

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Mentouri de Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Spécialité : Toxicologie et Santé

THEME :

**Evaluation de quelques activités biologiques d'une
plante endémique**

"Limonium sp"

Présenté et soutenu par : Bouhala Roukia

le 23 juin 2014

Bouhlais Meriem

Devant le jury :

Président du jury :	Mr. Menad Ahmed	Prof.	Université Mentouri de Constantine
Rapporteur :	M^{me} Amrani Amel	M.C	Université Mentouri de Constantine
Examineur :	M^{elle} Ihoual Safia	M.A	Université Mentouri de Constantine
	Mr. Bouldjaj Redouane	M.A	Université Mentouri de Constantine

Année universitaire

2013 /2014

دعاء

اللهم لا تجعلنا نصاب بالغرور إذا نجحنا
ولا باليأس إذا أخفقنا فذكرنا بان الإخفاق هو التجربة التي تسبق النجاح
اللهم إذا أعطيتنا فلا تأخذ منا تواضعنا
فإذا أعطيتنا تواضعا فلا تأخذ منا اعتزازنا بأنفسنا
ربنا تقبل الدعاء

remerciement

Nous tenons à remercier tout d'abord ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé, la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire. Nous remercions chaleureusement notre encadreur M^{me} Amrani Amel pour son aide précieuse et ses conseils éclairés dans la direction de notre travail, ainsi que pour sa grande disponibilité et son immense gentillesse.

Nous remercions les membres du jury : Pr Menad Ahmed et M^{elle} Ihoual Safia et Bouldjaj Radouane d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

Nous remercions Monsieur Lalaoui Korrichi et M^{me} Amedah Souad ainsi que tous les enseignants du département de biologie animal pour leur contribution a notre formation et leur disponibilité à orienter les étudiants.

Nos derniers remerciements et ce ne sont pas les moindres, vont

À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à :
Ma très chère mère qui a sacrifié ses belles nuits
rien que pour me voir réussir, et qu'a été
toujours pour moi une source de tendresse et de
courage.*

*Mon très cher père qui est ma source d'espoir,
du savoir, son courage et sa patience toujours
pour moi autant d'exemple.*

Mon marié : Abd elrahmen et sa famille

Ma soeur : Amira

Mes frères : Chouaib-Idris-Raouf

Ma grande mère et tous mes oncles.

Tous mes proches

Mes amis

Mes camarades de promotion

Tous mes enseignants

*Tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de
cette mémoire*

Meriem

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à :
Ma très chère mère qui a sacrifié ses belles nuits
rien que pour me voir réussir, et qu'a été
toujours pour moi une source de tendresse et de
courage.*

*Mon très cher père qui est ma source d'espoir,
du savoir, son courage et sa patience toujours
pour moi autant d'exemple.*

Mon frère : Attef

*Ma grande mère et toutes mes tantes et mes
oncles.*

Tous mes proches

Mes amis

Mes camarades de promotion

Tous mes enseignants

*Tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de
cette mémoire*

Roukia

Liste des Abréviations

ASAT	Aspartate transaminase
ALAT	Alanine transaminase
TNB	Acide thionitrobenzoïque
TBA	Thiobarbiturique
PBS	phosphate tampon salin
TCA	Acide trichloracétique
DTNB	Acide 5, 5'- dithiobis 2-nitrobenzoïque
DPPH	1,1-diphényle-2-picrylhydrazyl
GAE	Equivalent acide gallique
QE	Equivalent quercétine
TGO	Aspartate transaminase
TGP	Alanine transaminase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
LDL	Lipoprotéine de faible densité
CO	Cyclooxygénase
LO	Lipooxygénase
RH	Acide gras polyinsaturés
SOD	Superoxyde dismutase
MDA	Malondialdéhyde
GSH	Glutathion réduit
GPx	Glutathion peroxydase
GSSG	Glutathion-disulfure
GR	Glutathion-disulfure
g	Gramme
mg	Milligramme
µg	Microgramme
L	Litre

ml	Millilitre
µl	Microlitre
nm	Nanomètre
m	Mètre
mg/ml	Milligramme par millilitre
mg/l	Milligramme par litre
µg/ml	Microgramme par millilitre
mg/kg	Milligramme par kilogramme
g/kg	Gramme par kilogramme
nmol/gr	Nanomole par gramme
UV	Ultra-violet
Da	Dalton
I%	Pourcentage d'inhibition
K(%)	L'activité scavenger du lipide peroxydation
AC	Absorbance control
AS	Absorbance échantillon testé
DO	Densité optique
%	pourcentage
°C	degré Celsius
IC₅₀	concentration inhibitrice à 50%
Ls	<i>Limonium sp</i>
LPO	Liperoxydation

Liste des Figure

Figure1 : Effets biologiques des polyphénols	5
Figure2 : Structures chimiques de principaux polyphénols	8
Figure3 : Squelette de base des flavonoïdes.....	10
Figure 4 : Structures des différentes classes de flavonoïdes.....	11
Figure 5 : Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.....	12
Figure 6 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.....	16
Figure 7 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants.....	20
Figure 8 : Récapitulatif de l'extraction des parties aériennes de <i>Limonium sp</i>	24
Figure 9 : Pourcentage de l'activité antiradicalaire de l'extraits <i>n</i> -butanol de <i>Limonium sp</i> vis-à-vis du radical libre DPPH.....	30
Figure 10 : Inhibition de la peroxydation lipidique par l'extrait butanolique de <i>Limonium sp</i>	31
Figure 11 : Effet de l'éthanol, de l'extrait butanolique de <i>Limonium sp</i> sur la fonction hépatique et sa libération des transaminases TGO et TGP.....	31
Figure12 : Effet de l'extrait butanolique de <i>limonium sp</i> sur la production du MDA dans les cellules hépatiques.....	32
Figure 13 : Effet de l'extrait butanolique de <i>limonium sp</i> sur le niveau de GSH dans le foie.....	33
Figure 14 : Effet préventif de l'extrait butanolique de <i>Limonium sp</i> sur la défense enzymatique antioxydant (GPx) dans les hépatocytes, sous l'effet d'un stress oxydant induit par l'éthanol chez les rats.....	34

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principales classes de composés phénoliques.....**6**

Tableau 2 : Rendement des extraits.....**29**

Sommaire

Introduction

Revue bibliographique

Chapitre I : Les composés phénoliques

1. Les plantes médicinales.....	2
2. Les principes actifs des plantes.....	2
2.1. Les huiles essentielles.....	2
2.2. Les saponines.....	2
2.3. Les alcaloïde.....	3
2.4. Les mucilage.....	3
2.5. Les vitamines.....	3
2.6. Les glucosides.....	3
2.7. Les polyphénols.....	4
2.7.1. Les acides phénoliques.....	8
2.7.2. Tannins.....	8
2.7.3. Flavonoïdes.....	9

Chapitre II : Stress oxydant

1. Le stress oxydant.....	15
1.1. Le stress oxydant.....	15
1.2. Le radical libre	15
1.3. Source des radicaux libre.....	15
1.4. Nature des espèces réactives oxygénées (ERO).....	16
1.4.1. Anion superoxyde.....	16
1.4.2. Le peroxyde d'hydrogène.....	17
1.4.3. Radical libre hydroxyle.....	17
1.4.4. Les radicaux alkyles R• et peroxydes ROO•.....	17
1.4.5. Le monoxyde d'azote.....	17
1.4.6. Oxygène singulet.....	18

1.5. Les dégâts cellulaires.....	18
1.5.1. Oxydation des protéines.....	18
1.5.2. Peroxydation lipidique.....	19
1.5.3. Dégradation par oxydation de l'ADN.....	19
2. Les antioxydants.....	19
2.1. Définition.....	19
2.2. Classification des antioxydants.....	20
2.2.1. Systèmes antioxydants enzymatiques.....	20
2.2.1.1. La superoxyde dismutase.....	20
2.2.1.2. La catalase.....	21
2.2.1.3. La glutathion peroxydase.....	21
2.2.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques.....	21
2.2.2.1. Le système glutathion.....	21
2.2.2.2. L'acide urique.....	21
2.2.2.3. Autres anti-oxydants.....	21

Chapitre III: Matériels et méthodes

1. Matériel végétal.....	23
2. Extraction.....	23
3. Dosage des composés phénoliques totaux.....	25
4. Dosage des flavonoïdes totaux.....	25
5. Dosage de l'activité antiradicalaire DPPH.....	25
6. Inhibition de la peroxydation lipidique.....	25
7. Modèle expérimental <i>In vivo</i>	27
7.1. Évaluation <i>in vivo</i> de la peroxydation lipidique.....	27
7.2. Évaluation de l'activité enzymatique de GPx.....	27
7.3. Dosage de glutathion hépatique.....	28
7.4. Test de la fonction hépatique.....	28
8. Évaluation statistique.....	28

Chapitre IV: Résultat et discussion

1. Rendements d'extraction.....	29
---------------------------------	----

2. Dosage des composés phénoliques et flavonoïdes totaux.....	29
3. Évaluation du pouvoir antioxydant.....	29
4. Evaluation in vitro de la peroxydation lipidique.....	30
5. Effet de l'éthanol sur la fonction hépatique et l'action hépatoprotecteur de l'extrait butanolique.....	31
6. Évaluation LPO et l'action protecteur de l'extrait butanolique	32
7. Effet de l'éthanol, de l'extrait butanolique sur le niveau de GSH.....	32
8. Effet de l'éthanol, de l'extrait butanolique sur l'activité enzymatique de GPx.....	33
Conclusion.....	36

Références bibliographiques

Introduction

Introduction

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies [1]

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes. [2]

La plupart des espèces végétales contiennent des substances qui peuvent agir, à un niveau ou un autre, sur l'organisme humain et animal. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie. Elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus. [2]

Les plantes médicinales sont à la fois un produit fini destiné à la consommation et une matière première pour l'obtention de substances actives [25], telles que les métabolites secondaires qui représentent une variété très large de composés organiques sans fonction directe dans la croissance et le développement des plantes [4, 58] ces molécules constituent souvent la base des principes actifs des plantes médicinales. [5]

Les antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt certain dans la conservation des denrées comestibles, ils pourraient s'avérer utiles dans la prophylaxie et le traitement des maladies dans lesquels le stress oxydant est incriminé. En effet, le stress oxydant est la principale cause initiale de plusieurs maladies. [27] C'est le facteur potentialisant l'apparition des maladies plurifactorielles telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires. [7]

Cependant, l'évaluation des propriétés phytopharmaceutiques et antioxydante demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine traditionnelle. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs.

L'objectif de notre étude est d'estimer la teneur d'une espèce végétale endémique, *Limonium sp* en composés actifs essentiels, les polyphénols totaux et les flavonoïdes obtenus dans les parties aériennes de la plante et d'en évaluer leur pouvoir biologique de bloquer l'action des EOR et de protéger l'organisme contre les endommagements oxydatifs qu'elles peuvent induire en utilisant des systèmes chimiques et biologiques *in vitro* et *in vivo*.

Chapitre I
Plantes et composés
phénoliques

1. Les plantes médicinales

Les plantes médicinales sont utilisées depuis longtemps comme remèdes contre plusieurs maladies. A titre d'exemple, l'ail, le gingembre, la menthe, le thym, la sauge, le fenugrec, le genévrier, l'origan et l'absinthe sont utilisés comme antiseptiques, anti-inflammatoires, antiparasitaires et pour la stimulation de la digestion et le traitement de plusieurs maladies gastro-intestinales. [59, 60]

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable des substances et composés naturels bioactifs. [3] Plusieurs milliers de plantes sont utilisées par le monde. Leur champ d'action est vaste et leur puissance varie. La plupart ont des effets spécifiques sur certaines parties de l'organisme et sont reconnues pour pouvoir traiter divers cas. [2]

L'Algérie par son climat (méditerranéen, aride) et la nature de ses sols, possède une flore particulièrement riche en plantes médicinales et aromatiques dont la plupart existe à l'état spontané. La valorisation des plantes médicinales et aromatiques est un domaine particulièrement intéressant à développer car c'est une source de produits à haute valeur ajoutée. [111]

2. les principes actifs des plantes

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes. [2] Il s'agit la plus part du temps des produits du métabolisme de la plante qui, d'un point de vue chimique, peuvent appartenir aux groupes de substances les plus variés. [8] L'activité de ces substances dépend principalement de leur nature chimique et de leur concentration. [61]

2.1. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles extraites des plantes par distillation comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes, [2] Sont des composés volatils, oléagineux, dans la plus part des cas à la senteur aromatique, qui peuvent avoir une action très variée. Certaines possèdent ainsi des vertus anti-inflamatoires, tandis que d'autres sont antispasmodiques, diurétiques ou expectorantes.[8] Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : feuilles, fleurs, écorces, rhizomes, fruits et graines. [62]

2.2. Les saponines

Principaux constituants de nombreuses plantes médicinales, les saponines doivent leur nom au fait que, comme le savon, elles produisent, de la mousse quand on les plonge dans l'eau Les saponines existent sous deux formes, les stéroïdes et les triterpénoïdes, La structure

chimique des stéroïdes est similaire à celle de nombreuses hormones humaines (œstrogène, cortisone), et de nombreuses plantes qui en contiennent ont un effet sur l'activité hormonale.

