



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Intitulé :

Etude phytochimique et activité antioxydante d'une plante
médicinale Algérienne du genre *Hedera* (Araliaceae)

Présenté par :

AKLOUCHE Nour El Houda & BOUSSOUF Romaisa

Jury

TENIOU Soumia

MAA. UFM Constantine

Président

BOUTAGHANE Naima

MCA. UFM Constantine

Rapporteur

MOSBAH Asma

MCA. UFM Constantine

Examineur

Année universitaire

2019/2020



Remerciements

*Avant toute chose, nous remercions **Allah** tout puissant, de nous avoir guidé jusqu'à l'achèvement de ce mémoire, et de nous avoir donné la force, le courage et la patience.*

*Nos remerciements vont tout particulièrement au Mètre de conférence **Boutaghiane Naima** qui a accepté de nous encadrer et nous a offerte l'opportunité d'effectuer ce mémoire dans les meilleures conditions et qui nous a fortement impressionnées, par sa grande expérience et sa concrète contribution au bon déroulement de ce travail.*

*Notre attention se portera aussi sur le professeur **Kabouche Zahia** de nous avoir accueillis au sein de son laboratoire d'obtention de substances thérapeutiques (LOST).*

Que les membres du jury trouvent ici l'expression de notre reconnaissance pour avoir accepté d'évaluer notre travail.

*Nous adressons par la même occasion, nos remerciements aux doctorantes **djebbia lamia** et **Bendamen Samia** qui n'ont épargnées ni temps, ni effort pour nous aider et pour répondre à nos questions.*

Nous devons chaque bribe de notre connaissance à nos enseignants du département des Sciences de la nature et de la vie.

En fin, toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ce travail, qu'elles voient en ces mots l'expression de notre gratitude pour leur présence, pour leur dévouement et pour l'aide inestimable qu'elles nous ont apportées tout au long de ce parcours.

Dédicace



Je remercie tout d'abord Dieu tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Je dédie ce modeste travail :

A la mémoire de ma grande mère maternel **ma mina** qui a toujours souhaité que je réussisse dans mes études, Qui n'a jamais cessé de formuler des prières à mon égard et qui m'a aimé de tout son cœur. J'aurais tant aimé que tu sois présente. Que Dieu ait ton âme dans sa sainte miséricorde.

A la mémoire de ma grande mère paternel **Taous** et mon grand père maternel **Cherif** que Dieu vous accueille dans Son Paradis.

A mon grand père paternel **Hacene** Qui m'a accompagné par ses prières et sa douceur, puisse Dieu lui prêter longue vie et beaucoup de santé.

A ma mère **Houria** et mon père **Zoubir**, je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Puisse Dieu, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A mes chères sœurs **Yasmine** et **sérine**, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès. Que Dieu, vous protège et vous garde.

A toute ma famille paternelle **Aklouche** et maternelle **Koua** pour leur soutien et amour.

A mes très chère amies **Mima** et **Fedwa**. Je ne peux pas trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs sur qui je peux compter. Je vous souhaite une vie pleine de succès et de bonheur.

A mes amis **Dave** et **Oussama** qui m'ont toujours soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire, je vous dis Merci !

A ma chère **Nada** et toutes les personnes que j'aime et qui m'aiment.

Enfin, à toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste mémoire.



Nour El Houda



Dédicace

A mes très chers parents

Aucun mot ne saurait exprimer mon grand amour, mon respect et ma reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour ma formation et ma réussite

Maman ton amour ainsi que le soutien sans limite que tu me portes me renforcent énormément, sans cela, je ne serais jamais arrivée là où je suis. Puisse dieu le tout puissant, te préserver et t'accorder santé longue vie et bonheur

Papa dans ma vie rien n'aurait été possible sans toi tu es l'école de mon enfance, mon ombre durant toutes les années des études, qui a veillé à me donner l'aide, à m'encourager et à me protéger que dieu te garde pour moi.

*A mon cher frère **Abderrahmane** aucune phrase ne saurait exprimer toute l'affection et l'amour que j'ai pour toi, ton attention et tes encouragements m'ont toujours aidés à aller de l'avant tu es un frère formidable que dieu te protège et t'offre le bonheur.*

*A mon petit ange **Adem**, qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille, je te souhaite une vie pleine de bonheur, santé et succès.*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur mes deux grande mère **Leila benmahmoud** et **Ouarda haddad**.*

*A mon cher grand père **Youcef** à qui je souhaite une bonne sante*

*A la mémoire de mon grand-père **mouloud** que dieu t'accueille dans son vaste paradis*

*A mon cher oncle **Mohcen** tu as toujours été là pour moi, tu es mon soutien moral et source de joie et de bonheur, que dieu te garde, te procure santé, joie et bonheur. A*

*mon cher oncle **Malik** symbole de la gentillesse je te souhaite de tout mon cœur tout le bonheur qui règne sur terre*

*A mes Chères tantes **Akoula** et **Rym***

Merci pour tout l'amour la douceur la gentillesse avec lesquelles vous m'avez toujours entouré, que ces quelques mots témoignent des sentiments tendres et chaleureux que j'éprouve pour vous ; je vous adore.

*A mes chères Cousins **Hamoudi**, **Maria**, **Abderrahim** et mon adorable **Abderrahmane** qu'ils trouvent ici l'expression de mon attachement avec tous mes souhaits de bonheur et de santé.*

***Yacine** et **Saber** merci pour tout*

A toutes mes amies je vous exprime par ce travail toute mon affection et j'espère que notre amitié restera intacte et durera pour toujours.

Boussouf Romaissa

Table des matières

❖ Introduction générale.....	1
❖ Revue Bibliographique	
Chapitre I : Aspect botanique et études chimiques antérieures	
I.1 L'ordre Apiale.....	3
I.2 Les Araliaceae.....	3
I.2.1 Répartition Géographique.....	3
I.2.2 Position systématique de la famille Araliaceae	4
I.2.3 Description botanique de la famille Araliaceae	5
I.2.4 Etudes chimiques antérieures.....	5
I.2.5 Utilisation en médecine traditionnelle des Araliaceae	6
I.3 Présentation du genre <i>Hedera</i>	6
I.3.1 Description botanique du genre <i>Hedera</i>	7
I.3.2 Répartition géographique du genre <i>Hedera</i>	8
I.3.3 Classification systématique du genre <i>Hedera</i>	8
I.3.4 Etudes phytochimiques antérieures sur le genre <i>Hedera</i>	10
I.3.5 Utilisation en médecine traditionnelle.....	10
I.3.6 Quelques activités biologiques du genre <i>Hedera</i>	11
Chapitre II : Les Métabolites Secondaires	
II.1 Introduction.....	12
II.2 Les composés phénoliques	12
II.2.1 Biogénèse des composés phénoliques	13
II.3 Les Flavonoïdes	13
II.3.1 Classification des flavonoïdes	14
II.3.2 Les Voies de biosynthèse des flavonoïdes	15
II.3.3 Propriétés physiologiques des flavonoïdes.....	17
II.4 Les saponosides.....	23

II.4.1	Définition.....	23
II.4.2	Classification des saponosides.....	24
II.4.3	Biosynthèse des triterpénoïdes.....	27
II.4.4	Propriétés biologiques des saponosides	29
Chapitre III : Stress Oxydant et Activité Antioxydante		
III.1	Stress oxydatif.....	33
III.2	Les radicaux libres	34
III.2.1	Différents types des radicaux libres	34
III.3	Principales affections liées au stress oxydant	35
III.3.1	Athérosclérose.....	35
III.3.2	Cancers	36
III.3.3	Diabète de type 2.....	36
III.4	Les antioxydants.....	37
III.4.1	Les antioxydants enzymatiques	37
III.4.2	Les antioxydants non enzymatiques.....	39
III.5	Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante	45
III.5.1	Test du 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH).....	45
III.5.2	Test de l'activité antiradicalaire pour le radical ABTS ⁺	46
III.5.3	Test de Blanchissement de la Béta-carotène	46
III.5.4	Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC).....	46

❖ Partie Expérimentale

Chapitre IV : Matériels et méthodes

IV.1	Aperçu et but de travail	48
IV.2	Matériel et méthode.....	48
IV.2.1	Matériel végétale.....	48
IV.2.2	Matériel Chromatographique.....	49
IV.2.3	Méthode physico-chimique	50
IV.3	Etude phytochimique de la plante du genre <i>Hedera</i>	50

IV.3.1	Extraction par macération à froid.....	50
IV.4	Mise en évidence des polyphénols	52
IV.5	Evaluation de l'activité antioxydante de l'espèce du genre <i>Hedera</i>	52
IV.5.1	Test de piégeage du radical 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)	53
IV.5.2	Test de la capacité antioxydante par réduction de l'ion cuprique (CUPRAC) ...	54

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1	Rendement d'extrait brut	55
V.2	Fractionnement de l'extrait méthanolique	55
V.3	Dosage des polyphénols totaux.....	57
V.4	Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante.....	59
V.4.1	Test de l'activité scavenger du radical DPPH'	59
V.4.2	Teste de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)	62
❖	Conclusion générale.....	64

Liste des figures

Figure 01 : Carte de répartition géographique des Araliaceae.

Figure 02 : Représentation schématique d'une plante de la famille Araliaceae

Figure 03 : planche botanique de lierre rampant ou grimpant.

Figure 4 : Structures de base des flavonoïdes.

Figure 05 : Les différentes classes des flavonoïdes.

Figure 06 : Biogénèse de la chalcone.

Figure 07 : Schéma récapitulatif de biogénèse des différentes classes de flavonoïdes.

Figure 08: Principaux squelettes stéroïdiques.

Figure 09 : Principaux squelettes triterpéniques.

Figure 10: les différents monosaccharides rencontrés dans les saponosides.

Figure 11: Schéma de biosynthèse des triterpénoïdes.

Figure 12: la structure d'OSW-1.

Figure 13: la structure de la diosceine.

Figure 14 : La balance oxydants/anti-oxydants en équilibre.

Figure 15: Aperçu des espèces oxygénées activées (EOA) dérivant de l'oxygène et systèmes de protection permettant de limiter l'effet toxique de ces espèces. GSH : glutathion, Cl⁻ : anion chlorure ; MPO : myéloperoxydase, SOD : superoxyde dismutase, Se-GPx : glutathion peroxydase séléno-dépendante .

Figure 16 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants .

Figure 17 : acide ascorbique.

Figure 18: Structures chimiques des tocophérols.

Figure 19: Réactions d'élimination des radicaux lipidiques par les vitamines E, C et Glutathion

Figure 20 : Métabolites secondaires et prévention des certaines maladies.

Figure 21: Mécanisme réactionnel entre l'espèce radicalaire DPPH[•] et un antioxydant (AH)

Figure 22: oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de ABTS^{•+}

Figure 23 : Réaction de CUPRAC par une molécule antioxydante.

Figure 24 : Wilaya d'Annaba.

Figure 25: Etapes de macération et de filtration des parties aériennes de la plante du genre *Hedera*.

Figure 26: Procédé de concentration des filtrats hydroalcooliques.

Figure 27: Fractionnement de l'extrait brut par VLC.

Figure 28 : Mécanisme de la réaction de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) avec un antioxydant.

Figure 29 : Réduction du complexe néocuproïne / cuivre (II).

Figure 30 : Chromatogramme des fractions de la VLC de l'extrait brut (Système d'élution : CHCl_3 : MeOH : H_2O (7:3:0.5)).

Figure 31: Chromatogramme des fractions de la VLC de l'extrait brut (Système d'élution : Acétate : MeOH : H_2O (10 :1 :1)).

Figure 32 : Chromatogramme des fractions de la VLC de l'extrait brut (Système d'élution : CHCl_3 : MeOH (8 :2)).

Figure 33: Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois essais).

Figure 34 : Teneurs en polyphénols totaux de l'extrait éthanolique et de la fraction VLC 60/40 en mg/ml eq acide gallique.

Figure 35: Plaque CCM développée par deux systèmes (CHCl_3 : MeOH : H_2O (7 :3 :0) et CHCl_3 : MeOH (8 :2) révélé par le DPPH.

