

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DES ETUDES SUPERIEURES DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGOUAT
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue l'obtention du diplôme master en biologie

Option : biochimie des produits naturels

Thème

*Contribution à l'étude de l'activité
antioxydante de l'extrait méthanolique de la
plante de genre Aristolochia sp.*

Présenté par :

M^{elle}.CHELLAMA KHAOULA

M^{elle}.TAIBAOUI ZOHRA

Encadré par :

M^{elle}.ZAKHROUF ZOHRA

M^m^E. NBEG HALIMA

Jury de soutenance :

Nom et Prénom

Mr BOUBRIMA Youcef

Mr BOUKEROUIS Djoudi

M^{elle} ZAKHROUF Zohra

M^m^E NBEG Halima

Qualité

Président

Examineur

Promotrice

Co-promotrice

JUIN 2016



Remerciement

Comme le veut la tradition, la page des remerciements, est une tâche difficile qu'aucune expression, ni aucun geste, ne peut combler nos sentiments envers les gens, à qui Ce mémoire n'aurait vu le jour sans la confiance, la patience et la générosité.

*En premier lieu, nous tenons à remercier notre **DIEU**, notre créateur pour nous avoir donné la force pour accomplir ce travail.*

*Nous remercions également le **Docteur GOUZI.H**. Nous sommes très sensibles à votre grande disponibilité, à vos encouragements, à la confiance que vous avez bien voulu placer en nous. Merci pour votre soutien inconditionné.*

Votre grande expérience et votre engagement que nous avons permis la réalisation de la PFE. Nous vous prions de bien vouloir trouver ici l'expression de nos profondes gratitudee et de nos profonds respects.

*Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à notre promotrice Melle **ZAKHROUF.Z**. Merci pour votre gentillesse, votre disponibilité et pour votre exigence en termes de rédaction notamment et qui ont permis indéniablement d'améliorer la qualité de ce travail.*

*Nous remercions notre co-promotrice Mm **NBEG.H**. Pour la confiance qu'elle nous a accordées en réalisant ce travail.*


*Nous remercions également l'enseignant **BEN NASER .F** de nos 'avoir facilités le travail au sein de laboratoire et de nos 'avoir aidé.*

*Nous tiens à exprimer nos gratitudee à Messieurs **BOUKEROUIS.D** pour le soutien et l'aide qu'ils nous ont attribué.*

*Nous remercions les membres du jury les Professeurs **BOUBRIMA. Y** et **BOUKEROUIS .D** : en acceptant de lire, instruire et juger ce mémoire. Merci pour votre contribution à l'amélioration de ce document. Trouvez ici l'expression de toute notre reconnaissance.*

Je tiens à remercier aussi les membres de l'équipe PFE, en particulier ,Maseouda ben Tairiche. Roukia, Linda et khaltoum,Imane pour leur soutien moral et leur disponibilité.

Nous remercions également tous les ingénieurs de laboratoire qui nous avons beaucoup aidés à réaliser ce travail dans des bonnes conditions





DEDICACES

A mes parents

*Qui ont toujours cru en moi
Qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras*

A mes sœurs et frères

*Yamina, Fadila, Maria; Abdo Rahmane, Khaled, Abou Baker
Qui m'ont poussé à continuer*

A mes Familles

Chellama et Ben Sàada

A mon professeur

Pour le savoir qu'il m'a transmis

A mes proches amis

Loubna.Ch ; Amal.G ; Asma.S

Pour leur soutien

A mes nièces

Fatima Z, Hanaa, Rania.

****Khaoula****





D

édicace

Je dédie ce travail à mes
parents qui ont été toujours à
mes côtés pour me soutenir et
me donner le courage pour
terminer mes études.

Merci beaucoup papa et maman je vous aime beaucoup

A mes frères qui m'a beaucoup aidé dans la vie et ma
soutenu

A mes sœurs je remercie beaucoup pour leurs aides,
soutien moral et l'encouragement

Les cerises sur les gâteaux mes neveux et nièces .et a
toute la famille

Liste des tableaux	page
Tableau I.1 : classification de plante	4
Tableau I.2 : classification des composés phénoliques	7
Tableau I.3 : activités biologiques des composés polyphénoliques.....	11
Tableau II.1 : les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques.....	14
Tableau II. 2: les principales affections liées à la production des EO.....	17
Tableau II. 3 : principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées.....	19
Tableau III. 1: les produits chimiques et les réactifs.....	22
Tableau III.2 : appareils et instruments.....	23
Tableau IV-1 : tableau regroupant les rendements des deux extraits.....	31
Tableau IV-2 :rapports frontaux pour la plaque de CCM	37

Liste des figures	page
Figure I.1 : quelque exemples des especes d' <i>Aristolochia</i> ; A : <i>A. arborea</i> <i>A. macrophylla</i> ; B : <i>A. lindneri</i> ; C : <i>A. macrophylla</i> ; D : <i>A. pistolochia</i>	4
Figure.I.2 : A : <i>Aristolochia littoralis</i> , aspect extérieur de la fleur de profil et de face B : <i>Aristolochia altanii</i> , racine ,C: <i>Aristolochia clematitis</i> , coupe longitudinale de la fleur et détail de l'androcée et du gynécée , D : <i>Aristolochia sp.</i> , diagramme floral.....	5
Figure I.3 : classification et structure des polyphenols natureles	6
Figure I.4 principaux acides hydroxycinnamiques	7
Figure I.5 : principaux acides hydroxybenzoïques.....	8
Figure I.6 : principaux types de coumarines.....	8
Figure I.7 : définition des différents types de flavonoïdes à partir du squelette flavane.....	9
Figure I.8 : structure de base des tanins condensés.....	10
FigureII.1 : cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR	16
Figure II. 2 : structure chimique du β -carotène.....	20
Figure II.3 : model expliquant les étapes de carcinogénèse et les effets potentiels Des polyphénols sur la progression du cancer.....	21
Figure III.1 : les racines d' <i>Aristolichia</i>	23
FigureIII.2 : les étapes d'extraction.....	24
FigureIII.3 : le protocole d'extraction liquide –liquide de différentes phases.....	25
FigureIII.4 : structure de l'acide gallique.....	26
Figure III.5 :structure de Quercétine.....	27
Figure III.6 : développement chromatographique d'une plaque.....	30
Figure IV-1 : histogramme des rendements d'extraction.....	31
Figure IV-2 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	32
Figure IV-3 : courbe d'étalonnage de quercitine.....	33
Figure IV-4 : activité antiradicalaire A : l'extrait méthanolique et B :d'acide Ascorbique.....	34
Figure IV-5 : activité réductrice par la méthode de FRAP A : l'acide ascorbique B :extrait méthanolique	36
Figure IV-6 : système de solvant utilise chloroforme/méthanol/eau Observe au visible (1:extrait méthanolique de plante, 2 :quercitine,3:acide gallique.....	38

Liste des abréviations

Abs	Absorption.
AlCl₃	Trichlorure d'aluminium
PBS	Tampon phosphate salin
C	Concentration.
C°	Degré.
CCM	Chromatographie sur Couche Mince.
D	Nombre de dilution.
DPPH	1,1-diphényle-2-picrylhydrazyl.
EAG	Equivalent acide gallique.
EQ	Equivalent quercetine.
ERO	Espèce réactif de l'oxygène.
FRAP	Ferric reducing / Antioxydant power.
G/l	Gramme par litre.
G	Gramme.
C	Concentration.
IC₅₀	inhibitrice IC ₅₀ .
L	Litre.
M	Molaire.
m	masse.
mg/g	Milligramme par gramme.
mg/ml	Milligramme par millilitre.
Min	Minute.
ml	Millilitre.
μl	Microlitre.
Na₂CO₃	Bicarbonates de sodium.
Nm	Nanomètre.
NO	Oxyde nitrique.
R f	Rapport frontal.
ROS	Radicaux organiques.
S	Seconde.
TCA	Acide trichloroacétique
UV	Ultra-violet.
VC	Vitamine C ou acide ascorbique.
μ	Micro.
%	Pourcentage.

Résumé

Notre étude a pour objectif de évaluer la teneur en composés phénoliques et d'étudier l'activité antioxydante d'une plante répandue en Algérie appelée Aristolochia sp (Ben Rostoum). Cette plante est largement utilisée en médecine traditionnelle pour ses propriétés biologiques attribuées essentiellement aux polyphénols.

Afin d'évaluer la meilleure moyenne d'extraction des composés phénoliques par la macération, deux solvants (méthanol/eau, chloroforme) sont utilisés. Le meilleur rendement d'extraction est enregistré par le premier système de solvant soit une moyenne de 09.007 %. Pour la quantification des composés phénoliques on a utilisé seulement l'extrait méthanolique, la méthode de folin et la quantification des flavonoïdes par la méthode de AlCl₃ ont révélé une teneur d'Aristolochia sp en polyphénols (194.4 ± 0.217 mg EAG/100g) et en flavonoïdes (115.6 ± 0.158 mg EQ/100g). L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique a été évaluée par deux méthodes et comparé avec de standard Vitamine C. Pour le test le piégeage du radical libre DPPH, l'extrait de la plante obtenue in situ est doté d'un bon pouvoir antioxydant ($IC_{50}=0,166$ mg/ml), avec une efficacité plus grande par rapport à celle exprimée par l'acide ascorbique ($IC_{50}=0.146$ mg/ml) pour la méthode de FRAP, le pouvoir réducteur de l'extrait des racines $EC_{50}=19.22\mu\text{g/ml}$ est moins élevé comparé à celui de standard $EC_{50}=14.96\mu\text{g/ml}$. La chromatographie sur couche mince, appliquée à la fin de ce travail, montre des profils de séparation, indiquant la présence de nombreux constituants, parmi lesquels l'acide gallique et le quercétine.

Mots-clés: Extraction, composés phénoliques, activité antioxydant, le piégeage du radical libre DPPH, la réduction du fer, CCM, Aristolochia sp.

Abstract

Our study has for objective to evaluate the content in phenolic compounds and to study the antioxidant activity of a plant widely found in Algeria called Aristolochia sp (Ben Rostoum). This plant is frequently used in traditional medicine for its biological properties attributed essentially to polyphenols. To estimate the best method of extraction of the phenolic compounds by the maceration two solvents (methanol / water, chloroform) are used. The best yield on extraction is recorded by the first system of solvent with an average of 09.007 %. For The quantification of phenolic compounds, the méthanolique extract was used, the method of folin and the quantification of flavonoids by the method of AlCl₃ revealed the wealth of Aristolochia sp in polyphenols (194.4 ± 0.217 mg EAG / 100g) and in flavonoids (115.6 ± 0.158 mg EQ / 100g).The antioxidant activity of the extract méthanolique was estimated by two methods and compared with standard Vitamin C; the trapping of the free radical DPPH and the reduction of the iron Fe. In the test of the activity anti DPPH, the méthanoïque extract of the roots of Aristolochia sp showed the higher antioxidant activity ($CI_{50}=0,166$ mg/ml) compared with vtamineC ($CI_{50}=0.146$ mg/ml), for the reducing power by FRAP method, of the extract of roots is raised $CE_{50}=19.22\mu\text{g/ml}$ but still less compared with the standard $CE_{50}=14.96\mu\text{g/ml}$. The chromatography on thin layer, applied to the end of this work, data of the profiles of separation, indicated the presence of some constituents, among which the Gallic acid and quercetin.**Keywords:** extraction, phenolic compounds, activity antioxidant, the trapping of the free radical DPPH, the reduction of the iron, CCM, Aristolochia sp.

ملخص

تهدف دراستنا إلى اختبار المحتوى الفينولي و دراسة النشاط المضاد للأكسدة لعينة نباتية تدعى بن رستم اخذت من منطقة في الجزائر . يستخدم هذا النبات على نطاق واسع في الطب التقليدي ل خصائصه البيولوجية يعزى في المقام الأول إلى مادة البوليفينول من أجل تقييم أفضل طريقة ل استخراج المركبات الفينولية من قبل النقع استخدمنا اثنين من المذيبات (الميثانول / الماء ، الكلوروفورم) . يتم تسجيل أفضل عائد الاستخراج عن طريق أول نظام المذيبات في المتوسط من 09.007 % . لكي نحدد المركبات الفينولية استخدمنا فقط محلول الميثانويك ، وطريقة فولين وتقدير من الفلافونويد بمحلول ثلاثي الكلور الالمنيوم AICI3 لكشف ثروة نبتة برستم : البوليفينول (SGA 194.4 ± 0.217 ملغ / 100غ) و مركبات الفلافونويد (0.158 ± 115.6 ملغ مكافئ / 100غ) تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص المثلي من قبل طريقتين و مقارنتها مع مستوى فيتامين C ؛ DPPH و ارجاع الحديد . في اختبار لمكافحة النشاط -DPPH ,استخرجت من جذور بن رستم أظهرت أعلى نشاط مضاد للأكسدة بنسبة (80 %) الفاعلية المضادة للأكسدة المستخرجة من جذور بن رستم مرتفعة مقارنة بالمعايير .

تقنية الكروماتوغرافيا ccm ، وتطبيقها نهاية هذا العمل ، تظهر لنا ملامح الانفصال ، مشيرا إلى وجود العديد من العناصر ، بما في ذلك حمض الغاليك ، كيرسيتين

كلمات البحث: استخراج ، المركبات الفينولية ، والنشاط المضادة للأكسدة ، DPPH ، وانخفاض الحديد ، CCM ، بن رستم

Remercîment	
Dédicace	
Liste des tableaux.....	I
Listes des figures	II
Liste des abréviations	III
Résumé.....	IV
Abstract	V
ملخص	VI

Sommaire

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

Partie I : Etude bibliographique

Chapitre I : LES PLANTES MEDCINALES ET LES POLYPHENOLES

I.Histoire et popularité des phytothérapies.....	3
II.Présentation de la plante étudiée.....	3
II.1.Btanique.....	4
II.2.composition chimique.....	4
II.3. Utilisation traditionnelle.....	5
III. Métabolites secondaires.....	5
a)Classification des métabolite secondaire	
III.1.Les composés phénoliques	5
a)Classification	
III.1.1.Principales classes des polyphénols	7
III.1.2.Les acides phénoliques simples.....	7
a)Acides hydroxycinnamiques.....	
b) Acides hydroxybenzoïques	7
c)Les coumarines.....	8
III.1.3.Les flavonoïde.....	8
III.1.4.les tanins	9
a)Les tanins hydrolysables	9
b) Tanins condensés (proanthocyanidines).....	9
IV.Activités biologiques des polyphénols.....	10
IV.1.Intérêts thérapeutiques des polyphénols.....	11

Chapitre II : LE STRESS OXYDANT ET LES ANTIOXYDANT

II.1.LE STRESS OXYDANT	13
II.1.1.Historique	13

II.1.2.Définition d'un radical libre.....	13
II.1.3.Production de radicaux libres.....	15
II.1.4.Stress oxydant et ses conséquences biologiques.....	15
II.1.5.Implications pathologiques des EOR	16
II.1.6.Réaction de l'organisme vis-à-vis des radicaux libres.....	17
II.2.LES ANTIOXYDANTS.....	17
II.2.1.Mécanismes d'action des antioxydants	18
II.2.2.Les sources d'antioxydants.....	18
II.2.2.1. Les médicaments.....	18
II.2.2.2. L'alimentation.....	18
1). Les antioxydants naturels.....	18

Chapitre III : Matériels et Méthodes

III.1. Produits et Appareils utilisés	22
III.1.1. Produits chimiques	22
III.2 .Appareils et instruments	23
III.3.Matériel végétal	23
III.4.Méthode d'extraction (fractionnement liquide-liquide).....	24
III.4.1. Macération Principe.....	24
III.5.Analyse quantitative des composés phénoliques	26
III.5.1. Dosage des composés phénoliques totaux	26
III.5.1.1.Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	26
III.5.2.Dosage des flavonoïdes.....	27
III.5.2.1.Courbe d'étalonnage	27
III.6.Evaluation de l'activité antioxydant.....	27
III.6.1.Test au DPPH	27
III.6.2.Le pouvoir réducteur des composés phénoliques (Reducing Power Assay) par la méthode de FRAP	28
III.7. Analyse qualitative	29
III.7.1.Chromatographie sur couche mince.....	29

Chapitre VI : Résultats et Discussion

IV . Résultats et discussion	31
IV .1 Détermination de rendement d'extraction	31
IV.2 Quantification des composés phénoliques	32
IV.2.1 .Dosage des composés phénoliques totaux.....	32
IV.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	33
IV.3. L'étude du pouvoir antioxydant	34
IV.3 .1. Effet scavenger du radical DPPH.....	34
IV-3 .2.Analyse de pouvoir réducteur par la méthode de FRAP	35
IV-4.Analyse qualitative par Chromatographie sur couche mince	37
Conclusion.....	39
Référence	41

Introduction

Introduction générale

La médecine traditionnelle demeure le recours principal d'une grande majorité des populations pour résoudre leurs problèmes de santé, non seulement du fait qu'elle constitue un élément important du patrimoine culturel, mais aussi pour les moyens financiers limités face aux produits conventionnels (**Kone., 2009**).

