 %. Les brûlures sont traitées par 10,34 % des répondants, tandis que les inflammations sont concernées par 8,62 %.

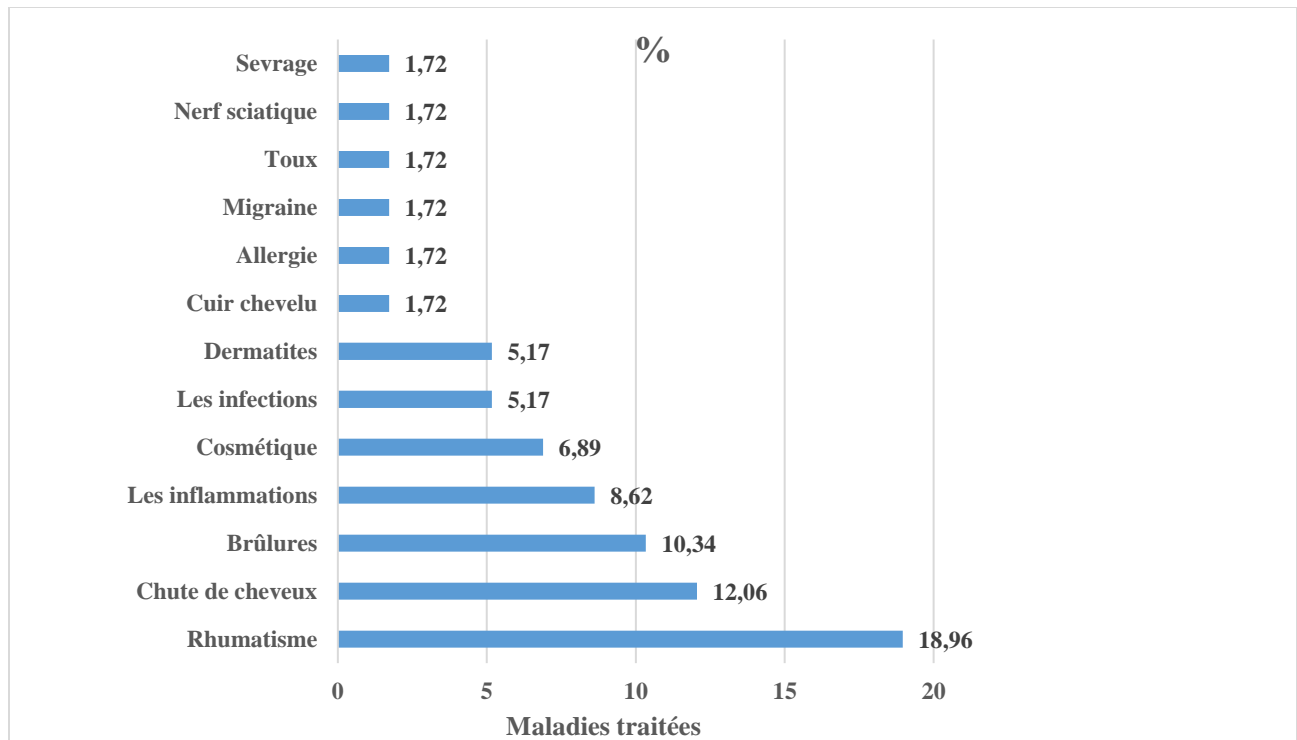


FIG.33: Distribution des enquêtés selon les maladies traitées par l'Agave.

Parmi les personnes qui connaissent et utilisent l'Agave, 20,68 % estiment que son efficacité est bonne, tandis que 18,96 % la jugent excellente. De plus, 13,73 % la considèrent comme ayant une efficacité moyenne. En revanche, 8,62 % des répondants la trouvent insuffisante, et 1,72 % déclarent qu'elle est nulle (Fig. 34).

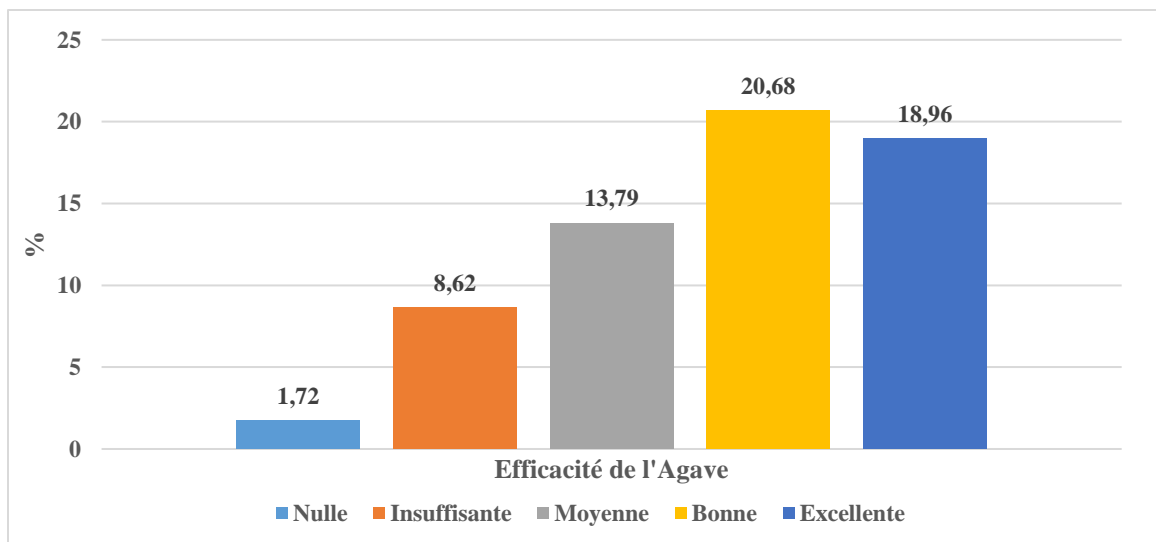


FIG.34: Distribution des enquêtés selon l'efficacité de l'Agave.



L'utilisation de l'Agave dans son milieu d'origine se concentre principalement dans le domaine industriel, selon GENTRY (1982), VARGAS-PONCE et al. (2009), et CASTETTER et al. (1938). Au Mexique, l'Agave est particulièrement exploitée pour l'alimentation humaine, et les fibres dérivées de cette plante revêtent une importance économique et culturelle significative dans la société mexicaine (BLOUW et al., 2008).

BLOUW et al. (2008) affirment que le Conseil de Recherche Scientifique et Industriel (CSIR) a mené des études approfondies sur l'Agave afin de mieux comprendre sa biochimie, en raison de l'importance de ses fibres dans la fabrication de textiles et de papier (GARCIA & LOTT, 1994). L'Agave est exploité depuis longtemps pour de multiples usages (fourrage, nourriture et boissons, médicaments, construction, tissage, papier, etc.) par les populations de la Mésoamérique et les premiers habitants de l'Amérique, notamment au Mexique. Les espèces du genre *Agave* présentent diverses utilisations traditionnelles à travers le monde, dont certaines sont soutenues par des recherches scientifiques.

Dans le cadre de l'ethnopharmacologie, l'Agave est principalement utilisée pour traiter des infections d'origine bactérienne, telles que les infections gastro-intestinales, les infections des blessures, les troubles urologiques et la dysenterie. De plus, elle est également employée pour lutter contre le stress oxydatif lié à des affections comme le cancer, le diabète et l'hypertension (CORNARA et al., 2009 ; INSTITUT NATIONAL INDIGENISTA, 2009 ; MONTESANO et al., 2012 ; SEMENYA et al., 2012). L'Agave présente également des propriétés antihypertensives (DUNCAN et al., 1999), antiparasitaires (ORESTES GUERNA et al., 2008) et antifongiques (VERASTEGUI et al., 2008), des activités qui ont été démontrées pour ce genre de plante.

Des investigations pharmacologiques montrent que le jus des feuilles d'une espèce proche, l'*Agave sisalana*, stimule les intestins et les muscles utérins, réduit la tension artérielle et peut provoquer l'avortement chez les animaux gestants.

La sève de l'*Agave sisalana* possède des propriétés antiseptiques et est considérée comme antibactérienne contre les bactéries de l'estomac et des intestins. Dans le nord du Maroc, le jus des feuilles de cette espèce est utilisé en médecine traditionnelle comme bain pour traiter les maladies cutanées (EL HILALY et al., 2003).



Elle est également employée contre la syphilis et recommandée pour le traitement de la tuberculose pulmonaire, des maladies du foie et de la jaunisse. De plus, elle peut être utilisée comme laxatif (SHARAF & ZAHRAN, 1967).

Nos résultats d'enquête corroborent ces propriétés, notamment en ce qui concerne les domaines d'utilisation de l'Agave par la population. Le domaine cosmétique est le plus représenté, avec un pourcentage de 44,82 %, suivi du domaine thérapeutique à 41,37 %. Les maladies traitées par l'Agave, selon les répondants, incluent principalement les dermatites (5,17 %), les infections (5,17 %) et les inflammations (8,62 %).

Concernant les parties utilisées de la plante, la feuille est la plus courante, représentant 53,45 %, tandis que le suc est utilisé par 3,45 % de la population, ce qui est en accord avec les propriétés mentionnées précédemment.

Les résultats de cette enquête mettent en lumière les différents domaines d'utilisation de l'Agave par la population de Bône. Initialement introduite en Algérie pour des raisons ornementales, cette plante trouve un large éventail d'applications sous diverses formes, tant dans les domaines thérapeutique et cosmétique que dans l'industrie. Ces résultats s'alignent bien avec les utilisations traditionnelles de l'Agave dans son pays d'origine, le Mexique.

3.2. Résultats de l'étude histologique

La figure (35) ci-dessous montre une coupe transversale de la tige *d'Agave americana* var. *americana* L., nous observons l'apparition de l'extérieur vers l'intérieur des tissus suivants :

- o Un épiderme cutinisé (selon les faces : dorsal, ventral) constitué d'une seule assise de cellules ayant pour rôles : protection la déshydratation et régulation de l'évaporation et autres échanges gazeux avec le milieu. Cette couche est souvent recouverte d'une cuticule épaisse qui aide à réduire l'évaporation de l'eau.
- o Un parenchyme à l'intérieur, est spongieux et rempli de grandes vacuoles, permettant le stockage de l'eau. Cette adaptation est cruciale pour survivre dans des environnements arides.
- o Un mésophylle homogène qui joue un rôle important dans la photosynthèse.



- o On remarque aussi la présence de macles d'oxalate de calcium, la cause principale de dermatite au contact de la peau et celle des tanins sous forme de réserve dans des Idioblastes spécifiques.

Au centre de la coupe on observe **Faisceaux vasculaires collatéraux** : Les vaisseaux xylématiques (transportant l'eau) et phloémiques (transportant les nutriments) sont organisés en faisceaux vasculaires. Ces faisceaux sont essentiels pour le transport efficace des ressources à travers la feuille.

- o On observe également un sclérenchyme coiffant et protégeant les tissus conducteurs.

La coupe transversale d'une feuille d'Agave americana révèle des adaptations morphologiques et anatomiques qui lui permettent de survivre dans des conditions arides. La structure de la feuille, avec son épiderme protecteur, son parenchyme spongieux et ses faisceaux vasculaires, est essentielle pour le stockage de l'eau et le transport des nutriments.

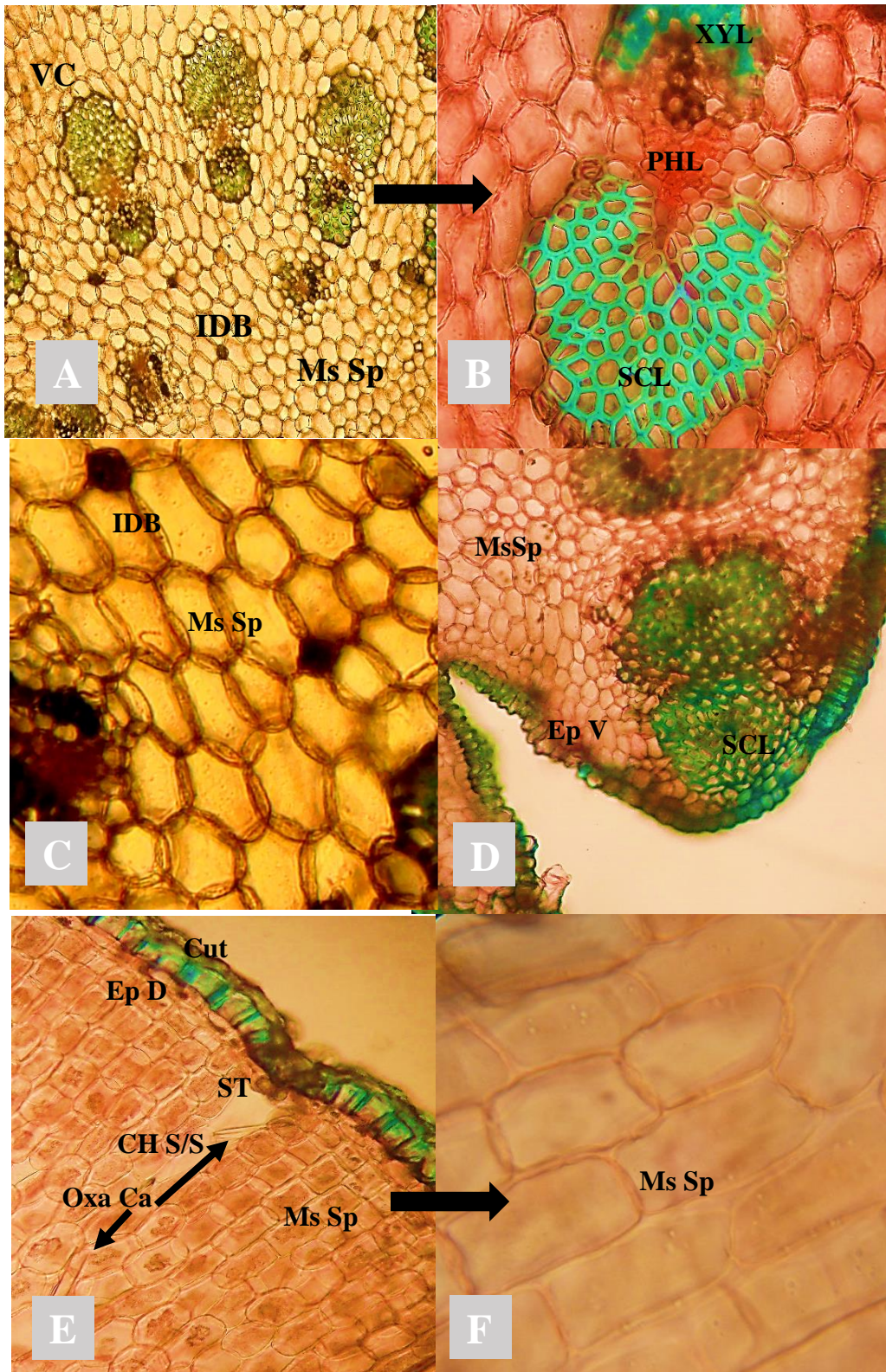


FIG.35: Histologie de la tige de l'Agave : **A** : Vue générale (Gx40), **B** : Détail Vaisseau Conducteur (Gx 100), **C** : Détail Mésophylle spongieux et Tanins (Gx 100), **D** : Détail face ventrale (Gx 100), **E** : Détail épiderme dorsal et stomate (Gx 100), **F** : Détail Parenchyme Palissadique.



VC : Vaisseau Conducteur, **PHL** : Phloème, **XYL** : Xylème,

Ms Sp : Mésophylle spongieux, **IDB** : Idioblaste contenant des tanins.

EP D: Epiderme Dorsal, **EP V** : Epiderme Ventral, **Cut** : Cutine, **ST**: Stomate, **CH S/S**: Chambre sous Stomatique

Oxa Ca : Macles d'oxalate de calcium

SCL: Sclérenchyme

Une structure histologique similaire a été identifiée dans les recherches menées par Alonso Gutiérrez en 2005, qui portaient sur l'*Agave tequilana* W. cv azul, une espèce appartenant au même genre que l'*Agave americana*. Dans cette étude, l'auteur a observé une succession de tissus comparable, comprenant un épiderme cutinisé, un mésophylle bien défini, ainsi que des vaisseaux conducteurs, comprenant à la fois le xylème et le phloème.

L'épiderme, avec sa cuticule épaisse, joue un rôle crucial dans la protection de la feuille contre la déshydratation, un aspect essentiel pour les plantes vivant dans des environnements arides. Le mésophylle, quant à lui, est constitué de cellules spongieuses qui facilitent le stockage de l'eau, ce qui est particulièrement important pour la survie de ces espèces succulentes.

De plus, la présence de raphides d'oxalate de calcium a également été notée. Ces structures cristallines, qui se forment dans les tissus de la plante, peuvent avoir plusieurs fonctions, telles que la protection contre les herbivores et la régulation de l'homéostasie du calcium au sein de la plante. Ainsi, les travaux de Gutiérrez mettent en lumière les caractéristiques anatomiques communes à ces espèces d'Agave, soulignant leur adaptation à des conditions de vie spécifiques.



3.3. Résultats du test phytochimique

Une étude préliminaire a été menée pour effectuer une investigation phytochimique, à la fois sur tube (réactions en solution) et sur plaque de chromatographie sur couche mince (CCM). Cette recherche a permis de mettre en évidence plusieurs métabolites secondaires présents dans la feuille de l'*Agave americana* L. Les résultats obtenus sont présentés de manière synthétique dans deux tableaux distincts. Le tableau (09) regroupe les résultats des tests phytochimiques réalisés sur tube, offrant un aperçu des différents composés identifiés. Parallèlement, le tableau (10) compile les résultats des analyses effectuées sur CCM, fournissant ainsi une perspective complémentaire sur les métabolites détectés. Cette approche méthodologique permet d'approfondir notre compréhension de la composition chimique de l'*Agave americana* et de ses potentialités.

TAB.09 : Récapitulatif des résultats des tests phytochimiques réalisés sur tube

Phyto-constituents	Résultat
Tanins catechiques	(-)
Tanins galliques	(+)
Anthocyanes	(-)
Leuco-anthocyanes	(-)
Flavonoïdes	(+)
Alcaloïdes	(+)
Saponosides	(+)
Cardinolides	(+)
Amidon	(+)
Terpènes et stérols	(+)
Coumarines	(-)
Dérivés anthracéniques :	
Quinones	(-)
O-hétérosides	(-)
Hétérosides a genine réduite	(-)
C-hétérosides	(+)
Iridoïdes	(-)

TAB.10 : Récapitulatif des résultats des tests phytochimiques réalisés sur CCM

Phyto-constituents	Résultats
Flavonoïdes	(+)
Tanins	(+)
Phénols	(+)
Coumarines	(-)
Anthraquinones	(-)
Alcaloïdes	(+)
Iridoïdes	(-)

- (+) : Test positif
- (-) : Test négatif

L'évaluation des tests a été réalisée principalement par le biais d'observations visuelles directes. Pour les tests effectués sur tube, nous avons utilisé l'intensité de la couleur ainsi que la formation



de précipités comme indicateurs analytiques. Ces deux critères ont permis de déterminer la présence de métabolites secondaires dans les feuilles de l'Agave.

En parallèle, les résultats obtenus à partir de la Chromatographie sur Couche Mince (CCM) se sont révélés prometteurs. Nous avons observé des fluorescences significatives après avoir exposé les plaques aux réactifs appropriés, spécifiques à chaque principe actif recherché. Ces fluorescences indiquent une réaction positive, permettant ainsi d'identifier la présence de certains composés phytochimiques dans les échantillons analysés. Cette approche combinée renforce la validité de nos résultats et souligne l'importance des techniques visuelles dans l'évaluation des métabolites secondaires.

L'analyse phytochimique de l'*Agave americana* var. *americana* L., qui est traditionnellement utilisée en Algérie principalement pour l'ornementation et non pour ses propriétés thérapeutiques, a révélé une présence significative de divers métabolites secondaires. Parmi ceux-ci, on trouve notamment des polyphénols, des alcaloïdes, des cardénolides, des terpènes et des stérols.

Ces résultats sont cohérents avec ceux observés chez d'autres espèces du genre *Agave*, telles que *A. intermixta*, *A. vera* et *A. sisalana*. En effet, des études antérieures de VAGHASIYA & CHANDA (2007) ; GARCIA et al. (1999) ; HAMMUEL et al. (2011) ont montré des profils phytochimiques similaires dans ces espèces. De plus, d'autres espèces comme *A. impressa*, *A. ornithobroma*, *A. rzedowskiana*, *A. schidigera* et *A. angustifolia* ont également présenté des résultats analogues (AHUMADA-SANTOSA et al. 2013)

Cependant, notre analyse chimique de *A. americana* L. a mis en évidence la présence de familles de composés additionnels, telles que les alcaloïdes et les cardénolides, qui n'ont pas été identifiés dans d'autres espèces d'Agave. Cette diversité de composés au sein de l'*Agave americana* pourrait être liée à différentes fonctions biologiques, notamment des effets antibactériens et antioxydants. Ces propriétés ont été préalablement démontrées pour chaque type de composé présent dans les groupes phytochimiques identifiés. Cela souligne l'importance de cette plante, non seulement pour son utilisation traditionnelle, mais aussi pour son potentiel thérapeutique encore sous-exploré.

Les principaux éléments constitutifs de la plante étudiée sont des saponines, comme l'indiquent YOKOSUKA & MIMAKI (2009). Parmi ces saponines, on retrouve principalement l'hécogénine



et la chlorogénine, ainsi que divers groupes de flavonoïdes, tels que rapporté par CHEN et al. (2009). Une recherche menée par ALMARAZ-ABARCA et al. (2009) sur la composition en polyphénols des tissus d'*Agave durangensis* a révélé que les polyphénols les plus abondants dans cette espèce sont le flavonol, le kaempférol et la quercétine. Ces composés sont notables pour leurs propriétés bénéfiques, notamment dans le domaine de la santé.

DUKE (2000) souligne également l'importance de la fraction polyphénolique présente dans les feuilles d'*A. americana*, qui est essentiellement dominée par le flavonoïde kaempférol. Ce dernier est reconnu pour ses effets antioxydants et anti-inflammatoires, ajoutant ainsi une valeur médicinale significative à cette plante.

Une étude phytochimique menée par KADAM et al. (2012) sur les racines d'*Agave americana* a mis en évidence la présence de flavonoïdes et de saponosides dans ces tissus racinaires. Ces résultats indiquent que les racines de cette plante pourraient également posséder des propriétés médicinales intéressantes, renforçant l'idée que l'ensemble de la plante pourrait être bénéfique pour la santé.

Des tests de révélation des métabolites secondaires ont également été effectués sur une autre espèce du même genre, *Agave sisalana* (Perrine, 1838). Les résultats ont montré la présence commune de plusieurs métabolites secondaires, dont les tanins, les flavonoïdes et les saponosides, comme l'ont rapporté HAMMUEL et al. (2011). Ces composés sont souvent associés à des activités biologiques variées.

En examinant les résultats obtenus, il est évident qu'il existe un fort potentiel médicinal dans les feuilles de l'agave américaine. Les différentes propriétés des composés révélés, telles que la capacité antibactérienne des flavonoïdes et des saponosides, mentionnées par BRUNETON (2006), ainsi que l'effet antidiarrhéique et vasoconstricteur des tanins décrits par PARIS (1981), soulignent l'importance de ces plantes dans la médecine traditionnelle et leur potentiel pour des applications thérapeutiques modernes.



3.4. Résultats du test quantitatif

3.4.1. Résultats des Dosages des métabolites secondaires

3.4.1.1. Dosage des Polyphénols totaux

Une courbe d'étalonnage a été réalisée figure (36) en utilisant l'Acide Gallique comme substance de référence. Cette courbe sert à quantifier la concentration des polyphénols dans l'échantillon analysé. Les résultats obtenus sont exprimés en grammes d'équivalent d'Acide Gallique par 100 grammes de matière végétale sèche (g EGA/100g Ms), ce qui permet d'évaluer la teneur en Acide Gallique dans l'échantillon de manière standardisée.

La précision de cette méthode est renforcée par un coefficient de corrélation très élevé, égal à 0,997. Ce coefficient indique une relation linéaire forte entre les concentrations connues d'acide gallique et les réponses mesurées, ce qui témoigne de la fiabilité de la courbe d'étalonnage pour les analyses futures. Cette approche est cruciale pour garantir des résultats précis et reproductibles lors de l'évaluation de la matière végétale.

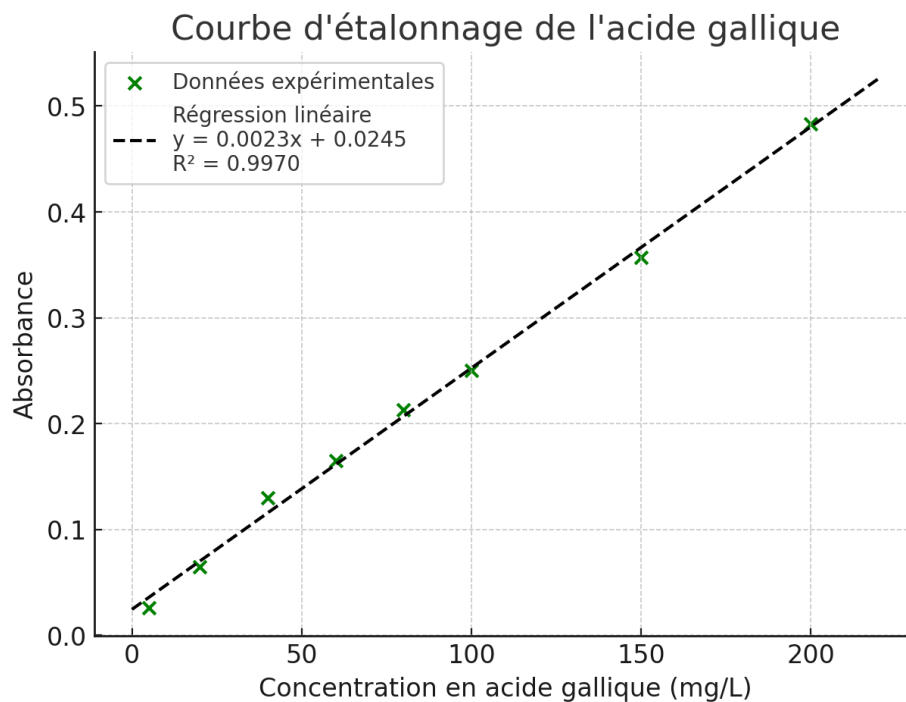


FIG. 36: Courbe d'étalonnage de l'Acide Gallique



La courbe d'étalonnage obtenue représente la relation entre la concentration en acide gallique (mg/L) et l'absorbance mesurée à une longueur d'onde spécifique. L'équation de la régression linéaire affichée sur le graphique est de la forme : $y=0.0023x+0.0245$

Où :

- Y : représente l'absorbance mesurée,
- X : représente la concentration en acide gallique (mg/L),
- $R^2=0.9970$ indique un excellent ajustement des données à une relation linéaire (plus proche de 1, plus la corrélation est forte).

Cette courbe d'étalonnage est un outil essentiel pour quantifier la teneur en polyphénols totaux dans un extrait végétal. En mesurant l'absorbance d'un échantillon inconnu et en reportant cette valeur sur la droite de régression, on peut en déduire sa concentration en équivalent acide gallique.

Le taux des polyphénols totaux mesuré dans *Agave americana var. americana* est de 5.308 mg d'équivalent acide gallique (EAG) par gramme de matière sèche (MS) soit 530.8 mg EAG/100g MS. ce qui est une valeur intéressante pour une plante médicinale. Les polyphénols sont reconnus pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes. Une teneur élevée en polyphénols suggère un fort potentiel biologique et peut justifier l'utilisation traditionnelle de cette espèce dans son continent d'origine dans divers remèdes naturels et formulations cosmétiques.

Selon l'étude réalisée par BENHAMISSA et al. (2012), la concentration totale de polyphénols dans l'*Agave americana* L. présente une variation significative, allant de 4,49 mg/g à 10,94 mg/g. Cette variation est influencée par plusieurs facteurs, notamment les conditions de température, de pression et la durée d'extraction. Ces résultats indiquent que le contenu en polyphénols de l'*Agave americana var. americana* L., qui est mesuré à environ 5,308 mg/g, se situe bien dans l'intervalle défini par cette recherche.

Les variations observées entre les différentes études peuvent être attribuées à plusieurs facteurs significatifs :



- **Méthode d'extraction** : Le choix des solvants, tels que le méthanol ou l'éthanol, peut avoir un impact considérable sur le rendement en polyphénols. En effet, chaque solvant a des propriétés spécifiques qui peuvent affecter la solubilité des composés polyphénoliques, entraînant ainsi des différences dans les quantités extraites.
- **Conditions environnementales** : Des éléments tels que le climat, la composition du sol et l'altitude jouent un rôle crucial dans la biosynthèse des polyphénols. Par exemple, certaines conditions climatiques peuvent favoriser la production de ces composés, tandis que d'autres peuvent la réduire, ce qui souligne l'importance de l'environnement dans le développement des plantes.
- **Maturité de la plante** : Les concentrations de polyphénols peuvent varier en fonction du stade de développement de la plante. À différents moments de la croissance, la plante peut produire des quantités inégales de polyphénols, ce qui peut influencer les résultats des analyses.

En considérant ces facteurs, il devient évident que les différences observées dans la teneur en polyphénols ne sont pas seulement le résultat de la génétique des espèces, mais aussi d'un ensemble complexe d'influences environnementales et méthodologiques. Cela souligne l'importance d'adopter des protocoles standardisés pour les études futures, afin de mieux comprendre et comparer les concentrations de polyphénols dans diverses espèces.

Cela suggère non seulement que l'*Agave americana* est une source potentielle de polyphénols, mais aussi que les conditions d'extraction jouent un rôle crucial dans la maximisation de leur concentration. Ces informations peuvent être précieuses pour les applications industrielles et scientifiques, notamment dans le domaine de la nutrition et de la phytothérapie, où les polyphénols sont reconnus pour leurs propriétés antioxydantes et bénéfiques pour la santé.



3.4.1.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été effectué en utilisant la méthode du trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), avec la catéchine comme étalon de référence. Cette méthode est couramment employée en raison de sa sensibilité et de sa précision dans la quantification des flavonoïdes. Pour déterminer la concentration des flavonoïdes, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde spécifique de 430 nm, qui est optimale pour détecter les complexes formés entre les flavonoïdes et le trichlorure d'aluminium.

Les résultats obtenus ont été représentés graphiquement sous la forme d'une courbe d'étalonnage, dont l'équation est donnée par $Y = 0,0035x + 0,0112$, avec un coefficient de détermination (R^2) de 0,998. Ce coefficient indique une très forte corrélation entre les concentrations de flavonoïdes et les valeurs d'absorbance mesurées, ce qui renforce la fiabilité de la méthode utilisée.