Figure 36 : Courbe de pourcentage d'inhibition du DPPH par différents extrait de plante.

Figure 37 : Valeurs des IC_{50} $\mu\text{g/ml}$ en ordre croissant.

Figure 38 : Plaque du test DPPH.

Figure 39: Valeurs des $A_{0,50}$ exprimés en classer en ordre croissant.

Figure 40: Plaque du test CUPRAC.

Liste des abréviations

µg: Microgramme

µl : Microlitres

·OH:Radical hydroxyle

¹O₂: Oxygène singulet

ABTS':2,2'-azinobis-

AcOEt: Acétate d'éthyle

ADN: Acide désoxyribonucléique

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique

BHA : Hydroxyanisole butylé.

CHCl₃: Chloroforme

Cl⁻:Anion chlorure

CUPRAC: Cupric Reducing Antioxidant Capacity

ARN: Acide ribonucléique

DO :Densités optiques

DPPH: 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl

EAG: Equivalent d'acide gallique

EOR: Espèces oxygénées réactives

GPx:Glutathion peroxydase

GSH: Glutathion

H₂O₂:Peroxyde d'hydrogène

HR: hydroxyéthyl rutoside

IC₅₀:Concentration d'inhibition à 50%

LDL: lipoprotéine de basse densité

MeOH : Méthanol

ml:Millilitre

MoO₄²⁻:Phosphomolybdique

MPO:Myéloperoxydase

NADPH:Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

ng: Nanogramme

nm:Nanomètre

NO•: Monoxyde d'azote

O₂⁻: Anion superoxyde

ONOOH:Nitroperoxyde

PHGPx:Phospholipidehydroperoxyde glutathion peroxydase

RO•: Radical alkoxyde

ROO•: Radical peroxyde

ROS:reactive oxygen species

Se-GPx:Glutathion peroxydase séléno-dépendante

SiO₂:Le dioxyde de silicium

SOD:Superoxyde dismutase

UV :Ultraviolet

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

VLC :Vacuum Liquid Chromatography

WO₄²⁻:Phosphotungstique

Liste des tableaux

Tableau 01 : Position taxonomique de la famille des Araliaceae selon Cronquist (1981).

Introduction Générale

Introduction générale

Introduction générale

Les plantes ont été utilisées par l'homme, depuis la période préhistorique, comme une source principale de nourriture. Ensuite, leur intérêt s'est développé pour être employées comme médicaments et remèdes afin de soigner les différentes maladies (**Damintoti, 2005**). Selon certaines estimations, environ 60 à 75% de la population mondiale et 80% de la population africaine ont recouru à la médecine traditionnelle. Cette pratique répond à leurs besoins pour lesquelles la majeure partie des thérapies implique l'exploitation de principes actifs de ces plantes (**Biyiti et al., 2004 ; Oyedemi et Afolayan, 2011**). Ces dernières produisent une large gamme de composés phytochimiques. Selon les statistiques récentes, les deux tiers des médicaments actuels commercialisés sont d'origine naturelle. Ils ont été obtenus par héli-synthèse à partir d'un pharmacophore ou par modification des produits naturels ; composés issus des biotechnologies, vaccins, composés d'origine végétale, microbiologique ou animale. Seul un tiers des médicaments possède donc une origine purement synthétique (**Verpoorte et al., 2002**).

Par ailleurs, il est actuellement établi que 20.000 à 30.000 espèces végétales, sur les 500.000 répertoriées mondialement, sont utilisées dans la pharmacopée humaine et pas moins de 75 % de médicaments sont d'inspiration végétale. En dépit du fait indiscutable que les plantes constituent un réservoir de molécules bioactives, le potentiel floristique demeure encore peu exploré.

L'Algérie, par la diversité de son climat et de ses sols, offre une flore particulièrement riche en plantes. Ces ressources végétales constituent incontestablement un réservoir riche en substances biologiquement actives, ce qui lui permet d'occuper une place privilégiée parmi les pays méditerranéens qui ont une longue tradition médicale et un savoir-faire traditionnel à base de plantes médicinales (**Quezel et al., 1963**).

Il est impératif de donner beaucoup d'importance à cette catégorie d'espèces végétale d'une part, et d'autre part construire du savoir au tour des plantes médicinales et de réaliser de recherches phytochimiques et pharmacologiques sur cette ressource naturelle pour isoler des

Introduction générale

nouvelles biomolécules aux activités biologiques prometteuses. Cette thématique transversale s'intéresse donc à la substance naturelle support de l'activité biologique. La chimie et la biologie sont donc indispensables pour préciser la relation structure-activité des biomolécules, notamment celles d'intérêt thérapeutiques. Ces composés bioactifs sont vraisemblablement à l'origine du développement de l'industrie pharmaceutique.

C'est dans ce sens que le Laboratoire (LOST), destiné à la valorisation de la flore du Nord algérien, par la recherche de nouveaux composés ou principes actifs à débouchés thérapeutiques. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante de la plante médicinale *Hedera* appartenant à la famille des Araliaceae. Cet intérêt s'explique par la richesse des plantes du genre *Hedera* en métabolites secondaires d'un grand intérêt biologique, comme les saponosides triterpéniques, les flavonoïdes et les composés phénoliques (Facino *et al.*, 1987; Li *et al.*, 2015; Pârvu *et al.*, 2015; Uddin *et al.*, 2011).

Notre travail sera présenté comme suit:

- **La première partie** concerne la recherche bibliographique, réunit en trois chapitres distincts
- ✚ **Le 1^{er} chapitre**, consacré aux aspects botaniques inclut une présentation de la famille Araliaceae, et du genre *Hedera*, leurs activités biologiques, différentes classes de métabolites antérieurement isolés et leur utilisation en médecine traditionnelle.
- ✚ **Le 2^{ème} chapitre** consacré à l'étude bibliographique des métabolites secondaires (polyphénols flavonoïdes et saponosides): leur définition, leur classification ainsi que leur intérêt thérapeutique
- ✚ **Le 3^{ème} chapitre** est un aperçu sur les antioxydants.
- **La deuxième partie** du manuscrit évoque nos travaux personnels menés en deux volets. D'abord: l'extraction, le fractionnement. Puis, l'évaluation du potentiel antioxydant de la plante du genre *Hedera* par la mise au point de deux différents tests à savoir: DPPH et CUPRAC.
- **La troisième partie** est consacrée à la présentation des résultats obtenus suite à cette investigation phytochimique et les tests biologiques.

CHAPITRE : 01

Aspect botanique et études

chimiques antérieures

I.1 L'ordre Apiale

Les Apiales rassemblent plus 5200 espèces réparties en 7 familles dont les deux principales sont les Apiécées et les Araliacées. Citons également les Pittosporaceae (250 espèce) dont *Pittosporum tobira* qui orne souvent les haies persistantes et parfumées dans les jardins du Midi mais devient aussi invasif notamment au pays Basque est sous d'autres climats subtropicaux. Nous traiterons ici la famille des Araliaceae qui renferme le genre *Hedera* que nous avons travaillée.

I.2 Les Araliaceae

Famille de Dicotylédones, de l'ordre des ombelliflorales (dialypétales caliciformes), les *Araliaceae* sont des plantes généralement ligneuses, à feuilles alternes. Leurs fleurs sont groupées le plus souvent en ombelles, actinomorphes, tetracycliques et pentamères. Les ombelles ne sont pas composées mais simples, en grappe (Lierre) ou proliférés (Hydrocotyle). Le nombre de carpelles n'est pas fixé mais varie entre 1 et 5. Le fruit est typiquement une drupe (Lierre, Ginseng) (Boullard, 1997; Dupont, 2007).

La famille des Araliaceae comprend environ 1500 espèces, réparties en 55 genres, qui appartiennent pour la plus part aux régions tropicales qui, en dehors du Lierre, ne comprend que des espèces exotiques (Wen et al, 1996). Cette famille est représentée par des arbustes subtropicaux ou tempérés arbustifs (*Aralia*), grimpantes (*Hedera*) ou herbacées (*Ginseng*). La flore africaine en comprend de nombreuses espèces, toutes endémiques, dont quelques unes ont été décrites. (Chazan, 1971).

I.2.1 Répartition Géographique

La famille vit principalement dans les régions subtropicales (en particulier dans le sud-est, le sud d'Asie et les îles du Pacifique) et tropicales d'Asie et d'Amérique. Hors des régions tropicales, les Araliacée sont peu nombreuses. Le lierre (*Hedera helix*), est par exemple le seul représentant de la famille indigène d'Europe. En Asie septentrionale et en Amérique du Nord, par contre, plusieurs espèces dont certaines ont acquis l'état herbacé (Wen et al, 2001).

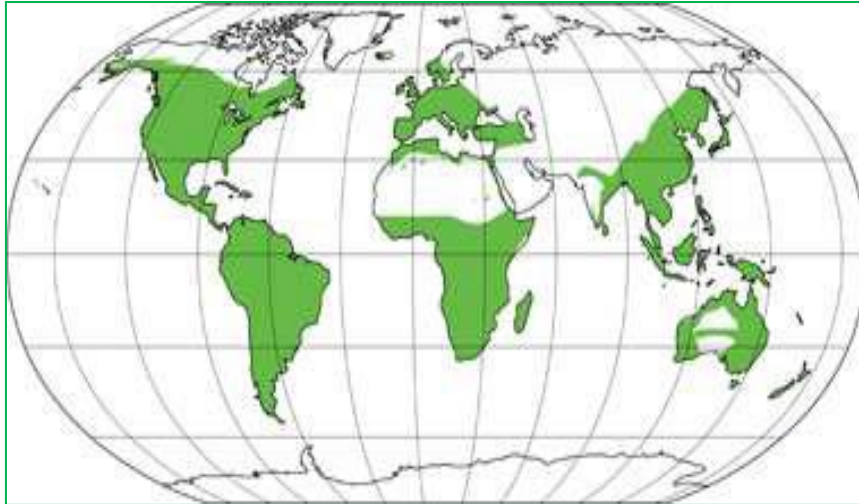


Figure 01 : Carte de répartition géographique des Araliaceae (Nicolas et Plunkett, 2009).

I.2.2 Position systématique de la famille Araliaceae

Selon la classification de Cronquist et la classification phylogénétique APG III, les Araliacées sont composées de **1500 espèces** réparties en **55 genres**.

Cette famille suit dans les classifications celle des Apiaceae avec laquelle elle partage de nombreux caractères, à tel point que les deux familles avaient été rassemblées dans APG I.

Tableau 01 : Position taxonomique de la famille des Araliaceae selon Cronquist (1981).

Classification selon Cronquist (1981)	
Règne	Plantae
Sous-Règne	Tracheobionta
Division	Mgnoliophyta
Classe	Magnoliopsida (Dicotylédones)
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Apiales
Famille	Araliaceae

I.2.3 Description botanique de la famille Araliaceae

Les Araliaceae constituent un groupe à peine distinct des Ombellifères. Ce sont des végétaux herbacés ou quelquefois des arbres très élevés. Leurs fleurs, également très-petites, sont disposées en ombelles simples ou en ombelles paniculées. Leur calice est également adhérent et denté; leur corolle, formée de cinq à six pétales. Leur ovaire présente de deux à six loges monospermes, et est surmonté d'autant de styles, que terminent des stigmates simples. Le fruit est tantôt charnu et indéhiscent, tantôt sec et se séparant en autant de coques monospermes qu'il avait de loges à l'ovaire. Nouveaux éléments de botanique et de physiologie végétale (Nicolas et Plunkett, 2009).



Figure 02 : Représentation schématique d'une plante de la famille Araliaceae

I.2.4 Études chimiques antérieures

Une recherche bibliographique réalisée sur les espèces de la famille Araliaceae montre qu'elles ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques. Celles-ci ont permis

d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires. Les substances dominantes sont les,sterols, diterpenes, cerebrosides, dérivés acétyléniques,sesquiterpenes (**Wang et al., 2019**) et saponines triterpéniques qui présentent de multiples propriétés biologiques et pharmacologiques : anti-proliférative, anti-inflammatoire, anparasitaires, antidiabétiques et de nombreuses activités relatives aux système nerveux et cardiovasculaire antifongique (**Clement , 2014**).

