

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمّار تليدي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT
كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم علوم المادة
DEPARTEMENT Sciences de la Matière



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Matière

Filière : Chimie

Option : Chimie organique appliqué

Présentée Par :

Mlle MESSAOUDI Sarah

THEME

Etude in vitro de l'activité antioxydante des extraits de *Cistus creticus* et leurs effets sur l'inhibition de la cristallisation oxalocalcique

Soutenu publiquement le 24/06/2023 devant le jury composé de :

Mme. Chahrazed HAMIA	MCA	Présidente	UATL-LAGHOUAT
Mme. Zineb HADBAOUI	MCB	Examinatrice	UATL-LAGHOUAT
Mr. Bakhti KORIBA	MAA	Examineur	UATL-LAGHOUAT
Mme. Yasmina AMI	MAA	Promotrice	UATL-LAGHOUAT
Mr. Mohammed YOUSFI	Pr	Co-promoteur	UATL-LAGHOUAT

Année Universitaire 2022-2023



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail A ma maman qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études.

Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A mon père Grâce à toi j'ai appris le sens du travail et de responsabilité, tu as toujours été pour moi un exemple de père respectueux, je tiens à honorer L'homme que tu es.

A mes frères pour leurs encouragements, A mes proches amis

Wissal, Fatiha et Nour.

A toute la famille Messaoudi et Ghris, Mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité. A Dr. Meridja Dr.

Nacira, Dr. Ibtissam, Dr. Fatima et Dr. Nahla, Dr. Souad qui m'ont toujours encouragé, et soutenu

A tous ceux que j'aime

Sarah Mess

Remerciements

Je tiens à exprimer mes remerciements à Mme AMI Yasmina, mon encadreur pour sa contribution, ses encouragements et son soutien tout au long de la préparation de ce travail.

Mes remerciements vont à Mr. YOUSFI Mohamed, mon Co-encadreur, pour son aide, conseils et orientations, sa gentillesse qui m'ont permis de mener à bien ce projet de fin d'étude.

Je remercie Mme Ch. HAMIA de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de mon mémoire de Master. De même, J'adresse mes remerciements à Mme Z. HADBAOUI, et Mr B. KORIBA, d'avoir accepté d'examiner ce projet de fin d'étude et de participer au jury de soutenance.

Je remercie également Mr Med. HARRAT et tout le staff de Laboratoire de Recherches de Science Fondamentale de l'Université de Laghouat, ainsi que tout le personnel qui ont assuré le bon déroulement de la partie expérimentale de ce travail par la mise en disposition des matériaux et appareillage nécessaires.

Mes remerciements s'adressent finalement à mes professeurs, la secrétaire Halima et Mme Nadia, mes collègues au département et à toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'achèvement de ce mémoire de Master.

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire de recherche « Sciences Fondamentales », à l'Université Amar Telidji, Laghouat.

Liste des figures

Figure 1: Calculs rénaux.....	2
Figure 2: Différentes formes de calcul.	3
Figure 3: Photo des différentes parties du <i>Cistus creticus</i>	5
Figure 4: Feuilles, Graines et fleurs séchés de <i>Cistus creticus</i>	7
Figure 5: Etapes d'extraction des extraits haxaniques/méthanoliques.....	8
Figure 6: Diagramme de la quantification des composés phénoliques totaux.	10
Figure 7: Etapes de dosage des flavonoïdes.	10
Figure 8: Protocole expérimental du dosage des tanins.	11
Figure 9: Structure de DPPH et sa réduction par l'antioxydant A-H.....	12
Figure 10: Protocole du test DPPH.	12
Figure 11: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	17
Figure 12: Courbe d'étalonnage de la quercétine.	17
Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la catchénine.	18
Figure 14: Courbe d'étalonnage de la vitamine C.	20
Figure 15: Courbe cinétique de différentes concentrations d'extrait.....	23
Figure 16: Courbe cinétique de comparaison entre les inhibiteurs.	26

Liste des tableaux

Tableau 1: Types des calculs.....	2
Tableau 2: Produits chimiques et les appareils utilisés.....	6
Tableau 3: Rendement et concentration des extraits bruts dans l'hexane, méthanol et l'eau.	15
Tableau 4: Rendements et concentrations dans MeOH/H ₂ O (8/2) et Ac/H ₂ O (7/3).....	16
Tableau 5: Teneurs en CPT, Flv et Tan dans tous les solvants utilisées sauf l'hexane.	19
Tableau 6: Valeurs des VCEAC dans l'hexane, MeOH et l'eau.	20
Tableau 7 : Valeurs de VCEAC dans les extraits hydrométhaniques et hydroacétonique	21
Tableau 8: Pouvoirs de la cristallisation oxalocalcique des extraits aqueux et méthanoliques. ..	24
Tableau 9: Pouvoir de la cristallisation oxalocalcique de la fraction AE dans les deux systèmes de solvants.	24
Tableau 10: Pouvoir de la cristallisation oxalocalcique de la fraction Hex dans les deux systèmes de solvants.....	25

Liste des abréviations

A_c: Absorbance du contrôle (sans Inhibiteur) mesuré pour chaque série.

A_{ex} : Absorbance de la solution Inhibitrice (extrait).

CPT : Composés Phénoliques Totaux.

DPPH : 2-2, diphényl-1-picrylhydrazyl.

EAG : Equivalent en Acide Gallique.

EC: Equivalent en catéchine.

EQ: Equivalent en quercétine.

f1: Fleurs de *Cistus creticus* récoltées le 30 Avril 2022.

F4: Feuilles de *Cistus creticus* récoltées le 15 Avril 2022.

Flv : Flavonoïdes.

G1: Graines de *Cistus creticus* récoltées le 30 Avril 2022.

G3: Graines de *Cistus creticus* récoltées le 15 Mars 2022.

G4: Graines de *Cistus creticus* récoltées le 15 Avril 2022.

Me: Masse de l'extrait brut.

Mv: Masse de la matière végétale.

PI%: Pourcentage d'inhibition.

R%: Rendement de l'extraction.

ROS : Espèces chimiques oxygénée réactives.

Tan : Tanins.

VCEAC: Capacité antiradicalaire équivalente en vitamine C.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

I. Introduction générale	1
II. Matériels et méthodes	5
II.1. Matériel végétal	5
II.1.2. Produits chimiques	6
II.2. Méthodes expérimentales	7
II.2.1. Echantillonnage	7
II.3. Préparation des extraits.....	7
II.3.1. Extraits hexaniques / méthanoliques	7
II.3.2. Extraits aqueux	8
II.3.3. Extraits MeOH/H ₂ O et Ac/H ₂ O	8
II.4. Détermination des rendements d'extraction	9
II.5. Dosages des composés phénoliques totaux (méthodes spectrophotométrique)	9
II.5.1. Dosage des polyphénols	9
II.5.2. Dosage des flavonoïdes	10
II.5.3. Dosage des tanins condensés	10
II.6. Evaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH	11
II.7. Evaluation de l'activité anti-urolithiasique.....	13
II.7.1. Principe de la cristallisation de l'oxalate de calcium	13
II.7.2. Test d'inhibition sur la cristallisation	13
III. Résultats et discussion	15
III.1. Etude phytochimique.....	15
III.1.1. Rendement de l'extraction	15
III.2. Dosage des composés phénoliques totaux	16
III.3. Evaluation de l'activité antiradicalaire.....	19

III.4. Evaluation de l'activité d'inhibition de la cristallisation oxalocalcique	22
IV. Conclusion générale.....	27
Références bibliographiques.....	29

Introduction générale

I. Introduction générale

Depuis des millénaires, les plantes représentent une source précieuse d'agents chimiques et thérapeutiques, qui rentrent aujourd'hui dans la fabrication de nombreux médicaments modernes, grâce aux substances bioactives que contiennent ces plantes telles que les antioxydants phénoliques. Ces substances dites métabolites secondaires de plantes proviennent de dérivées des voies métaboliques primaires qui constituent un groupe biochimique diversifié de molécules produites par la cellule végétale, jouant le rôle de défense et protection entre les espèces contre différents microorganismes, suivant leurs types et leurs concentrations en ces composés qui dépendent d'un certain nombre de facteurs comme le stade de maturation, le sol, les conditions climatiques. En outre, chaque variété de plante présente une composition différente en composés phénoliques (Tlili, ML et al. 2020).

En effet, les polyphénols végétaux sont les plus abondants dans le règne végétal, possédant de puissantes propriétés antioxydantes contre diverses maladies associées au stress oxydatif comme le cancer (Weiguang et al., 2005), les maladies cardiovasculaires (Stoclet et al., 2004, Scalbert & Williamson, 2000, Leifert & Abeywardena, 2008), et le lithiase urinaire (R. Laoufi et al., 2020) ...etc.

Les calculs urinaires ou lithiase urinaire se forment lorsque certaines substances présentes dans l'urine se cristallisent en résultant des calcifications parfois pathologiques, définies comme étant tout type de dépôts minéraux anormaux, calciques ou non classique, dans un tissu, un organe ou sur un dispositif médical. La lithiase urinaire dite également « pierres aux reins » engendrée par un agglomérat, peut être ordonné ou désordonné, de particules cristallines ou amorphes, précipitées dans les urines et qui peuvent varier en taille (de très petit au plus gros). Ces concrétions se développent dans le bassinet et/ou les calices rénaux et provoquant de ce fait une obstruction partielle ou totale à l'écoulement normal de l'urine par conséquent l'immobilisation et le dysfonctionnement rénal pour certains cas (voir figure 1). C'est pour cela qu'elle présente un problème majeur de santé publique dans le monde, connue depuis très longtemps.

En fait, il s'agit d'une maladie multifactorielle et complexe provenant d'une combinaison de plusieurs facteurs dont le principal est la sursaturation de certains composés dans l'urine tels que le calcium, l'oxalate, l'acide urique ou le phosphate. Un déséquilibre alimentaire, la génétique, le sexe, le groupe ethnique, les aspects climatiques et les perturbations métaboliques peuvent aussi augmenter le risque de la lithiase (DIABY S, 2023).

L'oxalate de calcium est de l'un des principaux composants des calculs urinaires retrouvés dans plus de 63% des cas (El Habbani R et al., 2023) : C'est le sel formé par la réaction entre l'acide oxalique présent dans certains aliments de nature organique avec le calcium présent dans l'urine

en provoquant ainsi à forte concentration une cristallisation en calculs rénaux. Généralement, chez les personnes saines, le processus de cette cristallisation dans l'urine est régulé par desinhibiteurs naturels contribuant à la prévention de la formation de cristaux solides.

