



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Animale.

قسم : بيولوجيا الحيوان

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Toxicologie et Santé*

Intitulé :

---

*Etude in vitro de l'activité antioxydante des polyphénols  
isolés à partir d'une plante médicinale*

---

Présenté et soutenu par :

Le : 05/06/2016

- Ø Laraba Meriem
- Ø Serrat Amina
- Ø Ouassaa Ghania

Jury d'évaluation :

- Ø **Président du jury :** Mme ZAMA Djamila (Pr- UFM Constantine).
- Ø **Rapporteur :** Mr BOULDJADJ Redouane (MAA- UFM Constantine).
- Ø **Examineurs :** Mr ZOUAGHI Youcef (MCA- UFM Constantine).  
Mme DEHILI Nedjwa (MAA- UFM Constantine).

*Année universitaire  
2015 – 2016*



## **Remerciements**

*Avant tout, nous remercions "Allah" le tout puissant de nous avoir donné la santé, la force, le courage, la patience, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.*

*Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre encadreur Monsieur **BOULDJADJ Redouane** qui nous dirigées ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa patience, ses conseils, sa grande disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour le temps qu'il a bien voulu nous consacrer et sans lui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*Nous exprimons nos profonds remerciements aux membres de jury qui vont juger notre recherche :*

*Madame ZAMA Djamila professeur à l'université de Constantine qui nous fait l'honneur de présider ce jury.*

*Monsieur ZOUAGHI Youcef maitre de conférences et Madame DEHILI Nedjwa maitre assistante à l'université de Constantine qui ont bien voulu examiner ce travail.*

*Nous offrons nos plus sincères remerciements à toute l'équipe du laboratoire ou nous avons fait notre travail pratique : " Mme Zaoui Heyem, Mme Sekrani Ibtissem, Mme Bayoud Kenza".*

*Nous souhaiterons également remercier nos professeurs de la faculté des sciences de la nature et de la vie pendant les cinq années du notre parcours .*

## Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail en signe de respect, de reconnaissance et de gratitude*

*A dieu de tout puissant de m'avoir donné le courage, la santé, et m'a accordé son soutien durant les périodes les plus difficiles.*

*A mes très chers parents, que j'admire beaucoup, qui m'ont toujours aidés dans ma vie et qui n'ont cessés de m'encourager et de me soutenir tout au long de mes études, que dieu les garde en bonne santé.*

*A mes frères pour leurs tendresse et leurs permanentes présence à mes cotés sans oublié mes grandes parents pour leurs soutient et encouragement.*

*Je le dédie aussi à tous les enseignants de notre faculté qui ont toujours guidé tout au long de mon parcours éducatif*

*A mes amis qui ont cru en moi et qui ont toujours encouragé, et avec qui j'ai passé des années inoubliables.*

*Meriem*

# Dédicaces

*À l'aide de dieu "Allah" tout puissant*

*Qui m'a tracé le chemin de ma vie,*

*J'ai pu réaliser ce travail.*

*Je dédie ce travail à ma famille spécialement aux personnes les plus chères au monde. Mes chers parents qui sont la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie. Qui m'ont apportés son appui durant toutes mes années d'études, pour ses sacrifices et soutien et qui m'ont donné la tendresse, la confiance, le courage et la sécurité.*

*À ma très belle chère mère **Fella**; tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi, et puisse Dieu le tout puissant te préserver, t'accorder la santé, longue vie et bonheur. Je t'aime Maman.*

*À mon très cher père **Ahcene**; Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation, et puisse dieu t'accorder santé et longue vie. Je t'aime Papa.*

*À ma petite très belle chère sœur unique ; **Hanine**.*

*À mes très chers frères ; **Sami, Sabri, Chérif, Moncef**.*

*À la mémoire de mes chers grands parents de ma mère.*

*À mes chers grands parents de mon père.*

*À mon trinôme Meriem et Ghania qui sont partagées avec moi les moments difficiles pour réaliser ce travail.*

*À mes chères amies ; Halla, Hadia, Ghania.*

*Je remercie toute les personnes que je n'ai pas pu citer leurs noms ici, et qui ont participé de pré ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.*

*À tous ceux qui aiment la science.*

***Amina***

# Dédicaces

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance,*

*C'est tous simplement que : Je dédie cette mémoire :*

*À ma tendre Mère Noua : Tu représente pour moi la source de tendresse et l'exemple de  
Dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire*

*Pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.*

*À mon très cher Père Abed El Hamid : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour,*

*l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous.*

*À mes chers frères : Oussama, Hicham et Youcef.*

*À mes belles sœurs : Nihad, Sara et Samah.*

*À tous les membres de ma famille, petits et grands.*

*À mes très chères amis : Amina, Hadia, Meriem, Narimene, Hadjer, Moumi, Ikram*

*Rabah, Mohamed, Kiraa et Abed El Malek.*

*À tous ceux qui me sens chers et que j'ai omis de citer.*

***Ghania***

# **Etude *in vitro* de l'activité antioxydante des polyphénols isolés à partir d'une plante médicinale**

## **Résumé**

Les substances naturelles issues de la biomasse des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans la biotechnologie tant dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique. Parmi ces composés on retrouve une grande partie des métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapie. On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions, les études des métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in vitro* et *in vivo* de tissus végétaux. C'est le cas notamment des composés phénoliques qui font l'objet de notre étude, composés largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydant et anti radicalaires. Dans ce contexte, le présent travail porte sur une étude phytochimique et antioxydante des phases *n*-butanolique, acétate d'éthyle et chloroformique issues d'une plantes endémique utilisée traditionnellement pour traiter plusieurs maladies en Algérie. Le taux des polyphénols est remarquablement très élevé dans la phase acétate d'éthyle ( $148,26 \pm 0,02$  mg EAG/g EXS) par rapport à la phase *n*-butanolique ( $100,04 \pm 0,002$  mg EAG/g EXS) et chloroformique ( $75,95 \pm 0,006$  mg EAG/g EXS). Les analyses complémentaires ont permis de mettre en évidence les capacités antioxydantes et anti-radicalaires de ces extraits selon les méthodes de DPPH<sup>\*</sup>, CAT et FRAP. Les résultats de ces travaux nous ont permis d'affirmer que l'ensemble des extraits de la plante étudié présentent des très bonnes propriétés antioxydantes qui pourraient nous permettre de les recommander dans la biotechnologie.

**Mots clés:** stress oxydant, antioxydant, polyphénole, DPPH, FRAP.

# **Study of antioxidant activity of polyphenols isolated from medicinal plant *in vitro***

## **Abstract**

Natural substances extracted from the vegetal biomass have multiple benefits exploited in industrial biotechnology of food, cosmetics and pharmaceuticals as well. Amongst these compounds we find a large proportion of secondary metabolites which are illustrated especially in therapy. We have been for a long time using in traditional medicine herbal components, without knowing the way they react, secondary metabolites studies were the subject of many researches based on *in-vitro* and *in-vivo* cultures of plant tissues. This is in particular the case of phenolic compounds which are the subject of our study, compounds widely used in therapeutics as vasculoprotectives, anti-inflammatory, enzyme inhibitors, antioxidant and anti-free-radicals. In this context, the present work takes on a phytochemical and antioxidant study of *n*-butanolic phases, ethyl acetate and chloroform are extracted from an endemic plant traditionally used to treat many diseases in Algeria. The polyphenols rate is remarkably high in the ethyl acetate phase polyphenols (148, 26 ± 0,02 mg AGE/g EXS) compared to *n*-butanolic phase (100,04 ± 0,002 mg EAG/g EXS) and chloroformic (75,95 ± 0,006 mg EAG/g EXS). The additional analyses allowed us to highlight the antioxidant and anti-free-radical capacities of these extracts, according to the DPPH<sup>•</sup>, TAC and FRAP methods.

The results obtained during this work allowed us to assert that all extracts of the studied plant have very good antioxidant properties that could enable us to recommend its using in biotechnology.

**Key words:** oxidative stress, antioxidant, polyphenols, DPPH, FRAP.

# الدراسة المخبرية للنشاط المضاد للأكسدة للعديد الفينول معزول من نبات طبي

## ملخص

المواد الطبيعية الناتجة عن الكتلة الحيوية النباتية تملك فوائد متعددة تستغل في التكنولوجيا الحيوية خاصة في الصناعات الغذائية، مستحضرات التجميل والمواد الصيدلانية. من بين هذه المركبات نجد جزء كبير من المركبات الثانوية تستعمل خاصة في العلاج. منذ فترة طويلة نستعمل أدوية تقليدية من أصل نباتي دون معرفة نتيجة تأثيرها. الدراسات القائمة على المركبات الثانوية موضوع العديد من البحوث التي تركز على المزارع المخبرية والأنسجة النباتية الحية. كما هو الحال وبالأخص بالنسبة للمركبات الفينولية التي هي موضوع دراستنا المستخدمة على نطاق واسع في العلاجات مثل الوقاية الوعائية، مضادات الالتهاب، مثبطات الانزيمات، مضادات الأكسدة ومضادات الجذور الحرة. في هذا السياق يركز عملنا على دراسة الكيمياء النباتية والمضادة للأكسدة لمختلف المراحل بيتانول، خلات الاثيل و الكلوروفورم الناتجة عن نباتات التي تستخدم لعلاج العديد من الأمراض في الجزائر.

معدل البوليفينول مرتفع بشكل ملحوظ في المرحلة خلات الإيثيل ( $148,26 \pm 0,02$  mg EAG/g EXS) مقارنة مع مرحلة البيتانول ( $100,04 \pm 0,002$  mgEAG/g EXS) و الكلوروفوم ( $75,95 \pm 0,006$  mg EAG/g EXS) تسمح المزيد من التحاليل بتسليط الضوء على القدرة المضادة للأكسدة والمضادة للجذور الحرة لهذه المستخلصات باستخدام الطرق التالية : FRAP، CAT ،DPPH.

النتائج المتحصل عليها في هذا العمل أكدت بأن جميع المستخلصات النباتية المدروسة لها خصائص مضادة للأكسدة ممتازة التي قد تسمح لنا بأن نوصي باستخدامها في مجال التكنولوجيا الحيوية.

**الكلمات المفتاحية :** الاجهاد التأكسدي، مضاد الأكسدة ، عديد الفينول ، DPPH ، FRAP.

# SOMMAIRE

<b>Remerciements</b>	
<b>Dédicaces</b>	
<b>Liste des Abréviations</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	<b>Page</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>SECTION I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b>	
<b>CHAPITRE I : SYSTEME OXYDANT, SYSTEME ANTIOXYDANT ET STRESS OXYDANT</b>	
<b>I. SYSTEM OXYDANT</b> .....	<b>3</b>
<b>I.1. Les espèces réactives de l'oxygène</b> .....	<b>3</b>
<b>I.2. Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène</b> .....	<b>3</b>
<b>I.2.1. L'anion superoxyde</b> .....	<b>3</b>
<b>I.2.2. Le peroxyde d'hydrogène</b> .....	<b>4</b>
<b>I.2.3. Le radical hydroxyle HO<sup>•</sup></b> .....	<b>5</b>
<b>I.2.4. Radicaux alkyles R<sup>•</sup> et peroxy ROO<sup>•</sup></b> .....	<b>5</b>
<b>I.2.5. L'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)</b> .....	<b>6</b>
<b>I.2.6. Le monoxyde d'azote NO</b> .....	<b>6</b>
<b>I.3. Intérêts biologiques des radicaux libres dans la physiologie</b>	
<b>Cellulaire</b> .....	<b>7</b>
<b>I.3.1. La phagocytose</b> .....	<b>7</b>
<b>I.3.2. La signalisation cellulaire</b> .....	<b>7</b>
<b>II. SYSTEMES DE DEFENSES ANTIOXYDANTS</b> .....	<b>8</b>
<b>II.1. Le Système antioxydant enzymatique</b> .....	<b>8</b>
<b>II.1.1. Superoxydes dismutases</b> .....	<b>9</b>
<b>II.1.2. Catalase</b> .....	<b>9</b>

II.1.3. Glutathions peroxydase (GP <sub>x</sub> ).....	10
II.2. Le système antioxydant endogène non enzymatique.....	11
II.2.1. Glutathion.....	11
II.2.2. L'acide urique.....	12
II.2.3. Bilirubine.....	12
II.2.4. Acide lipoïque.....	12
II.2.5. Coenzyme Q10.....	12
II.3. Le système antioxydant exogène.....	13
II.3.1. Vitamine E.....	13
II.3.2. Vitamine C.....	14
II.3.3. β carotène.....	14
II.3.4. Sélénium.....	14
II.3.5. Les Polyphénols.....	14
III. STRESS OXYDANT.....	15
III.1. Conséquences biochimiques du stress oxydant.....	15
III.1.1. Oxydation de l'ADN.....	15
III.1.2. Oxydation des protéines.....	16
III.1.3. Peroxydation des lipides.....	16
 <b>CHAPITRE II : LA PHYTOTHERAPIE</b>	
I. Définition de la phytothérapie .....	17
II. Différents types de la phytothérapie.....	17
II.1. L'aromathérapie.....	17
II.2. La Gemmothérapie.....	18
II.3. L'herboristerie.....	18
II.4. Phytothérapie pharmaceutique.....	18
III. Mode d'emploi des plantes médicinales.....	18
III.1. Infusion.....	18
III.2. Décoction.....	18
III.3. Macération.....	18
IV. Les avantages de la phytothérapie.....	19

<b>V. Interaction et précautions d'emploi.....</b>	<b>19</b>
--	-----------

## **CHAPITRE III : LES POLYPHENOLS**

<b>I. Généralité sur les métabolites secondaires .....</b>	<b>20</b>
<b>II. Structure des composés polyphénoliques.....</b>	<b>21</b>
<b>II.1. Composés polyphénoliques non flavonoïdiques.....</b>	<b>21</b>
<b>II.1.1. Les acides phénoliques.....</b>	<b>21</b>
<b>II.1.1.1. Les acides hydroxybenzoïques .....</b>	<b>21</b>
<b>II.1.1.2. Les acides hydroxycinnamique .....</b>	<b>22</b>
<b>II.1.2. Les stilbènes.....</b>	<b>23</b>
<b>II.1.3. Les lignanes.....</b>	<b>24</b>
<b>II.1.4. Les coumarines.....</b>	<b>24</b>
<b>II.1.5. Les xanthones.....</b>	<b>25</b>
<b>II.2. Composés polyphénoliques flavonoïdiques.....</b>	<b>26</b>
<b>II.2.1. Les Isoflavones.....</b>	<b>27</b>
<b>II.2.2 Les Flavanones.....</b>	<b>28</b>
<b>II.2.3. Les Flavones.....</b>	<b>28</b>
<b>II.2.4. Les Flavonols.....</b>	<b>28</b>
<b>II.2.5. Les anthocyanes.....</b>	<b>29</b>
<b>II.2.6. Les tanins.....</b>	<b>29</b>
<b>II.2.6.1. Les Tanins condensés.....</b>	<b>30</b>
<b>II.2.6.2. Tanins hydrolysables.....</b>	<b>31</b>
<b>III. Biosynthèse des polyphénols.....</b>	<b>31</b>
<b>III.1. La voie de Shikimate.....</b>	<b>31</b>
<b>III.2. La voie de l'acétate malonate.....</b>	<b>31</b>
<b>IV. Propriétés biologique et intérêt des polyphénols.....</b>	<b>32</b>
<b>IV.1. Chez les végétaux.....</b>	<b>32</b>
<b>IV.2. Chez l'être humain.....</b>	<b>32</b>
<b>IV.2.1. Activité antioxydante.....</b>	<b>32</b>

IV.2.1.1. Piégeage des radicaux libres.....	33
IV.2.1.2. Chélation des ions métalliques.....	34
IV.2.1.3. Inhibition enzymatiques.....	35
IV.2.2. Activité antibactérienne.....	35
IV.2.3. Activité anti inflammatoire.....	36
IV.2.4. Activité anti tumorale .....	36
IV.2.5. Activité anti cardiovasculaire.....	36
IV.2.6. Activité anti diabétique.....	37

## SECTION II : MATERIEL ET METHODE

I. MATERIELS.....	38
I.1. Matériel végétal.....	38
I.1.1. Récolte de la plante.....	38
I.1.2. Préparation des extraits.....	38
I.2. Réactifs.....	40
I.3. Appareils.....	40
II. METHODES.....	40
II.1. Méthodes de caractérisation quantitative des polyphénols.....	40
II.1.1. Dosage des polyphénols totaux.....	40
II.1.1.1. Principe.....	40
II.1.1.2. Méthode de dosage.....	41
II.2. Méthode de dosage des activités antioxydantes <i>in vitro</i> .....	41
II.2.1. Le test de piégeage du radical DPPH .....	41
II.2.1.1. Principe.....	41
II.2.1.2. Méthode de dosage.....	42
II.2.2. Dosage de la capacité antioxydante totale « test de phosphomolybdate».....	43
II.2.2.1. Principe.....	43
II.2.2.2. Méthode de dosage.....	43
II.2.3. Dosage du pouvoir réducteur « FRAP ».....	43
II.2.3.1. Principe.....	43
II.2.3.2. Méthode de dosage.....	44
III. EVALUATION STATISTIQUE.....	45

## **SECTION III : RESULTATS ET DISCUSSION**

<b>I. Caractérisation quantitative des extraits de la plante.....</b>	<b>46</b>
<b>I.1.Teneur des extraits en polyphénols.....</b>	<b>46</b>
<b>II. Méthodes de dosage des activités antioxydantes <i>in vitro</i> .....</b>	<b>48</b>
<b>II.1. Le test de piégeage du radical DPPH.....</b>	<b>49</b>
<b>II.2. Capacité antioxydante totale (CAT) « test de phosphomolybdate».....</b>	<b>52</b>
<b>II.3. Pouvoir réducteur du fer « FRAP ».....</b>	<b>53</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>56</b>
<b>Références bibliographiques</b>	

# Liste des figures

<b>Figure 1 :</b>	Les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.....	8
<b>Figure 2 :</b>	Action de l'antioxydant au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène.....	9
<b>Figure 3 :</b>	Cycle oxydo-réducteur du glutathion.....	10
<b>Figure 4 :</b>	Déséquilibre Antioxydant /Oxydant.....	15
<b>Figure 5 :</b>	Structure de l'acide benzoïque.....	22
<b>Figure 6 :</b>	Structure de l'acide hydroxycinnamique.....	22
<b>Figure 7 :</b>	Structure de base des stilbènes(tran ou cis).....	23
<b>Figure 8 :</b>	Structure de Trans-resveratrol.....	23
<b>Figure 9 :</b>	Structure de lignane.....	24
<b>Figure 10 :</b>	structure de coumarine.....	25
<b>Figure 11 :</b>	Structure de xanthone.....	25
<b>Figure 12 :</b>	Structure de base des flavonoïdes.....	26
<b>Figure 13 :</b>	Les structures chimiques des principales familles de flavonoïdes.....	27
<b>Figure 14 :</b>	Structure d'isoflavonne.....	27
<b>Figure 15 :</b>	Structure de flavanones.....	28
<b>Figure 16 :</b>	Structure de flavones.....	28
<b>Figure 17 :</b>	Structure de flavonols.....	29
<b>Figure 18 :</b>	Structure de base des anthocyanes.....	29
<b>Figure 19 :</b>	Structure de tanins condensés.....	30
<b>Figure 20 :</b>	Structure de tanins hydrolysable.....	31
<b>Figure 21 :</b>	Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques.....	33
<b>Figure 22 :</b>	Les caractéristiques structurales des flavonoïdes avec une activité de piégeage des radicaux libres élevée.....	34
<b>Figure 23 :</b>	Les étapes de préparation des différentes phases de la plante.....	39
<b>Figure 24 :</b>	Equation du radical DPPH transformé en DPPH.....	42
<b>Figure 25 :</b>	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe ferricyanide ferrique Fe (III) et un antioxydant (AH).....	44

<b>Figure 26 :</b>	Droite d'étalonnage de l'acide Gallique.....	46
<b>Figure 27 :</b>	Teneurs en polyphénols totaux dans l'extrait de 3 phases (n-butanolique, acétate d'éthyle, chloroformique) équivalent d'acide gallique.....	47
<b>Figure 28 :</b>	Pourcentage d'inhibition du radical DPPH <sup>•</sup> des antioxydants de références et des extraits testés.....	49
<b>Figure 29 :</b>	Droite d'étalonnage de l'acide ascorbique pour mesure la capacité antioxydante.....	52
<b>Figure 30 :</b>	Histogramme comparatif de la capacité antioxydante totale des antioxydants de références et des extraits testés.....	53
<b>Figure 31 :</b>	Evaluation de l'activité antioxydante des extraits par la méthode FRAP .....	54

# Liste des abréviations

**%** : Pourcentage

**°C** : Degré celsius

**µg /ml** : Microgramme par millilitre

**µl** : Microlitre

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** : Oxygène singulet

**AA** : Acide ascorbique

**AcOET** : Acétate d'éthyle

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARN** : Acide ribonucléique

**ATP** : Adénosine triphosphate

**BHA**: Butylated hydroxyanisole

**BHT**: Butylated hydroxytoluene

**CAT** : Catalase

**CHCl<sub>3</sub>** : Chloroforme

**Cl<sup>-</sup>** : Ion chlore

**CoQ10** : CoenzymeQ10

**COX** : Cyclooxygénase

**DO**: Densité optique

**DPPH**: 2,2'-diphényl-1-picryl hydrazyl

**E AA** : Équivalent acide ascorbique

**EAG** : Équivalent d'acide gallique

**ERO**: Espèces réactives oxygénées

**EX** : Extraits

**FCR** : Folin-Ciocalteu

**Fe<sup>3+</sup>** : Ion ferrique

**Fe<sup>2+</sup>** : Ion ferreux

**FeCl<sub>3</sub>** : Chlorure de fer

**FRAP** : Pouvoir antioxydant réducteur du fer

**g**: gramme

**GSH** : Glutathion

**GSSG** : Glutathion oxydé

**H<sup>+</sup>** : Proton  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène  
**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Acide sulfurique  
**H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : Aacide phosphomolybdique  
**H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : Aacide phosphotungstique  
**HO<sup>•</sup>** : Radical hydroxyle  
**HOCl**: Acide hypochlorique  
**IC<sub>50</sub>** : concentration d'inhibition de 50%  
**K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** : Potassium Phosphate dibasique  
**K<sub>3</sub>Fe(CN) 6** : Ferricyanide de Potassium  
**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : Phosphate de potassium monobasique  
**LDL** : Lipoprotéines de densité légère  
**LOO<sup>•</sup>** : Radicale lipidique peroxyde  
**LOOH** : Hydroperoxyde lipidique  
**MDA** : Malondialdéhyde  
**MeOH** : Méthanol  
**mg** : Milligramme  
**MPO** : Myloperoxydase  
**N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**: Trioxyde d'azote  
**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Dicarbonate de sodium  
**Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : Phosphate de sodium dibasique  
**Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Sulfate de sodium  
**NaCl** : Chlorure de Sodium  
**NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide d'hydrogène  
**NADPH** : Nicotinamide-Adenine-dinucleotide-Phosphate  
**nm** : Nanomètre  
**NO<sup>•</sup>** : Oxyde nitrique  
**NO<sub>2</sub>** : Dioxyde d'azote  
**NOS** : NO synthase  
**O<sub>2</sub>** : Oxygène  
**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** : Anion superoxyde.  
**ONOOH** : Nitroperoxyde.  
**Pb(OAc)<sub>4</sub>** : Tétracétate de plomb  
**PI** : Pourcentage d'inhibition

**PPM** : PhosPhoMolybdate

**R<sup>•</sup>** : Radical alkyles

**RO<sup>•</sup>** : Radical alkoxye

**ROO<sup>•</sup>** : Radical peroxye.

**SH** : Groupement sulfhydryle

**SOD** : Superoxyde dismutase

**TCA** : Acide trichloroacétique

**UQH2** : Ubiquinone

**UV** : Ultra-violet

**VIS** : Visible

**α-TO<sup>•</sup>** : Radical tocophéryle

**α-TOH**: Alpha-tocophérol

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> le pouvoir antioxydant (exprimé par $IC_{50}$ (en $\mu\text{g}/\text{ml}$ )) des antioxydants de références et des extraits testés.....	50
---	----

# **Introduction**

## INTRODUCTION

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux oxygénés toxiques. Actuellement, il est bien admis que même si un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution comme dans le cas du diabète, le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénérative. Ces dommages sont réalisés par l'attaque des radicaux libres sur de divers biomolécules, en particulier les protéines, les lipides et l'ADN, ayant finalement comme conséquence la dégradation et la mort de cellules. (**Moon & Shibamoto, 2009**).

Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), environ 65- 80% de la population mondiale dans les pays en développement, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne, dépendent essentiellement des plantes médicinales traditionnelles pour leurs soins de santé primaire. Et malgré les remarquables progrès en chimie organique de synthèse du vingtième siècle, plus de 25% des médicaments prescrits dans les pays industrialisés tirent directement ou indirectement leurs origines des plantes (**Newman *et al.*, 2000 ; Calixto, 2005**).

L'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées. En effet, les polyphénols sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal qui ont une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé. Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires; ils sont également utilisés comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (**Bougandoura & Bendimerad, 2012**).

Des recherches scientifiques ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir des différentes sources telles que les cultures agricoles et horticoles ou les plantes médicinales.

L'Algérie, riche par sa biodiversité et son climat, est une plate-forme géographique très importante qui mérite d'être explorée dans le domaine de la recherche de molécules antioxydantes et ou thérapeutique originaires de plantes qui ont pour longtemps servi à une grande tranche de population comme moyen incontournable de médication.

C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à étudier une plante endémique à l'Algérie poussant dans les zones arides et semi-arides, et qui est utilisée en médecine traditionnelle dans certaines régions algérienne.

Ce travail vise à étudier *in vitro* l'activité antioxydante une plante endémique à l'Algérie.

Notre travail sera présenté comme suit: une première partie est une synthèse bibliographique. Le premier chapitre est consacré à un rappel sur le stress oxydant et différents antioxydants enzymatique et non enzymatiques. Nous avons ensuite abordé un deuxième chapitre sur la phytothérapie avec ses différentes types et leurs avantages et inconvénients. Nous avons enfin dans le troisième chapitre, abordé les différentes classes des polyphénols, leurs biosynthèses ainsi que leurs intérêts sur la santé. La seconde section décrit le matériel et les méthodes utilisés lors du travail expérimental. La troisième section de ce mémoire expose l'ensemble des résultats obtenus et la discussion. Elle comprend deux parties :

- Ø Etude quantitatifs des polyphénols par le dosage des polyphénols totaux.
- Ø Etude du pouvoir antioxydant de la plante par mesure du pourcentage d'inhibition du radical DPPH, La capacité antioxydant totale (CAT) et le pouvoir réducteur (FRAP).

# **Rappels bibliographiques**

# SYSTEME OXYDANT, SYSTEME ANTIOXYDANT ET STRESS OXYDANT

## I. LE SYSTEME OXYDANT

### I.1. Les espèces réactives de l'oxygène

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule (**Afonso et al., 2007**).

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des radicaux libres issus de l'oxygène moléculaire, elles représentent la plus importante classe d'espèces réactives générées dans les organismes vivants à cause de l'importance du métabolisme aérobie (**Valko et al., 2007**).

Actuellement, on emploie le terme « espèces réactives de l'oxygène » pour désigner un ensemble plus large de molécules :

- Des radicaux oxygénés caractérisés par un électron non apparié: (l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ , les radicaux hydroxyles  $HO^{\cdot}$ , peroxyde  $ROO^{\cdot}$ , alkoxyde  $RO^{\cdot}$  (**Favier, 2003**).
- Des dérivés de l'oxygène non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , l'oxygène singulet  $^1O_2$  et le nitroperoxyde  $ONOOH$ , mais qui sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux libres (**Favier, 2003**).

### I.2. Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène

#### I.2.1. L'anion superoxyde

Il est considéré comme le type le moins réactif des ERO et le radical le plus fréquemment produit dans l'organisme (**Scheibmeir et al., 2005**). Il est chargé négativement et généré par la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire (**Lacolley et al., 2007**). Cette réaction semble surtout catalysée par des NADPH oxydases membranaires (**Wolin, 2009**).



Dans des conditions physiologiques et physiopathologiques,  $O_2^{\cdot-}$  peut également être formé dans certains organites cellulaires (**Gardès-Albert et al., 2005**). Tels que les peroxysomes, via la conversion de l'hypoxanthine en xanthine, puis en acide urique, catalysée

par la xanthine oxydase (**Wolin, 2009**), et les mitochondries où 2% à 5% d'oxygène consommé est transformé en radicaux superoxydes (**Favier, 2003**).

Il existe également des sources exogènes d'anion superoxyde comme la fumée de cigarette ou les radiations ionisantes particulièrement impliquées dans les pathologies pulmonaires (**Ames et al., 1993**).

L' $O_2^{\cdot-}$  est relativement stable, peu toxique pour l'organisme. Cette faible réactivité permet d'ailleurs son utilisation par l'organisme comme médiateur régulant des fonctions biologiques (**Favier, 2003**).

Le radical superoxyde ne traverse pas rapidement la membrane plasmique et se dismute spontanément au pH physiologique en produisant du peroxyde d'hydrogène :



Bien que le radical superoxyde ne soit pas considéré comme particulièrement réactif, son principal danger vient de sa réaction de neutralisation productrice de peroxyde d'hydrogène ou d'acide hypochloreux nettement plus puissants.

L' $O_2^{\cdot-}$  est régulé par des enzymes, les superoxydes dismutases qui catalysent sa dismutation (**Halliwell, 1989**).

### I.2.2. Le peroxyde d'hydrogène

Le Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), qui n'est pas un radical libre, peut être formé secondairement à la dismutation de  $O_2^{\cdot-}$  par le superoxyde dismutase ou produit par réduction bivalente de l'oxygène grâce à un grand nombre de déshydrogénases, notamment l'acylCoA déshydrogénase, la NADH déshydrogénase, la xanthine oxydase, l'uricase, la mono-amine-oxydase...etc.



L' $H_2O_2$  n'est pas un radical libre mais a la capacité de générer des radicaux hautement réactifs. En présence de métaux de transition (fer et cuivre), l' $H_2O_2$  donne naissance via la réaction de Fenton à un radical hydroxyle  $HO^{\cdot}$  hautement réactif (**Wardman & Candeias, 1996**).

Contrairement à l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène est capable de traverser les membranes des cellules et des organites cellulaires pour engendrer des dommages loin de son site de production (**Halliwell & Gutteridge, 1996**).

### I.2.3. Le radical hydroxyle HO<sup>•</sup>

Le radical hydroxyle est l'oxydant le plus réactif et le plus puissant (Marusawa *et al.*, 2002). Le peroxydase grâce à des oxydases spécifique représente l'une des sources les plus importantes productrices de ce radical (Poortmans & Boisseau, 2009).

Parmi les voies conduisant à la formation de ce radical on peut citer celle qui implique les métaux de transition, le cuivre et le fer sous leur forme réduite par une réaction appelée réaction de fenton (Favier, 2003).



L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut aussi réagir avec le radical superoxyde, aboutissant à la production du HO<sup>•</sup>, ce mécanisme réactionnel est appelé réaction d'Haber et Weiss (Sorge, 2004).



Le radical hydroxyle a une durée de vie extrêmement faible (inférieure à la microseconde) et les distances qu'ils peuvent parcourir sont également très faibles. Ce sont donc des radicaux qui diffusent peu et qui réagissent quasiment sur le lieu de leur production. Le HO<sup>•</sup> est capable de réagir avec la plupart des molécules biologiques comme l'ADN, les protéines, les sucres et les lipides membranaires. Parmi les ERO le radical hydroxyle est de loin le plus réactif. Le radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> a une demi vie plus longue et bien qu'il soit moins réactif il est aussi délétère que le radical HO<sup>•</sup> (Delattre *et al.*, 2005).

### I.2.4. Radicaux alkyles R<sup>•</sup> et peroxy ROO<sup>•</sup>

Les radicaux peroxy sont des radicaux secondaires issus de l'addition de l'oxygène sur les radicaux centrés sur le carbone R<sup>•</sup>.



Les radicaux R<sup>•</sup> sont généralement issus de l'action des radicaux hydroxyles sur les substrats biologiques (par arrachement d'atome d'hydrogène ou addition sur les doubles liaisons) (Delattre *et al.*, 2005).



### I.2.5.L'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ )

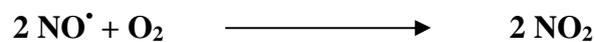
Il correspond à une forme excitée de l'oxygène  $\text{O}_2$ , il possède la même structure électronique que l'oxygène, mais «agencée» différemment, à savoir que les électrons de la couche externe initialement non appariés se sont appariés. Il n'est donc pas radicalaire. Son état «excité» lui confère un potentiel oxydant supérieur à celui de l'oxygène (**Bonnefont Rousselot *et al.*, 2003**).

### I.2.6. Le monoxyde d'azote NO

Le monoxyde d'azote (ou oxyde nitrique) est un radical libre ubiquitaire synthétisé dans la cellule endothéliale à partir de l'arginine et l' $\text{O}_2$  grâce à l'action d'enzymes appelées NO synthase (**Bonnefont Rousselot *et al.*, 2003 ; Vincent & Martin, 2008**).



Il se caractérise par sa grande faculté de diffusion dans les membranes cellulaires et sa réactivité moyenne (de l'ordre de quelques secondes *in vivo*), le monoxyde d'azote radicalaire peut aisément réagir avec la plupart des espèces oxygénées et se transformer en dioxyde d'azote ( $\text{NO}_2$ ) :



Lequel peut donner du trioxyde d'azote ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) :



Pour enfin aboutir à un ion nitrate stable ( $\text{NO}_2^-$ ) :



De plus, le monoxyde d'azote forme avec l'anion superoxyde le peroxyde nitrite ( $\text{ONOO}^-$ ):



Ce dernier est moins réactif que son précurseur azoté, mais responsable de l'oxydation de nombreuses biomolécules (**Rezaire, 2012**).

### I.3. Intérêts biologiques des radicaux libres dans la physiologie cellulaire

#### I.3.1. La phagocytose

Les radicaux libres jouent un rôle essentiel dans le bon déroulement de la réaction immunitaire. La phagocytose des bactéries et des parasites par les macrophages ou les polynucléaires s'accompagne d'une production d'espèces réactives de l'oxygène si brutale et intense qu'elle est connue sous le nom « Bouffée respiratoire » puis qu'elle s'accompagne d'une augmentation transitoire de la consommation d'oxygène. Au sein de phagosome, l'activation de la NADPH oxydase, l'action des superoxydes dismutases (SOD) et la NO synthase (NOS) aboutissent à un mélange très corrosif de  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO^{\cdot}$ ,  $ONOOH$ . L'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) en présence de chlore et sous l'effet de la myeloperoxydase donnera naissance à l'acide hypochlorique  $HOCl$ , c'est l'oxydant microbicide le plus puissant (**Favier, 2003**).



#### I.3.2. La signalisation cellulaire

En dehors de leurs actions délétères, les ERO peuvent agir en tant que molécule de signal et intervenir dans la communication intracellulaire et intercellulaire. Ils participent à l'expression de certains gènes et à leur régulation. Cela leur confère un rôle important dans les phénomènes de croissance et de mort cellulaire.

Les mécanismes de communication cellulaire faisant intervenir les radicaux libres ne sont pas encore élucidés. En résumé :

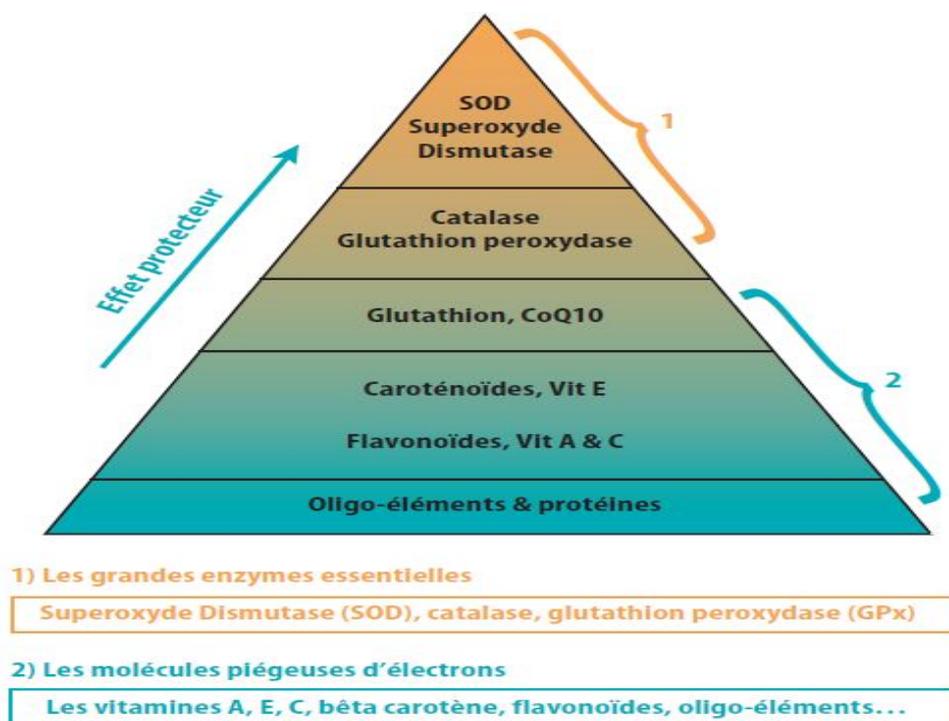
- les radicaux libres joueraient un rôle dans la régulation de l'expression des gènes. La présence de radicaux libres dans le milieu extracellulaire est à l'origine de l'activation de certains facteurs de transcription par des mécanismes encore mal compris. Il en résulte ensuite l'expression des gènes correspondants (**Delattre et al., 2005**).
- Les radicaux libres peuvent intervenir dans la prolifération, la différenciation, l'adhésion et la migration (**Jacques, 2010**).
- Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires (**Favier, 2003**).
- Les radicaux libres jouent un rôle dans la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire (**Favier, 2003**).

## II. SYSTEMES DE DEFENSES ANTIOXYDANTS

Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (**Droge, 2002**).

Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques. Mais aussi à des petites molécules hydro- ou liposolubles.

Les systèmes antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (**Delattre et al., 2005**).

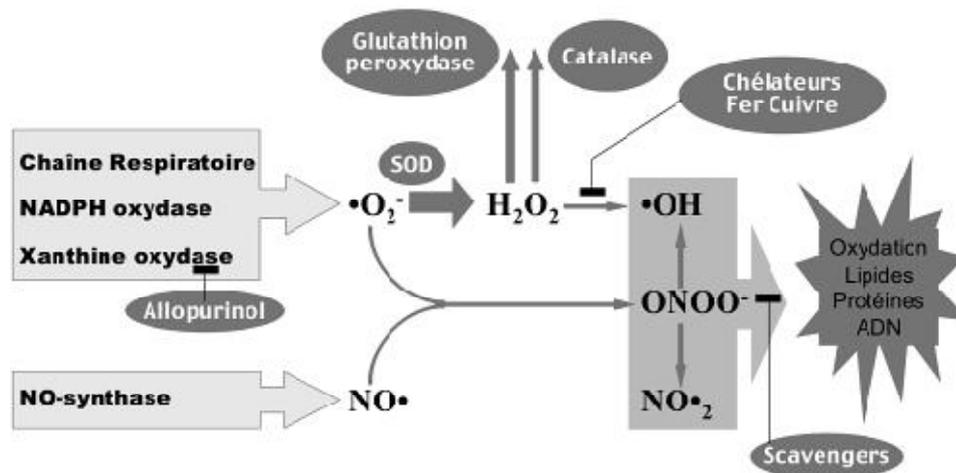


**Figure 1** : les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (**Menvielle-Bourg, 2005**).

### II.1. Le Système antioxydant enzymatique

Les protéines enzymatiques antioxydantes constituent la première barrière de cette défense antioxydante, qui est constituée de trois métalloenzymes essentielles: les superoxydes dismutases, la catalase et les glutathions peroxydases.

Leurs activités et leurs localisations dans la cellule sont complémentaires et assurent l'élimination des anions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène dans tous les compartiments intracellulaires.



**Figure 2:** Action de l'antioxydant au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène (Cano *et al.*, 2007)

### II.1.1. Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases ou SOD (EC 1.15.1.1) sont des antioxydants enzymatiques ubiquitaires. Ces métalloprotéines représentent l'une des premières lignes de défense contre le stress oxydant en assurant l'élimination de l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  par une réaction de dismutation en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante: (Haleng *et al.*, 2007).



Ces enzymes accélèrent la vitesse de cette réaction spontanée rendant très rapide la disparition du superoxyde mais en générant le peroxyde d'hydrogène. Celui-ci est un composé oxydant diffusible et dangereux à distance (Goudable & Favier, 1997) mais il peut être ultérieurement catabolisé par la catalase et les glutathion peroxydases.

Chez l'homme, trois isoformes de l'enzyme SOD qui diffèrent par leur structure et leur localisation cellulaire ont été caractérisées de façon biochimique et moléculaire. La Cu/Zn-SOD ou SOD1 cytosolique, et la ECSOD ou SOD3 extracellulaire, utilisent le cuivre et le zinc comme cofacteurs nécessaires à l'activité enzymatique, lorsque la SOD2, mitochondriale, utilise le manganèse (Afonso *et al.*, 2007).

### II.1.2. Catalase

La catalase (EC1.11.1.6) est une enzyme responsable de la détoxification du peroxyde d'hydrogène produit dans les conditions physiologiques (Niki *et al.*, 2007). Elle est localisée

principalement dans les peroxysomes, mais aussi dans les mitochondries et le cytoplasme (pour les cellules qui ne possèdent cette organelle ex ; érythrocytes) (Lindau-Sehpard & Shaffer, 1993).

La réaction catalysée par cette enzyme est une dismutation du peroxyde d'hydrogène :

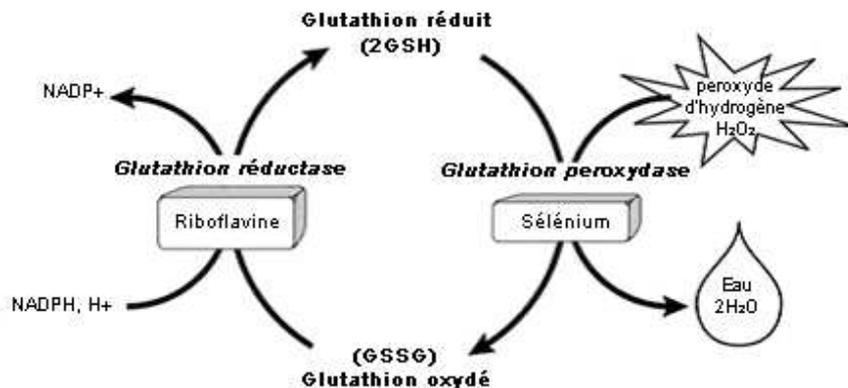


La Catalase est formée de quatre sous-unités, chaque sous-unité comporte un groupement ferriprotoporphyrine dans son site actif avec un atome de Fer à l'état  $\text{Fe}^{3+}$  et une molécule de NADPH. La fixation du NADPH par la catalase lui confère une protection contre l'attaque de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Delattre *et al.*, 2005).

La catalase et la glutathion peroxydase ont des rôles protecteurs similaires et leur contribution relative est assez variable. La catalase est surtout active lorsque le niveau de stress oxydatif est élevé ou que la quantité de glutathion peroxydase est limitée et elle joue un rôle significatif en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier (Cantin, 1999).

### II.1.3. Glutathions peroxydase ( $\text{GP}_x$ )

Le glutathion peroxydase (EC 1.11.1.19) ce sont des enzymes tétramérique à sélénium qui peuvent réduire le peroxyde d'hydrogène en eau, en utilisant les capacités réductrices du couple glutathion /glutathion disulfide (GSH/GSSG) (Matés *et al.*, 1999 ; Lacolley *et al.*, 2007).



**Figure 3** : Cycle oxydo-réducteur du glutathion (Hagen *et al.*, 1990)

Elles permettent également de limiter la propagation des réactions radicalaires en chaîne, en réduisant les peroxydes instables en acide gras hydroxylés. Ce système ne fonctionne que si le GSSG formé est continuellement réduit en GSH, ce qui est assuré par la glutathion

réductase en présence de NADPH, ce dernier pouvant être lui-même régénéré par l'intermédiaire d'un couplage métabolique avec la voie des pentoses phosphates (**Lacolley et al., 2007**).

Chez les Eucaryotes, on distingue cinq isoenzymes de la GPx qui sont présentes dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries: La GPx 1 cytoplasmique et mitochondriale, la GPx2 gastro-intestinale, la GPx3 plasmique, la GPx 4 ou PHGPx localisée à l'interface de la membrane interne du cytoplasme et la GPx5 épидidymaire. la plus abondant est la GPx 1 et elle est exprimée dans la plupart des cellules (**Delattre et al., 2005**).

A l'activité de seleno-dépendante, il faut ajouter les GSH-S-transférases, protéine sans sélénium. Ces enzymes constituent une classe formée d'un très grand nombre d'isoenzymes. Les glutathions transférases possèdent aussi une activité peroxydasique vis-à-vis des peroxydes organiques mais pas vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène (**Fisher et al., 1999**).