Un grand nombre de plante, aromatiques, médicinales, des plantes épicées et autres possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent application dans divers domaines à savoir en alimentation, médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture.

Cependant, l'évaluation des propriétés phytotérapeutiques comme antioxydante et antimicrobienne, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine et les traditions médicinales folkloriques. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs. En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels les composés phénoliques. On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques, il reste difficile de définir les molécules responsables de l'action (**Larousse encyclopédie des plantes médicinales ., 2001**). Beaucoup de métabolites secondaires sont également importants pour notre alimentation (goût, couleur), alors que d'autres ont une application commerciale dans les domaines pharmaceutiques et biomédicaux et font partie des drogues, colorants, arômes, parfums et des insecticides (**Cordell et al ., 2005**).

Le continent africain est un des continents dotés d'une biodiversité la plus riche dans le monde; plus de 5000 de substances naturelles différentes ont été identifiées.

La flore Algérienne est caractérisée par sa grande biodiversité, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeable (15%) d'espèces endémiques (**Teixeira et al., 2004**). Ce qui a donné à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable (**Sabouni et al., 2012**).

Pour la présente étude, nous avons choisi l'*Aristolochia sp*, une des plantes médicinales spontanées qui est fréquemment utilisée dans la médecine traditionnelle pour le traitement des différentes maladies y compris les palpitations de l'aorte abdominale, les maladies digestives et le cancer.

Ce pendant le genre *Aristolochie* est classé parmi les plantes dangereuses pour la santé humaine puisqu'il renferme les acides aristolochiques qui sont avérés cancérigènes, Cette plante *Aristolochia sp* a connu une large utilisation, en phytothérapie, malheureusement, le coté toxique de cette plante est mal étudié (**Bouayed.,2007**).

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une contribution à une meilleure connaissance de cette plante médicinale, évalue la teneur en phénol totaux et étudier l'activité antioxydante de cette plante. Dans ce contexte notre étude vise les objectifs suivants :

- Analyse quantitative et du contenu en polyphénols et en flavonoïdes d'extrait de la plante (fraction méthanolique) ;
- Etude de l'activité antioxydante par deux méthodes ;
 - Evaluation du pouvoir piègeur (scavenger) des extraits vis-à-vis d'un radical libre relativement stable (DPPH).
 - Pouvoirs réducteur (FRAP).
- Analyse qualitative par CCM.

Synthèse bibliographique

I. Histoire et popularité des phytothérapies

La phytothérapie existe depuis la préhistoire. Les hommes de Neandertal étaient inhumés avec des plantes dont on sait maintenant qu'elles ont des propriétés médicinales. Les premiers peuples ont probablement découvert ces propriétés de façon empirique au cours des siècles et, à chaque génération, ils ont ainsi accumulé des connaissances sur les plantes médicinales. Ces connaissances continuent de s'accroître aujourd'hui dans les régions du monde où les cultures indigènes ont échappé à l'influence destructrice de la société moderne (**Paul et Saunders ., 2005**).

Dans d'autres pays, l'information sur les plantes a été mise par écrit et organisée sous forme de longs textes appelés pharmacopées, qui expliquaient le mode de préparation de chaque plante et son emploi pour un traitement donné. Le choix des plantes et leur mode d'utilisation dépendaient de l'idée que la société concernée se faisait de la maladie. Par exemple, les peuples méditerranéens employaient l'ail pour éloigner les mauvais esprits qui, croyaient-ils, provoquaient la diarrhée, alors que les Chinois se servaient de l'ail pour guérir des maladies qui, selon eux, étaient dues à un dérangement de la rate et des reins (**Paul et Saunders ., 2005**).

La médecine traditionnelle demeure le recours principal d'une grande majorité des populations pour résoudre leurs problèmes de santé, non seulement du fait qu'elle constitue un élément important du patrimoine culturel, mais aussi pour les moyens financiers limités face aux produits conventionnels (**Kone, 2009**). Selon l'organisation mondiale de la santé, près de 80% des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire (**OMS, 2002**).

II. Présentation de la plante étudiée

Aristolochia constitué d'environ 550 espèces appartenant à quatre genres. Les genres sont regroupés en deux sous-familles, la *Asteroidea* et *Aristolochiaceae*. La classification actuelle au sein de la famille est fondée sur des preuves phylogénétique moléculaire, qui est congruent avec inflorescence et morphologie florale (**Wanke et al., 2006**). Les zones géographiques le plus riches en repartie sont : la Chine, le Mexique, le Brésil et Ispania (**Pfeifer, 1966; González et al ., 2014**).

Tableau I.1 : classification de plante.

Classification scientifique	Synonyme
Famille: <i>Aristolochiaceae</i> Sous famille: <i>Aristolochioideae</i> Genre: <i>Aristolochia</i> Espèces : Quelque exemples des espèces d' <i>Aristolochia</i> (Figure I.1).	Nom Grec : Aristolochos Anglais : Bracteated birthwort Arabe: ben rostome

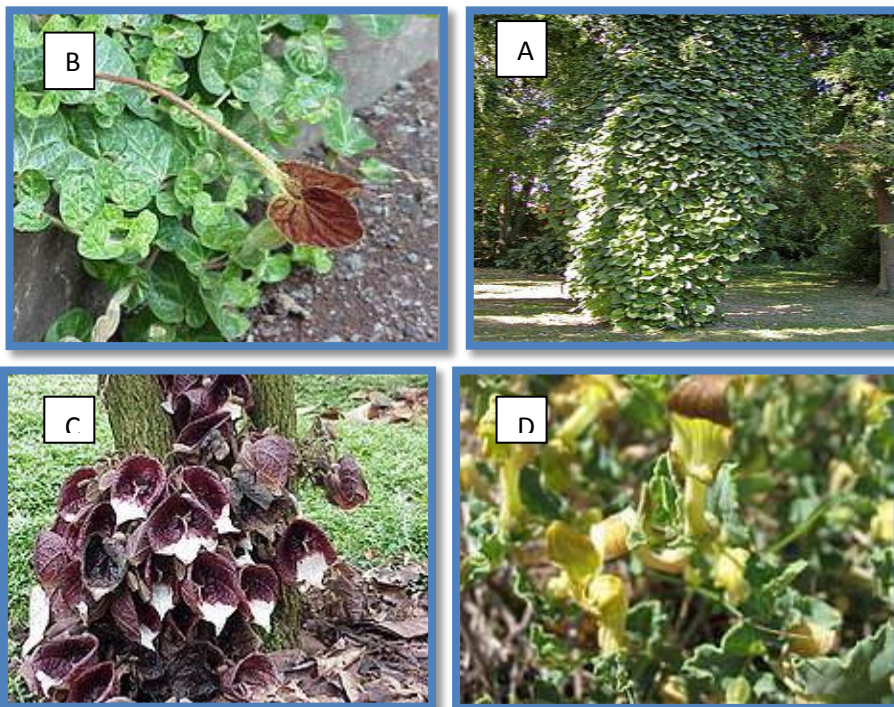


Figure I.1 : quelque exemples des especes d'*Aristolochia* ;**A** : *A. arborea*
A. macrophylla ; **B** : *A. lindneri* ; **C** : *A. macrophylla* ; **D** : *A. pistolochia*
 (Chawla *et al.* , 2013) online: www.uptodateresearchpublication.com.

III.1. Botanique

Il s'agit de **plantes herbacées vivaces ou d'arbustes**, plus rarement de **sous-arbrisseaux ou de lianes**, caducs ou persistants, normalement grimpants et fréquemment volubiles.

Les racines sont fréquemment tubéreuses.

Les **feuilles** simples et alternes, petiolées, sont entières ou composées de 3-7 lobes, pinnanervées+à palmatinervées et dépourvues de stipules.

Les **fleurs** (FF = [(3S) + (6E + (6C))]), parfois solitaires, sont axillaires, plus ou moins zygomorphes et bisexuées. Le périanthe se compose de 3 sépales unisériés soudés, formant à la base en un tube plus ou moins évasé, parfois courbé. Il y a 6 étamines disposées sur 1 seul

verticille, dépourvues de filets et aux anthères extrorses. Soudées au style, elles forment un gynostème. L'ovaire, infère, possède 6 carpelles soudés.

Ces fleurs sont souvent très parfumées, et ont développées un mécanisme intéressant de pollinisation. D'abord fonctionnellement femelle, elles attirent de nombreux petits insectes volants qui accèdent facilement au gynostème. En revanche, les poils du tube périanthaire s'opposent à leur sortie de la fleur. Prisonniers dans l'ampoule périanthaire, ils entrent en contact avec les lobes réceptifs du stigmate, ils y déposent leur pollen. Puis, les anthères s'ouvrent, les insectes reçoivent le pollen de la fleur, dont ils pourront assurer le transfert, car, entre temps, les poils périanthaires qui empêchaient leur sortie se sont flétris.

Le **fruit** est une capsule, généralement à 6 valves, à déhiscence apicale ou basale, rarement indéhiscente. Les graines, planes à planes convexes, avec ou sans ailes latérales, possèdent un funicule charnu (**Figure.I.2**).

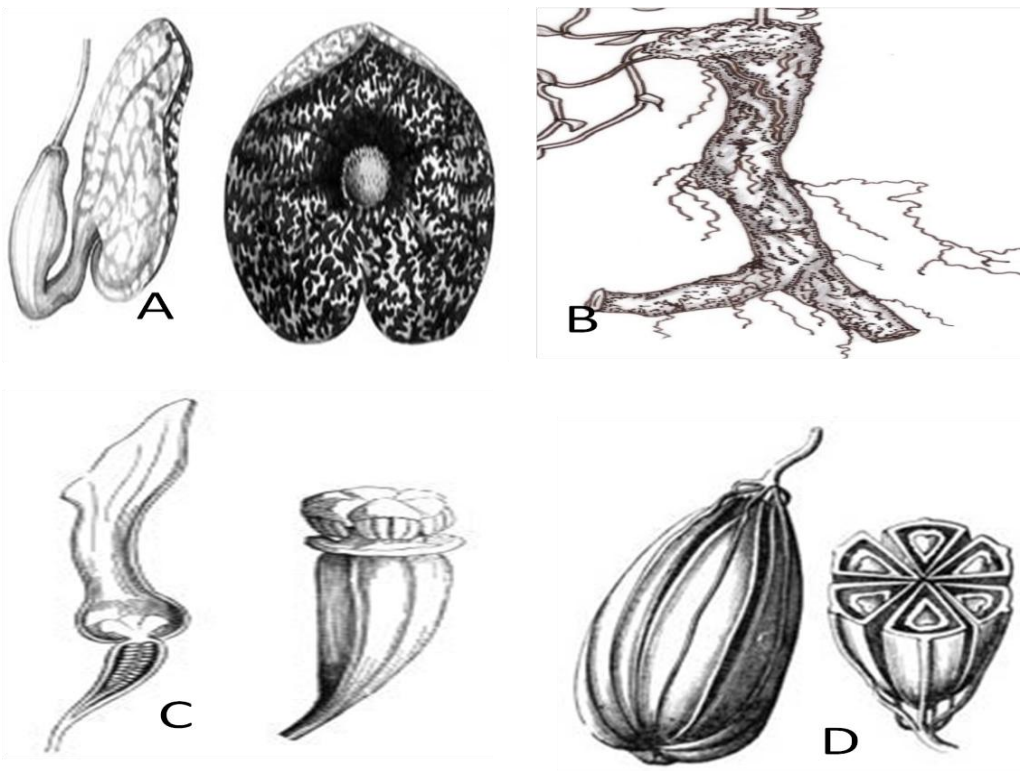


Figure.I.2 :A :*Aristolochia littoralis*, aspect extérieur de la fleur de profil et de face
 B :*Aristolochia altanii*, racine (Ahmet *et al.*, 2014), C: *Aristolochia clematitis*, coupe longitudinale de la fleur et détail de l'androcée et du gynécée, D :*Aristolochia sp.*, diagramme floral.
http://www.plantes-botanique.org/genre_aristolochia

II.2.composition chimique

Des nombreuses espèces d'*Aristolochia* sont importantes, ce genre a suscité beaucoup d'intérêt et le fait l'objet de nombreux produits chimiques et des études pharmacologiques. *Aristolochia* est un genres apparentés contiennent acide aristolochique, uniques à cette lignée, ainsi que des terpénoïdes (**Wu et al ., 2004**) .composé des deux acides cristallins dont l'identification de l'un des acides se fait avec l'acide aristolochique qui est toxique (**Burkill, 1985**). L'acide aristolochique a été en rapport avec le développement d'un nouveau néphropathies et le cancer neurothélial chez les patients néphropathie (**Volker et al ., 2002**).

II.3.Utilisation traditionnelle

Les espèces de *Aristolochia* sont largement utilisés pour des raison médicinale dans de nombreuses régions du monde et à la fois et d'un point de vue de la santé publique ce qui pose un risque (**Heinrich et al., 2009**).

Les racines, pulvérisées, associées au henné sont utilisées pour traiter les maladies de la peau et contre l'asthme (**Kahouadji, 1995**). Les racines L'Aristolochie sont utilisées pour le traitement de biimezoni (palpitations de l'aorte), de la constipation et des infections intestinales. Les racines sont aussi utilisées comme émético-cathartique et diurétique, dans les intoxications et comme alexitére (antidote des morsures de serpents) (**Bamm et Douira .,2002**).

III. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires végétaux peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes, par opposition aux métabolites primaires (protéines, lipides et glucides). Ces métabolites secondaires interviennent dans la structure des plantes (lignines et tannins) mais également, elles exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement (**Mansour., 2009**). Ils participent ainsi, d'une manière très efficace, dans la tolérance des végétaux à des stress variés : action anti-herbivore (menthe par exemple), inhibition des attaques pathogènes des bactéries et des champignons, prédation d'insectes, défense contre la sécheresse et lumière UV. Mais elles peuvent être antinutritifs. Beaucoup de métabolites secondaires sont toxiques, ils sont alors stockés dans des vésicules spécifiques ou dans la vacuole (**Sandrin., 2004**).

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on retrouve chez les plantes médicinales (**Mansour., 2009**).

A) Classification des Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont caractéristiques des plantes supérieures. Ces métabolites secondaires sont répartis en trois grandes familles chimiques : les composés phénoliques, les terpénoïdes et les alcaloïdes (Annou., 2014).

III. 1. Les composés phénoliques

Les polyphénols constituent une famille de molécules largement présente dans le règne végétal (Hagerman *et al.*, 1998). Ils sont caractérisés comme l'indique le nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement à masse moléculaire élevée. Ces composés sont le produit du métabolisme secondaire des plantes. Leur rôle d'antioxydants naturels dans les plantes est dû à leurs propriétés redox qui leur permettent d'agir soit comme des agents réducteurs (donneur d'hydrogène), piègeurs de l'oxygène singulet (O₂) ou des chélateurs de métaux. Les composés phénoliques constituent un des groupes les plus importants chez les végétaux, issus de la grande voie d'aromagenèse ; shikimates ou acide shikimique et de la voie acétate-malonate et peuvent être divisés en diverses classes sur la base de leur structure moléculaire, et plus de 8000 composés différents ont été décrits. Les plus abondants sont les acides phénols, les flavonoïdes, les stilbènes et les lignanes, dont les flavonoïdes et les acides phénols comptent 60% et 30%, respectivement, de polyphénols diététiques (fig I.1).