La figure (1) suivante montre la cristallisation des calculs rénaux.

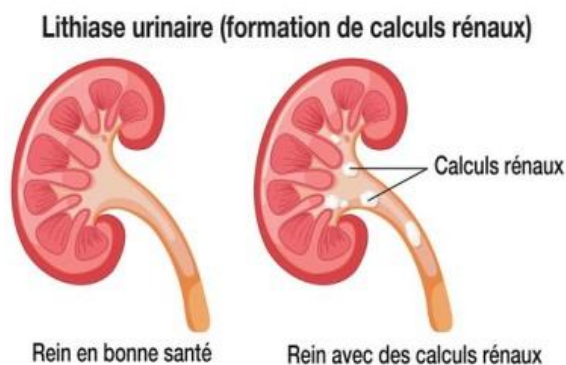


Figure 1: Calculs rénaux. (S.Parienté 2013)

Les lithiases sont distinguées par calciques et non calciques où les calciques sont, en effet, la forme la plus courante de calculs rénaux, représentant environ 80 à 90%.

Les types de calcul se catégorisent en lithiases calciques et non calciques :(**Tableau 1**)

Tableau 1:Types des calculs (Diaby S, 2023).

Calculs calciques	Calculs non calciques
Composés d'oxalate de calcium (76%)	Acide urique (7%)
Phosphate de calcium (12%)	Struvite (phosphoammoniac-magnésien) (2%)
Hydroxyapatite	Ou de composés rares comme la cystine (2%), la xanthine, certains médicaments (1%) etc.

L'image montre la forme de différents types calculs urinaire.



Figure 2: Différentes formes de calcul.

Hyperoxalurie est une forme de lithiase calcique, responsable d'environ de 20 à 30% des cas, caractérisée par une forte concentration d'oxalate dans l'urine, cela peut inclure une formation de calcul d'oxalate de calcium en se combinant avec le calcium pour former des cristaux d'oxalate de calcium. **(Diaby S, 2023); (M. Courbebaisse 2017).**

En outre, les traitements des lithiases urinaires prescrits dans certains médicaments en fonction de leur composition chimique, de type des calculs urinaires et de la cause sous jacente, certains d'eux pour alcaliniser l'urine d'une part, et réduire la production d'oxalate ou de calcium, de l'autre favoriser la dissolution des calculs dans le monde notamment en Algérie. Certains patients, en revanche, ont une préférence avoir recours à la phytothérapie à base de plantes (75% de la population globale des pays en développement) vu leurs insatisfactions de traitements en raison de leurs excessifs coût ou par rapport aux effets secondaires **(Chagnon A. 2007).**

De ce fait, nous avons opté dans cette étude l'exploration des vertus de plantes notamment la *Cistus creticus* sur l'activité antilithiasique urinaire à travers son efficacité d'inhibition sur la cristallisation d'oxalate de calcium. Cette dernière en effet, présente un intérêt particulier sur le plan théorique qui est l'étude chimique basé sur la compréhension des mécanismes de cette formation ainsi les facteurs influençant leur croissance. Et d'un point de vue biologique, sachant que la présence d'oxalate de calcium dans les calculs urinaires est importante car elle est associée à certaines conditions médicales ou même à certaines maladies.

Des travaux ont permis de relever l'utilisation traditionnelle de tisanes (décoction ou infusion) de certaines plantes dans les lithiases urinaires telle que *Paronychia argentea L*, *Hordeum vulgare L* et *Petrselinm sativum L* dans le Nord Est Algérien **(Mechri R et al., 2023)**, *Herniaria hirsute. L* dans la ville d'oran en Algérie **(W. KhItri et al. 2016)**. Par conséquent, en l'absence de travaux et d'études scientifiques approfondies sur le potentiel médicinal et l'effet réel de *Cistus creticus* dans le traitement naturel de la lithiase urinaire, notamment dans la prévention des calculs d'oxalate de

calcium, nous nous sommes intéressées à déterminer l'effet du pouvoir inhibiteur des extraits de cette plante récoltés dans la région de Laghouat sur la cristallisation urinaire oxalocalcique. Par contre, la cistus fait partie de la classe des plantes médicinales ayant d'autres effets bénéfiques à savoir analgésique, antimicrobien, antitumoral, antiviral, anti-inflammatoire, antifongique, gastroprotecteur et antioxydant (Loizzo, Jemia et al. 2013).

La *Cistus creticus* ou ciste de créte (القاصة), est une espèce spécifique de ciste appartenant à la famille Cistaceae comprenant environ 180 espèces d'herbes, d'arbustes et de sous arbrisseaux repartis dans huit genres différents à savoir *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum*, *Tuberaria*, *Crocianthemum*, *Hudsonia* et *Lechea* et le *Cistus creticus*. L (figure 3). Ce dernier est le plus connu et comprend de nombreuses espèces comprise entre 16 et 28 espèces distinctes. (Guzmán et al., 2005)

Notre étude est présentée en deux principaux axes :

- En premier lieu, l'étude phytochimique a été principalement basée sur la préparation des extraits hydroalcooliques et aqueux, y compris des solvants de différentes polarités. Cette étude visait à quantifier les composés phénoliques présents dans les parties aériennes de *Cistus creticus* séparément.
- En deuxième lieu, une évaluation du pouvoir antioxydant des extraits préparés par le screening DPPH. De plus, une partie a été consacrée à l'évaluation de l'activité d'inhibition de la cristallisation de l'oxalate de calcium *in vitro* de notre plante. La recherche bibliographique révèle qu'aucun travail scientifique n'a été réalisé dans le monde, en particulier en Algérie sur l'activité antilithiasique de la *Cistus creticus*, donc une partie de ce travail a été consacrée à l'étude de l'activité anti-urolithiasique de nos extraits d'où le but de combler cette lacune scientifique.

Matériels et méthodes

II. Matériels et méthodes

II.1. Matériel végétal

La plante étudiée dans ce travail est la *Cistus creticus* (feuille, graines, fleur) récoltée par le professeur YOUSFI Mohamed. La plante est séchée à l'abri de la lumière solaire. Le site de la récolte se situe dans la région d'Oued Morra au niveau d'EL Gaada caractérisée par les coordonnées suivantes : **Latitude** : 34° 09' 60.00" N et **Longitude** : 2° 18' 60.00" E.

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire de recherche « Sciences Fondamentales », à l'Université Amar Telidji, Laghouat.

- **Description botanique du genre *Cistus***

Les arbrisseaux peuvent aller de 30 cm jusqu'à 1 m de hauteur avec des racines généralement superficielles et peu développées. Les feuilles sont disposées de manière opposée sur les tiges, entières, oblongues à lancéolées, mesurant jusqu'à 10 cm de long. Elles ont souvent un bord ondulé avec une texture collante, de couleur variante du vert foncé au gris-vert selon les espèces. Les fleurs, blanches ou roses, ayant une forme en coupe comportent 5 pétales chiffonnées qui ressemblent au papier crépon.

La figure suivante illustre les photos des différentes parties de la *Cistus creticus*. L:



Figure 3: Photo des différentes parties du *Cistus creticus*.

Les plantes de la famille Cistaceae, notamment du genre *Cistus*, sont des petits arbustes qui poussent à l'état sauvage en Méditerranée occidentale (Portugal, Espagne, Sud de la France, Italie, Algérie, Maroc), en Europe, en Amérique du Nord ainsi que dans les zones tempérées. (**Hutchinson 1926**). Par ailleurs, la famille Cistaceae est considérée comme l'une des plus difficiles à étudier du point de vue botanique. Sa répartition en Algérie, s'étend partout sur le tell et le littoral, dans les forêts, broussailles, terrains siliceux, rocaillieux et calcaires (**Beniston 1984**),

Son habitat naturel est constitué de pentes et de collines pierreuses. On les aperçoit également dans les pinèdes.

II.1.2. Produits chimiques

Tous les produits utilisés dans ce travail sont d'un grade analytique élevé (**Tableau 2**).

Tableau 2: Produits chimiques et les appareils utilisés.

Produits	Firme
Carbonate de sodium Na_2CO_3 , Acide gallique $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl DPPH Vanilline, Quercétine, Acide Chlorhydrique HCl, citrate de sodium déhydrate $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Catéchine.	Sigma- Aldrich (France).
Acétate d'éthyle, Sulfate de sodium anhydre Na_2SO_3 .	Riedel-de Haen (Allemagne).
Hexane, Méthanol, Acétone, chlorure de calcium dihydrate $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (40mM), Chlorure de sodium NaCl (0,15M), Trichlorure d'aluminium AlCl_3 , Acide ascorbique.	VWR-PROLABO (France).
Oxalate de sodium $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (4 mM).	BDH (France).
Folin –Ciocalteu.	Fluka-Analytical.
Succinimide parbiol 3g.	
Appareillage : (UV/Visible (Shimadzu 1800), (UV/Visible (Shimadzu 1601), Cuvette UV/Visible en plastique, Rotavapeur (Laborota 4000), Bain marie (Memmert), Les verrerie.	

II.2. Méthodes expérimentales

II.2.1. Echantillonnage

Une fois la plante est séchée, le tri de chaque partie a été effectué en feuilles, en graines et en fleurs (figures 4), puis stockés dans des sacs en papier jusqu'à leurs utilisations.



Figure 4: Feuilles, Graines et fleurs séchés de *Cistus creticus*.

Les parties sont préparées selon les étapes suivantes :

- **Broyage :** les échantillons ont été broyés manuellement à l'aide d'un mortier.
- **Tamissage :** le tamissage a été réalisé à l'aide d'un tamis de diamètre de 250 μm .

II.3. Préparation des extraits

II.3.1. Extraits hexaniques / méthanoliques

Parmi les méthodes d'extraction existant, la macération qui a été choisie dans notre travail. Les échantillons des différentes parties de la plante ont été macérés dans 10 ml d'hexane pendant 24h suivie par une filtration puis évaporation dans l'étuve pendant 48h. Les extraits secs ont été stockés au réfrigérateur jusqu'à leurs utilisations.

Les résidus des extraits hexaniques ont été macérés une deuxième fois dans 10 ml de méthanol et ont été traités de la même manière que celle suivie de l'extraction par l'hexane.