[2] les triterpénoides sont souvent des expectorants très puissants, c'est-à-dire des substances qui facilitent l'évacuation des sécrétions des voies respiratoires et des bronches. [8]

2.3. Les alcaloïdes

Un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose. [9]

2.4. Les mucilages

De nombreuses plantes contiennent des mucilages, composés de polysaccharides, qui gonflent dans l'eau et se transforment en une substance collante et visqueuse. D'un point de vue thérapeutique, on les utilise par exemple pour envelopper les muqueuses de l'appareil digestif, ce qui les protège des substances irritantes ou inflammatoires. [8]

2.5. Les vitamines

Les vitamines sont des substances indispensables pour le bon fonctionnement de l'organisme. Cependant, le corps humain ne pouvant les synthétiser lui-même, il faut les lui apporter dans l'alimentation en mangeant notamment des végétaux qui en contiennent souvent une quantité considérable. [8] Tel que :

La vitamine E désigne un groupe de nombreux composants présents dans la nature : les α -, β -, γ - et δ -tocophérols et tocotriénols. Les rôles fondamentaux des tocophérols sont la protection antioxydante de la surface des lipoprotéines et des membranes cellulaires. Le γ -tocophérol est capable de piéger les peroxy-nitrites, particulièrement dangereux pour les neurones, ce que ne peut effectuer l' α -tocophérol. La vitamine E est un protecteur cardiovasculaire. [31]

La vitamine C ou acide ascorbique est l'antioxydant hydrosoluble majeur. Il permet la régénération de la vitamine E et du glutathion nécessaire à la glutathion-peroxydase. [28]

2.6. Les glucosides

Les glucosides sont des composés organiques. Comme ils ont souvent des actions différentes, ils sont répartis en divers sous-groupes dont le plus important est représenté par les glucosides cardiotoniques utilisés pour augmenter l'activité cardiaque lorsqu'elle est insuffisante. Ils sont en général aussi des propriétés diurétiques ce qui entraîne une diminution des liquides dans les tissus et fait ainsi baisser la pression artérielle. [8]

2.7. Les polyphénols

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. [11] Ce sont des métabolites secondaires des végétaux présents dans toutes les parties de la plante (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois). [3, 5]

Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. [96]

➤ Biosynthèse des polyphénols

Les polyphénols sont synthétisés par 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 [104]
- 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 naphthoquinones [71, 105]

De plus la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes. [106]

➤ Effets biologiques des polyphénols :

Ils sont des molécules biologiquement actives, ils sont largement utilisés en thérapeutique [65] Ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux [107], anti-allergènes, vasodilatateurs [108] et antioxydants [109]. (Figure 1)

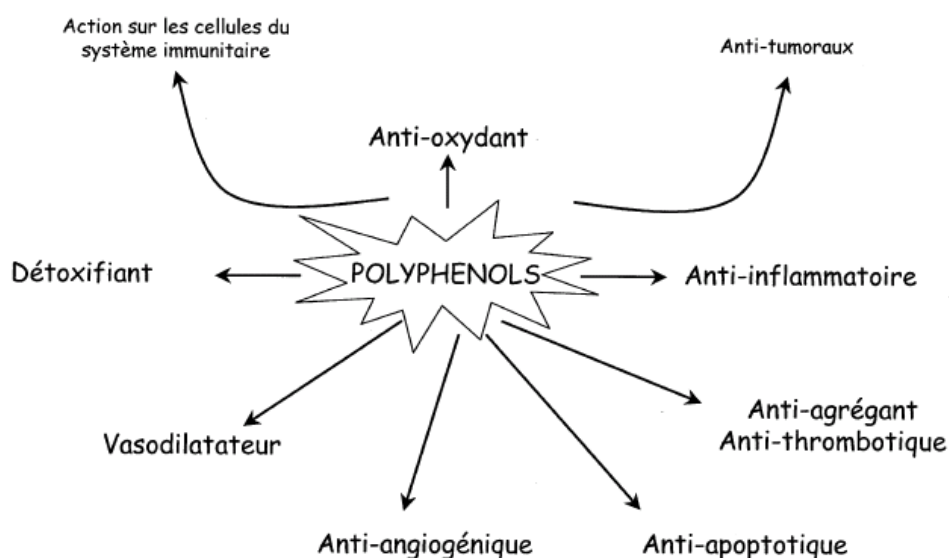


Figure 1. Effets biologiques des polyphénols. [106]

L'activité antioxydante des polyphénols est reconnue et pourrait expliquer leur rôle potentiel dans la prévention de plusieurs maladies associées au stress oxydatif, telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives. [10, 12, 30]

De nombreux travaux suggèrent que les polyphénols participent à la prévention des maladies cardio-vasculaires. En inhibant l'oxydation des LDLs, ils limitent leur incrustation dans les parois des artères qui contribuent à l'épaississement des parois et à réduire le flux de sang qui parvient au niveau des tissus. [110]

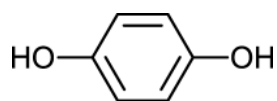
Les polyphénols inhibent aussi l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose, qui induit l'occlusion des artères. Ainsi en prévenant l'athérosclérose et les risques de thrombose, ces composés limitent les risques d'infarctus du myocarde. [13]

La structure chimique est identique à tous les polyphénols : un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. [12]

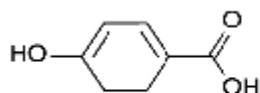
Les polyphénols sont classés en différents groupes (**Tableau1**). [89] en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des éléments qui les relient. [12]

Tableau 1 : Les principales classes de composés phénoliques [56]

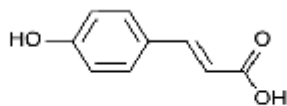
Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C ₆	Phénol simples	Catéchol	
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïques	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acides caféique, férulique scopolétine, esculétine	Citrus Citrus
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes, Flavonols Anthocyanes, - Flavanols Flavanones, Isoflavonoïdes	Kaempférol, quercétine, Pélargonidines, Cyanidine Catéchine, épicatechine Naringénines, Déidzéine	Fruits, légumes, fleurs fruits rouges, pomme, raisin Citrus, Soja, pois
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	pénorésinol	pin
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines		Bois, noyau des fruits
(C ₁₅) _n	Tannins		Raisins rouge, kaki



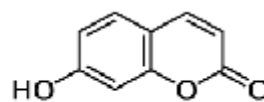
Phénols simples



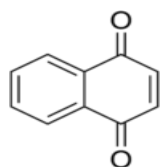
Acides
hydroxybenzoïque



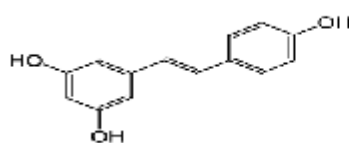
Acides
hydroxycinnamique



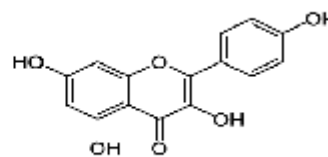
Coumarines



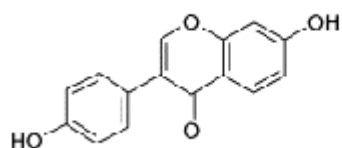
Naphtoquinones



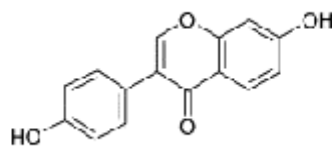
Stilbénoides



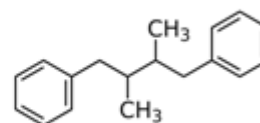
Kaempférol



Isoflavonoïdes



Anthocyanes



Lignanes

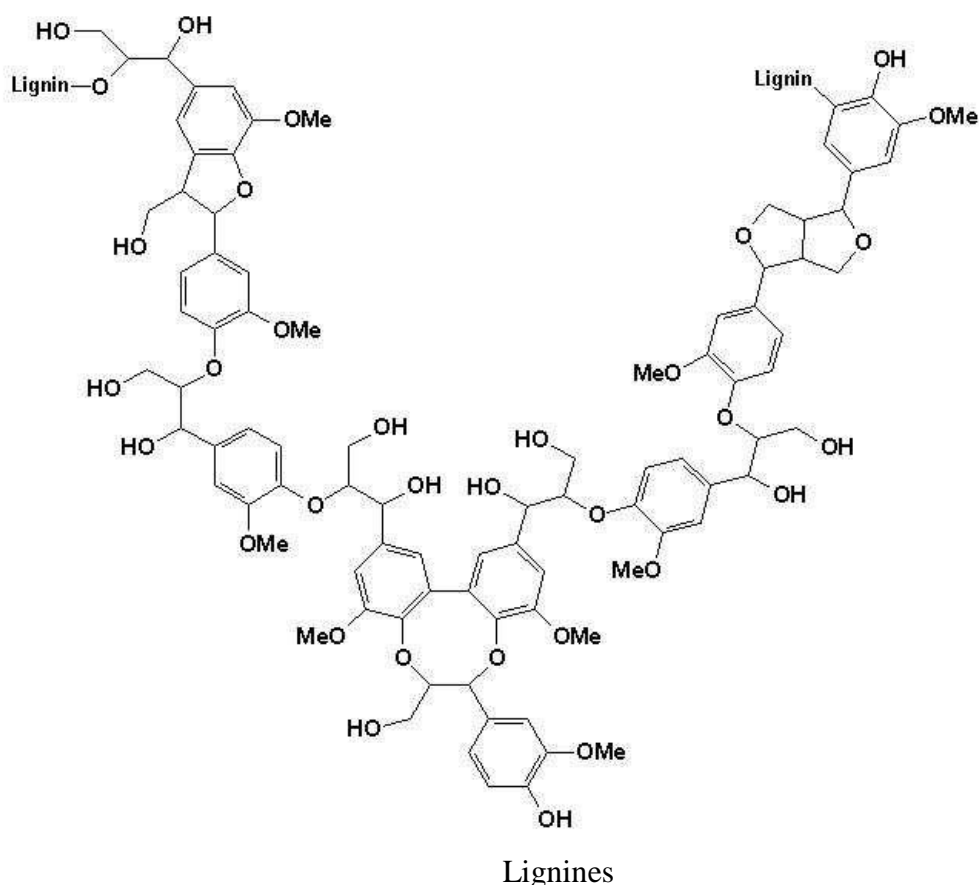


Figure 2 : Structures chimiques de principaux polyphénols. [101]

2.7.1. Les acides phénoliques

Ce sont les dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique. [9]

Les acides phénols et ces dérivés sont considérés comme responsables de l'activité cholérétique de l'artichaut et les propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires des dérivés salicylés. [97] Les composés possédant les activités antioxydantes et antiradicalaires sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique. [98]

2.7. 2.Tannins

Les tanins sont des composés phénoliques complexes, hydrosolubles ayant un poids moléculaire compris entre 500 et 3 000 Da. [63]. Leur structure chimique leur confère une capacité très développée de se fixer sur des molécules telles que les alcaloïdes, la gélatine, les polysaccharides, et essentiellement les protéines.[66]

Les tanins sont des molécules biologiquement actives, douées d'activités pharmacologiques remarquables et des effets significatifs sur la santé humaine, [68] ont de grandes capacités antioxydantes dues à leurs noyaux phénols. [69] Elles ont la particularité

d'inhiber la peroxydation des lipides, en agissant comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'auto oxydation. [67]

Selon leur nature chimique ces composés sont divisés en deux classes: les tanins hydrolysables et les tanins condensés. [58, 64]

2.7.3. Les flavonoïdes :

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. [18]. Ils existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides. [70]

Ils ont un important champ d'action et possèdent de nombreuses vertus médicinales. Antioxydants, ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation. Certains flavonoïdes ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antivirales, et des effets protecteurs sur le foie. [2]

➤ Localisation et distribution

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes. Ces molécules ont été identifiées dans presque toutes les parties de la plante : les feuilles, les racines, les tiges, les fleurs, les graines et l'écorce. [76] Les flavonoïdes sont trouvés dans les fruits, les légumes, les noix, les herbes, les épices, aussi bien que dans le thé et le vin rouge. [77]

Dans la majorité des cas, les flavonoïdes sont présents sous forme glycosylée dans les plantes car la glycosylation a pour effet de les rendre moins réactifs et plus hydrosolubles permettant alors leur stockage dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs, de l'épiderme et du mésophyle des feuilles, des parenchymes des tiges et racines. [1]

Dans le cas des fleurs, ils sont concentrés dans les cellules épidermiques. [71]

➤ Structures chimiques et classification

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phényl chromone [54] à 15 atomes de carbone (C6-C3 -C6), constitué de deux noyaux aromatiques (ou anneaux) que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygénés, qui désigne la lettre C (**figure 3**). [72]

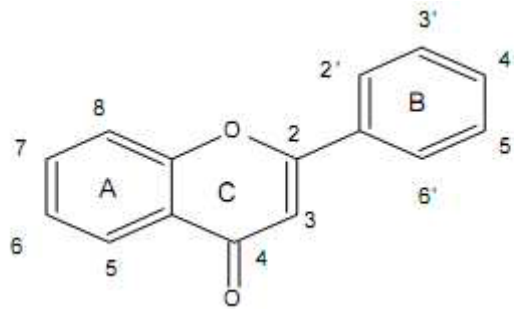
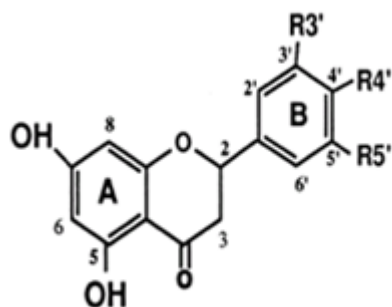


Figure 3 : Squelette de base des flavonoïdes. [102]

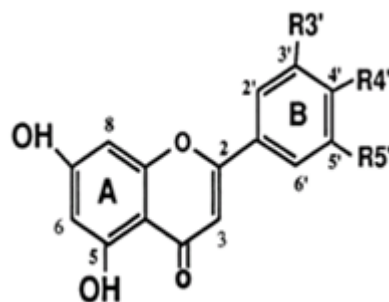
Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base. [14] Basé sur le degré d'oxydation et de substitution de la position 3 du cycle C, les flavonoïdes peuvent être divisés en six sous-groupes (**figure 4**). Parmi ceux-ci nous trouvons :