## **II.2. Le système antioxydant endogène non enzymatique**

Ce groupe de systèmes antioxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, l'acide lipoïque et le coenzyme Q.

### **II.2.1. Glutathion**

Le GSH est un tripeptide (L $\gamma$ glutamyl-L-cystéinyl-glycine) impliqué dans de nombreux processus au niveau intracellulaire. Son rôle dans la détoxification de xénobiotique (**Beaudeau & Geneviève, 2011**) et dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation a été bien établi (**Stamler & Slivka, 1996**).

Dans des conditions physiologiques, le glutathion sous forme réduite (GSH) représente la très grande majorité du glutathion total (90 à 98%), lors d'un stress oxydant le GSH est oxydé avec la formation de pont disulfure, GSSG, et/ou de pont disulfure mixte, GSSR (R étant fixé à un autre thiol radicalaire) (**Stamler & Slivka, 1996**). Le glutathion agit également comme cosubstrat d'enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase, glutathion réductase et transférase (**Ravi et al., 2004**). Il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydant tels que la vitamine C ou la vitamine E (**Gérard & Chaudière, 1996**).

### II.2.2. L'acide urique

Le tissu humain ne possède pas l'enzyme nécessaire à la dégradation de l'acide urique en allantoïne, c'est-à-dire l'urate oxydase: en conséquence, l'acide urique s'accumule comme produit final de catabolisme des purines, et est présent en quantité importante dans le plasma humain avant d'être éliminé par voie rénale. La perte de cette enzyme au cours de l'évolution pourrait avoir des effets bénéfiques puis qu'il a été démontré que l'acide urique possédait des propriétés antioxydantes (**Lacolley et al., 2007**). A un pH physiologique l'acide urique est majoritairement ionisé sous forme d'urate, un piègeur puissant de radicaux ( $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{ROO}^\bullet$ ,  $\text{NOO}^\bullet \dots$ ) (**Haleng et al., 2007**).

### II.2.3. Bilirubine

La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules réticuloendothéliales. Ce composé liposoluble est capable de piéger les radicaux peroxy, l'oxygène singulet et le radical hydroxyle, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (**Algeciras-Schimmich et al., 2007**). La bilirubine est oxydée par certaines espèces recyclée par la biliverdine réductase (**Halliwell & Gutteridge, 2007**).

### II.2.4. Acide lipoïque

C'est un antioxydant puissant qui peut régénérer d'autres antioxydants tels que les vitamines C et E (**David, 2015**). Il est capable de piéger le  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{ROO}^\bullet$ ,  $\text{HOCl}^\bullet$  et  $^1\text{O}_2$  (**Packer et al., 2001**), de chélater les métaux lourds, réduit la glycation et interviendrait dans la réparation de l'ADN. Il existe sous forme oxydée et sous forme réduite. Produit en petite quantité par le foie, il se trouve également dans certains aliments (la levure, la viande de bœuf, l'épinard, le brocoli...) (**Médart., 2009**).

### II.2.5. Coenzyme Q10

La coenzyme Q10 appelée ubiquinone en raison de son ubiquité dans les cellules, est un dérivé benzoquinolique avec une longue chaîne latérale isoprénique (**Haleng et al., 2007**). Elle est hautement soluble dans les lipides, et se retrouve dans la quasi-totalité de la membrane cellulaire, ainsi que les lipoprotéines (**Stargrove et al., 2008**). La CoQ10 synthétisée par l'organisme à partir du mévalonate qui est également impliqué dans la formation du cholestérol (**Roberfroid et al., 2008**). Cet antioxydant se trouve aussi dans des aliments comme les noix, le foie, les sardines, des grains complets et certains légumes.

L'action biochimique primaire de la CoQ10 est une coenzyme pour de nombreuses enzymes dans la chaîne de transport d'électrons, une série d'oxydoréduction de réaction impliquée dans la respiration cellulaire, où la présence de la coenzyme Q dans la membrane mitochondriale interne est nécessaire pour la conversion de l'énergie provenant des glucides et des lipides dans la synthèse d'ATP. (Stargrove *et al.*, 2008). La CoQ10 contribue également à prolonger l'effet antioxydant de la vitamine E. tous les processus physiologiques qui exigent une dépense énergétique requièrent la CoQ10 (Canavy *et al.*, 2014).

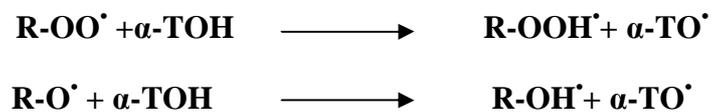
### II.3. Le système antioxydant exogène

L'organisme possède une seconde ligne de défense « les piègeurs de radicaux libres » qui sont des composés pour la plupart apportés par l'alimentation et dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des ERO, limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

#### II.3.1. Vitamine E

La vitamine E fait partie de la famille des tocophérols, cette famille comprend 4 substances ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ),  $\alpha$ -tocophérols est la forme la plus active (Cuvelier *et al.*, 2003).

Cette vitamine est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les erythrocytes chez l'homme, situé dans les lipoprotéines et dans les membranes. Tocophérol, il est capable d'une part, de piéger chimiquement l'oxygène singulet en s'oxydant en quinone, et d'autre part, de réagir avec le radical hydroxyle HO $\cdot$ . Mais son principal rôle biologique est de réagir avec les radicaux peroxydes ROO $\cdot$  pour former un radical tocophéryle (Dellatre, 2005).



Le tocophérol peut être régénéré par la vitamine C, le GSH (Chan *et al.*, 1991) et l'ubiquinone (Schin *et al.*, 1998). La régénération par l'ubiquinone s'effectue selon la réaction suivante.



### II.3.2. Vitamine C

La vitamine C Appelé aussi l'acide L-ascorbique, c'est un antioxydant hydrosoluble, qui se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire. Elle peut piéger directement l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ , le radical hydroxyle  $HO^{\cdot}$ , l'oxygène singulet et réduit le peroxyde d'hydrogène en eau via l'ascorbate peroxydase (**Evans, 2000**). En plus, elle permet la régénération de la forme non radicalaire de la vitamine E. La vit C a notamment un rôle antioxydant au niveau des tissus oculaires, en particulier la rétine, où elle participe à la dégradation du  $H_2O_2$  (**Ohla et al., 2005**). Elle peut recycler l' $\alpha$ -tocophérol pour aider à prévenir l'oxydation des lipides (**Chandan et al., 1994**). L'acide ascorbique peut agir en tant qu'un antioxydant seulement en absence de métaux de transitions sous forme libre (**Evans, 2000**).

### II.3.3. $\beta$ carotène

Le  $\beta$  carotène appartient à la grande famille des caroténoïdes, constituée de plus de 600 pigments identifiés dans de nombreux fruits et légumes, qui possèdent des propriétés antioxydantes. Le  $\beta$ -carotène est notamment capable de piéger les radicaux hydroxyles  $HO^{\cdot}$  et peroxydes  $ROO^{\cdot}$  et ainsi d'inhiber les chaînes de peroxydations lipidiques, il neutralise également l'oxygène singulet  $^1O_2$ . En outre le  $\beta$ -carotène, tout comme l' $\alpha$ -carotène et  $\beta$ -cryptoxanthine, sont des caroténoïdes précurseurs de la vitamine A (ou rétinol) chez l'homme, de sorte que le  $\beta$ -carotène est une provitamine A (**Beaudeau & Geneviève, 2011**).

### II.3.4. Sélénium

Sélénium est un élément minéral essentiel contenu à l'état de traces dans l'organisme. Il se présente sous diverses formes chimiques dans l'alimentation. Il est activement métabolisé puis incorporé de manière originale (**Roberfroid et al., 2008**). Le sélénium agit comme un cofacteur enzymatique de la glutathion peroxydase. Dans l'alimentation le sélénium organique se trouve essentiellement lié à un acide aminé, la cystéine. Le sélénium organique est mieux absorbé, il subit une métabolisation hépatique qui conduit à des intermédiaires nécessaires à la synthèse de dérivés physiologiquement actifs comme la GPx. Les aliments riches en sélénium sont notamment, les noix de Brésil, les brocolis, l'ail...etc (**Haleng et al., 2007**).

### II.3.5. Les Polyphénols

Les polyphénols sont des pigments végétaux dont les propriétés antioxydantes, les plus importants sont les flavonoïdes (**Médart., 2009**). Ils sont naturellement capables de piéger l'oxygène singulet  $^1O_2$  et le radical anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  en le dismutant en  $H_2O_2$  (**Chen et al., 2003**). Leur effet protecteur est notamment connu dans le système cardiovasculaire où ils

préviennent l'oxydation des protéines. Ils sont particulièrement présents dans certaines boissons (thé, vin rouge, bière...) ou les fruits et légumes (agrumes, carottes...) (Lehucher *et al.*, 2001).

### III. LE STRESS OXYDANT

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les pro oxydants et les antioxydants en faveur des premiers (Pincemail *et al.*, 1999), ce déséquilibre provient soit d'une production exagérée d'agents oxydants, soit d'une altération des mécanismes de défense (Morena *et al.*, 2002).

Lors d'un stress oxydant, les ERO non « détoxiquées » par le système antioxydant attaquent et endommagent les macromolécules par une oxydation directement à leur contact contenues dans les cellules, notamment les lipides, les protéines et l'ADN (Koechlin-Ramonatxo, 2006).



**Figure 4:** Déséquilibre Antioxydant /Oxydant (Morena *et al.*, 2002).

#### III.1. Conséquences biochimiques du stress oxydant

##### III.1.1. Oxydation de l'ADN

La molécule de l'ADN constitue une cible cellulaire importante pour les attaques radicalaires. Les modifications observées après l'action du radical HO<sup>°</sup> sont très nombreuses: conversion des résidus thymine en thymine glycol et 5-hydroxy méthyluracile, de la guanine en 8-hydroxy guanine, oxydation du désoxyribose entraînent une coupure des brins de la double hélice.

Ces dénaturations peuvent avoir de graves conséquences sur la réplication du génome (Leverse *et al.*, 2001) et conduisant ainsi à la mutagenèse, la carcinogénèse et la mort cellulaire (Pasquier, 1995).

### III.1.2. Oxydation des protéines

L'électron non apparié des radicaux libres peut s'attaquer à la structure de certaines protéines, en particulier les protéines porteuses d'un groupement sulfhydryle (-SH), c'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et entraîner la formation de ponts entre protéines, une fragmentation ou une dénaturation de la protéine (**Lacolley et al., 2007**).

Les protéines sont sensibles à l'action du radical HO<sup>•</sup>, celui-ci peut, en effet, réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, les plus sensibles à son action sont les acides aminés aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine, ou celui ayant un noyau imidazole comme l'histidine, sur lesquels le radical HO<sup>•</sup> s'additionne et provoque un changement de conformation de la molécule de protéine (**Pasquier, 1995**).

### III.1.3. Peroxydation des lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle HO<sup>•</sup>, qui est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, et qu'il sera oxydé en radical peroxy. Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne, car le radical peroxy formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (**Esterbauer et al., 1992**).

Les produits de dégradation des lipides sont des aldéhydes tels que le malondialdéhyde (MDA) et des hydrocarbures tels que l'éthane et l'éthylène (**Gutteridge & Halliwell, 1990**). La peroxydation lipidique dans les mitochondries entraîne des dysfonctionnements de la production d'ATP mais peut également induire l'apoptose (**Green & Reed, 1998**).

Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires. Les conséquences seront différentes: l'attaque des lipides circulants aboutissant à la formation de LDL (lipoprotéines de densité légère) oxydées qui captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, l'attaque des phospholipides membranaires modifiant la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (**Favier, 2003**).

## LA PHYTOTERAPIE

### I. Définition de la Phytothérapie

La phytothérapie correspond à l'utilisation des plantes et de leurs extraits à titre thérapeutique. La médecine traditionnelle correspond à l'utilisation de substances diverses, dont les plantes selon des règles issues de la tradition (**Boukhobza & Goetz, 2014**).

Les plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeurs thérapeutiques (**Nostro et al., 2000**).

La phytothérapie actuelle a pris ses lettres de noblesse à partir des années 1980. Elle renaît grâce à la « vague écologique » mais aussi grâce à la performance des recherches scientifiques. Ainsi la phytothérapie actuelle permet d'être une thérapeutique par elle seule ou une thérapeutique très complémentaire à la médecine la plus moderne (**Boukhobza & Goetz, 2014**).

### II. Les différents types de la phytothérapie:

#### II.1. L'aromathérapie

L'aromathérapie est une discipline utilisant les huiles essentielles provenant de plantes dites « aromatiques ». C'est une méthode naturelle (**Wichtl & Anton, 2003 ; Ricard, 2013**).

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatiles, isolées des plantes par hydrodistillation ou par expression mécanique (**Kalemba & Kunicka, 2003**). L'efficacité thérapeutique des huiles essentielles tient à leurs compositions chimiques extrêmement puissantes et complexes (**Festy & Pacchioni, 2014**).

Il existe deux groupes, qui sont caractérisés par des origines distinctes: le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (beaucoup moins fréquents) d'autre part elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (**Bruneton, 2009**).

## **II.2. La Gemmothérapie**

La gemmothérapie (du latin *gemma* : bourgeon) (**Ragot, 2011**) est une branche particulière de la phytothérapie qui utilise les bourgeons ou les jeunes pousses de diverses plantes riches en substance pharmacologiquement actives (**Schaller, 2015**).

## **II.3. L'herboristerie**

Elle correspond à la méthode de la phytothérapie la plus classique et la plus ancienne, l'herboristerie se sert de la plante fraîche ou sèche soit entière, soit une partie de celle-ci (écorce, fruit fleur). La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau: décoction, infusion, macération. Ces préparations existent aussi sous forme plus moderne de gélules de poudre de plante sèche que le sujet avale (**Besancon, 2012**).

## **II.4. Phytothérapie pharmaceutique**

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

## **III. Mode d'emploi des plantes médicinales**

Les trois principes élémentaires de préparation des plantes sont: l'infusion, la décoction, et la macération.

### **III.1. Infusion**

Consiste à verser les plantes dans l'eau bouillante, un temps plus ou moins long, trois à dix minutes. Elles sont réservées aux fleurs fragiles, aux plantes fortement aromatiques, aux graines mucilagineuses. (**Pierre & Lys, 2007**).

### **III.2. Décoction**

Les plantes sont versées dans l'eau froide et portées à ébullition un temps plus au moins long. Deux ou trois minutes pour tiges, les feuilles, les fruits, cinq minutes ou plus pour les écorces et les racines. (**Pierre & Lys, 2007**).

### **III.3. Macération**

Le liquide de macération peut être l'eau, de l'alcool, du vin, du vinaigre. Pour l'eau, les plantes sont versées dans le liquide froid ou tiède pendant quelques heures (10 ou 12 heures, en principe). Les macérations à l'eau ne doivent pas dépasser une douzaine d'heures par risque

d'oxydation et de fermentation du liquide. Pour l'alcool, le vin, le vinaigre, l'huile, cette macération peut se prolonger plusieurs jours sans inconvénient (**Pierre & Lys, 2007**).

#### **IV. Les avantages de la phytothérapie**

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

Aujourd'hui, les traitements à base des plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît, les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus.

La phytothérapie qui repose sur des remèdes naturels est bien acceptée par l'organisme, et souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques comme l'asthme ou l'arthrite (**Iserin et al., 2001**).

#### **V. Interaction et précautions d'emploi**

Certaines plantes contiennent des principes actifs qui peuvent être extrêmement puissants, d'autres sont toxiques à faible dose. Le fait que l'on n'utilise que des plantes ne signifie pas que cela est sans danger, la culture libre de certaines plantes est interdite dans certains pays.

La gravité des intoxications par les plantes dépend de nombreux facteurs : nature de la plante, partie consommée, quantité, prise à jeun ou non, âge et circonstances.

Autre effet indésirable possible: Les allergies. Certaines plantes peuvent provoquer une allergie grave de l'organisme (choc anaphylactique) nécessiter une intervention médicale immédiate. C'est le cas par exemple de *Aloe Vera*.

La prise simultanée de plantes médicinales et de médicaments peut entraîner l'interaction des deux remèdes et l'apparition d'effets secondaires, parfois graves. Les personnes qui sont sous médication (extraits thyroïdiens, insuline et antidiabétiques oraux, statine hypocholestérolémiantes) doivent le signaler pour adapter l'heure de prise et éviter les interactions (**Gayet, 2013**).

## LES POLYPHENOLS

### I. Généralité sur les métabolites secondaires

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leurs capacités à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils s'accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (**Macheix et al., 2005**).

Le terme métabolite secondaire est utilisé pour décrire une large gamme de composés chimiques dans les plantes qui ne sont pas impliqués dans les processus biochimique de la croissance et de la reproduction des plantes (**Amlan & Jyotisna, 2010**). Ils ont un rôle important dans les interactions de la plante avec son environnement tel que la protection contre les pathogènes, herbivores, la concurrence entre les plantes et le stress abiotique comme dessiccation et radiation UV (**Greathead, 2003**). Plus de 200.000 structures de métabolites secondaires ont été identifiées (**Hartmann, 2007**).

Les métabolites secondaires sont classés en trois groupes chimiques très variés :

- **Les polyphénols:** constituent le groupe de métabolites le plus large et le plus répandu du règne végétale plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues (**Marin & Andriantsitohaina, 2002**). L'élément structural fondamental qui caractérise les composés phénoliques est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel il est directement lié au moins à un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (**Bruneton, 2009**). Ce sont des pigments généralement responsables des teintes automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et fruit (jaune, orange, rouge). Ils sont présent partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Par ailleurs, les polyphénols font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale. Les principales sources alimentaires sont les fruits, légumes et les céréales...etc (**Edeas, 2007**).
- **Les terpénoïdes:** constituent un groupe de molécules très différentes tant d'un point de vue structurel que fonctionnel. Avec près de 15.000 structures moléculaires connues, ils constituent probablement la classe la plus vaste et la plus diversifiée de composés organiques végétaux. Ce sont des substances généralement lipophiles qui dérivent d'une entité simple à cinq atomes de carbones. La famille des terpènes comprend des hormones, des pigments caroténoïdes, des stérols, le latex (qui est à la base du caoutchouc naturel),

ainsi qu'une grande partie des huiles essentielles qui confèrent aux plantes leur parfum ou leur goût (**Hopkins, 2003**).

- **Les alcaloïdes:** figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine, l'intérêt qu'on leur porte reposait traditionnellement sur leur action physiologique et psychologique particulièrement violente chez l'homme. Ce sont des composés azotés au goût amer qui ont des propriétés chimiques basiques (alcalines) parmi les alcaloïdes on a morphine, coca, caféine (**Reven et al., 2000**).

## II. Structure des composés polyphénoliques

Les polyphénols peuvent se regrouper en deux grands groupes :

- **Les non flavonoïdes** dont les principaux composés sont: les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les coumarines et les xanthones.
- **Les flavonoïdes** dont on caractérise principalement : les flavones, flavanones, flavonols, isoflavonones, anthocyanines, proanthocyanidines et flavanols.

### II.1. Composés polyphénoliques non flavonoïdiques

#### II.1.1. Les acides phénoliques

Sont les principaux polyphénols alimentaires (**Watson et al., 2013**), ils sont présents dans tous les fruits et les légumes et représentent environ un tiers de la teneur totale de l'alimentation en polyphénols (**Sharma et al., 2015**).

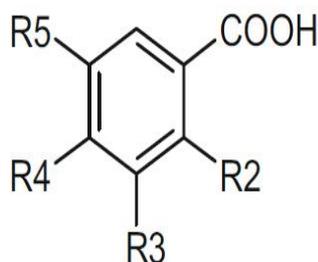
Les acides phénoliques constituent un groupe important de composés organiques naturels avec un large spectre d'activités pharmacologiques, ils possèdent des propriétés non seulement antioxydantes, mais également des propriétés antivirales et antibactériennes. L'activité anti-oxydante phénolique est généralement combinée avec des groupes hydroxyles trouvés dans leurs molécules (**Cazes, 2005**).

Les acides phénoliques existent sous deux formes: dérivés de l'acide benzoïque et dérivés de l'acide cinnamique (**watson et al., 2013**).

##### II.1.1.1. Les acides hydroxybenzoïques C6-C1

Les acides hydroxybenzoïques sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type (C6-C1) (**Macheix et al., 2005**). Les variations dans les structures de l'acide hydroxybenzoïque individuel se trouvent dans l'hydroxylation et la méthylation du cycle aromatique (**Shankar et al., 2012**). Sept acides benzoïques sont connus: acide p-hydroxy

benzoïque, acide protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicylique et gentsique (Collin & Crouzet, 2011).



composés	R2	R3	R4
Acide benzoïque (non phénolique)	H	H	H
Acide p-hydroxy benzoïque	H	H	OH
Acide protocatéchique	OH	OH	H
Acide vanillique	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Acide gallique	OH	OH	OH
Acide syringique	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Acide salicylique	H	H	H
Acide gentsique	H	H	OH

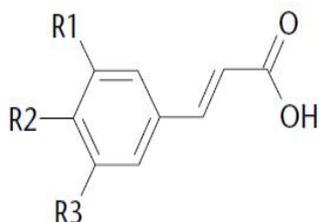
**Figure 5** : Structure de l'acide benzoïque (Chira *et al.*, 2008).

### II.1.1.2. Les acides hydroxycinnamique C6-C3

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante des polyphénols, dont la structure de base (C6-C3) dérive de celle de l'acide cinnamique. Les molécules de base de la série hydroxycinnamique : L'acide p-coumarique, caféique, férulique, et l'acide sinapique (Macheix *et al.*, 2005).

Le composé le plus courant est l'acide caféique qui représente à lui seul 75 à 100% des acides hydroxycinnamiques totaux de la plupart des fruits (D'Archivio *et al.*, 2007). Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique, et son éventuelle modification par des réactions secondaires, sont des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules (Macheix *et al.*, 2005).

En fait, les dérivés de l'acide cinnamique existent dans toutes les parties de fruits, bien que la concentration la plus élevée est présente dans les parties extérieures de fruits murs (Teixeira *et al.*, 2013).