I.2.5 Utilisation en médecine traditionnelle des Araliaceae

- En médecine populaire traditionnelle, les espèces du genre *Hedera* (Araliaceae), sont utilisées pour traiter diverses maladies et affections, comme les troubles gastro-intestinaux, les ulcères, les brûlures, les plaies, les callosités, la cellulite et les infections parasitaires, grâce à leurs propriétés antiseptique, cicatrisante, anti-inflammatoire et anti-infectieuse (**Villani et al., 2001**).
- Les racines de *Ginseng* (Araliaceae), sont utilisées pour le traitement de troubles hémorragiques, athérosclérose et pour soulager les symptômes de vieillissement et sont aactuellement utilisés comme herbe populaire pour le bien-être général (**Kim et al., 2014**).
- L'espèce *Schefflera leucantha* R.Vig. (Araliaceae), est très utilisé en pharmacopée traditionnelle chinoise pour le traitement desmaux de tête le sciatique etle rhumatisme (**Chinese Pharmacopoeia Commission, 1977**).
- En Asie, les feuilles de *Polyscias* (Araliaceae) sont employées comme remède pour soulager les maux gastriques, l'inflammation et pour leurs propriétés antibactériennes et également toniques, tandis que les racine sont reconnues pour leurs effets diurétique, anti-dysenterie et pour la névralgie (**Huan et al., 1998**).
- L'espèce *Polyscias.fulva* (Araliaceae) pour traiter le paludisme, l'obésité, la fièvre, les infections vénériennes et les maladies mentales (**Sugimoto et al., 2017**).
- Certaines espèces du genre *Cussonia* sont utilisées en médecine traditionnelle Africaine en raison de leurs propriétés anti-inflammatoire, anti-paludisme, anti-diarrhéiques et pour le traitement des maladies sexuellement transmissibles (**Villiers et al., 2010**).

I.3 Présentation du genre *Hedera*

Le genre *Hedera*, communément appelé lierre, comprend plusieurs espèces sauvages ou sélectionnées et cultivées comme plantes ornementales d'intérieur ou d'extérieur. La plus commun est le lierre grimpant ou lierre commun, *Hedera helix*.

C'est une liane grimpante phanérophyste qui peut être rampante et grimpante de la famille des Araliacées, elle est la liane la plus répandue dans les régions tempérées.

Le nom français « lierre » vient du latin *Hedera*, (de haerere: être attaché). *Hedera* a d'abord donné èdre, puis ierre, et ce dernier agglutiné avec l'article défini a donné lierre (**Couplan, 2012**).

I.3.1 Description botanique du genre *Hedera*

Hedera est un genre de plante à fleurs polypétalées, qui a des rapports avec les Cornouillers, les Aralies, et qui comprend des arbrisseaux sarmenteux toujours verts. Les feuilles sont alternes ou éparses dont les fleurs petites pédonculées, sont ordinairement disposées en ombelle.

Le caractère essentielle de ce genre est d'avoir un calice supérieur à cinq dents; cinq pétales cinq étamines et une baie semi-inférieure à cinq semences,

Chaque fleur offre :

- 1-un calice supérieur très-petit, à cinq dents caduques.
- 2-Cinq pétales ovales-oblongs, larges à leur base, plus grands que le calice, ouverts en rose.
- 3- Cinq étamines à filaments subulés, à peine de la longueur des pétales, à anthère inclinées.
- 4-Un ovaire semi -inférieur surmonté
- 5-Le fruit est une baie globuleuse, couronnée d'un rebord circulaire un peu au dessous de son sommet à cinq loges qui contient cinq semences ovales. , ridées, convexes sur leur dos anguleuses en leur face interne.



Figure 03: planche botanique de lierre rampant ou grimpant.

I.3.2 Répartition géographique du genre *Hedera*

Les plantes du genre *Hedera* sont des vignes grimpantes à feuilles persistantes qui appartiennent à la famille des Araliaceae. Ces plantes naturellement distribués en Asie, Europe et en Afrique mais sont actuellement cultivés dans le monde entier (Sun et al., 2015).

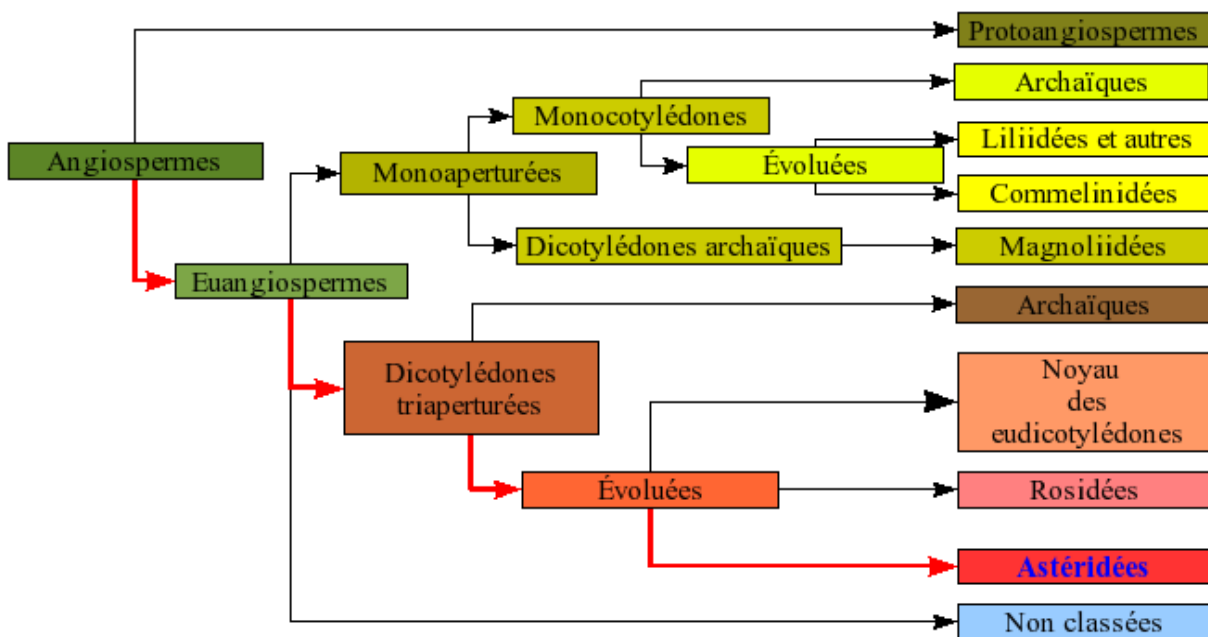
En Algérie, le Lierre est une plante fréquente dans tout le pays sauf dans les régions arides (Quezel et al., 1963).

I.3.3 Classification systématique du genre *Hedera*

Le genre *Hedera* est un genre dans la famille des Araleaceae dont la position systématique est la suivante :

- Selon Cronquist (1981)

Embranchement :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Sous classe :	Rosidae
Ordre :	Apiales
Famille :	<i>Araliaceae</i>
Genre :	<i>Hedera</i>



- Classification **phylogénétique**

Clade :	Spermatophyta
Clade :	Angiospermes
Clade :	Dicotylédones vraies
Clade :	Asteridées
Super ordre :	Euastéridées II
Ordre :	Apiales
Famille :	<i>Araliaceae</i>
Genre :	<i>Hedera</i>

I.3.4 Etudes phytochimiques antérieures sur le genre *Hedera*

De nombreuses études phytochimiques réalisées sur les espèces du genre *Hedera* ont montré la présence d'une haute teneur en composés saponosides triterpéniques, flavonoïdes et les composés phénoliques (Facino et al., 1987; Li et al., 2015; Pârvu et al., 2015; Uddin et al., 2011).

I.3.5 Utilisation en médecine traditionnelle

Le genre *Hedera* est très utilisé en pharmacopée traditionnelle chinoise, Européenne et Britanique (Khdaïr et al., 2010; Stauss-Grabo et al., 2009) et les propriétés pharmacologiques de certaines espèces ont été démontrées par des études scientifiques.

L'utilisation traditionnelle de *Hedra helix* remonte au 19^{ème} siècle (Hecker et al., 2002; Rippe and Medejsky, 2006). Cette plante est utilisée pour traiter les toux grasses et les troubles respiratoires notamment après ou pendant un refroidissement. C'est une alternative naturelle intéressante, car cette plante rend plus liquides les sécrétions et calme les crampes grâce à son effet spasmolytique (Khdaïr et al., 2010; Stauss-Grabo et al., 2009). Plusieurs formulations d'extrait du lierre sont utilisées dans des industries pharmaceutiques et ont été normalisés en 1988 par la réglementation allemande (Lakemedelsverket Medical Products Agency, 2014). On peut citer par exemple le médicament suisse Prospan® produit à partir de l'extrait éthanolique de feuilles de lierre.



I.3.6 Quelques activités biologiques du genre *Hedera*

Les plantes du genre *Hedera* sont connues pour leur richesse en saponosides à squelette α -hederin et hederacoside C (Timonet *al.*, 1980; Julienet *al.*, 1985; Hostettmann, 1980; Majesteret *al.*, 1991; Sieben et al., 2009) possédant diverses et intéressantes activités biologiques, notamment les activités : antifongique , molluscicide, antileishmania et antimutagène.

Parailleurs, des études biologiques ont confirmé que les saponines triterpénique isolés de *Hedera helix* L sont dotés d'activités : antibactériennes (Cioaca et al.,1978), antifongiques, antioxydantes,(Greunke et al., 2015; Mendel et al., 2011; Trute et al., 1997). antitumorale, antispasmodiques (Trute et al., 1997; Häberlein, 2008; Sieben et al., 2009) et anti-inflammatoires (Süleyman et al., 2003; Gepsdiremen et al., 2005).

Une autre étude *in vitro* a montré que l' α -hédérine et la hédérasaponine-C chez *Hedera helix* présentent une forte activité antioxydante comparable à celle de l' α -tocophérol, du butylhydroxyanisole (BHA) et du butylhydroxytoluène (BHT) (Gülçin et al., 2004).

CHAPITRE : 02

Les Métabolites Secondaires

II.1 Introduction

Chez les végétaux, les molécules naturellement synthétisées peuvent être classifiées en deux grandes catégories. Elles sont, soit des métabolites primaires (les acides nucléiques, les acides aminés communs, les acides gras et les sucres), ou des métabolites secondaires classés en trois grands groupes : les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes. Les métabolites secondaires marquent de manière originale, une espèce, un genre ou une famille de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique.

Les métabolites secondaires se répartissent dans tous les organes (fleurs, feuilles, rhizomes, racines, écorces, graines et fruits). Ils sont très utiles pour l'homme, comme colorants, arômes, antibiotiques, herbicides, et drogues...etc.

II.2 Les composés phénoliques

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement (**Bruneton, 1993**). L'élément structural de base qui les caractérise est la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, ester ou encore hétéroside) (**Bruneton., 2009**).

A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolés et identifiés (**Mompon et al., 1998**). Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (**Hennebelle et al., 2004**).

Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 (**Harbone, 1993**). Ils sont divisés en plusieurs catégories : anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénols, xanthonnes et autres phloroglucinols où les flavonoïdes représentent le groupe le plus commun et largement distribué. Ces métabolites secondaires sont synthétisés par les plantes pendant leur développement, ces derniers servent pour soulager et répondre aux conditions de stress, les infections, guérir les blessures et protéger contre les radiations UV....etc (**Bruneton., 2009**).

II.2.1 Biogénèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont issus de deux grandes voies d'aromagenèse, la voie de l'acide shikimique et de l'acétate.

- La voie la plus courante est celle qui, via le shikimate, joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie du phénylpropanoïde (**Yaoet al., 1995**).

Elle transforme les oses aux amino-acides aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs dérivés : acétophénones, acides phénols, coumarines, lignanes, lignines.... etc (**Ellis, 2009 ; Roberts, 1996**).

- L'autre voie part de l'acétate et conduit à des poly- β -cétoesters de longueurs variables (les polyacétates) qui engendrent par cyclisation (réaction de Claisen ou condensation aldolique), des composés souvent polycycliques : chromones, isocoumarines, depsides, depsidones, quinones.... etc (**Javillier, 1969 ; Paech, 1956**).