Finalement, la quantité de flavonoïdes a été exprimée en milligrammes d'équivalent de catéchine par milligramme de poids sec de l'extrait (mg EQ/mg Ps). Cette approche permet de standardiser les résultats et de faciliter les comparaisons entre différents extraits, contribuant ainsi à une meilleure compréhension de la richesse en flavonoïdes des échantillons analysés.

Courbe d'étalonnage de la Catéchine

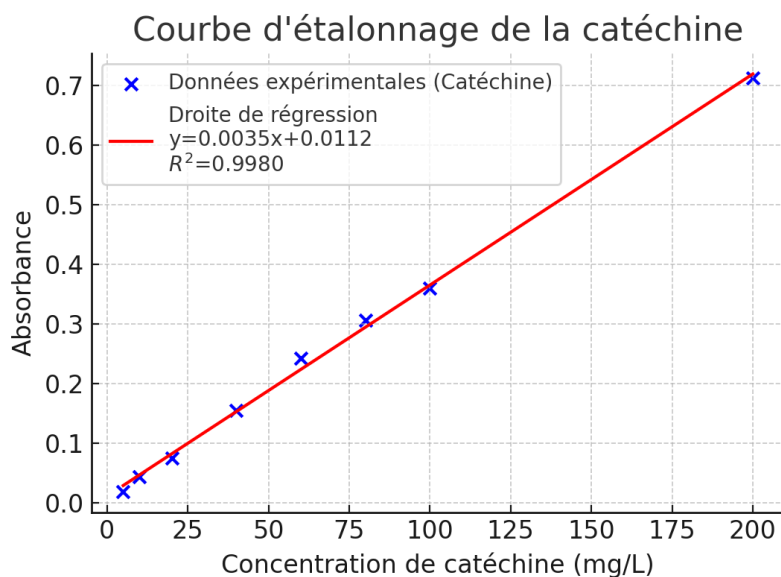


FIG. 37: Courbe d'étalonnage de la Catéchine



Teneur en flavonoïdes totaux : 95.085 mg équivalent catéchine (EC) par gramme de matière sèche (MS) pour 100g de MS, soit 0.95085 mg EC/100g MS.

Ce résultat a été déterminé à l'aide d'une courbe d'étalonnage de la catéchine, une méthode standard en spectrophotométrie qui permet de quantifier les flavonoïdes totaux en comparant l'absorbance des échantillons avec une gamme de concentrations connues de catéchine.

L'importance de cette teneur est à souligner, car les flavonoïdes sont des composés bioactifs reconnus pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et protectrices contre diverses pathologies. Une teneur élevée indique que cette plante pourrait être une bonne source naturelle d'antioxydants pour des applications pharmaceutiques et alimentaires.

Un résultat comparable a été rapporté par BEN HAMISSA et al. en (2012), qui ont mesuré une teneur en flavonoïdes de 96 mg/g. Cependant, la valeur obtenue pour notre échantillon est inférieure à celle enregistrée pour l'*Agave durangensis*, une espèce médicinale appartenant au même genre. En effet, les recherches menées par BARRIADA-BERNAL et al. en (2013) ont révélé que l'extrait des fleurs d'*Agave durangensis* contenait environ 121 mg de flavonoïdes pour 100 g d'extrait sec. Cette différence marquée dans les teneurs en flavonoïdes peut s'expliquer par le fait que ces composés sont principalement localisés dans les fleurs des plantes. Les flavonoïdes jouent un rôle crucial en tant que pigments, responsables de la coloration jaune des fleurs et des fruits, ce qui peut influencer leur attractivité visuelle pour les pollinisateurs. Cette concentration dans les fleurs souligne leur importance non seulement sur le plan esthétique, mais aussi sur le plan fonctionnel dans le cycle de reproduction des plantes.

Il serait donc pertinent d'explorer la composition flavonoïque des fleurs d'*Agave americana* var. *americana* L. afin de mieux comprendre leur potentiel. Une telle étude pourrait offrir des informations précieuses sur la richesse en flavonoïdes de cette espèce, ce qui pourrait avoir des implications significatives dans les domaines de la phytothérapie et de la nutrition. En évaluant la teneur en flavonoïdes des fleurs, nous pourrions également mieux appréhender les bénéfices santé associés à cette plante, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles applications dans le cadre de la médecine traditionnelle ou moderne.



Détermination de la part relative des flavonoïdes dans les polyphénols

Les flavonoïdes sont une sous-famille des polyphénols. Pour déterminer leur part relative, nous pouvons calculer le pourcentage des flavonoïdes par rapport aux polyphénols totaux :

$$\text{Pourcentage de flavonoïdes} = \frac{\text{Teneur en flavonoïdes totaux}}{\text{teneur en polyphénols totaux}} \times 100 = \frac{95.085}{530.8} \times 100 = 17.91\%$$

Cela signifie que seulement 17.91% des polyphénols présents dans *Agave americana* var. *americana* sont des flavonoïdes, les 82.09% restants étant d'autres types de polyphénols (acides phénoliques, tannins, lignines, etc.).

La forte teneur en polyphénols totaux indique un potentiel antioxydant global élevé, car ces composés neutralisent les radicaux libres et préviennent le stress oxydatif.

La fraction relativement modeste de flavonoïdes (17.91%) suggère que d'autres polyphénols (acides phénoliques comme l'acide caféique, chlorogénique, ou gallique) jouent également un rôle important dans l'activité biologique de cette plante.

3.4.2. Résultat de l'Extraction des flavonoïdes et calcul du rendement

L'extraction des flavonoïdes à partir de l'*Agave americana* var. *americana* a permis d'obtenir un rendement de 09.9 g pour 50 g de poudre utilisée. Pour exprimer ce rendement en pourcentage, nous appliquons la formule suivante :

$$\text{Rendement} = \frac{\text{Quantité extraite}}{\text{Quantité de matière utilisée}} \times 100 \quad \text{En substituant les valeurs, nous avons :}$$

$$\text{Rendement} = \frac{9.9g}{50g} \times 100 = 19.8\%$$

Ce rendement indique que 19.8 % de la poudre d'*Agave americana* var. *americana* a été convertie en flavonoïdes lors de l'extraction. Cependant, pour obtenir une évaluation plus représentative, nous rapportons ce rendement à 100 g de matière sèche. En faisant ce calcul, nous trouvons que le rendement total s'élève à 39.6 %.



Ce résultat est significatif, car il montre l'efficacité de l'extraction des flavonoïdes à partir de cette espèce. Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs propriétés antioxydantes et leurs bénéfices potentiels pour la santé, ce qui souligne l'importance d'optimiser les méthodes d'extraction pour maximiser la récupération de ces composés bioactifs.

Le rendement de l'extraction des flavonoïdes est influencé par plusieurs paramètres clés, qui méritent d'être examinés en détail pour optimiser ce processus.

Solvant d'Extraction : Le choix du solvant utilisé pour l'extraction des flavonoïdes joue un rôle crucial dans l'efficacité du procédé. Parmi les solvants couramment employés, l'éthanol et le méthanol se distinguent par leur capacité à solubiliser ces composés bioactifs. Ces solvants polaires sont efficaces pour extraire une large gamme de flavonoïdes, et leur utilisation peut significativement améliorer le rendement par rapport à d'autres solvants moins efficaces. En choisissant le bon solvant, les chercheurs peuvent maximiser la quantité de flavonoïdes récupérés.

Méthode d'Extraction : La méthode d'extraction choisie influence également la quantité de flavonoïdes obtenue. Des techniques avancées telles que l'extraction assistée par ultrasons ou la méthode Soxhlet sont particulièrement efficaces. L'extraction assistée par ultrasons utilise des ondes sonores pour agiter les molécules dans le solvant, ce qui augmente la pénétration et l'extraction des flavonoïdes. D'autre part, la méthode Soxhlet permet une extraction continue, garantissant que le solvant passe plusieurs fois à travers le matériau végétal, ce qui améliore également le rendement. En intégrant ces techniques modernes, on peut obtenir des extraits de flavonoïdes plus concentrés et plus purs.

Maturité de la Plante Un autre facteur important est la maturité de la plante au moment de la récolte. Les recherches indiquent que les plantes plus âgées tendent à accumuler des quantités plus élevées de flavonoïdes. Cela peut être dû à divers facteurs biologiques et environnementaux qui influencent la synthèse des flavonoïdes au cours du développement de la plante. En récoltant des plantes à un stade optimal de maturité, il est possible d'augmenter le rendement en flavonoïdes, ce qui pourrait avoir des implications significatives pour l'utilisation médicinale et commerciale de ces composés. Ces facteurs interconnectés soulignent l'importance d'une approche systématique dans l'extraction des flavonoïdes, permettant ainsi d'optimiser les rendements et d'assurer la qualité des extraits obtenus.



Caractéristiques organoleptiques des de l'extrait

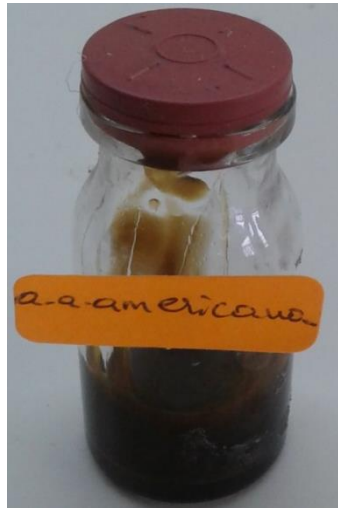


FIG. 38: Flavonoïdes extraits de l'*Agave americana* L.

L'aspect pour nos deux extraits des flavonoïdes totaux est circieux ce qui nous indique que ce sont des flavonoïdes de type aglycone. La couleur de l'extrait est plutôt jaunâtre. L'odeur est assez prononcée. L'aspect pour nos deux extraits

Rendement d'extraction des flavonoïdes de *Agave americana* var. *americana*

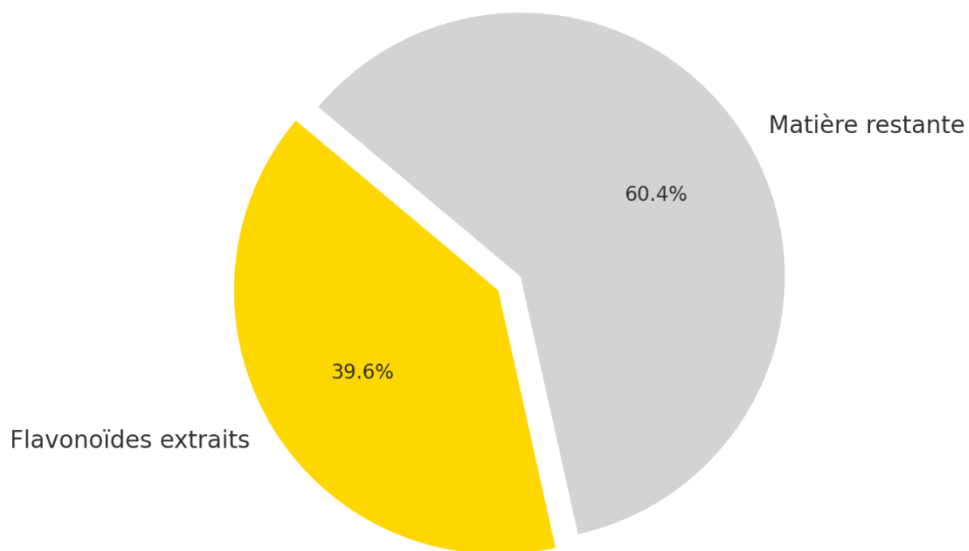


FIG. 39: Rendement d'extraction des flavonoïdes d'*Agave americana* L.



Le camembert en figure 39 illustre le rendement d'extraction des flavonoïdes d'*Agave americana* var. *americana*. On observe que 39,6 % de la matière sèche extraite est constituée de flavonoïdes, tandis que 60,4 % correspond au reste de la matière. Ce graphique met en évidence l'efficacité de l'extraction et le fort potentiel de cette plante en tant que source de composés bioactifs.

L'extrait de flavonoïdes d'*Agave americana* var. *americana* présente plusieurs caractéristiques organoleptiques :

L'aspect visuel de l'extrait est particulièrement révélateur de sa composition. Il se présente sous une forme liquide visqueuse, voire semi-solide, cireux ce qui peut suggérer que ce sont des flavonoïdes de type aglycone. Sa couleur est foncée, variant entre le marron et le noir, ce qui est typique des extraits qui contiennent une concentration élevée de composés phénoliques. Cette coloration profonde est souvent associée à des propriétés antioxydantes robustes. La couleur de l'extrait, comme on peut l'observer sur l'image, est foncée, allant du marron au noir. Cette teinte indique une concentration élevée en flavonoïdes ainsi qu'en autres composés phénoliques. Une telle coloration est souvent associée à des extraits riches en substances bioactives, ce qui suggère un potentiel antioxydant significatif.

Il est également intéressant de noter que, contrairement aux flavonoïdes colorés tels que les anthocyanes, cet extrait semble contenir principalement des flavones ou des flavonols. Ces types de flavonoïdes, lorsqu'ils sont concentrés, affichent généralement des teintes allant du jaune au brunâtre. Cette distinction dans la couleur est révélatrice des différents types de flavonoïdes présents, ce qui peut influencer les propriétés et les applications de l'extrait dans divers domaines, tels que la nutrition et la pharmacologie (TANAKA et al., 2008)

L'odeur de l'extrait est un aspect qui mérite d'être souligné. En général, les flavonoïdes peuvent dégager une odeur végétale, souvent légèrement amère ou herbacée. Cette caractéristique olfactive peut être indicative de leur origine végétale et de leur nature biochimique.

De plus, la présence de certains composés volatils dans l'extrait peut influencer l'intensité de cette odeur. Bien que les flavonoïdes eux-mêmes ne soient pas aromatiques, leur interaction avec d'autres métabolites et composés présents dans l'extrait peut moduler l'odeur globale.



Il est également plausible que l'extrait dégage une légère odeur végétale ou terreuse, résultant des métabolites secondaires de l'Agave. Cette nuance olfactive peut enrichir l'expérience sensorielle associée à l'extrait et offrir des indications supplémentaires sur sa composition chimique et son potentiel d'utilisation. En somme, l'odeur de l'extrait reflète non seulement ses caractéristiques biochimiques, mais aussi son origine botanique. (DIXON & PASINETTI, 2010 ; SCHWAB et al., 2008).

Le goût de l'extrait est un aspect essentiel à considérer. En général, les flavonoïdes sont connus pour leur saveur amère ou astringente, résultant de leur interaction avec les protéines salivaires. Cette caractéristique gustative est souvent plus prononcée dans les extraits concentrés, où la concentration de flavonoïdes et d'autres composés bioactifs est accrue (CHEYNIER, 2005).

Dans le cas de l'extrait concentré d'Agave americana, il est probable qu'il présente une forte astringence, une qualité typique des flavonoïdes qui interagissent avec les protéines de la salive. Cela peut donner une sensation particulière en bouche, souvent décrite comme une sécheresse ou une rugosité. La présence de cette astringence peut influencer non seulement l'expérience gustative, mais aussi la perception globale de l'extrait dans des applications culinaires ou médicinales. En somme, le goût des flavonoïdes contribue à leur profil sensoriel unique, enrichissant ainsi leur utilisation potentielle (BAXTER et al., 1997).

3.4.3. Résultats de l'Analyse Chromatographique par HPLC

La Figure 40 illustre le profil chromatographique des flavonoïdes extraits de l'agave, avec une détection effectuée à une longueur d'onde de 280 nm. Pour cette analyse, les standards ont été soigneusement préparés à une concentration de 1 mg/ml dans une solution de méthanol et d'eau, à parts égales (50:50 v/v). La solution injectée dans le système chromatographique contenait sept composés distincts : l'acide gallique, l'acide ascorbique, la rutine, la quercétine, la catéchine, la vanilline et l'acide cinnamique.

L'identification des composés présents dans l'extrait testé repose sur la comparaison des temps de rétention des pics observés avec ceux des standards connus, ainsi que sur l'analyse des masses molaires. Cela permet de déterminer avec précision quels flavonoïdes sont présents dans l'extrait d'agave. Les différents pics correspondant aux composés présents dans l'extrait. À cette longueur



d'onde, on peut observer une séparation des flavonoïdes, permettant d'identifier leur concentration et leur diversité. Les pics plus élevés indiquent une plus grande concentration de flavonoïdes, tandis que les zones sans pics peuvent signifier l'absence de certains composés.

Il est également important de souligner que certains composés présents dans l'extrait n'ont pas pu être identifiés en raison de l'absence de standards appropriés pour ces substances.

Les résultats de cette analyse sont synthétisés dans le tableau 06, qui met en évidence les principaux composés trouvés dans les flavonoïdes extraits de l'*Agave americana*. Les données révèlent que les composés clés identifiés comprennent l'acide galique, la catéchine, la vanilline, la rutine et la quercétine. En revanche, il a été noté que l'acide cinnamique et l'acide ascorbique étaient absents de l'extrait analysé.

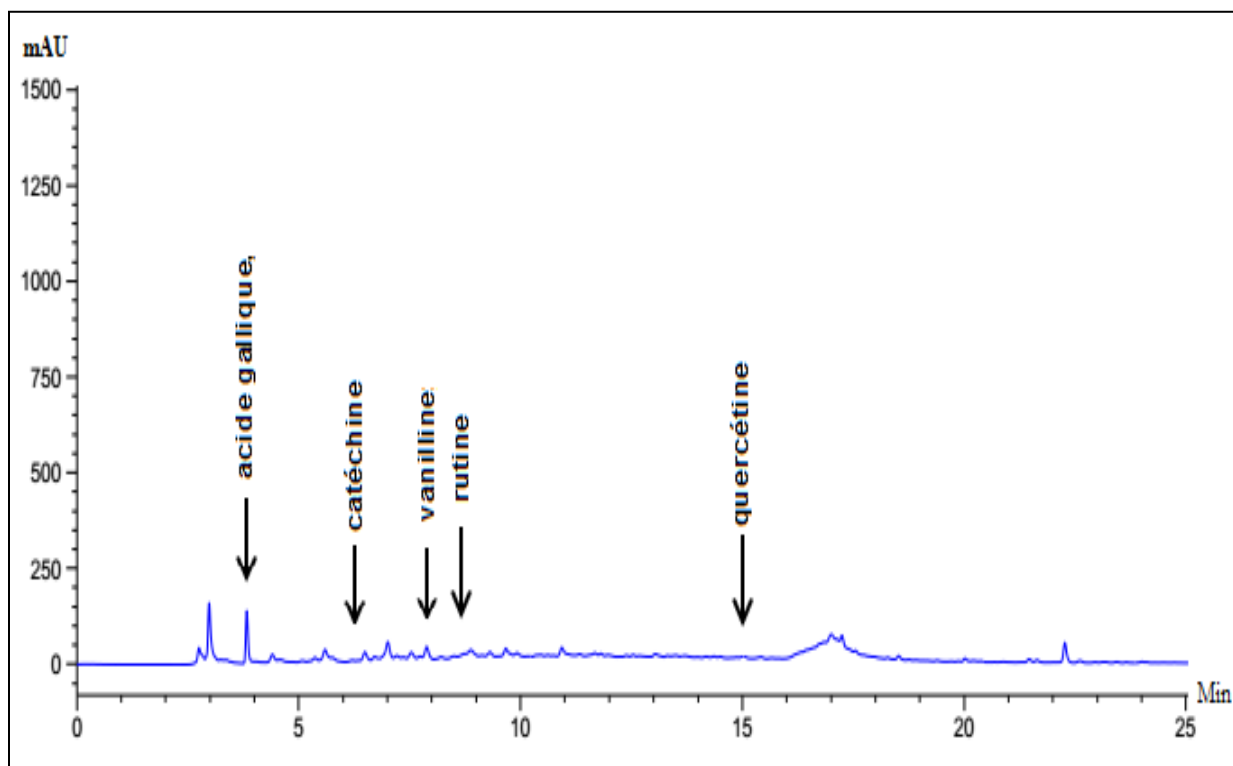


FIG. 40: Chromatogramme des flavonoïdes extraits à 280 nm



TAB.11 : Tableau récapitulatif des résultats de l'analyse qualitative des flavonoïdes extraits.

Réf	Tr (min)	Nom du composé	Détection	Pourcentage des aires %
1	2.89	Acide Ascorbique	(-)	-
2	3.82	Acide Gallique	(+)	42.77
3	6.18	Catéchine	(+)	8.17
4	7.80	Vanilline	(+)	9.45
5	8.52	Rutine	(+)	17.42
6	14.99	Quercétine	(+)	22.18
7	16.44	Acide Cinnamique	(-)	-

Réf : Reference ; Tr : Temps de Rétention +: détecté ; -: non détecté

Les résultats présentés dans le tableau 11 mettent en lumière les composés représentatifs des flavonoïdes extraits de l'*Agave americana*. Parmi ces composés, on trouve l'acide gallique, la catéchine, la vanilline, la rutine et la quercétine. Notons également l'absence d'acide cinnamique et d'acide ascorbique, ce qui pourrait avoir des implications sur la diversité chimique de l'extrait. En raison de l'absence de standards adéquats, certains composés présents dans l'extrait n'ont pas pu être identifiés, ce qui souligne la nécessité de recherches complémentaires pour mieux comprendre la composition de cette plante.

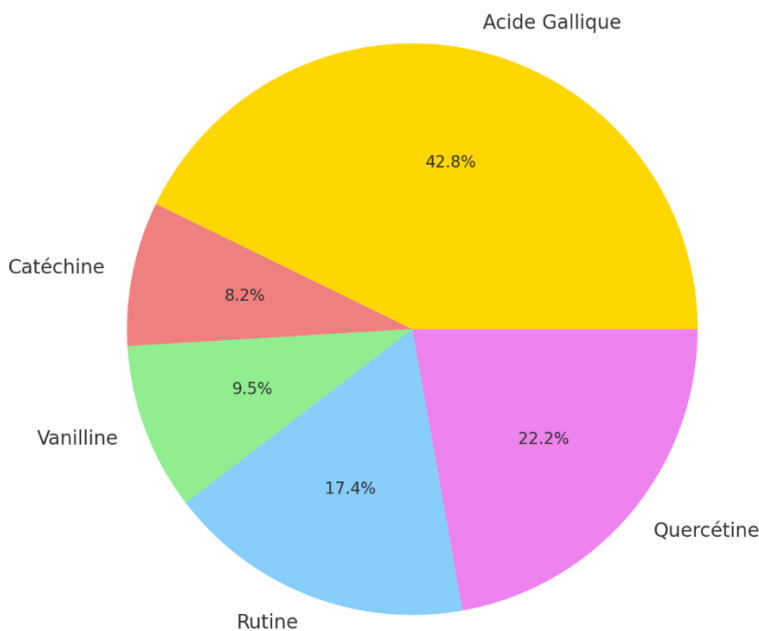


FIG. 41: Proportions des composants séparés et identifiés dans les flavonoïdes extraits



La figure 41 illustre les proportions des composants séparés et identifiés dans les flavonoïdes extraits d'*Agave americana* var. *americana*. L'acide gallique est le composé majoritaire avec 42,77 %, suivi de la quercétine (22,18 %) et de la rutine (17,42 %). La vanilline et la catéchine sont présentes en quantités plus faibles, respectivement à 9,45 % et 8,17 %.

L'analyse HPLC des flavonoïdes de l'*Agave americana* var. *americana* a permis d'identifier plusieurs composés phénoliques, avec des proportions variables en fonction de leur aire sous la courbe.

En premier lieu, l'acide gallique se distingue comme le composé majoritaire, représentant 42,77 % de l'extrait. Ce polyphénol est reconnu pour ses puissantes propriétés antioxydantes, jouant un rôle essentiel dans la protection des cellules contre le stress oxydatif, ce qui est crucial pour maintenir la santé cellulaire et prévenir diverses maladies.

Un autre composant significatif est la quercétine, qui constitue 22,18 % de l'extrait. Ce flavonoïde est bien connu pour ses effets antioxydants et anti-inflammatoires. Il contribue à la protection cardiovasculaire et possède également des propriétés antivirales, ce qui en fait un allié important pour le système immunitaire. Sa concentration élevée dans l'extrait suggère un potentiel bénéfique considérable pour la santé humaine.

La rutine, représentant 17,42 % de l'extrait, est un glycoside de la quercétine. Elle est réputée pour ses propriétés veinotoniques et anti-inflammatoires, jouant un rôle clé dans la protection des capillaires sanguins. Cela en fait un composant essentiel pour soutenir la santé vasculaire et réduire les risques de maladies associées.

Parmi les autres composés présents, la vanilline, qui représente 9,45 %, est un antioxydant également présent dans diverses plantes. En plus de contribuer à l'arôme de l'extrait, elle renforce les propriétés antioxydantes, agissant de concert avec les autres composés pour offrir une protection contre les radicaux libres.

Enfin, la catéchine, représentant 8,17 % de l'extrait, est un composant majeur du thé vert. Elle est reconnue pour ses effets protecteurs contre les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires, soulignant encore une fois le potentiel de l'*Agave americana* dans la promotion de la santé.



Cependant, il est à noter que certains composés, tels que l'acide ascorbique et l'acide cinnamique, n'ont pas été détectés en quantité significative dans l'extrait. Cela peut être attribué à leur faible concentration dans la plante ou à leur instabilité lors du processus d'extraction. Ces observations soulignent la complexité de l'extraction des flavonoïdes et la nécessité de poursuivre les recherches pour mieux comprendre la composition chimique de l'*Agave americana* L.

Des recherches antérieures, comme celles de SUBRAMANIAN & NAIR (1970), ont identifié deux glycosides de flavonol dans les fleurs d'*Agave americana* : le kaempférol-3-O-glucoside et le kaempférol-3-O-rutinoside. Ces découvertes ouvrent la voie à une meilleure compréhension des propriétés bioactives de la plante. Par ailleurs, PARMAR et al. (1992) ont mis en évidence un flavanone complexe, le 5,7-dihydroxy-6,5'-diméthoxy-3',4'-méthylénedioxyflavanone, dans les tissus somatiques de l'*Agave americana*, ce qui suggère une diversité chimique importante.

Récemment, des rapports ont également discuté des contenus en phénols, tannins et flavonoïdes présents dans les feuilles de l'*Agave americana*, ainsi que des propriétés biologiques associées à ces composés. Par exemple, l'étude de KHAN et al. (2010) a révélé des effets antibactériens significatifs des extraits de feuilles d'*Agave americana*, attribuant ces propriétés, au moins en partie, aux homo-iso-flavonoïdes identifiés auparavant. Cela met en lumière le potentiel de cette plante dans le développement de nouveaux agents antibactériens.

Cependant, il est intéressant de noter que KADAM et al. (2012) n'ont trouvé aucun flavonoïde ni tannin dans les racines d'*Agave americana* cultivées en Inde, ce qui souligne l'importance de la provenance géographique et des conditions de culture sur la composition chimique de cette plante. Ces résultats incitent à poursuivre les investigations pour explorer davantage les divers aspects biochimiques et pharmacologiques de l'*Agave americana*.

Les espèces du genre *Agave* présentent des profils en flavonoïdes variés, influencés par des facteurs tels que l'espèce spécifique, les conditions environnementales et les méthodes d'extraction. Des études menées sur différentes espèces d'*Agave* ont révélé une riche diversité de polyphénols et de flavonoïdes, dont la composition varie en fonction de l'origine géographique et des conditions d'extraction. Par exemple, GUTIERREZ-GRIJALVA et al. (2016) ont mis en évidence des niveaux élevés de quercétine et de catéchines dans l'*Agave tequilana*, associant cette concentration à une activité antioxydante significative. Cela souligne l'importance de cette espèce dans le



développement d'extraits aux propriétés bénéfiques pour la santé. De plus, NARVAEZ-FLORES et al. (2015) ont observé que l'acide gallique et la rutine étaient des composés dominants dans plusieurs autres espèces d'Agave, indiquant une tendance générale dans la chimie de ces plantes. Ces résultats suggèrent non seulement une richesse phytochimique dans le genre Agave, mais aussi le potentiel d'exploiter ces composés pour des applications thérapeutiques et nutritionnelles, tout en considérant les variations liées à la provenance et aux méthodes d'extraction.

3.4.4. Résultats de l'étude *in Silico*

Évaluation des propriétés médicamenteuses et du profil ADMET des composés identifiés

Les composés étudiés, à savoir l'acide gallique, la catéchine, la vanilline, la rutine et la quercétine, ont montré des profils ADME variés (tableau 12). En effet, tous ces composés répondent partiellement aux critères de Drug-likeness établis par LIPINSKI (LIPINSKI *et al.*, 2001), GHOSE (GHOSE *et al.*, 1999) et VEBER (VEBER *et al.*, 2002), à l'exception de la rutine.

Cette dernière présente un nombre élevé de groupes donneurs d'hydrogène ($nHBD = 10$) ainsi qu'une surface polaire totale (TPSA) très étendue (voir (Tableau 12), ce qui entraîne une faible absorption intestinale en raison d'une perméabilité limitée ($TPSA = 269,43 \text{ \AA}^2$) et d'un mécanisme d'efflux via la protéine P-gp.

Le tableau 12 montre que bien que la quercétine respecte les critères de LIPINSKI, elle présente un risque important d'interactions médicamenteuses en raison de son potentiel inhibiteur des enzymes CYP1A2, 2D6 et 3A4, ainsi qu'une surface polaire modérée ($TPSA = 131,36 \text{ \AA}^2$), ce qui pourrait affecter sa biodisponibilité.

La vanilline et l'acide gallique se distinguent par une absorption élevée ($TPSA < 100 \text{ \AA}^2$, LogP modéré) et une perméabilité à la barrière hémato-encéphalique (BBB). Les valeurs de Log Kp (entre -6,37 et -7,82) indiquent une perméabilité cutanée acceptable, sauf pour la rutine ($\text{Log Kp} = -10,26$) (Tableau 12).



TAB. 12 : Analyse des propriétés ADME des composés identifiés

Paramètres	Acide Gallique	Catéchine	Vanilline	Rutine	Quercétine
Logp (<i>Lipophilicite</i>)	0,21	0,83	1,20	-1,51	1,23
Tpsa (Å ²) (<i>Surface Polaire Totale</i>)	97,99	110,38	46,53	269,43	131,36
Nhba (<i>Accepteurs H</i>)	5	6	3	16	7
Nhbd (<i>Donneurs H</i>)	4	5	1	10	5
Absorption Gastro-Intestinale (Gi)	Élevée	Élevée	Élevée	Faible	Élevée
Perméabilité Bbb (<i>Barrière Hémato-Encéphalique</i>)	Oui	Oui	Oui	Non	Non
Substrat P-Gp	Non	Oui	Non	Oui	Non
Inhibiteur Cyp1a2	Non	Non	Non	Non	Oui
Inhibiteur Cyp2c19	Non	Non	Non	Non	Non
Inhibiteur Cyp2c9	Non	Non	Non	Non	Non
Inhibiteur Cyp2d6	Non	Non	Non	Non	Oui
Inhibiteur Cyp3a4	Oui	Non	Non	Non	Oui
Log Kp (<i>Permeabilité Cutanée, Cm/S</i>)	-6,84	-7,82	-6,37	-10,26	-7,05
Lipinski (Regle Des 5)	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
Ghose	Non	Oui	Non	Non	Oui
Veber	Oui	Oui	Oui	Non	Oui

Le tableau 13 et la figure 43 montrent que tous les composés examinés — acide gallique, catéchine, vanilline, rutine et quercétine — présentent un potentiel néphrotoxique, avec des probabilités allant de modérées à relativement élevées (Pb entre 0,53 et 0,77). En revanche, la majorité de ces composés sont prédits comme inactifs vis-à-vis de la toxicité hépatique, neurotoxique, cardiaque et cytotoxique, souvent avec des probabilités d'inactivité élevées.

