



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 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la
Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire
قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Intitulé:

**Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydante des trois espèces végétales
dans la région des Aurès.**

Présenté et soutenu par :

- CHELLI Mouna Rayene
- ZENAD Hadjer

Le : 27/06/2018

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme. MOSBAH A. (M.C.A-UFM Constantine 1).
Rapporteur : Mr. KASHI I. (Attaché de recherche-C.R.Bt.Constantine 1).
Co-Rapporteur : Mr. RAHMANI A. (Attaché de recherche-C.R.Bt.Constantine 1).
Examineur : Mr. MOKRANI E.H. (MAA-UFM Constantine 1).

*Année universitaire
2017- 2018*

Remerciement

A Dieu le Tout Puissant de nous avoir donné le courage, la santé, et accordé son soutien durant les périodes les plus difficiles.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de biochimie, Centre de Recherche en Biotechnologie (C.R.Bt), Constantine, Algérie.

*Merci également au **Dr I. KASHI** pour nous avoir encadré, Permis d'étudier et évalué l'activité antioxydante d'*Artemisia herba Alba*, *Artemisia Absinthuim* et *Alanda Alata*.*

*Merci également au **Dr C. bensouici** directeur de laboratoire de biochimie au Centre de Recherche en Biotechnologie.*

*Mes remerciements vont également aux membres de jury **Dr.***

***A. MOSBAH, Dr. E. MOKRANI** qui ont accepté d'examiner ce travail.*

*Nous exprimons aussi nos remerciements et notre gratitude à Mr **A. RAHMANI**, pour leurs encouragement et leurs aides précieuses durant toute la période de notre travail.*

Enfin nos remerciements s'adressent aux nos enseignants de l'université Frères Mentouri 1, Constantine.

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes chers parents, ma mère Habiba et mon père Abderazzek.

Pour leur patience, leur amour, leur soutien et leur encouragement tout au long de ma vie.

A mon frère Moundar Adib.

A ma sœur Lina Melissa.

À toute ma famille CHELLI de près ou de loin.

A mon encadreur KASHI Imad qui m'a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, pour sa disponibilité et ses conseils judicieux.

A mon binôme Hadjer qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail et son famille.

A La promotion de master 2 biochimie appliquée.

À mes amies.

À tous ceux qui me connaissent

Je dédie ce modeste travail

CHELLI Mouna Rayene

Dédicace

Je dédie ce travail à Ma famille ZENAD et aux personnes les plus chères au monde mes chers parents ;

A ma très chère mère Fatima ; 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 santé, longue vie et bonheur.

A mon père Mohammed ; Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est fruit de tes sacrifices qui tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

Je dédie spécial Mon marié Fares qui n'a jamais cessé de croire source d'amour et de tendresse sans toi ce mémoire n'aurait jamais un le jour...

A mes sœurs et mes frères

A ma deuxième famille : Ma mère : Zohra, Ma sœur et Mon frère.

A mon binôme Mouna Rayene qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail et son famille.

A La promotion de master 2 biochimie appliqué.

Sans oublier mes amies et a Tous ceux qui ont connus.

ZENAD Hadjer

LISTE DES ABREVIATIONS

1. A : Absorption.
2. A c : Absorbance contrôle.
3. A e : Absorbance extrait.
4. Ar HA: *Artemisia herba alba*.
5. Ac : Acétate d'éthyle.
6. ABTS : 2,2'- azino-bis (3 éthylbenzothiazoline -6- sulfonique Acide).
7. E Alata : Ephédra Alata.
8. ERO : Espèces réactives de l'oxygène.
9. Fe⁺³ : Fer ferrique.
10. Fe²⁺ : Fer ferreux.
11. SOD : Superoxyde dismutase.
12. cyt : Cytochrome
13. CAT : Catalases.
14. GPx : Glutathion peroxydases
15. GRD : Glutathion réductases.
16. RNS : Radicaux libres azotés.
17. µg : Microgramme. :
18. IC₅₀ : Concentration inhibitrice a 50%.
19. DPPH : 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl.
20. ORAC : Oxygen Radical Absorbance CapAcity.
21. G : Gramme.
22. GSH : Glutathionréduit.
23. GSSG : Glutathions disulfure.
24. H : Hydrogène.
25. H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.
26. mg/g : Milligramme par gramme.
27. NADPH : Nicotinamide adenine di nucleotide phosphate hydrogynase.
28. NO. : Monoxyde d'azote.
29. O₂⁻ : Anion superoxyde
30. O₂ : Oxygène.
31. ONOO⁻ : Peroxynitrite.
32. ROS : Réactive oxygène species (derives reactifs de l'oxygene).
33. MeOH : Méthanol.
34. Et : Ethanol.

- 33. Ac : Acétate d'éthyle.
- 34. B : Butanol.
- 35. Al : *Alanda alata*.
- 36. Ar: *Artemisia Absinthium*.
- 37. Ar HA: *Artemisia herba alba*.
- 38. R : Rendement.
- 39. PE : Poids de l'extrait (g).
- 40. PMV : Poids de matière végétale (g).

LISTE DES FIGURES

Fig 1 : Classification des quelques métabolites secondaires.....	2
Fig 2 : <i>Artemisia Absinthium</i>	4
Fig 3 : Structure chimiques de la thuyone.....	6
Fig 4 : Structure chimiques de l’Absinthine	6
Fig 5 : Biosynthèse de l’Artémisinine.....	6
Fig 6 : Plante dans son milieu naturel au début de la saison de fleuraison	8
Fig 7 : <i>Artemisia herba alba</i>	9
Fig 8 : Distribution géographiques d’ <i>Artemisia herba alba</i>	10
Fig 9 : Flavonoïdes de l’ <i>Artemisia herba alba</i>	11
Fig 10 : Sesquiterpènes lactones d’ <i>Artemisia herba alba</i>	12
Fig 11 : <i>Ephedra Alata</i>	14
Fig 12 : Composantes de la balance entre les molécules anti et pro-oxydantes.....	18
Fig 13 : Formation et décomposition de l’ion peroxinitrite.....	21
Fig 14 : Radicaux libres soufrés.....	21
Fig 15 : Résonance des quinones	22
Fig 16 : Appareils utilisés pour la réalisation des protocoles expérimentaux	32
Fig 17 : Extrait éthanolique (A) et acétate d’éthyle (B) d’ <i>Artemisia Absinthium</i>	33
Fig 18 : Extrait éthanolique (A) et acétate d’éthyle (B) d’ <i>Alanda Alata</i>	33
Fig 19 : Extrait éthanolique (A), acétate d’éthyle (B), méthanolique (C) et butanolique (D) d’ <i>Artemisia herba alba</i>	33
Fig 20 : Protocol d’étude expérimental	34
Fig 21 : Méthode graphique pour calculer IC ₅₀ des trois essais d’extrait éthanolique d’ <i>Artemisia Absinthium</i>	44
Fig 22 : Méthode graphique pour calculer IC ₅₀ des trois essais d’extrait acétate d’éthyle d’ <i>Artemisia Absinthium</i>	44
Fig 23 : Méthode graphique pour calculer IC ₅₀ des trois essais d’extrait éthanolique d’ <i>Alanda Alata</i>	45
Fig 24 : Histogramme d’IC ₅₀ des extraits et standards par DPPH.....	46
Fig 25 : Histogramme d’IC ₅₀ des extraits et standards par ABTS.....	47

Fig 26 : Histogramme d'IC ₅₀ des extraits et standards par CUPRAC.....	49
Fig 27 : Dosage des flavonoïdes (A) et polyphénols (B) sous microplaque	50
Fig 28 : Courbe d'étalonnage d'acide Gallique (Moyenne ± ET de trois essais)	53
Fig 29 : Courbe d'étalonnage de la gamme quercétine (Moyenne ± ET de trois essais).....	54

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Solvants utilisés et leurs formules.....	29
Tableau 2 : Réactifs utilisés et leurs formules.....	29
Tableau 3 : Rendement d'extraction par l'acétate d'éthyle.....	35
Tableau 4 : Rendement d'extraction par l'éthanol.....	35
Tableau 5 : Rendement d'extraction par butanol	35
Tableau 6 : Rendement d'extraction par méthanol.....	35
Tableau 7 : Pourcentage d'inhibition et l'IC ₅₀ pour DPPH.....	42
Tableau 8 : Absorbance des trois extraits par lecture microplaque.	43
Tableau 9 : Pourcentage d'inhibition des trois extraits	43
Tableau 10 : IC ₅₀ des trois essais et leur moyenne	44
Tableau 11 : IC ₅₀ des trois essais et leur moyenne.	45
Tableau 12 : IC ₅₀ des trois essais et leur moyenne	45
Tableau 13 : Pourcentage d'inhibition et l'IC ₅₀ pour l'ABTS.....	47
Tableau 14 : Absorbance et l'IC ₅₀ pour CUPRAC.....	48
Tableau 15 : Teneur en polyphénols et flavonoïdes	50
Tableau 16 : Absorbance de la gamme d'Acide gallique.	52
Tableau 17 : Absorbance des trois extraits et contrôle par lecture microplaque.....	53
Tableau 18 : Valeurs de S et P.....	53
Tableau 19 : Moyennes et l'écart type des trois extraits.....	53
Tableau 20 : Absorbance de la gamme quercétine.	54
Tableau 21 : Absorbance des trois extraits et contrôle par lecture microplaque.....	55
Tableau 22 : Valeurs de S et P.....	55
Tableau 23 : Moyennes et l'écart type des trois extraits.....	55

Tableau 24 : Valeurs des teneurs en polyphénols et flavonoïdes 55

SOMMAIRE

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
Chapitre I : Etude botanique	
I.1. <i>Artemisia Absinthium</i>	4
I.1.1. Présentation du plante <i>Artemisia Absinthium</i>	4
I. 1.2. systématique du plante	4
I.1.3. Nomenclature et taxonomie	4
I.1.4. description botanique	5
I.1.5. Répartition géographique.....	5
I.1.6. Composition chimique du plante	5
I.1.7. L'effet thérapeutique.....	7
I.2. <i>Artemisia herba Alba</i>	7
I.2.1. Présentation de la plante <i>Artemisia herba Alba</i>	7
I .2.2. Systématique de la plante	8
I .2.3. Nomenclature et taxonomie	8
I .2.4. La description botanique.....	9
I .2.5. La répartition géographique.....	10
I .2.6. Composition chimique.....	10
I .2.7. Utilisation traditionnel (Effet thérapeutique).....	13
I .2.8. La toxicité.....	13
I.3. <i>Ephédra Alata</i>	13
I.3.1. Présentation du genre <i>Ephédra</i>	13
I.3.2. Position systématique du Sous espèce <i>Ephedra Alata</i>	14
I.3.3. Description botanique de l'espèce <i>Ephédra Alata (E. Alata)</i>	15
I .3.4. Répartition géographique.....	15
I.3.5. Utilisation	15
I.3.6. Toxicité.....	16
I.3.7. Composition chimique de la plante.....	16

Chapitre II : Stress oxydatif Et antioxydants

II. 1. Stress oxydatif.....	17
II.1.1. Radical libre	18
II.1.1.1. Production des radicaux libres	18
II.1.1.2. Radicaux libres en biologie.....	19
II.1.1.2.1. Radicaux libres oxygénés (ROS).....	20
II.1.1.2.2. Radicaux libres azotés (RNS) 3, 4, 5.....	20
II.1.1.2.3. Radicaux libres soufrés.....	21
II.1.1.2.4. Radicaux libres à partir de Flavines et Quinones.....	22
II. 1.2. Conséquence du stress oxydatif	22
II .2. Antioxydants	22
II .2. 1. Antioxydants enzymatiques	22
II .2.2. Antioxydants non-enzymatiques.....	24
II .2. 2.1. Antioxydants non-enzymatiques d'origine endogène.....	24
II .2. 2.2. Antioxydants non-enzymatiques d'origine exogène	24
II .3. Propriétés biologiques des polyphénols et des flavonoïdes.....	26

Chapitre III : Protocole expérimental

III.1. Matériel	28
III.1.1. Matériel végétal.....	28
III.1.1.1. La récolte	28
III.1.1.2.Lavage et conservation.....	28
III.1.1.3. Séchage.....	28
III.1.2. Réactifs chimiques et solvants	29
III.1.3. Appareils utilisés.....	30
III.2. Méthodes.....	31
III.2.1. Broyage.....	31
III.2.2. Préparations de matériel végétal.....	32
III.3. Rendements des extraits	35
III.4. Protocoles.....	36
III.4.1. Piégeage du radical libre DPPH	36
III.4.1.1.Principe de la réaction.....	36
III.4.1.2.Mode opératoire	36

III.4.2. Réduction du radical-cation ABTS.....	37
III.4.2.1.Principe de la réaction.....	37
III.4.2.2. Mode opératoire.....	38
III.4.3. CUPRAC.....	38
III.4.3.1. Principe de la réaction.....	38
III.4.3.2. Mode opératoire.....	38
III.4.4. Total Phénolique.....	38
III.4.4.1. Principe de la réaction.....	38
III.4.4.2. Mode opératoire.....	39
III.4.5. Total Flavonoïde.....	40
III.4.5.1. Principe de la réaction.....	40
III.4.5.2. Mode opératoire.....	40

Chapitre IV : Résultats et Discussion

IV.1. DPPH.....	42
IV.2. ABTS.....	46
IV.3. CUPRAC.....	48
IV.4.1. Criblage phytochimique (polyphénols et flavonoïdes).....	49
IV.4.1.1. Caractérisation quantitative des extraits des plantes.....	51
IV.4.1.1.1.Teneur des extraits en polyphénols.....	51
IV.4.1.1.2.Teneur des extraits en flavonoïdes.....	54
IV.2. Les antioxydants.....	56
IV.2.1. composés phénoliques.....	56
IV.2.2. flavonoïdes.....	56
Conclusion et perspective.....	57
Références bibliographiques.....	59
Résumé.....	67

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les plantes produisent un grand nombre de composés, dont jusqu'à il n'y a pas très longtemps, on ne connaissait pas le rôle pour la plante. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent de réactions chimiques ultérieures, d'où le nom de métabolites secondaires. Des découvertes récentes ont montré que bon nombre d'entre eux ont un rôle défensif pour les plantes. Ils ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Ils se sont surtout illustrés en thérapeutique et dépassent actuellement 100 000 substances identifiées. Parmi eux : les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpènes. Ces composés se trouvent dans toutes les parties des plantes mais ils sont distribués selon leurs rôles défensifs. Cette distribution varie d'une plante à l'autre.

Le terme «métabolite secondaire», qui a probablement été introduit par Albrecht Kossel en 1891, est utilisé pour décrire une vaste gamme de composés chimiques dans les plantes (figure 1), qui sont responsables des fonctions périphérique indirectement essentielles à la vie des plantes, telles que la communication intercellulaire, la défense et la régulation des cycles catalytiques (Guillaume, 2008). Ils sont synthétisés par la plante en réaction à des stimulus extérieurs et ont souvent une fonction régulatrice dans le cadre d'une série de réactions physiologiques et métaboliques en cascade à la suite d'un stress environnemental ou d'une attaque par des ravageurs. Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique (Hartmann, 2007).

Lorsque l'on découvre une nouvelle fonction biologique à un métabolite secondaire, ce dernier est généralement reclassifié à titre de vitamine (BENBROOK, 2005).

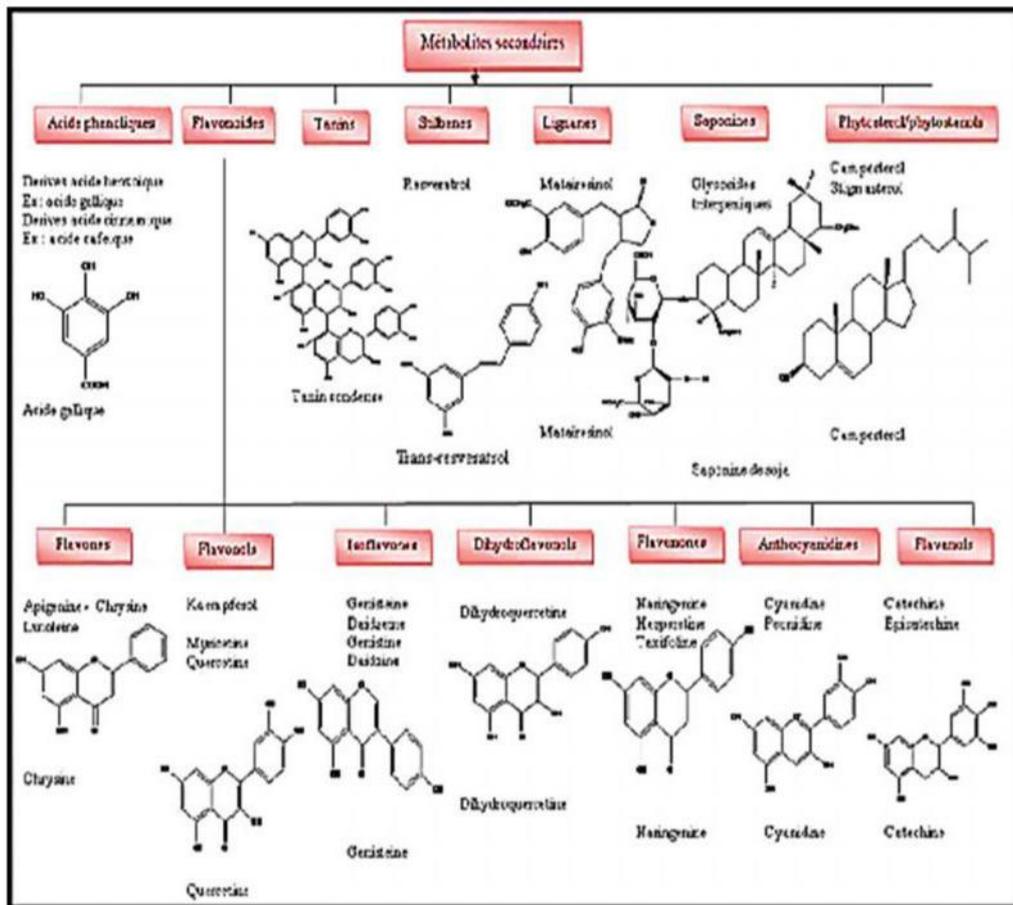


Figure 1 : Classification des quelques métabolites secondaires (MUANDA, 2010).

La Phytothérapie C'est une thérapeutique qui utilise les plantes ou formes galéniques dérivées de plantes excluant les principes d'extraction puis isolés des plantes (Maamri, 2009). Ainsi de nombreuses formes galéniques peuvent être utilisées comme tisanes (infusées, décoctées, macérées), extraits, teintures, ou des huiles essentielles (Hosttmann, 1997 ; Catier et Roux, 2007).

Le mot "phytothérapie" se compose étymologiquement de deux racines grecques : phuton et therapeia qui signifient respectivement "plante" et "traitement". La "biochimio-thérapie" naturelle précieuse repose sur la relation existant entre les composants chimiques des produits dérivés des plantes et les activités thérapeutiques qui en proviennent (Khaffach, 2015). La phytothérapie concerne le traitement des maladies par les plantes ou par leurs extraits (BORDEAU, 2009) au point des procédés de traitement des plantes qui permettent de ne garder que les molécules intéressantes. Les produits phytothérapeutiques sont élaborés à partir de plantes fraîches, de plantes sèches, ou d'extraits de plantes (Medjoujda et Benlifa, 2013).

Il existe différents types de phytothérapie :

- L'aromathérapie : c'est une thérapeutique qui utilise les huiles essentielles, substances aromatiques secrétées par de nombreuses familles de plantes.
- La gemmothérapie : se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les radicules.
- L'herboristerie : correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne qui utilise les plantes fraîche ou séchée.
- La préparation des plantes médicinales repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau comme :
 - La décoction : généralement on utilise des morceaux d'écorce ou les racines.
 - L'infusion : c'est la méthode la plus simple en particulier pour préparer les fleurs et les feuilles.
 - Macération : c'est une technique utilisée pour préserver les principes actifs de certaines plantes médicinales qui ne supportent pas la chaleur.

Ces préparations existent aussi sous forme plus moderne de gélules de poudre de plante sèche que le sujet avale (BESANÇON, 2012).

CHAPITRE I

Etude botanique

I.1. *Artemisia Absinthium*

I.1.1. Présentation du plante *Artemisia Absinthium*

Dans la majorité des cas, les AstérAcées sont des plantes herbAcées mais elles sont également représentées par des arbres, des arbustes ou des lianes, certains sont également succulentes (Barkely et al, 2006).



Figure 2 : *Artemisia Absinthium*.

I. 1.2. systématique du plante

Le nom vernaculaire	Chiba
Nom latin	<i>Artemisia Absinthium</i>
Famille	Composés

I.1.3. Nomenclature et taxonomie

L'espèce *Artemisia Absinthium* communément appelée absinthe appartient au genre *Artemisia* et à la famille des composés ou AstérAcée.