La pluralité structurale des composés phénoliques est due à cette double origine biosynthétique, et encore accrue par la possibilité très fréquente d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composés d'origine mixte : flavonoïdes, stilbènes, pyrones, xanthones... etc (**Hemingway et al., 1992 ; Payne, 1973**).

Parmi les nombreux composés phénoliques que sont les flavonoïdes, acide benzoïques, acides hydroxycinnamiques, coumarines, stilbènes, subérines et les lignanes..., nous nous intéresserons aux flavonoïdes. D'une part parce qu'ils sont plus représentés dans notre étude et d'autre part parce qu'ils présentent quelque fois des activités biologiques importantes.

II.3 Les Flavonoïdes

Les flavonoïdes (de *flavus*, « jaune » en latin) regroupent un vaste ensemble de composés polyphénoliques ubiquistes des plantes, plus de 7 000 flavonoïdes naturels ont été décrits (**Thilakarathna et Rupasinghe, 2013**). Ces métabolites possèdent une origine biosynthétique commune, la structure de base est représentée par un squelette 1,3-diphénylpropane (Ar-C3-Ar) (Figure 4), elle est constituée de deux noyaux aromatiques (cycle A et B) reliés par un chaînon propyle qui peut être complété par une fonction éther (cycle C). Cet enchainement est de type 1,3-diarylpropane pour les flavonoïdes, 1,2-diarylpropane pour les isoflavonoïdes ou encore 1,1-diarylpropane pour les néoflavonoïdes (**Bohm, 1998**).

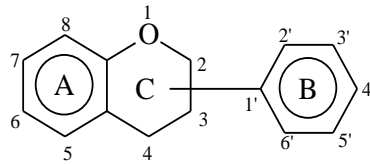


Figure 4 : Structures de base des flavonoïdes.

II.3.1 Classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes se divisent en plusieurs sous-classes qui se distinguent par une diversité structurale selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central lequel peut être ouvert et recyclisé en un motif furanique (dihydrofuranone). Les plus importants sont donnés ci-après (Figure 05).

- 2-phénylbenzopyriliums : comme les anthocyanes
- 2-phénylchromones : flavones, flavonols et leurs dimères ou flavanones et dihydroflavonols (dérivés 2,3-dihydrogénés).
- 2-phénylchromanes : flavanes, flavan-3-ols et flavane-3,4-diols.
- Chalcones et dihydrochalcones (le cycle pyranique est ouvert).
- 2-benzylidène-coumaranones (aurones).

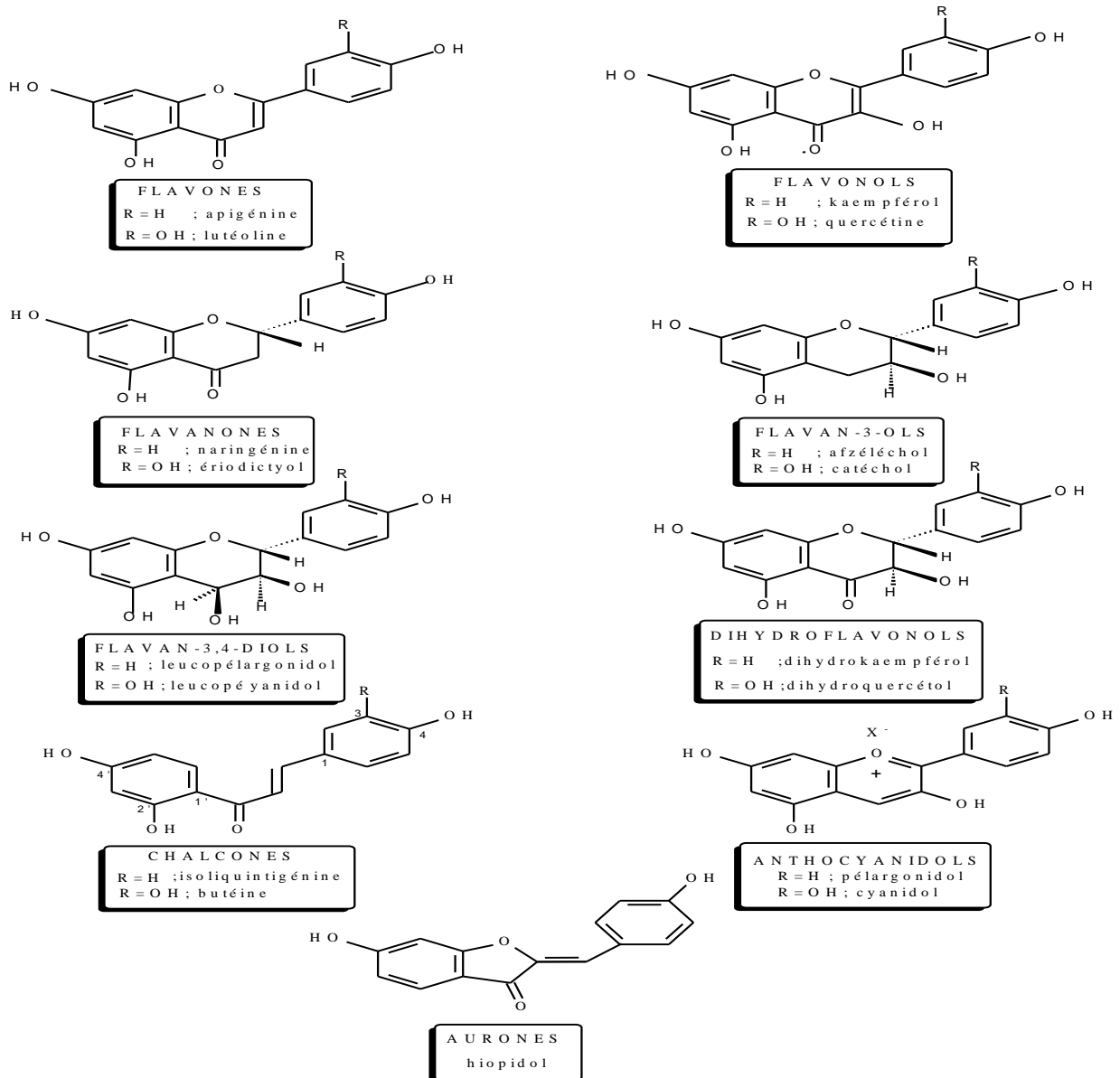


Figure 05 : Les différentes classes des flavonoïdes.

II.3.2 Les Voies de biosynthèse des flavonoïdes

La biosynthèse des flavonoïdes débute par la formation de thioester d'acide 3,5,7-trioxyoctanoïque à travers plusieurs étapes d'addition de l'acétyl-SCoA et le malonyl-SCoA. La réaction entre ce précurseur et le *p*-hydroxycinnamyl-SCoA permet de former une chalcone (Figure 06). En présence d'une isomérase, cette dernière est en équilibre avec une (2S)-flavanone.

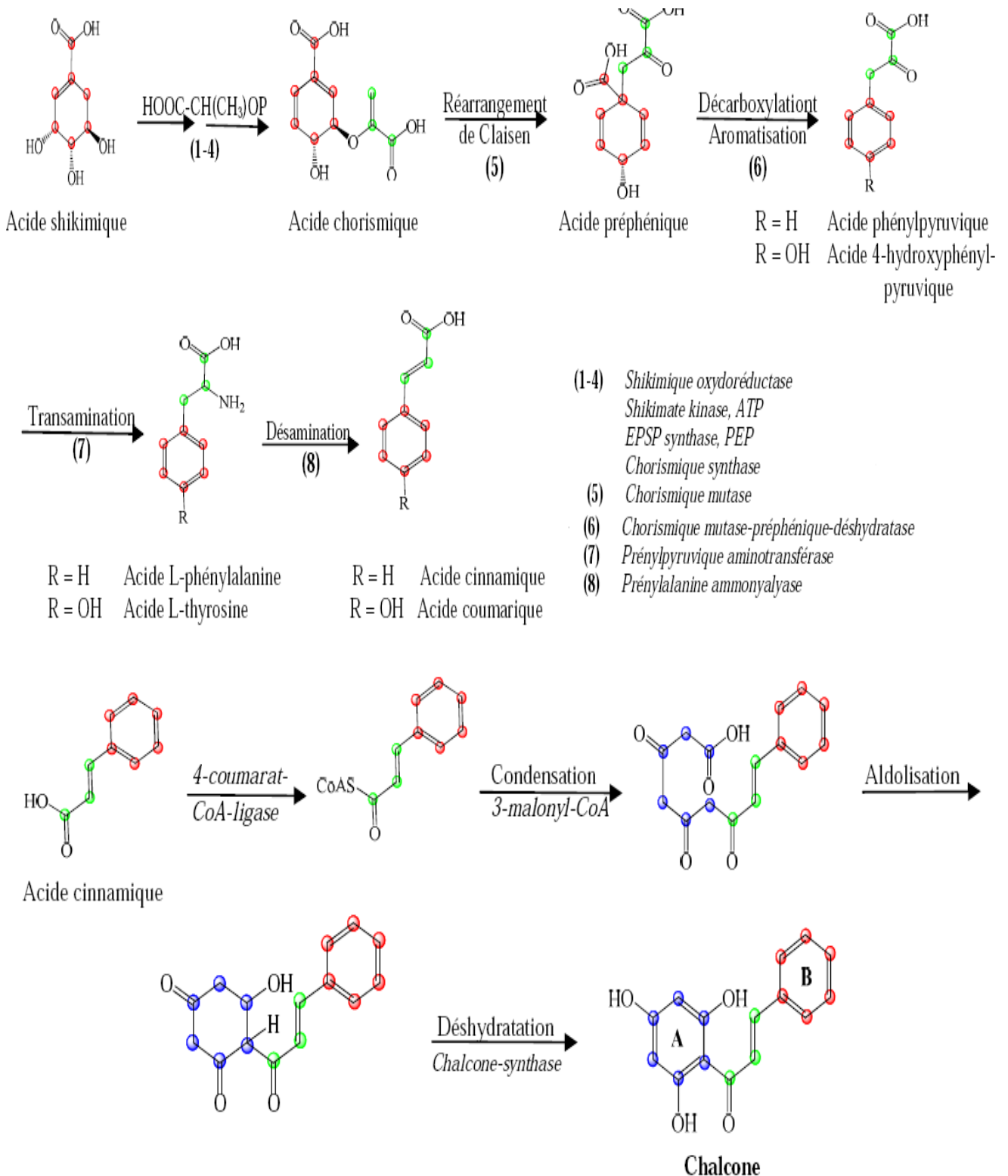


Figure 06 : Biogénèse de la chalcone.

Cette chalcone est également le précurseur de toutes les classes de flavonoïdes.