- Les flavonols (kaempferol, quercétine).
- Les flavones (apigénine, lutéoline).
- Les isoflavones (diadzéine, génistéine).
- Les flavanones (hespéretine, narigénine).
- Les flavanols ((+)-catéchine, (-)-épicatéchine, épigallocatechine, épigallocatechine gallate (EGCG).
- Les anthocyanes (perlagronidine, cyanidine, malvidine). [90]

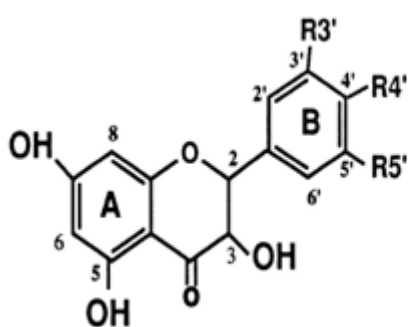
Flavanone



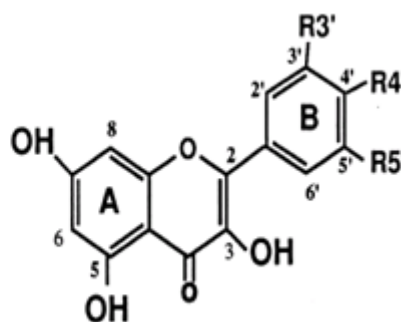
flavone



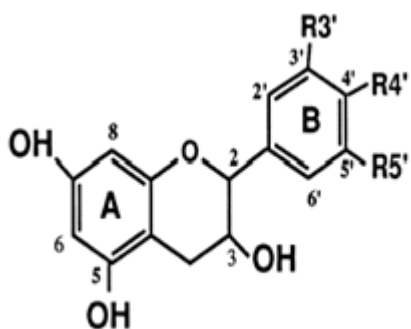
Flavanonol



flavonol



Flavan 3-ol



isoflavone

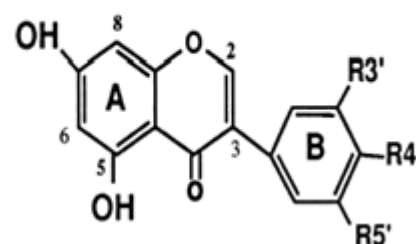


Figure 4. Structures des différentes classes de flavonoïdes . [103]

➤ Activités biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composants naturels hautement actifs. Plusieurs études ont démontré une large gamme des effets biochimiques et pharmacologiques de ces molécules.

[54]

a. *Activité antioxydant*

Les flavonoïdes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante et donc une bonne stabilisation de leurs forme radicalaires. C'est pourquoi les propriétés antioxydantes des flavonoïdes sont très souvent exprimées en terme de potentiel antiradicalaire. [5] sont des piègeurs efficaces des radicaux libres les plus prooxydants, particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique. [38] L'activité du piégeage des radicaux libres est l'un des mécanismes importants de l'activité antioxydante, ce mécanisme est lié à leur structure et de l'arrangement des groupements hydroxyles. [73]

Des études faites sur la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres ont montré que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants :

- La structure ortho dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.
- La double liaison C₂-C₃ en conjugaison avec la fonction 4-oxo
- La présence du groupe 3OH en combinaison avec la double liaison C₂-C₃. A titre d'exemple, la quercétine satisfait à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes (**Figure 5**) [14]

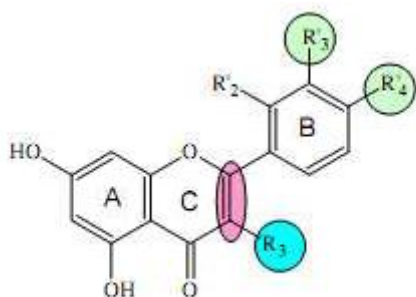


Figure 5 : Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes. [14]

La propriété antiradicalaire des flavonoïdes (Flav-OH) est dirigée principalement vers le radical hydroxyle (HO•) et l'anion superoxyde (O₂•-) aussi les radicaux peroxy et alkoxy. par transfert d'hydrogène. [74]

De plus, ils ont une activité chélatrice des métaux tels que cuivre et fer, qui, à l'état libre, peuvent être à l'origine de la production de radicaux libres par les réactions de Fenton d'Haber-Weiss. [38]

Les flavonoïdes sont aussi capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices du O₂•- et d'autres espèces réactives oxygénées, comme la xanthine oxydase, la protéine kinase C, la cyclooxygénase, lipooxygénase, monooxygénase microsomal, et la glutathion S-Transferase. Les flavonoïdes ayant une moitié catéchol sur le cycle B inhibent la succinoxidase mitochondriale et la NADH oxydase. [78, 79]

b. Activité anti-inflammatoire

Sous l'action de la cyclooxygénase (CO) et la lipooxygénase (LO), l'acide arachidonique se métabolise respectivement en prostaglandines, et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. [14]

Les flavonoïdes inhibent la synthèse des eicosanoïdes par inhibition de l'activité de LO et CO, aussi ils provoquent l'inhibition de la peroxydation non enzymatique des acides gras poly insaturés nécessaires pour l'activation de ces oxygénases ce qui provoque un effet anti-inflammatoire. [75] Cependant à de faibles concentrations, seule la lipooxygénase est affectée. En outre, d'autres flavonoïdes tels que l'apigénine et la chrysin agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase. [14]

c. Activité anticancéreuse

La plupart des flavonoïdes sont *in vitro*, antimutagènes ; par contre, quelques flavonols sont sur les mêmes modèles mutagènes et un petit nombre d'entre eux sont anticarcérogènes et inhibiteurs de la croissance des cellules tumorales *in vitro*. [71]

Les effets anti-carcinogènes de la quercétine et d'autres flavonoïdes deviennent de plus en plus évidents. [57]

Les flavonoïdes peuvent agir comme des bloqueurs de l'activation métabolique des pro-carcinogènes en carcinogènes, dans ce cas ils permettent une détoxification et/ou une élimination des carcinogènes. [15]

d. Autres Activités biologiques

Les flavonoïdes sont des substances liposolubles et hydrosolubles. Ce sont surtout des protecteurs vasculaires améliorant la résistance et la des vaisseaux aussi bien artériels que

veineux. Ils augmentent aussi la résistance des vaisseaux en protégeant le tissu conjonctif périvasculaire des dégradations enzymatiques.

Ils favorisent les échanges liquidiens transcapillaires et la diffusion des protéines plasmatiques. Ils protègent les LDL vis-à-vis de l'oxydation. [36] Ils inhibent l'adhésion et l'agrégation plaquettaires. [37]

Chapitre II
Stress oxydant

1. Le stress oxydant

1.1. Le stress oxydant

Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités anti-oxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire.[16, 32]

Le terme général de stress oxydatif est utilisé pour décrire une situation de dommages causés par les radicaux libres. [17]

1.2. Le radical libre

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. [18] Les radicaux libres sont très instables et réagissent rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir de la stabilité. [19]

1.3. Source des radicaux libre

Les radicaux libres nocifs sont produits dans l'organisme au cours du métabolisme normal. [19] la pollution, le tabagisme, la prise de pilule contraceptive, l'exposition immodérée au soleil ou à des radiations sans protection suffisante, la pratique de sport de haut niveau et l'inflammation chronique sont, par exemple, autant de sources de production des radicaux libres. [39] En effet, toute réaction impliquant de l'oxygène et un système réducteur de transfert d'électrons est susceptible de libérer des espèces réactives oxygénées. C'est ainsi que la chaîne respiratoire provoque une libération importante d'espèces réactives oxygénées, mais dont l'intensité demeure controversée. D'autres activités enzymatiques fournissent aussi des espèces réactives oxygénées, notamment les NADPH oxydases au cours de l'inflammation et les cytochromes P450 au cours de la détoxification des xénobiotiques. Ainsi, la mitochondrie, la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique sont les sièges principaux de libération d'espèces réactives oxygénées. [33]. (figure 6).

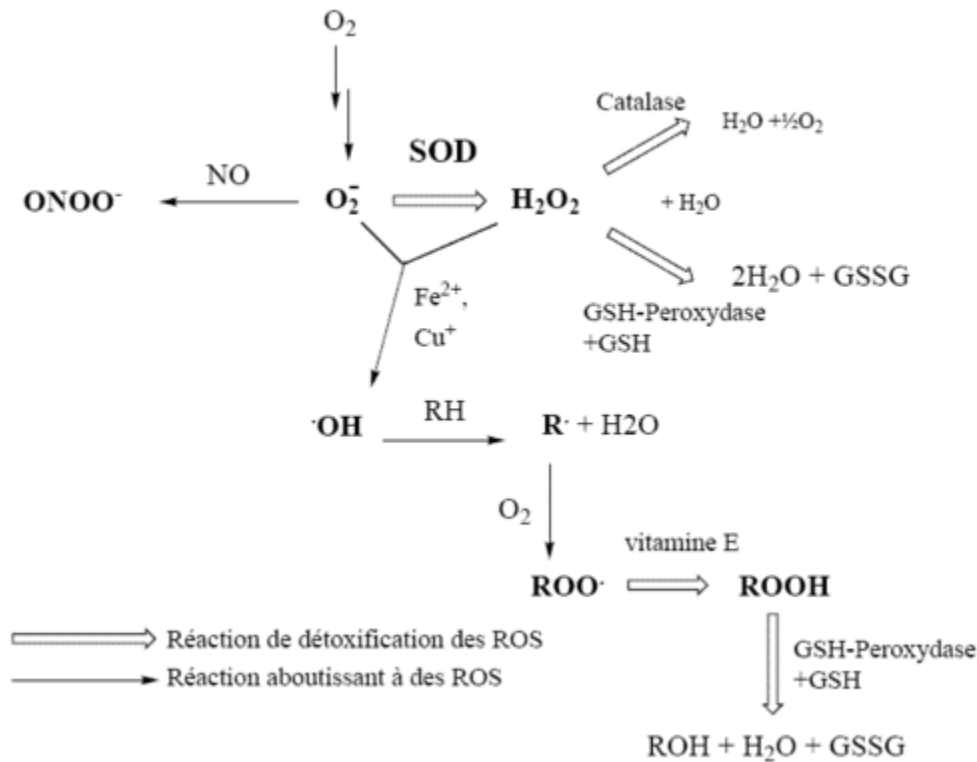


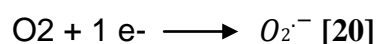
Figure 6: Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l’oxygène impliqué en biologie. [99]

1.4. nature des espèces réactives oxygénées (ERO)

Parmi toutes les espèces réactives oxygénées (ERO), on distingue un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appelons les radicaux primaires à savoir : l’anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^\bullet), le monoxyde d’azote (NO^\bullet), le radical peroxyde (ROO^\bullet) et le radical alkoxyde (RO^\bullet). Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires telles que l’oxygène singulet $^1\text{O}_2$, le peroxyde d’hydrogène (H_2O_2) et le nitroperoxyde (ONOOH), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule.[99]

1.4.1. Anion superoxyde : $\text{O}_2^{\bullet-}$

L’oxygène est normalement transformé en molécules d’eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. [24] Environ 2 % de l’oxygène subit une réduction monoélectronique (addition d’un seul électron) conduisant à la formation du radical superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ au niveau de l’ubiquinone (ou coenzyme Q). [20]

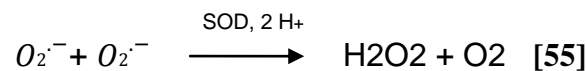


Les anions superoxydes ne sont pas très réactifs et ont une demi-vie courte, mais ils constituent des radicaux précurseurs et ils exercent leurs effets par la formation d'espèces radicalaires beaucoup plus réactives. [21]

1.4.2. Le peroxyde d'hydrogène : H₂O₂

La dismutation de L'anion superoxyde (O₂^{•-}) entraîne la formation d'oxygène fondamental et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

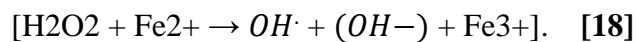
L'H₂O₂ n'est pas un radical libre au sens propre mais il est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. De plus, sa capacité à traverser les membranes biologiques fait qu'il peut se à une grande distance de son lieu de production. [18]



1.4.3. Radical libre hydroxyle : (OH•)

Le radical libre hydroxyle (OH•) est très réactif. Il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésions de nécrose. C'est un dérivé de l'anion superoxyde. [91]

Selon la réaction de Fenton, l'H₂O₂ se décompose, en présence d'ions ferreux (Fe²⁺), en un ion OH⁻ et un radical hydroxyle (OH•):

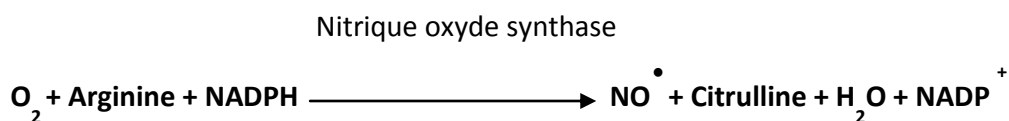


1.4.4. Les radicaux alkyles R• et peroxydes ROO•

Les radicaux alkyles sont les derniers maillons dans la chaîne de production des EROs , Ils sont les résultats de l'action oxydante de OH• sur les chaînes d'acides gras polyinsaturés (RH). R• et ROO• sont à l'origine des processus radicalaires en chaîne et en particulier de la peroxydation lipidique.[21]

1.4.5. Le monoxyde d'azote

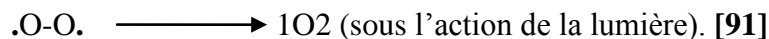
Le monoxyde d'azote (NO•) est produit chez les organismes supérieurs par l'oxydation de l'un des atomes N terminaux de la L-arginine, cette réaction est catalysée par la nitrique oxyde synthase (NOS). [80] selon la réaction suivante :