Le nom "Artemisia" est dérivé de la déesse Artemisia qui avait découvert les effets de la plante, alors que le mot "Absinthium" signifie imbuvable à cause du goût très amer de la centrale (Yildiz et al, 2011). Cette plante est classée dans :

- le Royaume : Plantae.
- Sous-règne : TrAcheobionta.
- Superdivision : Spermatophyta.
- Division : Magnoliophyta.

- Classe : Magnoliopsida.
- Sous-classe : Asteridae.
- Ordre : Asterales.
- Famille : Asteraceae.
- Sous-famille : Asteroideae.
- la tribu : Anthemideae.
- Sous-tribu : Artemisinae.
- Genre : Artemisia.
- Espèce : *Artemisia Absinthium*.

I.1.4. description botanique

L'*Artemisia Absinthium* est une plante aromatique, vivace, herbacée qui mesure entre 0,5 et 1 mètre. Elle possède une forte odeur (essence d'Ab-sinthe) et une saveur amère due à l'absinthine (Mansour Sadia, 2015), les tiges sont rameuses, herbacées, cylindrique et de couleur blanchâtre, en petits capsules globuleux groupés en panicules feuilles, les fleurs sont homogènes, tubuleuses, jaunes ou blanches et possèdent une corolle glabre ou velue, les fruits sont des akènes très petits non glanduleux (Lucienne, 2007).

I.1. 5. Répartition géographique

L'*Artemisia Absinthium* est une plante originaire des régions continentales à climat tempéré d'Europe, d'Asie et d'Afrique du nord (Sharopov et al, 2012), on la trouve pratiquement En Algérie dans la région des Aurès, elle est capable de pousser sur les terrains incultes et arides, sur les pentes rocheuses, au bord des chemins et des champs (Mansour Sadia, 2015).

I.1. 6. Composition chimique du plante

L'espèce *Artemisia absinthium* a fait l'objet de plusieurs investigations chimiques, signalant la présence de nombreux types des métabolites secondaires tels que l'huile essentielle (Mansour Sadia, 2015). Elle est connue pour contenir des thuyones : α et β -thuyones (figure 2). Il existe aussi de nombreux chémotypes : chémotype à Z-époxy- α -ocimène (26-47%), à Acétate de sabinyle ou à Acétate de chrysanthémyle. On note aussi la présence de polyynes (Bruneton, 2009), de coumarines, de lignanes, de polyphénols en quantité notable « absinthine (figure 3), artabsine, matricine » (Aberham et al., 2010) avec modifications.

Certains études rapportent qu'en plus de l'artémisinine, le genre *Artemisia* est une riche source d'autres lactones sesquiterpéniques et flavonoïdes (Jill et al., 2011).

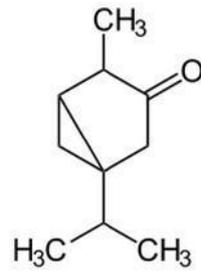


Figure 3 : Structure chimiques de la thuyone.

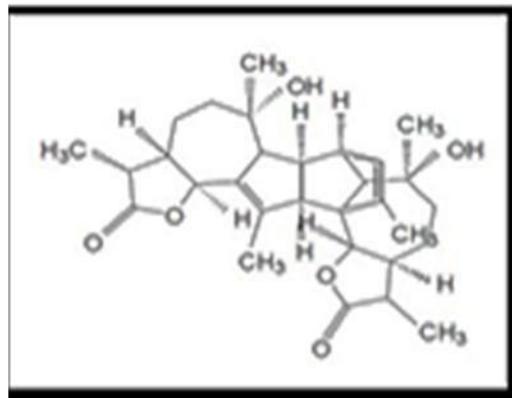


Figure 4 : Structure chimiques de l'Absinthine.

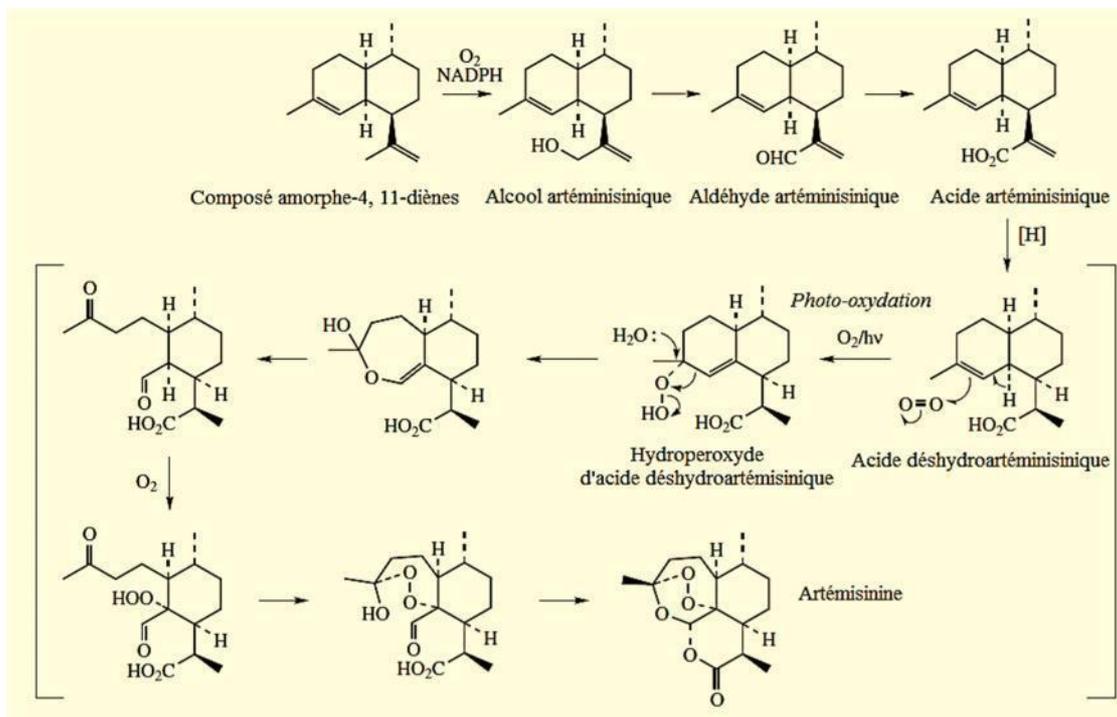


Figure 5 : Biosynthèse de l'Artémisinine.

I. 7. L'effet thérapeutique

La plante appelée communément « chiba » est employée en Algérie, en usage interne, comme remède digestif (Basta et al., 2006). Elle possède des propriétés thérapeutiques, parmi ces dernières on peut citer: un effet antigrippales, un effet antidiarrhétic, un effet antihemithic et emménagogue (Basta et al., 2006).

-Les racines de cette plante sont utilisées en décoction pour traiter l'ulcère gastrique (Lucienne, 2007).

-Le décocté de la nature de plante entière est recommandé pour combattre la syphilis, l'hypertension et le cancer.

-La tige feuillée est utilisée en usage interne sous forme d'infusé comme remède anti spasmodic et comme remède cholagogue (Basta et al., 2006).

I.2. *Artemisia herba Alba*

I .2.1. Présentation de la plante *Artemisia herba Alba*

L'*Artemisia herba Alba* (Armoise herbe blanche) a été décrite par l'historien grec Xenophon, dès le début du IV^e siècle, elle trouve dans les steppes de la Mésopotamie (khireddine, 2013).

C'est une plante qui se caractérise principalement par une odeur prest dans les huiles de thymol et un goût amer d'où son caractère astringent, plusieurs noms sont attribués à l'*Artemisia herba Alba* : thym des steppes, absinthe du désert, en Afrique du nord au Moyen-Orient on l'appelle (Chih) ou (Chih khersani) selon la région (KheffAche, 2015).



Figure 6 : Plante dans son milieu naturel au début de la saison de fleuraison (MESSAI, 2011).

I .2.2. Systématique de la plante

Nom vernaculaire	Chih
Nom français	Worm Wood
Nom latin	<i>Artemisia herba Alba</i>
Famille	Composés

Les parties les plus utilisées sont les parties aériennes.

I .2.3. Nomenclature et taxonomie

L'*Artemisia* est un genre de la famille des armoises, il provient de celui de la déesse grecque de la classe Artémis, herba alba signifie herbe blanche (Messai, 2011).

Son nom scientifique est *Artemisia herba Alba* ou l'*Artemisia incultadel* (seidemann, 2005).

Cette plante est classée dans :

- Règne : Plantae
- Embranchement : Spermaphytes (Phanérogames) ou « plantes à graines »
- Sous- embranchement : Angiospermes (Plantes à fleurs)
- Classe : Dicotylédones (Magnoliopsida)

- Sous- classe : Asteridae
- Ordre : Asterales
- Famille : Astéracées ou composée
- Tribu : Anthemideae
- Sous- tribu : Aremisinae
- Genre : *Artemisia*
- Espèce : *Artemisia herba Alba* (Messai, 2011).

I .2.4. La description botanique

L'*Artemisia herba Alba* est un arbuste naine vivace toujours verte (kavishankeret al, 2011). L'Armoise herbe blanche est une plante herbacée a tiges ligneuses (POTTIER, 1981), ces tige sont rigides et droite (COLINE, 2002) ramifiées et tomenteuses de 30 à 50cm de long, les fleurs sont groupées en grappes, poilues, courtes, de couleur verdâtre. Les capitules sont pauciflores en général, homogènes à fleurs hermaphrodites. Ils sont sessiles ou subsessiles (Quezel et Santa, 1963 ; Wright, 2002).

Jaunâtres emballées dans des petites capsules (comprenant chacun de 3 à 8 fleurs), les fruits sont des akènes (Chaabna, 2014).

Ces caractéristiques morphologiques et physiologiques font d'elle une espèce bien adaptée aux conditions climatiques arides. Le dimorphisme saisonnière de son feuillage lui permet de réduire la surface transpirante et d'éviter ainsi les pertes d'eau (Ferchichi et al, 2004).L'*Artemisia herba Alba* présente une forte production de graines et un pouvoir de régénération élevé (Matteucci, 2008).



Figure 7 : *Artemisia herba Alba*.

I .2.5. La répartition géographique

Le genre *Artemisia* est un membre d'une grande variété de plante appartenant à la famille des asteraceae (composite), plus de 300 différentes de ce genre se trouvent principalement dans les zones arides et semi arides d'Europe, d'Amérique, d'Afrique du nord ainsi qu'en Asie (Proksch et al. 1992 ; Nikolova et al., 2010).

L'*Artemisia herba Alba* est absente dans les zones littorales nord, ce taxons pousse de manière sauvage sur des substrats nitrophiles (Salido et al, 2004 ; Dunn et al. 1996). Qui abonde au Moyen-Orient, dans le sud Algérien et au Maroc, sur sable profonds (Boullard, 2001). L'armoise blanche se développe dans les zones bioclimatiques qui vont de la partie supérieure semi-aride à la partie inférieure Subsaharienne. (Gharbi et Sand, 2008).



Figure 8 : Distribution géographiques d'*Artemisia herba Alba* (Mohamed et al, 2010).

I .2.6. Composition chimique

L'*Artemisia herba Alba* est une plante riche en métabolites secondaires, parmi ces métabolites on trouve des constituants volatiles, l'huile essentielle, des constituants non volatiles tel que les flavonoïdes et sesquiterpènes lactones qui offrent leur vertu médicinale (Mohamed et al. 2010). En plus des sesquiterpènes lactones et des flavonoïdes l'analyse phytochimique a montré que la composition des huiles essentielles de l'*Artemisia herba Alba*

est riche en monoterpènes, triterpènespentacyc -liques, santonines, coumarines et tanins (Mohamed et al. 2010).

À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétéroside (KheffAch, 2015). Les principaux flavonoïdes isolés à partir de l'armoise herbe blanche sont : la hispiduline, la cirsimaritrine. Des flavones glycosidiques comme la 3- rutinoside, quercétine et isovitexine sont aussi mis en évidence (Aouadhi, 2010).

Il est noté aussi que la composition biochimique d'une espèce végétale est lié directement à la qualité du substrat (sol) (Bouzidi, 2016), Sa composition chimique est complètement dépourvue d'alcaloïdes (Gseryra, 2011).

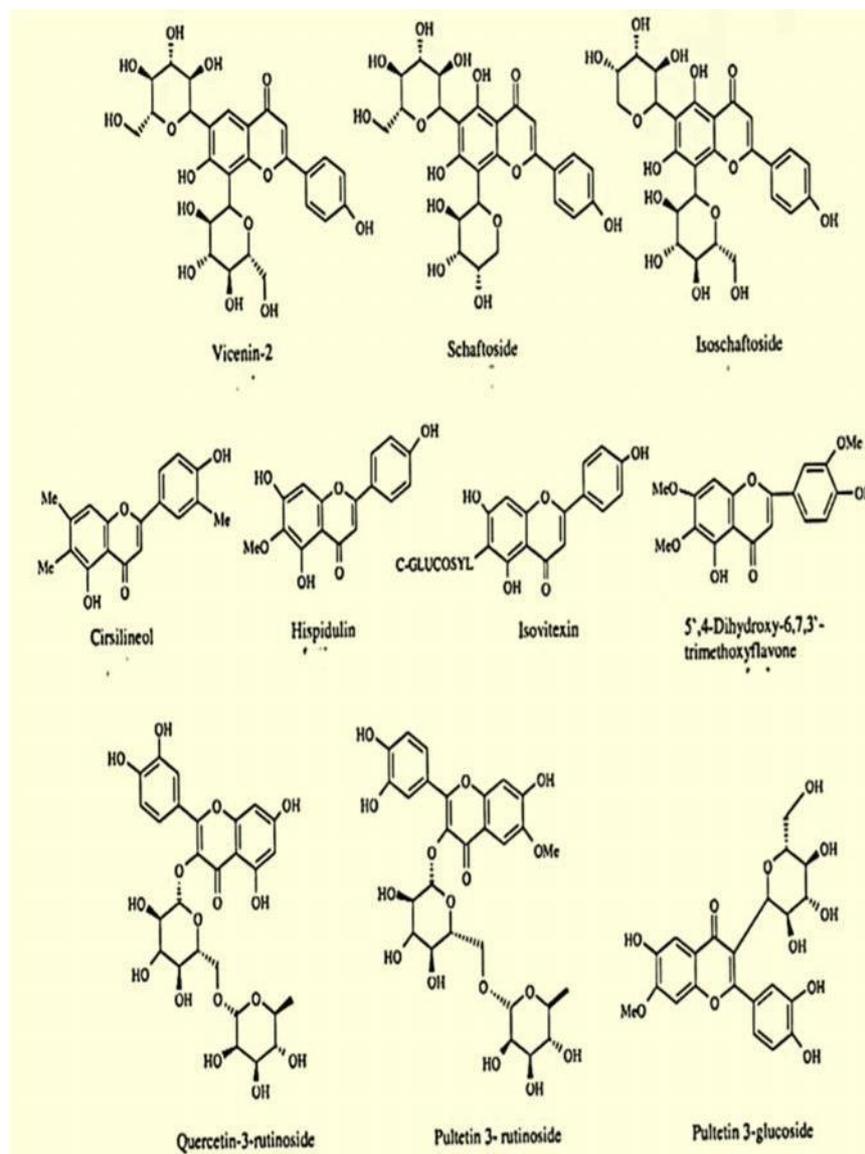


Figure 9 : Flavonoïdes de l'*Artemisia herba Alba* (Mohamed et al, 2010).

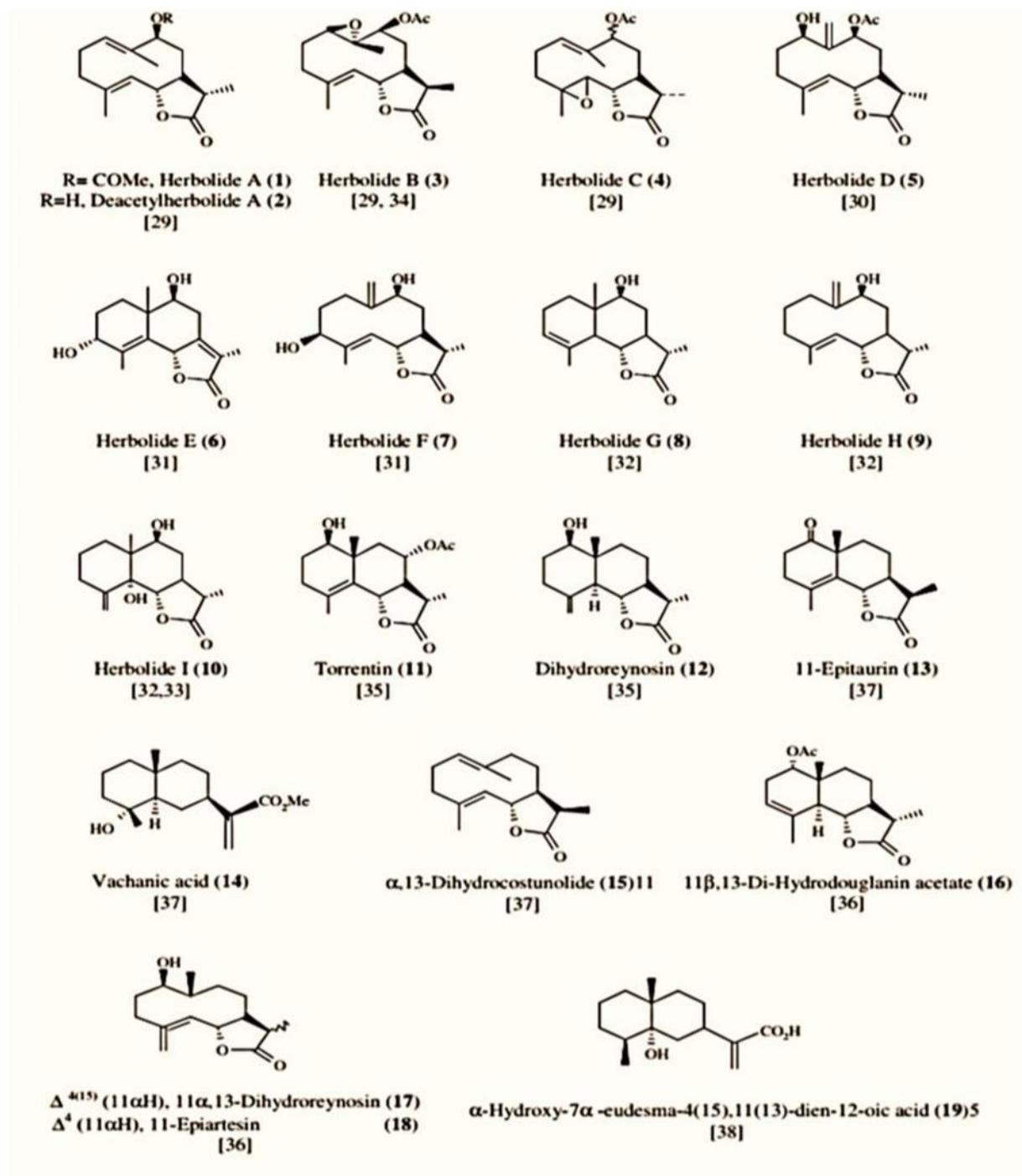


Figure 10 : Sesquiterpènes lactones d'*Artemisia herba Alba* (Mohamed et al, 2010).

I .2.7. Utilisation traditionnel (Effet thérapeutique) :

L'*Artemisia herba Alba* est très utilisé en médecine traditionnelle pratiquement contre plusieurs maladies y compris l'entérite, les troubles intestinales, la diarrhée et les douleurs abdominales (Mansour, 2015). Elle est aussi utilisée en tant que remède de l'inflammation du tractus gastro-intestinal (Gharabi, 2008).

Plusieurs études scientifiques ont également prouvées l'efficacité de l'armoise blanche en tant qu'agent antidiabétique (Tastekin et al. 2006), les homicides (Hatimi et al. 2001), anti parasitaire, antibactérien, Antiviral, anti-oxydant, Anti malarien, Antipyrétique, Antispasmodique et Antihémorragique (Boudjelal, 2013).

Artemisia herba Alba utilisée dans le traitement du diabète sucré (Twaijha et al-Badre, 1988), la macération, infusion, tisanes des feuilles, rameaux ou fleurs d'*artemisia herba alba* peuvent être utilisés pour soigner les troubles digestif et respiratoire, rhumatisme, obésité et refroidissement (Houda, 2015 ; Boukerker et al, 2016).

I .2.8. La toxicité

A forte dose l'*Artemisia herba Alba* devient une substance neurotoxique et hémorragique, seulement les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque dans la phytothérapie, comme tous les produits naturels (Bouzidi, 2016).

A des concentrations élevés, la thyone constitue la substance toxique et bioactive dans l'armoise et la forme la plus toxique c'est l'Alpha-thyone, elle a des effets convulsivantes (Aouadhi, 2010).