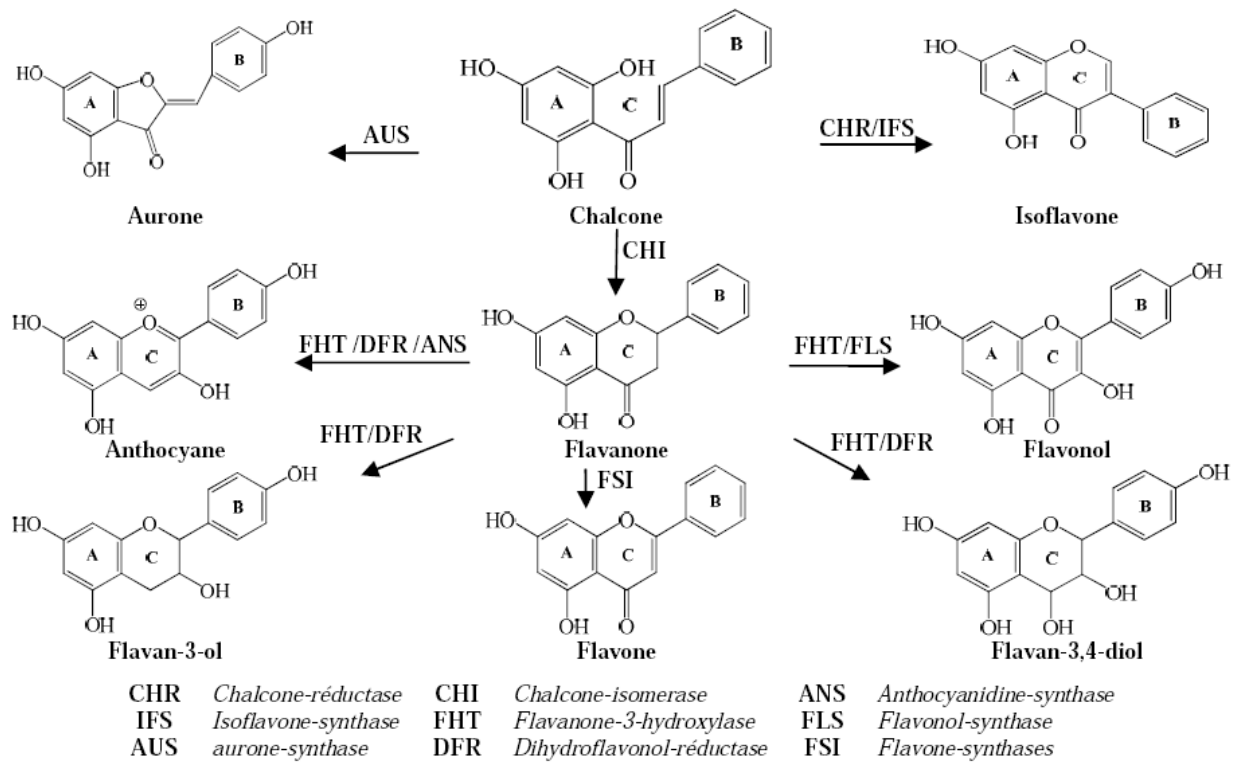


Figure 07 : Schéma récapitulatif de biogénèse des différentes classes de flavonoïdes.

II.3.3 Propriétés physiologiques des flavonoïdes

II.3.3.1 Distribution dans les plantes et le règne végétal

A de rares exceptions, seules les plantes ont la capacité de biosynthétiser des flavonoïdes. Les flavonoïdes peuvent être présents dans toutes les parties des plantes. Dans la majorité des cas, les flavonoïdes sont présents sous forme glycosylée dans les plantes car la glycosylation a pour effet de les rendre moins réactifs et plus hydrosolubles permettant alors leur stockage dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs, de l'épiderme et du mésophylle des feuilles, des parenchymes des tiges et racines (**Bruneton, 1999**). Les génines seules sont présentes dans les exsudats farineux de certaines plantes, dans les cuticules des feuilles, écorces et bourgeons ou sous forme de cristaux dans les cellules de certaines *Cactaceae* et plantes de régions arides (**Iwashina, 2000**).

II.3.3.2 Rôle dans les plantes

Les flavonoïdes sont les pigments colorés des fleurs. Par exemple, les couleurs orange, rouges et bleues des légumes, fruits, fleurs et tissus de stockage des plantes sont dues à des anthocyanes hydrosolubles (qui sont des flavonoïdes jaunes réduits). De ce fait, ils jouent un

rôle important dans les interactions avec les insectes (attraction et rôle dans la pollinisation entomophile et la dispersion des graines). Ils sont impliqués dans les interactions plantes-microorganismes : dans les pathogénèses comme dans les symbioses (nodules des légumineuses). Ils agissent dans les systèmes de défense des cellules végétales en réponses à certains stress tels que les radiations ultraviolettes. Ce sont également des inhibiteurs d'enzymes, des agents chélatants des métaux nocifs aux plantes. De plus ils sont impliqués dans la photosensibilisation et les transferts d'énergie, la morphogénèse et la détermination sexuelle, la photosynthèse et la régulation des hormones de croissance des plantes (**Di Carlo et al., 1999 ; Pietta, 2000**).

II.3.3.3 Importance dans l'alimentation

La contribution au régime alimentaire humain des flavonoïdes est très importante : de 50 à 800 mg/jour en fonction de la consommation de fruits et légumes mais aussi de boissons comme le thé ou le vin rouge (environ 200 mg par verre ou tasse) (**Pietta, 2000**). On trouve également des flavonoïdes dans de nombreuses plantes médicinales et des préparations à base de plantes contenant de flavonoïdes sont utilisées en médecine traditionnelle partout dans le monde (**Hollman et Arts, 2000**).

II.3.3.4 Activités biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont souvent des molécules de défense contre les organismes pathogènes, il n'est donc pas surprenant que certains de ces composés possèdent un potentiel en thérapeutique contre les microorganismes (bactéries, virus, champignons), contre les parasites et les insectes. Leur capacité antioxydante peut aussi expliquer un certain nombre de propriétés thérapeutiques.

II.3.3.4.1 Activité antioxydante

- **Inhibition d'enzymes ou chélation des éléments traces impliqués dans la formation de radicaux : suppression de la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (Pietta, 2000):**

Les flavonoïdes inhibent la xanthine oxydase, source biologique importante du radical superoxyde (O_2^{\cdot}). Ils sont également connus pour inhiber d'autres enzymes impliquées dans la génération de ROS telles que les cyclooxygénases, les lipooxygénases, ou les monooxygénases microsomiales (**Pietta, 2000**).

Le radical superoxyde réagit avec le peroxyde d'hydrogène (en présence de fer) pour donner par dismutation, des radicaux hydroxyles encore plus toxiques (OH[•]). C'est cette réaction, appelée réaction de Fenton, catalysée par le fer, qui est inhibée par certains flavonoïdes (tels que la quercétine) par une action de chélation du fer (**Cuyckens et Claeys, 2004**).

➤ Piégeage de radicaux

En raison de leur faible potentiel redox, les flavonoïdes peuvent réduire les radicaux libres très oxydés comme les superoxydes, les radicaux peroxydes ou les radicaux hydroxyles par transfert d'hydrogène (**Pietta, 2000**). L'oxyde nitrique qui forme, en se combinant avec le radical superoxyde, le très délétère peroxyde nitrite est également piégé par les flavonoïdes. Le radical flavonoïde ainsi formé est stable et interrompt les événements de dégradation cellulaire initiés par l'attaque radicalaire (**Hollman et Katan, 1997**).

Les radicaux seraient responsables d'altérations des acides nucléiques et des processus d'altérations d'initiations et de cancérisation ainsi que de dégradations cellulaires liées à leur réactivité avec les phospholipides membranaires (phénomènes de peroxydation). Ces dommages oxydatifs peuvent être impliqués dans de nombreuses affections : cancers, inflammations chroniques, athéroscléroses...

II.3.3.4.2 Activité antibactérienne

De nombreux flavonoïdes possèdent des propriétés antibactériennes (**Cushine et al., 2005**). Il a été démontré que les 5-hydroxyflavanones et les 5-hydroxyisoflavanones avec un, deux ou trois groupements hydroxyles en position 7, 2' et 4' inhiberaient la croissance de *Streptococcus* sp. L'hydroxylation la plus importante pour l'activité étant celle en position 2'. Par contre, les méthoxylations diminuent considérablement les effets antibactériens (**Cushine et al., 2005**). Les flavonoïdes agiraient à plusieurs niveaux. Il semblerait que le cycle B joue un rôle important dans l'intercalation avec les acides nucléiques et inhiberait ainsi la synthèse d'ADN et d'ARN. Ils peuvent également inhiber l'ADN gyrase d'*E. coli*, là encore une hydroxylation du cycle B semble essentielle à l'activité (**Cushine et al., 2005**).

II.3.3.4.3 Activité antifongique

De nombreux flavonoïdes possèdent des activités antifongiques, le plus grand nombre appartient aux flavanones et aux flavanes (**Grayer et al., 1994**). Une flavanone prénylée (5, 7,4'-trihydroxy-8-méthyl-6-(3-méthyl-[2-butényl])-(2S)-flavanone) ainsi qu'une flavane (7-

hydroxy-3',4'-(méthylènedioxy)-flavane sont actives contre *Candida albicans*. Alors que plusieurs flavones polyméthoxylées sont actives contre *Aspergillus flavus* (Cushine *et al.*, 2005).

Quelque soit la classe de flavonoïdes considérée, il apparait que le caractère lipophile des composés augmente l'activité, permettant aux molécules de pénétrer plus facilement à travers la membrane fongique (Jimenez *et al.*, 2008 ; Grayer *et al.*, 1994). De plus, la présence d'une chaîne isoprène apparait comme importante pour l'activité mais pas essentielle (Jimenez *et al.*, 2008).

II.3.3.4.4 Activité antivirale

La génistéine, ainsi que d'autres flavonoïdes (quercétine, kaempférol, 5,6,7-triméthoxyflavone, 3-méthylkaempférol) sont actifs *in vitro* sur plusieurs souches virales, que ce soit des virus non-enveloppés (poliovirus, adénovirus) ou des virus enveloppés (Retroviridae comme VIH, Flaviviridae, Herpes virus...). Le flavonoïde le plus étudié est de loin la génistéine, néanmoins les mécanismes d'action ne sont pas clairement élucidés (Andres *et al.*, 2009).

II.3.3.4.5 Effets anti-inflammatoire

In vitro, plusieurs flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique plaquettaire (Delporte *et al.*, 2005 ; Pelzer *et al.*, 1998 ; De Medina *et al.*, 2002). C'est ainsi que la myricétine et la quercétine bloquent l'action des cyclo-oxygénase et lipoxygénase à des concentrations relativement élevées. À faibles concentrations, c'est la lipoxygénase qui est inhibée préférentiellement. Certains travaux suggèrent qu'ils posséderaient une bonne activité anti-inflammatoire sans les effets indésirables de type ulcérogène (Asongolem *et al.*, 2004 ; Cruz *et al.*, 1998 ; Friesenecker *et al.*, 1995 ; Middleton *et al.*, 2000 ; Pelzer *et al.*, 1998 ; De Medina *et al.*, 2002 ; Han, 2005).

L'hespéridine, administrée par voie sous-cutanée (car inactive per os), présente une activité anti-inflammatoire significative chez le rat dont l'œdème a été induit aussi bien par la carragénine que par le dextran (Galati *et al.*, 1994).

II.3.3.4.6 Activité anti-ulcérogène

Les flavonoïdes sont capables de protéger la muqueuse gastrique contre divers agents ulcérogènes. L'hypolaetine-8- glucose, flavonoïde présent dans diverses espèces du genre *Sideritis*, présente une activité anti-ulcérogène significative (**Villaret *et al.*, 1987**). La naringine et la quercétine exercent également une activité anti-ulcérogène mise en évidence chez le rat dont l'ulcère gastrique a été induit par l'éthanol. Il a été suggéré que la quercétine exerce ses effets cytoprotecteurs grâce à un complexe impliquant la stimulation de la prostaglandine et l'inhibition de la production de leucotriènes via la production de mucus et ses propriétés antioxydantes (**Mastuda *et al.*, 2002**). Par ailleurs, il a été établi que la quercétine inhibe la croissance d'*Helicobacter pylorii* ainsi que la formation d'acide par les cellules pariétales en réponse à une stimulation par l'histamine et l'AMPc dibutyrique (**Beil *et al.*, 1995 ; Shih *et al.*, 2004**).

II.3.3.4.7 Propriétés antiallergiques

Les flavonoïdes sont également connus pour leurs effets antiallergiques. Ils agissent par inhibition des enzymes qui favorisent la libération d'histamine à partir des mastocytes et des basophiles: l'AMPc phosphodiesterase et la Ca⁺⁺ ATPase (**Amella *et al.*, 1985 ; Berg et Daniel, 1988 ; Kotani *et al.*, 2000 ; Yamamura *et al.*, 1998**). En outre, la quercétine exerce un puissant effet inhibiteur de la libération d'histamine à partir des mastocytes (**Formica et Regelson, 1995**).

II.3.3.4.8 Activité anti-cancérogène

Le cancer se présente habituellement comme une tumeur formée d'une masse cellulaire qui est l'aboutissement d'une série de transformation pouvant se dérouler pendant plusieurs années, donc la cancérogénèse est un processus complexe multi-séquentiel menant une cellule de l'état sain à un état précancéreux et finalement à un stade précoce de cancer (**Pincemill *et al.*, 1999**).