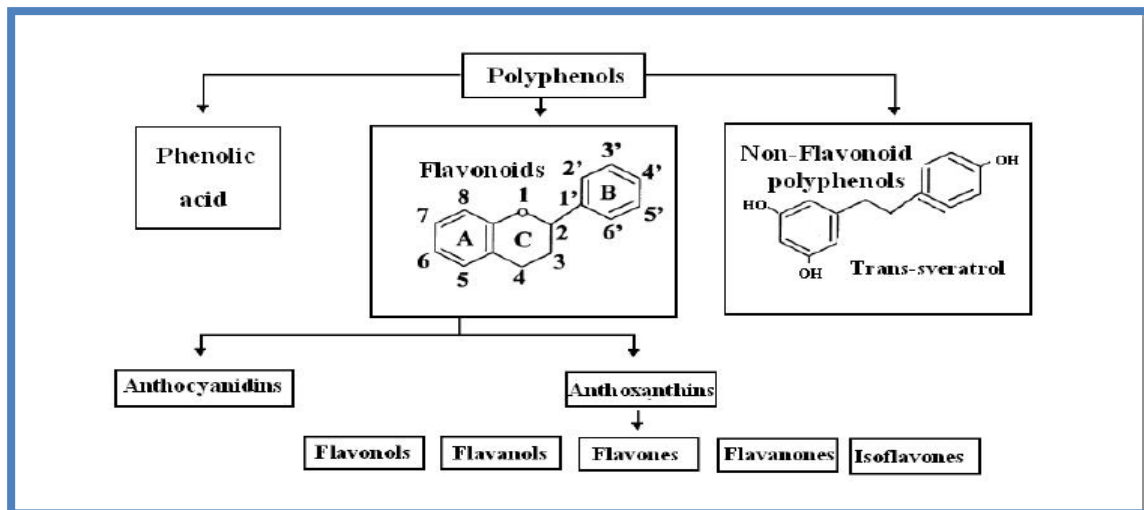


Figure I.3 : classification et structure des polyphénols naturels (Weinreb *et al.*, 2004).

A).Classification

L'élément structural fondamental qui caractérise les composés phénoliques est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside...) (**Bruneton., 1999**). Les composés phénoliques sont commodément classés selon le nombre d'atomes et de carbone dans le squelette de base (**Dacosta., 2003**) (**Tableau I.2**)

Tableau I.2 : Classification des composés phénoliques .

Structure	Classe
C6	Phénols simple
C6-C1	Acides phénoliques et composés dérivés
C6-C2	Acétophénone et acides phénylacétiques
C6-C3	Acides cinnamiques, coumarines, isocoumarines, chromones
C15	Flavanols, flavonones, anthocyanines et anthocyanidines
C30	Biflavonyles
C6- C1- C6,C6- C1- C6	Benzophénones, xanthones et stilbéne
C6, C10, C14	Quinones
C18	Bétacyanines
Lignanés ,neolignanés	Dimères ou oligomères
Lignine	Polymères
Tanins	Condensé et hydrolysable

III.1.1.Principales classes des polyphénols

III.1.2.Les acides phénoliques simples

a)Acides hydroxycinnamiques

Dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C6-C3). Existents souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent une réactivité chimique importante de ces molécules (**Fig. I.3**).

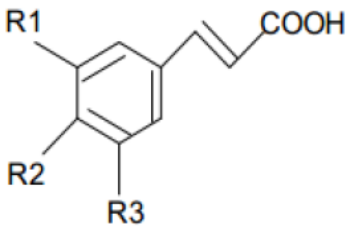
	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

Figure I.4. principaux acides hydroxycinnamiques (**Manchado et Cheynier, 2006**).

b) Acides hydroxybenzoïques

Sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C₆-C₁). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides. Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans (**figure I.5**).

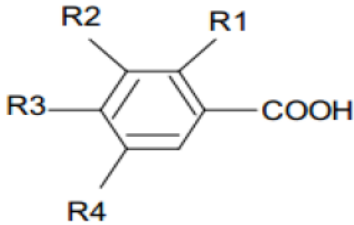
	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

Figure I.5: principaux acides hydroxybenzoïques (Manchado *et* Cheynier, 2006).

c) Les coumarines

Elles sont issues du métabolisme de la phénylalanine via un acide cinnamique, l'acide P coumarique. Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique (**Fig.I. 6**).

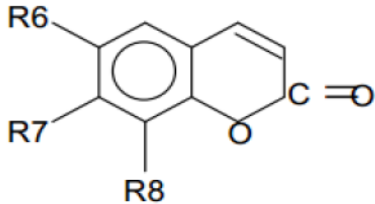
	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH3	OH	H	Scopolétole
	OCH3	OH	OH	Fraxétole
	H	OH	OH	Daphnétole

Figure I.6 : principaux types de coumarines (Macheix *et al.*, 2005).

III.1.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs et des fruits. Ils existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides : les flavonosides. Ils sont très largement répandus dans le règne végétal (les fruits, les légumes, les graines ou encore les racines des plantes) (**Fiorucci., 2006**). Les

familles les plus riches en flavonoïdes sont : *Fabacées*, *Myrtacées* et *Polygonacées* (Ghestem *et al.*, 2001). Tous les flavonoïdes (plus de 6000 structures) possèdent le même élément structural de base : le noyau flavane constitué de deux noyaux aromatique A et B et d'un hétérocycle oxygéné central C (Bruneton.,1999 ; Reynaud *et Lussignol.*, 2005) (Fig I.7).

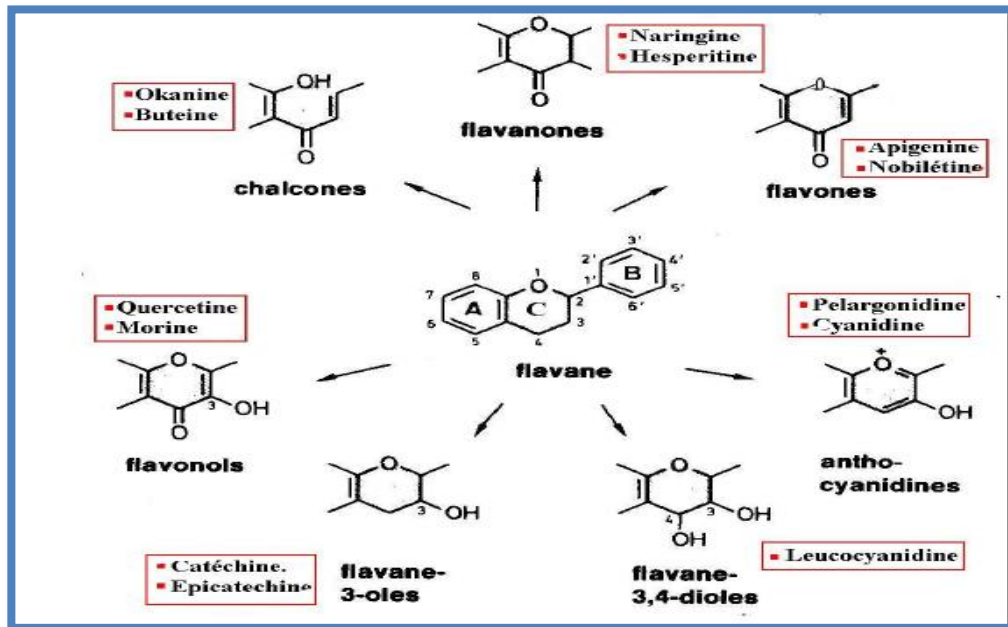


Figure I.7 : définition des différents types de flavonoïdes à partir du squelette flavane (Dacosta., 2003 ; Louis., 2004).

III.1.4. Les tanins

Les tanins sont des composés phénoliques très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes (tanins condensés) et les dicotylédones (tanins hydrolysables). Ces composés ont la capacité de se combiner et de précipiter les protéines. Ces combinaisons varient d'une protéine à une autre selon les degrés d'affinités (Harborne., 1992).

Le terme tannin vient de la source de tanins utilisée pour le tannage des peaux d'animaux en cuir. Dans ce processus, les molécules de tanins se lient aux protéines par des liaisons résistantes aux attaques fongiques et bactériennes. Le poids moléculaire des tanins varie entre 500 et 2000 K Da (3000 pour les structures les plus complexes) (Hagerman *et Butler.*, 1981). Deux groupes de tanins différents aussi bien par leur structure que par leur origine biogénétique sont distingués : les tanins hydrolysables et les tanins vrais.

a) Les tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des esters du glucose et d'acides phénols que sont l'acide gallique (tanins galliques) et l'acide éllagique (tanins éllagiques). Leurs polymères sont appelés des tannoïdes. Ils sont caractéristiques des Angiospermes dicotylédones.

b) Tanins condensés (proanthocyanidines)

De structure plus complexe, ils sont de loin les tanins les plus largement rencontrés dans les plantes vasculaires, des dicotylédones aux plantes plus primitives, fougères et gymnospermes. Ce sont des polymères de flavan-3-oles (Catéchine) et de flavan-3,4-dioles (leucoanthocyanidines), ou un mélange des deux.

Les chaînes de polymères comptent de 2 à 20 unités environ, et il existe de nombreuses hydroxylations possibles en différents endroits de chaque monomère. Cette diversité structurale explique les variations d'activité biologique (**Okamura *et al.*, 1993 ; Aganga et Mosase., 2001 ; Peronny, 2005**).

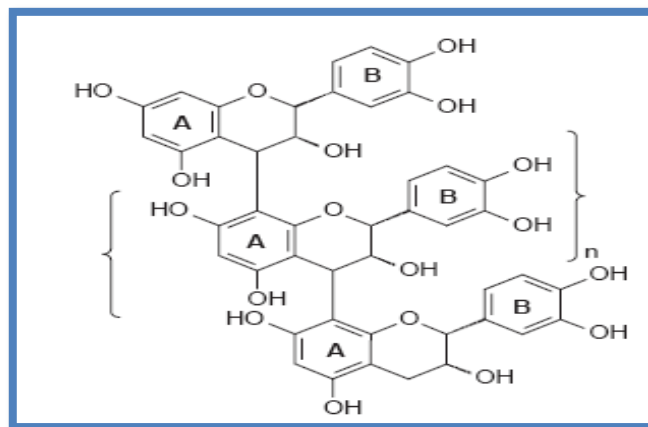


Figure I.8 : structure de base des tanins condensés (*Li., 2004*).

IV. Activités biologiques des polyphénols

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques interviennent dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures Mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (**Bahorun., 1997**). Ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux (**Babar *et al.*, 2007**), anti-allergènes, vasodilatateurs (**Feboulaaba *et al.*, 2008**) et antioxydants (**Gomez *et al.*, 2006**).

Tableau I.3: activités biologiques des composés polyphénoliques d'après (Frankel *et al.*1995).

Polyphénols	Activités	Auteurs
Acidesphénols (cinnamique et benzoïque)	Antibactérienne antifongique Antioxydant	<i>Didry et al.</i> ,1982 <i>Ravn et al.</i> ,1984 <i>Hayase et kato.</i> , 1984
Coumarine	Vasoprotectrices et Antioedemateuses	<i>Mabry et Ulubelen.</i> ,1980
Flavonoïdes	Anti-inflammatoire Anti -tumoraux Anti -carcinogènes Hypotenseurs et diurétiques Antioxydant	<i>Stavrice.</i> ,1992 <i>Das et al.</i> ,1994 <i>Bidet et al.</i> ,1987 <i>Bruneten</i> ,1993 <i>Aruoma et al.</i> ,1995
Anthocyane	Protection des veines et capillaires	<i>Bruneten</i> ,1993
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydants Antitumorales Antifongique Anti-inflammatoires	<i>Masquelier et al.</i> ,1979 <i>Bahorun et al.</i> ,1996 <i>DEOliveir et al.</i> ,1972 <i>DEOliveir et al.</i> ,1972 <i>Brownlee et al.</i> ,1992
Tanins galliques et catéchiques	Antioxydants	<i>Okuda et al.</i> ,1983 <i>Okamura.</i> ,1993

IV.1.Intérêts thérapeutiques des polyphénols

La principale caractéristique des polyphénols c'est qu'ils sont des agents antioxydants très puissants. En effet, ils sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. Cette même activité antioxydante permet aux polyphénols de réguler les radicaux libres bon-mauvais, comme l'oxyde nitrique qui favorise une bonne circulation sanguine, coordonne l'activité du système immunitaire avec celle du cerveau et module la communication entre les cellules de ce dernier (Akroum ., 2010). L'activité antioxydante des polyphénols peut s'exercer sur les transporteurs des lipides du sang et tout particulièrement sur le « mauvais » transporteur du cholestérol (les LDL ou les lipoprotéines de faible densité). Les polyphénols empêchent ainsi la formation des LDL oxydés, formation qui rend place lors d'états pathologiques variés caractérisés par un stress oxydatif (Descheemaeker., 2003). Ils aident à combattre l'inflammation et réduisent la fragilité des capillaires, ils réduisent les effets du diabète et protègent la peau contre les rayons ultraviolets en diminuant les dommages causés par les rayons solaires (Spiller ., 2007). De nombreuses études épidémiologiques montrent qu'une alimentation riche en polyphénols diminue le risque des maladies chroniques (Nève., 2002).

II.1.LE STRESS OXYDANT

II.1.1.Historique

Radicaux libres, les espèces réactives d'oxygène (ERO), le stress oxydant et antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public. Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisqu'il faut rappeler que dans le milieu des années 50, R. Gerschman puis D. Hartman évoquaient déjà la toxicité de l'oxygène et la « free radical theory » pour expliquer le processus du vieillissement. En 1969, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains un système enzymatique antioxydant la SOD, démontrant ainsi pour la première fois que notre organisme produit bel et bien des ERO dont il doit se protéger. Cette découverte sera le point de départ d'une intense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants (**Favier., 2003**).

II.2.Définition d'un radical libre

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (**Dacosta., 2003 ; Vansant., 2004**).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires [Radical peroxyde (ROO•), Radical alkoxyde (RO•)], se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Novelli, 1997**).

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (**ROS**). Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit [radical superoxyde ($O_2 \cdot^-$), radical hydroxyl (OH•), monoxyde d'azote (NO•)], mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante [l'oxygène singulet (1O_2), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), peroxyde d'azote ($ONOO^-$)] (**Tableau II.1**) (**Dacosta, 2003 ; Favier., 2003**).

Tableau II.1 : les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (Bartosz., 2003).

nomenclature	Structure	principales réactions
Superoxyde	$\bullet\text{O}=\text{O}-$	Catalyseur de la réaction de Haber-WeiB par recyclage de Fe^{2+} et Cu^+ ; formation du peroxyde d'hydrogène et peroxydinitrite
Peroxyde d'hydrogène	$\text{HO}=\text{OH}$	Formation du radical hydroxyle ; inactivation d'enzymes ; oxydation de biomolécules
Radical hydroxyle	$\bullet\text{OH}$	abstraction de l'hydrogène, production de radicaux libres et peroxydes lipidiques, oxydation des thiols
ozone	$-\text{O}=\text{O}+=\text{O}$	Oxydation de biomolécules, spécialement celles contenant des doubles liaisons, formations des ozonides et des aldéhydes cytotoxiques
Oxygène singulet	$\bullet\text{O}=\text{O}$	Réaction avec les doubles liaisons, formation de peroxydes, décomposition des aminoacides et nucléotides
Oxyde nitrique	$\bullet\text{N}=\text{O}$	Formation de peroxydinitrite, réaction avec autres Radicaux
peroxydinitrite	$\text{O}=\text{N}=\text{O}=\text{O}-$	Formation du radical hydroxyle, oxydation des groupements thiols et aromatiques, conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase, oxydation des biomolécules
Hypochlorite	$\text{ClO}-$	Oxydation des groupements amine et sulfure, formation de chlore
radical	$\text{R}\bullet$	abstraction de l'hydrogène, formation des radicaux peroxy et autres radicaux, décomposition de lipides et autres biomolécules
Radical peroxy	$\text{R}=\text{O}=\text{O}\bullet$	abstraction de l'hydrogène, formation des radicaux, décomposition de lipides et autres biomolécules
Hydroperoxyde	$\text{R}=\text{O}=\text{OH}$	Oxydation de biomolécules, destruction de membranes biologiques
ions fer et cuivre	$\text{Cu}^{2+}, \text{Fe}^{3+}$	Formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton et Haber-WeiB

II.3. Production de radicaux libres

Dans l'organisme, la production physiologique d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) se fait de manière continue. Ils ont un rôle essentiel à jouer dans certaines fonctions biologiques telles la phagocytose, la régulation de la croissance cellulaire et des signaux intercellulaires et la synthèse d'importants composés organiques. Toutefois, en concentrations élevées, ils deviennent hautement cytotoxiques en engendrant de sérieuses altérations aux cellules pouvant mener à la mort cellulaire. Les facteurs responsables de l'augmentation de la production de radicaux libres par l'organisme sont appelés facteurs oxydants. Ils se divisent en facteurs endogènes et exogènes. (Favier, 2003).