La **quercétine** se caractérise par la **toxicité aiguë prédite la plus élevée** (DL50 la plus basse à 159 mg/kg, **classe 3**) et une **probabilité de cancérogénéité de 0,68**, un risque également associé à l'acide gallique (0,56). La **rutine** présente une **forte probabilité d'immunotoxicité** (0,98), tandis que la **catéchine** se distingue par sa **faible toxicité globale**, avec une DL50 élevée (10 000 mg/kg, **classe 6**) et une prédiction d'inactivité pour la plupart des autres effets toxiques spécifiques, à l'exception d'une **néphrotoxicité commune**.

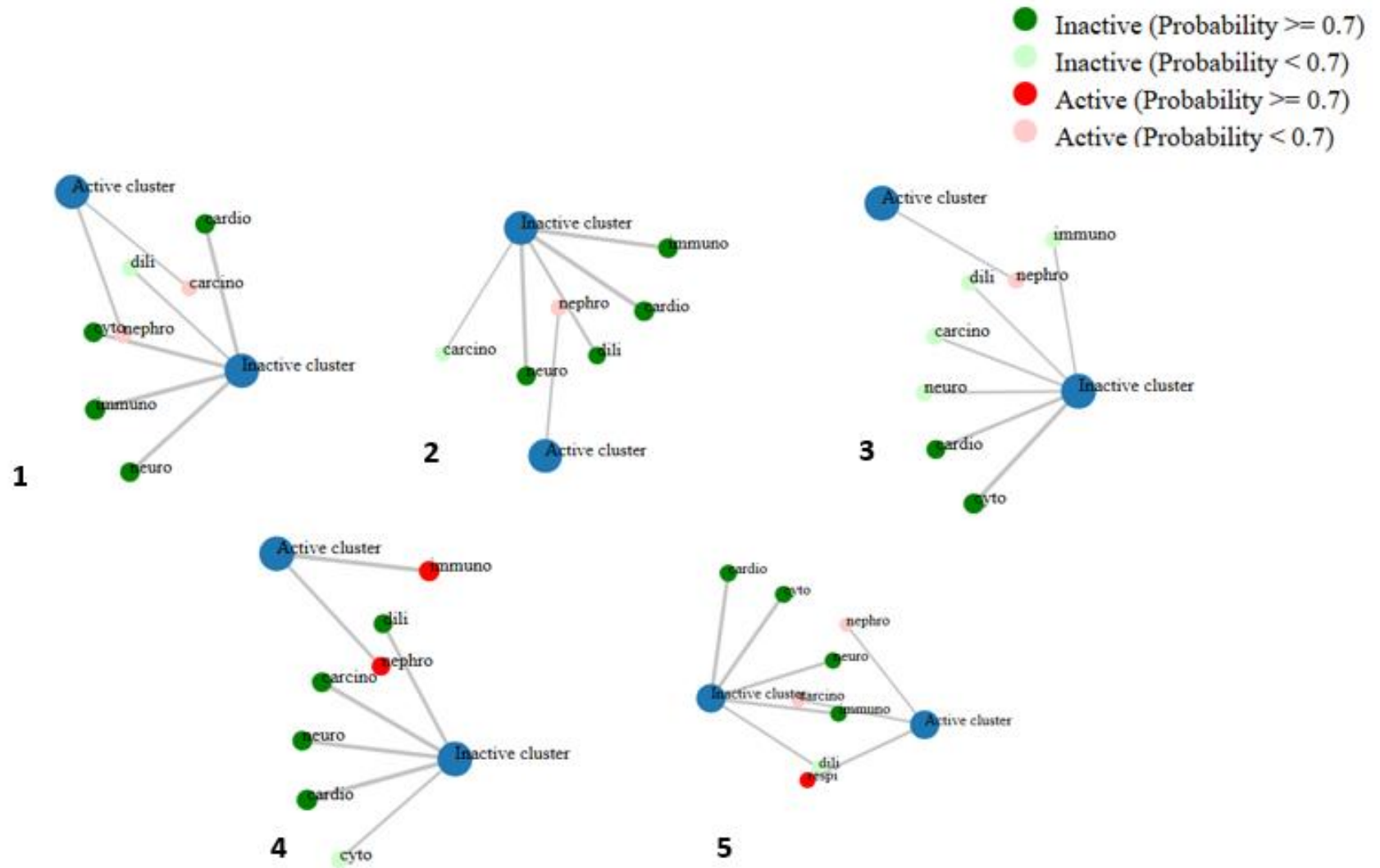


FIG. 43 : La connexion entre le composé sélectionné et les activités prédites



TAB. 13 : Prédiction in silico des profils de toxicité des composés identifiés

Composé	Hépatotoxicité	Neurotoxicité	Néphrotoxicité	Cardiotoxicité	Cancérogénicité	Immunotoxicité	Cytotoxicité	DL50 prédite (mg/kg)	Classe de toxicité
Acide gallique	I (0,61)	I (0,88)	A (0,69)	I (0,89)	A (0,56)	I (0,99)	I (0,91)	2000	4 – Nocif
Catéchine	I (0,72)	I (0,90)	A (0,62)	I (0,99)	I (0,51)	I (0,96)	I (0,84)	10000	6 – Non toxique
Vanilline	I (0,52)	I (0,59)	A (0,53)	I (0,79)	I (0,60)	I (0,55)	I (0,94)	1000	4 – Nocif
Rutine	I (0,80)	I (0,89)	A (0,77)	I (0,98)	I (0,91)	A (0,98)	I (0,64)	5000	5 – Potentiellement dangereux
Quercétine	I (0,69)	I (0,89)	A (0,62)	I (0,99)	A (0,68)	I (0,87)	I (0,99)	159	3 – Toxique

Légende :

- **A** : Actif (le composé est prédit comme ayant une activité toxique pour le paramètre concerné)
- **I** : Inactif (le composé est prédit comme n'ayant pas d'activité toxique pour le paramètre concerné)
- **DL50 (mg/kg)** : Dose létale médiane prédite – dose à laquelle 50 % des organismes testés meurent
- **Pr** : Prédiction (A ou I)
- **Pb** : Probabilité de la prédiction
- **Classe de toxicité** (selon ProTox-II) :
 - **Classe 1** : Extrêmement toxique ($DL50 \leq 5$ mg/kg)
 - **Classe 2** : Très toxique ($5 < DL50 \leq 50$ mg/kg)
 - **Classe 3** : Toxique ($50 < DL50 \leq 300$ mg/kg)
 - **Classe 4** : Nocif ($300 < DL50 \leq 2000$ mg/kg)
 - **Classe 5** : Potentiellement dangereux ($2000 < DL50 \leq 5000$ mg/kg)
 - **Classe 6** : Non toxique ($DL50 > 5000$ mg/kg)

La quercétine se caractérise par la toxicité aiguë prédite la plus élevée (DL50 la plus basse à 159 mg/kg, classe 3) et une probabilité de cancérogénicité de 0,68, un risque également associé à l'acide gallique (0,56). La rutine présente une forte probabilité d'immunotoxicité (0,98), tandis que la catéchine se distingue par sa faible toxicité globale, avec une DL50 élevée (10 000 mg/kg, classe 6) et une prédiction d'inactivité pour la plupart des autres effets toxiques spécifiques, à l'exception d'une néphrotoxicité commune.

Les propriétés de type médicamenteux et l'absorption gastro-intestinale des substances sélectionnées ont été illustrées par la prédiction "Boiled-egg" (figure 44) et par le radar de biodisponibilité (figure 45). Les substances situées dans la zone jaune du graphique "Boiled-egg"



peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique (BBB), tandis que la région rose du radar de biodisponibilité indique le caractère médicamenteux de ces composés.

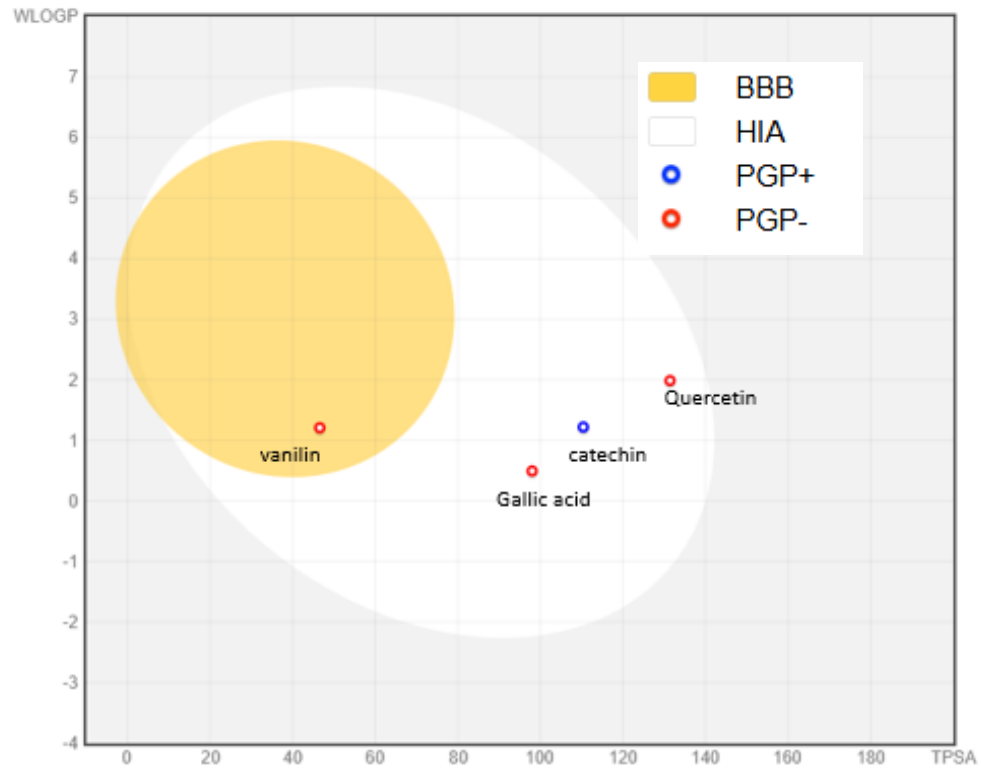


FIG. 44 : Graphique “Boiled-egg” des composés identifiés



Gallic acid



Catechin



Vanillin



Rutin



Quercetin

FIG. 45 : Radar de biodisponibilité pour les flavonoïdes sélectionnés (*la zone rose indique les propriétés de type médicamenteux des composés étudiés*)



3.5. Résultats de l'essai physiologique

3.5.1. Résultats des tests biologiques *in vitro*

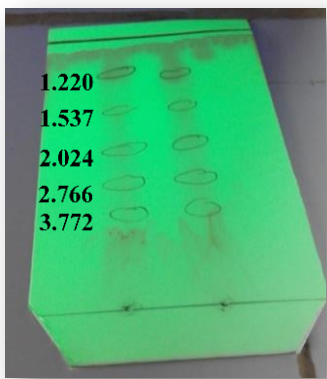
3.5.1.1. Résultats de l'activité antioxydante

A. Test de l'activité anti-oxydante sur C.C.M

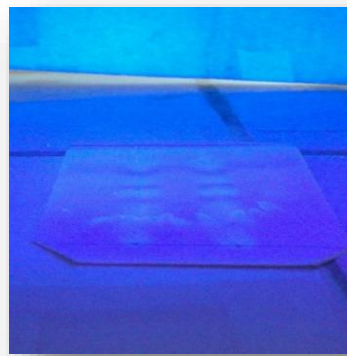
Après avoir procédé à la migration et à la séparation de la solution hydro-méthanolique testée à l'aide de la phase mobile, qui était un mélange de butanol, d'acide acétique et d'eau (BAW), nous avons observé la formation de cinq spots distincts. Ces spots ont été caractérisés par des rapports frontaux (R_f) spécifiques, à savoir $R_f 01 = 3.772$, $R_f 02 = 2.766$, $R_f 03 = 2.024$, $R_f 04 = 1.537$ et $R_f 05 = 1.220$. Cette séparation permet de visualiser les différents composés présents dans l'extrait, témoignant ainsi de la complexité de sa composition chimique.

Suite à cette séparation, nous avons réalisé un test de révélation en utilisant une solution méthanolique de DPPH à une concentration de 2 mg/ml. Cette étape a permis de mettre en évidence l'activité antiradicalaire des composés présents dans l'extrait. Les spots séparés de l'extrait hydro-alcoolique, qui avait un rapport de 7/3, ont révélé une coloration jaune distinctive. Cette coloration indique une réduction efficace des radicaux libres du DPPH, ce qui est un signe fort de l'activité antioxydante des flavonoïdes présents dans l'extrait.

Ce test préliminaire sur l'activité antioxydante des flavonoïdes extraits *d'Agave americana* var. *americana* L. à l'aide de la chromatographie sur couche mince (C.C.M) nous a fourni des indications précieuses concernant le potentiel antioxydant *in vivo* de ces composés. Les résultats observés suggèrent que les flavonoïdes extraits de cette plante pourraient jouer un rôle protecteur contre le stress oxydatif dans des conditions biologiques, renforçant ainsi l'intérêt pour l'exploration de leurs applications thérapeutiques et nutritionnelles.



-A-



-B-



-C-

FIG. 46: Les étapes du test de l'activité anti-oxydante sur C.C.M

-A- Rapports Frontaux et révélation par la lumière visible à 254 nm des flavonoïdes **-B-** Révélation par la lumière Ultra-Violette à 365 nm des flavonoïdes **-C-** Révélation par la solution méthanolique de DPPH à 02mg/ml des flavonoïdes

B. Résultats du test de l'ABTS

La figure (47) suivante présente la courbe d'étalonnage de la vitamine C réalisée pour le test ABTS

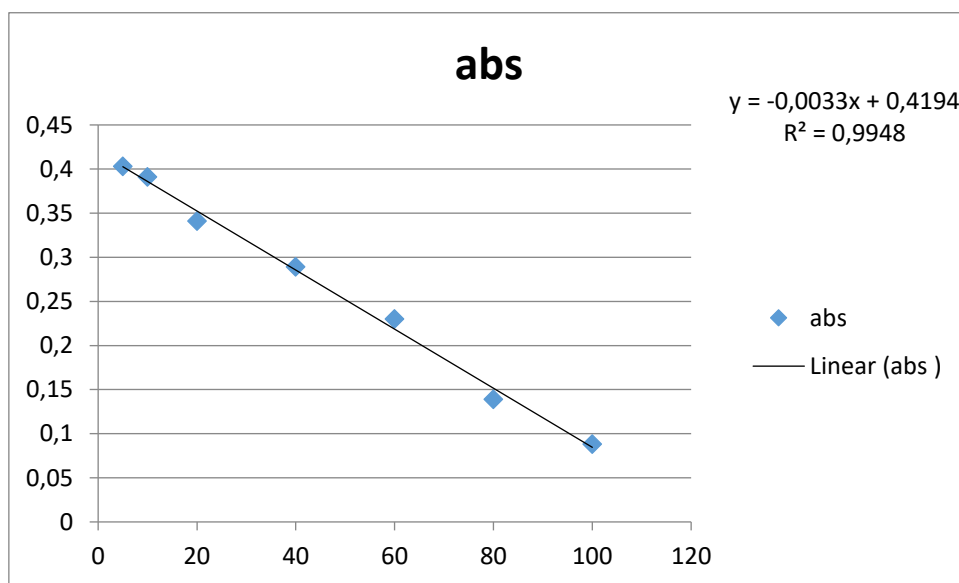


FIG. 47: Courbe d'étalonnage de la VC pour le test ABTS



Sur la base des valeurs d'absorbance des solutions d'extrait ayant réagi, et comparées à la solution étalon en vitamine C, on peut déterminer l'activité antioxydantes des flavonoïdes de l'Agave (figure 43). Sachant que l'activité antioxydante est exprimée en gramme équivalents à la vitamine C (g VCE). Ces résultats se rapportent à 100 gramme de matière sèche et les valeurs représentent les moyennes de trois mesures \pm déviation standard.

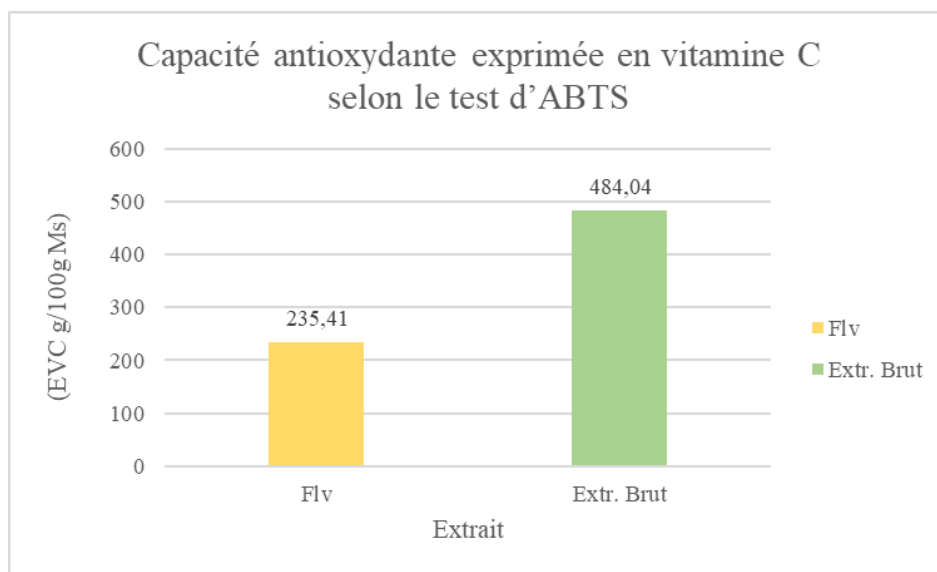


FIG. 48: Capacité antioxydante exprimée en Vit C selon le test ABTS

Le graphique à barres présenté dans la figure (48) illustre la capacité antioxydante de deux types d'extraits, exprimée en équivalent vitamine C (EVC g/100g de matière sèche), mesurée à l'aide du test ABTS. Sur l'axe des ordonnées (Y), la capacité antioxydante est représentée ; une valeur plus élevée indique un pouvoir antioxydant plus important. L'axe des abscisses (X) compare deux types d'extraits : le premier, noté Flv, représente les flavonoïdes extraits de l'Agave, tandis que le second, appelé Extr. Brut, est un extrait brut de la plante qui pourrait contenir un éventail plus large de composés bioactifs.

Les barres colorées du graphique montrent que l'extrait Flv, représenté par une barre jaune, possède une capacité antioxydante de 235,41 EVC g/100g de matière sèche. En revanche, la barre verte, correspondant à l'extrait brut, révèle une capacité antioxydante nettement supérieure, atteignant 484,04 EVC g/100g de matière sèche. Cette différence significative indique que l'extrait brut présente une capacité antioxydante presque deux fois plus élevée que l'extrait Flv.



Cette observation suggère que l'extrait brut pourrait contenir une plus grande variété de composés actifs ou bénéficier d'une meilleure synergie entre ses composants, ce qui lui confère une efficacité antioxydante accrue. En effet, il est probable que l'extrait brut renferme une gamme plus large de polyphénols, flavonoïdes, tanins et autres composés bioactifs, expliquant ainsi sa capacité antioxydante supérieure. À l'inverse, l'extrait Flv pourrait se concentrer davantage sur les flavonoïdes, sans inclure d'autres antioxydants puissants présents dans l'extrait brut.

Par ailleurs, il est possible que les antioxydants de l'extrait brut agissent en synergie, amplifiant ainsi leur effet global, contrairement à un extrait plus ciblé comme Flv. De plus, des différences dans les méthodes ou solvants utilisés pour l'extraction pourraient également influencer la concentration et la biodisponibilité des antioxydants dans chaque extrait.

Cette disparité dans la capacité antioxydante incite à mener des analyses plus approfondies afin d'identifier les composés spécifiques responsables de cette variation. Des tests supplémentaires, tels que ceux utilisant le DPPH ou le FRAP, pourraient également permettre de confirmer si cette tendance est applicable dans d'autres conditions expérimentales. Ces investigations contribueraient à une meilleure compréhension des propriétés antioxydantes des extraits et de leur potentiel dans des applications thérapeutiques.

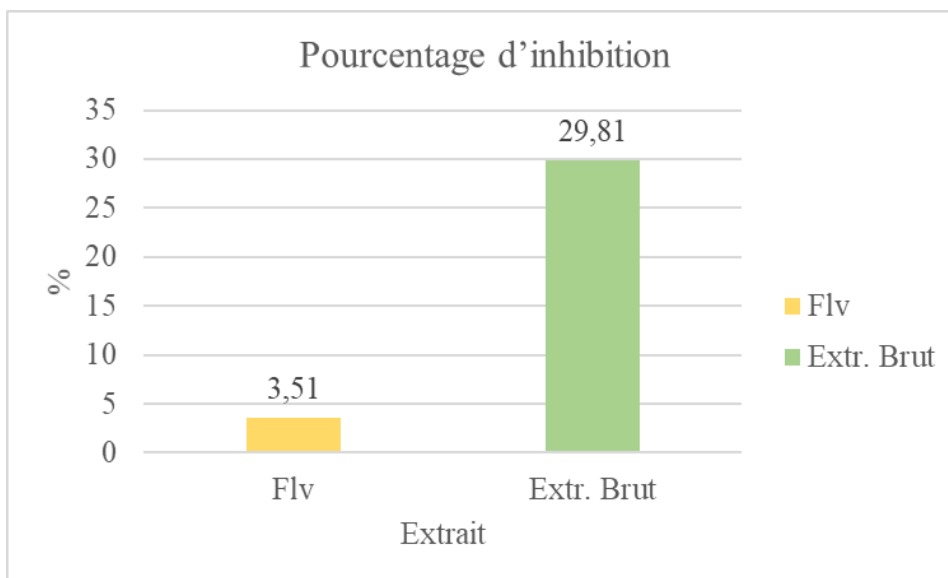


FIG. 49: Pourcentage d'inhibition des deux extraits testés par le test ABTS



Le graphique présenté dans la figure 49 met en lumière le pourcentage d'inhibition observé pour deux extraits testés : l'extrait des flavonoïdes extraits de l'Agave, noté Flv, et l'extrait brut de la même plante. Les résultats indiquent que l'extrait Flv présente un pourcentage d'inhibition de 3,51 %, tandis que l'extrait brut affiche une valeur significativement plus élevée de 29,81 %.

Le pourcentage d'inhibition est une métrique cruciale dans l'évaluation de la capacité d'un extrait à interférer avec la réaction des radicaux libres. Cette mesure est essentielle, car elle fournit une indication de l'activité antioxydante de l'extrait, c'est-à-dire sa capacité à neutraliser les espèces réactives de l'oxygène qui peuvent causer des dommages cellulaires. Dans ce contexte, une inhibition plus élevée est synonyme d'une meilleure protection contre le stress oxydatif.

L'extrait brut se distingue clairement par sa capacité d'inhibition, qui dépasse largement celle de l'extrait Flv, avec une différence de plus de 26 points de pourcentage. Cette différence significative suggère que l'extrait brut contient une variété de composés bioactifs qui agissent de manière synergique pour neutraliser les radicaux libres, renforçant ainsi son efficacité antioxydante. En revanche, l'extrait Flv, bien que possédant des flavonoïdes reconnus pour leurs propriétés bénéfiques, semble moins performant en termes d'inhibition des radicaux libres.

Ces résultats soulignent l'importance de considérer la composition globale des extraits lors de l'évaluation de leur potentiel antioxydant. L'extrait brut, avec sa richesse en divers composés bioactifs, pourrait offrir des avantages supplémentaires en matière de santé, ce qui mérite d'être exploré davantage dans des études futures.

Une corrélation notable se dégage entre la capacité antioxydante des extraits et leur pourcentage d'inhibition mesuré. En effet, l'extrait brut, qui présente une capacité antioxydante plus élevée, est également associé à un pourcentage d'inhibition significativement plus important. Ce constat indique que l'extrait brut est particulièrement efficace pour neutraliser les radicaux libres, ce qui se traduit par une meilleure protection contre le stress oxydatif.

D'autre part, l'extrait Flv, dont la capacité antioxydante est plus faible, montre également un effet inhibiteur nettement réduit. Cette observation renforce l'idée que les propriétés antioxydantes jouent un rôle crucial dans le mécanisme d'inhibition des radicaux libres. En d'autres termes, la



capacité d'un extrait à agir contre les radicaux libres est directement liée à sa concentration en composés antioxydants.

Ces résultats suggèrent que les extraits ayant une richesse en divers composés bioactifs, comme c'est le cas de l'extrait brut, sont plus aptes à offrir une protection antioxydante efficace. Cela souligne l'importance d'explorer la composition chimique des extraits pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à leur activité antioxydante et leur potentiel en tant que stratégies de prévention contre les dommages cellulaires liés au stress oxydatif.

C. Résultats du test de DPPH

Le graphique suivant (figure 50) représente l'activité antioxydante de différents extraits de l'Agave en fonction de leur concentration (C en mg/mL), mesurée par le test du DPPH (% d'inhibition). Trois courbes sont présentées : ExtB AA (extrait brut de l'Agave, en orange), Flavo AA (flavonoïdes, en gris) et finalement, l'Acide ascorbique (comme référence, en bleu).

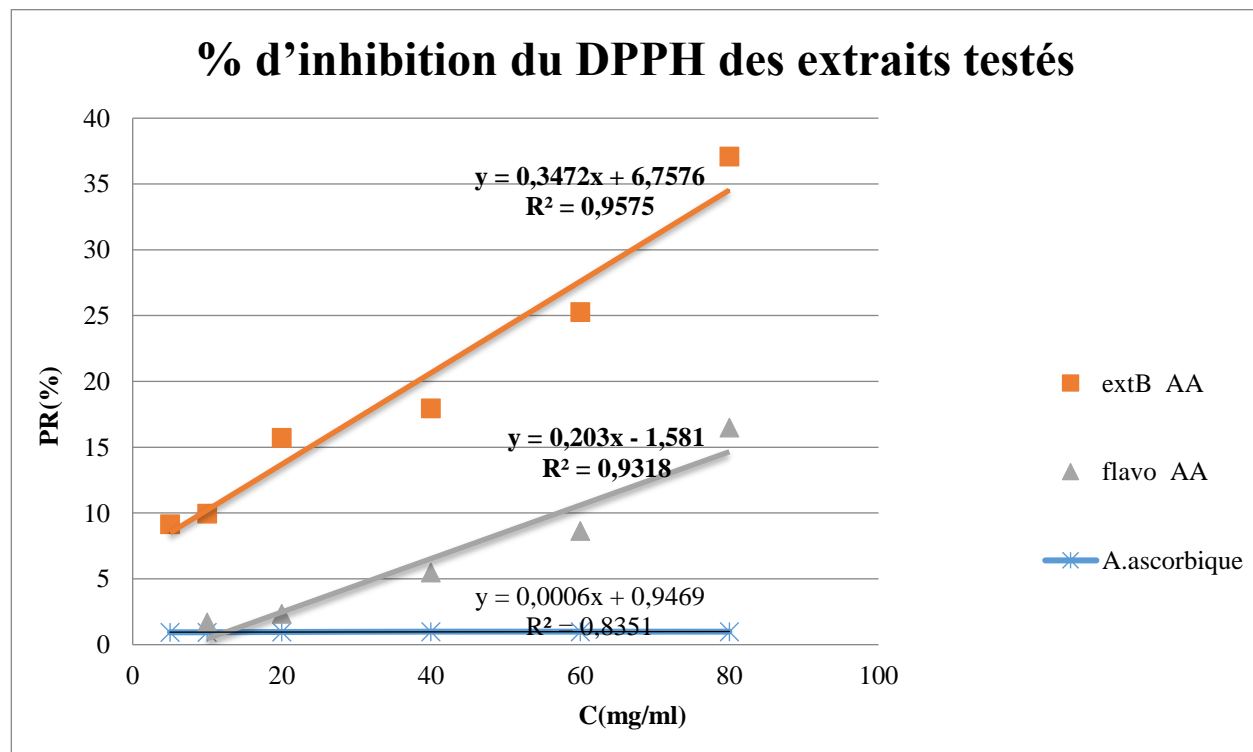


FIG. 50: % d'inhibition du DPPH des extraits testés



Les équations de régression linéaire permettent d'interpréter la relation entre la concentration et le % d'inhibition.

L'analyse des données concernant les extraits antioxydants révèle des différences significatives entre l'extrait brut et l'extrait de flavonoïdes. Pour l'extrait brut (noté ExtB AA), l'équation de la corrélation est donnée par $y=0,3472x+6,7576$, avec un coefficient de détermination R^2 de 0,9575. Cela indique une forte corrélation, signifiant que la tendance observée est bien ajustée aux données. La pente de 0,3472 suggère qu'il y a une augmentation marquée du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration, ce qui souligne l'efficacité de cet extrait. À la concentration la plus faible, le pourcentage d'inhibition est d'environ 6,76 %, ce qui révèle un effet de base non négligeable.

En revanche, pour l'extrait de flavonoïdes (Flavo AA), l'équation de la corrélation est $y=0,203x-1,581$, avec un coefficient de détermination R^2 de 0,9318. Bien que la corrélation soit bonne, elle est légèrement moins forte que celle de l'extrait brut. La pente de 0,203 est inférieure à celle de l'extrait brut, ce qui signifie que l'augmentation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration est moins prononcée. De plus, à la concentration la plus faible, la valeur prédite est de -1,581 %, ce qui est non réaliste et suggère une faible inhibition initiale. Ce résultat indique que l'extrait de flavonoïdes pourrait ne pas posséder d'effet antioxydant efficace à faible concentration, ce qui souligne l'importance d'explorer les concentrations optimales pour maximiser leur potentiel antioxydant.

L'analyse des capacités antioxydantes des différents extraits met en évidence des variations significatives dans leur efficacité. L'extrait brut se distingue clairement comme ayant la meilleure activité antioxydante, avec un pourcentage d'inhibition qui augmente rapidement en fonction de la concentration. Cette réponse rapide suggère que cet extrait contient une combinaison de composés bioactifs qui agissent efficacement pour neutraliser les radicaux libres, offrant ainsi une protection notable contre le stress oxydatif.