Les substances polyphénoliques sont capables d'activer les mécanismes naturels de la défense anticancéreuse (**Gonzalez *et al.*, 2011 ; Galliano *et al.*, 2012**). Il y a déjà plus de 20 ans, des études suggéraient que les flavonoïdes pouvaient « inhiber » le Cancer et qu'ils avaient des propriétés antitumorales (**Wattenberg, 1992 ; Wattenberg *et al.*, 1985**), parmi les flavonoïdes les plus actifs sur les cellules tumorales, nous citons la quercétine et la

catéchine qui sont très abondantes dans les aliments. La quercétine prévient la cancérogenèse, surtout le cancer de la peau et du colon. La présence de 20 % de quercétine dans l'alimentation chez les animaux diminue le cancer du côlon et y prévient l'apparition des cryptes anormales. Le mécanisme suggéré est que la quercétine joue le rôle d'un antagoniste des topoisomérases I et II produites par les cellules tumorales. La catéchine, quant à elle, est un inhibiteur de certaines réactions d'oxydation donnant un ADN anormal, elle inhibe surtout la formation du 8-hydroxydesoxyguanosine (8-OHdG), un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN. La catéchine a été démontrée comme étant plus active que la vitamine E sur les radicaux libres. (Pietta, 2000 ; Tomofuji *et al.*, 2009).

Enfin, les flavonoïdes peuvent inhiber les enzymes intervenant dans l'activation des procarcinogènes en intermédiaires mutagènes et carcinogènes (Obermeier *et al.*, 1995).

II.3.3.5 Effets sur le système cardiovasculaire

Les flavonoïdes sont réputés pour leur effet protecteur sur la santé cardiovasculaire en modifiant plusieurs processus pathologiques qui interviennent dans l'apparition des maladies cardiovasculaires. Certains flavonoïdes auraient un effet positif dans l'athérosclérose et les formes stables de maladies cardio-vasculaires en diminuant l'oxydation de LDL par inhibition de LOX, une atténuation du stress oxydatif et une diminution de l'inflammation (Duchnowic *et al.*, 2012).

Les flavonoïdes auraient également un intérêt dans la Régulation des réponses inflammatoires et immunitaires au niveau de la paroi des vaisseaux sanguins, qui peut être anormale en cas de maladie cardiovasculaire (Ding *et al.*, 2006) et dans le traitement des arythmies et de l'hypertension artérielle, en particulier grâce à une diminution du stress oxydatif dans la prévention des infarctus myocardiques, les flavonoïdes agiraient par inhibition de l'agrégation plaquettaire et une diminution des ROS (Mladinka *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2012). Les flavonoïdes inhiberaient l'agrégation plaquettaire par interaction avec les récepteurs aux thromboxanes et posséderaient une action vasodilatatrice, néanmoins, les mécanismes d'action qui interviennent sont encore flous (Mladinka *et al.*, 2010).

II.3.3.6 Effets protecteurs vasculaires

Les flavonoïdes agissent sur les vaisseaux sanguins sous forme d'activité vitaminique « P » (Beretz *et al.*, 1991). Cette activité intervient dans le maintien d'une perméabilité vasculaire

normale (Shih *et al.*, 2004 ; Youdim *et al.*, 2002). Ils sont, de ce fait, utilisés dans certains états pathologiques caractérisés par un défaut affectant la perméabilité vasculaire (Folts, 2002 ; Vitor *et al.*, 2004). Les effets de l'O- β -hydroxyéthyl rutoside (HR) ont été étudiés chez des patients présentant une insuffisance veineuse chronique : un traitement à base de HR a permis de restaurer les paramètres hémorhéologiques altérés. D'autres flavonoïdes sont responsables d'une augmentation de la résistance des capillaires. Cette activité serait en rapport avec les effets de certains flavonoïdes sur les plaquettes, les leucocytes et sur les enzymes intervenant dans la coagulation sanguine (Stoclet *et al.*, 2004 ; Ursini *et al.*, 1999).

II.3.3.7 Autres effets des flavonoïdes

Les flavonoïdes préviennent la cataracte diabétique par inhibition de l'aldose réductase du cristallin (Chaudhry *et al.*, 1983). En effet, la myricétine présente des effets hypoglycémisants et hypo-triglycéridémisants chez les animaux diabétiques (Ong et Khoo, 1997 ; Ong et Khoo, 2000).

L'effet des flavonoïdes sur le système immunitaire est complexe et demeure encore mal élucidé (Middleton, 1993). Certains d'entre eux réduisent l'activation du complément, diminuant de façon générale la réponse inflammatoire (Berrens *et al.*, 1997). À doses élevées, ils inhibent les fonctions lymphocytaires, mais, à concentrations plus faibles, ils pourraient agir comme immunostimulants chez les sujets immunodéprimés. L'activité immunomodulatrice des flavonoïdes dépend, d'une part, de leur capacité à inhiber la formation des eicosanoïdes et de l'histamine et de leur pouvoir piègeur des radicaux libres d'autre part (Damre *et al.*, 2003 ; Kuo *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2004).

II.4 Les saponosides

II.4.1 Définition

Les saponosides, produits naturels issus du métabolisme secondaire, constituent un vaste groupe d'hétérosides fréquemment rencontrés chez les végétaux (Saponaria, Quinoa, etc.). Elles sont caractérisées par leurs propriétés tensioactives car ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes (Bruneton, 2009). Du point de vue chimique, elles se caractérisent par un radical osidique (glucose, galactose...), lié à un radical aglycone via une fonction éther ou ester.

Les plantes à saponines ont été très recherchées pour leurs propriétés détergentes (**Sparg et al., 2004**), à l'instar de la Saponaire (*Saponaria officinalis* L.) qui a été largement employée pendant des siècles. Les saponines ont été aussi recherchées par l'industrie pharmaceutique parce qu'elles forment le point de départ pour l'hémi-synthèse des médicaments stéroïdiens (**Mors et al., 2000**). Leur nom provient du latin *sapos* signifiant "savon" en raison de leurs propriétés à former des solutions moussantes en présence d'eau (**Dewick, 2002**). Ce sont des hétérosides de poids moléculaire élevé, qui se composent d'une partie lipophile l'aglycone (ou génine) et d'une partie hydrophile osidique. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires en leurs molécules explique leur comportement moussant en solution aqueuse.

Elles présentent plusieurs propriétés pharmacologiques et sont employées dans la phytothérapie et dans l'industrie cosmétique. Se basant sur la nature de leur squelette aglycone, les saponines peuvent être classées en deux groupes, triterpènes et stéroïdes.

II.4.2 Classification des saponosides

Les saponosides sont classés en deux groupes selon la nature de leur génine qui peut être soit triterpéniques, soit stéroïdiques. Lorsque la génine est substituée par une seule chaîne osidique, les saponosides sont dits monodesmosidiques (liaison des sucres en C-3 ou en C-28 de l'aglycone) et lorsque la génine est substituée par deux chaînes osidiques, on parle de saponosides bidesmosidiques (liaison des sucres en C-3 et en C-28. Grâce à la performance des techniques chromatographiques et des techniques d'analyse, il a été mis en évidence durant ces dernières années des saponosides tridesmosidiques (trois chaînes) ou tétradesmosidiques (quatre chaînes) (**Kaipnazarov et al., 2004**).

La partie osidique de certains saponosides ainsi que les fonctions hydroxyles libres des géniens peuvent être substituées par des acides aromatiques ou aliphatiques.

II.4.2.1 Saponosides à génines stéroïdiques

Les angiospermes monocotylédones Liliaceae (Asperge, petit houx), Dioscoraceae(Discoraeae) et Agavaceae sont assez fournies en saponosides stéroïdiques (**Chawlek, 2004 ; Robinet, 2004**). La génine de ces derniers (on dénombre plus d'une centaine) est constituée d'un squelette à 27 atomes de carbone (**Malecky, 1951**). Deux principaux types de squelette existent (**Chawlek, 2004**) : pentacyclique (furostane) et

hexacyclique (spirostane). Ces saponosides ont généralement un hydroxyle en position 3. Ce dernier est le plus souvent substitué par une chaîne osidique.

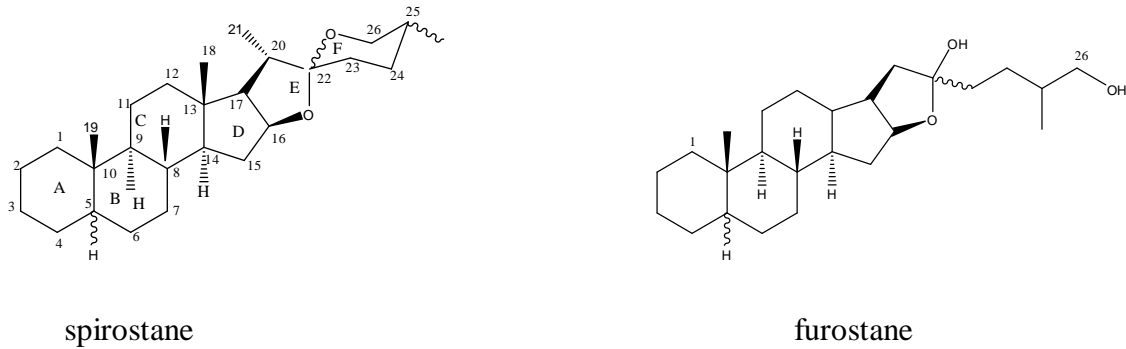
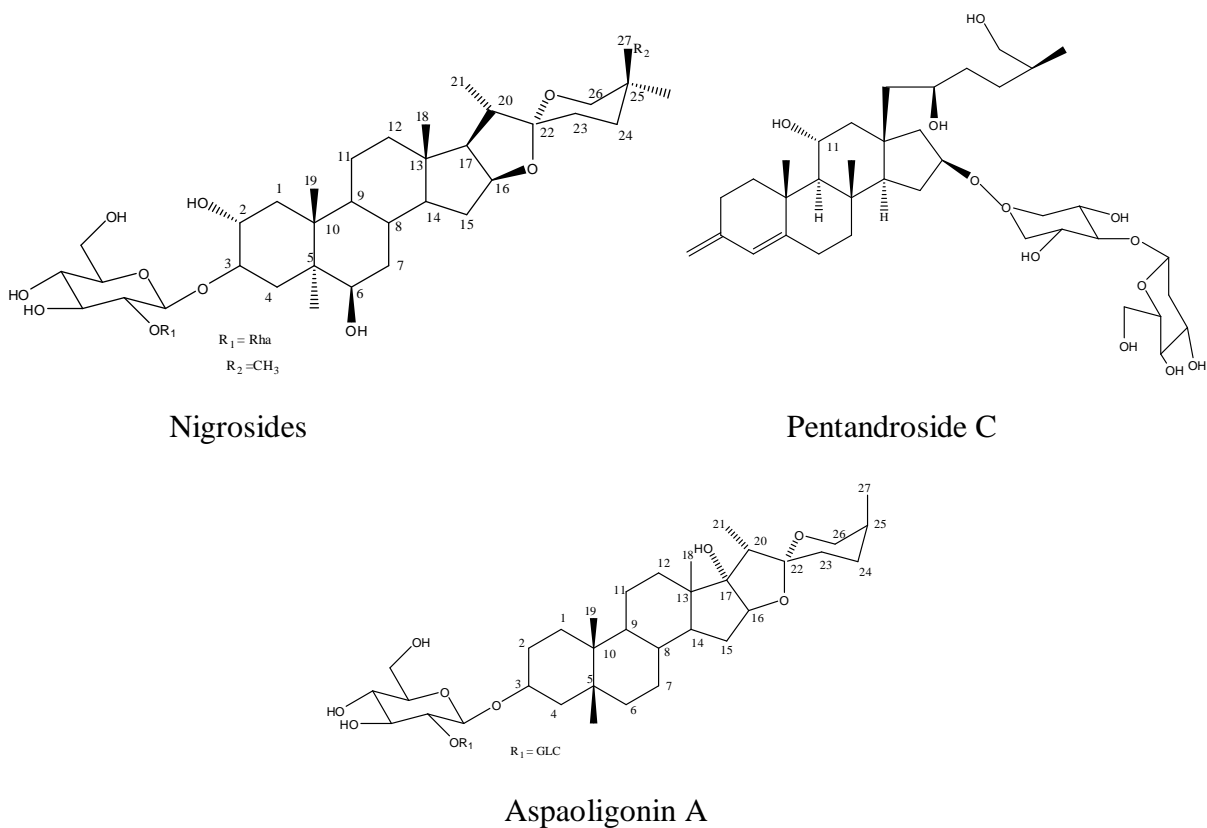


Figure 08: Principaux squelettes stéroïdiques.

