

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 d'Ingénieur d'Etat en Biologie

Option : Génie Biologie

Thème

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'EFFET
ANTIOXYDANT ET ANTI HEMOLYSE OXYDATIVE DES
EXTRAITS BRUTS DE QUELQUES PLANTES
MEDICINALES LOCALES D'ALGERIE**

Présenté par :

M^{lle}. SAIDAT Asma

M^{lle}. CHELLAMA Khaoula

Encadré par :

M. BOUKEROUIS Djoudi

JUIN 2014

Dédicace

Je dédie ce travail à ceux qui me sont les plus chers au monde

- ❖ *A Allah le Tout miséricordieux*, le très miséricordieux, louange à Toi qui nous a inculqué la force nécessaire et le courage pour mener à bien ce travail. Nous te prions de nous aider davantage à percer dans la recherche du savoir.
- ❖ A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie *ma mère* qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.
- ❖ A *mon cher père* qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, ses conseils et ses encouragements.
- ❖ A ma très chère sœur *Khedidja*
- ❖ A toute la famille *SAIDAT* et *BOUREZG*
- ❖ A mes très chères amies *Khaoula e Bouchra*
- ❖ A mes amis et amies

Asma



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

- ❖ *A Allah le Tout miséricordieux, le très miséricordieux, louange à Toi qui nous a inculqué la force nécessaire et le courage pour mener à bien ce travail. Nous te prions de nous aider davantage à percer dans la recherche du savoir.*
- ❖ *A mon père et à ma mère, depuis mes premiers pas à l'école, vous ne vous êtes jamais laissé de me relater l'importance des études. Vous m'avez toujours incité à être assidue, excellente. Votre affection sans limite m'a accompagné tout au long de la réalisation de cette œuvre. Je ne pourrai jamais vous en remercier assez. Puisse ce travail vous combler de joie et d'espoir. Qu'Allah vous garde longtemps parmi nous.*
- ❖ *A mes sœurs et frères, vous avoir à mes côtés représente un bonheur pour moi. Soyez unis, endurants et patients, la réussite est au bout de l'effort. Puisse ce travail affermir davantage les liens qui nous unissent, **Yamina, Fadhila, Maria, Abderrahmane, Khaled et A Boubaker al Sadik***
 - ❖ *A mes nièces **FATIMA et RANIA***
 - ❖ *A toute la familles **CHELLAMA et BENSAADA***
 - ❖ *A ma très chère amie **Amel et Asma***
 - ❖ *A mes Amies, **Loubna, Sara et Amina.***



Khaoula

Remerciement

*Au Nom De Dieu Le Très Miséricordieux, Le Tout Miséricordieux
Satisfaction Et Salut De Dieu Sur Le Prophète Muhammad Ainsi que
Sa Noble Famille et ses Satisfaisants compagnons.*

*Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à notre promoteur
M. BOUKEROUIS Djoudi pour la confiance qu'il nous a témoignée
depuis le début et pour son soutien tout au long de la réalisation de ce
travail. Nous vous remercions encore et vous prions d'agréer Monsieur
l'expression de notre sincère reconnaissance.*

*Nous remercions aussi les personnes qui nous font l'honneur de
participer à notre jury de soutenance.*

*Nos remerciements s'adressent également à toutes les personnes qui ont
contribué à l'obtention de ce diplôme sans exception.*

*Nous pensons en particulier à M. GOUZI Hicham et à tous les
enseignants qui nous accompagnent durant ces cinq ans d'étude.*

*Nous remercions profondément M^{elle} Benjdaia K et M. chef service de
centre de transfusion de sang à l'hôpital AHMAIDA Ben Adjila pour
leur aide inestimable tout au long de la période de notre travail.*

Résumé

Dans le présent travail, nous avons tenté d'évaluer l'effet anti-radicalaire contre le DPPH, le pouvoir réducteur, en appliquant la méthode FRAP, et l'effet contre l'hémolyse oxydative induite par AAPH, des extraits phénoliques de cinq plantes médicinales locales d'Algérie. Les résultats obtenus montrent que les feuilles de *Cistus albidus* sont riches en phénols totaux ($227,90 \pm 21,97$ mg EAG/g), et expriment aussi le meilleur effet anti-DPPH et anti-hémolyse dont les valeurs des IC_{50} sont $7,21 \pm 1,24$ μ g/ml et $12,03 \pm 1,06$ μ g/ml respectivement. Cependant ces propriétés sont moins importantes comparativement aux résultats de la molécule standard (la rutine ; $IC_{50} = 2,34 \pm 0,56$ μ g/ml). De même, cette plante est la plus douée en pouvoir réducteur (513,15 Mg Eq Acide Ascorbique/ 1g). L'extrait de feuilles de *Crateagus azarolus* étant malgré, le plus riche en phénols totaux ($244,37 \pm 4,40$ mg EAG/g), il vient en deuxième lieu pour l'effet anti-DPPH ($IC_{50} = 25,06 \pm 0,15$ μ g/ml) et en quatrième position pour l'effet protecteur contre l'hémolyse ($IC_{50} = 65,14 \pm 5,15$ μ g/ml). Pour, l'extrait de feuilles de *Rhamnus alaternus* et *Lonicera implexa*, leur activité est proche contre le DPPH ($IC_{50} = 51,7 \pm 7,03$ et $53,23 \pm 5,24$ μ g/ml respectivement) alors que *Lonicera implexa* s'est montrée plus active contre l'hémolyse induite par l'AAPH ($IC_{50} = 46,17 \pm 4,74$ μ g/ml). Concernant, l'extrait d'*A. capillus-veneris* qui fait l'exception d'être la plus riche en flavonoïdes ($837,21 \pm 26,49$ μ g/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 : composé phénolique, activité antioxydant, hémolyse oxydative, DPPH, FRAP, AAPH, *plantes médicinales*.

Abstract

In this work, we have attempted to evaluate the anti-DPPH radical activity, reducing power, by implicating FRAP test, and the anti AAPH-induced hemolysis effect of phenolic extracts of five medicinal plants from Algeria. The results obtained show that the sheets of *Cistus albidus* are rich in total phenols (EAG $227.90 \pm 21, 97$ mg / g), and expressed as the lowest anti-DPPH and anti-hemolysis with IC_{50} values are $7.21 \pm 1, 24$ μ g / ml and $12, 03 \pm 1, 06$ μ g/ml respectively. However these properties are less important compared to the results of the standard molecule (rutin; $IC_{50} = 2.34 \pm 0, 56$ μ g/ml). Also, this plant is the most talented in reducing power (513.15 Mg Eq Ascorbic Acid / 1g). The leaf extract of *Crateagus azarolus* despite being the richest in total phenols ($244.37 \pm 4,40$ mg EAG / g), it comes in second place for the anti-DPPH effect ($IC_{50} = 25.06 \pm 0, 15$ μ g/ml) and fourth for the protective effect against hemolysis ($IC_{50} = 65.14 \pm 5, 15$ μ g/ml). For the leaf extract of *Lonicera implexa* and *Rhamnus alaternus*, their activity is close against the DPPH ($IC_{50} = 51.7 \pm 7, 03$ and $53.23 \pm 5, 24$ μ g / ml respectively), whereas *Lonicera implexa* was more active against hemolysis AAPH induced ($IC_{50} = 46.17 \pm 4, 74$ μ g/ml). On the extract of *A. capillus-veneris* which is the exception to be the richest in flavonoids ($837.21 \pm 26, 49$ μ g/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 in the end of this work, shows separation profiles with several fractions, showing the diversity of molecules synthesized by these plants.

Keywords: phenolic compounds, antioxidant activity, oxidative hemolysis, DPPH, FRAP, AAPH, *medicinal plant*

ملخص

يهدف هذا العمل الى تقييم النشاط المضادة للأكسدة ضد DPPH وارجاع الحديد باستخدام طريقة FRAP ايضا دراسة تأثير انحلال الدم التأكسدي الناجم عن الجذر AAPH باستخدام المستخلصات الفينولية من خمسة نباتات طبية جزائرية *Adiantum* و *Cistus albidus* ; *Crataegus azarolus* ; *Rhamnus alaternus* ; *Lonicera implexa capillus-veneris*, والتي تستخدم عادة لعلاج المشاكل الصحية المختلفة. تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن مستخلص أوراق *C albidus* هي الأغنى في مجموع الفينولات، معربا عن نسبة (EAG 227.90 ملغ / غ) . و تعبر عن احسن تأثير ضد DPPH وضد انحلال الدم نتائج $IC_{50} = 7,21 \mu g/ml$ و $12,03 \mu g/ml$ على التوالي ولكن هذه الخصائص هي أقل أهمية مقارنة مع نتائج جزيء الروتين $IC_{50} = 2,34 \mu g/ml$ ايضا، مستخلص هذه النبتة هي الأكثر قدرة على الحد من الارجاع (513.15 مغ / مل المعادلة لحمض الأسكوربيك/ غ مستخلص اوراق *Crataegus azarolus* على الرغم من كونها أغنى في مجموع الفينول (244.37 ملغ / غ EAG) ، ويأتي في المركز الثاني لتأثير مضاد ل DPPH $IC_{50} = 25,06 \mu g/ml$ و رابعا للتأثير الوقائي ضد انحلال الدم $IC_{50} = 65,14 \mu g/ml$. بالنسبة لمستخلص أوراق *Lonicera implexa* و *Rhamnus alaternus* ، نشاطهم متقارب ضد DPPH $23,53$ و $53,23$ على التوالي)، في حين ان *Lonicera implexa* أكثر نشاطا ضد انحلال الدم الذي يسببه (AAPH $IC_{50} = 46,17 \mu g/ml$) . في حين ان مستخلص *A capillus* سجلت الاستثناء لتكون أغنى في فلافونيدات (837.21 ملغ / مل) بين النباتات الخمسة ، و الأضعف من حيث المحتوى من إجمالي الفينولات، وأيضاً أقل فعالية ضد جميع الأنشطة. في نهاية هذا العمل استعملنا كروماتوغرافيا CCM ، والتي بينت هجرة المركبات ، دلالة على تنوع الجزيئات في مختلف النباتات

الكلمات الرئيسية: مركبات الفينولية، والنشاط المضادة للأكسدة، والنشاط المضادة للانحلال الدم التأكسدي ، DPPH ، AAPH ، FRAP ، اعشاب طبية



Sommaire

Sommaire

	Pages
Introduction	1
Partie I : Etude bibliographique	
Chapitre I : La phytothérapie et les plantes médicinales	
I.1.Aperçu sur l’histoire de la phytothérapie et les plantes médicinales	3
I.2.La phytothérapie	4
I.2.1.Différents types de la Phytothérapie	4
I.2.2.Les avantages de la phytothérapie	5
I.3.Les plantes médicinales	5
I.4.Médicaments traditionnels à base de plantes et santé humaine	5
I.5.Formes d’utilisation des plants médicinales	6
I.6.Pathologie et les plantes médicinales	7
I.7.Métabolites secondaires des plantes dans la découverte de médicaments	8
I.8.Exemples de médicaments à base des plantes	8
Chapitre II : les composés phénoliques et leurs activités biologiques	
II.1 Généralité	10
II.1.Les métabolites synthétisés par les plantes	10
II.1.2.Métabolites primaires	10
II.1.3.Métabolites secondaires	10
II.2.Les polyphénols	11
II.3.Classification des composés phénoliques	11
II.3.1.Phénols simples et les acides phénoliques	12
II.3.2.Les flavonoïdes	13
II.3.3.Les tannins	15
II.4.Activités biologiques des polyphénols.....	15
II.4.1.Activité contre le cancer	16

II.4.2. Activité anti-inflammatoire	17
II.4.3. Effets cardiovasculaires	17
II.4.4. Activité contre le stress oxydatif	18
A. Stress oxydatif	18
B. Effet de stress oxydatif.....	19
C. Origine de stress oxydatif	19
D. Source de ROS	19
II.4.5. Activité antioxydante des polyphénols	20
A) Propriétés anti radicalaires	20
B) Chélation des ions métalliques	21

Partie II : Etude expérimental

Chapitre III : matériel et méthodes

III.1. Le matériel végétal	22
III.1.1 <i>Cystus albidus</i>	22
III.1.2 <i>Crataegus azarolus</i>	22
III.1.3 <i>Rhamnus alaternus</i>	23
III.1.4 <i>Lonicera implexa</i>	23
III.1.5 <i>Adiantum capillus veneris</i>	24
III.2. La récolte et séchage du matériel végétal	24
III.3. Broyage et extraction	24
III.4. Dosage des composés phénoliques.....	25
III.4.1. Dosage des phénols totaux	25
III.4.1.1. Principe de la méthode	25
III.4.1.2 Protocole expérimental	25
III.4.2. Dosage des flavonoïdes	26
III.4.2.1. Principe de la méthode	26
III.4.2.2. Protocole expérimental	26
III.5. Evaluation de l'activité antioxydant	26
III.5.1. Test anti-DPPH.....	26
III.5.1.1. Principe de la méthode	26
III.5.1.2. Protocole expérimental	27

III.5.2. Pouvoir réducteur par la méthode de FRAP	27
III.5.2.1.Principe de la méthode	27
III.5.2.2.Protocol expérimental.....	27
III.6. Effet anti hémolytique	28
III.6.1.Protocol expérimental.....	28
III.6.1.1.Préparation des globules rouges	28
III.6.1.2.Testes d'hémolyse oxydative induite par AAPH	29
III.7.Chromatographie sur couche mince	29
III.7.1.Protocol expérimental.....	30
III.8.Outil informatique	30

Chapitre IV : résultat et discussion

IV.1.Rendement de l'extraction	31
IV.2.Résultats de dosage des composés phénoliques.....	32
IV.2.1.Teneur en phénols totaux	32
IV.2.2.Teneur en flavonoïdes	34
IV.3.Evaluation de l'activité antioxydante	35
IV.3.1.Test anti-DPPH	35
IV.3.1.1.Résultats de l'activité anti-DPPH des extraits à 100 µg/ml	35
IV.3.1.2.Résultats de l'activité anti-DPPH en fonction de la concentration des extraits	36
A. Résultats de l'activité anti-DPPH en fonction de la concentration de <i>C.albidus</i>	37
B. Résultats de l'activité anti-DPPH en fonction de la concentration de <i>C. azarolus</i> , <i>R. alaternus</i> , <i>L.implexa</i>	38
C. Résultats de l'activité anti-DPPH en fonction de la concentration d' <i>A. capillus</i>	39
IV.3.2.Réduction du fer : FRAP (Ferric reducing antioxydant power)	40
IV.4.Résultats de l'activité des plantes contre l'hémolyse oxydative induite par l'AAPH. 42	
IV.4.1.Preuve d'hémolyse oxydative induite par AAPH	42
IV.4.2.Effet anti-hémolyse des extraits des plantes	44
A. Effet anti-hémolyse oxydative de <i>C. albidus</i>	45
B. Effet anti-hémolytique de <i>C. azarolus</i>	46
C. Effet anti-hémolytique de <i>R. alaternus</i>	47
D. Effet anti-hémolytique de <i>L. implexa</i>	48
E. Effet anti-hémolytique d' <i>A. Capillus</i>	49
IV.5. Résultats de Chromatographie sur couche mince (CCM)	50

Conclusion	52
Références bibliographique	54
Annexe	

Liste des abréviations

μ: micro.

Abs: absorbance.

AAPH : 2,2'-azobis (2-amidinopropane)

ADN / DNA: acide désoxynucléique/desoxynucleic acide.

AlCl₃: trichlorure d'aluminium.

CCM: Chromatographie sur Couche Mince.

DPPH: 1,1-diphényle-2-dipicrylhydrazyl.

EAG: équivalent acide gallique.

ER: équivalent rutine.

ERO: espèces réactives de l'oxygène.

ERON : espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.

FRAP: Ferric Reducing/Antioxidant Power.

GRs: globules rouges.

H₂O₂: peroxyde d'hydrogène.

HHDP: acide hexahydroxydiphénique.

HOCl: acide hypochlorure.

IC₅₀: Concentration à 50% d'inhibition.

LH : lipide polyinsature.

LDL: Low Density Lipoprotein.

mn : minute.

MVA: voie de mévalonate.

Na₂CO₃: bicarbonates de sodium.

NO: oxyde nitrique.

O₂⁻: anion superoxyde.

•OH: radical hydroxyle.

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

ONOO⁻ : Peroxynitrite.

ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity.

PBS : phosphate buffer saline (solution tampon phosphate saline).

RCOO•: le peroxyde.

R_f: rapport frontal.

RO•, R•, R-S•: radicaux organiques.

s: seconde.

SOD: Superoxyde Dismutase.

TEAC: Trolox Equivalent Antioxydant Capacity.

TLC: Thin Layer Chromatography.

UV: Ultraviolet.

Liste des figures

Figure 1: exemples de médicaments dont les molécules d'origine sont extraites à partir de plantes.....	8
Figure 2: classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe	12
Figure 3 : exemple de quelques acides phénols de la série benzoïque (A) et de la série cinnamique (B)	13
Figure 4: structure de base des flavonoïdes	14
Figure 5 : structures des squelettes de base des flavonoïdes	14
Figure 6: Effets biologiques des polyphénols	16
Figure 7: espèces réactives de l'oxygène(ROS) induite les dommages oxydatifs	18
Figure 8: les sources d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) endogène et exogène	20
Figure 9: piégeage des ROS (R·) par les flavonoïdes	21
Figure10: sites de chélation des ions métalliques (Men+) par les flavonoïdes	21
Figure11 : photo de <i>Cistus albidus</i>	22
Figure12 : photo de <i>Crataegus azarolus</i>	22
Figure13 : photo de <i>Rhamnus alaternus</i>	23
Figure14: photo de <i>Lonicera implexa</i>	23
Figure15: photo d' <i>Adiantum capillus veneris</i>	24
Figure16: schéma (a) représentatif d'une chromatographie sur couche mince et (b) le développement chromatographique d'une plaque.....	30
Figure17: courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.....	32
Figure18: courbe d'étalonnage réalisée avec la rutine pour le dosage des flavonoïdes	34
Figure19: Histogramme représentant l'activité anti-DPPH des extraits et la molécule standard à 100 µg/ml.....	36
Figure20: Effet anti-DPPH en fonction des concentrations d'extraits de feuille de <i>C.albidus</i>	37
Figure21: Effet anti-DPPH en fonction des concentrations des extraits des feuilles de <i>C. azarolus</i> , <i>R. alaternus</i> , <i>L. implexa</i>	38
Figure22: effet anti-DPPH en fonction des concentrations d'extraits de feuille d' <i>A.capillus</i>	39
Figure23: courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide ascorbique.....	40
Figure24: histogramme représentant l'activité du pouvoir réducteur des extraits	41
Figure25: effet d'hémolyse oxydative sur les hématies induite par AAPH et absence d'effet des extraits des plantes sur le phénomène d'hémolyse.....	43
Figure26: effet protecteur de l'extrait de <i>C. albidus</i> contre l'hémolyse induite par AAPH.	45
Figure27: effet protecteur de l'extrait de <i>C. azarolus</i> contre l'hémolyse induite par AAPH.	46
Figure28: effet protecteur de l'extrait de <i>R. alaternus</i> contre l'hémolyse induite par AAPH.	47
Figure29: effet protecteur de l'extrait de <i>L. implexa</i> contre l'hémolyse induite par AAPH.	48
Figure30: effet protecteur de l'extrait d' <i>A.Capillus</i> contre l'hémolyse induite par AAPH.....	49
Figure 31: photo des profils chromatographiques avec le mélange, Hexane : Ethyle acétate (9 :1), des extraits des plantes observés à la lumière du jour.	51
Figure 32 : photo des profils chromatographiques, avec le mélange Toluène : Acétone (9 :1), des extraits des plantes observés à la lumière du jour.	51

Liste de tableaux

Tableau I : source, action et utilisation de médicament d'origine végétale.	9
Tableau II: taux d'extraction des différentes plantes étudiées.	31
Tableau III: teneur en phénols totaux des extraits des plantes.	33
Tableau IV : teneur en flavonoïdes des extraits éthanoliques des plantes.	34
Tableau V: Résultat du test Antioxydant exprimant la concentration efficace 50% en mg/ml	39
Tableau IV : La concentration d'inhibition de l'effet hémolyse oxydative à 50%.....	66



Introduction

Avec le temps, l'homme a conçu que l'utilisation des médicaments synthétiques peuvent provoquer beaucoup d'effets indésirables sur l'organisme humain. C'est pour cela qu'actuellement plusieurs projets de recherches ont été lancés pour remplacer le traitement à base des médicaments de synthèse par des traitements avec des molécules bioactives d'origine végétale.

D'autre part, le traitement par les plantes est reconnu pour sa facilité d'utilisation, son efficacité ainsi que ses bienfaits incontestables. Et par conséquent, les chercheurs se sont orientés vers l'investigation des molécules naturelles biologiquement actives. En effet, le monde végétal constitue la source majeure de médicaments, grâce à leur richesse en produits dits du métabolisme secondaire.

Maintenant, c'est toute la communauté scientifique qui s'accorde à dire que le domaine de substances naturelles a connu une grande mutation vue les bénéfices qui peuvent amener au domaine de la santé, comme il est reconnu que les plantes sont une source inépuisable de substances qui procurent des propriétés curatives appréciables (Mouchid *et al.*, 2004).

En Algérie, les plantes médicinales et les remèdes n'ont jamais été totalement abandonnés et les gens n'ont pas cessé de faire appel à la médecine traditionnelle, ce qui a conduit à maintenir une tradition thérapeutique vivante malgré le développement spectaculaire de la médecine moderne.

Dans cette optique, cette étude est consacrée pour faire de la lumière sur quelques plantes médicinales poussant en Algérie en étudiant leurs propriétés biologiques liées à leurs composés phénoliques, les flavonoïdes, ainsi que leur activité antioxydante.

Pour atteindre ces objectifs, le présent travail est réparti en quatre parties, il a été convenu de commencer par une synthèse bibliographique subdivisée en deux chapitres : le premier chapitre porte sur un aperçu global sur les plantes médicinales et leur exploitation actuelle ; dans le deuxième chapitre nous nous sommes intéressés aux composés phénoliques et leurs activités biologiques.