Le digramme suivant montre les étapes suivies dans la préparation de tous les extraits :

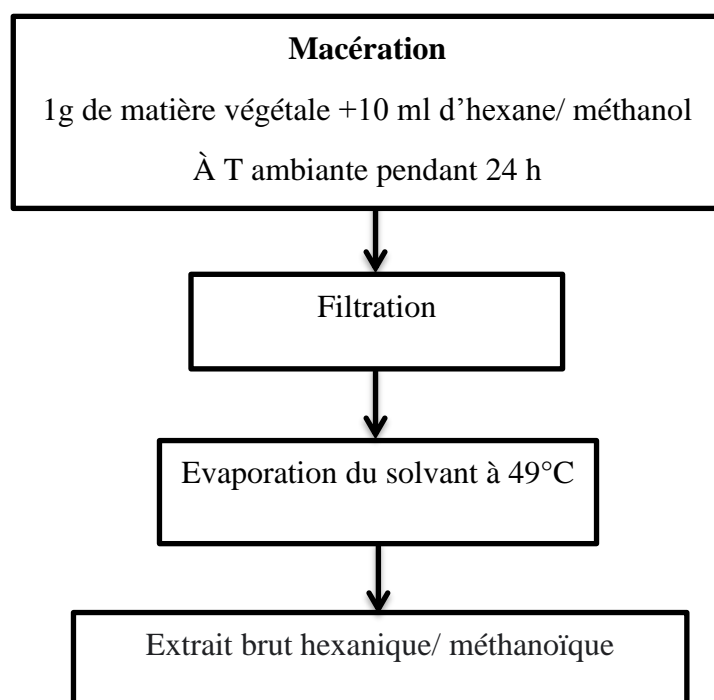


Figure 5: Etapes d'extraction des extraits hexaniques/méthanoliques.

II.3.2. Extraits aqueux

Une nouvelle masse de 0.5 g a été pesée de chaque échantillon macérée dans un volume de 20 ml de l'eau distillée pendant 24 heures, suivie par une filtration.

Le filtrat obtenu est évaporé sous pression réduite à l'aide d'un Rotavapeur à 47 °C, puis étuvé à 49°C afin d'éliminer les traces du solvant, ensuite le résidu sec obtenu est pesé puis solubilisé dans 3 ml d'eau distillée.

II.3.3. Extraits MeOH/H₂O et Ac/H₂O

Une autre macération d'une masse de 2 g de chaque échantillon dans un volume de 50 ml du méthanol/eau et acétone/eau avec des rapports volumiques de (8/2) et (7/3) respectivement, pendant 24 heures.

Après filtration et évaporation des solvants, la fraction aqueuse résiduelle est soumise à une série d'extractions liquide-liquide successives.

- **Extraction liquide-liquide**

Elle se fait par l'hexane en premier afin d'éliminer les pigments et chlorophylle jusqu'à épuisement en suite par l'acétate d'éthyle. En effet, deux fractions organiques sont résultantes (hexanique et acétate d'éthyle).

Un séchage avec le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) est nécessaire après l'extraction de chaque phase suivie par une filtration et une évaporation à l'aide d'un Rotavapeur à 40 °C.

Les résidus sont par la suite solubilisés dans 5ml du méthanol et qui sont conservés au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation.

II.4. Détermination des rendements d'extraction

Le rendement est le rapport entre la masse de l'extrait brute obtenu et la matière végétale traitée des extraits, calculé par l'équation suivante :

$$R\% = \frac{M_e}{M_v} \times 100 \quad (1)$$

Avec :

M_e : Masse de l'extrait brut.

M_v : Masse de la matière végétale.

II.5. Dosages des composés phénoliques totaux (méthodes spectrophotométrique)

II.5.1. Dosage des polyphénols

Son Principe est adapté par (**Singleton et Ross en 1965**) avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est un mélange de l'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$), et de l'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) qui se réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus du tungstène (W_8O_{23}) et molybdène (Mo_8O_{23}).

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été calculée grâce à la courbe d'étalonnage de différentes concentrations de l'acide gallique utilisé comme standard (0,07- 0,35 g/l), contre un blanc où le solvant remplace l'extrait.

Le protocole du dosage des composés phénoliques totaux est donné comme suit :

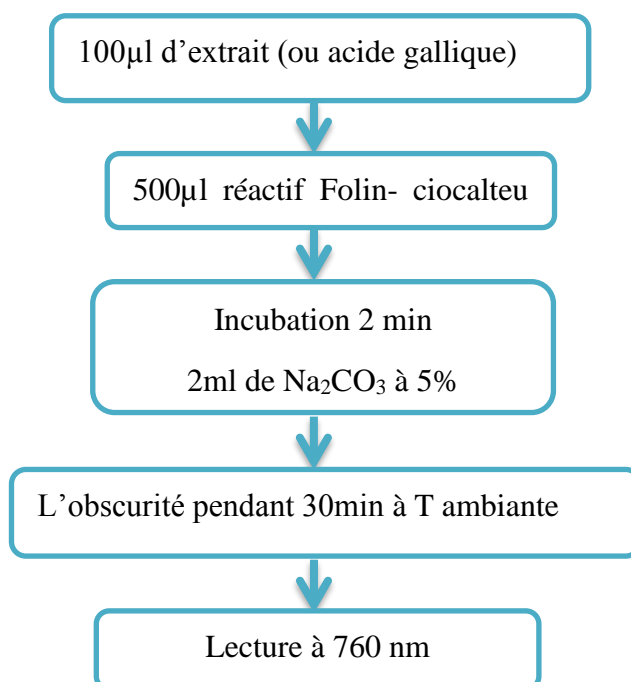


Figure 6: Diagramme de la quantification des composés phénoliques totaux.

Les teneurs sont exprimées en milligrammes équivalent en acide gallique (mg EAG /g mv) par gramme de la matière végétale.

II.5.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé suivant la méthode colorimétrique adaptée par Lamaison et Carnat (**Djeridane et al, 2006**). Les flavonoïdes possèdent des groupements hydroxyles (OH) formant des complexes jaunâtres avec le Trichlorure d'Aluminium $AlCl_3$.

Une courbe d'étalonnage standard (Quercétine) a été effectuée en allant de 5.10^{-3} jusqu'à $2,5.10^{-2}$ g/l permettant de déterminer les teneurs en flavonoïdes de chaque extrait qui sont exprimée en milligrammes équivalent en quercétine par gramme de la matière végétale (mg EQ /g mv).

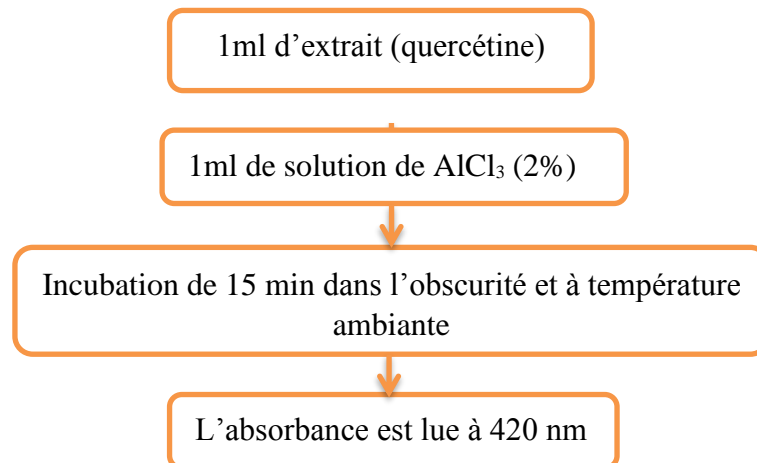


Figure 7: Etapes de dosage des flavonoïdes.

II.5.3 Dosage des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés (spécifique aux flavanols) a été réalisé par la méthode au chlorhydrate de vanilline qui est basé sur la condensation des composés polyphénoliques (**Price et al, 1978**).

Son principe est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de vanilline sur le carbone 6 du cycle A de la catéchine (**Figure 8**) ou (tanin condensé) pour former un complexe chromophore rouge. La concentration de tanins a été déterminée par rapport à une courbe d'étalonnage de la catéchine allant de 0.02 à 0.2 g/l, qui a été exprimée en milligrammes équivalent en catéchine par gramme de la matière végétale (mg EC /g mv).

L'extraction est faite de la manière suivante :

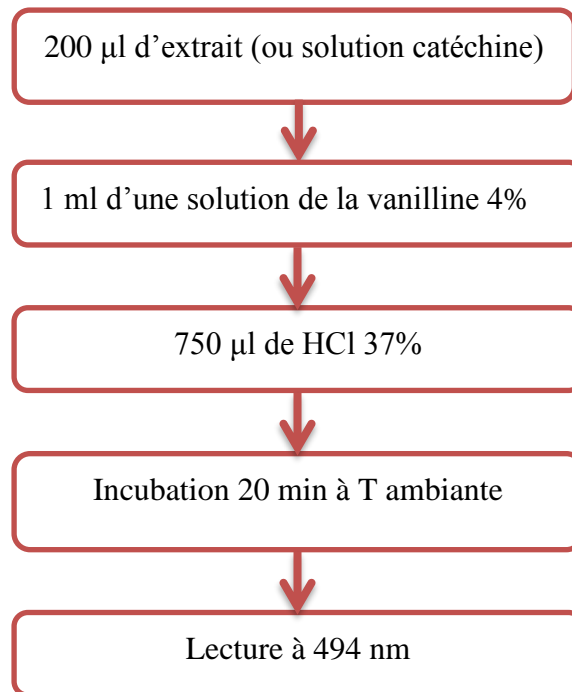


Figure 8: Protocole expérimental du dosage des tanins.

En effet, les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés dans les extraits étudiés sont calculés par la relation suivante :

$$T = \frac{A}{P} \times d \times \frac{V}{m} \quad (2)$$

Avec :

T : Teneur en composés phénoliques (tanins ou flavonoïdes) de l'extrait en (mg/g)

A : Absorbance de l'extrait.

P : La pente de la courbe d'étalonnage du standard

d : Nombre de dilution

V : volume de solvant solubilisé (ml)

m : Masse de la matière sèche en g

II.6. Evaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH

L'activité antioxydante est mesurée par la méthode du DPPH qui est 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. C'est un radical libre, stable et un accepteur d'hydrogène de couleur violet intense.

Le changement de sa coloration en jaune revient essentiellement à sa liaison avec des substances antioxydantes (AH) par le transfert de protons, qui dépend de la nature, de la concentration et de la puissance des principes actifs présents dans les extraits.

