

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar TELIDJI Laghouat

Faculté des sciences

Département de Biologie

جامعة عمار تليجي - الاغواط

كلية العلوم

قسم البيولوجيا



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme Master en Biologie

Option : Biochimie Des Produits Naturels

Thème

Contribution à l'étude de l'effet anti-radicalaire et anti-peroxydation des lipides plasmatique et cervicale des extraits bruts de quelques plantes médicinales locales.

Présenté par :

BAITICH Soumia

BRAHIMI Djamila

Encadreur : *Mr. BOUKEROUIS* Djoudi

Président : *Mr. GOUZI* Hichem

Examineur : *Mr. SIFI* Ibrahim

JUIN 2014

REMERCIEMENT

Ce travail est effectué et réalisé grâce à Allah que nous remercions en premier lieu.

Nous tenons tout d'abord à remercier Mr. BOUKEROUIS Djoudi professeur et encadreur de ce travail non seulement pour son aide, sa disponibilité, mais aussi et surtout pour la confiance dont il a fait et dont il fait encore preuve aujourd'hui à notre égard et nous tenons à lui faire part de notre gratitude.

Nous remercions également M. le président du jurés GOUZI Hichem et M. l'examineur SIFI Ibrahim d'être accepter notre travail.

Nous remercions aussi tous nos professeurs, qui nous ont accompagnés tout ou long de notre cursus universitaire, de l'Université Ammar Telidji à Laghouat aussi bien ceux de l'université Ziane Achour à Djelfa pour leurs efforts considérables.

Nous souhaitons aussi adresser nos sincères remerciements à toute l'équipe administrative et celle des laboratoires de département de Biologie de notre Université.

Nous adressant nos sincère remerciements à: Mr. GOUZI Hicham, Mr. HAMEL Khaled le Chef de Service de Centre de Transfusion du Sang de l'Hôpital de la ville de Laghouat, Melle. BENDJEDIAA Khaoula. Melle.et BAITICHE Fatima Zohra.

Nous adressons également toutes nos pensées les plus amicales à : CHELLAMA Khaoula et SÂAIDAT Asma, pour l'ambiance sympathique vécue pendant la phase pratique de notre modeste travail.

DEDICACE

A l'aide d'ALLAH le Tout Puissant, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

A mes chers parents,

*Pour leurs mains accueillantes qui m'ont tant fournies,
Pour leurs cœurs qui m'ont tant donnés.
Pour leurs sourires qui m'ont tant réchauffé.*

A mon père que dieu le garde, à qui je dois l'amour le respect et la reconnaissance pour son encouragement et son soutien tout au long de mes études.

A ma mère que dieu la garde, à qui je dois toute la tendresse et l'affection du monde .Merci chère maman .

A mes sœurs

Amina(Mouhamed), Fatima, Khadidja(Imad Eddin) , Asmaa et Marwa.

A mes frères

Oussama, Abdel Aziz, Ilyas et Ahmed

A tout la famille BAITICHE

A mes amies avec qui j'ai partagé les plus beaux moments au cours de mon cursus à l'université: Manel, Imane, Nour-elhouda, Zahra, et Amel,

A mes amies de résidence : Nawel, Cherifa, Amel, Marwa, Naaima, Hanifa, Chahra et Wafaa ..

A tous mes collègues de la promotion de master 2014 en Biochimie des produits naturels

A tous qui me connaissent et qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Soumia

DEDICACE

Je remercie ALLAH le tout puissant, maître des cieux et de la terre, qui m'a permis de mener à bien ce travail.

Tout d'abord

Je dédie ce travail à mes Parents , qu'ils trouvent ici toute ma gratitude, qui m'ont accompagnés par leurs prières, qu'ALLAH puisse leurs prêter de longue vie et beaucoup de santé et de bonheur dans les deux vies

Pour leur soutien tout au long de mes études

A mes Soeur et mes Frères

(Djamel, Kamila, Redouane, Rania, Ayoub, Israa, Yahiya, Fati)

À toutes mes Amies (Soumia, Zina, Imane, Nawel, Amel, Naima Marwa,

Sara, Majda, Chérifa, Khadija, Zakia , Amina

Malika, Fadwa, Nesrin, Fatiha, D'hyba, Maymouna, Fadila et wafa.)

En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.

Et à mes Amis de la promotion de biochimie

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour

Djamila

Résumé

L'objectif de ce travail est l'étude des propriétés anti-oxydantes des extraits éthanoliques de quelques plantes médicinales locales: *Lonicera implexa*, *Rhamnus alaternus*, *Crataegus azarolus*, *Cistus albidus* et *Adiantum capillus-veneris* par la détermination de l'activité anti-DPPH et le pouvoir réducteur suivi par des tests d'inhibition de la peroxydation lipidique induite par FeSO₄ ou par AAPH. Les résultats obtenus montrent que *C. albidus* est la meilleure plante pour tous les tests, elle a prouvé, d'ailleurs, un taux très élevé en phénols totaux (227,90mg EAG/g), un effet anti-DPPH dont l'IC₅₀ (7.21±1.24) est la plus proche de celle de la rutine (2,34 µg/ml) utilisée ici comme standard et un effet anti-péroxydation lipidique induite par FeSO₄ avec IC₅₀ de 13,35 ± 0,76 µg/ml plus efficace à celle de la rutine même (39,18 µg/ml). Le pouvoir réducteur est aussi le meilleur (513,15 mg Eq Acide Ascorbique/ 1g) pour cette plante. Les feuilles *C. azarolus* viennent en deuxième position pour les mêmes tests: l'effet anti-DPPH (IC₅₀= 25,06 µg/ml), l'effet anti-péroxydation lipidique induite par FeSO₄ (41,21µg/ml) et pouvoir réducteur (370 mgEq Acide Ascorbique/ 1g). Concernant, l'extrait d'*A. capillus-veneris* qui fait l'exception d'être la plus riche en flavonoïdes (837,21µg/ml) parmi les cinq plantes étudiées, elle est la plus faible en termes de teneur en phénols totaux et aussi la moins efficace contre toutes les activités testées. La chromatographie sur couche mince, appliquée à la fin de ce travail, montre des profils de séparation avec plusieurs fractions, indiquant la diversité des molécules synthétisées par ces plantes.

Mots clés: plantes médicinales, composé phénolique, flavonoïdes, anti-oxydation, anti-péroxydation, TBARS, AAPH, DPPH.

Abstract:

The objective of this work is the study of antioxidant properties of ethanolic extracts of some local medicinal plants: *implexa Lonicera*, *Rhamnus alaternus*, *Crataegus azarolus*, *Cistus albidus* and *Adiantum capillus-veneris* by the determination of the anti-DPPH, the reducing power and inhibition tests lipid peroxidation induced by FeSO₄ or by AAPH. The results show that *C. albidus* is the best for all plants tested, it proved, moreover, a very elevated levels of total phenols (227.90 mg EAG / g), an anti-DPPH effect which IC₅₀ (7.21 ± 1.24) is the closest to that of Rutin (2.34 mg / ml) used here as a standard and Inhibition of lipid peroxidation induced by FeSO₄ with IC₅₀ of 13.35 ± 0, 76 g / ml, more effectively than the Rutin (39.18 mg / ml). The reducing power is also the best (513, 15 mg Eq Ascorbic Acid / 1g) for this plant. Leaves *C. azarolus* come second for even tests: anti-DPPH effect (IC₅₀ = 25, 06 mg / ml), the effect of lipid peroxidation induced by FeSO₄ (41.21 mg / ml) and reducing power (Ascorbic Acid 370 mg Eq / 1g). On the extract of *A. capillus-veneris* which is the exception to be the richest in flavonoids (837.21 mg / ml) among the five plants studied, it is the weakest in terms of content of total phenols and also less effective against all activities tested. The thin layer chromatography, applied at the end of this work, shows separation profiles with several fractions, showing the diversity of molecules synthesized by these plants.

Key words:

Phenolics compound, anti-peroxidation, antioxidant activity, DPPH, CCM, medicinal plants, AAPH .

ملخص:

يهدف هذا العمل إلى دراسة تأثير المركبات الفينولية لبعض النباتات الطبية المحلية *Lonicera implexa, Rhamnus alaternus, Crataegus azarolus, Cistus albidus* و *Adiantum capillus-veneris* وهذا بتحديد مدى فعاليته المستخلصات الايثانولية لهاته ضد DPPH ودراسة طاقتها الإرجاعية متنوعة بقياس مدي تثبيطها لتأكسد الليبيدات وذلك ب تأثير ال FeSO4 و AAPH .

النتائج المتحصل عليها أظهرت أن *Cistus albidus* الأفضل من بين جميع النباتات المدروسة حيث أنها الأفضل من حيث أنها غنية بالمركبات الفينولية (227.90 مغ/غ مكافئ حمض الغاليك) وسجلت فعاليتها ضد DPPH حيث أن IC_{50} لديها قدر ب(7.21 ± 1.24) وهو الأقرب للروتين (2,34 ميكروغرام/مليتر) و أيضا فاعليتها ضد تأكسد الليبيدات المطبقة بال FeSO4 بقيمة IC_{50} تعادل (13,35 ميكروغرام/مليتر) حيث أنها فعالة بدرجة اكبر من الروتين (39,18 ميكروغرام/مليتر). أما بالنسبة للقدرة الارجاعية لهاته النبتة فهي الأفضل بما يعادل (15, 513 مغ/غ مكافئ حمض الاسكوربيك). تليها أوراق *C. azarolus* بالنسبة لجميع الاختبارات : فعاليتها ضد DPPH ب IC_{50} يقارب (25,06 ميكروغرام /مليتر) , فعاليتها المضادة للأكسدة الليبيدية المطبقة ب FeSO4 (41,21 ميكروغرام/مليتر) وقدرتها الارجاعية 370 مغ/غ مكافئ حمض الاسكوربيك). و بالنسبة لمستخلص ال- *A. capillus veneris* فهو بالاستثناء الأغنى بالفلافونويدات (837,21 ميكروغرام /مليتر) من بين النباتات الخمس وهي الأقر من ناحية توفرها على المركبات الفينولية .وزيادة على ذلك فهي الأضعف فعالية ضد جميع الاختبارات المطبقة . و أخيرا تقنية ال CCM في نهاية هاته الدراسة توضح مدى تنوع كل هاته النباتات الطبية بمختلف المركبات .

الكلمات المفتاح:

المركبات الفينولية,الفاعلية المضادة للأكسدة,الفاعلية المضادة لأكسدة الليبيدات ,AAPH, DPPH,CCM, النباتات الطبية.

Liste des figures

Figure 01 : l'acide salicylique et ses principaux dérivés naturels	11
Figure 02 : les principales classes de flavonoïdes	13
Figure 03 : exemple de structure d'un tannin condensé	14
Figure 04 : deux exemples de tannins hydrolysables	15
Figure 05 : origine des différents radicaux libres ORS de l'oxygène impliqué en biologies	16
Figure 06 : conséquence cellulaire de la peroxydation lipidique.....	17
Figure 07 : mécanisme moléculaire de l'effet anti-radicalaire des flavonoïdes	18
Figure 08 : flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques	19
Figure 09 : photo de <i>Lonicera implexa</i>	20
Figure 10 : photo de <i>Rhamnus alaternus</i>	20
Figure 11 : photo de <i>Crataegus azarolus</i>	21
Figure 12 : photo de <i>Cistus albidus L</i>	21
Figure 13 : photo d' <i>Adiantum capillus-veneris</i>	22
Figure 14 : la réaction entre MDA et TBA.....	26
Figure 15 : schéma représentatif de détermination des rapports frontaux	29
Figure 16 : courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux	31
Figure 17 : histogramme représentant la teneur en phénols totaux des extraits des plantes	31
Figure 18 : courbe d'étalonnage réalisée avec la rutine pour le dosage des flavonoïdes	33
Figure 19 : histogramme représentant la teneur en flavonoïdes des extraits des plantes.....	33
Figure 20 : histogramme représentant l'effet anti-DPPH (%) à la concentration de 100µg/ml.....	34
Figure 21 : effet anti-DPPH d'extrait de <i>C.albidus</i> à différentes concentrations	36
Figure 22 : effet anti-DPPH d'extrait de <i>C. azarolus</i> , <i>L .implexa</i> , et <i>R .alaternus</i> à différentes	37
Figure 23 : effet anti-DPPH d'extrait de <i>A. capillus</i> à différentes concentrations.....	38
Figure 24 : pouvoir réducteur des extraits des plants étudiées (mg Eq A As /1g)	39
Figure 25 : effet anti-peroxydation lipidique des extraits des plantes et la rutine à 100µg/ml	40
Figure 26 : effet anti-peroxydation lipidique à différentes concentrations de l'extrait de <i>C .albidus</i>	41
Figure 27 : effet anti-peroxydation lipidique à différentes concentrations des extraits de : <i>C. azarolus</i> <i>,R.alatarnus ,L.implexa</i>	42
Figure 28 : effet anti-peroxydation lipidique à différentes concentrations de l'extrait d' <i>A.capillus</i>	43
Figure 29 : effet anti-peroxydation sur des lipides de plasma humain induite par AAPH	44
Figure 30 : photo des profils chromatographiques, des extraits des plantes obtenus avec le mélange Hexane : Ethyle acétate (9 :1).....	45
Figure 31 : photo des profils chromatographiques, des extraits des plantes obtenus avec le mélange Toluène : Acétone (9 :1).....	45
Figure 32 : photo des profils chromatographiques, des extraits des plantes obtenus avec le mélange acétate d'éthyle : acide formique : acide acétique : H ₂ O	46

Liste des tableaux

Tableau I: quelques espèces de plantes et leurs usages traditionnels	07
Tableau II: taux d'extraction des différentes plantes étudiées	30

Liste des abréviations

AAPH: 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride .

ADN:acide désoxyribonucléique.

ALCL₃:trichlorure d'aluminium.

DPPH:2,2-diphénylpicrylhydrazyl.

EAG: équivalent acide gallique.

ER:équivalent rutine.

ERO:espèce réactives de l'oxygène .

Fe²⁺ : ion de fer.

G:gramme.

IC₅₀: concentration à 50% d'inhibition .

M:molaire

Mg:milligramme.

Min: minute.

ml:millilitre.

mM:millimolaire.

NaCl:chlore de sodium.

NaOH:hydroxyle de sodium.

nM:nanomètre.

O₂ -: anionsuperoxyde.

OMS: organisation mondiale de la santé.

PBS: Phosphate Buffer Solution.

pH: potentiel hydrogène .

V:volume.

°C:degré Celsius.

µg: microgramme.

Abs: absorbance.

CCM: chromatographie sur couche mince.

EAG: équivalent acide gallique.

ER: équivalent rutine.

Na₂CO₃: bicarbonates de sodium.

NO: oxyde nitrique.

OH: hydroxyld'hydrogène.

OH[•]: radical hydroxyle.

Rf: rapport frontal.

RO[•], R[•], R-S[•]: radicaux organiques.

S: seconde.

UV: ultraviolet.

CHRU:Centre Hospitalier de Recherche Universitaire,

AHHD: l'acide Hexahydroxydiphénique.

MDA:malonedialdéhyde.

RED: réducteur

Ox: oxydant

FeCl₃: trichlorure de fer.

TBARS: Thioarbituricacidreagent substance

Na₂HPO₄:phosphate de sodium

K₃Fe (CN): 6 ferricyanures de potassium

TBA: thiobarbiturique acide

µ:micro

EAA: équivalent acide ascorbique



Sommaire



Sommaire

Introduction	01
--------------------	----

Synthèse bibliographiques

Chapitre I: les plantes médicinales

I.1. Historique sur l'utilisation des plantes médicinales	03
I.2. Les plantes médicinales	04
I.2.1. Définition	04
I.2.2. Utilisation des plantes médicinales dans les traitements des maladies.....	04
I. 3. La phytothérapie	05
I.3.1. Les avantages de la phytothérapie	05
I.4. Des traitements à base de plantes	05
I. 4.1. Exemple des actions spécifiques	05
I. 4.2. L'efficacité des soins à base de plantes.....	06
I.5. Quelques exemples de plantes médicinales méditerranéennes.....	07
I. 6. Quelques exemples de plantes médicinales en Algérie	08
I.7. Les plantes médicinales de l'efficacité à la toxicité	08

Chapitre II: les composés phénoliques et leurs propriétés antioxydantes

II.1. Généralité sur les composés phénoliques.....	10
II.2. Les phénols simples	10
II.2.1. Les acides phénoliques.....	10
II.2.2. Propriétés biologiques des acides phénoliques	11
II.3. Stilbènes	12
II. 4. Coumarines	12
II. 4.1. Propriété biologique des coumarines	12
II. 5. Anthraquinones	12
II. 6. Les flavonoïdes	12
II. 6.1. Propriétés des flavonoids	14
II. 7. Les tanins	14
II. 7.1. Les tanins condensés	14
II. 7.2. Tanins hydrolysables.....	15
II. 7.3. Propriétés pharmacologiques des tannins	15
II.8. Stress oxydant et les composés phénoliques	16
II.8.1. Le stress oxydatif	16
II. 8.2. Les radicaux libres et leur origine	16
II.8.3. La peroxydation lipidique	17
II. 8. 4. Les composés phénoliques en tant que antioxydants	18
II. 8. 4. 1. Piégeage des radicaux libres	18
II. 8. 4. 2. Chélation des ions métalliques	18
II. 8. 4. 3. Inhibition de diverses enzymes	19
II. 8. 4. 4. Effet anti peroxydation lipidique	19

Partie pratique

Chapitre III : matériel est méthodes

III.1. Matériel vegetal	20
III.1.1. <i>Lonicera implexa</i>	20
III.1.2. <i>Rhamnus alaternus</i>	20
III.1.3. <i>Crataegus azarolus</i>	21
III.1.4. <i>Cistus albidus</i>	21
III.1.5. <i>Adiantum capillus-veneris</i>	22
III.2. Récolte et séchage	22
III.3. Broyage et extraction	22
III.4. Dosage des composés phénoliques	23
III.4.1. Dosage des phénols totaux	23
III.4.1.1. Principe de la méthode	23
III.4.1.2. Protocole expérimental	24
III.4.2. Dosage des flavonoïdes	24
III.4.2.1. Principe de la méthode	24
III.4.2.2. Protocole expérimental	24
III.5. Evaluation de l'activité antioxydant	25
III.5.1. Test anti- DPPH	25
III.5.1.1. Principe de la méthode	25
III.5.1.2. Protocole expérimental	25
III.6. Pouvoir réducteur	25
III.6.1. Principe de la méthode	25
III.6.2. Protocole expérimental	25
III.7. Evaluation de l'effet anti peroxydation lipidique	26
III.7.1. L'inhibition de la peroxydation lipidique du cerveau	26
III.7.1.1. Principe de la méthode	26
III.7.1.2. Protocole expérimental	27
III.7.2. L'inhibition de la peroxydation des lipides plasmatique par l'AAPH	27
III.7.2.1. Principe de la méthode	27
III.7.2.2. Protocole expérimental	28
III.8. Chromatographie sur couche mince "CCM"	28
III.8.1. Principe de la méthode	28
III.8.2. Protocole expérimental	29
III.9. Outils informatiques	29

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV.1. Rendement de l'extraction.....	30
IV.2. Résultats de dosage des composés phénoliques	30
IV.2.1. Teneur en phénols totaux	30
IV.2.2. Teneur en flavonoids	33
IV.3. Activité anti-DPPH	34
IV. 3.1. Résultats de l'activité anti-DPPH à la concentration de 100µg /ml	34
IV.3.2. Résultats de l'activité anti-DPPH en fonction de la concentration des extraits	35
IV.3.2.1. Effet anti-DPPH de l'extrait de feuilles de <i>C.albidus</i> à différentes contractions ...	36
IV.3.2.2. Effet anti-DPPH de l'extrait de feuilles de <i>C. azarolus</i> , <i>L .implexa</i> et <i>R. alaternus</i> à différentes contractions	37
IV.3.2.3. Effet anti-DPPH de l'extrait de feuilles d' <i>A.capillus</i> à différentes concentrations.	38
IV.4. Résultats de pouvoir réducteur	39
IV.5. Résultats de l'effet anti peroxydation lipidique	40
IV.5.1. Résultats de l'effet anti-peroxydation des lipides cervicales	40
IV.5.1.1. Résultats d'anti-peroxydation lipidique à 100µg /ml	40
IV.5.1.2. Effet anti-peroxydation lipidique en fonction des concentrations de <i>C. albidus</i>	41
IV.5.1.3. Effet anti-peroxydation lipidique en fonction des concentrations de <i>C.azarolus</i> , <i>R.alatarnus</i> , <i>L.implexa</i>	42
IV.5.1.4. Effet anti-peroxydation lipidique en fonction des concentrations de <i>A.capilus</i>	43
IV.5.2. Résultats de l'effet anti peroxydation lipidique plasmatique induit par AAPH	44
IV.6. Résultats de chromatographie sur couche mince CCM	45
Conclusion.....	58
Références bibliographiques	60



Introduction

Introduction

A travers les siècles, l'être humaine a su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer sa santé (**Iserin, 2001**).

Leurs utilisations a toujours était faites de façon empirique ce qui a laissé derrière un patrimoine transmis de génération en génération (**Svoboda et Svoboda, 2000**).Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours aux propriétés curatives des plantes et que les traitements à base de ces dernières reviennent au premier lieu.

Certainement, c'est l'expérience qui a donné à l'homme le choix d'utilisation d'une plante par rapport à une autre, cependant cette expérience ne doit pas être le seul argument pour justifier l'usage de certaines plantes dans les différentes cultures de médecines traditionnelles.

En effet, aujourd'hui, les ethnobotanistes et les praticiens de la médecine traditionnelle sont plus que jadis convaincus sur le fait que l'usage des plantes médicinales sera plus rationnel et plus efficace en mettant la lumière sur les principes actifs qu'elles pourraient contenir.

Avec l'intégration de la technologie dans les techniques d'étude et d'investigation des phytomolécules, des avancées spectaculaires ont marqué ce domaine en prouvant l'immense diversité des métabolites secondaires des plantes. Alors, les plantes présente une immense réserve des substances naturelles.