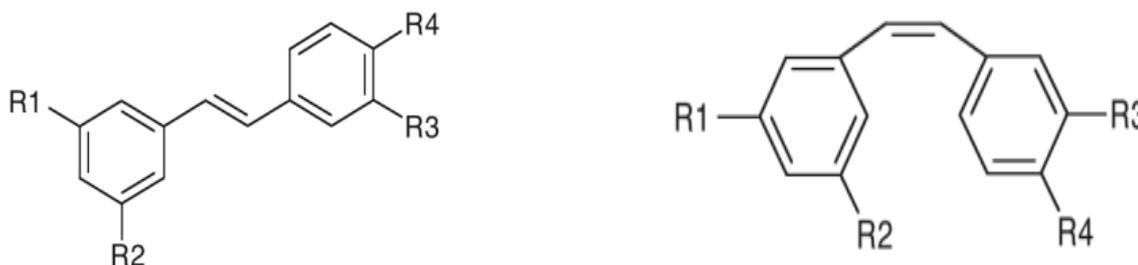


Composés	R1	R2	R3
Acide cinnamique (non phénolique)	H	H	H
Acide p-coumarique	H	OH	H
Acide caféique	OH	OH	H
Acide férulique	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Acide sinapique	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>

**Figure 6**: Structure de l'acide hydroxycinnamique (Laguerre *et al.*, 2007).

### II.1.2. Les stilbènes C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>

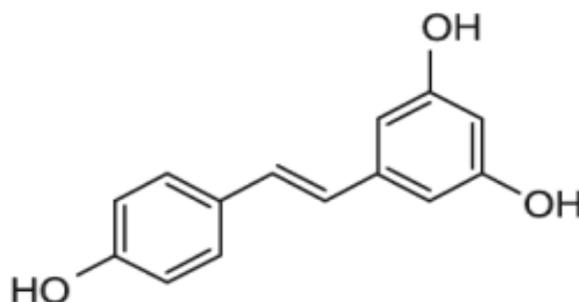
Les stilbènes font partie d'un groupe très vaste des polyphénols, celui des dérivés de l'acide cinnamique (phénylpropanoïdes). Ils sont présents dans toute les sources végétales (**Leray, 2010**). La structure chimique de base des stilbènes est composée de deux cycles aromatiques joint par un pont méthylène (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>). Les deux formes isomères des stilbènes (cis et trans) ont des propriétés chimiques et biologiques différentes (**Collin & Crouzet, 2011**).



**Figure 7** : structure de base des stilbènes(trans ou cis) (**Collin & Crouzet, 2011**).

Ils jouent un rôle important dans les mécanismes de défense constitutifs et inductibles, y compris des activités antibactériennes et antifongiques. Les stilbènes possèdent un large spectre d'effets pharmacologiques et thérapeutiques tels que l'effet anti-épileptique, anti-oxydant, anti-cancéreux, les activités anti-athérosclérose. en plus ils possèdent un effet cardioprotecteur, hépato-protecteurs et des effets neuroprotecteurs (**Ahuja & Ramawat, 2014**).

Le resvératrol est le stilbène le plus étudié, en raison de sa présence dans les produits issus du raisin (jus frais, vin) et de ses nombreuses propriétés pharmacologiques (anticancéreuses, cardioprotecteurs, antioxydantes...) (**Leray, 2010**). Il exerce son effet antioxydant par l'inhibition de la peroxydation lipidique et protège contre la cytotoxicité des LDL oxydés (**Cohen & Souied, 2014**).



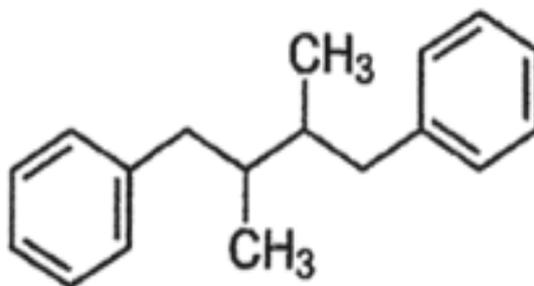
**Figure 8**: Structure de Trans-resvératrol (**Stuart & Robb, 2013**).

### II.1.3. Les lignanes (C6-C3)<sub>2</sub>

Sont un groupe de phytonutriments largement distribués dans le règne végétal (**Imran et al., 2015**). Ce sont des composés dimères formés par le couplage de deux fragments(C6-C3) monomères dérivées de la voie des phénylpropanoïdes (**Gilani & Anderson, 2002**).

Les lignanes phénoliques se trouvent dans la plupart des plantes riches en fibres, y compris les graines de citrouille, graines de sésame, les céréales, les fruits et les légumes (**Imran et al., 2015**). En fonction de la structure, les lignanes peuvent être classés en cinq familles de composés: proper lignanes, néolignanes, sesquilignanes, dineolignanes, norlignans et des lignanes hybrides (**Calvo-Flores et al., 2015**).

Les lignanes possèdent un certain nombre de propriétés utiles pour les humains, certains protègent contre l'apparition de divers cancers, tandis que d'autres sont antimitotiques, antivirales, antibactériennes, et antifongiques (**Costa et al.,1999**).

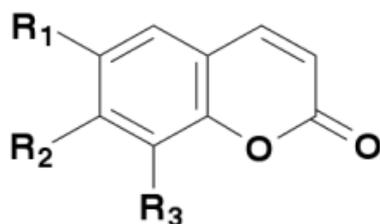


**Figure 9** : Structure de lignane (**Jost & Jost - Tse, 2016**).

### II.1.4. Les coumarines C6-C3

Les coumarines sont des composés aromatiques naturels, largement distribués dans le règne végétal, ils inhibent la croissance et la sporulation des champignons et autres micro-organismes qui sont pathogènes pour les plantes (**Edardes, 2008**).

Les coumarines ont une structure de base (C6-C3) dérivant des acides ortho-hydrocinnamiques (**Collin & Crouzet, 2011**). Différents dérivés coumariniques ont été isolés, habituellement, les substituants sont dans les positions C5, C6, C7 et C8 (par ex : l'ombelliférone, L'hierniarine, l'aesculétine, la scopolétine, l'osthenol, l'osthol...) (**Cazes, 2001**).



Composés	R1	R2	R3
Ombelliférone	H	OH	H
Herniarine	H	OCH <sub>3</sub>	H
Esculétol	OH	OH	H
Scopolétole	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Fraxétole	OCH <sub>3</sub>	OH	OH

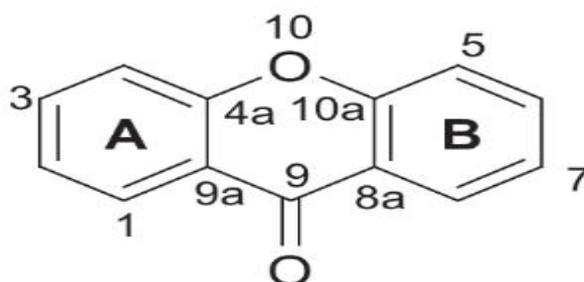
**Figure 10** : structure de coumarine (Bruneton, 2009).

### II.1.5. Les xanthones C6-C1-C6

Le xanthone terme dérivé du grec (xanthos), ce qui signifie jaune (Khan & Ather, 2006). Les xanthones sont des métabolites secondaires trouvés dans quelques plantes supérieures, les champignons et les lichens. Dans la nature, le xanthone se trouve dans des familles très restreintes de plantes, la majorité étant dans Gentianaceae et Guttiferae (Tiwari *et al.*, 2013).

La structure chimique d'un xanthone est constituée d'un système cyclique conjugué composé de carbone 1-4 (cycle aromatique A) et de carbone 5-8 (cycle aromatique B) (Kuete, 2013), et d'un système à trois anneaux qui contient plusieurs groupes fonctionnels comprenant l'isoprène, le groupe méthoxy et les groupes phényles, ainsi que des protons aromatiques, des groupes hydroxyle phénoliques, des protons hydroxyle, et les anneaux dihydrofuranne (Gongbo *et al.*, 2013).

Les xanthones peuvent être brièvement classés en cinq groupes dont xanthone simples oxygéné, prénylé, glycosides xanthone, xanthonolignoids et divers xanthones (Tiwari *et al.*, 2013), la diversité structurale et les propriétés chimiques des xanthones peuvent jouer un rôle majeur dans la prévention, y compris les activités anti-inflammatoires, antioxydantes, et anticancéreuses (Gongbo *et al.*, 2013).

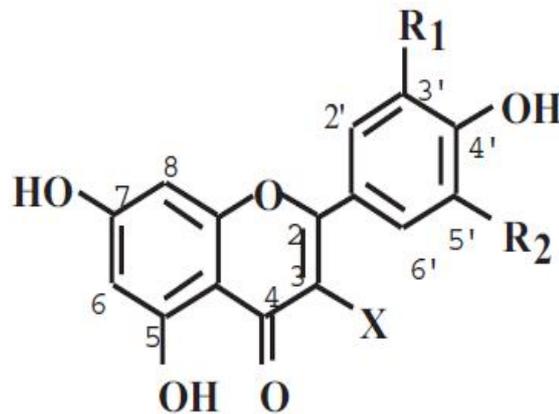


**Figure 11** : Structure de xanthone (Kuete, 2013).

## II.2. Composés polyphénoliques flavonoïdiques

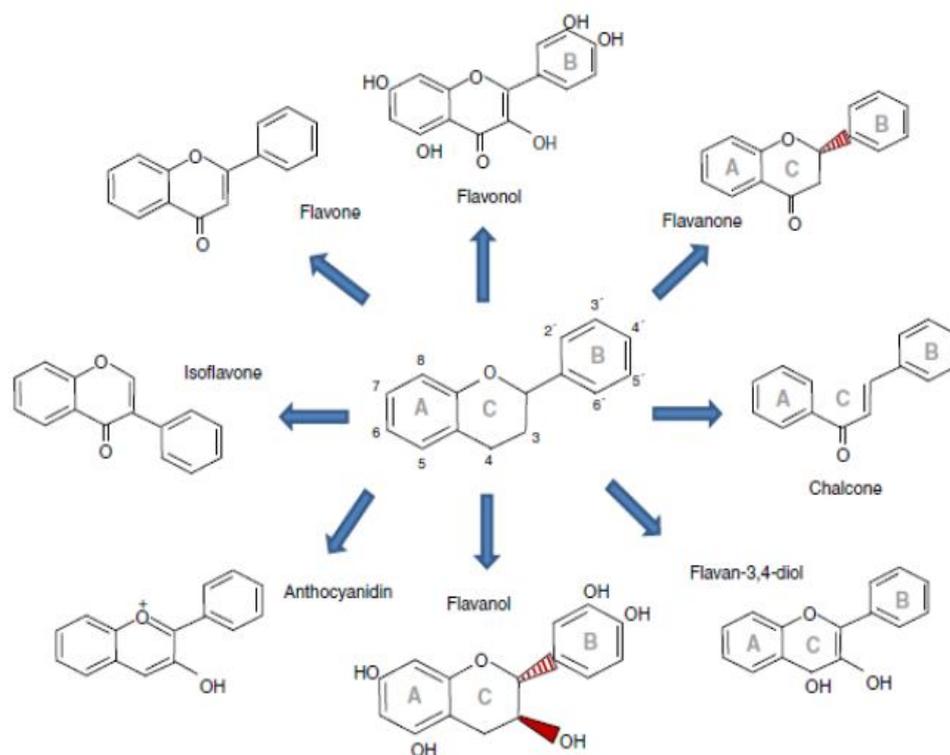
Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes (**Guignard, 1996**).

Les flavonoïdes sont formés d'un squelette à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6) correspondant à la structure du diphenylpropane (**Collin & Crouzet, 2011**). Ils sont constitués d'un cycle benzoïque présentant plusieurs groupements hydroxyles et pour cette raison ils sont nommés polyphénols. Ces groupements hydroxyles sont responsables de la fonction antioxydante des polyphénols (**Descheemaeker & provoost, 1999**).



**Figure 12** : Structure de base des flavonoïdes (**Lugasi et al., 2003**).

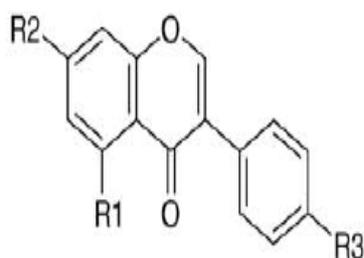
Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés chez les plantes. La liste de ces derniers est en croissance continue. Ceci est dû à la survenance de nombreux modèles dans les quelle les substitutions primaires (comme le groupe hydroxyle) peuvent être substitués (glycosylés ou acylés) et parfois créés des structures très complexe (**D'Archivio et al., 2007**). Les Principales classes des flavonoïdes sont : les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les isoflavones et les anthocyanes, ils varient dans leurs caractéristiques structurelles par la diversité fonctionnelle autour de l'oxygénation de l'hétérocycle.



**Figure 13 :** Les structures chimiques des principales familles des flavonoïdes (Fraga & Oteiza, 2011).

### II.2.1. Les isoflavones

Les isoflavones ont des similitudes structurales avec les oestrogènes, à savoir des groupes hydroxyles dans les positions C7 et C4, comme molécule d'oestradiol. Ils peuvent se lier à l'oestrogène récepteur et sont classés ainsi que les phytoestrogènes. Les isoflavones sont contenues presque exclusivement dans les légumineuses (Tapas *et al.*, 2008 ; D'Archivio *et al.*, 2007).

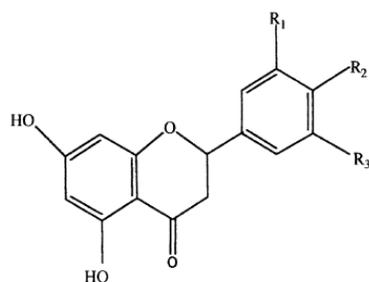


composés	R1	R2	R3
Biochanin	OH	OH	OCH <sub>3</sub>
Sissotrin	OH	7-O-GLU	OCH <sub>3</sub>
Genistein	OH	OH	OH
Genistin	OH	7-O-GLU	OH
Formononetin	H	OH	OCH <sub>3</sub>
Ononin	H	7-O-Glu	OCH <sub>3</sub>
Daidzein	H	OH	H
Daidzin	H	7-O-Glu	OH

**Figure 14:** Structure des isoflavones (Rijik *et al.*, 2006).

## II.2.2 Les flavanones

Les flavanones sont caractérisés par la présence d'un hétérocycle saturé à trois carbones en chaîne et un atome d'oxygène dans la C4. Ils sont généralement glycosylé par un disaccharide en C7. Les flavanones sont présents en haute dans les agrumes, mais ils sont également trouvé dans les tomates et certaines plantes aromatiques tels que la menthe (**Tapas et al., 2008**).

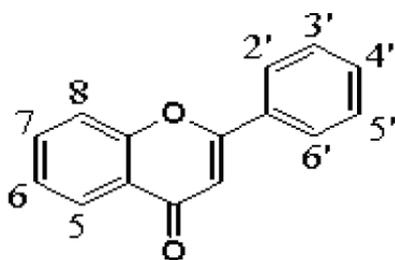


Composés	R1	R2	R3
Hesperetin	H	OCH <sub>3</sub>	OH
Naringenin	H	OH	H
Eriodictyol	H	OH	OH

**Figure 15** : Structure des flavanones (**O'connell & Fox, 2001**).

## II.2.3. Les flavones

Les flavones sont structurellement très proches des flavonols, la différence provenant de l'absence de l'hydroxyle en C3. Il existe aussi de très nombreuses substitutions des flavones, telles que l'hydroxylation, la méthylation, les O- et C- alkylation et glycosylation. Les flavones étant principalement trouvés sous forme de glucosides (**Chira et al., 2008**).

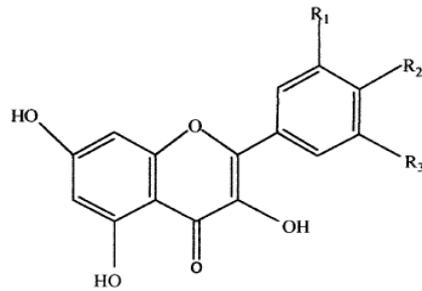


Composés	5	7	4'	3'
Apigenin	OH	OH	OH	--
Luteolin	OH	OH	OH	OH

**Figure 16**: Structure des flavones (**yordi et al., 2012**).

## II.2.4. Les Flavonols

Appartiennent à la sous famille des flavonoïdes, dans lesquels le cycle c'est un hétérocycle saturé avec un groupe hydroxyle en position 4. Ils peuvent avoir un groupe OH ou OCH<sub>3</sub> en haut à trois positions dans le noyau B (**Fraga & Oteiza, 2011**).



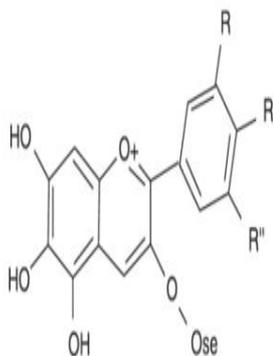
Composés	R1	R2	R3
Quercetin	H	OH	OH
Kaempferol	H	OH	H
Myricetin	OH	OH	OH

**Figure 17** : Structure des flavonols (O'connell & Fox, 2001).

### II.2.5. Les anthocyanes

Les anthocyanes (en grec anthos fleur et cyan bleu) (Valls *et al.*, 2009) sont des métabolites secondaires de la famille des flavonoïdes, produits par les angiospermes. Ce sont des pigments colorés responsables de la pigmentation des fleurs, des fruits et des grains (Samouelian *et al.*, 2003), mais aussi jouent un rôle important dans la physiologie végétale comme attracteurs des insectes dans la dispersion des grains (Shipp *et al.*, 2010).

Les anthocyanes possèdent une structure de base, le 2-phényl-1-benzopyrylium (cation flavylium) constituée de trois cycles aromatiques, responsable du pouvoir absorbant (chromophore). Cette structure porte plusieurs fonctions hydroxyles dont l'une est glycosylée par des différents oses (glucose, galactose, rhamnose, arabinose), omigosides ou hétérosides (Samouelian *et al.*, 2009).



Pigment	R	R'	R''	Couleur
Pélagonidine	H	OH	H	Rouge
Cyanidine	H	OH	OH	Bleu
Delphinidine	OH	OH	OH	Pourpre
Péonidine	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Rose
Pétunidine	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	Pourpre
Malvidine	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Mauve

**Figure 18** : Structure de base des anthocyanes (Samouelian *et al.*, 2009).

### II.2.6. Les tanins

Le terme tanin provient d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour «tanner» les peaux d'animaux, autrement dit pour transformer une peau en cuir. Ces extraits

contiennent des dérivés phénoliques qui se lient aux protéines et donc les dénaturent (**Hopkins, 2003**).

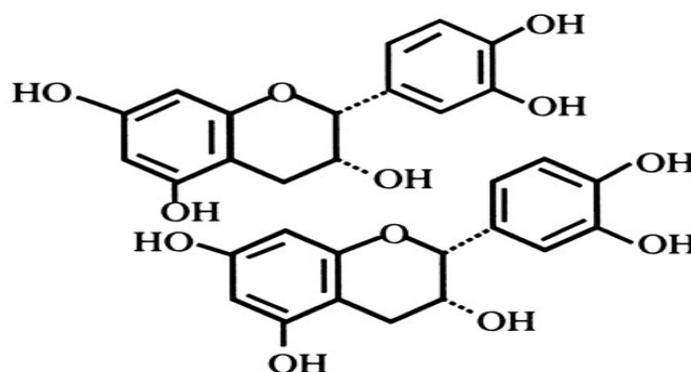
Les tanins sont des composés polyphénoliques, hydrosolubles, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 (**Gazengel & Orecchioni, 2013**). Ce sont des molécules fortement hydroxylées et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux (**Alkurd et al., 2008**).

Chez les végétaux supérieurs, il existe deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique :

### II.2.6.1. Les tanins condensés

Les tanins condensés (Tannins vrais ou tannoïdes) résultent de la condensation de molécules élémentaires de type flavane 3-ol (catéchines) ou flavane 3-4 diols (leucoanthocyanidines). Les liaisons formées sont de type carbone-carbone ce qui rend ces molécules difficilement hydrolysables. Les tannins condensés sont également appelés proanthocyanidines ; en effet leur oxydation en milieu alcool-acide à chaud entraîne la formation de pigments anthocyaniques tels que cyanidine et delphinidine. Ce type de molécules dotées de propriétés remarquables chez les plantes qui en sont pourvues (**Merghem, 2009**).

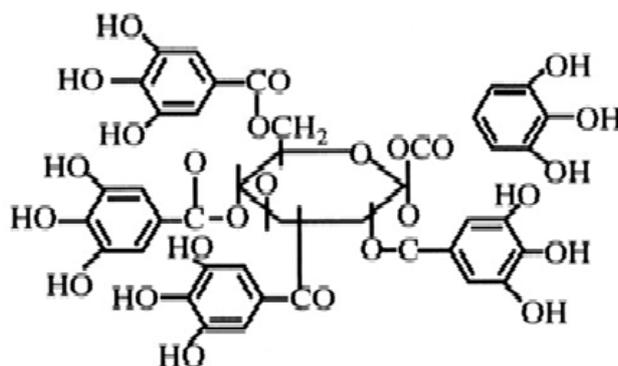
Les tanins condensés sont présents dans les vacuoles d'un réseau de cellules spécialisées, situées sous l'épiderme des feuilles et des tiges de certaines légumineuses tempérées (sainfoin, loier corniculé ou pédonculé) et tropicales herbacées (*Lespedeza sericea*, *des-modium intortum*) et arbustives, ainsi que dans les feuilles d'arbustes fourragers ...etc (**Jarrige et al., 1995**).



**Figure 19:** Structure de tanins condensés (**Cowan, 1999**).

### II.2.6.2. Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables, ou acide tannique, sont des polymères de l'acide gallique ou de son produit de condensation, l'acide ellagique. Ils ont un poids moléculaire plus faible (de 500 à 3000) et précipitent beaucoup moins les protéines que les tanins condensés (Jarrige *et al.*, 1995).



**Figure 20** : Structure de tanins hydrolysable (Cowan, 1999).

## III. Biosynthèse des polyphénols

Les composés phénoliques sont principalement synthétisés à partir des hydrates de carbone via la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate malonate (Chira *et al.*, 2008).

### III.1. La voie de Shikimate

C'est la voie de biosynthèse principale des composés aromatique (Kening *et al.*, 1995) dans les plantes et les micro-organisme, y compris les acide aminés aromatique : la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Ce sont des métabolites primaires qui servent de précurseurs pour de nombreux de produits naturels (secondaire) tel que les flavonoïdes, les acide phénoliques, les coumarines, les alcaloïdes... (Ghasemzadeh & Ghasemzadeh, 2001).

### III.2. La voie de l'acétate malonate

Ce mode de formation plus secondaire consiste à la cyclisation des chaînes polycétonique, elles-mêmes obtenus par condensation de groupement acétates. La condensation des groupements acétates ne se fait qu'après carboxylation de l'acétyl CoA en malonylCoA.

Chez les flavonoïdes, les anthocyanes, le cycle benzénique latéral (A) provient de l'enchaînement de 3 acétyl-COA (**Merghem, 2009**).

#### **IV. Propriétés biologique et intérêt des polyphénols**

Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment grâce à leurs propriétés et ces effets bénéfiques sur la santé des êtres humains ou chez les végétaux.