La réaction est donnée dans la figure 9 :

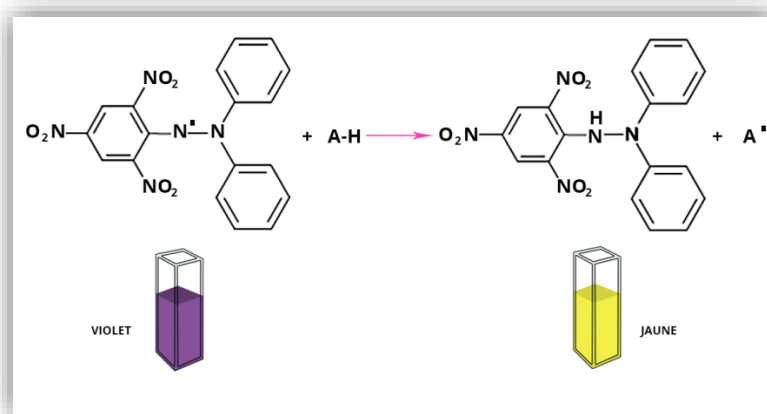


Figure 9: Structure de DPPH et sa réduction par l'antioxydant A-H.

La courbe d'étalonnage de La vitamine C Comme étant le standard par la préparation de la solution mère de 0.15 g/l de l'acide ascorbique (Vit C) dans le méthanol à différentes concentrations (8,52 – 42,58 $\mu\text{M/l}$).

Le contrôle est préparé pour chaque série en remplaçant l'extrait par le solvant.

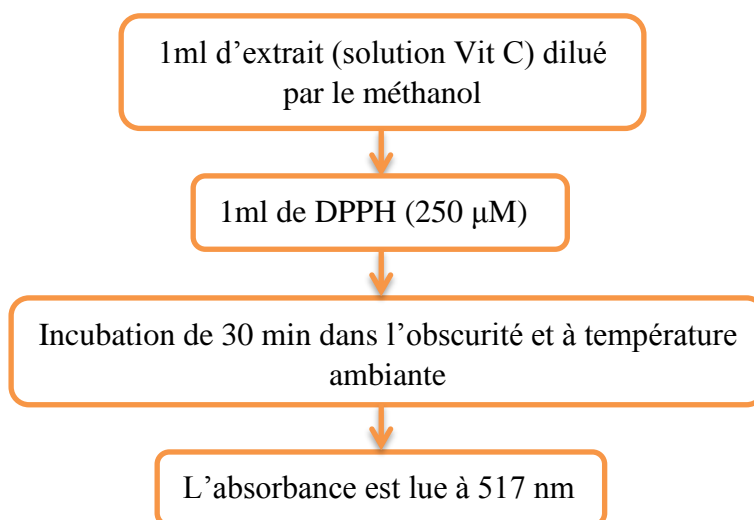


Figure 10: Protocole du test DPPH.

Les résultats des capacités antioxydantes (VCEAC) sont exprimés en micromolaire équivalent en vitamine C par gramme de la matière végétale ($\mu\text{M EQ Vit.C/g mv}$) contre un blanc qui contient du méthanol pur.

Le pouvoir d'inhibition (PI %) est calculé suivant cette relation :

$$\text{PI}\% = \frac{A_0 - A_{\text{test}}}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

Avec :

A_0 : Absorbance du contrôle.

A_{test} : Absorbance de l'échantillon.

Les valeurs de VCEAC sont calculées par la relation suivant :

$$\text{VCEAC} = \frac{A \times d \times V}{P \times m} \quad (4)$$

Avec :

VCEAC : Capacité antioxydante en équivalent en vitamine C de l'extrait en (mg EQ Vit C/g de Mv)

A : Absorbance de l'extrait.

p : La pente de la courbe d'étalonnage du standard.

d : Nombre de dilution.

V : Volume d'essai en (l).

m : Masse de la matière sèche en g.

II.7. Evaluation de l'activité anti-urolithiasique

II.7.1. Principe de la cristallisation de l'oxalate de calcium

L'activité antilithiasique *in vitro* de l'extrait a été évaluée en fonction de sa capacité à inhiber la formation d'oxalate de calcium en présence et en absence d'inhibiteurs.

II.7.2 Test d'inhibition sur la cristallisation

a) Etude de la cinétique de la réaction

En premier lieu, l'étude de l'inhibition de l'extrait de la précipitation d'oxalate de calcium a été réalisée pour différentes concentrations (0,25-0,5-1 et 2g/l) avec un UV –visible piloté par un microordinateur muni d'un logiciel, permettant de tracer une courbe des absorbances en fonction du temps durant 5min contre un test sans inhibiteur.

- En second lieu, après avoir choisie la concentration optimale d'une meilleure inhibition de l'extrait (1g/l), et fixer le temps de la réaction, la cinétique est effectuée avec d'autres inhibiteurs à savoir le citrate de sodium comme étant composé standard et le pharbiol médicament contre la lithiase.

b) Test d'inhibition avec l'extrait

Dans un tube à essai on verse dans l'ordre :

- 100 µl de l'extrait
- 500µl de la solution de chlorure de calcium dihydraté $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 40 mM.
- 500 µl de la solution d'oxalate de sodium $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ a 4 mM.
- Incubation pendant 5 min dans un bain marie à 37°C.
- Lecture à 620 nm.

Le test est répété trois fois pour tous les extraits.

- **Solution sans inhibiteur:**

La même procédure de la solution inhibitrice est effectuée néanmoins l'eau distillée remplace l'extrait.

Le pourcentage d'inhibition anti-urolithiasique est calculé par la relation suivante :

$$\text{PI}\% = \left(1 - \frac{A_c}{A_{ex}}\right) \times 100 \quad (5)$$

Avec :

A_c : Absorbance du contrôle (sans inhibiteur) mesuré pour chaque série.

A_{ex} : Absorbance de la solution inhibitrice (extrait)

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Etude phytochimique

III.1.1. Rendement de l'extraction

Après l'extraction, nous avons obtenu des extraits bruts de plusieurs fractions hexanique, méthanolique et aqueuse à partir de différents organes à savoir les graines G, les feuilles F et les fleurs f.

Les tableaux 3 et 4 présentent les valeurs des rendements en pourcentage massique R et les concentrations C des extraits bruts de la *Cistus creticus* de chaque solvant d'extraction.

Tableau 3: Rendement et concentration des extraits bruts dans l'hexane, méthanol et l'eau.

	Hexane		Méthanol		Eau	
	[C] g/l	R %	[C] g/l	R %	[C] g/l	R %
F4	1,97	0,59	34,77	10,43	30	17,99
G1	3,57	1,07	51,3	15,38	40	23,97
G3	4,23	1,27	26,37	7,91	30	18
G4	4,07	1,22	36	10,80	46,67	27,96
f1	3,73	1,12	63,27	18,97	56,67	33,95

D'après les résultats, nous constatons que les plus faibles rendements et concentrations sont ceux obtenus par l'hexane, alors qu'ils sont plus importants dans le méthanol et dans H₂O.

Les concentrations dans le méthanol sont comprises entre 26,37 et 63,27g/l avec le meilleur rendement correspondant aux fleurs qui atteint la valeur de 18,97%.

Pour les extraits aqueux les concentrations et les rendements varient selon l'organe utilisé de la plante. Il faut rappeler que les conditions opératoires des extractions avec les trois solvants n'étaient pas les mêmes à savoir les masses des prises d'essai et le volume du solvant. Malgré ces différences dans les conditions opératoires, on peut dire que les concentrations en extraits bruts ainsi les rendements sont importants dans les cas où les solvants utilisés dans l'extraction sont polaires voir méthanol et l'eau.

Entre outre, deux autres extractions dans deux systèmes de solvants différents MeOH/H₂O (8/2) V/V et Ac/H₂O (7/3) V/V ont été également effectuées. Les résultats sont groupés dans le tableau 4.

Tableau 4: Rendements et concentrations dans MeOH/H₂O (8/2) et Ac/H₂O (7/3).

Solvants Et extraits	MeOH/H ₂ O (8/2)				Ac/H ₂ O (7/3)			
	AE		Hex		AE		Hex	
	[C] g/l	R %	[C] g/l	R %	[C] g/l	R %	[C] g/l	R %
F4	12	3	6	1,5	18	4,5	8	2
G1	16	4	4	1	36	9	16	4
G3	10	2,5	2	0,5	32	8	nd	nd
G4	8	2	6	1,5	22	5,5	nd	nd
f1	10	2,5	2	0,5	16	4	6	1,5

Selon les résultats présentés dans le tableau 4, nous observons que les fractions acétate d'éthyle donnent des concentrations et des rendements élevés par rapport à celles des fractions hexanique et cela quelque soit le système de solvants utilisées. Il faut noter que les graines dans le système Ac/H₂O donnent les concentrations et les rendements les plus importantes, ce qui indique que les graines dans ce système renferment des composés polaires par rapport aux deux autres organes.

Enfin, nous constatons que les rendements de l'extraction et les concentrations des extraits bruts varient dans le même sens quelque soit les solvants de l'extraction utilisés.

III.2. Dosage des composés phénoliques totaux

Les courbes d'étalonnages de différents standards à savoir l'acidegallique, la quercetine et la catechine ont été utilisées pour calculer les teneurs en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes et en tanins respectivement. Le tableau 5 contient les résultats relatifs à ces composés.

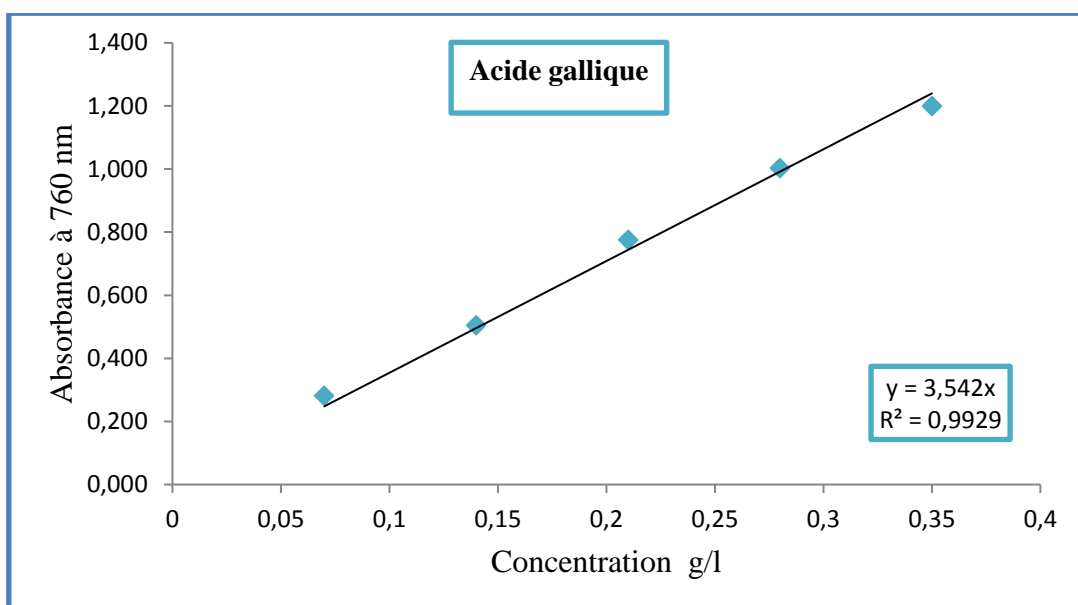


Figure 11: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Dans le système MeOH/H₂O, les quantités en phénols totaux varient de 10,71 à 34,76 mg EAG/g M_v, pour le système Ac/H₂O, les teneurs en CPT sont comprises entre 21,91 et 55,90 mg/g, nous remarquons que les teneurs en CPT sont plus importantes presque le double voir trois fois plus que celles trouvées dans le système MeOH/H₂O. Dans les deux systèmes de solvants de l'extraction utilisés MeOH/H₂O et Ac/H₂O, les graines G1 ont enregistré les quantités maximales en phénols totaux de l'ordre 34,76 et 55,90 mg/g respectivement.