Une telle évidence œuvre sur des perspectives qui visent à découvrir de nouvelles molécules à caractère thérapeutique notamment contre les phénomènes pathologiques pour lesquelles la médecine actuelle n'a pas encore trouvé de remède. Parmi ces problèmes de santé, il est à citer, les complications inflammatoires, les tumeurs, les problèmes cardiovasculaires, le diabète etc.

Le stress oxydant qui est défini comme un déséquilibre entre la production et l'élimination des radicaux libre dans notre corps, est largement impliqué dans le développement de ces pathologies en leur devenant synonyme par le fait qu'il est casé totalement constaté dans ces cas de maladies. Le stress oxydatif est le dénominateur commun de ces problèmes de santé. Actuellement, la société scientifique, biologiste et chimiste, met en évidence le rôle tragique du processus oxydatif incontrôlable induit par les espèces réactives oxygénées(ERO). Ces oxydants sont à l'origine directe de différents états pathologiques. Quel que soit le cas, le risque est aggravé avec l'accumulation de ces molécules dans l'organisme en aboutissant à une chaîne réactionnelle radicalaire qui dégrade les molécules vitales biologiques notamment

les lipides. La peroxydation lipidique est l'une des conséquences qui ne passent pas sans laisser des dégâts irréversibles en étant à l'origine des problèmes d'athérosclérose et complications cardiovasculaire (Bahlil, 2010).

Parmi les composés qui possèdent des activités biologiques et thérapeutiques on cite ; les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes, tannins ...), les huiles essentielles, les alcaloïdes.

Les composés phénoliques sont d'une grande diversité structurale et ils sont très connus pour leur effet antioxydants en agissant par divers mécanismes.

Notre travail se propose pour étudier le potentiel antioxydant (effet anti-radicalaire et effet anti-peroxydation lipidique) des extraits de cinq plantes médicinales locales d'Algérie à savoir : *Cistus albidus*, *Crataegus azarolus*, *Rhamnus alaternus*, *Lonicera implexa*, et *Adiantum capillus-veneris*. Tout résultat positif obtenu, pour ces effets, peut être un témoin sur l'usage de ces plantes en médecine traditionnelle, d'une part et d'autre, cela nous oriente sur piste de chercher les molécules qui sont à l'origine de ces propriétés thérapeutiques.

Pour ce faire, on a opté pour :

- Réaliser plusieurs extraits : extrait brut des composés phénolique et des flavonoïdes.
- Etudier l'activité antioxydant : faire des tests ; anti DPPH, pouvoir réducteur.
- Etudier également le pouvoir anti-peroxydation lipidique du cerveau d'animal.
- Etudier également l'effet contre la peroxydation lipidique du plasma du sang humain induite par AAPH.
- Faire une chromatographie sur couche mince.



Synthèse bibliographique

Chapitre I: les plantes médicinales

I.1. Historique sur l'utilisation des plantes médicinales

Pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal, voire l'unique recours de la médecine de nos grands-parents, cependant, malgré le développement de l'industrie pharmaceutique qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies qui étaient souvent mortelles, les plantes médicinales et les remèdes qu'on pouvait en tirer ne furent jamais totalement abandonnés et les gens ne cessèrent jamais de faire appel à la médecine traditionnelle, ce qui a conduit à maintenir vivante une tradition thérapeutique connue depuis nos ancêtres **(Fabre, 2003)**.

Dans l'Antiquité gréco-romaine, mentionnons les grands médecins grecs : Hippocrate; Dioscoride, Galien ; pour sa part, le Romain Plin l'Ancien , à la fois amiral, écrivain et naturaliste, a écrit une Histoire naturelle en 37 volumes. L'ouvrage de Dioscoride Sur la matière médicale (De materia medica), qui décrivait tous les médicaments en usage à son époque, demeura l'une des sources les plus consultées par les médecins jusqu'à l'aube du XIXe siècle. Au XVIe siècle, la célèbre école italienne de Salerne a marqué la médecine de son temps. Elle conseillait au roi « de conserver un esprit gai, de se ménager du repos, et de se contenter d'une alimentation modeste »; aujourd'hui, ces conseils pourraient être suivis judicieusement par chacun d'entre nous. Jusqu'au XIXe siècle, les médecins se contentaient, pratiquement, de puiser dans la « pharmacie du bon Dieu » pour soulager les maux de leurs contemporains. C'est alors que les chimistes ont réussi à isoler les principes actifs de certaines plantes importantes (la quinine du quinquina, la digitaline de la digitale, etc.). Poursuivant leurs recherches, au début du XXe siècle, ils ont fabriqué des molécules synthétiques. Récemment, des médecins et des professeurs dynamiques ont créé des centres de formation en phytothérapie, Ils expérimentent de nouvelles plantes, modernisent la présentation des médicaments et rendent ceux-ci plus efficaces (par exemple, les nébulisats ou extraits secs de plantes sont prescrits sous forme de gélules) **(Iserin, 2001)**.

Depuis les années 1970, le recours aux plantes à des fins médicales rencontre un succès grandissant. Plus qu'un effet mode, il traduit une volonté profonde de retour vers la nature. De nos jours, l'identification de nouveaux principes actifs et la découverte de nouvelles propriétés pharmacologiques, en balance avec les effets néfastes de certains médicaments de synthèse, ont contribué à faire de la phytothérapie une médecine à part entière et à faire comprendre que les plantes pouvaient être d'authentiques médicaments **(Fabre ,2003)**.

I.2. Les plantes médicinales

I.2.1. Définition

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies. Certaines plantes contenant toute une gamme de matières efficaces peuvent avoir des actions très différentes suivant leur préparation (**Schauenberg et Paris ,2008**).

La pharmacopée européenne définit les plantes médicinales comme « des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Par extension, on appelle souvent « plante médicinale » ou « plante » non seulement l'entité botanique mais aussi la partie utilisée (feuille, fleur, racine, écorce, sommité fleurie...). » Ces plantes médicinales peuvent également avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques (**Fabre ,2003**).

L'emploi des plantes médicinales est très valorisés dans toutes les traditions médicales. Il y a deux cents ans encore, les moyens thérapeutiques naturels étaient les seuls remèdes dont disposait l'humanité. Leur utilisation et leurs effets ont donc été minutieusement étudiés, documentés et développés. Les plantes médicinales comme les autres remèdes thérapeutiques et l'étiologie (la recherche des causes de la maladie) ont toujours été intégrés à la culture d'une époque, ou d'une civilisation donnée (**Grunwald et Janicke ,2006**).

I.2.2. Utilisation des plantes médicinales dans les traitements des maladies

Les produits naturels des plantes-dérivés peuvent être utilisés pour le traitement de maladies, donc peut agir comme une base pour le développement de nouveaux médicaments (**Hussain, et al ; 2013**).

I. 3. La phytothérapie

La phytothérapie est souvent présentée comme une médecine naturelle. Toutefois, il existe une certaine ambiguïté : le terme « naturel » équivaldrait aux termes « bénéfique » et « inoffensif » alors que la nature n'est ni bonne ni mauvaise, la mort, la maladie, les venins ou les toxines étant naturels. Des molécules très connues (l'atropine, la colchicine, l'opium, la digitaline) sont extraites de plantes et ne sont pas dénuées de toxicité (**Fabre, 2003**).

On distingue deux types de phytothérapies. Tout d'abord se place la phytothérapie traditionnelle. C'est une thérapie de substitution qui a pour but de traiter les symptômes d'une

affection. Ses origines peuvent parfois être très anciennes et elle se base sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. La seconde forme existante est la phytothérapie clinique. C'est une médecine de terrain dans laquelle le malade passe avant la maladie. Une approche globale du patient et de son environnement est nécessaire pour déterminer le traitement, ainsi qu'un examen clinique complet (**Chabrier, 2010**).

I.3.1. Les avantages de la phytothérapie

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus. C'est pourquoi on utilise à nouveau l'absinthe chinoise (*Artemisia annua*,) et surtout son principe actif pour soigner la malaria lorsque les protozoaires responsables de la maladie résistent aux médicaments. La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, est souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en Occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques (**Iserin, 2001**).

I.4. Des traitements à base de plantes

Si les stratégies adoptées par les phytothérapeutes pour prévenir les maladies ou pour guérir les malades sont différentes selon les nombreuses traditions en usage, les effets sur le corps des traitements à base de plantes sont eux identiques. Plusieurs milliers de plantes sont utilisées de par le monde. Leur champ d'action est vaste et leur puissance varie. La plupart ont des effets spécifiques sur certaines parties de l'organisme et sont reconnues pour pouvoir traiter divers cas (**Iserin, 2001**).

I. 4.1. Exemple des actions spécifiques

Allergies : *Petasites hybridus* ,

Asthme : *Drosera rotundifolia* , *Hederahelix*, *Thymus vulgaris*,

Bronchite : *Cinnamomum camphora* , *Drosera rotundifolia* , *Eucalyptus globules* , *Glycyrrhiza glabra* Brulures : *Arnica montana*, *Calendula officinalis* ,..

Céphalées : *Mentha piperita* , *Petasites hybridus* , *Salix sp* , *Tanacetum parthenium* .

Cirrhose du foie : *Silybum marianum* .

Constipation : *Aloebarbadensis* , *Cassiaacutifolia* , *Plantagoafra* .

Déficit immunitaire (lié ou non à une maladie grave ou auto-immune) : *Baptisiatinctoria* , *Echinaceapurpuria* , *Pelargoniumsidoides* , *Uncariatomentosa* , *Viscum album* .

Diarhée : *Cinnamomumzeylanicum* , *Plantagoafra* , *Potentillaericta* , *Vaccinium myrtillus* , ..

Douleurs cardiaques fonctionnelles : *Cinnamomumcamphora* , *Crataeguslaevigata* .

Épuisement : *cola acuminata* , *Eleutherococcus senticosus* , *Ilexparaguariensis* , *Panax ginseng* , *Paulliniacupana* .

Goutte : *Colchicumautumnale* .

Hémoroides : *Hamamelisvirginiana* , *Pinusmaritima* , *Plantagoafra* , *Ruscusaculeatus* .

Maladies biliaires : *AliliumsativumL* , *Chelidoniummajus* , *Curcuma longa* , *Cynarascolymus* , *Glycine max* , ..

Maladies de la peau : *Agrimoniaeupatoria* , *Arnica montana* , *Calendula officinalis* , ..

Névralgies : *Capsicumfrutescens* , *Menthapiperita* , *Piceasp* , *Salixsp* .

Trouble de la grossesse : *Capsicumfrutescens* . *Vitex agnus –castus* , *Zingiberofficinalis* .

(Grunwald et Janicke ,2006).

I. 4.2. L'efficacité des soins à base de plantes

Les médecins conçoivent difficilement que des soins naturels puissent être aussi efficaces, voire supérieurs aux médicaments. C'est qu'ils ne sont plus formés dans ce domaine depuis longtemps. Cette attitude évolue cependant à mesure que les chercheurs déterminent l'efficacité des plantes. L'exemple du millepertuis (*Hyperkum perforatum* ,), une plante très répandue en Europe, habituellement utilisée comme antidépresseur, illustre bien cette évolution. Les extraits de cette plante sont officiellement reconnus pour leur efficacité contre les dépressions légères et moyennes. Depuis 1979, plus d'une vingtaine d'études cliniques ont révélé que les extraits du millepertuis sont aussi efficaces que les antidépresseurs conventionnels et qu'ils provoquent moins d'effets secondaires. D'autres recherches ont permis de découvrir que le millepertuis pouvait être utile contre les infections virales, dans la guérison des blessures et le soulagement des symptômes de manque dans le sevrage des drogués et des alcooliques. Comme c'est souvent le cas, les recherches confirment la connaissance traditionnelle. Les phytothérapeutes actuels ont toutefois un avantage sur leurs aînés : ils comprennent mieux comment la plante agit sur l'organisme et peuvent établir des dosages très précis, qui prennent en compte les éventuels effets secondaires , et savent sous quelle forme administrer la plante. Les recherches actuelles s'orientent vers l'emploi traditionnel des plantes avec l'espoir de trouver de nouveaux traitements pour les problèmes

de santé de toutes sortes. C'est ainsi que le groseillier indien (*Embllica offidnalis*,) semble protéger le foie contre le cancer, abaisser la cholestérolémie et qu'il peut se montrer efficace pour soigner la pancréatite, tandis que le thym (*Thymus vulgaris*,) est un puissant antioxydant qui peut prévenir les carences en acides gras essentiels du cerveau et ralentir le vieillissement (Iserin, 2001).

I.5. Quelques exemples de plantes médicinales méditerranéennes

Ce tableau représente quelques espèces de plantes et leurs usages traditionnels

Tableau 1: Quelques espèces de plantes et leurs usages traditionnels

(Amessis-Ouchemoukh *et al* ,2014).

Famille	Espèces	Nom local	Partie utilisée	Usages traditionnels
Myrtaceae	Myrtus communis	Chilmoune	Feuilles Fruits	- Antiseptique, drogue du désinfectant et effets hypoglycémiques, - Antimicrobienne, tonique et agent balsamique, - Inhibent la xanthine activité de l'oxydase, activité anti-inflammatoire
Apiaceae	Eryngium maritimum	Tabelyatut	Feuilles Tige	- Diurétique, antiscorbutique, un cytotonique un remède de l'urétrite, un inhibiteur de pierre, un aphrodisiaque, un expectorant, un vermifuge, anti nociceptive et anti-inflammatoire - Utilisé pour morsures de serpent, fièvres, ou femme reproducteur désordres
Anacardiaceae	Pistacia lentiscus	Amadagh	Feuilles	- Antibactérien, et agent de l'antiulcer, - Traitement d'eczéma, diarrhée et infections de la gorge, anti-inflammatoire, antipyrétique et activités de l'insecticidal
Globulariaceae	Globularia alypum	Taselgha	Feuilles Fleurs	- Hypoglycémique, laxatif et agent diurétique, traitement de rhumatisme, arthrite, émorroïdes. Anti-inflammatoire
Lamiaceae	Marrubium vulgare	Marryet	Feuilles	- Traitement de gastroenterical et maladies respiratoires, antinociceptive, anti inflammatoire, hypoglycémique et l'insecticidal effectue. - Tonique, aromatique, expectorant, activités diaphorétiques et diurétiques
Liliaceae	Scillamaritima	Lebselwuchen	Ampoule	- Traitement d'insuffisance du coeur, oedème et mauvais rein performance, amélioration et rodenticide de mémoire. - Activité anti-inflammatoire, cardiotonique, diurétique

I. 6. Quelques exemples de plantes médicinales en Algérie

En Algérie, une grande gamme de plantes médicinales est utilisée dans la médecine pour le traitement de différentes maladies et est beaucoup utilisée pour le traitement de diabète de l'herba Alba de l'armoise Asso, ou Chih comme s'est communément nommé en Algérie. Elle est une plante de la famille *Lamiaceae* qui est largement utilisé dans la médecine traditionnelle dans des pays différents, cette plante est utilisé pour le traitement debdiabète en l'Algérie et au Maroc (**Hamza et al, 2010**). Il est aussi essentiel de citer *Z. lotus* L. (Desf.) qui est présent partout en Libye en Algérie et au Maroc, et dans les pays européens du sud comme l'Espagne, la Sicile, la Grèce. En Algérie c'est connu sous le nom de "Sedra." *Z. lotus* est utilisé dans la médecine traditionnelle algérienne pour ses effets anti-diabétique, calmant et hypoglycémique aussi bien que dans le traitement de diarrhée, fièvre et maladies intestinales (**Boulanouar et al ,2013**).

Articulatum Haloxylon Boiss (Chenopodiaceae de famille) Il est fréquemment utilisé dans la médecine traditionnelle, et est utilisé officieusement contre le diabète, et avec caractère anti-septique. La famille des *Asclepiadaceae* est distribuée surtout dans le Sahara algérien, il est fréquemment utilisé dans la médecine traditionnelle et a été rapporté pour ces réserves de glycosides stéroïdiennes dont les feuilles sont utilisées communément un purgatif, antipyrétique, expectorant, et antispasmodique.

Pycnanthum Echium Pomel (de famille *Boraginaceae*) est une autre plante sauvage endémique au désert aride, qui est reconnu parmi les guérisseurs traditionnels, et quelque fois pour traiter l'hépatite (**Chaouche et al ,2014**).

Le *Thymus* du genre L. qui appartient à la famille des *Lamiaceae*, est riche dans les espèces médicinales et aromatiques. Ces espèces sont connues généralement par leurs propriétés pharmaceutiques. Elles sont utilisées depuis longtemps comme médicament antimicrobien, antiseptique, aliment, agent de conservation, et comme additif alimentaire. En outre, dans le domaine cosmétique, les espèces du *Thym*, ont une importance économique énorme. Le genre *Thymus* a été l'objet d'un bon nombre d'études (**Benbelaid et al,2013**).

I.7. Les plantes médicinales de l'efficacité à la toxicité

Un regain d'intérêt envers la phytothérapie durant ces dernières années a permis d'approfondir l'analyse de son efficacité thérapeutique et surtout de son aspect toxicologique. Ce dernier aspect reste en retrait par rapport à l'avancement de la phytothérapie. En effet, plusieurs études réalisées sur les traitements traditionnels à base de plantes ont fait état de problème de toxicité ou d'interaction pouvant causer des échecs

thérapeutiques ou des accidents. D'autre part, les principes toxiques des plantes sont peu connus, essentiellement du fait de leur complexité naturelle. Ces plantes médicinales doivent alors, comme les «médicaments conventionnels », obéir à des règles strictes de culture, de contrôle. Actuellement, 205 drogues végétales entrent dans la composition de médicaments dits de phytothérapie et bénéficient d'un dossier allégé d'autorisation de mise sur le marché.

L'Organisation Mondiale de la Santé a établi une liste de monographies de plantes médicinales qui est divisée en trois catégories : plantes dont l'utilisation est supportée par des données cliniques, celles dont l'utilisation est supportée par des pharmacopées et des systèmes traditionnels de médecine et celles dont l'utilisation est décrite dans le milieu populaire mais non supportée par des données cliniques et expérimentales (**Zeggwagh, et al 2013**).

Des études sur les effets indésirables de la phytothérapie montrent que la plupart des effets nocifs des plantes médicinales sont rapportés non pas à la plante elle-même, mais à une erreur d'identification, à une contamination involontaire (par une autre plante, par des métaux lourds, par des micro-organismes pathogènes ou par des résidus agrochimiques), à un non-respect de la dose adéquate ou à une interaction avec les médicaments. A titre d'exemple, le ginseng a peu d'effets négatifs graves quand il est pris seul, toutefois, s'il est combiné avec la warfarine, son activité antiplaquettaire risque d'entraîner une anti coagulation excessive. Pour l'exemple de la contamination des plantes, on peut citer le cas de l'ail, souvent utilisé pour réduire le taux de cholestérol, qui peut ne pas produire de tels effets s'il est transformé de certaines manières.

L'erreur d'identification des plantes peut être illustrée par l'exemple de Belgique où plus de 50 personnes ont été atteintes d'insuffisance rénale en 1996 après avoir ingéré une préparation à base de plantes contenant *Aristolochiafangchi*, une plante toxique, au lieu de *Stephaniatetrandra* suite à la confusion entre ces deux espèces portant des noms vernaculaires chinois très proche (**Zeggwagh, et al 2013**).

L'effet nocif des remèdes à base de plante peut dépendre aussi de facteurs liés aux consommateurs, tels que l'âge, la génétique et les maladies concomitantes.

Les plantes médicinales, doivent, comme les médicaments, obéir à des règles standard strictes auxquelles seul le spécialiste en phytothérapie peut répondre (**Zeggwagh, et al 2013**). Ceci implique forcément la réglementation de la profession dans notre pays.

*Chapitre II: les composés
phénoliques et leurs propriétés
antioxydantes*

II.1. Généralité sur les composés phénoliques

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances chimiques car ce sont des produits du métabolisme secondaire, l'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une fonction : éther, ester, hétéroside (**Bruneton, 1999**). Toutefois, les composés phénoliques, représentent les groupes phytochimiques les plus importants et les plus largement distribués, et qui varient considérablement en 8000 structures ayant été identifiées (**Harborne, 1999**).

Les grands groupes des composés phénoliques comprennent : les phénols simples (catéchol, réSORCINOL, etc.), les acides phénoliques (acides p-hydroxybenzoïque, les acides hydroxycinnamiques etc.), stilbènes (resveratrol, etc.), flavonoïdes (quercétine, cyanidine, etc.), biflavonoïdes (ormocarpine, etc.), et les proanthocyanidines (epicatechine), tannins, coumarines, anthraquinones.

II.2. Les phénols simples

Ces molécules sont rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae..) le plus souvent à l'état de glucoside du diphéol (Arbutoside) ou de son monométhylether (**Bruneton, 1999**).

II.2.1. Les acides phénoliques

- **Les acides p-hydroxybenzoïque** : en C₆-C₁ dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside.

L'acide gallique et son dimère (l'acide Hexahydroxydiphénique AHHD) sont les éléments constitutifs des tannins hydrolysables. On connaît également les aldéhydes correspondants à ces acides : vanilline (le plus répandu), anisaldéhyde (dans certaines huiles essentielles), salicylaldéhyde (**Bruneton, 1999**).

- **Les acides hydroxycinnamiques** (C₆-C₃; acide caféique et férulique, etc.)

Ces acides possèdent une structure du type C₆-C₃. Les composés les plus fréquents sont l'acide p-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide sinapique (**Ribereau, 1968 ; Goetz et al., 1999**).