Le monoxyde d'azote (NO) est un radical libre qui est surtout réputé pour ses propriétés physiologiques. Or, le NO interagit avec l'anion superoxyde pour donner le peroxyde nitrite, composé extrêmement réactif et toxique. [34]

1.4.6. Oxygène singulet: 1O_2

Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'anion superoxyde selon la réaction suivante :



1.5. Les dégâts cellulaires

Les phénomènes radicalaires de base sont utiles au bon fonctionnement de l'organisme. L'altération des composants cellulaires et des structures tissulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement et dépasse la quantité d'antioxydants disponibles. [100]

Leur principal danger vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants tels que l'ADN ou la membrane cellulaire, avec risque de multiplication anormale des cellules, entraînant un dysfonctionnement ou une mort cellulaire, un cancer. [17]

1.5.1. Oxydation des protéines

Les acides aminés des protéines sont la cible des ERO.[81] Si la majorité des acides aminés peuvent être oxydés par les ERO, les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane) sont les plus sensibles.[82, 83, 84]

La cystéine une fois oxydée conduit à plusieurs composés comme l'acide cystéique, ou génère des ponts disulfures. Ceux-ci peuvent être aisément régénérés en fonction thiols, in vivo par le glutathion réduit ou la thiorédoxine réduite. L'oxydation réversible de la cystéine joue un rôle important dans l'activation ou l'inactivation de certaines protéines. Les acides aminés basiques et aromatiques subissent en majorité des modifications d'hydroxylation. [21]

Les modifications des structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines par les ERO sont à la base de la formation de dérivés protéiques carbonylés via plusieurs mécanismes incluant la fragmentation et l'oxydation des acides aminés. [22]

Les protéines modifiées deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et sont alors dirigées vers la dégradation protéolytique au niveau du protéasome. [85]

1.5.2. Peroxydation lipidique

Les acides gras polyinsaturés comme les acides linoléiques ou arachidonique sont les cibles privilégiées des ERO et plus particulièrement des radicaux libres. [22]

Les mécanismes d'oxydation des composés insaturés biologiques présentent trois phases principales :

- une phase d'initiation qui peut être due à l'intervention d'un radical hydroxyl qui est capable d'arracher un atome d'hydrogène.
- une phase de propagation : le radical formé $R\bullet$ va immédiatement réagir avec l'oxygène moléculaire, donnant un radical peroxy $ROO\bullet$, qui va à son tour arracher un atome d'hydrogène sur la chaîne insaturée voisine pour générer un hydroperoxyde $ROOH$ instable et un nouveau radical R assurant la propagation du processus.
- une phase de terminaison, où se recombinent différents radicaux formés pour aboutir à des composés stables. [21]

1.5.3. Dégradation par oxydation de l'ADN

Les bases puriques, pyrimidiques et le désoxyribose sont la cible privilégiée des ERO, ils sont alors transformés en produits de fragmentations et en bases oxydées. [82]

Les ERO peuvent réagir avec la guanine, base constitutive de l'ADN, pour la transformer en 8-hydroxy-2' déoxyguanosine (8-OH2DG) qui est capable d'induire des mutations spécifiques pouvant conduire au développement du cancer. [22]

Les modifications des bases puriques et pyrimidiques, les cassures simple et double-brin, et les sites abasiques, oxydés ou non, constituent les catégories principales de dommages oxydatifs de l'ADN. [21]

2. Les antioxydants

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique d'ERO est assuré par des systèmes antioxydants. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. [18]

2.1. Définition

Les antioxydants sont des molécules capables d'interagir sans danger avec les radicaux libres et de mettre fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées. [19]

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (Figure 7). [86]

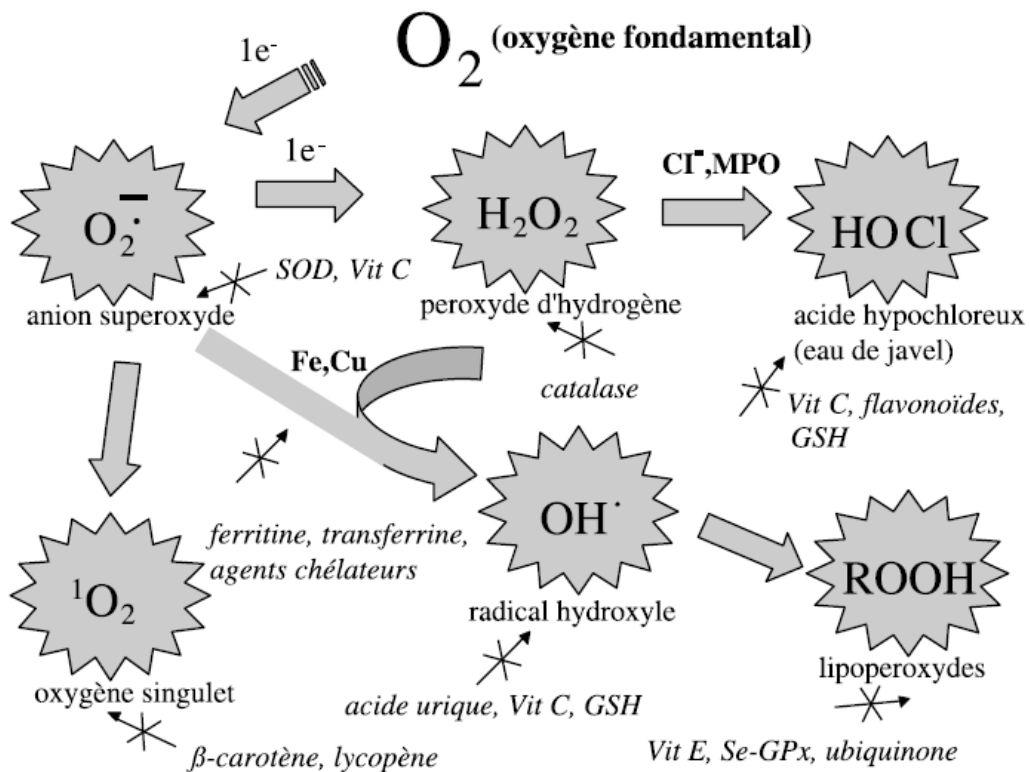


Figure 7 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants [88]

2.2. Classification des antioxydants

Les mécanismes de défense anti-oxydante du corps humain peuvent être divisés en deux catégories différentes. [19]

Les systèmes de régulation se composent d'enzymes antioxydantes tels que les superoxydes dismutases, la catalase et la glutathion peroxydase, et les antioxydants non enzymatiques tels que la transferrine, l'albumine, la vitamine C, la vitamine E, le glutathion et l'acide urique. [23]

2.2.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

2.2.1.1. La superoxyde dismutase

Comme l'indique son nom, la superoxyde dismutase (SOD) accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) qui diffèrent

selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire. [87]

2.2.1.2. La catalase

La catalase est une enzyme extrêmement active [92], retrouvée spécifiquement dans les peroxysomes et les hématies.[21]Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. [80]

2.2.1.3. La glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, [80, 82], et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique. Son substrat est le glutathion (GSH). [21]

2.2.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

2.2.2.1. Le système glutathion

Le glutathion, un chélateur hydrophilique direct retrouvé dans pratiquement tous les compartiments cellulaires, constitue un cofacteur pour la GPx et permet de régénérer les vitamines C et E dans leur forme active. [21]

Le glutathion peut chélater les ions cuivreux et ainsi limiter les réactions de type Fenton. En tant qu'antioxydant, le glutathion peut donc intervenir par deux types de mécanismes : la capture d'espèces radicalaires et la participation à l'activité d'enzymes anti-oxydants. [21]

2.2.2.2. l'acide urique

L'acide urique comme produit final du métabolisme des purines, augmente dans le plasma lors d'efforts physique intenses. [23] Il a été proposé comme un des meilleurs antioxydants du plasma *in vivo*, où il pourrait contribuer à 35-60% de la capacité antioxydante totale.[93, 94] L'acide urique peut être oxydé en différents produits, puis est régénère par la vitamine C. [95]

2.2.2.3. Autres anti-oxydants

Les protéines chélatrices de métaux de transitions comme l'haptoglobine, la ferritine, l'albumine et la céruloplasmine agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants, comme les ions Fe_{2+}/Fe_{3+} ou Cu_{2+}/Cu_{+} permettant par ce biais de prévenir la production des radicaux libres par la réaction de Fenton. [82]

D'autres antioxydants sont de nature non enzymatique et doivent être obtenus à partir de l'alimentation puisqu'ils ne peuvent être synthétisés par l'être humain[35], telles que les

vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules stables. [88, 6] La vitamine piégeuse devient à son tour un radical qui sera détruit ou régénéré par un autre système. A titre d'exemple, la vitamine E est régénérée par la vitamine C, elle-même régénérée par les ascorbates réductases. [88] En ajoutent quelques oligo-éléments (sélénium, cuivre et zinc) qui sont les cofacteurs de divers enzymes à activité antioxydante. [26]

Chapitre III
Matériels et méthodes

1. Matériel végétal

Limonium sp Desf. (Plumbaginaceae) a été récoltée durant le mois d'Avril en 2011 dans la région de Mogheul près de Bechar. Le matériel végétal a été séché pendant plusieurs jours à l'ombre. La détermination botanique a été réalisée par le Pr Kaabache (Département des sciences de la nature et de la vie, Université Ferhat Abbas, Sétif).

2. Extraction

Les parties aériennes de *Limonium sp* (1500 g) sont coupées en petits morceaux et mises à macérer dans un mélange éthanol/ eau (70/30) pendant 24 à 48 heures. Cette opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant. Après concentration à une température n'excédant pas 35 °C, nous avons obtenu un résidu sirupeux. Ce dernier est dilué avec de l'eau distillée à raison de 600 ml pour 1kg de matière sèche puis additionné d'acétate de plomb $[(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{Pb}]$ pour éliminer la chlorophylle par précipitation. Après filtration, la phase aqueuse obtenue est épuisée successivement par une extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants non miscibles à l'eau et de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. Les phases organiques ainsi obtenues (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont séchées par du sulfate de sodium anhydre pour éliminer toutes traces d'eau, puis filtrées et enfin concentrées à sec sous pression réduite et pesées.

Le processus d'extraction est résumé par l'organigramme suivant :

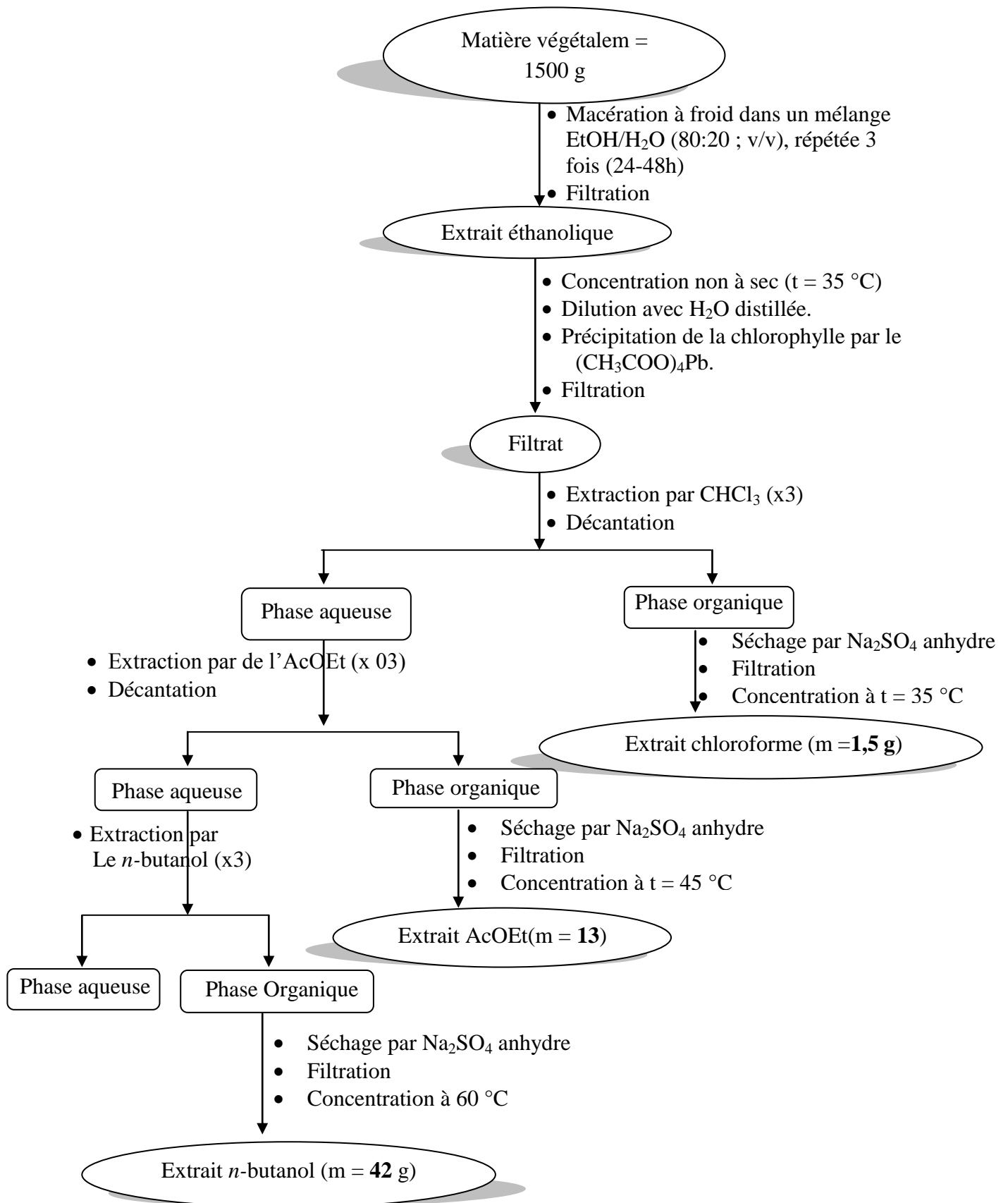


Figure 8 : Récapitulatif de l'extraction des parties aériennes de *Limonium sp*

3. Dosage des composés phénoliques totaux

La teneur en composés phénoliques totaux dans l'extrait a été déterminée en utilisant le réactif de Folin- Ciocalteus selon la méthode de Singleton et al., 1999[40]. 20 µl de l'extrait (1 mg / ml) a été mélangé avec 100 µl de réactif de Folin- Ciocalteus et 1580 µl d'eau distillée, après 3 min on ajoute 300 µl de carbonate de sodium (Na₂CO₃) 20%. Le mélange a été agité et l'absorbance a été mesurée à 765 nm après 2 h de réaction à la température ambiante. Tous les tests ont été effectués en triple. L'acide gallique a été utilisé comme standard. La courbe d'étalonnage (standard) a été préparé en utilisant 0, 50, 100, 150, 200, 250, 500 mg / L des solutions d'acide gallique dans le méthanol: eau (10:90 , v / v). La concentration des composés phénoliques totaux dans l'extrait a été déterminée en µg d'équivalents d'acide gallique (GAE) par 1 mg de l'extrait à l'aide de l'équation suivante obtenue à partir d'une courbe standard d'acide gallique (R² = 0,991). Absorbance = 0,001 × acide gallique (µg).

