

République algérienne démocratique et populaire  
Ministère de l'Enseignement supérieure et de la recherche scientifique  
Université frères mentouri Constantine



Faculté des sciences de la nature et de la vie  
Département de biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Mémoire présent en vue l'obtention du diplôme de master  
Domaine science de la nature et de la vie

Filière : biologie moléculaire et cellulaire  
Spécialité : biologie cellulaire et physiopathologie

**Thème : évaluation de l'activité antioxydant et anti  
inflammatoire des plantes médicinales algériennes**

*Thymus vulgaris, Matricaria recutita*

*Anethum graveolens*

Le : 01/07/2015

**Présenté et soutenu par :**

❖ **KHALDI FATIMA ZOHRA**

**Jury d'évaluation :**

- ❖ **PRESIDENT DU JURY : ROUABEH LEILA** Professeur à L'UMCI
- ❖ **RAPPORTEUR : IHOUAL-SAFIA** Maitre Assistante à L'UMCI
- ❖ **EXAMINATEUR : ABED NOUSSAIBA** Maitre Assistante à L'UMCI

**Année universitaire**

**2014/2015**

## **Remerciement :**

*Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et Le courage de surmonter tous les problèmes*

*En préambule à ce mémoire, nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous avons apporté leur aide et qui nous avons contribué à l'élaboration de mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire*

*Nous tenons remercier M<sup>elle</sup> : **IHOUAL SAFIA** , qui en tant que directrice de la mémoire ,s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire ,ainsi pour l'inspiration ,l'aide et le temps qu'il a bien voulu nous consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour*

*Nous exprimons notre profonde et respectueuse gratitude à Mme **L. ROUABAH**, professeur a l'université de Constantine, pour sa disponibilité de présider notre jury*

*et à Mme **ABED NESSAIBA** maître assistante à l'Université De Constantine I .*

*Nous adressons également nos sincères remerciements à tous nos professeurs de faculté des sciences de la nature et de la vie spécialement département de biochimie et biologie moléculaire et cellulaire de l'université Constantine I qui ont assuré notre formation*

*A nos parents, à la source d'amour et d'affection à ceux qui ont passé leur vie à m'éduquer et à me guider vers la réussite jour après jour,*

## Abstract

The antioxidant compounds are the subject of many works because, in addition to their use as conservatives in the foodstuffs by replacing synthesis antioxidants, they intervene in the treatment of many diseases. Within the framework of discovered new antioxidants from the natural sources, we have investigated in this work, the study of phenolic compounds and the evaluation of the antioxidant and antiinflammatory properties of *thymus vulgaris*, *matricaria recutita*, *anethum graveolens* aqueous extracts.

The first part of this study concerns the extraction and the quantification of total phenolics and flavonoids, by blue of Prusse and the aluminium trichloride respectively. The results obtained showed the richness of *thymus vulgaris*, and *anethum graveolens* and a middle result of *matricaria recutita*.

The second part is the study of the antioxidant and antiinflammatory activity of the plant extract using two techniques: DPPH radical scavenging and inhibition of protein denaturation method.

The antioxidant activity methods showed that *THV*, *AG*, *MR* have an effect scavenging of radicals (DPPH•) and, compared to BHT. And inhibition of protein denaturation. These results suggest that these plants can be used to treat diseases and inflammation that require the scavenging of free radical.

### Keywords:

*matricaria recutita*, *thymus vulgaris*, *anethum graveolens*, activité antioxydant, radicaux libres, polyphénols, flavonoïdes, inflammation, DPPH.

## Liste des abréviations :

**A** :absorption  
**ADN** :Acide désoxy-ribo-nucléique.  
**AGPI** :acides gras polyinsaturés.  
**ARN** :acide ribo-nucléique.  
**ATP** :adénosine triphosphate.  
**BSA** : Bovine serum albumine  
**BHT** : Butylated hydroxytoluen  
**CAT** :enzyme catalase .  
**CCL4** :tetrachlorure de carbone.  
**CML** :chronic myeloid leukemia.  
**Co-Q** :ubiquinone ou co-enzyme Q.  
**Co-QH**:ubisemiquinone.  
**Co-QH2** :ubiquinol.  
**Cu/Zn-SOD** :superoxyde dismutase aux ions cuivre et zinc.  
**Cox-2** :cyclo-oxygenase de type 2.  
**Da** :dalton.  
**DPPH** : 1,1-Diphényl -2-picryl-hydrazyl  
**DPPHH** :Diphénylpicrylhydrazine  
**Dos** :donorubicine  
**EA** :extrait aqueu  
**EAAG** : extrait aqueu d'anethum graveolens  
**EAMR** : extrait aqueu de matricaria recutita  
**EATHV** : extrait aqueu de thymus vulgaris  
**EQ** :equivalent de quercetine  
**EM** :extrait méthanolique  
**EGF** :epidermal growth factor.  
**ERO** :espece réactive de l'oxygène .  
**FADH2** :flavine adénine dinucléotide réduit.  
**Fe<sup>2+</sup>** :fer ferreux.  
**g** :gramme  
**GMPc6** :guanilate cyclase.  
**GPx** :glutathion peroxydase.  
**GR** :glutathion reductase.  
**GSSG** :glutathion oxydé.  
**GSH** :glutathion réduit.  
**H<sup>+</sup>** :proton.  
**H2O2** :peroxyde d'hydrogène.  
**HOCl** :acide HPOCHLORIQUE .  
**HOO°** :radical hydroperoxyde.  
**HTA** :Hypertension artérielle.  
**IC50** : Concentration inhibitrice à 50%  
**I%** :pourcentage d'inhibition  
**ICAM** : molécule d'adhésion intercellulaire  
**Ils** : interleukines  
**LT** :leucotriene  
**IEG** :intermédiaire 1beta.  
**IRM** :imagerie par résonance magnétique .  
**LDL** :low density lipoprotéine  
**LTB4** :leucotéiène B4

**OH<sup>-</sup>** :anion hydroxyle .  
**OH<sup>°</sup>** :radical hydroxyle.  
**MCP-1** : proteine 1 chimotactique. de macrophage  
**MDA** :malondialdehyde.  
**Mn-SOD** :superoxyde dismutase associé au manganése.  
**MPO**→myeloperoxydase.  
**NADH<sup>+</sup>** :nicotine adénine dinucléotide réduit.  
**NMDA** :N-methyl D-aspartase.  
**NO** :monoxyde d'azote.  
**NO<sub>2</sub>** :dioxyde d'azote.  
**NOS** :nitric oxyde synthase .  
**O<sub>2</sub>** :dioxygène.  
**O<sub>2</sub><sup>°-</sup>** :anion superoxyde.  
**ONOO<sup>°-</sup>** :peroxynitrite.  
**PDGF** :platelet-derived growth factor.  
**PKc** :proteine kinase c.  
**PN** :polynucéaires neutrophyles  
**PMN** :polymorphonucéaires neutrophyles  
**R** :rendement  
**ROS** :Reactive oxygen species  
**RO<sup>°</sup>** :radical alcoxyle.  
**ROO<sup>°</sup>** :radical peroxyde.  
**SD** :standart deviation  
**SH** :groupement sulfhydrique.  
**SOD** :superoxyde dismutase.  
**TGF-1 β**:trasforming growth factor 1beta.  
**TNF-α** :tumor necrosis factor alpha..  
**UV** :ultra-violet.  
**%** :pourcentage

## **SOMMAIRE :**

INTRODUCTION .

### **PARTIE I :REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

#### **CHAPITRE I :LES PLANTES MEDICINALES .**

<b>I-1-</b> L'utilisation médicinale des plantes.....	01
<b>I-2-</b> La phytothérapie et les produits naturels .....	02
<b>I-3-</b> les produits naturels des plantes et leurs activités biologiques.....	03
-les métabolites primaires.....	03
-les métablites secondaires.....	03
<b>I-3-1-</b> les flavonoides.....	03
<b>I-3-2-</b> les tannins.....	03
-les tannins hydrolysables.....	04
-les tannins condensés.....	04
<b>I-3-3-</b> les terpènes.....	04
<b>I-3-4-</b> les saponosides.....	04
1-1-5-les coumarines.....	04
1-1-6-les alcaloides.....	04
A-la plante médicinale <i>Matricaria recutita</i> .....	05
A-1-description de la plante.....	05
A- 2 -place dans la systematique.....	06
A- 3 -répartition géographique.....	06
A-4-utilisation en medecine traditionnelle.....	06
A-5 -composition chimique.....	07
B-la plante médicinale <i>Thymus vulgaris</i> .....	07
B -1-description de la plante.....	07
B -2-place dans la systematique.....	08
B-3 -répartition géographique.....	08
B-4 -utilisation en medecine traditionnelle.....	09
B-5 -composition chimique.....	09
C- la plante médicinale <i>Anethum graveolens</i> .....	10

C-1 -description de la plante.....	10
C-2 -place dans la systematique.....	11
C -3 -répartition géographique.....	11
C -4-utilisation en medecine traditionnelle.....	11
C-5 -composition chimique.....	12

## **CHAPITRE II :LES FLAVONOIDES**

II-1-vue d'ensemble sur les polyphenols.....	13
II-1-1- definition des flavonoides .....	13
a.Flavonoïdes hétérosides.....	14
b. Les flavonoïdes aglycones.....	14
II-1-2- Biosynthèse des flavonoïdes .....	14
II-1-3-structure chimique et classification .....	15
II-1-4- Rôle physiologique des flavonoïdes pour les plantes.....	18
II -1-5-propriétés biologiques .....	18
II-1-5-1 -activité antioxidante.....	18
II-1- 5-2-activités anti-inflammatoires .....	20
II -1-5-3-effets protecteurs vasculaires.....	20
II -1-5-4-effets antiallergiques.....	21
II -1-5-5- Propriétés antivirales et antibactériennes.....	21
II -1-5- 6 -D'autres activités biologiques.....	22

## **CHAPITRE III : L'INFLAMMATION :**

III-1-Définition.....	23
III-2-Les causes de l'inflammation .....	23
III -3- les cellules de l'inflammation.....	23
III-4- Les médiateurs de l'inflammation.....	24
III-4-1- Facteurs d'origine locale(cellulaire).....	25
-Amines vasoactives (histamine-sérotonine).....	25
-Prostaglandines et leucotriènes .....	25
-Les cytokines .....	25
-les molécules d'adhérence .....	26

III-4-2-Médiateurs circulants (plasmatiques).....	26
-le système de kinines.....	26
-le système du complément.....	26
-Le système de coagulation /fibrinolyse .....	27
III-4-3-médiateurs lipidiques.....	27
III-4-3-1-dérivés de l'acide arachidonique .....	28
III-4-3-2-facteur d'activation plaquettaire (PAF).....	28
III-4 -4-enzymes et métabolites des polynucléaires et des macrophages.....	28
enzymes lysosomiaux.....	28
-radicaux libres dérivés de l'oxygène.....	29
III -4-5- chimiokines.....	29
III-4-6- facteurs de croissance.....	29
III -4-7-monoxyde d'azote (no).....	30
III -5-Notions d'inflammation aiguë et d'inflammation chronique.....	30
III -5-1-Inflammations aiguë .....	30
III -5-2-Inflammations chroniques.....	30
III -6- Anti-inflammatoires.....	30
III -6- 1-Anti-inflammatoire non stéroïdiens... ..	30
III -6- 2-Anti-inflammatoire non stéroïdiens .....	31
III -6- 2-Anti-inflammatoires d'origine végétale.....	32

## **CHAPITRE IV: LES RADICAUX LIBRES**

IV 1-Définition des radicaux libres .....	33
IV -2-La formation des ERO .....	34
-Les espèces radicalaires.....	34
-Les espèces non radicalaires.....	34



3-Les sources des radicaux libres .....	39
3-1-Les sources exogènes .....	39
3-2-Les sources physiologiques .....	41
4-Rôle physiologique des ERO .....	46
4-1- Messenger intra et extracellulaire .....	46
4-2- Régulation de tonus vasculaire et autre fonction de NO .....	46
4-3-Défense immunitaire et «brust oxydatif» .....	46
4-4-Les ERO dans la transduction du signal.....	47
4-5- Les ERO , les protéines kinases et phosphatases .....	47
- Inhibition des protéines phosphatases .....	47
-Activation des protéines Kinases .....	48
4-6- Les ERO et facteurs de transcription .....	49
4-7-ERO et apoptose . .....	49

## **CHAPITRE V :LE STRESS OXYDANT.**

Définition.....	51
Les cibles de stress oxydant.....	51
2-1- Peroxydation des lipides.....	51
2-2- Oxydation des protéines .....	53
2-3- Oxydation d' ADN .....	55
2-4- Les glucides.....	56
v-2-Les systèmes de défenses antioxydants .....	57
v-2-1-Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes.....	57
1-Superoxyde dismutase (SOD).....	58
2-Glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR) .....	58
3-La catalase .....	58
V-2-2Les antioxydants non enzymatiques endogènes .....	59
V-2-3-Les antioxydants non enzymatiques exogènes :végétales.....	60

## **PARTIE II :ETUDE EXPERIMENTALE**

### **CHAPITRE L : MATERIEL ET METHODES**

1-Matériel .....	62
1-1-Matériel biologique(Echantillonnage) .....	62
1-1-1-Matériel végétal.....	62
1-1-2-Réactifs chimiques et instrumentations .....	62
2-méthodes .....	62
2-1-Préparation des extraits aqueux .....	62
2-1-1-Extraction. ....	63
2-2-1-Mise en évidence des tanins .....	63
2-2-2-Mise en évidence des saponosides .....	63
2-2-3-Mise en évidence des composés réducteurs .....	63
2-2-4-Mise en évidence des alcaloïdes .....	64
3-dosage des flavonoïdes .....	64
4-dosage des polyphénols .....	64
5-DPPH (effet scavenger).....	64
- Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> .....	65

### **CHAPITRE LL : RESULTAT ET DISCUSSION .**

I-Le rendement des extraits .....	67
II-Tests de mise en évidence de certains composés Phytochimiques.....	68
III-Dosage des polyphénols et des flavonoïdes .....	69
III-1- Dosage des flavonoïdes .....	69
III-2- Dosage des composés phénoliques totaux.....	71
IV-tests, <i>in vitro</i> , de l'activité antioxydante.....	73

IV-1 - Détermination de l'activité anti-radicalaire des extraits aqueux par la méthode de DPPH (effet scavenger).....73

V- Activité anti-inflammatoire *in vitro*.....77

**CONCLUSION .**

**RESUME.**

## Liste des tableaux :

Tableau 1 : Quelques usages traditionnels du <i>matricaria recutita</i> .....	6
Tableau 2 : Quelques usages traditionnels du <i>thymus vulgaris</i> .....	9
Tableau 3 : Quelques usages traditionnels du <i>Anethum graveolens</i> .....	11
Tableau 4 : Principales classes des flavonoïdes.....	16
Tableau 5 : Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) .....	33
Tableau 6 : Le rendement des extraits aqueux des 3 plantes.....	67
Tableau 7 : Analyse phytochimique préliminaire d'extraits aqueux de <i>Matricaria recutita</i> , <i>thymus vulgaris</i> <i>anethum graveolens</i> .....	68
Tableau 8 : Les concentrations des composés phénoliques qui inhibent 50 % du radical DPPH.....	76
Tableau 9 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA à la concentration De 250 µg/ml.....	77

# LISTE DES FIGURES

Figure 1. Photos de <i>matricaria recutita</i> .....	5
Figure 2. Photos de <i>thymus vulgaris</i> .....	8
Figure 3. Photos de <i>Anethum graveolens</i> .....	10
Figure 4. Structure de base des flavonoïdes.....	15
figure 5. piégeage des ros par les flavonoïdes.....	19
Figure 6. Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Men+)......	19
Figure7. Inhibition de la lipoxygénases et de la cyclo-oxygénases sous l'action de différents flavonoïdes.....	20
Figure8: Production de l'anion superoxyde en condition physiologique par la fuite d'électron de la chaîne respiratoire mitochondriale.....	35
Figure 9: Etat des orbitales atomiques externes des espèces réactives de l'oxygène selon la règle de l'octet.....	36
Figure 10: Dismutation du peroxyde d'hydrogène.....	37
Figure 11: Réaction de Fenton/Haber-Weiss.....	37
Figure 12 : Synthèse du monoxyde d'azote ( $^{\circ}\text{NO}$ ), du peroxyde d'azote ( $\text{ONOO}^{\cdot}$ ) et du dioxyde d'azote ( $\text{NO}_2^{\circ}$ ).....	38
Figure 13 : Origine intra et extracellulaire des ERO XO : xanthine oxydase ; P-450 : Cytochrome P-450.....	41
figure 14 : la chaîne respiratoire.....	44
Figure 15: La production d'ERO par le complexe III.....	48
Figure 16 : L'action des ERO sur l'activité des phosphatases.....	50
Figure 17 : Les ERO dans le mécanisme de l'apoptose.....	52
Figure 18 : Les trois phases de la peroxydation lipidique.....	54

<b>figure 19 : Attaque par les produits de peroxydation lipidique des molécules biologiques telles que les protéines.....</b>	<b>56</b>
<b>Figure 20: Effet de l'attaque du radical hydroxyle (HO<sup>0</sup>) sur la guanine, base constitutive de l'ADN.....</b>	<b>57</b>
<b>Figure 21 :Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants.....</b>	<b>57</b>
<b>Figure 22 : Courbes d'étalonnage de la quercétine.....</b>	<b>70</b>
<b>Figure 23 : Teneur en flavonoïdes totaux (mgEQ/gE).....</b>	<b>70</b>
<b>Figure24:Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....</b>	<b>71</b>
<b>Figure 25 :Teneurs en polyphénols totaux (mgEAG/gE).....</b>	<b>72</b>
<b>Figure 26 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....</b>	<b>73</b>
<b>Figure27 : pourcentage d'inhibition de BHT.....</b>	<b>73</b>
<b>Figure28 : pourcentage d'inhibition de l' extrait aqueux de Quercétine de <i>matricaria recutita</i>.....</b>	<b>74</b>
<b>Figure 29 : pourcentage d'inhibition de l' extrait aqueux de Quercétine de <i>thymus vulgaris</i>.....</b>	<b>74</b>
<b>Figure 30: pourcentage d'inhibition de l' extrait aqueux de Quercétine <i>anethum graveolens</i>.....</b>	<b>75</b>
<b>Figure 31 :Graphe : La concentration des trois extraits et de BHT qui inhibent 50 % du radical DPPH .....</b>	<b>75</b>
<b>Figure 32 : Principaux éléments de l'activité antioxydante des flavonoïdes.....</b>	<b>77</b>

### INTRODUCTION :

L'utilisation des plantes médicinales par l'homme est une pratique antique (1).

De nos jours la majorité des habitants du globe terrestre utilisent de très nombreuses plantes, compte tenu de leurs propriétés aromatiques, comme source d'assaisonnement ou comme remède en médecine traditionnelle. Cependant, cette utilisation ne se base sur aucun critère scientifique, elle tient compte simplement des Observations au cours des siècles (1,2).

Actuellement, plusieurs questions sont soulevées concernant la sécurité des produits Chimiques synthétiques utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire. En effet, la peroxydation des lipides produites au cours des processus de fabrication et de stockage des aliments sous l'action des radicaux libres de l'oxygène (ROS) conduit à la perte de la qualité et de la sécurité des aliments. Les antioxydants de synthèse généralement utilisés en industrie alimentaire pour retarder l'oxydation des lipides se sont avérés responsables d'effets indésirables. De plus, l'usage excessif d'agents antibactériens chimiques dans la médication humaine ainsi que dans l'élevage animal conduit à l'apparition de souches bactériennes résistantes (2).

Les extraits bruts des plantes commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Ils font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses et pour la protection des aliments contre l'oxydation et comme des anti-inflammatoires, et des anti-analgésiques.

Ce travail vise à étudier l'activité anti-inflammatoire et antioxydante des extraits bruts des trois Plantes aromatiques et médicinales **matricaria recutita**, **thymus vulgaris**, et **anethum graveolens**, qui appartiennent respectivement à la famille **des asteraceae**, **lamiaceae**, **apiaceae** ;Elles sont parmi les familles de plantes les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à qualité médicale intéressante (3).

La sélection de ces plantes s'est fondée sur les critères suivants : sont parmi les plus populaires plantes aromatiques et médicinales utilisées dans le monde entier, leur utilisation fréquente par nos populations dans le domaine culinaire et celui de la médecine traditionnelle, à côté du fait que leurs huiles essentielles sont utilisées dans les industries alimentaires, pharmaceutique et cosmétique, leur efficacité dans le traitement Symptomatique de troubles de l'appareil digestif supérieur reconnue traditionnellement.

Elles représentent récemment un sujet de recherche scientifique intéressant.

Notre travail sera réparti en deux parties :

- une partie relative à l'étude bibliographique, des 3 plantes, des flavonoïdes, activité anti- Inflammatoire, radicaux libres, stress oxydant et les antioxydants. .
- Une autre partie réservée à l'étude expérimentale subdivisée en deux chapitres: l'un Présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail et l'autre consacré à la présentation et la discussion des résultats obtenus.



## CHAPITRE I - LES PLANTES MEDICINALES :

### I -1-L'utilisation médicinale des plantes :

On a trouvé la trace de l'utilisation des plantes 5000 ans avant J-C en Chine, en Mésopotamie et en Egypte. Tablettes cuneiformes et Papyrus, témoignent du recours aux plantes dans le monde occidental, les observations cliniques des effets des plantes par Hippocrate marquèrent l'intérêt pour ces remèdes, de siècle en siècle, Théophrastes, Aristote puis Plin et Discoride approfondirent la connaissance des plantes et de leurs propriétés, l'ouvrage de Discoride (I<sup>er</sup> siècle avant J-C) le « De materia medica » décrit plus de cinq cent plantes et leur utilisation : il restera une référence jusqu'au XVIII<sup>e</sup> siècle, il en restera de même des travaux de Galien, médecin de Marc-Aurèle ? considéré comme le fondateur de la pharmacie, par la suite, le développement des routes commerciales vers l'inde et l'Asie, aussi bien que la diffusion de la culture arabe, enrichirent l'arsenal thérapeutique végétal de sa flore et une incidence forte tant sur l'alimentation (pomme de terre, tomate, mais ..ect).

Les progrès de la physiologie puis la pharmacologie permirent de comprendre les mécanismes d'action de ces substances naturelles, depuis quelques décennies, la compréhension des relations qui existent entre la structure d'une molécule et son activité biologique permet la conception et la fabrication de médicaments synthétiques aux performances améliorées ou aux effets indésirables mieux contrôlés (3,4).

Aujourd'hui, des inventaires systématiques, des enquêtes ethnobotaniques, l'extension de la recherche aux champignons, ce sont eux qui produisent les antibiotiques et aux innombrables organismes marins, ainsi que des moyens puissants (criblage à haut débit) permettent de sélectionner des substances qui pour certaines, deviennent (ou deviendront) des médicaments, révèlent des mécanismes d'action originaux, ouvrent de nouvelles voies de synthèse dérivés de l'artémisinine, paclitaxel, docétaxel, ixabépilone ...etc. témoignent de cet apport majeur des substances naturelles à la thérapeutique.

Parallèlement, l'approfondissement de la connaissance des plantes d'usage traditionnel, tout comme l'amélioration des techniques de production et de contrôle améliorent leurs qualités, l'évaluation clinique de leurs effets permet de mieux cerner ce qu'elles peuvent apporter à l'arsenal thérapeutique, aux prix d'un risque généralement limité(3,4).

## I-2- La phytothérapie et les produits naturels :

D'un point de vue étymologique, le terme « phyto » de phytothérapie provient du grec ancien avec le terme plus précis de « phyton » et signifie « végétal », C'est le traitement ou la prévention des maladies par l'usage des plantes (3,5).

Il y a plus de 20 ans, déjà que l'OMS reconnaissait l'importance de la médecine traditionnelle et proposait son intégration dans les systèmes officiels de santé, particulièrement dans les pays en développement. Toutefois, malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. De tout temps, à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria. Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques a diminué et les bactéries sont peu à peu adaptées aux médicaments et leur résistent de plus en plus (4,5).

La phytothérapie se partage en deux grands types :

- une pratique traditionnelle, parfois très ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement, cette phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle et encore massivement employée dans certains pays dont les pays en voie de développement, c'est une médecine non conventionnelle du fait de l'absence d'étude clinique
- une pratique basée sur les avancées et preuves scientifiques qui recherche des extraits actifs des plantes, les extraits actifs identifiés sont standardisés, cette pratique conduit aux phytomédicaments et selon la réglementation en vigueur dans les pays, leur circulation est soumise à l'autorisation de mise sur le marché pour les produits finis, et à la réglementation sur les matières premières à usage pharmaceutique pour les préparations magistrales de plantes médicinales, celles-ci étant délivrées exclusivement en officine on parle alors de biologie pharmaceutique (5).

## I-3- Les produits naturels des plantes et leurs activités biologiques :

Les plantes produisent un grand nombre de composés, Ils ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermopharmacie. Ils se sont surtout illustrés en thérapeutique et dépassent actuellement 100 000 substances identifiées. Les produits naturels des plantes peuvent être classés en deux catégories, les métabolites primaires et les métabolites secondaires (4,5).

- **Les métabolites primaires** : ils ont un rôle essentiel pour le métabolisme et le développement végétal, se retrouvent dans toutes les espèces ( 4,5).
- **Les métabolites secondaires**: ils ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent de réactions chimiques ultérieures , Ils sont des molécules qui ne participent pas directement au développement des plantes mais plutôt interviennent dans les relations avec les stress biotiques, abiotiques, microorganismes pathogènes...etc. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre. Ils sont différents dans les différentes espèces , Parmi eux : les terpènes, les flavonoïdes, les tannins, les saponosides, les alcaloïdes et les coumarines(4,5 ).

### I-3-1- Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des substances présentes dans les plantes(4,5,6). Ils sont à l'origine des teintes brunes, rouges et bleues des fleurs et des fruits. Certaines plantes sont réputées pour leur richesse en flavonoïdes : par exemple, le thé, le raisin, les oignons, les pommes, le cacao, la grenade, le cassis et les myrtilles ou encore le café)( 6).

Sont des composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (6,5 ). Qui peuvent être rencontrés dans une large variété de fruits et de légumes consommés quotidiennement par l'être humain, certains de ces composés présentent des activités biologiques d'intérêts, telles que des actions anti- oxydantes ( 7 ), anti-Inflammatoires, antihypertenseurs, anti-influenza antiallergique, antifongiques et Antivirales(7 ).

### I-3-2- Les tannins :

Les tannins sont des polyphénols polaires très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes et les dicotylédones , existent dans presque chaque partie de la plante : feuilles, fruits et racines, ils sont caractérisés par leur capacité antioxydante et leur propriété thérapeutique (6,7,5 ) ; Les tannins permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections .traiter la diarrhée ou les irritations cutanées(7,6 ), Ils sont divisés en deux groupes :

- Tannins hydrolysables qui sont des esters d'un sucre (généralement le glucose) et d'un nombre variable de molécules d'acide phénolique (acide gallique ou acide hétéroxydiphénique (HHDP)(7 ) .
- Tannins condensés qui sont formés par la condensation des unités flavan-3-ols et flavan-3-4-diols(7 ).

**I-3-3- Les terpènes :**

Les terpènes forment un groupe de produits naturels largement représenté(6,7), Ils sont formés par la polymérisation des unités à 5 atomes de carbone. Ils constituent le principe odoriférant des végétaux( 6,7). Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles.

Des études faites sur des animaux ont montré que certaines classe des terpènes telle que : le bêta sitostérol, comme son glucoside, possèdent des propriétés anti-inflammatoire, antipyrétique, antinéoplasique et immuno-modulatrice(7). Aussi, les terpènes sont largement utilisés dans le secteur de la nutrition humaine (saveur, conservateur) et l'industrie du parfum(7).

**I-3-4- Les saponosides :**

Mot latin « sapon », l'herbe à savon (7,8). Ils sont des métabolites secondaires hétérosidiques présents dans de nombreuses plantes et quelques organismes marins sont des terpènes glycosylés, des stéroïdes, des alcaloïdes glycosylés ou des hétérosides triterpéniques, ils peuvent aussi se trouver sous forme d'aglycones (ou génines, ce sont les composés terpéniques ne possédant pas de glucide)(8), ils sont de nature amphiphiles, ces molécules sont connues pour leur propriété tensio-active ou encore leur capacité à lyser les globules rouges (hémolyse) (7,9,10).

**I-3-5- Les coumarines :**

Se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses(6,7,8,10). Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes( 6,7,8). Les conditions structurales requises pour l'activité antiperoxydante des coumarines sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes (7,8,11).

**I-3-6- Les alcaloïdes :**

Les alcaloïdes sont des composés organiques azotés (7,8,11) molécules d'origine naturelle. On les trouve principalement chez les végétaux (7,6,8), mais aussi chez les animaux et chez certains micro-organismes. Ils ont une nature basique, contenant de l'azote et sont pharmacologiquement actifs(8,12,14), ils sont utilisés aussi comme antalgiques majeurs (morphine), pour combattre l'excès d'acide urique (colchicine), comme substance paralysante/stimulante (curare, caféine), comme anticancéreux (vinblastine, vincristine)(8). Ils sont aussi de forts agents antimicrobiens(8,13).

**A-La plante médicinale *Matricaria recutita* :**

*Matricaria recutita* est une petite plante aromatique et médicinale annuelle (plante qui accomplit son cycle de végétation, depuis la germination jusqu'à la fructification, sur une seule année, puis meurt)(15) .