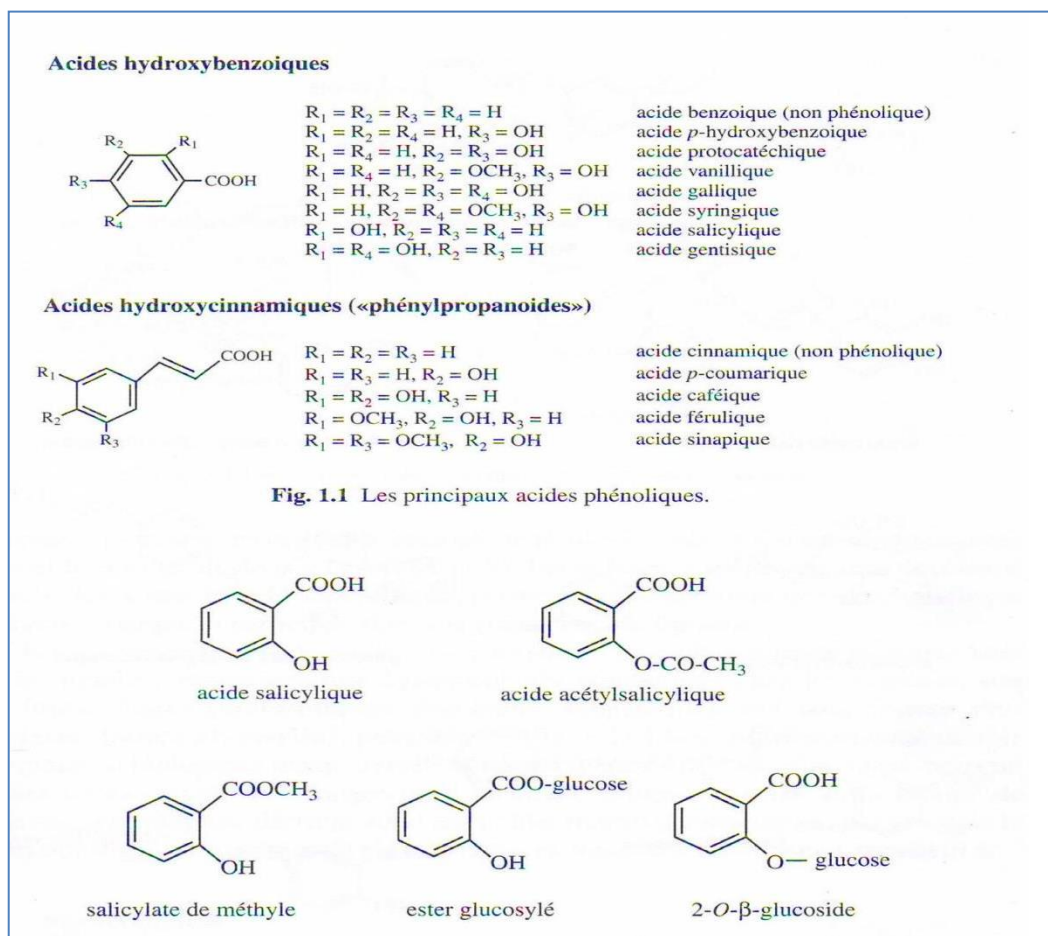


Figure 01 : l'acide salicylique et ses principaux dérivés naturels (salicylate de méthyle, ester glucosylé, glucoside). L'acide acétylsalicylique, principe actif de l'aspirine, est également représenté (**Macheix et al .,2005**).

II.2.2. Propriétés biologiques des acides phénoliques

Les acides phénols et ces dérivés sont considérés comme responsables de l'activité cholérétique de l'artichaut et les propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires des dérivés salicylés. Les composés possédant les activités antioxydantes et antiradicalaires sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique. Pour l'acide caféique, il se montre très efficace contre les virus, bactéries et champignons. Alors, l'acide gallique a pour pouvoir de réduire la viabilité des cellules cancéreuse du poumon chez les souris *in vitro* et que la combinaison de cet acide avec les médicaments anticancéreux tels la cisplatine peut être un traitement efficace pour ce type de cancer. Il peut aussi prévenir les dommages oxydatifs d'ADN cellulaire à une faible concentration et exerce une forte activité antiproliférative tels que la quercétine sur les cellules humaines cancéreuses du colon et les cellules épithéliales du foie chez les rats normaux. Certaines quinones, dérivant de l'antraquinone, sont des laxatifs stimulants. Elles sont rencontrées dans la bourdaine (*Rhamnus frangula L.*), les séné (Cassia

spp.) et les aloès (*Aloe* spp.). D'autres activités antidépressives (hypericin), anti-protazoaires, antivirales, antibactériennes, fongicides et antiallergiques ont été décrites et plusieurs molécules du groupe ont une toxicité non négligeable (**Benhammou,2011**).

II.3. Stilbènes : (C6–C2–C6; resveratrol, etc.)

Les composés phénoliques qui possèdent deux noyaux benzéniques séparés par un pont éthane ou éthène, c'est –à-dire les bibenzyls et les stilbènes. Ces derniers peuvent être libres ou hétérosidique, parfois polymériques .Ils sont présents dans de nombreuses familles de végétaux supérieurs. Ces composés, qui sont parfois des phytoalexines, peuvent, dans certains cas, être des régulateurs de croissance. Ils sont souvent antifongiques et antimicrobiens (**Bruneton,1999**).

II.4. Coumarines

Ce sont des 2H-1-benzopyran-2-ones que l'on peut considérer comme étant des lactones des acides o-hydroxy-z-cinnamique.Généralement toutes les coumarines sont substituées en position 7 par un hydroxyle qui peut être méthyler ou engagé dans une liaison hétérosidique (**Bruneton ,1999**). Elles possèdent une intense fluorescence bleue en lumière ultraviolette (**Paris et Hurabielle ,1981**).

II.4.1. Propriété biologique des coumarines

Les coumarines sont utilisées pour leurs propriétés vasculoprotectrices, neurosédatives, diurétiques, stomachiques et carminatives. Ils ont la capacité de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes, etperoxydes. Ils préviennent également la peroxydation des lipides membranaires (**Benhammou,2011**).

II.5. Anthraquinones

Ce sont des composés de couleur rouge. Elles appartiennent à la famille des anthracénosides (regroupent tous les composés phénoliques et hétérosides).Ils sont très peu solubles dans l'eau froide, solubles dans les solvants organiques et les alcools.

II.6. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes (du latin *flavus*, jaune) sont des substances généralement colorées répondues chez les végétaux ; on les trouve dissoutes dans la vacuole à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes (**Guignard, 1996**).

Plus de 6400 structures des flavonoïdes ont été établies (**Harborne et Williams, 1992**). Les flavonoïdes appartiennent aux groupe des métabolites secondaires et possèdent tous quinze atomes de carbones C15 (C6-C3-C6), une structure caractérisée par la fonction

phényl-2-benzopyrane (**Ribereau-Gayon,1972**). La fraction benzopyrane, appelée aussi anneau chromane, porte généralement un cycle aromatique en C-2, C-3, ou C-4, elle est dénommée cycle 'A', tandis que le phényl constitutif est connu comme le cycle 'B' et l'anneau benzopyrane heterocycliques comme le cycle 'C' (figure 02). Le centre le plus souvent heterocycliques existe sous trois formes : pyran, pyrilium, ou γ -pyrone (**Ribereau-Gayon, 1972**).

Chez les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents comme O ou C glycosides; O glycosides en flavonoïdes se produit beaucoup plus fréquemment que C glycosides. La plus commune des glucides sont rhamnose, glucose, galactose et arabinose.

Ces composés sont subdivisés en différentes familles (figure 02), tels que les flavonols, flavan-3-ols, les flavones, flavanones, anthocyanes, chalcones, etc, avec les flavonols, flavan-3-ols et anthocyanins qui sont quantitativement dominante dans les plantes.

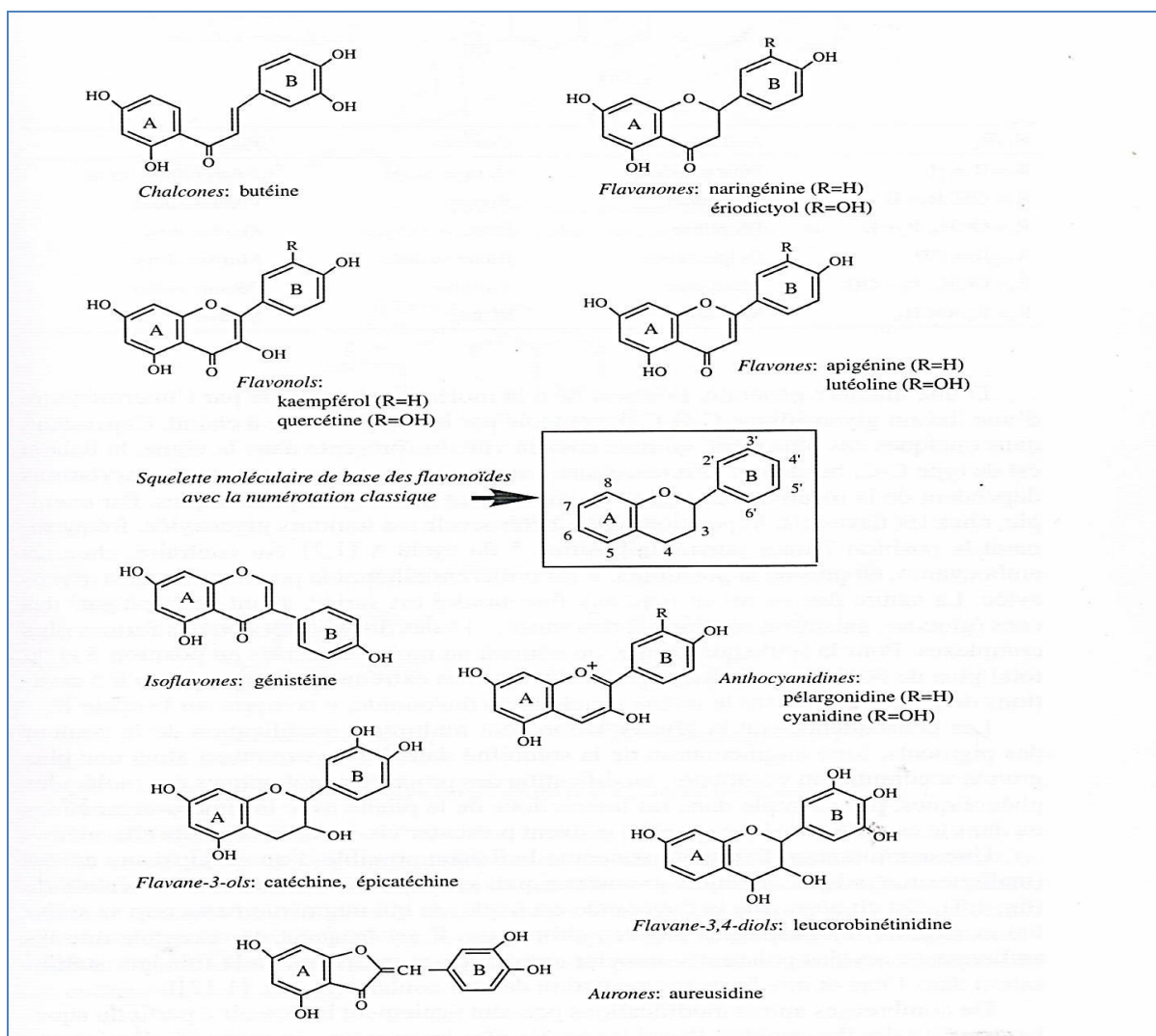


Figure 02 : les principales classes de flavonoïdes. Un (ou deux) exemple(s) précis a été donné dans chacun des cas. La numérotation classique des différentes sommets des cycles est rappelée sur le squelette moléculaire de base (**Macheix et al., 2005**).

II.6.1. Propriétés des flavonoïdes

Les flavonoïdes protègent les plantes contre les radiations UV, elles sont également impliquées dans les processus de défense de la plante contre les infections bactériennes et virales. Agissent comme des pigments ou des co-pigments. Ils peuvent moduler la distribution d'auxine, comme elles fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire. Agis sur la régulation de l'élongation des tiges et interviennent dans la maturité des fruits. Sont à l'origine des goûts amers et astringents afin de repousser les animaux herbivores (Harrar, 2012).

II.7. Les tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques à haut poids moléculaire, forment des complexes avec les protéines, hydrates de carbone, alcaloïdes, vitamines et les minéraux. Ils sont répandus dans le cuir, la nourriture et l'industrie pharmaceutique (Muchuweti *et al.*, 2006).

Les tanins sont divisés en deux grandes classes : tanins condensés et tanins hydrolysables.

II.7.1. Les tanins condensés

Tanins condensés, aussi appelés proanthocyanidines, sont des polymères de flavanols (flavane-3-ol) rejoint avec les liaisons CC_{ce} qui rend ces molécules très difficilement hydrolysables. Les unités monomères qui les composent peuvent être regroupées par le nombre de groupement OH sur le noyau-B: procyanidines ont un cycle B dihydroxyl, alors que prodelphinidins ont un cycle B trihydroxyl. Les liens entre les monomères sont généralement C4- C8, même C4-C6 sont également trouvés, avec une longueur variable de chaîne (Kandra *et al.*, 2004). Selon leur structure chimique et degré de polymérisation (2 à 50 unités de flavonoïdes), ils peuvent être solubles ou pas dans les solvants organiques et aqueux (Waterman et Mole, 1994).

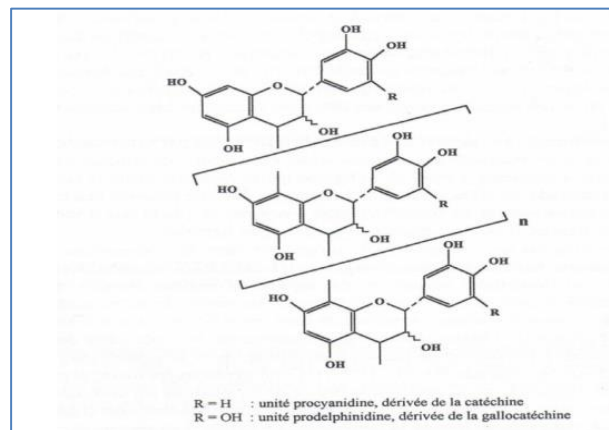


Figure 03 : exemple de structure d'un tannin condensé (Macheix *et al.*, 2005).

II.7.2. Tanins hydrolysables

Tanins hydrolysables peuvent être hydrolysés par les acides (ou enzymes) en un sucre et un acide carboxyphénolique. D'après, la nature de cet acide (Kandra *et al*, 2004), ils sont subdivisés en gallotannins et ellagitannins et qui sont constitués d'acide gallique ou des esters d'acides hexa-hydroxydiphenique, respectivement, liées à une fraction de sucre. Bien que les gymnospermes et les monocotylédones ne contiennent que des tanins condensés, les dicotylédones peuvent contenir l'un ou les deux types de tannins

(Kandra *et al*, 2004)

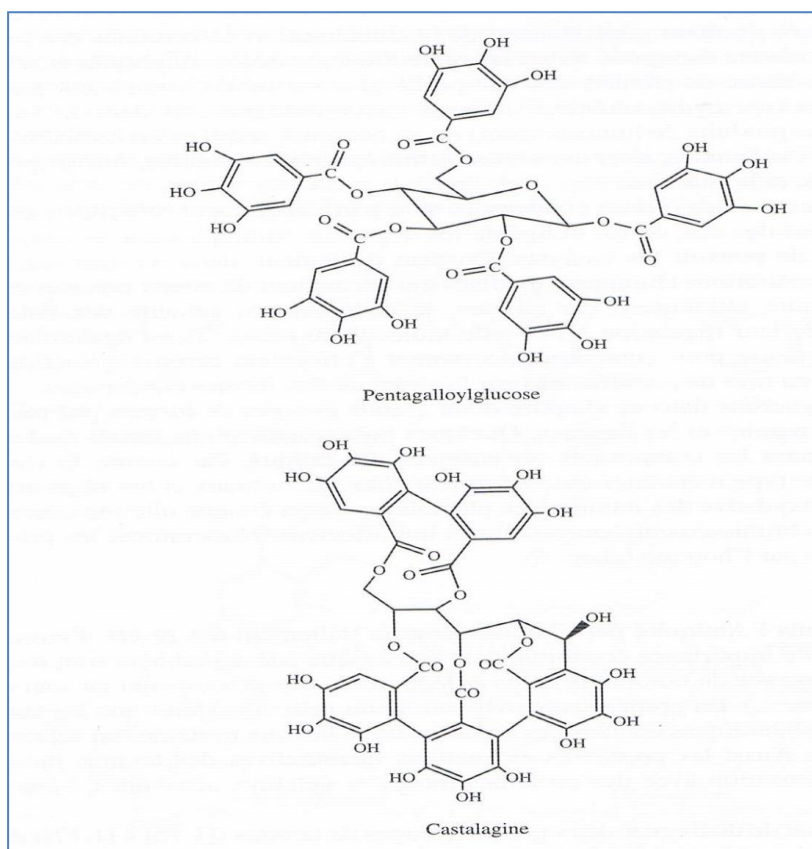


Figure 04: deux exemples de tannins hydrolysables (Macheix *et al*.,2005).

II.7.3. Propriétés pharmacologiques des tannins

Plusieurs observations, chez les humains comme chez les animaux de laboratoires suggèrent que les tannins exhibent un large spectre de propriétés pharmaceutiques, thérapeutiques et chimio protectrices dues à leur propriété anti-radicalaire. En effet, les tannins protègent contre les toxicités induites par différents agents(hydrogène peroxyde, acétaminophène, extraits contenus dans la fumés du tabac...), contre l'hypercholestérolémie .

II.8.3. La peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne initiée par la captation d'un atome d'hydrogène par l' HO^\bullet ou l' O_2^\bullet à des esters d'acides gras insaturés ou constituants des membranes lipidique.

Un principal produit de dégradation de lipidique est la malonedialdéhyde(MDA) qui altère la fluidité et la fonction des membranes ,dont la composition en acides gras insaturés module l'oxydabilité.

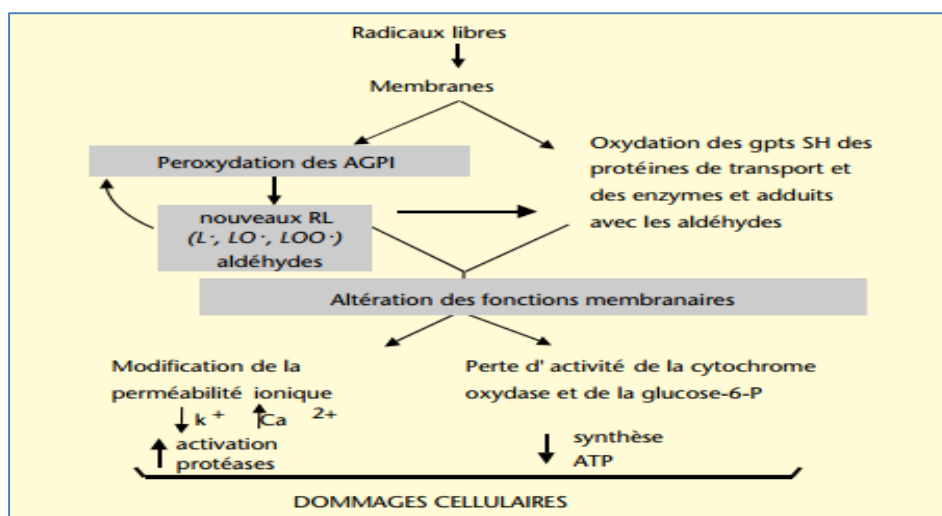


Figure 06 : conséquence cellulaire de la peroxydation lipidique (Josiane et Pierre, 2006).

La peroxydation lipidique est suivie d'un changement structural des membranes biologiques ou d'autres éléments contenant des lipides, ce qui induit une perte de la perméabilité de la membrane, une inactivation des récepteurs et des enzymes membranaires (Bahlil, 2010).

Dans les LDL, l'oxydation des lipides joue un rôle majeur dans le développement de l'athérosclérose. Les LDL oxydés se comportent en effet comme de véritables « chevaux de Troie », en introduisant dans les macrophages des produits d'oxydation qui participent – par des mécanismes encore partiellement élucidés à la formation de cellules spumeuses et de stries lipidiques concomitantes. L'oxydation des lipides pose également de sérieux problèmes pour les industries agroalimentaires et cosmétiques qui utilisent de plus en plus d'acides gras polyinsaturés, tels que ceux issus de la famille n-3 (ω -3), très sensibles à l'oxydation(Laguerre *et al.*, 2007).

II. 8. 4. Les composés phénoliques en tant que antioxydants

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs divers propriétés physiologiques comme les activités anti-allergique, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire (Middleton *et al.*, 2000). Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est dû à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (Nijveldt *et al.*, 2001). Ci-dessous, divers mécanismes de lutte contre les radicaux libres et leurs dérivés sont traités.

II. 8. 4. 1. Piégeage des radicaux libres

Les flavonoïdes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires. À cause de leur faible potentiel redox (Javanovic *et al.*, 1994), les flavonoïdes (Flav-OH) sont thermo dynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants ($R\cdot$) comme le superoxyde, le radical peroxy, le radical alkoxy et le $OH\cdot$ par transfert d'hydrogène. Le radical flavonoxy (Fl-O \cdot) peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable (McCord, 1995).

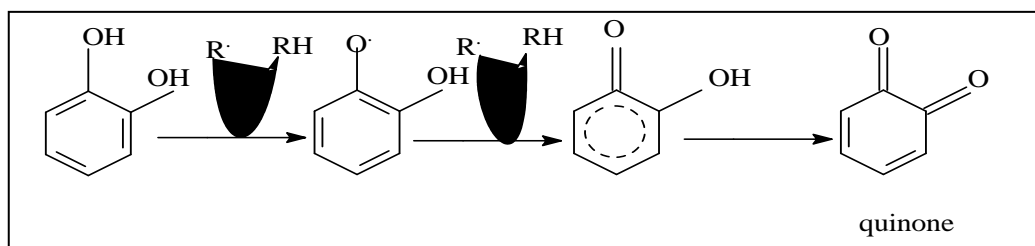


Figure 07: mécanisme moléculaire de l'effet anti-radicalaire des flavonoïdes (Pietta, 2000).

II. 8. 4. 2. Chélation des ions métalliques

Les ions du fer (Fe^{+2}) et du cuivre (Cu) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques, mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle.

Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques (Brown, 1998).

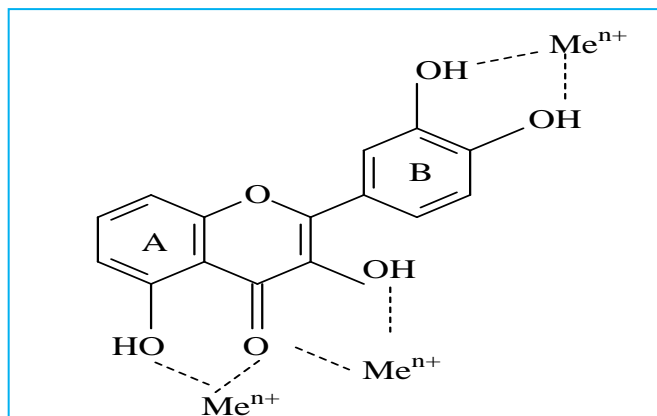


Figure 08: flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques.

II. 8. 4. 3. Inhibition de diverses enzymes

Les flavonoïdes sont responsables à l'inhibition de très nombreuses enzymes ; parmi lesquelles les enzymes directement impliquées dans le stress oxydant (gluthathione S-transférase, les lipoxgénases, la xanthine oxydase, et les nitrique oxyde synthases) et les enzymes digestives (comme la trypsine, l' α -amylase et la lipase)(Nagao *et al.*, 1999).

II. 8. 4. 4. Effet anti peroxydation lipidique

Selon Buettner les antioxydants susceptibles de protéger les lipides de l'oxydation peuvent être réparties en deux types : les antioxydants préventifs qui empêchent la formation d'espèces réactives de l'oxygène ou interceptent les espèces responsables de l'initiation de la lipoperoxydation et les antioxydants qui interceptent les radicaux propagateurs de la peroxydation lipidique et retardent la peroxydation (période d'induction) (Josiane et Pierre, 2006).

Les briseurs de chaîne les plus puissants connus à ce jour appartiennent sans conteste à la famille des tocophérols qui génère une phase de latence très distincte. De nombreuses études ont montré que ce briseur de chaîne piège deux molécules de peroxyradicaux (L'et LOO'). En théorie, la vitamine C et les polyphénols semblent également capables de réduire les peroxyradicaux. Néanmoins, leur caractère hydrophile et leur éloignement de ces radicaux lipophiles semblent empêcher toute action directe par contact (Laguerre *et al.*, 2007).



Partie expérimentale

Chapitre III: matériel et méthodes

III.1. Matériel végétal

III.1.1. *Lonicera implexa*

- Noms habituels

Nom Français : chèvrefeuille

Nom Arabe : zehar al açel, soltan el gaba

Nom berbère : Tamthwala

Famille : *Caprifoliacées*

Genre : *Lonicera*

Espèce : *Lonicera implexa*.



Figure 09 : photo de *Lonicera implexa*
(<http://www.musees.vd.ch>)

- Usage traditionnel et courant

Les fruits de *Lonicera implexa* étaient utilisés en Italie contre le rhumatisme, sous forme d'un cataplasme (Loi et al ,2004).

III.1.2. *Rhamnus alaternus*

- Noms habituels

Nom vernaculaire : Oued el khir ,Qaced

Nom berbère : mlilès, mlilez, ajrouroj(Ait Youssef ,2006)

Nom Français : Neprum alaterne

Nom Anglais : Evergreen buckthorn

Famille : *Rhamnacees*

Espèce : *Rhamnus alaternus*



Figure10 : photo de *Rhamnus alaternus*
(www.mediflora.com)

- Usage traditionnel et courant

La décoction des parties aériennes de cette plante semble être efficace pour le traitement de l'ictère (Aouadhi ,2010) Les tiges et les feuilles de *Rhamnus alaternus* étaient utilisés en Algérie. Dans le Constantinois- contre la jaunisse et les troubles hépatiques (Ait Youssef ,2006)

III.1.3. *Crataegus azarolus*

- Noms habituels

Nom Vernaculaire : zaaroura, zaârour

Nom Français : azarolier

Nom berbère : tazaraourt ,tafirez ou tefifiha

Famille : *Rosacée*

Genre : *Crataegus*

Espèce : *Crataegus azarolus*



Figure 11 : photo de *Crataegus azarolus*
(<http://www.musees.vd.ch>)

- Usage traditionnel et courant

Les fleurs sont employées en Tunisie sous forme de décocté dans le traitement de l'angine ; elle est réputée utile pour supprimer les douleurs post-partum. (Ait Youssef ,2006) Les fleurs et les feuilles sont capables d'exercer des activités antioxydantes et une action positive sur le cœur, en raison de la teneur en flavonoïdes et les procyanidines (Bignami *et al* ,2003)

III.1.4. *Cistus albidus*

- Noms habituels

Nom Vernaculaire : Túzzalla l'beyda (Maroc), ataï ou touzzalt (Algérie)

Nom Français : Ciste blanc

Famille : Cistacees

Genre : *Cistus*

Espèce : *Cistus albidus*

Floraison : Mai-juin

Aire géographique : ouest méditerranéenne



Figure 12 : photo de *Cistus albidus*
(www.herbier.sesa-aude.com)

- Usage traditionnel et courant

La plante est utilisée contre les maux d'intestins. Les feuilles sont utilisées, en infusion Plantes médicinales au Maroc dans du thé, comme digestif (Bammi et Douira,2002).

Les feuilles de *Cistus albidus* étaient employées en Algérie, en usage interne sous forme d'infusion Les fruits sont employés au Maroc du nord en usage externe, mélangés a

des fruits de l'espèce *Juniperus phoenica*L., pour la confection du fard a tatouages dénommé harkus (Ait Youssef,2006) .

III.1.5. *Adiantum capillus-veneris*

- Noms habituels

Arabe: Maanos el bir

Berbère:Araadat

Famille :Pteridaceae

Genre : Adiantum

Espèce : *Adiantum capillusveneris*



Figure 13: photo d'*Adiantum capillus-veneris*(www.missouriplants.com)

- Usage traditionnel et courant

Est une espèce de plante sauvage distribués qui a été largement utilisé dans la médecine traditionnelle populaire du sud de la Chine. Le genre a été couramment utilisé pour le traitement de maladies inflammatoires telles que la gastrite, la bronchite, la néphrite, et la dermatite (Yuan *et al*, 2013).

A été utilisé comme tonique et diurétique; dans le traitement de froid, la fièvre, de la toux et de troubles bronchiques, comme stimulant, émollient, purgative, adoucissant, tonique général et tonique capillaire, en plus de maladies de la peau, les tumeurs de la rate, du foie et d'autres viscères, dans le traitement de l'ictère et l'hépatite et de nombreux d'autres usages (Ibraheim *et al*,2011).

III.2. Récolte et séchage

La récolte des feuilles des plantes a été faite dans le nord de l'Algérie (Bejaïa) ou le climat régnant est méditerranéen. La période de récolte était, en mois de mars de l'année de 2013. Après leur identification par des spécialistes en botanique au niveau de parc national de Gouraia ,les feuilles sont séchées à l'ombre sous la température ambiante.

III.3. Broyage et extraction

Après le séchage, des plantes ont été réduites en poudre fine suite au broyage et au tamisage successif. La poudre obtenue de chaque plante est macérée dans l'éthanol (90%) à raison de 4ml pour 1g de la poudre, pendant 12heures sous agitation continue à l'obscurité et à la température ambiante. Le mélange est ensuite laissé décanter pendant 24 heures, et le

surnageant éthanolique est récupéré et laissé évaporer à la température ambiante de laboratoire jusqu'à la stabilité de son poids. Le taux d'extraction (%) est calculé en appliquant la formule suivante:

$$\% = [(P_1 - P_0) / E] \times 100$$

P1: poids d'extrait après l'évaporation(g)

P0: poids vide du boîte de pétri(g)

E: poids de la poudre végétale(g)

III.4. Dosage des composés phénoliques

III.4.1. Dosage des phénols totaux

III.4.1.1. Principe de la méthode

En pratique, plusieurs méthodes sont appliquées pour estimer la teneur en phénols totaux dans les tissus végétaux, mais aucune n'est apte seule de détecter tous les composés phénoliques présents réellement dans ces tissus. Parmi elles, la méthode de Folin-Ciocalteu est utilisée depuis environ un siècle pour doser la quantité des phénols dans les plantes, elle est utilisée initialement pour les acides aminés (tyrosine et tryptophane), ou le réactif de Folin-Ciocalteu interagit avec le groupement phénolique hydroxylé de ces acides aminés (**Vermerris et Nicholson, 2006**).

Le principe est basé sur la réduction du réactif Folin-Ciocalteu de couleur jaune, qui est un mélange de l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et l'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) par les groupements hydroxyles des polyphénols, en oxydes bleus de tungstène et de molybdène qui absorbe dans le visible à 740nm, la réaction s'effectue de préférence dans un milieu basique (**Vermerris et Nicholson, 2006**). Pour cette méthode spectrophotométrique, il faut établir une courbe d'étalonnage qui relie les absorbances aux différentes concentrations, comme celle de l'acide gallique ou chlorogénique. Les concentrations en composés phénoliques sont alors apportées en équivalent d'acide gallique ou chlorogénique respectivement (**Vermerris et Nicholson, 2006**).

Pour estimer la teneur en phénols totaux dans nos extraits, nous avons utilisé cette méthode, suivant le protocole décrit par Ben Ammar *et al*(2007), en prenant l'acide gallique comme étalon.

III.4.1.2. Protocole expérimental

Pour la réalisation de la courbe d'étalonnage, différentes concentrations de l'acide gallique allant de 0.025 à 0.2 mg/ml ont été préparées. Par la suite, un volume de 100µl du réactif du Folin-Ciocalteu (50%) est mélangé avec 100µl de chaque solution préparée, et après environ 5mn, 2ml de bicarbonates de sodium Na₂CO₃ (2%) ont été ajouté au mélange. Le tout est laissé réagir pendant 30 minutes à l'obscurité. La lecture de la densité optique est effectuée à 720nm contre un blanc réactif, et les résultats ainsi obtenus ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Les extraits des plantes ont été traités selon les étapes de protocole suivies lors de la préparation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, et les résultats obtenus sont exprimés en mg EAG/g d'extrait sec.

III.4.2. Dosage des flavonoïdes

III.4.2.1. Principe de la méthode

Le dosage des flavonoïdes est effectué selon la méthode de **Rao et al(2010)**. Cette méthode utilise le trichlorure d'aluminium (AlCl₃) qui interagit spécifiquement avec les flavonoïdes en donnant une couleur jaune foncée. L'intensité de la coloration rose est évaluée par spectrophotomètre à 510nm. De même que le dosage des phénols totaux, le dosage des flavonoïdes nécessite aussi l'établissement d'une courbe d'étalonnage d'un flavonoïde standard (la rutine par exemple).

III.4.2.2. Protocole expérimental

Pour la préparation de la gamme d'étalon, une série de dilution allant à 0.2 à 2mg/ml de solution de la rutine est préparée. Dans un tube à essai, on met un volume de 100µl de la rutine, 300µl d'eau distillé suivie par 30µl NaNO₂ (5%).Après 5min la température ambiante, un volume de 30µl d'AlCl₃ (10%)a été ajouté .Après encore d'autre 5min, la réaction a été traitée par 200µl de 1M de NaOH. En fin, le mélange est dilué. La lecture est effectuée à 510nm et les valeurs des absorbances trouvées pour chaque solution sont utilisées pour tracer la courbe d'étalonnage. Pour les essais, les mêmes étapes suivies sauf qu'à la place de la rutine on a introduit les extraits des plantes.

III.5. Evaluation de l'activité antioxydant

III.5.1. Test anti- DPPH

III.5.1.1. Principe de la méthode

Le DDPH(1,1 diphényle-2-dipicrylhydrazyl), est un radical libre de couleur violette intense, relativement stable et largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydant de différents composés(Wojodyl *et al*,2008).Ce radical lorsqu'il est réduit sous l'effet d'un antioxydant se décolore pour donner une couleur jaune .La mesure de l'efficacité d'un antioxydant(capacité de fixer des radicaux libres)se fait ,justement ,en mesurant la diminution de la coloration violette (Rolland,2004; Kubola et Siriamornpu,2008;Khadri *et al*,2009).

DPPHox+ Antioxydant red \longrightarrow DPPH red +Antioxydant ox (Rolland, 2004).

III.5.1.2. Protocole expérimental

L'activité antioxydant des extraits des plantes est évaluée par la méthode de Maaisuthisakul et ses collaborateurs (2007), dans laquelle 20µl DPPH (5mM) est ajouté à 980µl d'extrait préparé à différentes concentrations, l'absorbance est mesurée à 517 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante.

Le pouvoir antioxydant est exprimé en pourcentage d'inhibition ou effet scavenger contre le DPPH par les antioxydants présents dans les extraits.

$$\text{Effet scavenger contre le radicale DPPH(\%)} = \frac{(A_T - (A_E - A_B))}{A_T} \times 100$$

Ou **AT**: absorbance de témoin(980µl de méthanol +20µl de DPPH).

AE: absorbance de l'échantillon(980µl d'extrait+ 20µl de DPPH).

AB: absorbance du blanc de l'échantillon (980µl d'extrait + 20µl de méthanol).

III.6. Pouvoir réducteur

III.6.1. Principe de la méthode

Le pouvoir réducteur des extraits des plantes et l'acide ascorbique a été déterminée en utilisant la méthode de (Oyaizu, 1986).Les substance qui ont une potentiel de réduction réagissent avec le ferricyanure de potassium (Fe^{3+}) pour former la ferrocyanure de potassium (Fe^{2+}) puis réagit avec le trichlorure de fer pour donner le complexe ferroferrique mesurable à l'absorbance maximum de 700nm(Singhal *et al* ,2014).

III.6.2. Protocole expérimental

Des extraits des plants ou une solution d'acide ascorbique à différentes doses ont été préparées avec du tampon phosphate(0.5 ml, 0.2 M, pH 6.6)et mélangé avec du ferricyanure

de potassium [K₃Fe (CN) ₆] (0,5 ml, 1%). Ensuite le mélange a été incubé à 50 ° C pendant 20 min. Un volume (0,5 ml, 10%) de l'acide trichloro acétique a été ajouté au mélange, le tout est passé par la suite à la centrifugation pendant 10 min à 3000 tours par minute (1000 g). Un volume 0,5 ml de surnageant est mélangée avec de l'eau distillée (0,5 ml) et du FeCl₃ (0,1 ml, 0,1%) pendant 10 min. L'absorbance a été mesurée à 700 nm par spectrophotomètre contre un blanc, l'absorbance avec plus élevées indiquent une plus grande réduction de puissance (Hseu *et al*; 2008).

III.7. Evaluation de l'effet anti peroxydationlipidique

III.7.1. L'inhibition de la peroxydation lipidique du cerveau à l'aide de thiobarbituric acid reagent substances (TBARS)

III.7.1.1. Principe de la méthode

En pratique il existe plusieurs méthodes pour évaluer l'effet anti peroxydation lipidique selon le type de marqueur de la peroxydation. Dans notre étude on a fait le test en utilisant le FeSO₄ et l'acide ascorbique selon la méthode de **Barreira *et al*, 2008**. Ce test est réalisé en mesurant la quantité de MDA produit durant la peroxydation induite par le Fe⁺² sur les lipide de cerveau selon les réactions suivants:

1. $LH + X^{\cdot} \longrightarrow L^{\cdot} + XH$
2. $LH + Fe^{+2} \text{ active} \longrightarrow L^{\cdot} + Fe^{+3} \text{ inactive}$
3. $L^{\cdot} + O_2 \longrightarrow LOO^{\cdot}$
4. $LOO^{\cdot} + LH \longrightarrow L^{\cdot} + LOOH$
5. $LOOH + Fe^{+2} \longrightarrow LO^{\cdot} + Fe^{+3}$
6. $LOO^{\cdot} \longrightarrow MDA + \text{nonenal}$

*Le MDA est mesuré à partir de fixation de ce dernier par la réaction suivant:

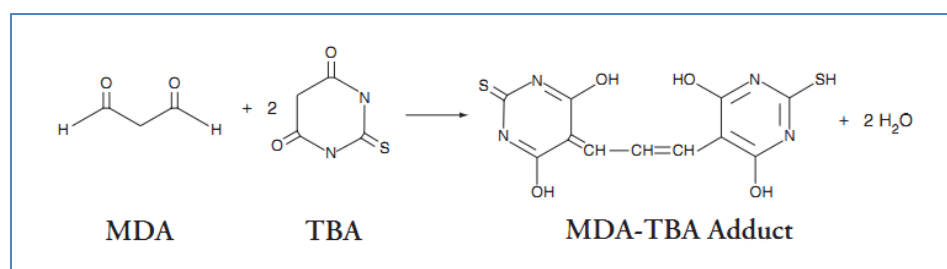


Figure 14: la réaction entre MDA et TBA (Arbor, 2014)

III.7.1.2. Protocole expérimental

Les cerveaux, obtenus à partir des lapins, sont homogénéisés dans une solution tampon Tris-HCl glacé (20 mM, pH 7,4) 1:2 (p / v) pour produire un homogénat de tissu cérébral qui a été centrifugé à 3000g pendant 10 min. Une partie (0,1 ml) du surnageant a été incubé avec des extraits des plantes (0,2 ml) en présence de FeSO₄ (1mM, 0,1 ml) et l'acide ascorbique (0,1 mM; 0,1 ml) à 37 ° C pendant 1 h. Pour provoquer la formation de complexe de révélation de la peroxydation lipidique (TBARS), un volume d'acide trichloroacétique (28% p / v, 0,5 ml), et de l'acide thiobarbiturique (TBA, 2%, 0,38 ml) sont ajoutés et le mélange a été ensuite chauffé à 80 ° C pendant 20 min (**Barreira et al ,2008**).

Après centrifugation à 3000g pendant 10 min, l'intensité de couleur de TBARS dans le surnageant a été mesurée à 532 nm. Le taux d'inhibition (%) a été calculé en utilisant la formule suivante:

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = [(A-B)/A] \times 100\%$$

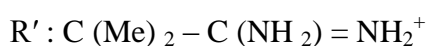
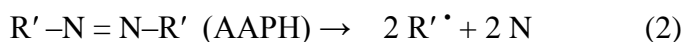
où A et B sont les absorbances de témoin et de la solution de l'échantillon d'extrait, respectivement.

La concentration de l'extrait fournissant 50% d'inhibition de la peroxydation lipidique (IC₅₀) a été calculée à partir du graphe de pourcentage d'activité anti-oxydante en fonction des concentrations en extrait. La rutine a été utilisée comme standard.

III.7.2. L'inhibition de la peroxydation des lipides plasmatique par l'AAPH

III.7.2.1. Principe de la méthode

Le réactif AAPH est utilisé comme initiateur de la peroxydation lipidique, il se décompose pour générer le radical alkyle (R'•), qui en présence de l'oxygène est converti en radicaux peroxyyle correspondant (ROO•) (2) et (3). Ces radicaux peroxyyles induisent l'oxydation des lipides polyinsaturés (LH) causant une réaction en chaîne connue sous la peroxydation lipidique (équation 4-6) (**Banerjee et al , 2008**).



III.7.2.2. Protocol experimental

Le plasma du sang humain est récupéré du service de transfusion du sang de l'Hôpital « BEN ADJILA Ahmada de la Wilya de Laghouat ». Le plasma est diluée (1/2) avec la solution tampon phosphate, PH=7.4. Un volume de 1ml de dilution plasma est traité avec différentes concentration de l'extrait, puis incubé avec AAPH de (v= 0.25ml, et 200mM) dans 37°C pendant deux heures.

A la fin de l'incubation, on ajoute 0,5ml de TCA (20%) et de 0.5ml de TBA (1%) à chaque tube et chauffer à 100°C pendant 20min. les tubes ainsi traités sont refondis dans les glaces, puis centrifugés pendant 5min à 3000×g. le surnageant a été récupéré est mesuré par le spectrophotomètre ,la lecture se fait à 532 nm.

Les pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique sont calculés selon la formule appliquée précédemment.

III.8. Chromatographie sur couche mince "CCM"

III.8.1. Principe de la méthode

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : 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. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont:

- la cuve chromatographique
- la phase stationnaire
- l'échantillon
- l'éluant (**Lafargue , 1971**)

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires (**Lafargue , 1971**).

La chromatographie sur couche mince est une méthode plus utilisée pour l'analyse des flavonoïdes, ou pour l'identification de nouveau médicament à partir des plantes. Elle a plusieurs avantages ; un court temps de séparation, possibilité d'utilisation des révélateurs et possibilité de séparer plusieurs échantillons au même temps (Andersen et Markham, 2006).

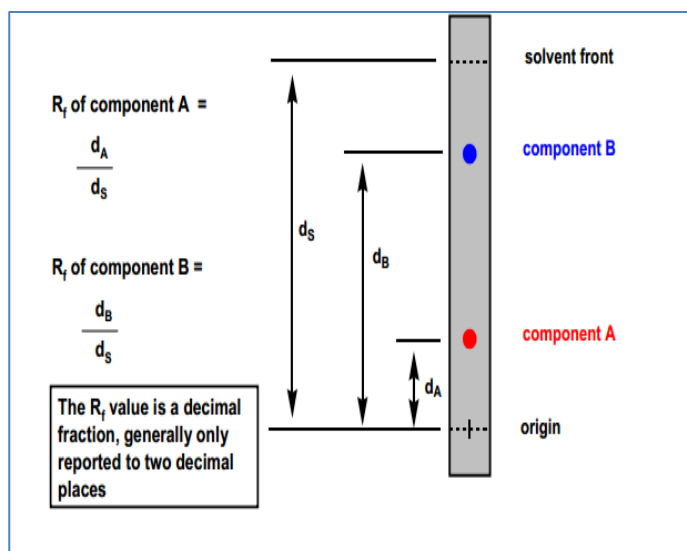


Figure 15: schéma représentatif de détermination des rapports frontaux (Gambhir, 2008)

III.8.2. Protocole expérimental

Dans cette étude nous avons utilisé une plaque d'aluminium étalée par une couche mince de gel de silice, sur laquelle cinq spots déposés sur la ligne de dépôt à distance de 1cm de bas de la plaque, correspondants respectivement de gauche à droite aux extraits de : *Cistus albidus*, *Crataegus azarolus*, *Rhamnus alaternus*, *Lonicera implexa*, *Adiantum capillus-veneris* de concentration 100 mg/ ml dans le méthanol, la plaque par la suite est déposée verticalement dans la cuve de chromatographie contenant le mélange de solvants utilisées pour la séparation, nous avons utilisé deux systèmes de séparation :

- Système 1 : hexane : acétate d'éthyle (9 :1).
- Système 2 : toluène : acétone (9 :1).
- Système 3 : acétate d'éthyle : acide formique : acide acétique : H₂O.