##### **IV.1. Chez les végétaux**

Les composés phénoliques sont des pigments responsables des teintes automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et fruits (jaune, orange, rouge) (**Edeas, 2007**).

Ils jouent un rôle important dans l'interaction de la plante avec son environnement, en particulier contre les radiation UV, le stress oxydatif, les attaques microbiennes (**Moheb et al., 2011**). Ils sont impliqués aussi dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits (**Biozot & Charpentier, 2006**).

##### **IV.2. Chez l'être humain**

La consommation d'aliments riches en polyphénols réduit le développement de nombreuses pathologies, telles que le cancer, l'ischémie cardiaque, l'athérosclérose et l'hypertension Cela peut-être expliqué par le fait que ces composés ont la capacité de modifier de nombreux facteurs impliqués dans la genèse de ces maladies (**Martin & Andriantsitohaina, 2002**).

Ces composés montrent des activités anticancéreuses, antivirales, antibactériennes, (**Babar et al., 2007**), Antiallergique, antiathérogène, antioxydant, anti-inflammatoire, anti-thrombotiques, cardioprotecteur et les effets vasodilatateurs (**Falleh et al., 2008**).

Leurs propriétés sont liées au fait qu'ils peuvent moduler l'activité de nombreuses protéines intracellulaires (les protéines kinases, les phospholipases, l'adénylate cyclase, les ATPases, les cyclo-oxygénases (COX), les NOS ou le cytochrome P450) et agir sur différents types cellulaires (**Martin & Andriantsitohaina, 2002**).

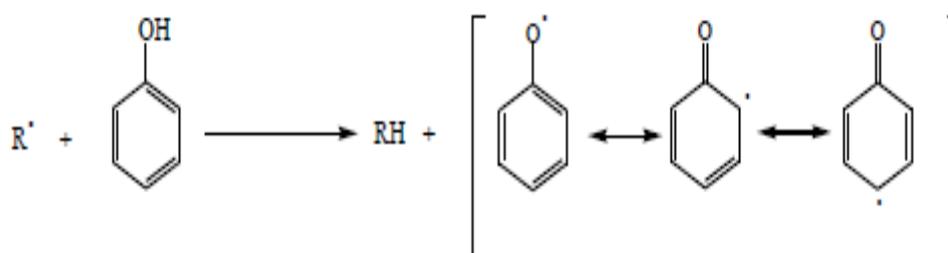
##### **IV.2.1. Activité antioxydante**

Les antioxydants sont classés selon leur mode d'action : éliminateurs de radicaux libres, chélateurs d'ions métalliques, piègeurs d'oxygène dans des systèmes fermés. Les polyphénols,

naturellement présents dans les aliments ou formés au cours des procédés de transformation sont considérés comme éliminateurs des radicaux libres (**Chew *et al.*, 2009**).

#### IV.2.1.1. Piégeage des radicaux libres

Les composés phénoliques ont des propriétés antioxydantes en raison de leur capacité à piéger les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène, le processus est radicalaire (**Sökmen *et al.*, 2012**). Ils interfèrent avec l'oxydation des lipides et d'autres molécules par la donation rapide d'un atome d'hydrogène aux radicaux libres selon un mécanisme proposé dès 1976 par Sherwin : l'antioxydant cède formellement un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un radical intermédiaire. Il est stabilisé par ses structures mésomères conjuguées (**Sökmen *et al.*, 2012**).



**Figure 21:** Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques.

Les radicaux intermédiaires phénoxy ( $PO^{\bullet}$ ) sont relativement stables en raison de la résonance et donc une nouvelle réaction en chaîne n'est pas facile à initié (**Dai & Mumper, 2010**). Par ailleurs, ils peuvent agir avec d'autres radicaux libres selon la réaction:

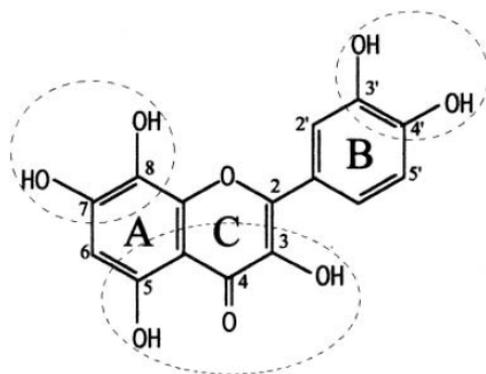


Les composés phénoliques possèdent une structure chimique idéale pour le piégeage des radicaux libres, parce qu'ils possèdent:

- Des groupes phénoliques hydroxyles qui sont susceptibles de donner un atome d'hydrogène ou un électron au radical libre.
- Un système aromatique stabilisé par la résonance (**Dai & Mumper, 2010**).

Les flavonoïdes en général et les flavan-3-ols en particulier sont de bons piégeurs des radicaux libres (**Fraga, 2007**). A cause la présence de 3',4'-dihydroxy et la présence du groupe

*o*-dihydroxy (structure des catéchol) sur le noyau aromatique B; ils possèdent la propriété de donneur d'électrons. En outre, la présence du 3-OH du cycle C est également bénéfique pour l'activité antioxydante des flavonoïdes. La présence de la double liaison C2-C3 conjuguée avec le groupe 4-céto est responsable de la délocalisation des électrons du noyau B, ce qui améliore encore l'activité antiradicalaire (Amic *et al.*, 2003).



**Figure 22:** Les caractéristiques structurales des flavonoïdes avec une activité de piégeage des radicaux libres élevée (Amic *et al.*, 2003)

#### IV.2.1.2. Chélation des ions métalliques

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

Les Composés phénoliques avec catécholates et groupes gallate peut inhiber le métal-induit la formation du radical oxygène soit par coordination avec le  $\text{Fe}^{2+}$  et le renforcement de l'auto-oxydation de  $\text{Fe}^{2+}$  soit par la formation de complexe inactif avec le  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ou le  $\text{Cu}^+$  relativement avec faible interaction (Yoshino *et al.*, 1998 ; Perron & Brumaghin, 2009).



La chélation des ions métalliques par les flavonoïdes nécessite trois sites principaux :

- Noyau catéchol sur le cycle B
- Les groupe 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C
- Le groupe 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycle A et C (Heim *et al.*, 2002 ; Pietta, 2000).

A titre d'exemple ; la quercétine et la myricétine répondent à tous ces critères nécessaires pour avoir une activité antiradicalaire efficace et importante (**Middleton et al., 2000**).

#### IV.2.1.3. Inhibition enzymatique

En raison de la présence de multiples fonctionnalités phénol, ils interagissent avec les protéines si fortement, que la précipitation des complexes protéines-polyphénols se produit fréquemment, ce qui est la base de leur utilisation dans le processus de tannage du cuir (**Handique & Baruah, 2002**). Les phénomènes d'interaction polyphénols-protéines ont été largement étudiés *in vitro*, particulièrement dans le cas des flavonoïdes (**Rolo-Naranjo et al., 2009**). Afin de préciser le mécanisme d'action de l'activité inhibitrice des flavonoïdes, des études ont été réalisées sur l'effet de la quercétine sur l'oxydation de l'acide linoléique par une lipoxygénase. Ces auteurs ont constaté que le mécanisme d'inhibition des lipoxygénases par la quercétine ne serait pas dû à une complexation ou à une oxydation du  $Fe^{2+}$ , mais plutôt à une inhibition irréversible résultant de liaisons covalentes entre l'enzyme et les dérivés oxydés de la quercétine (quinone ou radical phénoxy) (**Chebil, 2006**).

#### IV.2.2. Activité anti bactérienne

Les polyphénols sont doués d'activité antibactériennes importantes et diverses, probablement dû à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité (**Cowan, 1999**). Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés plus ils sont inhibiteurs des microorganismes (**Scalbert, 1991**). Les flavane-3-ols, les flavonols et les tanins ont reçu plus d'attention du à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols. (**Daglia, 2011**).

Ces composés jouent un rôle inhibiteur, ils n'agissent pas sur la paroi bactérienne mais plutôt sur un mécanisme interne. Ces composés sont supposés agir sur l'ADN, l'ARN et la synthèse protéique (**Ulanowska et al., 2008**). Ils possèdent une capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne telle que l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes ainsi qu'à leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques (**Daglia, 2011**).

#### IV.2.3. Activité anti inflammatoire

De nombreuses études indiquent que les polyphénols notamment les flavonoïdes possèdent des propriétés anti inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (**González-Gallego *et al.*, 2007**). D'autres flavonoïdes sont capables d'inhiber l'histamine (**Kim *et al.*, 2004**). Les flavones et les flavonols sous forme glycosylée ou libre comme la quercétine, kaempférol, myricétine ont une activité inhibitrice de la cyclooxygénase COX (**Tapas *et al.*, 2008**).

#### IV.2.4. Activité anti tumorale

Le développement d'un cancer est un processus lent, constitué de plusieurs phases (initiation, promotion, progression et invasion) dans lesquelles les radicaux libres oxygénés et des composés carcinogènes jouent un rôle primordial : ils modifient la structure et l'expression de certains gènes dont le rôle est de contrôler le fonctionnement normal de la cellule (**Suschetet *et al.*, 1996 ; Alberts *et al.*, 1999**). Par leur action antioxydante puissante, les polyphénols pourraient donc produire leur effet anti-cancer.

Les stilbènes notamment le resvératrol possède agit sur la carcinogénèse en présentant des actions au niveau des trois stades de ce processus : la phase d'initiation, la phase de promotion et la phase de progression. De plus, il supprime les phases finales de la carcinogénèse telles que l'angiogénèse et les métastases (**Delmas *et al.*, 2006**). Le resvératrol joue un double rôle car il peut prévenir de la formation de cancers mais permet aussi de lutter contre un cancer déjà déclaré (**Kundu & Surh, 2008**). A faible dose, le resvératrol a la propriété de potentialiser l'effet des chimiothérapies traditionnelles (**Delmas *et al.*, 2006**).

#### IV.2.5. Activité anti cardiovasculaire

Diverses études épidémiologiques ont montré qu'il existe une corrélation inverse entre la consommation d'aliments riches en polyphénols et le risque de développement des maladies cardiovasculaires (**Visioli *et al.*, 2000 ; Arts & Hollman, 2005**). Au niveau des artères, ces molécules préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) (**Yamanaka, 1996**) évitant ainsi l'athérosclérose (épaississement des artères qui contribue à réduire le flux sanguins et peut conduire à l'asphyxie des tissus irrigués). Les polyphénols inhibent aussi l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose, qui induit l'occlusion des artères. Ainsi

en prévenant l'athérosclérose et les risques de thrombose, ces composés limitent les risques d'infarctus du myocarde (**Rein et al., 2000**).

D'après de récentes données probantes, certains polyphénols sous forme purifiée, y compris le resvératrol, et la naringénine, ont des effets bénéfiques sur la dyslipidémie chez les modèles humains ou animaux. Un traitement à la naringénine atténuait l'athérosclérose en corrigeant la dyslipidémie (**Mulvihill & Huff, 2000**).

#### **IV.2.6. Activité anti diabétique**

Des travaux multiples ont démontré les bienfaits des polyphénols sur les troubles et les complications métaboliques induites par le diabète. Les produits riches en polyphénols peuvent moduler le métabolisme des glucides et des lipides, atténuer l'hyperglycémie, la dyslipidémie et la résistance à l'insuline, améliorer le métabolisme du tissu adipeux, et atténuer le stress oxydatif et les voies de signalisation sensibles au stress et les processus inflammatoires (**Bahadoran et al., 2013**).

Les effets antidiabétogènes et cytoprotecteurs des extraits de flavonoïdes notamment la quercétine se traduit par un effet significativement positif sur l'insulinosécrétion des cellules  $\beta$  et la glycémie. Cet effet est dû au pouvoir antioxydant et cytoprotecteur des composés phénoliques et à la réduction de la production du MDA en empêchant donc la lipoperoxydation et la normalisation du niveau cytosolique des systèmes antioxydants (SOD, CAT et GSH) (**Kebièche et al., 2011**).

Les composés polyphénoliques peuvent également prévenir la santé avec d'autres activités : activité sur les maladies neurodégénératives, activité insecticide, activité anti virale, anti parasitaires...etc.

# **Matériels et méthodes**

## **MATERIEL ET METHODES**

### **I. MATERIELS**

#### **I.1. Matériel végétal**

##### **I.1.1. Récolte de la plante**

La plante est récoltée à la fin du mois de Mai 2015 dans la région saharienne de Boussaâda. L'échantillon est ensuite lavé puis séché à l'air libre et à l'ombre pendant 21 jours. Devenue sèche, la partie aérienne de la plante est récupérée, stockée dans des bocaux fermés hermétiquement et placée dans un endroit à l'abri de la lumière et de la chaleur avant son utilisation.

##### **I.1.2. Préparation des extraits.**

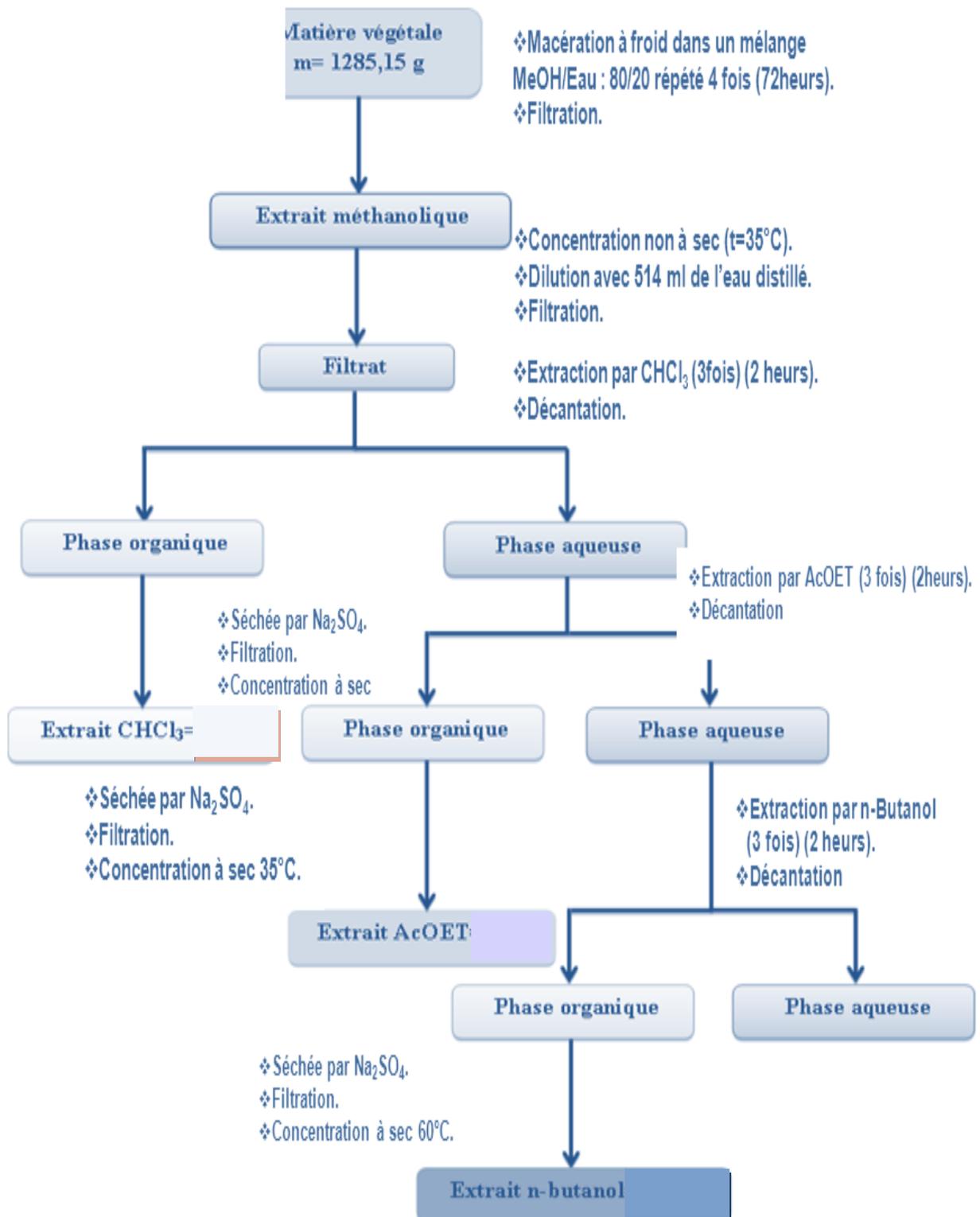
Les différentes étapes de la préparation des phases chloroformique, acétate d'éthyle et *n*-butanolique de la partie aérienne du plante sont réalisées au niveau de l'unité de recherche : Valorisation des Ressources Naturelles et Analyses Physico-Chimiques et Biologiques, Faculté des Science Exactes, Université Mentouri et selon la méthode suivante :

La quantité de matériel végétal obtenue (1285,15g) a subit une macération dans un mélange hydroalcoolique (Ethanol/Eau ; 70 : 30 ; v/v) pendant 72 heures. Le premier extrait récupéré est concentré sous pression réduite et une température modérée (environ 35 °C). La macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas de 24 à 48 heures.

Les trois extraits hydroalcooliques récupérés sont réunis et concentrés. A la solution concentrée obtenue, on ajoute sous agitation magnétique 260 ml d'eau distillée et du tétraacétate de plomb  $Pb(OAc)_4$  jusqu'à disparition de la coloration verte au profit d'une coloration marron. La solution ainsi obtenue est laissée au repos à froid pendant une nuit pour décantation. Cette décantation permet le dépôt de la chlorophylle, des cires, du sable...etc.

Après filtration on obtient une solution aqueuse claire. Cette phase aqueuse subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol.

Les trois phases organiques récupérées sont séchées avec du  $Na_2SO_4$  anhydre puis filtrées, concentrées sous pression réduite à sec et pesées.



**Figure23:** les étapes de préparation des différentes phases de la plante (Harborne, 1967).

## **I.2. Réactifs**

Les solvants organiques utilisés dans les différents compartiments de cette étude sont de grade analytique (Le méthanol, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol) ont été fournis par *Sigma- Aldrich*.

Les différents acides sont : Le Trichloroacide Acétique (TCA), l'acide sulfurique et l'acide ascorbique sont achetés de *Biochem*, et l'acide gallique de *Sigma*.

Les réactifs chimiques sont le DPPH diphénylpicryl  $\beta$  hydrazyl, le Molybdate d'ammonium, le Ferricyanide de Potassium et le trichlorure d'aluminium ont été fournis par *Sigma-Aldrich*, le Folin-Ciocalteu (FCR) par *Biochem*.

Les sels sont: Bicarbonate de sodium, Chlorure de Sodium (NaCl), potassium Phosphate dibasique ( $K_2HPO_4$ ), Phosphate de potassium monobasique ( $KH_2PO_4$ ) de *Sigma*. D'autres produits chimiques utilisés : la quercétine, le Chlorure de fer ( $FeCl_3$ ) par *Sigma-Aldrich*, le butylhydroxytoluène (BHT) et le BHA par *Fluka*.

## **I.3. Appareils**

- Centrifugeuse *Sigma*.
- pH-mètre *Hanna*.
- Spectrophotomètre.
- Bain mariememett.
- *Balance*

## **II. METHODES**

### **II.1. Méthodes de caractérisation quantitative des polyphénols**

La caractérisation quantitative des différentes phases de la plantes a été réalisée de la manière suivante :

#### **II.1.1. Dosage des polyphénols totaux**

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit en 1965 par Singleton et Rossi. Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines plus diverses.

##### **II.1.1.1.Principe**

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleu de tungstène et de

molybdène (**Ribéreau, 1968**). La coloration produite, dont l'absorption maximum à environ 760-765 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Boizot & Charpentier, 2006**).

#### **II.1.1.2.Méthode de dosage**

Les polyphénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie, suivant le protocole appliqué en 2006 par Wong et ses collaborateurs.

125 µl d'extrait végétal dilué dans le méthanol est mélangé avec 500 µl d'eau distillés et 125 µL de réactif de Folin-Ciocalteu (FCR). Après 5 minutes, 1250 µl de 2% decarbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) et 1000 µl d'eau distillée sont ajoutés. Après une incubation du mélange réactionnel pendant 90 minutes à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 760 nm.

La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations (0-500 µg/ml), dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage. Les résultats sont ainsi exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par 1g poids sec de l'extrait (mg EAG/1g EXS). Toutes les mesures sont répétées 3 fois.

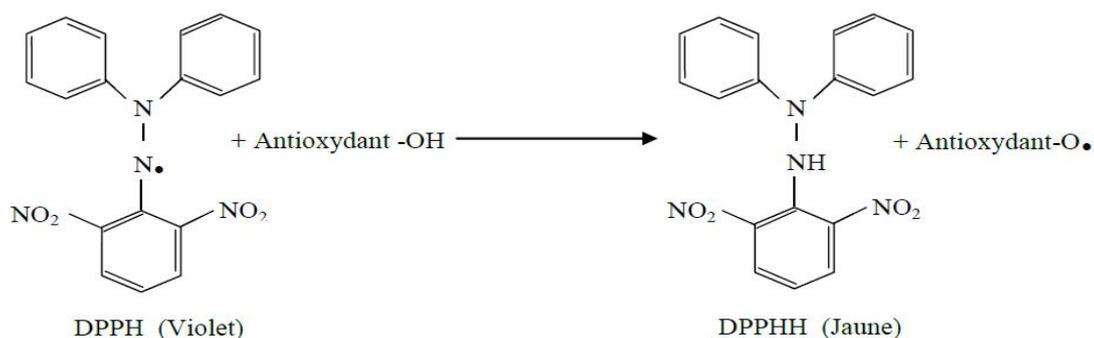
### **II.2. Méthodes de dosage des activités antioxydantes *in vitro***

#### **II.2.1. Le test de piégeage du radical DPPH**

##### **II.2.1.1. Principe**

Le test DPPH (diphénylpicrylhydrazyl) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante.

En effet, le DPPH se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. La présence de ces radicaux DPPH<sup>•</sup> donne lieu à une coloration violette foncée de la solution. La réduction des radicaux DPPH<sup>•</sup> par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution (**Molyneux, 2004**). Le changement de couleur peut être suivie par spectrophotométrie à 517nm et de cette façon le potentiel antioxydant d'une substance ou un extrait de plante peut être déterminée (**Popovici et al., 2010 ; Molyneux, 2004**).



**Figure 24 :** Equation du radical DPPH transformé en DPPH (Talbi *et al.*, 2015).

Notons que compte tenu de la solubilité en milieu organique du DPPH, cette méthode est plus adaptée pour les dosages qui se déroulent en milieu alcoolique (méthanol et éthanol).