La deuxième partie traite la procédure expérimentale menée où les détails des manipulations sont présentées : extraction, quantification des composés phénoliques ainsi que l'activité anti-radicalaire sur DPPH, le pouvoir réducteur en utilisant la méthode de FRAP et l'activité anti hémolyse oxydative induite par AAPH sur des érythrocytes de l'humain, d'autre part, une analyse chromatographique, par CCM, a été appliquée pour avoir un aspect qualitatif sur les extraits des plantes.

La troisième partie du mémoire est consacrée à la présentation de l'ensemble des résultats obtenus et aux discussions qui en découlent.

En fin, on termine, ce travail, par une conclusion générale et perspective de cette étude.



*Chapitre I : LA PHYTOTHERAPIE ET LES PLANTES
MEDICINALES*



I.1. Aperçu sur l'histoire de la phytothérapie et les plantes médicinales

L'histoire de la phytothérapie est liée à celle de l'humanité. En effet, dans toutes les cultures les hommes ont toujours compté sur les valeurs curatives des plantes pour se soigner et se guérir. Toutes les cultures l'ont utilisé, à un moment de leur histoire, comme principal mode de traitement. La phytothérapie ou médecine par les plantes est apparue très tôt dans l'histoire des hommes. A l'origine, il est vraisemblable qu'elle ait pris naissance en Inde. La connaissance médicale se répandit ensuite en Chine et au Moyen Orient. On a ainsi retrouvé la trace d'un recueil consacré à ces premiers remèdes naturels par un empereur chinois au XXIème siècle av. J.-C (Lorrain, 2013).

Depuis la nuit des temps, les hommes apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours à leurs propriétés curatives. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Si certaines pratiques médicales paraissent étranges et relèvent de la magie, d'autres au contraire semblent plus fondées, plus efficaces. Pourtant, toutes ont pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes (Iserin *et al.*, 2001).

La phytothérapie a traversé les âges pour aujourd'hui pour avoir une réelle place dans le monde de la médecine. Dans son livre, le Docteur Eric Lorrain explique que « La phytothérapie actuelle est bien loin de la tisanothérapie de nos grands-mères.

Pendant longtemps, les plantes ont été mises à toutes les sauces : tisanes, infusions, poudres de plantes indéterminées ou compléments alimentaires au petit bonheur des actifs végétaux et des nutriments... ». La phytothérapie moderne utilise seulement les plantes médicinales dont les effets sont fondés sur des preuves scientifiques (Lorrain, 2013).

La nature est pleine de ressources aux vertus bénéfiques pour l'homme. En plus de son alimentation, il y trouve des substances actives qui procurent un bienfait à son organisme. La médecine traditionnelle et plus particulièrement les traitements à base de plantes étaient bien développés en Algérie, mais le recours à la médecine conventionnelle est à l'origine d'un délaissement de ces pratiques ancestrales qui risquent de tomber dans l'oubli (Rebbas *et al.*, 2013).

I.2. La phytothérapie

La phytothérapie désigne la médecine basée sur les extraits de plantes et les principes actifs naturels. On peut la définir en deux types de pratiques :

Une pratique traditionnelle, parfois très ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Selon l'OMS, cette phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle et encore massivement employée dans certains pays dont les pays en voie de développement. C'est le plus souvent une médecine non conventionnelle du fait de l'absence d'étude clinique.

Une pratique basée sur les avancées scientifiques qui recherche des extraits actifs des plantes. Les extraits actifs identifiés sont standardisés. Cette pratique conduit aux phytomédicaments et selon la réglementation en vigueur dans le pays, la circulation des phytomédicaments est soumise à l'autorisation de mise sur le marché (AMM). On parle alors de pharmacognosie ou de biologie pharmaceutique (Sadok, 2009).

I.2.1. Différents types de la Phytothérapie

•**Aromathérapie** : est une thérapeutique qui utilise les essences des plantes, ou huiles essentielles, substances aromatiques secrétées par de nombreuses familles de plantes, ces huiles sont des produits complexes à utiliser souvent à travers la peau.

•**La gémothérapie**: se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les radicelles.

•**L'herboristerie** : correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. L'herboristerie se sert de la plante fraîche ou séchée; elle utilise soit la plante entière, soit une partie de celle-ci (écorce, fruits, fleurs). La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération. Ces préparations existent aussi sous forme plus moderne de gélule de poudre de plante sèche que le sujet avale.

•**La phytothérapie pharmaceutique** : utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présentés sous forme de sirop, de gouttes, de gélules, de lyophilisats (Strang, 2006).

I.2.2. Les avantages de la phytothérapie

Toutefois, malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps, à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria.

Aujourd'hui, les traitements à base des 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.

La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, est souvent associée aux traitements classiques (Iserin *et al.*, 2001).

I.3. Les plantes médicinales

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capable de prévenir, soigner et soulager divers maux ou guérir des malades (Schauenberg et Paris, 2005)

Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (Farnsworth *et al.*, 1986). Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains.

I.4. Médicaments traditionnels à base de plantes et santé humaine

Depuis très longtemps, les végétaux servent à nous nourrir et sont à l'origine de nombreux médicaments. Comme le précise le Docteur Lorrain « Chaque plante renferme entre 200 et 250 familles de principes actifs, soit des dizaines voire des centaines de milliers de molécules. Une multitude d'associations est donc possible, et toutes ne sont pas encore exploitées. ». Les Extraits de Plantes fraîches Standardisés (EPS) ont donc naturellement pris leur place dans la boîte à outils des médecins (Lorrain, 2013).

Les médicaments à base de plantes, élément essentiel des soins de santé partout dans le monde. La reconnaissance de leur valeur clinique, pharmaceutique et économique continue de croître, bien que cela varie fortement selon les pays (Jayasuriya, 1990).

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés

directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs.

En vue d'assurer la conservation et la disponibilité de ces plantes pour l'avenir, la réglementation de leur exploitation et de leur exportation est essentielle, tout comme la coopération et la coordination au niveau international (Jayasuriya, 1990).

Malgré l'utilisation de médicaments à base de plantes pendant de nombreux siècles, seul un nombre relativement petit d'espèces de plantes ont été étudiées pour d'éventuelles applications médicales. Les données relatives à l'innocuité et à l'efficacité sont disponibles pour un nombre encore plus restreint de plantes, leurs extraits et principes actifs et les préparations qui les contiennent (Heide, 1991).

Près de 80% de la population mondiale dépend encore des médicaments à base de plantes pour leurs soins de santé. La thérapie à base de plantes est marquée en raison de son faible coût, la disponibilité facile. A l'heure actuelle, les industries à base de plantes sont à la hausse au niveau international, mais malheureusement, en raison de la croissance incontrôlée de la population et non planifiées, utilisation excessive et détournements d'espèces végétales en voie de disparition en font, donc un sujet menacé. Pour cela, il est nécessaire de renforcer nos connaissances ethnobotaniques et de créer l'attention pour la culture de plantes médicinales utiles à plus grande échelle et assurer une meilleure utilisation (Tiwari, 2008).

Environ 25% des médicaments prescrits dans le monde proviennent de plantes, 121 de ces composés actifs étant en cours d'utilisation. Des 252 médicaments considérés comme fondamentaux et essentiels par l'Organisation mondiale de la santé (OMS), 11% sont exclusivement d'origine végétale et un nombre important sont les drogues de synthèse obtenus à partir de précurseurs naturels (Shu, 1998).

I.5. Formes d'utilisation des plantes médicinales

En ce qui concerne les médicaments d'origine végétale, il est important de garder à l'esprit certaines distinctions conceptuelles. Les plantes peuvent être utilisées en tant que ressources thérapeutiques de plusieurs manières. Ils peuvent être utilisés comme des tisanes ou autres remèdes faits maison, quand ils sont considérés comme des plantes médicinales.

Elles peuvent être utilisées sous forme d'extraits bruts ou des fractions enrichies "standard" dans les préparations pharmaceutiques, tels que des teintures, des extraits fluides, des poudres, des pilules et des capsules, quand ils sont considérés comme des préparations phytopharmaceutiques, des médicaments à base de plantes (Rates, 2001).

I.6. Pathologie et les plantes médicinales

Un médicament est un produit préparé selon des procédures juridiques et techniques qui sont utilisées pour le diagnostic, la prévention et le traitement de la maladie et a été caractérisé scientifiquement en termes de son efficacité, sécurité et la qualité (OMS, 1991).

L'OMS considère la phytothérapie dans ses programmes de santé et propose des procédures de base pour la validation de médicaments d'origine végétale dans les pays en développement (OMS, 1991 ; Vulto et Smet, 1998).

La recherche de médicaments actifs contre les tumeurs, les virus et les problèmes cardiovasculaires et les maladies tropicales est une priorité. Le plus grands champs de recherche, telles que défini par le nombre de publications, montrent que des composés d'origine végétale bioactifs dans les dernier quelques années, sont des médicaments anti-tumoraux, des antibiotiques, des médicaments actifs contre les maladies tropicales, médicaments contraceptifs, anti-inflammatoires médicaments, les immuno-modulateur, protecteurs rénaux et médicaments à usage psychiatrique (Hamburger et Hostettman, 1991).

Le NCI (National Cancer Institute, USA) a testé plus de 50.000 échantillons de plantes pour l'activité anti- VIH et 33000 échantillons pour l'activité anti -tumorale. En 1993, le programme international de coopération pour la biodiversité (IPCB) a été lancé afin de promouvoir les produits naturels en Amérique latine et en Afrique, reliant les universités, les industries et les gouvernements dans un programme multidisciplinaire pour le développement durable et la préservation de l'environnement (Rouhi, 1997). Les grandes sociétés pharmaceutiques, comme Merck, CIBA, Glaxo, Boehringer et Syntex, ont maintenant des services spécifiques dédiés à l'étude de nouveaux médicaments à partir de sources naturelles (Reid *et al.*, 1993).

Cependant, l'utilisation potentielle des plantes supérieures comme une source de nouveaux médicaments est encore mal exploré. Parmi les espèces végétales estimées 250,000-500,000, seul un faible pourcentage a été étudié en phytochimie et même un petit pourcentage a été correctement étudié en fonction de leurs propriétés pharmacologiques ; dans la plupart des cas, seul criblage pharmacologique ou les études préliminaires ont été réalisées.

Entre les années 1957 et 1981, le NCI projette autour de 20 000 espèces de plantes originaires d'Amérique latine et d'Asie ont une activité anti-tumorale, mais même ceux-ci n'ont pas été examinés pour d'autres activités pharmacologiques (Hamburger et Hostettman, 1991).

I.7. Métabolites secondaires des plantes dans la découverte de médicaments

Bien que les produits naturels, en particulier des métabolites secondaires, ont formé la base de médicaments et de la présence de ces composés dans la biochimie de plantes est très souvent difficile à justifier. Il a été suggéré que ces composés ont pu être synthétisés par la plante dans le cadre du système de défense de la plante, par exemple les plantes sont connues pour produire des phytoalexines, en réponse à l'attaque par les bactéries et les champignons.

Quelles que soient les raisons de la présence de ces composés dans la nature, ils fournissent des ressources inestimables qui ont été utilisées pour trouver de nouvelles molécules pharmaceutiques, la figure ci-dessous montre quel que exemples et donne une indication de l'élaboration de nouveaux médicaments à partir de plantes. (Fakim, 2006).

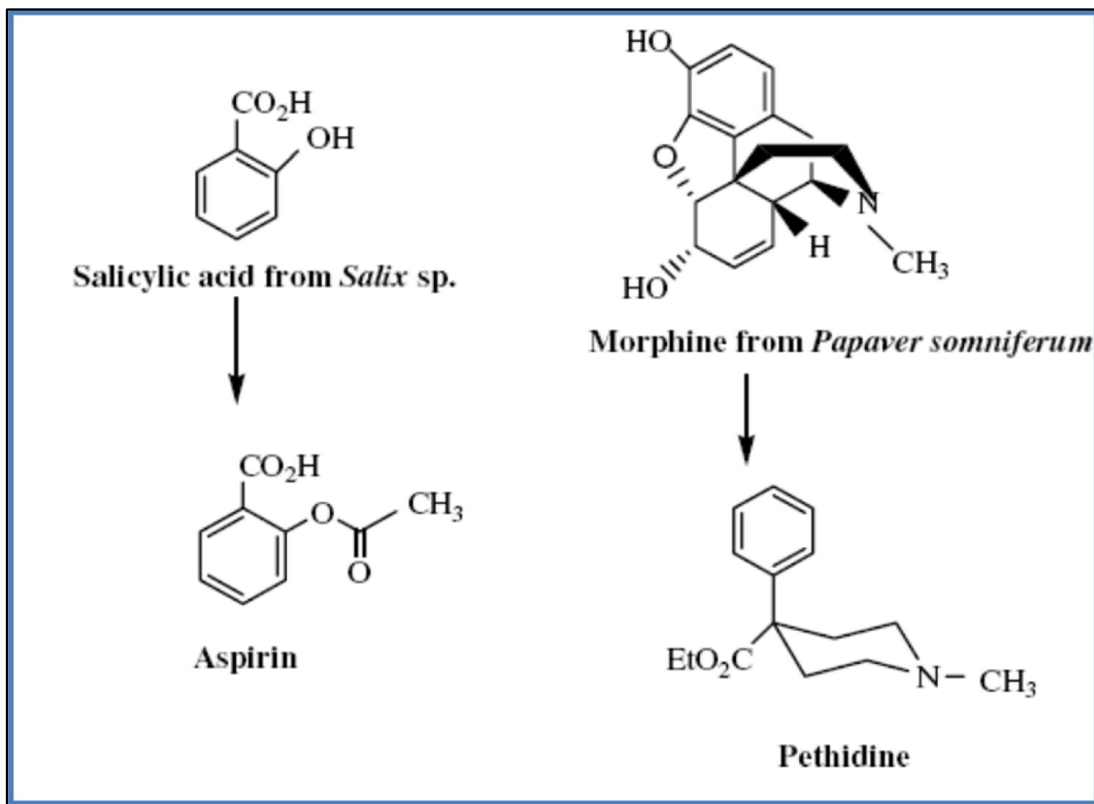


Figure 1 : exemples de médicaments dont les molécules d'origine sont extraites à partir de plantes

I.8. Exemples de médicaments à base des plantes

Des exemples de médicaments obtenus à partir de plantes sont Digoxine de *Digitalis spp*, la quinine et Quinidine de *Quinquina spp*, Vincristine et la Vinblastine de *Catharanthus roseus*, Atropine de *Atropa belladone* et la Morphine et de la Codéine à partir de *Papaver somniferum*. Il est estimé que 60% des médicaments anti-tumoraux et anti-infectieux déjà sur le marché ou à l'essai clinique sont d'origine naturelle (Shu, 1998).

En outre, des composés tels que la muscarine, physostigmine, les cannabinoïdes, la yohimbine, la forskoline, la colchicine et les esters de phorbol, tous obtenus à partir des plantes médicinales, sont importants et utilisés en pharmacologie, et dans des études biochimiques (Williamson *et al.*, 1996).

Tableau I : source, action et utilisation de médicament d'origine végétale (Norman *et al.*, 1986).

Substance	Action et utilisation clinique	Plant d'origine	Utilisation traditionnelle
Aescine	Anti-inflammatoire	<i>Aesculus hippocastanum L</i>	Inflammations
Aesculétine	Anti-dysentérique	<i>Frascinus rhynchophulla Hance</i>	Dysenteries
Agrimophol	Anthelminthique	<i>Agrimonia eupatoria L</i>	Anthelminthique
Ajmalicine	Troubles circulatoires	<i>Rauwolfia serpentina L</i> <i>Bentha esc kusz</i>	Tranquillisant
Allyle isothiocyanate	Révulsif	<i>Brassica nigra L.koch</i>	Révulsif
Andrographolide	Dysenterie bacillaire	<i>Andrographis paniculata Nees</i>	Dysenterie
Cocaine	Anesthésique local	<i>Erythroxyln coca Lamk</i>	Anorexigène stimulant
Berbérine	Dysenterie bacillaire	<i>Berberis vulgaris L</i>	Trouble gastrique
Caféine	Simulant du SNC	<i>Camellia sinensis L</i> <i>kuntze</i>	Stimulant
Adoniside	Cardiotonique	<i>Adonis vernalis L</i>	Maladies cardiaques



*Chapitre II : LES COMPOSE PHENOLIQUES ET LEURS
ACTIVITES BIOLOGIQUES*



II.1.Généralité

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse de principes actifs les plus divers. Ce processus métabolique est lié aux conditions mêmes de vie de la plante : la plante doit faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit : prédateurs, microorganismes pathogènes, etc. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre (Kansole, 2009).

II .2.Les métabolites synthétisés par les plantes

Les plantes synthétisent une large gamme de substances, qui ont été subdivisées en deux groupes : les métabolites primaires et les métabolites secondaires dont une grande partie de ce chapitre sont consacrés.

II .2.1.Métabolites primaires

Ces métabolites tels que les acides aminés, les glucides, les lipides, les protéines et les acides nucléiques sont tous essentiels pour la croissance et la survie de la plante et représentent environ 90 % de la matière biologique rencontrée au niveau de la plante (Reynertson, 2005).

II.2.2 Métabolites secondaires

Les composés secondaires des plantes sont réputés depuis l'antiquité pour leurs propriétés pharmacologiques et depuis quelques décennies l'homme s'intéresse également à leurs autres activités biologiques (Najjaa *et al.*, 2010).

Les métabolites secondaires sont souvent considérés comme n'étant pas essentiels à la vie de la plante. Ils sont biosynthétisés à partir de métabolites primaires et jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème.

Ces composés sont très nombreux et variés, et certains sont largement répandus, comme les alcaloïdes, les terpènes et les tanins, tandis que d'autres ont une répartition plus restreinte comme les composés soufrés.

Ces substances ont la particularité d'être présentes à faibles concentrations dans les plantes, elles peuvent jouer différents rôles permettant à la plante de se défendre contre les insectes, les bactéries ou les champignons (Reynertson, 2005).

II .3.Les polyphénols

Les polyphénols constituent le groupe de métabolites le plus large et le plus répandu du règne végétal et font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale. Plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues, allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

Ils sont divisés en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Tapiero *et al.*, 2002).

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes. Ils sont synthétisés à partir de deux voies biosynthétiques :

- celle de l'acide shikimique, qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples ;
- celle issue de l'acétate, qui conduit à des poly β -coesters (polyacétates) de longueur variable menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les dihydroxy-1,8 anthraquinones ou les naphtoquinones (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

II .4.Classification des composés phénoliques

La structure chimique est identique à tous les polyphénols : un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des éléments qui les relient.

Les polyphénols sont répartis en plusieurs classes :

- Les phénols simples (C6): un seul noyau phénol comme pour les acides phénoliques (C6-C1).
- Les flavonoïdes (C6-C3-C6): 2 noyaux aromatiques reliés par un hétérocycle oxygéné.
- Les tanins hydrolysable et non-hydrolysable.
- Les stilbènes (C6-C2-C6).
- Les lignanes, les lignines et les coumestanes : 2 unités de phénylpropane.

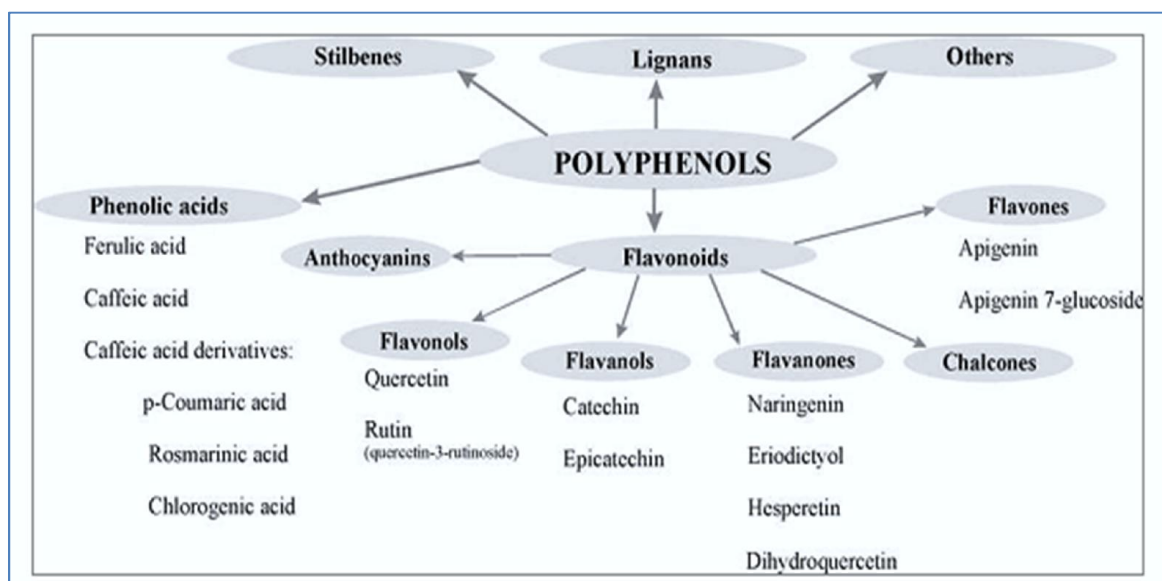


Figure 2 : Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe (Boros et al., 2010)

II.4.1. Phénols simples et les acides phénoliques

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique (Belyagoubi, 2011).

Les acides phénols, ou acides phénoliques, ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols. Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature. Ils présentent des propriétés biologiques intéressantes : antiseptique urinaire, anti-inflammatoires, anti radicalaires, cholagogues, hépatoprotecteurs, immunostimulants (Bruneton, 1999). On distingue deux catégories :

- Les dérivés de l'acide benzoïque (constitués d'un squelette à sept carbones).
- Les dérivés d'esters hydroxycinnamiques (constitués d'une structure de type C6-C3). (Kanoun, 2011).

Les acides phénols dérivés de l'acide benzoïque sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinée à l'état d'esters ou d'hétérosides (Haslam, 1994).

Les acides benzoïques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbones. Ils sont principalement représentés par les acides vanilliques, galliques, syringiques, gentisiques, salicyliques, protocatéchiques, p-hydroxybenzoïques et o-hydroxybenzoïques.

Les acides protocatéchiques et galliques ont probablement une origine et des fonctions différentes dans la plante. Le premier est très largement répandu, le second est plus rare, on le rencontre dans la nature surtout sous forme de dimère (Ribereau, 1968).

Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique sont souvent estérifiés. Ces acides possèdent une structure du type C6-C3 (Ribereau, 1968). Les plus courants sont (acides p-coumarique, caféique, férulique, sinapique) ont une distribution très large ; les autres (acides o-coumarique, o-férulique) sont peu fréquents (Bruneton, 1993).

Les acides cinnamiques et caféique sont des représentants communs du groupe de dérivés phénylpropaniques qui diffère par son degré d'hydroxylation et de méthylation (Cowan, 1999).

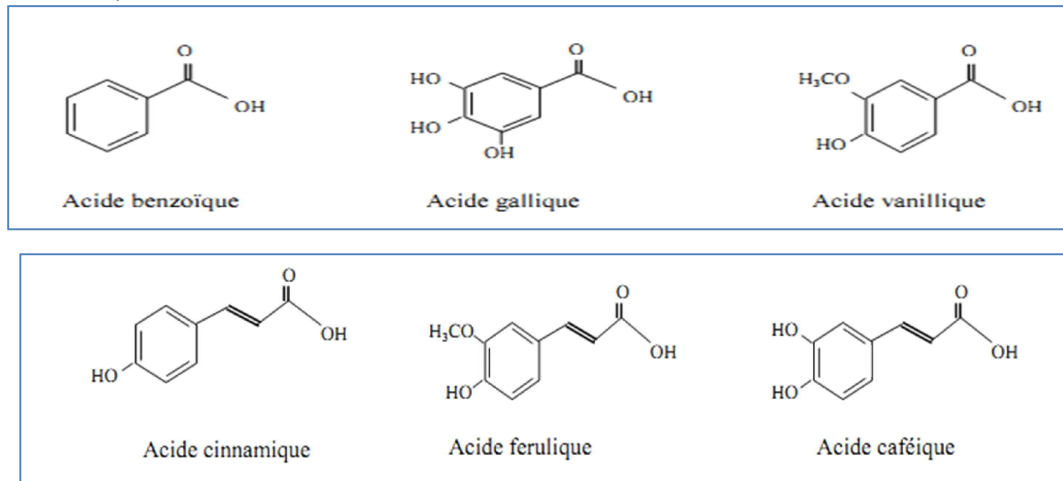


Figure 3: Exemple de quelques acides phénols de la série benzoïque (A) et de la série cinnamique (B) (Bruneton 2009, Pawlowska *et al.*, 2006).

II .4.2.Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux. Les flavonoïdes sont rencontrés dans les fruits et les légumes. Des boissons telles que le vin rouge, le thé, le café et la bière en contiennent également des quantités importantes. Les flavonoïdes sont retrouvés également dans plusieurs plantes médicinales. Des remèdes à base de plantes renfermant des flavonoïdes ont été utilisés en médecine traditionnelle par le monde (Ghedira, 2005).

Les flavonoïdes ont une variété d'effets biologiques dans de nombreux systèmes cellulaires de mammifères, in vitro comme ainsi que in vivo (Peter *et al.*, 1996) Les composés flavoniques ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane (Yao *et al.*, 2004).

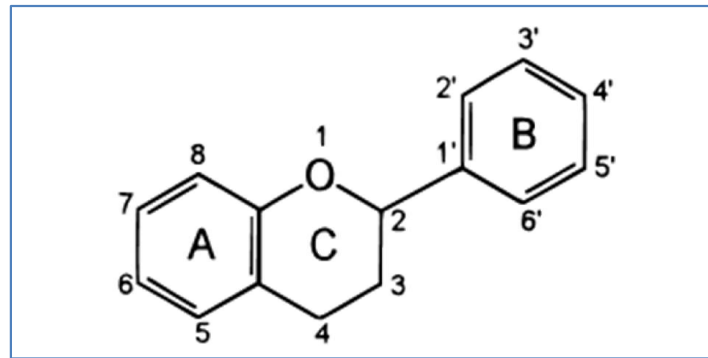


Figure 4: structure de base des flavonoïdes (Pietta, 2000).

En basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines ; flavonoles ; isoflavonoles ; flavones ; isoflavones ; flavanes ; isoflavanes ; flavanols ; isoflavanols ; flavanones ; isoflavanones ; aurones (Havsteen, 2002 ; Edenharder et Grünhage, 2003).

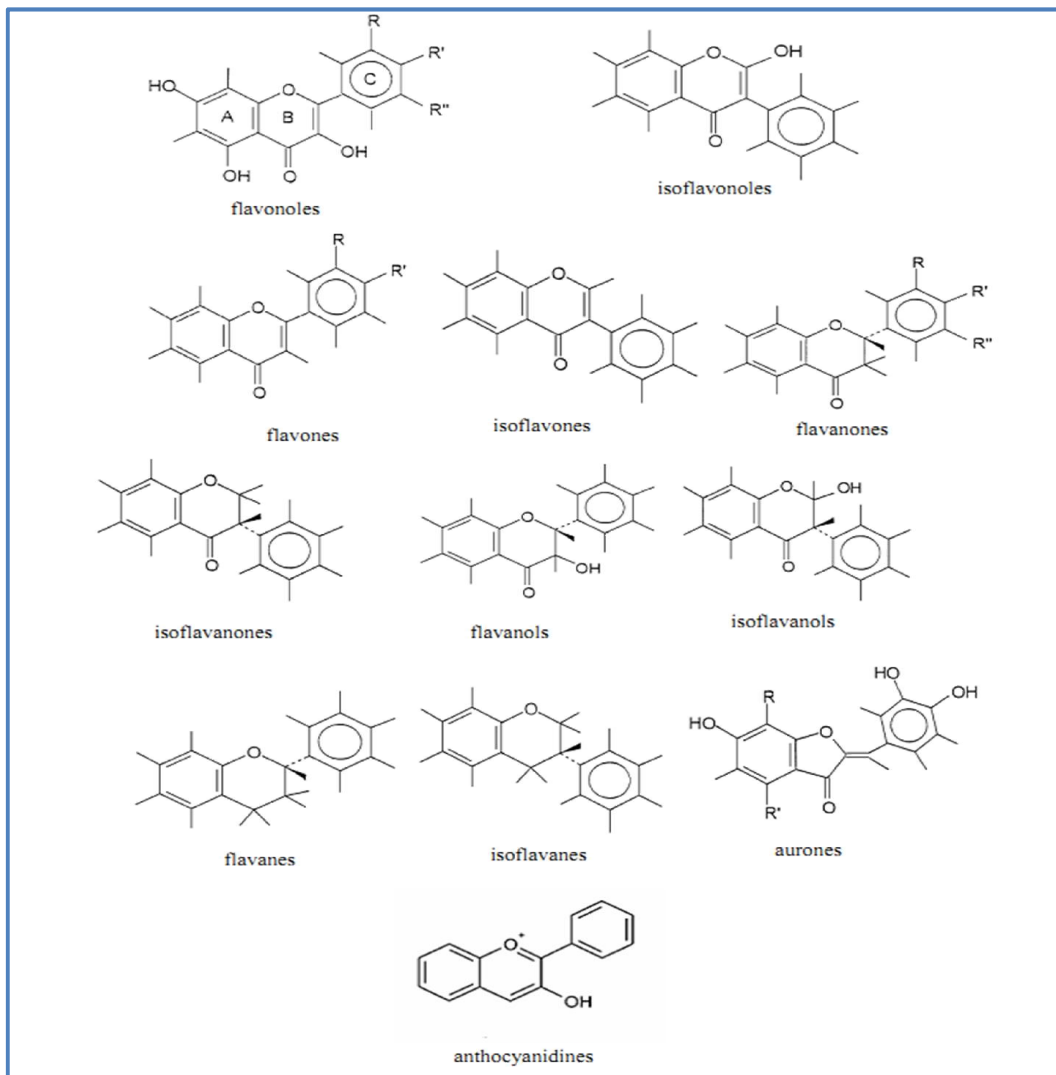


Figure 5: structures des squelettes de base des flavonoïdes (Havsteen, 2002).

II.4.3. Les tannins

Les tannins sont des polyphénols polaires non azotés d'origines végétales, existent dans presque chaque partie de la plante : feuilles, fruits et racines, leurs poids moléculaires compris entre 500 et 3000 Da. Ils sont caractérisés par leur capacité antioxydante et leur propriété thérapeutique (Cowan, 1999).

Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques et leur degré d'oxydation (Hemingway, 1992).

Les drogues à tanin sont employées contre les hémorroïdes, blessures superficielles. Les extraits tanniques sont anti-inflammatoires dans les cas de brûlures. Ils sont utilisés aussi comme antiseptiques. En solutions buvables, elles employées comme antidiarrhéiques (Ayad, 2008).

Les tanins sont divisés selon leur structure en deux groupes :

Les tannins condensés : proanthocyanidines : ce sont des composés phénoliques hétérogènes. Sont largement répandus dans l'alimentation humaine (Guigniard, 1996). Ils se trouvent sous forme d'oligomères ou polymères de flavanes, flavan-3-ols, 5 desoxy-3-flavonols et flavan-3,4-diols. Les polymères donnent une structure hérissée d'OH phénoliques capable de former des liaisons stables avec les protéines (Akroum, 2011).

Les tannins hydrolysables : sont des esters d'acide gallique qui se lient aux molécules de glucose. Plus précisément, un glucose se lie à plusieurs molécules d'acide gallique (Sarni-Manchado et Cheynier 2006). Ce groupe de tanins est caractéristique des Dicotylédones. Ces tanins en raison de leurs nombreux groupements OH se dissolvent plus ou moins (en fonction de leur poids moléculaire) dans l'eau, en formant des solutions colloïdales (Guigniard, 1996).

II .5. Activités biologiques des polyphénols

Les polyphénols ont une multitude d'activités biologiques dépendant de leurs structures chimiques et sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique, présentent un intérêt à ne pas négliger dans la prévention mais également dans le traitement des nombreuses pathologies (Martin et Andriantsitohaina, 2002). De nombreux travaux suggèrent que les polyphénols participent à la prévention des maladies cardio-vasculaires (Manach *et al.*, 2005).

Ils constituent une importante famille d'antioxydants dans les plantes, les fruits et les légumes puisqu'elles comprennent plus de 6000 molécules (Lhuilier, 2007).

La consommation d'aliments riches en polyphénols réduit le développement de nombreuses pathologies, telles que le cancer, l'ischémie cardiaque, l'athérosclérose et

l'hypertension. Cela peut-être expliqué par le fait que ces composés ont la capacité de modifier de nombreux facteurs impliqués dans la genèse de ces maladies.

Les polyphénols sont en effet capables d'abaisser la pression artérielle, d'empêcher l'oxydation des LDL qui est l'un des facteurs clé du processus physiopathologique de l'athérosclérose, d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, d'empêcher l'agrégation plaquettaire, de stabiliser les cellules immunitaires et de promouvoir le relâchement des cellules musculaires lisses vasculaires. Ils ont ainsi été décrits comme étant des antioxydants, des anti-inflammatoires, des anti-allergènes, des anti-thrombotiques et des anti-tumoraux. (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

Les polyphénols ont également un rôle dans le contrôle de la croissance et le développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance. Ils permettent aux végétaux de se défendre contre les rayons ultraviolets. Certains d'entre eux jouent le rôle de phytoalexines comme les isoflavonols permettant de lutter contre les infections causées par les champignons, ou par les bactéries (Maamri, 2008 ; Gauthuret, 1968).

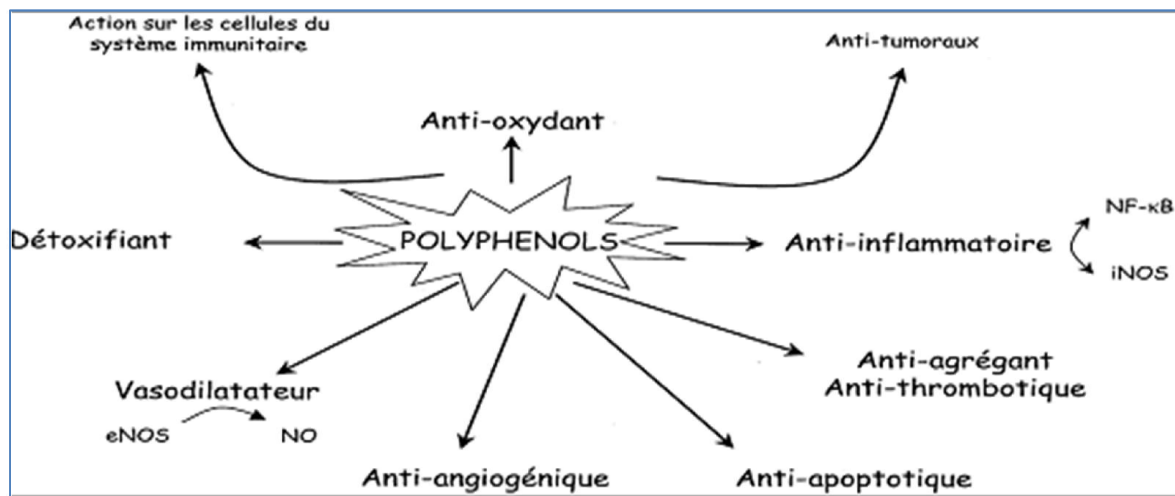


Figure 6: effets biologiques des polyphénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

II.5.1. Activité contre le cancer

Depuis longtemps, on associe le cancer et le type d'alimentation, de nombreux chercheurs ont étudié le rôle des nutriments dans le développement des cancers. Plus récemment des recherches expérimentales suggèrent que les flavonoïdes en particuliers sont parmi les substances susceptibles de retarder voire d'empêcher l'apparition de certains cancers, tout en réduisant d'une manière spécifique les risques d'en avoir chez les sujets humains (Decloitre, 1993 ; Hertog, 1996).

Parmi les flavonoïdes les plus actifs sur les cellules tumorales, nous citons la quercétine et la catéchine qui sont très abondantes dans les aliments.

La quercétine prévient la cancérogenèse, surtout le cancer de la peau et du colon. La présence de 20 % de quercétine dans l'alimentation chez les animaux diminue le cancer du côlon et y prévient l'apparition des cryptes anormales. Le mécanisme suggéré est que la quercétine joue le rôle d'un antagoniste des topoisomérases I et II produites par les cellules tumorales.

La catéchine, est un inhibiteur de certaines réactions d'oxydation donnant un ADN anormal, elle inhibe surtout la formation du 8-hydroxydesoxyguanosine (8-OHDG), un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN (Pietta, 2000 ; Tomofuji *et al.*, 2009).

Ils interviennent dans l'étape d'initiation comme piègeurs des mutagènes électrophiles ou en stimulant la réparation de l'ADN muté. Durant les étapes de promotion et de progression, ils agissent comme des agents suppresseurs de tumeurs par différents mécanismes comme l'induction de l'apoptose et l'inhibition de la prolifération cellulaire (Scalbert *et al.*, 2002).

II .5.2.Activité anti-inflammatoire

Les propriétés anti-inflammatoires des composés polyphénoliques peuvent être dues à leurs capacités d'inhiber des enzymes impliquées dans les processus inflammatoires (Skerget *et al.*, 2005). Plusieurs flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique plaquettaire .C'est ainsi que la myricétine et la quercétine bloquent l'action des cyclo-oxygénase et lipoxygénase à des concentrations relativement élevées. À faibles concentrations, c'est la lipoxygénase qui est inhibée préférentiellement. Certains travaux suggèrent qu'ils posséderaient une bonne activité anti-inflammatoire sans les effets indésirables de type ulcé-rogène (Ghedira, 2005).

II .5.3.Effets cardiovasculaires

Les polyphénols participent à la prévention des maladies cardiovasculaires (Crozier *et al.*, 2010). Leur consommation se traduit par une augmentation transitoire de la capacité antioxydante du plasma dans les heures qui suivent le repas. Parvenus au niveau des artères, ils préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoproteins ou LDL), qui est l'un des facteurs clé du processus physiopathologique de l'athérosclérose (épaississement des artères qui contribue à réduire le flux sanguin et peut conduire à l'asphyxie des tissus irrigués). En inhibant l'oxydation des LDLs, ils limitent leur

incrustation dans les parois des artères qui contribue à l'épaississement des parois et à réduire le flux de sang qui parvient au niveau des tissus. Les flavonoïdes agiraient aussi en inhibant l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose qui peut conduire à l'occlusion des artères (Scalbert *et al.*, 2005).

Les flavonoïdes agissent sur les vaisseaux sanguins sous forme d'activité vitaminique «P». Cette activité intervient dans le maintien d'une perméabilité vasculaire normale. Les flavonoïdes sont responsables d'une augmentation de la résistance des capillaires. Cette activité serait en rapport avec les effets de certains flavonoïdes sur les plaquettes, les leucocytes et sur les enzymes intervenant dans la coagulation sanguin (Ghedira, 2005).

II .5.4. Activité contre le stress oxydatif

A. Stress oxydatif

C'est le déséquilibre des oxydants et les antioxydants du corps conduit à un stress oxydatif résultant en la destruction des lipides insaturés, des ADN, des protéines et d'autres molécules essentielles. En plus de preuves suggèrent que les dommages oxydatifs à des composants de cellules à un rôle physiopathologique pertinent dans plusieurs types de maladies humaines (Ames *et al.*, 1993).

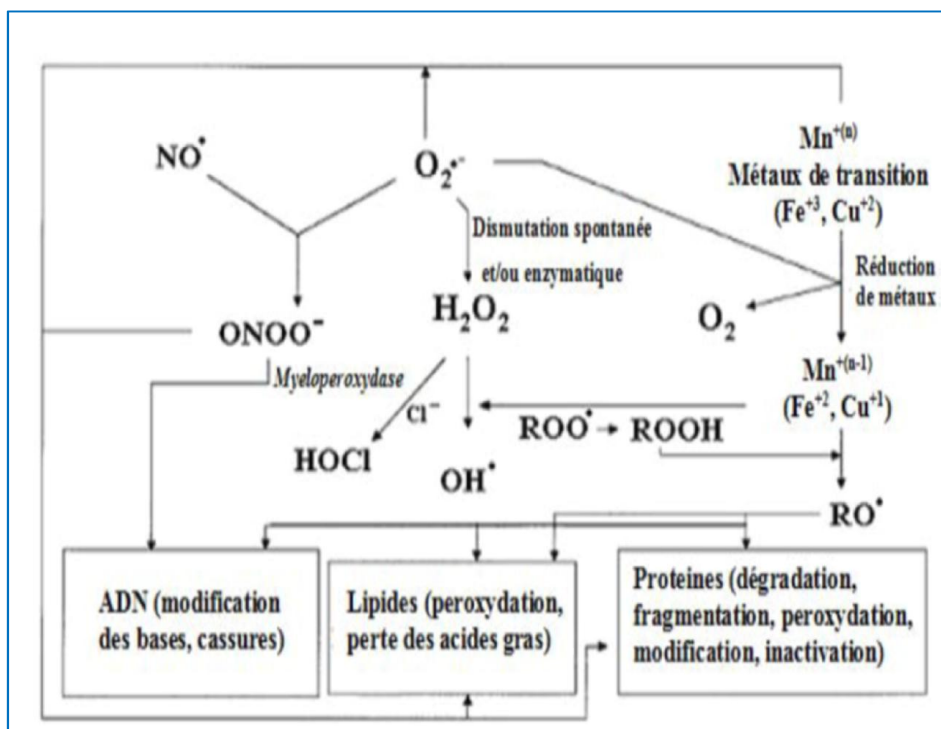


Figure 7: espèces réactives de l'oxygène(ROS) induite les dommages oxydatifs

B. Effet de stress oxydatif

En effet, le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la multiplication mitochondriale de radicaux (Girodon *et al.*, 1997; Sohal *et al.*, 2002). Le stress oxydant est la principale cause initiale de plusieurs maladies (Mates et Sanchez-Jimenez, 2000). C'est le facteur potentialisant l'apparition des maladies multifactorielles telles que le diabète, la maladie d'alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Sergeant *et al.*, 1998).

C. Origine de stress oxydatif

Les radicaux libres (RL) sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à doses raisonnables. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de RL, un état de « stress oxydant » est signalé (Favier, 2003).

D. Source de ROS

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) dont l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) sont produites naturellement par l'organisme. Du fait de l'efficacité des systèmes de défense naturelle, ces EROs n'ont pas d'effets néfastes majeurs. Cependant, lorsque se produit un déséquilibre entre les systèmes antioxydants naturels et les EROs, l'organisme fait face à un stress oxydant. Les EROs en excès ont alors pour cible l'ADN, les lipides, les sucres et les protéines. Plusieurs maladies telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires, le diabète et les maladies dégénératives, sont associées à l'oxydation et au processus de vieillissement. De plus, les UV, la pollution et de nombreux agents chimiques peuvent être à l'origine d'une production accrue des EROs.

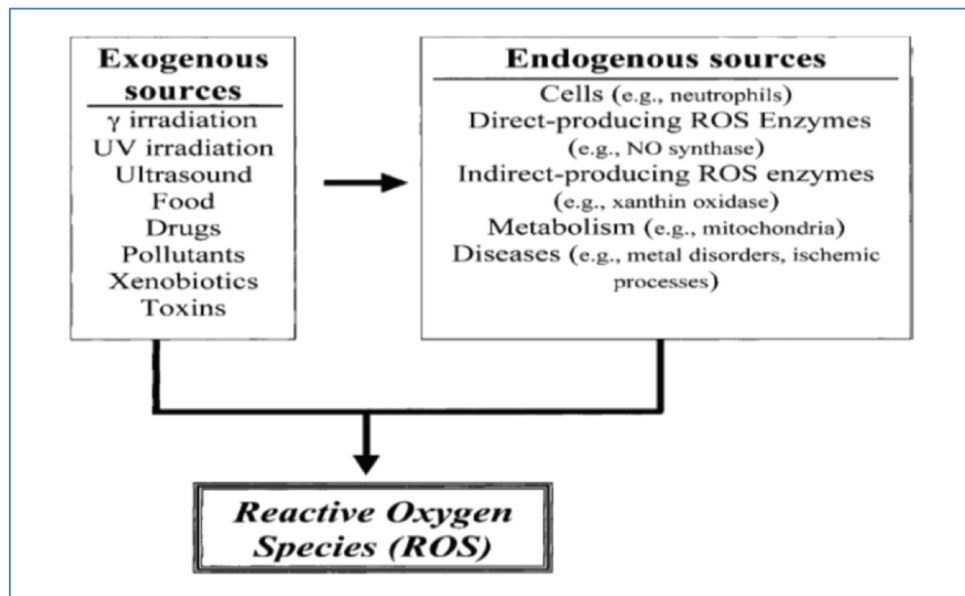


Figure 8 : les sources d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) endogène et exogène (Kohen et Nyska, 2002).