II.4. Stress oxydant et ses conséquences biologiques

Le stress oxydatif réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défenses antioxydants, que ce soit par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution des défenses antioxydants (Sorg, 2004). Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents pro oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques) (Pincemail *et al.*, 2002 ; Sorg, 2004 ; Ramonatxo., 2006).

La principale source de ROS est la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire, elle produirait en effet 90% des ROS cellulaires. Il existe de nombreuses autres sources parmi lesquelles l'autooxydation des petites molécules, Les cyclooxygénases et lipooxygénases, la xanthine oxydase et la NADPH oxydase, le réticulum endoplasmique et les peroxysomes. L'auto-oxydation de la dopamine est en partie impliquée dans le processus apoptotique lors de pathologies neurodégénératives, notamment lors de la maladie de Parkinson. (Mohammedi ., 2012).

L'accumulation des EOR a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines les lipides et l'acide désoxyribonucléique (Halliwell *et Whiteman* 2004; Valko *et al.*, 2006) (Figure I.1).

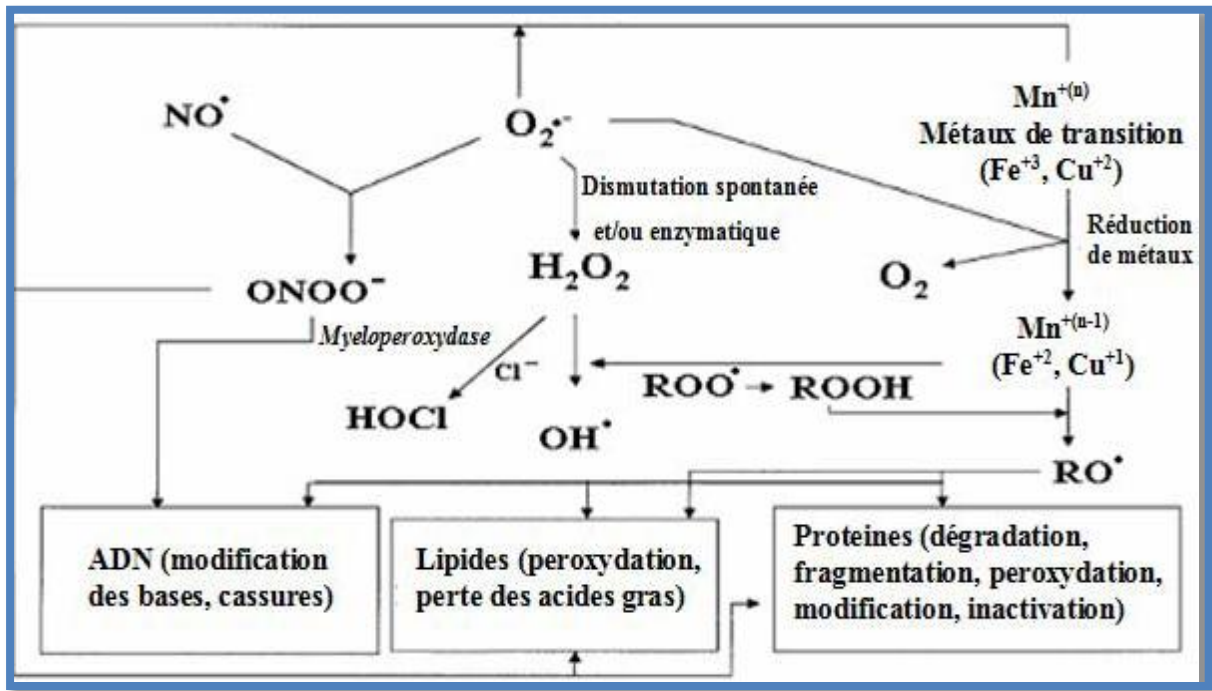


Figure II.1 : cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR
(Kohen *et Nyska.*, 2002).

II.5. Implications pathologiques des EOR

En raison de leur réactivité élevée, les EOR interagissent avec toute une série de substrats biologiques conduisant à l'altération de l'homéostasie cellulaire de l'organisme. Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine de phénomènes du stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution est maintenant largement démontré (Favier, 2003). En fait, de nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes (Pincemail *et al.*, 2002) allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies .

Inflammatoires,, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète (Tableau II. 2). Le rôle du stress oxydant à été également évoqué même dans des processus physiologiques tel que le vieillissement (Martinez, 1995 ; Lehucher *et al.*, 2001 ; Sorg, 2004 ; Valko *et al.*, 2007).

La multiplicité des conséquences médicales de ce stress n'a rien de surprenant car, selon les maladies, celui-ci se localisera à un tissu et à des types cellulaires particuliers, mettra en jeu des espèces radicalaires différentes et sera associé à d'autres facteurs variables et à des

anomalies génétiques spécifiques à chaque individu. De plus, La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux avec une diminution de l'efficacité des systèmes de réparations et de dégradations des constituants oxydés (Sohal *et al.*, 2002).

Tableau II. 2: les principales affections liées à la production des EO (Meziti, 2009).

<i>Pathologies</i>	<i>Références</i>
Lésions de reperfusion post-ischémique	(Zweier et Talukder, 2006)
Maladies auto-immunes	(Halliwell et guetteridge, 1999)
Arthrite rhumatoïde	(Ahsan et al., 2003)
Maladies inflammatoires	(Densiov et Afanas'ev, 2005)
Athérosclérose	(Harrison et al, 2003)
Maladies d'Alzheimer, de parkinson	(Sorg, 2004)
Emphysème	(Lechuer-Michel et al., 2001)
Diabète sucré	(Pal Yu, 1994)
Certains cancers	(Valko et al., 2007)
Anémie drépanocytaire	(Martinez-Cayuela, 1995)

II.6. Réaction de l'organisme vis-à-vis des radicaux libres

L'organisme se défend contre les radicaux par le biais d'enzymes qui les neutralisent comme la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase.

Cependant, lorsque la quantité de radicaux libres est trop importante, les cellules n'arrivent pas toujours à produire suffisamment d'antioxydants. Il semble ainsi que les formes réactives de l'O₂ soient en partie à l'origine de nombreuses maladies comme Alzheimer, Parkinson, l'athérosclérose, la polyarthrite chronique, le mongolisme ou encore le cancer (Müller, 1992; Aouissa, 2002).

II.2. Les antioxydants

Toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat est appelée antioxydant. Le terme de substrat oxydable inclut toutes sortes de molécules *in vivo* (Halliwell, 1999).

L'organisme est capable, dans certaines mesures, de limiter les dommages dus aux radicaux libres, grâce à des mécanismes de défense développés au cours de l'évolution (Hennebelle, 2006).

II.2.1. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (Favier., 2006 ; Harrar.,2012).

II.2.2. Les sources d'antioxydants

Les antioxydants sont d'origine médicamenteuse et alimentaire.

II.2.2.1. Les médicaments

Actuellement, plusieurs agents thérapeutiques notamment les antihypertensifs, les bêta bloquants, les anti-inflammatoires non stéroïdiens, ont été évalués pour leurs propriétés antioxydantes.

On cite les exemples :

Le Probucol agit comme un antioxydant en supprimant l'oxydation des lipoprotéines de basse densité.

La N-acétylcystéine agirait de manière significative dans la régénération d'un antioxydant connu: le glutathion (Calvin, 2001).

II.2.2.2. L'alimentation

1). Les antioxydants naturels

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires.

Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxylés phénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles et super oxydés.

Les antioxydants d'origines naturelles sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures et sont en générales des composés phénoliques. Ils agissent par la désactivation des radicaux par création d'addition covalente, la réduction des métaux ou de peroxydes, la complexation d'ions et de métaux de transition et le captage de l'oxygène singulet. Le (Tableau I.3) énumère les principaux antioxydants et cite des exemples de quelques importantes sources en ces composés naturels (Mohammedi.,2006).

Tableau II. 3 : principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées

Principaux nutriments antioxydants	Sources alimentaires
Vitamine C	Agrume, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron
Vitamine E	huile de tournesol, de soja, de maïs, beurre, oeufs, noix
β -carotène	Légumes et fruits
Sélénium	Poisson, oeufs, viandes, céréales, Volaille
Zinc	Viande, pain complet, légumes verts, huîtres, produits laitiers
Flavonoïdes	Fruits, légumes, thé vert
Acides phénoliques	Céréales complètes, baies, cerises
Tannins	Lentilles, thé, raisins

A) La vitamine E (tocophérol) prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux peroxydes. Elle est retrouvée dans les huiles végétales, dans les noix, les amandes, les graines, le lait, les oeufs et les légumes à feuilles vertes (Aouissa., 2002).

B)La vitamine E (tocophérol) prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux peroxydes. Elle est retrouvée dans les huiles végétales, dans les noix, les amandes, les graines, le lait, les oeufs et les légumes à feuilles vertes (Aouissa., 2002).

C) Le β - carotène possède, outre l'activité provitaminique A, la capacité de capter l'oxygène singulet. Il est présent dans les légumes verts, les épinards, les carottes, la papaye et d'autres fruits jaunes. Sa constitution polyénique (FigureII. 2) lui confère une capacité de piégeage de l'oxygène par formation d'un dioxétane (addition d'une olifine et d'une molécule d'oxygène) ou par production d'hydropéroxydes (insertion d'oxygène dans toutes liaisons C-H conjuguées d'une double liaison) susceptibles d'être réduits à leur tour.

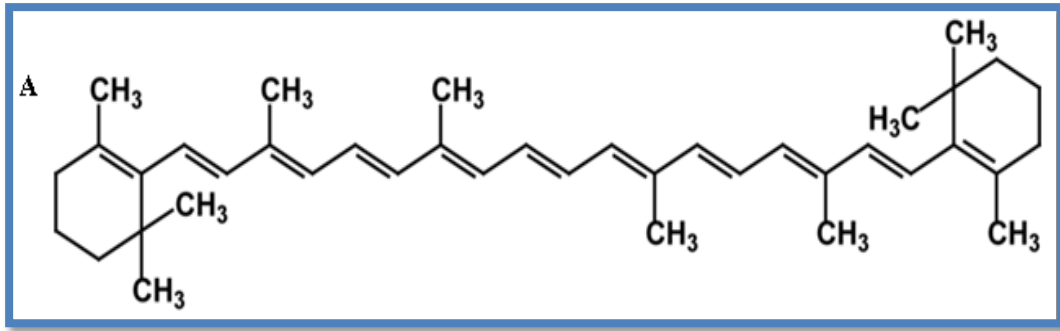


Figure II. 2: structure chimique du β -carotène (Mohammedi,2006).

D) La vitamine C empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase). Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée. Elle est présente dans les légumes, le chou, le persil, les agrumes, le kiwi.

E) Le sélénium est un antioxydant essentiel. Il agirait comme une coenzyme pour la glutathion Peroxydase, enzyme antioxydante capable de réduire les lipides oxydés des membranes cellulaires (Daas., 2009). Le sélénium est capable d'interagir dans l'organisme avec de nombreux métaux (As, Cd, Pb Hg) et est de ce fait susceptible de moduler leur toxicité. Le sélénium agit à plusieurs niveaux dans le métabolisme de l'acide arachidonique notamment en contrôlant la concentration intracellulaire des hydroperoxydes, ce qui explique son action anti-aggrégante. Un rôle bénéfique du sélénium est décrit en dermatologie et dans la prévention de maladies rhumatologiques. Le sélénium pourrait également diminuer de façon très significative l'incidence générale des cancers et serait responsable des effets anti-cancéreux et anti-âge.

Il est efficace dans le traitement de l'arthrose. On le retrouve dans la viande, le poisson, et les céréales. Il a été montré qu'un apport quotidien en sélénium de 200 microgrammes faisait baisser de moitié le risque du cancer de la prostate (Mohammedi., 2006).

F) Le zinc son importance dans la prévention des effets toxiques dus aux radicaux libres est primordiale. Le zinc joue un rôle dans l'activité et le maintien de la SOD qui est un piègeur capital des ions superoxydes. Il protège également les groupements thiols des protéines et peut inhiber partiellement les réactions de formation des espèces oxygénées induites par le fer ou le cuivre (Mohammedi., 2006).

G) Les polyphénols naturels vont de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins. Les polyphénols végétaux ont d'abord été étudiés pour leurs effets protecteurs contre les pathogènes ou le rayonnement UV. Ils ont été pendant longtemps considérés comme des facteurs antinutritionnels. C'est un regard tout à fait différent qu'on leur porte aujourd'hui, après la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes. Leur nature chimique fait de ces composés des agents réducteurs et ce sont, par ailleurs, les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation. On en consomme en moyenne 1 g par jour. Les bienfaits des polyphénols alimentaires suggèrent un rôle protecteur à l'encontre des cancers (**figureII. 3**) et des maladies chroniques.

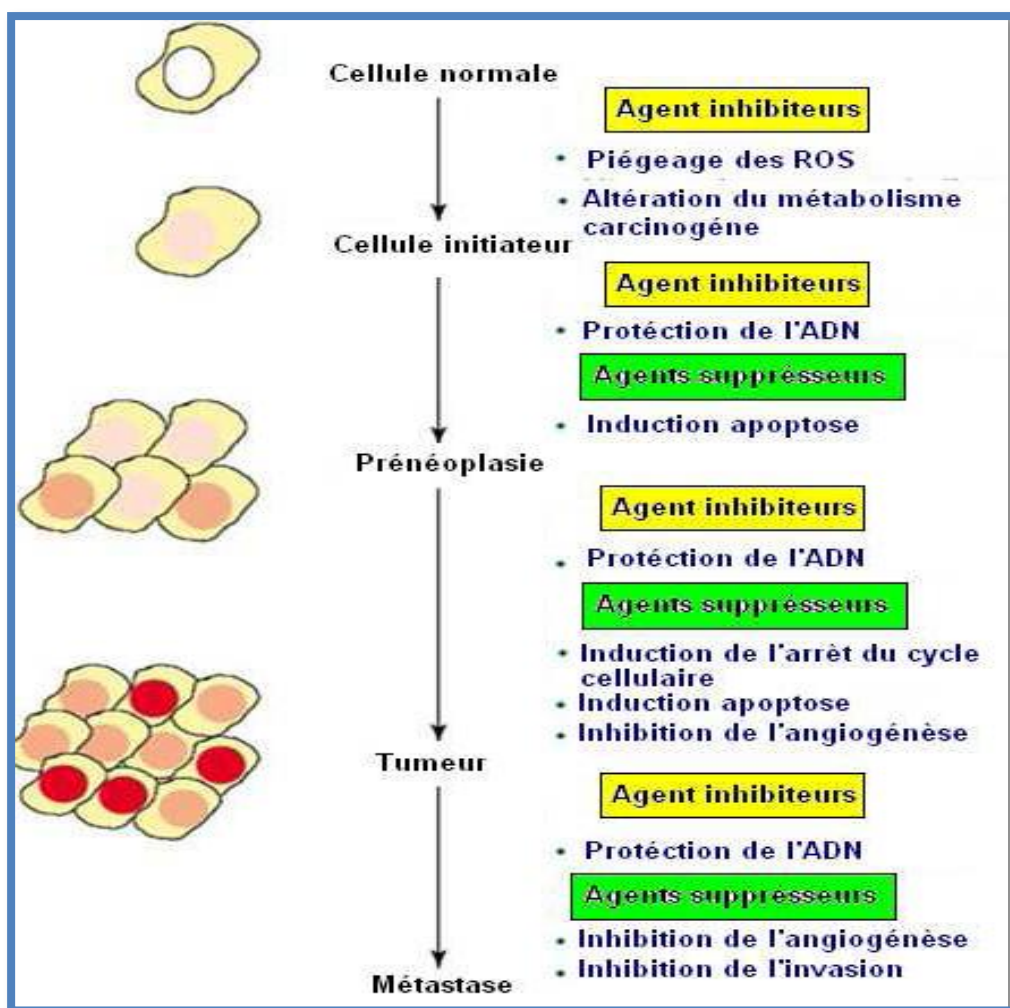


Figure II.3 : model expliquant les étapes de carcinogénèse et les effets potentiels Des polyphénols sur la progression du cancer (Mohammedi, 2006)