### II.2.1.2. Méthode de dosage

Dans notre étude, ce test a été évalué suivant le protocole appliqué en 2007 par Kuramasamy et ses collaborateurs. Brièvement, 1 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,2 mM) a été mélangé avec 1ml de différentes dilutions des extraits de plante (0-1 mg/ml). Le mélange obtenu est ensuite gardé à l'abri de la lumière à la température ambiante pendant 30 minutes. Puis l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un témoin composé de 1ml de la solution de DPPH et de 1ml de méthanol.

Les échantillons, les témoins (l'acide ascorbique, la quercétine, le BHA, le BHT, et le torolox) et le banc sont préparés dans les mêmes conditions opératoires. La décroissance de l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre et le % PI (pourcentage d'inhibition) est calculé suivant la formule ci-dessous :

$$\% \text{ PI} = \frac{\text{Densité optique de blanc} - \text{Densité optique de l'échantillon}}{\text{Densité optique de blanc}} \times 100$$

La réalisation de la cinétique de cette activité permet de déterminer les concentrations qui correspondent à 50 % d'inhibition (IC<sub>50</sub>); la valeur d'IC<sub>50</sub> la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée. La valeur de l'IC<sub>50</sub> est exprimée en µg/ml (3 répétitions pour chaque concentration).

## II.2.2. Dosage de la capacité antioxydante totale « test de phosphomolybdate »

Le test du PPM (PhosphoMolybdate) est une variante du test au DPPH. Au cours de ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé réducteur (extrait-antioxydant) vers le complexe oxydant (PPM). Ce transfert dépend du potentiel redox, du pH du milieu et de la structure du composé antioxydant.

### II.2.2.1. Principe

Le test est basé sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate  $\text{MoO}_4^{2-}$  à molybdène Mo (V)  $\text{MoO}^{2+}$  en présence de l'extrait ou d'un agent antioxydant. Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/Mo (V) à un pH acide (Prieto *et al.*, 1999). On mesure l'augmentation de la coloration du complexe molybdène (VI) en présence d'antioxydant. A la différence des autres tests, ce test permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des polyphénols mais aussi d'autres composés antioxydants tel que les vitamines (C, E...).

### II.2.2.2. Méthode de dosage

La méthode consiste à introduire dans un tube 200  $\mu\text{l}$  de chaque extrait à différentes concentrations mélangés à 2000  $\mu\text{l}$  d'un réactif composé de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,6 M), de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Le tube est ensuite bien fermé puis incubé à 95°C pendant 90 minutes. Après les avoir refroidis, l'absorbance est mesurée à 695 nm. Le témoin est constitué de 200  $\mu\text{l}$  de méthanol mélangé avec 2000  $\mu\text{l}$  du réactif mentionné ci-dessus.

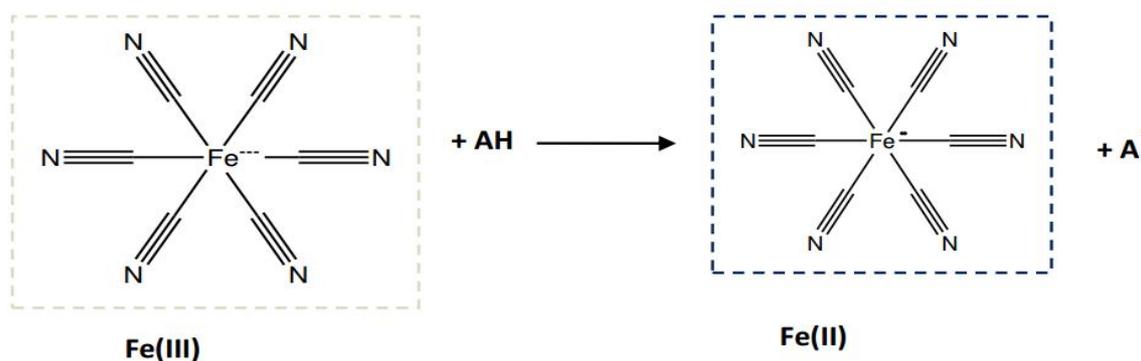
Les échantillons et les témoins sont incubés dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent acide ascorbique par gramme de matière sèche de l'extrait (mg EAA/g EXS).

## II.2.3. Dosage du pouvoir réducteur « FRAP »

### II.2.3.1. Principe

La méthode FRAP est basée sur la réduction de l'ion ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en ion ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Cette méthode évalue le pouvoir réducteur des composés (Ou *et al.*, 2001).

La présence des réducteurs (AH) dans les extraits des plantes provoque la réduction de  $\text{Fe}^{3+}$ / complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, le  $\text{Fe}^{2+}$  peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu cyanée dans le milieu réactionnel à 700 nm (Chung *et al.*, 2002). En effet, le système  $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  confère à la méthode la sensibilité pour la détermination «semi quantitative» des concentrations des antioxydants, qui participent à la réaction redox (Amarowicz *et al.*, 2004).



**Figure 25** : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe ferricyanide ferrique Fe (III) et un antioxydant (AH)

### II.2.3.2. Méthode de dosage

Le protocole utilisé au laboratoire est basé sur celui décrit par Oyaizu, 1986. Dans un tube à essai en verre contenant 200  $\mu\text{l}$  de solution d'échantillon à différentes concentrations, ont été ajoutés 500  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate (0,2M : pH 6,6) puis 500  $\mu\text{l}$  de potassium hexacyanoferrate [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] 1% dans l'eau distillée. L'ensemble est chauffé à 50°C au bain marie pendant 20 minutes. Un volume de 500  $\mu\text{l}$  d'acide trichloracétique (10%) est ensuite ajouté et le mélange est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes. Un aliquote de 500  $\mu\text{L}$  de surnageant est transféré dans un autre tube auquel ont été ajoutés 500  $\mu\text{l}$  d'eau distillée et 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{FeCl}_3$  1% fraîchement préparé dans de l'eau distillée. Un blanc sans échantillon est préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par méthanol.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par le méthanol qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre). Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

### **III. EVALUATION STATISTIQUE**

Les courbes et les histogrammes sont tracés par le Microsoft Excel 2007. Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type,  $n = 3$ . Les valeurs d'IC50 (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition =  $f$ (concentrations)].

# **Résultats et Discussion**

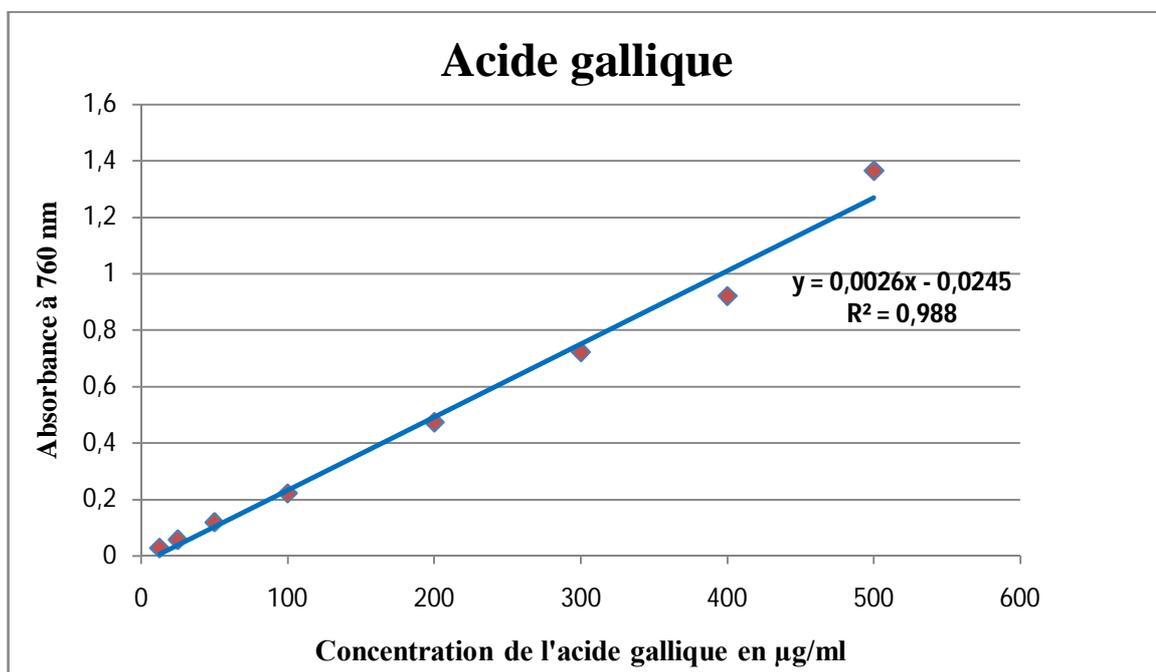
## RESULTATS ET DISCUSSION

### I. Caractérisation quantitative des extraits de la plante

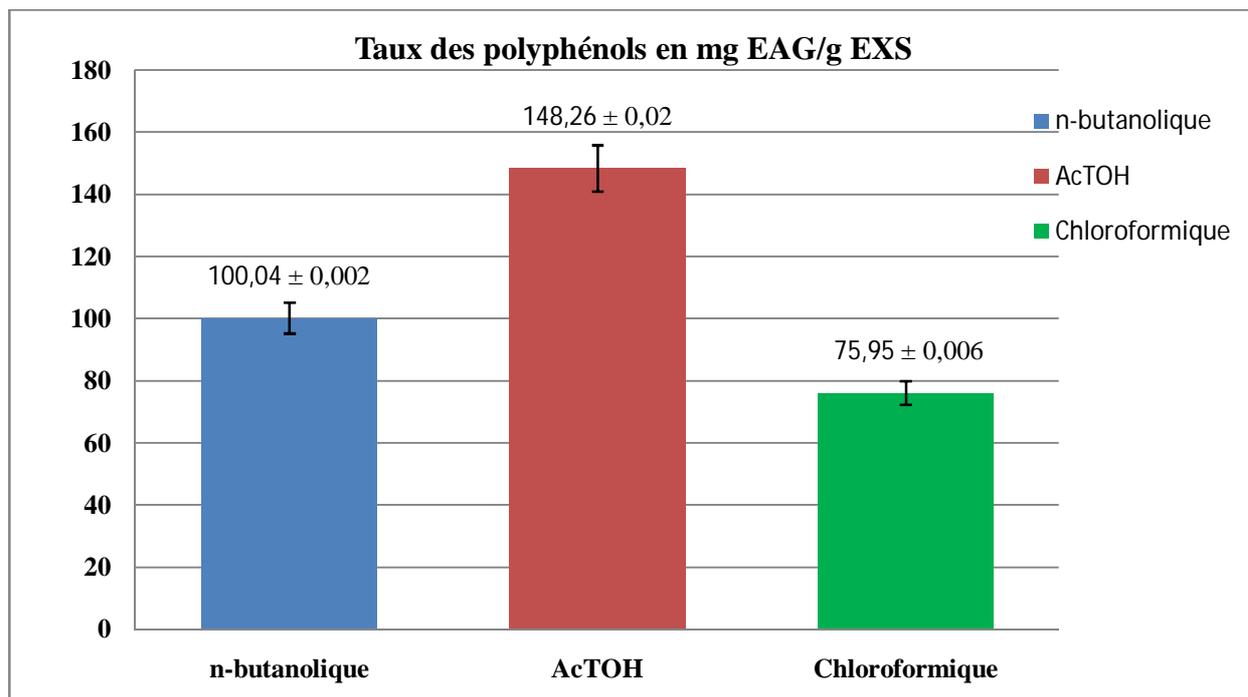
#### I.1. Teneur des extraits en polyphénols

L'extraction et la préparation des phases chloroformiques, acétate d'éthyle et *n*-butanolique de la partie aérienne du plante a permet d'obtenir des extraits de différente couleurs, qui sont conservés au frais dans des flacons ombrés jusqu' à leur utilisation.

La teneur en phénols totaux estimée par la méthode de Folin- Ciocalteu pour chaque extrait à partir d'une gamme étalon établie avec différentes concentrations d'acide gallique (l'équation standard de courbe :  $y = 0,0026x - 0,0345$  ;  $R^2 = 0,988$ ) (**figure 26**). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par g de l'extrait sec (mg EAG/1g EXS). En plus de sa sensibilité, cette méthode de dosage représente une productibilité puisque l'absorbance et étroitement corrélée à la concentration de l'acide gallique utilisé dans la gamme étalon,  $R^2 = 0,988$ .



**Figure 26:** Droite d'étalonnage de l'Acide Gallique ((Moyenne  $\pm$  SD de trois essais)



**Figure 27:** Teneurs en polyphénols totaux dans l'extrait de 3 phases (n-butanolique, acétate d'éthyle, chloroformique) équivalent d'acide gallique.

D'après les résultats, on peut constater que tous les extraits de la plante étudiés, sont riches en polyphénols mais avec des quantités différentes.

La (figure 27) montre que l'extrait acétate d'éthyle possède la plus haute teneur en polyphénols ( $148,26 \pm 0,02$  mg EAG/g EXS), suivi par l'extrait *n*-butanolique ( $100,04 \pm 0,002$  mg EAG/g EXS) et enfin l'extrait chloroformique ( $75,95 \pm 0,006$  mg EAG/g EXS).

Les teneurs des polyphénols totaux déterminées ne sont pas des mesures absolues des quantités des phénols du matériel de départ, elles sont en fait, basées sur la capacité réductrice relative à une capacité réductrice équivalente à l'acide gallique (EAG). Les valeurs obtenus par la méthode colorimétrique fournies des informations directes sur la quantité des groupes phénolique antioxydant de l'extrait qui dépend essentiellement du nombre des groupes hydroxyles de ce derniers (Balasunderam *et al.*, 2006).

Le profil polyphénolique des extraits de plantes peut varier sous l'influence de divers facteurs parmi lesquels la variété, le climat, la localisation géographique (Ryan *et al.*, 1999 ; Benlarbi, 2004), les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante

(Park & Cha, 2003) la température et le solvant d'extraction (Sousa *et al.*, 2008 ; Conde *et al.*, 2009).

Cependant, le contenu phénolique dans les extraits de la plante dépend également du type d'extrait, c'est à dire de la polarité du solvant utilisé dans l'extraction. La solubilité élevée des phénols dans les solvants polaires donne la concentration élevée de ces composés dans les extraits obtenus en utilisant les solvants polaires pour l'extraction.

Selon De Maraco *et al.*, 2013, l'acétate d'éthyle est utilisé pour l'extraction des formes aglycones ou mono O-glycosides et partiellement di-o-glycosides, tandis que le n-butanol est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes di-o-glycosides et triglycosides et C glycosides.

Le chloroforme utilisé en premier, a pu extraire une quantité d'aglycone, en second, l'acétate d'éthyle qui pourrait remplir la fraction d'extracteur d'une large gamme de structure monoglycosylées ou éventuellement aglycones, le n-butanol, ayant une polarité plus élevée que les deux solvants précédemment cités, semble extraire les formes les plus polaires

## **II. Méthodes de dosage des activités antioxydantes *in vitro***

La mesure du potentiel antioxydant est réalisée en déterminant les produits résultant de l'oxydation ou en évaluant l'aptitude à piéger des radicaux de modèles réactionnels.

Le premier mode, plus ancien, nécessite une connaissance préalable des composés issus de l'oxydation. En effet ces méthodes recherchent certains groupements fonctionnels (aldéhydes, cétones, dicarbonylés...) dans les dérivés des constituants d'origine. Le second relie la quantité de radicaux piégés à celle d'antioxydant utilisé.

Nous avons choisi parmi de nombreux modes d'expression de cette mesure d'utiliser le pourcentage d'inhibition (IP) et/ou l'équivalence en Vitamine C (VCE) obtenu par spectroscopie UV-Visible.

Le pourcentage d'inhibition qui permet d'évaluer l'activité antioxydante d'un échantillon se calcul selon la formule suivante:

$$\% \text{ PI} = \frac{\text{Densité optique de blanc} - \text{Densité optique de l'échantillon}}{\text{Densité optique de blanc}} \times 100$$

L'évaluation de l'aptitude du composé (extrait) à piéger des radicaux libres consiste donc à mesurer sa capacité à piéger les radicaux libres et donc à ralentir ou inhiber la création de radicaux libres.

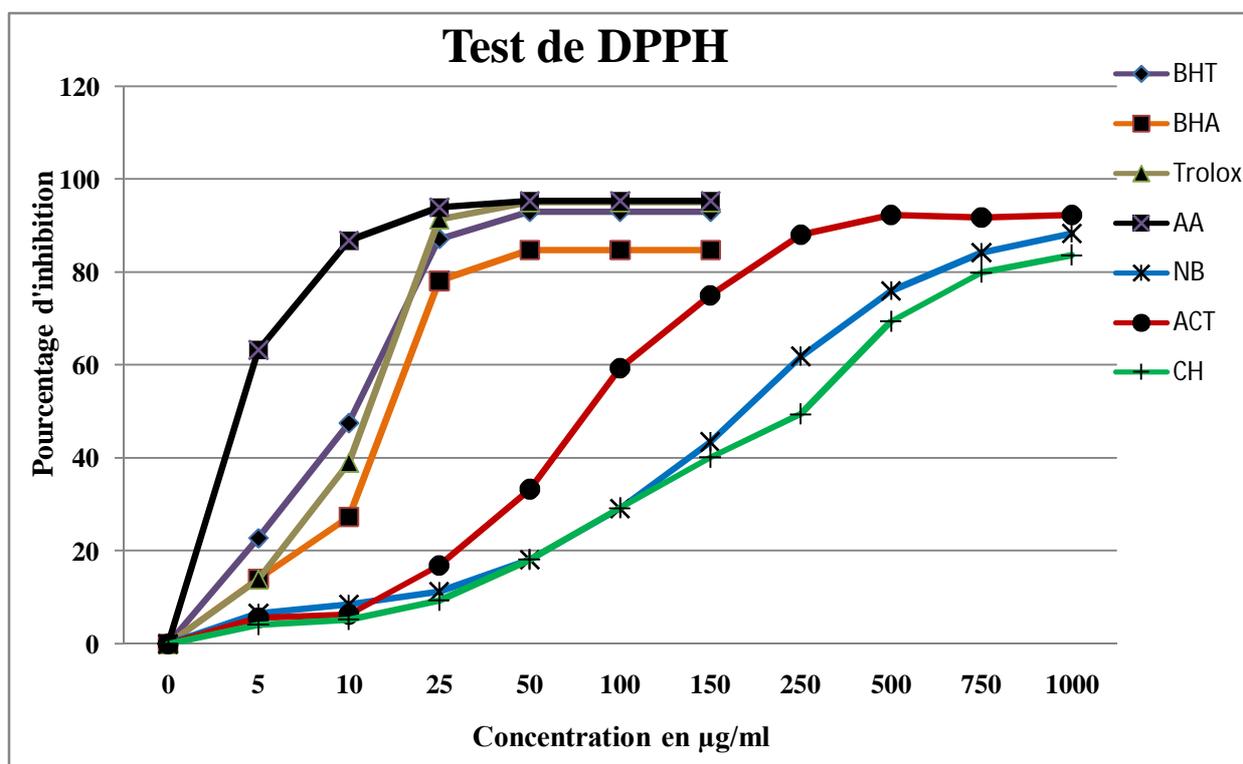
Dans le cas de l'évaluation de l'activité antioxydante en fonction de l'équivalence en acide ascorbique, la méthode consiste à comparer l'absorbance de nos échantillons à celle d'une droite d'étalonnage qui relie l'absorbance à la concentration en acide ascorbique.

Les trois types de tests que nous avons utilisés pour évaluer l'activité antioxydante de nos extraits de plantes sont: le radical DPPH le radical PPM et le test FRAP.

### II.1. Le test de piégeage du radical DPPH

La méthode du DPPH est indépendante de la polarité de substrat. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron. La forme non radicalaire DPPH-H est formée. Les graphes ci-dessous représentent la variation du pourcentage du pouvoir inhibiteur en fonction de la concentration de chaque extrait.

D'après les résultats représentés dans la (figure 28), il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour les standards (l'acide ascorbique, BHA, Trolox, BHT) ou pour les différents extraits de la plante.



**Figure 28:** Pourcentages d'inhibition du radical DPPH' des antioxydants de références et des extraits testés (chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD).

On a remarqué que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour les extraits était inférieur à celui des standards pour toutes les concentrations utilisées. Pour une concentration de 50 µg/ml les standards ont révélé un pourcentage d'inhibition de DPPH de 95,91% ± 0,7 pour l'acide ascorbique, 95,01% ± 0,14 pour le torolox, 93,05% ± 0,1 pour le BHA et 84,71% ± 0,53 pour le BHT. Concernant les trois extraits, pour une concentration de 1000 µg/ml, le pourcentage d'inhibition de DPPH est de 92,36 % ± 0,2 pour l'extrait d'acétate d'éthyle tandis que l'extrait *n*-butanolique est de 88,28% ± 0,24 et l'extrait chloroformique est de 83,68% ± 0,12. Ces pourcentages correspondent à une inhibition totale du DPPH reflétée par la décoloration complète du DPPH du violet en jaune pâle.

La capacité antioxydant des différents extraits a été déterminée à partir de l'IC<sub>50</sub>, c'est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radicale DPPH. Plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (**Hobi & Eddouks, 2016**).