La chromatographie obtenue est observé à la lumière du jour, et sous une lumière UV. Les différentes couleurs observées ainsi que les R_f calculés des différentes taches ont été pris en considération.

III.9. Outils informatiques

- Les graphes sont établis avec Microsoft Office Excel 2010 et Systat Sigma Plot 1 2.2.
- Les IC₅₀ sont calculées par l'application de logiciel Origin 6.0Professional.

Chapitre IV: Résultats et discussion

IV.1. Rendement de l'extraction

Les composés phénoliques sont des principes solubles dans les solvants polaires, c'est la raison pour laquelle on a choisi l'éthanol, afin de les extraire avec un rendement de recouvrement maximal (Vermerris et Nicholson, 2006).

Les procédés d'extraction des composés phytochimiques à partir des plantes médicinales, constituent une étape cruciale, car elle est déterminante de la qualité et de la quantité de principes actifs recherchés, qui reflètent directement leurs activités biologiques.

Les plantes étudiées dans ce travail sont récoltées pendant les périodes présumées d'être propices pour la synthèse des niveaux élevés de ces métabolites. Le tableau ci-dessous présente les différents taux d'extraction obtenus.

Tableau II: taux d'extraction des différentes plantes étudiées

Plantes	Taux d'extraction %
<i>C. albidus</i>	16,83
<i>C. azarolus</i>	11,97
<i>R. alaternus</i>	06,38
<i>L. implixa</i>	11,08
<i>A. capillus-veneris</i>	04,64

Sachant que la procédure d'extraction appliquée pour toutes les plantes est effectuée dans les mêmes conditions, les résultats obtenus montrent des rendements d'extractions variables.

Le taux d'extraction le plus élevé correspond à celui des feuilles de *C. albidus* (16,83%), tandis que le taux le plus faible est celui de *R. alaternus* et *A. capillus* (06,38% et 04.64 %) respectivement. Cette différence pourrait être due principalement à la richesse ou la pauvreté de la plante en composés solubles dans le solvant utilisé ou bien à la taille des particules de la poudre végétale (Vermerris et Nicholson, 2006).

D'autre part, on observe que les feuilles de *C. azarolus* et *L. implixa* ont un taux d'extraction sensiblement proches (11,97% et 11,08% respectivement).

IV.2. Résultats de dosage des composés phénoliques

IV.2.1. Teneur en phénols totaux

L'analyse quantitative des phénols totaux est déterminée en appliquant de la méthode de Folin Ciocalteu. La teneur en phénols totaux est exprimée à partir de la courbe d'étalonnage préparée avec l'acide gallique utilisée comme molécule standard (Figure 16).

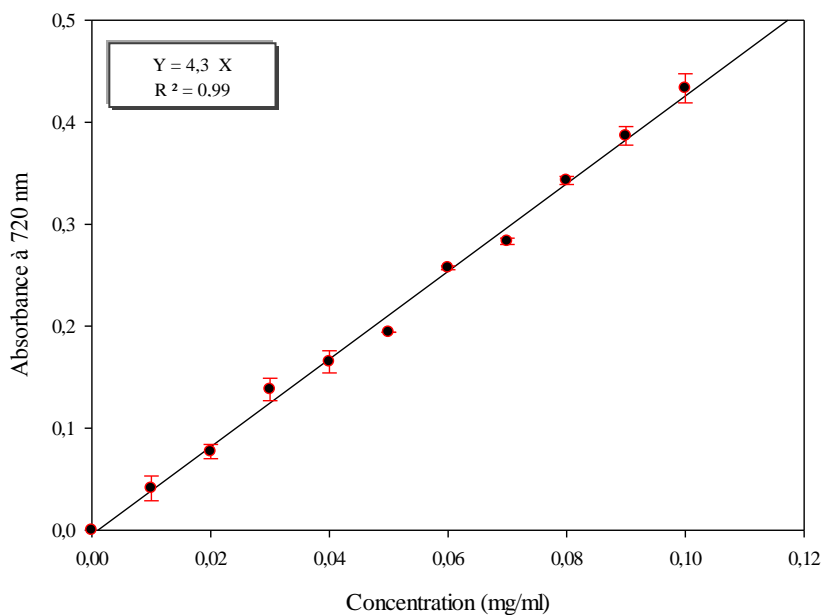


Figure 16 : courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.
- Les valeurs sont la moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype).

L'histogramme ci-dessous représente les résultats de la teneur en phénols totaux de l'extrait éthanolique de chaque plante, exprimés en EAG/g d'extrait sec.

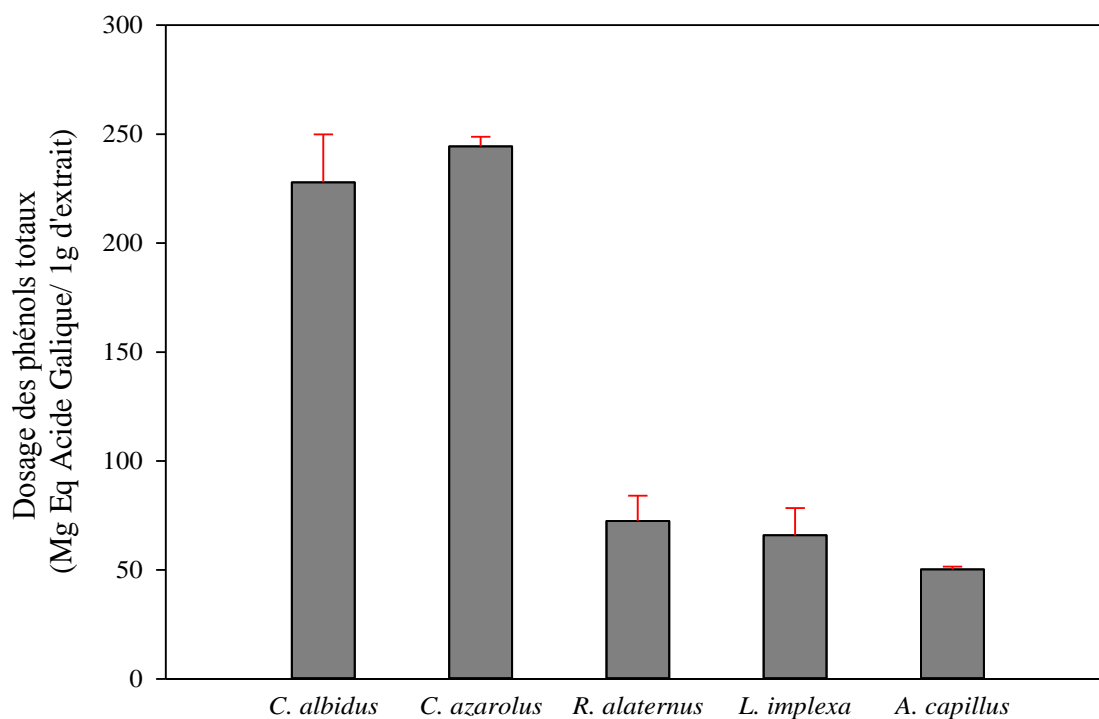


Figure 17 : histogramme représentant la teneur en phénols totaux des extraits des plantes (mg EAG/g).
- Les valeurs sont la moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype).

La teneur des phénols totaux des extraits éthanoliques des plantes étudiées dépend essentiellement : de leur origine (**Ebrahimzadehet et al,2008**) de la variété, de la saison de récolte, des conditions climatiques et environnementales ainsi que la localisation géographique (**Park et Cha, 2003**).

D'après ces résultats (figure 17), les teneurs en phénols totaux montrent que les valeurs les plus élevées sont exprimées par l'extrait de feuilles de *C. azarolus* (244,37mg EAG/g) et *C.albidus*(227,90mgEAG /g).L'extrait de feuilles de *R. alaternus* (72,48mg EAG /g) et *L .implexa*(65,89 mg EAG /g) viennenten deuxième lieu avec des valeurs très proches, tandis que la plante *A. capillus-veneris*, d'après les résultats, elle est la plus pauvre de ces composés dont la teneur est de 50,29 mg EAG /g.

Dans leur étude très récente, **Gonçalves et ces collaborateurs(2013)** ont indiqué que, parmi les dix plantes qu'ils ont étudiées, l'extrait d'infusion des feuilles de *C. albidus* est l'un des plus riches en phénols totaux. Ce résultat est en concordance avec le notre, en ayant trouvé une teneur relativement importante en ces métabolites au niveau de cette même plante

D'après l'étude menée par El-Mustapha et Al-Thunibat (2008), l'extrait aqueux des feuilles de *C. azarolus* est classé en 5^{ème} position sur l'ensemble des extraits de 21 plantes médicinales qu'ils ont analysées.

IV.2.2. Teneur en flavonoïdes

Les résultats de dosage des flavonoïdes sont exprimés à partir de la courbe d'étalonnage réalisée avec la rutine utilisée ici comme molécule standard (figure ci-après).

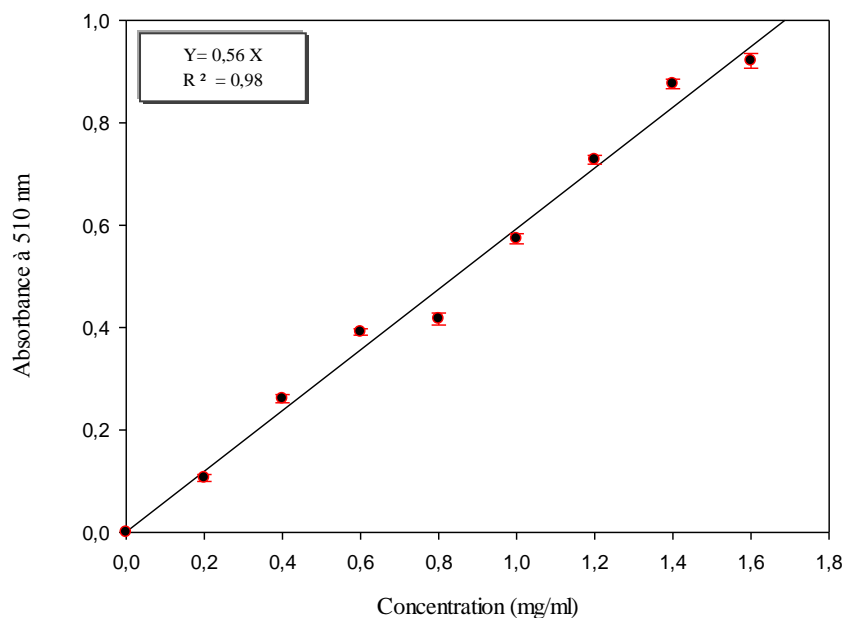


Figure 18 : courbe d'étalonnage réalisée avec la rutine pour le dosage des flavonoïdes.

- Les valeurs sont la moyenne de trois essais (n= 3) avec \pm l'écartype.

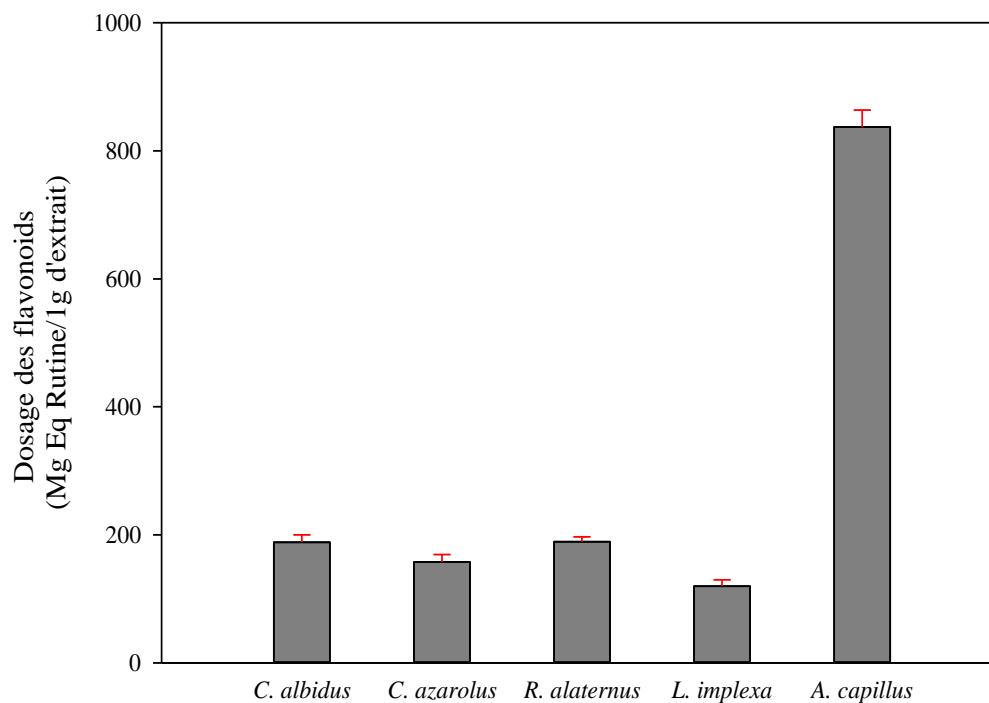


Figure 19 : histogramme représentant la teneur en flavonoïdes des extraits des plantes.

- Les valeurs sont la moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

L'histogramme ci-dessous représente les résultats de la teneur en flavonoïdes de l'extrait éthanolique de chaque plante, exprimés en ER/g d'extrait sec.

D'après cet histogramme, on remarque que l'extrait de *A. capillus*, qui a marqué le taux de le plus faible en phénols totaux, est contrairement le plus riche en flavonoïdes en exprimant une valeur de 837,21 mg ER /g ; quatre fois plus élevée par rapport à celle des autres plantes dont les teneurs en flavonoïdes ne dépassent pas 200 mg ER /g en moyenne.

L'extrait méthanolique de fruit de *Crataegus monogyna*, est marqué par le taux le plus élevé en flavonoïdes en comparaison aux autres extraits étudiés par **Bouزيد et al (2011)**.

Les feuilles de *L. implexa* contient 22 composants (Cinq iridoids, un saponin, un cyclitol, trois dérivés acides quiniques et 12 flavonoides). Parmi ces derniers, trois nouveaux flavonoïdes nommés : Implexa flavone, madreselvin A et madreselvin B, ont été isolés par **(Flamini et al 1997)**.

IV.3. Activité anti-DPPH

IV.3.1. Résultats de l'activité anti-DPPH à la concentration de 100µg /ml

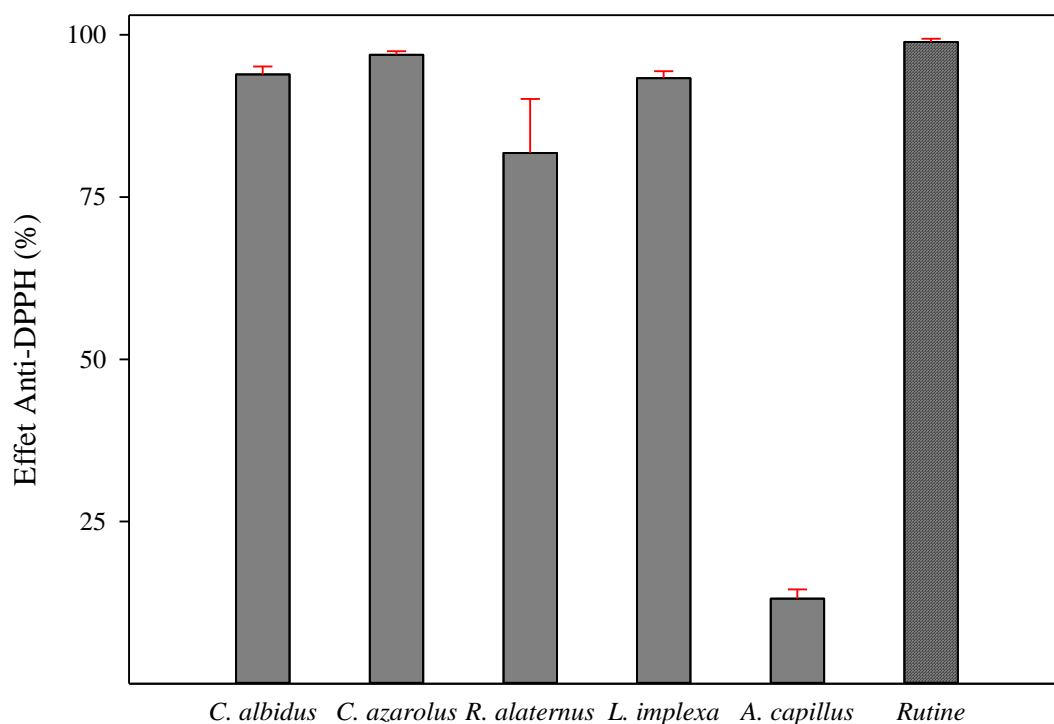


Figure 20: histogramme représentant l'effet anti-DPPH (%) à la concentration de 100µg /ml.
- Les valeurs sont la moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

Une première lecture des résultats (figure 20), nous permet de supposer que nos plantes sont de bonne source de molécules à caractère antioxydant sauf *A. capillus*.

Selon les résultats rapportées sur l'histogramme sur l'effet anti-DPPH à 100µg /ml, on constate que les extraits de quatre plantes : *C.azarolus* ,*C.albidus* ,*L .implexa*, et *R .alaternus* qui ont montrées les taux suivants : 93,87, 96,89 81,80 93,30 % respectivement, sont très actives contre ce radicale. La rutine testée, en parallèle, pour cette activité à prouver un effet avoisinant 98,88 % à cette même concentration (100 µg/ml).

Cependant, les feuilles de *A. capillus*, qui ont montrées la teneur la plus faible en phénols totaux, ont aussi exprimé l'effet anti-DPPH le plus faible (13,11%) ce qui laisse prédire le rôle principale que pourraient jouer les composés phénoliques dans cette activité. Ces résultats prouvent non seulement la richesse des extraits des plantes en polyphénols , mais aussi la nature de leurs composés phénoliques hydrosolubles qui sont caractérisés par la présence des groupements hydroxyles fortement impliqués dans l'activité anti-radicalaire (**Robards et al.,1999**).

IV.3.2. Résultats de l'activité anti-DPPH en fonction de la concentration des extraits

L'évaluation de l'activité anti-DPPH des extraits des plantes suivant leurs concentrations est menée dans le but de déterminer les concentrations inhibitrices à 50% (IC50%). Les IC50, par définition, sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs faibles reflètent un effet anti-radicalaire important (**Villano et al, 2007 ; Khadri et al, 2009**). Les valeurs IC50 sont déterminées en µg/ml exprimant la concentration efficace de l'extrait antioxydant nécessaire pour le piégeage et la réduction de 50% de DPPH.

D'après les résultats obtenus on constate que les allures des courbes sont différentes d'une plante à une autre suivant les différentes séries de dilutions appliquées. Ce qui indique que l'efficacité contre le DPPH est variable d'une plante à une autre.

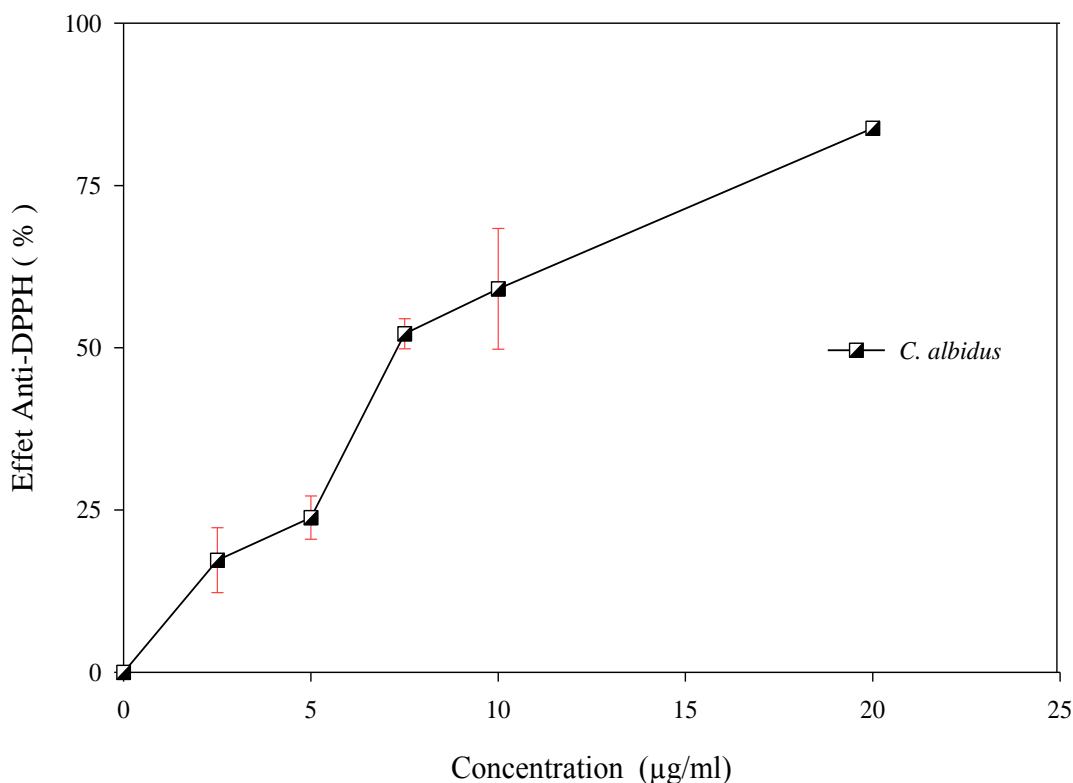
IV.3.2.1. Effet anti-DPPH de l'extrait de feuilles de *C.albidus* à différentes concentrations

Figure 21 : effet anti-DPPH d'extrait de *C.albidus* à différentes concentrations.