**A-1- Description de la plante :**

une plante Annuelle à tige unique, dressée et rameuse et feuilles très découpées, Son involucre est constitué de bractées qui sont linéaires, verdâtres le long de la nervure médiane, pâles et membraneuses sur les bords, L'hauteur de 10–50 cm , les Fleur sont Nombreux fleurons radiés blancs ligulés et fleurons bisexués en disque tubulaires jaunes regroupés en capitules, 1–2,5 cm de diamètre et se reconnaissent à leur odeur , Ligule de fleurons s'abaissant rapidement. Pointe munie de trois dents peu marquées. Corolle de fleurons à cinq lobes. Absence de calice. Cinq étamines, anthères regroupées en tube autour du style. Pistil constitué de deux carpelles soudés, style solitaire, stigmate bilobé. Capitule enveloppé par des verticilles de bractées involucrees. Capitule solitaire, à l'extrémité de la tige et des ramifications, Les Feuilles sont alternes, à pétiole court ou sans pétiole, glabres, Le Limbe bipenné ou tripenné, divisé. Divisions fines, filiformes ou linéaires, ses fruit de Cypsèle jaunâtre ovale, 4–5 cannelures sans aigrette( 16).



Figure 1. Photos de *Matricaria recutita*.

**A- 3-Place dans la systématique :**

**Régne :** Plantae

**Embrenchement :** Spermatophyta (plantes à graines)

**division :** magnoliophyta

**Classe :** magnoliopsida

**ss.Classe :** Astériadaea

**Ordre :** Astérales

**Famille :** Asteraceae

**Genre :** Matricaria

**Especce :** *Matricaria recutita* (15,16)

#### A-4- Répartition géographique :

Abondante en Europe, surtout en Hongrie, Yougoslavie, et en Afrique du Nord, croît dans les lieux incultes ( 17) .

#### A-5-Utilisation en médecine traditionnelle :

la plante médicinale *Matricaria recutita* très utilisée dans la pharmacopée traditionnelle . En règle générale, les fleurs sont la partie de la plante les plus utilisées fréquemment comme abortif, antispasmodique, antiparasitaire et antalgique, le tableau 1 presente des differentes usages traditionnelles.

**Tableau 1. Quelques usages traditionnels du *Matricaria recutita* :**

La plante	Pays	Partie utilisée	Voie	Usages	Réf.
<i>Matricaria recutita</i>	Espagne Italie allemagne lituanie suisse	Plante entière	Orale externe	Antimicrobique, anti_inflammatoire Infections pulmonaires, cicatrisant de la peau douleurs rhumatismales, rhume, maux de gorge ,pommade contre les piqûres des insectes les irritations anales et vulvaires	18, 19 20
	France			Infections de tube digestif, antispasmodique, arthrose	
	Algérie maroc egypt	Plante entière	Orale externe	Affections gastrointestinales calculs biliaires tumeurs internes rhumatismes sciatiques névralgie Antifongique, antimicrobien, et Antispasmodique anti_ulcère	

#### A-6- Composition biochimique :

L'espèce *Matricaria recutita* représente une source essentielle de plusieurs composés telle que : Les alcaloïdes 2-(decan-9-one)-N-méthyl-4-quinolone (16), les coumarines (Herniarine, Umbellifénone, Coumarine, Isoscolétine, Scolétine,

Umbelliférone Esculétine 2-(decan-9-one)-N-méthyl-4-quinolone, montanine)(16), les flavonoïdes(Quercétagine, Apigénine 7-glucoside, Lutéoline 7-glucoside, Hypéroside, Rutine Apigénine, Apigénine 8-B-O-(4'-O-acétyl) glucoside, Apigénine 7-glucoside)(16), les tanins et les huiles essentielles(Chamazulène, -alpha-bisabolol) (16,17,18).

### **B -La plante médicinale *Thymus vulgaris* :**

Le Thym commun, Thym cultivé ou Farigoule (*Thymus vulgaris*). En cuisine, on l'appelle simplement « thym ». C'est une espèce commune des garrigues ensoleillées et des steppes du sud de l'Europe, et du Nord de l'Afrique. Le thym commun est indissociable de la culture méditerranéenne. Le thym commun est une plante des pharmacopées méditerranéennes(21).

*Thymus vulgaris* a été ainsi nommé par Carl von Linné en 1753 et reste le nom utilisé par toutes les nomenclatures scientifiques.(21,22), *Thymus vulgaris* est un petit sous-arbrisseau vivace de la famille des Lamiacées, touffu et très aromatique(22,23).

#### **B-1 Description de la plante :**

Une Plante de 7 à 30 cm de hauteur, d'un aspect grisâtre ou vert-grisâtre. Ses tiges, ligneuses à la base, herbacées supérieurement, sont presque cylindriques. et très rameuses sont regroupées en touffe ou en buisson très dense (22,24), Elles peuvent acquérir, vers leur base, une assez grande épaisseur. Les tiges florifères ne produisent jamais de racines adventives, et sont rampantes, dressées ou redressées, tortueuses dans leur partie inférieure, velues et blanches tout autour chez les jeunes rameaux (21,22), Ses feuilles sont très petites, ovales, lancéolées, à bord roulés en dessous à nervures latérales distinctes, obtuses au sommet, ponctuées supérieurement, au pétiole extrêmement court, et blanchâtres à leur face inférieure (22,23), ses fleurs, quant à elles, sont blanches, font de 4 à 6 mm de longueur, sont pédicellées et réunies ordinairement au nombre de trois à l'aisselle des feuilles supérieures. Elles forment ainsi une sorte d'épi foliacé au sommet des ramifications de la tige (22 ;23), Le limbe du calice est bilabié, un peu bossu ; la lèvre supérieure a trois divisions séparées entre elles environ jusqu'au quart ou jusqu'au cinquième de sa longueur, la lèvre inférieure possède deux divisions étroites et subulées (21). la figure 2 montre la structure de la plante *Thymus vulgaris*



Figure 2. Photos de *Thymus vulgaris*

### B-2. Place dans la systématique :

**Règne :** Eucaryote

**Sous règne :** Tracheobionta

**Division :** Magnoliophyta

**Classe :** Magnoliopsida

**Sous classe :** Astéridae

**Ordre :** Lamiales

**Famille :** Lamiaceae

**Genre :** Thymus

**Espèce :** *Thymus vulgaris* (21)

### B-3. Répartition géographique :

La plante médicinale *Thymus vulgaris* est originaire des pays du bassin méditerranéen sur les rives nord et ouest (où il est souvent cultivé dans les jardins) et des territoires limitrophes sous influence climatique méditerranéenne; ainsi qu'en Afrique du Nord. Assez nomade, il est subspontané dans des régions subtropicales, chaudes ou tempérées, et plus spécialement en Europe et en Amérique du Nord (21,22,24).

### B-4. Utilisation en médecine traditionnelle :



la plante médicinale *Thymus vulgaris* très utilisée dans la pharmacopée traditionnelle . En règle générale, les différentes parties de la plante sont utilisées fréquemment comme, anti\_inflammatoires antispasmodique, antiparasitaire et antalgique (Tableau 2).

**Tableau 2. Quelques usages traditionnels du *Thymus vulgaris* .**

La plante	Pays	Partie utilisée	Voie	Usages	Réf.
<i>Thymus vulgaris</i>	France	Plante entière	Orale externe	douleurs rhumatismal,toux, grippe, bronchite, asthme, angine , rhume, maux de gorge, Antifongique, antimicrobien, soulager les piqûres d'insectes,antioxydant,anti_inflammatoires	21,23
	Italie			Infections de tube digestif, antispasmodique, arthrose, Les troubles hépatiques, les troubles des règles et les infections des voies urinaires,anti-inflammatoire	,21,22,24
	Allemagne	Parties aériennes		Antifongique, antimicrobien, et Antispasmodique, ballonnement épigastrique bain de bouche ou de pieds	22, 25,26 27

#### B-5. Composition biochimique :

L'espèce *Thymus vulgaris* représente une source essentielle de plusieurs composés telle que : Les alcaloïdes(24), les flavonoïdes'(Ac gallique, l'Ac caféique, la quercétine, la rutine et la catéchine, Patulétine)(27,30,29), les tanins, et les huiles essentielles(Alpha-bisabolole, chamazulene,chamavioline,spathulenol)(23,24) .

#### C-la plante médicinale *ANETHUM GRAVEOLENS* :

C'est une herbacée annuelle très aromatique,Origine du nom : **Aneth** vient du latin anethum(30)., emprunté au grec ἄνηθον - anêthon, d'origine inconnue, et **graveolens** signifie en latin « d'odeur forte », composé de « gravis » (*lourd, fort*) et « olens » (*sentant*). est une plante de la famille des Apiacées(31,32) .

#### C-1 Description de la plante :

une plante médicinale de 30-150 cm d'hauteur , ses longues tiges dressées, grêles et striées sont creuses. Les feuilles de couleur verte sont profondément découpées, formant de fines lanières. Leur saveur est douce, les fleurs s'épanouissent. Minuscules et de couleurs jaune-vert, elles sont réunies en grandes ombelles, très fréquentées des abeilles ,ses fruits sont de petites graines ovales et aplaties, brun clair et couvertes de poils courts.(33)

Les graines d'anethum graveolens possède des propriétés médicinales ; il est notamment anti spasmodique, digestif, apéritif, et carminatif,antioxydant et anti-inflammatoire. (31,33)

feuilles tripennatiséquées, toutes finement divisées en lanières filiformes, les supérieures sessiles sur une gaine plus courte que le limbe (34,35).la figure 3 montre la structure de la plante *Anethum graveolens* :



Figure 3. Photos de *Anethum graveolens*

### C-2. Place dans la systématique :(33, 34,36)

**Régne :** plantae

**Embrenchement :** spermatophyta

**Ordre :** Apiales

**Famille :** Apiaceae

**Genre :** anethum

**Especie :** anethum graveolens

### C-3. Répartition géographique :

Très fréquente dans la région méditerranéenne ; le grand maghreb, Europe méridionale ; Asie occidentale ,amerique du nord (36 ,34).

#### C-4. Utilisation en médecine traditionnelle :

la plante médicinale *Anethum graveolens* très utilisée dans la pharmacopée traditionnelle . En règle générale, les différentes parties de la plante sont utilisées dans les cas des Infections de tube digestif, antirhumatismal, antispasmodique, le tableau 3 montre des différentes usages traditionnelles .

Tableau 3. Quelques usages traditionnels du *Anethum graveolens*.

La plante	Pays	Partie utilisée	Voie	Usages	Réf.
<i>Anethum graveolens</i>	Syria maroc	grains	Orale	Infections pulmonaires, douleurs rhumatismales, rhume, -Carminative (limite l'accumulation de gaz dans le corps et favorise leur élimination maux de gorge	38
	France italie	Plante entière		Infections de tube digestif, antispasmodique, arthrose, Augmente la sécrétion lactée (galactologue).	37 39
	France	Parties aériennes		Antifongique, antimicrobien, et Antispasmodique	39

#### B-5. Composition biochimique :

L'espèce *Anethum graveolens* représente une source essentielle de plusieurs composés telle que : Les alcaloïdes (3-Hydroxyqui-2- noline et montanine, 1-methyl-4- methoxy-2-quinolone, evolitune), les flavonoïdes (Eriodictyol, Taxifoline , Lutéoline , Chrysine), les tanins et les huiles essentielles (2,5 à 4 %) (la carvone, la myristicine , l'apiol Alpha-bisabolole, chamavioline, spathulenol) (37) ; Elles stimulent la sécrétion de la vésicule biliaire (labile) qui facilite la digestion des matières grasses. En outre, les essences naturelles de la menthe et de fenouil ont un effet spasmolytique

(37, 38, 39) .

## **CHAPITRE II : LES FLAVONOIDES**

### **II-1-vue d'ensemble les polyphenols :**

Les polyphénols sont des phytomicronutriments synthétisés par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire, Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois). Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales **(40)**.

Les polyphénols forment une immense famille de plus de 8000 composés naturels, sont divisés en plusieurs catégories : sont les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide ferulique, acide chlorogénique...)(41,42), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols ; les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes, les coumarines, les lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables(43), sont des molécules biologiquement actives, ils sont largement utilisés en thérapeutique comme vasoconstricteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicalaires, antimicrobiens. le Cancer (43), les maladies dégénératives et cardio-vasculaires, des antioxydants végétaux (43), caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec des glucides, sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la germination des graines et la maturation des fruits(43,44).

L'élément structural fondamental qui caractérise les composés phénoliques est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside...) (43). Les composés phénoliques sont commodément classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base (43).

### II-1-1 -Définition de flavonoïdes :

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal(.40.41.42), désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, où ils interviennent comme filtre UV et comme agent de protection contre des organismes pathogènes (43,44).

Le terme flavonoïde provenant du latin "flavus", signifiant "jaune" (44,43,45,46), sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles, qui peuvent être rencontrés dans une large variété de fruits et de légumes, Les et boissons telles que le vin et le thé consommés quotidiennement par l'être humain (44,46,47). Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, vasculoprotectrices, antihépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et même antitumorales significatives (44,46).

On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits(48,47)

. Présents dans tous les organes aériens, ils ont une teneur maximale dans les organes jeunes (feuilles et boutons floraux) (44,45,46,47).

#### **a. Flavonoïdes hétérosides:**

la partie osidique peut être mono, di ou trisaccharidique. En général, les hétérosides sont hydrosolubles et solubles dans les alcools(47), bon nombre d'entre eux ont une hydrosolubilité plutôt faible (rutoside, hespéroside)(48,49).

#### **b. Les flavonoïdes aglycones :**

Les génines sont, pour la plupart, solubles dans les solvants organiques apolaires. Les lipophiles des tissus superficiels des feuilles (ou des frondes) sont directement extraits par des solvants moyennement polaires (dichlorométhane)(48,49) ; il faut ensuite les séparer des cires et des graisses extraites simultanément (on peut certes laver d'abord à l'hexane, mais la sélectivité de ce solvant n'est pas absolue) (49,48).

### **II- 1-2- Biosynthèse des flavonoïdes :**

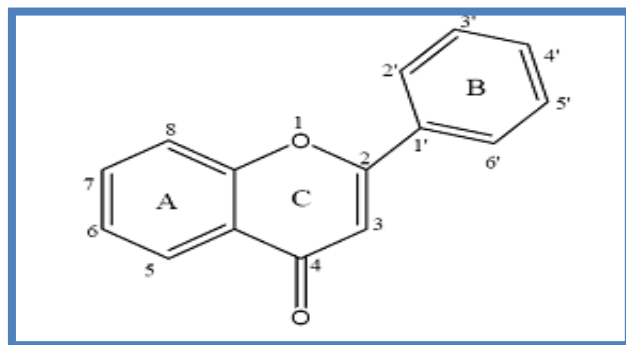
Les flavonoïdes possèdent tous le même élément structural de base(49,50,51), car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune. Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzymeA (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose. Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose, mais par la voie du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en  $p$ -coumarate puis en  $p$ -coumaroyl-CoA. Le  $p$ -coumaroylCoA et les 3malonylCoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4, 2',4', 6'-tétrahydroxychalcone. Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalcone-isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une seule 2(S)-flavanone : la naringénine, Ce cycle s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de flavonoïdes (52).

Des étapes ultérieures surtout de glycosylation et acylation amènent les flavonoïdes à la forme définitive dans laquelle elles se trouvent in vivo (53).

### **II-1-3-structure chimique et classification:**

Les flavonoïdes partagent une structure chimique commune, Leur structure de base est celle d'un diphenylpropane à 15 atome de carbone: le C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, constitué de deux cycles benzéniques ou deux noyaux aromatiques (ou anneaux) que désignent les lettres (A et B), reliés par un cycle pyrone, ou un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C (53)

Cette structure est appelée aussi la molécule de flavone, qui a été représentée dans la figure 4.



**Figure 4. Structure de base des flavonoïdes.**

On remarquera qu'afin de distinguer les positions sur l'anneau A et celles sur l'anneau B, la nomenclature normalisée appose à ces dernières le symbole ' (prime). L'hétérocycle C est attaché au noyau B par une liaison carbone-carbone. De façon générale, les flavonoïdes peuvent être hydroxylés en position 3, 5, 7, 3', 4', 5' et/ou 6'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, ou sulfatés (54).

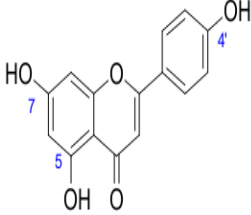
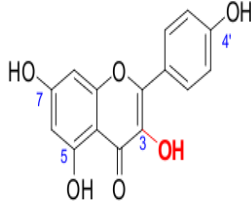
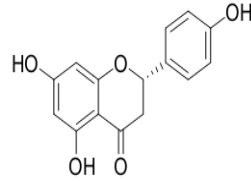
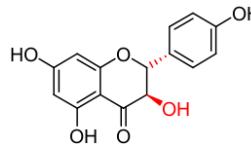
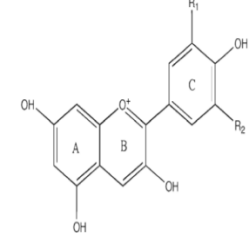
Ils existent soit à l'état libre (dans ce cas ils sont dits aglycones ou génines), soit sous forme de C- ou O- glycosides, ce qui tend à les rendre hydrosolubles (ils sont alors liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose, le plus souvent aux positions 3 et 7), ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères (54).

Les flavonoïdes se différencient par le degré d'oxydation de l'hétérocycle C et par les modes d'hydroxylation des anneaux A et B. Dans toutes les classes de flavonoïdes mentionnées cidessous, la biosynthèse justifie la présence fréquente d'au moins trois hydroxyles phénoliques en C-5, C-7 et C-4' de la génine cependant, l'un d'entre eux peut être absent. Six grandes classes; de flavonoïdes peuvent être mentionnées.

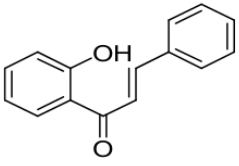
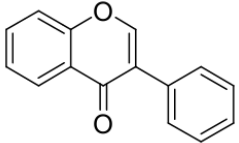
Les flavones et les flavonols sont les composés flavonoïdiques les plus répandus, alors que les flavanones, les flavanols, les chalcones et les anthocyanidines sont considérés comme des flavonoïdes minoritaires en raison de leur distribution naturelle restreinte (55).

La classe des flavonoïdes comporte à elle seule plus de 4000 substances qui ont été isolées et identifiées à partir des milliers des plante qu'endivise en plusieurs catégories: Les flavones, les flavonols et les dihydroflavonols, les isoflavonoïdes, les biflavonoïdes, les flavanones, les flavanols, les flavanediols (leucocyanidines), les anthocyanidines, les chalcones et les dihydrochalcones, les aurones (56), le tableau 4 montre des exemples de chaque classe et ses caractéristiques, et la richesse de différents aliments de ces flavonoïdes.

**Tableau 4. Principales classes des flavonoïdes (56) :**

Les flavonoïdes	Exemples	Aliments	Les caractéristiques
Flavones 	L'apigénine Lutéoline , Chryssine	Peau des fruits , persil, et céleri .	Les Flavones et Flavonols sont caractérisés par la présence d'une double liaison entre C2 et C3, et l'existence d'hydroxyle en C3 dans les flavonols .
Flavonols 	Quercétine Kaempférol Myricétine	Poireau, radis, thé noir, oignon, pomme, olive et brocolis	
Flavanones 	Naringénine, Eriodictyol Taxifoline	Poireau, radis, thé noir, oignon, pomme, olive, brocolis, et vin rouge	Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison entre C2 et C3 et par la présence de centre d'asymétrie , La seule différence entre ces deux classes est la présence d'hydroxyle en C3 dans les dihydroflavonols
Dihydroflavonols 	Dihydrokaempférol	Fruits de genre <i>citrus</i>	Caractérisées par l'engagement de l'OH en C3 dans une liaison hétérosidique .
Anthocyanidols 	Cyanidol, malvidol et apigénidol	Raisin, fraise et framboise	



Chalcones 	Butéine phlorétine	et /	Les chalcones, dépourvues de l'hétérocycle central, sont caractérisées par la présence d'un chaînon tricarboné, cétonique $\alpha$ , $\beta$ -insaturé.
Aurones	Sulfurétine	/	Caractérisées par une structure de 2-benzylidènocoumarone.
Isoflavones 	Genistéine, Daidzéine	Légumineuses (soja, et pois chiches verts), et graines de tourne sol	Caractérisés par leur variabilité structurale dont l'attachement du cycle B se fait en C3. Ils ont un effet préventif sur les cancers du sein.

#### II-1-4- Rôle physiologique des flavonoïdes pour les plantes :

Les plantes étant immobiles, elles ont dû mettre en place un système de résistance pour combattre les effets de l'environnement et conserver leur forme. La dureté au gel et la résistance à la sécheresse sont parfois attribuées aux flavonoïdes et autres composés phénoliques. Les flavonoïdes pourraient également permettre aux plantes de survivre sur les sols riches en métaux toxiques comme l'aluminium. Ils jouent un rôle important dans la protection des plantes vis-à-vis des rayonnements nocifs en absorbant les radiations UV et en protégeant ainsi les tissus internes des tiges et des feuilles (56).

Une des propriétés majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable(57). Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance.

Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries (56,58).

## II -1-5- Propriétés biologiques :

De nos jours, les propriétés thérapeutiques des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités biologiques et pharmaceutiques. Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques.

### 1- Activité antioxydante :

Les flavonoïdes sont susceptibles de réagir avec la plupart des espèces réactives oxygénées (57). L'action antioxydante de ces phytonutriments ne s'exerce pas seulement par l'inhibition et la désactivation des radicaux libres, elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation des traces d'ions métalliques responsables de la production de ROS.(58).

A cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants, comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyde, par transfert d'hydrogène et le radical flavonoxyl qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (59), ce qui est montré dans la figure 5.

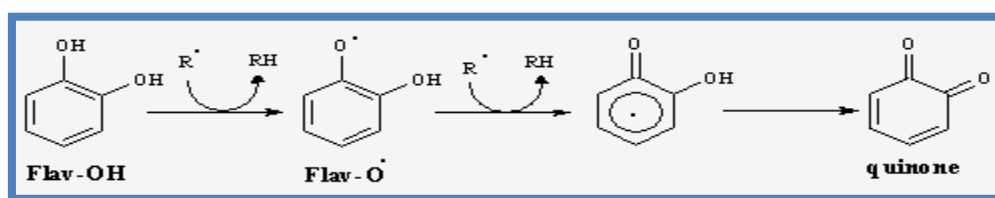


figure 5 : piégeage des ros par les flavonoïdes.

D'autres études ont montré que les flavonoïdes sont des bons inhibiteurs d'enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la xanthine oxydase qui est une source biologique importante du radical superoxyde (60).

Les flavonoïdes sont aussi considérés comme de bons chélateurs d'ions métalliques (61), comme les ions du fer (Fe<sup>2+</sup>) et du cuivre (Cu<sup>+</sup>) qui sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques, mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante:



La figure 6 résume les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques : (a) un noyau catéchol sur le cycle B, (b) les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C, et (c) les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C (60).

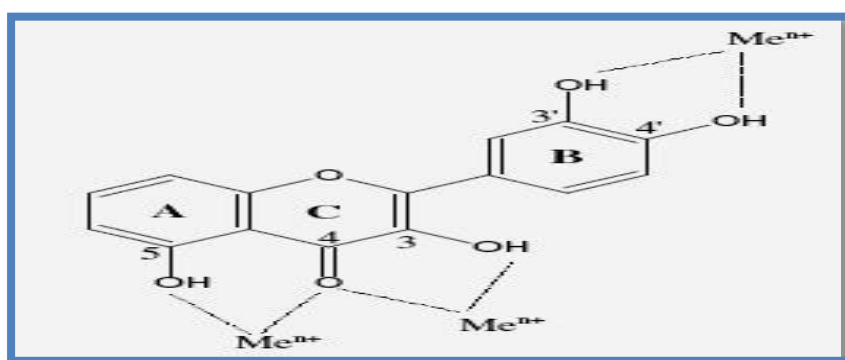


figure 6 : Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques ( $\text{Me}^{n+}$ ) (54).

## 2 -Activité anti-inflammatoire :

Sous l'action de la cyclooxygénase et la lipooxygénase, l'acide arachidonique (acide gras  $\text{C}_{20}:4$ ) se métabolise respectivement en prostaglandines + thromboxane et en leucotriènes, molécules fortement impliquées dans le processus inflammatoires. *In vitro*, plusieurs flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique plaquettaire (61).

Ils ont même reporté que les effets de la quercétine et La myricétine sont dose-dépendants.

A de fortes concentrations, ils inhibent la cyclooxygénase et la lipooxygénase. Cependant à de faibles concentrations, seule la lipooxygénase est affectée. En outre, d'autres flavonoïdes tels que la lutéoline, la morine, l'apigénine et la chrysine agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase (62, 60), Ce qui est illustré dans la figure 7.

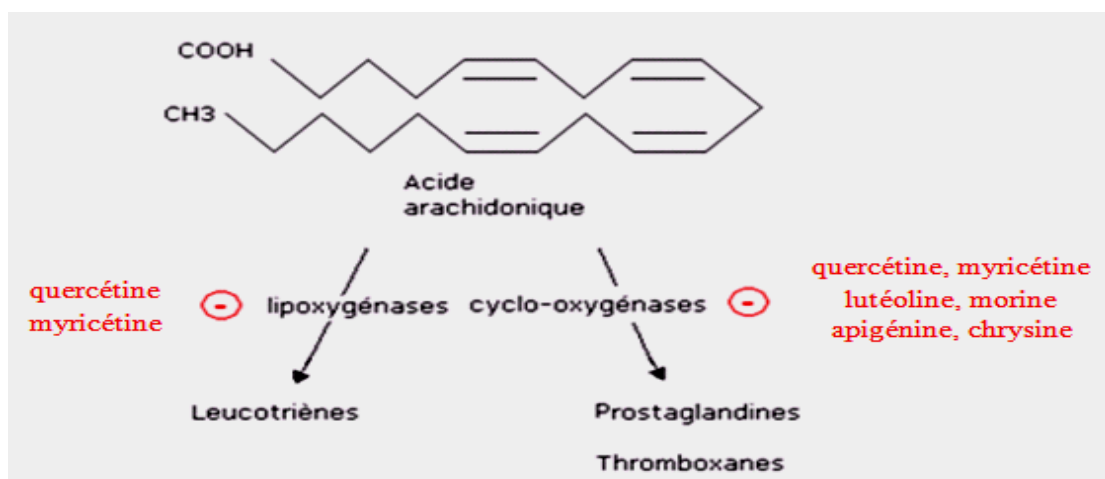


figure 7: Inhibition de la lipoxygénases et de la cyclo-oxygénases sous l'action de différents flavonoïdes (60) .

### 3 -Effets protecteurs vasculaires :

Les flavonoïdes agissent sur les vaisseaux sanguins pour le maintien d'une perméabilité vasculaire normale (62); deux flavonoïdes, l'hespéridine et l'hespéretine (connus sous le terme citroflavonoïdes) exercent des propriétés vasorelaxantes (62). D'autres flavonoïdes, la quercétine et la silybine, sont responsables d'une augmentation de la résistance des capillaires. Cette activité serait en rapport avec les effets de certains flavonoïdes sur les plaquettes, les leucocytes et sur les enzymes intervenant dans la coagulation sanguine (62).

### 4 -effets antiallergiques :

Les flavonoïdes sont également connus pour leurs effets antiallergiques. Ces effets sont attribués à leur influence sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase  $Ca^{++}$ -dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase  $Ca^{++}$ -dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules (63).

En outre, la quercétine exerce un puissant effet inhibiteur, de la libération d'histamine à partir des mastocytes, supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme (63).

### 5- Propriétés antivirales et antibactériennes :

La stratégie de recherche d'un composé antiviral consiste à mesurer la réduction de l'infection virale de cellules en culture. Une substance peut agir à différents niveaux du cycle viral:

- au niveau de l'adsorption du virus sur la cellule hôte,
- au niveau de la pénétration du virus dans la cellule hôte
- au niveau de la pénétration du virus dans la cellule hôte,
- au niveau de la réplication du virus et la synthèse des protéines virales,
- au niveau de l'assemblage et de la sortie du virus hors de la cellule hôte.

Les flavonoïdes sont capables d'agir au niveau de la synthèse des protéines virales. Ce mécanisme semble être impliqué dans la protection des souris vis-à-vis d'une infection virale à la suite d'une administration journalière de 3-O-méthylquercétine à raison de 20 mg/kg pendant 9 jours(64).

Mucsi et Pragaien 1985(64) [ont également montré une corrélation entre l'effet inhibiteur de certains flavonoïdes sur divers virus de l'herpès et leur capacité à augmenter les taux intracellulaires en AMPc dans des cellules infectées. Des travaux ont mis en évidence un impact des flavonoïdes sur le rétrovirus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). De nombreux agents sont susceptibles d'inhiber la réplication du rétrovirus du SIDA par une inhibition de la reverse transcriptase. Toutefois, ils peuvent être toxiques pour l'organisme. Il a été étudié l'impact des flavonoïdes sur la «reverse transcriptase ». Les flavonoïdes se sont montrés de bons inhibiteurs de cette enzyme (65).

Cependant, leur impact semble plus fort sur l'ADN et l'ARN polymérase de la cellule hôte que sur la reverse transcriptase virale (66,67). Récemment, des chercheurs ont montré que les Flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV (la gp120), empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte (68). Enfin, les flavonoïdes seraient susceptibles d'inhiber l'intégrase rétrovirale du virus HIV-1. Cette enzyme permet l'intégration du génome viral à celui de la cellule hôte. Des études structure-activité devraient permettre de montrer quelles sont les molécules les plus actives (69). En fait, il semble que l'intérêt éventuel des flavonoïdes ou d'autres micronutriments pour combattre le virus du SIDA n'ait pas été suffisamment approfondi. Théoriquement, les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont de puissants inhibiteurs in vitro de l'ADN gyrase(70).

Une étude a montré l'effet bactéricide de différentes flavanones sur un staphylococcus Aureus(71). Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, il faut citer :

- l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes

- la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer .
- l'inhibition du métabolisme microbien (72).

**6 -D'autres activités biologiques :**

ils sont notamment: antihypertenseurs, anti-influenza, antifongiques, antiulcéreux, hépato protecteurs, hypocholestérolémiants, anti cancérogènes. On rapporte même qu'ils peuvent avoir plusieurs effets. Certains flavonoïdes ont également démontré un potentiel d'agent vasodilatateur, le diabète.