D'autres hydroxyles peuvent être présents sur ce squelette, en positions 2, 6 (nigroside), 11 (pentandroside C) (**Bruneton, 1999 ; HostettmannMarston, 1995**) et 17 (aspaoligonin A) ...etc.



II.4.2.2 Saponosides à génines triterpéniques

Ils constituent la majorité des sapogénines des angiospermes dicotylédones (**Sparg *et al.*, 2004**) et possèdent un squelette de 30 atomes de carbone qui comporte habituellement cinq cycles (Figure 09.). Ce sont des dérivés du noyau oléanane, ursane, lupane, friedelane, hopane (pentacycle), ou parfois du noyau dammarane, cucurbitane, lanostane et cycloartane (tétracycle).

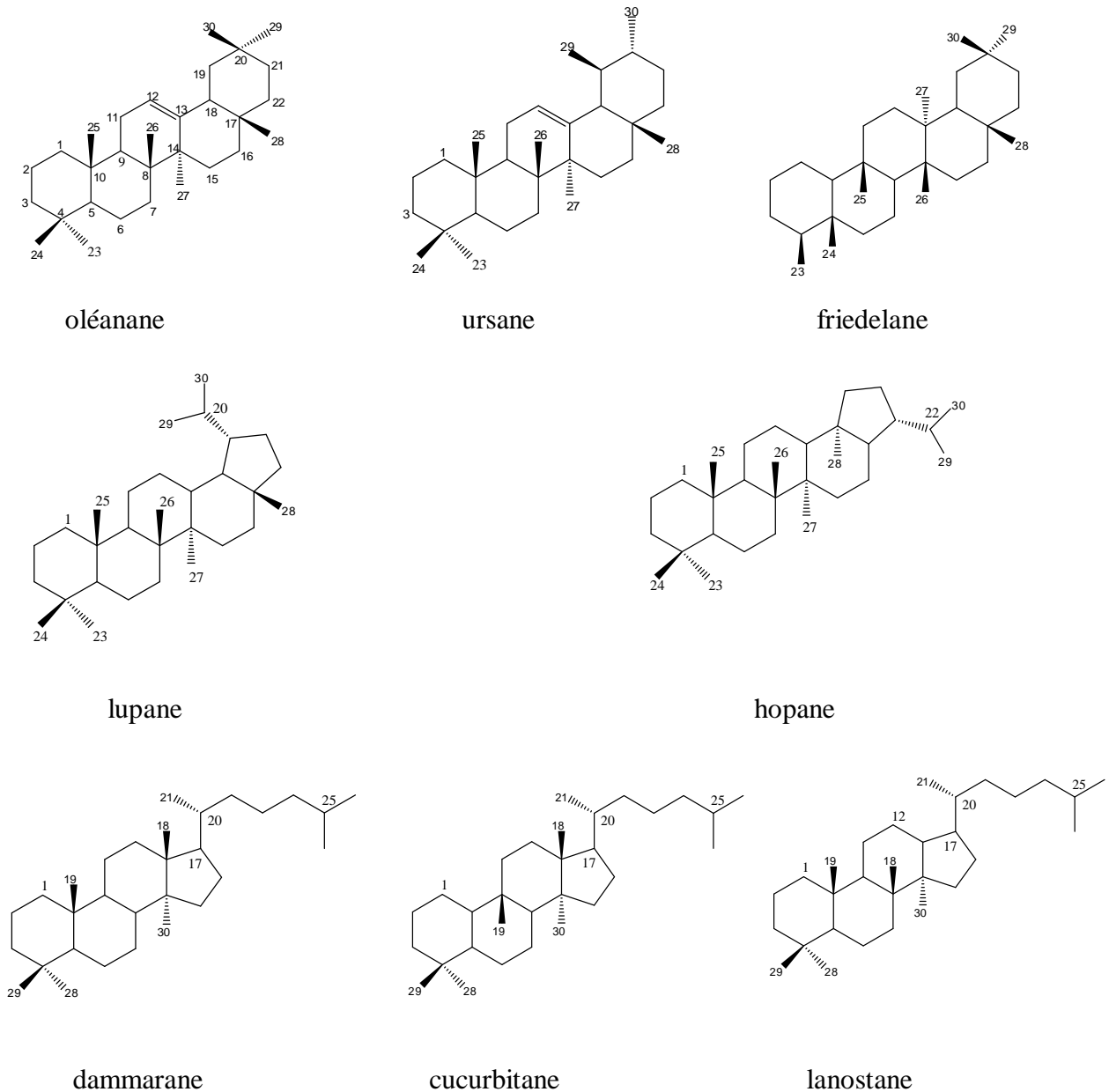


Figure 09 : Principaux squelettes triterpéniques.

II.4.2.3 Partie osidique

Les oses, constitutifs des saponines, les plus courants sont : le D-glucose, le D-galactose, le D-xylose, le D-fucose, le D-apiose, le L-arabinose, le L-rhamnose et l'acide D-glucuronique (figure 10) :

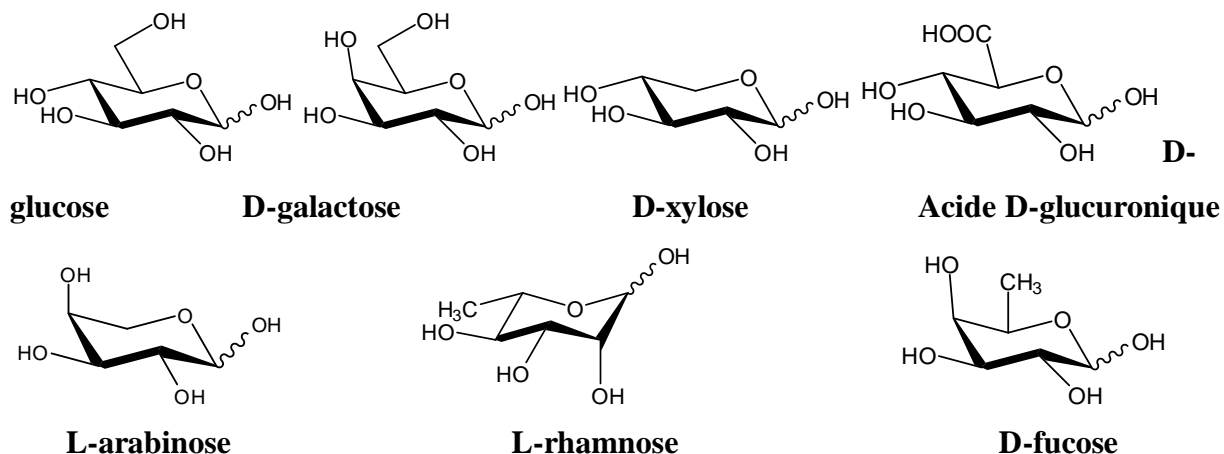


Figure 10: les différents monosaccharides rencontrés dans les saponosides.

II.4.3 Biosynthèse des triterpénoïdes

Les saponines sont produites à partir du squalène, lui-même formé par la condensation de deux unités farnésyl-pyrophosphate via la condensation d'unités isopréniques par la voie mévalonique (MVA). Dans la plupart des cas, le squalène est converti en 2,3-squalène époxyde par une enzyme appelée squalène époxydase, puis cyclisé grâce à une oxydosqualèncyclase pour donner les cations dammarényle ou prostostéryle. La figure suivante (Figure 11) montre le schéma de biosynthèse des triterpénoïdes.

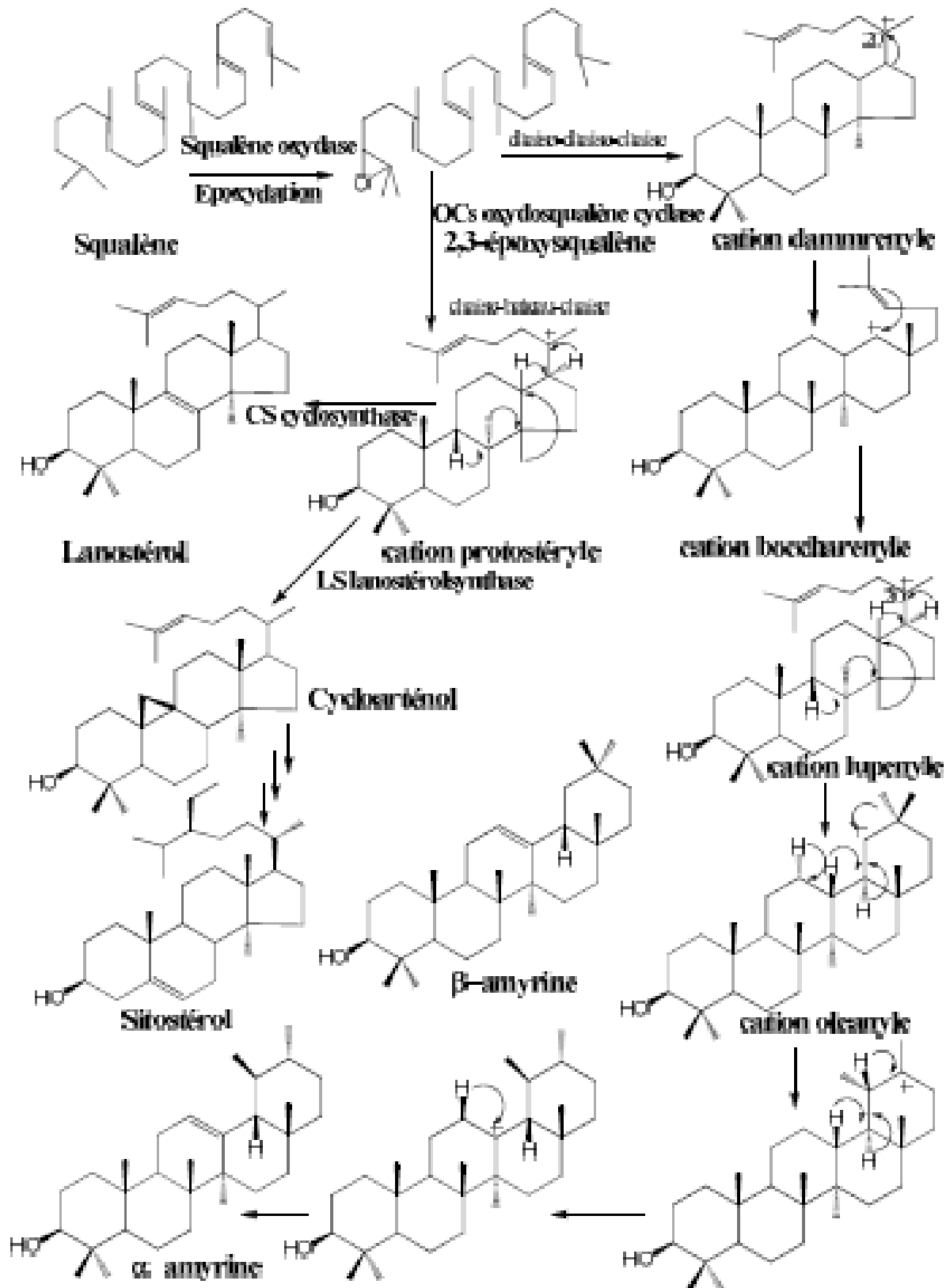


Figure 11: Schéma de biosynthèse des triterpénoïdes.