I.3. *Ephédra Alata*

I.3.1. Présentation du genre *Ephédra*

L'origine de l'*Ephédra* a parfois été considérée comme ancienne, peut-être dès ou avant l'éclatement de la Pangée (environ 200 millions d'années passant dans le Trias moyen) (Huang et Price, 2003).

La famille des Ephedraceae représentée par le seul genre *Ephédra* inclue environ 40 espèces dans le monde (Evans, 2009) est représentée par des arbustes dioïques vivaces à rameaux articulés, qui peuvent atteindre 1 à 3 mètre de haut, avec de minces tiges dressées, verts jaunâtres, intersectées et légèrement nervurées, à canalicules de 1,5 mm de diamètre et qui se termine par une pointe souvent Acérée. Au niveau des nœuds, qui sont écarté de 4 à 6

cm, les feuilles réduites en écailles apparaissent triangulaires qui se développent en paires opposées ou en verticilles de trois, donnant à la plante l'aspect d'un arbuste sans feuille. De petites fleurs apparaissent en été (Limberger et al, 2013).

Les espèces de ce genre peuvent pousser dans des conditions semi-arides et désertiques, ce qui rend les six continents appropriés pour la croissance de ce genre. Ce dernier se développe habituellement dans des sols sableux, des pentes sèches et des côtés secs de montagnes (Limberger et al, 2013).

I.3.2. Position systématique du Sous espèce *Ephedra Alata*

- Embranchement : Spermaphytes
- Sous embranchement : Gymnospermes
- Classe : Gnetopsida
- Ordre : Ephedrales
- Famille : Ephedraceae
- Genre : *Ephedra*
- Espèce : *Ephedra Alata*
- Sous espèce : *Ephedra Alata alenda* (Ozenda, 1991).



Figure 11 : *Ephedra Alata*.

I.3.3. Description botanique de l'espèce *Ephédra Alata* (*E. Alata*)

Cette espèce, qui est réputée pour sa tolérance élevée à la carence en eau dans les régions sahariennes.

- Un arbuste de 1 à 3 mètres de haut.
- Rameaux articulés et très ramifiés d'une couleur vert-jaunâtre.
- Portant au niveau des nœuds de petites feuilles opposées, alternant d'un nœud à l'autre.
- Les fleurs sont en petits cônes blanchâtres, dioïques (fleurs mâles et femelles sur des pieds différents).
- Les fruits entourés de bractées largement membraneuses.
- Elle présente un système de racines latérales extrêmement puissant (Derbel et al, 2010).
- Floraison : hiver, printemps (Nabti Hichem, 2017).

I.3.4. Répartition géographique

En Algérie, *E. Alata* se trouve dans le Sahara septentrional et occidental au niveau des terrains sableux, des regs et les lits sablonneux des oueds. Elle est même rencontrée dans le sable de l'étage tropical et la Hamada de Tinghert (Ozenda, 1991).

I.3.5. Utilisation

Les espèces du genre *Ephedra* sont parmi les plus anciennes herbes médicinales connues de l'humanité. *Ephedra sinica* est l'espèce principale qui a été utilisée en Chine depuis plus de 5000 ans. *Ephedra gerardiana* a aussi été utilisée dans la médecine traditionnelle indienne depuis l'ancien temps. Même durant le temps de l'empire Romain, l'*Ephedra* était bien connue (Abourashed et al, 2003).

Ma-huang est le terme spécifique donné, par les chinoises, à la partie aérienne des espèces : *Ephedra sinica*, *Ephedra equisetina*, *Ephedra intermedia*, *Ephedra distachya*, *Ephedra gerardiana*, *Ephedra minuta* ainsi qu'autres espèces contenant de l'éphédrine (Abourashed et al, 2003). Ma-huang a été traditionnellement utilisé en Chine pour lutter contre l'asthme bronchiale, rhume, grippe, fièvre, frissons, rhinite, congestion nasale, œdème, maux de tête, arthralgies et comme diaphorétique, anti-allergique et antitussif (Ma et al, 2007).

En dépit de sa longue histoire et sa promesse agronomique, l'utilisation de l'herbe a diminué au fil des ans, mais au début du vingtième siècle, l'importance de l'herbe a graduellement revécu comme il est démontré par son large utilisation aux Etats Unis dont beaucoup de produits contenant de l'*Ephedra* vendus sous des noms tels que "Herbal Ecstasy and Escalation" sont supposés être efficaces pour la perte de poids et l'amélioration des performances physiques (Abourashed et al., 2003).

I.3.6. Toxicité

Les espèces de l'*Ephedra* ont des effets bénéfiques et néfastes (Ma et al, 2007). Cliniquement, il peut en résulter une tachycardie, une hypertension, une hypersudation, une broncho dilatation, une agitation et une mydriase. L'utilisation de l'*Ephedra* est également connue pour être associée avec des manifestations gastro-intestinales et psychiatriques (Peters et al, 2005). Ces effets peuvent être les raisons pour lesquelles l'utilisation de l'*Ephedra* est recommandée uniquement pour les situations aiguës en médecine traditionnelle chinoise et contre-indiqué pour une utilisation à long terme (Chen et al, 2010).

I.3.7. Composition chimique de la plante

Les espèces de l'*Ephedra* sont des sources naturelles de nombreux phyto constituants incluant des alcaloïdes, des tanins, des saponines, des proanthocyanidines, des Acides phénoliques, des flavonoïdes et des huiles essentielles (Hegazi et El-Lamey, 2011).

Il est bien connu dans la littérature que les propriétés biologiques traditionnelles de l'*Ephedra* sont attribuables en grande partie aux alcaloïdes de type éphédrine, proto-alcaloïdes dérivés de la phénylalanine (Caveney et al, 2001). Notons que la négatif éphédrine et le positif pseudo éphédrine sont généralement les plus abondantes, ils représentent environ 80% de la teneur en alcaloïdes dans la plante séchée (Phinney et al, 2005).

Plus de 50 espèces d'*Ephedra* sont originaires de deux hémisphères, mais la détection des alcaloïdes de la série de l'éphédrine a été limitée à des espèces en Eurasie dont l'*Ephedra asinica* est la principale source, tandis que les espèces américaines telle que *Ephedra nevadensis* connue comme Mormon ou le thé de désert sont considérées comme dépourvues de ces métabolites (Limberger et al, 2013). Néanmoins, ce type d'alcaloïdes ne représente pas les seuls alcaloïdes identifiés dans la plante.

CHAPITRE II

Stress oxydatif et antioxydants

II. 1. Stress oxydatif

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre la production d'oxydants, ou ERO, et les molécules antioxydants en faveur des oxydants (figure 11). Le terme ERO fait référence à plusieurs types de métabolites réactifs à l'oxygène tels que les radicaux libres et d'autres non-radicalaires tel que le peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Les radicaux libres sont des molécules hautement réactives possèdent un ou plusieurs électrons non appariés tels que l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et l'oxygène singlet (Wiseman et Halliwell 1996). Ces molécules se lient rapidement aux molécules non radicalaires à proximité résultant généralement en la formation de nouveaux radicaux (Yosra Baratli 2014).

Les ERO sont principalement formés lors de l'oxydation des lipides par le cycle de Krebs et lors de la chaîne de transport mitochondriale d'électrons qui a pour but de produire de l'énergie. Les radicaux libres sont formés suite à l'oxydation des glucides, la glycation non enzymatique des protéines et leur subséquente dégradation. La présence d'une faible concentration d'ERO est importante pour le maintien d'un statut redox cellulaire normal, les fonctions tissulaires et les processus de signalisation intracellulaire (Yosra Baratli 2014).

Par contre une production excessive d'ERO endommage les lipides, les protéines et l'ADN compromettant les fonctions cellulaires. De l'autre côté de la balance, plusieurs processus de défense contre les ERO existent de manière à contrer leurs effets néfastes sur les fonctions cellulaires. La première ligne de défense est leur captation par des systèmes non enzymatiques tels que les vitamines C et E, les caroténoïdes, les polyphénols et le glutathion réduit, et plusieurs enzymes dont les plus importantes sont les enzymes superoxyde dismutases, la glutathion, la catalase et les peroxiredoxines (Yosra Baratli 2014).

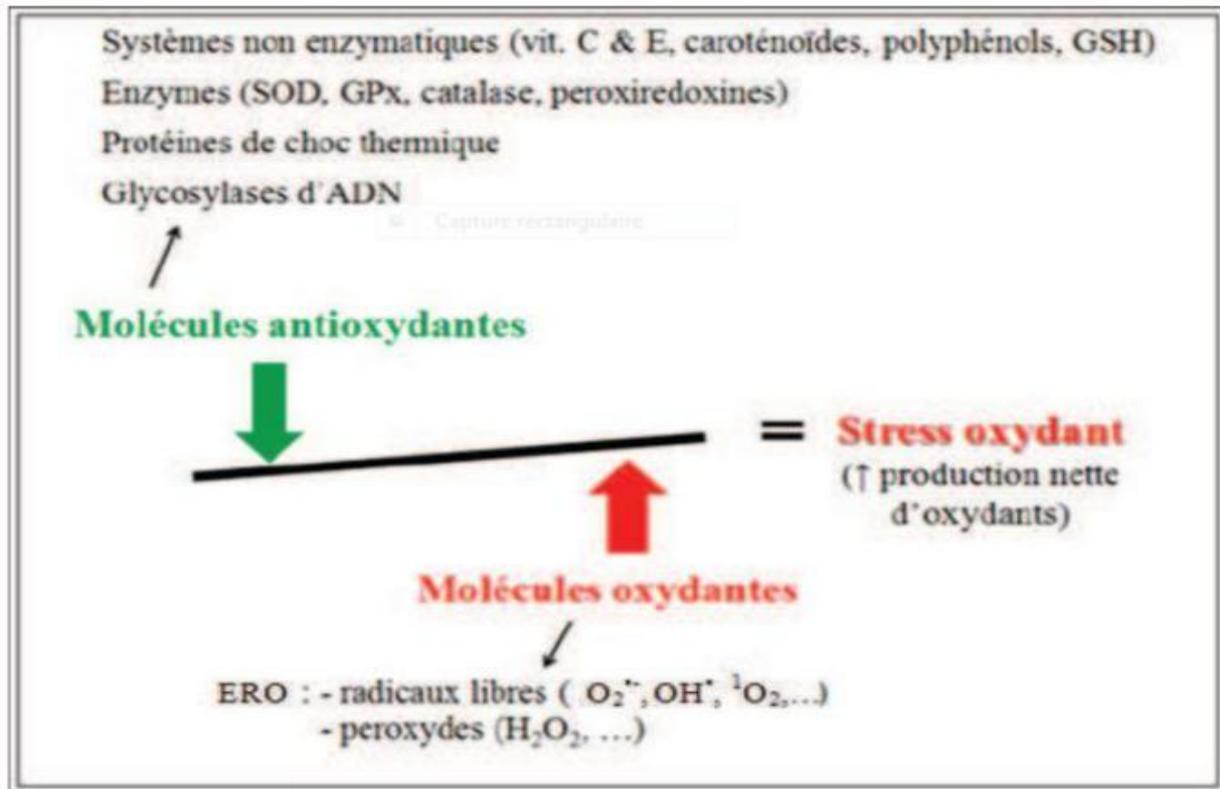


Figure 12 : Composantes de la balance entre les molécules anti et pro-oxydantes.

II.1.1. Radical libre

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante (« libre») en contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié sur une orbitale). Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé (Chérifa Boubekri 2014).

II.1.1.1. Production des radicaux libres

La principale voie de production des radicaux libres est la rupture homolytique d'une liaison covalente en deux entités possédant chacune un électron, les autres étant l'élimination ou l'addition d'un électron. Ces réactions sont endergoniques. Une fois produits, les radicaux sont souvent instables. Il faut donc des méthodes de détection adéquates. Les méthodes utilisées pour produire des radicaux libres sont : (Benaïssa Bouguerne, 2012).

a. Méthodes physiques :

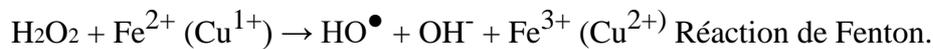
Thermolyse : Rupture d'une ou de plusieurs liaisons covalentes, consécutive à l'exposition d'un composé à une élévation de température, ou tout processus dans lequel une telle rupture joue un rôle essentiel.

Photolyse : coupure d'une ou de plusieurs liaisons d'une entité moléculaires consécutive à une absorption de lumière, ou tout processus photochimique dans lequel une telle-coupure joue un rôle essentiel.

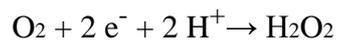
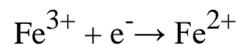
Radiolyse : lyse d'une molécule provoquée par une radiation.

b. Méthodes chimiques :

L'oxydoréduction : l'exemple le plus important est la réaction de Fenton, C'est une réaction qui permet la production du radical hydroxyle à partir du peroxyde d'hydrogène en présence d'un métal (Cu, Fe) (Benaïssa Bouguerne, 2012).

**c. Méthodes électrochimiques :**

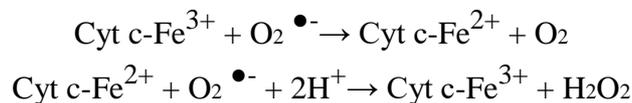
La production du radical hydroxyle (HO^\bullet) $\text{Fe}^{3+} + e^- \text{Fe}^{2+}$ s'effectue par une réaction appelée Electro-Fenton. Elle consiste à réduire électrochimiquement via des électrodes de mercure ou de graphite le fer ferrique en fer ferreux et l'oxygène en peroxyde d'hydrogène. Ce système permet de produire les deux espèces nécessaires à la réaction de Fenton. (Benaïssa Bouguerne, 2012).

**II.1.1.2. Radicaux libres en biologie**

La biochimie des radicaux libres est née en 1960, quand McCord et Fridovich montrent que l'anion superoxyde est sécrété en milieu vivant. En 1969, ces mêmes chercheurs découvrent le superoxyde dismutase (SOD). En 1970, Murad et Ignarro mettent en évidence les effets relaxants du monoxyde d'azote NO^\bullet , ce qui leur vaut le prix Nobel de médecine en 1998. (Benaïssa Bouguerne, 2012).

II.1.1.2.1. Radicaux libres oxygénés (ROS)

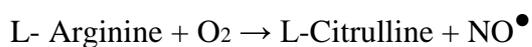
L'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et sa forme Acide ont une faible réactivité. En revanche et en présence de cation métallique, l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ donne naissance au radical hydroxyle HO^{\bullet} très réactif. Lors de la respiration mitochondriale, le dioxygène se réduit en eau. Les étapes de la réduction sont de 1 ou 2 électrons, mais aucun intermédiaire moléculaire ou radicalaire ne devrait sortir. Or il se produit des fuites de radicaux $O_2^{\bullet-}$ qui sortent dans le cytosol (1 à 2 % du dioxygène respiré). L'autre source de ce radical est la NADPH oxydase, qui est exprimée par la plupart des cellules et en particulier dans les neutrophiles. Dans le cytosol (pH = 7.4) les radicaux superoxydes sont sous forme déprotonée, ce sont des oxydants ou des réducteurs doux, peu réactifs avec les bio-polymères qui ne contiennent pas un cation métallique. A titre d'exemple, ces radicaux peuvent à la fois oxyder la forme réduite du cytochrome c (Cyt c) ou réduire sa forme oxydée.



Oxydation et réduction du cytochrome C, Cyt c. Dans les organites cellulaires Acides tels que les lysosomes (pH ~ 5), l'anion superoxyde est sous sa forme Acide appelée radical hydroperoxyde HO_2^{\bullet} qui est suffisamment oxydant pour initier une peroxydation lipidique. Du fait de leur constante de vitesse réactionnelle très élevée ($> 10^7 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$), les radicaux HO^{\bullet} peuvent oxyder les protéines, les Acides nucléiques et peroxyder les Acides gras. (Benaïssa Bouguerne, 2012).

II.1.1.2.2. Radicaux libres azotés (RNS) 3, 4, 5

L'oxyde azotique NO^{\bullet} est principalement produit par un système enzymatique, la NO synthase, qui transforme l'arginine en citrulline en présence de la NADPH (1.5 équivalent).



Il est aussi possible de le produire par réduction des nitrites en nitrates sans l'aide d'enzyme. Le NO^{\bullet} peut réagir avec les fonctions thiols en donnant naissance aux S-nitroso thiols (RSNO), avec les métaux de transition (fer, cuivre) et avec l'anion superoxyde pour former le peroxydinitrite.

La forme Acide du peroxydinitrite (ONOOH) est un oxydant fort, dont la rupture produit deux oxydants puissants (NO_2^{\bullet} , OH^{\bullet}). Il peut également s'ajouter au CO_2 pour donner un adduit instable, qui donne par la suite les radicaux NO_2^{\bullet} et $CO_3^{\bullet-}$ (Benaïssa Bouguerne, 2012) (Figure 12).

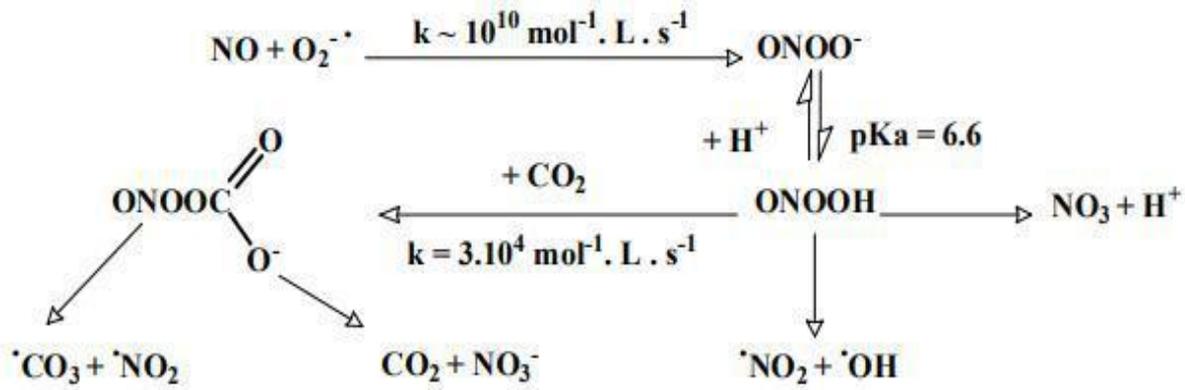


Figure 13 : Formation et décomposition de l'ion peroxinitrite.

II.1.1.2.3. Radicaux libres soufrés

Ils ont comme origine l'oxydoréduction à un électron du couple disulfure/ dithiol de protéines ou de petits peptides. Le principal disulfure cellulaire est le glutathion, qui est un tripeptide dont la concentration dans le cytosol peut aller jusqu'au mM. Dans le milieu intracellulaire réducteur, il est présent à l'état réduit thiol (GSH). Lors d'une attaque oxydante, il se dimérise pour donner GSSG, tout en passant par le radical thiyle (GS[•]) qui est un oxydant fort, puis un disulfure (GSSG^{•-}) (Benaïssa Bouguerne 2012)(figure 13).

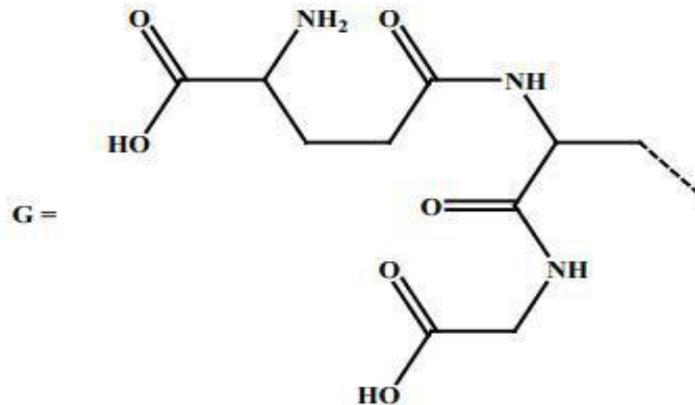


Figure 14 : Radicaux libres soufrés.

II.1.1.2.4. Radicaux libres à partir de Flavines et Quinones

Les quinones et les flavines sont aptes à transférer les électrons un à un. Leurs formes radicalaires sont stabilisées par résonance (figure 14). Ce sont des cofacteurs enzymatiques. (Benaissa Bouguerne, 2012).