Matériels et méthodes

III.1. Produits et Appareils

III.1.1. Produits chimiques

Tableau III. 1: les produits chimiques et les réactifs

Produits	Propriétés
Méthanol (CH ₃ -OH)	M=32.04 g/mol, 99%
Acétate d'éthyle.(CH ₃ COOCH ₂ CH ₃)	D=88.1, 99.8%
Chloroforme (CHCl ₃)	M=119.4, 99%
Hexane	M=86,16g/mol
Carbonate de sodium(Na ₂ CO ₃)	M=105.99g/mol
Sulfate de Sodium.Na ₂ SO ₄	M=142.04g/mol
Eau distillée.(H ₂ O)	M=18g/mol
Chlorure d'aluminium(AlCl ₃)	M=241.43 g/mol
Acide ascorbique	M=152g/mol
Solution de Folin.	d =1.22
DPPH.	M =394.3g/mol
Quercitrine.	M=302 g/mol
Acide trichloroacétique (TCA)	M=163,387 g/mol
Chlorure de fer (FeCl ₃)	M=270.30g/mol
Ferricyanure de potassium (K ₃ Fe(CN))	M=329.24g/mol
Phosphate de monopotassium (KH ₂ PO ₄)	M=136.09g/mol
Hydrogénophosphate de potassium (K ₂ HPO ₄)	M=174.175g/mol
Catéchine	M=290,268g/mol
Solution de Folin	d=1.22
Acide gallique monohydrate (C ₇ H ₆ O ₅ H ₂ O)	M=188.14g/mol

III.2 .Appareils et instruments :

Tableau III.2 : appareils et instruments

Appareils et matériels	Caractéristiques
Ampoule à décanter.	250 ml
Micropipette	plus 100
Ballons pour le rota-vapeur.	(250ml→1000ml)
Etuve	Tmax=320°C
Rota vapeur	Damp f vapeur PT-100
Balance électronique	Scout Pro (MASSE MAX°=600g)
CCM	TLC silica gel F254 25 Aluminium Sheets 20*20cm
Bain Marie	Memmert Neutrtemp type WB7 100°C
Agitateur magnétique plaque chauffante	Stuart max 300°C
Agitateur vortex	Ficher scientifique Topmix FB15024 10-40 Hertz
Stérilisateur	Melag 75 Tmax : /180°C tempmax 20 min
Lampe UV	VL-6C 230 v ,50/60 HZ, $\lambda=254\text{nm}$

III.3.Matériel végétal

L'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante est effectuée sur un matériel végétal représenté par les racines d'*Aristolachia sp.* Les racines sont achetées chez un herboriste. Puis broyé et utilisées pour la préparation des différents extraits.

Figure III.1 : les racines d'*Aristolichia*

III.4.Méthode d'extraction (fractionnement liquide-liquide)

III.4.1. Macération Principe :

Il s'agit du contact à froid entre le produit et son solvant pendant un temps déterminé. Après broyage, une quantité de 40 g de poudre de plante a été macérée dans 400 ml d' un mélange hydroalcoolique ou de chloroforme, deux systèmes des solvant sont utilisés : (Méthanol /eau ; 90/10 ; V/V ;chloroforme100%) .Cette macération est répétée 2 fois avec renouvellement du solvant chaque 24 heures à température ambiante et à l'obscurité. Après filtration et évaporation sous pression réduite à une température de 50°C.

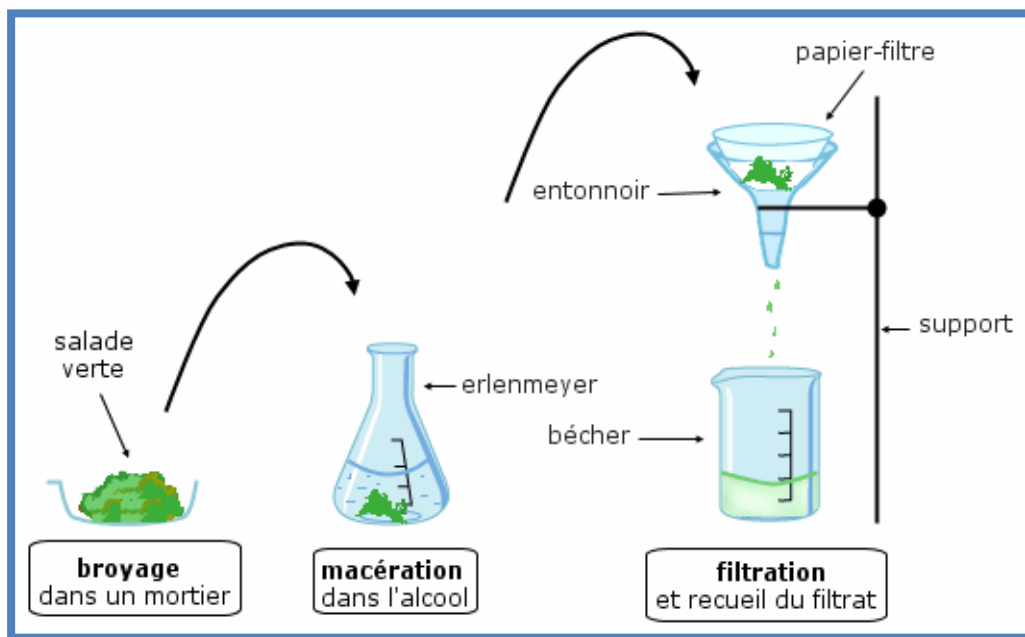


Figure III.2 : les étapes d'extraction.

La phase aqueuse de chaque extrait est lavée une ou plusieurs fois avec un double-volume de l'hexane dans une ampoule à décanter afin d'éliminer toutes traces de composés apolaires (pigments, lipides, etc).

La phase aqueuse ainsi obtenue est ensuite lavée une ou plusieurs fois avec un double volume d'acétate d'éthyle. La phase organique obtenue est séchée par le sulfate de sodium anhydre Na_2SO_4 pour éliminer toutes traces d'eau. Après filtration le solvant est évaporé à sec sous pression réduite à 50°C. Le résidu est conservé à +4°C donnant l'extrait phénolique brut (Figure III .3).

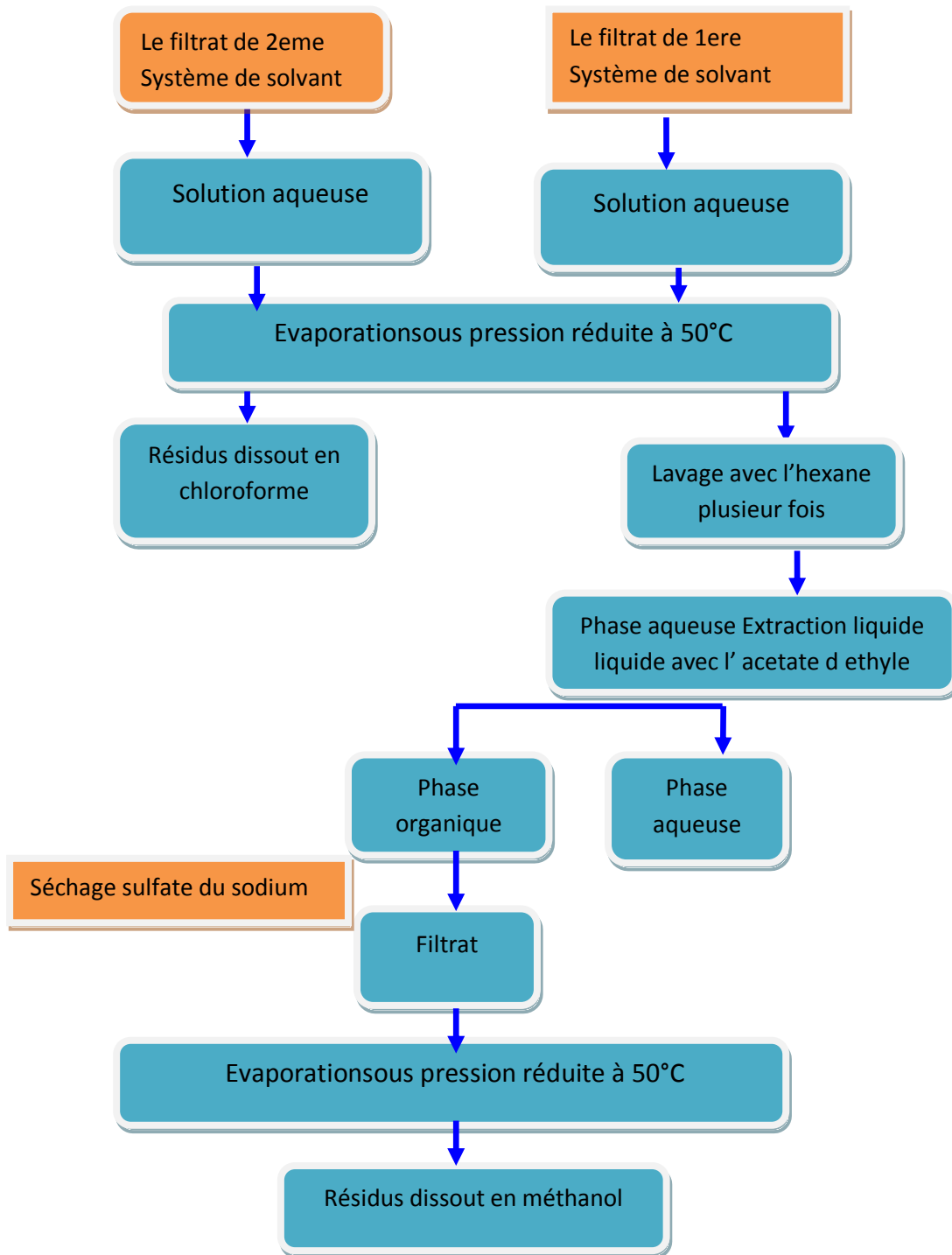


Figure III.3: le protocole d'extraction liquide –liquide de différentes phases.

III-5. Analyse quantitative des composés phénoliques

L'extrait méthanolique obtenu a été soumis à une série de dosages spectrophotométriques afin de quantifier leur teneur en polyphénols totaux.

III-5.1. Dosage des composés phénoliques totaux

Le dosage des composés phénoliques totaux a été effectué par une méthode adaptée de *Singleton* et *Ross* (en 1965) avec le réactif de folin-denis. En milieu basique, le réactif de folin-denis qui est formé d'acide phosphotungstique $H_3PW_{12}O_{40}$ et l'acide phosphomolybdique $H_3PMO_{12}O_4$ oxyde les groupements oxydables des composés polyphénoliques présents dans l'échantillon. La concentration massique des constituants utilisés dans la préparation des réactifs, a été optimisée pour obtenir la réponse analytique la plus linéaire possible en respectant le rapport réactifs/composés phénoliques totaux. Dans cette méthode on a utilisé l'acide gallique comme étalon **figure III.4** (*Dendougui*, 2010).

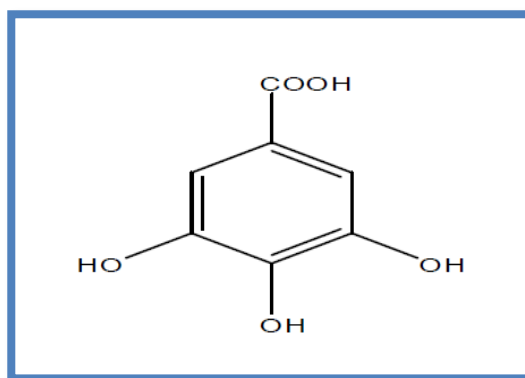


Figure III.4: structure de l'acide gallique

III-5.1.1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

La courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir des solutions d'acide gallique de différentes concentrations (0.1 - 0.7 mg/ml). On prend 50 µl de chaque solution ont été introduit à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivi de l'addition de 250 µl du réactif de folin-denis (diluée 10 fois). Après incubation pendant 3 minutes, 1 ml de carbonates de sodium Na_2CO_3 à 4% a été ajoutées, puis maintenues dans l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm contre un blanc préparé de la même manière sauf qu'il ne contient pas d'acide gallique (l'extrait phénolique). Les lectures de la densité optique à 760 nm, des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique. L'analyse quantitative des phénols totaux des extraits phénoliques a été réalisée par la même procédure (**Maamri**., 2008).

III.5.2. Dosage des flavonoïdes

Le chlorure d'aluminium (AlCl₃) forme un complexe très stable avec les groupements hydroxydes OH des phénols. Ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde 430 nm. Les phénols sont estimés par une spectroscopie UV, dont la Quercétine est utilisée comme un standard à une longueur d'onde $\lambda = 430$ nm (**Chia-chi *et al.*, 2002**).

III-5.2.1. Courbe d'étalonnage

Un standard de calibration a été préparé en utilisant des solutions de Quercétine des différentes concentrations de 10 jusqu'à 170 $\mu\text{g/l}$. 0.5 ml de la solution diluée a été mélangé avec 0.5 ml de chlorure aluminium, puis laissé 15 minutes dans l'obscurité. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 430 nm.

En utilisant les valeurs des absorbances obtenues pour les différentes solutions de Quercétine ainsi préparées nous avons tracé la courbe d'étalonnage.

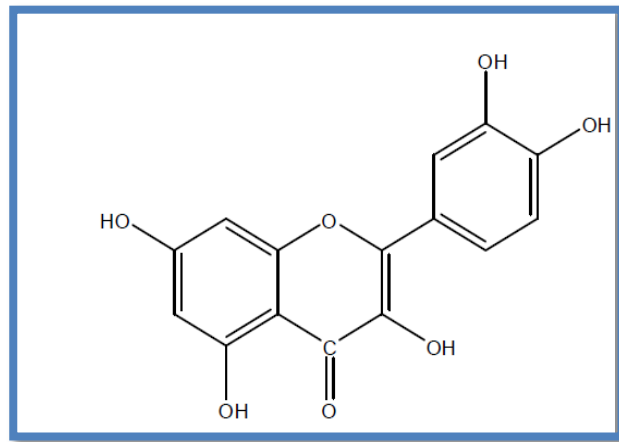


Figure III.5: structure de Quercétine

III.6. Evaluation de l'activité antioxydant

III.6.1. Test au DPPH

L'activité du balayage des radicaux libres a été mesurée en employant le radical libre stable DPPH (C₁₈H₁₂N₅O₆) qui est l'un des essais principaux employés pour explorer l'utilisation des extraits d'herbes comme antioxydants (**Bastos *et al.*, 2007**).

a) Principe

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. (2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune.

(**Maataoui *et al.*, 2006**). Ce radical est un oxydant qui peut être réduit par l'antioxydant (AH) selon la réaction suivante :



b) Mode opératoire

L'Activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par

Mansouri *et al.*, (2005) :

Une solution méthanolique de 12µM de DPPH. est mélangée avec différentes concentrations d'extraits d'*Aristolichia sp* (5, 50, 100, 300µg/ml), Mettre 1ml de chaque dilution de ces extraits dans un tube à essai, ajouter 1ml de solution méthanolique de DPPH, puis laisser incuber pendant 30 min à l'abri de la lumière à température ambiante. puis Lire l'absorbance à 517 nm.

Répéter les mêmes opérations, en remplaçant l'extrait d'*Aristolichia* par l'acide ascorbique T (control positif) et le méthanol pur (control négatif). Toutes les opérations sont réalisées en deux fois.

L'évaluation de l'activité anti-oxydante en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage selon la relation suivante :

Le pourcentage d'inhibition est exprimé ensuite par la valeur de la CI50, sachant que l'IC50 est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH.

$$\% \text{Inhibition} = \frac{[(\text{Abs Control} - \text{Abs Extrait})] \times 100}{\text{Abs Control}}$$

Où

% : Pourcentage de l'activité anti-radicalaire ;
 Abs Echantillon : Absorbance de l'échantillon ;
 Abs Control négatif : Absorbance du control négatif ;

III.6.2. Le pouvoir réducteur des composés phénoliques (Reducing Power Assay) par la méthode de FRAP

Ce test est découvert par **(Oyaizu 1896)**. Ce test est considéré comme un test direct et rapide, et utilisé pour déterminer l'activité antioxydante des extraits étudiés dans un milieu neutre. Ce test est basé sur la réduction des ions $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ à des ions de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde $\lambda = 700 \text{ nm}$.