- Les valeurs sont la moyenne de trois essais (n= 3) avec \pm l'écartype.

La figure 21 représente l'effet anti-DPPH à différentes concentrations de l'extrait de feuilles de *C. albidus*. Nous constatons que cet effet est proportionnelle avec l'augmentation des concentrations testées. Étant donné l'extrait de feuilles de *C. azarolus* est très actif en terme d'effet anti-DPPH, une série de concentration, à part, a été testée, commençant de 2,5 µg/ml jusqu'à 20 µg/ml. Par conséquent, elle a refelté une IC50 très basse ($7,21 \pm 1.24$ µg/ml) la plus proche à celle du standard (2,85 µg/ml). Ceci confirme que *C. albidus* est la plus efficace en terme d'effet anti DPPH.

IV.3.2.2. Effet anti-DPPH de l'extrait de feuilles de *C. azarolus*, *L. implexa* et *R. alaternus* à différentes concentrations

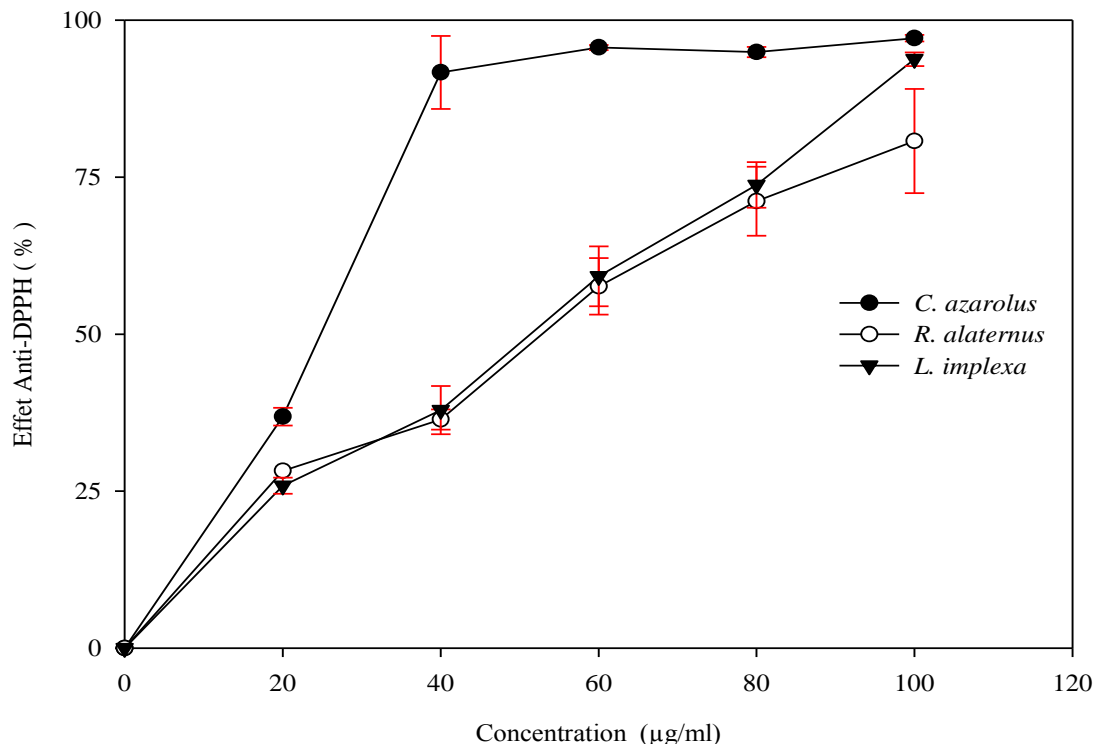


Figure 22: effet anti-DPPH d'extrait de *C. azarolus*, *L. implexa*, et *R. alaternus* à différentes concentrations.
- Les valeurs sont la moyenne de trois essais (n= 3) avec \pm l'écartype.

L'extrait de feuilles de *C. azarolus*, *R. alaternus* et *L. implexa* sont testés sur une série de dilutions décroissante commençant de 100 µg/ml jusqu'à 20 µg/ml. A cette concentration (20 µg/ml), les trois plantes marquent les taux anti-DPPH les plus faibles contrairement à l'extrait de *C. albidus* qui a montré à cette dilution un effet très élevé. D'autre part, suivant l'allure des courbes (figure 22) on constate que *C. azarolus* a maintenu son effet anti-radicalaire stable de la concentration 100 µg/ml jusqu'à 40 µg/ml. Alors que les deux autres plantes, leurs effets commencent à diminuer dès la première dilution (80 µg/ml). Cette différence dans l'allure des courbes a reflété des IC 50 différentes dont *C. azarolus* est la plus active avec une IC 50 de 25,06 µg/ml alors que *R. alaternus* et *L. implexa* sont moins actives en manifestant des IC 50 plus élevés dont la moyenne est proche de 50 µg/ml.

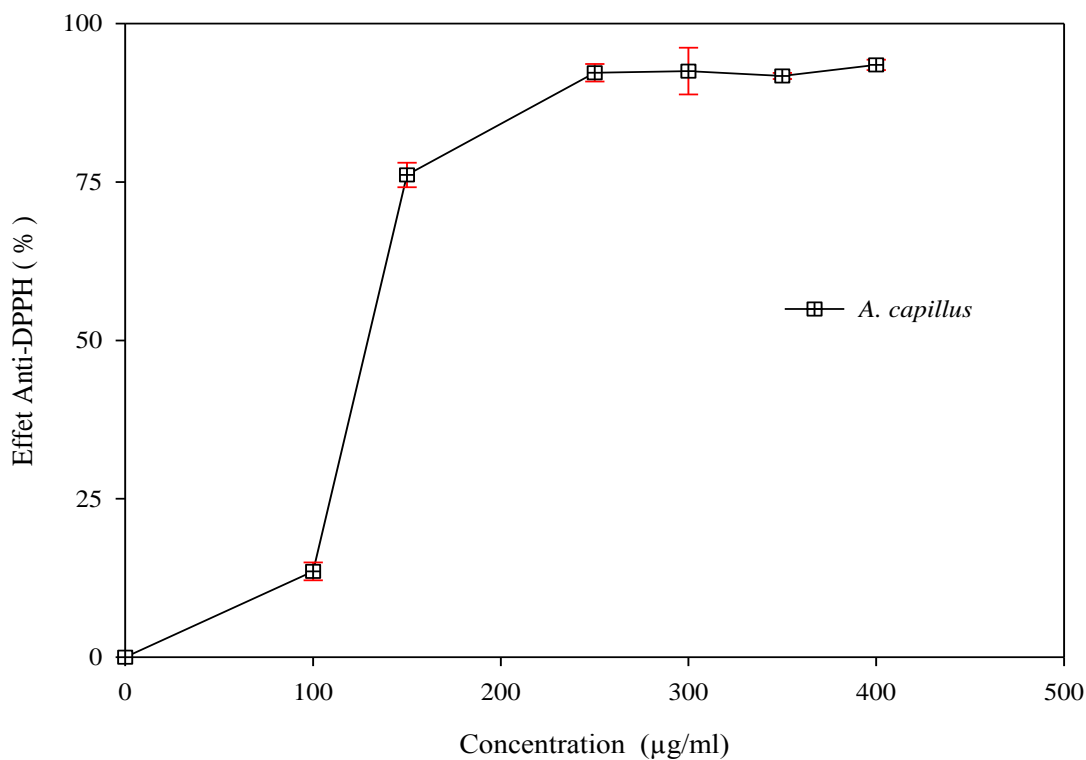
IV. 3. 2. 3. Effet anti-DPPH de l'extrait de feuilles d'*A. capillus* à différentes concentrations

Figure 23: effet anti-DPPH d'extrait de *A. capillus* à différentes concentrations.

- Les valeurs sont la moyenne de trois essais (n= 3) avec \pm l'écartype.

L'effet anti-DPPH de l'extrait de feuilles d'*A. capillus* est testé sur une autre série de dilution commençant de 100µg/ml jusqu'à 400µg/ml (figure 23). Cette plante, d'après ces résultats est la plus faible contre le DDPH, car son effet n'a atteint les taux les plus élevés qu'à la concentration de 250µg/ml. Par conséquent, cet extrait a montré l'IC50 la plus élevée dont la valeur est 130,46 µg/ml. Nous concluons que cette plante est pauvre en molécules douées d'effet anti-radicalaire impliqué dans la neutralisation directe des radicaux libres.

IV.4. Résultats de pouvoir réducteur

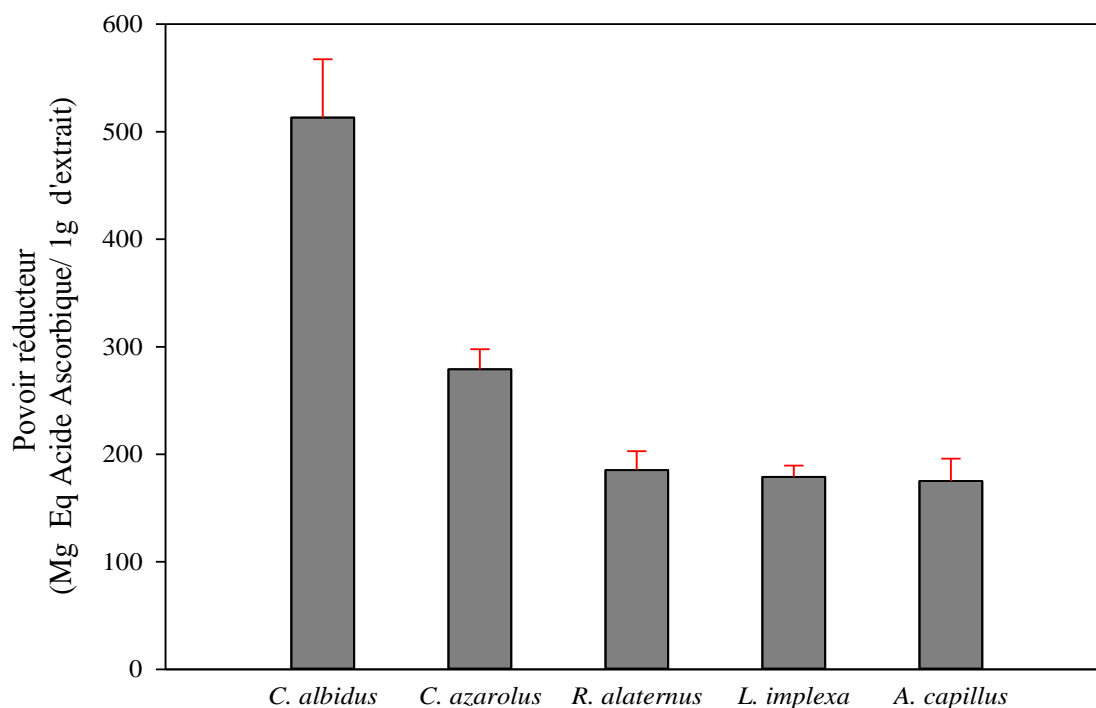


Figure 24: pouvoir réducteur des extraits des plants étudiées (mg Equivalent Acide Ascorbique /1g d'extrait).
- Les valeurs sont la moyenne de trois essais (n= 3) avec \pm l'écartype.

Les résultats de l'activité réductrice des extraits éthanoliques des plantes étudiées sont représentés dans la figure 24.

En premier lieu, l'extrait de *C.albidus*(515 mg EAA/g) possède la meilleure capacité de réduction de fer par rapport aux autres extraits des plantes puis l'extrait de *C. azarolus* vient en deuxième lieu avec une capacité moyenne (280 mg EAA/g), tandis que les trois autres à savoir : *R.alaternus*, *L.implexa* et *A. cappilus*, elle sont presque égales et faibles d'activité réductrice , les valeurs sont respectivement (184 , 181 , 180 mg EAA/g).

IV.5. Résultats de l'effet anti peroxydation lipidique

IV.5.1. Résultats de l'effet anti-péroxydation des lipides cervicales

IV.5.1.1. Résultats d'anti-péroxydation lipidique à 100µg /ml

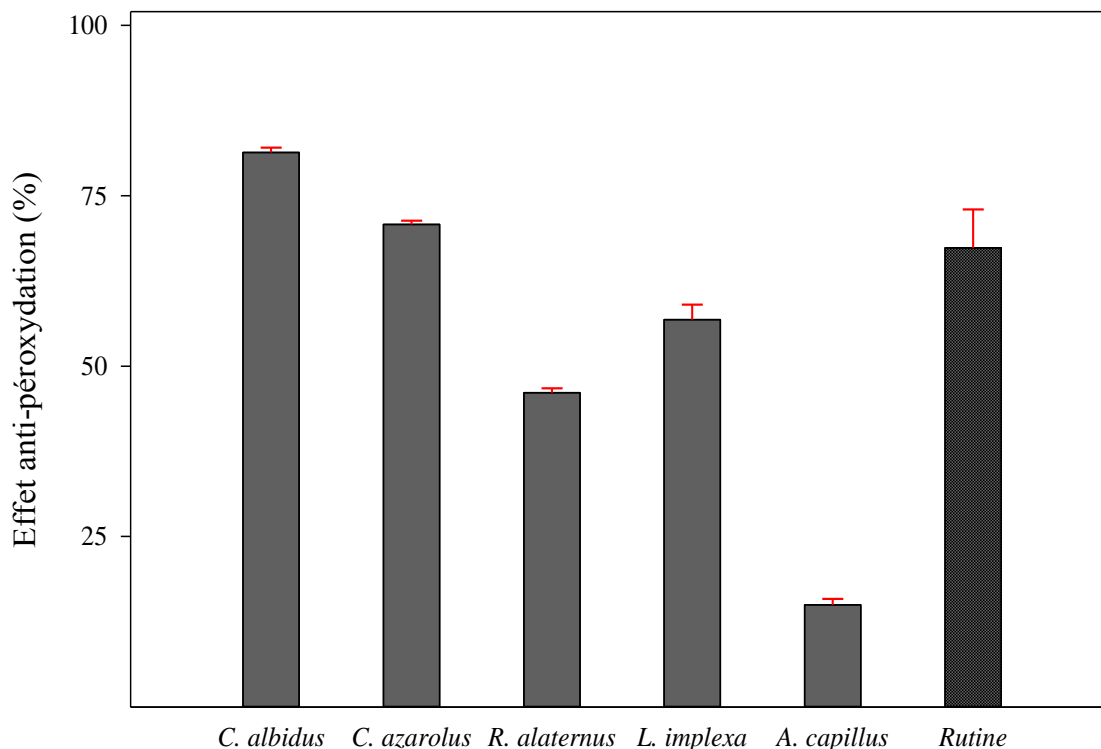
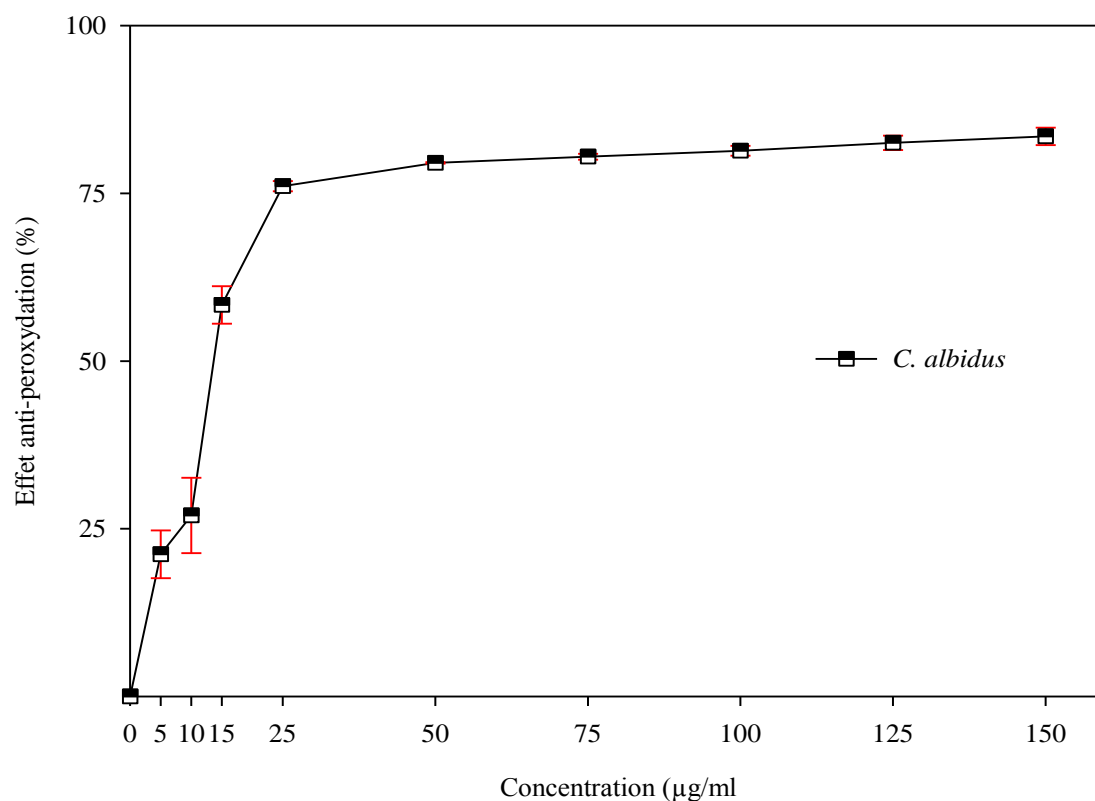


Figure 25 : effet anti-péroxydation lipidique des extraits des plantes et la rutine à la concentration 100µg /ml.
- Les valeurs sont la moyenne de trois essais (n= 3) avec \pm l'écartype.

Pour avoir une idée, ne serait-ce que globale, sur l'activité anti-péroxydation des lipides de cerveau animal, des extraits des différentes plantes, ces dernières sont évaluées pour cet objectif à la concentration de 100 µg/ml. Les résultats (figure 25) montrent que les plantes, *C. albidus* et *C. azarolus*, sont les plus actives (81,34 et 70,78 % respectivement) par rapport aux autres et même encore, par rapport à la molécule standard (67,36 %). Ces deux plantes confirment leur potentiel antioxydant car, elles ont déjà montré des propriétés anti radicalaires (anti-DPPH) importante dans le premier test. Quant à l'extrait de *R. alaternus*, et *L. implexa*, l'effet contre la peroxydation lipidique est juste moyenne avec des pourcentages de 46,11 et 56,84 % respectivement inférieurs à l'effet de la rutine.

Tandis que, la plante *A. capillus*, d'après les résultats, elle est la moins active en manifestant l'effet le plus bas(14,97%). Cette plante est jugée très faible et non efficace de point de vue potentiel anti-péroxydation lipidique comme elle a été déjà considérée faible contre DPPH.

IV.5.1.2. Effet anti-péroxydation lipidique en fonction des concentrations de *C. albidus*

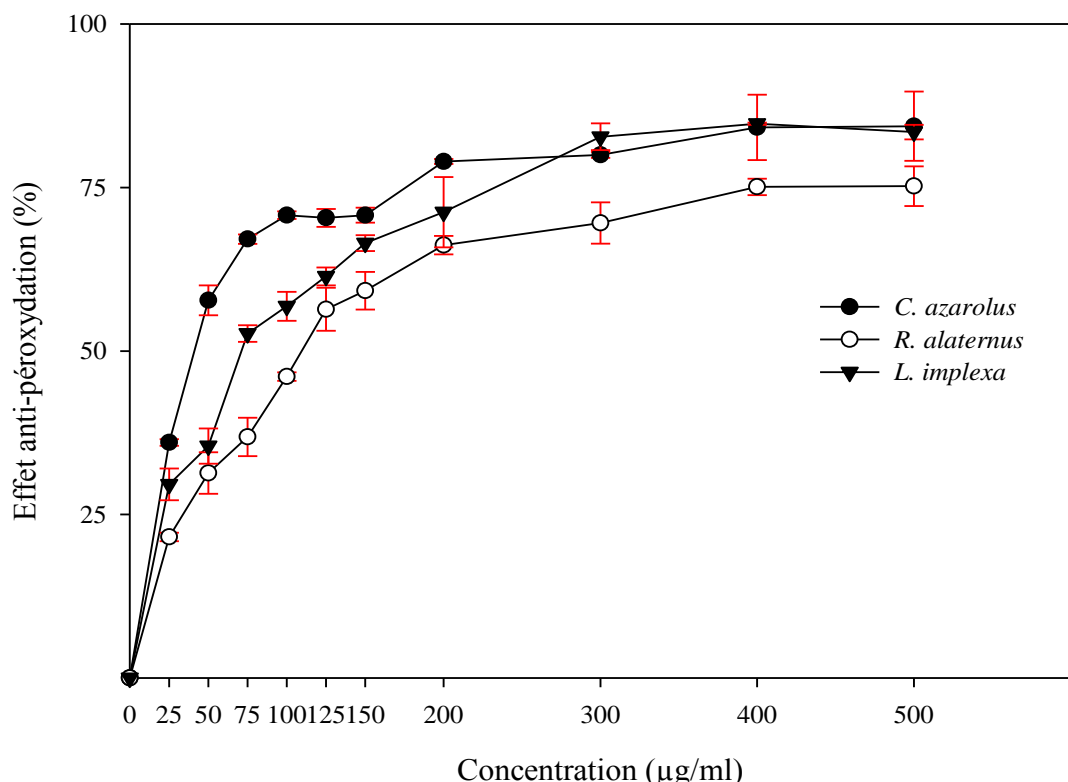
Figures 26 : effet anti-péroxydation lipidique à différentes concentrations de l'extrait de *C. albidus*
 - Les valeurs sont la moyenne de trois essais (n= 3) avec \pm l'écartype.