Nous avons déterminés pour chaque extrait, la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical libre DPPH ou IC<sub>50</sub>. À partir des équations des régressions linéaires des graphes. Les valeurs sont représentées dans le tableau suivant :

**Tableau 1:** le pouvoir antioxydant (exprimé par IC<sub>50</sub> (en µg /ml)) des antioxydants de références et des extraits testés

	IC <sub>50</sub> ±Ecart type (En µg /ml)
Acide ascorbique	<b>5 ,01 ± 0 ,31</b>
BHT	<b>11 ,62 ± 0,27</b>
BHA	<b>15 ,76 ±0,09</b>
Torolox	<b>12,84 ±0,26</b>
Acétate d'éthyle	<b>91,49 ±0,50</b>
<i>n</i> -butanolique	<b>185 ,19 ±0,73</b>
chloroformique	<b>225,23 ± 5,10</b>

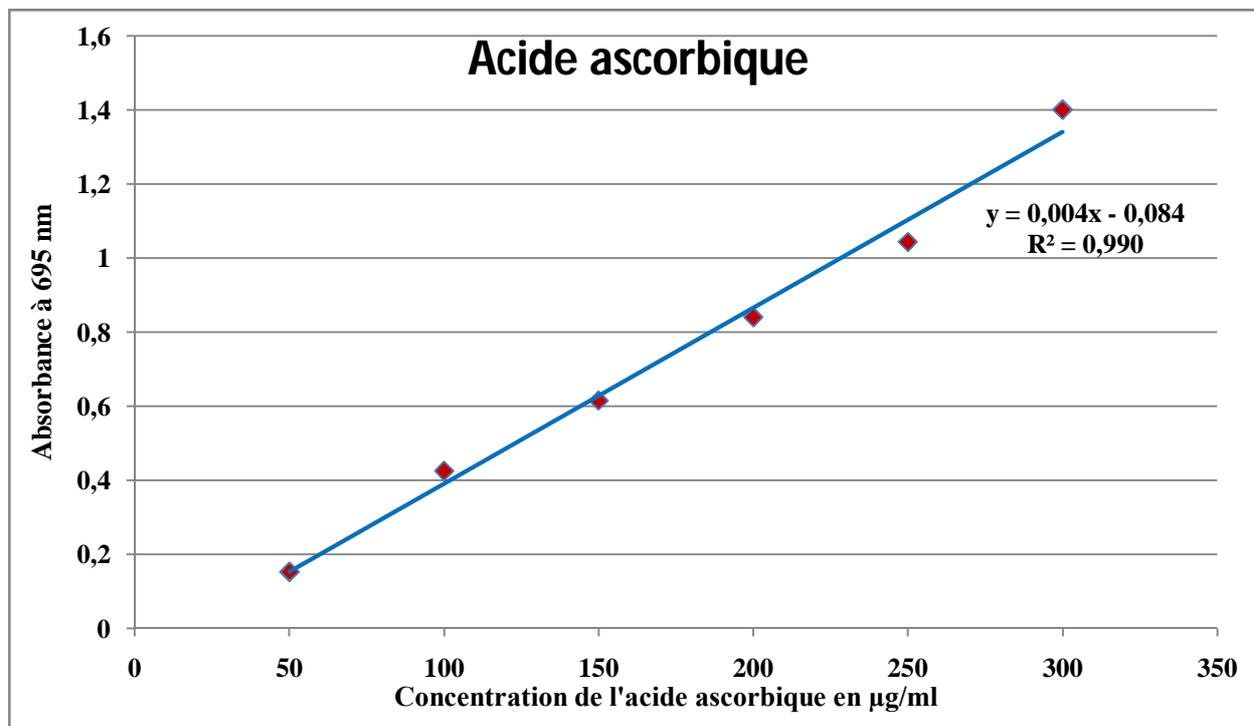
D'après les résultats présentés dans le **tableau1**, l'IC<sub>50</sub> obtenu pour l'acide ascorbique (5 ,01 ± 0 ,31 µg /ml), BHT (11 ,62 ± 0,27 µg /ml), BHA (15 ,76 ± 0,09 µg /ml) et Torolox (12,84 ± 0,26 µg /ml)) utilisés comme des molécules de référence, est bien plus inférieur à ceux des extraits et donc, une activité antioxydante très élevé. La fraction acétate d'éthyle présente un IC<sub>50</sub> (de l'ordre de 91,49 ± 0,50 µg /ml) largement inférieur à ceux des extraits *n*-butanolique (185 ,19 ± 0,73µg /ml) et chloroformique (225,23 ± 5,10µg /ml).

Il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, tocophérol, flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (**Bougandoura & Bendimerad, 2012**). Les polyphénols contenus dans nos extraits sont probablement responsables de l'activité antioxydante.

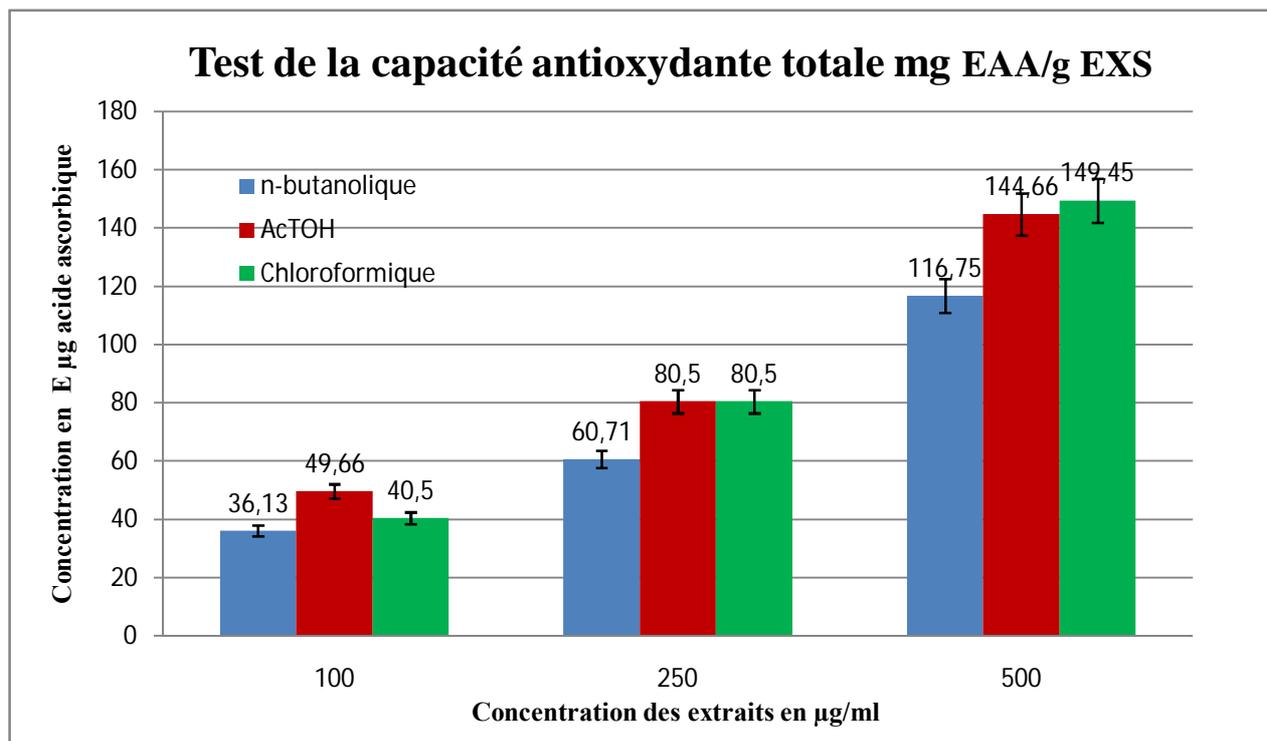
A travers la recherche bibliographique, de très grandes différences de points de vue sont notées à propos de cette corrélation. Certains travaux ont montré une bonne corrélation entre les CI50 et la teneur en polyphénols et en flavonoïdes, à l'opposé d'autres études n'ont pas établie cette corrélation (**Athamena et al., 2010 ; Mariod et al., 2010**). Par ailleurs, il est bien établi que l'activité antioxydante est corrélée positivement avec la structure des polyphénols. Généralement, les polyphénols avec un nombre élevé de groupements hydroxyles présentent l'activité antioxydante la plus élevée (**Heim et al., 2002**) due à leur pouvoir de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres (**Torres de pinedo et al., 2007**), ce qui peut expliquer en partie que l'activité anti-radicalaire est dépendante du nombre, de la position et de la nature des substituants sur les cycles B et C (groupements hydroxyles, méthoxylés, glycosylés) et le degré de polymérisation (**Popovici et al., 2010**). Ainsi, l'effet antioxydant n'est pas seulement dose-dépendant mais également structure-dépendant (**Rodriguez-Bernaldo et al., 2010**).

## II.2. Capacité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale des extraits étudiés est exprimée en nombre d'équivalents d'acide ascorbique à partir d'une courbe d'étalonnage ( $y = 0,004x - 0,084$  ;  $R^2 = 0,990$ ) (figure 29). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide ascorbique par g de l'extrait sec (mg EAA/1g EXS).



**Figure 29:** Droite d'étalonnage de l'acide ascorbique pour mesure la capacité antioxydante (Moyenne  $\pm$  SD de trois essais)



**Figure 30:** Histogramme comparatif de la capacité antioxydante totale des antioxydants de références et des extraits testés (Moyenne  $\pm$  SD de trois essais).

D'après les résultats obtenus dans la (**figure 30**), l'estimation de la capacité antioxydante totale des extraits a montré une variabilité en fonction de la nature du solvant (chloroformique, acétate d'éthyle, *n*-butanolique) utilisé pour l'extraction.

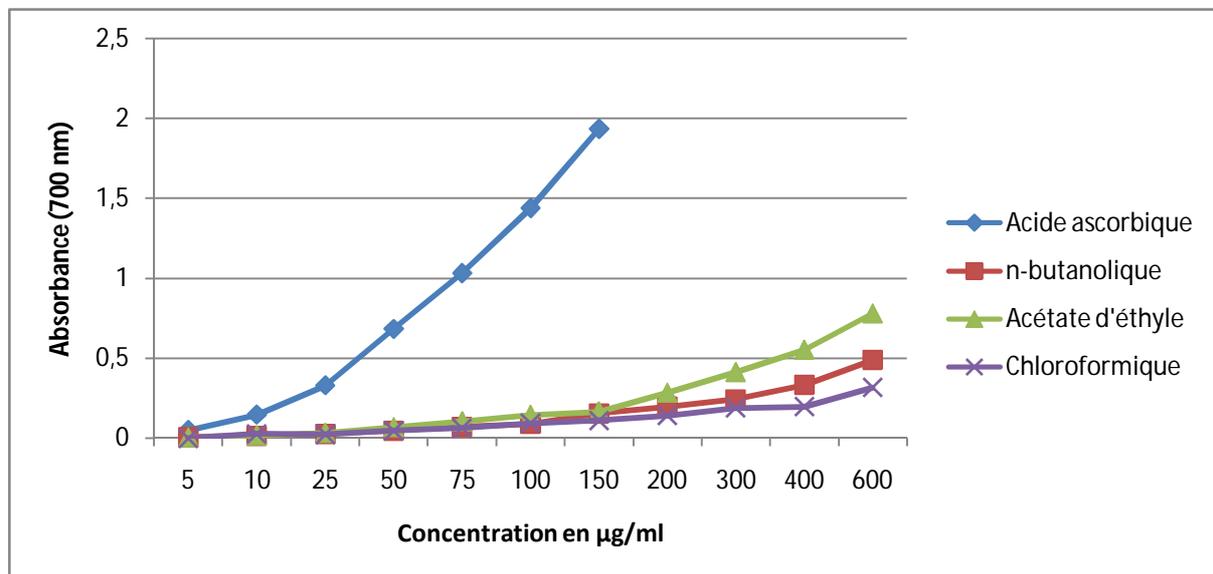
On remarque que dans la concentration de 500 µg/ml, la fraction chloroformique a un pouvoir antioxydant le plus élevé ( $149,45 \pm 0,03$  mg EAA/1g EXS) par rapport aux extraits d'acétate d'éthyle et *n*-butanolique (respectivement  $144,66 \pm 0,04$  mg EAA/1g EXS et  $116,75 \pm 0,05$  mg EAA/1g EXS). Ce pouvoir antioxydant observé dans les trois extraits peut être dû essentiellement à la richesse des extraits en polyphénols particulièrement les flavonoïdes, et aussi en fonction des structures chimiques des molécules bioactives.

### II.3. Pouvoir réducteur du fer (Test FRAP: Ferric Reducing Antioxydant Power)

L'activité antioxydante des extraits *n*-butanolique, acétate d'éthyle et chloroformique de la plante a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible. Il est universel peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux (**Bougandoura & Bendimerad, 2012**).

La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de  $Fe^{3+}$ /complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent,  $Fe^{2+}$  peut être évalué en mesurant et

en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm (**Bougandoura & Bendimerad, 2012**). Beaucoup de publications actuelles ont indiqué qu'il y a une relation directe entre les activités antioxydantes et la puissance de réduction des composants de quelques plantes (**Bentabet et al., 2014**).



**Figure 31** : Evaluation de l'activité antioxydante des extraits par la méthode FRAP (chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD).

A partir des résultats obtenus (**figure 31**), on remarque que le pouvoir réducteur des extraits de la plante est dose dépendante (concentration dépendante) c'est-à-dire que la capacité de réduction de fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des extraits.

Les résultats obtenus montrent que la capacité des extraits de réduire le Fer est largement inférieure à celle de l'acide ascorbique. A la concentration de 600 µg/ml, le pouvoir réducteur est beaucoup plus important dans la phase acétate d'éthyle ( $DO= 0,78 \pm 0,006$ ) par rapport à la phase *n*-butanolique, et chloroformique (respectivement  $DO= 0,49 \pm 0,003$  et  $DO= 0,32 \pm 0,03$ ).

Le pouvoir réducteur des extraits de la plante est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (**Bougandoura & Bendimerad, 2012**). Les études menées par Van Acker *et al* sur la chélation des ions du fer par certains flavonoïdes ont mis en évidence les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques :

- les groupes 3'-hydroxy et 4'-hydroxy du cycle B (les fonctions catéchol), les groupes 3-hydroxy et 4-oxo du cycle C.
- les groupes 4-oxo et 5-hydroxy en position 3. Ainsi, la quercétine qui combine tous ces substituants est un complexant métallique particulièrement efficace (**Ghedadba et al., 2015**).

Ce processus d'autoxydation dépend de multiples paramètres tels que la concentration de l'ion métallique et du polyphénol, la température, le pH, la présence d'agents complexants (**Ghedadba et al., 2015**).

Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Bougandoura & Bendimerad, 2012**).

# **Conclusion**

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. La majorité des médicaments actuels sont des copies concentrées de remèdes végétaux, notamment les polyphénols qu'ils sont les composés les plus intéressants et les plus étudiés de nos jours.

L'évaluation quantitative des polyphénols totaux par la méthode de Folin-ciocalteu a révélé la présence des quantités importantes en polyphénols dans les trois phases de la plante étudiée. Le potentiel antiradicalaire a été déterminé par la méthode de DPPH, TAC et FRAP le montrent que les trois extraits de la plantes étudiée présentent des propriétés antioxydantes remarquables. Les capacités antioxydantes révélées *in vitro* des phases chloroformiques, acétate d'éthyle et *n*-butanolique de la partie aérienne plante peut être liée directement à sa richesse en polyphénols mais également à la structure de ces derniers.

Globalement, la plante sélectionnée dans ce travail contient probablement des molécules très intéressantes qui peuvent être considérées comme des agents antioxydants de première classe et peuvent être employées pour des applications thérapeutiques, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace à la prévention des maladies telles que le cancer, et les maladies cardiovasculaires.

Sachant que notre pays possède une biodiversité végétale immense, qui reste à découvrir et une grande partie de cette flore est constitué par des espèces médicinales, dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches, de cet effet, et comme perspectives on propose d'identifier clairement les molécules impliquées dans l'effet antioxydant qui pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.

Enfin, nous recommandons une culture des plantes médicinales et alimentaires pour permettre à la population d'avoir des médicaments et des denrées alimentaires moins chers et d'éviter la disparition de certaines espèces intéressantes.

# **Références bibliographiques**

# Références bibliographiques

## A

**Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. (2007).** Radicaux libre dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : role dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*, **74**, 636 – 643.

**Ahuja, M. R., & Ramawat, K. G. (2014).** Biotechnology and biodiversity. Edition *Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London*, p 216.

**Alberts, D. S., Colvin, O. M., Conney, A. H., Ernster, V. L., Garber, J. E & Greenwald P. (1999).** Prevention of cancer in the next millennium, Report of the Chemoprevention Working Group to the American Association for Cancer Research. *Cancer Res*, **59**, 4743 – 4758.

**Algeciras-Schimmich, A., Cook, W. J., Milz, T. C., Saenger, A. K., & Karon, B. S. (2007).** Evaluation of hemoglobin interference in capillary heel-Stick samples collected for determination of neonatal bilirubin. *Clinical Biochemistry*, **40**, 1311 – 1316.

**Alkurd, A., Hamed, T. R., & Al-Sayyed, H. (2008).**Tannin contents of selected plants used in jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, **4**, 265 – 274.

**Amlan, K., & Jyotisna, P. S. (2010).** A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, **71**, 1198 – 1222.

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

**Ames, B. N., Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. (1993).** Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 7915 – 7922.

**Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., & Trinajstić, N. (2003).** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, **76** (1), 55 – 61.

**Arts, I. C., & Hollman, P. C. (2005).** Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr*, **81**, 317S – 325S.

**Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., & Khebri, S. (2010).** Activite anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *cuminum cyminum* L. *Lebanese science journal*, **11** (1), 69 – 81.

## B

**Babar, M. A., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2007).** Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in panax ginseng bioreactor root suspension cultures. *Molecules*, **12**, 607 – 621.

**Bahadran, Z., Mirmira, P., & Fereidoun, A. (2013).** Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, **12** (43), 1 – 9.

**Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-product : antioxidant activity, occurrence; and potential uses. *Food Chemistry*, **9**, 191 – 120.

**Beaudeau, J. L., & Geneviève, D. (2011).** Biochimie médicale : Marqueurs actuels et perspectives. 2<sup>ème</sup> édition. Edition *Lavoisier Chantal Arpino*, p 130 , 131.

**Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., & Boucherit, K. (2014).** Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de béchar en algérie. *Phytothérapie*, **12**, 364 – 371.

**Besançon, (2012).** Progrès en dermato-allergologie. Edition *John libbey eurotext*, p 111.

**Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des orgnes d'un forestier. *Le cahier des techniques de l'Inra*, 79 – 82.

**Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., & Delattre, J. (2003)** .Radicaux libre et antioxydant en : Delattre, J., Durand, G., Jardillier, J. C. Biochimie pathologique. *Flammarion*, Pris, p, 317.

**Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2012).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.) Briq.* *Nature & Technologie*, (9), 14 – 19.

**Boukhobza, F., & Goetz, P. (2014).** Phytothérapie en odontologie. Edition *CDP*.

**Bruneton, J. (2009).** Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales. 4<sup>ème</sup> édition. Edition *Lavoisier Tec & Doc. Médicales Internationales, Paris*, p 261 , 308 , 571.

## C

**Calixto, J. B. (2005).** Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, **100**, 131 – 134.

**Calvo-Flores, F. G., Dobado, J. A., Isac-Garcia, J., & Martin-Martinez, F. J. (2015).** Lignin and Lignans as Renewable Raw Materials. Edition Wiley, Chemistry, Technologie and Application. Edition *john wiley & sons ,ltd*, p 315.

**Canavy, B., Didier, J. C., & Jacquélet, F. (2014).** Mieux vivre avec une maladie professionnelle. Edition *Lulu Press*, p 116.

**Cano, N., Barnoud, D., Schneidre, S., Vasson, M. P., Hasselmann, M., & Lerverve, X. (2007).** Traité de nutrition artificielle de l'adulte. 3<sup>ème</sup> édition. Edition *springer- Verlag*, p 254.

**Cantin, P. A. (1999).** Oxidant and antioxidants in lung injury. In: Lam and Other Diseases Characterized by Smooth Muscle Proliferation. *Moss j. New York: Dekker*, 519 – 531.

**Cazes, J. (2001).** Encyclopedia of Chromatography (Print). Edition *Marcel Dekker*, p 206.

**Cazes, J. (2005).** Encyclopedia of chromatograph. Second Edition. Edition *Taylor & Francis*, p 1250.

**Chan, A. C., Tran, K., Raynor, T., Ganz, P., & Chow, C. K. (1991).** Regeneration of vitamine E in human platelets. *J.Biol .Chem*, **266**, 17290 – 17295.

**Chandan, K., Sens, M. A., & Osmo, H. (1994).** Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency. *Journal of Applied Physiology*, **77 (5)**, 2177 – 2187.

**Chebil, L. (2006).** Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia*: études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse de Doctorat : Institut national polytechnique de LORRAINE.

**Chen, L., Yang, X., Jiao, H., & Zhao, B. (2003).** Tea catechins protects against lead-induced ROS formation, mitochondrial dysfunction, and calcium dysregulation in pc 12 cells. *Chemical Research in Toxicology*, **16** (9), 1155 – 1161.

**Chew, M. H., Xu, G. G., Ho, P. W., & lee, C. W. (2009).** A propos d'un cas de syndrome compartimental glutéal après traitement chirurgical d'un anévrisme de l'aorte abdominale. *Annles de chirurgie vasculaire*, **23** (4), 17 – 21.

**Chira, K., Suh, j. H., Saucier, C., & Teissédre, P. L. (2008).** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, **6**, 75 – 82.

**Chung, Y. C., Chang C. T., Chao W. W., Lin C. F., & 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 & Food Chemistry*, **50**, 2454 – 2458.

**Cohen, S. Y., Souied, E & Quentel, G. (2014).** Dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) / Myopie et étiologies de la néovascularisation choroïdienne. Edition *Lavoisier Médecine sciences publications*, p 77.

**Collin, S., & Crouzet, J. (2011).** Polyphénols et procédés. Edition *Lavoisier TEC & DOC*, p 5 , 13 , 16 , 235.

**Conde, E., Cara, C., Moure, A., Ruiz, E., Castro, E. & Dominguez, H. (2009).** Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chemistry*, **114** (3), 806 – 812.

**Costa, M. A., Xia, Z. Q., Davin, L. B., & Lewis, N. G. (1999).** Toward Engineering the Metabolic Pathways of Cancer-Preventing Lignans in Cereal Grains and Other Crops. Edition Springer. *Recent Advances in Phytochemistry*, **33**, 67 – 87.

**Cowan, M. M. (1999).** Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12** (4), 564 – 582.

**Cuvelier, C., Dotreppe, O., & Istasse, L. (2003).** Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Ann.Méd .Véte*, **147**, 315 – 324.

## D

**D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super Sanità*, **43** (4), 348 – 361.

**Daglia, M. (2011).** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, **23**, 1 – 8.

**Dai, J. & Mumper, R. J. (2010).** Plant Phenolics : Extraction, Analysis and Their Antioxydant and Anticancer Properties. *Molecules*, **15** (10), 7313 – 7352.

**Davide, G. W. (2015).** Encyclopedia of Mind Enhancing, Foods, Drugs and Nutritional Substances. Second edition. Edition *Mcfarland & Company, Inc, Publishers Jefferson, North Carolina*, p 166.

**Delattre, J., Beaudoux, J. L., & Bonnefont-Rousselot. (2005).** Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Edition *Lavoisier TEC & DOC éditions Médicales Internationales, Paris*, p 14 , 93 , 94.

**Delmas, D., Lançon, A., Colin, D., Jannin, B & Latruffe, N. (2006).** Resveratrol as a chemopreventive agent: A promising molecule for fighting cancer. *Current Drug Targets*, **7** (4), 423 – 442.

**Descheemaeker, K., & Provoost, C. (1999).** L'impacte de la nutrition sur la santé, développements rcebts-1. Edition. *Louvin-Garant*, p 95.

**Droge, K. S. (2002).** Free radicals in physiological control of cell fuction. *Physiol.Rev*, **82**, 47 – 95.

## E

**Edardes, J. P. (2008).** Coumarin Anticoagulant Research Progress. Edition *Nova Biomedical Books*, p 100.

**Edeas, M. (2007).** Les polyphenols et les polyphenols de thé. *Phytothérapie*, **5**, 264 – 270.

**Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., & Jurgens, G. (1992).** The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical. Biology & Medicine*, **13**, 341 – 390.