D'autre part, les flavonoïdes présentent une activité intermédiaire en termes d'inhibition. Bien qu'ils soient reconnus pour leurs propriétés bénéfiques, leur efficacité reste nettement inférieure à celle de l'extrait brut. Cela soulève des questions sur la composition et la synergie des flavonoïdes, qui pourraient ne pas être aussi optimisées que celles présentes dans l'extrait brut.



Pour évaluer l'efficacité antioxydante de nos extraits, il est essentiel de les comparer aux résultats obtenus dans des études antérieures sur des espèces du genre *Agave*. Par exemple, l'extrait aqueux d'*Agave angustifolia* a montré des valeurs d'activité antioxydante notables, avec des résultats de 94,2 μmol équivalent de trolox par gramme ($\mu\text{mol ET/g}$) pour le test DPPH, 239,1 $\mu\text{mol ET/g}$ pour le test ABTS, et 148,8 $\mu\text{mol ET/g}$ pour le test FRAP (LOPEZ-ROMERO *et al.*, 2018). Ces résultats soulignent une capacité antioxydante significative, attribuée à la richesse de cet extrait en composés phénoliques.

En ce qui concerne *Agave sisalana*, un extrait dérivé de résidus industriels a révélé une concentration de 77,93 mg équivalent acide gallique par gramme, accompagné d'une activité antioxydante *in vitro* (DAHER *et al.*, 2023), la présence notable de composés phénoliques indique un potentiel antioxydant qui mérite d'être exploré davantage.

Pour *Agave americana*, l'évaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH a montré que tous les extraits possédaient une activité anti-radicalaire importante (RAHMANI, 2016).

D. Résultats du test FRAP

Le graphique dans la figure 48 représente l'évolution de l'absorbance (A) en fonction de la concentration des extraits testés (C en mg/mL), ce qui permet d'évaluer leur pouvoir réducteur du fer (FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power).

Le test du pouvoir réducteur du fer (FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power) est une méthode permettant d'évaluer l'activité antioxydante en mesurant la capacité d'un extrait à réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} . Une absorbance plus élevée indique un pouvoir réducteur plus important.

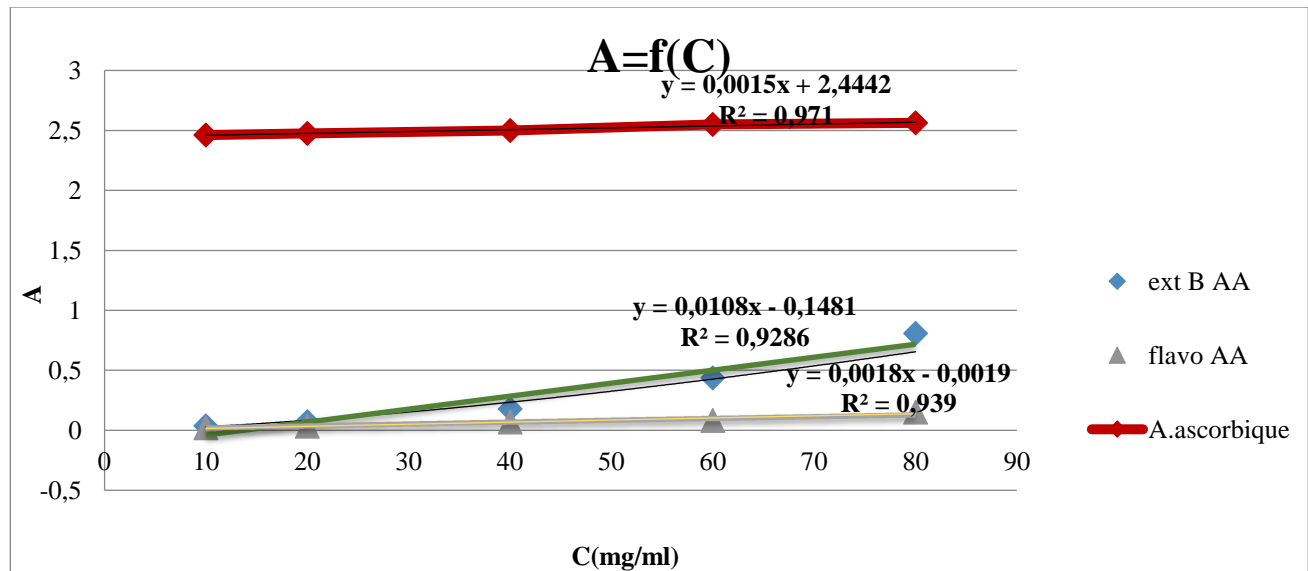


FIG. 51: Pouvoir réducteur du fer des extraits testés

L'analyse des résultats concernant l'activité antioxydante des extraits et de l'acide ascorbique met en évidence des tendances et des différences significatives récapitulées dans les tableau 13.

TAB.14 : Comparaison des extraits testés par le test FRAP

Paramètre	Acide Ascorbique	Extrait Brut	Extrait Flavonoïde
Pente (a)	0,0015	0,0108	0,0018
R^2	0,971	0,9286	0,939
Pouvoir réducteur (efficacité)	Très élevé	Modéré	Faible

Premièrement, l'acide ascorbique, représenté par la courbe rouge, affiche une absorbance élevée d'environ 2,5, qui reste presque constante indépendamment de la concentration. La pente de la courbe, mesurée à 0,0015, indique une forte activité réductrice qui ne varie pas avec la concentration, ce qui témoigne de la stabilité de son pouvoir antioxydant. De plus, le coefficient de détermination ($R^2 = 0,971$) suggère une excellente corrélation linéaire, renforçant l'idée d'une relation fiable entre la concentration et l'absorbance.

Concernant l'extrait brut (courbe verte), les résultats montrent une augmentation progressive de l'absorbance avec la concentration, ce qui indique un effet dose-dépendant. La pente de 0,0108, supérieure à celle de l'acide ascorbique, suggère que cet extrait possède une activité antioxydante plus marquée. Avec un R^2 de 0,9286, les résultats montrent également une bonne linéarité, bien que légèrement inférieure à celle de l'acide ascorbique.



Pour l'extrait de flavonoïdes (courbe grise), les valeurs d'absorbance sont plus faibles que celles de l'extrait brut. La pente, mesurée à 0,0018, est inférieure à celle de l'extrait brut, ce qui indique une activité antioxydante plus modérée. Le coefficient de détermination ($R^2 = 0,939$) démontre une corrélation linéaire correcte, mais moins prononcée que pour les autres extraits.

En conclusion, l'acide ascorbique sert de standard de référence en raison de son pouvoir réducteur élevé et constant. Bien que l'extrait brut montre une capacité réductrice significative, supérieure à celle de l'extrait de flavonoïdes, il reste néanmoins en deçà de celle de l'acide ascorbique. Ces résultats suggèrent que la fraction de flavonoïdes ne suffit pas à elle seule à expliquer l'activité antioxydante observée, et que d'autres composés, tels que des polyphénols non flavonoïdes, pourraient également jouer un rôle clé dans cette activité. De plus, le fait que l'activité des extraits soit dose-dépendante souligne l'importance d'ajuster la concentration pour maximiser le potentiel antioxydant.

Ces résultats mettent en lumière les différences significatives dans l'activité antioxydante des différents extraits, fournissant ainsi des informations précieuses pour l'optimisation future des formulations ou des applications des extraits testés.

Récapitulatif de l'activité antioxydante

- **ABTS :**
 - L'extrait brut présente une capacité antioxydante deux fois plus élevée que l'extrait flavonoïde.
 - Cela montre que des composés autres que les flavonoïdes contribuent à l'activité antioxydante.
- **DPPH :**
 - L'extrait brut (Ext B AA) a une meilleure activité antioxydante que l'extrait flavonoïde (Flavo AA), avec une pente plus élevée et un IC_{50} plus faible.
 - L'acide ascorbique présente une activité négligeable dans ces conditions.
- **FRAP :**
 - L'extrait brut possède le pouvoir réducteur du fer le plus élevé, suivi par l'extrait flavonoïde.
 - L'acide ascorbique a une contribution stable mais faible.



Performance de l'Extrait Brut (Ext B AA) (tableau 15) L'extrait brut (Ext B AA) se démarque comme le plus performant dans les trois tests d'activité antioxydante réalisés. Ce constat indique probablement qu'il renferme un mélange complexe de composés antioxydants, tels que des polyphénols, des flavonoïdes, des tanins, et d'autres métabolites secondaires. Cette diversité chimique est cruciale, car elle peut contribuer à une synergie d'effets antioxydants, rendant l'extrait brut particulièrement efficace pour neutraliser les radicaux libres et protéger les cellules contre le stress oxydatif.

Comparaison des Tests ABTS et DPPH (tableau 15) Les résultats obtenus lors du test ABTS sont systématiquement supérieurs à ceux du test DPPH. Ce phénomène est courant dans la littérature scientifique et peut être expliqué par le fait que le test ABTS évalue une gamme plus large de composés antioxydants. En effet, il détecte non seulement les antioxydants capables de réduire les radicaux libres, mais aussi ceux qui peuvent interagir avec des espèces réactives de l'azote et d'autres systèmes. Cette capacité à mesurer une plus grande variété de mécanismes d'action antioxydants pourrait expliquer les résultats plus élevés observés dans ce test.

Spécificité du Test FRAP (tableau 15) Le test FRAP, quant à lui, est plus spécifique aux composés ayant un fort pouvoir réducteur. Cela signifie qu'il est particulièrement sensible à la présence de substances capables de réduire les ions ferriques en ions ferreux. Cette spécificité peut expliquer pourquoi certains extraits montrent une activité plus élevée dans ce test que dans les tests DPPH ou ABTS. En d'autres termes, bien que certains extraits puissent avoir une activité antioxydante globale plus faible, ils peuvent contenir des composés très efficaces en tant qu'agents réducteurs, ce qui les rend plus performants dans le test FRAP.

TAB.15 : Comparaison des tests antioxydants en fonction de leur sensibilité

Test	Résultat principal	Sensibilité aux types d'antioxydants
DPPH	Ext B AA > Flav AA	Mesure principalement les antioxydants hydrophobes (ex. flavonoïdes et polyphénols).
ABTS	Ext B AA > Flav AA	Plus sensible aux antioxydants hydrophiles et lipophiles.
FRAP	Ext B AA > Flav AA	Mesure spécifiquement la capacité de réduction des ions Fe^{3+} .



3.5.1.2. Résultats de l'activité antibactérienne des flavonoïdes extraits

Les flavonoïdes extraits de l'*Agave americana* L. ont été testés contre cinq souches bactériennes de référence en utilisant deux doses (20 mg/mL et 200 mg/mL). Le Cefixime, un antibiotique couramment utilisé, a servi de témoin positif. Le Cefixime est un antibiotique de la famille des céphalosporines, largement utilisé contre les infections bactériennes. Son efficacité est comparée ici aux flavonoïdes pour évaluer le potentiel de ces derniers. La sensibilité des bactéries est indiquée par le symbole (+) dans le tableau 16. Cela signifie que toutes les bactéries testées réagissent aux flavonoïdes, mais avec des niveaux d'efficacité variables.

Le tableau 16 présente les diamètres des zones d'inhibition mesurées en millimètres (mm). Une zone d'inhibition plus grande indique une meilleure activité antibactérienne. L'interprétation de ces résultats permet de mieux comprendre l'efficacité de ces flavonoïdes et d'envisager leur potentiel comme agents antimicrobiens naturels.

TAB.16: Effet Antibactérien des flavonoïdes de l'*Agave americana* L.

	Flav. Dose01 20mg/ml		Flav. Dose02 200mg/ml		Cefixime	
	Diameter	Sensibilité	Diamètre	Sensibilité	Diamètre	Sensibilité
<i>Escherichia coli</i> ATCC. 25922	9.67 ± 0,54	+	10.67 ± 1,41	+	8.66 ± 0.42	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC. 27853	11.00 ± 0	+	10.00 ± 0	+	9.16 ± 0,5	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC. 700603	10.16 ± 1,07	+	8.83 ± 1,67	+	9.33 ± 0,28	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC.25923	09.00 ± 0	+	12.00 ± 1,3	+	10 ± 0	+
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC.29212	10.00 ± 0	+	11.33 ± 1,5	+	9.00 ± 0.5	+

(+) Sensible

L'analyse comparative des doses de flavonoïdes a révélé des tendances intéressantes concernant leur efficacité antibactérienne. En général, une dose plus élevée de 200 mg/mL entraîne une augmentation du diamètre d'inhibition, ce qui indique une activité antibactérienne plus marquée. Cette tendance est particulièrement observable pour les bactéries *Staphylococcus aureus* (B4) et *Enterococcus faecalis* (B5), où les diamètres d'inhibition varient respectivement de 9.00 ± 0 à



12.00 ± 1.3 mm et de 10.00 ± 0 à 11.33 ± 1.5 mm. En revanche, pour *Pseudomonas aeruginosa* (B2), l'effet antibactérien reste relativement stable, avec des mesures de 11.00 mm et 10.00 mm, ce qui pourrait indiquer une résistance relative à l'action des flavonoïdes. De manière surprenante, *Klebsiella pneumoniae* (B3) montre une légère diminution du diamètre d'inhibition à des doses plus élevées, passant de 10.16 ± 1.07 mm à 8.83 ± 1.67 mm, ce qui pourrait être attribué à une variabilité biologique ou à un mécanisme d'adaptation de la bactérie. Lors de la comparaison avec le contrôle positif, le Cefixime, on observe que pour *Escherichia coli* (B1) et *Pseudomonas aeruginosa* (B2), son efficacité est légèrement inférieure ou comparable à celle des flavonoïdes, avec des diamètres d'inhibition de 8.66 ± 0.42 mm et 9.16 ± 0.5 mm respectivement. Toutefois, *Staphylococcus aureus* (B4) et *Enterococcus faecalis* (B5) montrent une meilleure réponse aux flavonoïdes à 200 mg/mL qu'au Cefixime, atteignant respectivement 12.00 mm contre 10 mm et 11.33 mm contre 9 mm, suggérant ainsi une efficacité potentiellement supérieure sur ces bactéries à Gram positif. À l'inverse, pour *Klebsiella pneumoniae* (B3), le Cefixime semble plus efficace, avec un diamètre d'inhibition de 9.33 ± 0.28 mm, contre 8.83 ± 1.67 mm pour les flavonoïdes. En termes de sensibilité globale, toutes les souches bactériennes testées montrent une sensibilité aux flavonoïdes, et les bactéries à Gram positif (B4 et B5) apparaissent plus sensibles que celles à Gram négatif (B1, B2, B3). *Staphylococcus aureus* (B4) se révèle être la plus affectée, ce qui est particulièrement encourageant compte tenu de son rôle fréquent dans les infections résistantes.

Les résultats de l'analyse de la sensibilité des souches bactériennes révèlent des distinctions notables entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Les souches de *Staphylococcus aureus* (B4) et d'*Enterococcus faecalis* (B5) montrent des zones d'inhibition plus larges lorsqu'exposées aux flavonoïdes, ce qui suggère que ces composés ont une efficacité particulière contre ces bactéries. En revanche, les bactéries à Gram négatif présentent une sensibilité qui varie. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* (B2) maintient une sensibilité relativement constante, avec des zones d'inhibition mesurant entre 10 et 11 mm. En revanche, *Klebsiella pneumoniae* (B3) révèle la plus faible réponse, avec une diminution de la zone d'inhibition à des doses plus élevées, ce qui peut indiquer une affinité réduite des flavonoïdes pour cette souche. Cette différence de sensibilité peut s'expliquer par la structure cellulaire des bactéries : les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe riche en lipopolysaccharides, qui limite la pénétration de nombreux agents antibactériens. À l'inverse, les bactéries à Gram positif, avec leur paroi cellulaire



plus perméable, semblent plus réceptives aux flavonoïdes, ce qui pourrait expliquer leur plus grande sensibilité.

Les analyses statistiques des résultats obtenus sont récapitulées dans les tableaux 17 et 18

TAB.17: AV2 des Diamètres dose/bactérie.

$\bar{X} \pm SD$				
Bactérie	Dose	Interaction	Groupe	
B ₁	9.67 ±0.97	D ₁	9.97±0.69	B
B ₂	10.05±0.80	D ₂	10.57±1.29	C
B ₃	9.44±0.80	T	9.23±0.56	A
B ₄	10.33±1.41			
B ₅	10.11±1.08			
P value	0.004 DHS	0.000 DTHS	0.000 DTHS	
F (ddl)	4.75 ddl4	27.36 ddl 2	11.57 ddl 8	

Les moyennes suivies de lettres différentes étaient significativement différentes selon le test de Tukey à un niveau de signification de ($P \leq 0,05$).

TAB.18: Comparaison Multiple par le test Tukey

	D1	D2	T
D1	/	0.006	0.001
D2	0.006	/	0.000
T	0.001	0.000	/

L'interprétation des résultats des tests statistiques, comme en témoigne les tableaux 17 et 18, offre une perspective approfondie sur l'efficacité des flavonoïdes contre différentes souches bactériennes, en mettant en lumière des variations significatives tant au niveau des bactéries qu'en fonction des doses administrées.

Dans le cadre de l'analyse des diamètres d'inhibition, il est intéressant de noter que les valeurs moyennes des différents groupes bactériens révèlent des comportements distincts. Par exemple, *Escherichia coli* (B1) affiche un diamètre d'inhibition de 9.67 ± 0.97 mm, tandis que *Staphylococcus aureus* (B4) présente une inhibition plus marquée, atteignant 10.33 ± 1.41 mm. Cette différence suggère que *Staphylococcus aureus* pourrait être particulièrement vulnérable aux flavonoïdes, ce qui est d'autant plus pertinent dans le contexte des infections nosocomiales, où cette souche est souvent impliquée. À l'inverse, *Klebsiella pneumoniae* (B3), avec un diamètre d'inhibition de 9.44 ± 0.80 mm, apparaît comme une souche moins sensible, ce qui soulève des



questions sur la nécessité d'explorer des approches alternatives pour traiter les infections causées par cette bactérie.

Lorsque l'on examine les doses, l'analyse révèle une tendance claire : la dose de 200 mg/mL (D2) affiche un diamètre d'inhibition moyen de 10.57 ± 1.29 mm, supérieur à celui observé pour la dose de 20 mg/mL (D1), qui est de 9.97 ± 0.69 mm. Cette augmentation significative du diamètre d'inhibition avec l'augmentation de la dose confirme l'effet dose-dépendant des flavonoïdes, suggérant que des concentrations plus élevées de ces composés pourraient induire une réponse antibactérienne plus efficace. Cela met en évidence l'importance de l'optimisation des dosages dans les traitements futurs utilisant des flavonoïdes en tant qu'agents antimicrobiens.

L'analyse des groupes statistiques, réalisée grâce au test de Tukey, permet de classer les différentes souches en fonction de leur résistance ou sensibilité aux flavonoïdes. *Klebsiella pneumoniae* (B3) est isolée dans un groupe distinct, ce qui indique qu'elle présente une réponse significativement moins efficace par rapport aux autres souches. En revanche, *Escherichia coli* (B1) et *Pseudomonas aeruginosa* (B2) sont regroupés dans un groupe intermédiaire, tandis que *Staphylococcus aureus* (B4) et *Enterococcus faecalis* (B5) affichent des réponses similaires, suggérant une sensibilité plus élevée des bactéries à Gram positif. Cette classification souligne l'importance de cibler les bonnes souches lors de l'application des flavonoïdes dans un contexte clinique.

Les valeurs de P inférieures à 0.05 sont particulièrement révélatrices, car elles indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes, renforçant la validité des résultats obtenus. Le test F, quant à lui, démontre des variations significatives entre les différents groupes bactériens et les doses administrées, confirmant ainsi l'influence des facteurs bactériens et des doses sur l'efficacité des flavonoïdes.

Enfin, l'analyse des comparaisons multiples dans le tableau 18, via le test de Tukey, apporte des éclaircissements supplémentaires sur l'efficacité relative des différentes doses. Les comparaisons entre D1 et D2 montrent un P de 0.006, indiquant une différence significative entre les deux doses. De plus, la comparaison entre D1 et le Cefixime (T) révèle un P de 0.001, tandis que D2 par rapport à T présente un P de 0.000. Ces résultats suggèrent non seulement que la dose de 200 mg/mL est significativement plus efficace que la dose de 20 mg/mL, mais aussi que le Cefixime, bien qu'étant un contrôle positif, n'atteint pas l'efficacité des flavonoïdes. Cela ouvre la voie à des recherches



futures pour explorer le potentiel des flavonoïdes en tant qu'alternatives ou compléments aux antibiotiques traditionnels, en particulier dans le traitement des infections causées par des souches résistantes.

En somme, ces résultats soulignent l'importance des flavonoïdes comme agents antimicrobiens potentiels et mettent en exergue la nécessité d'une recherche continue pour optimiser leur utilisation dans un cadre clinique.

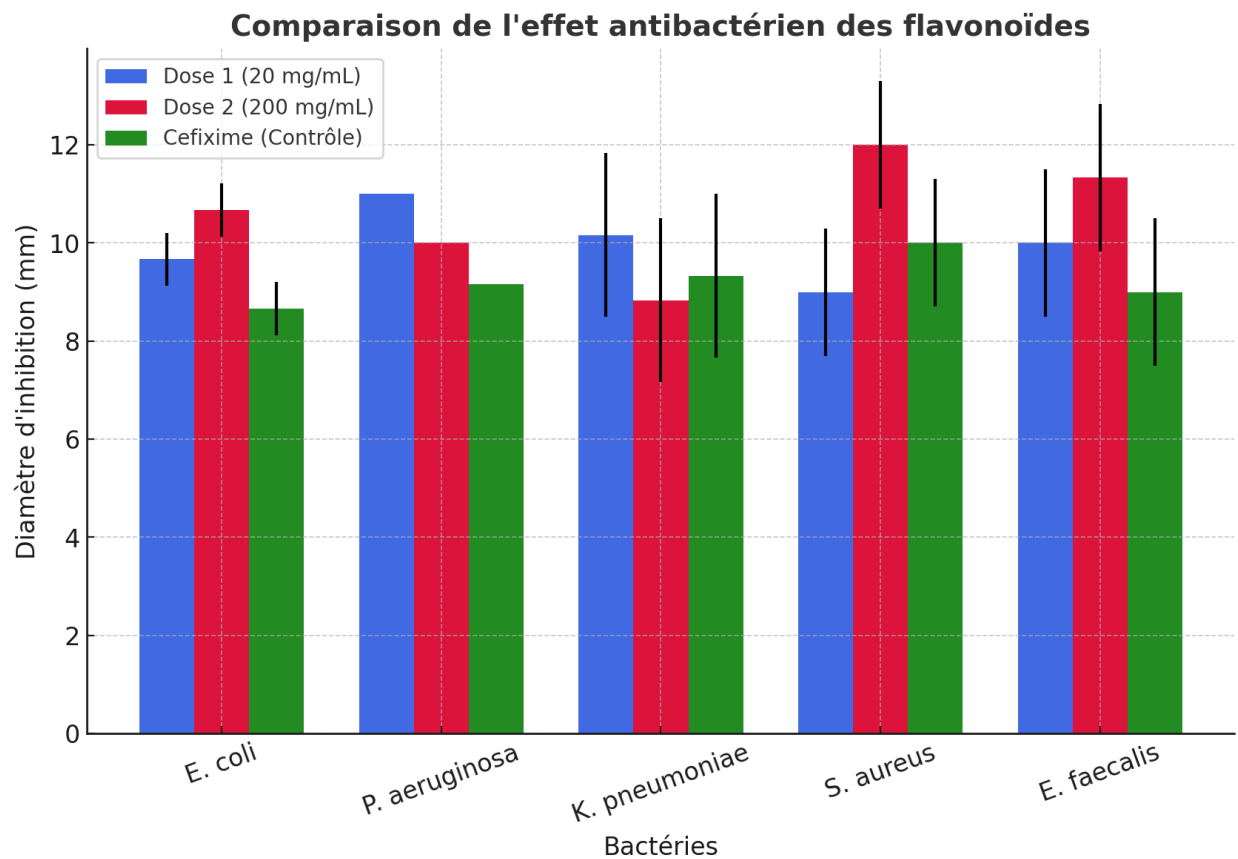


FIG. 52: Relation dose-réponse pour les bactéries de référence testées.

L'interprétation de la Figure 52, qui illustre la relation dose-réponse des flavonoïdes sur différentes souches bactériennes, révèle des insights significatifs sur leur efficacité antibactérienne. Les couleurs utilisées dans le graphique facilitent la distinction entre les doses et le contrôle : bleu pour la dose de 20 mg/mL, rouge pour celle de 200 mg/mL, et vert pour le contrôle avec Cefixime.



Effet dose-dépendant

L'effet dose-dépendant est manifeste dans le graphique, où la dose 2 (rouge) montre systématiquement une plus grande inhibition bactérienne que la dose 1 (bleu). Cela indique clairement que l'augmentation de la concentration des flavonoïdes améliore leur activité antibactérienne. Notamment, pour certaines souches, comme *Staphylococcus aureus* (B4), l'inhibition observée avec la dose de 200 mg/mL dépasse même celle du contrôle, suggérant un potentiel supérieur des flavonoïdes par rapport à l'antibiotique de référence.

Comparaison par bactérie

- *Escherichia coli* (B1) : Les résultats montrent que la dose 2 est plus efficace que la dose 1 et le contrôle, soulignant que les flavonoïdes surpassent l'efficacité du Cefixime dans ce cas.
- *Pseudomonas aeruginosa* (B2) : Bien que les effets des doses 1 et 2 soient proches, le contrôle affiche une efficacité moindre, ce qui indique une certaine résistance de cette souche aux traitements administrés.
- *Klebsiella pneumoniae* (B3) : L'inhibition est légèrement supérieure à celle des autres conditions, mais le contrôle reste le moins efficace, ce qui pourrait indiquer une résistance relative.
- *Staphylococcus aureus* (B4) : Ce pathogène se distingue par une inhibition marquée avec la dose 2, indiquant une grande sensibilité aux flavonoïdes.
- *Enterococcus faecalis* (B5) : Comme pour *Escherichia coli*, la dose 2 démontre une inhibition significativement plus forte que la dose 1 et le contrôle, renforçant l'idée d'une bonne sensibilité à ces composés.

Analyse des barres d'erreur

Les barres d'erreur (écart-type) associées aux mesures indiquent une faible variabilité, ce qui témoigne de la fiabilité et de la précision des résultats obtenus. Toutefois, pour *Klebsiella pneumoniae*, des barres d'erreur plus grandes peuvent suggérer une variabilité plus élevée dans la réponse à l'inhibition, ce qui mérite une attention particulière dans les études futures.



Les flavonoïdes extraits d'*Agave americana* L. montrent une activité antibactérienne significative et dose-dépendante, avec une efficacité supérieure à celle du Cefixime pour certaines souches. *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* se révèlent particulièrement sensibles, tandis que *Pseudomonas aeruginosa* semble plus résistant. Les résultats suggèrent que l'utilisation de flavonoïdes pourrait constituer une option thérapeutique prometteuse, en particulier dans le traitement des infections causées par des bactéries résistantes.

Analyse statistique

Le test de Tukey, utilisé pour comparer les moyennes, renforce ces conclusions. Les valeurs de P inférieures à 0,05 dans les tableaux 17 et 18 confirment des différences significatives entre les différents groupes de traitement, soulignant l'impact des doses sur l'efficacité antibactérienne. La dose de 200 mg/mL s'avère non seulement plus efficace que la dose de 20 mg/mL, mais également que le contrôle, ce qui suggère que les flavonoïdes pourraient être exploités comme agents antimicrobiens dans des applications cliniques.

Une étude plus récente a mis en évidence la puissance antibactérienne d'un glycoside flavonoïde contre des souches de bactéries à gram positif et à gram négatif. Cela souligne la diversité des flavonoïdes et leur potentiel d'action contre différents types de bactéries, ce qui est crucial dans le contexte actuel de résistance aux antibiotiques (HARBORNE & WILLIAMS, 2000).

Le mécanisme d'action des flavonoïdes en tant qu'agents antimicrobiens est complexe et multifactoriel. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées :

- Inhibition du Métabolisme Énergétique Microbien : Les flavonoïdes pourraient interférer avec les voies métaboliques des microbes, perturbant ainsi leur capacité à produire de l'énergie nécessaire à leur croissance et à leur reproduction (ESTRADA-CASTILLON et al., 2014).
- Inhibition des Fonctions de la Membrane Cytoplasmique : Les flavonoïdes peuvent affecter l'intégrité de la membrane cytoplasmique des bactéries, entraînant une perte de sélectivité de la membrane et une fuite de composés essentiels (TSUCHIYA & IINUMA, 2000).



- Inhibition de la Synthèse des Acides Nucléiques : Certains flavonoïdes peuvent interférer avec la synthèse de l'ADN ou de l'ARN, empêchant ainsi la reproduction des bactéries et leur capacité à exprimer des gènes essentiels (HARBORNE, 1989).

En conclusion, les flavonoïdes extraits d'*Agave americana* var. *americana* L. présentent un potentiel antibactérien qui mérite d'être exploré davantage. Leur efficacité comparée à des antibiotiques de référence, couplée à leur mécanisme d'action multifacette, ouvre la voie à des recherches futures. En approfondissant l'étude des autres composés bioactifs de l'Agave, nous pourrions développer des traitements naturels efficaces contre les infections bactériennes, contribuant ainsi à la lutte contre la résistance croissante aux antibiotiques.

3.5.2. Résultats des tests biologiques *in vivo*

3.5.1. Résultats de l'étude pondérale

Le suivi des paramètres métriques en l'occurrence, le poids corporel, le poids absolu et relatif du foie et de la rate et des reins exprimés en gramme chez les cinq lots (Témoin, Shame, Préventif, Curatif et Cancéreux) sont rassemblés dans les tableaux et les figures suivants.

3.5.1.1. Variation du poids corporel

Le tableau 19 présente l'évolution du poids corporel des rats issus des différents groupes expérimentaux, ce qui permet d'évaluer l'impact des flavonoïdes extraits de l'*Agave americana* L. dans un modèle de carcinogénèse induite par le DMH (1,2-Diméthylhydrazine).