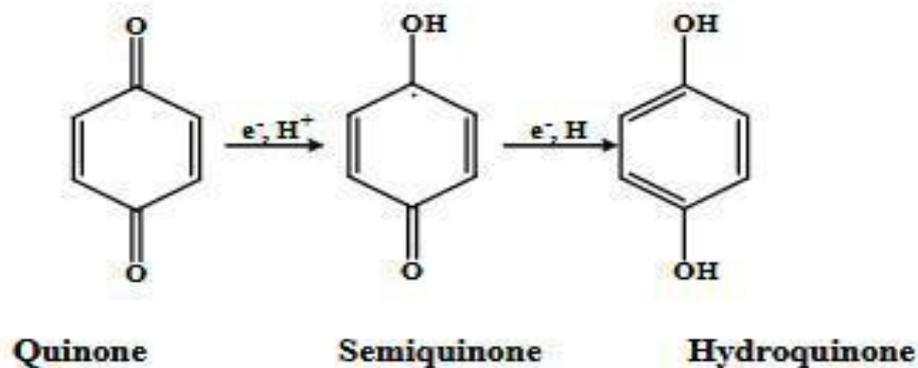


Figure 15 : Résonance des quinones.

II. 1.2. Conséquence du stress oxydatif

Le principal danger des radicaux libres vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'ADN, les lipides (peroxydation), les protéines...etc. Cette oxydation provoque des dommages sur tout l'organisme, Accélération du vieillissement (maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives, cancer, diabète...) et la dégradation des cellules et des tissus (Chérifa Boubekri, 2014)

II .2. Antioxydants

Toute substance qui retarde, empêche ou répare les dégâts oxydatifs d'une molécule cible est appelé antioxydant (Halliwell et Gutteridge, 2000 et 2008). Les antioxydants sont aussi des molécules naturellement produites par le corps ou bien apportées par l'alimentation pour combattre les effets toxiques des radicaux lors du stress oxydant (Halliwell et Gutteridge, 2008). Les antioxydants peuvent être classés selon leurs origines en deux classes les antioxydants enzymatiques et les non enzymatiques (Delattre et al, 2005).

II .2. 1. Antioxydants enzymatiques

a. Les superoxydes dismutases (SOD)

Les (SOD) représentent la première ligne de défense pour éliminer les ROS et ce sont les enzymes antioxydantes les plus importantes (Higashi et al, 2009). Ce sont des métallo

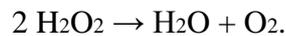
enzymes qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et d'oxygène (Huang, 2001).



Chez les mammifères cette famille comporte trois isoformes (SOD1, SOD2, SOD3) (Antwerpen, 2006), qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD) (Huang, 2001).

b. Les catalases (CAT)

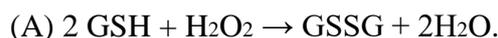
Elle est composée de quatre sous-unités contenant chacune un hème et elle n'utilise pas des cofacteurs enzymatiques. Le rôle principal de la catalase est la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène (Powers et Jackson, 2008)



La catalase présente dans tous les organes est particulièrement concentrée dans le foie, et à l'état libre se trouve dans le plasma. Dans les hématies, la CAT protège la membrane plasmique et les tissus traversés du peroxyde d'hydrogène produit par la dismutation du radical superoxyde, lui-même issu des auto-oxydations de l'hémoglobine (Halliwell et Gutteridge, 2008).

c. Les glutathion peroxydases (GPx)

La glutathion peroxydase est une sélénoprotéine ayant une Activité enzymatique, formée de quatre sous-unités identiques (homotétramère), chaque sous-unité contient un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélélocystéine (Raman et Berry, 2011). La (GPx) est réduite d'une part par le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau (A), et d'autre part par les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools (B). Lors de cette réaction, qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celles-ci se transforment en glutathion-disulfure (GSSG) (Halliwell et Gutteridge, 2008 ; Raman et Berry, 2011) :



d. Les glutathion réductases (GRD)

C'est une flavoenzyme homodimérique ; chaque sous-unité contient du FAD au niveau de son site Actif, la (GRD) permet de régénérer le GSH à partir du GSSG (Raman et Berry, 2011). La glutathion réductase utilise un cofacteur, le NADPH qui réduit d'abord le FAD en

FADH₂. Le FADH₂ est ensuite une source d'électrons sur un pont disulfide –S—S– de l'enzyme qui réduit à son tour le GSSG en GSH (Halliwell et Gutteridge, 2008).

II .2.2. Antioxydants non-enzymatiques

II .2. 2.1. Antioxydants non-enzymatiques d'origine

endogène A. Glutathion (GSH/GSSG)

C'est un tripeptide formé de glycine, cystéine et de glutamate (Raman et Berry, 2011). Il est considéré comme le principal antioxydant non enzymatique intracellulaire (Valko, 2011). Le glutathion possède deux formes l'une oxydée (GSSG) et l'autre réduite (GSH). Ces deux états forment le couple redox (GSSG/GSH). La capacité antioxydante du glutathion réside dans la présence d'un groupement thiol (–SH) présent sur la cystéine réduite. Le GSH réagit très bien avec de nombreux ERO comme les radicaux HO, RO•, RO₂•, les radicaux centrés sur le carbone R•, ClO-, ONOO-, et l'oxygène singulet. (Raman et Berry, 2011).

B. ACIDE URIQUE

C'est le produit de dégradation des composés puriques comme la xanthine et l'hypoxanthine

(Villasante et al, 2010). Il réagit avec plusieurs espèces réactives aux potentialités oxydantes fortes comme ROO•, HO•, ONOO-, NO₂• et l'oxygène singulet. Cette réactivité donne naissance au radical urate stable grâce à la délocalisation de l'électron célibataire sur son noyau purine, l'urate est très bien réduit par l'Acide ascorbique (vitamine C), intégrant bien l'urate au sein de la défense antioxydante (Halliwell et Gutteridge, 2008).

C. Bilirubine

La bilirubine est le produit final de la dégradation de l'hème de plusieurs protéines hémiques. La dégradation de l'hème en biliverdine est fait par une enzyme appelée l'hème oxydase (HO) qui est retrouvée dans le réticulum endoplasmique. Après la biliverdine est transformée en bilirubine grâce à la biliverdine réductase présente dans le cytosol.

La bilirubine possède des propriétés antioxydantes envers plusieurs espèces réactives tel que le ONOO -et l'1O₂ (Halliwell et Gutteridge, 2008), aussi elle intervient dans la protection des membranes cellulaires contre la peroxydation lipidique (Paredi et al, 2002).

II.2.2.2. Antioxydants non-enzymatiques d'origine exogène

Ces antioxydants ne sont pas synthétisés par l'organisme mais doivent être apportés par l'alimentation sous forme de fruits et de légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, et polyphénols (Vertuani et al, 2004). Egalement quelques oligo-éléments comme le sélénium et

le zinc qui sont des cofacteurs importants pour l'Activité de certains enzymes antioxydants (Pincemail et Defraigne, 2004).

A. Vitamine C

La vitamine C ou l'Acide L-ascorbique est considérée comme le principal antioxydant hydrosoluble. Elle possède une très bonne réactivité envers plusieurs ERO comme le HO•, le O₂•-, le NO₂•, l'1O₂ (Carr et Frei, 1999). Ainsi, elle empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Lors de son oxydation en Acide déhydroascorbique, elle passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) (Chen et al, 2000), qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée (Valko, 2011).

B. Vitamine E

La vitamine E est considérée comme l'antioxydant liposoluble le plus important (Halliwell et Gutteridge, 2008). Leur forme naturelle incluse quatre tocophérols isomères α , β , γ , δ , avec une Activité antioxydante variable dont l'alphatocophérol (α -TocH) est la forme la plus Active. La vitamine E est un bon protecteur des lipides contre la peroxydation lipidique. En effet, elle réagit très rapidement avec les radicaux peroxydes lipidiques (Halliwell et Gutteridge, 2008).

C. Caroténoïdes

Les caroténoïdes forment un groupe de pigments colorés retrouvés et synthétisés dans de nombreuses cellules végétales et sont divisées en caroténoïdes à chaîne oxygénée et ceux à chaîne non oxygénée. Certains caroténoïdes (surtout les β -carotènes) sont des précurseurs de la vitamine A. In vivo, les capacités antioxydantes des caroténoïdes sont donc bien supérieures à leur capacité pro-oxydante, notamment en présence d'un foyer de peroxydation lipidique (Halliwell et Gutteridge, 2008).

D. Polyphénols

Sont des molécules possédant plus de deux groupes aromatiques -OH et au moins un noyau aromatique benzène. Les polyphénols sont impliqués dans la prévention des diverses pathologies associées au stress oxydant grâce à leurs propriétés antioxydantes (Rock, 2003), et peuvent inhiber la peroxydation lipidique et détruisent certaines espèces réactives telles que HO•et NO₂•par abstraction d'un de leurs atomes d'hydrogène. Certains peuvent réagir directement avec l'ion superoxyde O₂•-(Halliwell et Gutteridge, 2008).

E. Zinc

Le zinc joue un rôle de cofacteur dans la SOD1, il pourrait agir comme antioxydant en déplaçant le fer (particulièrement ionique) des sites de fixation, inhibant alors la synthèse d'espèces réactives rendue possible ou facilitée par sa présence (Halliwell et Gutteridge, 2008).

II .3. Propriétés biologiques des polyphénols et des flavonoïdes :

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs divers propriétés physiologiques comme les Activités antiallergique, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire (Ksouri et al., 2007).

Ces Actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (Nijveldt et al, 2001).

Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (Leong et Shui, 2002). D'après les études multiples attestant de l'impact positif de la consommation de polyphénols sur la santé et la prévention des maladies, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou des suppléments alimentaires. De plus, leur Activité antioxydante assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique. Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes dans la santé et la beauté de la peau. En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes (les propriétés vasculoprotectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres coumarines), chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques (Hennebelle et al., 2004).

En ce qui concerne les flavonoïdes, ces composés peuvent empêchés les dommages oxydatifs par différentes mécanismes d'Actions : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxydes et peroxydes (Hodek et al., 2002) ; soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (Benavente-Garcia et al., 1997). Ils jouent un rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibant la

lipoxigenase, la phospholipase et la cyclooxygenase), des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension (quercétine), des thromboses (flavonols), des allergies et des affections bactériennes et viraux (anti-HIV) (Yao et al., 2004). Mais, on attribue également aux flavonoïdes des propriétés neurosédatives, antispasmodiques, diurétiques, anti-œstrogènes (isoflavones), contre la sénescence cérébrale et ses conséquences telle l'altération de la mémoire et la confusion.

D'autres part, les citroflavonoïdes (flavonoïdes provenant de divers Citrus) et la fragilité capillaire (insuffisance veino-lymphatique, crise hémorroïdaire) (Hennebelle et al, 2004).

CHAPITRE III

Protocole expérimental

Le but de ce chapitre est de présenter les matériaux utilisés dans notre travail qui a été réalisé au laboratoire de biochimie, Centre de Recherche Biotechnologie (C.R.Bt), Constantine, Algérie. Nous nous sentons très chanceux parce que nous avons eu l'occasion de travailler dans ce laboratoire grâce à d'excellentes installations de recherche.

III.1. Matériel

III.1.1. Matériel végétal

Notre étude a été portée sur la partie aérienne (feuille, tiges) des plantes médicinales *Artemisia herba Alba*, *Artemisia Absinthium* et *Ephedra alata*.

III.1.1.1. La récolte

Le matériel végétal a été récolté dans la commune de Djellal située dans la wilaya de Khenchela dans la région des Aurès, durant la période de floraison et de fructification (Mars, 2018), loin de la pollution et ceci pour écarter toute modification dans la composition chimique de cette plante.

III.1.1.2. Lavage et conservation

Les plantes utilisées sont bien nettoyées et lavées avec l'eau courante afin de se débarrasser de toute poussière et matières étrangères comme le sable, le sol et d'autres impuretés, puis conservée dans un endroit sec et loin de la lumière.

III.1.1.3. Séchage

Une fois les plantes sont récoltées et nettoyées, nos échantillons sont séchées à une température ambiante dans un endroit aéré et à l'abri de la lumière, pour :

- Obtenir une meilleure extraction.
- Uniformiser le taux d'humidité résiduelle de nos échantillons et permettre un meilleur broyage.

III.1.2. Réactifs chimiques et solvants

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans les différents compartiments de cette étude :

Tableau 1 : Solvants utilisés et leurs formules.

Solvants	formule
Méthanol	CH ₃ OH
Buthanol	C ₄ H ₁₀ O
Acétate d'éthyle	C ₄ H ₈ O ₂
Éthanol	C ₂ H ₆ O

Tableau 2 : Réactifs utilisés et leurs formules.

Réactifs	
DPPH diphénylpicryl β hydrazyl	ferricyanure de potassium (K ₃ Fe(Cn) ₆)
Trichlorure d'aluminium (AlCl ₃)	TrichlorAcétique (TCA)
Molybdate d'ammonium	chlorure ferrique (FeCl ₃)
le Folin-Ciocalteu (FCR)	Acétated'ammonium (Cu Cl ₂ , 2H ₂ O)
Carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃)	Neocupronine
Chlorure de Sodium (NaCl)	ABTS
la quercétine	α-tocophérol
Phosphate de sodium (Na ₃ PO ₄)	Alpha -amylase
phosphate dibasique (Na ₂ HPO ₄)	nitrate d'aluminium (Al(NO ₃) ₃ , 9H ₂ O)
phosphate monobasique (NaH ₂ PO ₄)	Potassium Acétate (CH ₃ COOK)
Acidechlorhydrique (HCl)	Tampon phosphate (NaCl)
Acide gallique	IKI (5mM iodine dissous dans 3% KI)

III.1.3. Appareils utilisés :

a. Lecteur microplaque (Perkin Elmer, Enspire)

Un lecteur de plaques est un appareil servant à automatiser la lecture des plaques microtitre en biologie moléculaire.

b. Rota-vapeur

Cet appareil permet d'éliminer rapidement un solvant volatil par évaporation. Le principe est basé sur l'abaissement du point d'ébullition avec la pression.

c. Broyeur à lame

Machine ou appareil dont la fonction est de broyer, de concasser, de réduire à l'état de particule.

d. Ultrason

Le bain à ultrasons ou nettoyage à ultrasons ou sonicateur est une procédure accélérée de nettoyage de pièces ou de dissolution de produits par l'effet mécanique d'ondes ultrasonores de fréquence généralement comprises entre 20 kHz et 400 kHz.

e. Bain marie

Cet appareil convient parfaitement pour des incubations et inactivations de cultures, également par ex. pour le chauffage de milieux bactériologiques, pour les réactions chimiques ou pour la décongélation d'échantillons.

f. Balance électrique

C'est un instrument essentiel en laboratoire pour peser les masses des échantillons.

i. Agitateur vortex

Instrument indispensable en laboratoire, l'agitateur mélange une solution en générant, comme son nom l'indique, un vortex puissant dans la solution par application d'un mouvement orbital rapide à la base du tube. Ce modèle est adapté pour toute agitation ponctuelle ou occasionnelle de petites séries de tube.

j. Agitateur magnétique

Instrument quasi-indispensable dans un laboratoire de chimie, l'agitateur magnétique comme son nom l'indique permet d'agiter une solution en utilisant la force magnétique, il comprend un moteur électrique dont la vitesse est régulée électroniquement entraîne un disque ou un cylindre magnétique qui à son tour entraîne un barreau aimanté aussi appelé « turbulent ». La vitesse de rotation varie généralement de 60 à 1200 tours/minute.

k. Etuve

Est un appareil de chauffage fonctionnant le plus souvent à la pression atmosphérique (parfois sous vide ou sous gaz neutre) et permettant d'effectuer divers traitements thermiques à température régulée. Les laboratoires d'analyse ou de recherche en sont souvent pourvus.

III.2. Méthodes**III.2.1. Broyage**

Les feuilles de trois plantes sont séchées et réduites en poudre fine grâce à un broyeur électrique. La poudre obtenue est conservée dans une boîte en verre couverte avec un papier aluminium à l'abri de la lumière pour éviter la photo oxydation des substances actives dans la poudre.

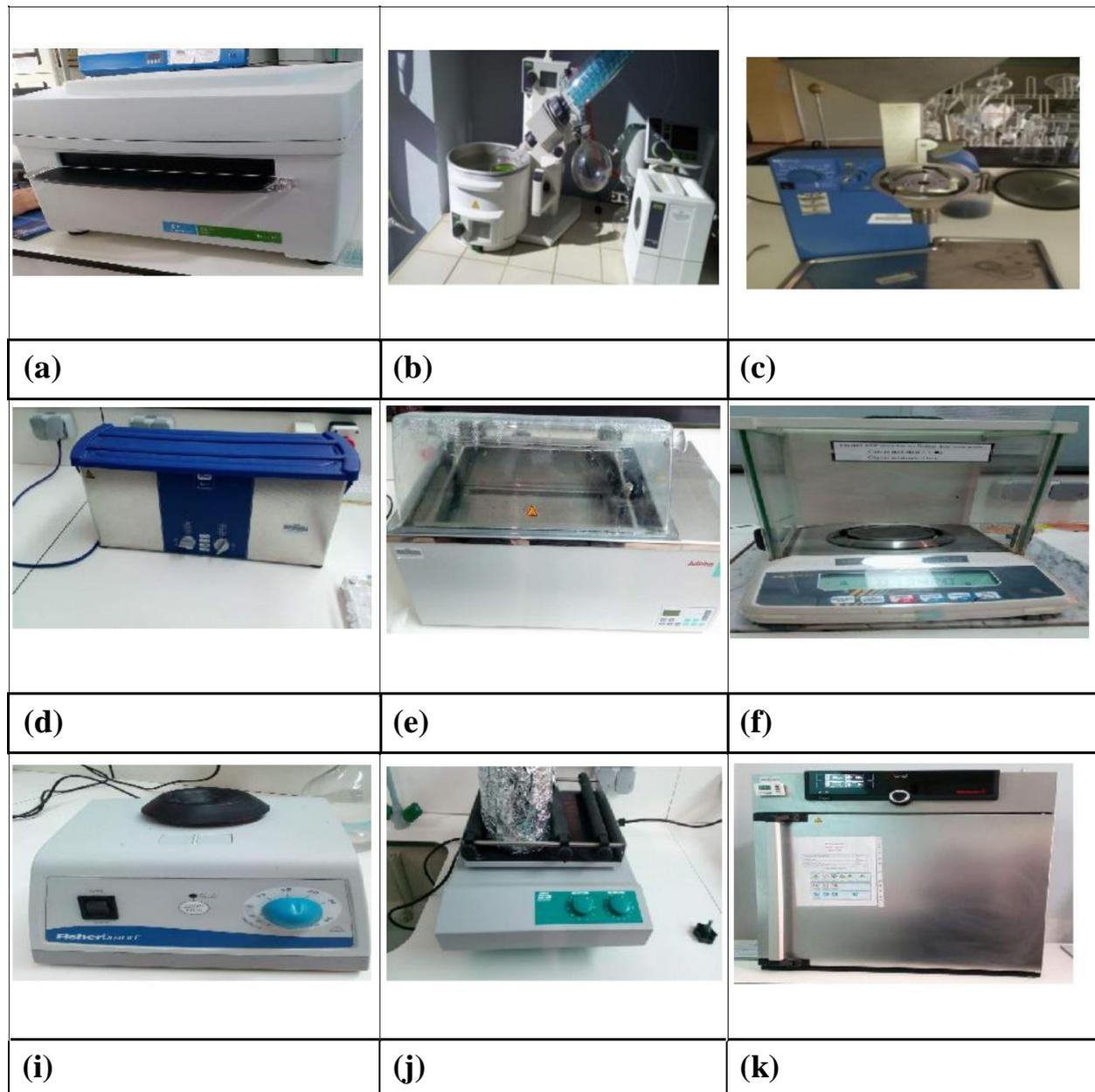


Figure 16 : Appareils utilisés pour la réalisation des protocoles expérimentaux.

III.2.2. Préparation du matériel végétal

L'extraction des substances bioactives contenues dans la partie aérienne des plantes est réalisée par une macération des feuilles on pèse :

- 20g pour *Artemisia Absinthium*.
- 20g pour *Ephedra Alata*.
- 24 g pour *Artemisia herba alba*.

Chaque plante (*ArtemisiaAbsinthium* et *EphedraAlata*), se divise en deux parties égales l'une se mélange avec un volume d'éthanol et l'autre partie avec l'Acétate d'éthyle. Pour la

Troisième plante (*Artemisia herba alba*) le matériel végétale est divisé en quatre parties avec différents solvants (Éthanol, Méthanol, Acétate d'éthyle et Butanol). Au puis laisser 24 heures sous agitation pour la macération, les extraits obtenus sont ensuite filtré sur papier filtre. Les filtrats obtenus Sont évaporé à sec : l'extrait éthanolique à 40 °C pendant 45 minutes et l'extrait d'Acétate à 43°C pendant 1 heure sous pression réduite avec un évaporateur rotatif de type BÜCHI R-210 représenté dans la Figure(16 b).Les extraits obtenu sont récupérés sur des boîtes de Pétri puis conservé dans le réfrigérateur à 4°C à l'obscurité jusqu'à l'utilisation Figure(16 k) selon le protocole de (Bouldjadj,2009) avec modification.