II.5.5. Activité antioxydante des polyphénols

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS (Vansant, 2004).

Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (Favier, 2003).

Ces dernières années, une importance particulière a été accordée aux propriétés antioxydantes des flavonoïdes qui sont attribuées à leur capacité de piéger directement les RL, de chélater les ions métalliques impliqués dans la production des EOR via les réactions de Fenton et Haber-Weiss, d'inhiber quelques enzymes en particulier les oxydases, d'activer les enzymes antioxydantes et de réduire les radicaux α -tocophéryl (Cotelle, 2001; Lin et Weng, 2006; Heim *et al.*, 2002).

A) Propriétés anti radicalaires

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle selon la réaction représentée ci-dessous :



Où $\text{R}\cdot$ représente l'anion superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle. Cette réaction de

piégeage donne une molécule stable (RH) et un radical flavoxy (FLO•) (Amić *et al.*, 2003). Le radical flavoxy (FL-O•) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable comme illustré en figure N°9.

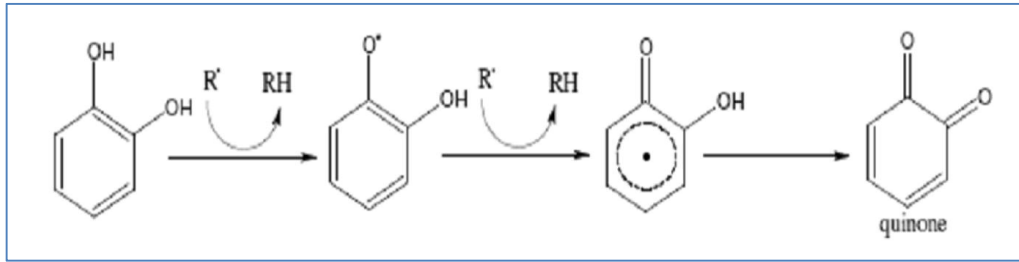


Figure9 : piégeage des ROS (R•) par les flavonoïdes (Pietta, 2000).

En outre, le radical flavoxy peut interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction est responsable d'un effet pro-oxydant indésirable des flavonoïdes (Pietta, 2000).

B) Chélation des ions métalliques

Les ions métalliques sont nécessaires pour le fonctionnement des processus biochimiques et physiologiques cellulaires, mais dans certains cas et lorsque leur mécanisme d'action n'est pas bien contrôlé ces mêmes ions peuvent être à l'origine d'une peroxydation lipidique, un stress oxydatif, ou une blessure des tissus, à titre d'exemple Cu^{2+} est un stimulateur de la peroxydation des LDL (Tiqwari, 2001).

Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques grâce à leur structure chimique spécifique (Derbel et Ghedira, 2005). La chélation des ions métalliques nécessite trois sites principaux :

- Site situé entre le groupe 3' OH et le groupe 4' OH du cycle B ;
 - Site situé entre le groupe 3OH et 4 C=O de l'hétérocycle C ;
 - Site situé entre le groupe 5OH du cycle A et le groupe 4C=O de l'hétérocycle C
- (Tiqwari, 2001).

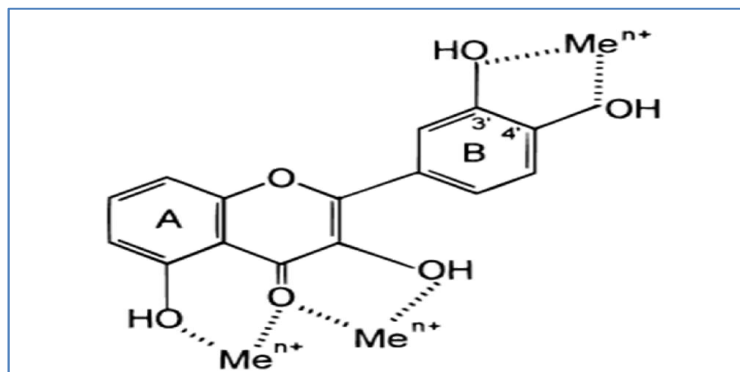


Figure 10 : sites de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes (Pietta, 2000).



Matériel et méthodes

III. 1. Le matériel végétal

III. 1.1. *Cystus albidus*

Arabe: oum aliya
 Berbère: tusalt
 Français : ciste cotonneux ou ciste blanc
 Famille : cistacées
 Genre : *Cystus*
 Espèce : *Cystus albidus*



Figure 11: photo de *Cystus albidus*
 Source: http://www.henriettes_sherbal.com

Propriété et usage

A air de répartition ouest-méditerranéenne .elle s'accommode des terrains rocheux ; préfère les terrains calcaires, elle peut se trouver aussi sur sols siliceux. Elle est présente en Algérie et au Maroc, dans la région méditerranéenne. En Algérie, souvent dénommée atai ou touzzalt elle est assez commune dans la zone littorale, dans l'Atlas tellien et sur les hauts plateaux de l'oranais. Les feuilles de *C. albidus* L sont employées au Maroc, en usage interne sous forme d'infusion comme digestif, employées en Algérie, en usage interne sous forme d'infusion (Ait Youssef ,2006).

III. 1.2. *Crataegus azarolus*

Arabe: Zaaoura, Zaârour
 Berbère : Tazaraout
 Français : Azerolier
 Famille : Rosacées
 Genre : *Crataegus*
 Espèce : *Crataegus azarolus*



Figure 12 : photo de *Crataegus azarolus*
 Source: http://www.henriettes_sherbal.com

Propriété et usage

Elle assez rare dans le Tell de l'Algérois et du Constantinois ; elle pousse surtout dans les forêts. La feuille de *Crataegus azarolus* est employée en Tunisie, en usage interne sous forme d'un décocté recommandé aux diabétiques à raison d'un verre tous les matins à jeun. la fleur est employée sous forme de décocté dans le traitement de l'angine (Ait Youssef ,2006).

III. 1.3. *Rhamnus alaternus*

Arabe: Aoud el kheir, Qaced
 Berbère: Mliles, Ajroudj
 Français : Alaterne
 Famille : Rhanacées
 Genre : Rhamnus
 Espèce : *Rhamnus alaternus*



Figure 13: photo de *Rhamnus alaternus*.
 Source: <http://www.henriettesherbal.com>

Propriété et usage

L'espèce *Rhamnus alaternus* L. à une aire de répartition méditerranéenne. On la trouve dans les pays d'Afrique du nord : en Algérie, au Maroc ou elle sera commune et en Tunisie. Cette espèce serait commune dans les fourrés du littoral méditerranéen. En Algérie elle est très commune dans toute l'Algérie, poussant surtout dans les forêts et les rocailles.

Les tiges et les feuilles de *Rhamnus alaternus* L. étaient utilisées en Algérie dans le Constantinois contre la jaunisse et les troubles hépatiques provoqués par le paludisme (Ait Youssef, 2006).

III. 1.4. *Lonicera implexa*

Arabe: Sultane el rabaa, anaraf
 Berbère: Tamthwala
 Français : chèvrefeuille
 Famille : Caprifoliaceae
 Genre : Lonicera
 Espèce : *Lonicera implexa*



Figure 14 : photo de *Lonicera implexa*.
 Source: <http://www.henriettesherbal.com>

Propriété et usage

Son aire de répartition est méditerranéenne. On la trouve souvent dans les groupements du chêne pubescent et sur terrain calcaire. En Algérie elle est très commune dans tout le Tell et très rare ailleurs ; on l'y trouve surtout dans les forêts.

Hormis la mention par Ibn Al-Baytar d'un médicament connu sous le nom de « Sarimet el-djedi, » auquel les herboristes espagnols donnent le nom de soltan el-djebel, nous ne possédons à ce jour aucune autre information concernant des usages d'espèces du genre *Lonicera* L. dans les pays du Maghreb. Il faut savoir que le fruit est toxique (Ait Youssef, 2006).

III. 1.5. *Adiantum capillus veneris*

Arabe: Maadnos el bir
 Berbère: Ar3dat
 Français : Capillaire de Montpellier
 Famille : Pteridaceae
 Genre : *Adiantum*
 Espèce : *Adiantum capillus veneris*



Figure 15: photo d'*Adiantum capillus veneris*
 Source: <http://www.henriettesherbal.com>

Propriété et usage

Dans la médecine traditionnelle *A. capillus –veneris* est employé car fluidifiant, diurétique, fébrifuge, comme tonique de cheveux, dans les maladies de poitrine, dans des infections catarrhales, pour traiter les tumeurs dures dans la rate, les problèmes de voies respiratoires et elle est anticanceruse (Puri et Arora, 1961 ; Singh *et al.*, 1989 ; Jain *et al.*, 1992 ; Kumar *et al.*, 2003).

III.2. La récolte et séchage du matériel végétal

La récolte des feuilles des plantes a été faite dans le nord, précisément de la région de Bejaïa, en mois mars de l'année de 2013. Après leur identification par des spécialistes en botanique au niveau de parc national de Gouraia. Le matériel végétal est séché à l'ombre et à une température ambiante pendant quelques jours.

III.3. Broyage et extraction

Après le séchage, les feuilles 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 (95%) à raison de 4 ml pour 1g de la poudre, pendant 12 heures sous agitation continue à l'obscurité et à la température ambiante. Le mélange est ensuite laissé décanter pendant 24 heures, et le surnageant éthanoïque 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 évaporation (g).

P₀ : poids vide du boîtier de pétri en verre (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 rapportées 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 de Folin-Ciocalteu (50%) est mélangé avec 100µl de chaque solution préparée, et après environ 5 min, 2ml de bicarbonates de sodium Na_2CO_3 (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 mgEAG/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 (AlCl_3) qui interagit spécifiquement avec les flavonoïdes en donnant une couleur jaune foncée. L'intensité de la coloration est évaluée par spectrophotomètre à 510 nm. 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 de 0,2 à 2 mg/ml de solution de la rutine est préparée. Dans un tube à essai, on met un volume de 100 μl de la rutine, 300 μl d'eau distillé suivie par 30 μl NaNO_2 (5%). Après 5 min à la température ambiante, un volume de 30 μl d' AlCl_3 à 10% (133mg d' AlCl_3 et 400mg d'acétate de sodium sont dilués dans 100 ml d'eau distillée) a été ajouté. Après encore d'autres 5 min, la réaction a été traitée par 200 μl de 1 Mm de NaOH. A la fin, le mélange est dilué par 1 ml d'eau distillé. La lecture est effectuée à 510 nm et les valeurs des absorbances trouvées pour chaque solution sont utilisées pour tracer la courbe d'étalonnage. Pour les essais, les mêmes étapes ont été suivies sauf qu'à la place de la rutine on a introduit les extraits des plantes.

III.5. Evaluation de l'activité antioxydante

III.5.1. Test anti-DPPH

III.5.1.1. Principe de la méthode

Pour étudier l'activité anti radicalaire des différents extraits, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH (diphényl picryl-hydrayl), Le radical DPPH• est l'un des substrats les plus utilisés généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse (Bozin *et al.*, 2008). L'activité antioxydante est déterminée par la diminution de l'absorbance d'une solution alcoolique de DPPH• à 517 nm, qui est du à sa réduction à une forme non radicalaire DPPH-H par les antioxydants (AH) donneurs d'hydrogènes présent dans l'extrait végétal ou par une autre espèce radicalaire comme le montre les équations suivantes (Maisuthisakul *et al.*, 2007, Da Silva Pinto *et al.*, 2008).



III.5.1.2. Protocole expérimental

L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Maisuthisakul et ses collaborateurs (2007). Un volume de 20 µl DPPH (5mM) est ajouté à 980µl d'extrait préparé à différentes concentration, Puis après incubation à l'obscurité pendant 30 minutes et à température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Les absorbances mesurées servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir anti radicalaire de l'échantillon (Parejo *et al.*, 2003) cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. Le pourcentage de piégeage du radical est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Effet scavenger contre le radical DPPH(\%)} = \{[A_T - (A_E - A_B)] / A_T\} \times 100$$

Où : A_T : absorbance de témoin (980µl de méthanol +20µl de DPPH).

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

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

III.5.2. Pouvoir réducteur par la méthode de FRAP

III.5.2.1. Principe de la méthode

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm (Oyaizu, 1986). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Hubert, 2006).

III.5.2.2. Protocol expérimental

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée par Oyaizu (1986). En effet, Un volume de 0,5ml de l'échantillon à différentes concentrations dilué dans l'eau distillée est mélangé avec 0,5 ml d'une solution tampon phosphate (0,2 M ; pH = 6,6) et 0,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1 %, puis on incube les tubes à 50 °C pendant 20 minutes. Puis ajouté 0,5ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction et les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10min. Nous prélevons 0,5 ml du surnageant auxquels nous ajoutons 0,5 ml d'eau distillée. Nous additionnons ensuite au mélange 100 µl d'une solution de chlorure de fer ($FeCl_3, 6H_2O$) à 0,1 % fraîchement

préparée. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions.

III.6. Effet anti hémolytique

Les érythrocytes sont les cellules les plus abondantes dans le corps humain et possèdent des caractéristiques morphologiques et physiologiques souhaitables, pour être exploitées intensivement dans le domaine des essais pharmacologiques des drogues thérapeutiques (Yoo *et al.*, 2011).

Le dommage oxydatif de la membrane des érythrocytes (lipide / protéine) peut être impliqués dans l'hémolyse associée à certaines hémoglobinopathies, médicaments oxydants, des excès de métaux de transition, les radiations et les carences dans certains systèmes antioxydants érythrocytaires (système antioxydant endogène).

La peroxydation lipidique est l'une des conséquences de dommages oxydatifs, et il a été proposé comme un mécanisme général de la mort cellulaire (c'est-à dire l'hémolyse) (Trachootham *et al.*, 2008 ; Rajeshwari *et al.*, 2012).

L'hémolyse oxydative induite par l'AAPH (2,2'-azobis-2-amidinopropane dihydrochloride), un initiateur de la peroxydation lipidique, est l'une des méthodes les plus utilisées actuellement dans le domaine de l'investigation des activités antioxydante (He *et al.*, 2000). Le réactif AAPH provoque l'oxydation des lipides et des protéines de la membrane cellulaire conduisant à la lyse des Globules Rouges du Sang (GRS) (Pannangpetch, 2007).

Etant donné que la peroxydation lipidique est une réaction en chaîne des radicaux libres, une initiation radicalaire induite par le réactif AAPH pourrait provoquer jusqu'à vingt réactions de propagation, par conséquent la membrane des globules rouges est rapidement endommagé, conduisant à l'hémolyse.

III.6.1. Protocol expérimental

III.6.1.1. Préparation des globules rouges

Des échantillons de sang ont été obtenus à partir des donneurs en bonne santé au niveau du centre de transfusion de sang de l'Hôpital « AHMAIDA Ben Adjila de la willaya de Laghouat ».

Le sang frais récupéré dans des tubes anticoagulant, est centrifugé en premier lieu à 4000rpm pendant 5 minutes pour éliminer le plasma et retenir les hématies dans le culot.

Ce dernier a subi un premier lavage avec la solution fraîche de NaCl (0.9%), puis trois lavages avec une solution saline de tampon phosphate (PBS) à pH 7.4 (150 mM de NaCl, 0,58 mM de KH_2PO_4 et 3,4 mM de Na_2HPO_4). Au final, les hématies sont suspendues dans la solution tampon phosphate pour obtenir un hématoците à 15% de la suspension cellulaire.

III.6.1.2. Teste d'hémolyse oxydative induite par AAPH

Les échantillons d'extraits des plantes (0.5 ml) à différentes concentrations (5 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$) (concentration finale) ont été ajoutés à 0.5 ml de suspension d'érythrocyte puis incubées pendant 30 minutes à 37°C. Juste après, on a ajouté l'AAPH (concentration finale 50 mM). Le tout a été incubé à 37°C pendant 6 h (Hseu *et al.*, 2014).

Après, chaque 1h de temps, un volume (200 μl) de surnageant est prélevé et dilué avec de PBS puis centrifugé à 3000 rpm pendant 5min. L'absorbance du surnageant a été mesuré avec le spectrophotomètre à 540 nm. À partir des mesures de densité optique, le taux d'inhibition d'hémolyses des différents extraits a été déterminé avec la formule suivante :

$$\text{Effet hémolytique \%} = (\text{Do}_{\text{Teste}} / \text{Do}_{\text{Témion}}) \times 100$$

$$\text{Effet Anti hémolytique \%} = ((\text{Do}_{\text{Témion}} - \text{Do}_{\text{Teste}}) / \text{Do}_{\text{Témion}}) \times 100$$

-Do_{Teste} : absorbance à 540nm en présence d'AAPH et l'extrait.

-Do_{Témoin} : absorbance à 540 nm en présence d'AAPH seul.

Les valeurs exprimées sont la moyenne de trois tests pour chaque dose de chaque extrait. Dans ce protocole, la rutine est testée pour son effet contre l'oxydation hémolytique, comme molécule standard dans les mêmes conditions que les extraits des plantes.

III.7. Chromatographie sur couche mince

L'analyse des extraits bruts par chromatographie sur couche mince (CCM) nous permet dans un premier temps d'avoir une idée sur les différentes classes de composés contenus dans les extraits testés (Ghania, 2010).

La CCM est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse. Elle 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. La façon dont chaque espèce chimique migre dépend de son adsorption sur la phase fixe (plaque) et de sa

solubilité dans la phase mobile (éluant) qui monte par capillarité (Scott, 2003 ; Koolman et Roehm, 2005).

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

$$R_f = d/D$$

d : Distance parcourue par le constituant

D : Distance parcourue par le front de l'éluant

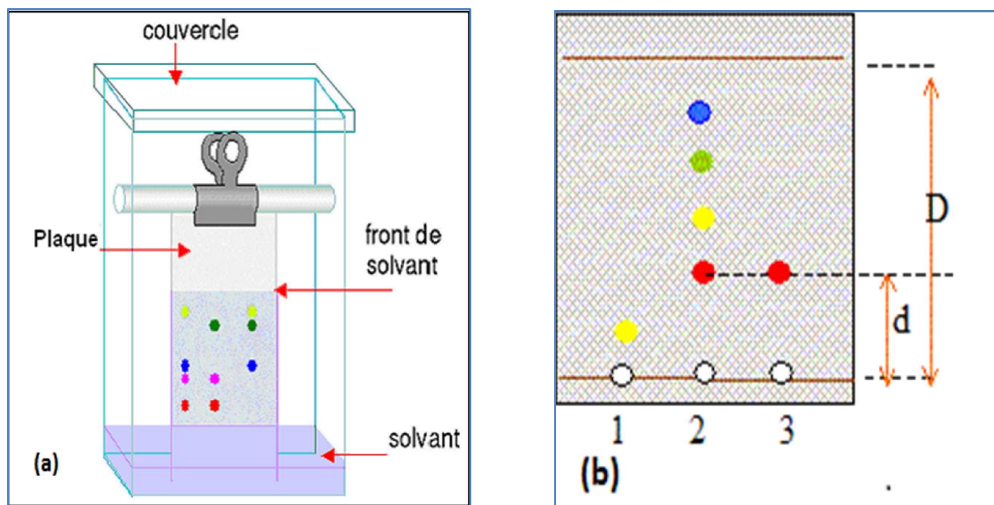


Figure 16: (a) schéma représentatif du dispositif d'une chromatographie sur couche mince. (b) schéma du développement chromatographique d'une plaque.

III.7.1. Protocol expérimental

Les extraits des plantes sont dissouts dans le méthanol à une concentration de (100 mg/ml) et déposés sous forme de spots sur la ligne de départ de migration. La séparation a été menée en appliquant différents mélange de solvants en l'occurrence l'hexane et l'éthyle acétate ainsi que le toluène et l'acétone. Après séparation, les plaques sont observées au visible ainsi que sous UV ($\lambda=254\text{nm}$).

III.8. outil informatique

La présentation et le traitement des résultats ont été conçus par l'application du logiciel SigmaPlot 11.0.



Résultats et discussion

IV.1.Rendement de l'extraction

Pour qu'une extraction soit optimale et efficace elle doit respecter plusieurs facteurs tels que les propriétés chimiques de soluté (solubilité), le transfert de matière, qui dépend de la taille des particules et de la structure du matériel végétal, le type de solvant choisi et de sa viscosité (Mitra, 2003). Comme on l'a déjà cité dans le chapitre II, 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. 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 (Vermerri et Nicholson, 2006).

En outre, la production des métabolites phénoliques varie en fonction des saisons, elle atteint son maximum en été avec une puissante activité antioxydante, tandis qu'en hiver ces deux paramètres diminuent considérablement (Meot-Duros et Magne, 2009).

À cet effet 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. implexa</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. En effet, 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 (Vermerri et Nicholson, 2006).

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

IV.2. Résultats de dosage des composés phénoliques

Il n'existe aucune méthode permettant de doser de manière satisfaisante et simultanée l'ensemble des composés phénoliques présents dans un extrait végétal brut. Néanmoins, une estimation peut être obtenue par différentes méthodes.

La méthode de Folin-Ciocalteu est très sensible mais malheureusement peu spécifique, car beaucoup de composés réducteurs non phénoliques peuvent interférer tels que les caroténoïdes et la vitamine E (Kahkonen *et al.*, 1999), cependant, elle reste la méthode la plus employée.

IV.2.1. Teneur en phénols totaux

La courbe d'étalonnage des phénols totaux réalisée avec l'acide gallique ; molécule standard; est représentée dans la figure ci-dessous. La teneur en phénols totaux pour tous les extraits est évaluée par la même procédure suivie pour l'acide gallique selon le protocole détaillé précédemment.