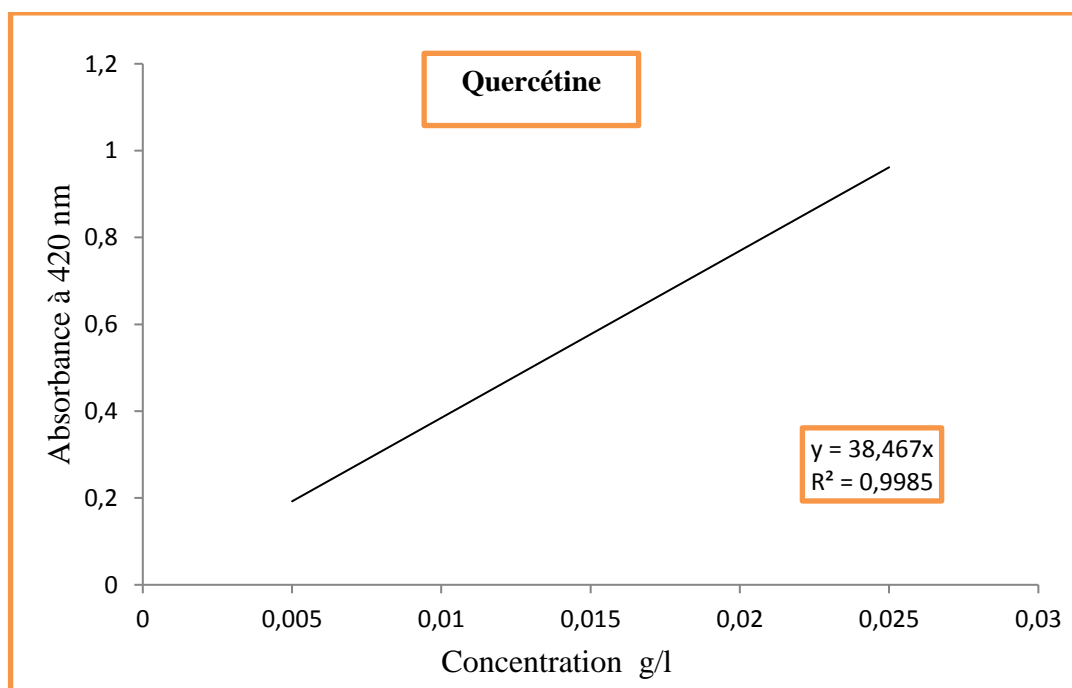


Figure 12: Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Concernant les flavonoïdes, les teneurs maximales reviennent aux feuilles dont les valeurs sont comprises entre 0,94 à 4,74 mg EQ/g Mv et 2,33 à 57,69 mg EQ/g Mv dans les deux systèmes méthanolique et acétonique respectivement qui correspond également à l'étude (**Enrique Barrajon-Catalán et al**) qui affirme l'abondance des flavonoïdes dans les extraits aqueux des feuilles de *Cistus creticus*. L'organe F4 est le plus riche en flavonoïdes avec les quantités 4,74 et 57,69 mg/g dans les deux systèmes de solvants méthanolique et acétonique respectivement. Une remarque qui attire l'attention est que la quantité des flavonoïdes dans F4 relative au système acétonique dépasse beaucoup la quantité en CPT, elle est presque 3 fois plus, ce qui n'est pas raisonnable. Cette anomalie peut être expliquée par le fait que le test spectrophotométrique utilisé est spécifique pour le dosage des flavones et flavanols et que les feuilles de cistus renferment d'autres flavonoïdes de structures différentes que ceux cités précédemment (flavone et flavanols).

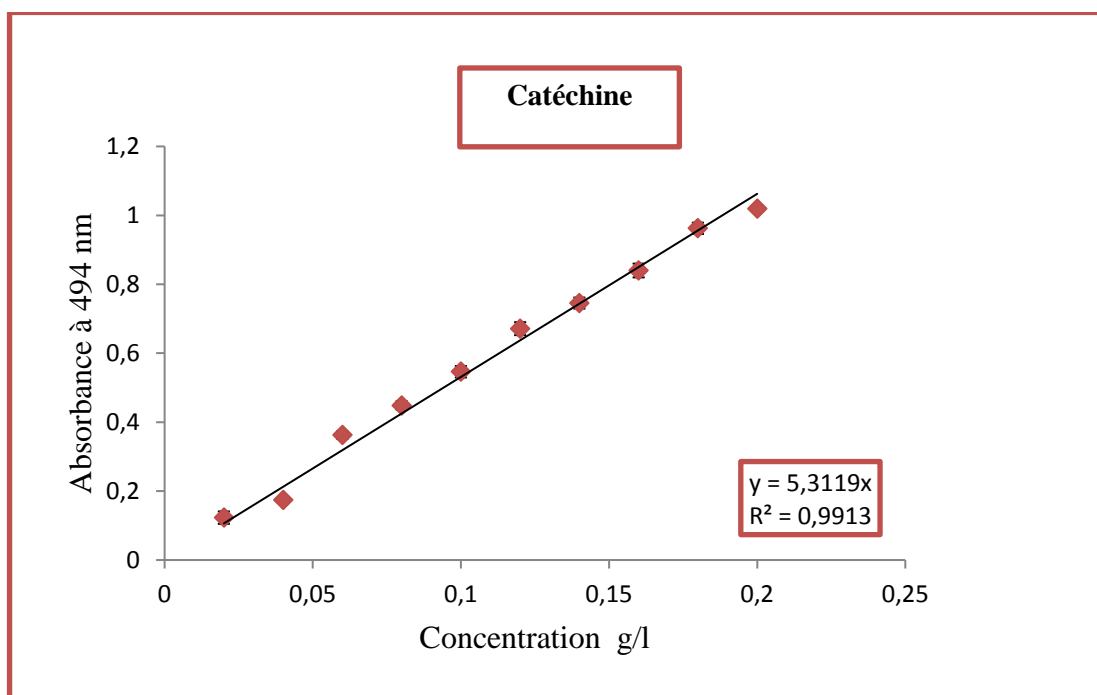


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la catéchine.

En ce qui concerne les tanins, le système Ac/H₂O donne les meilleures teneurs en ces composés comparativement au système MeOH/H₂O, les teneurs enregistrées varient de 1,1 à 8,22 mg EC/g Mv. L'échantillon G₃ donne la teneur en tanins la plus grande. En générale les teneurs en tanins sont environ 3 fois plus dans les extraits hydroacétoniques que ceux hydrométhanoliques à l'exception de l'échantillon G₁ et f₁.

Tableau 5: Teneurs en CPT, Flv et Tan dans tous les solvants utilisées sauf l'hexane.

Solvants Et extraits	AE						MeOH	Eau
	MeOH/Eau (8/2)			Ac/Eau (7/3)				
	CPT (mg/g)	Flv (mg/g)	Tan (mg/g)	CPT (mg/g)	Flv (mg/g)	Tan (mg/g)	CPT (mg/g)	CPT (mg/g)
F4	12,38± 0,0080	4,74± 0,0131	3,51± 0,0070	21,91± 0,0267	57,69± 0,0120	7,60± 0,0030	38,95± 0,0213	27,19± 0,0049
G1	34,76± 0,0022	2,69± 0,0051	1± 0,0102	55,90± 0,0067	4,33± 0,0144	1,10± 0,0144	47,89± 0,0031	69,69± 0,0120
G3	24,10± 0,0187	1,01± 0,0042	2,44± 0,0010	51,45± 0,0127	3,45± 0,0093	8,22± 0,0165	24,86± 0,0044	70,57± 0,0176
G4	15,30± 0,0224	2,18± 0,0027	0,4± 0,0036	46,20± 0,0069	5,78± 0,0104	1,45± 0,0007	40,16± 0,0038	91,46± 0,0276
f1	10,71± 0,0064	0,94± 0,0118	1,39± 0,0045	29,54± 0,0031	2,33± 0,0053	1,74± 0,0049	49,51± 0,0080	97,33± 0,0015

Les quantités en phénols totaux les plus importantes sont remarquables pour les extraits aqueux et méthanoliques qui sont relative a leur polarité.

III.3. Evaluation de l'activité antiradicalaire

L'évaluation de l'activité antiradicalaire des différents extraits des feuilles, graines et fleurs de la plante est importante afin d'avoir une idée sur la capacité des extraits à neutraliser les radicaux libres DPPH et par conséquent justifier l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle.

L'acide ascorbique est utilisé comme antioxydant de référence pour déterminer la capacité antiradicalaire des extraits de *Cistus*. Une gamme d'étalonnage a été préparée à partir d'une solution mère de l'acide ascorbique à différentes concentrations (8,52 – 42,58 µM/l) permettant de tracer une courbe d'étalonnage de ce standard.