TAB.19: Variation du poids corporel en grammes chez les rattes témoins et traitées

Poids	LOT1	LOT2	LOT3	LOT4	LOT5
Moy	199,29 ±7.23	227,70 ± 51.40	204,40 ±7.63	222,67 ±2.55	237,01 ±11.19
Groupe	A	A	A	A	A
P	0,348				

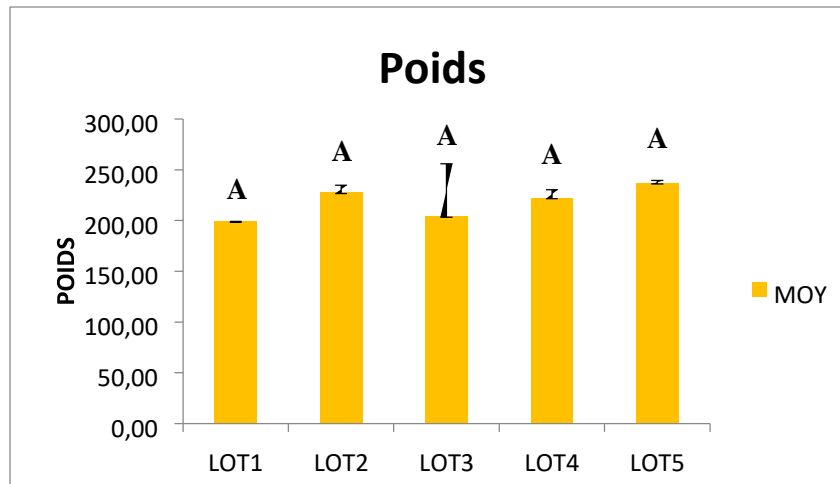


FIG. 53: Variation du poids corporel en grammes chez les rattes témoins et traitées

La figure 53 illustre l'évolution du poids corporel des rats issus de divers groupes expérimentaux, permettant d'évaluer l'impact des flavonoïdes extraits de l'*Agave americana* L. dans un modèle de carcinogénèse induite par le DMH (1,2-Diméthylhydrazine).

LOT 01 (Témoin – Sans traitement) : Ce groupe sert de référence physiologique, affichant un poids relativement stable tout au long de l'étude. Cette absence de variations significatives indique que les conditions d'élevage et d'alimentation sont appropriées, permettant ainsi aux rats de vieillir naturellement sans perte ou gain de poids notables.

LOT 02 (Shame – Flavonoïdes seuls) : Ce groupe a reçu uniquement les flavonoïdes extraits de l'*Agave americana* L. On observe une légère augmentation du poids, suggérant que ces composés n'ont pas d'effet toxique majeur et pourraient même contribuer à une stabilité pondérale ou à une amélioration métabolique. Cette amélioration pourrait être attribuée à leurs propriétés antioxydantes, qui aident à préserver l'intégrité cellulaire et à maintenir un métabolisme énergétique normal.

LOT 03 (Préventif – Flavonoïdes puis DMH) : Dans ce groupe, les flavonoïdes ont été administrés avant l'induction du cancer par le DMH. Le maintien du poids corporel, proche de celui des groupes témoin et shame, suggère un effet protecteur potentiel des flavonoïdes contre la toxicité du DMH. Ces composés pourraient limiter le stress oxydatif et l'inflammation causés par le DMH, réduisant ainsi son impact négatif sur le métabolisme des animaux.



LOT 04 (Curatif – DMH puis Flavonoïdes) : Ce groupe a d'abord reçu le DMH, suivi d'un traitement aux flavonoïdes. Une tendance similaire à celle observée dans le LOT 03 est constatée, avec un poids relativement préservé par rapport au groupe DMH seul (LOT 05). Cela suggère un potentiel effet réparateur des flavonoïdes après l'induction du cancer, en limitant les dommages oxydatifs et en favorisant un meilleur équilibre physiologique. Néanmoins, l'effet curatif semble légèrement moins marqué que l'effet préventif, ce qui pourrait indiquer que les flavonoïdes sont plus efficaces lorsqu'ils sont administrés avant l'exposition au DMH.

LOT 05 (Cancéreux – DMH seul) : Ce groupe montre une perte de poids significative par rapport aux autres groupes, indiquant une toxicité métabolique marquée du DMH. Cette toxicité pourrait être due à un stress oxydatif accru, qui altère les cellules et entraîne une dégradation musculaire et lipidique, ainsi qu'à une inflammation et une altération digestive qui peuvent réduire l'absorption des nutriments. De plus, un catabolisme énergétique accru est souvent observé dans les modèles cancéreux. Ces résultats confirment le rôle cancérogène et délétère du DMH sur la physiologie des rats.

3.5.1.2. Variation du poids hépatique

Le poids absolu du foie représente la masse totale de cet organe en grammes, tandis que le poids relatif du foie est le rapport entre le poids du foie et le poids corporel total, également exprimé en grammes (tableau 20). Ces deux indicateurs sont cruciaux pour évaluer l'impact des traitements sur la santé hépatique ainsi que sur la fonction métabolique du foie. En analysant ces données, il est possible de mieux comprendre comment les différentes interventions influencent la physiologie hépatique et d'identifier d'éventuels effets néfastes ou bénéfiques sur cet organe vital.

TAB.20: Variation du poids absolu et relatif du foie en gramme chez les rattes témoins et traitées

Lots	LOT1	LOT2	LOT3	LOT4	LOT5
Poids absolus du foie (gr)	5.85 ±0.90	5.76±0.45	6.76±0.12	6.85±0.99	7.83±0.75
Poids relatifs du foie (gr/100gr)	2.88 ±0.45	2.86 ±0.23	3.19 ±0.13	3.00 ± 0.39	3.15 ±0.30
Groupe	A	A	A	A	A
P vs T	0,106				

□Poids relatif = (Poids absolu individuel / poids corporel individuel) × 100

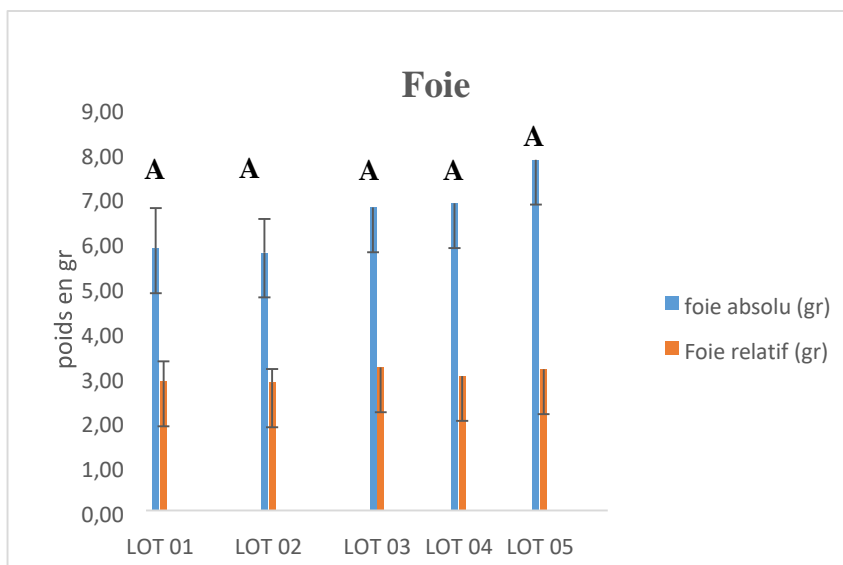


FIG. 54: Variation du poids absolu et relatif du foie en gramme chez les rattes témoins et traités.

L'interprétation de la variation du poids absolu et relatif du foie chez les rats témoins et traités révèle des informations cruciales sur la santé hépatique et l'effet des traitements. La figure 54 présente deux paramètres essentiels : le poids absolu du foie, mesuré en grammes et représenté par des barres bleues, et le poids relatif du foie, qui exprime le rapport entre le poids du foie et le poids corporel total, illustré par des barres oranges. Ces indicateurs sont fondamentaux pour évaluer l'impact des traitements sur la fonction métabolique du foie.

En analysant les résultats par groupe expérimental, le LOT 01, qui sert de groupe témoin sans traitement, montre des valeurs normales de poids absolu et relatif, indiquant une fonction hépatique saine. Dans le LOT 02, où les rats ont reçu uniquement des flavonoïdes, une légère augmentation du poids absolu du foie est notée. Cette variation pourrait témoigner des effets bénéfiques des flavonoïdes, qui semblent stimuler l'activité hépatique sans induire de toxicité. Le LOT 03, où les flavonoïdes ont été administrés avant l'exposition au DMH, révèle un poids du foie similaire, voire légèrement supérieur, à celui du groupe témoin, suggérant une protection potentielle contre les effets cancérogènes du DMH. Pour le LOT 04, où les rats ont d'abord été exposés au DMH puis traités avec des flavonoïdes, une légère baisse du poids absolu du foie est observée par rapport au LOT 03, indiquant que l'effet protecteur des flavonoïdes est plus prononcé en prévention qu'en traitement après exposition. Enfin, le LOT 05, qui a reçu uniquement le DMH, présente une diminution marquée du poids absolu du foie, associée à une légère augmentation du poids relatif.



Cette perte de masse hépatique est probablement due à la toxicité du DMH, entraînant des dommages cellulaires et une destruction des hépatocytes, tandis que l'augmentation du poids relatif peut être expliquée par une perte de poids corporel global, ce qui augmente le rapport entre le foie et le reste du corps.

En conclusion, les résultats suggèrent que les flavonoïdes jouent un rôle protecteur contre la toxicité hépatique induite par le DMH, en maintenant le poids du foie proche des valeurs normales. L'effet préventif des flavonoïdes s'avère plus efficace que l'effet curatif, soulignant leur capacité à limiter les dommages oxydatifs et inflammatoires avant l'exposition. L'administration de DMH seule entraîne une réduction significative du poids absolu du foie, signifiant une atteinte hépatique importante. Ces observations renforcent l'hypothèse selon laquelle les flavonoïdes extraits de *Agave americana* L. pourraient offrir des effets hépatoprotecteurs contre les agressions cancérogènes.

3.5.1.3. Variation du poids de la rate

Le tableau 21 concerne la variation du poids de la rate en grammes chez les rates témoins et traitées révèle des tendances intéressantes. Dans le LOT 1, qui sert de groupe témoin, le poids absolu de la rate est mesuré à $0,68 \pm 0,13$ g, établissant une référence physiologique. Dans le LOT 2, où les rates ont reçu uniquement des flavonoïdes, une légère réduction du poids est observée, avec une moyenne de $0,64 \pm 0,06$ g. Cette diminution suggère que les flavonoïdes pourraient avoir un effet modérateur sur le poids de la rate. En revanche, le LOT 3, dans lequel les flavonoïdes sont administrés avant l'exposition au DMH, affiche une augmentation notable du poids de la rate à $0,83 \pm 0,03$ g. Ce résultat indique que les flavonoïdes pourraient avoir des propriétés protectrices, favorisant une réponse positive de l'organe face à l'agression. De même, le LOT 4, qui a reçu le DMH avant les flavonoïdes, présente un poids comparable à celui du LOT préventif, à $0,84 \pm 0,10$ g, ce qui suggère que l'effet bénéfique des flavonoïdes persiste même après l'exposition au carcinogène.

Enfin, le LOT 5, qui a été exposé uniquement au DMH, montre un poids de $0,80 \pm 0,09$ g, une augmentation par rapport aux groupes témoins et shams. Cette hausse pourrait être indicative d'une inflammation ou d'une prolifération cellulaire anormale engendrée par le DMH. En somme, l'administration du DMH, qu'elle soit préventive ou curative, entraîne une augmentation du poids



absolu de la rate, ce qui pourrait refléter des changements pathologiques dans cet organe, tels que des réponses inflammatoires. Ces résultats soulignent l'importance de la modulation du poids de la rate en réponse aux traitements et mettent en lumière le rôle potentiel des flavonoïdes dans la protection des organes face aux agressions cancérogènes.

TAB.21: Variation du poids de la rate en gramme chez les rattes témoins et traitées

Lots	LOT1 (Témoin)	LOT2 (Shame)	LOT3 (Préventif)	LOT4 (Curatiff)	LOT5 (Cancéreux)
Poids absolu (g)	0.68 ± 0.13	0.64 ± 0.06	0.83 ± 0.03	0.84 ± 0.10	0.80 ± 0.09
Poids relatif (g/100g poids corporel)	0.31 ± 0.061	0.32 ± 0.023	0.42 ± 0.021	0.37 ± 0.043	0.09 ± 0.023
Groupe P vs T	A	A	A	A	A
	0.193				

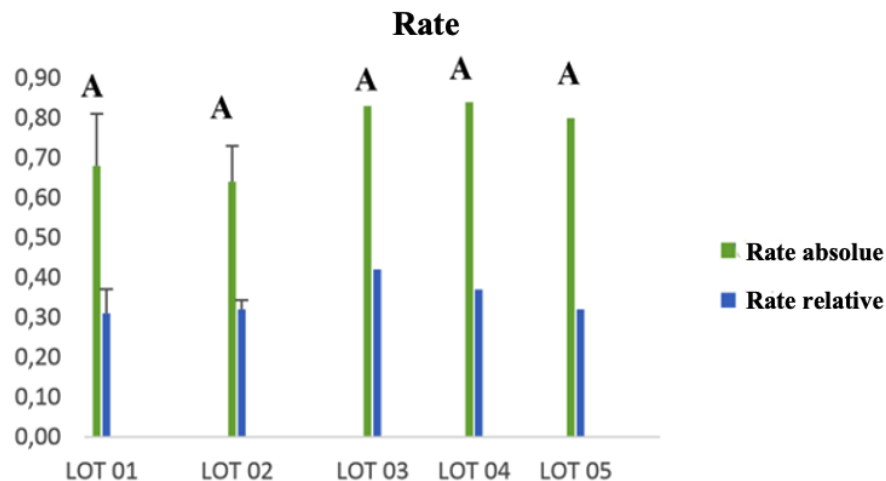


FIG. 55: Variation du poids de la rate en grammes chez les rattes témoins et traitées.

L'analyse du poids relatif de la rate, exprimé en grammes pour 100 grammes de poids corporel, comme illustré dans la figure 55, met en lumière des variations significatives selon les groupes expérimentaux. Le poids absolu de la rate, représenté par des barres vertes, indique le poids réel de cet organe, tandis que le poids relatif, illustré par des barres bleues, établit le rapport entre le poids de la rate et le poids corporel total des rates. Dans le LOT 1, le groupe témoin présente un poids relatif de $0,31 \pm 0,061$, ce qui établit une référence normale. Le LOT 2, qui a reçu uniquement des flavonoïdes, montre une valeur similaire à celle du témoin, à $0,32 \pm 0,023$, suggérant que les



flavonoïdes n'affectent pas significativement le poids relatif de la rate dans cette condition. En revanche, le LOT 3, ayant reçu les flavonoïdes avant l'exposition au DMH, révèle une augmentation significative du poids relatif avec une moyenne de $0,42 \pm 0,021$. Cela pourrait indiquer une réponse immunitaire stimulée ou un effet protecteur des flavonoïdes face aux agressions cancérogènes.

Pour le LOT 4, où l'administration de flavonoïdes a suivi l'exposition au DMH, le poids relatif de la rate est de $0,37 \pm 0,043$, restant supérieur à celui des groupes témoins, ce qui confirme l'effet bénéfique des flavonoïdes même après traitement. En revanche, le LOT 5, exposé uniquement au DMH, présente une forte diminution du poids relatif de la rate à $0,09 \pm 0,023$, ce qui pourrait être le signe d'une atrophie splénique liée au cancer ou à un affaiblissement du système immunitaire. En conclusion, les résultats suggèrent que les flavonoïdes jouent un rôle protecteur, limitant l'atrophie de la rate causée par le DMH. À l'inverse, l'administration du DMH seule semble entraîner une réduction significative du poids relatif, signalant un affaiblissement potentiel du système immunitaire chez les rates cancéreuses. Ces observations soulignent l'importance des flavonoïdes dans la protection des organes et la modulation des réponses immunitaires face aux agressions cancérogènes.

3.5.1.4. Variation du poids des reins

L'analyse du poids des reins (tableau 22) révèle des différences non significatives entre les différents groupes expérimentaux. Notamment, le lot cancéreux se classe dans le même groupe que le lot sham, tandis que les lots préventif et curatif forment un groupe intermédiaire, avec des différences non significatives entre eux. De plus, le lot témoin se distingue en formant un groupe à part, affichant des différences significatives par rapport au lot cancéreux, mais des différences non significatives avec les autres groupes. Toutefois, il est important de noter que ces variations de poids absolu ne se traduisent pas par des différences significatives dans les poids relatifs des reins entre les différents lots. Cela suggère que, bien que des changements notables soient observés dans le poids des reins, ceux-ci ne reflètent pas nécessairement une altération fonctionnelle significative, ce qui pourrait indiquer une certaine stabilité de la fonction rénale malgré les traitements et les conditions expérimentales.



TAB.22: Variation du poids des reins en gramme chez les rattes témoins et traitées

Lots	LOT1	LOT2	LOT3	LOT4	LOT5
Poids absolus des reins (gr)	1,05 ±0.10	1.21± 0.09	1.20±0.04	1.16±0.02	1.32±0.09
Poids relatifs des reins (gr/100gr)	0.52±0.047	0.60±0.027	0.57±0.028	0.51±0.015	0.53±0.016
Groupe	B	A	AB	AB	A
P vs T	0,056				

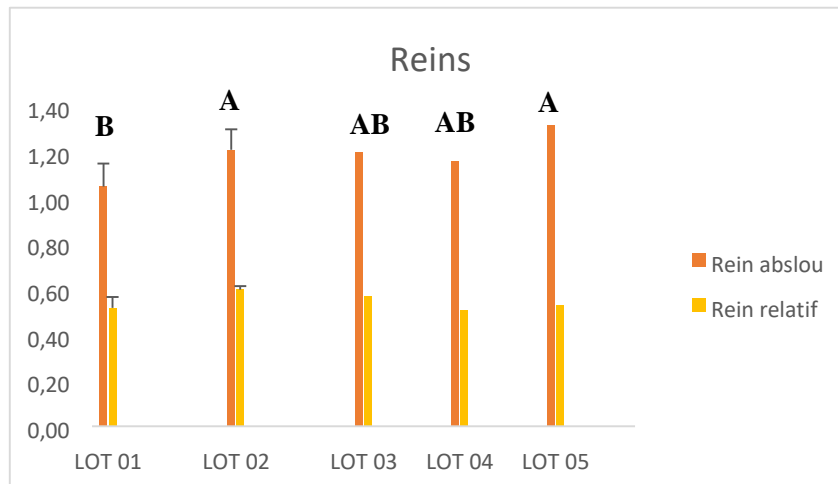


FIG. 56: Variation du poids des reins en grammes chez les rattes témoins et traitées.

L'interprétation de la variation du poids absolu et relatif des reins chez les rates témoins et traitées, comme illustré dans la figure 56, met en évidence une stabilité remarquable dans ces paramètres. Concernant le poids absolu des reins, représenté par des barres orange foncé, les résultats montrent peu de fluctuations entre les différents groupes expérimentaux, allant du LOT 01 au LOT 05. Aucune variation drastique n'est observée, ce qui suggère que les traitements appliqués, qu'il s'agisse des flavonoïdes ou du DMH, n'ont pas eu d'impact significatif sur le poids absolu des reins. Les barres d'erreur, indiquant l'écart-type, soulignent que la dispersion des données intra-groupe est faible, ce qui témoigne d'une cohérence dans les mesures.

De plus, le poids relatif des reins, exprimé en grammes pour 100 grammes de poids corporel, est également stable entre les groupes, indiquant que la proportion de poids des reins par rapport au poids corporel total des rattes n'a pas été significativement modifiée par les traitements. Cette absence de variation dans le poids relatif renforce l'idée que les reins ne subissent pas d'effets notables en réponse aux flavonoïdes ou au DMH. Cela pourrait être interprété comme une



résilience des reins face aux effets de ces traitements, contrastant avec d'autres organes comme la rate ou le foie, où des changements significatifs ont été observés.

En conclusion, tant le poids absolu que le poids relatif des reins demeurent globalement stables entre les groupes expérimentaux. Les traitements appliqués, qu'il s'agisse des flavonoïdes ou du DMH, ne semblent pas influencer de manière significative la masse rénale. Cette stabilité indique que les reins ne constituent pas une cible majeure des effets des flavonoïdes et/ou du DMH dans ce modèle expérimental, soulignant ainsi leur capacité à maintenir leur intégrité fonctionnelle malgré les conditions de traitement.

Les résultats obtenus dans notre étude indiquent que la croissance physiologique des rattees n'a pas été influencée par l'administration de DMH, de flavonoïdes, ou même par des combinaisons des deux traitements. Il est important de noter que le régime alimentaire des rates est resté inchangé tout au long de l'expérience, et leur appétit a été maintenu à un niveau normal. Cela a permis de préserver leur croissance, suggérant que les traitements n'ont pas eu d'effet néfaste sur leur développement général.

Ces observations contrastent avec les travaux de GUEDRI et al. (2010), qui ont rapporté des différences significatives dans le poids corporel, le poids du foie et le poids de la rate entre les groupes traités et les témoins. Cette divergence souligne l'importance de la variabilité entre les études et les modèles expérimentaux utilisés. Toutefois, nos résultats sont en accord avec ceux de TANWAR et al. (2009), qui n'ont pas observé d'impact du traitement au DMH sur le poids corporel. Ainsi, bien que certains travaux antérieurs aient mis en évidence des effets significatifs des traitements sur la croissance.

3.5.2. Résultats de l'étude morphométrique du colon

3.5.2.1. Variation de la longueur du colon

Les résultats des variations de la longueur du colon sont représentés dans le tableau 23 et la figure 57.



TAB.23: Variation de la longueur des colons en cm chez les rattes témoins et traitées.

Lots	LOT1	LOT2	LOT3	LOT4	LOT5
Longueurs des colons (cm)	18.50±2.52	17.75± 0.96	21±2.65	17±2.00	20±2.65
Groupe P vs T	A	A	A	A	A
	0.208				

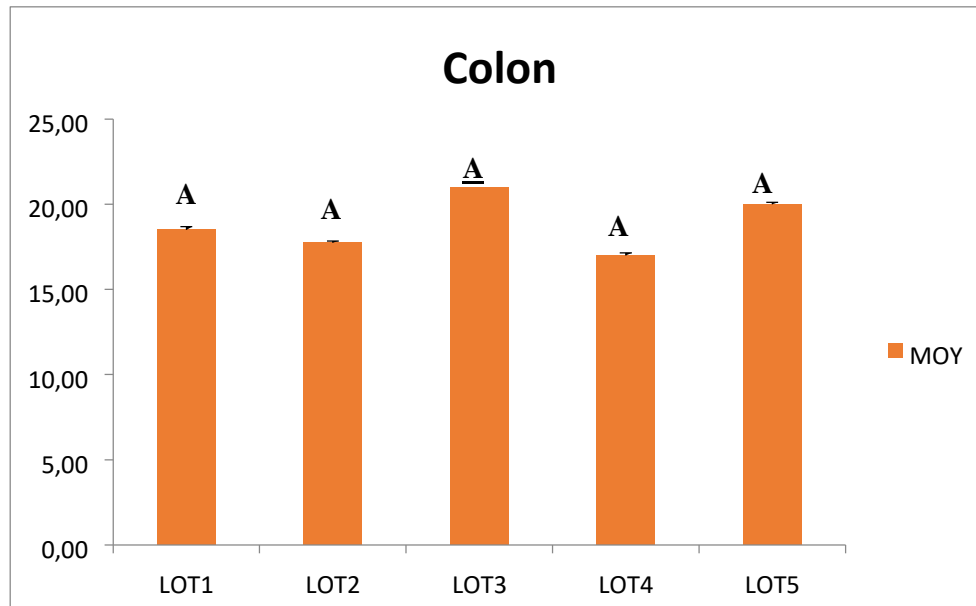


FIG. 57: Variation de la longueur des colons en cm chez les rattes témoins et traitées.

L'analyse de la variation de la longueur du côlon chez les rattes témoins et traitées, comme présenté dans la figure 57, révèle des tendances intéressantes. En général, la longueur du côlon varie légèrement entre les différents groupes expérimentaux, allant du LOT 01 au LOT 05. Certains groupes affichent une longueur plus importante que d'autres, ce qui pourrait indiquer une influence des traitements appliqués sur cette mesure.

En examinant les résultats par lot, il est notable que les groupes LOT 01 (Témoin) et LOT 02 (Shame) présentent des longueurs de côlon similaires et relativement stables, témoignant d'une condition physiologique normale. En revanche, le LOT 03, qui a reçu des flavonoïdes suivis de DMH, montre une augmentation significative de la longueur du côlon par rapport aux témoins, ce qui pourrait suggérer un effet protecteur des flavonoïdes contre les dommages causés par le DMH. Dans le LOT 04, où les rattes ont été traitées avec DMH puis avec des flavonoïdes, la longueur du



côlon est réduite par rapport au groupe préventif, mais elle reste proche de celle observée chez les témoins. En revanche, le LOT 05, soumis à un traitement par DMH seul, révèle une diminution notable de la longueur du côlon, ce qui est attendu dans un modèle de carcinogenèse, car le DMH est connu pour provoquer une inflammation et un petit raccourcissement du côlon.

La signification biologique de ces résultats est claire : l'effet du DMH seul semble entraîner une réduction de la longueur du côlon, ce qui peut être un marqueur d'inflammation et de dommage tissulaire. En revanche, l'effet protecteur des flavonoïdes est particulièrement évident dans le groupe préventif, où la longueur du côlon est mieux préservée. Dans le groupe curatif, bien que les flavonoïdes aient été administrés après l'induction du cancer, leur effet semble moins prononcé que dans le cadre préventif, mais ils contribuent néanmoins à restaurer une longueur du côlon proche de celle des témoins.

En conclusion, ces résultats mettent en lumière que le DMH induit un petit raccourcissement du côlon, probablement lié à des processus inflammatoires ou tumoraux. Les flavonoïdes, lorsqu'ils sont administrés en prévention, semblent offrir une protection contre cet effet délétère, tandis que leur impact en traitement curatif est plus limité. Cela suggère un effet bénéfique des flavonoïdes sur l'intégrité du côlon, soulignant l'importance de leur administration préventive pour préserver la santé digestive.

3.5.2.2. Variation du nombre des A.F.C induites par le D.M.H

Cette étude a été conçue dans le but d'évaluer l'effet des flavonoïdes sur l'évolution du processus cancérigène, en particulier en ce qui concerne l'apparition d'altérations précancéreuses suite à l'injection de DMH (Diméthylhydrazine). L'accent a été mis sur la quantification des Foyers de Cryptes Abérents (ACF) dans le côlon, en utilisant la méthode établie par BIRD en 1987, qui est reconnue pour sa précision dans l'identification de ces lésions précoces.

Pour mener à bien cette analyse, nous avons utilisé un microscope optique pour observer les colons qui avaient été colorés au bleu de méthylène. Il est important de noter que cette observation a été effectuée de manière aveugle, c'est-à-dire que les échantillons étaient codés pour éviter tout biais dans l'évaluation des résultats. Cette approche garantit que les observations et les conclusions tirées sont objectives et basées uniquement sur les données obtenues.



Dans le cadre de cette étude, nous avons compté le nombre total d'ACF présents dans chaque colon, ainsi que le nombre de cryptes observées par ACF. Cette quantification nous permet d'obtenir des données précises sur l'étendue des altérations précancéreuses induites par le DMH et d'évaluer l'impact potentiel des flavonoïdes sur ce processus. Les résultats obtenus sont ensuite présentés sous forme de moyennes accompagnées de l'écart type, fournissant ainsi une vue d'ensemble claire et statistiquement significative des variations observées dans les différents groupes expérimentaux. Cette méthodologie rigoureuse assure la fiabilité des conclusions tirées de l'étude.

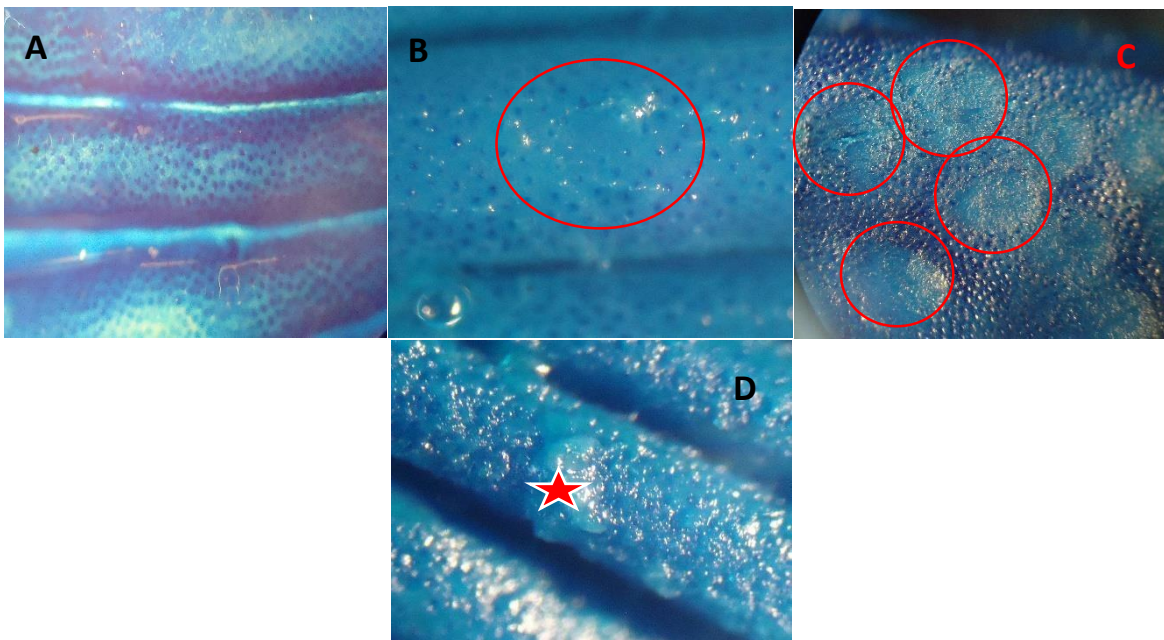


FIG. 58: Vue microscopique des colons colorés au bleu de méthylène selon Bird, des rattes traitées par le DMH. (B, C, D) montrant des foyers de cryptes aberrantes ACF (encerclés) en comparaison aux colons témoins et ceux traités par les Flavonoïdes (A) (Témoin)
En B, C : AFC multiples > 4 cryptes (encerclé) ; D : Adénocarcinome du colon du lot cancéreux (étoile).

L'interprétation de l'observation microscopique présentée dans la figure 58, qui montre des colons colorés au bleu de méthylène, révèle des différences significatives entre les groupes observés. Dans l'image A, correspondant aux témoins ou aux rats traités uniquement avec des flavonoïdes, le colon apparaît normal, affichant des cryptes bien organisées et une architecture régulière, sans aucune



apparition de cryptes aberrantes (ACF). Cela témoigne d'une muqueuse saine, suggérant un effet protecteur potentiel des flavonoïdes contre les altérations précancéreuses.

En revanche, les images B et C, représentant les échantillons traités avec DMH, mettent en évidence la présence de multiples foyers de cryptes aberrantes, caractérisées par plus de quatre cryptes encerclées. Ces structures sont des lésions précancéreuses, reconnues comme des marqueurs précoces du cancer colorectal. Les cryptes dans ces images apparaissent plus larges, plus sombres et désorganisées, confirmant une progression tumorale associée à l'effet carcinogène du DMH.