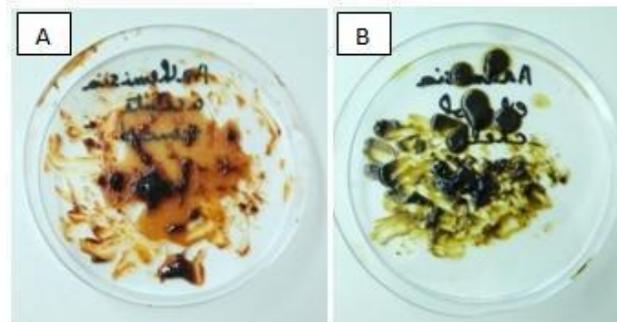


Figure 17 : Extrait éthanolique (A) et Acétate d'éthyle (B) d'*Artemisia Absinthium*.



Figure 18 : Extrait éthanolique (A) et Acétate d'éthyle (B) d'*Alanda Alata*.

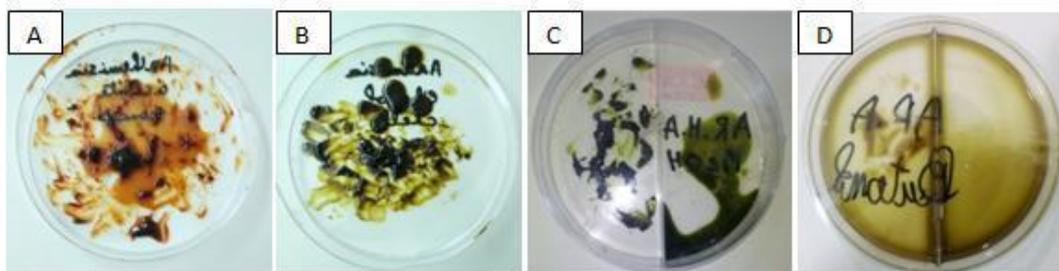


Figure 19 : Extrait éthanolique (A), Acétate d'éthyle (B), méthanolique (C) et butanolique (D) d'*Artemisia herba Alba*

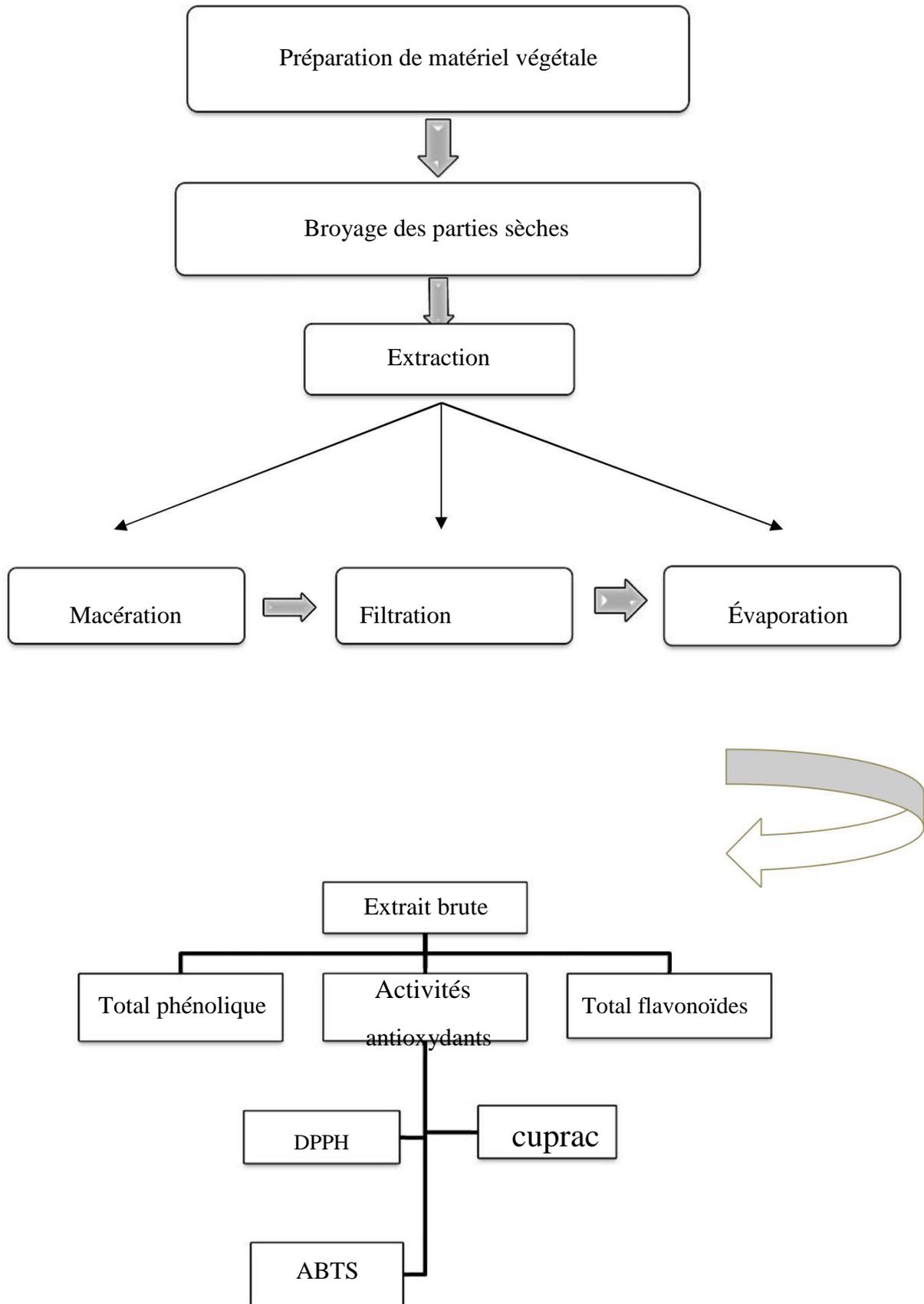


Figure 20 : Protocole d'étude expérimental.

III.3. Rendements des extraits

L'extraction des plantes étudiées, nous a permis de déterminer les rendements de leurs extraits.

L'extrait a été quantifié selon la formule suivante :

$$R\% = PE / PMV * 100$$

R : rendement

PE : poids de l'extrait (g)

PMV : poids de matière végétale (g)

Les valeurs obtenues sont représentées dans les tableaux suivants

Tableau 3 : Rendement d'extraction par l'acétate d'éthyle.

Les plantes	PMV (g)	PE (g)	R (%)
<i>Artemisia herba alba</i>	6	0.73	12.17
<i>Artemisia Absinthium</i>	10	0,5	5
<i>Alanda Alata</i>	10	0,64	6,4

Tableau 4 : Rendement d'extraction par l'éthanol.

Les plantes	PMV (g)	PE (g)	R (%)
<i>Artemisia herba alba</i>	6	0,83	13.83
<i>Artemisia Absinthium</i>	10	0,22	2,2
<i>Alanda Alata</i>	10	0 ,38	3,8

Tableau 5 : Rendement d'extraction par butanol.

La plantes	PMV (g)	PE (g)	R (%)
<i>Artemisia herba Alba</i>	6	1.11	18.5

Tableau 6 : Rendement d'extraction par méthanol.

La plantes	PMV (g)	PE (g)	R (%)
<i>Artemisia herba Alba</i>	6	0.89	14.83

Les teneurs en extraits varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille mais également en fonction des paramètres de l'extraction, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion de solvant.

En plus de ces aspects quantitatifs, quel que soit la méthode d'extraction appliquée, elle doit tenir compte de la qualité d'extrait, autrement dit de la bioactivité de ces principes actifs. Dans la présente étude, la méthode de macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait tout en préservant la bioactivité de ses constituants. De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'obtenir le maximum des composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux Températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

III.4. Protocoles

III.4.1. Piégeage du radical libre DPPH

III.4.1.1.Principe de la réaction :

L'Activité anti-radicalaire libre est déterminée par spectrophotométrie par le dosage du DPPH(Blois1958), le α -tocophérol, BHT et le BHA sont utilisés comme standards antioxydants.

III.4.1.2.Mode opératoire :

Préparation de la DPPH :

Dissoudre 6 mg de DPPH dans un volume de 100 ml de méthanol, le radical DPPH est dissous dans le méthanol et gardé à -20°C à l'abri de la lumière. L'absorbance est 0.5 nm (517 nm) dans le spectrophotomètre.

Procédure :

160 μl (DPPH) + 40 μl (extrait) + lecture 517

III.4.2. Réduction du radical-cation ABTS

III.4.2.1.Principe de la réaction :

L'Activité ABTS est déterminée par la méthode de Re et al. (1999)

III.4.2.2.Procédure :

A partir de l'ABTS et du persulfate de potassium $K_2 S_2 O_8$: les deux produits en solution aqueuse sont mélangés et mis à l'abri de la lumière pendant 12- 16H ; l'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée par (Ethanol ou H_2O) à 0.700 ± 0.020 à 734 nm avant l'usage.

$(ABTS^+) \rightarrow 19,2 \text{ mg (7 mM) ABTS} + 5 \text{ ml } H_2O + 3,3 \text{ mg (2.45 mM) } (K_2S_2O_8) + 5 \text{ ml } H_2O +$
attendre 16 heure à l'abri de la lumière.

$M (ABTS) = 548,68 \text{ g/mol}$

$M (K_2S_2O_8) = 270,32 \text{ g/mol}$

La mesure de l'absorbance de l'ABTS avec le spectrophotomètre comme suit :

1 ml (ABTS) + 50 μ l H_2O ----- 1.41 nm

1 ml (ABTS) + 75 μ l H_2O ----- 0.98 nm

1 ml (ABTS) + 85 μ l H_2O ----- 0.87 nm

1 ml (ABTS) + 90 μ l H_2O ----- 0.83 nm

1 ml (ABTS) + 100 μ l H_2O ----- **0.73nm**

A = 0.70 - 0.75 nm de l'ABTS⁺

Procédure :

160 μ l (ABTS⁺) + 40 μ l (extrait) + attendre 10 mn + lecture à 734 nm

L'Activité ABTS⁺ a été exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$\text{Effet de piégeage de l'ABTS}^+(\%) = (A_{\text{Control}} - A_{\text{Echantillon}} / A_{\text{Control}}) * 100$$

III.4.3. CUPRAC

III.4.3.1. Principe de la réaction :

La capacité antioxydante par réduction de cuivre est déterminée par la méthode CUPRAC, A pack et al, 2004

III.4.3.2. Procédure :

a- Préparation des solutions :

- $m = 1,927 \text{ g}$ Acétate d'ammonium (ACNH_4) + 25 ml (H_2O) → S1 transparent (PH=7.0)
- $m = 0,042625 \text{ g}$ ($\text{Cu Cl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$) + 25 ml (H_2O) → S2 bleu
- $m = 0,039 \text{ g}$ (Neocupronin) + 25 ml (Et) → S3

1- ajouter la solution S1 au plat qui contient les extraits → pour lecture

2- mélanger la solution S2 et S3 → pour lecture

3- le CUPRAC prend une heure de temps pour lecture

b- Procédure :

40 μl extrait + 60 μl (S1) + 50 μl (S3) + 50 μl (S2) + attendre 1 heure + lecture à 450 nm

$M(\text{Cu Cl}_2, 2\text{H}_2\text{O}) = 170,50 \text{ g/mol}$

$M(\text{ACNH}_4) = 77 \text{ g/mol}$

$M(\text{Neocupronin}) = 208,27 \text{ g/mol}$

III.4.4. Total Phénolique

III.4.4.1. Principe de la réaction :

La teneur en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi, 1965) selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par Muller et al. (2010).

Le réactif FCR, constitué par un mélange d'Acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'Acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$), est réduit, lors de l'oxydation des phénols,

en mélange d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximum aux environs de 750 -765 nm.

III.4.4.2. Mode opératoire :

1- Préparation de Carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5% :

7,5 gramme de Na_2CO_3 et sont dissouts dans 100 ml d'eau distillé.

2- Préparation de l'extrait de plante :

Une masse de 1 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de l'eau distillée (ou Méthanol).

3- Préparation de Folin-Ciocalteu (FCR) dilué 10fois

1ml de la solution FCR concentré (2M) est complété à 10ml avec l'eau distillée (9ml).

Procédure :

20 μ l d'extrait de plante + 100 μ l de FCR dilué (1 :10) + 75 μ l de carbonate de sodium (7,5%) + mettre le mélange à l'obscurité pendant 2h + lecture à 765 nm. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol).

Gamme d'étalonnage :

Préparation de la gamme d'étalon de l'Acide gallique :

On prend 0,5 mg de l'Acide gallique et on le dissolvé dans 5 ml de Méthanol pour obtenir la solution S₁ (0,2mg/ml). Les dilutions sont préparées dans des eppendorfs comme la suite :

25 μ g/ml	25 μ l de S ₁ + 175 μ l de MeOH
50 μ g /ml	50 μ l de S ₁ + 150 μ l de MeOH
75 μ g/ml	75 μ l de S ₁ + 125 μ l de MeOH
100 μ g/ml	100 μ l de S ₁ + 100 μ de MeOH
125 μ g /ml	125 μ l de S ₁ + 75 μ l de MeOH
150 μ g /ml	150 μ l de S ₁ + 50 μ l de MeOH
175 μ g /ml	175 μ l de S ₁ + 25 μ l de MeOH
200 μ g /ml	200 μ l de S ₁

20µl de chaque dilution sont transférés dans une microplaque + 100µl FCR (1 :10) + 75µl de Na₂CO₃ (7,5%) + incubation 2h + lecture à 765nm.

III.4.5. Total Flavonoïde

III.4.5.1. Principe de la réaction :

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre Al⁺³ et les flavonoïdes. La méthode de Topçu et al, (2007) est utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque 96 puits.

III.4.5.2. Mode opératoire :

Préparation des solutions :

Pour 1 M Potassium Acétate (CH₃COOK) on dissout 9.80 gramme de (CH₃COOK) dans 100 ml d'eau distillé pour obtenir la solution S₁.

Pour 10% nitrate d'aluminium (Al(NO₃)₃, 9H₂O) on pèse 10g de ce produit dans 100ml d'eau distillée.

Préparation de l'extrait de plante :

Une masse de 1 milligramme d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de méthanol pour obtenir la solution (S₂).

Procédure :

A- Pour l'extrait :

50µl (S₂) (extrait de plante) + 130 µl (MeOH) +10 µl (S₁) (CH₃COOK) + 10 µl (Al(NO₃)₂, 9H₂O) + attendre 40 mn + lecture à 415 nm. Un blanc échantillon est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (50µl extrait + 150µl méthanol).

B- Pour l'étalon :

Préparation de la gamme d'étalon de la Quercetin :

On prend 1 mg de la Quercetin et on le dissout dans 5 ml de méthanol pour obtenir la solution 0,2mg/ml S_m.

Les dilutions sont préparées dans des eppendorfs comme la suite :

Quercetin(25)	25µl Sm+ 175 µl MeOH
Quercetin(50)	50µl Sm+ 150µl MeOH
Quercetin (75)	75 µl Sm + 125µ MeOH
Quercetin(100)	100µl Sm+ 100µl MeOH
Quercetin (125)	125 µl Sm + 75µl MeOH
Quercetin(150)	150µl Sm + 50µl MeOH
Quercétine (175)	175µl Sm + 25µl MeOH
Quercetin(200)	200µl Sm + 0 MeOH

50 µl de chaque dilution sont transférés dans une microplaque 96 puits + 130 µl (MeOH) +10 µl (S₁) (CH₃COOK) + 10 µl (Al(NO₃)₂, 9H₂O) + attendre 40 mn + lecture à 415 nm.

CHAPITRE IV
RESULTATS ET
DISCUSSION

L'activité antioxydant ne doit pas être conclue sur la base d'un seul modèle de test antioxydant. Et en pratique, plusieurs essais *in vitro* procédures sont menés pour évaluer les Activités antioxydants avec les échantillons d'intérêt.

Les trois techniques utilisées sont ; DPPH, ABTS, CUPRAC.

• Détermination des IC₅₀ des extraits et des standards

La valeur IC₅₀ (concentration inhibitrice à 50%) est déterminée pour les extraits et les standards utilisés .Elle est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'Activité de DPPH ou d'ABTS, ou encore, c'est la concentration de l'échantillon exigée pour diminuer de 50% l'absorbance de la solution de DPPH ou d'ABTS Les IC₅₀ sont inversement proportionnelles à l'effet scavenge dont les valeurs faibles reflètent un effet anti radicalaire important (Villanoetal, 2007).

IV.1. DPPH

La réduction du radical libre DPPH[•] (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV- Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants (Molyneux, 2004). En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. (2.2 Diphényl 1 picrylhydrazyl) de couleur violette se réduit en 2.2 Diphényl 1 picryl hydrazine de couleur jaune.

Tableau 7 : Pourcentage d'inhibition et l'IC₅₀ pour DPPH.

Extraits	% Inhibition pour DPPH								
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg		
Ar Et	3,32±1,41	5,46±1,38	8,13±2,23	14,83±0,99	24,31±0,45	42,21±1,19	68,11±4,34		
Ar Ac	1,88±0,60	5,95±2,16	8,93±0,91	19,59±1,16	30,70±0,43	52,28±1,30	68,75±0,26		
Al Et	7,44±1,47	10,57±1,4 2	23,91±1,34	42,41±1,49	69,10±1,14	68,30±2,19	77,83±1,04		
Al Ac	0,97±1,20	2,04±1,28	3,34±0,00	10,89±4,66	17,80±1,45	27,40±0,00	52,14±0,54		
Ar HA meoh	10,20±1,84	19,65±0,2 4	39,83±2,31	65,80±0,93	77,91±3,85	82,95±2,53	84,23±0,64		
Ar HA Ac	3,93±1,10	4,99±1,67	11,36±2,74	19,60±0,46	34,84±0,00	54,75±0,55	73,02±1,36		
Ar HA Et	4,41±1,04	9,93±2,00	21,46±1,39	42,59±2,96	67,92±0,18	81,09±1,28	83,86±0,18		
Ar HA b	7,12±4,31	11,74±2,8 3	14,18±2,16	23,26±0,56	43,39±0,37	69,68±0,74	81,84±0,84		
BHT	56,93±1,84	72,83±1,2 3	78,46±1,01	79,48±0,31	80,03±1,62	80,10±0,66	80,71±0,42		
BHA	31,73±1,22	54,89±3,6 0	67,60±1,13	76,77±0,54	78,67±1,31	79,01±0,89	79,14±0,66		
IC ₅₀ µg/mL									
Ar Et	Ar Ac	Al Et	Al Ac	Ar HA meoh	Ar HA Ac	Ar HA Et	Ar HA b	BHT	BHA
525,97± 5,28	380,51± 9,37	133,36± 2,45	772,81± 4,89	72,07± 1,25	353,07± 4,22	136,78± 1,94	264,16± 2,71	6,82± 0,49	12,99± 0,41

Méthode pour calculé IC₅₀ :

Exemple :

Tableau 8 : Absorbance des trois extraits par lecture microplaque.

Ar Et	Ar Et	Ar Et	Ar Ac	Ar Ac	Ar Ac	Al Et	Al Et	Al Et
0,247	0,205	0,191	0,208	0,211	0,174	0,197	0,216	0,226
0,396	0,38	0,389	0,323	0,328	0,311	0,144	0,157	0,146
0,512	0,508	0,506	0,435	0,464	0,469	0,201	0,206	0,216
0,565	0,574	0,578	0,549	0,538	0,534	0,387	0,397	0,377
0,6	0,626	0,626	0,616	0,615	0,605	0,502	0,52	0,512
0,646	0,631	0,629	0,631	0,618	0,647	0,595	0,596	0,612
0,65	0,64	0,659	0,66	0,663	0,655	0,625	0,611	0,63
0,647	0,685	0,698	0,688	0,682	0,677	0,688	0,714	0,659

La dernière ligne du tableau représente la ligne de contrôle Alors Moyenne de contrôle (MC)= 0.672

Et l'écart type (ET)= 0.025.

$$I = ((A C - A E) / A C) \times 100$$

A c : Absorbance du contrôle.

A e : Absorbance de l'extrait.

Tableau 9 : Pourcentage d'inhibition des trois extraits.