Commençant par *C. albidus*, cette plante est testée sur une série de concentrations qui commence de 5 µg/ml jusqu'à 150 µg/ml.

L'effet s'est montré sensiblement variable entre les concentrations allant de 5 à 25 µg/ml. Au-delà de cette concentration, cet effet augmente légèrement pour se stabiliser aux dernières concentrations testées.

L'effet de cette plante, qui a été variable à des concentrations très faibles, a reflété ainsi l'IC 50 la plus basse possible ($13,35 \pm 0,76$ µg/ml). Cette concertation témoigne encore le potentiel très estimé des feuilles de *C. albidus* contre la peroxydation lipidique.

IV.5.1.3. Effet anti-péroxydation lipidique en fonction des concentrations de *C.azarolus*, *R.alatarnus*, *L.implexa*.

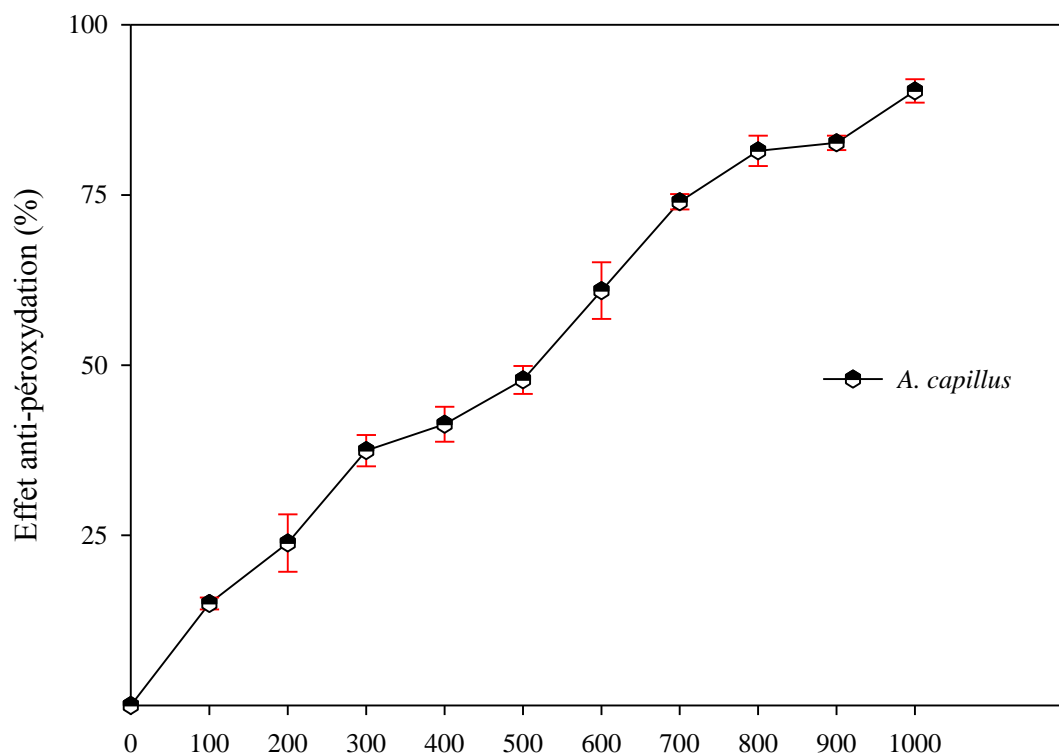


Figures 27: effet anti-péroxydation lipidique à différentes concentrations des extraits de: *C.azarolus*, *R.alatarnus*, *L.implexa*.

- Les valeurs sont la moyenne de trois essais (n= 3) avec \pm l'écartype.

Le potentiel anti-péroxydation lipidique des extraits des trois plantes citées ci-dessus s'est manifesté dépendant des concentrations élevées, allant de 25 $\mu\text{g/ml}$ à 300 $\mu\text{g/ml}$. A partir de cette dernière, l'effet semble être stable jusqu'à la concentration de 500 $\mu\text{g/ml}$ (figure 27).

D'autre part, on constate que l'allure des courbes, est distincte d'une plante à une autre, et ce, en fonction des capacités de chaque une à lutter contre le phénomène de la peroxydation lipidique. En effet, l'extrait de feuilles de *C. azarolus* est témoin d'une IC50 équivalente à 41,21 $\mu\text{g/ml}$; très proche à celle de la rutine (39,18 $\mu\text{g/ml}$) alors que les IC50 de *L. implexa* et *R. alatarnus* sont de l'ordre de 71,20 110,46 $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

IV.5.1.4. Effet anti-péroxydation lipidique en fonction des concentrations de *A. capillus*

Figures 28 : effet anti-péroxydation lipidique à différentes concentrations de l'extrait d'*A. capillus*.

- Les valeurs sont la moyenne de trois essais (n= 3) avec \pm l'écartype.

L'efficacité de d'inhiber la destruction des lipidiques par l'extrait de d'*A. capillus* est très faible car l'effet prouvé par cette plante est dépendant des concentrations hautement élevées faisant l'exception par rapport aux autres plantes.

Par conséquent, cette plante n'a donné un effet anti-péroxydation à 50 % qu'à la concentration 517, 47 $\mu\text{g/ml}$, prouvant ainsi un effet 38 fois moins efficace par rapport à *C. albidus*.

IV.5.2. Résultats de l'effet anti peroxydation lipidique plasmatique induit par AAPH

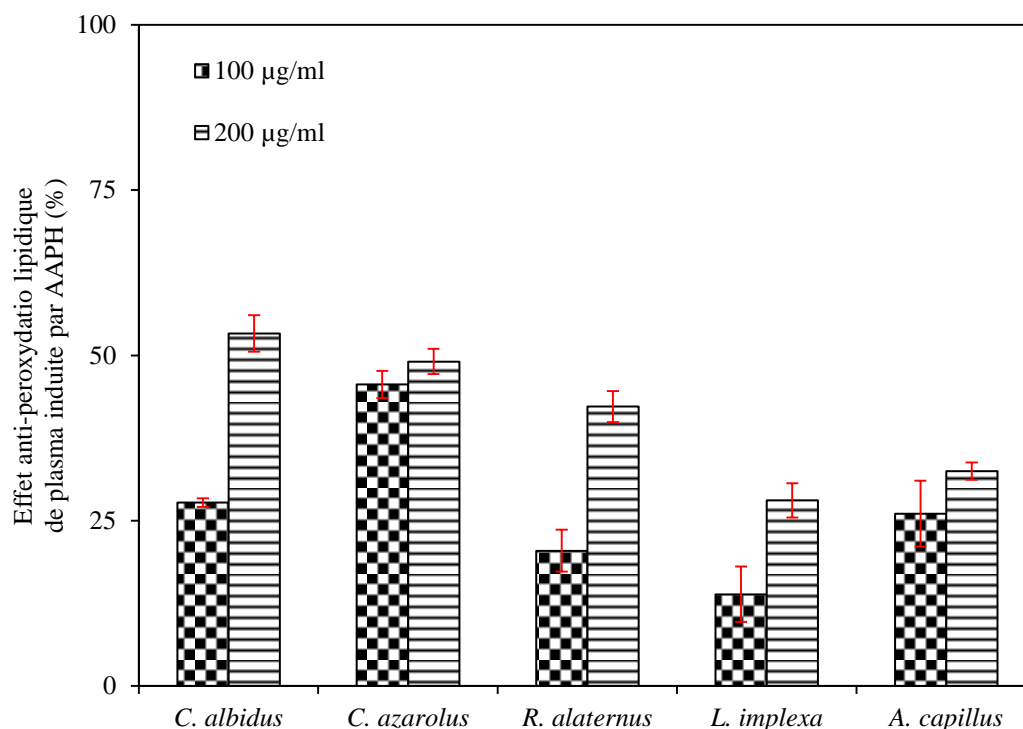


Figure 29 : effet anti-peroxydation sur des lipides de plasma du sang humain induite par AAPH.

- Les valeurs sont la moyenne de trois essais (n= 3) avec \pm l'écartype.

L'évaluation de l'effet anti-peroxydation lipidique en utilisant l'AAPH comme initiateur de la destruction des lipides plasmatiques est effectué pour deux concentrations (100 et 200µg/ml). L'effet protecteur des extrait des plantes est, d'après la figure 30, varie entre ces deux concentrations testées, indiquant un phénomène dépendant de la teneur en composés actifs, tout comme cela était vérifié par les résultats précédents sur les lipides du cerveau animal.

Encore une autre fois, les feuilles de *C ;albidus* présentent un pouvoir anti-peroxydation lipidique très prononcé, les feuilles de *C. azarolus* sont aussi active car elles viennent juste après. Cette dernière a été rapportée par **Ljubuncic et al. 2005** comme étant une plante très active contre la peroxydation des lipides du plasma induite par AAPH. Il est indiqué dans cette étude que des concentrations croissantes de *Crataegus azarolus* provoquent une inhibition significative, dépendante des concentrations sur l'oxydation des lipides de plasma induite par AAPH atteignant 90% à la concentration la plus élevée (667 µg/ml).

IV.6. Résultats de chromatographie sur couche mince CCM

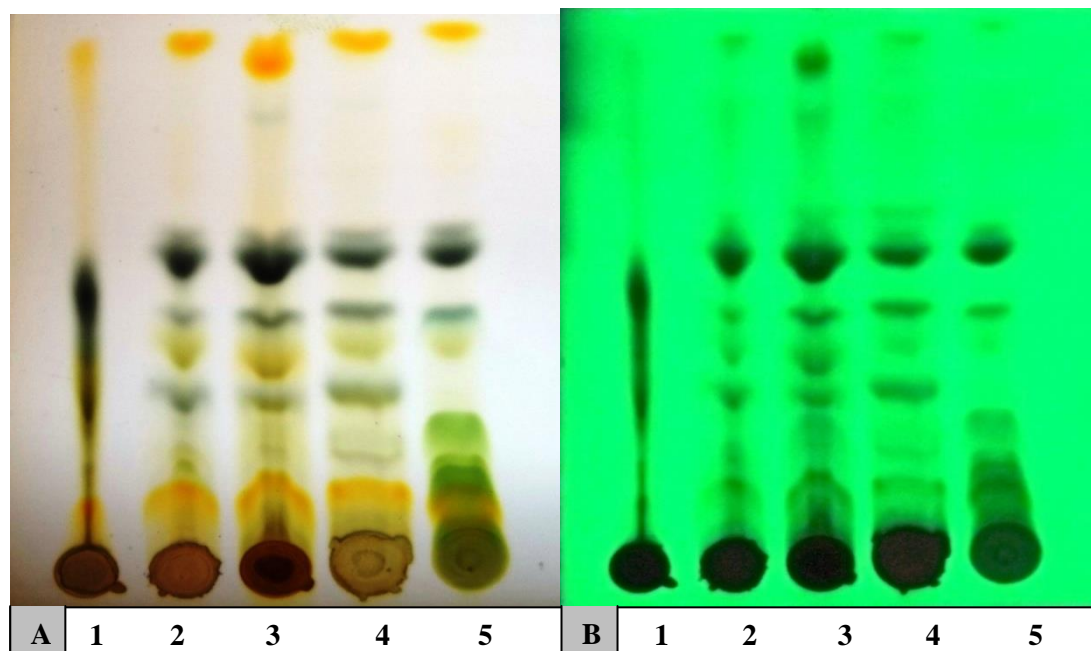


Figure 30 : photo des profils chromatographiques, des extraits des plantes obtenus avec le mélange Hexane : Ethyle acétate (9 :1). (A) observation à la lumière du jour. (B) observation sous une lampe UV. **1 :***C. albidus* **.2 :***C. azarolus*.**3 :***R. alaternus*. **4 :***L. implexa*. **5 :***A. capillus*.

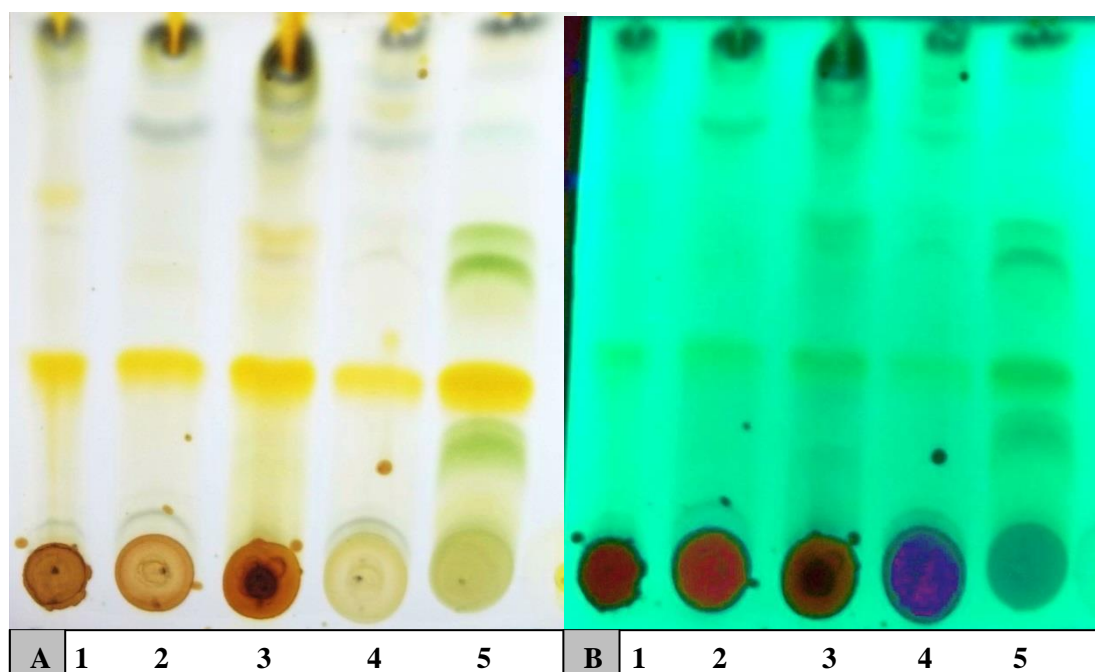


Figure 31: photo des profils chromatographiques, des extraits des plantes obtenus avec le mélange Toluène : Acétone (9 :1).(A)observation à la lumière du jour. (B) observation sous une lampe UV. **1 :***C. albidus* **.2 :***C. azarolus*.**3 :***R. alaternus*. **4 :***L. implexa*. **5 :***A. capillus*.

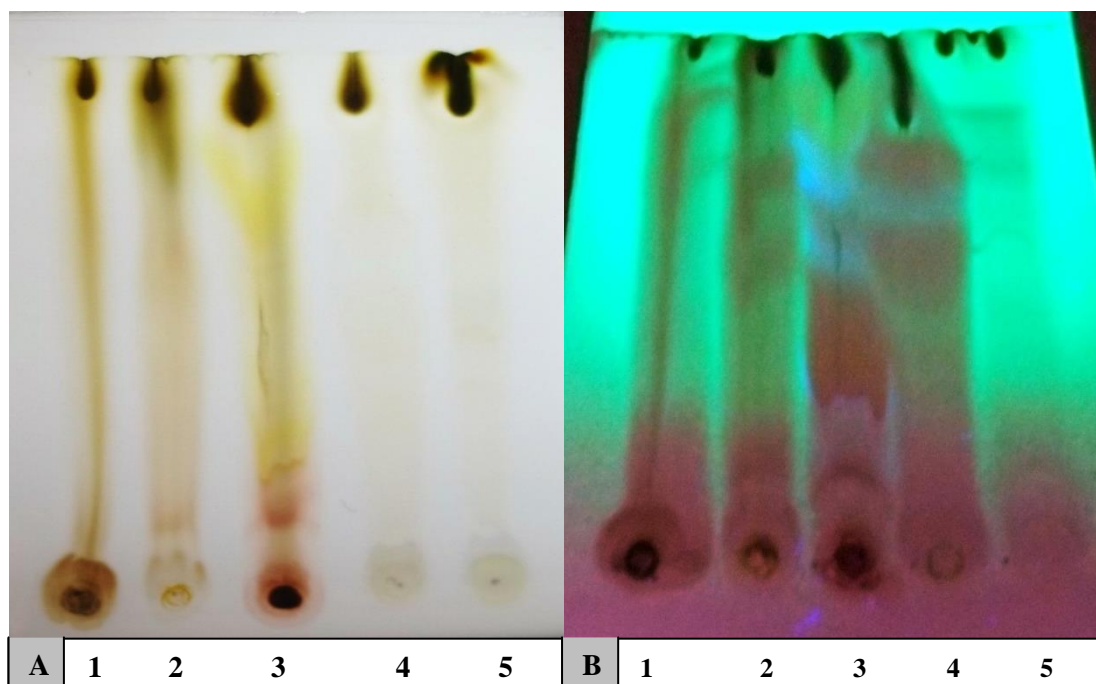


Figure 32: photo des profils chromatographiques, des extraits des plantes obtenus avec le mélange acétate d'éthyle : acide formique : acide acétique : H₂O. (A) observation à la lumière du jour. (B) observation sous une lampe UV. 1 : *C. albidus*. 2 : *C. azarolus*. 3 : *R. alaternus*. 4 : *L. implexa*. 5 : *A. capillus*.

Le développement de la méthode pour la chromatographie sur couche mince commence non seulement par le choix de la phase mobile de séparation mais aussi le choix de la phase stationnaire, la technique de développement choisie. Les dimensions de la chambre de développement, et de l'espace vapeur ont un effet prononcé sur la séparation (Yrjonen, 2004).

Les résultats présentent des taches de couleurs variées : orange, jaune, bleu, verte, marron, qui peuvent correspondre à plusieurs classes de métabolites secondaires.

La distinction entre les différents composés des plantes est basée sur la comparaison des R_f et couleurs observées à la lumière du jour et sous une lampe UV (voir annexe VI et VII).

Pour le mélange de séparation H₂ : Ethyle acétate (9 :1), les extraits des feuilles, *C.azarolus*, *R.alternus*, *L.implixa* sont apparues très riches en divers molécules présumées et ont des profils très similaires selon la figure (30). D'autre part, les feuilles de *A.capillus* ont montré un profile déférent à celui des autres extraits, tandis que le dépôt de l'extrait de feuille de *C.albidus* n'a pas donné une bonne séparation. Ceci serait lié à la nature des substances contenues dans les feuilles de cette plante

D'autre part, l'autre système de solvant (figure 31) montre une bonne séparation pour tous les dépôts des extraits des plantes. Pour le dépôt des extraits des feuilles *C.albidus* et *C.azarolus* *R.alternus*, *L.implixa*, les profils sont semblables, indiquant ainsi que ce système

de solvant sépare une série de molécules partagées entre ces plantes. Cependant *A. Capillus* donne un profil différent, donc différents composés. De ce dernier résultat, on signale l'apparition d'une fraction de couleur jaune très intense partagée entre toutes les plantes.

En fait, le système de séparation (EA-AF-AAc-H₂O) / (100-11-11-26) que nous avons appliqué (figure 32) exerce selon (**Andriambelson *et al* 1998**) une hydrolyse acide sur les formes complexes telles que les tannins (tannins hydrolysables), permettant ainsi la migration des unités issues de cet effet.

L'application de ce système, a montré des profils qui présentent peu de séparation et moins de résolution ce qui ne permet pas de distinguer facilement entre les fractions séparées. Notre hypothèse stipule la présence de molécules à haut poids moléculaire et très polaire.

Ces résultats et les observations nous renseignent et confirment que les extraits bruts des plantes étudiées sont d'une diversité moléculaire assez frappante témoignant sur la biodiversité des principes actifs qu'elles pourraient nous offrir afin de les exploiter dans le domaine thérapeutique.



Conclusion et perspectives

Conclusion

La valorisation des plantes médicinales appliquées dans les différentes cultures ethniques, en étudiant leurs activités biologiques, est une étape clé pour tenter de trouver des remèdes pour plusieurs problèmes de santé et ouvre sur des perspectives de découvrir de nouvelles molécules naturelles et la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques.

Lors de ce travail, les extraits des cinq plantes médicinales : *Cistus albidus*, *Crateagus azarolus*, *Rhamnus alaternus*, *Lonicera implexa* et *Adiantum capillus-veneris* ont fait l'objet d'une étude détaillée, commençant par l'extraction et le dosage des composés phénoliques ainsi que l'évaluation de leur effet anti-radicalaire DPPH et le pouvoir réducteur FRAP, en suite l'estimation de l'effet anti-péroxydation lipidique induite par FeSO₄ et AAPH, enfin la caractérisation des extraits à l'aide d'une chromatographie sur couche mince.

L'extraction des composés phénoliques a été faite à partir d'une poudre fine de ces plantes en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction. Les rendements de cette extraction montrent que les feuilles de *C.albidus* sont les plus importantes en comparaison aux autres.

Le dosage des phénols totaux, par la méthode de Folin-ciocalteu, affirme que *C.albidus* est relativement riche en ces composés (227,90mg EAG/g). La même qualité a été constatée pour les feuilles de *C.azarolus* en montrant le meilleur taux des phénols totaux (244,90mg EAG/g). Cependant, le taux le plus faible est exprimé par les feuilles d'*A. capillus-veneris* (50,29 mg EAG/g).

Quant aux teneurs des plantes en flavonoïdes, l'extrait d'*A. capillus-veneris* est le plus riche en démontrant un taux de (837,21mg ER/g), suivi par les extraits des feuilles de *C.albidus* et *R.alaternu* avec des valeurs suivantes 888,47mg ER/g et 152,62mg ER/g respectivement.

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire contre le DPPH affirme que l'extrait de feuilles de *C.albidus* est le plus puissant avec une IC₅₀ très basse (7,21µg/ml) et la plus proche à celle de standard rutine (2.85µg/ml). Ceci serait expliqué par la richesse de cette plante en composés phénoliques. L'extrait de feuilles de *C.azarolus*, classées en deuxième lieu, est aussi marqué par une IC₅₀ importante d'environ 12,06µg/ml, alors que les extraits de feuilles de *R.alaternus* et *L.implexa* ont montré des IC₅₀ plus élevées (51,74 et 53,23 µg/ml respectivement)

Tandis que l'extrait d'*A.capillus-veneris* exprime une IC₅₀ la plus élevée, reflétant ainsi l'activité anti-radicalaire la plus faible.