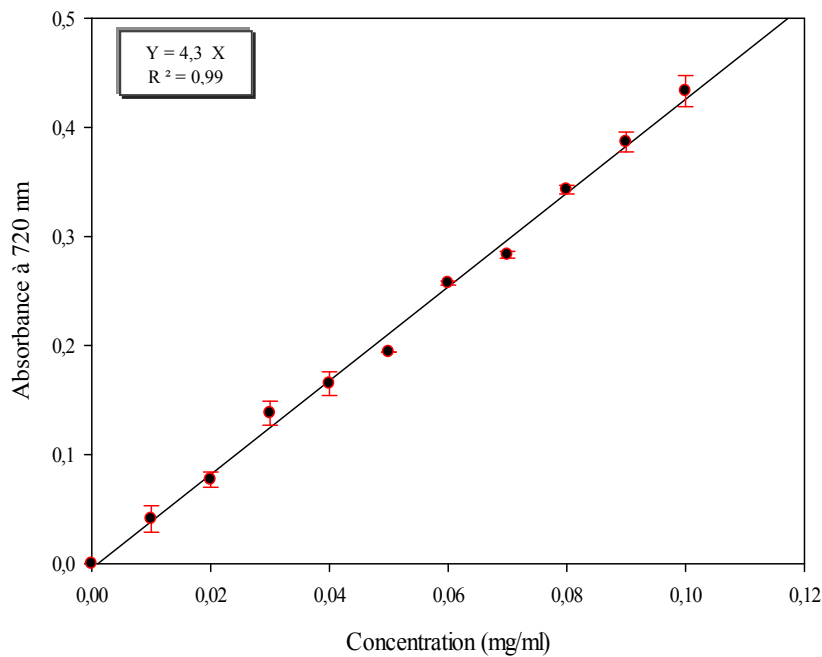


Figure 17: courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

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

Les résultats de la teneur en phénols totaux de l'extrait éthanolique de chaque plante, exprimés en mg EAG/g d'extrait sec, sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau III : teneur en phénols totaux des extraits des plantes.

Plantes	Teneur en phénols totaux (mg EAG/g)
<i>C. albidus</i>	227,90±21,97
<i>C. azarolus</i>	244,37±4,40
<i>R. alaternus</i>	72,48±11,54
<i>L. implexa</i>	65,89±12,43
<i>A. capillus-veneris</i>	50,29±1,23

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

En faisant le lien entre les résultats présentés dans le tableau ci-dessus avec ceux des rendements d'extraction, on constate que les valeurs de teneur des plantes en phénols varient de façon proportionnelle par rapport à celles des taux d'extraction. Cette corrélation positive nous renseignerait que l'éthanol, pris comme solvant d'extraction dans cette étude, était un bon choix.

La teneur des phénols totaux des extraits éthanoliques des plantes étudiées dépend essentiellement : de leur origine (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008), la variété, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique, les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante (Park et Cha, 2003), la durée de conservation (Özgüven et Tansi, 1998) et les facteurs génétiques (Aganga, 2001).

D'après ces résultats, les teneurs en phénols totaux montrent que la valeur la plus importante est celle de l'extrait des feuilles de *C. albidus* (227,90 \pm 21,97mg EAG/g) suivie par *C. azarolus* (244,37±4,40 mg EAG/g). D'après l'étude menée par Bouzid *et al* (2011), l'extrait méthanolique du fruit de *Crataegus monogyna*, une plante de même genre que *C. azarolus*, est le plus riche en phénols totaux par rapport aux autres extraits étudiés.

D'autre part, l'extrait de feuilles d'*A. capillus-veneris* est relativement le plus pauvre en phénols totaux, mais cela n'exclura pas sa richesse en le comparant à d'autres plantes médicinales.

La richesse des extraits polaires en composés phénoliques est une caractéristique prédictible vu la propriété de ces derniers d'être solubles dans l'eau et les solvants polaires et peu solubles dans les solvants apolaires (Macheix *et al.*, 2005).

IV.2.2. Teneur en flavonoïdes

La méthode de dosage des flavonoïdes est plus spécifique, si on la compare à celle de dosage des phénols totaux, car elle est basée sur la formation de complexe chromogène spécifique entre les flavonoïdes et AlCl_3 . L'application du protocole, a été mise à profit, en premier lieu, pour la préparation de courbe d'étalonnage avec une série de dilution de la rutine (figure 18).

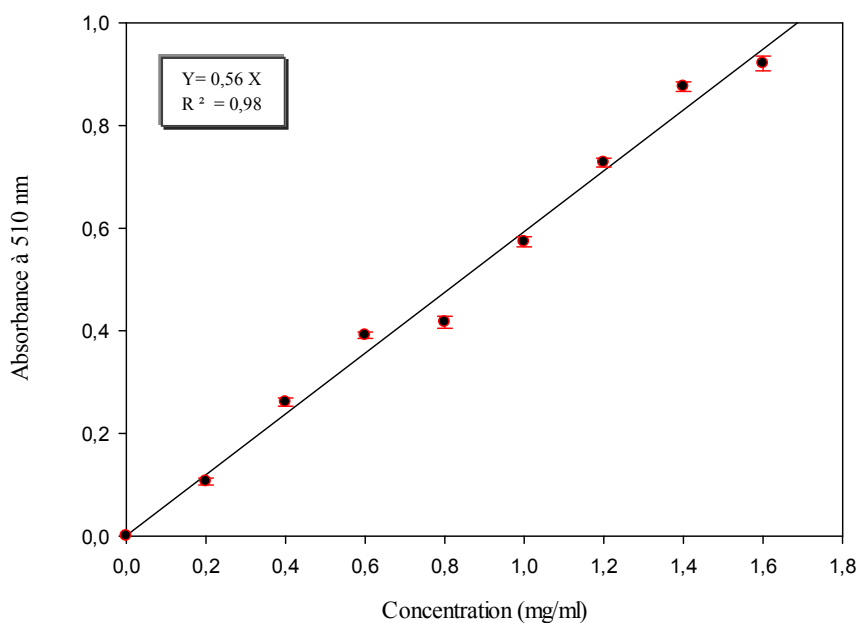


Figure 18: Courbe d'étalonnage réalisée avec la rutine pour le dosage des flavonoïdes.

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

Concernant l'estimation de nos extraits en flavonoïdes, les teneurs sont exprimées en mg ER/g d'extrait sec, à partir de la courbe d'étalonnage réalisée avec la rutine (figure18). Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau IV : teneur en flavonoïdes des extraits éthanoliques des plantes.

Plantes	Teneur en flavonoïdes mg ER/g
<i>C. albidus</i>	188,47 \pm 11,52
<i>C. azarolus</i>	112,00 \pm 3,80
<i>R. alaternus</i>	152,62 \pm 27,76
<i>L. implexa</i>	135,60 \pm 6,48
<i>A. capillus-veneris</i>	837,21 \pm 26,49

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

Les résultats révèlent que les teneurs en flavonoïdes varient d'une plante à une autre. L'extrait de feuilles d'*A. capillus-veneris* qui est marqué par la teneur la plus faible en phénols totaux, présente une teneur assez importante en flavonoïdes avec une valeur de (837,21±26,49 mg ER/g). *C. albidus* viens en deuxième position en terme de teneur en flavonoïdes avec un taux de (188,47± 11,52 mg ER/g). Les autres plantes : *C. azarolus*, *R. alaternus* et *L. implexa* ont marqué des teneurs plus au moins proches dont les taux sont les suivants : 112,00± 3,80 ; 152,62±27,76 et 135,60±6,48 mg ER/g respectivement. A titre de remarque, on constate que les teneurs en flavonoïdes n'est pas en corrélation avec celle des phénols taux. En effet, *A. capillus-veneris* marquée par le taux le plus faible en phénols totaux est à l'inverse la plus élevée en flavonoïdes.

IV.3.Evaluation de l'activité antioxydante

Les principales méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant des principes phytochimiques, sont fondées sur la détermination de produits résultants de l'oxydation ou bien en mesurant l'efficacité d'une substance à piéger les radicaux libres (Marc, 2004).

Il existe différentes méthodes pour déterminer le potentiel antioxydant des extraits des plantes : le test de décoloration de β -carotène linoléate, le test DPPH, le test FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power), l'activité scavenger contre le radical hydroxyle et contre le peroxyde d'hydrogène (Kubola et Siriamornpun, 2008), le test TEAC / ABTS+ (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) (Wojdyło *et al.*, 2007), et plus récemment test ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) (Rolland, 2004).

Parmi ces différentes méthodes, les tests anti-DPPH et le test FRAP sont les deux méthodes qui ont été prises en considération pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits des plantes étudiées dans ce travail.

IV.3.1.Test anti-DPPH

IV.3.1.1.Résultats de l'activité anti-DPPH des extraits à 100 µg/ml

D'après les résultats montrés dans la figure (19), à la concentration de 100 µg /ml, les extraits de feuilles de *C. albidus*, *C.azarolus*, *L. implexa* ont manifesté des taux très similaires d'une moyenne dépassant 90 %. Leurs effets sont proches à celui de la molécule standard qui est la rutine (98%). D'autre part, l'effet anti-DPPH de l'extrait de feuilles de *R. alaternus* vient juste après, avec un taux de 81, 80 % ; considéré inférieur à l'effet des trois première plantes et la Rutine. En dernier, *A. Capillus* a montré l'effet le plus faible contre le DPPH avec un taux de 13,11%. Ce résultat s'expliquerait non seulement par la richesse d'extraits de plantes en polyphénols (quantité), mais aussi par la nature (qualité) 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).

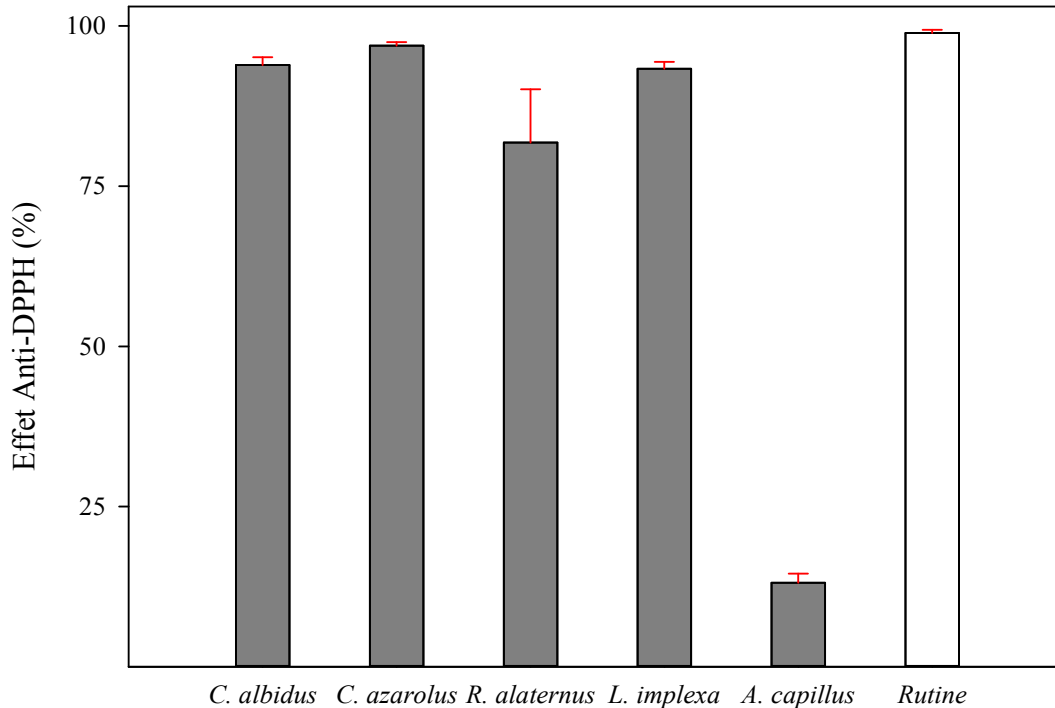


Figure 19 : histogramme représentant l'activité anti-DPPH des extraits et la molécule standard à 100 µg/ml. Toutes les valeurs sont la moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

IV.3.1.2. 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 (figure 19) 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.

A. Résultats de l'activité anti-DPPH en fonction de la concentration de *C.albidus*

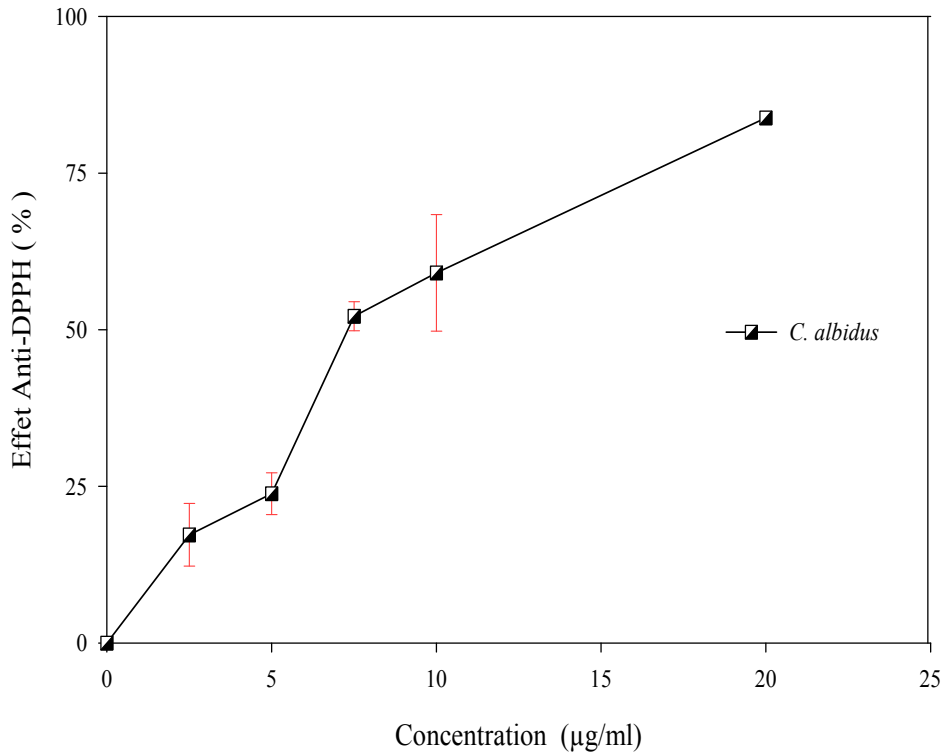


Figure 20 : effet anti-DPPH en fonction des concentrations d'extraits de feuille de *C.albidus*.
-Toutes les valeurs sont la moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype

Commençant par la figure 20, l'extrait éthanolique de feuille de *C. albidus* a été testé sur une série de dilution allant de 2,5 à 20 µg/ml. L'effet, d'après la figure 20, s'est montré dépendant des concentrations testées, où l'IC 50 est déterminé au environ de $7,21 \pm 1,24$ µg/ml en indiquant ainsi un pouvoir scavenger contre le DPPH assez important comparativement aux autres plantes. Ceci confirme que *C. albidus* est la plus efficace en terme d'effet anti DPPH.

B. Résultats de l'activité anti-DPPH en fonction de la concentration de *C. azarolus*, *R. alaternus*, *L. implexa*

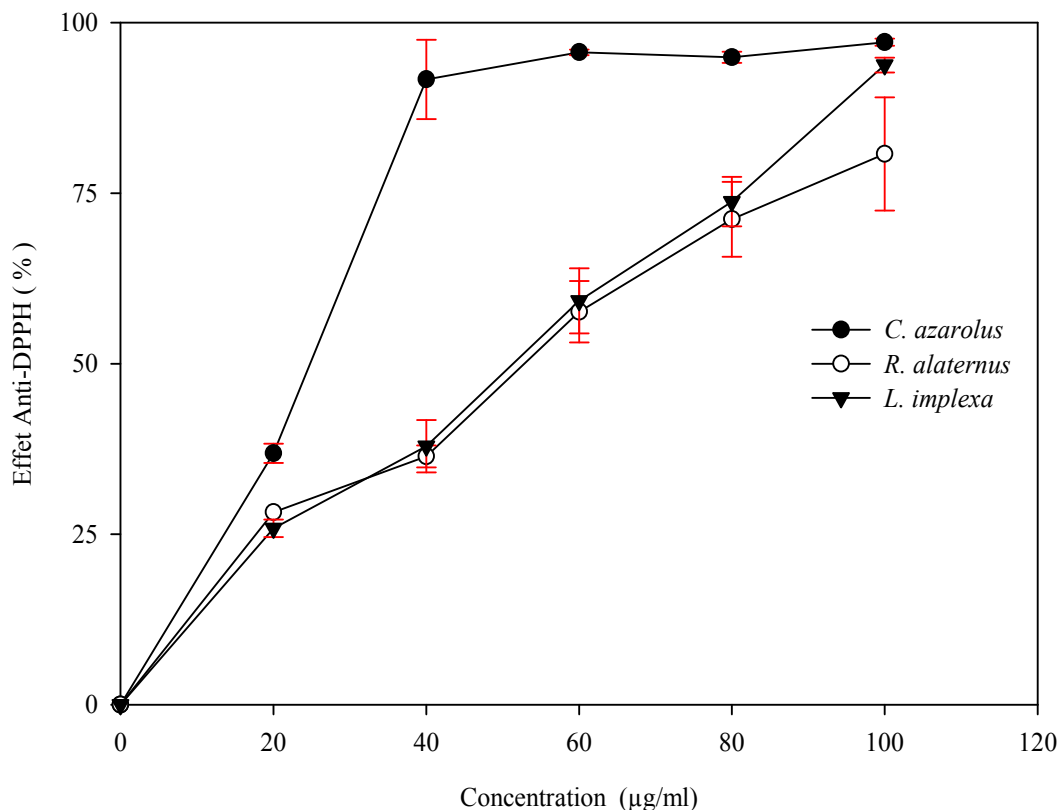


Figure 21 : Effet anti-DPPH en fonction des concentrations des extraits des feuilles de *C. azarolus*, *R. alaternus*, *L. implexa*.

-Toutes 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 100µg/ml jusqu'à 20µg/ml. A cette concentration (20µg/ml), les trois plantes marquent les taux anti-DDPH 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 21) on constate que *C. azarolus* a maintenu son effet anti-radicalaire stable de la concentration 100µg/ml jusqu'à 40µg/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 $25,06 \pm 0,15$ µg/ml alors que *R. alaternus* et *L. implexa* sont moins actives en manifestant des IC 50 plus élevés (voir tableau V).

C. Résultats de l'activité anti-DPPH en fonction de la concentration d'*A. capillus*

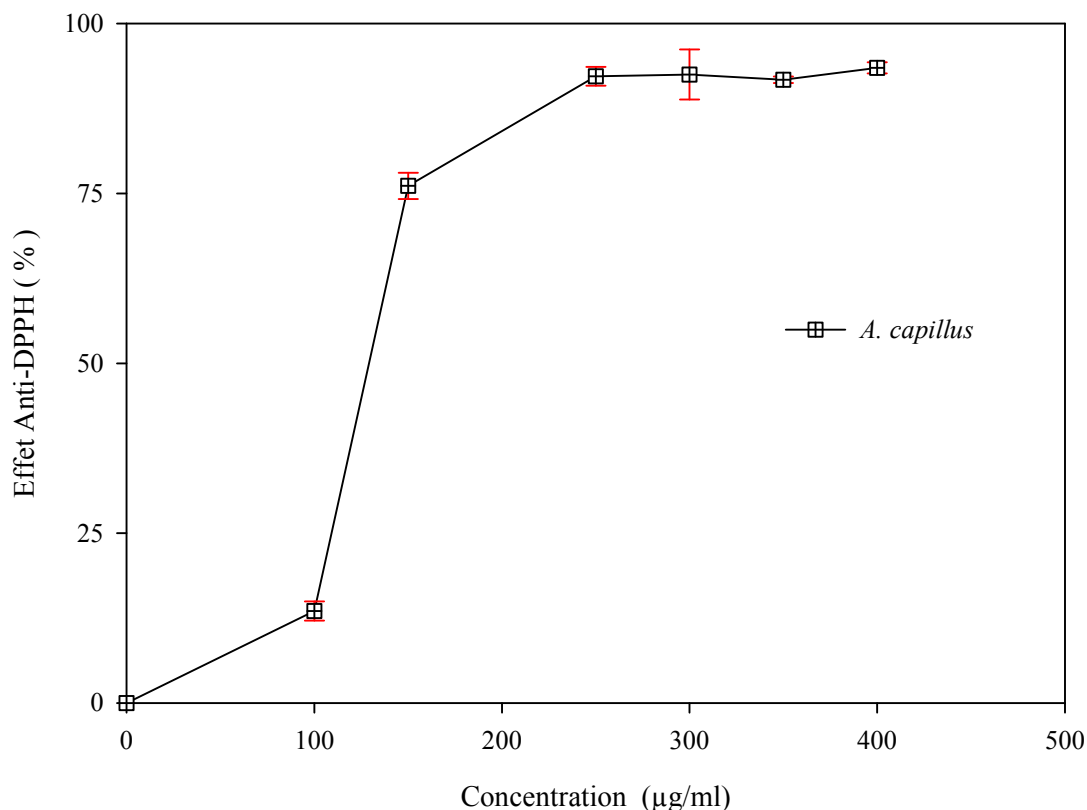


Figure 22: effet anti-DPPH en fonction des concentrations d'extraits de feuille d'*A. capillus*.

-Toutes 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 22). Cette plante, d'après ces résultats est la plus faible contre le DPPH, 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 $130,46 \pm 0,45$ µg/ml.

Tableau V : résultats du test anti-DPPH exprimant la concentration efficace 50% en µg/ml.

Extrait méthanolique	IC50 (µg/ml)
<i>C. albidus</i>	$7,21 \pm 1,24$
<i>C. azarolus</i>	$25,06 \pm 0,15$
<i>L. implexa</i>	$51,74 \pm 7,03$
<i>R. alaternus</i>	$53,23 \pm 5,24$
<i>A. capillus</i>	$130,46 \pm 0,45$
<i>Rutine</i>	$2,85 \pm 0,17$

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

La synthèse de ces résultats indique que l'extrait de *C. albidus* est le plus efficace en termes d'activité anti-radicalaire contre le DPPH, en montrant l'IC50 la plus basse ($7,21 \pm 1,24 \mu\text{g/ml}$) la plus proche de celle exprimée par la Rutine ($2,85 \mu\text{g/ml}$). Alors que, les feuilles d'*A. capillus* ont manifesté l'IC50 la plus élevée atteignant ($130,46 \pm 0,45 \mu\text{g/ml}$) reflétant ainsi l'activité anti radicalaire la plus faible.

IV.3.2. Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power)

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

La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} / complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm (Chung *et al.*, 200). La capacité de la réduction d'un composé peut servir comme un important indicateur de potentiel d'activité antioxydante (Meir *et al.*, 1995).