Ar Et	Ar Et	Ar Et	Ar Ac	Ar Ac	Ar Ac	Al Et	Al Et	Al Et
63,2440	69,4940	71,5774	69,0476	68,6012	74,1071	70,6845	67,8571	66,3690
41,0714	43,4524	42,1131	51,9345	51,1905	53,7202	78,5714	76,6369	78,2738
23,8095	24,4048	24,7024	35,2679	30,9524	30,2083	70,0893	69,3452	67,8571
15,9226	14,5833	13,9881	18,3036	19,9405	20,5357	42,4107	40,9226	43,8988
10,7143	6,8452	6,8452	8,3333	8,4821	9,9702	25,2976	22,6190	23,8095
3,8690	6,1012	6,3988	6,1012	8,0357	3,7202	11,4583	11,3095	8,9286
3,2738	4,7619	1,9345	1,7857	1,3393	2,5298	6,9940	9,0774	6,2500

L'équation de la courbe linéaire est :

$$Y = a X + b$$

Pour la détermination de l'IC₅₀ :

$$IC_{50} = Y-b / a$$

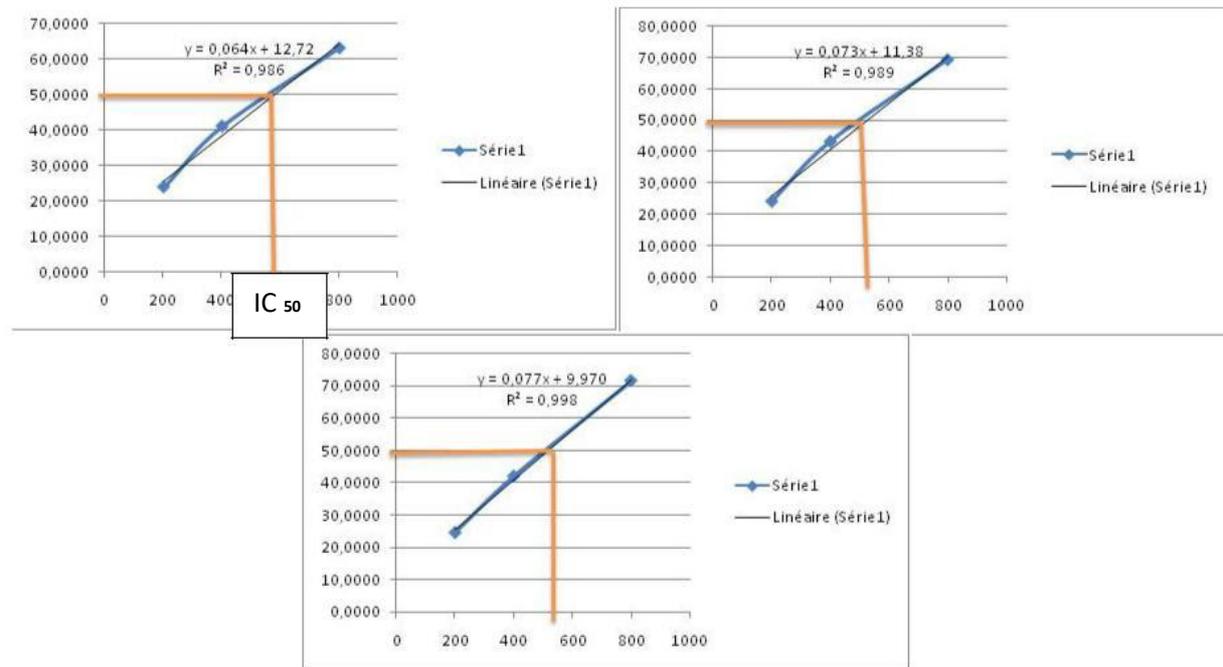


Figure 21 : Méthode graphique pour calculer IC₅₀ des trois essais d'extrait éthanolique d'*Artemisia Absinthium*.

Tableau 10 : IC₅₀ des trois essais et leur moyenne.

Y	A	B	IC 50	IC 50-ORT	ET
50	0,1765	21,081	163,85	160,61	0.49
50	0,1863	21,081	155,23		
50	0,1724	21,938	162,77		

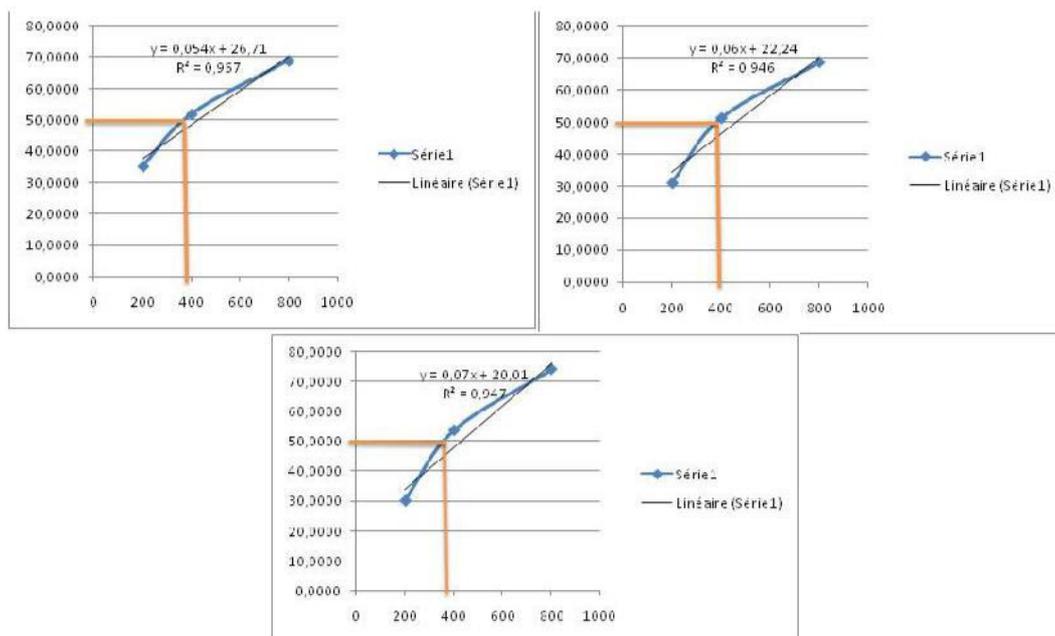


Figure 22 : Méthode graphique pour calculer IC₅₀ des trois essais d'extrait Acétate d'éthyle d'*Artemisia Absinthium*.

Tableau 11 : IC₅₀ des trois essais et leur moyenne.

Y	A	B	IC 50	IC 50-ORT	ET
50	0,2328	20,605	126,27	117,06	8,32
50	0,2307	24,603	110,09		
50	0,2369	22,795	114,84		

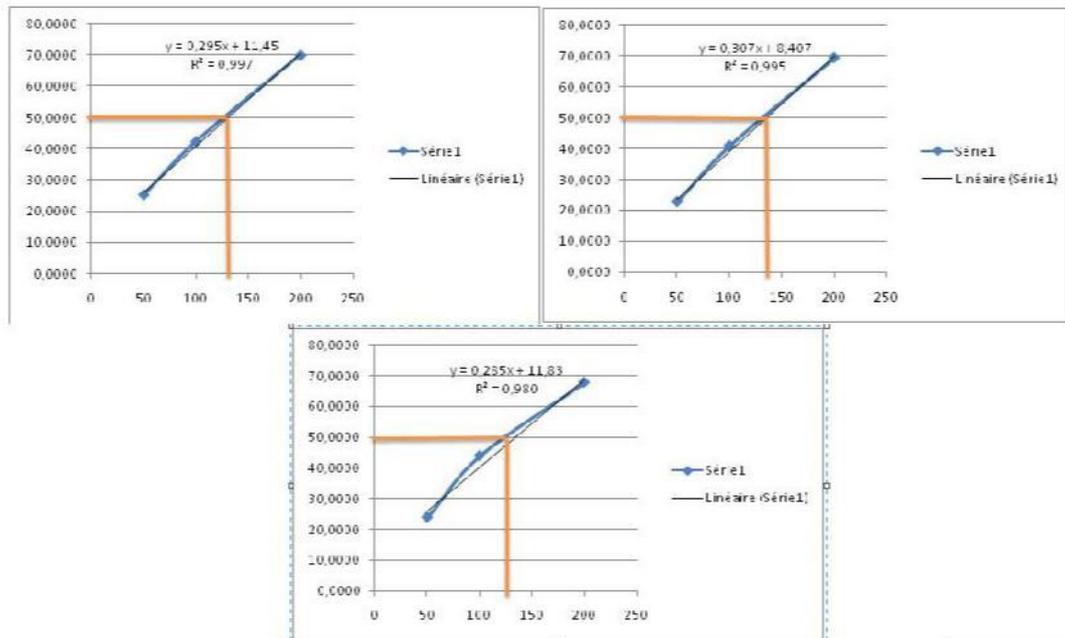


Figure 23 : Méthode graphique pour calculer IC₅₀ des trois essais d'extrait éthanolique d'*Alanda Alata*.

Tableau 12 : IC₅₀ des trois essais et leur moyenne.

Y	A	B	IC 50	IC 50-ORT	ET
50	0,5766	19,082	53,62	49,74	3,36
50	0,5761	22,414	47,88		
50	0,5962	21,557	47,71		

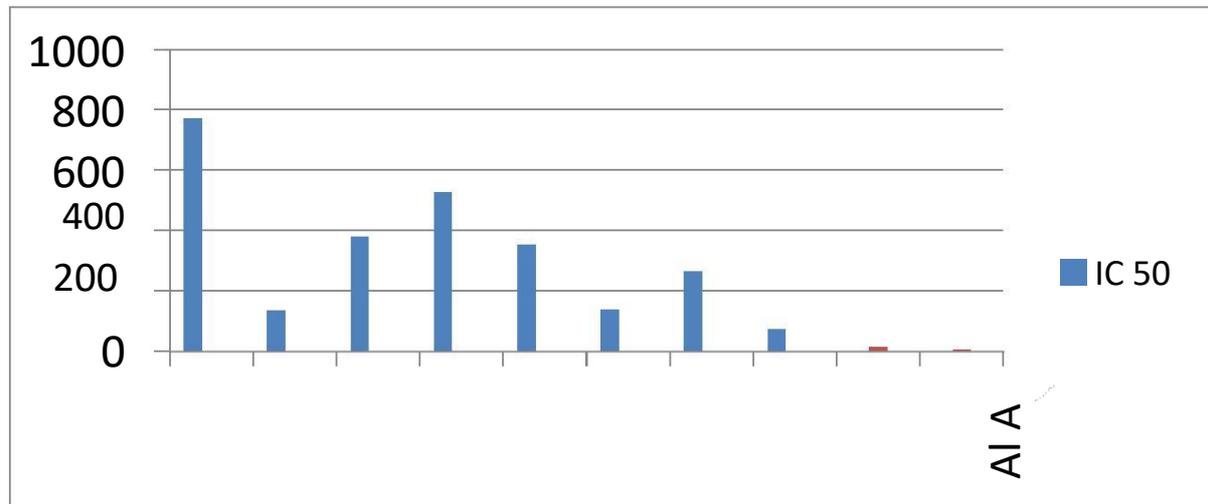


Figure 24 : histogramme d'IC 50 des extraits et standards par DPPH.

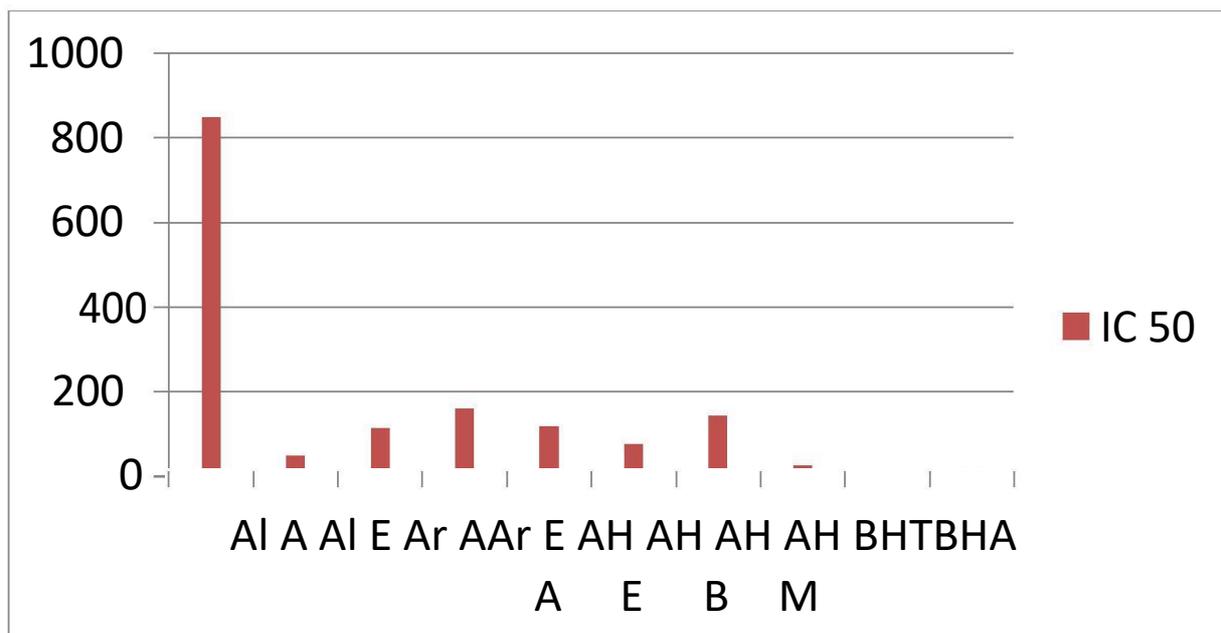
D'après le tableau 12 et la représentation graphique (figure23), les valeurs de IC₅₀ des extraits Ar Ac, Ar Et, Al Ac, Ar HA Ac (380,51±9,37 ; 525,97±5,28; 772,81±4,89; 353,07±4,22µg/mL respectivement) montrent une Activité plus faible dans la réduction de DPPH• par rapport au standard BHT et BHA (12,99±0,41 ;6,82±0,49 µg/mL respectivement), par ailleurs, Les valeurs de IC₅₀ des extraits AL Et , Ar HA Et , Ar HA B, Ar HA M(133,36±2,45; 136,78±1,94; 264,16±2,71,72,07±1,25µg/mL respectivement) montrent une Activité modérée en comparaisent avec les standards (BHT et BHA).

IV.2. ABTS

La méthode de radicale ABTS est l'un des tests les plus utilisés pour la détermination de la concentration des radicaux libres. Il est basé sur la neutralisation d'un radical - cation résultant de la mono électronique oxydation du chromophore synthétique 2,2'- azino-bis (3 éthylbenzothiazoline -6- sulfonique Acide) (ABTS') :

Tableau 13 : pourcentage d'inhibition et l'IC₅₀ pour l'ABTS.

Extraits	% Inhibition pour ABTS								
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg		
Ar Et	3.85±1.63	13.92±0.77	28.98±0.83	41.17±0.87	56.40±1.49	75.12±1.08	85.78±0.94		
Ar Ac	12.80±1.06	20.86±0.48	33.17±1.88	49.23±0.29	68.78±1.75	84.39±2.96	86.80±0.94		
AL Et	19.46±3.15	34.82±1.45	51.32±3.27	78.93±1.88	84.20±0.0	86.99±4.23	98.97±0.29		
Al Ac	3.59±1.94	9.44±2.56	11.13±0.61	19.30±3.35	30.11±3.35	39.07±3.78	46.27±2.32		
Ar HA MeOH	36,53±2,54	47,25±2,57	63,42±0,79	84,43±0,71	88,54±0,58	89,42±0,00	89,57±0,13		
Ar HA Ac	17,21±3,23	23,31±2,75	34,55±0,38	48,43±1,15	56,80±0,00	68,71±0,00	78,70±0,92		
Ar HA Et	23,75±1,80	27,13±1,68	41,71±0,78	61,07±2,46	76,64±0,22	85,97±1,04	88,76±0,58		
Ar HA b	17,21±2,74	23,45±0,89	34,40±0,64	45,79±0,00	57,02±1,53	70,84±1,47	75,61±4,33		
BHT	59.22±0.59	78.55±3.43	90.36±0.00	92.18±1.27	93.37±0.86	94.87±0.87	96.68±0.39		
BHA	83.42±4.09	93.52±0.09	93.58±0.09	93.63±0.16	93.63±0.95	94.20±0.90	95.39±2.62		
IC ₅₀ µg/mL									
Al Ac	Ar Et	Ar Ac	Al Et	Ar HA MeOH	Ar HA Ac	Ar HA Et	Ar HA b	BHT	BHA
>800	160.62 ±4.7	114.99 ±4.9	49.74± 3.36	27,19±4,1 0	118,12±9,89	75,82±9,15	142,91± 6,67	1.81±0. 10	1.29± 0.30

Figure 25 : Histogramme d'IC₅₀ des extraits et standards par ABTS.

D'après le tableau 13 et la représentation graphique (figure 24), La valeur de IC₅₀ des extraits Al Ac, (>800µg/mL) montre une Activité plus faible par rapport au standard BHT et BHA (1.29±0.30 et 1.81±0.10 µg/mL respectivement), par ailleurs, Les valeurs de IC₅₀ des extraits Al Et, Ar Ac, Ar HA Ac, Ar HA Et et Ar HA b (160.62±4.7, 114.99±4.9, 118,12±9,89, 75,82±9,15 et 142,91±6,67 µg/mL respectivement) montrent une Activité modérée en comparaisent avec les standards (BHT et BHA). Tandis que, Les valeurs de IC₅₀

des extraits AL Et et Ar HA MeOH (49.74 ± 3.36 et $27,19 \pm 4,10$ $\mu\text{g/mL}$ respectivement) montrent une bonne Activité en comparaisent avec les standard (BHT, BHA).

IV.3. CUPRAC

La mesure ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) permet de déterminer si une source organique possède un effet antioxydant en le comparant à un analogue de la vitamine E : le trolox. Dans cet essai, l'AAPH (2,2'-azobis-2-aminopropane dihydrochloride) est utilisé comme source génératrice de radicaux peroxydes. L'addition de fluorescéine comme sonde fluorescente permet de quantifier, à l'aide d'une analyse spectrophotométrique, en fonction du temps, la perte de fluorescence associée à la réaction avec les radicaux libres fournit par l'AAPH par un mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène. La présence d'antioxydants empêche ou ralentit la perte de fluorescence qui est calculée par l'aire sous la courbe en fonction du temps. Celle-ci peut être détectée à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et d'émission de 520 nm. Il s'agit donc d'une méthode permettant de mesurer la capacité antioxydant contre les radicaux peroxydes (OU et *al*, 2001). Lorsqu'un capteur de radicaux libres est incorporé dans le milieu, les radicaux libres sont captés, et la fluorescence persiste, donnant ainsi une idée précise du pouvoir anti-radical libre, donc antioxydant de l'échantillon (ROLLAND, 2004).

Tableau 14 : Absorbance et l'IC₅₀ pour CUPRAC.

Extraits	Absorbance pour CUPRAC								
	12.5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	400 μg	800 μg		
Ar Et	0.14±0.01	0.20±0.03	0.21±0.00	0.27±0.01	0.38±0.01	0.56±0.00	0.96±0.02		
Ar Ac	0.15±0.03	0.16±0.00	0.21±0.00	0.30±0.01	0.44±0.02	0.69±0.00	0.96±0.05		
AL Et	0.18±0.01	0.25±0.01	0.38±0.01	0.62±0.01	1.02±0.04	1.77±0.13	2.87±0.37		
AL Ac	0.03±0.23	0.19±0.01	0.40±0.00	0.55±0.01	0.59±0.01	1.05±0.01	2.04±0.09		
AR HA MeOH	0.45±0.00	0.51±0.00	0.68±0.01	1.06±0.01	1.57±0.02	2.15±0.11	2.44±0.04		
AR HA Ac	0.31±0.03	0.33±0.01	0.40±0.01	0.53±0.02	0.74±0.04	1.10±0.03	1.38±0.10		
AR HA Et	0.31±0.00	0.33±0.00	0.49±0.01	0.73±0.00	0.96±0.00	1.60±0.04	2.52±0.45		
AR HA B	0.33±0.02	0.42±0.01	0.54±0.00	1.03±0.05	0.72±0.04	0.72±0.04	1.36±0.06		
BHT	0.19±0.01	0.33±0.04	0.66±0.07	1.03±0.07	1.48±0.09	2.04±0.14	2.32±0.28		
BHA	0.46±0.00	0.78±0.01	1.34±0.08	2.36±0.17	3.45±0.02	3.76±0.03	3.93±0.01		
A _{0.5} $\mu\text{g/mL}$									
Ar Et	Ar Ac	AL Et	AL Ac	Ar HA MeOH	Ar HA Ac	Ar HA Et	Ar HA b	BHT	BHA
332.43 ±1.75	256.67 ±3.27	75.21± 1.27	363.33 ±1.15	21.31±0. 36	94.46±1.89	54.85±0.65	84.05± 2.79	3.64±0. 19	9.62± 0.87

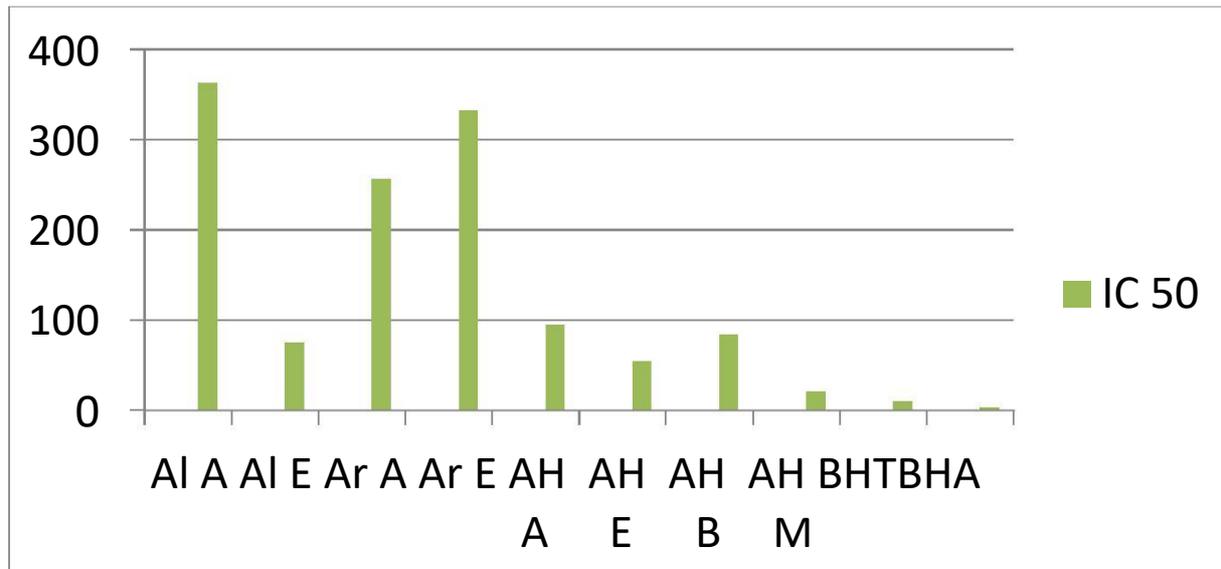


Figure 26 : histogramme d'IC₅₀ des extraits et standards par CUPRAC.