**CHAPITRE III : L'inflammation****III-1-definition :**

L'inflammation est la réponse adaptative des tissus vivants, vascularisés (73), à une infection ou une agression tissulaire.elle est généralement bénéfique, conduit à l'élimination d'éventuels pathogènes et au retour à l'homéostasie du tissu lésé (74). Cette réponse fait intervenir des phénomènes d'immunité - c'est à dire de résistance aux agressions. L'immunité peut être naturelle : elle ne dépend pas d'une exposition préalable à l'agression (ex. certaines formes de phagocytose) ou, au contraire, spécifique (cellulaire, humorale) (75). Inflammation n'est pas synonyme d'infection mais l'infection peut être cause d'inflammation (75).

**III-2-Les causes sont multiples et représentent les agents pathogènes :**

Ces causes déterminent des lésions cellulaires et tissulaires qui vont déclencher l'inflammation (75) :

- infection contamination par des micro-organismes (bactérie, virus,parasites, champignons)
- agents physiques: traumatisme, chaleur, froid, radiations
- agents chimiques: caustiques, toxines, venins

- corps étrangers: exogènes ou endogènes
- défaut de vascularisation: réaction inflammatoire secondaire à une nécrose par ischémie.
- agression dysimmunitaire(anomalie de la réponse immunitaire, allergies, auto-immunité...)

### **III -3- Les cellules de l'inflammation :**

Les cellules de l'inflammation comprennent 1) les lymphocytes, 2) les cellules phagocytaires ou phagocytes (polynucléaires -principalement neutrophiles- et monocytes-macrophages), 3) les mastocytes et les polynucléaires basophiles, 4) les fibroblastes (75,76,77).

#### **III -3-1 Lymphocytes :**

Les lymphocytes, cellules de l'immunité spécifique, humorale et cellulaire, sont de type B (CD20), T (CD3) ou ni B ni T (NK pour natural killer) Parmi les lymphocytes T, certains sont dits auxiliaires = « helper » (CD4), d'autres, cytotoxiques (CD8). Les lymphocytes sont la mémoire de l'immunité acquise et servent à son expression : les plasmocytes, par exemple, étape finale de la maturation de la lignée B, sécrètent les anticorps. Les lymphocytes T sécrètent des cytokines . Les lymphocytes NK peuvent avoir une action cytotoxique (76).

#### **III -3-2- Mastocytes et polynucléaires basophiles :**

Les mastocytes et les polynucléaires basophiles comportent des granulations qui contiennent des médiateurs chimiques de l'inflammation, en particulier l'histamine et l'héparine (77) .

#### **III -3-3- Cellules phagocytaires et phagocytose :**

Les cellules phagocytaires ou phagocytes comprennent les polynucléaires neutrophiles et les cellules du système monocyte-macrophage (incluant les histiocytes résidents, c'est à dire les macrophages des tissus comme les cellules alvéolaires du poumon ou les cellules de Küpffer du foie). La cellule microgliale est le macrophage du cerveau (76).

#### **III -3-4- Les fibroblastes :**

Ce sont les cellules qui produisent le collagène ; elles jouent un rôle important dans la cicatrisation (76) .

### **III-4- Les médiateurs chimiques de l'inflammation :**

De multiples médiateurs chimiques, provenant du plasma ou des cellules, déclenchent l'inflammation et interviennent à tous les stades de l'inflammation. Les médiateurs d'origine plasmatique sont présents dans le plasma sous la forme de précurseurs qui doivent être activés (généralement par protéolyse) pour acquérir leurs propriétés.

Les médiateurs d'origine cellulaire sont soit préformés et séquestrés dans des granules intracellulaires (et le stimulus inflammatoire entraîne la dégranulation) soit synthétisés de novo en réponse à un stimulus (78).

La plupart des médiateurs exercent leur action en se fixant à des récepteurs membranaires sur des cellules cibles. Ils provoquent des réactions en cascade : un médiateur peut déclencher la libération d'autres médiateurs par les cellules cibles et qui agissent de façon synergique ou antagoniste. L'activation de divers médiateurs peut se répéter au cours du processus inflammatoire, entraînant des mécanismes d'amplification ou de résistance à l'action médiatrice initiale (79).

Dans les conditions physiologiques, la régulation du déroulement de la réaction inflammatoire implique que les médiateurs soient rapidement inactivés par un ou plusieurs inhibiteurs ou détruits (79).

### III-4-1- Facteurs d'origine locale (cellulaire) :

#### -Amines vasoactives (histamine-sérotonine) :

Ces médiateurs sont formés avant l'inflammation, stockés sous la forme de granules cytoplasmiques et sont parmi les premiers médiateurs libérés lors du déclenchement de l'inflammation, dans la phase initiale vasculo-exsudative. Il s'agit de la sérotonine sécrétée par les plaquettes lors de leur agrégation et présente dans les cellules entérochromaffines et surtout de l'histamine largement présente dans les tissus, au sein des mastocytes du tissu conjonctif, polynucléaires basophiles et plaquettes. La dégranulation de l'histamine mastocytaire est déclenchée par des facteurs multiples tels que traumatisme, choc thermique, complexe Ag-Ac (hypersensibilité de type I allergique médiée par les IgE), fractions du complément (anaphylotoxines), enzymes lysosomiales des polynucléaires, cytokines IL1 et IL8. Son action est rapide et fugace : augmentation précoce de la perméabilité vasculaire lors de la phase aiguë exsudative (vasodilatation artériolaire et contraction des cellules endothéliales des veinules), contraction des fibres musculaires lisses (bronchoconstriction) et attraction des polynucléaires éosinophiles (80).

#### -Prostaglandines et leucotriènes :



Les prostaglandines et les leucotriènes sont des acides gras comportant 20 atomes de carbones (= eicosanoïdes), synthétisés dans les membranes à partir de l'acide arachidonique. Produits localement, ils ont des effets marqués, locaux (vasodilatation, douleur, attraction des polynucléaires) et généraux, tels que la fièvre(80).

#### **-Les cytokines :**

Facteurs solubles peptidiques synthétisés et libérés par diverses cellules leucocytaires (lymphocytes et monocytes-macrophages activés) et non leucocytaires. Les cytokines sont des médiateurs de la communication intercellulaire. Elles agissent à faible concentration, généralement localement (à proximité de leur lieu de synthèse), sur les cellules qui les ont synthétisées (action autocrine) ou sur des cellules voisines (action paracrine), par l'intermédiaire d'une fixation à des récepteurs membranaires de haute affinité (81). Elles sont nombreuses et ne sont citées ici que les principales intervenant dans la réaction inflammatoire(85).

**a- cytokines synthétisées principalement (non exclusivement) par les lymphocytes activés:** Interféron gamma , facteurs chimiotactiques, facteurs activant les macrophages et inhibant leur migration, lymphotoxines(dont le TNF-alpha responsables de lyse cellulaire, interleukine 2 et 4 (IL2, IL4),

**b- cytokines synthétisées principalement (non exclusivement) par les macrophages activés :** Interleukine 6(IL6) , Interleukine 8 (IL8), nterleukine 1 (IL1),TNF (tumor necrosis factor).

#### **-les molécules d'adhérence :**

Les cellules du foyer inflammatoire sont concentrées à l'endroit précis de l'organisme où l'agression a eu lieu(81). Ce ciblage est le résultat d'interactions complexes de molécules d'adhérence et de leurs ligands cellulaires, qui, par exemple, augmentent ou diminuent l'adhérence au tissu interstitiel. Les vaisseaux du foyer expriment des molécules d'adhérence pour retenir les cellules sanguines qui portent le ligand correspondant(82).

#### **III-4-2-Médiateurs circulants (plasmatiques) :**

Les médiateurs circulants ne sont actifs qu'à la suite d'une cascade de réactions qui permet d'en réguler la production.

#### **-le système de kinines :**

Les kinines sont des Polypeptides à action vasoactive formés à partir du kininogène plasmatique grâce à l'action d'enzymes (les kallikréines). elle-même issue du clivage de la prékallikréine circulante. Le facteur XII (Hageman) activé est l'une des molécules qui clive la prékallikréin. Les kinines sont de puissants vasodilatateurs. Elles augmentent la perméabilité vasculaire. La bradykinine est un médiateur de la douleur(80,81).

#### **-le système du complément :**

Ensemble de 9 protéines plasmatiques (C1 à C9)s'activant selon une réaction en cascade déclenchée soit par la fixation d'un complexe Ag-Ac sur la fraction C1, soit par des substances variées (endotoxines, lyse cellulaire, enzymes lysosomiales libérées par les polynucléaires) et aboutissant au complexe d'attaque membranaire capable de lyser les agents Microbiens(80,81).

Certaines fractions du complément (essentiellement C3 et C5) jouent un rôle dans la perméabilité vasculaire, le chimiotactisme et l'opsonisation. C3a et C5a (aussi appelées anaphylotoxines) stimulent la libération d'histamine des mastocytes. C5a est chimiotactique pour les polynucléaires et les monocytes et active dans ces cellules la voie de la lipooxygénase du métabolisme de l'acide arachidonique(aboutissant à la libération de médiateurs lipidiques). C5a stimule l'adhésion des polynucléaires neutrophiles à l'endothélium. C3b et C3bi favorisent la phagocytose en se fixant à la paroi des bactéries (opsonisation). C3 et C5 peuvent être directement activés par des protéines présentes dans l'exsudat : plasmine et enzymes lysosomiaux des polynucléaires neutrophiles, ce qui contribue à un auto-entretien de la migration des polynucléaires neutrophiles.

Des inhibiteurs contrôlant le mécanisme d'assemblage des protéines du complément sont présents dans la membrane des cellules de l'hôte, le distinguant des agents microbiens et protégeant ses cellules contre une lyse inadéquate(80,81).

#### **-Le système de coagulation /fibrinolyse:**

Les relations sont complexes entre inflammation et système de la coagulation. La présence de dépôts de fibrine intra et extra vasculaires est quasi constante dans l'inflammation. La mise en jeu du système de la coagulation aboutit à la formation de thrombine qui déclenche la formation de fibrine à partir du fibrinogène plasmatique ; l'activation du système de la fibrinolyse conduit à la formation de plasmine (à partir de son précurseur plasmatique : le

plasminogène) et la plasmine détruit la fibrine par protéolyse. L'inflammation active la fibrinof formation et par voie de conséquence la fibrinolyse. La fibrinof formation/fibrinolyse contribue à amplifier l'inflammation(80,81).

On peut citer plus particulièrement :

- facteur XII (Hageman):** active les kinines, le système du complément, la coagulation et la fibrinolyse. C'est une enzyme sérique qui est activée par les complexes Ag-Ac, les fragments du collagène issus de protéolyse, les corps insolubles (cristaux)

- produits de dégradation de la fibrine (PDF):** vasodilatateurs et chimiotactiques sur les polynucléaires.

- thrombine:** active plaquettes et cellules endothéliales ; chimiotactique pour polynucléaires et monocytes-macrophages

### III-4-3-médiateurs lipidiques :

dérivés des phospholipides des membranes cellulaires, ils comprennent les métabolites de l'acide arachidonique et le facteur d'activation plaquettaire(80,81).

#### III-4-3-1-dérivés de l'acide arachidonique :

L'acide arachidonique est un acide gras formé par dénaturation des phospholipides des membranes cellulaires, sous l'influence de la phospholipase A2 (surtout des leucocytes et des plaquettes) activée par l'agression initiale (stimulus mécanique ou chimique) et par divers médiateurs (C5a par exemple). Le métabolisme de l'acide arachidonique est complexe : les métabolites intermédiaires et terminaux ont des effets variables et parfois antagonistes au cours de l'inflammation(80).

#### Il existe deux principales voies métaboliques de l'acide arachidonique :

**a-voie de la cyclo-oxygénase :** qui conduit aux principaux médiateurs suivants :

- thromboxane A2: puissant agrégant plaquettaire, et vasoconstricteur (l'enzyme qui forme le thromboxane A2 est surtout présente dans les plaquettes et est absente dans l'endothélium).

- prostacycline : anti-agrégant plaquettaire (par inhibition de la synthèse du thromboxane) et vaso-dilatateur (l'enzyme qui forme la prostacycline est surtout présente dans les cellules endothéliales)

- prostaglandines PGD2, PGE2, PGF2 : effets très variables selon la dose pharmacologique et le type de prostaglandine ; le plus souvent les prostaglandines entraînent : vasodilatation, hyperperméabilité vasculaire, chimiotactisme, douleur, fièvre. Leurs effets sont moins rapides et plus prolongés que ceux de l'histamine.

**b- Voie de la lipo-oxygénase:** forme les leucotriènes, groupe de médiateurs à action chimiotactique puissante (leucotriène B4), vasoconstricteurs, bronchoconstricteurs et augmentent perméabilité vasculaire (leucotriènes C4, D4, E4).

### **III-4-3-2-facteur d'activation plaquettaire (PAF) :**

médiateur synthétisé à partir des phospholipides membranaires par activation de la phospholipase A2, par de nombreuses cellules de la réaction inflammatoire (polynucléaires neutrophiles et basophiles, mastocytes, monocytes-macrophages, endothélium, plaquettes). Ses effets sont nombreux, par action sur des récepteurs spécifiques ou par induction d'autres médiateurs : augmentation de la perméabilité vasculaire, agrégation des plaquettes, stimulation de l'attraction des leucocytes et de leur adhésion à l'endothélium(81).

### **III-4 -4-enzymes et métabolites des polynucléaires et des macrophages :**

**- enzymes lysosomiaux :** sont déversés dans les vacuoles de phagocytose et interviennent dans la digestion des produits de phagocytose ou sont déversés dans le milieu extérieur par la lyse des polynucléaires. Les polynucléaires contiennent deux types de granules. Dans les granules primaires (granules azurophiles) sont contenus la myéloperoxydase, le lysozyme (hydrolyse des parois bactériennes), la cathepsine G, la phospholipase A2, des hydrolases acides et des protéases neutres (élastase, collagénase)(80,81). Dans les granules secondaires, présence de lysozyme, lactoferrine, gélatinase, activateur du plasminogène, collagénase de type IV, histaminase et phosphatase alcaline. Les monocytes et macrophages contiennent des hydrolases acides, collagénase, élastase, un activateur du plasminogène, toutes ces enzymes contribuant à remodeler la matrice extra cellulaire. Les granules de éosinophiles contiennent la major basic protein, protéine toxique pour les parasites et les épithéliums. Les polynucléaires et les macrophages ont donc une activité de bactéricidie et de dégradation du tissu conjonctif dans le foyer inflammatoire (lyse de la fibrine, du tissu élastique et collagène, des membranes basales)(82). Des protéases neutres activent directement C3 et C5. Afin de limiter les effets pro-inflammatoires de ces enzymes quand elles sont déversées dans le milieu extra-cellulaire et donc de limiter les lésions tissulaires qui en sont directement issues, le sérum et les liquides extra-cellulaires contiennent des anti-protéases telles la bêta2 macroglobuline et l'alpha1-antitrypsine, synthétisée par le foie et inhibiteur de l'élastase neutrophilique(83).

**-radicaux libres dérivés de l'oxygène :** formés lors de la phagocytose, ils ont une action nécrosante locale (notamment endommagent les cellules endothéliales), inactivent des antiprotéases (dont l'alpha1-antitrypsine), activent la phospholipase A2 (d'où la synthèse de leucotriène B4, chimio-attractant des polynucléaires et la synthèse du PAF). Leurs effets

potentiellement dangereux sont contrebalancés par des anti-oxydants présents dans le sérum, les liquides extra-cellulaires et les cellules(84).

### **III -4-5- chimiokines:**

famille de petites protéines partageant des séquences similaires d'acides aminés. Sécrétées par diverses cellules (macrophages activés, endothélium...), elles jouent un rôle dans l'activation et le chimioattractisme, avec des spécificités différentes, pour les polynucléaires neutrophiles (IL-8), les éosinophiles (éotaxine), les basophiles, les monocytes (MCP-1) et les lymphocytes (lymphotaxine)(85).

### **III-4-6- facteurs de croissance :**

facteurs peptidiques proches des cytokines (dans le groupe desquelles ils tendent actuellement à être englobés) influençant la prolifération, la différenciation, la mobilité cellulaires, par des actions endocrines, paracrines ou autocrines. Dans la réaction inflammatoire, ils interviennent surtout à la phase du bourgeon charnu (prolifération fibroblastique et endothéliale), de la fibrogenèse cicatricielle et de la régénération épithéliale. Les macrophages activés produisent notamment : PDGF, EGF, FGF, TGF bêta(85) .

### **III -4-7-monoxyde d'azote (no) :**

gaz soluble produit par les macrophages, les cellules endothéliales, et certains neurones cérébraux. Il a une action paracrine à proximité de son site de production et des effets variés au cours de l'inflammation : c'est un puissant vasodilatateur (relaxation des cellules musculaires lisses des vaisseaux), il diminue l'agrégation plaquettaire, régule le recrutement leucocytaire, participe à une action anti-microbienne (les radicaux libres de NO sont cytotoxiques)(86).

### **III -5-Notions d'inflammation aiguë et d'inflammation chronique :**

#### **III -5-1-Inflammations aiguës :**

Il s'agit de la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours ou semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculoexsudatifs intenses. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante(80,82,83,84).

#### **III -5-2-Inflammations chroniques :**

Inflammations n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée et qui évoluent en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années. On peut distinguer deux types de circonstances de survenue des inflammations chroniques :

- les inflammations aiguës évoluent en inflammations prolongées subaiguës et chroniques lorsque l'agent pathogène initial persiste dans les tissus (détersion incomplète) ou lorsqu'une inflammation aiguë récidive de façon répétée dans le même organe en entraînant à chaque épisode des destructions tissulaires de moins en moins bien réparées.
- Les inflammations peuvent parfois se manifester d'emblée sous une forme apparemment chronique. La phase aiguë vasculo-exsudative est passée inaperçue car brève ou asymptomatique. C'est souvent le cas de maladies auto-immunes, ou d'affections où les mécanismes dysimmunitaires sont prépondérants (exemple : hépatite chronique active secondaire à une infection par virus de l'hépatite B ou C)(81).

### III -6- Anti-inflammatoires :

#### III -6- 1-Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) :

constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol(84), principal glucocorticoïde surrénalien. Les glucocorticoïdes sont des substances dérivées du cholestérol(85), dont la production est stimulée par l'ACTH libérée selon un cycle nyctéméral par le lobe antérieur de l'hypophyse.

Dans les tissus cibles, les glucocorticoïdes se fixent à leurs récepteurs des glucocorticoïdes (GR) du cytoplasme de la cellule(85). Après , le complexe récepteur-ligand formé pénètre dans le noyau cellulaire où il se fixe à de nombreux éléments de réponse aux glucocorticoïdes dans la région du promoteur des gènes-cibles. Le récepteur, ainsi fixé à la molécule d'ADN(86) .

*Matricaria recutita* ,*Thymus vulgaris* ,*Anethum graveolens* interagissent avec les facteurs de transcription basiques, provoquant une augmentation de l'expression génique de gènes-cibles spécifiques. Ce processus est appelé transactivation et conditionne la plupart des effets secondaires métaboliques et cardiovasculaires des glucocorticoïdes .

Le mécanisme opposé est appelé transrépression. Le récepteur hormonal activé interagit avec des facteurs de transcription spécifiques et prévient la transcription des gènes-cibles. Les glucocorticoïdes sont capables d'empêcher la transcription de tous les gènes immuns, incluant celui codant IL-2(87)

Les glucocorticoïdes ordinaires ne font pas de différence entre la transactivation et la transrépression, et influencent à la fois les gènes immuns "voulus" et ceux "non voulus" régulant les fonctions métaboliques et cardiovasculaires. Actuellement, les efforts de

recherche visent à découvrir des glucocorticoïdes agissant sélectivement qui seraient capables de ne réprimer que le système immunitaire(88)

### **III -6- 2-Anti-inflammatoire non stéroïdiens :**

Les anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques les plus tilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-pyrétique et antalgiques. Actuellement, il y a plus de 50 différents AINS sont sur le marché mondial.

Le mécanisme d'action des AINS a été précisé par les travaux de Vane en 1971, il repose en grande partie sur l'inhibition compétitive, réversible ou non, de la cyclooxygénase, enzyme qui permet la production de prostaglandine à partir de l'acide arachidonique (87).

Cette caractéristique commune à tous les AINS conduit à une diminution de la production des prostaglandines (notamment la PGE2 et la PGI2), importants médiateurs de l'inflammation . Même si d'autres modes d'action existent, cette activité explique largement les propriétés pharmacologiques et thérapeutiques des AINS, mais aussi une partie de leurs effets secondaires en raison du rôle ubiquitaire et des fonctions physiologiques des prostaglandines Ainsi, la production exagérée de prostaglandines en situation pathologique participe à l'inflammation (vasodilatation, augmentation de la perméabilité capillaire) et à la douleur (sensibilisation des nocicepteurs) alors que sa production basale permet l'homéostasie tissulaire (production de mucus, de bicarbonates et maintien du flux sanguin sous muqueux gastrique, maintien de l'hémodynamique rénale en cas d'hypoperfusion en particulier). L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les AINS semblait donc, jusqu'à récemment, devoir obligatoirement s'accompagner d'effets favorables et délétères (88) .

### **III -6- 3-Anti-inflammatoires d'origine végétale :**

Le nombre de composés phytochimiques, trouvé dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti inflammatoire. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxygénase ainsi que par d'autres mécanismes (88) .

## CHAPITRE IV : LES RADICAUX LIBRES

### IV -1- Définition des radicaux libres :

L' $O_2$  est une molécule bi radicalaire formée de deux atomes présentant sur leurs orbitaux externes deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en  $O_2$  puis en  $H_2O_2$ . Il est ainsi à l'origine de la formation d'espèces réactives oxygénées (ERO) (89).

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairier son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant alors comme un réducteur). Cette première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux ; ceci explique que la production d'un premier radical libre puisse causer d'importantes lésions dans une cellule (90).

L'appellation < Dérivés réactifs de l'oxygène > n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres proprement dit [radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hydroxyl ( $OH^{\cdot}$ ), monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ ),..... ], mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante [peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), peroxydinitrite ( $ONOO^{\cdot-}$ )] (91).

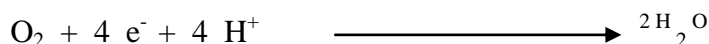
**Tableau 5 - Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (91) :**

	Nom	Symbole chimique
<b>Formes radicalaires</b>	Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$
	Radical hydroxyle	$OH^{\cdot}$
	Oxyde nitrique	$NO^{\cdot}$
	Radicaux peroxydes	$RO_2$
	Peroxydinitrite	$ONOO^{\cdot-}$
	Radical nitrosyl	$ONOOH$
<b>Formes non radicalaires</b>	Oxygène singulet	$O_2$
	Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$



## IV -2-La formation des ERO :

Dans les cellules la majeure partie de l'oxygène subit une réduction tétravalente (addition de 4 électrons) conduisant à la production d'eau. Cette réaction est catalysée par le cytochrome oxydase, accepteur terminal d'électrons présents dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne mitochondriale (92).



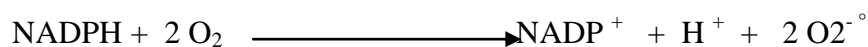
Toutefois cette chaîne de transport des électrons peut laisser fuir une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène, mais en partie seulement. C'est ainsi qu'environ 2% de l'oxygène subit une réduction mono électronique (addition d'un seul électron conduisant à la formation du radical superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) au niveau de l'ubiquinone ou coenzyme Q.



Ce phénomène de fuite des électrons intervient parce que les enzymes qui assurent l'approvisionnement de la chaîne respiratoire en énergie (électrons et protons), les complexes I et II, présentent un potentiel d'activité conjoint supérieur à celui de réutilisation des électrons : le cytochrome oxydase (complexe IV) (92).

La production des radicaux libres au niveau de la chaîne respiratoire augmente avec l'activité de celle-ci après augmentation de l'apport de nutriments énergétiques ou après un apport accru d'oxygène.

De même la NADPH oxydase des cellules endothéliales peut conduire à la formation de radicaux  $\text{O}_2^{\cdot -}$ .



L'anion superoxyde est peu réactif par lui-même, mais sa toxicité est due au fait qu'il est à l'origine de la formation d'autres ERO (Figure 8)

Les ERO peuvent être classés selon deux groupes :

- **Les espèces radicalaires:** Le radical hydroxyl ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), le radical hydroperoxyde ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ), le radical peroxyde ( $\text{RO}_2^{\cdot}$ ), le radical alcoyle ( $\text{RO}^{\cdot}$ ).
- **Les espèces non radicalaires:** Le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), l'acide hypochloreux ( $\text{HOCl}$ ), l'ozone ( $\text{O}_3$ ), l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ , état excité de la molécule), peroxynitrite ( $\text{ONNO}^{\cdot -}$ ) (94).

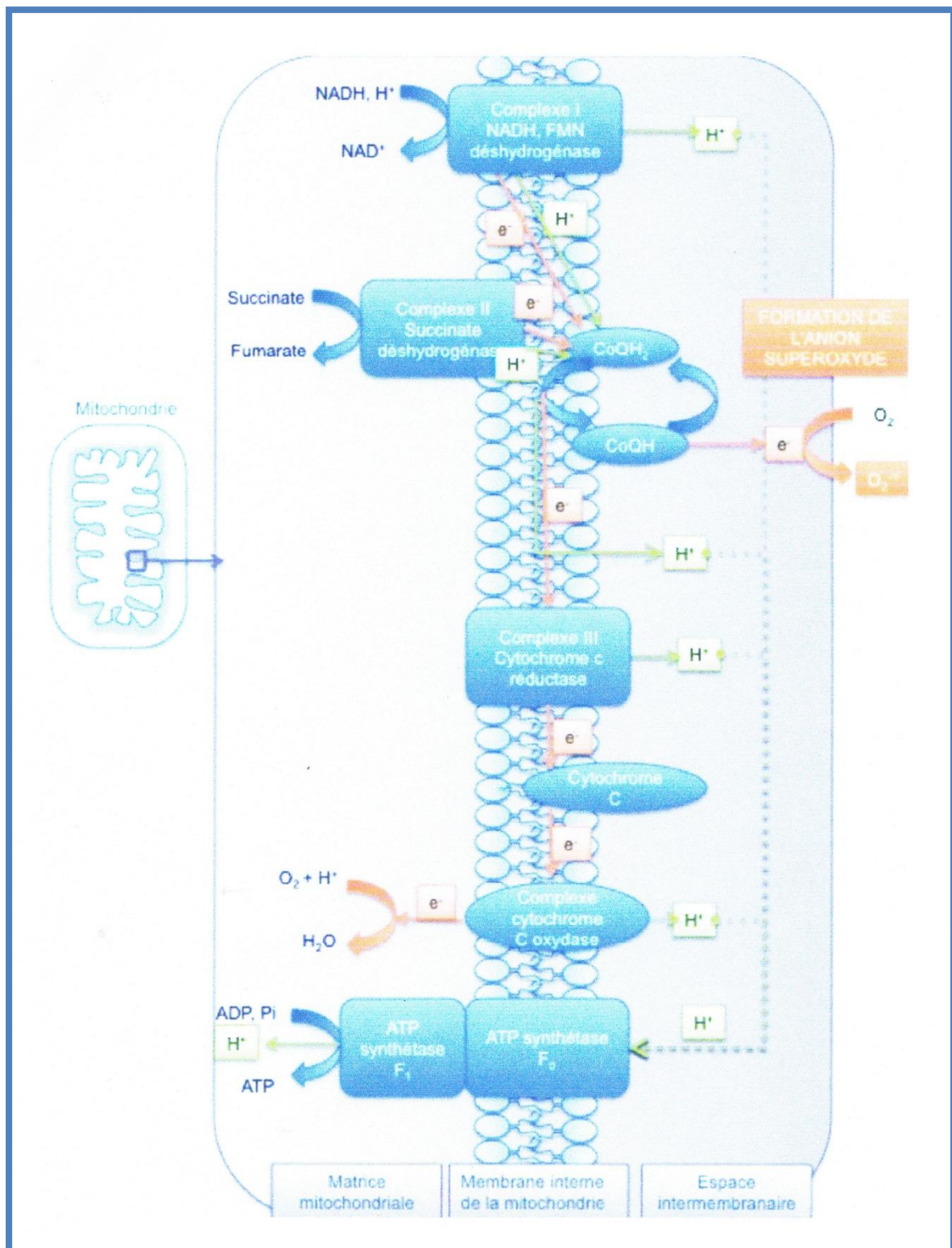


Figure 8- Production de l'anion superoxyde en condition physiologique par la fuite d'électron de la chaîne respiratoire mitochondriale (94).