L'évolution de l'activité antioxydante de notre extrait est comparée par rapport à l'acide ascorbique (vitamine C) et cela en traçant une courbe d'étalonnage.

On prépare des solutions d'acide ascorbique (vitamine C) et de l'extrait de concentration différentes de 0.005 jusqu'à 0.050 g/l. 50 µl de chaque solution a été introduits à l'aide d'une pipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 1 ml d'une solution $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1%), 1 ml de solution tampon phosphaté (PH=6 C=1M). Les solutions ont été secouées

immédiatement et bien mélangées, puis ils sont maintenus dans un bain marie pendant 30 minutes à une température de 50 °C. Ensuite, on ajoute 1 ml de l'acide trichloracétique (TCA 10%). On prend de chaque tube 1 ml et on introduit dans un autre tube à essai et on ajoute 1 ml de l'eau distillé, 0.2 ml de solution de FeCl₃ (0.1 %). L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 700 nm contre un blanc. Les lectures de la densité optique à 700 nm, des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (Vitamine C) même procédure se fait pour l'extrait méthanolique.

III.7. Analyse qualitative

III.7.1. Chromatographie sur couche mince

La Chromatographie sur couche mince est une technique couramment utilisée pour séparer des composants dans un but d'analyse (CCM analytique) ou de purification (CCM préparatrice). Cette technique (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption et d'interaction. La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Chaque constituant d'un mélange, mise en évidence par une tache, est caractérisé par un Rapport frontal, noté R_f , défini par :

$$R_F = \frac{X}{y} \quad (R_F < 1)$$

X : distance parcourue par le constituant .

Y : Distance parcourue par le front de l'eluant.

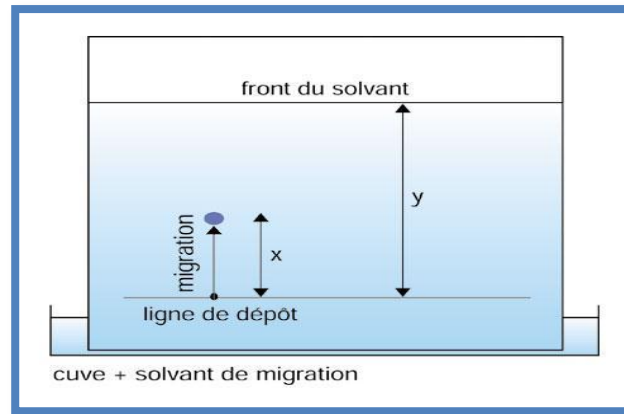


Figure III.6 : développement chromatographique d'une plaque

a) Mode opératoire

Dans notre travail, nous avons utilisé des plaques de chromatographie sur couche mince de taille 10*10 cm pour la séparation des fractions étudiées. Après plusieurs essais, nous avons choisi le système d'élution suivant qui a été réalisé sur une plaque de CCM de gel de silice dans une cuve en verre.

Système utilisé : -Acétate d'éthyle/ Méthanol/Eau distillée (12 :1.35 :1) (v/v/v) ml.

- Chloroforme /Méthanol /Eau distillé (65/35/5)(v/v/v) ml. (Siabna . ,2009)

Par le biais de ce système, nous avons pu mettre en évidence : 1 extraits, et les trois standards l'acide gallique, quercitrine et le catéchine, les dépôts sont positionnés selon l'ordre suivant : quercitrine, acide gallique, Catéchine. Après la séparation, les plaques sont observées au visible et sous UV à 254nm.

Résultats et discussion

IV - Résultats et discussion

IV -1 Détermination de rendement d'extraction

L'opération de l'extraction par macération des racine d'*Aristolichia sp* dans le méthanol/eau (90/10)% ou le chloroforme (100%) a permis d'obtenir un résidu sec d'extrait brute.

Le rendement d'extraction a été déterminé par la formule suivante

$$R\% = \frac{\text{Masse des résidus d'extrait}}{\text{Masse de la poudre végétale}} * 100$$

Pour chaque échantillon, nous avons calculé le rendement de l'extraction, les résultats obtenus sont présentes dans le tableau suivant :

Tableau IV-1 : tableau regroupant les rendements des deux extraits.

Matériel végétale	Extrait	m (g)	Aspect /couleur	Rendement %
<i>Aristolochia sp</i>	Chloroforme	1.923	Pateuse /jaune foncé	4.807
	Méthanol /eau	3.603	huileuse /jaune claire	9.007

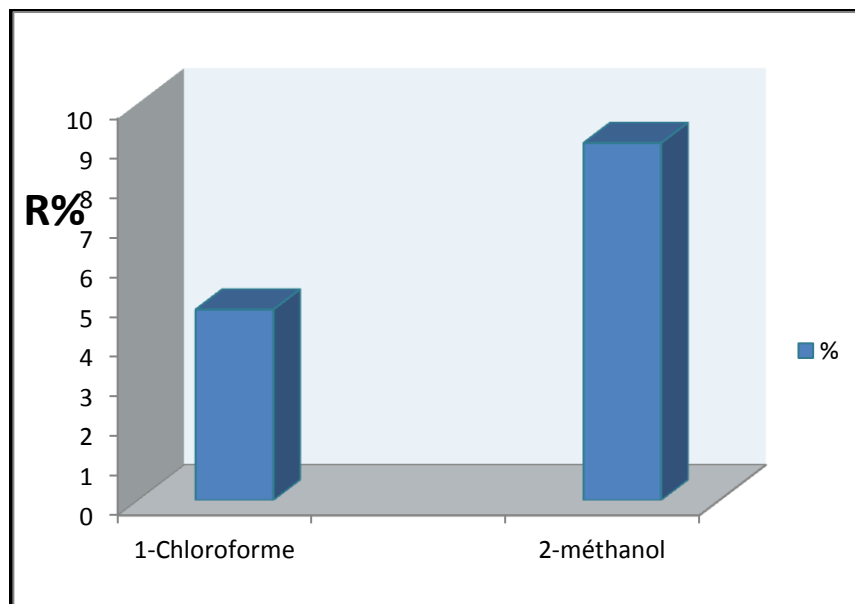


Figure IV-1 : Histogramme des rendements d'extraction, 1-Chloroforme, 2-Méthanol/eau

L'extraction des polyphénols par macération, bien que généralement longue et exige des solvants organiques qui sont chers et dangereux pour la santé (**Garcia et al., 2010**) est la seule méthode utilisable dans le cas de l'extraction d'un ensemble de molécules fragiles (**Ben Amor.,2008**).

Les résultats obtenus montrent l'extrait brut de méthanol/eau d'*Aristolochia sp*, représente le rendement le plus élevé (9.007%), suivi par le chloroforme (4.807%).

Dans une étude réalisée par **Shrishailappa et al., (2005)** sur le même genre originaire de village Sayala, confirment nos résultats en indiquant que le méthanol en combinaison avec l'eau permet une meilleure extraction des polyphénols totaux.

L'addition de l'eau aux solvants organiques augmente la solubilité des polyphénols (**Sripad et al.,1986**). par modulation de la polarité du solvant organique (**Mohammedi et Atik., 2011**).

IV-2 Quantification des composés phénoliques

IV-2-1 .Dosage des composés phénoliques totaux

La quantification des composés phénoliques a été faite en utilisant d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax$) réalisé par une solution étalon l'acide gallique comme standard à différents concentration.

La teneur en composés phénoliques de l'extrait méthanolique d'*Aristolochia sp* a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalent en acide gallique par 100 gramme de la matière sèche, la mesure de la densité optique a été effectuée à la longueur d'onde de 765 nm. **Figure IV-2**

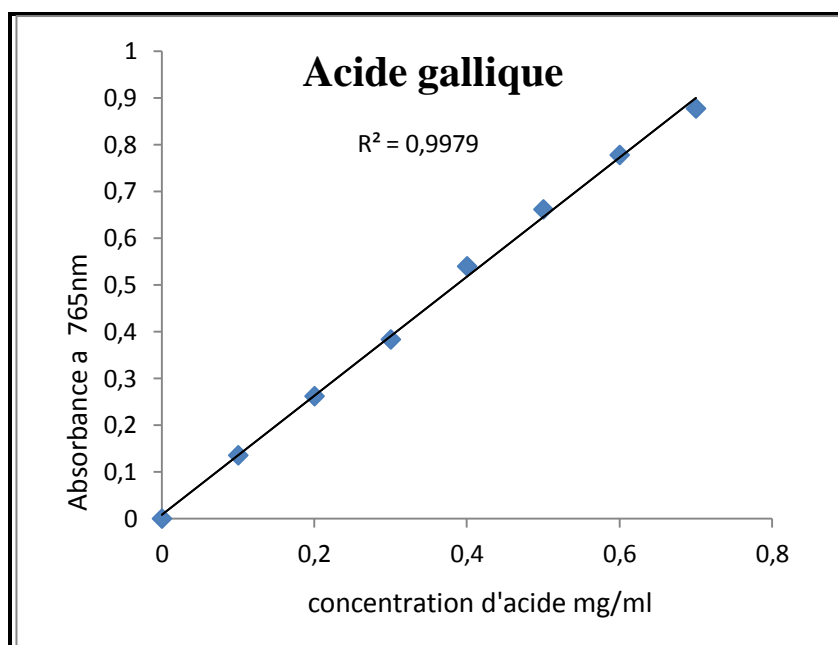


Figure IV-2 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

-Toutes Les valeurs représentent une moyenne de deux essais (n=2).

Les résultats montrent que la teneur en phénol totaux de L'extrait des racines est très faible ($194,4 \pm 0.217$ mg EAG /100g). Ces valeurs peuvent être comparées à autre étude faite sur l'espèce d'*Aristolochia longa* par **Djeridane et al .,2006**, leur résultat trouvé est proche à celle de notre étude (147 mg EAG/100g).

La solubilité des polyphénols dépend principalement du nombre de groupements hydroxyles, de poids moléculaire et de la longueur de la chaîne carbonique de squelette de base (**Mohammedi et Atik.,2011**).

Le contenu phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs **intrinsèques** et **extrinsèques** (**Falleh et al., 2008**).

Le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement d'une plante à une autre. Cela peut être attribué à plusieurs facteurs dont nous citons les facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies...etc ; le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante. La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux. Il a été prouvé que leurs teneurs et celles des flavonoïdes sont élevées lorsque le milieu de vie de la plante n'est pas adéquat, dans ce cas la plante favorise la synthèse des métabolites secondaires afin de s'adapter et de survivre (**Apak et al 2007**).

IV-2-2. Dosage des flavonoïdes :

La quantification de flavonoïdes a été faite en utilisant une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax$) réalisé par une solution étalon de (*Quercitine*) à différentes concentrations.

La teneur en flavonoïdes de chaque extrait a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalent en *Quercitine* par 100 gramme de la matière sèche, la mesure de la densité optique a été effectuée à la longueur d'onde de 430 nm. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure IV-3**.

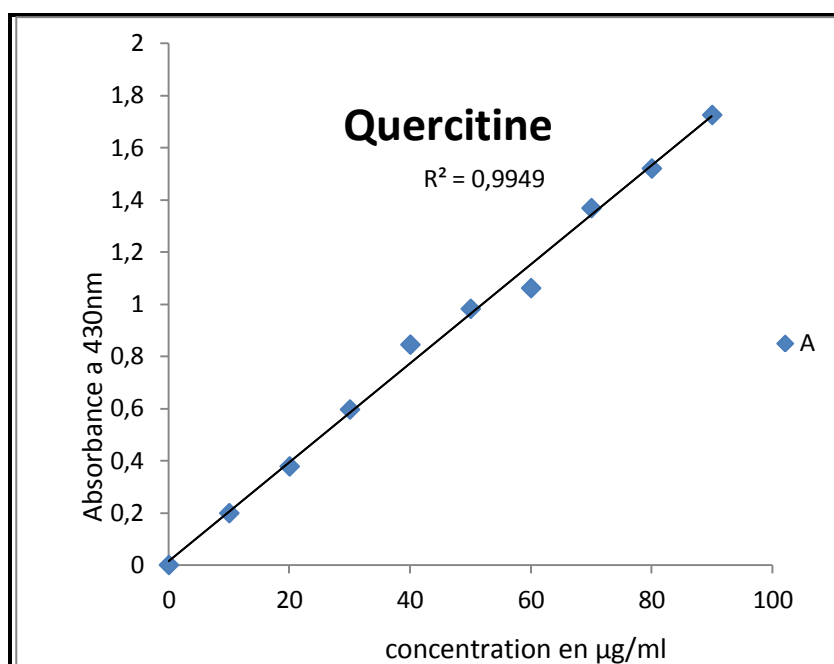


Figure IV-3 : Courbe d'étalonnage de quercitine

-Touts Les valeurs sont moyenne de deux essais (n=2).

Les résultats de dosage des flavonoïdes révèlent pour l'extraits méthanolique la valeur enregistré ($115,6 \pm 0,158$ mg/100g). Ceci concorde avec les resultats trouvé par **djeridane et al .,2006**, qui ont trouvé également que les teneur en flavonoïdes est un peu bas (80 mg /100 g) dans l'extrait methanolique de la plante *Aristolichia.longa* .

IV-3 L'étude du pouvoir antioxydant

IV-3 .1. Effet scavenger du radical DPPH

L'activité antioxydante des extraits méthanoliques d' *Aristolochia sp* et de l'antioxydant standard (acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaire (**Yermakov et al.,1987**).

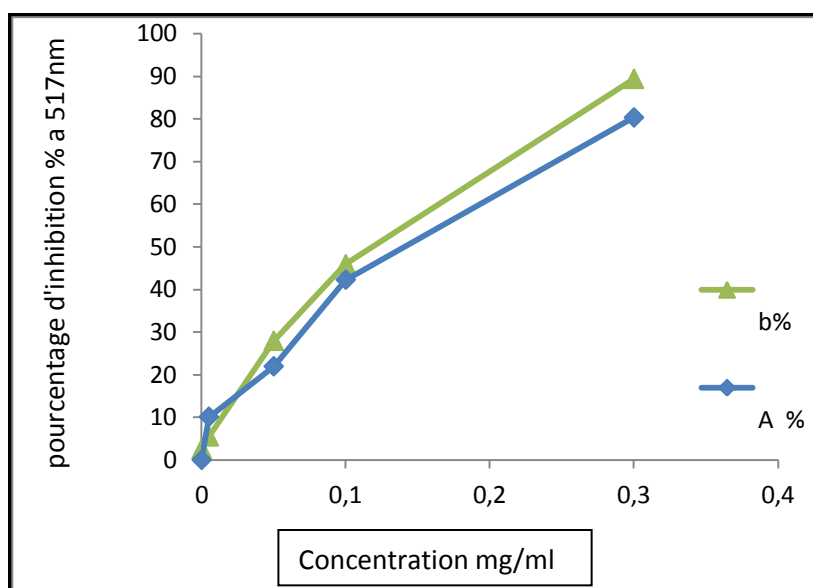


Figure IV- 4: Activité antiradicalaire **A** : l'extrait méthanolique et **B** : d'acide Ascorbique

-Touts Les valeurs sont moyenne de deux essais (n=2).

L'effet scavenger de l'extrait vis-à-vis du radical DPPH est exprimé par la concentration inhibitrice à 50 % (CI50) qui correspond à la concentration des polyphénols nécessaire pour inhiber ou réduire 50% de la concentration initiale du DPPH. Une CI50 faible représente l'activité anti-radicalaire la plus élevée.

Le résultat du pouvoir antioxydant de l'extrait testé montre que à une concentration de 0.3mg/ml, le pourcentage d'inhibition de l'extrait méthanolique d'*Aristolochia sp* est supérieur à 80% à (Fig IV- 4).

Selon les résultats enregistrés, l'extrait de la plante obtenue *in situ* est doté d'un bon pouvoir antioxydant (IC50=0,166 mg/ml), avec une efficacité plus grande et plus proche à celle exprimée par l'acide ascorbique (IC50=0.146mg/ml) .

Il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, tocophérol, flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (**Gardeli et al.,2008**).