D'après le tableau 14 et la représentation graphique (figure 25), la réduction des ions cuivre (CUPRAC) pour les extraits Ar Et, Ar Acet AL Ac(332.43±1.75, 256.67±3.27, 363.33±1.15 µg/mL respectivement) montrent une Activité plus faible par rapport au standard BHT et BHA (9.62±0.87 et 3.64±0.19 µg/mL respectivement), par ailleurs, Les valeurs de IC₅₀ des extraits AL Et, Ar HA Ac, Ar HA Et et Ar HA B (75.21±1.27 , 94.46±1.89, 54.85±0.65 et 84.05±2.79 µg/mL respectivement) montrent une bonne Activité en comparaisent avec les standards (BHT et BHA). Tandis que, La valeur d'IC₅₀ de l'extrait Ar HA MeOH (21.31±0.36 µg/mL) montre une activité exagéré en comparaisent avec les standard (BHT, BHA).

IV.4.1. Criblage phytochimiques (polyphénols et flavonoïdes)

Cette méthode est basée sur des essais de solubilité des constituants et le changement de couleur spécifique.

Tableau 15 : Teneur en polyphénols et flavonoïdes.

Extraits	Polyphénols	Flavonoïdes
Al Ac	++++	+++
Al Et	+	+++
Ar Ac	+/-	+/-
Ar Et	+/-	+/-
Ar HA Ac	+/-	+
Ar HA B	+/-	+
Ar HA Et	++	+
Ar HA MeOH	+++	++

+/- : présent en quantité négligeable ou absent.

+

++ : Présence moyenne.

+++ : Présence forte.

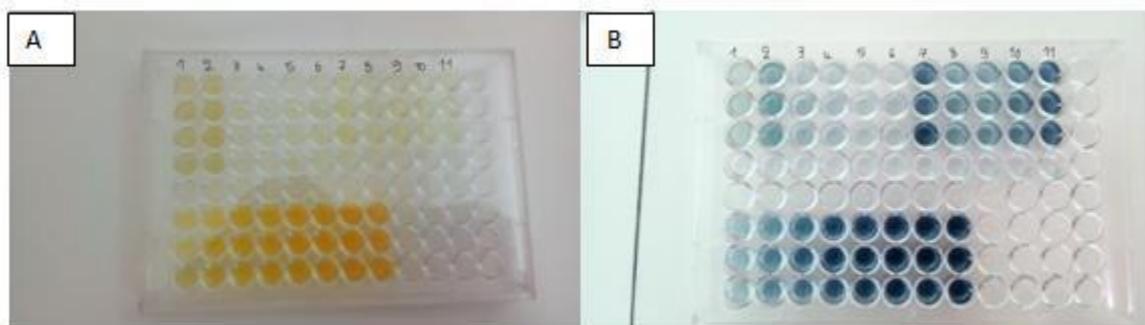


Figure 27 : Dosage des flavonoïdes (A) et polyphénols (B) sous microplaque.

1 : Extraits acétate *d'Alanda alata*.

2 : Extraits éthanolique *d'Alanda alata*.

3 : Extraits acétate d'*Artemisia absinthium* Acétate.

4 : Extraits éthanolique d'*Artemisia absinthium*.

8 : Extraits acétate d'*Artemisia herba alba*.

9 : Extraits butanolique d'*Artemisia herba alba*.

10 : Extraits éthanolique d'*Artemisia herba alba*.

11 : Extraits méthanolique d'*Artemisia herba alba*.

L'étude de criblage phytochimique des extraits (tiges et feuilles) des trois plantes montre que ces plantes contiennent :

1- les flavonoïdes dans les deux parties (tiges et feuilles) en quantité variante La teneur en flavonoïdes est plus grande dans l'extrait d'*Ephedra Alata* (Acétate et Éthanol), par contre, la teneur la plus faible marqué dans les extraits d'*Artemisia Absinthium* (Acétate et éthanol), par contre les extraits d'*Artemisia Herba Alba* (Acétate, Buthanol, Éthanol et Méthanol) présentent des teneurs moyennes par rapport aux autres extraits.

2- les polyphénols dans les extraits aérienne des trois plantes montre que leur teneur en polyphénols se varié d'un extrait à l'autre. La plus grande teneur marqué par l'extrait d'*Artemisia Herba Alba* (Méthanol), suivi par l'extrait éthanolique de même espèce en quantité moyenne .par contre les extraits d'*Ephedra Alata* (Acétate et éthanolique), l'*Artemisia Absinthium* (Acétate et éthanolique) et l'*Artemisia Herba Alba* (Acétate et butanolique) présentent la teneur la plus faible par rapport aux autres extraits.

La richesse de ces extraits en composés chimiques Actifs pourrait expliquer leurs utilisations traditionnelles.

IV.4.1.1. Caractérisation quantitative des extraits des plantes

IV.4.1.1. 1.Teneur des extraits en polyphénols :

L'extraction quantitative des composés phénoliques d'une poudre végétale pose plusieurs problèmes, parmi ces derniers :

La présence dans les cellules végétales de différents types d'enzymes, susceptibles de modifier les composés phénoliques, en particulier les polyphénols oxydases et les glycosidase,

Le séchage du végétal est une bonne méthode pour éliminer les Activités enzymatiques mais, la température de séchage peut être un facteur destructeur des polyphénols (Ribéreau-Gayon, 1968).

D'autres paramètres peuvent influencer significativement le taux et la nature des composés phénoliques à savoir le type de solvant d'extraction, la taille des particules et le temps d'extraction

Dans le présent travail, nous avons procédé à l'optimisation du solvant d'extraction des composés phénoliques à partir des trois plantes ainsi qu'à la détermination des Activités antioxydante des extraits obtenus.

La teneur en polyphénols totaux estimé par la méthode de Folin-Ciocalteu pour chaque extrait. Ils sont calculés à partir de la courbe d'étalonnage de l'Acide gallique dans une gamme de concentration allant de 0,02 à 0,08mg/ml.

Les résultats obtenus montrent que la quantité des composés phénoliques extraits est différente selon le solvant utilisé

Tableau16 : Absorbance de la gamme d'Acide gallique.

[C] ug/ml	Ab1	Ab2	Ab3
25	0,376	0,413	0,335
50	0,603	0,639	0,56
75	0,829	0,775	0,592
100	1,1	1,118	0,827
125	1,196	1,293	1,02
150	1,463	1,51	1,318
175	1,606	1,56	1,198
200	1,87	1,822	1,758

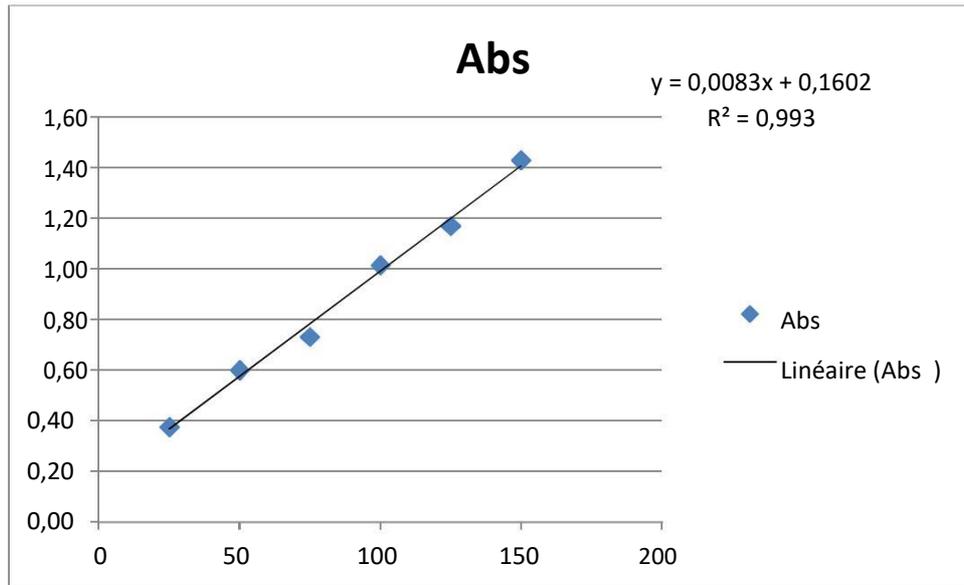


Figure 28 : Courbe d'étalonnage d'Acide Gallique (Moyenne ± ET de trois essais).

L'équation de la courbe linéaire est $Y = a X + b$

Tableau 17 : Absorbance des trois extraits et contrôle par lecture microplaque

	Al Act	Al Act	Al Act	Al Et	Al Et	Al Et	Ar Act	Ar Act	Ar Act
A E	0,246	0,293	0,279	0,564	0,557	0,519	0,271	0,303	0,355
A C	0,154	0,133	0,116	0,119	0,159	0,154	0,133	0,116	0,119

Tableau 18 : Valeurs de S et P.

	Al Act	Al Act	Al Act	Al Et	Al Et	Al Et	Ar Act	Ar Act	Ar Act
S	0,09	0,16	0,16	0,45	0,40	0,37	0,14	0,19	0,24
P	-8,22	-0,02	0,34	34,31	28,65	24,67	-2,67	3,23	9,13

$S = Abs E - Abs C$

$P = (S - b) / a$

Tableau 19 : Moyennes et l'écart type des trois extraits.

Calcul des Teneurs		
Extrait	Moyene	ET
Al Act	-2,63	4,84
Al Et	29,21	4,84
Ar Act	3,23	5,90

IV.4.1.1.2. Teneur des extraits en flavonoïdes :

La concentration des flavonoïdes totaux a été déterminée par la méthode au trichlorure d'ammonium. Les taux des flavonoïdes des deux extraits ont été obtenus à partir de la courbe d'étalonnage (Figure ?) qui suit une équation de type : $y = 0,013x + 0,207$ sachant que $R^2 = 0,973$. Les concentrations des flavonoïdes de l'échantillon sont déterminées à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine.

Tableau 20 : Absorbance de la gamme quercétine.

[C] ug/ml	Ab1	Ab2	Ab3
25	0,457	0,437	0,48
50	1,034	0,924	0,824
75	1,405	1,25	1,171
100	1,764	1,669	1,738
125	2,186	2,083	1,841
150	2,108	2,195	2,123
175	2,715	2,653	2,497
200	3,016	2,845	2,683

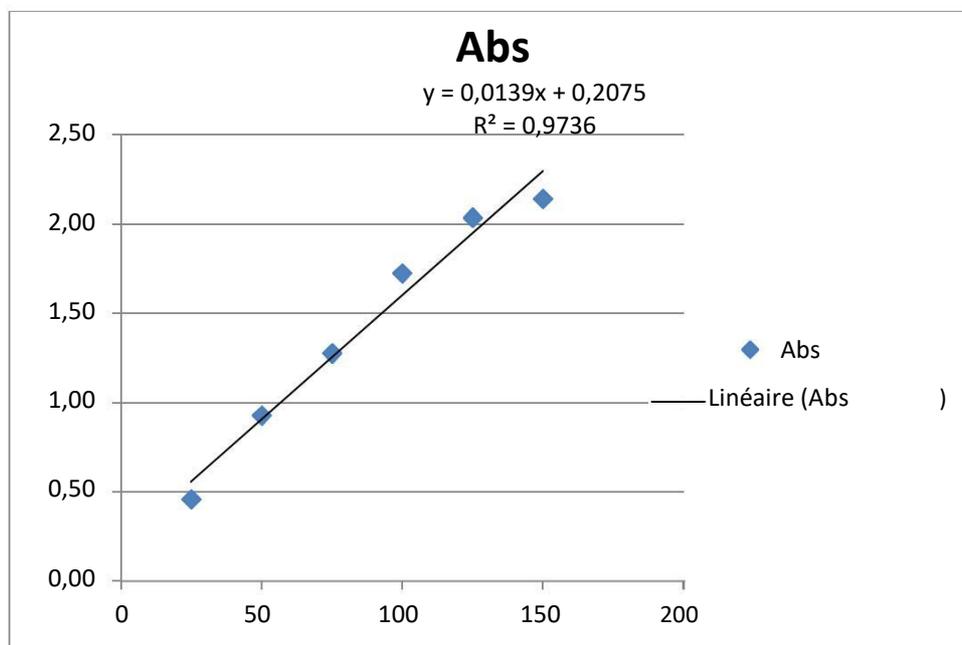


Figure 29 : courbe d'étalonnage de la gamme quercétine (Moyenne \pm ET de trois essais).

Tableau 21 : Absorbance des trois extraits et contrôle par lecture microplaque

	Al Ac	Al Ac	Al Ac	Al Et	Al Et	Al Et	Ar Ac	Ar Ac	Ar Ac
A E	0,681	0,868	0,773	0,721	0,87	0,826	0,186	0,207	0,203
A C	0,197	0,102	0,172	0,126	0,147	0,127	0,121	0,131	0,096

Tableau 22 : Valeurs de S et P.

	Al Ac	Al Ac	Al Act	Al Et	Al Et	Al Et	Ar Ac	Ar Ac	Ar Ac
S	0,48	0,77	0,60	0,60	0,72	0,70	0,07	0,08	0,11
P	19,89	40,18	28,31	27,88	37,09	35,36	-10,25	-9,46	-7,23

Tableau 23 : Moyennes et l'écart type des trois extraits.

Calcul des Teneurs		
Extrait	Moyene	ET
Al Ac	29,46	10,19
Al Et	33,44	4,89
Ar Ac	-8,98	1,56

Tableau 24 : Valeurs des teneurs en polyphénols et flavonoïdes.

ExtrActs	Total Phenolic content (mg/g)	Total Flavonoid content (mg/g)
Al Ac	43±3,78	29,46±10,19
Al Et	34,04±2,89	33,44±4,89
Ar Ac	/	/
Ar Et	/	/
Ar HA Ac	10,44±1,15	1,00±1,76
Ar HA B	7,47±3,36	3,66±6,84
Ar HA Et	20,71±3,08	8,60±1,80
Ar HA MeOH	48,41±2,63	26,03±2,05

IV.2. Les antioxydants

IV.2.1. composés phénoliques

D'après le tableau 24, les valeurs de teneur en polyphénols des extraits Ar HA B et Ar HA Ac, ($3,66\pm 6,84$ et $1,00\pm 1,76$ mg/g respectivement) montrent une teneur plus faible, par ailleurs, les valeurs des extraits d'Ar HA MeOH et Ar HA Et ($26,03\pm 2,05$ et $8,60\pm 1,80$ mg/g respectivement) montrent une teneur moyenne. Tandis-que, les teneurs des extraits d'Al Et et d'Al Ac ($33,44\pm 4,89$ et $29,46\pm 10,19$ mg/g respectivement) montrent la teneur la plus élevée. Cette différence est liée à la solubilité des composés phénoliques, le type de solvant utilisé et le degré de leurs polymérisations (Naczki et Shahidi, 2004). Cependant, ces derniers sont le plus souvent combinés à d'autres substances (protéines, polysaccharides, terpènes, chlorophylle, lipides, composés inorganiques, ...) (Mompon et al, 1996).

IV.2.2. flavonoïdes

D'après le tableau, les valeurs de teneur en flavonoïdes des extraits Ar HA B et Ar HA Ac, ($3,66\pm 6,84$ et $1,00\pm 1,76$ mg/g respectivement) montrent une teneur plus faible, la teneur d'extrait d'Ar HA Et présente une valeur plus au moins faible ($8,60\pm 1,80$ mg/g) en comparant avec les valeurs précédentes. Par ailleurs, la valeur d'extrait d'Ar HA MeOH ($26,03\pm 2,05$ mg/g) montre une teneur moyenne. Tandis-que, les teneurs des extraits Al Et et Al Ac ($29,46\pm 10,19$ et $31,88\pm 6,20$ mg/g respectivement) montrent la teneur la plus élevée.

**CONCLUSION
GENERALE**

Notre étude a été consacrée pour l'évaluation de l'activité antioxydante des plantes médicinales de la flore Algérienne *Artemisia Absinthium*, *Alanda Alata* et *Artemisia herba Alba*, suivie par le dosage de quelques antioxydants de ces plantes (Totale polyphénols et flavonoïdes).

L'étude de l'activité anti radicalaire DPPH a montré que les extraits Ar Ac, Ar Et, Al Ac, AR HA Ac ayant une activité plus faible par rapport au standard BHT et BHA, En plus, les extraits AL Et, Ar H A Et, Ar HA B, AR HA MeOH montrent une activité exagérée en comparaisent avec les standards.

Pour l'activité ABTS les extraits AL Et et Ar HA MeOH montrent une bonne activité comparable avec les standard (BHT, BHA) par rapport aux autres extraits testés.

Pour la réduction des ions cuivre (CUPRAC), les extraits Ar Et, Ar Ac et AL Ac) montrent une activité plus faible par rapport au standard BHT et BHA, En plus, les extraits AL Et, Ar HA Ac, Ar HA Et et Ar HA B montrent une activité modérée en comparaisent avec les standards, Tandis que l'extrait Ar HA MeOH montre une bonne activité en comparaisent avec les standard.

Les résultats du dosage des composés phénoliques, à partir des extraits obtenus, montrent que les extraits Al Et et Al Ac ayant la teneur la plus élevée, par ailleurs, les extraits Ar HA MeOH et Ar HA Et montrent une teneur moyenne. Tandis-que, les extraits Ar HA B et Ar HA Ac montrent une teneur plus faible.

D'autre part, le dosage des flavonoïdes a montré que les extraits Al Et et Al Ac ayant la teneur la plus élevée, par ailleurs, l'extrait d'Ar HA MeOH montrent une teneur moyenne. La teneur de l'extrait Ar HA Et présente une valeur plus au moins faible. Tandis-que, les extraits Ar HA B et Ar HA Ac montrent une teneur plus faible.

Ces résultats suggèrent une utilisation potentielle des trois plantes comme une source des molécules bioactifs.

En perspectives, dans le but de compléter ce travail, on propose :

- D'évaluer l'activité anti-oxydante par d'autres méthodes (blanchiment bêta carotène et pouvoir réducteur).
- Tester et exploiter d'autres systèmes de solvants pour améliorer l'extraction de certaines plantes.
- D'étudier l'activité antioxydante des huiles essentielles de ces plantes.
- D'identifier les principes actifs de ces espèces avec des méthodes chromatographiques.
- De tester l'activité enzymatique des extraits on utilisant les différents enzymes in vitro (Alpha amylase, acetylcholine ésterase).

- Faire des essais *in vivo* (souris et rats) concernant l'activité antalgique, anti-inflammatoires, antivirale et anticancéreuse.
- Détecter la présence des autres métabolites secondaires tels que les alcaloïdes et les quinones, tanins (catéchique et vrais), saponines, stérols et polyterpènes.
- De tester l'effet antimicrobien des polyphénols et des huiles essentielles de l'Artémisia herba alba, Artemisia Absinthium et Ephedra Alata.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

-Abourashed E.A., El-Alfy A.T., Khan I.A. et Walker L., 2003-Ephedra in perspective—a current review. *Phytother. Res.*, Vol. 17, PP. 703-712

-Antwerpen P. V. (2006). Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myclopéroxydase /Peroxyole d'hydrogène / Clilorure. Thèse de Doctorat en Science Pharmaceutiques Bruxelles.