4. Dosage des flavonoïdes totaux

Le teneur totale en flavonoïdes a été estimée selon la méthode décrite par Wang et al., 2008[41]. En bref, à 0,5 ml d'échantillon, on a ajouté 0,5 ml de solution à 2% d'AlCl₃. Après 1 h d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 420 nm. Le teneur totale en flavonoïdes a été calculée en µg d'équivalents de quercétine (QE) pour 1 mg de l'extrait à l'aide de l'équation suivante obtenue à partir d'un graphique de la quercétine standard (R² = 0,983). Absorbance = 0,34 × quercétine (µg) + 0,015.

5. Dosage de l'activité antiradicalaire DPPH

La capacité des échantillons d'essai de donneur d'hydrogène a été examiné en présence de radical DPPH (1,1- diphenyl-2 - picrylhydrazyl) en utilisant la méthode décrite par Braca et al., 2001[42]. 3 ml d'une solution méthanolique 0,004 % du DPPH a été ajouté à différentes concentrations (1, 2,5, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 75 µg / ml) des échantillons d'essai. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Le pourcentage d'inhibition de radical DPPH (I %) a été calculé comme suit ;

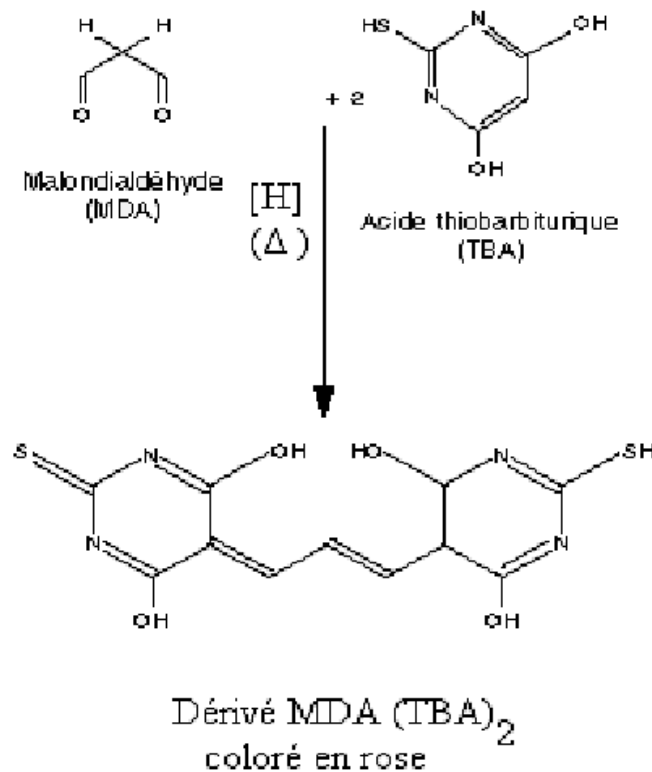
$$I\% = (DO \text{ contrôle} - DO \text{ échantillon} / DO \text{ contrôle}) \times 100 ;$$

L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle.

6. Inhibition de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique dans le *vitellus des œufs* est évaluée par le dosage de malondialdéhyde (MDA) selon la méthode Cao U et Ikeda, 2009 [43]. En milieu acide et à

chaud (pH 2 à 3, 100°C) une molécule de MDA est condensée avec deux molécules de thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré en rose (lecture à 532 nm).



- Pour le dosage du MDA 1 g de *vitellus* sont additionné à 10 ml de solution de PSB (20mM, pH 7.4) puis homogénéisés.
- L'homogénat est centrifugé pendant 20 minutes à 4000 tours/minute et le surnageant obtenu est utilisé.
- à 0,5 ml de surnageant (l'homogénat 10%) Différentes concentrations de l'extrait à tester (0,1 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mg/ml) et 50µl FeSO₄ (0.07 M) sont ajoutées.
- Après 60 minutes d'incubation à une température 37 °C la réaction est stoppé par l'adition de 1ml d'acide trichloracétique (TCA20% w/v) et 1.5 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 1% respectivement.
- Le mélange est chauffé à 100 °C pendant 15 minutes, refroidi puis additionné 4 ml *de n*-butanol.
- Après centrifugation de 20 minutes à 4000 tours/minute, l'absorbance est déterminée au spectrophotomètre à 532nm.
- Les résultats du dosage sont exprimés en pourcentage d'inhibition.
- L'activité scavenger du lipide peroxydation (K, %) est calculé par l'équation suivante:

- $K(\%) = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\%$

A_c absorbance de control, et A_s absorbance des échantillons testé

7. Modèle expérimental *In vivo*

Notre étude expérimentale a porté sur des rats *Wistar albinos* adultes, pesant $180 \text{ g} \pm 210 \text{ g}$ (Institut Pasteur, Alger), acclimatées à une température ambiante. Les rats ont eu un régime standard de laboratoire et l'eau est donnée *ad libitum*.

Une hépatotoxicité expérimentale est induite par, l'éthanol à raison de 3 g/kg dissous dans l'eau distillée Les rat sont réparties en 4 lots expérimentaux à raison de 8 rats par lot:

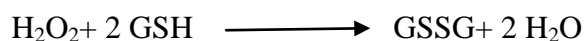
- témoins (T).
- traité par, l'éthanol par gavage chaque 6 h (3dose)
- traité par l'extrait butanolique de *Limonium sp* par gavage à raison de 100 mg/kg dissous dans l'eau distillée (Ls),
- traité par l'éthanol et l'extrait butanolique

7.1. Évaluation *in vivo* de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique dans le foie est évaluée par le dosage de malondialdéhyde (MDA) selon la méthode d'Uchiyama and Mihara [44]. 1 g de foie est additionné à 5 ml de solution de KCl (1.15%) puis homogénéisés. À 0,5 ml de l'homogénat, 3 ml d'acide phosphorique (1 %) et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA, 0,67%) sont additionnés. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 45 min, refroidi puis additionné de 4 ml de *n*-butanol. Après centrifugation de 15 min à 3000 tours/minute, l'absorbance est déterminée sur le surnageant à 532nm. Les résultats du dosage sont exprimés en nmol/gr de foie.

7.2. Évaluation de l'activité enzymatique de GPx

L'activité enzymatique de GPx est déterminée par la méthode de Flohe et Gunzler, 1984 [45]. Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante:



Le dosage des protéines dans les fractions cytosoliques est réalisé par la méthode de Lowry, 1951[46].

7.3. Dosage de glutathion hépatique

Le dosage du glutathion hépatique (GSH) est déterminé par la méthode colorimétrique d'Ellman [47]. Le principe est basé sur la réaction d'oxydation du GSH par l'acide 5, 5'-dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB) libérant ainsi l'acide thionitrobenzoïque (TNB) absorbant à 412 nm. Pour ce dosage, le foie est homogénéisé dans cinq volumes de TCA 5% puis centrifugé à 2000 rpm. 200 µl de surnageant sont dilués dans 1.8 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH 8). À 2 ml du mélange de dilution, 100µl de DTNB (0.01M) sont additionnés. L'absorbance est lue à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA 5 %. Les concentrations sont exprimées en n mol/gr de foie.

7.4. Test de la fonction hépatique

Les activités enzymatiques d'aspartate transaminase (ASAT) et alanine transaminase (ALAT), biomarqueurs de la fonction hépatique, sont déterminées selon la méthode de Bergmeyer et al [48] en utilisant des kits commerciaux (Quimica Clinica Aplicada S.A, Spain).

8. Évaluation statistique

Les résultats sont donnés sous forme de moyennes et d'écart-types. L'évaluation statistique est effectuée en utilisant le test t de Student.

Chapitre IV

Résultat et discussion

1. Rendements d'extraction

L'extraction des flavonoïdes montre que l'extrait *n*-butanol représente le rendement le plus élevé (2.60 %), suivi de l'extrait d'acétate d'éthyle (0.86 %). Le rendement le plus faible est obtenu par l'extrait chloroformique (0.1%) (Tableau 2).

Tableau 2 : Rendement des extraits

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement
Parties aériennes (1290 g)	Chloroforme	1.5	0,1 %
	Acétate d'éthyle	13	0,86 %
	<i>n</i> -butanol	42	2.66 %

2. Dosage des composés phénoliques et flavonoïdes totaux

Les résultats obtenus montrent la richesse de *Limonium sp* en polyphénols et en flavonoïdes dont la teneur est 343 µg d'équivalents d'acide gallique / mg d'extrait et 220,5 µg d'équivalents de quercétine / mg extrait respectivement.

3. Évaluation du pouvoir antioxydant

Les résultats figurant dans la courbe (figure 9) illustrent les pourcentages de l'activité antiradicalaire de l'extrait *n*-butanol de *Limonium sp* vis-à-vis du radical libre DPPH.

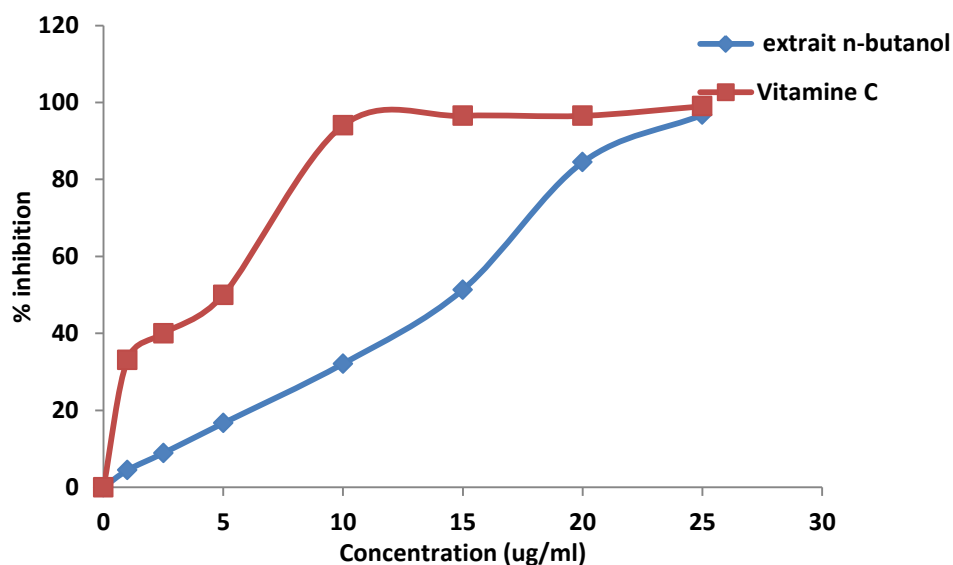


Figure 9 : Pourcentage de l'activité antiradicalaire de l'extrait *n*-butanol de *Limonium sp* vis-à-vis du radical libre DPPH, classés selon l'ordre décroissant suivant (20 $\mu\text{g/ml}$): vitamine C (96.00%) > extrait *n*-butanol (84.44%).

La capacité antiradicalaire de l'extrait *n*-butanol de *Limonium sp* et de l'acide ascorbique (témoin positif) est dose-dépendante. Les valeurs d' IC_{50} , calculées sur une moyenne de trois essais, sont les suivantes: acide ascorbique ($\text{IC}_{50} = 5 \mu\text{g/ml}$), extrait butanolique ($\text{IC}_{50} = 14.92 \mu\text{g/ml}$). Le pouvoir antioxydant de l'extrait vis à vis du DPPH°, le plus élevé (96%) est observé avec une dose de 25 $\mu\text{g/ml}$; pouvoir équivalent à celui qu'exerce la vitamine C (96%) à la même concentration.

L'activité antiradicalaire de l'extrait *n*-butanol de *Limonium sp* est probablement liée à leur richesse en composés phénoliques et en flavonoïdes.

4. Evaluation in vitro de la peroxydation lipidique:

La lecture de la figure 10, montre que l'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique de l'extrait est dose dépendant. Le pouvoir antioxydant de l'extrait vis à vis du LPO, le plus élevé (76.00%) est observé avec une dose de 400 $\mu\text{g/ml}$. L'inhibition de la peroxydation lipidique exercé par l'extrait due à la diminution de la concentration des radicaux libres produite par le FeSO_4 . Ces résultats expliquent la propriété antioxydante des composés phénoliques démontrés dans plusieurs travaux .