Les polyphénols contenus dans l'extrait d *Aristolochia sp* est probablement responsable de l'activité antioxydante. Ceci est en accord avec des travaux menés sur l'extrait d'*Aristolochia sp* qui ont mis en évidence une forte activité antioxydante de l'extrait alcoolique (IC50=223.63µg/ml) (**Moazzem et al .,2014**). Ces études montrent que *Aristolochia indica* est une espèce riche en composés phénoliques qui sont responsables de

nombreuses activités biologiques notamment l'activité antioxydante, anticancéreux , antimicrobienne et antifongique(**Benarba et Meddah.,2014**) .

IV-3 .2.Analyse de pouvoir réducteur par la méthode de FRAP

L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique des racines d'*Aristolochia sp* a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible (**Benzie et Strain ., 1996**). Il est universel peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux (**Li et al.,2008**).

La présence des réducteurs dans l'extrait de plante provoque la réduction de Fe^{3+} complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm (**Chung et al. ,2002**).

L'extrait est traité de la même façon que ceux des solutions standards de l'acide ascorbique (V.C). Nous avons tracé les courbes représentant la variation du pouvoir réducteur exprimée en déférente concentration en fonction de l'absorbance.

En d'autre terme, le système $FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semiquantitative » des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction rédox (**Amarowicz et al.,2004**).

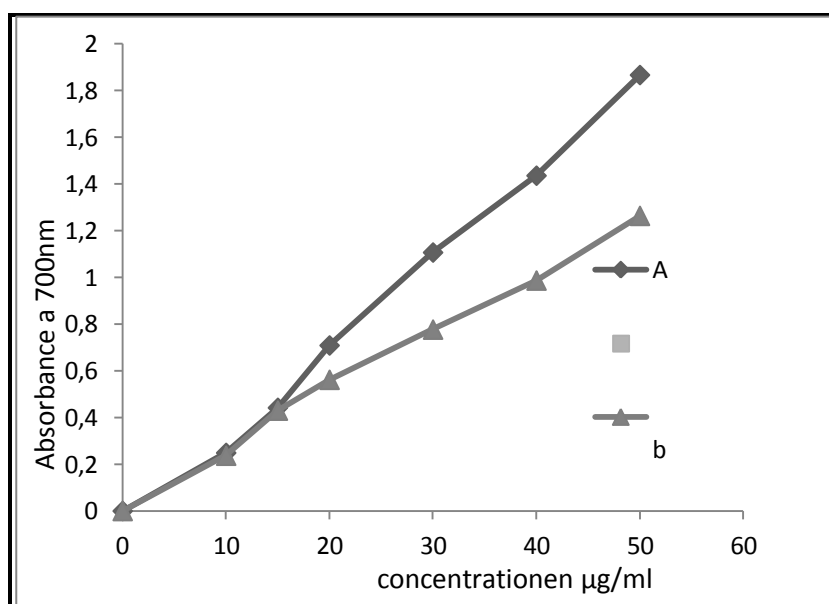


Figure IV-5 : Activité réductrice par la méthode de FRAP

A : l'acide ascorbique **B** : extrait méthanolique .

-Toute Les valeurs une moyenne de deux essais (n=2).

Le résultat représenté dans la figure IV-5, nous ont montrés que la puissance des réductions augmente avec l'augmentation de la concentration d'acide ascorbique et l'extrait méthanolique.

Le potentiel réducteur de l'extraits et de standards (acide ascorbique) est exprimé par les valeurs des concentrations effectives à 50% (CE50) qui correspondent à la concentration des polyphénols nécessaire pour donner une absorbance égale à 0,5 à 700 nm

Le pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique d'*Aristolochia sp* est élevé, (EC50=19.22µg/ml) en confirmant sa performance antioxydante et proche à celle de l'acide ascorbique (EC50=14.96µg/ml), ces résultats montrent que l'extrait des racines contient des composés capable de réduire le fer.

Le pouvoir réducteur de plante *Aristolochia sp* est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (Siddhuraju et Becker., 2007).

Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Jeong et Kim., 2004 ; Kumaran et Karunakaran., 2007).

IV-4. Analyse qualitative par Chromatographie sur couche mince

Par ses faibles contraintes techniques, son emploi simple et son coût modeste, la CCM est un outil de choix pour l'analyse phytochimiques de routine d'extraits bruts, de fractions, ainsi que de produits purs isolés. De ce fait nous avons opté pour cette technique dans le but de caractériser les différents constituants des extraits des racines d'*Aristolochia sp*. A été réalisée suivant la méthode de (SIABANA., 2009). Les systèmes des solvants utilisés :

- Acétate d'éthyle- méthanol-eau (15 : 1.35 : 1 ;V/ V/V);
- chloroforme - Méthanol - Eau (65 : 35 : 5 ;V/V/V).

Le meilleure système de migration constitué de chloroforme, méthanol et l'eau, (65: 35:5, V/V/V), a permis d'avoir une très bonne séparation chromatographique et une visibilité acceptable des spots (jaune, orange). La révélation est réalisée par; observation sous la lumière de jour et ultraviolette (à 254 nm) (Figure IV-6).

Suite à l'observation sous la lampe UV (254 nm), la comparaison des Rf des spots issus de la séparation des extraits avec ceux des témoins utilisés permet d'avoir une idée sur les composés présents dans les racines d'*Aristolochia sp*. La quercétine et l'acide gallique (Rf : 0,75 et 0,65 respectivement) sont probablement présents dans l'extrait méthanolique.

L'extrait des racines de plante (*Aristolochia sp*) est montré après observation à l'UV (254 nm) une richesse en constituants chimiques. A 254 nm, la majorité des spots apparaissent Sombre.

Tableau IV-2 :Rapports frontaux pour la plaque de CCM

Extrait méthanolique et les temois	Observation a visible
Extrait methanolique	0.82/0.75 /0.65
Quercitine	0.75
Acide galique	0.65

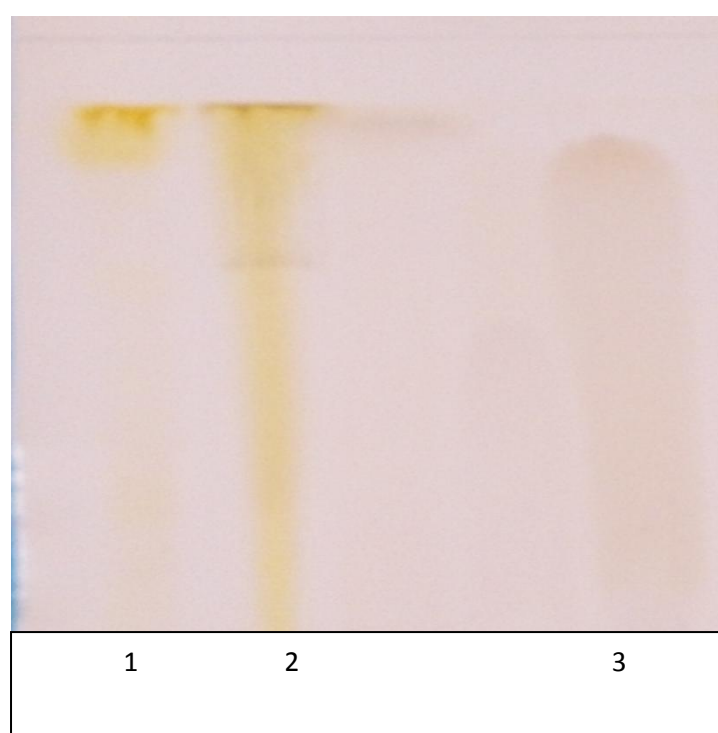


Figure IV-6 : système de solvant utilise chloroforme /méthanol/eau (1:extrait méthanolique de plante, 2 :quercitine,3:acide gallique .

Conclusion

Conclusion

Les plantes médicinales constituent une richesse naturelle très importante dont la valorisation demande une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur. Ces propriétés dépendent de la présence d'agents bioactifs variés et appartenant à différentes classes chimiques (Maihebiau.,1994)

Dans le présent travail, différents aspects du genre *Aristolochia sp* ont été étudiés: quelques propriétés phytochimiques et activités antioxydantes de l'extraits brut. L'extraction des composés phénoliques des racines de la plante a permis d'obtenir des rendements qui se diffèrent en fonction des solvants utilisés (méthanol/eau (9.007%), chloroforme (4.807%)).

Le dosage des composés phénoliques dans l'extrait méthanoïque des racines de plante *Aristolochia sp* a révélé la présence des teneurs considérables en phénol totaux (194.4 ± 0.217 mg EAG/100g), et le taux des flavonoïdes étaient plus important (115.6 ± 0.158 mg EQU/100g).

L'activité antioxydante d'extrait méthanolique d'*Aristolochia sp* a été évaluée par deux méthodes: le test de réduction de radical libre DPPH et la méthode de pouvoir réducteur FRAP. Pour le premier test de réduction du radical libre DPPH, l'activité antiradicalaire est élevée dans l'extrait méthanolique ($IC_{50}=166\mu\text{g/ml}$) et plus proche que celles obtenues à partir d'antioxydants utilisés dans les industries alimentaire et pharmaceutique en l'occurrence l'acide ascorbique ($IC_{50} =146$ mg/ml). L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique des racines de la plante obtenue par la deuxième méthode est montré une capacité à réduire le fer plus marquée ($IC_{50} =19.22\mu\text{g/ml}$) et proche que celles de l'acide ascorbique ($IC_{50} =14.96\mu\text{g/ml}$).

L'analyse qualitative par chromatographie sur couche mince sur gel de silice ont confirmé la richesse d'extrait de plante étudiée en divers composés.

L'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, une étude in vivo est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités biologiques des extraits de cette plante.

notre étude donne des résultats préliminaires et nécessite des études complémentaires approfondies. Ainsi, de quelques perspectives peuvent être envisagées :

- ✓ Caractérisation quantitative identification des composés polyphénoliques issus de différentes sources par des méthodes de séparation plus performantes (CLHP, CL/SM, CG/SM...).
- ✓ étude in vivo est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités biologiques des extraits de cette plante.

Références bibliographiques

A

-**Apak R.,Guculu K., Demirata B.,Ozyurek M.,Celik S.E.,Bektasoglu B.,Berker K.I.Ande Ozyurt D.,(2007).**Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the cprac assay .*MOL.*,12:1496-1547.

-**Ahsan H, Ali A and Ali R .,(2003)..** Oxygen free radicals and systemic autoimmunity.*Clinical and Experimental Immunology*, 131, 398-404.

-**Ahmet İlçim, Lütfi Behçet, Aycan Tosunoğlu .,2014** *Aristolochia altanii* (Aristolochiaceae), a new species from Turkey .*Turkish Journal of Botany*, 39: 835-840

-**Aganga A, Mosase K.W., (2001).** Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Animal Feed Science and Technology*, **91**:107-113.

-**Akroum S., (2010).** Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. *Thèse de Doctorat : Université Mentouri De Constantine-Algerie*.

-**Amarowicz R., Pegg R.B., Rahimi-Moghaddam P., Barl B., et Weil J.A.,(2004).**Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*. 84, 551–562.

-**Annou G.,(2014)** ;Tracabilité de l'identification des métabolites secondaires végétaux, département de science biologique ,*Université Kasdi Merbah ,ouargla*.11p.

-**Aouissa I .W. R., (2002).** Etude des activités biologiques et de la toxicité aiguë de l'extrait aqueux des feuilles de mangifera indica L. (anacardiaceae). *Thèse de doctorat .Université de Bamako*.127 p.

B

-**Babar Ali M.,Hahn E .J.,Paek K.Y.,(2007).**Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative stress and Accumulation of Phenolics in panax ginseng Bioactor Root Suspension Cultures moléculaires. 12: 607-621

-**Bachir Benarba, Boumediene Meddah.,(2014).** Ethnobotanical study, antifungal activity, phytochemical screening and total phenolic content of Algerian *Aristolochia longa*.*Journal of Intercultural Ethnopharmacology* .vol3.pp 150-154.

-**Bahorun T.,(1997).**Substances naturelles actives:La flore mauricienne,une source d'approvisionnement potentielle.Food and agricultural research council,Réduit ,Mauritius.83-94.

- **Bamm1 Jamal et Allal Douira.,(2002)**. Les Plantes Medicinales Dans La Foret De L'achach(Plateau Central, Maroc). *Acta BotanicaMalacitana* 27: 131-145.

-**Baghiani, A., Harrison, R. and Benboubetra, M., (2003)**. Purification and partial characterisation of camel milk xanthine oxidoreductase. *Archives of Physiology and Biochemistry*.p111, 407- 414.

-**Bartosz G., (2003)**.Generation of reactive oxygen species in biological systems.*Comments on Toxicology*, p9, 5-21.

- **Bastos Markowicz, D. H., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A.C.H. F., Cunha, I B. S., Carvalho, P. O. Eberlin, M. N., (2007)**. Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Cameliasinensis*) Extracts.

-**Benzie I.F.F.et Strain J.J., (1996)**. The ferric reducing ability of plasma as a measure of “antioxidant power” the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*.239, 70– 76.

- **Ben Amor.,(2008)**. Maîtrise de l’aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d’extraction de principes actifs ; texturation par détente instantanée contrôlée DIC. *Thèse de doctorat en Génie des Procédés Industriels. Université de la Rochelle. France. pp. 187.*

-**Boulaaba, M., Abdelly,C.,(2008)**. Phenolic composition of *Cynaracardunculus* L. organs, and their biological activities .*C. R. Biologies*, 331: 372-379.

-**Bouayed J.(2007)**. Etude de la corrélation anxiété / statut oxydatif des granulocytes chez la souris et évaluation des effets antioxydants / neuroactifs des polyphénols extraits de *Prunus domestica* L. *Thèse de doctorat, Université Verlaine-Metz,*

-**Bur kill H.M., (1985)**. The useful plants of west tropical Africa.*Edition 2. Vol-1. Famille A-D. P.960.*

-**Bruneton J., (1999)**. Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales, *3eme édition, Tec et Doc (ED)*. Paris, 658p.

C

-**Calvin A., (2001)**. Investigation phytochimique de trois plantes indonesiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires. *Tinospora crispa, Merremiamarginata et Oropheaenne-andra*. Thèse de doctorat. *Université de Lausanne*, 243p

-**Cheynier V, Duenas-Paton M, Salas E, Maury C, Souquet JM, Sarni-Manchado P.,(2006)**. Structure and properties of wine pigments and tannins.*Am J EnolVitic* 20;57:298– 305.

-**Chia-chi et al.,(2002)**.estimation total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods , *Journal of food and drug analysis* , vol 10, no. 3, pages 178-182.

-Chung Y-C., Chang C-T., Chao W-W., Lin C-F., et 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.

-Cordell, G.A.; Colvard, M.D. ,(2005). *Journal of Ethnopharmacology*,100,pp 5-14.

D

- Daas Saliha Amiour.,(2009). Etude quantitative des composés phénoliques des extraits de trois variétés de dattes (*Phoenix dactylifera L.*) Et évaluation in vitro de leur activité biologique. Thèse Magister en Biologie, *Université El-Hadj Lakhdar - Batna* .

-Dacosta, Y. Descheemaeker, K., (2003). Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. 317 p.-. Nutri-et Phytothérapie : Developpements Recents. *Edition Garant*, page 12, 46.

- Dendougui .,(2010). Contribution à l'étude phytochimique et l'activité antioxydante de *Cleome Arabica*, mémoire de master, *Université KasdiMerbah*. Ouargla.

Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Maamri S, Djireb F, Stocker P.,(2006). Phenolic extracts from various Algerian plants as strong inhibitors of porcine liver carboxylesterase. *J Enzyme Inhib Med Chem*; 21:719-26.

F

-Favier A. (2003) Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*.108-115.

-Ferhoum^{1,2}, L. Haderbache², M. Hachemi³ & A. Mohammedi.,(2012) .composition chimique et activité antioxydante de la propolis Algérienne. *Proceeding of the 2nd African Congress on Biology & Health University Ferhat Abbas Setif1*, 11-13.

-Feboulaaba M., Abdely C .,(2008) .Phénolique composition of *Cynaracardunculus L.* Organs ,and their biologiques activités. *C.R.Biologies*.331:372-379

-Fiorucci S., (2006). Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. *Thèse de doctorat*. Nice, 211p.

-Frankel E. N., Water house A. L. and Teissedre P. L.,(1995).Principal chemicals in selected Californian wines and their antioxidant activity in inhibition oxidation of human low density lipoprotein. *J.Agric. Food. Chem.* 43:221-235 .