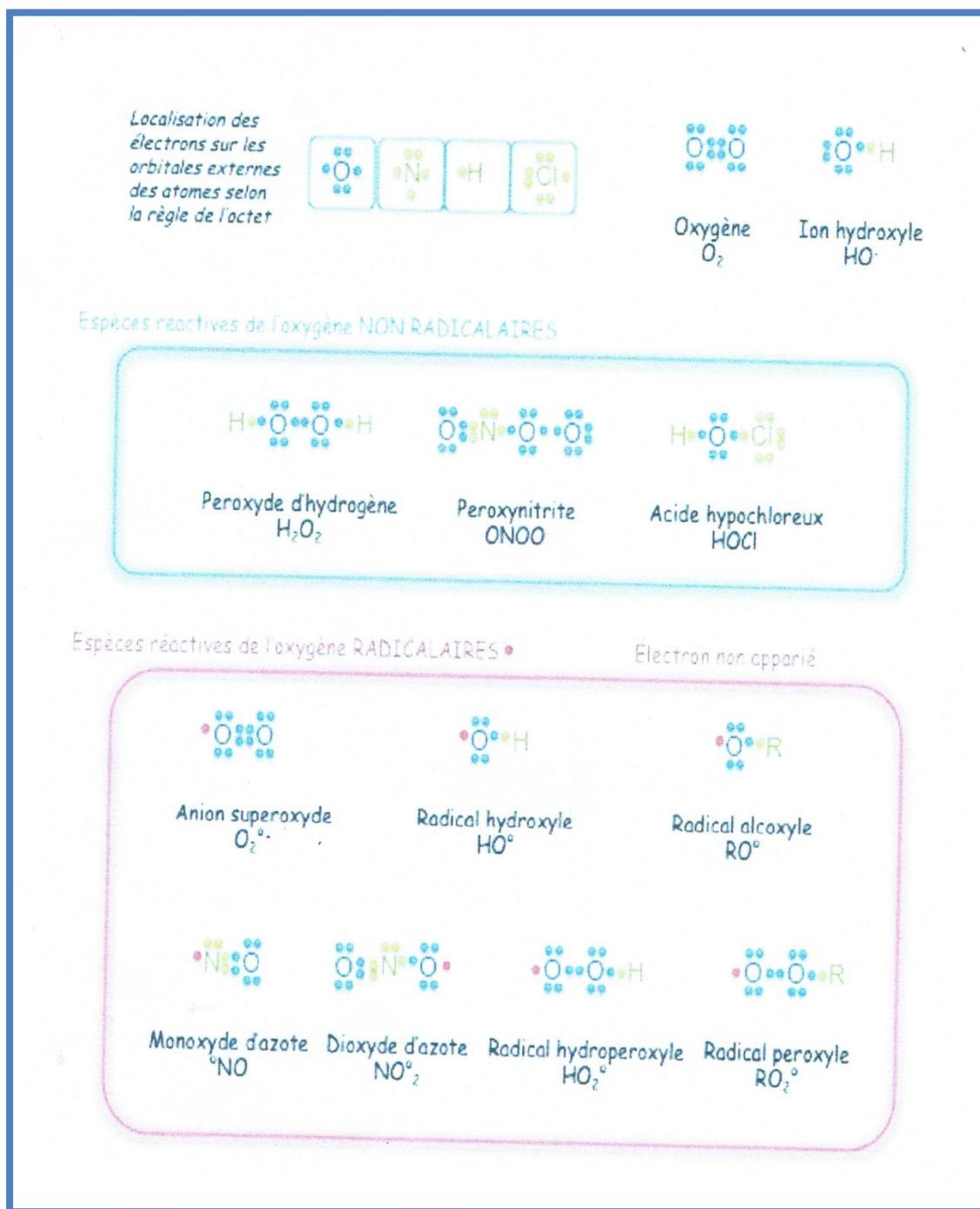
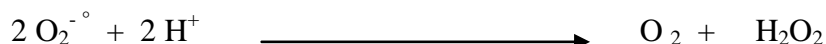


Figure 9- Etat des orbitales atomiques externes des espèces réactives de l'oxygène selon la règle de l'octet (95)

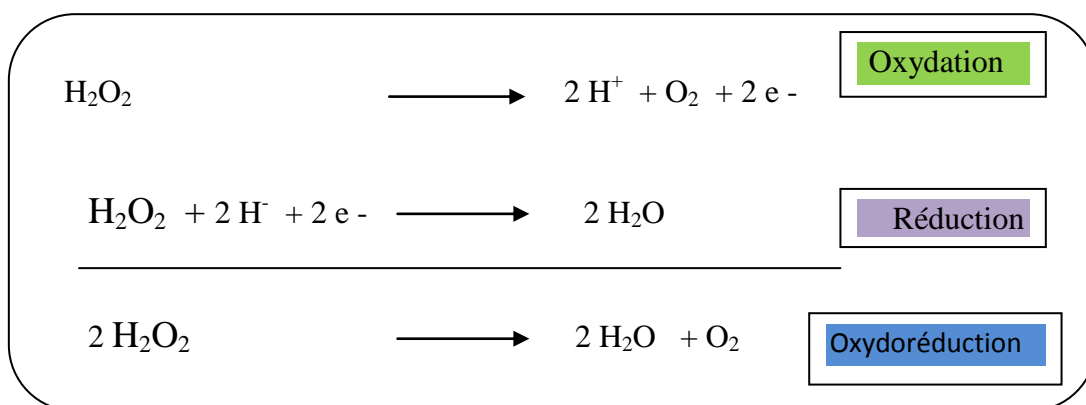
Les superoxydes des dismutases assurent l'élimination par dismutation de l'anion superoxyde, première espèce toxique formée à partir de l'oxygène, ceci selon la réaction suivante :



La dismutation de l'anion superoxyde par les superoxydes dismutases produit de peroxyde d'hydrogène, une autre ERO.

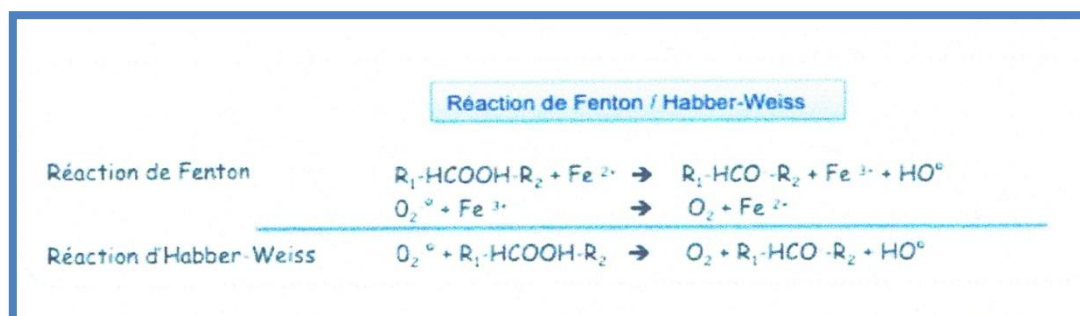
La beta oxydation est aussi connue pour produire du peroxyde d'hydrogène.

Le peroxyde d'hydrogène peut se comporter aussi bien en oxydant qu'en réducteur lors de sa dismutation (Figure10). Cette réaction de dismutation est lente( 96).



**Figure 10- Dismutation du peroxyde d'hydrogène (96).**

En présence d'ions métalliques tel que le fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), le peroxyde d'hydrogène formé peut aboutir par réduction, à la formation du radical hydroxyle ( $\text{HO}^\bullet$ ) hautement toxique pour les cellules (réaction de Fenton/Haber-Weiss, Figure 11).

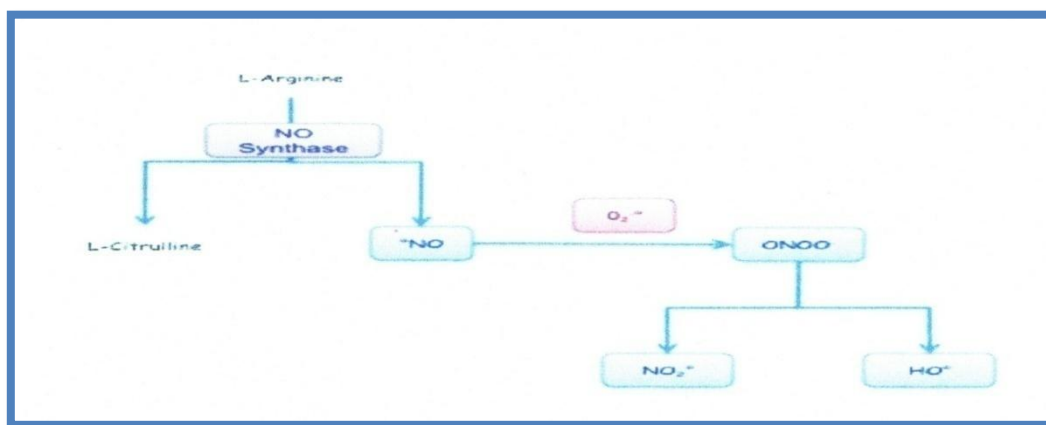


**Figure 11- Réaction de Fenton/Habber-Weiss**

Lors de cette réaction l'anion superoxyde est detoxifié.

Une autre origine du radical hydroxyle est la réaction entre les métaux et des peroxydes organiques, lipidiques, ou protéiques. De nouvelles chaînes radicalaires, quelque fois très actives, peuvent alors être initiées par ce biais (96).

Des ERO tels que le monoxyde d'azote peuvent être aussi à l'origine de la formation du radical hydroxyle. Le monoxyde d'azote est un radical libre ubiquitaire synthétisé à partir de l'arginine grâce à l'action d'enzymes appelées NO synthases (Figure 12).

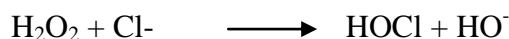


**Figure 12- Synthèse du monoxyde d'azote ( $^{\circ}\text{NO}$ ), du peroxynitrite ( $\text{ONOO}^{\circ}$ ) et du dioxyde d'azote ( $\text{NO}_2^{\circ}$ )(97).**

Le monoxyde d'azote est susceptible de réagir avec d'autres radicaux libres pour former des espèces oxydantes, telle que la formation du peroxynitrite  $\text{ONOO}^{\circ}$ , oxydant puissant vis-à-vis de nombreuses molécules. Ceci réduit la disponibilité de  $\text{NO}^{\circ}$  et donc la vasorelaxation.

En outre, le peroxynitrite peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants ( $\text{NO}_2^{\circ}$ ,  $\text{HO}^{\circ}$ ).

Une autre source de radical hydroxyle est la réaction de l'acide perchloreux formé lors de la phagocytose (par action de myeloperoxydase) avec l'anion superoxyde (Figure 06) (98).



Plusieurs d'autres ERO peuvent se produire dans l'organisme vivant, comme le radical alkoxyde ( $\text{RO}^{\circ}$ ) et le radical peroxyde ( $\text{ROO}^{\circ}$ ).

Les radicaux peroxydes sont des espèces très énergétiques. Le plus simple radical peroxyde et le dioxyde (hydroxyle :  $\text{HOO}^\circ$ ) qui est l'acide conjugué du radical  $\text{O}_2^\circ$  (98).

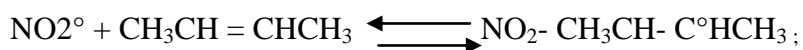
#### IV-3- Les sources des radicaux libres

##### IV-3- 1- Les sources exogènes:

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres(99,100 ,101 ,102 ,103 ).

- **Les rayonnements UV:** induisent la synthèse de radicaux libres ( $\text{O}_2^\circ$ ,  $\text{OH}^\circ$ ,  $^1\text{O}_2$ ) et de molécules génératrices de radicaux libres ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) par l'intermédiaires d'agents photosensibilisants (99).
- **Les radiations ionisantes :** provoquent également la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène(99).
- **L'ingestion d'alcool :** est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes  
Enfin montré que l'alcool pouvait diminuer l'activité des enzymes de protection (SOD-GSH-Px). De même, les concentrations sériques en sélénium et vitamine E sont abaissées chez les alcooliques et corrélées avec une atteinte hépatique plus ou moins sévère( 99 ,100).
- **Des toxiques :** tels que l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote ( $\text{NO}_2$ ) , présents dans notre environnement (suies, goudron, tabac, polluants industriels), participent à la genèse de radicaux libres : ils sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires (100).

La réaction peut être réversible :



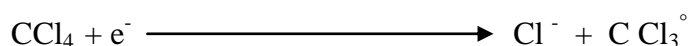
Ou irréversible



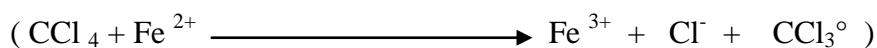
NO et  $\text{NO}_2$  peuvent aussi réagir avec le peroxyde d'hydrogène produit par les macrophages au niveau des alvéoles pulmonaires et donner naissance à des radicaux  $\text{OH}^\circ$ .

- **La fumée de cigarette** : joue un rôle majeur dans la formation de ces espèces radicalaires : elle contient NO et NO<sub>2</sub> renferme de fortes concentrations en composés insaturés et stimule, par son action irritante, les macrophages et les alvéoles pulmonaires. D'autres toxiques agissent par transfert d'électrons(101).

Il en est ainsi du tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) dont la toxicité s'exerce par l'intermédiaire des radicaux CCl<sub>3</sub><sup>°</sup> et mis en évidence des hépatocytes de rat par résonance paramagnétique électronique (RPE). La réaction de CCl<sub>4</sub> et CCl<sub>3</sub><sup>°</sup> s'effectue, soit sous l'action du cytochrome P450(102).



Soit en présence de fer ferreux



Ont montré que le CCl<sub>3</sub><sup>°</sup> était capable d'induire l'auto-oxydation des acides gras polyinsaturés, et donc de provoquer une augmentation importante des hydroperoxydes lipidiques.

- **Des antibiotiques anticancéreux** : tels que les anthracyclines, sont également capables de générer des radicaux libres.

La formation d'espèces radicalaires serait responsable de leur mode d'action anticancéreux et de leur toxicité. Ils agissent selon un mécanisme de transfert d'électrons. Ainsi, réalisés sur cultures de cellules tumorales mammaires, l'adriamycine est bioactivée en radical semiquinone de l'adriamycine (SQ<sup>°</sup>) par réduction enzymatique (cytochrome P450). Ce radical peut réagir avec l'oxygène pour former l'anion superoxyde. Pour une autre anthracycline, la daunorubicine (DOS), la réduction en radical libre (DSO<sup>°</sup>) se réalise alors que la molécule est déjà intercalée dans l'ADN (103).

- **Le sida** : Virus induit un stress oxydant (réprime le gène de la SOD de GPX)

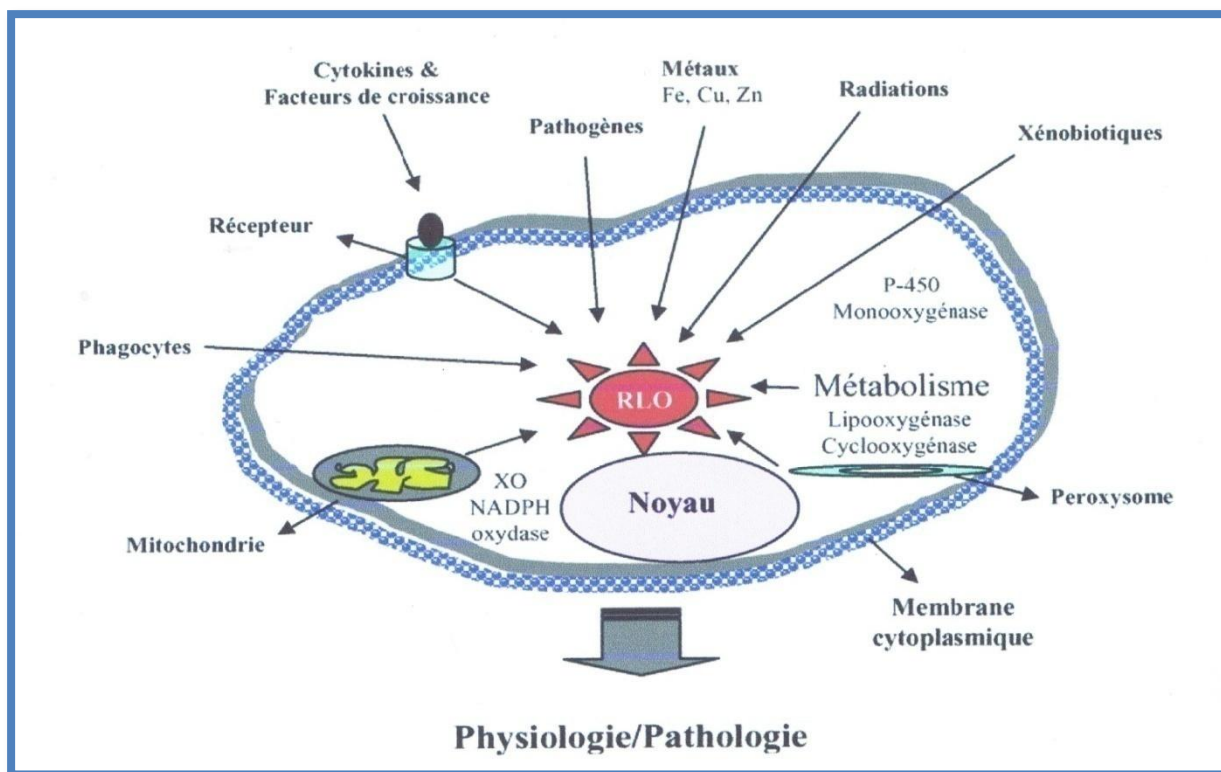


Figure 13 - Origine intra et extracellulaire des ERO XO : xanthine oxydase ; P-450 : Cytochrome P-450 (103).

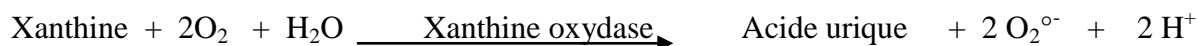
#### IV-3- 2-Les sources physiologiques :

Dans l'organisme, il existe de nombreuses sources de ERO parmi lesquelles l'autooxydation des petites molécules, la xanthine oxydase et la NADPH oxydase, le réticulum endoplasmique, les peroxyosomes (104, 105, 106, 107, 108).

- **L'auto-oxydation des molécules** : telles que la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones est une importante source d'ERO.

Le produit direct de ces auto- oxydations est souvent l' $O_2^{\circ-}$ . Ainsi, l'auto-oxydation de la dopamine est en partie impliquée dans le processus apoptotique lors de pathologies neurodégénératives, notamment lors de la maladie de Parkinson (104).

- **La xanthine oxydase** : catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande d'ATP et de déficit en oxygène. Mais elle peut également catalyser l'oxydation de la xanthine en acide urique, notamment lors d'ischémie, reperfusion ou d'hypoxie. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme accepteur d'électron produisant ainsi l' $O_2^{\circ-}$ . (104)





- **La NADPH oxydase :** joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes (104). En effet, lors de la phagocytose, cette enzyme présente dans la membrane plasmique des phagocytes, catalyse la formation d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Il existe aussi une NADPH oxydase dans des cellules non phagocytaires dont le rôle serait de réguler la croissance cellulaire (105).



- **Le réticulum endoplasmique lisse:** contient des enzymes qui catalysent une série de réaction pour detoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques. La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi des ERO.

Il semble que cette production radicalaire régule certaines fonctions du réticulum (105).

- **Les peroxysomes :** sont une importante source de production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cellulaire. Toutefois, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale (enzyme antioxydant) afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification présent dans le foie et le rein. Seule une faible quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase (106).

- **La mitochondrie:** est la principale source d'ERO par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire, elle produit en effet 90% des ERO cellulaires.

La mitochondrie est un organe intracellulaire qui est responsable de la majorité de production d'énergie sous forme d'ATP pour la cellule et représente donc une structure cruciale du fonctionnement cellulaire (105). Elle est considérée comme une des principales sources d'ERO dans la cellule par le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Même si elle est une source d'ERO plus spécifique dans certains tissus (tissu post-mitotique), elle reste, dans l'ensemble des tissus, une cible privilégiée des ERO (104).

La mitochondrie possède un système de double membrane (interne et externe) qui délimite l'espace matriciel mitochondrial dans lequel se trouvent, entre autres, les enzymes de voies métabolique de Krebs et de la β-oxydation.

Le catabolisme des glucides, acide gras et acides aminés s'accompagne de la production d'équivalents réduits qui sont le NADPH et FADH<sub>2</sub>. L'oxydation de ces équivalents réduits

par  $O_2$  a lieu au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale et aboutit à la formation d'énergie..

### **Complexe I : NADH ubiquinone oxydoréductase**

Le complexe I est le plus gros composant protéique de la membrane interne de la mitochondrie : il possède 46 sous-unités dont 7 sont codées par l'ADN mitochondrial et 39 par l'ADN nucléaire. Sa masse moléculaire est d'environ 750KDa.

L'oxydation du coenzyme NADH,  $H^+$  qui a lieu sur la face matricielle de la membrane par la NADH -déshydrogénase produit 2 électrons qui sont transférés jusqu'à l'ubiquinone (CoQ).

Le complexe I est la première pompe à proton de la chaîne respiratoire (106).

### **Complexe II : Succinate - deshydrogénase**

Le complexe II catalyse la ré-oxydation du succinate en fumarate qui, par l'intermédiaire de l'oxydation du  $FADH_2$  et de la réduction d'ubiquinone, permet le transfert de 2 électrons au complexe III (complexe b-c1). Ce transfert d'électrons est le seul à ne pas être couplé à un efflux protons (106).

### **Complexe III : Complexe b-c1 (ubiquinone-cytochrome C réductase)**

Le pool des quinones est un transporteur libre d'électrons des complexes I et II vers le complexe III. Ce dernier permet un transfert d'électrons à un deuxième transporteur mobile situé dans l'espace intermembranaire, le cytochrome C qui relie le complexe III au complexe IV (106).

Ce transfert d'électrons, également associé à un efflux de protons, fait du complexe III la deuxième pompe à protons de la chaîne respiratoire.

### **Complexe IV : Cytochrome C oxydase**

Le complexe IV catalyse la dernière réaction d'oxydoréduction entre le cytochrome C et l' $O_2$  qui est réduit en  $H_2O$  par 4 électrons.

Ce transfert d'électrons est irréversible, contrairement à celui qui a lieu dans les complexes I, II et III mais est aussi associé à un efflux de protons faisant de ce complexe le dernier site de couplage de la mitochondrie (106).

L'oxydation phosphorylante est le couplage entre la respiration mitochondriale et la production d'ATP. Ainsi, l'ATP synthase est parfois considérée comme le 5<sup>ème</sup> complexe de la chaîne respiratoire.

### ATP synthase

L'ATP synthase associe la diffusion facilitée des protons à la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de Pi. Le site catalytique est appelé F<sub>1</sub> et la sous-unité F<sub>o</sub> est constituée d'un canal de protons. Ce complexe enzymatique permet la conservation de la différence de potentiel électrochimique en énergie chimique (ATP) au travers d'un processus réversible (107).

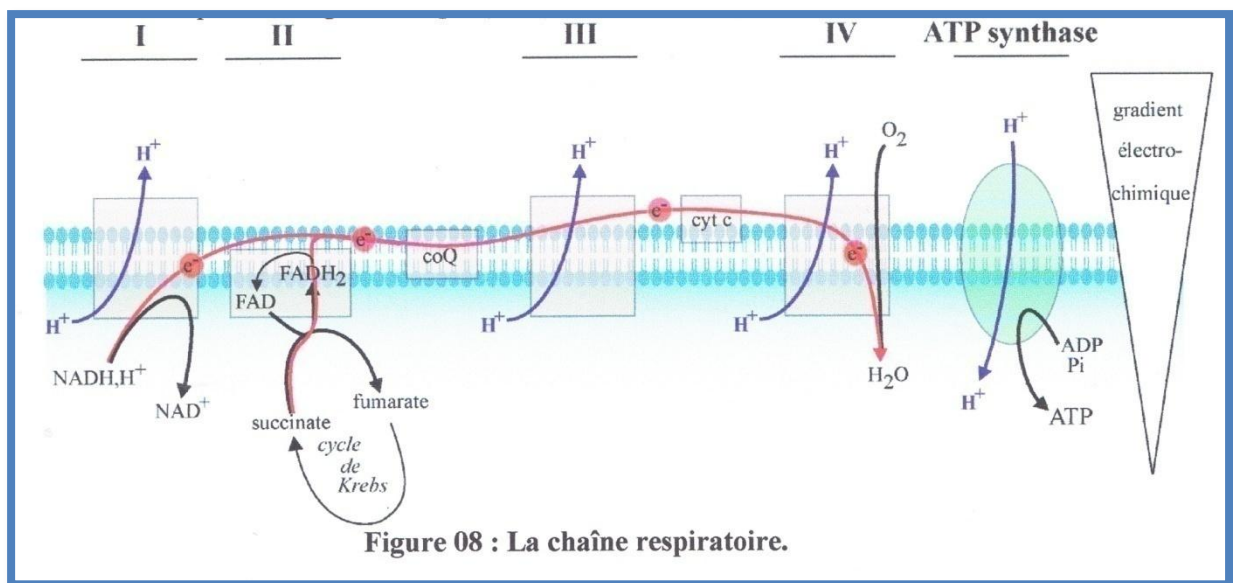
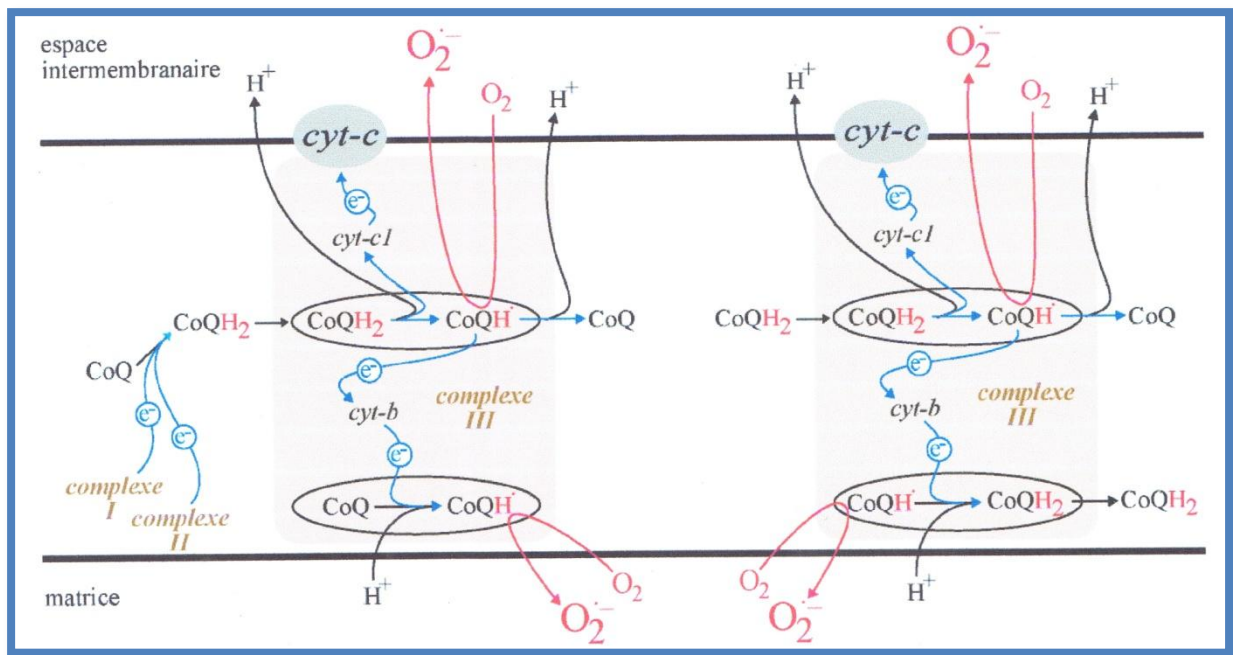


figure 14 -la chaîne respiratoire (107).

### La production mitochondriale de l'ERO :

Lorsque les électrons transportés par la chaîne respiratoire sont perdus, ils se combinent avec l'oxygène résultant en la formation de l'anion superoxyde. Ce phénomène a principalement lieu au niveau des complexes I et III (108).



**Figure 15- La production d'ERO par le complexe III (108).**

Les sources mineures d'ERO mitochondriaux étant l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase du cycle de Krebs et la monoamine oxydase.

Le mécanisme de production par le complexe I est encore débattu. Dans le complexe I et III, la fuite d'électrons a lieu au cours du cycle du co-enzyme Q. Dans ce cas, la demi-vie du radical ubisemiquinone (Co-QH<sup>•</sup>) est déterminante.

Si la chaîne tourne lentement la demi-vie des intermédiaires augmente (comme celle de Co-QH<sup>•</sup>), favorisant la production de superoxyde. A l'inverse, une vitesse plus élevée diminuera la demi-vie de Co-QH<sup>•</sup> et la probabilité de fuite d'électrons (108).

La production d'ERO mitochondriaux est ainsi fonction de l'état métabolique de la cellule. A cette notion de vitesse, il faut ajouter celle d'un découplage partiel (mild uncoupling). Ainsi, un léger découplage de la respiration permettrait une accélération de la chaîne et donc une diminution de la production de superoxyde.

production d'ERO est une cascade qui débute avec la formation du superoxyde. Ainsi, lors de la respiration mitochondriale, 0.2 à 2% du flux d'électrons conduirait à la production de ROS. L'anion superoxyde est donc un dérivé <involontaire> de la respiration (108).

#### **IV-4- Rôle physiologique des ERO :**

De façon physiologique, les espèces réactives radicalaires  $\text{OH}^\circ$  ou non  $\text{H}_2\text{O}_2$ , existent dans les tissus à des concentrations faibles mais mesurables. Elles protègent, régulent la cellule et permettent de maintenir une certaine homéostasie de l'état redox de l'organisme. Lorsqu'elles sont produites dans un compartiment cellulaire spécifique, elles peuvent participer au fonctionnement de certaines enzymes, intervenir dans les voies de transduction de signal et ainsi réguler les fonctions cellulaires.

##### **IV-4- 1-Messenger intra et extracellulaire :**

Les radicaux libres ou les espèces réactives constituent par eux même un système de transmission de signaux, qui serait apparu très tôt dans la vie. Ils peuvent être considérés comme des messagers intra et extracellulaires car ils permettent d'induire des réponses cellulaires face de nombreux stress. Ce stress peut être d'origine thermique ou induits par des radiations comme les ultraviolets ou par xenobiotiques (pesticides, médicaments), ce qui conduit à l'expression de gène de défense (SOD à manganèse, catalase..) (109).

Ils participent à la cascade de signalisation intracellulaire dans de nombreuses cellules comme les fibroblastes. Les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et le tissu thyroïdien.

##### **Régulation de tonus vasculaire et autre fonction de NO :**

Le monoxyde d'azote (NO) extracellulaire ou produit par les NOS, a la capacité de se fixer et d'activer la guanylate cyclase, produisant un second messager important à l'origine de nombreuses réponses physiologiques, le GMPc. Dans les cellules musculaires lisses, l'activation de la protéine Kinase GMPc dépendante permet la phosphorylation et l'activation de canaux potassiques calcium dépendants responsables de la relaxation des vaisseaux. Le NO joue également un rôle dans l'inhibition de l'adhésion plaquettaire (110).