**Evans, W. J. (2000).** Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr*, **72**, 647S– 652S.

## F

**Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Bouraoui, N. K., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus L.* orgns, and their biological avtivities. *C. R. Biologies*, **331**, 372 – 379.

**Favier, A. (2003).** Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, 108 – 115.

**Fisher, A. B., Dodia, C., Manevich, Y., Chen, J. W., & Feinstein, S. I. (1999).** Phospholipid Hydroperoxides Are Substrates for Non-selenium Glutathione Peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 21329 – 21334.

**Fraga, C. G. (2007).** Plant polyphenols: How to translate their *in vitro* antioxidant actions to *in vivo* conditions. *IUBMB Life*, **59** (4-5), 308 – 315.

**Fraga, C. J., & Oteiza, P. I. (2011).** Dietary flavonoides : Role of (-) – epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, **51**, 813 – 823.

## G

**Gardès-Albert, M., & Jore, D. (2005).** "Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène." Radicaux libres et stress oxydant. Edition *Lavoisier*, Paris, p 1 – 23.

**Gardés-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh., Z., & Jore, D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène .*L'actualité Chimique*, 91 – 96.

**Gayet, C. (2013).** Guide de poche de phytothérapie. Editions *Quotidien Malin*, p 29.

**Gazengel, J. M., & Orecchioni, A. M. (2013).** Le préparateur en pharmacie, Guide théorique et pratique. 2<sup>ème</sup> édition. Edition *Lavoisier TEC & DOC*, Paris, p 1174.

**Gèrard-Monnier, D., & Chaudière, J. (1996).** Métabolisme et fonction antioxydant du glutathion. *Path Biol*, **44**, 77 – 85.

**Ghasemzadeh, A., & Ghasemzadeh, N. (2001).** Flavonoids and phenolic acids: role and biochemical activity in plants and human . *Journal of Medicine Plants Research*, **5** (31), 6697– 6703.

**Ghedadba, N., Hambaba, L., Ayachi, M. C., Aberkane, H., Bousselsela, S. M., & Oueld-Moukhtar. (2015).** Polyph énoles totaux, activités antioxydant et antimicrobienne des feuilles de Marrubium deserti de Noé. *Phytothérapie*, **13**, 118 – 129.

**Gilani, G. S., & Anderson, J. J. B. (2002).** Phytoestrogens and health. Edition *Aocs Press*, p 405.

**Gongbo, L., Stacey, T., & Jeremy, J. J. (2013).** Polyphenols from the mangosteen (*Garcinia mangostana*) fruit for breast and prostate cancer. *Frontiers in pharmacologie*, **4** (80), 1 – 4.

**Gonzalez-Gallego, J., Sanchez-Campos, S., & Tunon, M. J. (2007).** Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutricion Hospitalaria*, **22** (3), 287 – 293.

**Goudable, J., & Favier, A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Mdtabol*, **11**, 115 – 120.

**Greathead, H. (2003).** Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proceedings of The Nutrition Society*, **62**, 279 – 290.

**Green, D. R., & Reed, J. C. (1998).** Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281**, 1309 – 1312.

**Guignard, J. L. (1996).** Abrégé de biochimie végétale. Edition *Masson, Paris*, p 160.

**Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (1990).** The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biol Sci*, **15**, 129 – 135.

## H

**Hagen, T. M., Wierzbicka, G. T., Sillau, A. H., Bowman, B. B., & Jones, D. P. (1990).** Bioavailability of dietary glutathione: Effect on plasma concentration. *Am j Physiol*, **259**, 524 – 590.

**Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007).** Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*, **62**, 628 – 638.

**Halliwell, B. (1989).** Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol*, **70**, 737 – 757.

**Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1996).** Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathologie Biologie*, **44**, 6 – 13.

**Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2007).** Free Radicals in biology and medicine. Fourth Edition *New York, Oxford University Press*, p 851.

**Handique, J. G., & Baruah, J. B. (2002).** Polyphenolic compounds: an overview. *Reactive & Functional Polymers*, **52**, 163 – 188.

**Harborne, J. B. (1967).** Comparative biochemistry of flavonoids-V: Luteolin 5- glucoside and its occurrence in the umbelliferae. *Phytochemistry*, **6** (11), 1569 – 1573.

**Hartmann, T. (2007).** From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, **68**, 2831 – 2846.

**Hebi, M., & Eddouks, M. (2016).** Evaluation de l'activité antioxydante de *Stevia rebaudiana*. *Phytothérapie*, **14**, 17 – 22.

**Heim, E. K., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002).** Flavonoïds antioxydants : chemistry ; metabolism and structure-activity relationships. *The journal of Nutritional Biochemistry*, **13**, 572 – 584.

**Hopkins, W. G. (2003).** Physiologie végétale. 2<sup>ème</sup> édition. Edition de Boeck Université, p 268, 280.

## I

**Imran, M., Ahmad, N., Anjum, F. M., Kamran-Khan, M., Mushtaq, Z., Nadeem, M., & Hussain, S. (2015).** Potentiel protective properties of flax lignin secoisolariciresinol diglucoside. *Nutrition journal*, **14**, 1 – 7.

**Iserin, P., Masson, M., Restellini, J. P., Ybert, E., DeLaage de Meux, A., Moulard, F., et al., (2001).** Larousse des plantes médicinales. Identification, préparation, soins. Edition Larousse, p 10, 12.

## J

**Jacques, R. (2010).** Signalisation cellulaire et cancer un manuel pour les étudiants et les oncologue. Edition Springer- Verlag France, Paris, p, 195.

**Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M. H., & Journet, M. (1995).** Nutrition des ruminants domestique: ingestion et digestion. Edition Inra, p 57.

**Jost, J. P., & Jost-Tse, Y. C. (2016).** L'automédication chez les animaux dans la nature. Editions connaissances & savoirs, p 23.

## K

**Kalemba, D., & Kunicka, A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, **10**, 813 – 829.

**Kebièche, M., Lakroun, Z., Mraïhi, Z., Soulimani, R. (2011).** Effet antidiabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de *Ranunculus repens* L. et de la quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique. *Phytothérapie*, **9**, 274 – 282.

**Kening, Y., Vincenzo, D. L., & Normand, B. (1995).** Création of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptiblity of potato to phytophthora infestans. *The Plant Cell*, **7**, 1787 – 1799.

**Khan, M. T. H., & Ather, A. (2006).** Lead molecular for natural products. First edition. Edition Elsevier, p 273.

**Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., & Kang, S. S. (2004).** Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, **96** (3), 229 – 245.

**Koehlin-Ramonatxo, C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et supplémentation antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans la maladie respiratoire. *Nutrition Clinique & Métabolisme*, **20**, 165 – 177.

**Kuete, V. (2013).** Medicinal plant research in Africa: Pharmacology and chemistry. 1<sup>ère</sup> édition .Edition Elsevier Insights, p 393 , 394.

**Kundu, J. K., & Surh, Y. (2008).** Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. *Cancer Letters*, **269** (2), 243 – 261.

## L

- Lacolley, P., Babuty, D., Boulanger, C., Ghaleh, B., Loirand, G., Pinet, F., & Samuel, J.L. (2007).** Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux. Edition *John Libbey Eurotext, Paris*, p 312 , 316 , 317.
- Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007).** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, **46**, 244 – 282.
- Lehucher-Michel, M. P., Lesgards, J. F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., & Prost, M. (2001).** Oxidative stress and human disease, Current knowledge and perspectives for prevention. *Presse Medicale*, **30**, 1076 – 1081.
- Leray, C. (2010).** Les lipides dans le monde vivant. Edition *Lavoisier TEC & DOC*, p 5.
- Leverse, X., Cosnes, J., Erny, P., & Hasselmann, M. (2001).** Traité de nutrition artificielle de l'adulte. 2<sup>ème</sup> édition. Edition *Springer*, p 241.
- Lindau-Sehpar, B., & Shaffer, J. (1993).** Expression of human catalase in acatalasemic murine SVB2 cells confers protection from oxidative damage. *Free Rad Boil Med*, **8**, 15 – 581.
- Lugasi, A., Hovari, J., Sagi, K. V., & Biro, L. (2003).** The rol of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, **47**, 119 – 125.

## M

- Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de metabolites secondaire d'importance économique. Edition *Presses Polytechniques & Universitaires Romandes*, p Vii, 2, 3.
- Mariod, A. A., Ramlah, M. I., Maznah, I., & Norsharina, I. (2010).** Antioxydant activities of phenolic rich fraction (PRFs) obtained from black mahlab *Monechma ciliatum* and white mahlab *Prunus mahaleb* seedcakes. *Food Chemistry*, **118**, 120 – 127.
- Martin, S., & Andriantsitohaina, R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie*, **51**, 304 – 315.
- Marusawa, H., Ichikawa, K., Narita, N., Murakami, H., Ito, K., & Tezuka, T. (2002).** Hydroxyle radical as a strong electrophilic species. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **10**, 2283 – 2290.
- Matés, J. M., Perez-Gomez, C., & Castro, N. I. (1999).** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*, **32**, 595 – 603.
- Médart, J. (2009).** Manuel pratique de nutrition: l'alimentation préventive et curative. 2<sup>ème</sup> édition. Edition *de Boeck Université*, p 51 , 52.
- Menvielle-Bourg, F. J. (2005).** La superoxyde dismutase , puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale. *Phytothérapie*, 118 – 121.
- Merghem, R. (2009).** Eléments de biochimie végétale. Editions *Bahaeddine Algérie*, p 111, 123.
- Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000).** The effects of plants flavonoids on mammalian cells : Implication for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, **52** (4), 673 – 751.

**Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarim J.Sci.Technol*, **26**, 211 – 219.

**Moneb, A., Ibrahim, R. K., Roy, R., & Sarhan, F. (2011).** Changes in wheat leaf phenolome in response to cold acclimation. *Phytochemistry*, **72**, 2294 – 2307.

**Moon, J. K., & Shibamoto, T. (2009).** Antioxidant assays for plant and food components. *J Agr Food Chem*, **57**, 1655 – 1666.

**Morena, M., Martin-mateo, M., Cristol, J. P., & Canoud, B. (2002).** Stress oxydant, hémoincompatibilité et complication de la dialyse au long cours. *Néphrologie*, **23** (5), 201 – 208.

**Mulvihill, E. E. & Huff, M. W. (2010).** Antiatherogenic properties of flavonoids : Implications for cardiovascular health. *Canadian Journal of Cardiology*, **26**, 17A - 21A.

## N

**Nastro, A., Germano, M.P., D'Angelo, V., Marino, A., & Cannatelli, M. A. (2000).** Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity, **30** (5), 79 – 384

**Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2000).** The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Report*, **17**, 215 – 234.

**Niki, L., Reynaert, S. W., Aesif, T. M., Amy, B., Emiel, F. M., Wouters, C. G., Irvin., Yvonne, M. W., & Janssen-Heininger. (2007).** Catalase over expression fails to attenuate allergic airways disease in the mouse. *The journal of Immunology*, **178**, 3814 – 3821.

## O

**O'connell, J. E., & Fox, P. F. (2001).** Significance and application of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. *international Dairy journal*, **11**, 103 – 120.

**Ohla, S. E., Opere, C. A., & Leday, A. M. (2005).** Pharmacological consequences of oxidative stress in ocular tissues, *Mutation Research*, **579**, 22 – 36.

**Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001).** Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **49**, 4619 – 4626.

## P

**Packer, L., Kraemer, K., & Rimbach, G. (2001).** Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, **17** (10), 888 – 895.

**Pasquier, C. (1995).** Stress oxydatif et inflammation. *Revue Française des Laboratoires*, **276**, 87 – 92.

**Perron, N. R., & Brumaghim, J. L. (2009).** A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem. Biophys*, **53**, 75 – 100.

**Pierre, M., & Lys, M. (2007).** Secrets des plantes pour se soigner naturellement. Edition Artémis, p 36.

**Pietta, P. G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, **63**, 1035 – 1042.

**Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., & Defraign, J. O. (1999).** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaissaux, Cœur, Poumons*, **4**, 1 – 7.

**Poortmans, J. R., & Boisseau, N. (2009).** Biochimie des activités physiques et sportives. Edition de *Boeck université*, p 503.

**Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowskib. (2010).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, (4), 1– 8.

**Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem*, **269**, 337 – 341.

## R

**Ragot, M. (2011).** Produire du lait biologique : Conversion et témoignages. Edition *Eucagri*, p 203.

**Raven, P. H., Evert, R. F., Eichhorn, S. E., Bouharmont. J., & Evrard, C. M. (2000).** Biologie végétale .1<sup>ère</sup> édition. Edition de *Boeck Université, Paris*, p 32.

**Ravi, K., Ramachandran, B., & Subramanian, S. (2004).** Effect of Eugenia Jambolana seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sciences*, **75**, 2717 – 2731.

**Rein, D., Paglieroni, T. G., Wun, T., Pearson, D. A., Schmitz, H. H., Gosselin, R., & Keen, C. L. (2000).** Cocoa inhibits platelets activation and function. *Am. J. Clin. Nutr.*, **72** (1), 30 – 35.

**Rezaire, A. (2012).**Activité anti-oxydant et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien oenocarpus bataua (patawa). Thèse de Doctorat université des Antilles et de la Guyane.

**Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Sudraud, P., & Ribéreau-Gayon, P. (1968).** Sciences et techniques du vin. Tome 1. Edition. *Dunod, Paris*, p 671.

**Ricard, M. H. (2013).** Se soigné avec les huiles essentielles. Edition *E.D.M*, p15.

**Festy, D., & Pacchioni, I., (2014).** Guide de poche d'aromathérapie : 41 Huiles essentielles pour se soigner en toute simplicité. Edition *Quotidien Malin*, p 12.

**Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C., & Brinkman, U. A. T. (2006)** .Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, **1112**, 31 – 63.

**Roberfroid, M. B., Coxam,V., & Delzenne, N. M. (2008).** Aliments fonctionnels. 2<sup>ème</sup> édition. Edition *Lavoisier TEC & DOC*, p 209, 215

**Rodriguez-Bernaldo, A. Q. F. S., Frecha, P. A., Vidal., & Lopez, H. J. (2010).** Antioxydant compounds in edible brown seaweeds. *European Food Research & Technology*, **231** (3), 495 – 498

**Rolo-Naranjo, A., Rebollido-Rios, R., Melchor-Rodriguez, K., & Codorniu-Hernández, E. (2009).** Pseudo-phase portrait applied to pattern recognition in flavonoid–protein interactions. *AppliedMathematics and Computation*, **215**, 156–167.

**Ryan, M. T., Muller, H., & Pfanner, N. (1999).** Functionalstaging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *J BiolChem* , **274** (29), 20619 – 20627.

## S

- Samouelian, F., Gaudin, V., & Boccara, M. (2009).** Génétique moléculaire des plantes. Edition *Quae*, p 21, 22.
- Scalbert, A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, **30**, 3875 – 3883.
- Schaller, C. T. (2015).** La prise en charge de la prostate par la médecine holistique. Edition *Lanore, Paris*, p 41.
- Scheibmeir, H. D., Christensen, K., Whitaker, S. H., Jegaethesan, J., Clancy, R., & Pierce, J. D. (2005).** A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs*, **21** (1), 8 – 24.
- Schin, I. N., Yoshinori, N., & Kazou, M. (1998).** Tunneling effect in the regeneration reaction of vitamine E by ubiquinol. *Chemical Physics Letters*, **287**, 70 – 74.
- Shankar, S., & Srivastava, R. K. (2012).** Nutrition, diet and cancer. Edition *springer Dordrecht Heidelberg London New York London*, p 213.
- Sharma, S., Sheehy, T., Kolahdooz, F., & Barasi, M. (2015).** Nutrition at a Glance. Second Edition *Wiley Backwell*, p 162.
- Shipp, J., & Abdel-Aal, E. S. M. (2010).** Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients. *The Open Food Science Journal*, **44**, 7 – 22.
- Sökmen, B. B., Aydın, S., & Kınalıoğlu, K. (2012).** Antioxidant and antibacterial properties of a lichen species *Diploschistes scruposus* (Schreb.) Norman. *IUFS Journal of Biology*, **71** (1), 43 – 51.
- Sorg, O. (2004).** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus A Biologies*, **327**, 649 – 662.
- Sousa, R., Dias, S., & Antunes C. (2006).** Spatial subtidal macrobenthic distribution in relation to abiotic conditions in the Lima estuary, NW of Portugal. *Hydrobiologia*, **559**, 135 148.
- Stamler, J. S., & Slivka, A. (1996).** Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutrition Reviews*, **54** (1), 1 – 30.
- Stargrove, M. B., Treasure, J., & Mckee, D. L. (2008).** Herb, Nutrient and Drug interaction: Clinical Implication ad Therapeutic Strategies. Edition *Mosby Elsevier*, p 733.
- Stuart, J. A., & Robb, E. L. (2013).** Bioactive polyphenols from wine grapes. Edition *springer New york Heidelberg Dordrecht London*, p 3.
- Suschetet, M., Siess, M. H., Le Bon, A. M. & Canivenc-Lavier, M. C. (1996).** Anticarcinogenic properties of some flavonoids. In *Polyphenols 96 – Les Colloques 87*. Edition *Inra*, p 165, 204.

## T

- Tapas, A. R., Sakarkar, D. M., & Kakde, R. B. (2008).** Flavonoids as nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **7**(3), 1089 – 1099.
- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., & Borges, F. (2013).** Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. *BioMed Research International*, 1 – 11.
- Tiwari, A. K. (2001).** Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. *Current science*, **81** (9), 1179 – 1181.

**Tiwari, B. K., Brunton, N. P & Brennan, C. S. (2013).** Handbook of plant food phytochemicals. 1<sup>ère</sup> édition. Edition *John Wiley & Sons*, p 2000.

**Torres De Pinedo, A., Pen alver, P., & Morales, J. C. (2007)** Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: structure-activity relationship. *Food Chem*, **103**, 55–61.

## U

**Ulanowska, K., Traczyk, A., Konopa, G & Wegrzyn, G. (2008).** Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol*, **184** (5), 271 –278.

## V

**Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functionand human disease. *Int j Biochem Cell Biol*, **39**, 44 – 84.

**Valls, J., Millan, S., Marti, M. P., Borrás, E., & Arola, L. (2009).** Advanced separation methods of food anthocanins, isoflavones and flavanols . *Journale of Chromatography A*, **1216** (43), 7143 – 7172.

**Vincent, J. L., & Martin, C.(2008).** Le syndrome de détresse respiratoire aigue. Edition *Springer Berlin Heidelberg New York*, p 172.

**Visioli, F., Borsani, L., & Galli, C. (2000).** Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of Phytochemicals. *Cardiovascular Research*, 419 – 425.

## W

**Wardman, P., & Candeias, L. P. (1996).** Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res*, **145**, 523 – 531.

**Waston, R. R., Preedy, V. R., & Zibadi, S. (2013).** Polyphenol in Human Health and Disease. Edition *Academic Press is an Imprint of Elsevier*, p 643.

**Wichtl, M., Anton, R., Czygan, F. C., Frohne, D., Hiller, K., Holtzel, C., Nagell, A., Pachaly, P., Pfander, H. J., Willuhn, G., & Buff, W.(2003).** Plantes thérapeutiques. 2<sup>ème</sup> édition. Edition *Lavoisier Tec & DocMédicales Internationales, Paris*, p XXVI.

**Wolin, M. S. (2009).** Reactive oxygen species and the control of vascularfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **296**, H539 – 549.

**Wong, C. C., Li, H. B., Cheng, K. W., & Chen, F. (2006).** A systematic survey of antioxidantactivity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem*, **97**, 705 – 711.

## Y

**Yamanaka, N., Samu, O., & Nagao, S. (1996).** Green tea catechins such as (-) epicatechin and (-) epigallocatechin accelerate Cu<sup>+2</sup> induced low density lipoprotein oxidation in propagation phase. *Febs Lett*, **401**, 230 – 234.

**Yordi , E. G., Pérez, E. M., Matos, M. J., & villares, E. U. (2012).** Antioxidant and pro oxidant effects of polyphenolic compounds and structure- avtivity relationship evidence, 23 –48.

**Yoshino, M., & Murakami, K. (1998).** Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. *Anal. Biochem*, **257**, 40 – 44.

<b>LARABA Meriem</b> <b>SERRAT Amina</b> <b>OUASSAA Ghania</b>	<b>Date de soutenance</b> <b>05 /06/2016</b>
<b>Titre : Etude <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante des polyphénols isolés à partir d'une plante médicinale</b>	
<b>Nature du diplôme : Master</b> <b>Domaine : Science de la nature et de la vie</b> <b>Option : Toxicologie et santé</b>	
<b>Résumé</b>  <p>Les substances naturelles issues de la biomasse des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans la biotechnologie tant dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique. Parmi ces composés on retrouve une grande partie des métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapie. On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions, les études des métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de tissus végétaux. C'est le cas notamment des composés phénoliques qui font l'objet de notre étude, composés largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydant et anti radicalaires. Dans ce contexte, le présent travail porte sur une étude phytochimique et antioxydante des phases <i>n</i>-butanolique, acétate d'éthyle et chloroformique issues d'une plantes endémique utilisée traditionnellement pour traiter plusieurs maladies en Algérie. Le taux des polyphénols est remarquablement très élevé dans la phase acétate d'éthyle (<math>148,26 \pm 0,02</math> mg EAG/g EXS) par rapport à la phase <i>n</i>-butanolique (<math>100,04 \pm 0,002</math> mg EAG/g EXS) et chloroformique (<math>75,95 \pm 0,006</math> mg EAG/g EXS). Les analyses complémentaires ont permis de mettre en évidence les capacités antioxydantes et anti-radicalaires de ces extraits selon les méthodes de DPPH*, CAT et FRAP. Les résultats de ces travaux nous ont permis d'affirmer que l'ensemble des extraits de la plante étudié présentent des très bonnes propriétés antioxydantes qui pourraient nous permettre de les recommander dans la biotechnologie.</p>	
<b>Mots clés:</b> stress oxydant, antioxydant, polyphénole, DPPH, FRAP.	
<b>Laboratoire de recherche :</b> Laboratoire de biologie et d'environnement, faculté des sciences de la nature et de la vie. université Mentouri, Constantine.	
<b>Président du jury :</b> Mme ZAMA Djamila (Pr- UFM Constantine). <b>Rapporteur :</b> Mr BOULDJADJ Redouane (MAA- UFM Constantine). <b>Examineurs :</b> Mr ZOUAGHI Youcef (MCA- UFM Constantine). Mme DEHILI Nedjwa (MAA- UFM Constantine).	