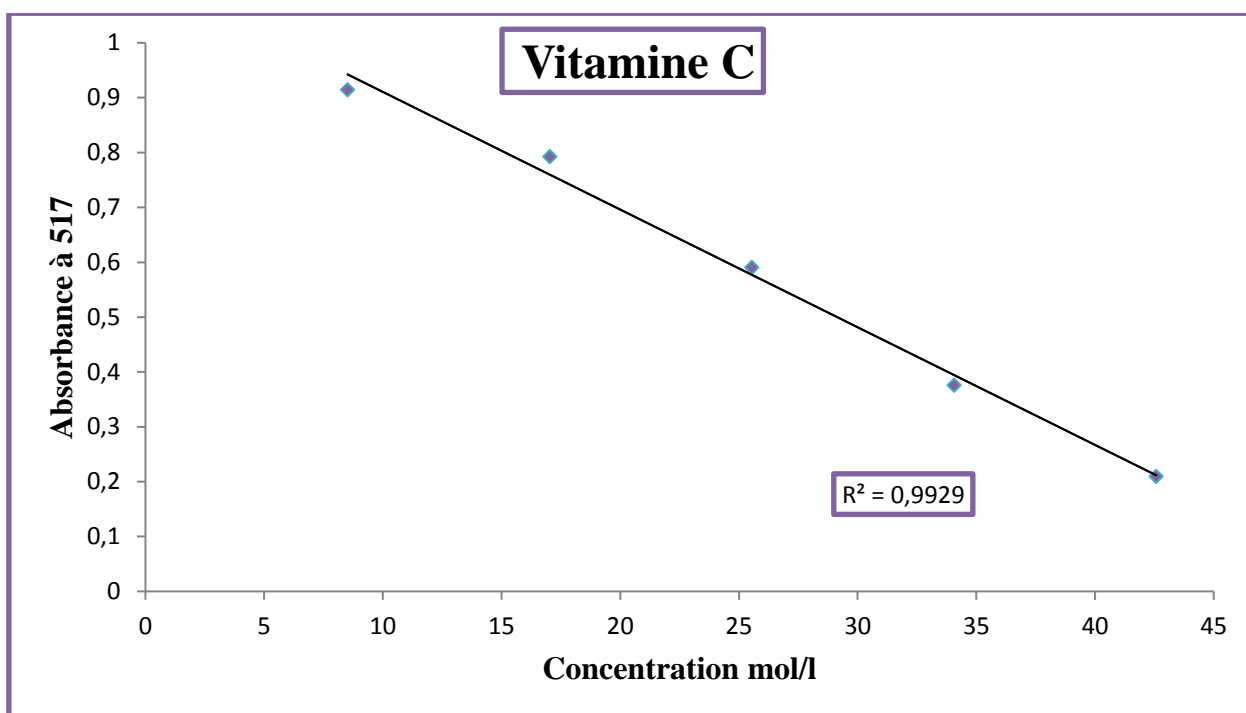


Figure 14: Courbe d'étalonnage de la vitamine C.

La capacité antiradicalaire a été exprimée par le facteur VCEAC définie comme étant la concentration micromolaire de l'acide ascorbique ayant la même capacité d'une solution de concentration 1g de la substance étudiée.

Tableau 6: Valeurs des VCEAC dans l'hexane, MeOH et l'eau.

Solvants et Extraits	Hexane	Méthanol	Eau
	VCEAC ($\mu\text{M/g}$)	VCEAC ($\mu\text{M/g}$)	VCEAC ($\mu\text{M/g}$)
F4	$0,37 \pm 0$	$359,23 \pm 0,0053$	$147,68 \pm 0,0136$
G1	$0,35 \pm 0$	$626,40 \pm 0,0053$	$347,63 \pm 0,0098$
G3	$0,26 \pm 0$	$121,04 \pm 0,0131$	$339,68 \pm 0,0113$
G4	$0,34 \pm 0$	$386,08 \pm 0,0020$	$491,01 \pm 0,0080$
f1	$0,38 \pm 0$	$645,04 \pm 0,0104$	$579,05 \pm 0,0093$

Pour l'extraction solide liquide en utilisant l'hexane, le méthanol et l'eau distillée, les valeurs de VCEAC dans le tableau montrent que les extraits hexaniques sont les plus faibles antioxydants par rapport aux extraits méthanoliques et aqueux qui ont dévoilé des valeurs de VCEAC plus importantes. D'une façon générale, on remarque que les extraits méthanoliques sont les plus

puissants antioxydants par rapport aux extraits aqueux, l'extrait méthanolique des fleurs a enregistré la plus importante valeur de VCEAC qui est égale à 645,04 $\mu\text{M/g}$ et qui signifie que 1g de fleurs donne la même activité antiradicalaire de 645,04 μM de l'acide ascorbique traduit par la présence des composés phénoliques extraits par le méthanol dans les fleurs de *Cistus creticus* qui peuvent piéger les ROS, et donc leur responsabilité de l'activité antioxydante par le DPPH.

Pour les extraits hydrométhanoliques et hydroacétoniques, les valeurs de VCEAC sont consignées dans le tableau 8. Les fractions hexaniques n'ont pas donné vraiment des activités antiradicalaires remarquables par rapport aux fractions acétate d'éthyle. Cependant, les fractions d'acétate d'éthyle issues de l'extraction hydroacétonique ont donné les plus grandes valeurs de VCEAC qui s'échelonnent entre 78,01 jusqu'au 474,44 μM . Etant donné que les teneurs en CPT dans le système hydroacétonique varient dans le même sens que les valeurs de VCEAC, donc cela nous permis de confirmer que les polyphénols sont responsables de l'activité antioxydante par le DPPH. Les résultats obtenus à partir de ces tests fournissent des données simples qui permettent de classer les extraits en fonction de leur potentiel antioxydant en équivalence à la vitamine c malgré que l'activité antioxydante ne correspond pas toujours à la présence de grandes quantités de polyphénols comme le cas de G4 dans le système hydroacétonique.

Tableau 7 : Valeurs de VCEAC dans les extraits hydrométhanoliques et hydroacétonique

Solvants Et extraits	MeOH/ Eau (8/2)		Ac / Eau (7/3)	
	AE	Hex	AE	Hex
	VCEAC($\mu\text{M/g}$)	VCEAC ($\mu\text{M/g}$)	VCEAC ($\mu\text{M/g}$)	VCEAC ($\mu\text{M/g}$)
F4	55,69 \pm 0,0122	0,17 \pm 0	78,01 \pm 0,0053	0,10 \pm 0
G1	199,74 \pm 0,0053	0,34 \pm 0,0231	379,19 \pm 0,0124	0,18 \pm 0
G3	102,73 \pm 0,0087	0,35 \pm 0,0136	455,86 \pm 0,0184	0,09 \pm 0
G4	71,27 \pm 0,0076	0,39 \pm 0,0136	474,44 \pm 0,0053	0,09 \pm 0
f1	66,74 \pm 0,0169	0,50 \pm 0,0233	160,17 \pm 0,0189	0,35 \pm 0

Afin de confirmer la relation entre l'activité antiradicalaire et le contenu en CPT, nous avons essayé de chercher des corrélations entre ces deux facteurs. Le traitement a montré qu'il existe de forte corrélation entre cette activité et les teneurs en CPT pour tous les extraits et toutes les fractions

avec des coefficients enregistrés compris entre 0,90 et 0,98, ce qui prouve que les CPT (s) sont responsables de cette activité antiradicalaire.

Parmi les échantillons de cistes analysés dans l'étude (**Bernacka K et al.2022**), les échantillons ayant la plus forte teneur en flavonoïdes et la plus faible teneur en polyphénols non flavonoïdes, ce qui était associé à une activité antioxydante plus élevée in vitro, contrairement aux résultats trouvés dans notre étude où la valeur maximale (57,69 mg Eq Qu/g Mv) des flavonoïdes trouvés dans le système hydroacétonique présente la valeur minimale de VCEAC (78,01 μ M Eq Vc/g Mv), idem pour le système hydrométhanolique. La compilation des coefficients de corrélation (-0.79) a confirmé que les flavonoïdes ne constituent pas un groupe significatif de composés responsables des propriétés antioxydantes de feuilles de *Cistus creticus* pour les deux systèmes hydrométhanolique et hydroacétoniques de la fraction acétate d'éthyle.

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que l'utilisation de solvants à polarité intermédiaire comme le système hydroacétonique peut assurer la meilleure récupération des principaux composés de *Cistus creticus*, en effet, ce système a donné des rendements plus importants ainsi que des teneurs en composés phénoliques totaux comparativement au système hydrométhanolique ayant une polarité plus grande.

Tandis que, ce type de solvant peut augmenter le rendement d'extraction pour d'autres composés non phénoliques qui peuvent augmenter le potentiel thérapeutique de l'extrait par une action synergique, enregistré dans la littérature sur le *Cistus creticus* dans un système hydroéthanolique. Cette plante présente une source importante de composés bioactifs comme les dérivés de la myricétine et de la quercétine appartenant à la grande famille des polyphénols. (**Mocan Andrei et al., 2022**)

III.4. Evaluation de l'activité d'inhibition de la cristallisation oxalocalcique

Avant de tester l'effet de l'inhibition de la cristallisation oxalocalcique, nous avons tout d'abord étudié la cinétique de la réaction de cristallisation oxalocalcique qui se produit entre le chlorure de calcium CaCl_2 et l'oxalate de sodium $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ en présence et en absence de l'extrait.

Dans un premier temps, une courbe cinétique de l'absorbance en fonction du temps a été préparée en utilisant trois concentrations d'un extrait aqueux 0,25 ; 0,5 ; 1 et 2 g/l. Les résultats montrent que l'inhibition de la réaction est produite lorsque la concentration de l'extrait aqueux atteint la valeur 1g/L avec un temps de 5 minutes et un taux d'inhibition de 84,71% (**Voir figure 15**).