##### **Défense immunitaire et «brust oxydatif» :**

Dans les leucocytes et notamment les polynucléaires neutrophiles (PN), les entités oxydantes participent très activement dans la défense de l'organisme par leur action toxique notamment sur les bactéries par le phénomène de brust oxydatif. Dans un environnement inflammatoire, les PN sont attirés par des facteurs chimiotactiques et atteignent le lieu de l'infection par diapédèse. Ils phagocytent les microorganismes dans le phagosome qui

fusionne avec les granules lysosomiales pour former le phagolysosome à l'intérieur duquel les particules infectieuses sont digérées (110). Cette activation des neutrophiles permet la libération de protéine cationique, la lactoferrine et des enzymes hydrolytiques et protéolytiques, et implique l'isoforme phagocytaire de la NADPH oxydase, la myéloperoxydase ou MPO et la NOS. La NADPH oxydase relargue une grande quantité d'anions superoxydes qui sont ensuite dismutés en peroxyde d'hydrogène dans la fente du phagosome qui contient du chlorure à forte concentration (111).

Ainsi le peroxyde d'hydrogène et le chlorure vont être utilisés par la MPO pour former de l'acide hypochlorique (HOCl), qui peut réagir avec l'anion superoxyde pour former le radical hydroxyle, qui va exercer son attaque oxydante.

Le but est d'éliminer le microorganisme en produisant des espèces oxydantes capables de détruire les capsules polysaccharidiques bactériennes résistantes aux enzymes protéolytiques.

Le burst oxydatif est la première ligne des défenses dans un environnement pathogène (111).

#### **IV-4- 2- Les ERO dans la transduction du signal :**

La transduction du signal dépendante des ERO est couramment décrite en réponse à certains stimuli. Il a ainsi été démontré une production de ERO après fixation du PDGF (Platelet-derived growth factor), de l'EGF (Epidermal growth factor), du TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor alpha), du TGF- $1\beta$  (Transforming growth factor 1 beta), ou de l'IL 1- $\beta$  (Interleukine 1 beta) sur leurs récepteurs (112).

De façon intéressante, la transduction du signal est inhibée par des antioxydants tels que la catalase ou N-acétylcystéine et l'addition de ERO exogènes rétablit l'effet biologique (111).

Les ERO génèrent par la fixation du ligand vont moduler les fonctions biologiques des effecteurs en aval, notamment les Kinases, les phosphatases qui à leur tour vont traduire le signal jusqu'au noyau (112).

#### **IV-4- 3- Les ERO, les protéines kinases et phosphatases :**

Les protéines kinases et phosphatases sont les principales cibles des modulations biologiques provoquées par les ERO.

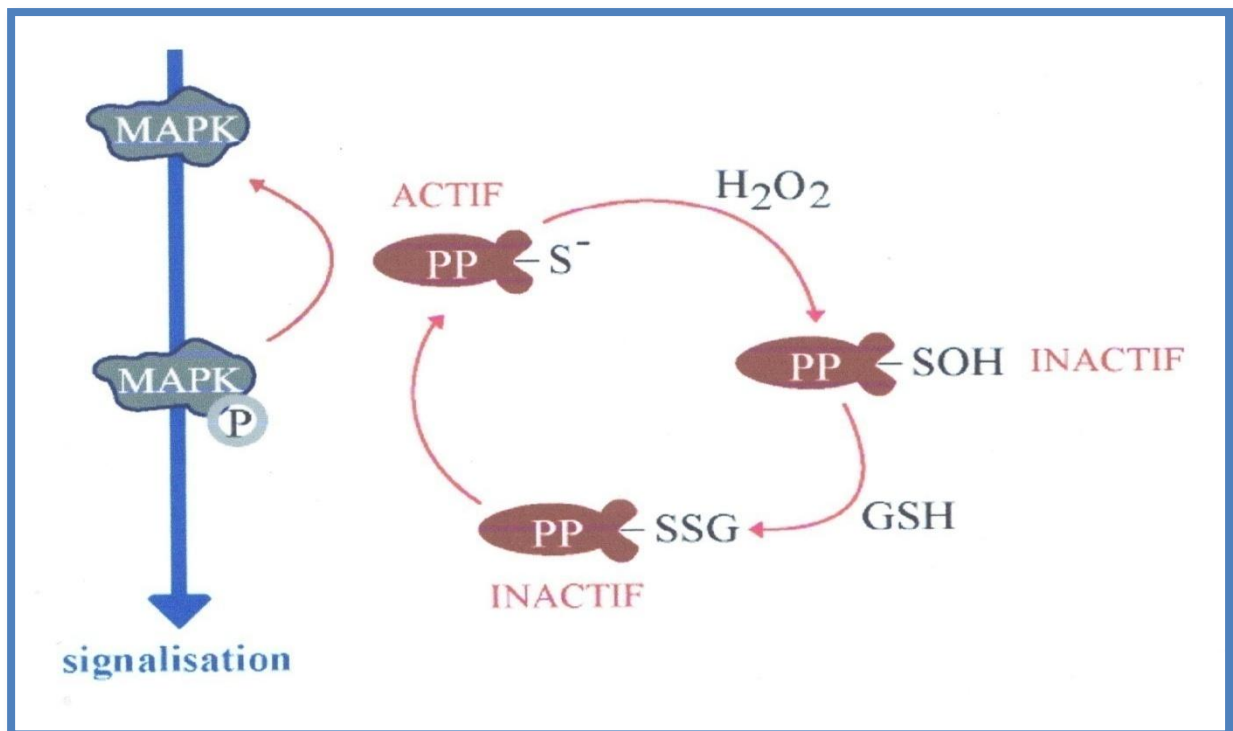
##### **-Inhibition des protéines phosphatases :**

Les protéines phosphatases ont en commun un résidu cystéine essentiel à leur activité catalytique, présent au sein même de leur site actif. En présence de concentration de l'ordre de 1mM de peroxyde d'hydrogène ce résidu cystéine peut être oxydé en sulfénique (cys-OH) ou se combiner au glutathion (glutathionylation) avec une perte d'activité de l'enzyme. Cette inhibition directe des protéines phosphatases par les ROS semble réversible en présence de glutathion (112).

#### -Activation des protéines Kinases :

Dans des conditions d'oxydation similaires, certains auteurs rapportent une augmentation massive de la phosphorylation des tyrosines kinases. Certaines isoformes de la PKc (Protéine Kinase C) comme l'isoforme alpha seraient également activables par le peroxyde d'hydrogène. De façon indépendante des phospholipides du résidu tyrosine présent dans le site actif. Le statut redox de la cellule est également prépondérant dans la modulation des MAPK n (Mitogène-Activated Protein Kinases).

Les MAPK sont des protéines serine/threonine kinases réparties en de 4 groupe : ERK (Extra cellular signal regulated kinase), JNK/SAPK (c-jun N Terminal Kinase/stress activated protein Kinase), p38 Kinase et BMK1 (Big mitogen activated protein kinase 1) leur activité est régulée par une double phosphorylation au niveau du motif protéique threonine-X-tyrosine (112).



**Figure 16 - L'action des ERO sur l'activité des phosphatases (112).****IV-4- 4-Les ERO et facteurs de transcription :**

En aval des protéines Kinases et phosphatases, les ERO peuvent intervenir dans l'ultime étape de la transduction de signal sur la modulation d'activité de certains facteurs de transcription. Le NF $\kappa$ B (Nuclear Factor Kappa B) est un complexe multi protéique connu pour activer un grand nombre de gènes impliqués dans l'inflammation. En l'absence de stimulation, le NF $\kappa$ B réprime dans le cytoplasme par son inhibiteur I $\kappa$ B. La phosphorylation de la sous unité I $\kappa$ -B entraîne la libération du NF $\kappa$ B qui peut alors transloquer dans le noyau et transcrire les gènes cibles. Les ERO agiraient en facilitant la phosphorylation d'I $\kappa$ B favorisant l'activité des kinases en amont et inhibant les phosphatases. En concentration plus importante, ils peuvent en revanche inhiber l'activité du NF $\kappa$ B par oxydation du résidu cystéine présent sur le domaine de fixation à l'ADN (113).

AP-1 (Activator protein 1) est un autre facteur de transcription régulé par l'état redox de la cellule.

AP-1 est un facteur de transcription didermique composé par les protéines d'oncogènes c-Fos ou c-Jun.

Son activation n'est pas directement dépendante des ERO mais se fait par l'intermédiaire des MAP Kinase JNK actives qui vont phosphoryler les résidus serines du domaine de transactivation de c-Jun.

AP-1 est également impliqué dans l'inflammation mais aussi dans la réponse antioxydant (113).

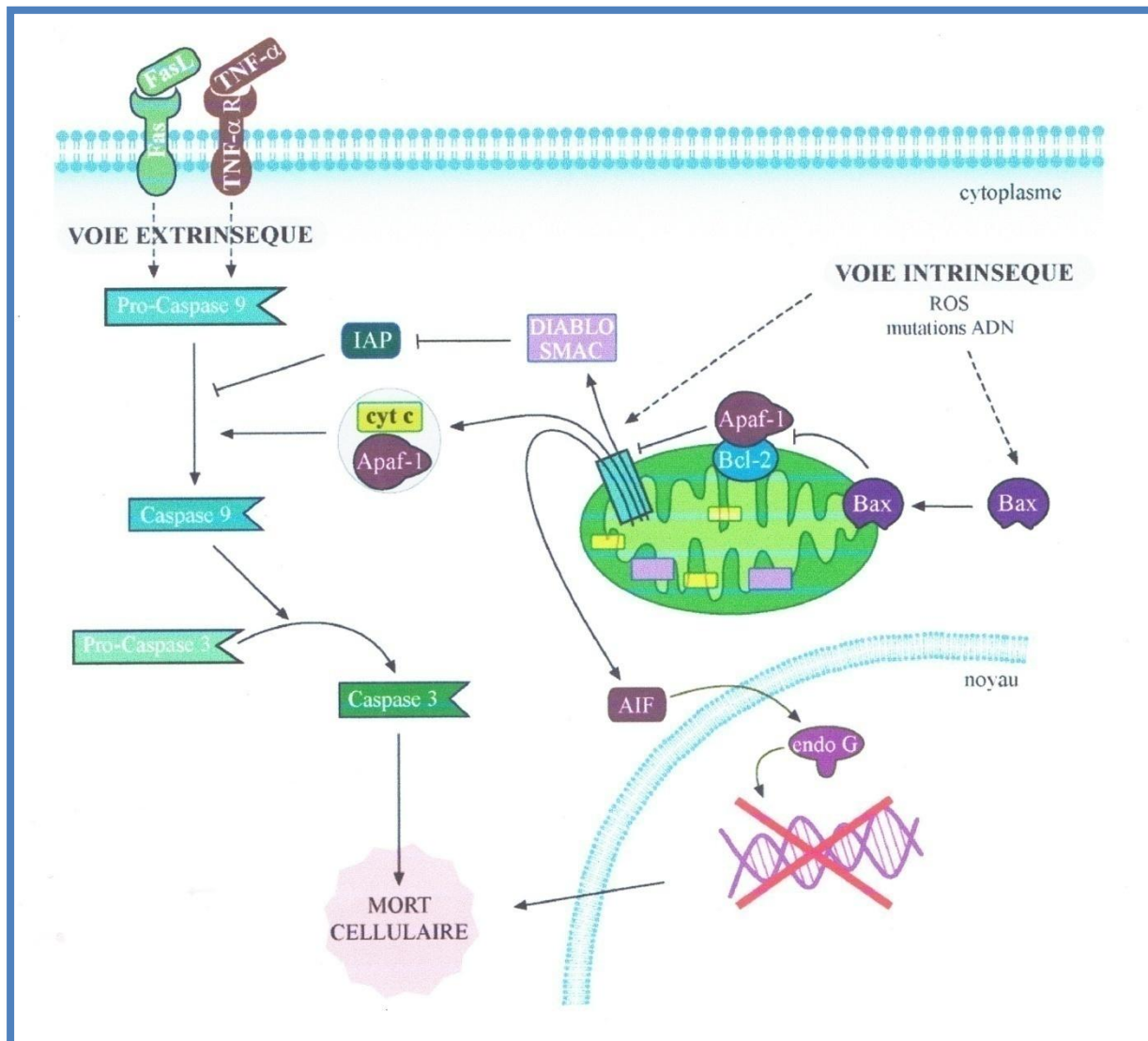
**IV-4- 5-ERO et apoptose :**

Les ERO semblent occuper un rôle prépondérant dans l'initiation du processus de mort cellulaire programmée. En particulier, les ERO générés par NOX4 sont décrits comme étant l'origine de l'apoptose des hépatocytes, des cellules endothéliales micro vasculaires cérébrales ou encore de différentes lignées de lymphocytes T leucémiques. Plus généralement, les ERO et le stress oxydant semblent impliqués dans plusieurs maladies dégénératives liées à l'âge comme l'arthrose, la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson.

Le stress oxydant pourrait être à l'origine du vieillissement. A l'apoptose dans certaines lignées tumorales, les ERO confèrent une résistance à l'apoptose d'astrocytes. Par



exemple, les ERO générés par NOX4 confèrent une résistance à l'apoptose d'astrocytes malins en oxydant le résidu cystéine présent au sein du site actif de la capase 3 active (114).



**Figure 17 - Les ERO dans le mécanisme de l'apoptose (114).**

En réponse à un signal de mort intrinsèque (ERO, mutations de l'ADN) ou extrinsèque (TNF- FasL) La cellule initie une cascade d'événements conduisant à sa mort par apoptose. Au niveau de la mitochondrie, l'ouverture du pore de transition libère dans le cytoplasme plusieurs médiateurs. Le cytochrome c et Apaf-1 activent la pro-caspase 9. Smac / DIABLO lève l'inhibition qui pèse sur les voies d'activation des caspases. AIF active endo-G, participant à la dégradation de l'ADN (114).

## CHAPITRE V :LE STRESS OXYDANT

### V-1- Définition:

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et leur destruction par des systèmes de défenses antioxydants (115), est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution) ou d'une diminution des capacités antioxydants (116).

Ce déséquilibre potentiellement conduisant à des dégâts structuraux et fonctionnels (117), provoque des mécanismes pathogènes qui sont liés à de nombreuses maladies, (117).

### V-2- Les cibles de stress oxydant :

Les radicaux libres peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le mécanisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles protéines, lipides acides Nucléiques et Les glucides, (118).

**v-2- 1-Peroxydation des lipides** :Les premières cibles des ERO sont les lipides notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGP) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation. l'oxydation des lipides génère de peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs.(118) la peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne, cette réaction organisée en 3 phases successives :

- **la phase d'initiation:**

Consiste dans la création d'un radical d'acide gras à partir d'un acide gras RH par soustraction d'un atome d'hydrogène (H) Cette déshydrogénation peut être provoquée par un initiateur radical, tel que HO ou HOO

- **la phase de la propagation:**

Le radical lipidique subit ensuite un réarrangement moléculaire pour donner un radical avec une structure de diène conjugué, plus stable, qui peut réagir avec une molécule d'O<sub>2</sub> et former un radical peroxyde (ROOH).

Ce radical est suffisamment réactif pour arracher à nouveau, un H à un

acide gras polyinsaturé voisin, propageant ainsi la réaction. L'hydroperoxyde lipidique (ROOM) formé peut être oxydé en présence de  $\text{Fe}^{+2}$  ou  $\text{Cu}^{+2}$  et entraîner la formation d'alcane (éthane, éthylène, pentane) et d'aldéhydes (118,119).

Le radical peroxyde, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malonalaldéhyde ou l'hydroxynonenal, (119).

- **La phase terminaison :**

La réaction en chaîne peut être heureusement interrompue par l'association de deux radicaux libres et la formation d'un composé stable ou le plus souvent par la réaction du radical avec une molécule antioxydant (119), La transmission en chaîne de la réaction de peroxydation lipidique est stoppée par la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidique des membranes(120) .

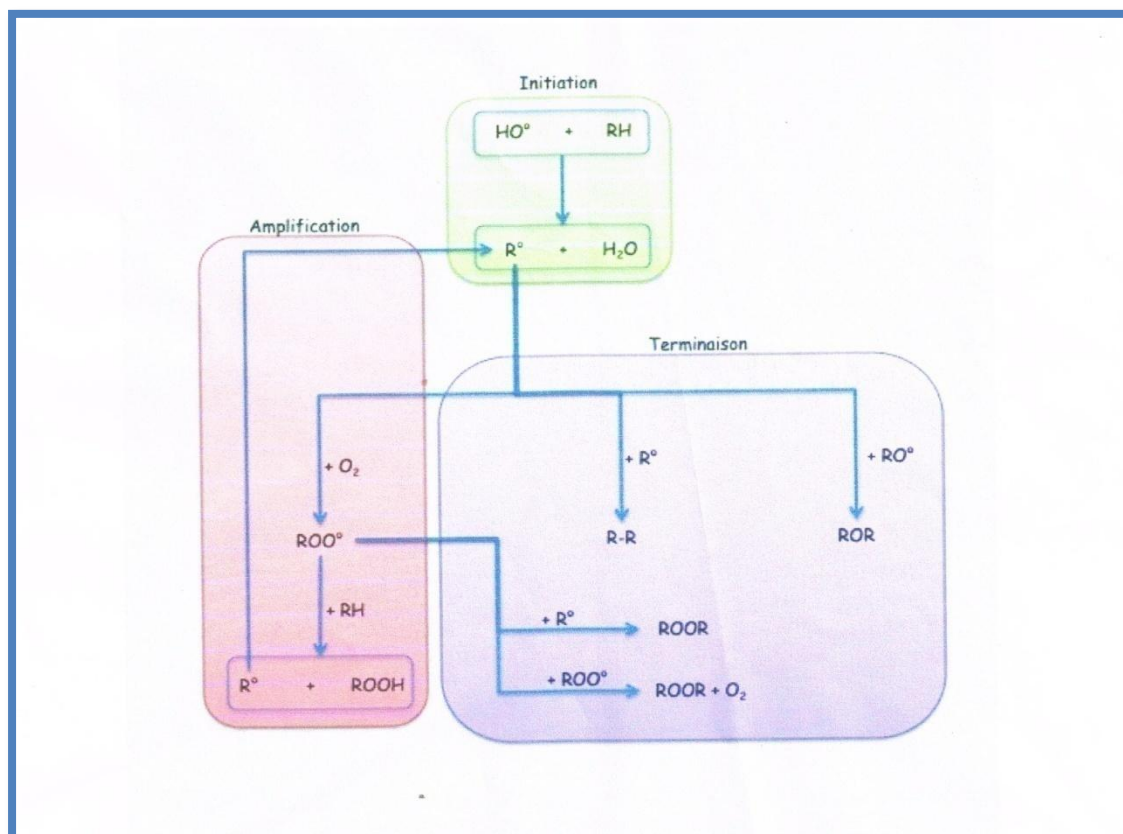


Figure 18 - Les trois phases de la peroxydation lipidique (120).

Cette réaction est à l'origine de la formation d'hydroperoxydes lipidiques. Ceux-ci s'accumulent dans la membrane, entraînent la diminution de sa fluidité et de sa perméabilité. Sa fonction étant complètement perturbée, la membrane se désorganise (120). Si les dégâts sont trop importants, les peroxydes peuvent conduire à la mort de la cellule (121).

Les produits formés lors de la peroxydation lipidique l'isoprostane, le malondialdéhyde (MOA), l'acide thiobarbiturique (TRARS) et le 4-hydroxynonanal (4-H-INE) sont étudiés comme marqueur de la peroxydation lipidique. Cependant, le 4-HNE peut activer directement le découplage mitochondrial par action directe sur les UCP et pourrait ainsi réduire la production mitochondriale d'ERO. Ce mécanisme pourrait être un moyen de réguler la production d'ERO. (122)

les peroxydes lipidiques peuvent aussi réagir avec d'autres composés cellulaires et être à l'origine de molécules très toxiques. Par exemple, ils peuvent réagir avec l'ADN et être à l'origine de substances mutagènes.

#### **v-2- 2- Oxydation des protéines :**

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ERO. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine. Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le  $\text{Cu}^{2+}$  et le  $\text{Fe}^{2+}$  peuvent être classées en deux catégories :

- 1) celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique.
- 2) les modifications des peptides par l'addition de produits ISSUS de la peroxydation lipidique.(122)

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. D'autres lésions irréversibles conduisent à la formation d'un intermédiaire radicalaire (123).

Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation notamment de

ponts bi- tyrosine détectables par leur fluorescence, soit subir des coupures en cas d'agression forte, soit des modifications de certains acides aminés en cas d'agressions modérées (123)

Les acides aminés comme la méthionine, la lysine et les acides aminés aromatiques peuvent être oxydés de façon irréversible, ce qui modifie la structure des protéines et peut altérer leur antigénicité ou leur activité. L'oxydation de la cystéine est réversible mais peut également perturber les fonctions biologiques du glutathion (GSH) ou de certaines protéines (122).

Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, anti-enzyme, récepteur ...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome.

Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles vont alors former des amas, anormaux dans ou autour des cellules. Ces amas, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuscines caractéristiques des tissus des sujets âgés, (122).

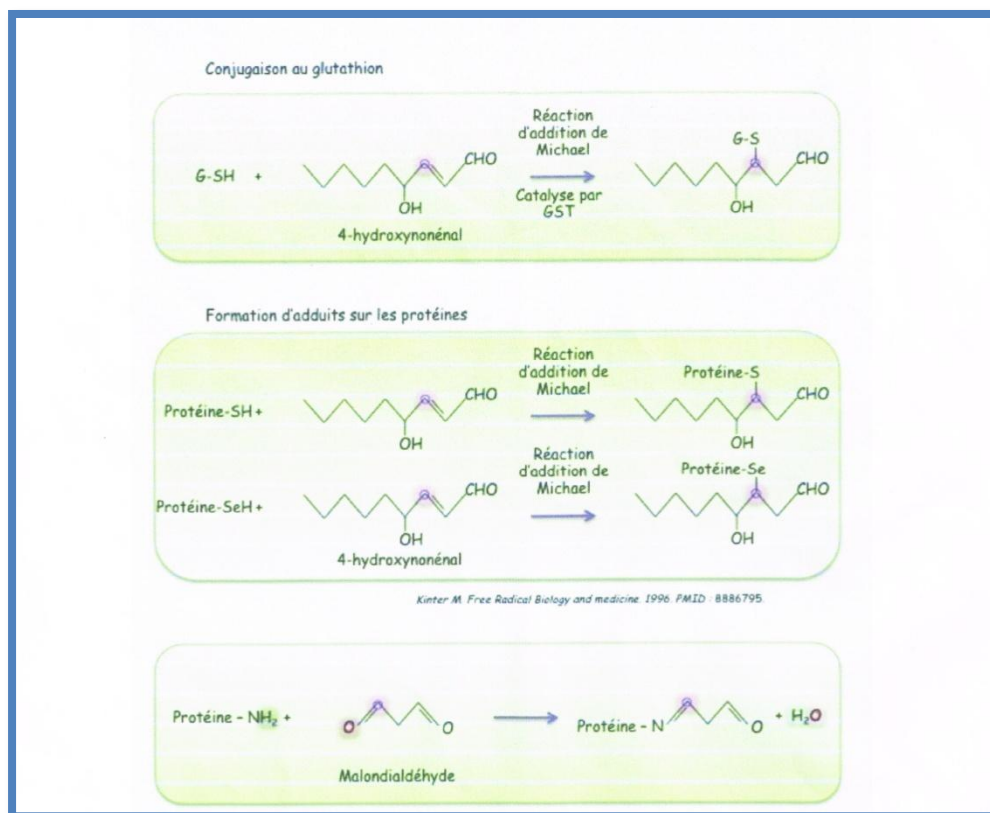


figure 19 - Attaque par les produits de peroxydation lipidique des molécules biologiques telles que les protéines

**v-2- 3 Oxydation d' ADN :**

La stress oxydant étant principalement d' origine mitochondriale, ces organites sont les premières cibles des ERO. En effet, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire (124).

Les mécanismes explicatifs proposés sont:

- 1) l'absence d'histones protectrices autour de l'ADN Mitochondrial.
- 2) sa localisation proche de la membrane interne.
- 3) des mécanismes de réparations frustrés.
- 4) une structure circulaire sans introns augmentant statistiquement le risque de mutations pathogènes (124), les bases qui composent l'ADN. et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées : 8-oxo guanine, 8-nitro guanine, formamidopyrimidine, 8-oxo adénine, formimido uracile, 5-hydroxy cytosine, 5-hydroxy méthyl uracile, thymine diol, Oxazolone.

Le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre: lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin.

Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés(125).

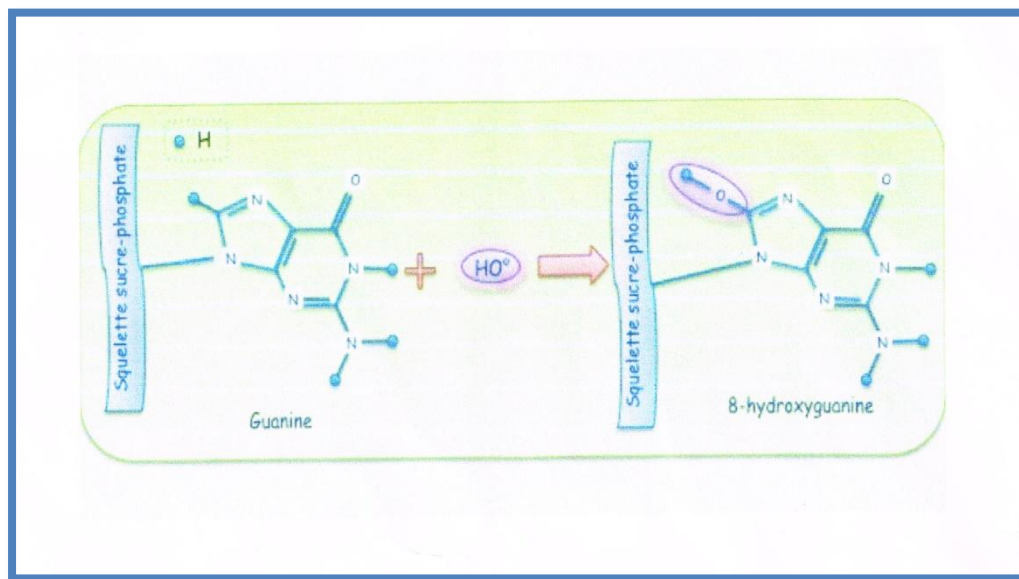
L'attaque radicalaire des protéines qui sont très nombreuses à entrer en contact avec l'ADN pour le protéger (histones) ou pour le lire (enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription), entraîne des pontages des protéines ou des adduits sur des bases de type lysinoguanine.

Malheureusement, ce beau mécanisme peut se dérégler soit par une surcharge de lésions en cas de stress massif, soit par un mauvais fonctionnement de ces systèmes de réparation chez des sujets déficients en cofacteurs (thioredoxines, zinc) ou atteints d'une anomalie génétique.

Dans ce cas, les lésions non réparées vont perturber les mécanismes de réplication de l'ADN et entraîner soit des erreurs de lecture et de synthèse par des ADN polymérase translésionnelles infidèles aboutissant à une mutation ponctuelle dans le génome, soit une impossibilité de copie de l'ADN qui aboutira à la mise en

route du suicide programmé des cellules par un mécanisme appelé apoptose.

Cette modification de l'ADN induit des mutations par transitions GC(guanine /cytosine )versTA(thymine/adénine) souvent observées spontanément dans les cellules cancéreuses (126) . la figure 20 montre l'effet du radical hydroxyl sur la base constitutive de l'ADN ( guanine ) qui se transforme en une molécule 8-hydroxyguanine.



**Figure 20- Effet de l'attaque du radical hydroxyle ( $\text{HO}^\bullet$ ) sur la guanine, base constitutive de l'ADN (126) .**

#### v-2- 4- Les glucides :

Les radicaux libres peuvent aussi agir sur le glucose et générer des intermédiaires réactifs. Les dommages oxydatifs peuvent alors se propager via l'attaque des radicaux formés sur d'autres molécules. L'oxydation du glucose peut libérer des cétoaldéhydes, du peroxyde d'hydrogène et des anions superoxydes en présence des métaux, et entraîner également la coupure de protéine et leurs glycation par attachement du céto- aldéhyde (127), Il forme aussi un dérivé de produit de glycation avancé (126).

## v-2-Les systèmes de défenses antioxydants :

L'organisme est déterminé d'un ensemble de systèmes de défenses antioxydants très efficaces afin de diminuer la concentration des espèces oxydantes dans l'organisme. Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. Ces systèmes peuvent être soit enzymatiques, soit moléculaires. Ils peuvent être d'origine endogènes ou exogènes et peuvent être des composés naturels ou synthétiques (127) .