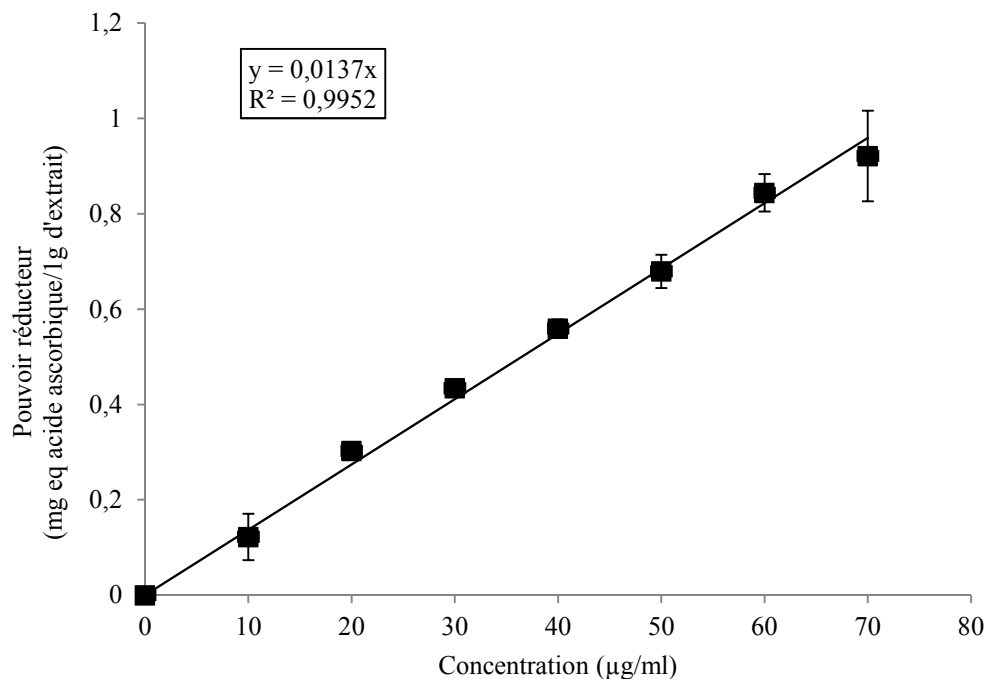


Figure 23 : courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide ascorbique.

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

Pour estimer le pouvoir réducteur des extraits des plantes étudiées dans ce travail, on a réalisé une courbe de référence en utilisant l'acide ascorbique comme molécule standard connue pour son pouvoir réducteur (figure 23). Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide ascorbique par rapport à un gramme d'extrait brut des plantes. Le résultat représenté dans la figure 24, nous ont montrés que la puissance des réductions augmente avec l'augmentation de la concentration d'acide ascorbique.

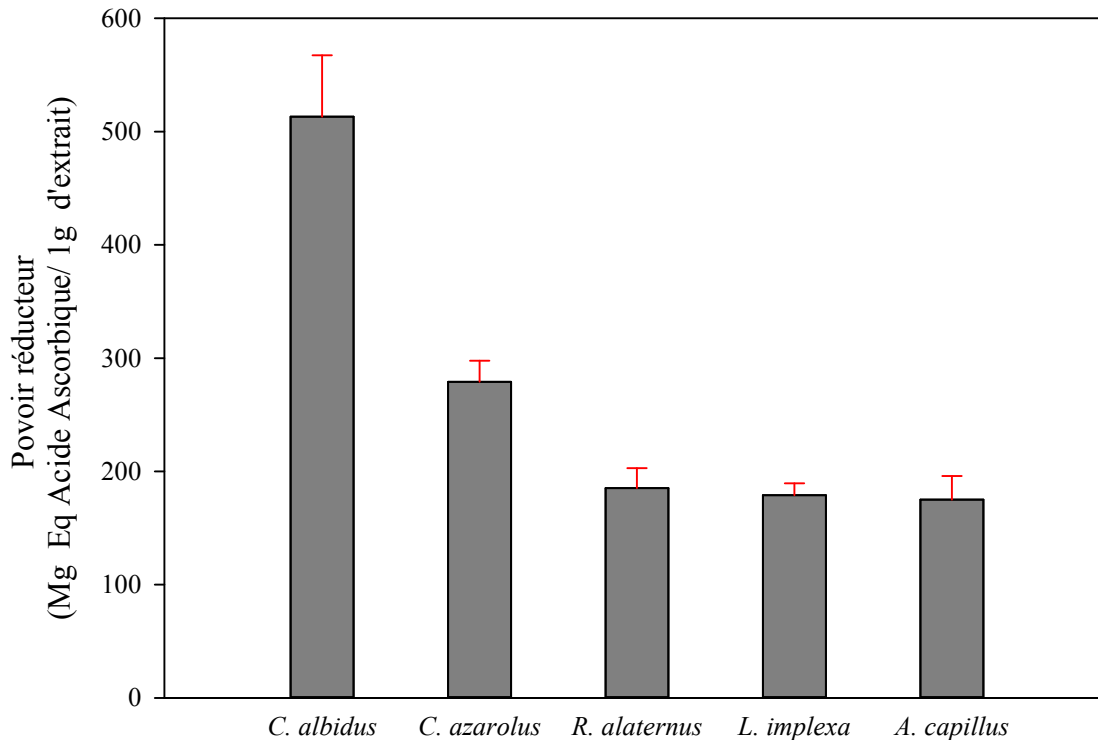


Figure 24: histogramme représentant l'activité du pouvoir réducteur des extraits

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

D'après les résultats montrés sur la figure ci-dessous, le pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique de *C.albidus* s'est montré largement supérieur (513,15 Mg Eq Acide Ascorbique/ 1g d'extrait) en confirmant sa performance antioxydante.

L'extrait de *C. azarolus* a provoqué un effet intermédiaire (279,13 Mg Eq Acide Ascorbique/ 1g d'extrait), tandis que *R.alaternus*, *L.implexa* et *A.capillus* ont presque le même pouvoir réducteur (185,26 ; 178,91 et 175,05 Mg Eq Acide Ascorbique/ 1g d'extrait) respectivement, marquant les taux les plus faibles. Le pouvoir réducteur de l'espèce *C.albidus* est probablement dû à la présence de groupements hydroxyles dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (Siddhuraju *et al.*, 2007).

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

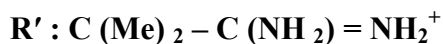
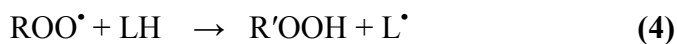
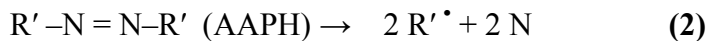
IV.4. Résultats de l'activité des plantes contre l'hémolyse oxydative induite par AAPH

IV.4.1. Preuve d'hémolyse oxydative induite par AAPH

Les érythrocytes constituent un modèle cellulaire très adéquat pour l'étude du stress oxydant. Ces cellules sont extrêmement susceptibles aux endommagements oxydatifs en raison de la richesse de leurs membranes en acides gras polyinsaturés et la concentration cellulaire élevée en oxygène, en hémoglobine, en métaux de transition tels que le fer et le cuivre. Le dommage oxydatif de la membrane des globules rouges implique généralement la peroxydation des lipides, ce qui peut provoquer son dysfonctionnement en modifiant sa fluidité et les fonctions enzymatiques et récepteurs membranaires (Arbos *et al.*, 2008 ; Çimen, 2008 ; Alvarez-Suarez *et al.*, 2012).

Le système radicalaire le plus utilisé est celui du radicale AAPH connu pour sa dégradation dans un milieu aqueux en présence d'oxygène à la température physiologique (37 C°).

Lorsque l'AAPH est ajouté comme initiateur, 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) dans RBC membranes causant une réaction en chaîne connue sous la peroxydation lipidique (équations 4 - 6). À la suite de cette peroxydation lipidique, la membrane des globules rouges subit des dégâts et des pertes de son intégrité membranaire, conduisant à la libération de l'hémoglobine (hémolyse oxydative) (Banerjee *et al.*, 2008).



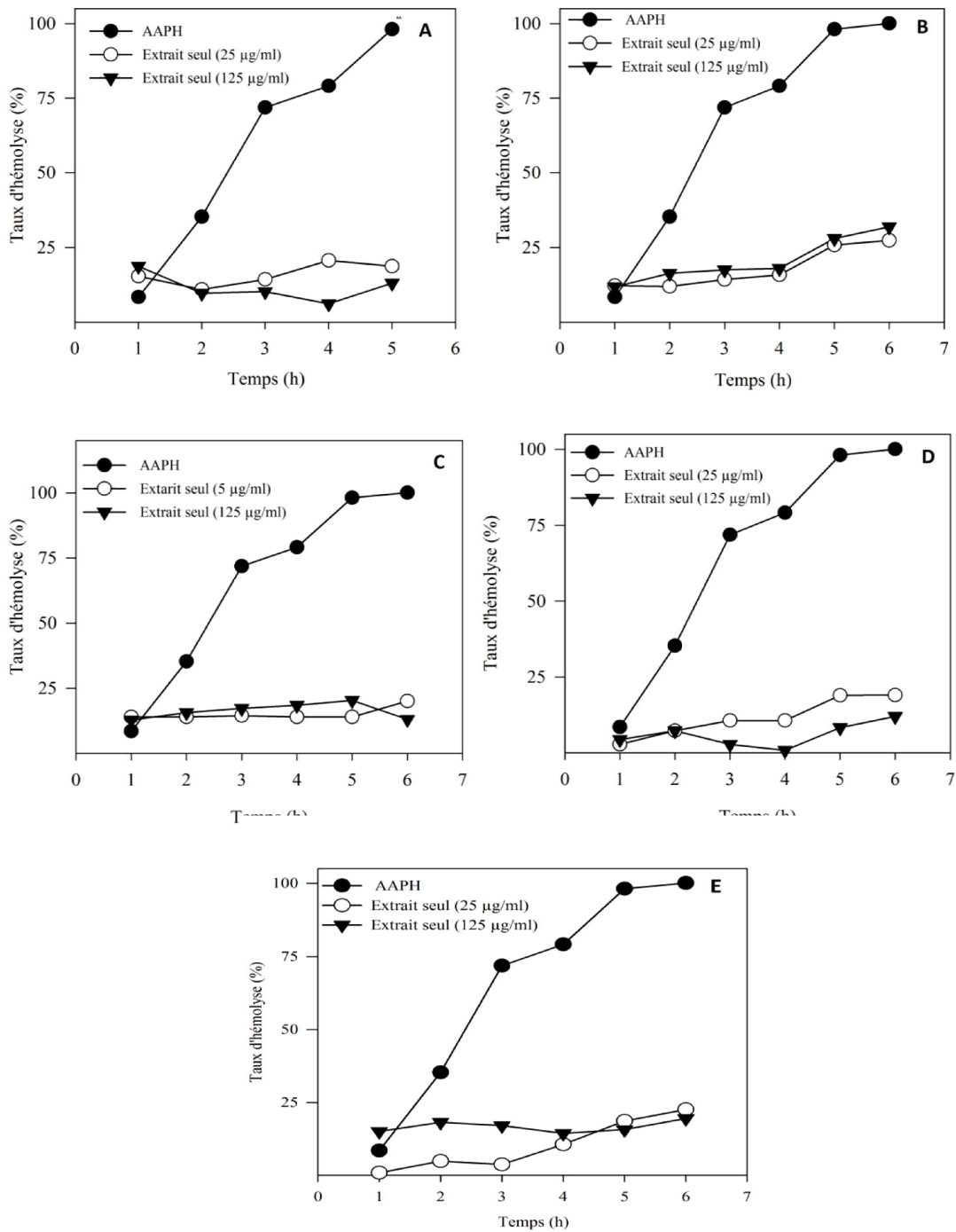


Figure 25: effet d'hémolyse oxydative sur les hématies induite par AAPH et absence d'effet des extraits des plantes sur le phénomène d'hémolyse, **A**(*C.albidus*) ; **B**(*C.azarolus*) ; **C**(*R.alaternus*) ; **D**(*L.implexa*) et **E**(*A.capillus*).

La figure ci-dessus est une preuve du phénomène de l'hémolyse oxydative exercé par le réactif AAPH en fonction du temps. L'AAPH a, alors, exercé son effet oxydatif sur les hématies comme il est expliqué précédemment en induisant l'hémolyse.

Ce phénomène augmente graduellement pour atteindre les taux les plus importants après 6 h d'exposition avec l'AAPH.

Il est indiqué, que les hématies, face au réactif AAPH, peuvent y lutter pendant les premiers temps d'exposition grâce à leur système antioxydant endogène : enzymatique et non enzymatique (Zou *et al.*, 2001).

D'autre part, les extraits des plantes sont incubés seuls avec les hématies pour vérifier si un effet hémolytique serait exercé par le mélange de molécules de chaque extrait brut. Comme il est montré dans les figures, les extraits des plantes étaient neutres vis-à-vis de l'effet hémolytique en présentant des taux significativement faibles et stables dans le temps, contrairement au réactif AAPH.

Tout de même, un effet hémolytique peut être exercé par les plantes en raison de la présence probable des molécules de type saponine connues pour leur effet hémolytique (Dewik, 2009), et interfèrent avec l'effet du réactif AAPH et jouent ainsi le rôle inverse des antioxydants qui protègent contre la peroxydation lipidique membranaire.

IV.4.2.Effet anti-hémolyse des extraits des plantes

Diverses études ont récemment étudié les effets protecteurs potentiels des extraits de plantes, riches en composés phénoliques, contre les dommages oxydatifs des globules rouges (Ferrali *et al.*, 1997; Fiorani *et al.*, 2002; Pawlikowska-Pawlega *et al.*, 2003; Fiorani and Accorsi, 2005; Blasa *et al.*, 2007; Suwalsky *et al.*, 2007; Tulipani *et al.*, 2011; Mendes *et al.*, 2011; Valente *et al.*, 2011), ce qui suggère une interaction possible de flavonoïdes dans les membranes cellulaires, qui servent généralement comme cibles pour la peroxydation des lipides (Ferrali *et al.*, 1997).

Un facteur limitant de l'activité antioxydante d'une molécule dans la cellule est sa localisation ou l'accès aux différents composants de la cellule. Une fois compartimenté dans les membranes cellulaires, les composés antioxydants, tels que les polyphénols, semblent exercer une inhibition significative de la peroxydation des lipides, et, en même temps, d'améliorer l'intégrité de la membrane à l'encontre de plusieurs conditions de stress physique et chimique (Pawlikowska-Pawlega *et al.*, 2003).

Dans cette étude nous avons proposé l'étude de l'effet des extraits des plantes contre l'hémolyse oxydative provoquée par le réactif AAPH. Tout effet prouvé contre l'hémolyse est un indice d'activité anti-oxydation lipidique et protéique membranaire des hématies, ce qui peut faire des plantes de bons exemples pour des applications dans les produits alimentaires et les produits pharmaceutiques.

D'après les résultats obtenus on constate (Figure 25, **A**, **B**, **C**, **D** et **E**) que l'allure des courbes est différente d'une plante à une autre, et ce, en fonction de leur efficacité contre la peroxydation membranaire et leur teneur en molécules à caractère antioxydant.

A. Effet anti-hémolyse oxydative de *C. albidus*

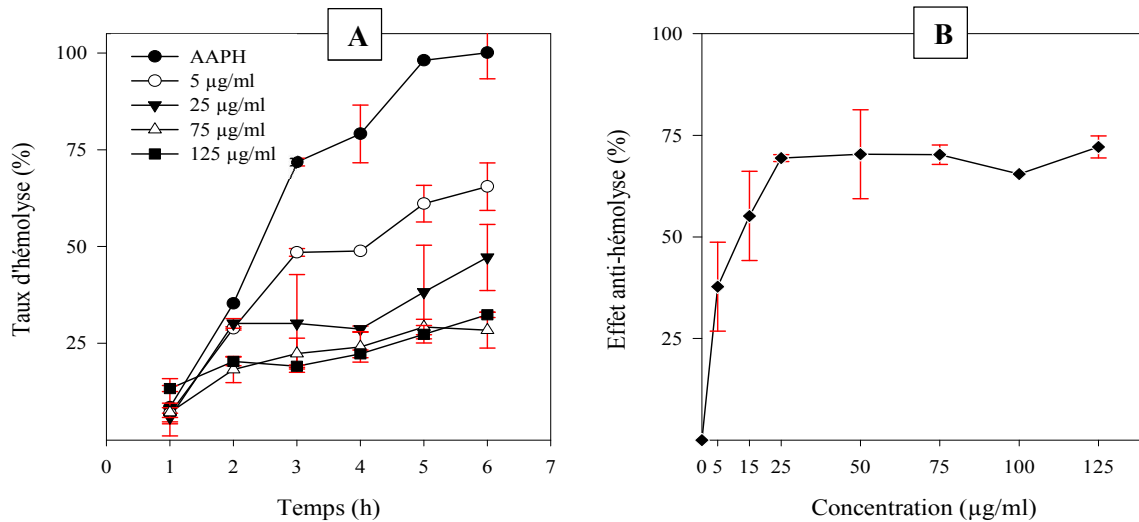


Figure 26 : effet protecteur de l'extrait de *C. albidus* contre l'hémolyse induite par AAPH. **A** : effet hémolytique en fonction du temps en présence d'AAPH. **B** : effet anti-hémolyse en fonction des concentrations. -Toutes les valeurs sont la moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

Commençant par l'extrait de feuilles de *C. albidus* qui est marqué par l'effet le plus prononcé contre la peroxydation lipidique des membranes des hématies. Cette plante a été testée à différentes concentration : 5, 15, 25, 50, 75, 100 et 125 µg/ml. D'après la figure ci-dessus, on remarque qu'à la concentration de 25 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml, 125 µg/ml un effet protecteur très intéressant, en maintenant l'hémolyse induite par AAPH, à des taux faibles qui ne dépassent pas 40 %, et ce, après 6 h d'incubation. Par contre l'effet protecteur s'est montré faible à la concentration de 5 µg/ml.

D'autre part, les résultats de l'effet anti-hémolyse en fonction des concentrations (figure 26, **B**) après 5 heures montrent la concentration inhibitrice d'hémolyse à 50 %, la plus intéressante avoisinant ($12,03 \pm 1,06 \mu\text{g/ml}$).

Cependant, cette concentration reste supérieure et moins efficace à celle exprimée par la rutine ($2,34 \pm 0,56 \mu\text{g/ml}$), la molécule standard testée dans cette étude pour son effet protecteur contre l'hémolyse induite par AAPH.

La plante *C. albidus* est largement citée pour sa richesse en flavonoïdes tels que les catéchine et épicatechine et autres qui seraient fortement impliqués dans l'effet protecteur de cette plantes sur les hématies (Tomas *et al.*, 1994).

B. Effet anti-hémolytique de *C. azarolus*

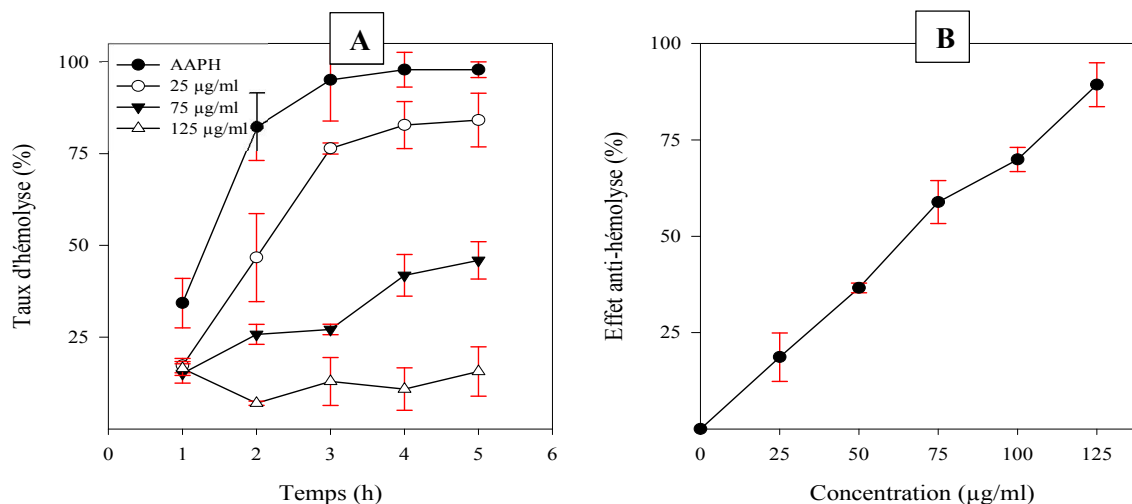


Figure 27: effet protecteur de l'extrait de *C. azarolus* contre l'hémolyse induite par AAPH. **A :** effet hémolytique en fonction du temps en présence d'AAPH. **B :** effet anti-hémolyse en fonction des concentrations.

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

Concernant les feuilles de *C. azarolus*, leur extrait a été testé sur une série de concentrations allant de 25 à 125 $\mu\text{g/ml}$. Cette série de dilution est déterminée suivant les capacités de cette plante à protéger les hématies contre les pyroxyles radicalaires induits par AAPH. En effet la concentration 25 $\mu\text{g/ml}$ est celle qui a montré l'effet de protection le plus faible indiquant que les molécules à caractère antioxydant sont faiblement présentes à cette concentration. Cette activité s'est améliorée progressivement avec la concentration : 75 et 125 ($\mu\text{g/ml}$). A la concentration de 125 $\mu\text{g/ml}$, la capacité de réduire le dommage membranaire de GRs est maintenue au maximum pendant toute la période d'incubation, l'effet anti-hémolytique est de 90% après 5 h d'incubation.

La figure (27, **B**) confirme que le phénomène de protection des hématies contre la peroxydation membranaire est dépendant de la concentration de l'extrait testé. L'IC 50 est estimé de $65,14 \pm 5,15$ $\mu\text{g/ml}$ mais qui reste supérieur à celle de *C. albidus* et bien évidemment à celle de la rutine.

Des études indépendantes ont rapporté que des extraits de *C.azarolus* sont riches en pro-anthocyanidines et les flavonoïdes et beaucoup de ces composés phénoliques se sont avérés doués d'effet cytoprotecteurs, en réduisant le stress oxydatif (Ljubuncic *et al.*, 2005).