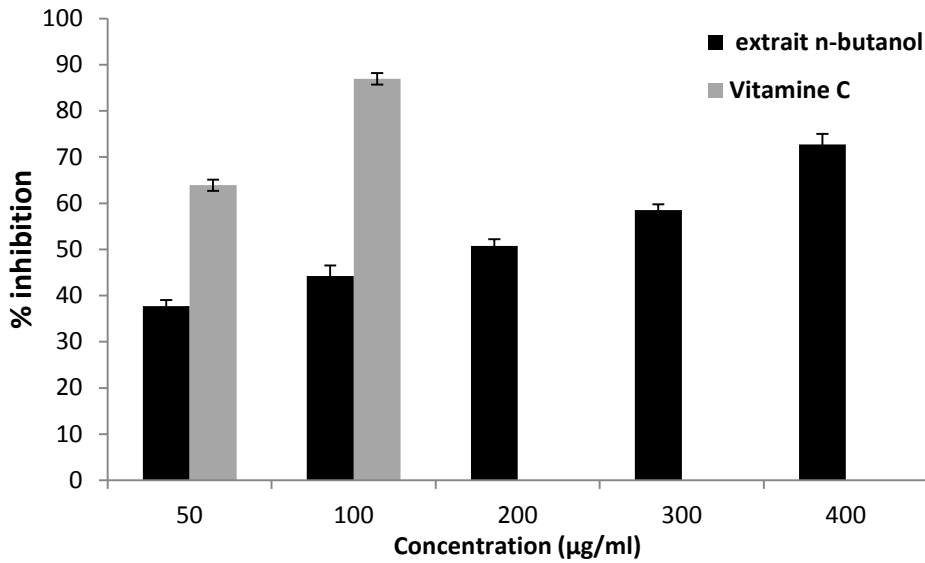


Figure 10 : Inhibition de la peroxydation lipidique par l'extrait butanolique de *Limonium sp*

5. Effet de l'éthanol sur la fonction hépatique et l'action hépatoprotecteur de l'extrait butanolique.

L'effet de l'éthanol sur les fonctions hépatiques avec ou sans l'extrait butanolique est illustré par la figure 11. Une élévation significative ($p < 0.01$) du niveau sérique de TGO (aspartate transaminase) est observée chez les rats traités par l'éthanol contre le groupe témoin.

L'administration de l'extrait butanolique temporeise l'effet de l'éthanol et normalise la valeur de cette enzyme. Les mêmes remarques pour les variations de la TGP (alanine transaminase). Il est probable que ce soit les composés polyphénoliques de l'extrait butanolique qui préservent le foie de la toxicité provoquée par le l'éthanol.

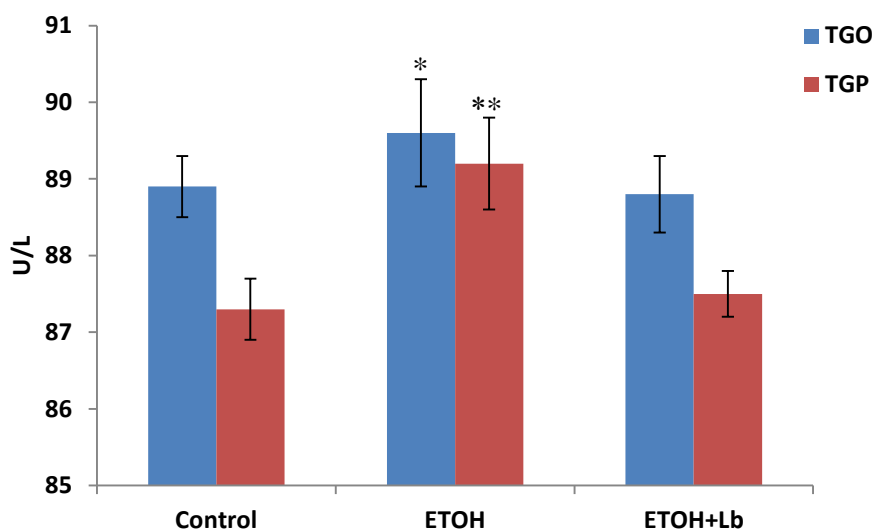


Figure 11: Effet de l'éthanol, de l'extrait butanolique de *Limonium sp* sur la fonction hépatique et sa libération des transaminases TGO et TGP. Les valeurs sont données en moyenne \pm écart type. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, comparativement au groupe témoin.

6. Évaluation la peroxydation lipidique et l'action protecteur de l'extrait butanolique.

L'effet de l'éthanol sur la peroxydation des lipides est illustré par la figure 12. La lipoperoxydation est matérialisée par une augmentation significative du MDA ($p < 0.001$), comparé au groupe témoin. Le prétraitement par l'extrait butanolique diminue l'oxydation des lipides chez les rats.

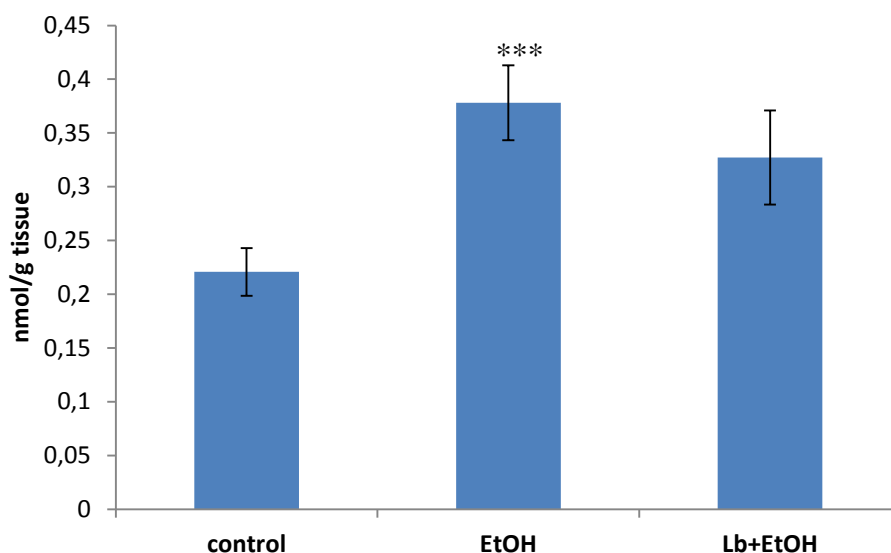


Figure12 : Effet de l'extrait butanolique de *limonium sp* sur la production du MDA dans les cellules hépatiques Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecart type. Test de student: *** $p < 0.001$ comparativement au groupe témoin.

7. Effet de l'éthanol, de l'extrait butanolique sur le niveau de GSH

La figure 13 illustre l'effet de l'extrait butanolique sur la variation de glutathion (GSH) dans les cellules hépatiques chez les rats recevant l'éthanol, prétraités ou non par l'extrait butanolique de *Limonium sp*.

Nous avons remarqué une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de GSH chez les rats recevant l'éthanol par rapport au groupe témoin. Par contre, chez les rats recevant l'éthanol et prétraités par l'extrait butanolique on constate une elevation significative ($p < 0.05$) de GSH par rapport au groupe recevant l'éthanol.

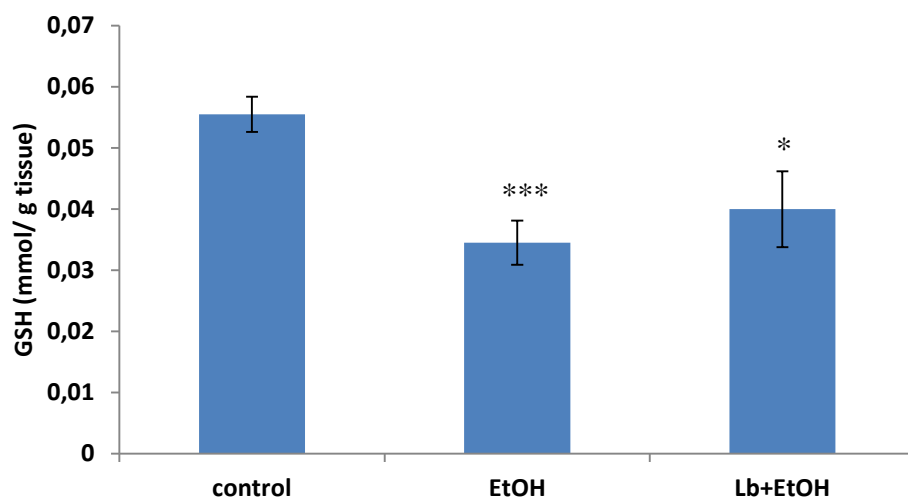


Figure13 : Effet de l'extrait butanolique de *limonium sp* sur le niveau de GSH dans le foie. Les valeurs sont données en moyenne \pm écart type. Test de Student: *** $p < 0.001$ comparativement au groupe témoin.

8. Effet de l'éthanol, de l'extrait butanolique sur l'activité enzymatique de GPx

La figure 14 montre que l'administration de l'éthanol provoque une augmentation significative ($p < 0.001$) de l'activité de GPx chez les rats traitées par l'éthanol comparés au groupe normal. Par ailleurs, le prétraitement des animaux par l'extrait butanolique (100 mg/kg) associés avec l'éthanol, a normalisé la teneur cellulaire en ce facteur antioxydant dans l'hépatocyte.

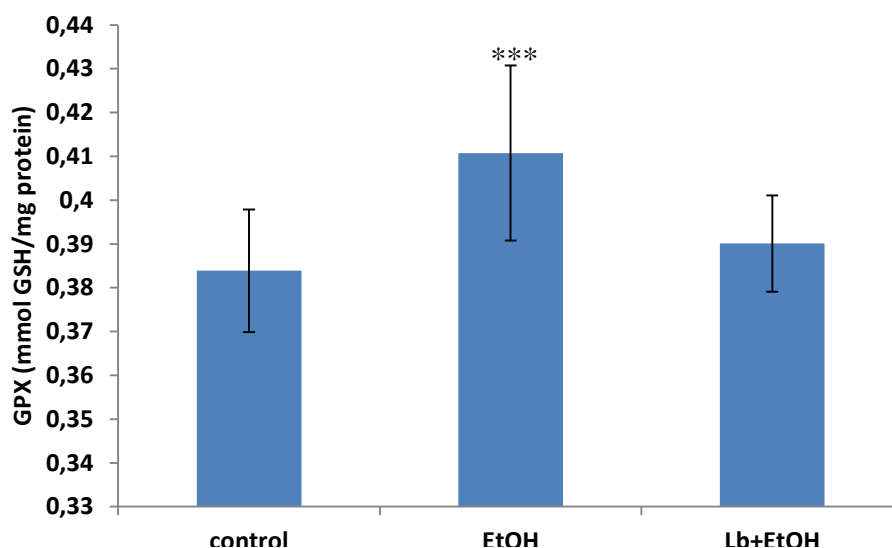


Figure 14 : Effet préventif de l'extrait butanolique de *Limonium sp* sur la défense enzymatique antioxydant (GPx) dans les hépatocytes, sous l'effet d'un stress oxydant induit par l'éthanol chez les rats. Les valeurs sont données en moyenne \pm écart type. Test de Student: *** p < 0.01 comparativement au groupe témoin.

Au niveau du foie, organe principal du métabolisme, l'éthanol est susceptible d'entraîner diverses lésions telles que la stéatose, la nécrose, l'hépatite alcoolique aiguë, la fibrose ou la cirrhose. Les mécanismes impliqués dans le développement des maladies hépatiques chroniques d'origine alcoolique demeurent encore une énigme. Néanmoins, la fréquence de l'hépatotoxicité est liée à l'âge, à la dose et à la durée du traitement.

De nombreux arguments montrent que l'éthanol est responsable au niveau hépatique d'un stress oxydant résultant d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives oxygénées (ERO), pro-oxydantes, et les systèmes intrinsèques de protection antioxydante. Ceci suggère que des supplémentation en antioxydants pourraient présenter un intérêt dans la réduction du stress oxydant et la limitation de l'évolution des atteintes hépatiques.

Dans la présente étude, nous avons investi les marqueurs du stress oxydatif généré par l'éthanol dans les hépatocytes et étudié l'effet antioxydant et hépatoprotecteur d'un extrait butanolique de *limonium sp* vis-à-vis de l'hépatotoxicité induite par l'éthanol.

Les résultats ont montré clairement une élévation significative du MDA, lorsque les animaux sont traités avec l'éthanol, traduisant une augmentation de la lipoperoxydation et par conséquent des dommages tissulaires par formation excessive de radicaux libres [49,50]. Ce constat est susceptible d'expliquer la fuite des transaminases hépatiques et leur passage au

niveau sanguin. Par contre, l'administration préventive de l'extrait butanolique associés avec l'éthanol, maintient l'équilibre du système redox intrahépatocytaire. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Hassan, 2012 [51].

Le glutathion réduit (GSH), antioxydant non enzymatique, constitue la première ligne de défense antiradicalaire. La déplétion du GSH hépatique est généralement associée à l'hépatotoxicité [52]. Dans la présente étude, les résultats ont révélé une déplétion significative du GSH hépatique chez les rats traités par l'éthanol. Par contre, la teneur hépatocytaire de GSH est maintenue à son niveau cellulaire normal quand les rats sont traités par l'éthanol associée à l'extrait butanolique de *Limonium sp.* Grâce à leur pouvoir antiradicalaire, les polyphénols présents dans cet extrait sont en effet capables d'empêcher la chute du GSH en stimulant sa régénération à partir de GSSG suite à la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans l'étude de l'activité antioxydante et hépatoprotectrice des extraits de *Phyllanthus amarus* et *Eclipta prostrata* [53].