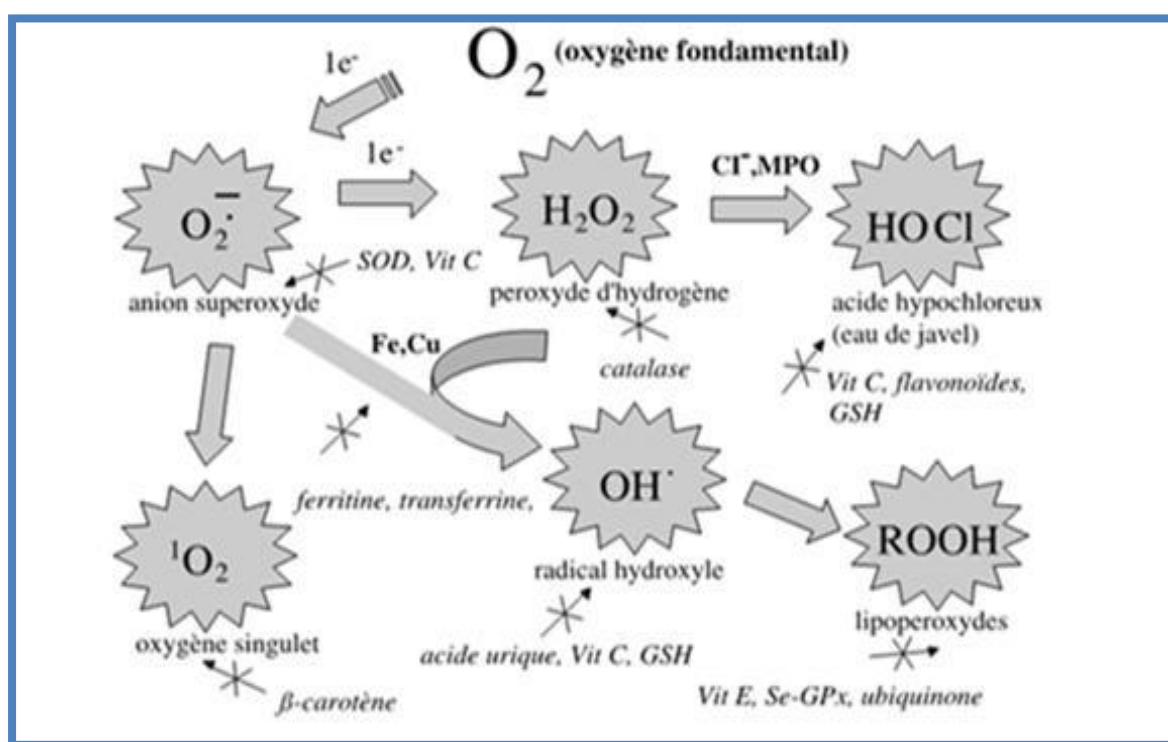


Figure 21 -Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants.

### V-2-1-Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes :

Les antioxydants enzymatiques (le superoxyde dismutase la glutathion réductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les différents espèces oxydantes. Leur rôle principal est de diminuer la quantité des ROS dans la cellule(127).

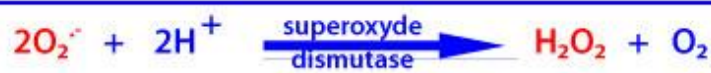
Parfois, ces enzymes nécessitent des cofacteurs comme les oligoéléments (Zn, Cu, Mn, Se, Fe) pour exercer leur activité enzymatique(129).



### 1- Superoxyde dismutase (SOD) :

Les SOD sont le premier enzyme à intervenir dans la cascade des ROS. Ce sont des métalloprotéines qui catalysent la dismutation des ions superoxydes ( $O_2^{\bullet-}$ ) en peroxyde d'hydrogène (130).

( $H_2O_2$ ) et oxygène ( $O_2$ ). Ils existent trois isoformes chez les mammifères (128). Les SOD se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : SOD à Manganèse (Mn-SOD) dans les mitochondries, à ions cuivre ou à zinc (Cu/Zn-SOD) dans le cytoplasme et les mitochondries, et des formes extracellulaires (EC-SOD) dans les vaisseaux sanguins (130). Il a été nouvellement montré que la (Cu/Zn-SOD) était également présente dans l'espace inter membranaire (132 ; 133 , 134)



### 2-Glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR) :

La (GPx) est présente dans les liquides extracellulaires (sang), dans les cellules au niveau du cytoplasme et dans les membranes. Leur rôle principal est d'assurer la réduction du ( $H_2O_2$ ) en  $H_2O$  et  $O_2$  (131).

Lors de sa réaction deux molécules de glutathion (GSH) réduites sont oxydées en glutathion-Disulfure (GSSG) (130, 133). Dans chacune de ces réactions, une molécule de glutathion oxydée est obtenue, pour perdurer cette réaction, il doit y avoir un taux constant de GSH, ce qui est rendu possible par la glutathion réductase (GR), qui catalyse la réduction du (GSSG) en (GSH), à l'aide d'un cofacteur qui est le NADPH sous forme réduite ( $NADPH, H^+$ ), l'équation suivante explique sa :



### 3-La catalase :

est une enzyme hémérique composée de quatre chaînes polypeptidiques. Son site catalytique permet l'élimination du peroxyde d'hydrogène, présent à haute

concentration,



Quatre molécules de NADPH, liées à la catalase, confèrent à cette enzyme une protection contre l'attaque de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou comme source de NADPH pour la glutathion peroxydase. Son activité est particulièrement abondante dans les globules rouges, le foie et les reins. La catalase joue un rôle important dans la détoxification de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans les peroxysome(133).

### V-2-2 Les antioxydants non enzymatiques endogènes :

Ils existent de nombreux réducteurs endogènes participant à la protection de l'organisme contre les DROs, les plus importants étant le glutathion, la bilirubine, l'acide urique, le coenzyme Q, les oestrogènes, la mélanine, la mélatonine et l'acide lipoïque(.134).

#### -Le glutathion :

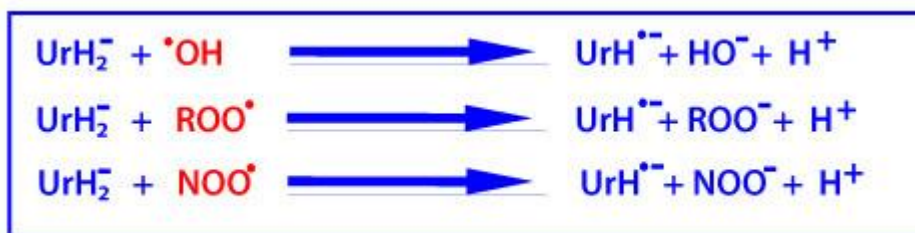
Le glutathion (GSH) est un tripeptide composé de trois acides aminés : l'acide L-Glutamique, la LCystéine et la L-Glycine. Le site principal de la synthèse du GSH au niveau cellulaire est le cytosol, à partir duquel il est distribué aux autres compartiments cellulaires. Le GSH est synthétisé par l'action séquentielle de la glutamate-cystéine ligase et la glutathion synthétase (134).

Il est présent en grande quantité dans les organes exposés aux toxines tels que les reins, le foie, les poumons ou les intestins et peu présent dans les fluides biologiques. Le GSH joue un rôle primordial dans les cellules où il participe la détoxification cellulaire.

#### -L'acide urique :

est formé suite à l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine par la xanthine oxydase (voir ci-dessus). réducteur. Dans les conditions physiologiques, l'acide urique est majoritairement ionisé sous sa forme d'urate ( $\text{UrH}_2^-$ )(132). C'est un puissant piègeur de radicaux  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{ROO}\cdot$  et  $\text{NOO}\cdot$  en produisant le radical  $\text{UrH}^-$ , qui

est relativement stable en raison de la délocalisation des électrons dans le noyau purine.

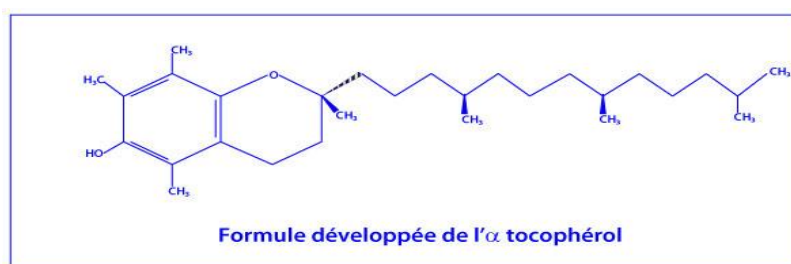


### V-2-3-Les antioxydants non enzymatiques exogènes :végétales

La principale source d'approvisionnement de l'organisme en antioxydants exogènes sont les aliments soit d'origine animale, soit d'origine végétale. Les plus connus sont la vitamine E, la vitamine C et les polyphénols.

### V-2-3-Les antioxydants non enzymatiques exogènes :végétales

**La vitamine E** : est un antioxydant liposoluble désignant un ensemble de 8 molécules organiques, 4 tocophérols et 4 tocotriénols, la forme la plus active étant l'alpha-tocophérol et celle la plus abondante dans l'alimentation étant le gamma-tocophérol(135).



La vitamine E s'incorpore facilement dans les membranes cellulaires et les protège contre la peroxydation lipidique en neutralisant les radicaux peroxyde, alkyle et alcoyle ( $\text{ROO}^\bullet$ ). L'alpha-tocophérol est la forme la plus active de la vitamine E. Elle réagit directement sur les peroxydes ce qui conduit à son oxydation en radical tocophéryle. La vitamine C et/ou le glutathion réagissent en synergie avec la vitamine E permettant ainsi sa régénération par la réduction du radical tocophéryl. In vitro, les vitamines E et C augmentent l'activité de la glutathion peroxydase, de la superoxyde dismutase et de la glutathion réductase, et elles diminuent la peroxydation lipidique

La vitamine C

**-La vitamine C** :ou acide L-ascorbique (AscH) est un antioxydant hydrosoluble, présent sous sa forme ascorbate anionique (AscH<sup>-</sup>) au pH physiologique. Elle est capable de réagir directement sur les DROs et en particulier avec les ions superoxydes  $O_2^{\bullet -}$ . Comme la vitamine E, elle limite la peroxydation lipidique en piégeant les radicaux peroxyde. Enfin, elle assure la régénération de la vitamine E par réduction spontanée du radical tocophéryl (134).

**-Les catéchines** :Les catéchines sont des molécules polyphénoliques hydrosolubles, composées d'au moins un groupement phénolique.Elles sont abondantes dans certaines plantes, particulièrement dans les feuilles de thé et dans le vin(134). Elles ont la capacité de piéger les ions superoxydes  $O_2^{\bullet -}$ , et l'oxygène singulet  $^1O_2$ ,  $O_2^{\bullet -}$  étant directement réduit en  $H_2O_2$ .

**-Les caroténoïdes** : sont, avec la chlorophylle et les anthocyanes, les pigments les plus répandus dans la nature. A ce jour, plus de 600 caroténoïdes ont été identifiés, mais seule une quarantaine est retrouvée régulièrement dans l'alimentation humaine. Une trentaine de caroténoïdes et de leurs métabolites a été identifiée dans le plasma et les tissus humains, mais 6 caroténoïdes sont majoritaires : le  $\beta$ -carotène, le lycopène, la lutéine, la  $\beta$ -cryptoxanthine, l' $\alpha$ - Carotène, et la zéaxanthine (135 ,136).

## CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES :

Le travail expérimental, ayant pour objet l'étude de l'activité antioxydant et anti-inflammatoire des plantes médicinales : *Matricaria recutita*, *Thymus vulgaris*, *Anethum graveolens* .La partie expérimentale est réalisée au laboratoire de biologie animal, Université –Constantine -1 .

### I.Matériel :

#### I.1.Matériel biologique(Echantillonnage) :

##### I.1.1.Matériel végétal :

Les espèces sélectionnées : ( *Matricaria recutita* ) ; (*Thymus vulgaris*) ; (*Anethum graveolens* ) ont été achetées .La partie aérienne(fleurs de *Matricaria recutita*),(feuilles de *Thymus vulgaris*)et(les grains de *Anethum graveolens* ),les plantes séchées ont été pulvérisées au broyeur pour obtenir une poudre fine pour qu'elle soit prête à l'utilisation.

##### I.1.2.Réactifs chimiques et instrumentations :

plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences,parmi ce produits : acide sulfurique( $H_2SO_4$ ),acide chlorhydrique (HCl), acide acétique ,NaOH,NH<sub>4</sub>OH,KI,I<sub>2</sub>,NaCl,,AlCl<sub>3</sub> ;acide galique ;rutine quercétine,méthanol,eau distillé, coton.DPPH,diclofénac,BSA,GummeArabique,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,K<sub>3</sub>Fe(Cn)<sub>6</sub>,FeCl<sub>3</sub>,Parmil'apar eillage utilisé:,spectrophotomètreUV-Visible double faisceau (JENWAY 6305 UV/VIS),Chambre d'observation UV « 264/3645 nm »(VILBERCOURMAT),Bain Marie(MEMMERT),Etuveuniversselle de 5 à220°C avec ventilation (MEMMERT),Agitateur magnétique (SCIOLOGEX), vortex (VELP), Balance (OHAUS) , PH mètre.

## II-Méthodes :

### II-1-Préparation des extraits aqueux végétaux :

#### II-1-1- Préparation de l'extrait total aqueux :

La partie aérienne (,fleurs)de *M.recutita* et(feilles) *TH.vulgaris*,les grains de *A.graveolens* ,ont été nettoyées et séchées à température ambiante ,ensuite broyées à l'aide d'un broyeur manuel,lapréparation des extraits consiste a macerer 40g de la poudre de chaque plante dans un becher avec 1000 ml de H<sub>2</sub>O , met sur un agitateur de type SCIOLOGEX pendant 24heures,les homogénats est filtrés successivement 2fois à l'aide du coton hydrophile puis une fois sur les

papiers de WATTMAN N° 1 ;la filtrat obtenue est évaporé à l' aide d' une étuve de type MEMMERT à 50°C pour donner des poudres des extraits aqueus secs des 3 plantes MR,THV,AG .

### II-1-2-Screening phytochimique des extraits végétaux :

Les tests phytochimiques sont réalisés sur les extraits bruts des 3 plantes ; l'extrait total aqueux (EAMR) ;(EATV) ;(EAAG) .

#### 2.1.Mise en évidence des tanins :

A 2 ml de la solution à tester ,ajouter 2 à 3gouttes de la solution de **FeCl<sub>3</sub>** à 2%.un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue –noire et un précipité (laisse reposer quelques minutes).

#### 2.2.Mise en évidence des saponosides :

- **Test 1** :5ml de la solution à tester sont bien mélangés avec 10ml d'H<sub>2</sub>O pendant 2min . la formation d'une mousse persistante après 15min confirme la présence des saponosides.
- **Test 2** :5ml de l'extrait ont mélangés avec 2ml de chloroforme et 3ml d'acide sulfurique concentré.une couleur rouge-marrone de la couche d'interface indique la présence des triterpènes hétérosidiques.

#### 2.3.Mise en évidence des flavonoides :

5ml d'extrait sont traités avec quelques gouttes d'AlCl<sub>3</sub>(1%).la présence de flavonoides est confirmée par l'apparition d'une couleur jaune

#### 2.4.Mise en évidence des composés réducteurs :

Ce test est basé sur la réaction de Keller-kiliani.A1ml de l'extrait ajouter 5ml d'acide acétique contenant des traces de FeCl<sub>3</sub> et 5 ml d'acide sulfurique contenant des traces de FeCl<sub>3</sub> .la présence des composés réducteurs est confirmé par la formation de deux phases une colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert(acide sulfurique).

Parmi les composés réducteurs on note les coumarines ,placer 1g d'échantillon de la plante humide dans un tube à essai, couvrir le tube avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et

mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière ultraviolette la fluorescence des taches confirme la présence des coumarines .

### 2-5-Mise en évidence des alcaloïdes :

Ce test fait pour révéler la présence ou l'absence des alcaloïdes sels. A l'extrait sec, ajouter 5ml d'HCl au résidu et chauffer dans un bain marie .filtrer le mélange et réaliser les tests avec le réactif de Wagner (2gde KI et ,1.27g d'I<sub>2</sub> solubilisé dans 100 ml d'eau distillée) . la présence de turbidité ou de précipitation indique la présence des alcaloïdes sels .

### 3-dosage des flavonoïdes :

1ml de chaque extrait a été ajouté à 1ml de la solution d'AlCl<sub>3</sub> (trichlorure d'aluminium 2%,dans le méthanol),après 10 minutes d'incubation,l'absorbance a été lue à 430 nm.la concentration des flavonoïdes dans les extraits a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage  $y=ax+b$  établie avec la quercétine à différentes concentrations (0-0.40µg/ml,chacune a été préparée dans le méthanol) pratiquée pratiquée dans les memes conditions opératoires que les extraits servira à la quantification des flavonoïdes.la teneur en flavonoïdes a été exprimé en milligrammes équivalents de quercétine par grammes du poids d'extrait (mg EQ/GE) (**137 ,138**).

### 4-dosage des polyphénols totaux :

Le dosage des polyphénols totaux des extraits Des 3 plantes .été effectué selon la méthode de bleu de Prusse (Price and Butler, 1977)(**139**)modifier par oraham(1992) (**140**), Cette technique est basée sur le principe d'oxydation du ferricyanide de potassium (K<sub>3</sub>Fe[CN]<sub>6</sub>) par les polyphénols pour donner les ions ferreux (Fe<sup>2+</sup>) ;ces derniers réagissent avec le chlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>) et donne le complexe bleu de Prusse qui absorbe à 700 nm. Brièvement, 0.1 ml de l'extrait a été ajouté à 3 ml de l'eau distillée. Après agitation, 1 ml du K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>(0.016 M) puis 1 ml du FeCl<sub>3</sub>(0.02 M dans le HCl 0.1N) ont été ajoutés successivement avec un intervalle de temps d'une minute.

Après 15 minutes, 5 ml de la solution stabilisante (contenant 30 ml Gomme Arabique 1 %, 30 ml acide phosphorique 85 % et 90 ml de l'eau distillée) ont été ajoutés et l'absorbance a été lue à 700 nm. La concentration des polyphénols totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (figure 24) (0-200 µg / ml) et exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique par grammes du poids d'extrait (mg EAG / g E) (**139 ,140**) .

**5-DPPH (effet scavenger) :**

L'activité anti-radicalaire des différents extraits des 3 plantes ont été évaluée, *in vitro*, par le test de DPPH. Cette méthode spectrophotométrique utilise le radical DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette comme réactif, qui vire au jaune, en présence de capteurs de radicaux libres, et se réduit en 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazine (Cuendet et al., 1997 (141); Burits and Bucar, 2000 (142)). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm. Pour cela, 50 µl de chacune des différentes concentrations des extraits ont été incubés avec 5 ml d'une solution méthanolique de DPPH à 0.004 %. Après une période d'incubation de 30 minutes, les absorbances à 517 nm ont été enregistrées. Les résultats obtenus pour chaque extrait testé ont été exprimés par rapport à ceux obtenus pour le BHT pris comme antioxydant de référence. Le pourcentage d'inhibition (I %) du radical DPPH par les extraits des 3 plantes ont été calculé comme suit:  $I \% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$

$A_C$ : absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)

$A_E$ : absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon)

La concentration inhibitrice de 50 % de l'activité du DPPH ( $IC_{50}$ ) de chaque extrait a été par la suite calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur. Elle a été exprimée en µg / ml et comparée avec celle du BHT (141,142).

**6.Activité Anti-inflammatoire**

L'activité anti-inflamatoire *in vitro* de l'extrait méthanolique des 3 plantes :MR ;THV ;AG a été effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines. La méthode consiste à préparer quatre solutions.

La solution d'essai ( $T_s$ ) (0,5 ml) composée de 0,45 ml de la solution aqueuse de sérum bovine albumine (SBA) 5 % et 0,05 ml d'extrait aqueux avec une concentration de 250 µg/ml.

La solution control test( $T_c$ ) (0,5 ml) composée de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml d'eau distillé.

La solution contrôle produit( $p_c$ ) (0,5 ml) composée de 0,45 ml d'eau distillé et 0,05 ml d'extrait aqueux avec une concentration de 250 µg/ml .

La solution standard test ( $s_s$ ) (0,5 ml) compose de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml de la solution de standard diclofénac sodium avec une concentration de 250 µg/ml.



Tous les solutions au-dessus ont été ajustée à pH 6,3 par une solution d'HCl (1N), les chantillonsont été incubées à 37 ° C pendant 20 min, ensuite la température était augmenté pour garder leschantillons à 57°cpendant 3 min, après refroidissement des tubes, 2,5ml de la solution phosphate buffer saline « tampon » (pH 6,3)a été ajouté aux solutions ci-dessus, l'absorbance a été lue par le spectrophotomètreUV –visibleà416 nm,et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculée comme suit:

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = 100 - \frac{A_{TS} - A_{pc}}{A_{TC}} \times 100$$

Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées ; et les résultats sont comparé avec le diclofenac sodium ( 250ug/ml)(Ass) (**143, 144 , 145 , 146**) .

**CHAPITRE II :RESULTATS ET DISCUSSION :**

Le présent travail porte sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydants et anti-inflammatoire des extraits aqueux de la partie aérienne des plantes médicinales (fleurs)de *M.recutita*,et( feuilles)de *TH .vulgaris*, et les grains de *Anethum graveolens* .

**I- Le rendement des extraits :**

Les extraits aqueux des trois plantes ont été préparés à partir de la poudre de la partie aérienne de *M.recutita* et *TH.vulgaris* et les grains de *A.graveolens*, le tableau 6 presente le rendement des extraits aqueux des 3 plantes médicinales .

**Tableau 6- Le rendement des extraits aqueux des 3 plantes :**

Le poids du matériel végétal en (g)	Les extraits	Le poids des extraits en (g)	Le rendement en (%)
40	EA MR	4	10
	EA TH V	4.5	11.02
	EA AG	5.3	13.25

La méthode extraction par macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact d'eau avec l'extrait tout en préservant la bio-activité de ses constituants. De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement d'extrait à pression réduite permet d'obtenir le maximum des composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

Le calcul des rendements par rapport au poids sec de la poudre végétale (Tableau6) a montré que l'**EAq AG** représente le rendement le plus élevé (**13.25%**), ensuite l'**EAq THV** avec (**11.02%**), et enfin le rendement de **EAq MR** (**10%**) est le plus faible.

il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie de manière générale. En effet, le rendement n'est pas relatif; il dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. D'autre part, la méthode d'extraction affecte également le contenu total en phénol et flavonoïdes (**147**).

## II- Tests de mise en évidence de certains composés Phytochimiques :

Les tests phytochimiques réalisés sur les extraits aqueux des trois plants révèlent la présence de plusieurs familles de composés dont les résultats sont présentés dans le tableau 7.

**Tableau 7 : Analyse phytochimique préliminaire d'extraits aqueux de *Matricaria recutita*, *thymus vulgaris* *anethum graveolens* :**

Composés	EA MR	EA THV	EAAG
<b>Tanins</b>	+ Apparition d'une coloration bleue noire et un précipité après 3min	+ ++ Apparition d'une coloration bleue noire et un précipité après 3min	+ ++ Apparition d'une coloration bleue noire et un précipité après 3min
<b>Saponosides( test 1,et 2)</b>	+	+++	+++
<b>Flavonoïdes</b>	+++ Apparition d'une couleur jaune	++ Apparition d'une couleur jaune	++ Apparition d'une couleur jaune
<b>Composés réducteurs</b>	+++ Apparition de deux phases, une colorée en brun rouge et la deuxième en bleu-vert.	.+ ++ Apparition de deux phases, une colorée en brun rouge et la deuxième en bleu-vert	.+ + Apparition de deux phases, une colorée en brun rouge et la deuxième en bleu-vert
<b>Coumarines</b>	+ +	- - - Résultat négatif	- - - Résultat négatif
<b>Alcaloïdes sels</b>	+ + Résultat positif avec le réactif de Wagner (présence de turbidité)	- - - Résultat négatif	+ + Résultat positif avec le réactif de Wagner (présence de turbidité)

Les résultats sont interprétés comme suit: (+) Réaction positive, (±) Trace, (-) Réactions négatives.

L'étude phytochimique et d'ET a montré que **EAMR** contiens : des flavonoïdes, des saponosides, des tanins, des coumarines, des composés réducteurs, et des alcaloïdes sels. Ce qui confirme les travaux de(18), La richesse de ce extrait en composés chimiques actifs

pourrait expliquer leurs utilisation traditionnelle pour soigner de nombreuses maladies telles que: la Fièvre, contre les infections, Antispasmodique, Ce qui confirme les travaux de(*Jarrahi M, Vafaei AA, Taherian AA, Miladi H, Rashidi 2008*)(18) .

-**EATHV** riche en : flavonoïdes , des tanins, des des composés réducteurs ; des composés réducteurs,et pauvre en alcaloïdes sels , et en coumarines Ce qui confirme les travaux de(*Hohmann B., Reher G., Stalh-Biskup E2004*) (24) qui a été révélé l'absence de coumarines,mais il a montré qu'il ya une faible quantité d'alcaloïdes .

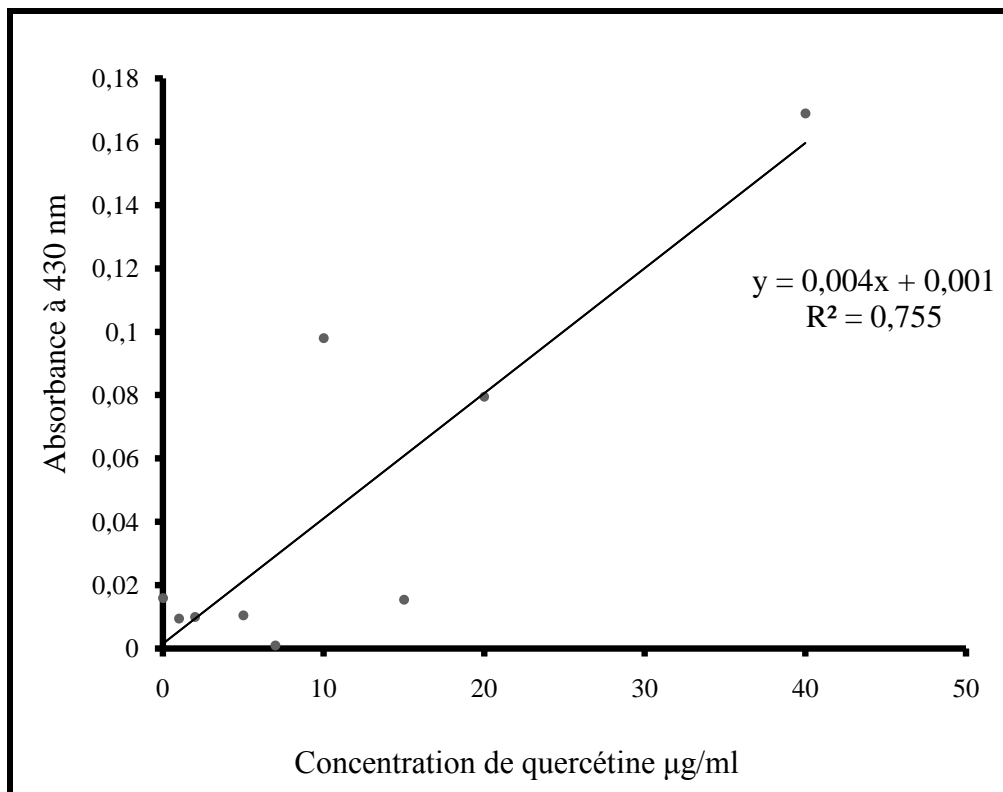
-**EAAG** contiens : flavonoïdes , des tanins, des des composés réducteurs , des alcaloïdes et pauvre en coumarines. Ce qui confirme les travaux de(*Bahramikia S, Yazdanparast R 2009*)(37) qui a montré l'absence des coumarines .

### III- Dosage des polyphénols et des flavonoïdes :

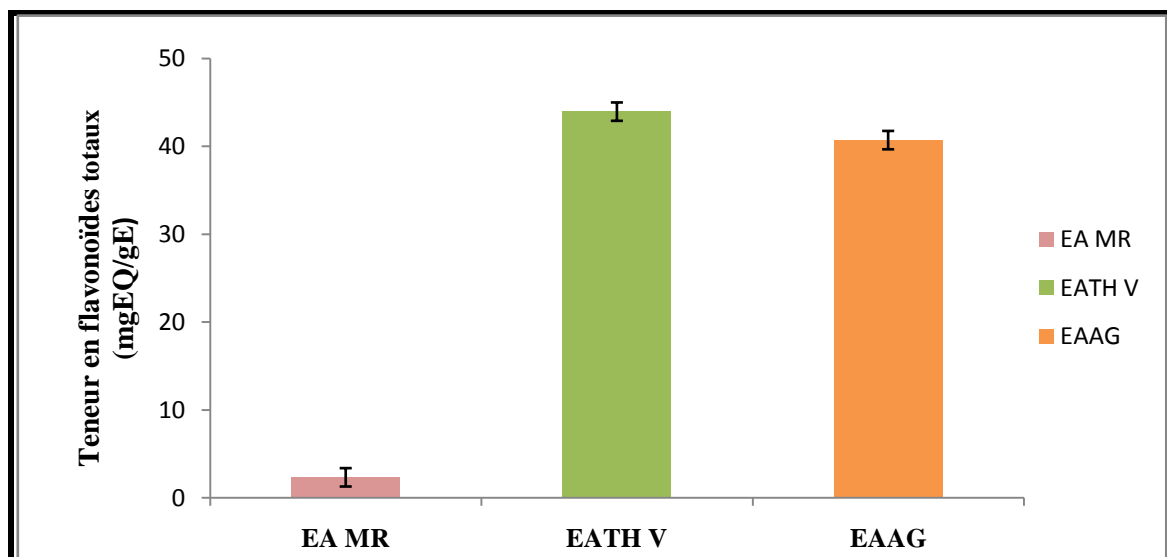
Les composés phénoliques (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (148) . Et comme la majorité des effets pharmacologiques des plantes est dû à ces substances, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes des extraits a été effectué pour en estimer les teneurs.

#### III-1- Dosage des flavonoïdes :

L'étude quantitative des extrait aqueux au moyen des dosages spectrophotométriques, selon la méthode de trichlorure d'aluminium  $AlCl_3$  avaient pour objectif la détermination de la teneur totale des flavonoïdes. Une courbe d'étalonnage (Figure22) a été tracée pour cet objectif, établie avec la quercétine à différentes concentration. Des mesures de densité pour chaque fraction réalisées à 430 nm. Les quantités des flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en équivalent milligramme de quercétine par gramme d'extrait (Figure23) et déterminés par l'équation de type:  $y=a x + b$



**Figure 22 - Courbes d'étalonnage de la quercétine**  
Chaque point de la courbe représente la moyenne (n = 3)



Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n = 3).