C. Effet anti-hémolytique de *R. alaternus*

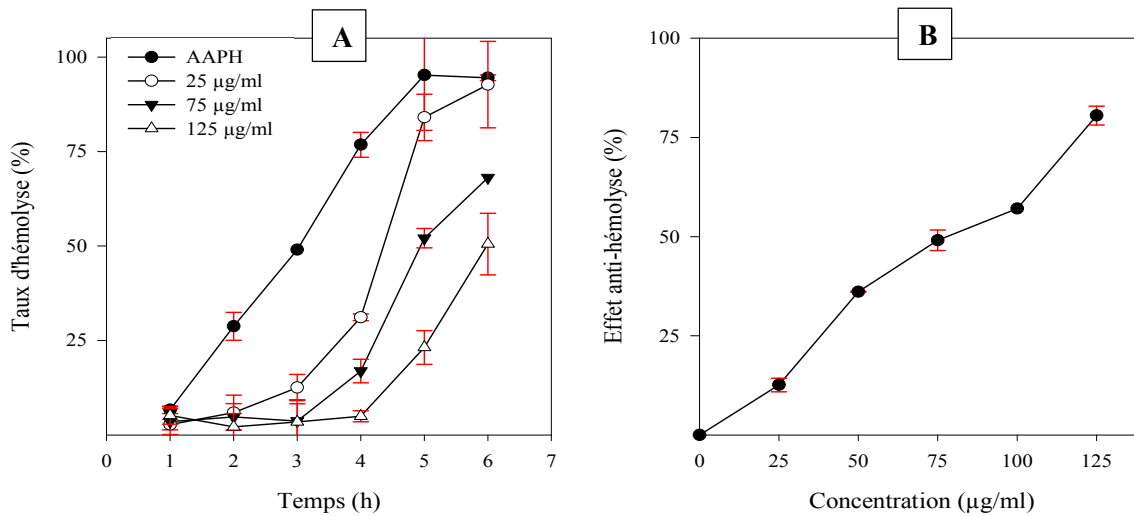


Figure 28 : effet protecteur de l'extrait de *R. alaternus* contre l'hémolyse induite par AAPH. **A :** effet hémolytique en fonction du temps en présence d'AAPH. **B :** effet anti-hémolyse en fonction des concentrations. -Toutes les valeurs sont la moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

D'après les résultats qu'on a obtenus des feuilles de *R.alaternus*, on a constaté qu'il y a un bon effet protecteur de l'extrait pendant les deux premières heures, donc il n'y a pas d'effet hémolytiques, et ce, pour toutes les concentrations (25,75 et 125µg/ml). A partir de la troisième heure on remarque une petite augmentation dans l'allure de la courbe au niveau de la concentration 25 et 75 µg/m, tandis que la concentration 125µg/ml a gardé son efficacité de protection des GRs contre les attaques oxydatives exercées par l'AAPH.

Après la quatrième heure la progression de l'effet hémolytique provoqué par l'AAPH commence à augmenter pour toutes les concentrations mais d'une façon toujours proportionnelle à ces dernière. En effet, après six heures de contact des hématies avec l'AAPH, l'hémolyse oxydative est estimé à 98 %, 67 % et 48% pour les concentrations 25, 75, 125 µg/ml respectivement.

La concentration d'inhibition de l'effet hémolyse oxydative à 50%, calculée après 5h, de l'extraits de *R.alaternus* est de 75 µg /ml.

Pour conclure, l'extrait de *R.alaternus* a joué un rôle très efficace à retarder l'hémolyse en raison de son capacité à réduire directement les radicaux libre et régler l'activité anti hémolytique des GRs contre les endommagement forcé par le AAPH.

D .Effet anti-hémolytique de *L. implexa*

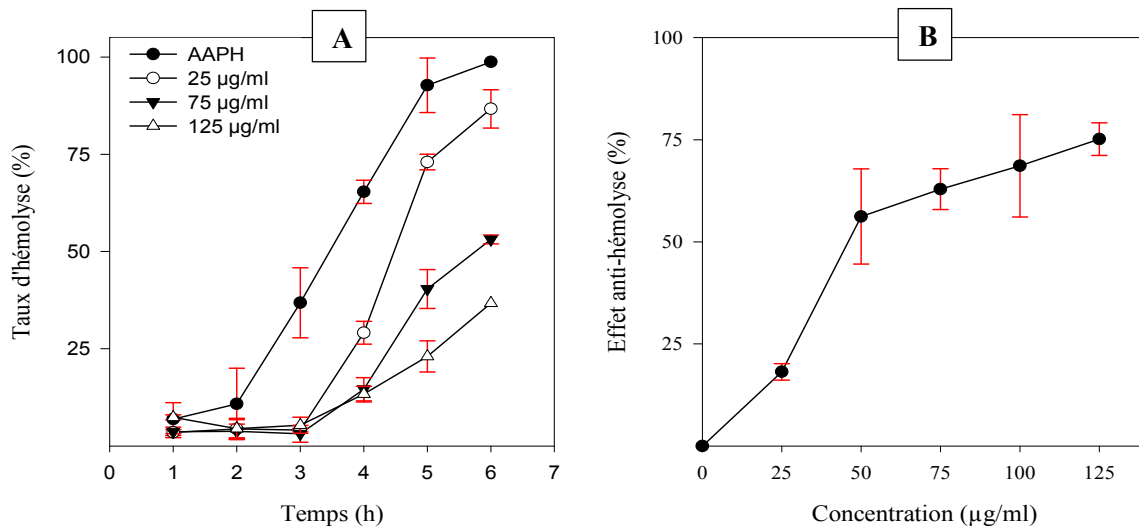


Figure 29 : effet protecteur de l'extrait de *L. implexa* contre l'hémolyse induite par AAPH. **A :** effet hémolytique en fonction du temps en présence d'AAPH. **B :** effet anti-hémolyse en fonction des concentrations. -Toutes les valeurs sont la moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

Les résultats de la figure 29, montre que, l'effet hémolytique exercés par AAPH est proportionnellement inverse par rapport aux différentes concentrations testées sur les GRs. En effet, l'inhibition de l'effet hémolytique manifesté par cette plantes est maintenue à son niveau maximal pendant les trois premiers heures (1,2 et 3h) en le comparant à l'effet d'AAPH seul avec les GRs. C'est-à-dire que l'effet hémolytique et la stabilité des hématies est retardé jusqu'à 3 h d'incubation. A partir de 3 h, l'effet déstabilisateur et destructeur de AAPH sur la membrane commence à se manifesté d'une façon dépendante avec les concentrations testées (25, 75, 125µg/ml) (figure 29, A). En effet, l'extrait, à la concentration 25µg/ml pendant 4, 5 et 6 h est dominé par l'effet hémolytique d'AAPH. Alors que, à la concentration 125 µg/ml on constate, pendant cette période, un effet protecteur relativement remarquable, en comparaison, aux concentrations 25, 50, 75 et 100µg/ml. Ces résultats indiquent qu'il y a un rôle antioxydant de la plante.

L'IC 50 exprimé par cette plante Le temps d'inhibition à 50% a été de 5h lorsque la concentration de l'extraits de *L.implexa* était de 45µg /ml.

Tout comme les autres plantes testée, l'effet anti-hémolyse de l'extrait de feuilles de *L. implexa* s'est montré dépendant des concentrations (figure 29, B). D'après cette figure, l'IC 50 est estimée à $46,17 \pm 4.74$ µg/ml ; une concentration nettement efficace par rapport à celles des feuilles de *C. azarolus* et *R. alaternus*.

L. implexa a été citée dans l'étude réalisée par Flamini et ces collègues (1997) pour la présence dans ces feuilles des composés de type flavonoïdes : implexa flavone (1),

3-methoxyquercetin 7-O- β -D-glucopyranoside. Ces composés seraient fort probablement impliqués dans les propriétés anti-hémolytiques de cette plante.

E. Effet anti-hémolytique d'*A. Capillus*

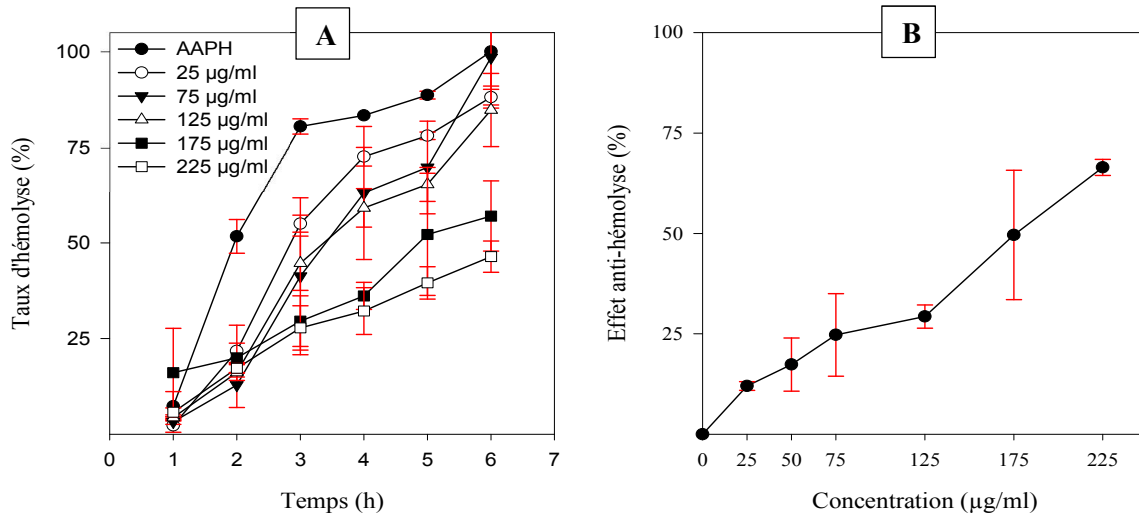


Figure 30 : effet protecteur de l'extrait d'*A. Capillus* contre l'hémolyse induite par AAPH. **A :** effet hémolytique en fonction du temps en présence d'AAPH. **B :** effet anti-hémolyse en fonction des concentrations. -Toutes les valeurs sont la moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

Les feuilles de *A. Capillus* sont tellement faible pour leur effet protecteur, il était nécessaire de les testées à des concentrations très élevées dépassant 125 µg/ml pour constater une activité significativement important à la concentration 175 et 225 µg/ml (figure 30, **A**). En effet l'activité anti-hémolytique à des concentrations inférieures de 125 µg/ml s'est montrée très faible laissant l'AAPH agir sur les hématies sans les détruite.

L'effet anti-hémolyse oxydative est exprimé dans la figue (30, **B**). De cette dernière il est remarqué que l'IC₅₀ de l'extrait de cette plantes est la plus élevée (175, $62 \pm 9,33$ µg/ml) des autres reflétant ainsi une efficacité très faible.

IV.5. Résultats de Chromatographie sur couche mince (CCM)

Pour un essai d'analyse qualitative du contenu de l'extrait de chaque plante on a eu recours à l'utilisation de la chromatographie sur couche mince (CCM) puisqu'elle est une des méthodes de séparation des différents constituants d'un extrait végétal et qui est plutôt simple à mettre en œuvre.

Dans ce travail, la chromatographie sur couche mince a été appliquée, seulement, pour avoir les fractionnements des différents principes des extraits. Pour ce faire, nous avons utilisé deux système de solvant constitué hexane : d'éthyle acétate et toluène : acétone avec le rapport (9 :1/ v : v).

L'analyse des chromatogrammes obtenus avec le mélange de solvant composé d'hexane : d'éthyle acétate, exhibent une série de fractions de couleurs différentes, visualisées à l'œil nu (à lumière du jour) (figure 31). Les résultats présentent des taches de couleurs variées : orange, jaune, bleu, verte, marron qui peut correspondre à plusieurs classes de métabolites secondaires (Georgievskii, 1990).

Les extraits des feuilles, *C. azarolus*, *R. alaternus*, *L. implixa* sont apparues très riches en divers molécules présumées et ont des profils très similaires d'après la figure (31), par contre *A. capillus* donne un profile déférent à celui des autres extraits, tandis que le dépôt de l'extrait de feuille de *C. albidus* ne donne pas une bonne séparation. Ceci étant lié à la nature des substances contenues dans les feuilles de cette plante.

D'autre part, l'autre système Toluène : Acétone (9 :1) de solvant 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. alaternus*, *L. implixa*, les profils sont semblables, indiquant ainsi que ce système de solvant sépare une série de molécules partagées entre les plantes. Cependant *A. capillus* donne un profil différent, donc différents composés. De ce dernier résultat, on signale l'apparition d'une fraction de couleur jeune très intense partagée entre toutes les plantes.

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.

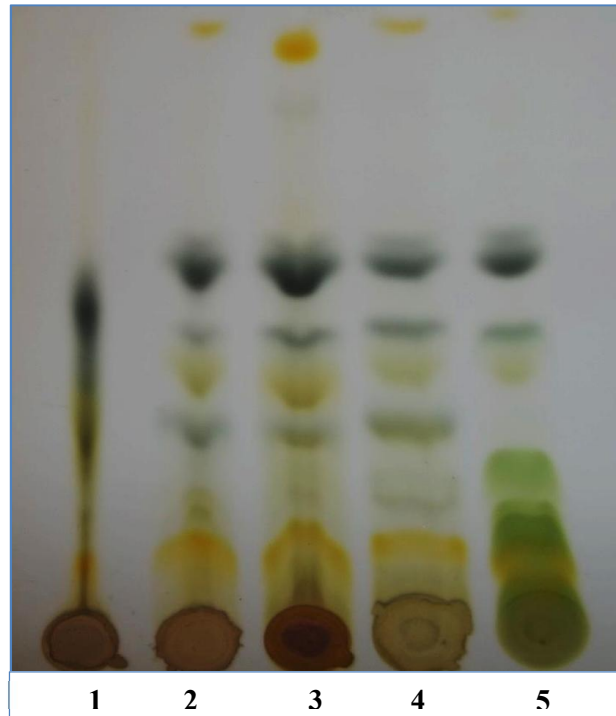


Figure 31: photo des profils chromatographiques avec le mélange, Hexane : Ethyle acétate (9 :1), des extraits des plantes observés au visible. 1 : *C. albidus*. 2 : *C. azarolus*. 3 : *R. alaternus*. 4 : *L. implexa*. 5 : *A. cappilus*.

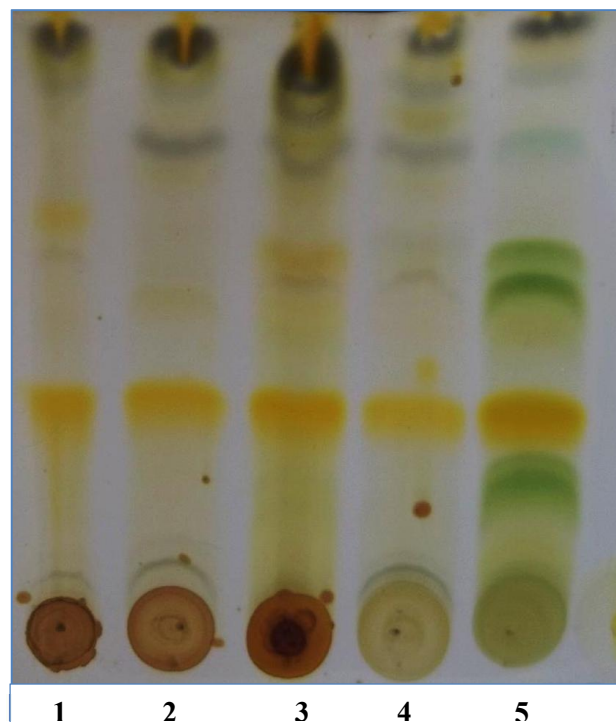


Figure 32 : photo des profils chromatographiques, avec le mélange Toluène : Acétone (9 :1), des extraits des plantes observés au visible. 1 : *C. albidus*. 2 : *C. azarolus*. 3 : *R. alaternus*. 4 : *L. implexa*. 5 : *A. cappilus*.



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 hémolyse 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 ($227,90 \pm 21,97$ mg EAG/g). La même qualité a été constatée pour les feuilles de *C.azarolus* en montrant le meilleur taux des phénols totaux ($244,90 \pm 4,40$ mg EAG/g). Cependant, le taux le plus faible est exprimé par les feuilles d'*A. capillus-veneris* ($50,29 \pm 1,23$ mg EAG/g).

Quant aux teneurs des plantes en flavonoïdes, l'extrait d'*A. capillus-veneris* en est le plus riche en démontrant un taux de ($837,21 \pm 26,49$ mg ER/g), suivi par les extraits des feuilles de *C.albidus* et *R.alaternus* avec des valeurs suivantes ($188,47 \pm 11,52$ et $152,62 \pm 27,76$ mg 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 IC_{50} très basse ($7,21 \pm 1,24$ µg/ml) et la plus proche à celle de standard rutine ($2,85 \pm 0,17$ µg/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 IC_{50} importante d'environ $25,06 \pm 0,15$ µg/ml, alors que les extraits de feuilles de *R.alaternus* et *L.implexa* ont montré des IC_{50} plus élevées ($51,74 \pm 7,03$ et $53,23 \pm 5,24$ µg/ml respectivement).

Tandis que l'extrait d'*A. capillus-veneris* a exprimé une IC_{50} 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. implexa* et *A. capillus*.

Pour l'effet protecteur des hématies contre la peroxydation des lipides membranaire induite par AAPH, l'extrait de *C. albidus* a confirmé, encore une autre fois, son efficacité et sa performance à lutter contre différent type d'oxydants. En effet, cette plante a montré un effet protecteur de la membrane des hématies le plus important ($IC_{50} = 12,03 \pm 1,06 \mu\text{g/ml}$) suivi par l'extrait de *L. implexa* ($46,17 \pm 4,74 \mu\text{g/ml}$). Alors que la plante *A. capillus* est la plus faible contre l'hémolyse des globules rouges dont l' IC_{50} de son extrait est équivalente à ($175,62 \pm 9,33 \mu\text{g/ml}$) ; une valeur très élevée en la comparant à celles des autres plantes et la molécule standard.

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.

Nous concluons à partir de cette étude que les extraits des plantes constituent une source inestimable en divers composés phénoliques doués d'activité antioxydante, ce qui témoigne et justifie leur utilisation en médecine traditionnelle dans le traitement de diverses maladies. Cependant, ces résultats restent partiels et d'autres travaux sur ces plantes s'imposent aux niveaux pharmacologiques et chimiques, car les approches sont restées globales en ne prenant en compte que l'ensemble des composés présents dans les extraits. Il serait essentiel, à l'avenir de préciser la nature des composés phénoliques, en utilisant des méthodes plus avancées telles que l'HPLC, la GC-MS et la RMN.

Aussi, il serait intéressant de tester les composés identifiés individuellement en faisant appel à des tests pharmacologiques *in vivo*. Finalement, il est impératif de vérifier également l'absence d'effets toxiques des composés.



Références bibliographiques

- Aït Youssef, M. (2006). Plantes médicinales de Kabylie. *Édition Ibis Press, Paris*. 349p.
- Aganga, A., Mosase, K.W. (2001). Tannins content, Nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Zizphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lanceaseeds*. *Animal Feed Science and Technology*, 91:107-113.
- Alvarez-Suarez, J.M., Giampieri, F., González-Paramás, A. M., Damiani, E., Astolfi, P., Martínez-Sánchez, G., Bompadre, S., Quiles, J. L., Santos-Buelga, C., Battino, M. (2012). Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*, 50 (5) : 1508-1516.
- Amić, D., Bešlo, D., et Trinajstić, N. (2003). Structure–Radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta CCACAA*, 76: 55-61.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90:7915-7922.
- Akroum, S. (2011). Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. *Thèse de Doctorat en Sciences* (Option: Physio-Toxicologie).
- Arbos, K.A., Claro, L.M., Borges, L., Santos, C.A.M., Weffort-Santos, A.M. (2008). Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. *Nutrition Research*, 28: 457–463.
- Ayad, R. (2008). Recherche et Détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce : *ZYGOPHYLLUM CORNUTUM* (Zygophyllaceae). *Thèse de Magister* (Spécialité Chimie Organique). *Université Mentouri de Constantine*.
- Banerjee, A., Kunwar, A., Mishra B., Priyadarsini, K.I. (2008). Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. *Chemico-Biological Interactions*, 174: 134-139.
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma as a measure of “antioxidant power” the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Ben Ammar R., Kilani S., Bouhlel I., Skandrani I., Naffeti A., Boubaker J., Ben Sghaier M., Bhourri, W., Mahmoud, A., Chekir-Ghedira, L. et Ghedira, K. (2007). Antibacterial and cytotoxic activities of extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae). *Ann. Microbiol.* 57: 453-460.
- Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, M.P., Piatti, E. (2007). Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. *Food Chem*, 104:1635-1640.

- Bozin, B; Mimica-Duric, N; Samojlik, I; Goran, A; Igic, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L. Alliaceae), *Food Chemistry*, 111: 925-929.
- Bruneton, J. (1999). Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2eme édition, Paris : Editions médicales internationales, *Tec et Doc Lavoisier*, p 1120.
- Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition, Paris: *Lavoisier Techniques & Documentation*.
- Boros, B., Jakabova, S., Dornyei, A., Horvath, G., Pluhare, Z., Kilar, F., Felinger, A. (2010). Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, 1217: 7972–7980.
- Belyagoubi, N. (2011). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l’Ouest et du Sud-Ouest Algérien. *Thèse de Doctorat en Biologie, Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen*, p 12.
- Bouزيد, W., Yahia, M., Abdeddaim, M., Aberkane, M. C., Ayachi, A. (2011). Evaluation de l’activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l’*Aubepine monogyne*. *Lebanese Science Journal, Vol. 12, No. 1*
- Bruneton, J. (2009). Menthe in : Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 4e éd., *Tec & Doc, Paris*, p. 631-638. ISBN 978-2-7430-1188-8.
- Çimen, M.Y.B. (2008) Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*, 39: 1-11.
- Chung, S.Y, Landau, J.M. (2000). Effects of tea consumption on nutrition and health. *J Nutr* 130: 2409-12.
- Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Current topics in medicinal chemistry*, 1: 569-590.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents, *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 564-582.
- Crozier, A., Del Rio, D., Clifford, M.N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31: 446–467.
- Da Silva Pinto, M; Maria Lajolo, F; Innés Genovese, M. (2008). Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananasa* Duch), *Food Chemistry*, 107: 1629-1635.
- Derbel, S., Ghedira, K. (2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie et nutrition*, 1: 28-34.