L'image D, quant à elle, illustre un stade avancé de la maladie avec la présence d'un adénocarcinome du côlon, identifié par une étoile. On y observe des structures glandulaires déformées, typiques d'un cancer colorectal avancé, soulignant les conséquences graves de l'exposition au DMH. Cette observation renforce l'idée que le DMH induit des lésions précancéreuses et des adénocarcinomes, confirmant ainsi son rôle en tant qu'agent carcinogène.

En conclusion, les résultats montrent que le DMH est responsable de l'induction de lésions précancéreuses (ACF) et d'adénocarcinomes, illustrant son effet carcinogène. L'absence d'ACF dans le groupe témoin ou chez les rats traités avec des flavonoïdes suggère un effet préventif potentiel de ces composés contre la carcinogenèse. Ainsi, les flavonoïdes pourraient inhiber l'initiation ou la progression des ACF vers le cancer, un aspect qui mérite d'être approfondi par des analyses histopathologiques et biochimiques supplémentaires pour mieux comprendre leurs mécanismes d'action.

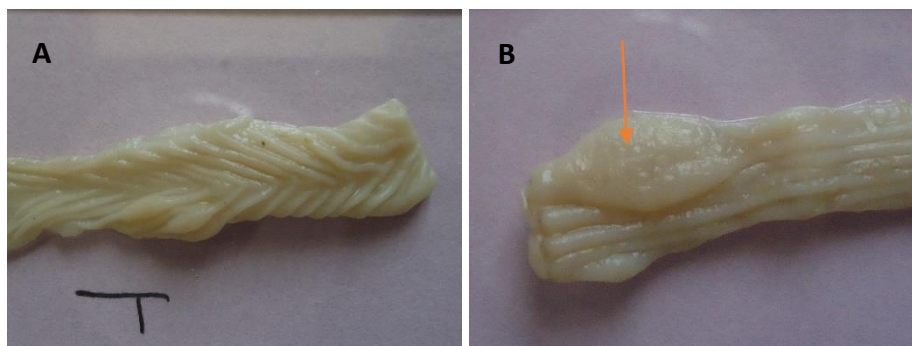


FIG. 59: Vue macroscopique des colons des rattes traitées par Le DMH (B) traitées par les flavonoïdes (A)



L'interprétation de la vue macroscopique des colons, comme illustré dans la figure 59, révèle des différences marquées entre les groupes expérimentaux. Dans l'image A, qui représente le groupe témoin traité par des flavonoïdes, le colon présente une apparence normale, avec une surface lisse et régulière. L'absence de masses visibles dans cette image suggère qu'aucune lésion tumorale n'est présente, ce qui indique un état de santé préservé du tissu colique. En revanche, l'image B, correspondant aux rats ayant reçu un traitement par DMH, met en évidence la présence d'une masse tumorale bien visible, signalée par une flèche. Cette image montre également que la structure du colon est épaissie et irrégulière, ce qui indique des altérations morphologiques significatives causées par l'exposition au DMH.

Les résultats obtenus à partir de ces observations sont révélateurs. Le DMH, un agent carcinogène robuste, induit effectivement la formation de tumeurs, confirmant son rôle dans le processus carcinogène. L'absence de lésions visibles dans l'image A suggère un effet protecteur des flavonoïdes, qui pourraient empêcher la formation tumorale. En revanche, la présence d'une tumeur dans l'image B illustre une progression vers un stade avancé de carcinogenèse, caractérisée par un épaississement des parois intestinales et une perte de l'architecture normale du colon, ce qui est typique des transformations tumorales.

En conclusion, ces résultats montrent clairement que le DMH provoque des transformations tumorales du colon, qui sont visibles macroscopiquement. De plus, les flavonoïdes semblent avoir un effet protecteur, en inhibant ou en retardant cette transformation. Toutefois, pour confirmer ces observations et approfondir la compréhension des mécanismes impliqués, une analyse histologique et biochimique est nécessaire. Cela permettrait d'éclaircir le rôle exact des flavonoïdes dans la prévention de la carcinogenèse.



TAB.24: Variation du nombre des AFC chez les rattes témoins et traitées.

Lots	LOT1	LOT2	LOT3	LOT4	LOT5
Moy.	0.00±0.00	0.00±0.00	2.33±1.12	05.67±3.21	12.67±3.21
Groupe	C	C	BC	B	A
1-5	0,000				
1-4	0,015				
1-3	0,527				
1-2	1,000				
4-5	0,006				
3-5	0,000				
3-4	0,268				

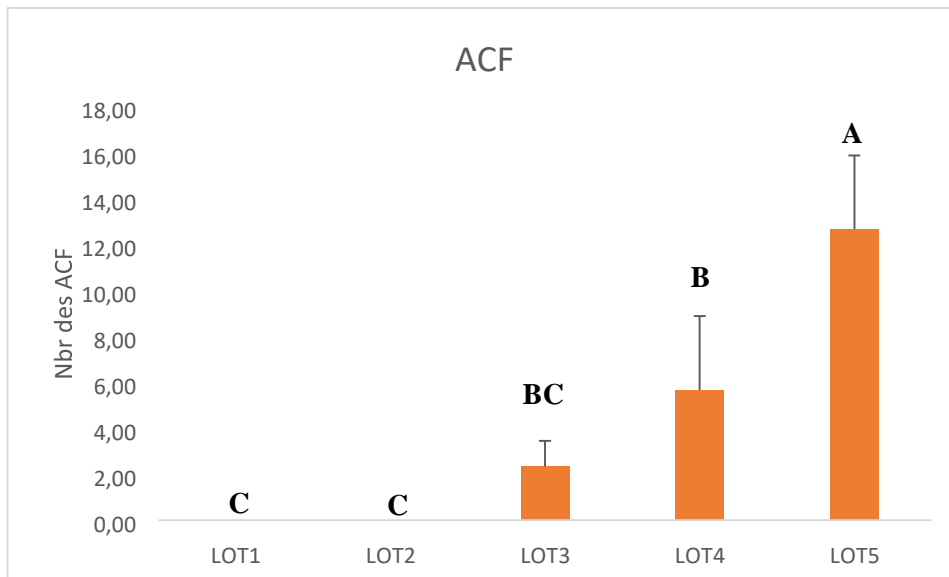


FIG. 60: Variation du nombre des AFC chez les rattes témoins et traitées.

L'interprétation de la variation du nombre de cryptes aberrantes (AFC) chez les rattes témoins et traitées, comme illustré dans le tableau 24 et la figure 60, révèle des résultats significatifs. Sur l'axe des abscisses, les différents lots expérimentaux sont présentés : le LOT 1 (Témoin), le LOT 2 (Shame, traité uniquement par les flavonoïdes), le LOT 3 (Préventif, recevant des flavonoïdes avant le DMH), le LOT 4 (Curatif, ayant reçu le DMH avant les flavonoïdes) et le LOT 5 (Cancéreux, traité uniquement avec le DMH). L'axe des ordonnées montre le nombre moyen d'AFC détectées, avec une augmentation notable du nombre d'AFC entre les groupes, atteignant un maximum dans le LOT 5, confirmant la présence de lésions précancéreuses.



Une analyse des résultats révèle que les LOT 1 et 2 affichent un nombre d'AFC presque nul, ce qui indique une absence de lésions précancéreuses, et le traitement par les flavonoïdes seuls (LOT 2) ne provoque aucune anomalie. En revanche, le LOT 3, qui a reçu des flavonoïdes avant l'exposition au DMH, présente un faible nombre d'AFC, suggérant un effet protecteur des flavonoïdes contre la carcinogenèse induite par le DMH. Le LOT 4, qui a reçu le DMH avant les flavonoïdes, montre une augmentation du nombre d'AFC par rapport au LOT 3. Cela indique que, bien que les flavonoïdes semblent atténuer les lésions déjà initiées par le DMH, leur effet curatif est moins marqué que leur effet préventif. Enfin, le LOT 5, traité uniquement avec le DMH, révèle le nombre maximal d'AFC, confirmant le potentiel carcinogène du DMH en l'absence de traitement protecteur.

En conclusion, ces résultats soulignent que le DMH induit la formation de cryptes aberrantes, des lésions précancéreuses, tandis que les flavonoïdes démontrent un effet préventif significatif en limitant la formation d'AFC. Bien que l'effet curatif des flavonoïdes soit partiel, ils contribuent néanmoins à réduire les dommages causés par le DMH. Le LOT 5 renforce l'idée du potentiel carcinogène du DMH et met en avant l'intérêt des flavonoïdes en prévention. Ces résultats suggèrent que l'administration préventive de flavonoïdes pourrait constituer une stratégie efficace pour contrer le développement du cancer du côlon.

L'effet des flavonoïdes est plus prononcé en prévention qu'en traitement curatif. Selon MIDDLETON & KANDASAMI (1993), les propriétés des flavonoïdes ont fait l'objet de nombreuses études dans le domaine médical, où ils sont reconnus pour leurs diverses activités, notamment antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques, antioxydantes et anti-cancéreuses. Ces observations s'alignent avec les résultats de MANJU & NALINI (2006), qui ont examiné l'utilisation de la luteoline comme traitement contre le cancer du côlon induit par le DMH. Dans leur étude, ils ont constaté une diminution significative du nombre de cryptes aberrantes (AFC) chez les groupes traités avec la luteoline, renforçant ainsi l'idée que les flavonoïdes peuvent jouer un rôle préventif efficace dans la lutte contre le développement de cancers, notamment celui du côlon. Ces résultats soulignent l'importance de l'administration préventive de flavonoïdes pour maximiser leurs bénéfices dans la prévention des lésions précancéreuses.



3.5.2.3. Résultats de l'étude histologique du colon

L'étude histologique est essentielle pour comprendre l'impact du traitement par le DMH (diméthylhydrazine), un agent cancérigène, et pour évaluer l'effet protecteur potentiel des flavonoïdes extraits de l'*Agave americana* L. Cette analyse permet d'observer les altérations structurales du côlon chez les rattes témoins et traitées, en comparant les différents groupes expérimentaux.

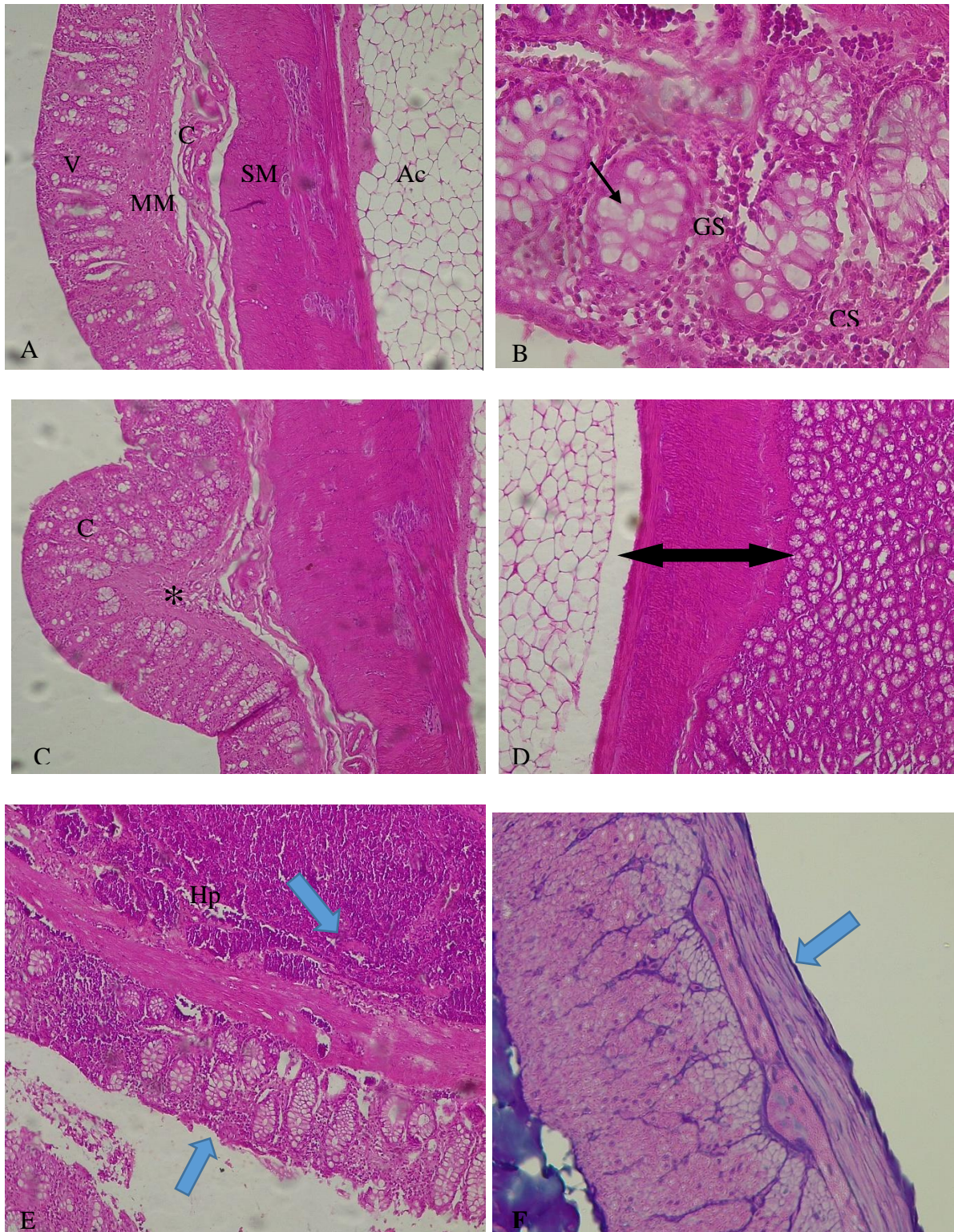


FIG. 61: Coupes longitudinales du colon des rats témoins colorés à l'HE. A : vue générale montrant les villosités (V) avec présence du chorion (Ch.) qui s'étend entre les cryptes (C) et forme l'axe central de chaque villosité. Les différentes couches, la musculaire muqueuse (MM) et la sous muqueuse (MS) (150X). B : Les glandes séreuses (GS)



et la couche séreuse (CS) avec présence des cellules caliciformes flèche noir (300X). Chez les rats cancéreux DMH C et D : apparition de plusieurs cryptes aberrants (CA) et une hyperplasie très marquée des deux couches la muqueuse et la sous muqueuse (double flèches noir) (150X). C : hyperplasie tubulaire qui est synonyme d'une lésion précancéreuse (HpT) et formation d'un axe conjonctivo-vasculaire (Asterix) (300X). E et F groupe des rats DMH traités par l'extrait de flavonoïdes montrant un rétablissement de l'hyperplasie des couches MM et SM (150X)

La figure 61 illustre plusieurs coupes histologiques colorées à l'hématoxyline-éosine (H&E), une méthode qui permet de visualiser les structures cellulaires et tissulaires du côlon.

La coupe A montre la structure normale du côlon, représentant le groupe témoin et celui traité avec des flavonoïdes. L'observation histologique révèle une organisation normale des couches tissulaires : la muqueuse affiche des cryptes intestinales bien structurées, la sous-muqueuse est exempte d'infiltrats inflammatoires ou d'anomalies cellulaires, et la musculature présente une intégrité maintenue avec une couche musculaire uniforme. Aucune dysplasie ni infiltration cellulaire anormale n'est observée, concluant ainsi que le tissu colique est sain et bien structuré.

La coupe B met en évidence des cryptes coliques et des glandes séreuses dans le même groupe témoin. Les observations montrent des cryptes coliques alignées et bien formées, ainsi que des glandes séreuses typiques, sans hypertrophie ni anomalies cellulaires. Cela indique l'absence de signes de transformation néoplasique dans ce groupe.

La coupe C illustre une hyperplasie et des altérations débutantes de la muqueuse chez les rattes traitées avec DMH. L'épaississement marqué de la muqueuse colique signale un phénomène d'hyperplasie, accompagné d'une structure désorganisée avec des cryptes légèrement déformées et irrégulières. La présence de cellules atypiques en prolifération suggère les premiers signes d'une transformation cancéreuse induite par le DMH.

La coupe D révèle une hypertrophie importante et une prolifération cellulaire dans le groupe DMH. L'épaississement marqué de la paroi colique, signalé par une flèche double, est accompagné d'une prolifération de cellules anormales, entraînant une absence de la structure typique des cryptes. Cela indique un processus tumoral en cours, caractérisé par une dysplasie sévère.

Enfin, les coupes E et F montrent des infiltrats inflammatoires et une dégradation du tissu dans un groupe DMH avancé. Un infiltrat inflammatoire massif est observé dans la muqueuse et la sous-



muqueuse, avec une désorganisation complète des cryptes coliques et une perte de la structure tissulaire normale. Il est également possible que des cellules cancéreuses envahissent les couches profondes du côlon. Cette observation conclut à une progression de la tumeur vers un stade avancé, avec invasion des tissus environnants.

En somme, ces coupes histologiques illustrent clairement l'évolution des lésions coliques, allant d'une structure saine à des altérations significatives, témoignant des effets délétères du DMH sur le tissu colique.

TAB.25: Analyse comparative histopathologique des groupes expérimentaux

Groupe	Observation histologique	Interprétation
Témoin (A & B)	Structure normale, cryptes bien organisées	Côlon sain, aucune transformation pathologique
<i>Groupe DMH – Début (C)</i>	Hyperplasie et prolifération cellulaire	Premier stade de transformation cancéreuse
<i>Groupe DMH – Avancé (D)</i>	Hypertrophie importante et dysplasie sévère	Processus tumoral confirmé
<i>Groupe DMH – Stade final (E & F)</i>	Inflammation massive et perte de structure tissulaire	Progression tumorale invasive

Le DMH (1,2-diméthylhydrazine) est un agent cancérigène bien établi, connu pour induire des lésions précancéreuses et des tumeurs du côlon. Son mécanisme d'action repose sur l'augmentation de la prolifération des cellules anormales et la provocation d'une inflammation chronique. L'évolution observée dans les coupes histologiques présente un schéma typique de progression du cancer colorectal, qui se décline en trois étapes :

1. Hyperplasie : Épaississement des tissus, signalant une augmentation anormale du nombre de cellules.
2. Dysplasie : Altérations morphologiques des cellules, indiquant des changements précoces vers une malignité.
3. Formation de tumeurs invasives : Développement de néoplasies qui envahissent les tissus environnants.



De plus, la présence d'une infiltration inflammatoire dans les tissus coliques suggère une réaction immunitaire à l'encontre des cellules cancéreuses, ce qui pourrait influencer la progression de la maladie.

Les flavonoïdes sont réputés pour leurs multiples propriétés bénéfiques, notamment leurs effets antioxydants, anti-inflammatoires et antiprolifératifs. Ils pourraient jouer un rôle crucial dans l'inhibition de la progression tumorale en agissant de plusieurs façons :

- Réduction de l'inflammation et du stress oxydatif : En diminuant les niveaux d'inflammation, les flavonoïdes peuvent contribuer à un environnement cellulaire plus sain, limitant ainsi les dommages aux tissus.
- Inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses : En freinant la multiplication des cellules anormales, ils peuvent prévenir l'avancement des lésions précancéreuses vers des stades plus avancés.
- Favorisation de l'apoptose : Les flavonoïdes peuvent induire la mort cellulaire programmée des cellules anormales, éliminant ainsi les cellules potentiellement dangereuses avant qu'elles ne deviennent malignes.

En se basant sur ces observations, nous formulons l'hypothèse que les rattes ayant reçu un traitement préventif avec des flavonoïdes pourraient présenter moins de lésions cancéreuses ou une progression tumorale plus lente par rapport aux groupes non traités. Cette hypothèse nécessite des analyses biochimiques approfondies pour valider l'efficacité des flavonoïdes en tant qu'agents protecteurs contre le cancer du côlon.

3.5.3. Résultats de l'analyse du stress oxydatif

3.5.3.1. Teneur en Glutathion colique

Le stress oxydant dans les cellules ou les tissus se réfère à renforcer la production d'espèces réactives de l'oxygène et/ou la déplétion dans le système de défense antioxydante. Les ROS générés dans les tissus sont efficacement piégés par le système enzymatique antioxydant comme la GPx et la GR, ainsi que les antioxydants non enzymatiques comme le GSH, la vitamine A, C et E (SCHLORFF et al., 1999).



Le glutathion est le plus abondant thiol de basse masse moléculaire, il agit comme un antioxydant physiologique de protection dans des systèmes biologiques (FATIMA & MAHMOOD, 2007).

De même, le GSH est un élément crucial du mécanisme de défense antioxydante, fonctionne comme un capteur de radicaux libres réactifs direct (ROMAO et al., 2006).

La diminution du taux de GSH chez les rats traités par le DMH est peut-être dû à sa consommation dans le processus de piégeage des radicaux libres produits par le DMH (BAGCHI et al., 2002).

TAB.26: Variation de la teneur en Glutathion chez les rattes témoins et traitées

Lots	LOT1	LOT2	LOT3	LOT4	LOT5
Moy.	54.38±1.82	55.89± 0.97	39.89±0.13	42.21±0.15	32.56±0.94
Groupe	A	A	B	B	C
P vs T	0.000				

Le tableau 26 présente les variations de la teneur en glutathion réduit (GSH) chez différentes rattes témoins et traitées, mettant en évidence des résultats significatifs. Les données montrent que les groupes témoins, LOT 1 ($54,38 \pm 1,82$) et LOT 2 ($55,89 \pm 0,97$), affichent des valeurs élevées et très proches, indiquant un système antioxydant fonctionnel et une condition normale. En revanche, le LOT 3, constitué de rattes traitées préventivement avec des flavonoïdes puis exposées au DMH, révèle une diminution significative de la mesure ($39,89 \pm 0,13$), suggérant que, bien que les flavonoïdes atténuent l'effet néfaste du DMH, une baisse de la teneur en GSH persiste. Le LOT 4, qui représente les rattes ayant reçu le DMH avant le traitement par flavonoïdes, montre également une réduction similaire ($42,21 \pm 0,15$), indiquant que bien que les flavonoïdes continuent d'exercer un effet protecteur, leur efficacité semble moindre en traitement curatif. Enfin, le LOT 5, composé de rattes cancéreuses ayant uniquement reçu du DMH, présente la valeur la plus basse ($32,56 \pm 0,92$), soulignant l'impact considérable du stress oxydatif induit par le carcinogène. Une analyse statistique révèle une différence très significative entre les groupes, avec une valeur p de 0,000, confirmant ainsi l'effet délétère du DMH et l'impact protecteur, bien que partiel, des flavonoïdes. Ces résultats suggèrent que le DMH entraîne une réduction significative de la teneur en GSH, tandis que les flavonoïdes contribuent à atténuer cette réduction, avec une efficacité plus marquée en prévention qu'en traitement curatif.

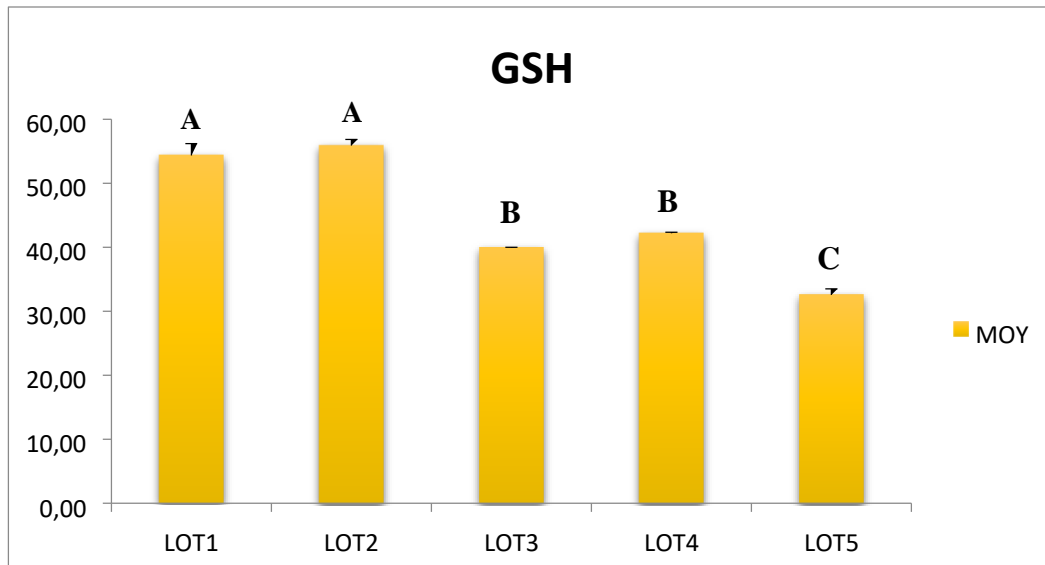


FIG. 62: Variation la teneur en GSH chez les rattes témoins et traitées.

La figure 62 illustre la variation de la teneur en glutathion réduit (GSH) chez les rattes témoins et traitées, permettant une analyse approfondie des résultats. Les lots 01 (Témoin) et 02 (Shame) affichent les valeurs les plus élevées en GSH, ce qui indique une bonne capacité antioxydante dans ces groupes, dépourvus d'exposition au DMH. En revanche, le lot 03, qui a reçu un traitement préventif avec des flavonoïdes avant l'exposition au DMH, montre une diminution de la teneur en GSH par rapport aux groupes témoins. Cette baisse pourrait être attribuée à une réponse au stress oxydatif induit par le DMH, malgré le traitement préventif. Le lot 04, où les rattes ont d'abord été exposées au DMH puis traitées avec des flavonoïdes, présente une réduction similaire ou légèrement inférieure à celle du lot préventif, suggérant que l'administration des flavonoïdes après le DMH peut partiellement atténuer l'effet oxydatif. Enfin, le lot 05, composé de rattes cancéreuses ayant reçu uniquement du DMH, affiche la plus faible teneur en GSH, indiquant une altération significative des défenses antioxydantes, favorisant ainsi le stress oxydatif et la progression tumorale. L'analyse des données confirme que la diminution du GSH dans les groupes exposés au DMH est indicative d'une augmentation du stress oxydatif, tandis que l'administration des flavonoïdes semble préserver partiellement les niveaux de GSH, particulièrement en traitement préventif. L'épuisement du GSH observé dans le lot cancéreux suggère un lien direct entre l'oxydation cellulaire et le développement tumoral. En ce qui concerne la comparaison statistique, les lots témoins montrent des niveaux de GSH optimaux, sans différence significative entre eux. Le lot préventif présente une réduction modérée de GSH, avec une différence potentiellement



significative par rapport aux témoins ($p < 0,05$), tandis que le lot curatif montre une diminution similaire, indiquant une restauration partielle du GSH, bien que son efficacité puisse être moindre que celle du traitement préventif. Finalement, le lot cancéreux révèle une diminution marquée du GSH, avec des différences très significatives attendues ($p < 0,01$ ou $p < 0,001$) par rapport aux autres groupes, soulignant l'impact maximal du stress oxydatif induit par le DMH. Cette étude met en lumière l'effet du stress oxydatif provoqué par le DMH et le potentiel rôle protecteur des flavonoïdes extraits d'Agave americana L. dans la préservation des niveaux de GSH.

3.5.3.2. Activité du Glutathion -S- Transférase colique

La glutathion S-transférase (GST) est une enzyme clé impliquée dans la détoxification cellulaire. Son rôle principal est de catalyser la conjugaison du glutathion (GSH) aux composés toxiques, facilitant leur élimination. Son activité est souvent utilisée comme marqueur de stress oxydatif et de réponse aux agents toxiques, notamment dans le cadre de la cancérogenèse induite par le diméthylhydrazine (DMH).

TAB.27: Variation de l'activité de la GST chez les rattes témoins et traitées

Lots	LOT1	LOT2	LOT3	LOT4	LOT5
Moy.	0.98±0.03	0.99± 0.02	1.03±0.00	1.09±0.01	1.28±0.04
Groupe	C	C	BC	B	A
P vs T	0.000				

L'analyse de l'activité de la glutathion S-transférase (GST) chez les rattes témoins et traitées, présentée dans le tableau 27, révèle des résultats significatifs. Les groupes témoins, LOT 1 (Témoin) et LOT 2 (Shame), affichent des valeurs proches de $0,98 \pm 0,03$ et $0,99 \pm 0,02$, respectivement, ce qui indique un métabolisme normal de la GST, sans altération due au traitement shame. En revanche, le lot 3, qui a reçu un traitement préventif avec des flavonoïdes avant l'exposition au DMH, montre une légère augmentation de l'activité de la GST ($1,03 \pm 0,00$) par rapport aux témoins, suggérant que les flavonoïdes modulent l'activité enzymatique en réponse au stress oxydatif. Le lot 4, constitué de rattes ayant été exposées au DMH avant le traitement par flavonoïdes, présente une augmentation plus marquée de l'activité de la GST ($1,09 \pm 0,01$), ce qui indique une activation de l'enzyme en réaction au stress oxydatif provoqué par le DMH. Cette observation suggère que les flavonoïdes aident à maintenir l'activité de la GST à un niveau



contrôlé. À l'opposé, le lot 5, composé de rattes cancéreuses ayant uniquement reçu du DMH, affiche la valeur la plus élevée de GST ($1,28 \pm 0,04$), témoignant d'une réponse adaptative significative au stress oxydatif induit par le carcinogène, et indiquant une tentative de détoxification par les cellules face à cette agression. L'analyse statistique révèle une différence hautement significative entre les groupes témoins et traités, avec une valeur p de 0,000, confirmant l'effet clair du DMH sur l'augmentation de la GST chez les rattes cancéreuses. En conclusion, ces résultats montrent que le DMH stimule l'activité de la GST en réponse au stress oxydatif et à la formation de métabolites toxiques, tandis que les flavonoïdes influencent cette activité, ayant un effet plus prononcé en contexte curatif qu'en préventif. L'augmentation de la GST observée chez les rattes cancéreuses souligne une réponse cellulaire face à un stress oxydatif intense.

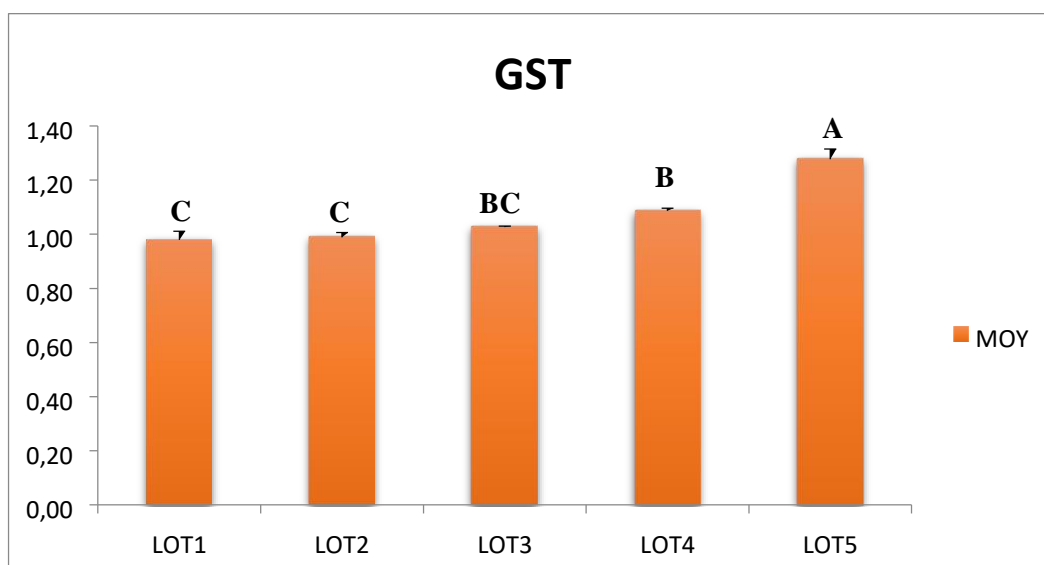


FIG. 63: Variation l'activité de la GST chez les rattes témoins et traitées.