G

-Garcia-Salas, A. Morales-Soto, A. Segura-Carretero and A. Fernández-Gutiérrez.,(2010).Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples.*Molecules*. Vol. 15.. pp. 8813- 8826.

- Gardeli, P. Vassiliki, M. Athanasios, T. Kibouris et M. Komaltis.,(2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food chemistry*. 107:1120-1130.

-Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A.M., (2001).Le préparateur en pharmacie. Dossier 2, *Botanique-Pharmacognosie-Phytotherapie-homeopathie*. Tec et Doc (Ed), 272p.

-Gomez- Caravaca A.M., Gomez –Romero M., Arraez- Roman D. ,Segura- Carretero A., Fernandez – Gutierrez A. ,(2006) .Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and biomedical analysis*. 41: 1220-1234.

H

-Hagerman A.E., Riedl K.M., Jones G.A., Sovik K.N.,(1887) . High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (5), 1887-1892.

-Hagerman, A.E., Butler, L.G.,(1981). The specificity of proanthocyanidin– protein interactions.*Journal of Biological Chemistry* 256, 4494–4497.

-Hagerman A.E., Riedl K.M., Jones G.A., Sovik K.N. et al.(1998).High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

-Halliwell B, Gutteridge JMC.,(1999).Free radicals in biology and medicine.*Ed 3, Oxford University Press*, 415-421.

-Harborne J. B., Williams C. A., (1992). Advances in flavonoid research since. *Phytochemistry*.55 :481-504.

-Heinrich M, Chan J S, Wanke C N and Simmonds M S J., (2009). Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic Acid 1 and 2 – A global assessment based on bibliographic sources,*Ethnopharmacology*, 125, 108-144.

-Hennebelle T., (2006). Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de la lamiles productrices d’antioxydants: *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées). *Thèse de doctorat. Lille*, 304p.

J

-Jeong S.M., Kim S.Y., Kim D.R., Jo S.C., Nam K.C., Ahn D.U., et Lee S.C., (2004). Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from *citrus peels*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52, 3389–3393.

K

-Kahouadji, M.S.,(1995). Contribution à une étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Maroc oriental. Thèse de troisième cycle. *Université Mohammed I. faculté des sciences*, Oujda. 206 p.

-Ketsawatsakul U, Whiteman M and Halliwell B., (2000). A reevaluation of the peroxynitrite scavenging activity of some dietary phenolics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279, 692-699.

-Kone Donatien, 2009. Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes-extraction, identification d'alkaloïdes-caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante. Thèse de doctorat en chimie organique, *Universités Paul Verlaine de Metz-UPV-M (France) et de Bamako*, 157p.

-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.

-Koechlin-Ramonatxo C., (2006). Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way of nutrition in respiratory diseases. *Nutr. Clin. et Métab.* 20 165-177.

-Kumaran, A. et Karunakaran, R.J.,(2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 40, 344–352.

L

-Larousse encyclopédie des plantes médicinales, édition., (2001). Paris, p16.

-Lehucher-Michel M P., Lesgards J F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M., (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. P 30-1076-1081.

-Li K., Gengx., Simonsen J., Karchesy J., (2004). Novel wood adhesives from condensed.

-Li H-B. , Wong C-C., et Cheng K-W., Feng C.,(2008). Antioxidant properties in vitro and total Phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LebensmittelWissenschaft and Technology*. 41(3), 385–390.

-Louis S., (2004). Diversité structural et d'activité biologique des Albumines sentomotoxiques de type 1b des légumineuses. *Thèse de doctorat. Lyon*, 259p.

M

- **Maamri., (2008).**étude de *Pistacia atlantica* de deux régions de sud Algérie: dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens, mémoire magister, *Université De Boumerdes*.
- Mansour A., (2009).**Investigation photochimique de l'extrait n- butanol de l'espèce *centaurea A Fricanai*.
- Macheix J.J., Fleuriot A., Jay Allemand C.,(2005).**Les composés phénoliques des végétaux ISBN2-88074-625-6.
- Maihebiau., (1994)** . La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. *Lausanne*. P.635.
- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., Kefalas, P., (2005)** .Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemist.*. 89 411-420.
- Martinez-Cayuela, M., (1995).** Oxygen free radicals and human disease.*Biochimie* 77, 147-161.
- Maataoui, B.S., Hmyene, A., Hilali, S., (2006).** Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*, 7(1):3-8.
- Maihebiau.,(1994)** .La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. *Lausanne*. P.635.
- Majhenic L., kergel M.S., etKnez Z., (2007).**Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts.*Food Chemistry*.104, 1258–1268.
- Mohammedi Zohra., (2006)** . Étude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes la région de Tlemcen. *UniversitéAbou BakrBelkaid*. Tlemcen.
- **Mohammedi and F. Atik.,(2011).** Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarixaphylla* (L.) karst.*Inter. J. Pharma. Bio. Sci.* Vol. 2. pp. 609-615.
- Miliauskasa, P.R. Venskutonis. et T.A. Van Beek.,(2004).**Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chemistry*. 85:231-237.
- Meziti, A., (2009).**Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L Étude in vitro et in vivo. Mémoire de magistère. *Université el-hajlakhdarbatna*. Département des Sciences Biologiques. P, 41-49.
- Muller K., (1992).**Freie Radikale Bedeutung in pathophysiologie und therapie.Dtsch. Apoth.Ztg. 132 : 1473-1482.
- **Moazzem Hossen, Md. Shakhawat Hossain, Jahidul Islam, M. Nurunnobi Pinto,**

Nur-E-Jannat and Firoj Ahmed.,(2014).Comparative preliminary phytochemical and biological investigations on *Andrographis paniculata*(Nees) and *Aristolochia indica*(Linn).*Scholars Research Library Der PharmaChemica*, 2014, 6(3):332-338

N

-Nève, J., (2002). Nutrition et stress oxydant : Modulation de l'apport alimentaire en anti-oxydants. Optimisation of dietary intake of anti-oxidants.*Nutrition cliniqueetmétabolisme* 16, 292–300.

-Novelli G. P., (1997). Role of free radicals in septic shock .*J PhysiolPharmacol*.48 : 517-527.

O

-Okamura H., Mimura A., Yakou Y., (1993).Antioxydant activity of Tannins and flavonoid in *Eucalyptus rostarta*.*Phytochem*, 33:557-561.

-Organisation Mondiale de la Santé (OMS), (2002). Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour ,*Genève*. 78p.

-Oyaizu M.,(1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition* 1986; 44:307–315.

P

-Paul R. Saunders, PhD,(2005). Un guide pratique des plantes médicinales. Réseau canadien d'infotraitements sida (CATIE)*Édition révisée*.p2.

-Payal Chawla1, Amit Chawla1, Gagan Shah1, U.S. Baghell, R.K. Dhawan1.,(2013). A Review On Pharmacognosy And Biological Activities Of *Aristolochia*. *Asian Journal of Research in Biological and Pharmaceutical Sciences*.1(2), 101 - 110.

-Pfeifer HW (1966).Revision of the North and Central American hexandrous species of *Aristolochia* (*Aristolochiaceae*). *Ann Mo Bot Gard* 53: 115–196.

-Peronny S., (2005). La perception gustative et la consommation des tannins chez le maki (*Lemur catta*). *Thèse de doctorat*, 151p.

-Pincemail j., Bonjean K., Cayeux K., defraigne J.O., (2002).Physiological action of antioxydant.

-Pooter H.L. , Schamp N., (1986). Comparaison of the volatilscomposition of some Calaminthasatureja species.In : Progress in essential oil research. *Ed. E-J. Brunk, Walter De Gruyter*, Berlin.139-150p.

R

-Reynaud J., Lussignol M., (2005). The flavonoids of *Lotus Corniculatus*. *Lotus Newsletter*, 35:75-82.

S

Sabouni Rima^{1,*}, Boukhres Selma² & Kabouche Ahmed³,(2012). Separation Et Identification Des Substances Bioactives De La Phase Acetate D'ethyle De L'espece *Astragalus Gombo Coss.* &Dur. *Biological &Pharmacological activities of Natural Substances*,p171.

-Sandrine L., (2004) .;Diversité structurale et d'activité biologique des Albumines entomotoxiques de type 1b des graines de légumineuses. *thèse de doctorat*. Lyon.

- **Siabana Abdoulaye.,(2009).** Etude de la phytochimie et des activites biologiques de *Aristolochiaalbida* DC (*Aristolochiaceae*) utilise dans le traitement des douleurs abdominales.Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto -Stomatologie ,*universite de Bamako*.

-Sripad, V. Prakash and M. S. NarasingaRao.,(1982).Extractability of polyphenols of sunflower seed in various solvents.*J. Biosci.* Vol. 4. pp. 145-152.

-Siddhuraju P.et Becker K., (2007) .The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vignaunguiculata* (L.) Walp.) seedextracts. *Food Chemistry*. 101(1), 10-19.

-Spiller, G. &Spiller, M., (2007). Tout savoir sur les fibres. *Editions le mieux-etre*, p27.

-Sorg, O .,(2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes rendus biologies* 327, 649-662.

-Sohal R. S., Mockett R. J., Orr W. C.,(2002) .Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis, *Free Rad. Biol. Med.* 33 (5) : 575.

-Singleton, V.L., Ross, J.A., (1956).Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagent.*American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144–158.

-Shrishailappa Badami, Christy K Jose, ChoksiRakshit Kumar K, Santosh Kumar H Dongre,Jagadish PC and Suresh B.,(2005). In vitro antioxidant activity of various extracts of *Aristolochiabraceolata* leaves. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*.5(4), 316-321.

T

-Teixeira da Silva J-A., (2004) . Mining the essential oils of the Anthemideae.*African journal of biotechnology*.3 (12), pp706-720.

V

-**Vansant G.** ,(2004).Radicauxlibres et antioxydants :principes de base. *Ed InstitutDanone*.

-**Volker MA, Stiborova M, Schmeiser HH (2002)**.Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review. *Mutagenesis* 17: 265–277.

W

-**Wanke, S., F. González & C. Neinhuis. (2006)**. Systematics of pipevines: Combining morphological and fast-evolving molecular characters to investigate the relationships within subfamilyAristolochioideae (*Aristolochiaceae*). *Intl. J. Pl. Sci.* 167:1215-1227.

-**Wu TS, Damu AG, Su CR, Kuo PC (2004)**. Terpenoids of Aristolochia and their biological activities.*Nat Prod Rep* 21: 594–624.

-**Weinreb, O., Mandel, S., Amit,T., Youdim M.B. (2004)**. Neurological mechanisms of greentea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases.*The Journal of Nutritional* 15, 506-516.

Z

-**Zweier, J. L.; Talukder, M. A.,(2006)**.The role of oxidants and free radicals in reperfusioninjury. *Cardiovasc. Res.* 70:181–190; 2006.

Y

- **Yermakov, V.V. Arasimov et N.P. Yarosh.,(1987)**.Methods of biochemical analysis of plants.Agropromizdat. Leningrad.

Résumé

Notre étude a pour objectif de évaluer la teneur en composés phénoliques et d'étudier l'activité antioxydante d'une plante répondeuse en Algérie appelée *Aristolochia sp* (Ben Rostoum). Cette plante est largement utilisée en médecine traditionnelle pour ses propriétés biologiques attribuées essentiellement aux polyphénols.

Afin d'évaluer le meilleur moyen d'extraction des composés phénoliques par la macération, deux solvants (méthanol/eau, chloroforme) sont utilisés . Le meilleur rendement d'extraction est enregistré par le premier macération soit une moyenne de 09.007 % . Pour La quantification des composés phénoliques on a utilisé seulement l'extrait méthanolique , La méthode de folin et la quantification des flavonoïdes par la méthode de AlCl₃ ont révélé une teneur d'*Aristolochia sp* en polyphénols (194.4 ± 0.217 mg EAG/100g) et en flavonoïdes (115.6 ± 0.158 mg EQ/100g). L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique a été évaluée par deux méthodes et comparé avec de standard Vitamine C . Pour le test le piégeage du radical libre DPPH, l'extrait de la plante obtenue *in situ* est doté d'un bon pouvoir antioxydant (IC₅₀=0,166 mg/ml), avec une efficacité tres proche à celle exprimée par l'acide ascorbique (IC₅₀=0.146mg/ml) pour la méthode de FRAP, le pouvoir réducteur de l'extrait des racines EC₅₀=19.22µg/ml est moins petites comparé à celui de standard EC₅₀=14.96µg/ml . La chromatographie sur couche mince, appliquée à la fin de ce travail, montre des profils de séparation, indiquant la présence de nombreux constituants, parmi lesquels l'acide gallique et le quercetine.

Mots-clés: Extraction, composés phénoliques, activité antioxydant, le piégeage du radical libre DPPH, la réduction du fer, CCM, *Aristolochia sp*.

Abstract ;

Our study has for objective to test the content in phenolic compounds and to study the antioxidant activity of a plant widely found in Algeria called *Aristolochia sp* (Ben Rostoum). This plant is frequently used in traditional medicine for its biological properties attributed essentially to polyphenols. To estimate the best method of extraction of the phenolic compounds by the maceration two solvents (methanol / water, chloroform) are used. The best yield on extraction is recorded by the maceration (methanol / water) with an average of 09.007 %. For The quantification of phenolic compounds, the méthanolique extract was used, the method of folin and the quantification of flavonoids by the method of AlCl₃ revealed the wealth of *Aristolochia sp* in polyphenols (194.4 ± 0.217 mg EAG / 100g) and in flavonoids (115.6 ± 0.158 mg EQ / 100g).The antioxidant activity of the extract méthanolique was estimated by two methods and compared with standard Vitamin C; the trapping of the free radical DPPH and the reduction of the iron Fe. In the test of the activity anti DPPH, the méthanoïque extract of the roots of *Aristolochia sp* showed the higher antioxidant activity (CI₅₀=0,166 mg/ml) compared with vtamineC (CI₅₀=0.146mg/ml) , for the reducing power by FRAP method, of the extract of roots is raised CE₅₀=19.22µg/ml but still less compared with the standard CE₅₀=14.96µg/ml . The chromatography on thin layer, applied to the end of this work, data of the profiles of separation, indicated the presence of some constituents, among which the Gallic acid and quercetin.

Keywords: extraction, phenolic compounds, activity antioxidant, the trapping of the free radical DPPH, the reduction of the iron, CCM, *Aristolochia sp*.

ملخص

تهدف دراستنا إلى اختبار المحتوى الفينولي و دراسة النشاط المضاد للأكسدة لعينة نباتية تدعى بن رستم اخذت من منطقة في الجزائر . يستخدم هذا النبات على نطاق واسع في الطب التقليدي ل خصائصه البيولوجية يعزى في المقام الأول إلى مادة البوليفينول من أجل تقييم أفضل طريقة ل استخراج المركبات الفينولية من قبل النقع استخدمنا اثنين من المذيبات (الميثانول / الماء ، الكلوروفورم) . يتم تسجيل أفضل عائد الاستخراج عن طريق أول نظام المذيبات في المتوسط من 09.007 % . لكي نحدد المركبات الفينولية استخدمنا فقط محلول الميثانويك ، وطريقة فولين وتقدير من الفلافونويد بمحلول ثلاثي الكلور الالمنيوم AlCl₃ لكشف ثروة نبتة برستم : البوليفينول (194.4 ± 0.217 SGA ملغ / 100غ) و مركبات الفلافونويد (115.6 ± 0.158 ملغ مكافئ / 100غ) تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص المثلي من قبل طريقتين و مقارنتها مع مستوى فيتامين C ؛ DPPH و ارجاع الحديد . في اختبار لمكافحة النشاط -DPPH, استخرجت من جذور بن رستم أظهرت أعلى نشاط مضاد للأكسدة بنسبة (80 %) الفاعلية المضادة للأكسدة المستخرجة من جذور بن رستم مرتفعة مقارنة بالمعايير .

تقنية الكروماتوغرافيا ccm ، وتطبيقها نهاية هذا العمل ، تظهر لنا ملامح الانفصال ، مشيرا إلى وجود العديد من العناصر ، بما في ذلك حمض الغاليك ، كيرسيتين

كلمات البحث: استخراج ، المركبات الفينولية ، والنشاط المضادة للأكسدة ، DPPH ، وانخفاض الحديد ، CCM ، بن رستم