-Aberham A, Cıçek, S S, Schneider P, Stuppner H (2010). Analysis of sesquiterpene lactones, lignanes and flavonoids in wormwood (*Artemisia Absinthium L.*) using high performance liquid chromatography (HPLC) – Mass Spectrometry, Reversed Phase HPLC, and HPLC Solid Phase Extraction – Nuclear Magnetic Resonance. *J. Agric. Food Chem.* 58: 10817–10823.

-Apak, R., Guclu" , K.,Ozyurek, M., &Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence ofneocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and FoodChemistry*, 52, 7970–7981.

-Aouadhi S., (2010). Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle étude de 57 plantes recommandées par les herboristes ,15-166p.

-Apak, R., Guclu" , K.,Ozyurek, M., &Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence ofneocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and FoodChemistry*, 52, 7970–7981.

B

-(BOULBERHANE SAOUSSENE, NABTI HICHEM) (2017) Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne et l'activité antifongique des deuxplantes: *Artemisia compestris L.* et *Ephédra alata alenda Staph* ; Diplôme de MasterFilière: Sciences Biologiques ;7-10

-Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F.R., Ortuno, A., Del Rio, J.A. (1997). Uses and properties of Citrus flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 45 : 4505–4515 p.

-Benaissa Bouguerne, 2012, conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires, Doctorat, p7-11.

Boudjelal A., (2013). Extraction identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (*Ajugaiva*, *Artemisia herba alba* et *Marrubiumvulgare*) de la région de M'Sila Algérie. Thèse doctorat : Biochimie Appliquée Annaba, Université Badji Mokhtar, p61.

-BOULLARD B., 2001-PLANT MEDICINALES DU MONDE-Croyances et Réalités.Ed ESTEM, Paris.645. -BROOKER C.,2000- Le corps humain: Étude, structure et fonction .Paris. Ed 2 : DE BOECK . 562p.

-Boukerker H., Salemkour N., Nouasria D., Benyakhlef B., Nacereddine S., Chalabi K., Nouidjem Y., and Belhamra M., (2016). La végétation steppique au profit de la phytothérapie dans la région d'El Bayadh, *Journal Algérien des Régions Arides (JARA)*. (13) : 61-73 p.

-Bouzidi N., (2016). Etude des activités biologiques de l'huile essentielle de l'armoise blanche « *Artemisia herba alba* Asso ». Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie, Université Mustapha Stambouli Mascara.

-Barkely T M, Brouillet L, Strother J L (2006). *Flora of North America –Asteraceae*. Oxford University Press, New York. P193.

-BORDEQUX., 2009. Progrès en dermatologie - Allergologie. Ed. John Libbey Eurotext, Paris: 251p

-BESANÇON., 2012. Progrès en dermatologie - Allergologie. Ed. John Libbey Eurotext. Paris: 111p.

-Bruneton J (1995). *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. Lavoisier Publishing, Paris 367-370.

-Blois M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*, 4617 (181): 1119-1200.

C

-Caveny S., Charlet D.A., Freitag H., Maier-Stoete M. et Starratt A. N., 2001-New observations on the secondary chemistry of world Ephedra (Ephedraceae). *American Journal of Botany*. Vol.88, N°7. PP. 1199–1208

-Chérifa Boubekri, 2014, Etude de l'activité antioxydante des Polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques, Doctorat en sciences, p 44.

-Carr A., Frei B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *The FASEB Journal*, 13(9) :1007-1024 p

-Chen K., Suh J., Carr A.C., Morrow J.D., Zeind J., Frei B.(2000). Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol , 279(6) :1406-1412p.

-Chaabna N., (2014). Activité anticoccidienne des extraits d'*Artemisia herba alba*. Mémoire de Magister en Biologie et physiologie végétale, Université Ferhat Abbas Sétif, 51-52 p.

-COLLIN S., CROUZET J., 2011- Polyphénols et procédés. Ed.TEC & DOC, Paris.339p.

D

-Derbel S., Touzard B., Triki MA. et Chaieb M., 2010- Seed germination responses of the Saharan plant species *Ephedra Alata* ssp. *Alenda* to fungicide seed treatments in the laboratory and the field. *Flora*, Vol. 205, pp. 471–474

-Delattre J., Beaudoux J. L., Bonnefont D. et Rousselot. (2005). Radicaux libres et stress oxydant. *Aspects biologiques et pathologiques*, 87-108 p.

E

-Evans W.C., 2009-Trease and Evans' Pharmacognosy. Saunders (16eme Ed).46-Ghourri M., Zidane L., Douira A., 2013-Usage des plantes médicinales dans le traitement du Diabète Au Sahara marocain (Tan-Tan). *Journal of Animal & Plant Sciences*, Vol.17, pp. 2388-2411

F

-FERCHICHI A., CHAIEB C., FERJANI E., 2004-Characterisation de la variabilité du comportement phytologique de certaines populations d'*Artemisia herba-alba* du sud tunisien.CIHEMA.vol. (62) : 211- 216p.

G

-Ghrabi Z. and Sand R.L. 2008. *Artemisia herba alba* Asso. A Guide to Medicinal Plants in North Africa, 49 - 49.

-Guillaume J. (1993). *Nutrition et Alimentation des Poisson et Crustacés*. Terrain,396.

-GSEYRA N., 2011- Étude Phytochimiques de Deux Espèces Pastorales. Ed. EUE, France.160p - Hatimi S., Boudouma M., Bichichi M., Chaib N. and Guessous Idrissi N. 2001. *BSoc Pathol*, 94: 29-31

H

-Huang J. et Price R.A., 2003-Estimation of the Age of Extant *Ephedra* Using Chloroplast *rbcL* Sequence Data. *Mol. Biol. Evol.*, Vol. 20, N°3, pp435–440.

-Hegazi G.A.E. et El-Lamey T.M., 2011-In vitro Production of Some Phenolic Compounds from *Ephedra alata* Decne. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, Vol,1, N°8, pp.158-163

-Huang, T.T.(2001). Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic. Biol.Med* 31: 1101-1110 p.

-Higashi, Y., Noma, K., Yoshizumi, M. et Kihara, Y. (2009).Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ. J*, 73: 411-418 p.

-Halliwell B., J. M. C. Gutteridge. (2008). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Fourth Edition. Oxford University Press.Citer dans la Thèse de Doctorat (2015):Implication du stress oxydant dans plusieurs affections du cheval athlete:revue bibliographique, 44-61 p

- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: 3-6 p.
- Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem. Biol. Interact*, 139: 1–21 p.

J

- Jill M. Squiresa, Jorge F.S. Ferreirab, David S. Lindsaya, Anne M. Zajaca., EffectSad artemisinin and Artemisia extracts on Haemonchus contortusin gerbils (Meriones unguiculatus). *Veterinary Parasitology* 175 (2011) 103–108

K

- Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly. C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte Cakile maritima. *Plant. Physiol Bioch*, 45: 244-249 p.

- Kheffach., (2015). La Cytotoxicite De Certaines Huiles Essentielles Chez Les Lapins, Memoire de Master En Sciences Biologiques Option : Biochimie Appliquée, Université Echahid Hamma Lakhdar El-Oued, 31-32 p.

- Khireddine H., (2013). Comprimés de poudre de dattes comme support universel des principes actifs de quelques plantes médicinales d'Algérie. Thèse Magistère : Technologie Alimentaire. l'université de Tlemcen. 165 p.

- Kavishankar G.B., Lakshmidivi N., Murthy S.M., Prakash H.S., and Niranjana S.R., (2011). Diabetes and medicinal plants. *International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 2. (3): 65-80 p.

L

- Limberger R.P., Jacques ALB, Schmitt GC. et Arbo MD., 2013 -Pharmacological Effects of Ephedrine. *Natural Products*, pp. 1218-1237.
- Leong, LP., Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem*, 76: 69-75 p.
- Lucienne D. (2007). Les Plantes Médicinales de l'Algérie. Berti. -Mansour S., (2015). Evaluation de l'effet anti inflammatoire de trois plantes médicinales : Artemisia absinthium L, Artemisia herba alba Asso et Hypericum scarboides Etude in vivo. Thèse de doctorat en biologie, Université des Sciences et de la Technologie Mohamed Boudiaf Oran, 29-30 p.

M

- Ma G., Bavadekar S.A., Davis Y.M., Lalchandani S.G. Nagmani R., Schaneberg B.T., Khan I.A., et Feller D.R., 2007- Pharmacological Effects of Ephedrine Alkaloids on Human A 1- and a 2 Adrenergic Receptor Subtypes. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, Vol. 322, N°1, pp. 214-221.

- Maamri Z (2009). Effet toxicologique de quelques plantes algériennes , Thèse de Magister en toxicologie cellulaire , Université de mentouri Constantine. 11p.
- Müller L., Gnoyke S., Popken A.M., V. Böhm V. 2010. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 992–999

- Mansour S (2015). Evaluation de l'effet anti inflammatoire de trois plantes médicinales : Artemisia absinthium L, Artemisia herba alba Asso et Hypericum scarboides THESE DOCTORAT en biologie Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed BOUDIAF 23-39p
- Marco J.A. (1989). Sesquiterpene lactones from Artemisia herba-alba. Phytochemistry, 28: 3121-3126.
- Maurice Nicole. 1997. De l'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIesiècle, Ed : Lavoisier, Paris, 12-14 P.
- Messai L., (2011). Etude phytochimique d'une plante médicinale de l'Est algérien (Artemisia herba alba), Thèse de Doctorat en chimie option phytochimie, Université de mentouri Constantine.
- Mohamed A.E.H., El-Sayed M.A., Hegazy M.E., Helaly S.E., Esmail A.M. and Mohamed N.S., (2010). Chemical constituents and biological activities of Artemisia herba-alba. Records of Natural Products. (1): 1-25 p.
- MUANDA F., 2010. Identification de polyphéols , evaluation de leur Activite antioxydante et etude de leur proprietes biologiques.- Thèse de doctorat en chimie organique .Université Paul Verlaine-Metz : 55p.
- Madjoudja O (2014). Méthodes d'études d'activité des antioxydants des plantes médicinales Thèse de licence en biochimie fondamentale et appliquée, UNIVERSITE KASDI MERBAH, OUARGLA .2-4p.

N

- Nijveldt, R. J., Nood, E., Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Norren, K., Leeuwen, P. (2001). Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. Am. J. Clin Nutr, 74 : 418–425.
- Nikolova M., Gussev C.H. and Nguyen T. 2010. Evaluation of the Antioxidant action and flavonoid composition of Artemisia species extracts. Biotechnol, 21-23 p.

O

- Ozenda P., 1991-Flore et végétation du Sahara. Centre National De La Recherche Scientifique, Paris (3ème Ed.). 662 p
- Ozenda P., 1991-Flore et végétation du Sahara. Centre National De La Recherche Scientifique, Paris (3ème Ed.). 662 p

P

-Peters C.M., O'Neill J.O. et Young J.B., 2005-Is there an association between Ephedra and heart failure? a case series. *Journal of Cardiac Failure*, Vol. 11, N°1, pp.9-11.

-POTTIER G., 1981-Artemisia herba-alba. Flore de la Tunisie : angiospermes-dicotylédones gamopétales. 10-12p.

-Phinney K.W., Ihara T. et Sander L.C., 2005-Determination Of ephedrine alkaloid stereoisomers in dietary supplements by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1077, pp. 90–97

- Paredi P., Kharitonov S.A., Barnes P.J. (2002). Analysis of expired air for oxidation products. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 166, (supplement 1), 31–37 p.

-Powers S. K., Jackson M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews*, 88 (4) : 1243-1276 p.

- Pincemail J. et Defraigne J.O. (2004) .Les antioxydants : un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène, Symposium «antioxydant et alimentation» institut Danone. 23/10/2004. Cité dans le Mémoire de Doctorat (2015) Etude chimique et bibliographique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de Côte d'Ivoire, 17-18 p.

-Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999.Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26, 1231–1237.

R

-Raman, Arjun V., and Marla J. Berry. (2011). Selenoproteins in cellular redox regulation and signaling. *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Cell Signaling*, 195-208 p.

-Rock E., (2003) .Stress oxydant, micronutriments et santé. Intra –CRNH, unité des maladies métaboliques et micronutriments 63122 St Genès Champanelle. Université d'été de nutrition Clermont-Ferrand, 37-42 p.

-ROUX D., 2008- Conseil en aromathérapie. 2^{ème} Ed. Pr-officina, Paris. 186p. - Salido S., Valenzuela L. R., Altarejos J., Noguera M., Sanchez A. et Cano E. (2004). Composition and infraspecific variability of *Artemisia herba-alba* from southern Spain. *Biochem. Syst. Ecol.*, 32, 265-277.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999.Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26, 1231–1237.

S

-SEIDEMANN J., 2005-World Spice Plants Economic Usage, Botany, Taxonomy. Ed. ISBN, Germany. 505p.

-Sharopov F S, Sulaimonova V A, Setzer W N (2012), Composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Tajikistan, Rec. Nat. Prod. P127–134.

-State University/USDA, p 53–70 -Tastekin D., Atasever M., Adigüzel G., Keles M. and Tastekin A. 2006. Hypoglycaemic effect of *Artemisia herba-alba* in experimental hyperglycaemic rats. Bull Vet Inst Pulawy, 50: 235-238.

-Singleton V.L and Rossi J.A.J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Amer. J. Enol. Viticult. 16:144-58.

T

-TWAJJ HA, AL-BADR A., 1988- Hypoglycaemic activity of *Artemisia herba-alba*. J Ethnopharmacol. vol. 24 (2-3):123–126. - Wright C W (2002). *Artémisia*. Taylor&Francis, New York, U.S.A. P 82.

-Topçu G., Ay A., Bilici A., Sarıkürkcü C., Öztürk M., and Ulubelen A. 2007. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. Food Chemistry 103: 816–822

-Tiago Margraf, Ariadne Roberto Karnopp, Neiva Deliberali Rosso, and Daniel Granato. 2015. Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates. Journal of Food Science. C2397-C2403.

V

-Valko M., Omova K.J. (2011). Free Radicals, Signal Transduction, and Human Disease. Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Cell Signaling, 17-32 p.

-Villasante A., Araneda O.F., Behn C., Galleguillos M., Adames H. (2010). Antioxidant capacity and oxidative damage determination in synovial fluid of chronically damaged equine metacarpophalangeal joint. Veterinary Research Communications, 34 (2):133–141p.

-Vertuani, S., Angusti, A. et Manfredini, S. (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. Curr. Pharm. Des 10: 1677-1694 p

W

-Wiseman, H., Halliwell, B., 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. Biochem J 313 (Pt 1), 17-29.

Y

-Yao, L.H., Jiang, Y.M., SHI, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S. (2004). Flavonoids in Food and their health benefits. Plant. Food Hum. Nutr., 59 : 113-122 p.

-Yosra Baratli, 2014, ETUDE DE LA TOXICITE DES NANOPARTICULES D'OXYDE DE FER CHEZ LE RAT ANALYSES MITOCHONDRIALES ET DU STRESS OXYDANT, THESE DE DOCTORAT ; p37-38.

RESUME

Résumé

Ce travail est une contribution à l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique et acétate d'éthyle des trois plantes médicinales : *Artemisia herba alba*, *Artemisia Absinthium* et *Ephedra Alata*, en plus l'extrait butanolique et méthanolique de l'*Artemisia herba alba* en utilisant trois méthodes à savoir : le piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•), le piégeage du radical-cation ABTS (l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) et la réduction des ions cuivre (CUPRAC). Ainsi, l'étude de la teneur en polyphénols et flavonoïdes de ces extraits. Les résultats ont montré que les extraits ALA, Ar HA Et, Ar HA B, Ar HA MeOH, AL Et, Ar Ac, Ar HA Ac, et Ar Et ayant une activité antioxydante significative en piégeant les radicaux libres en comparant avec les standard (BHT, BHA). Ces résultats se sont avérés fortement corrélés avec les niveaux de polyphénols et flavonoïdes.

En conclusion, notre étude a montré que les plantes médicinales *Artemisia herba alba*, *Artemisia Absinthium* et *Ephedra Alata* sont très riches en différents composés métaboliques et présentent une bonne activité antioxydante qui pourrait être utilisée dans le domaine pharmaceutique comme une source potentielle des molécules bioactives.

Mots clés : activité antioxydante, teneur en polyphénols, teneur en flavonoïdes, *Artemisia herba alba*, *Artemisia Absinthium* et *Ephedra Alata*

Summary

This work is a contribution to evaluate the antioxidant activity of the ethanolic extract and ethyl acetate of the three medicinal plants: *Artemisia herba alba*, *Artemisia Absinthium* and *Ephedra Alata*, in addition to the butanolic and methanolic extract of the *Artemisia herba alba* using three methods namely: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging (DPPH•), 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid radical scavenging (ABTS) and the reduction of copper ions (CUPRAC). Thus, the study of the polyphenol and flavonoid content of these extracts. The results showed that ALA, Ar HA Et, Ar HA B, Ar HA MeOH, AL Et, Ar Ac, Ar HA Ac, and Ar Et extracts having significant antioxidant activity by trapping free radicals in comparison with standards (BHT, BHA). These results proved to be strongly correlated with polyphenol and flavonoid levels.

In conclusion, our study showed that the medicinal plants: *Artemisia herba alba*, *Artemisia Absinthium* and *Ephedra Alata* are very rich in different metabolic compounds and has a good antioxidant activity that could be used in the pharmaceutical field as a potential source of bioactive molecules with antioxidant properties.

Keywords: Antioxidant activity, polyphenol content, flavonoid content, *Artemisia herba alba*, *Artemisia Absinthium* and *Ephedra Alata*.

ملخص

هذا العمل عبارة عن تقييم للنشاط المضاد للأكسدة لمستخلص الايثانولو خلات الايثيل لثلاث نباتات طبية (الشيح الأبيض و شيح ابن سينا والعلندة) بالإضافة الى مستخلص البيتانول والميثانول للشيخ الأبيض باستخدام ثلاث طرق : DPPH, ABTS , CUPRAC ودراسة البوليفينول والفلافونويد لهذه النباتات. أظهرت النتائج أن المستخلصات ALA, Ar HA Et, Ar HA B, Ar HA MeOH, AL Et, Ar Ac, Ar HA Ac, Ar Et لها نشاط مضاد للاكسدة معتبر مقارنة مع المعايير BHT, BHA وهذه النتائج متعلقة طرديا بمستوى البوليفينول و الفلافونويد.

في الختام هذه النتائج تثبت أن مستخلصات هذه النباتات غنية بمركبات الأيض المختلفة ولديها نشاط مضاد للأكسدة مما يسمح باستخدام هذه النباتات في المجال الصيدلاني كمصد للجزيئات النشطة بيولوجيا. الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للأكسدة، الشيح الأبيض، شيح ابن سينا، العلندة، مستوى البوليفينول ومستوى الفلافونويد.

Année universitaire : 2017/2018

Présenté par : CHELLI Mouna Rayene
ZENAD Hadjer

Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydante des trois espèces végétales dans la région des Aurès.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie appliquée.

Résumé

Ce travail est une contribution à l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique et acétate d'éthyle des trois plantes médicinales : *Artemisia herba alba*, *Artemisia Absinthium* et *Ephedra Alata*, en plus l'extrait butanolique et méthanolique de l'*Artemisia herba alba* en utilisant trois méthodes à savoir : le piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•), le piégeage du radical-cation ABTS (l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) et la réduction des ions cuivre (CUPRAC). Ainsi, l'étude de la teneur en polyphénols et flavonoïdes de ces extraits. Les résultats ont montré que les extraits ALA, Ar HA Et, Ar HA B, Ar HA MeOH, AL Et, Ar Ac, Ar HA Ac, et Ar Et ayant une activité antioxydante significative en piégeant les radicaux libres en comparant avec les standard (BHT, BHA). Ces résultats se sont avérés fortement corrélés avec les niveaux de polyphénols et flavonoïdes.

En conclusion, notre étude a montré que les plantes médicinales *Artemisia herba alba*, *Artemisia Absinthium* et *Ephedra Alata*. Sont très riches en différents composés métaboliques et présentent une bonne activité antioxydante qui pourrait être utilisée dans le domaine pharmaceutique comme une source potentielle des molécules bioactives.

Mots clés : activité antioxydante, teneur en polyphénols, teneur en flavonoïdes, *Artemisia herba alba*, *Artemisia Absinthium* et *Ephedra Alata*

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Biochimie Au C.R.Bt.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme. MOSBAH A. (M.C.A-UFM Constantine 1).
Rapporteur : Mr. KASHI I. (Attaché de recherche-C.R.Bt.Constantine 1).
Co-Rapporteur : Mr. RAHMANI A. (Attaché de recherche-C.R.Bt.Constantine 1).
Examineur : Mr. MOKRANI E.H. (MAA-UFM Constantine 1).

Date de soutenance : 27/06/2018