La variation de l'activité de la glutathion S-transférase (GST) chez les rattes témoins et traitées, comme le montre la figure 63, révèle des différences significatives entre les groupes expérimentaux. Dans les groupes LOT 1 (Témoin) et LOT 2 (Shame, Flavonoïdes seuls), l'activité de la GST est stable et relativement faible, ce qui est anticipé chez des sujets non exposés à un stress chimique. En revanche, le LOT 3, qui a bénéficié d'un traitement préventif avec des flavonoïdes avant l'exposition au DMH, présente une légère augmentation de l'activité de la GST par rapport aux témoins. Cela suggère que les flavonoïdes préparent les cellules à mieux gérer le stress oxydatif induit par le DMH. Pour le LOT 4, où les rattes ont été exposées au DMH avant de



recevoir les flavonoïdes, on observe une activité de la GST encore plus élevée, indiquant que le traitement curatif aide à réguler les effets toxiques. Enfin, le LOT 5, composé de rattes cancéreuses ayant reçu uniquement du DMH, affiche une augmentation marquée de l'activité de la GST, ce qui témoigne d'un stress oxydatif significatif provoqué par la cancérogenèse induite par le DMH.

D'un point de vue physiopathologique, l'augmentation de l'activité de la GST dans les lots exposés au DMH (Lots 3, 4 et surtout 5) illustre une réponse adaptative à la toxicité du DMH. Dans le LOT 5, où l'activité de la GST est la plus élevée, cela suggère une surcharge en composés toxiques et une activation excessive des défenses antioxydantes. L'effet protecteur des flavonoïdes est également évident dans les traitements préventif et curatif, où leur présence semble moduler l'activité de la GST et atténuer la pression oxydative.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES



Conclusion et Perspectives

Les divers axes abordés dans notre étude ont mis en évidence les caractéristiques et spécificités de l'*Agave americana* var. *americana* L. Les résultats de l'enquête révèlent les multiples usages de l'Agave au sein de la population de Bône. Parmi les 100 personnes interrogées, 58 % se sont déclarées familières avec cette plante, dont les applications varient largement, allant du secteur cosmétique (44,82 %) à l'industrie. Dans le domaine médical, 25,86 % l'utilisent comme cataplasme, tandis que 6,89 % l'emploient sous forme de macération. Les maladies traitées incluent principalement le rhumatisme (18,96 %) et la chute de cheveux (12,06 %), suivies des brûlures (10,34 %) et des inflammations (8,62 %).

L'étude histologique a révélé la présence de plusieurs tissus dans la plante, notamment un épiderme, un parenchyme palissadique, un vaisseau conducteur, un cambium, un sclérenchyme et le mésophile.

Les analyses phytochimiques des feuilles ont mis en évidence plusieurs principes actifs, notamment les tanins galliques, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les saponosides, l'amidon, les cardinolides, et les terpènes et stérols.

Selon les dosages réalisés, les polyphénols sont bien représentés, avec une teneur de 530,8 mg EAG/100 g MS, tandis que les flavonoïdes constituent une fraction modérée (17,91 %) des polyphénols totaux, avec une teneur de 0,95085 mg EC/100 g MS, suggérant une grande diversité d'autres polyphénols dans cette plante.

Le rendement d'extraction de 39,6 % pour *Agave americana* var. *americana* est élevé pour ce genre botanique, confirmant le potentiel de cette plante comme source exploitable de flavonoïdes pour des applications pharmacologiques ou agroalimentaires. L'extrait de flavonoïdes se distingue par sa couleur foncée, sa viscosité apparente, et une saveur probablement amère et astringente.

L'analyse HPLC de l'extrait montre une proportion significative de flavonoïdes et de polyphénols, principalement dominés par l'acide gallique (42,77 %), la quercétine (22,18 %) et la rutine (17,42 %).

L'analyse *in Silico* a montré que les composés étudiés, à savoir l'acide gallique, la catéchine, la vanilline, la rutine et la quercétine, ont montré des profils ADME variés. En effet, tous ces composés répondent partiellement aux critères de Drug-likeness établis par LIPINSKI à l'exception de la rutine.

Les tests antioxydants soulignent l'importance de l'extrait brut en tant que source riche en composés antioxydants variés, et la variation de performance entre les tests ABTS, DPPH et FRAP souligne la nécessité d'utiliser plusieurs méthodes d'évaluation.

Les résultats du test antibactérien sont prometteurs, indiquant que les flavonoïdes d'*Agave americana* L. possèdent un potentiel antibactérien intéressant, en particulier contre les bactéries à Gram positif. L'efficacité des flavonoïdes augmente avec la dose, bien que non toujours de manière linéaire. Comparés au Cefixime, les flavonoïdes montrent une efficacité similaire, voire supérieure, sur certaines souches, ouvrant ainsi des perspectives d'utilisation comme alternatives naturelles aux antibiotiques.

L'étude *in vivo* a montré que les flavonoïdes d'*Agave americana* L. semblent avoir un effet protecteur contre la perte de poids induite par le DMH, avec un effet préventif plus marqué que l'effet curatif. Le DMH seul entraîne une perte de poids significative, confirmant son action néfaste. Cette étude met en lumière l'effet du stress oxydatif provoqué par le DMH et le potentiel rôle protecteur des flavonoïdes extraits d'*Agave americana* L. dans la préservation des niveaux de GSH. L'analyse de l'activité de la glutathion S-transférase (GST) chez les rattes témoins et traitées, suggère que les flavonoïdes aident à maintenir l'activité de la GST à un niveau contrôlé. L'analyse histologique a révélé des transformations caractéristiques du cancer colorectal, tandis que l'étude suggère que les flavonoïdes pourraient atténuer la progression tumorale.

Pour l'avenir, il serait souhaitable de :

- Tester d'autres activités biologiques des flavonoïdes d'*Agave americana* L., telles que l'activité antifongique, anti-inflammatoire et anti-tumorale *in vivo* sur différentes lignées cellulaires.
- Comparer les résultats histologiques avec des analyses biochimiques et moléculaires pour mieux comprendre l'effet des flavonoïdes sur les voies de signalisation cancéreuse.
- Examiner les marqueurs d'apoptose et de prolifération cellulaire pour confirmer l'activité antitumorale des flavonoïdes.

- Identifier les flavonoïdes extraits de l'Agave à l'aide de techniques avancées, combinées avec des techniques de spectroscopie de masse (HPLC/SM).
- Étudier d'autres parties de la plante, comme les fleurs et les racines, afin de comparer l'efficacité des différents principes actifs.
- Élargir le champ d'étude à d'autres espèces d'Agave du même genre pour explorer d'autres propriétés au sein de cette famille.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES



BIBLIOGRAPHIE

-A-

1. Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : Rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*, 74, 636–643. <https://doi.org/10.1016/j.rhum.2006.12.009>
2. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS). (1999). *Antibiothérapie par voie générale en pratique courante : Infections ORL et respiratoires basses. Rhinopharyngite aiguë.*
3. Aguirre, R. J., Chascas, S. H., & Flores, F. J. L. (2001). *El maguey mezcalero potosino* (pp. 59–61). Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología, Gobierno del Estado de San Luis Potosí.
4. Ahumada-Santos, Y. P., Montes-Avila, J., Uribe-Beltrán, M. J., Díaz-Camacho, S. P., López-Angulo, G., Vega-Avina, R., López-Valenzuela, J. A., Basilio-Heredia, J., & Delgado-Vargas, F. (2013). Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six Agave species from Sinaloa, Mexico. *Industrial Crops and Products*, 49, 143–149.
5. Akroum, S. (2011). *Étude analytique et biologique des flavonoïdes naturels* (Thèse de doctorat). Université Mentouri de Constantine.
6. Ali, S. S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., & Bora, U. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, 41(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.10.001>
7. Alilou, H., Bencharki, B., Idrissi Hassani, L. M., & Barka, N. (2014). Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus*. *Afrique SCIENCE*, 10(3), 316–328.
8. Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E. A., Hernández-Vargas, V., Ortega-Chávez, M., Orea-Lara, G., Cifuentes-Díaz de León, A., Ávila-Reyes, J. A., & Muñoz-Martínez, R. (2009). Profiling of phenolic compounds of somatic and reproductive tissues of *Agave durangensis* Gentry (Agavaceae). *American Journal of Applied Sciences*, 6, 1076–1085.

9. Almaraz-Abarca, N., Hernández-Vargas, V., Torres-Morán, I., Delgado-Alvarado, A., Orea-Lara, G., Cifuentes-Díaz de León, A., & Naranjo-Jiménez, N. (2011). *Agave durangensis*. México, D.F., México: IPN-CONACYT-COCYTED.
10. Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E. A., Ávila-Reyes, J. A., Uribe-Soto, J. N., & González-Valdez, L. S. (2013). The phenols of the genus *Agave* (Agavaceae). *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 4, 9–16. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2013.41A002>
11. Alonso Gutiérrez, M. (2005). *Valorisation de la bagasse de l'agave tequilana W. cv azul : caractérisation, étude de la digestibilité et de la fermentation des sucres* (Thèse de doctorat). Institut National Polytechnique de Toulouse.
12. Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J. A. (2004). Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551–562. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00278-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00278-4)
13. Anthoni, J. (2007). *Synthèse enzymatique, modélisation moléculaire et caractérisation d'oligomères de flavonoïdes* (Thèse de doctorat). Université de Lorraine.
14. Angiosperm Phylogeny Group II. (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141, 399–436.
15. Angiosperm Phylogeny Group III. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 105–121.
16. Angiosperm Phylogeny Group IV. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181, 1–20.
17. ARC Fondation pour la recherche sur le cancer. (2021). *Le cancer* (Collection Comprendre et Agir).
18. Ati. (2010). *Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne de Callycotome villosa*, p. 11.
19. Ávila-Reyes, J. A., Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E. A., González-Valdez, L. S., Valencia-del Toro, G., & Durán-Páramo, E. (2010). Phenol profile and antioxidant

capacity of mescal aged in oakwood barrels. *Food Research International*, 43, 296–300.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.002>

20. **Azzi, A., Ricciarelli, R., & Zingg, J. M. (2002).** Non-antioxidant molecular functions of alpha-tocopherol (vitamin E). *FEBS Letters*, 519, 8–10. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02706-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02706-0)

-B-

21. **Bagchi, D., Stohs, S. J., Downs, B. W., Bagchi, M., & Preuss, H. G. (2002).** Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology*, 180(1), 5–22.
[https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00378-5](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00378-5)
22. **Baker, H. J., Lindsey, J. R., & Weisbroth, S. H. (1980).** *The laboratory rat. Volume II: Research application.* Academic Press.
23. **Balkis, M. M., Leidish, S. D., Mukheryei, P. K., & Ghannoun, M. A. (2002).** Mechanism of fungal resistance. *Drugs*, 62, 1025–1140.
24. **Barriada-Bernal, L. G., Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E. A., Gallardo-Velázquez, T., Ávila-Reyes, J. A., Torres-Morán, M. I., González-Elizondo, M. S., & Herrera-Arrieta, Y. (2013).** Flavonoid composition and antioxidant capacity of the edible flowers of *Agave durangensis* (Agavaceae). *CyTA - Journal of Food*.
25. **Bartsch, H., & Nair, J. (2002).** Potential role of lipid peroxidation derived DNA damage in human colon carcinogenesis: studies on exocyclic base adduct as stable oxidative stress markers. *Cancer Detection and Prevention*, 26, 308–312.
26. **Bastide, N. M., Pierre, F., & Corpet, D. (2011).** Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: A meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prevention Research*, 4, 177–184.
27. **Baynes, J. W., & Thorpe, S. R. (1999).** Role of oxidative stress in diabetic complications; a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, 48, 1–9.
28. **Baxter, N. J., Lilley, T. H., Haslam, E., & Williamson, M. P. (1997).** Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry*, 36(18), 5566–5577.
29. **Belouad, A. (1998).** *Plantes médicinales d'Algérie.* Office des publications universitaires.
30. **Benson, L. (1979).** *Plant classification.* Lexington: Heath and Co.

31. Ben Hamissa, A., Seffen, M., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Perego, P., & Converti, A. (2012). Phenolics extraction from *Agave americana* (L.) leaves using high-temperature, high-pressure reactor. *Food and Bioproducts Processing*, 90(2), 17–21.
32. Bernadet, M. (2000). *La phytothérapie par les plantes*. Éditions Favre.
33. Bird, R. P. (1987). Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Letters*, 37, 147–151.
34. Bishop, J. M. (1987). The molecular genetics of cancer. *Science*, 235(4786), 305–311.
35. Blackadar, C. B. (2016). Historical review of the causes of cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 7(1), 54.
36. Bobzin, S. C., Yang, S., & Kasten, T. P. (2000). Application of liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy to the identification of natural products. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 748, 259–267. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00289-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00289-9)
37. Böhm, V., Puspitasari-Nienaber, N. L., Ferruzzi, M. G., & Schwartz, S. J. (2002). Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene, and zeaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 221–226.
38. Boulahbel, R. (1999). *Caractéristiques d'un modèle de peuplement d'oiseaux d'eau nicheurs. Cas du lac Oubeira et du marais du lac Mellah (Parc National d'El Kala Wilaya d'El Tarf)* (Mémoire de Magister). Université de Annaba.
39. Bouroubou, B. H. (2004). Approches sur la contribution des médicaments traditionnels améliorés dans les soins de santé primaires : étude des cas. *Pharmacie et Médecine Traditionnelle Africaine*, 13, 35–48.
40. Bosetti, C., Rossi, M., McLaughlin, J. K., et al. (2007). Flavonoids and the risk of renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 16, 98–101.
41. Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199–1200.
42. Blouw, S., Botha, A., & Trollip, N. (2008). *Updated Agave project plan*. Council of Scientific and Industrial Research (CSIR). Unpublished report.
43. Bown, D. (1995). *Encyclopedia of herbs and their uses*. Dorling Kindersley.

44. **Bradford, M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
45. **Brahimi, I., & Terrai, R. (2018).** Évaluation de l'activité antioxydante des deux plantes *Rosmarinus officinalis* et *Curcuma longa* (Mémoire de Master). Université des Frères Mentouri Constantine 1, Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire.
46. **Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
47. **Bruneton, J. (1993).** *Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales* (2^e éd.). Paris.
48. **Bruneton, J. (1999).** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. TEC & DOC, E.M. Inter.
49. **Bruneton, J. (2002).** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (3^e éd.). Tec & Doc.
50. **Bruneton, J. (2009).** *Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales* (4^e éd.). Paris : Éditions Tec & Doc.
51. **Burnichon, N., & Texier, A. (2003).** L'antibiogramme : la détermination de la sensibilité aux antibiotiques. *DES Bactériologie*.
52. **Byers, T., & Sedjo, R. L. (2015).** Body fatness as a cause of cancer: Epidemiologic clues to biologic mechanisms. *Endocrine-Related Cancer*, 22(3), R125–R134.

-C-

53. **Carbonnelle, B. (1988).** *Bactériologie médicale, techniques usuelles*. Paris, 330 p.
54. **Castetter, E. F., Bell, W. H., & Grove, A. R. (1938).** The early utilization and distribution of agave in the American Southwest. *University of New Mexico Bulletin, Biological Series*, 5, 10–19.
55. **Castillo, V., & Coelho, A. (2007).** Dinámicas de la cadena agave-tequila. Tendencias y adaptación a la globalización. In A. Vázquez, Y. Vargas & S. Saldívar (Comps.), *Agaves del Occidente de México* (pp. 160–182). Universidad de Guadalajara-CUCBA, CRT, CIATEJ, LSU y CONAFOR.
56. **Chai, Y. C., & Mieryl, J. J. (2023).** Glutathione and glutaredoxin—key players in cellular redox homeostasis and signaling. *Antioxidants*, 12(8), 1553.

57. Chandra, A., Rana, J., & Li, Y. (2001). Separation, identification, quantification, and method validation of anthocyanins in botanical supplement raw materials by HPLC and HPLC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3515–3521. <https://doi.org/10.1021/jf010389p>
58. Chatterjee, S. K., Bhattacharya, M., & Barlow, J. J. (1984). Murine monoclonal antibodies against galactosyltransferase from the ascites of ovarian cancer patients. *Cancer Research*, 12, 5725–5732.
59. Chebil, L. (2006). *Acylation des flavonoïdes par les lipases de Candida antarctica et de Pseudomonas cepacia : études cinétique, structurale et conformationnelle*, p. 5.
60. Chen, P. Y., Kuo, Y. C., Chen, C. H., Kuo, Y. H., & Lee, C. K. (2009). Isolation and immunomodulatory effect of homoisoflavones and flavones from *Agave sisalana* Perrine ex Engelm. *Molecules*, 14, 1789–1795.
61. Cherpelis, B. S., & Fenske, N. A. (2000). Purpuric irritant contact dermatitis induced by *Agave americana*. *Cutis*, p. 287–288.
62. Chevallier, A. (1996). *The Encyclopedia of Medicinal Plants*. Dorling Kindersley, London.
63. Cheyner, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 223S–229S.
64. Chung, Y. C., Chang, C. T., Chao, W. W., Lin, C. F., & Chou, S. T. (2002). Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2454–2458.
65. Collins, C. H., & Lyne, P. M. (1976). *Microbiological Methods* (4th ed., pp. 234–247).
66. Colunga-García Marín, P., Coello-Coello, J., Espejo-Peniche, L., & Fuente-Moreno, L. (1993). Agave studies in Yucatan, Mexico II. Nutritional values of the inflorescence peduncle and incipient domestication. *Economic Botany*, 47, 328–334.
67. Conzatti, C. (1947). *Flora taxonomica mexicana* (Vol. 2, pp. 93–118). Talleres gráficos de la Nación, México, D.F.
68. Cornara, L., La Rocca, A., Marsili, S., & Mariotti, M. G. (2009). Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 125, 16–30.
69. Corpet, D. E. (1996). Introduction aux modèles utilisés en expérimentation animale. In *Alimentation et cancer* (pp. 243–254). Paris: Tec & Doc.

70. Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A. J., & De Berghe, D. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, 61, 71–76.
71. Cotellet, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1, 569–590.
72. Cox, P. A., & Balick, M. J. (1994). The ethnobotanical approach to drug discovery. *Scientific American*, 270(6), 82–87.
73. Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press.
74. Cronquist, A. (1988). *The evolution and classification of flowering plants* (2nd ed.). New York: New York Botanical Garden.

-D-

75. Daher, C. C., Barreto, S. M. A. G., de Brito Damasceno, G. A., de Santana Oliveira, A., Leite, P. I. P., Reginaldo, F. P. S., ... & Ferrari, M. (2023). Use of sisal industrial waste (*Agave sisalana* Perrine) in sustainable and multifunctional cosmetic products. *International Journal of Cosmetic Science*, 45(6), 815–833.
76. Dahlgren, R. M. T., Clifford, H. T., & Yeo, P. F. (1985). *The Families of the Monocotyledons: Structure, Evolution, and Taxonomy*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York/Tokyo, 520 p.
77. Dalton, D. A. (1995). Antioxidant defenses of plants and fungi. In *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology* (pp. 298–355). Springer, Boston, MA.
78. Da Silva, B. P., De Sousa, A. C., Silva, G. M., Mendes, T. P., & Parente, J. P. (2002). A new bioactive steroidal saponin from *Agave attenuata*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57, 423–428.
79. Debnath, M., Pandey, M., Sharma, R., Thakur, G. S., & Lal, P. (2010). Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: a unique fiber yielding plant with medicinal property. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(3), 177–187.

- 80. De Gaulejac Saint-Cricq, Provost, N., & Vivas, N. (1999).** Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 425–431.
- 81. Defraigne, J. O., & Pincemail, J. (2008).** Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Revue Médicale de Liège*, *63*, 10–19.
- 82. De Jong, T. A., Skinner, S. A., Malcontenti-Wilson, C., Vogiagis, D., Bailey, M., & van Driel, I. R. (2000).** Inhibition of rat colon tumors by sulindac and sulindac sulfone is independent of K-ras (codon 12) mutation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *278*(2), G266–G272.
- 83. Delgado-Lemus, A., Torres, I., Blancas, J., & Casas, A. (2014).** Vulnerability and risk management of *Agave* species in the Tehuacán Valley, México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, *10*, 1–15.
- 84. Descheemaeker, K. (2004).** Nutri-et phytothérapie. Développements récents – 1. *Garant*, 41–51.
- 85. Deschner, E. E., Ruperto, J., Wong, G., & Newmark, H. L. (1991).** Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis*, *7*, 1193–1196.
- 86. Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012).** A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, *2*, 303–336.
- 87. Dibong, S. D., Mpondo, M. E., Nigoye, A., Kwin, M. F., & Betti, J. L. (2011).** Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences*, *37*, 2496–2507.
- 88. Dixon, R. A., & Pasinetti, G. M. (2010).** Flavonoids and isoflavonoids: from plant biology to agriculture and neuroscience. *Plant Physiology*, *154*(2), 453–457.
- 89. Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L. M., Badoc, A., & Gmira, N. (2003).** Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, *142*, 61–78.
- 90. Doll, R., & Peto, R. (1987).** The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Journal of the National Cancer Institute*, *66*, 1191–1308.
- 91. Dorman, H. J. D. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oil. *Journal of Applied Microbiology*, *88*, 308–316.

92. Duke, J. A., & Ayensu, E. S. (1985). *Medicinal plants of China*. Reference Publications Inc., Algonac, MI.
93. Duke, J. A. (2000). *Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
94. Duncan, A. C., Jäger, A. K., & van Staden, J. (1999). Screening of Zulu medicinal plants for angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors. *Journal of Ethnopharmacology*, 68(1–3), 63–70.
95. Dupont, F., & Guignard, J. L. (2007). *Botanique : systématique moléculaire* (14^e éd. révisée). Elsevier Masson.
96. Duraffourd, C., Lapraz, J. C., & Chemli, R. (1997). *La plante médicinale : de la tradition à la science*. Éditions J. Grancher, pp. 11–15.

-E-

97. Edenharder, R., von Petersdorff, I., & Rauscher, R. (1993). Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-b]quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. *Mutation Research*, 287, 261–274.
98. Eguiarte, L. E. (1995). Hutchinson (Agavales) vs. Hubert y Dahlgren (Asparagales) : Análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de la familia Agavaceae sensu Hutchinson dentro de las monocotiledóneas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 56, 45–56.
99. Eguiarte, L. E., Souza, V., & Silva-Montellano, A. (2000). Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Botanical Sciences*, 66, 131–150.
100. El-Hilaly, J., Hmammouchi, M., & Lyoussi, B. (2003). Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). *Journal of Ethnopharmacology*, 86(2–3), 149–158.
101. Elqaj, M., et al. (2007). La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. *Journée scientifique « ressources naturelles et antibiotiques »*, Maroc.

102. Estrada-Castillón, E., Garza-López, M., Villarreal-Quintanilla, J. A., Salinas-Rodríguez, M. M., Soto-Mata, B. E., González-Rodríguez, H., ... & Cantú-Ayala, C. (2014). Ethnobotany in Rayones, Nuevo León, México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, *10*, 1–3.

103. Evenamede, K. S., Kpegba, K., Simalou, O., Boyode, P., Agbonon, A., & Gbeassor, M. (2017). Étude comparative des activités antioxydantes d'extraits éthanoliques de feuilles, d'écorces et de racines de *Cassia sieberiana*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, *11*(6), 2924–2935.

-F-

104. Fatima, S., & Mahmood, R. (2007). Vitamin C attenuates potassium dichromate-induced nephrotoxicity and alterations in renal brush border membrane enzymes and phosphate transport in rats. *Clinica Chimica Acta*, *386*(1–2), 94–99.

105. Favier, A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité Chimique*, *(11/12)*, 108–117.

106. Feitelson, M. A., et al. (2015). Sustained proliferation in cancer: mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars in Cancer Biology*, *35*(Suppl), S25–S54.

107. Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., et al. (2020). Observatoire mondial du cancer : « Cancer Today ». Lyon : *Centre international de recherche sur le cancer*. Disponible sur : <https://gco.iarc.fr/today>

108. Fiala, E. (1975). Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer*, *36*, 2407–2412.

109. Fiala, E. S. (1977). Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane. *Cancer*, *40*, 2436–2445.

110. Fiala, E. S., Sohn, O. S., & Hamilton, S. R. (1987). Effects of chronic dietary ethanol on the in vivo and in vitro metabolism of methylazoxymethanol and methylazoxymethanol-induced DNA methylation in the rat colon and liver. *Cancer Research*, *47*, 5939–5943.

111. Forman, H. J., Zhang, H., & Rinna, A. (2009). Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, *30*(1), 1–12.

112. Frazier, D. E., Tarr, M. J., & Olsen, R. G. (1991). The in vitro and in vivo effects of 1,1-dimethylhydrazine (UDMH) on murine lymphocyte subsets and Ia antigen expression. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 13(1), 25–46.

113. Fujiki, H., Horiuchi, T., Yamashita, K., Hakii, H., Suganuma, M., Nishino, H., ... & Sugimura, T. (1986). Inhibition of tumor promotion by flavonoids. In Cody, V., Middleton, E., & Harborne, J. B. (Eds.), *Plant flavonoids in biology and medicine: Biological, pharmacological, and structure-activity relationship* (pp. 429–440). Alan R. Liss, New York.

-G-

114. Garait, B. (2006). *Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®* (Thèse de doctorat, Université Joseph-Fourier-Grenoble I).

115. García Mendoza, A., & Lott, E. J. (1994). Agave. In G. Davidse, M. Sousa Sánchez, & A. O. Chater (Eds.), *Flora Mesoamericana*, Vol. 6 (pp. 40–44). Universidad Nacional Autónoma de México & Missouri Botanical Garden.

116. García Mendoza, A., & Galván, R. V. (1995). Riquezas de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 56, 7–24.

117. García, M. D., Sáenz, M. T., Puerta, R., Quílez, A., & Fernández, M. A. (1999). Antibacterial activity of *Agave intermixta* and *Cissus sicyoides*. *Fitoterapia*, 70, 71–73.

118. García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A. J., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P. J., & Moreno-Arribas, M. V. (2008). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*, 19, 835–841.

119. Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N., & Wendoloski, J. J. (1999). A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 1(1), 55-68. <https://doi.org/10.1021/cc9800071>

120. Girgin, F., Karaoglu, O., Erkus, M., Tuzun, S., Ozutemiz, O., Dincer, C., ... & Tanyalcin, T. (2000). Effects of trimetazidine on oxidant/antioxidant status in trinitrobenzenesulfonic acid-induced chronic colitis. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 59(8), 641–652.

121. **Genillier-Foin, N., & Avenel-Audran, M. (2007).** Dermatite purpurique de contact au suc d'*Agave americana*. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 134, 477–478.
122. **Gentry, H. S. (1982).** *Agaves of Continental North America*. University of Arizona Press.
123. **Gentry, H. S. (1978).** *The Agaves of Baja California*. Occasional Papers of the California Academy of Sciences, 130.
124. **Georgetti, S. R., Casagrande, R., Di Mambro, V. M., Azzolini, A. E., & Fonseca, M. J. (2003).** Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *AAPS PharmSci*, 5(2), 111.
125. **Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P., & Fenn, W. O. (1954).** Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science*, 119(3097), 623–626.
126. **Globocan. (2008).** *Cancer Incidence and Mortality Worldwide*. IARC, International Agency for Research on Cancer.
127. **Gómez-Pompa, A., Villalobos-Pietrini, R., & Chimal, A. (1971).** Studies in the Agavaceae. I. Chromosome morphology and number of seven species. *Madroño*, 21(4), 208–221.
128. **Good-Ávila, V. S., Souza, V., Gaut, B. S., & Eguiarte, L. E. (2006).** Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(24), 9124–9129.
129. **Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949).** Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177(2), 751–766.
130. **Gras, G., & Choutet, P. (2010).** Prescription et surveillance des antibiotiques. *La Revue du Praticien*, 60, 573–579.
131. **Greenlee, R., Murray, R., Bolden, S., & Wingo, P. A. (2000).** Cancer statistics, 2000. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 50, 7–33.
132. **Guedri, K. (2010).** *Étude de l'effet de la glisodine sur les réponses de détoxification enzymatiques au cours d'un stress oxydatif cancérigène induit par l'azoxyméthane chez le rat Wistar* (Mémoire de Magistère, Université d'Annaba).
133. **Gurib-Fakim, A. (2006).** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1–93.
134. **Gutiérrez, C. M. L., Acedo, F. E., & Valenzuela, Q. A. I. (2007).** Industria del bacanora y su proceso de elaboración. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5, 394–404.

135. **Gutiérrez-Grijalva, E. P., Ambriz-Pérez, D. L., Leyva-López, N., Castillo-López, R. I., & Heredia, J. B. (2016).** Dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 66(2), 87–100.

-H-

136. **Habig, H. W., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1984).** Glutathion S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130–7139.

137. **Haenszel, W., & Kurihara, M. (1968).** Studies of Japanese migrants. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *Journal of the National Cancer Institute*, 40, 43–68.

138. **Hahn, M. W., Lunsdorf, H., Wu, Q., Schauer, M., Hofle, M. G., Boenigk, J., & Stadler, P. (2003).** Isolation of novel ultramicrobacteria classified as antibacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1442–1451.

139. **Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1990).** Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. In *Methods in Enzymology* (Vol. 186, pp. 1–85). Academic Press.

140. **Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1999).** *Free radicals in biology and medicine* (3rd ed.). Oxford University Press.

141. **Hammer, K. A. (1999).** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985–990.

142. **Hammuel, C., Yebpella, G., Shallangwa, G., Magomya, M., & Agbaji, A. S. (2011).** Phytochemical and antimicrobial screening of methanol and aqueous extracts of *Agave sisalana*. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 68(4), 535–539.

143. **Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000).** The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.

144. **Harborne, J. B. (1973).** *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Chapman and Hall, London.

145. **Harborne, J. B. (1989).** Plant phenolics. In *Methods in Plant Biochemistry* (Vol. 1, pp. 1–28). Academic Press.

146. **Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000).** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481–504.