**Figure 23- Teneur en flavonoïdes totaux (mgEQ/gE)**

Suivant la figure ci-dessus, les teneurs en flavonoïdes, exprimés en mg équivalent quercétine par g extrait sont:

**43,95mgEQ/gE, 40,70 mgEQ/gE et 2,33 mgEQ/gE**, respectivement avec les extraits **EATH ; EAAG et EAMR**.

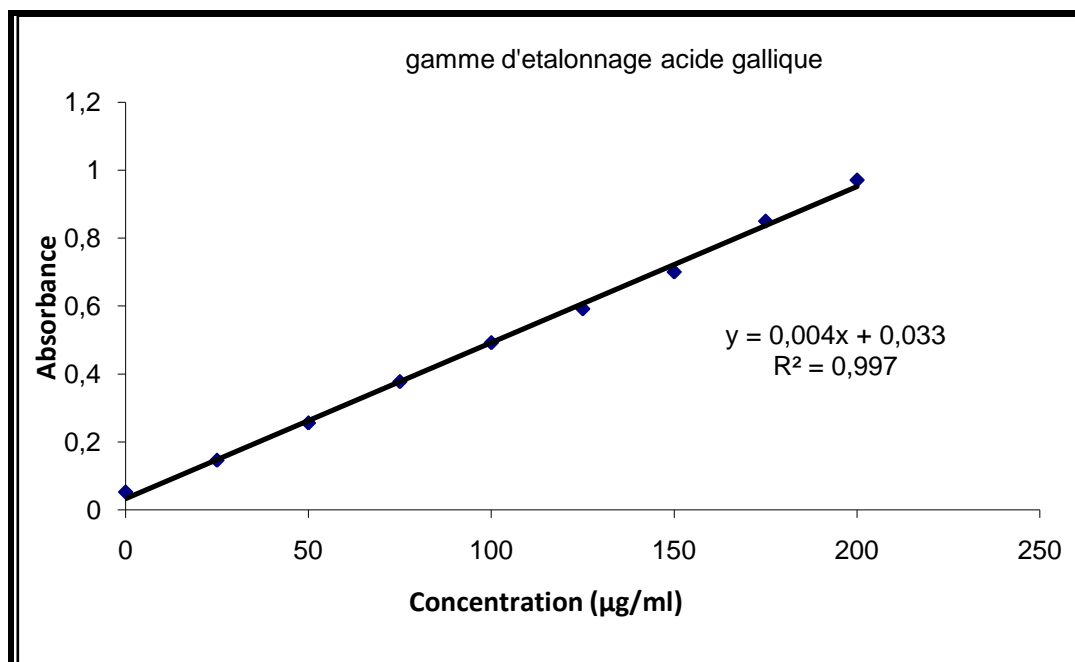
**EATHV** représente la teneur la plus élevée **43,95mgEQ/gE** parmi les 3 plantes étudiées, les travaux de (24) montre que l'EATHV a une teneur de **56,13 mgEQ/gE** ce qui est plus élevé que le résultat obtenu qu'on peut le expliquer par les différences entre les matériels et les produits utilisés.

**EAAG** représente la teneur **40,70 mgEQ/gE** est proche de celle de (37) avec une teneur de **43,63 mgEQ/gE**

tandis que La teneur la plus basse a été obtenue avec l'extrait **EAMR** avec une teneur de **2,33 mgEQ/gE** qui est plus bas que les résultats des travaux de (18) **6,19 mgEQ/gE**.

### III-2- Dosage des composés phénoliques totaux :

La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y=ax$ ) réalisé par une solution étalon (l'acide gallique) à différentes concentrations.



**Figure 24 - Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.** Chaque point de la courbe représente la moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ).

Les polyphénols totaux dans ce extrait sont dosés selon la méthode de bleu de Prusse modifiée par Graham H.D. (1992) (140).

La teneur en composés phénoliques d'extrait a été calculer à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalent en acide gallique par 100 gramme de la matière

sèche, la mesure de la densité optique a été effectuée à la longueur d'onde de 760 nm. Les résultats obtenus sont présentés dans le graphe suivant :

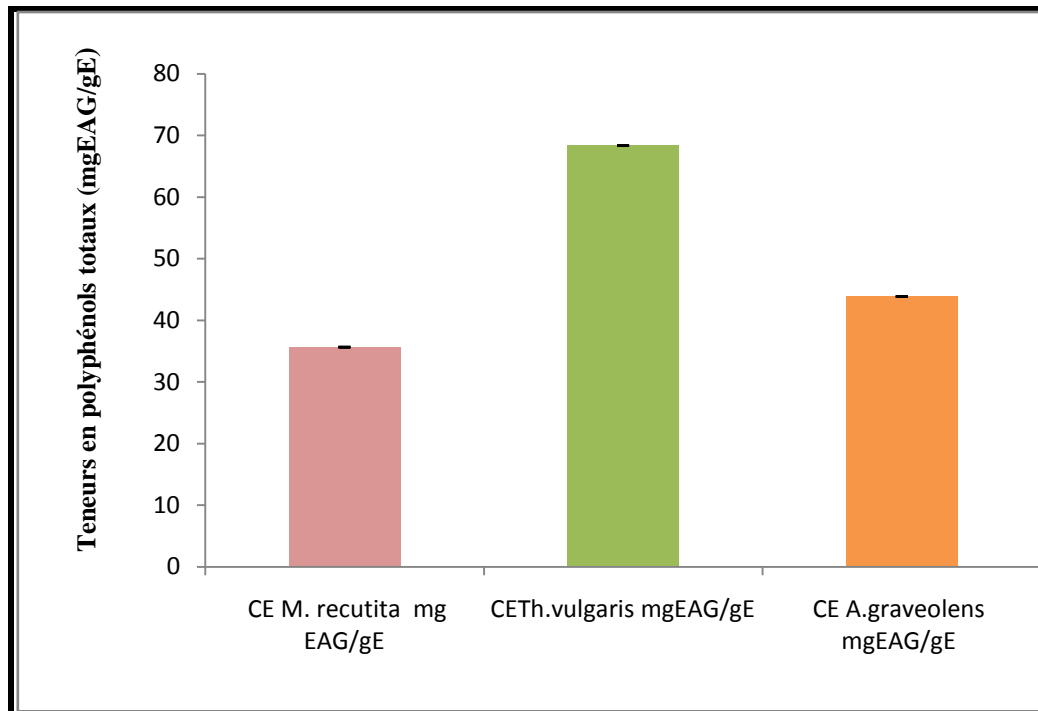


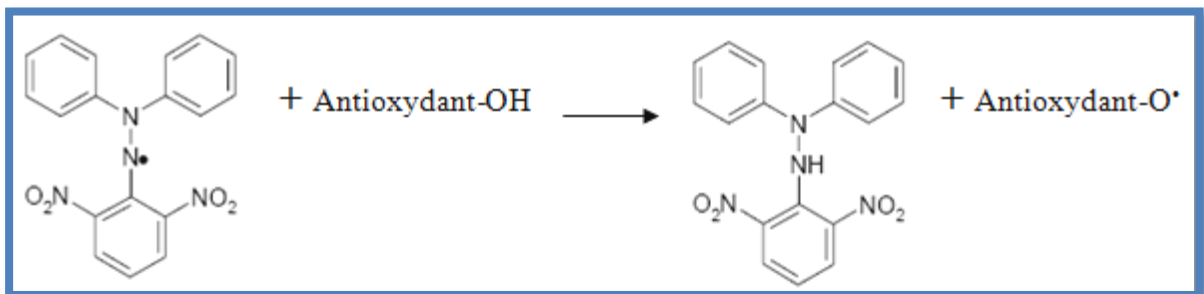
Figure 25 -Teneurs en polyphénols totaux (mgEAG/gE)

On peut remarquer, d'après les résultats des phénols totaux des différents extraits (fig 25) que l'extrait aqueux de *T. vulgaris* est celui qui en contient le taux le plus élevé avec **68,35± 0,086 mg** (milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche) **EAG/ gE** ce qui est très proche des travaux de (21) qui a étudié l'espèce *thymus polytrichus* avec une teneur de **71 ,23±0,0072 mg EAG/ gE** . suivi par l'E *A. graveolens* (**43,86± 0.010 mg EAG/g E**) et enfin l'E *M. recutita* qui contient **35,64 ± 0,0034 mg EAG/gE** de polyphénols trouvée. L'examen de ces résultats permet de mettre en évidence une corrélation entre la teneur des extraits en flavonoïdes et en composés phénoliques. Ceci est logique étant donné que les flavonoïdes représentent les composés majoritaires des polyphénols. , le système  $FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$  confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semiquantitative » des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction rédox (148,149) .Le pouvoir réducteur des extraits des plantes sont des doses dépendantes (concentrations dépendantes). Le pouvoir réducteur des l'espèces étudié est probablement dû à la présence de groupement ,hydroxyle(OH-) dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (150). Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (151,152) .

#### IV-TESTS, *IN VITRO*, DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE :

##### IV-1 - Détermination de l'activité anti-radicalaire des extraits aqueux par la méthode de DPPH (effet scavenger) .

L'activité antioxydante des différents extraits d' *vis-à-vis* du radical DPPH à été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm (**Figure 26**) la cinétique de décoloration de ce radicale a été suivie après addition de 50 µl de chacune des concentrations d' extrait **EATHV ;EAMR** et **EAAG**.



Diphénylpicrylhydrazyl DPPH (violet)

Diphénylpicrylhydrazine DPPH-H (jaune)

Figure 26 - Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH .

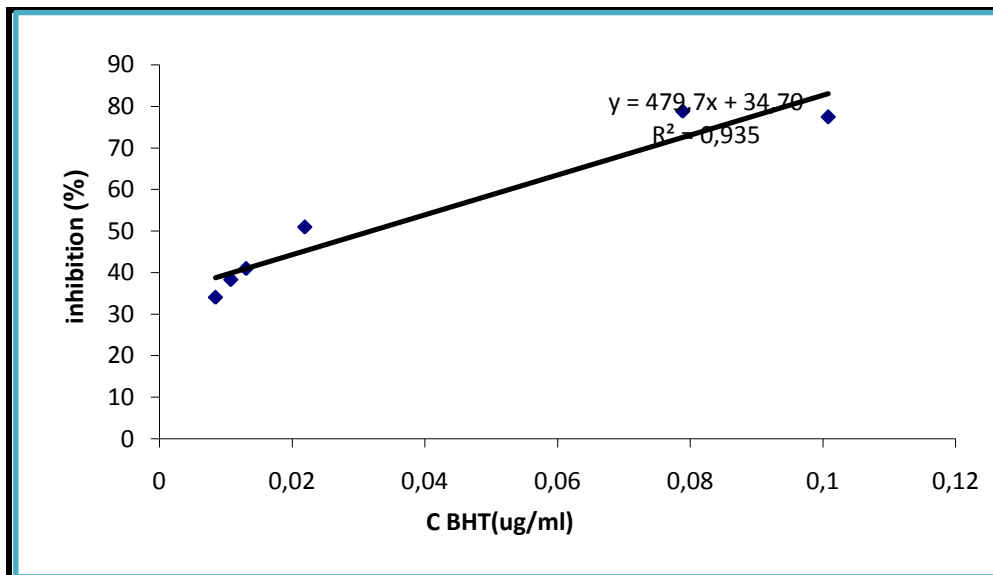


Figure 27 - pourcentage d'inhibition de BHT .



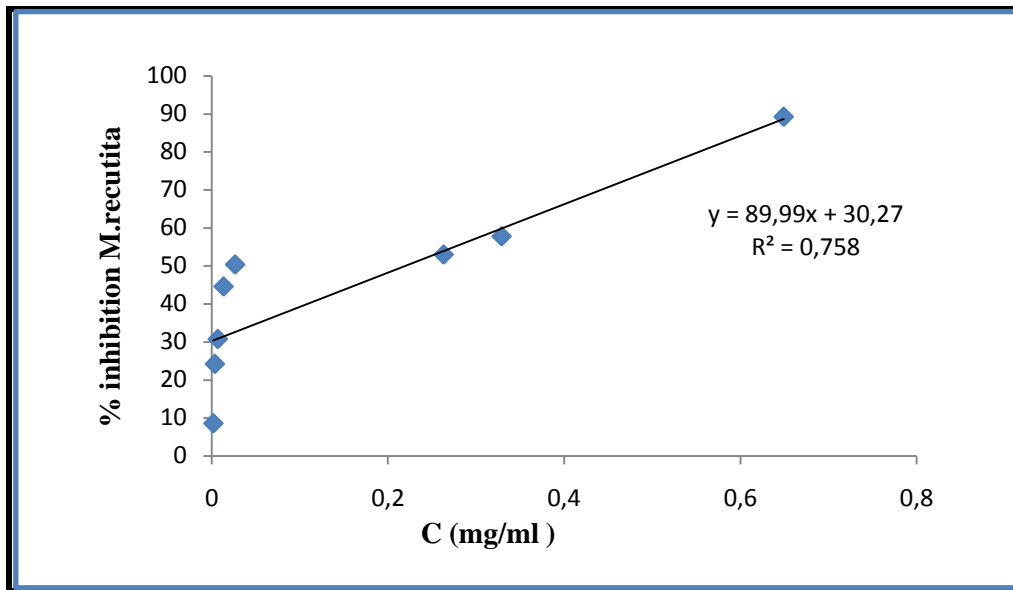


Figure 28 - pourcentage d'inhibition de l' extrait aqueux de Quercétine de *Matricaria recutita*.

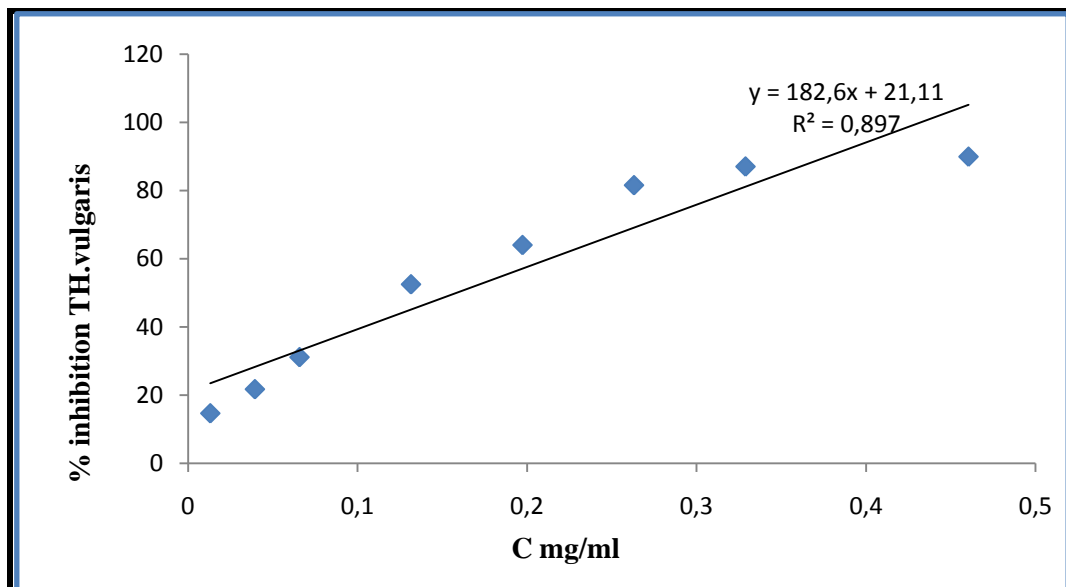


Figure 29 : pourcentage d'inhibition de l' extrait aqueux de Quercétine de *Thymus vulgaris*.

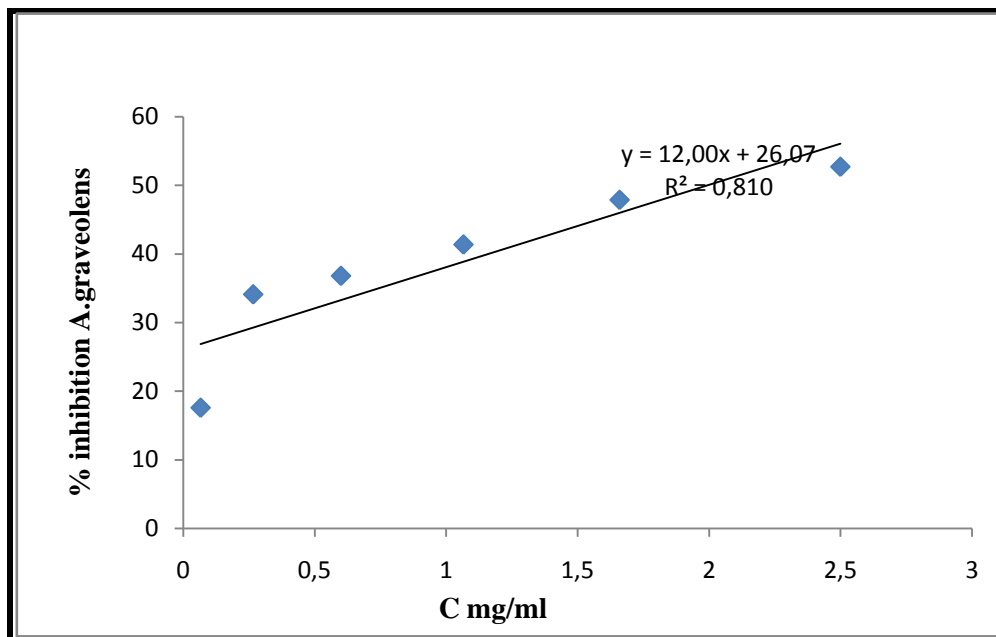


Figure 30: pourcentage d'inhibition de l' extrait aqueux de Quercétine *Anethum graveolens*.

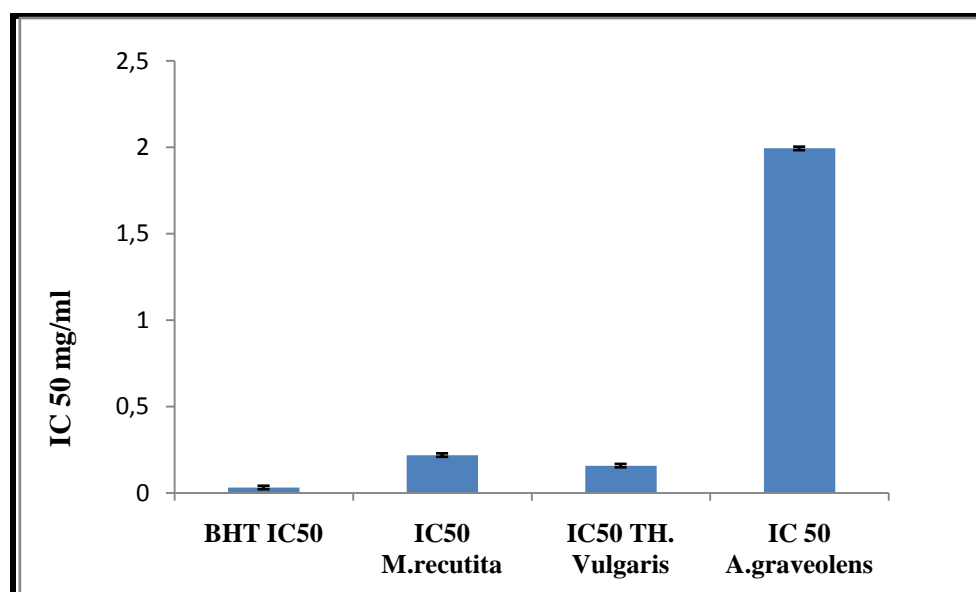


Figure 31 -Graphe : La concentration des trois extraits et de BHT qui inhibent 50 % du radical DPPH . Les valeurs représentent la moyenne de trois essais  $\pm$  SD

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus (Fig31) révèlent que les extraits de possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante, les concentrations d'extraits et standards qui piègent 50 % du radical DPPH (IC50) graphe(fig 31) . C'est un paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydante. Plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est très

élevé (153,154 ,155) ; l'espece *T.vulgaris* possède l'effet scavenger le plus puissant parmi les trois extraits ( $p < 0.001$ ) avec une valeur de  $IC_{50} = 0,158214 \pm 0,0009$  mg / ml, suivi par L'espece *M.recutita* ( $IC_{50}$  de  $0,219235 \pm 0,0006$  mg / ml), et enfin l'Espece *A.graveolens* qui est le plus faible parmi ces extraits avec une  $IC_{50}$  d'environ  $1,99416 \pm 0,01$  mg / ml. Comparant avec le BHT , les extraits (EATHV, EAMR,EAAG ) ont un effet scavenger inférieur de 5,27 ,7,30 et enfin 66 ,47 fois respectivement. Le radical DPPH est souvent utilisé comme un indicateur pour tester la capacité de l'extrait à donner un atome d'hydrogène ou un électron et donc l'activité antioxydante. Il a été trouvé que l'acide ascorbique, l'á-tocophérol, les tannins et les flavonoïdes provoquent la réduction et la décoloration du radical libre diphénylpicrylhydrazyl (DPPH) en lui donnant un hydrogène pour former le diphénylpicrylhydrazine(DPPHH )(Figure 31) (141,142).

**Tableau 8: Les concentrations des composés phénoliques qui inhibent 50 % du radical DPPH.**

Echantillons	IC50(ug/ml)
Rutine	4,25 ±0,18
Qercitine	3,22±0,029
Acide gallique	0,58±0,01

L'activité anti-radicalaire des extraits est donc relativement dépendante de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes. Par exemple l'EATHV, qui représente la fraction la plus riche en polyphénols, possède l'effet scavenger le plus puissant par rapport aux autres extraits. (figure 31 ).

Les composés phénoliques (acide gallique, quercétine et rutine) **Tableau 8** possèdent une activité anti-radicalaire très élevée et supérieure à celle du BHT. Le plus actif est l'acide gallique avec une  $IC_{50}$  d'environ  $0.58 \pm 0.01$   $\mu$ g / ml, ensuite la quercétine et la rutine qui ont des  $IC_{50}$  de  $3.22 \pm 0.029$  et  $4.25 \pm 0.18$   $\mu$ g / ml, respectivement , Les résultats du présent travail sont relativement en accord avec les études suivantes :( *Kobayashi Y, Takahashi R, 2005*)(17) ont montré que l'effet scavenger des extraits méthanoliques de 2 especes du genre *matricaria* sur le radical DPPH est en ordre suivant: *M. aurea* (76,34±4,8%) <acide ascorbique (77.75 %) .*M. chamomilla* (68.18± 3,1 %) < BHT (72.20 %) ,( *Bouhdid S., Idaomar, M. ; Zhiri, A.; Bouhdid, (2006)* (21) ont montré que l'effet scavenger des extraits méthanolique de l'espece *thymus vulgaris* sur le radical DPPH est : 73,42±9,5%> BHT (70.2 %) ,( *Bahramikia S, Yazdanparast R(2009)*( 37) , ont montré que l'effet scavenger des

extraits méthanolique de l'espece anethum graveolens  $60,88 \pm 9,09\%$  <BHT (72.20 %) , Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant (156,157) ; Quelques composés se réagissent très vite avec le DPPH en réduisant un nombre de molécules de DPPH égal à celui des groupements hydroxyles de L'effet scavenger des flavonoïdes sur les radicaux libres dépend de la présence des groupements OH libres(158), en particulier 3-OH, avec une configuration 3',4'-rthodihydroxy (159) . Le nombre et/ ou la position des groupes hydroxyle sur les noyaux de ces molécules, les substitutions sur les cycles B et A avec la présence de la double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C renforcent l'activité antioxydante des flavonoides ce qui est montré dans la Figure 32 (159).

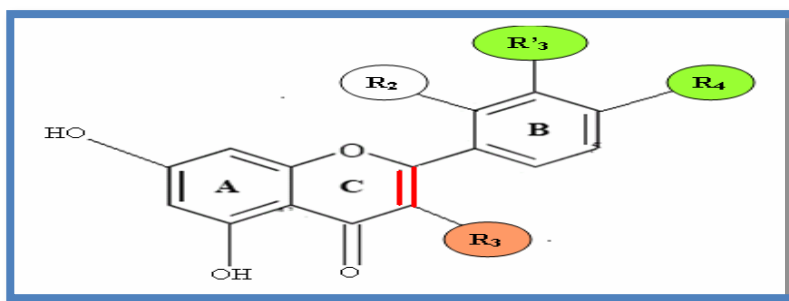


Figure 32 - Principaux éléments de l'activité antioxydante des flavonoïdes.

#### V- Activité anti-inflammatoire in vitro :

Le tableau 9 montre les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits Aqueux de *T.vulgaris* , *M.recutita* et de *A.graveolens* qui consiste à évaluer les pourcentages

Tableau 9- Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA à la concentration

De 250 µg/ml :

Les Echantillons	% d'inhibition de la dénaturation des protéines
Diclofenac sodium 250 µg/ml	90.66±3.3%
EAMR250 µg/ml	69,14±4,8%
EATHV250 µg/ml	66,12±12,5%
EAAG250 µg/ml	55,12±9,97%

D'après les résultats du tableau, les trois extraits étudiés inhibent la dénaturation de BSA à la concentration de 250 µg/ml. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation est de **69,14±4,8 %**; **66,12±12,5%** Et **55,12±9,97%** Respectivement pour l'EAMR ; EATHV et EAAG. avec une différence de **21.52%** (EAMR); **24.54%**(EATHV) ;**33 .54%**(EAAG) ; Lorsque on le compare à ceux obtenus pour le diclofenac sodium, un médicament anti-inflammatoire utilisé comme standard qui exercé un pourcentage d'inhibition de **90.66±3.3%** a la même concentration., La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation (**160,161,162**) .

La production d'auto-antigènes dans les maladies inflammatoires peut être due à la dénaturation des protéines *in vivo*. Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à l'altération des liaisons électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintien la structure tridimensionnelle des protéines (**161,162,**) .

Il est prouvé que les anti-inflammatoires non stéroïdiens comme le phenylbutazone et L'indomethazine inhibent pas seulement la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires, mais inhibent aussi la dénaturation des protéines(**162**) .

D'après les résultats, on constate que les trois extraits sont capables de contrôlé la production d'auto-antigène par l'inhibition de la dénaturation des protéines. L'activité inhibitrice de la dénaturation de BSA est peut être attribuée a la présence de différents composés bioactifs tels que les flavonoïdes et les tannins dans les trois extraits trouvés lors des criblages phytochimiques. De nombreuses études ont évalué l'effet inhibiteur de différents extraits de plantes sur l'activité anti-inflammatoire *in vitro* par la méthode de la dénaturation des protéines (**162,163**).

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES :

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie.

Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires. Les extraits naturels issus des plantes contiennent une variété de composés phénoliques et des huiles essentielles auxquelles on attribue des capacités antioxydantes et anti-inflammatoires..

L'objectif primordial assigné par cette étude englobe le même contexte afin d'évaluer les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoire des extraits brut aqueux de fleurs de *Matricaria recutita*, les feuilles de *Thymus vulgaris* et des grains de *Anethum graveolens*, plantes largement utilisées en médecine traditionnelle à travers le monde.

La détermination des rendements en extraits bruts a montré une rentabilité importante en extraits polaires ( Aq) chez les trois espèces de plantes allant de 10% ,11.02% , 13.25 %, l'extrait Aq de *Matricaria recutita* a le plus faible rendement avec 10%.

Ces molécules naturelles de nature phénolique sont très recherchées en phytothérapie vue les effets secondaires des médicaments et les séquelles néfastes des antioxydants de synthèse à savoir le BHA et le BHT.

Dans la première partie, la quantification par des méthodes spectrophotométriques nous a permis de déterminer les teneurs en phénols totaux par la méthode de bleu de Prusse (Price and Butler, 1977) modifiée par Graham (1992) , en flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium. Et Les résultats obtenus nous ont révélé que les plantes riches en polyphénols et en flavonoides avec un teneur de; **71 ,23±0,0072 mg EAG/gE** **43,95mgEQ/gE** pour *T.vulgaris* ,et de **43,86± 0.010 mg EAG/g E** ; **40,70 mgEQ/gE**pour *A.graveolens*,et enfin **35,64 ± 0,0034 mg EAG/gE**(moyenne) ; **2,33 mgEQ/gE**(faible) pour *M.recutita*

Dans la deuxième partie, nous sommes intéressés par l'étude des propriétés Antioxydantes et anti inflammatoire par deux techniques .

Le potentiel antioxydant a été confirmé par les méthodes non enzymatiques. L'EATHV, EAMR, EAAG.

EAMR, EATHV, EAAG possèdent un effet scavenger sur le radical DPPH élevé, et les études de l'activité anti-inflammatoire in vitro effectuées selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines présentent un pourcentage d'inhibition de  $69,14 \pm 4,8\%$  ;  $66,12 \pm 12,5\%$  ;  $55,12 \pm 9,97\%$  respectivement.

Ces propriétés sont en corrélation avec la teneur en phénols totaux, plus particulièrement les flavonoïdes, et de tous les résultats obtenus, nous avons déduit que l'extrait aqueux des plantes EATHV (feuilles), EAMR (fleurs), EAAG (grains) présente une activité antioxydante et anti-inflammatoire qui pourrait être utilisée dans le domaine pharmaceutique. Pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées : élargir le panel des activités antioxydantes in vitro et in vivo et pourquoi pas d'autres tests biologiques : antitumorale, anticancéreuse et anti-analgésique. Caractériser et isoler les principes actifs responsables de ces propriétés pharmacologiques.

## Resumé :

Les composés antioxydants font l'objet de nombreux travaux car, en plus de leur utilisation comme des conservateurs dans les denrées alimentaires en remplaçant les antioxydants de synthèse, ils interviennent dans le traitement de nombreuses maladies. Dans le cadre de la découverte de nouveaux antioxydants à partir des sources naturelles, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude des composés phénoliques et l'évaluation des propriétés antioxydants et anti-inflammatoire d'extrait aqueux des plantes médicinales Algériennes *matricaria recutita* ; *thymus vulgaris* ; *anethum graveolens*.