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO), par une réactivité élevée et une vie très courte, sont analysées indirectement par l'évaluation d'un enzyme antioxydant, la GPx. L'augmentation de l'activité de la GPx est observée dans le foie des rats traitées par l'éthanol où nous avons observé une elevation importante. Ce résultat peut expliquer une production intensive de H₂O₂ suite au traitement des rats par l'éthanol. Par contre, le prétraitement des rats par l'extrait butanolique de *limonium sp* atténue complètement ces effets puisque le taux de GPx reviennent à la normale. Ces résultats confirment les propriétés antioxydantes des composés phénoliques démontrés dans plusieurs travaux.

Conclusion

L'extrait butanolique de *limonium sp* est riche en polyphénols, et peuvent être considéré comme une source naturelle très importante de constituants phytopharmaceutiques utilisés pour diminuer les radicaux libres responsables de nombreuses pathologies. L'extrait butanolique a montré un excellent pouvoir inhibiteur de la peroxydation lipidique et celle du piégeage du radical libre DPPH.

L'expérimentation réalisée dans le cadre de cette étude a confirmé l'effet hépatotoxique de l'éthanol. Ses effets se traduisent par un dommage tissulaire profond suite à la production intensive des radicaux libres provoquant un déséquilibre dans le statut redox cellulaire.

L'extrait butanolique de *Limonium sp* jouent un rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydatif produites dans le foie par l'éthanol. Nos résultats montrent que l'extrait butanolique de *Limonium sp* contient des composés phénoliques antioxydants piègeurs de radicaux libres qui protègent les hépatocytes contre la lésion oxydante de l'éthanol.

De même, il serait intéressant d'envisager l'utilisation de ressources naturelles pour remplacer les anti-oxydants de synthèses largement utilisés en industrie agro alimentaire et pharmaceutique.

Résumé

Dans cette étude, nous avons tenté d'évaluer l'activité antioxydante de l'extrait *n*-butanol préparé à partir des parties aériennes de *Limonium sp.*

Nous avons tout d'abord procédé aux dosages quantitatifs colorimétriques par un spectrophotomètre UV-Vis des polyphénols totaux, ainsi que les flavonoïdes comme étant la classe la plus importante de la famille des polyphénols

Les dosages quantitatifs des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes par la méthode d'AlCl₃ ont révélé la richesse du *Limonium sp* en polyphénols, où la teneur est 343 µg EAG / mg d'extrait et 220,5 µg EQ / mg extrait respectivement.

Le pouvoir antioxydant de l'extrait a été évalué *in vitro* par les tests du DPPH• et l'Inhibition de la peroxydation lipidique dans le *vitellus des œufs*, la Vitamine C est utilisé comme contrôle. Des résultats obtenus, il ressort que ces polyphénols ont une grande capacité de piéger le radical DPPH• et d'inhiber la peroxydation lipidique avec un pourcentage appréciable de l'ordre de 76.00%.

Les activités antioxydantes de l'extrait *n*-butanol de *Limonium sp* est confirmé *in vivo* chez le rat, l'administration de l'extrait butanolique par voie orale à raison de 100 mg/kg et de l'éthanol chaque 6 h (3dose) pendant 2 jours, a entraîné une action hépatoprotecteur.

Mots clés: *Limonium sp*, polyphénol, flavonoïdes, Activités Antioxydantes, Stress oxydant.

ملخص

في هذه الدراسة حاولنا تقدير النشاط المضاد للاكسدة للمستخلص البيتانولي لنبات (*Limonium sp*). قمنا اولاً بإجراء تقدير كمي بواسطة مطيافية الاشعة فوق البنفسجية المرئية للفينولات و كذلك الفلافونيدات على أساس أنها أهم قسم من العائلة الفينولية. بين كل من التقدير الكمي للفينولات باستعمال طريقة Folin-Ciocalteu و الفلافونيدات باستعمال طريقة $AlCl_3$ غنى المستخلص البيتانولي لنبات (*Limonium sp*) بالفينولات و الفلافونيدات حيث تحتوي على (343 ميكرو غرام مكافئ حمض الغاليك / مغ مستخلص و 220.5 ميكرو غرام مكافئ الكيرستين / مغ مستخلص) على التوالي. تم تقدير النشاط المضاد للأكسدة لهذه المستخلصات باستعمال اختبارات DPPH• و تثبيط الاكسدة الفوقية لليبيدات في صفار البيض مقارنة بالفيتامين C . من خلال النتائج المتحصل عليها يتضح بان هذه المستخلصات قادرة على اقتناص الجذر الحر DPPH• وعلى تثبيط الأكسدة الفوقية لليبيدات و بنسب معتبرة تعادل 76.00% . تم تأكيد الخصائص المضادة للأكسدة للمستخلص البيتانولي *in vivo* على الجرذان. حيث إن إعطاء 3 جرعات من الميثانول عن طريق الفم لمدة يومين مع المستخلص البيتانولي (100 ميكرو غرام / كغ) أدى إلى وقاية الكبد من التسمم المعرض بالايثانول.

الكلمات المفتاحية: *Limonium sp*, عديدات الفينول, الفلافونيدات, النشاطية المضادة للتأكسد للتأكس..

Abstract

In this study we tried to estimate the antioxidant activity of *n*-butanol extract prepared from the aerien part of *Limonium sp.*

First, we carried out colorimetric quantification by a spectrophotometer UV-Vis of total polyphenols as well as the flavonoids being the most important class of the family of polyphenols.

The quantification of total polyphenols using the Folin-Ciocalteu method and of the flavonoids using the AlCl₃ method revealed the richness of the *Limonium sp* in polyphenols. The content of the extract in phenolic compounds was respectively 343µg EAG/mg of extract and 220.5 µg EQ/mg of extract.

The antioxidant capacity of this extract was evaluated *in vitro* by these tests: DPPH• free radical scavenging assay and Inhibition of lipid peroxydation in the *vitellus*, Compared with vitamin C. The extract demonstrated a great capacity to scavenge the DPPH• radical and to inhibit lipid peroxydation with respectable percentages of about 76.00 %.

The antioxidant activities of the *n*-butanolic extract of *Limonium sp* is confirmed by an *in vivo* assay in rat, the oral administration of the extract (100 mg/kg) and ethanol each 6 h (3 time) during 2days, result in hepatoprotective action.

Key Words: *Limonium sp*, Polyphenols, Flavonoids, Antioxidant activity, Stress oxidant.

Références bibliographiques

- [1] **Lhuillier A.** Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambourissa trichophylla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embelia concinna* Baker (*Myrsinaceae*). Thèse de doctorat. Toulouse. 2007
- [2] **Iserin P.** Encyclopédie des plantes médicinales. Identification, Préparations, soins. 2nd edition, Dorling Kindersley Limited, Londres. 2001; Pages : 10-15.
- [3] **Boizot N et Charpentier JP.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. Le cahier des Techniques de l'Inra. 2006 ; pp79-82.
- [4] **Combrinck S, Du Plooy GW, Mccrindle RI, Botha BM,** Morphology and Histochemistry of the Glandular Trichomes of *Lippia scaberrima* (*Verbenaceae*). *Annals of botany*. 2007; **99** (6) : 1111–1119.
- [5] **Hadj Salem J.** Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. Thèse pour l'obtention de grade de Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine. Université- INPL Nancy, 2009.
- [6] **Koehler-Ramonatxo C.** Oxygen , oxidative stress and antioxidant supplementation ,or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique*. 2006 ; **20**:165-177.
- [7] **Sergeant C, Hamon C, Simonoff M, Constans J, Conri C, Peuchant C, Delmas-Beauvieux MC, Clerc C, Pellegrin JL, Leng B, Pellegrin I, & Fleury H.** Oxidative Stress in Cancer. *AIDS and neurodegenerativediseases*. Editors: L. Montagnier, R. Olivier, C. Pasquier; Marcel Dekker. Inc. New York- Basel-Hong Kong.1998; 409-427.
- [8] **Dr Hans W. Kothe.** 1000 plantes aromatiques et médicinales. Blue Earths Publishers Limited. 2007; Pages:10-13.
- [9] **Donatien K.** Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes – Extraction, Identification d'Alcaloïdes – Caractérisation, Quantification de polyphénols : Etude de leur activité antioxydante. Thèse de doctorat. Université de Bamako et Université de Paul Verlaine de Metz France. 2008.
- [10] **Hertog MGL, Hollman PCH, Katan M, Kromhout D.** Intake of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids and Their Determinants in Adults in The Netherlands. *Nutrition and Cancer*. 1993; **20**(1):21-29.
- [11] **Bruneton J.** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.1993.
- [12] **Boros B, Jakabova S, Dornyei A, Horvath G, Pluhare Z, Kilar F, Felinger A.** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*. 2010; **1217**: 7972–7980.
- [13] **Rein D, Paglieroni TG, Wun T, Pearson DA, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL.** Cocoa inhibits platelets activation and function, *Am. J. Clin. Nutr.* 2000; **72**:30-5.
- [14] **Marfak A.** Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les Radicaux issue des Alcool : Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université-Limoges, Ecole Doctorale Sciences Biologie Sante, Faculte de Pharmacie. 2003.

- [15] **MOREL S.** Etude phytochimique et évaluation biologique de *derris ferruginea* Benth(Fabaceae). Thèse de doctorat. Université d'Angers. 2011.
- [16] **Morel Y, Barouki R.** Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. Med Sci (Paris).1998 ; 14 : 713-21.
- [17] **Lecerf JM.** Anti-oxydants : qu'en attendre ? Réalités en Nutrition. 2009,No 17.
- [18] **Garait B.** Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la Glisodin. Thèse de doctorat. Université-Joseph Fourier-Grenoble 1, 2006.
- [19] **Pelli K et Lyly M.** Les antioxydants dans l'alimentation. Biotechnology Finlande, 2003; Pages : 6, 8.
- [20] **Cadenas E, Davies JA,** Free Radic. Biol. Med. 2000 ; 29, p. 222.
- [21] **Ronald M St-Louis** Implication des espèces de l'oxygène dans le contrôle central de l'osmorégulation, Thèses de doctorat, Université-Paris VI, Pierre et Marie Curie, 2011.
- [22] **Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO.** Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme: importance en matière de prévention. cancerologie. Medi Sphere 95; 1999.
- [23] **Baillie JK, Bates MGD, Thompson AAR, Waring WS, Partridge RW, Schnopp MF, Simpson A, Gulliver-Sloan F, Maxwell SRJ, Webb DJ.** Lowland Subjects Exposed to High Altitude Plasma Antioxidant Capacity in Healthy Endogenous. Urate Production Augments. Chest. 2007; **131** :1473-8.
- [24] **Pincemail J, Lecomte J, Collart E, Castiaux JP, Defraigne JO.** Stress oxydant, antioxydants et exercice physique. Vaisseaux, Coeur, Poumons. 2001; **6**(5): 1-3.
- [25] **Bouزيد W, Yahia M, Abdeddaim M, Aberkane MC et Ayachi A.** Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'aubépine monogyne. Lebanese Science Journal. 2011; 12(1):59-69.
- [26] **Cillard J, Cormier M, Girre RL.** Autoxidation rate increase of linoleic acid in the presence of tocopherol in aqueous medium; study of the transformation of tocopherol. CR Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D. 1975; **281**: 455-458.
- [27] **Mates JM & Sanchez-Jimenez FM.** Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. Int J Biochem Cell Biol. 2000; **32**: 157-170.
- [28] **Remesy C, Manach C, Demigne C, Texier O, et Regeat F.** Intérêt nutritionnel des flavonoides. Med et Nut.1996 ; **32** (1) : 17-27.
- [29] **Cooke JP.** Nutraceuticals for Cardiovascular Health. Am J Cardiol. 1998; **82**(10A):43S-46S.
- [30] "Coronary Heart Disease and Flavonoids" Nutrition Week, 1999; **29**(21):7/Am J Epidemiol, 1999; **149**(10):943-949.
- [31] **Ohrvall M, Sundlof G, Vessby B.**Tocopherols and Heart Disease Nutrition Report, 1996; 20/"Gamma, But Not Alpha, Tocopherol Levels in Serum are Reduced in Coronary Heart Disease Patients. Journal of Internal Medicine, 1996; **239**:111-117
- [32] **Delattre J, Thérond P, Bonnefont-Rousselot D.** Espèces réactives de l'oxygène, antioxydants et vieillissement. In : Delattre JB, Bonnefont-Rousselot D, eds. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Paris : Lavoisier, 2005 : 281-309.
- [33] **Barouki R, Morel Y.** Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress : mechanisms and biological implications. Biochem Pharmacol 2001; **61**: 511-6.