147. **Harman, D. (1956).** Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298–300.
148. **Hatzidimitriou, E., Nenadis, N., & Tsimidou, M. Z. (2007).** Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity conditions. *Food Chemistry*, 105(4), 1504–1511.
149. **Heilerova, L., Buckova, M., Tarapcik, P., Silhar, S., & Labuda, J. (2003).** Comparison of antioxidative activity data for aqueous extracts of *Melissa officinalis L.*, *Origanum vulgare L.*, *Thymus vulgaris L.*, and *Agrimonia eupatoria L.* obtained by conventional methods and the DNA-based biosensor. *Czech Journal of Food Sciences*, 21(2), 78–84.
150. **Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572–584.
151. **Hirsch, H. A., & Gynakol, R. (1985).** Vulvovaginal candidosis: definition of the disease and its special problems and treatment in pregnancy. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(5), 5–11.

-I-

152. **IBM SPSS® Statistics. (2017).** *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0.* IBM Corp.
153. **Inouye, S., Shimokawa, N., & Okigawa, M. (1969).** [Titre de l'article non précisé]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 17, 1942–1948.
154. **Instituto Nacional Indigenista. (2009).** *Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana.* Universidad Nacional Autónoma de México. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php> (consulté le 21/09/2011).
155. **Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., et al. (1993).** Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*, 363, 558–561.
156. **Irish, M., & Irish, G. (2000).** *Agaves, yuccas, and related plants: A gardener's guide.* Timber Press, Incorporated. 384 p.
157. **Iserin, P., Masson, M., Restellini, J., et al. (2001).** *Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins* (2^e éd.). VUEF, Hong Kong. Vol. 335.

158. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69–90.
159. Jha, P., Flather, M., Lonn, E., Farkouh, M., & Yusuf, S. (1995). The antioxidant vitamins and cardiovascular disease: A critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Annals of Internal Medicine*, 123(11), 860–872.
160. Jiofack, T., Fokunang, C., Guedje, N., Kemeuze, V., Fongnzossie, E., Nkongmeneck, B. A., Mapongmetsem, P. M., & Tsabang, N. (2010). Ethnobotanical uses of medicinal plants of two ethnoecological regions of Cameroon. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2(3), 60–79.
161. Joncas, F. H. (2017). *Localisation intracellulaire des isoformes d'Akt dans la chimiorésistance des cancers gynécologiques* (Thèse de doctorat, Université du Québec à Trois-Rivières).
162. Juj, Y., Polhamus, C., Marr, K. A., Holland, S. M., & Bennett, J. E. (2002). Efficacies of fluconazole, caspofungin and amphotericin B in *Candida glabrata* infected p47-phox^{-/-} knockout mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 1240–1245.
163. Juma, B. F., & Majinda, R. R. T. (2004). Erythrinaline alkaloids from the flowers and pods of *Erythrina lysistemon* and their DPPH radical scavenging properties. *Phytochemistry*, 65, 1397–1404.
164. Junio, H. A., Cordero, A. A., Ettefagh, K. A., Burns, J. T., Micko, K. T., & Graf, T. N. (2011). Synergy-directed fractionation of botanical medicines: A case study with goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *Journal of Natural Products*, 74, 1621–1629.
165. Jürgen, R., Paul, S., Ulrike, S., & Reinhard, S. (2009). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—An overview. *Forschende Komplementärmedizin*, 16, 79–90.

166. Kadam, P. V., Yadav, K. N., Deoda, R. S., Narappanawar, N. S., Shivatare, R. S., & Patil, M. J. (2012). Pharmacognostic and phytochemical studies on roots of *Agave*

americana (Agavaceae). *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 4(3), 92–96.

167. **Kempf, S., & Zeitouni. (2009).** Coût biologique de la résistance aux antibiotiques : analyse et conséquences. *Pathologie Biologie*, article in press.
168. **Ketterer, B., & Mulder, G. J. (1990).** Glutathione conjugation. In *Conjugation reactions in drug metabolism* (pp. 307–364).
169. **Khan, M. T. J., Ahmad, K., Alvi, M. N., Amin, N. U., Mansoor, B., Saeed, M. A., Khan, F. Z., & Jamshaid, M. (2010).** Antibacterial and irritant activities of organic solvent extracts of *Agave americana* Linn., *Albizia lebbek* Benth., *Achyranthes aspera* Linn., and *Abutilon indicum* Linn.: A preliminary investigation. *Pakistan Journal of Zoology*, 42(1), 93–97.
170. **Kohen, R., & Nyska, A. (2002).** Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30, 620–650.
171. **Kooiman, P. (1969).** [No title specified]. *Acta Botanica Neerlandica*, 18, 124–137.
172. **Krishnaprabu, S. (2020).** Therapeutic potential of medicinal plants: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(2), 2228–2233.

-L-

173. **Lamaison, J. L. C., & Carnet, A. (1990).** Teneur en principaux flavonoïdes des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq. et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C) en fonction de la végétation. *Pharmaceutica Acta Helvetia*, 65, 315–320.
174. **Landolfi, R., Mower, R. L., & Steiner, M. (1984).** Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochemical Pharmacology*, 33, 1525–1530.
175. **Langeron. (1934).** *Précis de microscopie*. Paris : Masson, 32 p.
176. **Leminor, L., & Véron, M. (1998).** Bactériologie médicale. In *Flammarion Médecine Sciences*, pp. 273–294.
177. **Lin, J. K., & Weng, M. S. (2006).** Flavonoids as nutraceuticals. In E. Grotewold (Ed.), *The Science of Flavonoids* (pp. 217). Springer.
178. **Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001).** Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and

development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 3-26.
[https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)

179. **López-Romero, J. C., Ayala-Zavala, J. F., Peña-Ramos, E. A., Hernández, J., & González-Ríos, H. (2018).** Antioxidant and antimicrobial activity of *Agave angustifolia* extract on overall quality and shelf life of pork patties stored under refrigeration. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 4413–4423.
180. **Lu, S. C. (2013).** Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830, 3143–3153.

-M-

181. **Mahmoudi, Y. (1987).** *La thérapeutique par les plantes les plus communes en Algérie*. Palais des livres, Blida, 105 p.
182. **180. Manju, V., & Nalini, N. (2005).** Chemopreventive efficacy of ginger, a naturally occurring anticarcinogen during the initiation, post-initiation stages of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Clinica Chimica Acta*, 358(1–2), 60–67.
183. **Manju, V., & Nalini, N. (2006).** Protective role of luteolin in 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *Cell Biochemistry and Function*, [Online ahead of print]. <https://doi.org/10.1027/cbf.1305>
184. **Marian, B. (2004).** Colorectal cancer: modeling causes, prevention and therapy. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 1(1), 1–7.
185. **McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969).** Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049–6055.
186. **Middleton, E., & Kandaswami, J. C. (1993).** The flavonoids. In: Harborne J.B. (Ed.), *Advances in Research Since 1986* (pp. 617–652). Chapman and Hall, London.
187. **Mehta, S., Singh, R. P., & Pooja, S. (2017).** Phytochemical screening and TLC profiling of various extracts of *Reinwardtia indica*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 9, 523–527.

- 188. Melvin, R., & Suersh, C. (2002).** Islet redox stress: the manifold toxicities of insulin resistance, metabolic syndrome and amylin-derived islet amyloid in type 2 diabetes mellitus. *JOP. Journal of the Pancreas*, 3(4), 86–108.
- 189. Middleton, E., & Kandaswami, C. (1992).** Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochemical Pharmacology*, 43, 1167–1179.
- 190. Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993).** A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84(4), 407–412.
- 191. Montesano, V., Negro, D. S., De Lisi, A. G., Laghetti, G., & Hammer, K. (2012).** Notes about the uses of plants by one of the last healers in the Basilicata Region (South Italy). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 8, 15. <http://www.ethnobiomed.com/content/8/1/15>
- 192. Mouffok, S. (2011).** Étude des métabolites secondaires de *Centaurea pubescens* ssp. *omphalotricha* (Asteraceae). Mémoire de Magister, Université de Batna, pp. 125–134.
- 193. Mohammedi, Z. (2011).** Étude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de Magister, Université de Tlemcen, pp. 18–50.
- 194. Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical DPPH for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 26(2), 211–219.
- 195. Moon, J.-K., & Shibamoto, T. (2009).** Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1655–1666.

-N-

- 196. Najjaa, H., Zouari, S., Arnault, I., Auger, J., Ammar, E., & Neffati, M. (2011).** Différences et similitudes des métabolites secondaires chez deux espèces du genre *Allium*, *Allium roseum* L. et *Allium ampeloprasum* L. *Acta Botanica Gallica*, 158(1), 111–123.
- 197. Narváez-Flores, M., Sánchez-Madrigal, M. Á., Quintero-Ramos, A., Paredes-Lizárraga, M. A., González-Laredo, R. F., Ruiz-Gutiérrez, M. G., ... & Meléndez-Pizarro, C. O. (2015).** Ultrasound assisted extraction modeling of fructans from agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul) at different temperatures and ultrasound powers. *Food and Bioprocess Technology*, 96, 232–239.

198. Nauciel, C., & Vildé, J. L. (2005). *Bactériologie médicale* (2^e éd.). Masson, Paris, pp. 5–10.
199. NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1997). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. Approved Standard, NCCLS Document M27-A, Wayne, USA.
200. Neuwinger, H. D. (1996). *African ethnobotany: Poisons and drugs – chemistry, pharmacology, toxicology*. Chapman & Hall, London.
201. Newell, L. E., & Heddle, J. A. (2004). The potent colon carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. *Mutation Research*, 564, 1–7.
202. Nishino, C., Enoki, N., Tanaka, S., Mori, A., Kobayashi, K., & Fukushima, M. (1987). Antibacterial activity of flavonoids against *Staphylococcus epidermidis*, a skin bacterium. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51, 139–143.
203. Nobel, P. S., & Valenzuela, A. G. (1987). Environmental responses and productivity of the CAM plant, *Agave tequilana*. *Agricultural and Forest Meteorology*, 39, 319–334.
204. Nobel, P. S. (1994). *Remarkable agaves and cacti*. Oxford University Press.
205. Nobel, P. S., Pimienta-Barrios, E., Zañido-Hernández, J., & Ramírez-Hernández, B. (2002). Historical aspects and net CO₂ uptake for cultivated Crassulacean Acid Metabolism plants in México. *Annals of Applied Biology*, 140, 1–10.

-O-

206. Ojeda Revah, L., & Ludlow, B. (1995). Palinología de Agavaceae, una contribución biosistemática. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 56, 25–43.
207. Okombe Embeya, V. (2011). Activité antihelminthique de la poudre d'écorce de racine de *Vitex thomasi* De Wild (Verbenaceae) sur *Haemonchus contortus* chez la chèvre. *Veterinary Medicine and Animal Health*. Université de Lubumbashi, République Démocratique du Congo, p. 91.
208. Organisation mondiale de la Santé (OMS). (2003). Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle. *WHO/TRM/2000.1*, annexe II : 31–35.
209. Orestes Guerra, J., Meneses, A., Simonet, A. M., Macías, F. A., Nogueiras, C., Gómez, A., & Escario, J. A. (2008). Saponinas esteroidales de la planta *Agave brittoniana* (Agavaceae)

con actividad contra el parásito *Trichomonas vaginalis*. *Revista de Biología Tropical*, 56, 1645–1652.

- 210. Osman, A. M., Wong, K. K. Y., & Fernyhough, A. (2006).** ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346(1), 321–329.
- 211. Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001).** Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619–4626.
- 212. Ould El Hadj, M. D., Hadj-Mahammed, M., & Zabeirou, H. (2003).** Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrional est). *Courrier du Savoir*, 3, 47–51.
- 213. Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan Journal of Nutrition*, 44, 307–315.

-P-

- 214. Paris, M., & Hurabielle, M. (1981).** *Abrégé de matière médicale* (p. 339). Paris : Masson.
- 215. Parmar, V. S., Jha, H. N., Gupta, A. K., & Prasad, A. K. (1992).** Agamanona, a flavanone from *Agave americana*. *Phytochemistry*, 31(7), 2567–2568.
- 216. Pincemail, J., Degruene, F., Voussure, S., et al. (2007).** Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 21, 66–75.
- 217. Pirie, N. W., & Pinhey, K. G. (1929).** The titration curve of glutathione. *Journal of Biological Chemistry*, 184, 321–333.
- 218. Pitot, H. C. (2002).** *Fundamentals of oncology*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- 219. Poonkuzhali, B., Shaji, R. V., Salamun, D. E., George, B., Srivastava, A., & Chandy, M. (2001).** Cytochrome P4501A1 and glutathione S-transferase gene polymorphisms in patients with aplastic anemia in India. *Acta Haematologica*, 114(3), 127–132.
- 220. Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowski, B. (2009).** Évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, 4(8).

- 221. Porter, C. L. (1967).** *Taxonomy of flowering plants*. San Francisco: Freeman and Co.
- 222. Prasad, M. M., & Seenayya, G. (2000).** Effect of spices on the growth of red halophilic cocci isolated from salt-cured fish and solar salt. *Food Research International*, 33(9), 793–798.
- 223. Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.

-Q-

- 224. Queiroga de Paula, V., da Silva, O. R. R. F., da Cunha Medeiros, J., & de Oliveira Franco, C. F. (2021).** *Sisal (Agave sisalana, Perrine) : Tecnologias de plantio e utilização*. Editores Técnicos. Associação da Revista Eletrônica A Barriguda – AREPB, 217 p.

-R-

- 225. Radford, E. A., Catullo, G., & de Montmollin, B. (2011).** *Zones importantes pour les plantes en Méditerranée méridionale et orientale*. UICN, 134 p.
- 226. Rahal, K., Boulini, R., & Benslimani, A. (2005).** Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'O.M.S. 4^e éd., Algérie, pp. 46–52.
- 227. Rahman, I. (2002).** Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic targets. *Current Drug Targets – Inflammation & Allergy*, 1(3), 291–315.
- 228. Rahman, N. (2014).** Realizing the promise of cancer predisposition genes. *Nature*, 505(7483), 302–308.
- 229. Rahmani, H. (2016).** *Contribution à l'étude phytochimique et valorisation de l'espèce Agave americana L. dans l'ouest algérien* (Thèse de doctorat, Université Djilali Liabès).

230. **Ramage, G., Bachmann, S., Patterson, T. F., Wickes, R. L., & Lopez-Ribot, J. L. (2002).** Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 973–980.
231. **Rasool, A., Bhat, K. M., Sheikh, A. A., Jan, A., & Hassan, S. (2020).** Medicinal plants: Role, distribution and future. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(2), 2111–2114.
232. **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., & Pannala, A. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
233. **Reddy, B. S. (1995).** Nutritional factors and colon cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 175–190.
234. **Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996).** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933–956.
235. **Rodero, L., Cuenca-Estrella, M., Cordora, S., & Rodriguez-Tudela, J. L. (2002).** Transient fungemia caused by an amphotericin B-resistant isolate of *Candida haemulonii*. *Caries Research*, 36, 93–100.
236. **Romao, T. et al. (2006).** Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania spp.* against nitrosothiol-induced cytotoxicity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39(3), 355–363.
237. **Ross, J. A., & Kasum, C. M. (2002).** Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 19–34.
238. **Rousserie, P. (2019).** *De la biosynthèse des flavanols aux tanins du vin : quelle place pour les pépins de raisin ?* (Thèse de doctorat). École Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Bordeaux.
239. **Rossi, M., Garavello, W., Talamini, R., La Vecchia, C., Franceschi, S., Lagioui, P., ... & Negri, E. (2007).** Flavonoids and risk of squamous cell esophageal cancer. *International Journal of Cancer*, 120(7), 1560–1564.
240. **Roux, D. (2007).** *Contribution à la chimie des flavonoïdes : Accès à des analogues de pigments du vin rouge.* p. 52.

- 241. Sabu, M., & Kattan, R. (2002).** Antidiabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 155–160.
- 242. Saini, M. K., Sharma, P., Kaur, J., et al. (2009).** The cyclooxygenase-2 inhibitor etoricoxib is a potent chemopreventive agent of colon carcinogenesis in the rat model. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 28, 39–46.
- 243. Salah, N., Miller, N. J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G. P., & Rice-Evans, C. A. (1995).** Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339, 339–346.
- 244. Sánchez-Moreno, C., & Larrauri, J. A. (1998).** Principales métodos para la determinación de la oxidación lipídica. *Food Science and Technology International*, 4(6), 391–399.
- 245. Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1999).** Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International*, 32(6), 407–412.
- 246. Sánchez-Moreno, C. (2002).** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121–137.
- 247. Sandy, L. (1991).** *HPLC by open learning*. John Wiley & Sons.
- 248. Saouli, R. A. (2018).** Cartographie thématique d’Annaba (Algérie) par le biais d’outils d’aide à la décision (SIG et télédétection). *Les Annales de l’Université d’Alger I*, 32(4), 918–936.
- 249. Sarr, S. O., Fall, A. D., Gueye, R., Diop, A., Diatta, K., Diop, N., & Diop, Y. M. (2015).** Étude de l’activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (Verbenaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(3), 1263–1269.
- 250. Satô, D. (1935).** Analysis of the karyotypes in *Yucca*, *Agave* and the related genera with special reference to the phylogenetic significance. *Japanese Journal of Genetics*, 1, 272–278.
- 251. Satô, D. (1942).** Karyotype alteration and phylogeny in Liliaceae and allied families. *Japanese Journal of Botany*, 12, 57–161.
- 252. Schlorff, E. C., Husain, K., & Somani, S. M. (1999).** Dose- and time-dependent effects of ethanol on plasma antioxidant system in rat. *Alcohol*, 17(2), 97–105.

253. Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J., & Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113, 1226–1233.
254. Tanaka, T., Kojima, T., Suzui, M., & Mori, H. (1998). Chemoprevention of colon carcinogenesis by the natural product of a simple phenolic compound protocatechuic acid: Suppressing effects on tumor development and biomarkers expression of colon tumorigenesis. *Cancer Research*, 53, 3908–3913.
255. Tanaka, Y., Sasaki, N., & Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54(4), 733–749.
256. Tanwar, L., Vaish, V., & Sanyal, S. N. (2009). Chemoprevention of 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Colon Carcinogenesis by a Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug, Etoricoxib, in Rats: Inhibition of Nuclear Factor B. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 10, 241–248.
257. Tavani, A., Spertini, L., Bosetti, C., et al. (2006). Intake of specific flavonoids and risk of acute myocardial infarction in Italy. *Public Health Nutrition*, 9, 369–374.
258. Tewari, A., & Tiwari, S. (2018). Synthesis of Medicinal Agents from Plants. In *Elsevier* (pp. 47–74). Amsterdam.
259. Thiede, J., & Eggli, U. (2020). Agavaceae. In U. Eggli & R. Nyffeler (Eds.), *Monocotyledons* (2nd ed., pp. 9–20). Springer Verlag.
260. Thresiamma, K. C., George, J., & Kuttan, R. (1998). Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation-induced genotoxicity. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 17(4), 431–434.
261. Tiwari, O. N., & Rohinikumar Singh, M. (2005). Biodiversity, occurrence and succession of Cyanobacteria. *Journal of Industry and Botanical Society*, 84(1–4), 107–110.
262. Torre, L. A., et al. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87–108.
263. Toth, B., & Gannett, P. (1990). Carcinogenesis study in mice by 3-methylbutanal methylformylhydrazone of *Gyromitra esculenta*. *In Vivo*, 4, 283–288.
264. Toth, B. (1991). Carcinogenic fungal hydrazines. *In Vivo*, 5, 95–100.
265. Trease, G., & Evans, W. (1972). *Pharmacognosy* (10th ed.). London: Baillière Tindall.

266. Tshibangu, D. S. T., Ngbolua, K. N., Lengbiye, E. M., Tshilanda, D. D., Mvingu, B. M., Iteku, B. J., Mbala, B. M., Mudogo, V., & Mpiana, P. T. (2016). Chemical composition and bioactivity of *Canarium schweinfurthii* stem bark extracts from DR Congo against Sickle cell disease and associated bacteria. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5, 181–187.
267. Tsuchiya, H., & Iinuma, M. (2000). Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine*, 7, 161–165.

268. Vaghasiya, Y., & Chanda, S. V. (2007). Screening of methanol and acetone extracts of fourteen Indian medicinal plants for antimicrobial activity. *Turkish Journal of Biology*, 31, 243–248.
269. Valenzuela Zapata, A. G. (2003). *El agave tequilero: cultivo e industria de México*. Ediciones Mundi-Prensa.
270. Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40.
271. Van Acker, S. A. B. E., van den Berg, D. J., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D. H., van Bennekom, W. P., van der Vijgh, W. J. F., & Bast, A. (1996). Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 331–342.
272. Van der Kooy, F., & Sullivan, S. E. (2013). The complexity of medicinal plants: the traditional *Artemisia annua* formulation, current status and future perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(1), 1–13.
273. Vandepitte, J., Engbaek, E., Plot, P., & Heuk, C. C. (1994). *Bactériologie clinique : techniques de base pour le laboratoire*. Genève : Organisation Mondiale de la Santé, pp. 62–64.

274. **Van Leishout, E. M. M., Peters, W. H. M., & Jansen, J. B. M. J. (1996).** Effect of oltipraz, α -tocopherol, β -carotene and phenyl isothiocyanate on rat oesophageal, gastric, colonic and hepatic glutathione, glutathione S-transferase and peroxidase. *Carcinogenesis*, *17*, 1439–1445.
275. **Vargas-Ponce, O., Zizumbo-Villarreal, D., Martínez-Castillo, J., Coello-Coello, J., & Colunga-GarcíaMarín, P. (2009).** Diversity and structure of landraces of agave grown for spirits under traditional agriculture. *American Journal of Botany*, *96*, 448–457.
276. **Vaughn, M. B. Jr. (1974).** Prehistoric diet in southwestern Texas: The coprolite evidence. *American Antiquity*, *39*, 407–420.
277. **Verastegui, A., Verde, J., Garcia, S., Heredia, N., Oranday, A., & Rivas, C. (2008).** Species of *Agave* with antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria and fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*, 1249–1252.
278. **Volak, J., & Stodola, J. (1983).** *Les plantes médicinales*. Paris : Éditions Gründ.
279. **Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H.-Y., Smith, B. R., Ward, K. W., & Kopple, K. D. (2002).** Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, *45*(12), 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>
280. **Verdrager, J. (1978).** *Ces médicaments qui nous viennent des plantes : ou les plantes médicinales dans les traitements modernes*. Paris : Maloine S.A. éditeur, pp. 12–15.

-W-

281. **Walter, H. (1977).** *Zonas de Vegetacion y Clima*. Ed. Omega, Espagne.
282. **Wattenberg, L. W. (1985).** Chemoprevention of cancer. *Cancer Research*, *45*, 1–7.
283. **Weichselbaum, T. E. (1946).** An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *American Journal of Clinical Pathology*, *16*, 40.
284. **Weckbecker, G., & Cory, J. G. (1988).** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathion-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Letters*, *40*, 257–264.
285. **Wen, C., Ma, H., & Luo, X. (2018).** Advances in ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from cash crops—A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *48*, 538–549.

286. Willet, W. C., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Rosner, B. A., & Speizer, F. E. (1990). Relation of meat, fat and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *New England Journal of Medicine*, 323, 1664–1669.
287. Williamson, J. R., & Kilo, C. (1989). Glucotoxicity and diabetic vascular disease. *Medical Dialogue on Diabetes*, 8, 8–10.
288. Witsch, E., Sela, M., & Yarden, Y. (2010). Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology*, 25(2), 85–101.
289. Wynder, E. L. (1975). The epidemiology of large bowel cancer. *Cancer Research*, 35, 3388–3394.

-Y-

290. Yamamoto, S. (2000). Cancer statistics digest. All cancer mortality of prefectures in Japan. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 30, 168.
291. Yildiz, D., & Kuman, C. I. (2004). Recovery of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene detoxification by N-acetyl-L-cysteine in glutathione predepleted human erythrocytes. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 34, 233–238.
292. Yi-Zhong, C., Sun, M., Xing, J., Luo, Q., & Corke, H. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78(25), 2872–2888.
293. Yokosuka, A., & Mimaki, Y. (2009). Steroidal saponins from the whole plants of *Agave utahensis* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry*, 70(6), 807–815.

-Z-

294. Zane, L., Shanna, V., & Misteli, T. (2014). Common features of chromatin in aging and cancer: cause or coincidence? *Trends in Cell Biology*, 24(11), 686–694.
295. Zizumbo-Villareal, D., & Colunga-García Marín, P. (2008). Early coconut distillation and the origins of mezcal and tequila spirits in west-central Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55, 493–510.

WEBOGRAPHIE

<https://tox.charite.de/protox3/>

www.gooleearth.com *Version 7.1.7.2600*

<http://www.swissadme.ch>

www.tela-botanica.org

ANNEXES



Annexe 01 : Fiche de l'Enquête Ethnobotanique

l'Agave americana L. var. americana.

A propos de vous :

Sexe : Homme
 Femme

Âge :

< 20 ans 40-49 ans
 20-29 ans 50-59 ans
 30-39 ans 60 et +

Etat de connaissance de la plante :

Connaissez- vous l'agave : Oui
 Non

Comment appelez-vous l'Agave : (Autres noms vernaculaires) :

.....
.....
.....
.....

(Dans le cas où vous connaissez l'Agave).

Domaines d'utilisation de l'Agave :

Thérapeutique Cosmétique Ornementale Industriel Autres

Sous quelle forme utilisez-vous l'Agave en thérapeutique :

Tisane Décoction Macération Teinture Cataplasme Autres

(Dans le cas où vous avez déjà utilisé l'Agave en thérapeutique).

Parties utilisées de l'Agave :

Plante entière Feuilles Fleurs Racine Suc Autres

Maladies traitées par l'Agave :

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

.....
.....

Comment vous jugez l'efficacité de l'Agave :

Nulle

Insuffisante

Moyenne

Bonne

Excellente

Merci de votre collaboration

Annexe 02 : Préparation des solutions colorantes de la technique histologique Vert de Méthyle et Rouge Congo

A. Solution de vert de méthyle (1 %)

Utilisée pour colorer les parois secondaires (xylème, fibres...)

Formule :

- Vert de méthyle : **1 g**
- Éthanol 50 % : **100 mL**

Préparation :

1. Dissoudre 1 g de vert de méthyle dans un peu d'éthanol.
2. Compléter jusqu'à 100 mL avec de l'éthanol 50 %.
3. Filtrer si nécessaire.
4. Conserver à l'abri de la lumière dans une bouteille ambrée.

B. Solution de rouge Congo (0,5 à 1 %)

Utilisée pour colorer le cytoplasme ou les tissus non lignifiés.

Formule :

- Rouge Congo : **0,5 g à 1 g**
- Eau distillée : **100 mL**

Préparation :

1. Dissoudre le rouge Congo dans de l'eau distillée.
2. Filtrer si besoin.
3. Conserver également dans une bouteille ambrée.

Annexe 03 : Préparation des réactifs pour le screening chimique

Préparation des extraits végétaux

A. Infusé à 10 %

Utilisé pour extraire les composés solubles dans l'eau par infusion (tanins, flavonoïdes, saponines...)

Formule :

- **10 g** de poudre végétale sèche
- **100 mL** d'eau distillée bouillante

Procédure :

1. Peser **10 g** de poudre sèche de plante.
2. Verser **100 mL** d'eau bouillante sur la poudre dans un bécher.
3. Couvrir et laisser **infuser 15 à 30 min.**
4. Filtrer à chaud.
5. Conserver l'infusé dans un flacon propre, au frais si nécessaire.

À utiliser dans les 24 heures pour éviter les fermentations.

B. Décoction à 10 %

Meilleure pour les écorces, racines ou feuilles coriaces.

Formule :

- **10 g** de poudre ou fragments de plante
- **100 mL** d'eau distillée

Procédure :

1. Introduire **10 g** de plante dans **100 mL** d'eau distillée froide.
2. Chauffer à ébullition pendant **15 à 20 minutes.**
3. Laisser tiédir, puis filtrer.
4. Utiliser directement ou conserver temporairement à 4 °C.

2. Réactifs pour le criblage phytochimique

A. Réactif de Stiasny

Composition :

- **Formaldéhyde (37 %) :** 1 volume
- **Chlorure d'hydrogène concentré :** 1 volume

Préparation :

1. Mélanger **1 volume** de formol 37 % avec **1 volume** d'**acide chlorhydrique concentré**.
2. Conserver dans un flacon en verre ambré, bien bouché.

B. Alcool chlorhydrique

Composition :

- **Éthanol 70 % :** 95 mL
- **Acide chlorhydrique concentré :** 5 mL

Préparation :

1. Ajouter **5 mL d'HCl concentré** à **95 mL d'éthanol 70 %** (toujours ajouter l'acide à l'alcool, pas l'inverse).
2. Mélanger doucement.
3. Conserver dans un flacon bien fermé.

Annexe 04 : Préparation des solutions pour le stress oxydatif

1. AFC

Préparation du Bleu de méthylène à 00,5%

Composition :

- **Bleu de méthylène (poudre) : 0,05 g**
- **Eau distillée : 100 mL**

Préparation :

1. Peser **0,05 g** de bleu de méthylène.
2. Le dissoudre dans environ 20 mL d'**eau distillée** dans un bécher.
3. Compléter à **100 mL**.
4. Bien mélanger jusqu'à dissolution complète.
5. Filtrer si nécessaire.
6. Conserver dans un flacon **ambré, hermétique, à température ambiante**.

2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

- **BSA (1 mg/ml)** : Dissoudre **5 mg** BSA dans 5 ml d'eau distillée.
- **Réactif de Bradford** : Dissoudre **100 mg** de bleu de Coomassie (G 250) dans **50 ml** d'éthanol (**95%**). Agiter par l'agitateur pendant **2 heures**, puis ajouter **100 ml** d'acide orthophosphorique (**85%**) et **850 ml** d'eau distillée (pour obtenir **1 L** de solution). Ce réactif doit être filtré puis conserver pendant 1 mois au maximum à une température de **4°C** et à l'abri de la lumière.

2. Dosage du glutathion

- **Tris (0,4 M), EDTA (0,02 M) et pH 9,6** : Dissoudre **12,114 g** Tris et **1,871 g** EDTA dans **250 ml** d'eau distillée et ajuster le **pH à 9,6**.
- **EDTA (0,02 M)** : Dissoudre **5,613 g** EDTA dans **750 ml** d'eau distillée.
- **DTNB (0,01 M)** : Dissoudre **200 mg** DTNB dans **50 ml** de méthanol absolu.

- **L'acide salicylique (0,25%)** : Dissoudre **250 mg** d'acide salicylique dans **100 ml** d'eau distillée.

3. Dosage de l'activité enzymatique de la Glutathion-S-Transférase (GST)

- **CDNB (0,02 M)** : Dissoudre **202,55 mg** CDNB dans **50 ml** d'éthanol absolu.
- **Solution GSH (0,1 M)** : Dissoudre **153,65 mg** GSH dans **50 ml** d'eau distillée.