Concernant la capacité des plantes à réduire les ions ferriques, elle a été déterminée par l'analyse FRAP. L'extrait de *C. albidus*, d'après les résultats, est le plus puissant en pouvoir réducteur (513,15 Mg Eq Acide Ascorbique/ 1g) suivi, dans un ordre décroissant, par l'extrait de *C. azarolus*, *R. alaternus*, *L. implixa* et *A. capillus*.

L'activité anti-péroxydation lipidique montre que l'effet le plus puissant est celui de l'extrait de *Cistus albidus* avec un IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) de (13.35 ± 0.76) suivi par l'extrait de *Crataegus azarolus* (41.21 ± 2.15) puis vient *Lonicera implexa* en troisième lieu (71.20 ± 3.24) et en fin l'extraits de *Rhamnus alaternus* et *Adiantum capillus-veneris* qui sont les plus faibles (110.46 ± 1.03 et 517.46 ± 1.33).

La peroxydation lipidique du plasma testée à deux concentrations (100 et 200 $\mu\text{g/ml}$) montre un effet assez important au niveau des feuilles les feuilles de *C. albidus*.

Les analyses effectués par la chromatographie sur couche mince sur gel de silice avec trois systèmes solvants différents ont montré, sous l'UV, ont confirmé la richesse des extraits des plantes étudiées en divers composés.

L'ensemble de ces résultats obtenus ne constitue qu'une première étape de la recherche de substances de source naturelle biologiquement active. Il serait essentiel, à l'avenir de préciser la nature des composés phénoliques, en utilisant des méthodes plus avancées. Sans oublier l'étude de l'effet toxique de ces composés.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Ait Youssef, M. 2006. plantes médicinales de Kabylie, *éditions Ibis Pres*. P: 92-93-94-100-194-278-279.
- Al-Mustafa, A.; Al-Thunibat, Y. 2008. Antioxidant activity of some Jordanian medicinal plants used traditionally for treatment of diabetes. *Pakistan Journal of Biological Science*. 11 (3) P: 351-358.
- Amessis-Ouchemoukha, N.; Khodir M.; Pedro, L.V. F.; Serralheiro, L.M.; Eduarda, M., Araújo, M. 2014. Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetyl cholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*. P:53 (6– 15).
- Andersen, M.; Makham, K.R. 2006. Flavonoids chemistry, Biochemistry and Application. *Taylor et Francis Group*. P: 1197.
- Andriambelson, E.; Magnier, C.; Hann-Archipoff, G.; Lebostien, A.; Anton, R.; Bertz, A.; Stoclet, J. C.; Andriansitohaina, R. (1998). Natural dietary polyphenolic compound cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *The journal of nutrition*. 128 P: 2324-2333.
- Aouadhi, S. 2010. Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle. l'étude de 57 plantes recommandées par les herboristes / Faculté de médecine de Tunis 2010)
- Arbor, A. 2014. TBARS essay, *cayman chemical company, MI, USA*. P: 7.
- Bahlil, Y. 2010. Effet d'un extrait aqueux de *globularia alypum* sur le profil lipidique et le statut redox, chez des rats soumis à un régime enrichi en fructose. 12-23.
- Bammiet, J.; Douira, A. 2002. Les plantes médicinales dans la forêt de l'achach (plateau central, Maroc) *Acta Botanica Malacitana*. 27 P: 131-145
- Banerjee, A.; Kunwar, A.; Mishra, B. 2008. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. *chemico-biological interactions* 174 P: 136.
- Barreira, J.C.M.; Ferreira I.C.F.R.; Beatriz P.M.; Oliveira P.; Pereira J.A. 2008. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chemistry*. 107 P: 1106–1113.

- Benbelaïd , F.; Abdelmounaïm, K.; Abdoune, M A.; Bendahou,M. 2013. Phytochemical screening and in vitro antimicrobial activity of *Thymus lanceolatus* Desf. From Algeria. *Asian Pac J Trop Dis.* 3(6) P: 454-459.
- Benhammou, N. 2011. Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest du Sud-Ouest Algérien ; Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen (mémoire de Magistère).
- Bignami. M.; Paolucci and A.; Scossa G. B.2003. Évaluation préliminaire des composantes nutritionnelles et médicinales des fruits de *Crataegus azarolus* : Département de la production végétale, Université de la Tuscia Via S. Camillo de Lellis 01100 Viterbe, Italie Institut de l'écophysiologie des plantes Arbres fruitiers Conseil national de recherches, Via Gobetti Bologna, Italie.P: 101, 40129
- Boulanouar, B.; Abdelaziz, G.; Aazza, S.; Gago .; Grac, M. 2013. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products.*46 P:85– 96.
- Bouzid, W.; Yahia, M.; Abdeddaim, M.; Aberkane, M. C.;Ayachi, A. 2011. Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'*Aubepinemonogyne*. *Lebanese Science Journal, Vol. 12, No. 1.*
- Brown, B. A. 1988. Haematology: Principles and procedures. *5th ed. Philadelphia: Lea and Febiger.* ; P:195–215.
- Bruneton, J .1999. Pharmacognosie-Phytochimie,Plantes médicinales. Technique et documentation.3ème Ed. *Lavoisier,Paris.* P:45.
- Chabrier Jean-Yves . 2010. Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie *Universite Henri Poincare - Nancy I* (Thèse de Doctorat) P22-24-25
- Chaouche ,T. M .; Haddouchi, F.; Ksouri, R.; Atik-Bekkara, F . 2014 . Evaluation of antioxidant activity of hydromethanolic extracts of some medicinal species from South Algeria, *Journal of the Chinese Medical Association .* P: 1- 6.
- Cillard,J.; Cillard,P.2006. Mécanisme de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations ; 13 (1). P: 27.
- Devasagayma,T. P. A.; Bloor,K.; Ramasarma,T. 2003. Methods for estimating lipid peroxidation : An analysis of merits and demeritsindian. *Journal of biochemistry et biophysics .* P:301-302
- Diallo, A. 2005.Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygiumguineense*willd. (*myrtaceae*). Thèse de Pharmacie. MALI. P: 99.

- Diallo, A. 2005. Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd. (Myrtaceae). Thèse de Pharmacie. MALI. P: 99.
- Ebrahim, Z.M. A.; Pourmmorad, F.; Hafezi, S. 2008. Antioxydant activities of Iranian corn silk. Turkish journal of biology. 32 P:43-49.
- Fabre, A. J. 2003. Histoire des sciences médicales - Tome XVI - N° 1. P:4.
- Favier A. 2003. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique. 108 –
- Flamini, G.; Braca, A.; Cioni, P. L.; Morelli, I. 1997. Three new flavonoids and other constituents from *Lonicera implexa*. J. Nat. Prod. 60, P:449-452.
- Gambhir, G. 2008. Chromatography (A Refresher Course CPDHE) Submitted by Acharya Narendra Dev College Dated. P: 12.
- Gonçalves, S.; Gomes, D.; Costa, P.; Romano, A. 2013. The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*. 43 P: 465– 47.
- Grunwald, J.; Janicke, C. 2006. Guide de la phytothérapie. Edition Marabout. P:402-409.
- Grunwald, J.; Janicke, C. 2006. Guide de la phytothérapie. Edition Marabout.
- Guignard, J., 1996. Biochimie végétale. Edition Lavoisier, Paris, P: 175-192.
- Hamza, N.; Benedict, B.; Cheze, C.; Agli, A.; Robinson, P.; Ginc, H.; Moore, N. 2010. Prevention of type 2 diabetes induced by high fat diet in the C57BL/6J mouse by two medicinal plants used in traditional treatment of diabetes in the east of Algeria), *Journal of Ethnopharmacology*. P: 513–518.
- Harborne, J.B.; Williams, C.A. 1999. Advances in flavonoid research since 1992. P: 651.
- Harrar A El Nacer. 2012. Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. université ferhatabbas – setif (thèse de doctorat).
- Hseu, Y-C.; Chang W-H.; Chen, C-S.; Liao J-W.; Huang, C-J.; Lu, F-J.; Chia, Y-C.; Hsu, H-K.; Wu, J-J.; Yang, H-L. 2008. Antioxidant activities of *Toona sinensis* leaves extracts using different antioxidant models *Food and Chemical Toxicology*. 46 P: 105–114.
- Hussain, J.; Rehman, N.U.; Al-Harrasi, A.; Liaqat, A.; Khan, A.; Abdullah, M. 2013. Essential oil composition and nutrient analysis of selected medicinal plants in Sultanate of Oman, Albroumi (by the Asian Pacific Journal of Tropical Disease. All rights reserved). *Journal of Saudi Chemical Society*. 227-295

- Ibraheim, Z .;Amany S.; Ahmed.; Yaser G. Gouda. 2011.Phytochemical and biologicalstudies of *Adiantum capillus-veneris* L. *Saoudi Pharmaceutical Journal*. 19 P: 65–74.
- Iserin Paul.2001.larousse encyclopédie des plantes médicinales : identification ,préparation ,soins. P: 10-11-12-30.
- Javanovic, S.V. ; Steenken, S. ; Tosic, M. ; Marjanovic. ; B, Simic, M.J. 1994. Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*. 316 P: 4846-4851.
- Josiane ,C.; Pierre, C.2006.Mécanisme De La Peroxydation Lipidique Et Des Anti-Oxydations ;Oct Vol 13 N°1.P: 27.
- Kandra, L.; Gyemant ,G.; Zajacz ,A.; Batta ,G. 2004.Inhibitory effects of tannin on human salivary a-amylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319, P: 1265–1271.
- Khadri, A .; Neffati, M .; Smiti, S. ;Fale , P. ; lion ,A. ; Rosa L .;Serralheiro , M. ; Luisa M.; Araujo, M. ; Eduarda, M. 2009. Antioxidant, antiacetylcholinesterase and antimicrobial activites of *Cymbopogonschoenanthus* L. Spreng (lemongrass) fromTunisia .*LWT-Food Science and Technology*, 43 P:331-336
- Kubola, J. ;Siriamornpun, S.2008. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd(*Momordicacharantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food Chemistry*, 110. P: 881–890.
- Kubola, J. ;Siriamornpun, S.2008. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordicacharantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food Chemistry* ,110 .P: 881–890.
- Lafargue, S .1971.Principales and practice of chromatography.*chro-Ed booksseries.Libarary for science .P:100.*
- Laguerre, M. , López-Giraldo, L.J., Lecomte, J., Pina, M., Villeneuve, P. 2007. Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante. *OCLVOL*. 14 (5) :278-292.
- Ljubuncic, P. ; Portnaya, I. ; Cogan, U. ; Azaizeh, H. ; Bomzon, A .2005. Antioxidantactivity of *Crataegus aronia* aqueousextractused in traditionalArabmedicine in Israel. *Journal of Ethnopharmacology*. 101. P:153–161.
- Loi ,MC. ;Poli,F.;Sacchetti,G .;Sелenu ,M B .; Ballero,M .2004.Etgnopharmacology of Ogliastra (VillagrandeStrisaili,Sardinia, Italy) .University of cagliari ,Vial S .Ignazio 13 ,I-09123 Cagliari ,Italy .*Fitoterapia* .75 P:227-295.

- Macheix J-J.; Fleuriet,A.; Christian ,J.2005.Les Composés Phénoliques Des Végétaux ;presses polytechniques et universitaires romandes . P:1-2-4-5-8.
- McCord, J.M. 1995. Superoxide radical: Controversies, contradictions and paradoxes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*.202 , P:112-117.
- Middleton, E.; Kandaswami,C.; Theoharides, T.C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cell: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52 P: 673-751.
- Muchuweti M.; Ndhlala A.R.; Kasiamhuru ,A .2006. Analysis of phenolic compounds including tannins, gallicotannins and flavanols of *Uapacakirkiana* fruit. *Food Chemistry*, 94 P: 415–419.
- Nagao, A.; Seki, M. and Kobayashi, H. 1999. Inhibition of xanthine oxydase by flavonoids. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 63(10): 1787-1790.
- Nijveldt, R. J.; Nood, E.; Hoorn, D. E.; Boelens, P. G.; Norren, K.; Leeuwen, P.2001. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin Nutr*, 74 P: 418–425. P: 9.
- Paris M.; Hurabielle M. 1981. Abrégé des matières médicales. Tome 1 , Généralités morphologiques. Edition Masson, Paris, P:182-216.
- Park ,H J .; Cha ,H C . 2003. Flavonoids from leaves and exocarps of the grape *Kyodo Korean journal of biological society*.7 P:327-330.
- Park, HJ.; Cha,HC .2003. Flavonoids From Leaves and exocarps of the grape *Kyoho.korean journal of biological society*.7 P:327-330. *Phytochemistry*, 55 P: 481–504.
- Pietta, PG. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*;63 P: 1035–1042.
- Ribereau Gayon.P. 1972. Plant Phenolics. New York, USA, Hafner Publishing Company ., P: 875-878.
- Ribereau Gayon.P.1968. Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod, Paris, P: 254.
- Robads ,K .; Prenzeler ,P.D .; Toker , G .; Swatsitang ,P.;Glover,W.1999.phenolic compounds and their role in oxidative process in fruits.*Food Chemistry*,66 P:401-436.
- Rolland, Y. 2004.Antioxydants naturels végétaux.OCL.11:419-424.
- Schaouenberg , P.; Paris , F. 2008 . Guide des plantes médicinales (analyse,description et utilisation des 400 plantes): *Delachaux et Nestlé, Paris,P:4-5-7.*

- Schaouenberg,P .;Ferdinand.;P .2008. Guide des plantes médicinales (analyse, description et utilisation des 400 plantes): Delachaux et Nestlé, Paris. P:456-460.
- Singhal ,M .;Arindam P.; Hemendra ,P S.2014. Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives. King Saud University148,P:789-794.
- Vermerris,W .;Nicholson , R.2006. phenolic compound biochemistry .springer science. Netherlands. P:276.
- Villano, D.; Fernandez-pachon, M, S.; Moya, M, L.; Traoncoso, A, M.; Garcia-parrilla, M, C. 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71 P: 230-235.
- Waterman P. G.; Mole S. 1994. Analysis of Plant Phenolic Metabolites; Blackwell: Oxford, U.K. P:784-801.
- Wojdyl, A.;Oszamianski, J.; Czemerys,R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compound in 32 selectedherbs . food Chemistry.105 P:940-949.
- Yrjonen T.2004, Extraction And Planar Chromatographic Separation Technique In The Analysis Of Natural Products.Conference Room 513 At Viikki Infocentre (Viikinkari 11) Faculty Of Pharmacy Of The University Of Helsinki.64 P.
- Yuan, Q.; Zhang , X .; Liu, Z.; Song, S.; Xue , P .; Wang , J .; Ruann , J. 2013. Ethanol extract of *Adiantum capillus- veneris* L suppresses the production of inflammatory mediators by inhibiting NFκ B activation. *Journal of Ethnopharmacology* 147 P:603–611.
- Yuan,Q.;Xuenong,Z.; Ziwei L.; Shanshan,S.;Pinpin ,X.;Jianping ,W.; Jinlan, R. 2013. Ethanol extract of *Adiantum capillus- veneris* L suppresses the production of inflammatorymediators by inhibiting NFκ B activation *Journal of Ethnopharmacology*147 P:603–611.
- Zeggwagh, A.A.; Lahlou. Y.; Bousliman, Y. 2013. Enquête sur les aspects toxicologiques de la phytothérapie utilisée par un herboriste à Fes , Maroc. *The Pan African Medical Journal*. 14 P: 125.



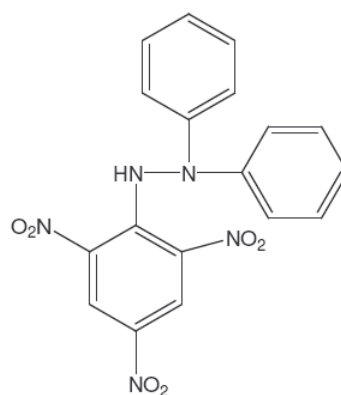
Annexes

Annexe I :: valeurs des IC50 ($\mu\text{g/ml}$) de l'activité anti-DPPH

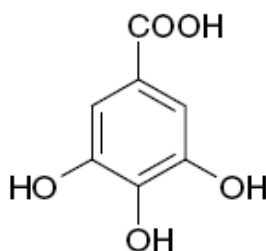
Extraits	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
<i>C. albidus</i>	7,21 \pm 1.24
<i>C. azarolus</i>	25,06 \pm 0.15
<i>R. alaternus</i>	51,74 \pm 7.03
<i>L. implixa</i>	53,23 \pm 5.24
<i>A. capillus-veneris</i>	130,46 \pm 0,45
Rutine	2.85 \pm 0.17

Annexe II : valeurs des IC50 ($\mu\text{g/ml}$) de l'activité anti-peroxydation.

Extraits	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
<i>C. albidus</i>	13,35 \pm 0, 76
<i>C. azarolus</i>	41,21 \pm 2.15
<i>R. alaternus</i>	110,46 \pm 1.03
<i>L. implixa</i>	71,20 \pm 3.24
<i>A. capillus-veneris</i>	517,46 \pm 1,33
Rutine	39.18 \pm 0.37

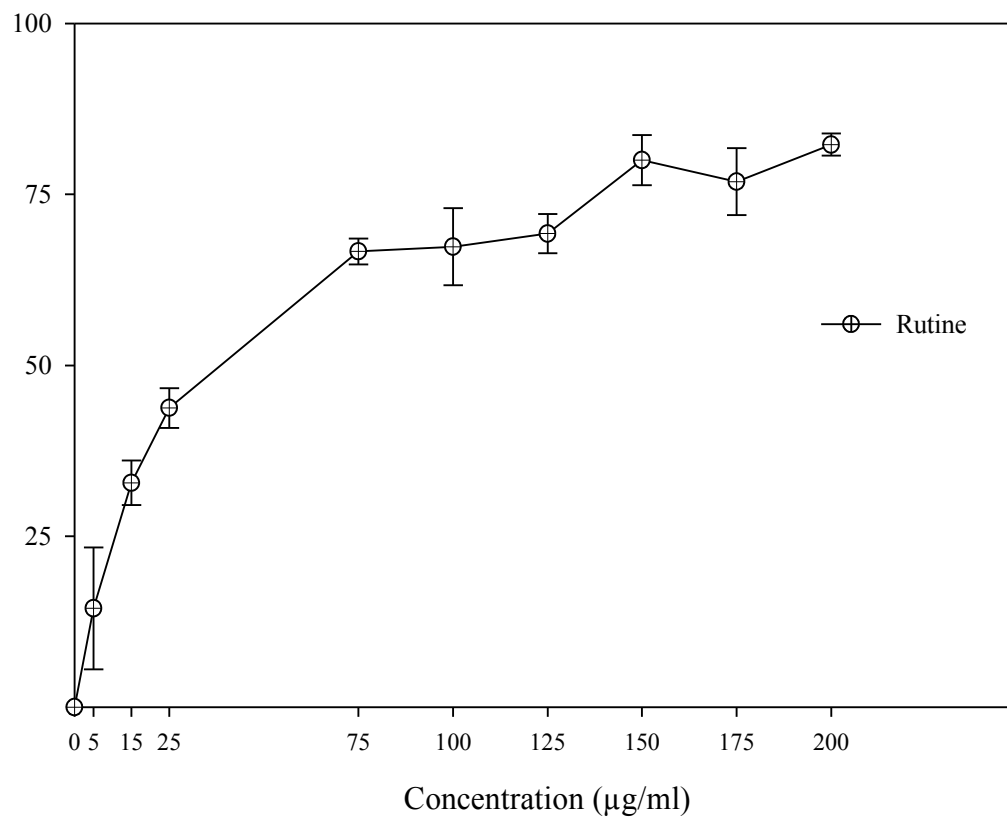
Annexe III : structure de la molécule de DPPH (Diallo, 2005)

DPPH

Annexe IV : structure de l'acide gallique (Kubola et Siriamornpun, 2008).

Annexe V: effet anti-péroxydation lipidique de la rutine en fonction de la concentration

- Les valeurs sont la moyenne de trois essais (n= 3) avec \pm l'écartype.

**Annexe VI:** tableau des propriétés des fractions obtenues avec le mélange, Toluène : Acétone.

Couleur observée à la lumière du jour	Couleur observée sous UV	<i>Cistus albidus</i> L	<i>Crataegus azarolus</i>	<i>Rhamnus alaternus</i>	<i>Lonicera implexa</i>	<i>Adiantum capillus-veneris</i>	Rf
Vert jaune	Bleu claire Vert	+	+	+	+	+	0,013 0.166
Vert foncé	Bleu	+	+	+	+	+	0.2
Vert très foncé	Bleu	+	+	+	+	-	0.33
Bleu- vert	Noir	+	+	+	+	+	0.416
Bleu foncé	Noir	-	+	+	+	+	0.45
Jaune	Vert	-	+	+	+	+	0.95

Annexe VII: tableau des propriétés des fractions obtenues avec le mélange Hexane : Ethyle acétate

Couleur observée à la lumière du jour	Couleur observée sous UV	<i>Cistus albidus</i> L	<i>Crataegus azarolus</i>	<i>Rhamnus alaternus</i>	<i>Lonicera implexa</i>	<i>Adiantum capillus-veneris</i>	Rfs
jaune	Vert	+	+	+	+	+	0.05
Vert	Bleu	+	+	-	-	+	0.167
Vert foncé	Bleu	+	+	+	+	-	0.21
Vert Claire	Bleu claire	+	+	+	+	+	0.23
Bleu	Noir	+	+	+	+	+	0.26
Bleu foncé	Noir	+	+	+	+	+	0.31
Orange	Gris claire	+	+	+	+	+	0.5

Annexe VIII: Exemples de formes combinées des acides hydroxycinnamiques (Macheix et al, 2005).