- [34] **Finkel T.** Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 2003; **15**: 247-54.
- [35] EU Project Case Only Study (COS) on the interaction of diet and genetic predisposition in the occurrence of breast cancer in young women (présentation résumée à l'adresse <http://www.istitutotumori.mi.it/istituto/documenti/cittadino/COSleaflet2006.pdf>)
- [36] **Leake DS.** Effects of Flavonoids on the Oxidation of Low-Density Lipoproteins. *Flavonoids in Health and Disease*, 1998; Chapter **10**:253- 276
- [37] **Halpern MJ, Dahlgren AL, Laakso I, Seppanen-Laakso T, Dahlgren J and McAnulty PA.** Red-Wine Polyphenols and Inhibition of Platelet Aggregation: Possible Mechanisms, and Potential Use in Health Promotion and Disease Prevention. *J Int Med Res*, 1998; **26**:171-180
- [38] **Puppo A.** Effect of Flavonoids on Hydroxyl Radical Formation by Fenton-Type Reactions; Influence of the Iron Chelator. *Phytochemistry*, 1992; **31**(1):85-88
- [39] **Magder S.** Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care*, 2006; **10**: 208-216.
- [40] **Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. In: Packer L, editor. *Methods in enzymol: oxidant and antioxidants (part A)*, vol. 299. San Diego, CA: Academic Press, 1999; p: 152–78
- [41] **Wang H, Dong Gao X, Zhou GC, Cai L, Yao WB.** In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. *Food Chem* 2008; **106**:888-895.
- [42] **Braca A, De Tommasi N, Di Bari L, Pizza C, Politi M, Morelli I.** Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. *J. Nat. Prod*, 2001; **64**:892-895
- [43] **Cao U, Ikeda I.** Antioxidant activity and antitumor activity (in vitro) of xyloglucan selinious ester and surfated xyloglucan. *Int J Biol. Macromol* 2009; **45**:231-235
- [44] **Uchiyama M, Mihara M.** Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thriarbituric acid test. *Anal. Biochem* 1978; **86**: 271-278
- [45] **Flohe L, Gunzler WA.** Analysis of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.* 1984; **105**: 114-121.
- [46] **Lowry OH, Rosegrough N J, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 1951; **193**: 265-275
- [47] **Ellman G L.** Plasma antioxidants. *Arch. Biochemistry & Biophysics* 1959; **82**: 70-77
- [48] **Bergmeyer HU, Scheibe P and Wahlefeld AW.** Methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. *Clin. Chem* 1978; **24**: 58-73
- [49] **Kalaz EB, Evran B, Develi S, Erata GÖ, Uysal M, ak-Toker KN.** Effect of binge ethanol treatment on prooxidant–antioxidant balance in rat heart tissue. *Pathophysiology* 2012; **19** (2012) 49–53

[50] **Dobrzyńska I, Szachowicz-Petelska B, Skrzydlewska E, Figaszewski Z.** Effects of Green Tea on Physico-Chemical Properties of Liver Cell Membranes of Rats Intoxicated with Ethanol. Polish J. of Environ. Stud. 2008; **17**(3): 327-333

[51] **Hassan HMM.** Hepatoprotective Effect of Red Grape Seed Extracts Against Ethanol-Induced Cytotoxicity Global Journal of Biotechnology & Biochemistry 2012; **7** (2): 30-37.

[52] **Bishayee A, Sarkar and M Chatterjee.**

the hepatoprotective activity of carrot (*Daucus carota* L.) against carbon tetrachloride intoxication in mouse liver, Journal of Ethnopharmacology 1995; **47**: 69–74.

[53] **Arun K , Balasubramanian U.** Comapartive

Study on Hepatoprotective activity of *Phyllanthus amarus* and *Eclipta prostrate* against alcohol induced in albino rats International journal of environmental sciences. 2011; **2**(1):361-379.

[54] **Milane H,** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Strasbourg. 2004.

[55] **Wardman P, Candeias L P,** Radiat. Res, **1996**; 145, p. 523.

[56] **Harborne JB.** Secondary Plant Products. Encyclopedia of Plant Physiology, Vol 8, Bell EA, Charlwood BW, eds, Springer-Verlage, Berlin, 1980; p.329-402. In : Les composés phénoliques des végétaux.

[57] **Hollman PCH, Hertog MGL, Katanc MB.** Analysis and health effects of flavonoids. Food chem. 1996; **51**: 43-46.

[58] **Cowan MM.** Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews. 1999; **12** : 564–582.

[59] **Tipu MA, Akhtar MS, Anjum MI, Raja ML.** New dimension of medicinal plants as animal feed. Pakistan Veterinary Journal. 2006; **26** (3) : 144–148.

[60] **Viegi L, Pieroni A, Guarrera PM, Vangelisti R.** A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. Journal of Ethnopharmacology. 2003; **89** : 221–244.

[61] **Bodas R, Lopez S, Fernandez M, Garcia-Gonzalez R, Rodriguez AB, Wallace RJ, et al.** *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. Animal Feed Science and Technology. 2008; **145** : 245–258.

[62] **Karray-Bouraoui , Rabhi M, Neffati M, Baldan B, Ranieri A, Marzouk B, et al.** Salt effect on yield and composition of shoot essential oil and trichome morphology and density on leaves of *Mentha pulegium*. Industrial Crops and Products. 2009; **30** : 338–343.

[63] **Kamra DN, Agarwal N, Chaudhary LC.** Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. International Congress Series. 2006; **1293** : 156–163.

[64] **Kamra DN.** Rumen microbial ecosystem. Current Science. 2005; **89** (1) : 124–135.

[65] **Boizot N et Charpentier J-P.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. Le cahier des Techniques de l'Inra. 2006 ; pp79-82.

- [66] **Zimmer N et Cordesse R.** Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants Ed INRA Prod Anim. 1996 ;**9** :167-179.
- [67] **Perret C.** Analysis de tannins inhibiteurs de stilbène oxydase produite par *Brytis cinerea* Pers. FR .Thèse de Doctorat .Université de Neuchatel. 2001; 173p.
- [68] **Chavan UD, Shahidi F, Naczk M.** Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. Food Chemistry. 2001; **75**:509-512.
- [69] **Peronny S.** La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta).Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle .Discipline Eco-Ethologie. 2005;151p.
- [70] **Ghestem A, Seguin E, Paris M, Orecchioni AM.** Le préparateur en pharmacie .Dossier 2.Editions Technique & Documentation, Paris. 2001 ; 275p.
- [71] **Bruneton J.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, (3ème éd).Tec et Doc (Ed), Paris. 1999 ;1120p
- [72] **Dacosta Y.** Les phytonutriments bioactifs.Yves Dacosta (Ed).Paris. 2003; 317 p
- [73] **Sokol-Letowska A, Oszmianski J, Wojdylo A.** Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn pine and skullcap.Food chemistry. 2007; **103**:853-859.
- [74] **Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F.** Flavonoids as antioxidant agents importance of their interaction with biomembranes .Free radical biology & medicine. 1995; **19**:481-486.
- [75] **Formica JV et Regelson W.** Review of the Biology of quercétin and related Bioflavonoids.Fd Chem.Toxic. 1995; **33**:1061-1080.
- [76] **Lee YJ, Erdos G, Hou Z, Kim SH, Kim JH, Cho JM, Corry PM.** Mechanism of quercetin-induced suppression and delay of heat shock gene expression and thermotolerance development in HT-29 cells. Molecular and cellular biochemistry. 1994; **137**: 141-154.
- [77] **Schewe T, Sies H.** Flavonoids as protectants against prooxidant enzymes. Biologie médicale. 2003; **34**: 243-253.
- [78] **Pietta PG.** Flavonoids as antioxidants. Journal of natural products. 2000; **63**: 1035-1042.
- [79] **Densiov ET, Afanas'ev IB.** IN: Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Eds: Taylor & Francis Group (U.S.A). 2005; Pp: 703-861.
- [80] **Sorg O.** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. Comptes Rendus Biologies. 2004; **327**: 649-662.
- [81] **Berlette BS, Stadtman ER.** Protein oxidation in aging disease, and oxidative stress. The Journal of biological chemistry. 1997; **272**: 20313-20316.
- [82] **Martínez Cayuela M.** Oxygen free radicals and human disease. Biochimie. 1995; **77**: 147-161.
- [83] **Lehucher Michel MP, Lesgards JF, Delubac O, Stocker P, Durand P, Prost M.** Stress oxydant et pathologies humaines. La Presse médicale. 2001; **30**: 1076-1081.

[84] **Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Biocell.* 2007; **39**: 44-84.

[85] **Jung T, Bader N, Grune T.** Oxidized proteins : intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2007; **462**: 231-237.

[86] **Goudable J, Favier A.** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme.* 1997; **11**: 115-20.

[87] **Zelko IN, Marian TJ, Folz RJ.** Superoxide dismutase multigene family : a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free radical biology & medicine.* 2002; **33**: 337-349.

[88] **Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne JO.** Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme.* 2002; **16**: 233-239.

[89] **Herbert RB.** The Biosynthesis of secondary metabolites. 2^{ème} édition Campman and Halle. 1989; P 2, 11-115.

[90] **Puppo A.** Effet of flavonoids on Hydroxyl Radical Formation by Fenton-Type Reaction ; Influence of the Iron Chelator. *Phytochemistry*, (1999; 31(1) :85-88.

[91] **Turrens JF, Alexander A, Lehninger AL.** Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch BiochemBiophys.* 1985; **237** :408-414.

[92] **Nancy J, Linford SI, Chriner E, Peter S, Rabinovitch1.** Oxidative Damage and Aging : Spotlight on Mitochondria . *Cancer Res.* 2006; **66** : 2497-2499.

[93] **Finaud J, Scislowski V, Lac G, Durannd D, Vidalin H, Robert A, Filaire E.** Antioxidants Status and Oxidative Stress in Professional Rugby Players Evolution Throughout a Season. *Int J Sports Med.* 2006; **27** : 87-93.

[94] **Johnson RJ, Sautin YY, Oliver WJ, Roncal C, Mu W, Gabriela Sanches-Lozada L, Rodriguez-Iturbe B, Nakagawa T, Benner SA.** Lessons from comparative Physiologie : could uric acid represent a physiologic alarm signal gone awry in western society. *J Comp Physiol B.* 2009;**179**(1) : 67-76.

[95] **Vasconcelos SML , Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato M, Kubota LT.** Espécies reactivas de oxigénio et de nitrogénio, antioxydants e marcadores de dano oxidativo em sangue humano : principais métodos analiticoa para sua determinação. *Quim Nova.* 2007 ; **30**(5) : 1323-38.

[96] **Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC.** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000; **52**: 673-839.

- [97] **Hennebelle T, Sahpaz S, Bailleul F.** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*. 2004 ; **1**: 3-6.
- [98] **Bossokpi IPL.** Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloides* LAM (Rutaceae). Thèse de pharmacie, Bamako. 2002 ; p 133.
- [99] **Favier A.** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 2003 ; 108-115.
- [100] **Rahman I.** Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic target. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2002; **1**(3) : 291-315.
- [101] **Scalbert A, Williamson G.** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*. 2000; **130** : 2073-2085.
- [102] **Girotti –Chanu C.** Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine , flavone extraite de miirotea de bilis .thèse de Doctorat. Institut national des sciences appliquées de Lyon. 2006 ; 136p.
- [103] **Gamet-Payrastre L, Manenti S, Gratacap MP, Tulliez J, Chap H, Payrastre B.** Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *General Pharmacology*. 1999 ; **32**: 279-286.
- [104] **Knaggs AR.** The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*. 2003; **20** : 119–36.
- [105] **Nacz M, Shahidi F.** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*. 2004; **1054** : 95–111.
- [106] **Martin S, Andriantsitohaina R.** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. 2002 ; **51** : 304–315.
- [107] **Babar Ali M, Hahn EJ, Paek KY.** Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules*. 2007; **12**: 607-621.
- [108] **Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdelly C.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .*C. R. Biologies*. 2008; **331**: 372-379.
- [109] **Gomez-Caravaca AM, Gomez-Romero M, Arraez-Roman D, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A.** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006; **41**: 1220-1234.
- [110] **Manach C, Mazur A, Scalbert A.** Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*. 2005; **16**: 1–8.
- [111] **Felidj M, Bouazza M, Ferouani T.** Note sur le cortège floristique et l'intérêt de la plante médicinale *Ammoides pussila (verticillata)* dans le Parc national des Monts de Tlemcen (Algérie occidentale); **2010**, 34 : 147 - 154

Annexe

Classification:

Kingdom: Plantae

Phylum: Tracheophyta

Class: Magnoliopsida

Order: Caryophyllales

Family: Plumbaginaceae

Genus: Limonium

Species: *Limonium sp*

Bouhlais Meriem et Bouhala Roukia

Date de soutenance : 23/06/2014

Thème : Evaluation de l'activité biologique d'une plante endémique "*Limonium sp*"

Nature du diplôme : Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la vie.

Mention : Physio toxicologie.

Résumé

Dans cette étude, nous avons tenté d'évaluer l'activité antioxydante de *n*-butanol l'extrait préparé à partir des parties aériennes de *Limonium sp*.

Nous avons tout d'abord procédé aux dosages quantitatifs colorimétriques par un spectrophotomètre UV-Vis des polyphénols totaux, ainsi que les flavonoïdes comme étant la classe la plus importante de la famille des polyphénols

Les dosages quantitatifs des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes par la méthode d'AlCl₃ ont révélé la richesse du *Limonium sp* en polyphénols, où la teneur est 343 µg EAG / mg d'extrait et 220,5 µg EQ / mg extrait respectivement.

Le pouvoir antioxydant de l'extrait a été évalué *in vitro* par les tests du DPPH• et l'Inhibition de la peroxydation lipidique dans le *vitellus des œufs*, la Vitamine C est utilisé comme contrôle. Des résultats obtenus, il ressort que ces polyphénols ont une grande capacité de piéger le radical DPPH• et d'inhiber la peroxydation lipidique avec un pourcentage appréciable de l'ordre de 76.00%.

Les activités antioxydantes de l'extrait *n*-butanol de *Limonium sp* est confirmé *in vivo* chez le rat, l'administration de l'extrait butanolique par voie orale à raison de 100 mg/kg et de l'éthanol chaque 6 h (3dose) pendant 2 jours, a entraîné une action hépatoprotecteur.

Mots clés: *Limonium sp*, polyphénol, flavonoïdes, Activités Antioxydantes, Stress oxydant.

Devant le jury :

Président du jury : Mr. Menad Ahmed Prof. Université Mentouri de Constantine

Rapporteur : M^{me} Amrani Amel M.C Université Mentouri de Constantine

Examineur : M^{elle} Ihoual Safia M.A Université Mentouri de Constantine

Mr. Bouldjaj Radouane M.A Université Mentouri de Constantine