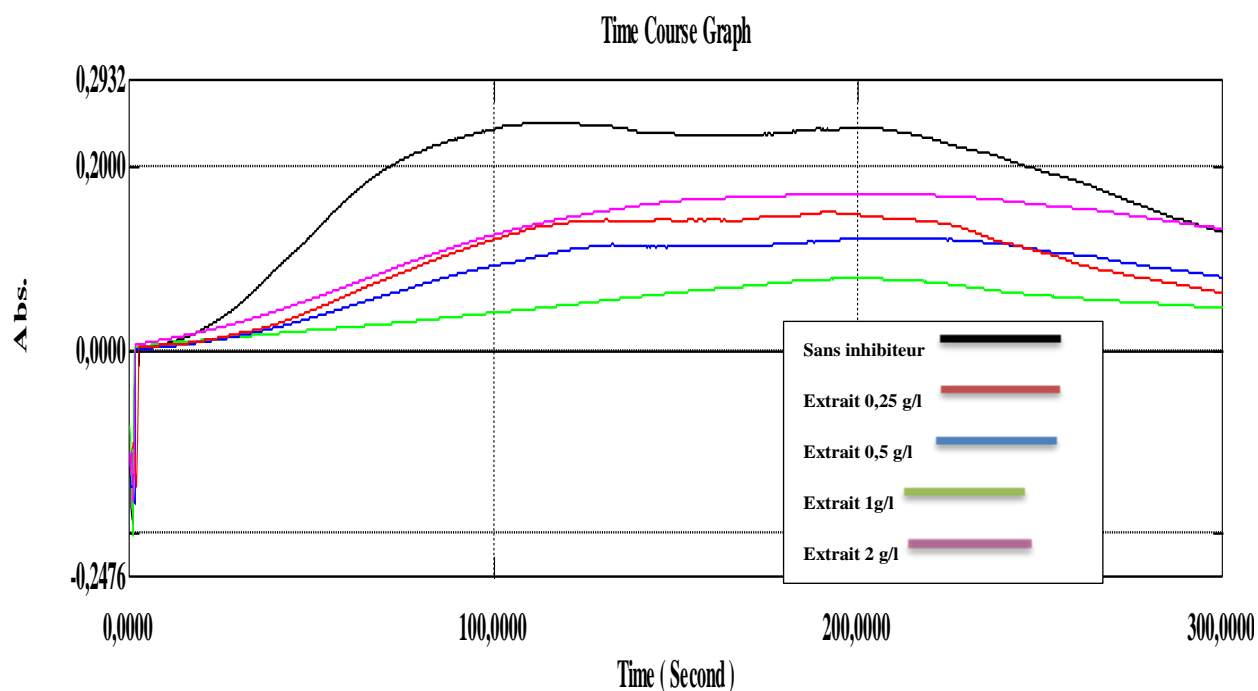


Figure 15: Courbe cinétique de différentes concentrations d'extrait.

En deuxième temps, nous avons déterminé les pourcentages d'inhibition de tous les extraits à une concentration unique égale à 1g/L.

L'effet des extraits méthanoliques et aqueux sur l'inhibition des produits de la réaction de cristallisation oxalocalcique est exprimé en pourcentage d'inhibition PI%, les valeurs de ces pourcentages sont données dans le tableau (8) Pour les tous extraits organiques. Les pouvoirs d'inhibition ont été déterminés par deux voies, dans la première, les résidus des extraits sont solubilisés dans le méthanol, après des observations sur l'aspect du milieu réactionnel trouble, nous avons pensé à évaporer le solvant organique et re-solubilisé les résidus dans l'eau distillée et faire un deuxième test qui a amélioré les valeurs des pourcentages d'inhibition de la réaction.

Les pourcentages d'inhibition de la réaction oxalocalcique des extraits sont regroupés dans les deux tableaux (9 et 10).

Tableau 8: Pouvoirs de la cristallisation oxalocalcique des extraits aqueux et méthanoliques.

Solvants et Extraits	MeOH		Eau
	Solubilisés Dans le MeOH	Solubilisés dans l'eau	
	PI %	PI %	
F4	11,95 ± 0,0044	17,38 ± 0,0048	78,89 ± 0
G1	15,91 ± 0,0185	14,01 ± 0,0115	75,38 ± 0,0033
G3	4,72 ± 0,0109	29 ± 0,007	60,78 ± 0,0115
G4	32,30 ± 0,0025	59,35 ± 0,0120	68,96 ± 0,0120
f1	24,94 ± 0,0138	60,70 ± 0,0008	73,38 ± 0,0081

Tableau 9: Pouvoir de la cristallisation oxalocalcique de la fraction AE dans les deux systèmes de solvants.

Solvants et Extraits	Fraction AE			
	MeOH /Eau (8/2)		Ac / Eau (7/3)	
	Solubilisés dans le MeOH	Solubilisés dans l'eau	Solubilisés dans le MeOH	Solubilisés dans l'eau
	PI %	PI %	PI %	PI %
F4	24,45 ± 0,0102	26,13 ± 0,0135	26,99 ± 0,0091	40,42 ± 0,0038
G1	30,99 ± 0,0149	27,81 ± 0,0105	23,52 ± 0,0093	32,41 ± 0,0145
G3	28,83 ± 0,0145	3,19 ± 0,0175	22,10 ± 0,0127	70,74 ± 0,0030
G4	29,12 ± 0,0047	11,67 ± 0,0080	20,11 ± 0,0167	60,32 ± 0,0005
f1	2,41 ± 0,0095	49,33 ± 0,0071	23,37 ± 0,0185	57,87 ± 0,0101

Tableau 10: Pouvoir de la cristallisation oxalocalcique de la fraction Hex dans les deux systèmes de solvants.

Solvants et Extraits	Fraction Hex			
	MeOH /Eau (8/2)		Ac / Eau (7/3)	
	Solubilisés dans le MeOH	Solubilisés dans l'eau	Solubilisés dans le MeOH	Solubilisés dans l'eau
	PI %	PI %	PI %	PI %
F4	11,64 ± 0,0115	33,49 ± 0,0183	44,58 ± 0,018	46,95 ± 0,022
G1	-72,02 ± 0,0095	24,85 ± 0,0210	-34,370 ± 0,0131	42,75 ± 0,0135
G3	-113,17 ± 0,0138	34,97 ± 0,0120	nd	nd
G4	-15,95 ± 0,0153	27,10 ± 0,0153	nd	39,37 ± 0,0195
f1	-17,06 ± 0,0164	23,410,0248	12,62 ± 0,0076	25,38 ± 0,0058

D'après les résultats du tableau (8), on remarque que tous les extraits ont donné des pourcentages d'inhibition remarquables. Pour l'extrait méthanolique, l'extrait des graines G4 a dévoilé le taux d'inhibition le plus important qui égale à 32,30%, cette valeur augmente lorsque son résidu est solubilisé dans l'eau, la valeur sera 59,35%. Par contre, elle atteint 68,96% lorsque l'eau est utilisée comme solvant dès le départ. Ce résultat est généralisé pour tous les extraits aqueux de tous les organes de la plante. Nous pouvons conclure que les extraits aqueux ont donné de meilleurs résultats du pouvoir inhibiteur de la calcination oxalocalcique que ceux hydrométhanoliques.

Les préparations aqueuses de *Cistus creticus* représentent le pouvoir inhibiteur de calcination oxalocalcique excellent compris entre (78,89-73,38%), ceci revient probablement à la présence d'autres composés non phénolique telles que les protéines, les acides aminés.

Le même comportement est remarqué pour toutes les fractions hexanique et acétate d'éthyle issues des solvants hydrométhanolique et hydroacétonique. A titre d'exemple la fraction acétate d'éthyle des fleurs f1 de l'extrait hydrométhanolique a enregistré un pourcentage d'inhibition de l'ordre 2,41 contre 49,33. Dans le méthanol et l'eau respectivement.

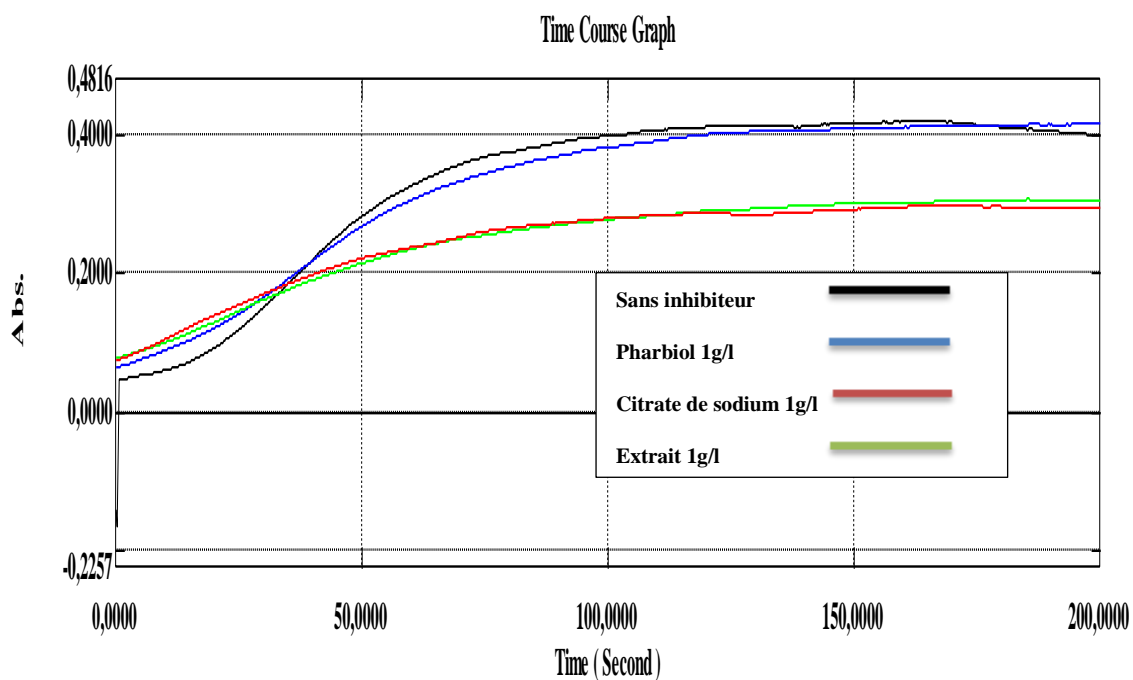


Figure 16: Courbe cinétique de comparaison entre les inhibiteurs.

Afin de comparer qualitativement l'inhibition de l'extrait aqueux le plus actif qui a donné un pouvoir d'inhibition le plus élevé 78,89% avec le citrate de sodium pris comme référence (c'est un inhibiteur qui se lie au calcium responsable à la formation du calcul d'environ 85%) et le pharbiol médicament recommandé pour le traitement des calculs rénaux, nous avons réalisé une cinétique de l'inhibition de la réaction de la cristallisation oxalocalcique dans les conditions suivantes : Température 37 °C, le temps 200 seconde et une concentration unique pour toutes les substances égale à 1 g/L (**figure 16**). D'après cette courbe, nous remarquons que le citrate de sodium et l'extrait aqueux F4 sont dans le même ordre en termes d'inhibition mieux que le médicament pharbiol. Ce qui confirme dans ce cas la réaction du citrate avec le calcium présent dans l'oxalate de calcium, l'extrait utilisé est aqueux macéré dès le départ dans de l'eau donnant donc le meilleur pouvoir inhibiteur et qui est concurrent avec le citrate de sodium, ce qui est expliqué par la présence d'autres composés extraits par l'eau qui ne font pas partis des polyphénols (27mg Eq AG/g MV) à savoir les protéines, saponine ou les acides organiques. Aucune étude n'a été révéler sur ce test de l'inhibition de la cristallisation d'oxalate de calcium de *Cistus creticus* afin de confirmer les résultats obtenus par notre étude.