La première partie de cette étude concerne l'extraction et la quantification des phénols totaux et des flavonoïdes selon la méthode de bleu de Prusse ,et le trichlorure d'aluminium respectivement. Les résultats obtenus ont montré la teneur de **matricaria recutita**, **thymus vulgaris** ; et **anethum graveolens** ,des composés phénoliques et le contenus des flavonoïdes est moyenne pour **MR** ; bon pour **THV** ; ET **AG** .et pour La deuxième partie est l'étude de l'activité antinflammatoire activité d'extraits des plantes en utilisant deux techniques: DPPH (effet scavenger) et l'inhibition de la dénaturation des protéines .

La méthode évaluation d' activité antioxydante d' **EAMR** ;**EATHV** ;**EAAG** contre le radical DPPH •montre une bonne puissance comparés avec le BHT Et des pourcentages d'inhibition de la dénaturation des protéines monte une bonne activité antiinflammatoire.

LES résultats obtenus suggèrent que ces plantes peuvent être utilisés pour traiter les maladies et l'inflammation qui nécessitent le piégeage des radicaux libres.

**Mots clés :** *matricaria recutita* .*thymus vulgaris*.*anethum graveolens* ,activité antioxydant , radicaux libres , polyphénols et flavonoïdes , inflammation DPPH.



## Abstract

The antioxidant compounds are the subject of many works because, in addition to their use as conservatives in the foodstuffs by replacing synthesis antioxidants, they intervene in the treatment of many diseases. Within the framework of discovered new antioxidants from the natural sources, we have investigated in this work, the study of phenolic compounds and the evaluation of the antioxidant and antiinflammatory properties of *thymus vulgaris*, *matricaria recutita*, *anethum graveolens* aqueuses extracts.

The first part of this study concerns the extraction and the quantification of total phenolics and flavonoids, by bleu of Prusse and the aluminium trichloride respectively. The results obtained showed the richness of thymus vulgaris, and anethum graveolens and a middle result of matricaria recutita.

The second part is the study of the antioxidant and antiinflammatory activity of the plant extract using two techniques: DPPH radical scavenging and inhibition of proteines dénaturation methode.

The antioxidant activity methods showed that *THV*, *AG*, *MR* have a effect scavenging of radicals (DPPH•) and, compared to BHT. And inhibition of protein denaturation. These results suggest that this plants can be used to treat diseases and inflammation that require the scavenging of free radical.

### Keywords:

*matricaria recutita*, *thymus vulgaris*, *anethum graveolens*, activité antioxydant, radicaux libres, polyphénols, flavonoïdes, inflammation, DPPH.

## الملخص

تظل المركبات المضادة للأكسدة هي موضوع العديد من الدراسات العلمية ، بالإضافة إلى استخدامها كمادة حافظة للأغذية فإنها تستعمل في علاج الكثير من الأمراض و منذ اكتشاف إمكانية استبدال المواد المضادة للأكسدة الاصطناعية في مواد مضادة للأكسدة جديدة من مصادر طبيعية و في إطار البحث عن مضادات للتأكسد جديدة نحن مهتمون في هذا العمل بدراسة المركبات الفينولية وتقييم خصائص مضادة للأكسدة و المضادة للالتهابات من المستخلصات المائية للنباتات الجزائرية *thymus vulgaris* (الزعتر) *matricaria recutita* (بابونج) *anethum graveolens* (الشبت).

أولا الجزء الأول من هذه الدراسة تتعلق استخلاص وتقدير كل من الفينولات والفلافونيدات وفقا لطريقة الأزرقو ثلاثي البروسي و تقنية كلوريد الألومنيوم على التوالي أظهرت النتائج ثراء النبتة الطبية الزعتر و النبتة الطبية الشبت بالمركبات الفينولية أما النبتة الطبية البابونج فتحوي كمية متوسطة.

أما الجزء الثاني من هذه الدراسة فتمثل في تقدير النشاط الضد الالتهابي و ضد تاكسد لنبات وتثبيط البروتينات هذا وبينت.

**نتائج هذه الدراسة:** إن المستخلصات النباتية تستطيع تثبيط جذر DPPH

و من خلال هذه النتائج فان لهذه النبتات خصائص مضادة للأكسدة و مضادة للالتهاب يمكن

استغلالها لعلاج الكثير من الأمراض خاصة التي ينتج عنها تحرير الجذور الحرة.

# LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

## Les Références Bibliographiques :

**1-Majinda R.R.T., Abegaz B.M., Bezabih M. et autres (2001)** Resent resultants from naturel product rescarch at the university of Botswana, *Pure. Appl. Chem.* **73** (7) : 1197-1208.

**2-Mau J-L. Huang P-n. Huang S-J. and C-C. (2004)** Antioxydant properties of methanolic extracts from two kinds of Antrodia camphorata mycelia. *Food Chemistry.* **86** : 25-31.

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

**4- Quezel p., Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et méridionales, Tome II, Ed. CNRS, Paris, 590-593

**5- Collin F., 2007.** Identifier les fleurs du Maroc Atlantique par leurs couleurs, 59.  
**6-Achille R.,1980.** Botanique médicale, 4ème Ed. Paris: l'imprimerie de Rignoux,321

**7-Kambouche N., Merah B., Bellahouel S., Bouayed J., Dicko A., Derdour A.,Younos C., Soulimani R.,2008.** Chemical composition and antioxidant potential of RutamontanaL. essential oil from Algeria. *Journal of Medicinal Food*, **11**(3) : 593-595

**8-Claisse R., 1993.** Plante à usage dermatologique de la pharmacopée traditionnelle marocaine. *Médicaments et aliments : l'approche ethnopharmacologique*, **24**(27) : 172-173.

**9- Kechkar M., 2008.** Extraction de la Silymarineet étude de son activité antimicrobienne, mémoire de magister en microbiologie appliquée, université Mentouri Constantine, 30-36.

**10-Sablonnière B., 2002.** Biologie microbiologie. Ellipses, Paris, 270-273.

**11-Meyer A., Deiana J., Bernard A., 2004.** Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2èmeEd. Biosciences et techniques, doin, 217-247.

**12-Upton A., 2006.** Les produits antimicrobiens à domicile. Le problème de l'antibiorésistance. *Énoncé de la SCP*, **11**(3) : 177-181.

**13-Allion A., 2004.** Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides, thèse de doctorat en sciences alimentaires. Ecole nationale supérieure des industries agricoles et alimentaires, 22-28.

**14-Milane H., 2004.** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques, thèse de doctorat en Pharmacochimie. Université de Louis Pasteur Strasbourg, 22.

## LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 15- Cemek M, Kağa S, Simşek N, Büyükokuroğlu ME, Konuk M. 2008** Antihyperglycemic and antioxidative potential of *Matricaria chamomilla* L. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nat Med (Tokyo)*.; 62(3):284-93.
- 16-Srivastava JK, Gupta S. 2007.** Antiproliferative and apoptotic effects of chamomile extract in various human cancer cells. *J Agric Food Chem.*; 55(23):9470-8.
- 17- Kobayashi Y, Takahashi R, 2005.** Ogino F Antipruritic effect of the single oral administration of German chamomile flower extract and its combined effect with antiallergic agents in ddY mice. *J Ethnopharmacol*; 101(1-3):308-12.
- 18- Jarrahi M, Vafaei AA, Taherian AA, Miladi H, Rashidi Pour A, 2008.** Evaluation of topical *Matricaria chamomilla* extracts activity on linear incisional woundhealing in albino rats. *Nat Prod Res.*; 22(14):1197-202.
- 19- Weiss, Fintelmann, 2000** «Herbal Medicine», second edition revised and expanded,.
- 20- Jean, Harvey Wickeman, 2007** « The Eclectic Materia Medica, Pharmacologand Therapeutics »,.
- 21-Bouhdid S., Idaomar, M. ; Zhiri, A.; Bouhdid, D.; Skali, N. S. ; Abrini, J. (2006)** Thymus essential oils:chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. *Biochimie, Substances Naturelles et environnement, Congrès Intrntional de biochimies, Agadir.* 324-327.
- 22-Balladin D.A; Headley, O. (2006).** Evaluation of solar dried thyme (*Thymus vulgaris* Linné) herlos. *Renewable Energy.* **17**: 523-531.
- 23- World Health Organization ;** Library Cataloging in Publication Data, WHO monographs on selected medicinal plants – VOL. 1, World Health organization 1999.
- 24- Hohmann B., Reher G., Stalh-Biskup E. ;** Mikroskopische Drogenmonographien der deutschsprachigen Arzneibücher, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2004.
- 24- Les études expérimentales de la ulcérprotective effet de thymus vulgaris (la trad de l'auteur).** *Planta Med* 1979; 35:218-227.
- 25- Hormann H, Korting H.** La preuve de l'efficacité 10.et la sécurité des médicaments à base de plantes d'actualité en dermatologie:partie 1:. des agents anti-inflammatoires *Phytothérapie*1994; 1:161-170.
- 26- D' Jean Valnet ;** Aromathérapie - Traitement des maladies par les essences des plantes, Le livre de poche (ISBN 2-253-03564-5.
- 27- Christopher Grey-Wilson** LES FLEURS SAUVAGES *le guide visuel de plus de 500 espèces de fleurs d'Europe tempérée*; BORDAS (thymus polytrichus p. 209).

## LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 28- Lambinon J., Delvosalle L., Duvigneaud J.,** Nouvelle flore de la Belgique, du Grand-Duché de Luxembourg, du Nord de la France et des Régions voisines, Édition du Jardin botanique national de Belgique, 2004, cinquième édition.
- 29- ochrman mann B., Robert G., jean-Biskup E. ;** Mikroskopische Drogenmonographien der deutschsprachigen Arzneibücher, missenschaftlicee rerlagsgesellschaft, 2002
- 30- EGK-Caisse de Santé |** Connaissance des herbes, série de Brigitte Speck, Ursula & Christian Fotsch .
- 31- Hajhashemi V, Abbasi N:**Hypolipidemic activity of anethum graveolens in rats. *Phytotherapy Research* 2008, 22:372–375.
- 32- Kohen R., Nyska A. (2002)** Oxidation of biological systems: anethum graveolens. Oxidative stress phenomena, antioxidants, r. *Toxicolo Pathol.* **30**: 620-650.
- 33- Harikrishna D., Appa Rao A. V. N., Prabhakar M. C. (2004)** Pharmacological investigation of *A. graveolens*. *Indian. J. Pharmacol.* **36** : 244-250.
- 34- Friedman M., Henika P. R., Mandrell R. E. (2002)** Bactericidal activities of plant essential oils of *A. graveolens* . *J. Food Prot.* **65** : 1545-1560.
- 35- Fiorini C., David B., Fourastét I., Vercauteren J. (1998)** Acylated Kaempferol glycosides from *A. graveolens* , *J. Photochemistry.* **47 (5)** : 821-824.
- 36- Arbabi SB, TaheriE BH, Ziarati P(2011):**Safety evaluation of oral anethumgraveolens L total hydroalcoholic extract in mice. *Journal of Pharmaceutical & Health Sciences*, 1(2):6–67
- 37- . Bahramikia S, Yazdanparast R(2009)** Efficacy of different fractions of anethum graveolens leaves on serum lipoproteins and serum and liver oxidative status in experimentally induced hypercholesterolaemic rat models. *Am J Chin Med*, 37(4): 685 –699.
- 38- Callan; W., Johnson, D. L., Westcott, M. P. & Weity, L. E. 2007.** Herb and oil composition of dill (*Anethum graveolens*L): effects of crop maturity and plant density. *Ind. Crops Products*, 25, 282–287
- 39- Vera, R.R., Chane-Ming, J. 1998.** Chemical composition of essential oil of dill (*Anethum graveolens*L.) growing in Reun-ion Island. *Journal of Essential Oil Research*, 10: 539-542
- 40- Jovanovic S.V., Steenken S., Simic M.G., Hara Y. (1998)** Antioxidant properties of flavonoids. *AHDIEQ Journal.* **7** : 137-161.

## LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 41- *Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K. et autre (1998)* Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.*
- 42- *Brown J. E., Khodr H., Hider R. C., Rice-Evans C. (1998)* Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions. *Biochem. J.* **330** : 1173-1178
- 43- *Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S. (1994)* The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* **16**: 845-850
- 44- *Van Acker S.A.B.E., van den Berg D.J., Tromp M.N.J.L., et al. (1996)* Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* **20**: 331-342.
- 45- *Middleton E. J. (1998)* Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv. Exp. Med. Biol.* **439**: 175-182.
- 46- *Middleton E. J. (1998)* Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv. Exp. Med. Biol.* **439**: 175-182.
- 47- *Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S. (1994)* The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* **16**: 845-850
- 48- *Middleton E. J. (1998)* Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv. Exp. Med. Biol.* **439**: 175-182.
- 49- *Laughton M. J., Evans P.J., Moroney M. A. et autre (1991)* Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Biochem. Pharmacol.* **42** : 1673-1681.
- 50- *Dacosta, Y. (2003)* Les phytonutriments bioactifs. *Ed Yves Dacosta. Paris.* 317 p.
- 51- *Middleton E. J. (1998)* Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv. Exp. Med. Biol.* **439**: 175-182.
- 52- *Bruneton, J. (1999)*. Pharmacognosie, phytochimie, plante médicinale, (3eme éd). Editions Tec & Doc Lavoisier, p1120
- 53- *Bouakaz, I., (2006)*. Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister. Batna.
- 54 - *Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R., Krishina, D.R. (2001)* Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology.* **33**: 2-16
- 55- *Seyoum, A., Asres, K., El-Fiky, F.K. (2006)* Structure-radical scavenging activity

## LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

relationships of flavonoids . Journal of phytochemistr.67: 2058-2070

**56-DjemaiZoughlacheS. (2008)**, Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphus lotus* L, mémoire magister, Université -El Hadj Lakhder –Batna

**57-Cotelle, N. (2001)**Role of flavonoids in oxidative stress. Current topics in medicinal chemistry. 1: 569-590.

**58-Lin, J.K., Weng, M.S. (2006)**Flavonoids as Nutraceuticals. In :The science of flavonoids. Grotewold, E. Eds, Springer, p: 217.

**59-Heim, E.K., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002)**Flavonoid antioxidants : chemistry , metabolism and structure-activity relationships. The Journal of Nutritional Biochemistry.13: 572-584.

**60- Da silva.E.J.A, Oliveira.A.B, Lapa.A.J.**Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids,duartin and claussequinone, in rats and mice. J. Pharm.PharmacoL.1994 46(2): 118-22

**61Galati.E.M,Monforte.M.T,Kirjavainen.S,Forestieri.A.M,Trovato.A,Tripodo.M.M.** Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I):antiinflammatory and analgesic activity. Farmaco.1994 40(11): 709-12

**62- Read, M. A.**Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents Vascular. Am. J.Pathol. 1995 147(2): 235-7

**63- Middleton.E.J.**Biological properties of plant flavonoids: an overview. Int.J. Pharmacol. 1996 34 (5): 344-348.

**64- Mucsi,I, Pragai.B.M.**Inhibition of virus multiplication and alteration of cyclic AMP level in cell cultures by flavonoids. Experientia1985 41(7):930-1.

**65-Spedding.G, Ratty.A, Middleton.E.J.**Inhibition of reverse transcriptasesby flavonoids.Antivir.Res. 1989 12(2): 99-110.

**66-Ono.K, Nakane.H, Fukushima.M, Chermann.J.C, Barre-sinoussi.F.** Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reversetranscriptase and cellular DNA and RNA. polymerases. Eur. J. Biochem. 1990190(3): 469-76.

**67-Ono.K, Nakane.H.**Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids. J. Biochem. 1990 108(4): 609-13

**68-Mahmood.N, Pizza.C, Aquino.R, De tommasi.N, Placente.S, Colman.S, Burke.A, Hay.A.J.**Inhibition of HIV infection by flavanoids.Antivir. Res. 199346(7): 1257-71.

## LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 69-Fesen.M.R, Pommier.Y, Leteurtre.F, Hiroguchi.S, Yung.J, Kohn.K.W.**  
Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochem.Pharmacol.* 1994 48(3): 595-608.
- 70-Ohemeng.K.A, Schwender.C.F, Fu.K.P, Barrett.J.F.** DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1993 3(2):225-30.
- 71-Sato.M, Tsuchiya.H, Takase.I, Kureshiro.H, Tanigaki.S, Iinuma.M.**  
Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics. *Phytother. Res.* 1995 9(7): 509-12.
- 72-Mila.I, Scalbert.A.** Tannin antimicrobial properties through iron deprivation: a new hypothesis. *International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance*, 1994 381(2): 749-755.
- 73- Nathan C (2002).** Points of control in inflammation. *Nature*, 420, 846-852.
- 74- Barton G M (2008)** A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest*, 118, 413-420.
- 75- Bianchi M E (2007).** DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*, 81, 1-5
- 76- Medzhitov R (2008).** Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454, 428-435.
- 77- Charles N Serhan, Peter A Ward and Derek W Gilroy (2010).** *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge University Press, 2-3.
- 78- Kumar Vinay, Abul K Abbas, Nelson Fausto and Richard Mitchell (2007).** *Robbins Basic Pathology*, 8th Edition, 20-60.
- 79- Weill B, Batteux F and Dhainaut J (2003).** *Immunopathologie et réactions inflammatoires*. Eds, De Boeck Université (Paris), 12-23.
- 80- Nourshargh Sussan, Fritz Krombach, and Elisabetta Dejana (2006).**  
The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *Journal of Leukocyte Biology*, 80, 714-718.
- 81- Blain, Jouzeau, Netter and Jeandel (2000).** Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives. *Rev Méd Interne*, 21, 978-88.
- 82- Nicolas Jean-François, Florence Cousin and Jean Thivolet (2001).**



## LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

Immunologie clinique et allergologie. Aspirine et AINS : intolérance et allergie. John Libbey Eurotext, 2001, 55-58.

**83- Barnes Peter J (1998).** Anti-inflammatory actions of glucocorticoids : molecular mechanisms. *Clinical Science*, 94, 557-572.

**84- Han T, Li H L, Zhang QY, Han P, Zheng H C, Rahman K and Qin L P (2007).** Bioactivity-Guided Fractionation For Anti-Inflammatory And Analgesic Properties And Constituents Of Xanthium Strumarium L. *Phytomedicine*, 14, 825–829

**85- Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luycky M. and Gazin M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *ArzneimForsch / Drug Res.* 1-6.

**86-Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luycky M. and Gazin M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *ArzneimForsch / Drug Res.* 1-6

**87-Barnes Peter J (1998).** Anti-inflammatory actions of glucocorticoids : molecular mechanisms. *Clinical Science*, 94, 557-572.

**88-Han T, Li H L, Zhang QY, Han P, Zheng H C, Rahman K and Qin L P (2007).**

Bioactivity-Guided Fractionation For Anti-Inflammatory And Analgesic Properties And Constituents Of Xanthium Strumarium L. *Phytomedicine*, 14, 825–829

**89-Favier, A. (2003).** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la Compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, p108-115.

**90-Haton C., (2005).** Effets des rayonnements ionisants sur la structure de la fonction de la cellule épithéliale intestinale. Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, France, pp : 43.

**91-Boumaza A. (2009).** Effet de l'extrait méthanolique de zygophyllum cornutum coss contre le stress oxydant associé au diabète sucré et les organes en relation. Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie cellulaire et moléculaire Option : Toxicologie cellulaire et moléculaire. Université Constantine. p.18-25

**92-Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Biocell* 39: 44-84.

**93-Salvayre R, Auge N & Nègre-Salvayre A (2003).** Rôle de l'oxydation dans la genèse et la progression de l'athérosclérose. *L'athérosclérose : Physiopathologie*,

## LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

Diagnostics,Thérapeutiques., J.F., Toussaint, M.P., Jacob, L., Lagrost, J., Chapman, Eds. Masson: Paris,14, 269-290.

**94-Halliwel B (2006).** Phagocyte-derived relative specie : salvation or suicide.T pends in biochemical sciences . vol 3.N°9: 509-15.

**95-Durackova Z .Djrolo F.,Houngbe H.,Avode G.,Attonlou V.,Adrra B N.Avimadj M. 2008).**Oxidants, Antioxidants and oxidativesstress.Mitochondrie medicine .GvozdjakovaA(ed)P: 19-43;

**96-Mohammedi Z. (2005),**Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et falvonoides de quelques plantes de la région du Tlemcen , Thèse de magistère , Université-AbouBakrBelkaid-Telemcen .

**97-Sorg, O.(2004)** Oxydatif stress: a theoretical model or a biological reality.ComptesRendus Biologies.327:649-662.

**98-BouhadjraK. (2011),**étude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge, thèse pour l'obtention du diplôme de magister, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.

**99-Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O. (2002)**Physiological action of Antioxidantdefences. Nutrition Clinique et Métabolisme. 16: 233-239

**100-Koechlin-Ramonatxo, C. (2006)**Oxygen , oxidative stress and antioxidant supplementation ,or an other way for nutrition in respiratory diseases. Nutrition cliniqueetmétabolique. 20:165-177.

**101-Halliwel, B., Whiteman, M. (2004)**Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture : how should you do it and what do the results mean?. British journal of pharmacology142: 31-2

**102-Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006)** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-biological interactions.160: 1- 40.

**103-Martínez-Cayuela, M. (1995)**Oxygen free radicals and human disease. Biochimie.77: 147-161.

**104-Berlette, B.S., Stadtman, E.R. (1997)**Protein oxidation in aging disease, and oxidative stress. The Journal of biological chemistry.272: 20313-20316

**105-Goudable, J., Favier, A. (1997)**Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Nutrition Clinique etMétabolisme. 11: 115-20

## LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 106-Lehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost, M. (2001)** Stress oxydant et pathologies humaines. La Presse médicale. 30:1076-1081.
- 107-Beckman, K.B., Ames, B.N. (1998)** The free radical theory of aging matures. Physiological Oxygen free radicals and human disease. Biochimie. 77: 147-161. reviews. 78:547-581.
- 108-Berger, M.M. (2006)** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. Nutrition Clinique et Métabolisme. 20: 48-53.
- 109- 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.
- 110- Pelli Ket Lyly M.** Les antioxydants dans l'alimentation. Biotechnology Finlande, 2003; Pages: 6, 8
- 111- 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
- 112- Leake DS.** Effects of Flavonoids on the Oxidation of Low-Density Lipoproteins. Flavonoids in Health and Disease, 1998; Chapter 10:253-276
- 113- Magder S.** Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? Crit Care, 2006; 10: 208-216.
- 114- Chevion M., Berenshtein E., Stadtman E. R.** Human studies related to protein oxidation: proteincarbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res.* 2000; **33**: 99 -108.
- 115- Morel Y, Barouki R.** Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. Med Sci (Paris). 1998; 14 : 713-21
- 116- Lecerf JM.** Anti-oxydants : qu'en attendre ? Réalités en Nutrition. 2009, No 17
- 117-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.
- 118- Pincemail J, Lecomte J, Collart E, Castiaux JP, Defraigne JO.** Stressoxydant, antioxydants et exercice physique. Vaisseaux, Coeur, Poumons. 2001;6(5): 1-3

## LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 119- Koechlin-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.
- 120- 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 neurodegenerative diseases. Editors: L. Montagnier, R. Olivier, C. Pasquier; Marcel Dekker. Inc. New York-Basel-Hong Kong. 1998; 409-427.
- 121- Powers S. K., Lennon S. L.** Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc*. 1999; **58**: 1025-1033.
- 122- Faridovich I.** *Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu. Rev. Biochem.*, 1995, 64:97-112.
- 123- Okado-Matsumoto A., Fridovich I.** Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem*. 2001; **276**: 38388-38393.
- 124- Sturtz L. A., Diekert K., Jensen L. T., Lill R., Culotta V. C.** A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem*. 2001; **276**: 38084-38089.
- 125- Huang T. T., Carlson E. J., Kozy H. M., Mantha S., Goodman S. I., Ursell P. C., et al.** Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic Biol Med*. 2001; **31**: 1101-1110
- 126- Sentman M.L., Granstrom M., Jakobson H., Reaume A., Basu S., Marklund S. L.** Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 2006; **281**: 6904-6909.
- 127- Lardon R A ;** *The antioxidants of higher plants. Phytochemistry*, 1988, 27 : 969-
- 128- Kamal-Eldin A., Appelqvist LA.** *The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. Lipids*, 1996, 31(7) : 671-701.
- 128- Halliwell B.** (1994) Free radicals and antioxidants. *Nutr. Rev.* **52** : 253-265.
- 129- Pelzer L. E., Guardia T., Juarez A. O., et al. (1998)** Acute and chronic anti-inflammatory effects of plant flavonoids. *Farmaco*. **53** (6): 421-424
- 130- Sánchez de Medina F., Vera B., Gálvez J., et al. (2002)** Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sci*. 70 (26): 3097-3108

## LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**131- Youdim K. A., McDonald J., Kalt W., et al. (2002)** Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults (small star, filled). *J. Nutr Biochem.* 13 (5): 282-8

**132- Orallo F., Alvarez E., Basaran H., Lugnier C. (2004)** Comparative study of the vasorelaxant activity superoxide-scarvenging ability and cyclic nucleotide phosphodiesterase-inhibitory effects of hesperetin and hesperidin. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 370 : 452-463

**133- Stoclet J. C., Chataigneau T., Ndiaye M., et al. (2004)** Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur. J.Pharmacol.* **500** : 299-313..

**134- Yamamura S., Ozawa K., Ohtani K., et al. (1998)** Antihistaminic flavones and aliphatic glycosides from *Mentha spicata*. *Phytochemistry.* 48 (1) : 131-136 .

-- **Formica J. V., Regelson W. (1995)** Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* 33: 1061-1080.

**133- Garait .B.(2006).**le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires)ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSOdin.pp 8-26.

**134- Fauntaine .E.(2004).**production et élimination des radicaux libres,thèse de doctorat

**135- vibet .S.(2008).**role du statut oxydant et de la vascularisation tumorale .Augmentation de la sensibilité des cellules tumorales mammaires aux agents anticancéreux par les acides gras polyinsaturés n-3.thèse de doctorat.pp80-81.

**136 - Tachini .PH.(2010).**le stress oxydatif et les antioxydants.journal edel therapeutique PSE-B/EPFL,2015 Lausanne.pp21-21

**137- Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luycky M. and Gazin M. (1996).**Oxigen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *ArzneimForsh / Drug Res.*1-6.

**.138- Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luycky M. and Gazin M. (1996).**Oxigen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *ArzneimForsh / DrugRes.*1-6.

**139-Price M.P. and Butler L.G. (1977).**Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*25, 1268-1273.

**140-Graham H.D. (1992).**Modified Prussian Blue assay for total phenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*40, 801-805

## LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 141-Cuendet M., Hostettmann K. and Potterat O. (1997).**Iridoidglucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta* 80, 1144-1152.
- 142-Burits M. and Bucar F. (2000).**Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research* 14, 323-328.
- 143-Williams LAD, O'connar A, Iatore L, Dennis O, Ringer S,** ANTI-inflammatory. *West indian Med j* 2008; 57:327-331.
- 144-Sangita C, priyanka C,**Evaluation of in-vitro ant-inflammatory 2012; 2(suppl1):s178- s180.
- 145-Beta tatul.GERva, lEutahtaiodniSoRf ,aVnetidoaxiPdGa,n St waantdhiaPnKti,-CinhfalanmdrmikaatoKry, RaacotivViAty,** of *Euphorbia heyneana* Spreng. *Asian Pac J Trop Biomed* 2011; S191-4
- 146-Schtiavrimtya a nGdNt,oDtaulbfleayvoSnKo,idSactoinNte,n St aonfaAdeygaleJm. aArnmtie-loinsfsleaemdm. aItnotrJyPharm Sci Drug Res 2011;** 3(3): 214-8
- 147- Lee et al., 2003.** Cacao has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine, *J Agric Food chem.*, 51: 7292-7295.
- 148- Beta T., Nam S., Dexter J.E. and Sapirstein H.D. (2005).** Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal Chem.* 82, 390-393.
- 148-Amarowicz R., Pegg R.B., Rahimi-Moghaddamc P., Barl B., et Weil J.A.(2004)**Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry.* 84, 551–562.
- 149- Chung Y-C., Chang C-T., Chao W-W., Lin C-F., et Chou S-T. (2002)** Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 50, 2454–2458.
- 150- Siddhuraju P.et Becker K. (2007)** The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry.* 101(1), 10-19.
- 151-Jeong S.M., Kim S.Y., Kim D.R., Jo S.C., Nam K.C., Ahn D.U., et Lee S.C. (2004)** Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 52, 3389–3393.

## LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- 152-Kumaran, A. et Karunakaran, R.J.(2007)**In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 40, 344–352
- 153-Brand-Williams W., Cuvelier M.E. and Berset C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **28**, 25-30.
- 154- Tsimogiannis D.I. and Oreopoulou V. (2004).** Free-radical scavenging and antioxidant activity of 5,7,3',4'-hydroxy-substituted flavonoids. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **5**, 523-528
- 155- Atoui A.K., Mansouri A., Boskou G. and Kefalas P. (2005).** Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry* **89**, 27-36.5
- 156- Molyneux P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* **26**, 211-219.
- 157- Tsimogiannis D.I. and Oreopoulou V. (2006).** The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **7**, 140-144
- 158- Bondet V., Williams W.B. and Berset C. (1997).** Kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel -Wissenschaft und Technologie* **30**, 609-615
- 159- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* **13**,572-584
- 160- Bagad YM, Umalkar AR, Tatia AU, Surana SJ.**Investigation of anti-inflammatory and analgesic activity of *bridelia airyshawii* (Euphorbiaceae). *J pharm Res* 2011;4(5):1326-1332
- 161- - Mizushima Y and Kobayashi M (1968).**Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **20** (1)169-173
- 162- M Sangeetha , K Kousalya, R Lavanya, Cherukuru S Chamundeeswari D, Uma Maheswara R.2011.** In-vitro Anti-inflammatory and Anti-arthritis Activity of Leaves of *Cleodendron Inermis*. *RJPBCS Volume 2* (1): 822-827.
- 163- Adarsh vm, ajay kp, Kavitha d, Anurag kb,** Anti denaturation and antioxidant activities of *annona cherimola* in-vitro. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2011;2(2):0975-6299