- Decloitre, F. (1993). Impact des facteurs alimentaires sur les mécanismes de la cancérogénèse : bases d'une prévention des cancers par l'alimentation. *Cahiers de Nutrition et de diététique*, 28 (2): 85-95.
- Dewik, P.M. (2009). Medicinal natural products: A Biosynthetic Approach. *John Wiley et Sons. 3rd Edition*. P : 241-243.
- Diallo, A. (2005). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense willd.* (myrtaceae). *Thèse de Pharmacie*. MALI, 99 p.
- Ebrahimzadeh, M. A., Pourmmorad, F., Hafezi, S. (2008). Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turkish journal of biology*, 32: 43-49.
- Edenharder, R., Grünhage, D. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res*, 540: 1–18.
- Fakim, A.G. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 1–93.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.
- Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D. et Guo Z. (1986). Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé*, 64: 159-164.
- Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., Comporti, M.,(1997). Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett*, 416 : 123-129.
- Fiorani, M., Accorsi, A., (2005). Dietary flavonoids as intracellular substrates for an erythrocyte trans-plasma membrane oxidoreductase activity. *Br. J. Nutr*, 94 : 338–345.
- Fiorani, M., de Sanctis, R., de bellis, R., Dachà, M., (2002). Intracellular flavonoids as electron donors for extracellular ferricyanide reduction in human erythrocytes. *Free Radical Biol. Med*, 32 (1): 64–72.
- Flamini, G., Braca, A., Cioni, P. L., Morelli, I. (1997). Three new flavonoids and other constituents from *Lonicera implexa*. *J. Nat. Prod*, 60 : 449-452.
- Girodon, F., Blache, D., Blache, A.L., Monget, M., Lombart, P. Brunet-Lecompte, J. Arnaud, M.J. Richard, P. (1997). Galan, Effect of a Two-Year Supplementation with Low Doses of Antioxidant Vitamins and/or Minerals in Elderly Subjects on Levels of Nutrients and Antioxidant Defense Parameters. *J. Am. Coll. Nutr.* 16 : 357–365.

- Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4: 162-169
- Guingard, J. (1996). Biochimie végétale, *Ed. Lavoisier, Paris*, p 175-192.
- Gauthuret, R.J. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. *Université de Bordeaux*. p 7-87-1234-133.
- Hamburger, M.; Hostettmann, K.; (1991). Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Photochemistry*, 30 (12): 3864–3874.
- Haslam, E. (1994). Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. *Nat. Prod*, 11: 41-66.
- Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology. Therapeutic*, 96: 67– 202.
- Heide, L. (1991). Traditionelle Arzneipflanzen in der Gesundheitsversorgung der dritten Welt-Möglichkeiten und Grenzen. *Zeitschrift für Phytotherapie*, 12:1-8.
- Hertog, M. G. (1996). Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proceeding of the nutrition society*, 55 (1B): 385-397.
- Heim, E.K.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584.
- Hemingway, R.W. (1992). Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: *Lplant polyphenols: synthesis, properties, significance. Laks P.E, Hemingway R.W New York*.
- Hseu, Y.C., Lee, C., Lee, C.C., Chen, Y.C., Kumar, K.J, Chen, C.S., Tsai, C.T., Huang, H.C., Wang, H.H. et Yang ,H.L.(2014). Antrodia salmoneain submerged culture exhibits antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*, 66: 150–157.
- Hubert, A.J. (2006). Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine, *Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, école doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries, spécialité : qualité et sécurité des aliments*, p 174.
- Iserin, P. (2001).Larousse Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation et soins .*Ed Larousse*, p 10-12.
- Jayasuriya, D.C. (1990). A review of legislation concerning medicinal plants. *Unpublished Report*.

- Jain, N., A. Magan and S. M. Sondhi. (1992). Determination of mineral elements present in medicinal plants used for development of health, for treatment of cough and vomiting, pyorrhoea and rheumatic and allied disorder. *Indian Drugs* 30: 190- 194.
- Jeong, H.J., Chung, H.S., An, H.J., Seo, S.W., Kim, T.G., Won, J.H., Shin, J.Y., Ahn, K.S., Kim, H.M. (2004). The immune-enhancing effect of the herbal combination Bouum-Myunyu-Dan. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 29–33.
- Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., & Kujala, T. S. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954–3962.
- Khadri, A., Neffati, M., Smiti, S., Fale, P., Lion, A., Rosa L., Serralheiro, M., Luisa M., Araujo, M., Eduarda, M. (2009). Antioxidant, anti-acetyl cholinesterase and anti-microbial activities of *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (lemongrass) from Tunisia. *LWT-Food Science and Technology*, 43:331-336.
- Kansole, M.M.R. (2009). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques Lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* Vahl et *Orthosiphon pallidus* Royle ex Benth. *Mémoire pour obtenir un diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A)* en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.
- Kanoun, K. (2011). Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Houaïra). *Thèse de Magister, université Aboubekr Belkaid Tlemcen*, p14.
- Koolman, J.; and Roehm, K. H. (2005). *Color Atlas of Biochemistry*, 2nd edition. Thieme. Stuttgart. New York. 467p.
- Kohen, R., Nyska, A. (2002) Oxidation of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. 30: 620-650.
- Kumar, M., M. Ramesh and S. Sequiera. (2003). Medicinal pteridophytes of Kerala, South India. *Indian Fern J.* 20: 1-28.
- Kumaran A, Karunakaran RJ. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of *Phyllanthus* species from India. Volume 40. *Lebens-Wiss Technologie*, 344-352.

- Kubola, J. et Siriamornpun, S. (2008). Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) Leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food Chemistry*, 110: 881–890.
- K. Rebbas, R. Bounar, R. Gharzouli, M. Ramdani, Y. Djellouli, D. Alatou. (2012). Plantes d'intérêt médicinal et écologique dans la région d'Ouanougha (M'Sila, Algérie). *Phytothérapie* 10:131–142.
- Li, Q. L., Li, B. G., Zhang, Y., Gao, X. P., Li, C. Q., Zhang, G. L. (2008). Three angiotensin-converting enzyme inhibitors from *Rabdosia coetsa*. *Phytomedicine* 15 386–388.
- Liégeios, C., Lermusieau, G., et Collin, S. (2000). Measuring antioxidant efficiency of wort, malt and hops against the 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride-induced oxidation of an aqueous dispersion of linoleic acid. *J Agric Food Chem*, 48:1129-1134.
- Lin, J.K., Weng, M.S. (2006). Flavonoids as Nutraceuticals. In: The science of flavonoids. Grotewold, E. Eds, Springer, p 217.
- Lorrain, E. (2013). La phytothérapie : 100 questions sur la phytothérapie, p 220.
- Ljubunčić, P., Portnaya, I., Cogan, U., Azaizeh, H., Bomzon, A. (2005). Antioxidant activity of *Crataegus aronia* aqueous extract used in traditional Arab medicine in Israel. *Journal of Ethnopharmacology* .101: 153–161
- Lhuillier, A. (2007). Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* hook Fexoliver, *Agauria polyphlia* baker (ERICACEAE), *Tambourissa trichophylla* baker (MONIMIACEAE) et *Embelia concinna* baker (MYRSINACEAE). *Thèse de Doctorat, Université de Toulouse*, p 20-28-152-153.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A. et Jay-Allemand, C.H. (2005). Les composés phénoliques des végétaux. *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes*, p 192.
- Martin, S., Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, 51 : 304–315.
- Manach, C., Mazur, A., Scalbert, A. (2005). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, 16: 1–8.
- Maamri, S. (2008). Etude de *pistacia atlantica* de deux régions de sud algérien : dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. *Mémoire de Magister Université de Boumerdes*, P 10 11 12 35 57.
- Maisuthisakul, P, Suttajit, M, Pongsawatmmit, R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some that indigenous plants, *Food Chemistry*, 100:1409-1418.

- Mates J.M. & Sanchez-Jimenez F.M., (2000). Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 32: 157-170.
- Meir S, Kanner J, Akiri B, Hadas SP. (1995) .Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J Agric Food Chem*, 43:1813-1817.
- Mitra, S. (2003). Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. *John Wiley & Sons edition. Hoboken, New Jersey*, 162-458.
- Meot-Duros, L., Magne, C. (2009). Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 37–41.
- Mendes, L., Freitas, V., Baptista, P., Carvalho, M. (2011). Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo*L.) leaf and fruit. *Food Chem. Toxicol.* doi:10.1016/j.fct.2011.06.028.
- Mounchid, K., Dersi N., Bellik, A., Aboussaouira, T., Rachidai, A., Zarrouck, K., Tantaoui Elaraki, A. et Alaoui-Ismaili, M. (2004). Caractérisation chimique et recherche de l'effet antibactérien des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*, *Eucalyptus globulus* et *Mentha pulegium* du sud marocain. *Biotechnologies, Congrès International de Biochimie*, Marrakech, 525 - 527.
- Najjaa, H., Zouari, S., Arnault, I., Auger, J., Ammar, E., et Neffati, M. (2011). Différences et similitudes des métabolites secondaires chez deux espèces du genre *Allium*, *Allium roseum* L. et *Allium ampeloprasum* L. *Acta Bot. Gallica*, 158 : 111-123.
- Norman, R., Farnsworth., Olaiwola, A., Bingel, S., Soejarto, D., et Zhengang, G. (1986).Place des plantes médicinales dans la thérapeutique .*Bulletin de l'organisation mondiale de la santé*, 64: 159-175.
- OMS. (1991). Organizacion Mundial de la Salud. Pautas para l'evalucion de medicamentos herbarios. Ginebra.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on the products of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn. J. Nutr*, 44: 307–315.
- Özgüven, M., Tansi, S. (1998). Drug yield and essential oil of *Thymus vulgaris* L as in influenced by ecological and ontogenetical variation. *The Turkish journal of agriculture and forestry*, 22: 537-542.
- Pawlowska AM, De Leo M, Braca A. (2006). Phenolics of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) fruits: Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (26): 10234-38.

- Pannangpetch, P., Laupattarakasem, P., Kukongviriyapan, V., Kukongviriyapan, U., Kongyingyoes, B. et Aromdee, C. (2007). Antioxidant activity and protective effect against oxidative hemolysis of *Clinacanthus nutans* (Burm.f) Lindau. *Songklanakarinn J. Sci. Technol*, 29: 1-9.
- Park, H J., Cha, H C. (2003). Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. *Korean journal of biological society*, 7: 327-330.
- Parejo, I ; Viladomat, F ; Bastida, J ; et al. (2003). Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity, *Life Sci*, 73 : 1667-81.
- Pawlikowska-Pawlega, B., Wieslaw, I., Gruszeckib, L.E., Misiakb, A.G., (2003). The study of the quercetin action on human erythrocyte membranes. *Biochem. Pharmacol*, 66 : 605–612.
- Peter C. H. HoUrnan, MichaEl G. L. Hertog” & Martijn B. Katanc.(1996). Analysis and health effects of flavonoids. *Food C/tern&y*, Vol. 51, No. 1, pp. 4346.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63:1035–1042
- Puri, G. S. and R. K. Arora. (1961). Some medicinal ferns from Western India. *Indian Forester*. 87: 179-183.
- Rates, S.M.K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39: 603–613.
- Ribereau, G.P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux, *Dunod, Paris*, p254.
- Reynertson, K.A. (2005). Plants That Fight Cancer. *Economic Botany*, 59:201-202.
- Reid, W.V., Laird, S.A., Meyer, C.A., Gamez, R., Sittenfeld, A., Janzen, D.H., Gollin, M.A., et Juma, C. (1993). Biodiversity Prospecting: Using Genetic Resources for Sustainable Development, *World Resources Institute (USA)*.
- Robards, K., Prenzeler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P.; Glover, W. (1999) .Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruit. *Foods Chemistry*, 66:401-436.
- Rolland, Y. (2004). Antioxydants naturels végétaux. *OCL*, 11:419-424.
- Rouhi, A.M. (1997). Seeking drugs in natural products. *C and EN* ,7: 14–29.
- Sadok, G. (2009). La phytothérapie .*Ecole supérieure des sciences et techniques de la sante de Sousse*.p2.
- Rajeshwari, C.U., Shoba, R.I., Andallu, B. (2012). Antihemolytic activity of various fractions of methanolic extract of coriander (*Coriandrum sativum* L.) leaves and seeds: a comparative study. *Pakistan J. Biol. Sci.* 22, 1–6.

- Sarni-Manchado, P., et Cheynier, V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire, *Ed. Lavoisier (Tec & Doc), Paris*, 300-398.
- Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., et Remesy, C. (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed. Pharmacother.* 56:276-282.
- Shu, Y.Z. (1998). Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products*, 61: 1053–1071.
- Siddhuraju, P., Becker, K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) seed extracts. *Food Chemistry*, 101(1):10-19.
- Skerget, M., et Kotnik, P., Hadolin, M., Rizner Hras, A., Simonic, M. Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89:191-198.
- Strang, C. (2006). Larousse médical. *Ed Larousse*.
- Schauenberg, P., et Paris, F. (2005). Guide des plantes médicinales : analyse, description et utilisation de 400 plantes. *Ed : Delachaux et Niestle*, p204-207.
- Suwalsky, M., Orellana, P., Avello, M., Villena, F., 2007. Protective effect of Ugnimolinae Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. *Food Chem. Toxicol*, 45: 130-135.
- Scott, R. (2003). Principles And Practice Of Chromatography. BOOK 1, Chrom-Ed Book Series. *Library for science*. 100p.
- Sohal, R.S., Mockett, R.J., Orr, W.C. (2002). Mechanisms of aging : an appraisal of the oxidative stress hypothesis, *Free radical biology & medicine*. 33: 575-586.
- Sergeant C., Hamon C., Simonoff M., Constans J., Conri C., Peuchant C., Delmas-Beauvieux M-C., Clerc C., Pellegrin J.L., Leng B., Pellegrin I. & Fleury H. (1998). Oxidative Stress in Cancer, AIDS and neurodegenerative diseases. Editors: L. Montagnier, R. Olivier, C. Pasquier; Marcel Dekker. Inc. *New York- Basel-Hong Kong*, 409-427.
- Singh, K. K., S. Saha and J. K. Maheshwari. (1989). Ethnomedicinal uses of some ferns among the tribals of Uttar Pradesh. *Indian Fern J.* 6: 63-67.
- Tapiero, H., Tew, K.D., Nguyen, Ba.G., et Mathé, G. (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedical, Pharmacotherapy*, 56: 200-207.
- Tiqwari, A.K. (2001). Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. *Current science*, 81 (9): 1179-1181.
- Tiwari, S. (2008). Plants: A Rich Source of Herbal Medicine. *Journal of Natural Products*, 1:27-35.

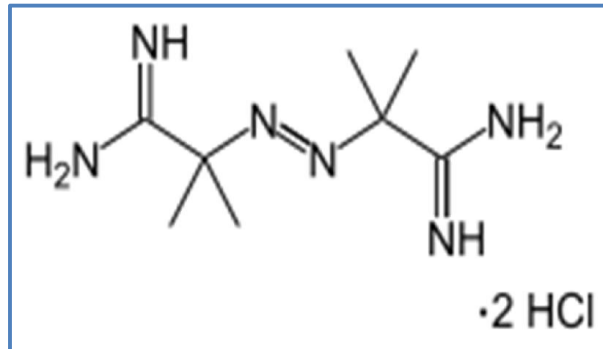
- Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Endo Y, Tamaki N, Sanbe T, Murakami J, Yamamoto T, Morita M. (2009). Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. *J. Periodontol.*, 80 (11): 1799-808.
- Tomas Vogt et Paul Gerhard Gultez. (1994). Accumulation of flavonoids during leaf development in *cistus laurifolius*. *Phytochemistry*, vol. 36. 3. 591-597.
- Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J.M., Busco, F., Bompadre, S., Quiles, J.L., Mezzetti, B., Battino, M., (2011). Strawberry consumption improves plasma antioxidant status and erythrocyte resistance to oxidative hemolysis in humans. *Food Chem*, 128: 180–186.
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M.A., Nilsa, R.D., Huang, P. (2008). Redox regulation of cell survival. *Antioxid. Redox. Signal.* 10, 1343–1374.
- Vansant, G. (2004) Radicaux libres et antioxydants : principes de base. *Ed Institut Danone*.
- Vermerris, W., et Nicholson, R. (2006). Phenolic Compound Biochemistry. *Springer Science. Netherlands*. p276.
- Valente, M.J., Baltazar, A.F., Henrique, R., Estevinho, L., Carvalho, M. (2011). Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. *Food Chem. Toxicol*, 49:86-92.
- Villano D., Fernandez-Pachon M.S., Moy M.L., Troncoso A.M., Garcia-Parrilla M.C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71, 230-235.
- Vulto, A.G., et Smet, P.A.G.M. (1988). In: Dukes, M.M.G. (Ed.). *Meyler's Side Effects of Drugs*. Elsevier, Amsterdam, p 999–1005.
- Williamson, E., Okpako, D.T., Evans, F.J. (1996). Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. *Reviews and current literature*, p250.
- Wojdylo, A., Oszmianski, J., et Czemerys R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compound in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105:940-949.
- Yao, L.H., Jiang, Y.M., SHI, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S. (2004). Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr*, 59: 113-122.
- Yakhlef Ghania. (2010). Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* L. ET *Laurus nobilis* L. *thèse de MAGISTER*. p50.
- Yoo, J.W., Irvine, D.J., Discher, D.E., Mitragotri, S. (2011). Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 521–535.

- Zou, C.G., Agar, N.S, Jones, G.L. (2001). Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical initiator AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture. *Life Sciences*, 69: 75–86.

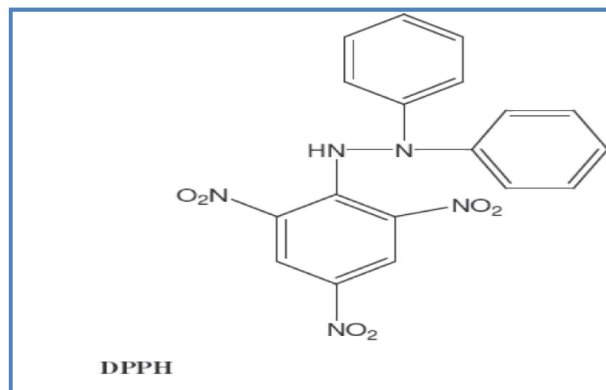


Annexes

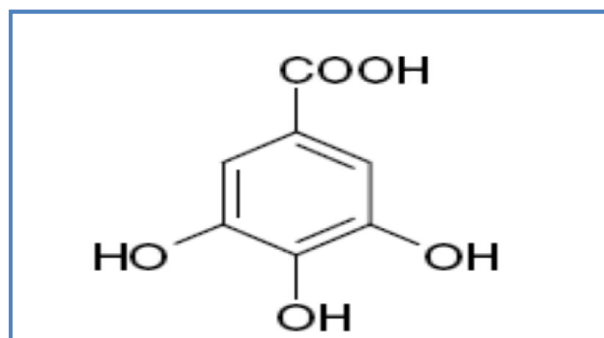
Annexe I : structure de la molécule d'AAPH (Liégeois *et al.*, 2000)



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



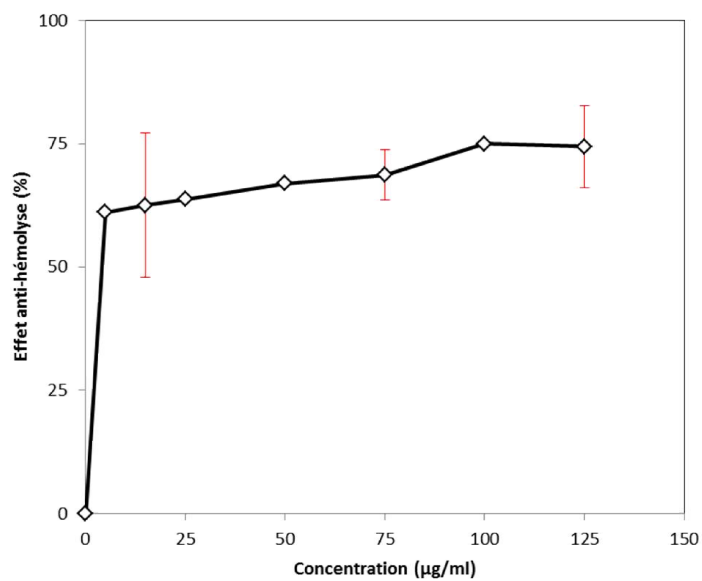
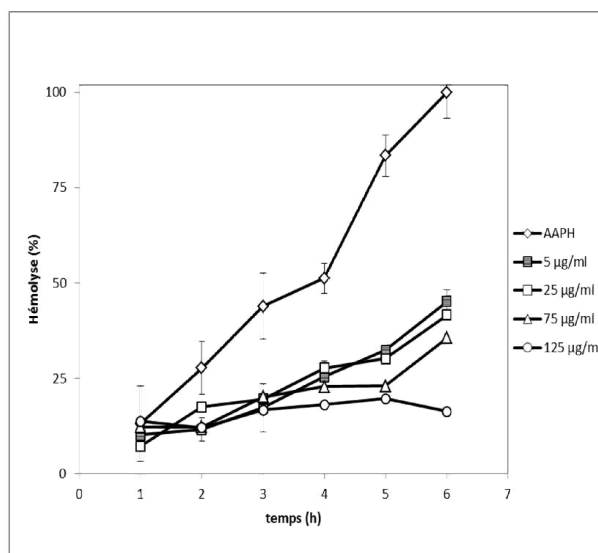
Annexe III : structure de l'acide gallique (Kubola et Siriamornpun, 2008).



Annexe IV (tableau VI): La concentration d'inhibition de l'effet hémolyse oxydative à 50%

Extrait éthanolique	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
<i>C. albidus</i>	12,03 \pm 1,06
<i>C. azarolus</i>	65,14 \pm 5,15
<i>R. alaternus</i>	79,37 \pm 6,03
<i>L. implexa</i>	46,17 \pm 4,74
<i>A. capillus</i>	175,62 \pm 9,33
Rutine	2,34 \pm 0,56

Annexe V : effet d'hémolyse oxydative sur les hématies et anti hémolyse de la rutine





Synthèse bibliographique



Partie expérimentale