Conclusion générale

IV. Conclusion générale

La médecine traditionnelle demeure le recours principal pour une grande majorité des populations pour résoudre leurs problèmes de santé. Il est admis actuellement que plusieurs systèmes de régulation peuvent être modulés par les plantes. Dans le cas de la lithiase rénale, on compte plus de 70 espèces ayant des propriétés anti lithiasiques.

L'objectif de ce travail consiste à évaluer l'activité antiradicalaire des différents extraits de *Cistus creticus* et déterminer leurs effets inhibiteurs sur la réaction de la cristallisation oxalocalcique.

Nous avons utilisé dans notre travail plusieurs solvants à savoir : le méthanol, l'eau et deux systèmes de solvants hydrométhanolique et hydroacétonique suivi par des extractions liquide-liquide avec l'hexane et l'acétate d'éthyle.

- Dans la comparaison entre les deux systèmes hydrométhanolique et hydroacétonique, les résultats montrent que les fractions acétate d'éthyle issues du système hydroacétonique donnent les meilleurs rendements en extraits bruts ainsi en composés phénoliques totaux, flavonoïdes et tanins.
- En effet les teneurs en composés phénoliques sont plus importantes dans les extraits aqueux des fleurs **97,33 mgEAG/g** que celle trouvés dans les extraits méthanoliques.
- L'extrait méthanolique des fleurs a marqué la meilleure activité antiradicalaire vis-à-vis le radical DPPH avec une valeur de VCEAC égale à **645,04uM E.V.C/g** de fleurs.
- Tous les extraits ainsi que toutes les fractions étudiées ont révèlent des effets inhibiteurs positifs de la réaction de la cristallisation oxalocalcique. La meilleure valeur du pourcentage d'inhibition de l'extrait aqueux des feuilles F4 donne 78,89% suivie par les extraits aqueux G1, f1, G4 et G3 avec des pourcentages d'inhibition 75,38 ; 73,38 ; 68,96 et 60,78% respectivement.
- De bonnes corrélations ont été trouvées entre le contenu en composés phénoliques et l'activité antiradicalaire pour l'ensemble des extraits, ce que justifier la responsabilité de ces composés vis-à-vis de cette activité. Cependant, relativement une bonne corrélation 0,61 a été trouvée entre le contenu en composés phénoliques totaux et l'activité anti lithiasique dans les extraits méthanoliques contre ceux qui sont solubilisés dans l'eau 0,21 et les extraits aqueux qui ont enregistré une corrélation négative (-0,38). Ce résultat

permet de prédire que les composés inhibiteurs de la réaction de la cristallisation oxalocalcique ne sont pas de nature phénolique.

Ces résultats restent préliminaires d'autres études sont nécessaires pour confirmer ces résultats obtenus à savoir :

- Identification et caractérisation des composés contenus dans les extraits inhibiteurs.
- Réaliser des tests gravimétriques.
- Déterminer la composition des extraits inhibiteurs en composés minéraux.

Références bibliographiques

Barrajón-Catalán E et al., 2011: Barrajón-Catalán E, Fernández-Arroyo S, Roldán C, Guillén E, Saura D, Segura-Carretero A, Micol V. A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship. *Phytochem Anal.* 2011 (4):303-12.

Beniston, W., 1984. Fleurs d'Algérie, édition entreprise nationale de livre, Algérie.

Bernacka K et al., 2022: Bernacka K, Bednarska K, Starzec A, Mazurek S, Fecka I. (2022): Antioxidant and Antiglycation Effects of *Cistus × incanus* Water Infusion, Its Phenolic Components, and Respective Metabolites, *Molecules*, 27(8):2432.

Chagnon A. 2007 : Chagnon A. (2007), Lithiase urinaire : des médicaments pour favoriser l'expulsion des calculs. *Concours médical* 129 (3-4) : 81-82.

DIABY Sékou 2023 : DIABY Sékou (2023) : Plantes médicinales utilisées dans la prise en charge de la lithiase urinaire au Mali, these de doctorat, université des sciences, des techniques et des technologies de BAMAKO, Mali.

Djeridane et al, 2006: Djeridane, A.; Yousfi, M.; Nadjemi, B.; Boutassouna, D.; Stocker, P.; Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds, *Food chemistry*, 654-660.

El Habbani R et al., 2023: El Habbani R, Kachkoul R, Chaqroune A, Lahrichi A, Mohim M, El Oumari FZ, Sqalli Houssaini T, (2023): The relationship between the stone's composition and the biochemical parameters of blood and urine in patients with urolithiasis, *Scientific African*, Volume 19.

Guzmán, B et al., 2005: Guzmán, B. and P. Vargas (2005): "Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (Cistaceae) based on ITS, trnL-trnF, and matK sequences." *Molecular phylogenetics and evolution* 37(3): 644-660.

Hutchinson, J. 1926: Hutchinson, J. (1926): *The Families of Flowering Plants...: Arranged According to a New System Based on Their Probable Phylogeny*, Macmillan and Company, limited.

Laoufi R et al.,2020: laoufi R, yahiaoui K, Benchenak Ouahiba, Benhabiles Narimen, Lefkir S, Arab K, (2020): Effet bénéfique de l'extrait aqueux *d'Urtica dioica* sur la cristallisation de l'oxalate de calcium dans l'urine, 2020, International Journal of Green Pharmacy, v14.

Leifert & Abeywardena et al., 2008: Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM and Dirsch VM (2002): Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression subsequent nitric oxiderelease from endothelial cells. *Circulation*.106:1614-1617.

Loizzo, M. Jemia, et al., 2013: Loizzo MR, Ben Jemia M, Senatore F, Bruno M, Menichini F, Tundis R. R., M. B (2013): "Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils." *Food and chemical toxicology* 59 : 586-594.

M. Courbebaisse et al., 2017 : M. Courbebaisse, C. Prot-Bertoye, J.-P. Bertocchio, S. Baron, G. Maruani, S. Briand, M. Daudon, P. Houillier (2017) : Lithiase rénale de l'adulte : des mécanismes au traitement médical préventif, *La Revue de Médecine Interne*, Volume 38, Issue 1, Pages 44-52.

Mechri R et al., 2023 : Mechri R, Smati D, Boutefnouchet A, Daudon M, (2023) : Plantes médicinales utilisées dans le traitement de la lithiase rénale dans le Nord Est Algérien, hal-04064327, Open science.

Mocan Andrei et al., 2022: Mocan Andrei, Fernandes Ângela, Calhelha Ricardo C., Gavrilaş Laura, Ferreira Isabel C. F. R., Ivanov Marija, Sokovic Marina, Barros Lillian, Babotă Mihai (2022): Bioactive Compounds and Functional Properties of Herbal Preparations of *Cystus creticus* L. Collected from Rhodes Island, *Frontiers in Nutrition*, VOL 9 2296-861X.

Price et al, 1978: Price, M.L.; Van Scoyoc, S; Butler, L.G. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agr. Food Chem.* 26:1214-1218.

Scalbert & Williamson, 2000: Scalbert A, Williamson G, (2000): Dietary intake and bioavailability of polyphénols *J Nutr.*130, 2073-2085.

Singleton et Ross en 1965: Singleton V.L., Rossi J.R,(1965): Colorimetry Of total phenolics with phosphomolybdic- phosphostungstic acid. *American Journal of Enology and viticulture*.1965, (16), 144.

S Parienté 2013 : Sophie Parienté, (2013) : Calcul rénal : causes, symptômes et traitement, *Doctissimo*.

Stoclet et al., 2004 : Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, OakMH, El Bedoui J, Chataigneau M, Schinikerth VB (2004) : Vascular protection by dietary polyphenols. Eur J Pharmacol, 500 :299-313.

TLILI, M. L. et al., (2020) : ML Tlili, R Hammoudi, K Dehak, HM Mahfoud (2020) : "Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de feuilles de *Pergularia tomentosa* issue D'EL OUED (Algérie)." Revue des bio ressources 10(2) : 11-11.

W Khitri et al.,2016 : W Khitri, N.L souffritoi, A. Tasfaout, A. Lardjamet A. Khalfa. (2016) : Plantes antilithiasiques utilisées en médecine traditionnelle dans la ville d'Oran, Algérie, Revue d'ethnoécologie, 9.

Weiguang et al., 2005: Yi W, Fischer J, Krewer G, Akoh CC (2005): Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. J Agric Food Chem. 53(18):7320-9.

ملخص

الهدف من العمل الحالي تحديد محتوى المركبات الفينولية في مستخلصات نبتة القاصة وتقييم نشاطها المضاد للأوكسدة، والتأثير المثبط لتفاعل التبلور أو كسالوكالسيك. النتائج أظهرت أن المستخلصات الواعدة للمركبات الفينولية وعلى وجه الخصوص المستخلصات المائية، سجلت المستخلصات الميثانولية أفضل مضادات للجذور الحرة، تم الكشف عن أهم تأثير مثبط مضاد للتحصي للمستخلصات المائية مع نسبة تثبيط 78,89%.

قيم معاملات الارتباط بين محتويات المركبات الفينولية والنشاط المضاد للتحصي تبين أن مساهمة هذه المركبات جزئية.

الكلمات المفتاحية: القاصة، النشاط المضاد للجذور الحرة، اكسالات الكالسيوم، تحص.

Résumé

Le présent travail a pour objectif de déterminer le contenu en composés phénoliques dans les extraits de *Cistus creticus* et d'évaluer leurs activités antiradicalaires et l'effet inhibiteur de la réaction de cristallisation oxalocalcique. Les résultats montrent que les extraits sont des sources prometteuses en composés phénoliques et notamment les extraits aqueux. Les extraits méthanoliques ont enregistré les meilleures activités antiradicalaires. L'effet inhibiteur antilithiasique le plus important a été révélé pour les extraits aqueux avec un pourcentage d'inhibition de 78,89%. Les valeurs des coefficients de corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité antilithiasique montre que la contribution de ces composés à cette activité est partielle.

Mots clés : *Cistus creticus*, DPPH, oxalocalcique, lithiase.

Abstract

The present study aims was to determine the total phenolic compound of *Cistus creticus* extracts, and to evaluate their antiradical activity and the inhibitory effect of the oxalocalcium crystallization reaction. The results shows that extracts are promising sources of phenolic compounds, particularly the aqueous extracts, and the methanolic extracts recorded the best anti radical activity. The most important anti lithiasis inhibitory effect was revealed for aqueous Extracts with 78.89% an inhibition percentage. The correlation coefficients values between the phenolic compounds content and the anti lithiasis activity show that the phenolic compounds contribute is partially.

KEY-WORDS: *Cistus creticus*, DPPH, oxalocalcic, lithiasis.