II.4.4 Propriétés biologiques des saponosides

Les saponines sont considérées comme responsables de nombreuses propriétés pharmacologiques (Sparg *et al.*, 2004). Elles formeraient les principaux constituants de plusieurs remèdes issus des plantes. Elles ont été recherchées par l'industrie pharmaceutique parce qu'elles constituent le point de départ de l'hémi-synthèse des médicaments stéroïdiens (Estrada *et al.*, 2000). Elles sont considérées comme des éléments clefs dans la pharmacopée traditionnelle chinoise et responsables de la plupart des effets biologiques observés (Liu *et al.*, 2000). Les saponines possèdent des propriétés : expectorante, anti-inflammatoire, vasoprotectrice, hypocholestérolémique, immunomodulatoire, hypoglycémique, molluscicide, antifongique, antiparasite.

➤ Activité Hémolytique

Le pouvoir des saponosides à lyser les globules rouges ou hémolytique (érythrocytes) est connu depuis très longtemps (Magid, 2005). Cette propriété peut être utilisée comme moyen de détection au sein des plantes. Cependant, en raison de la variation structurale de cette classe de métabolites secondaires, chaque saponoside n'est pas forcément hémolytique (Magid, 2005). Le phénomène d'hémolyse est expliqué par l'adsorption du saponoside sur la membrane cellulaire des érythrocytes. Cette adsorption se ferait par complexation du saponoside avec les stérols membranaires (Magid, 2005).

Le pouvoir hémolytique dépend de la nature de la génine et du nombre d'unités osidiques (Voutquenne *et al.*, 2002). La comparaison des activités des saponosides monodesmosides et bidesmosides a prouvé que les premiers cités sont généralement plus hémolytiques (Voutquenne *et al.*, 2002). De nombreuses saponines ont montré une activité cytotoxique *in vitro* envers une grande variété de lignées cellulaires cancéreuses. Les valeurs d'IC₅₀ mentionnées dans la littérature varient entre environ 4 µg/ml et 20 µg/ml en fonction de la nature de la saponine et de la lignée cellulaire.

➤ Activités molluscicide

Depuis quelques années l'activité molluscicide retient l'attention de plusieurs chercheurs vu son importance dans le domaine de l'agriculture. Les saponines triterpénoides à squelette hédéragénine isolées de *Sapindus mukorossi* Gaertn (Sapindaceae) ont des effets molluscicides contre l'escargot du pommier (*Pomacea canaliculata*) qui est devenu l'un des principaux parasites du riz et d'autres récoltes aquatiques (Huang *et al.*, 2003).

➤ **Activité immunomodulatrice**

Actuellement, de nombreux nouveaux vaccins sont en cours de développement parallèlement à l'amélioration des vaccins déjà existants en vue de diminuer le nombre d'injections ainsi que les doses injectées. Il est donc nécessaire d'effectuer des recherches en vue de découvrir de nouvelles molécules qui auront un pouvoir immunostimulant plus important que leurs prédécesseurs. Parmi ces nouvelles molécules, les saponosides semblent être promis à un bel avenir. Nous citerons ici un rappel bibliographique sur les saponosides immunostimulants découverts (**Lacaille-Dubois, 1999**).

Certains saponosides ont montré une activité immunostimulante sur divers types cellulaires. Ainsi, des auteurs ont mis en évidence le rôle immunostimulant *in vitro* des saponosides isolés de *Randia dumetorum*, qui augmente la prolifération *in vitro* de lymphocytes humains.

L'extrait brut de saponosides de *Q. saponaria*, la Quillayanine, Quil-A et l'acide glycyrrhizique ont tous montré la capacité à stimuler la prolifération des splénocytes de souris. Un effet sélectif a été mis en évidence sur les deux types cellulaires, les lymphocytes B et les lymphocytes T. Les saponosides isolés à partir des racines d'*Acanthophyllum squarrosum* ont montré un rôle immunomodulateur *in vitro* (**Lacaille-Dubois et al., 1993**) et lymphoprolifératif sur cellules leucémiques humaines (**Gaidi et al., 2000**).

➤ **Antibactérienne et antiparasitaire**

Un bon nombre de saponosides assurent la défense des végétaux contre l'attaque microbienne, il a été démontré que les trois saponines isolées de *Hedera helix* L. (Araliaceae), l'hédérine (alpha et beta) et hédéracolchiside A1, possèdent une activité antileishmaniale (**Delmas et al., 2000**). Les résultats ont montré que ces saponines présentent une forte action antiproliférative dans toutes les étapes de développement du parasite *Leishmania infantum* (**Delmas et al., 2000**).

➤ **Anti-oxydante**

L' α -hédérine, l'hédérasaponine C, l'hédéracolchisides E et F présentent une forte activité anti-oxydante (**Gulcin et al., 2004**).

➤ Activités Cytotoxique et Antitumorale

De nombreuses saponines possèdent une activité cytotoxique *in vitro* envers une grande variété de lignées cellulaires cancéreuses. Les valeurs d'IC₅₀ mentionnées dans la littérature varient entre environ 4 ng/ml à 20 µg/ml en fonction de la nature de la saponine et de la lignée cellulaire (**Lacaille-Dubois, 2000**) OSW-1 ou 3β,16β,17α-trihydroxycholest-5-en-22-one-16-O-[(2-O-(4-méthoxybenzoyl)-β-D-xylopyranosyl)-(1→3)-2-O-acétyl-α-L-arabinopyranoside] (figure 12), un cholestane acétylé isolé de *Ornithogalum saundersiae*, est l'une des saponines stéroïdiques les plus cytotoxiques connues jusqu'à ce jour. Son IC₅₀ inférieure à 1 nM en fait un agent anticancéreux environ 10 à 100 fois plus puissant que ceux actuellement utilisés en phase clinique comme le taxol, la camptothécine et la mitomycine C. Des études ont montré que les effets cytotoxiques d'OSW-1 pouvaient être causés par une induction de l'apoptose des cellules cancéreuses. De surcroît, cette saponine n'a exercé qu'une faible toxicité *in vitro* sur des lignées cellulaires saines humaines (**Deng et al., 1999**).

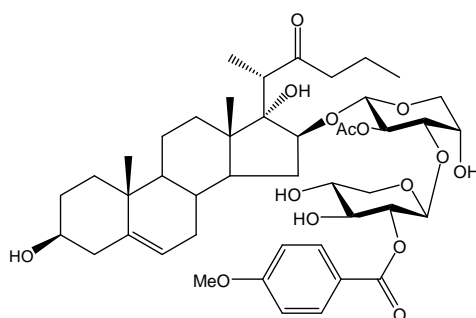


Figure 12: la structure d'OSW-1.

Une autre saponine stéroïdique, la dioscine (figure 13), a attiré l'attention des chercheurs. Cette saponine isolée d'un grand nombre de légumes et plantes de la médecine traditionnelle orientale exerce un vaste spectre d'activités biologiques (antitumorale, antivirale, antifongique et anti-inflammatoire) (**Yui et al., 2001**). La structure de la section osidique (chacotriose) de cette saponine est très particulière. Elle consiste en une section D-glucose substituée aux positions O-2' et O-4' par des sucres de type L-rhamnose. Une étude a mis en évidence que les fonctions hydroxyles aux positions 6 et 8 du L-rhamnose en H-4' représentent les groupements polaires clés responsables de l'activité antitumorale de la dioscine (**Li et al., 2003**). Le potentiel cytotoxique de la dioscine et ces dérivés s'est révélé être en lien direct avec leur capacité à diffuser à l'intérieur des cellules cancéreuses. Il est très intéressant de noter qu'aucune interaction prolongée avec la membrane lipidique n'a été montrée lors de cette étude.

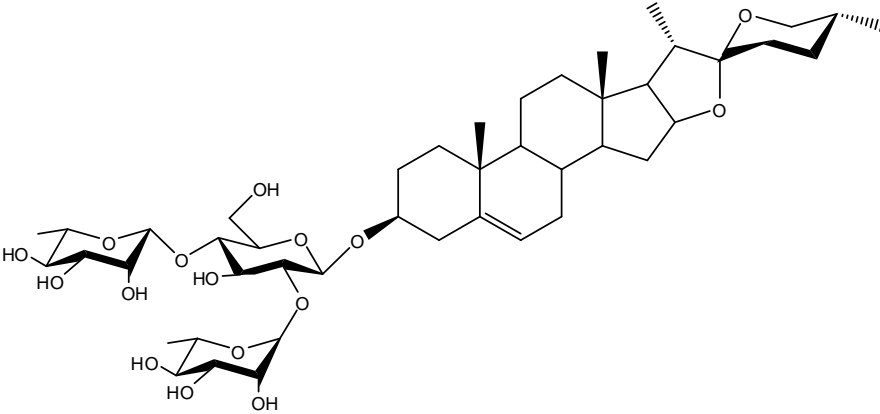


Figure 13: la structure de la dioscin.

CHAPITRE : 03

Stress Oxydant et Activité Antioxydante

III.1 Stress oxydatif

"Le stress" est un terme général qui a été d'abord employé dans un contexte biologique par l'endocrinologue Hans Selye en 1936, pour décrire la réponse physiologique inadéquate d'un organisme (**Schiavone *et al.*, 2013**). Le stress occupe une place importante dans la recherche biologique actuelle. L'intérêt considérable porté à ce domaine est justifié par les multiples implications des ROS dans diverses pathologies, comme le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives. C'est pourquoi la recherche fondamentale du stress oxydant s'efforce à déchiffrer les bases moléculaires des agressions oxydatives provoquées par les ROS, ainsi que les systèmes physiologiques de protection et de réparation des lésions d'origine oxydatives (**Enoiu, 2001**).

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles. La réduction univalente de l'oxygène résulte dans la formation d'espèces oxygénées réactives (EOR) dont font partie les radicaux libres (anion superoxyde, radical hydroxyle, le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet). Toutes ces espèces sont potentiellement toxiques pour l'organisme. En situation normale, les EOR sont produites en permanence par notre organisme (rôle physiologique) mais un système efficace de défenses antioxydantes (vitamines, enzymes, oligoéléments) permet de réguler cette production afin de prévenir tout dégât cellulaire excessif. Dans certaines conditions, une surproduction d'EOR due à l'activation de divers mécanismes biochimiques peut submerger rapidement les défenses antioxydantes : c'est le stress oxydatif. Celui-ci est de plus en plus impliqué pour expliquer les dégâts cellulaires observés dans les états inflammatoires aigus, le vieillissement, le cancer, le diabète et les maladies cardiovasculaires (**Pincemail, 1999**).



Figure 14 :La balance oxydants/anti-oxydants en équilibre (Reuter *et al.*, 2010).

III.2 Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce caractérisée par une instabilité et /ou un pouvoir oxydant fort, il se différencie par la présence d'un électron non apparié sur la couche électronique la plus externe (Favier, 2003). Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente (fission homolytique) pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'électrons à partir d'un composé non radical. Du fait de leur instabilité énergétique, les radicaux libres ont tendance à revenir immédiatement à un état stable en donnant un électron ou en prenant une à une autre molécule ils peuvent donc être réducteurs ou oxydants. En jouant le rôle d'accepteur ou donneur d'électrons, les radicaux libres ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs vis-à-vis des autres molécules, possédant un temps de demi-vie extrêmement court (de la nano- à la milli seconde) (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

III.2.1 Différents types des radicaux libres

Parmi toutes les espèces réactives oxygénées (ERO), on distingue un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appelons les radicaux primaires à savoir : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), le radical peroxyde (ROO^{\cdot}) et le radical alkoxyde (RO^{\cdot}). Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires telles que l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le nitroperoxyde ($ONOOH$), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Favier, 2003). Les plus importantes sont l'ion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle, l'hypochlorite et le peroxyde nitrite (Figure 15). L'ion superoxyde est formé spontanément ou par certaines enzymes comme les

oxydases ou les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Peroxyde d'hydrogène par l'enzyme superoxyde dismutase. Cette molécule est plus stable que l'ion superoxyde. Elle est dégradée en eau et oxygène par la catalase et la glutathion peroxydase. En présence de métaux de transition sous forme libre (fer et cuivre), elle peut donner naissance au radical hydroxyle qui est la plus réactive et donc la plus toxique des ERO (Ichai *et al.*, 2011).

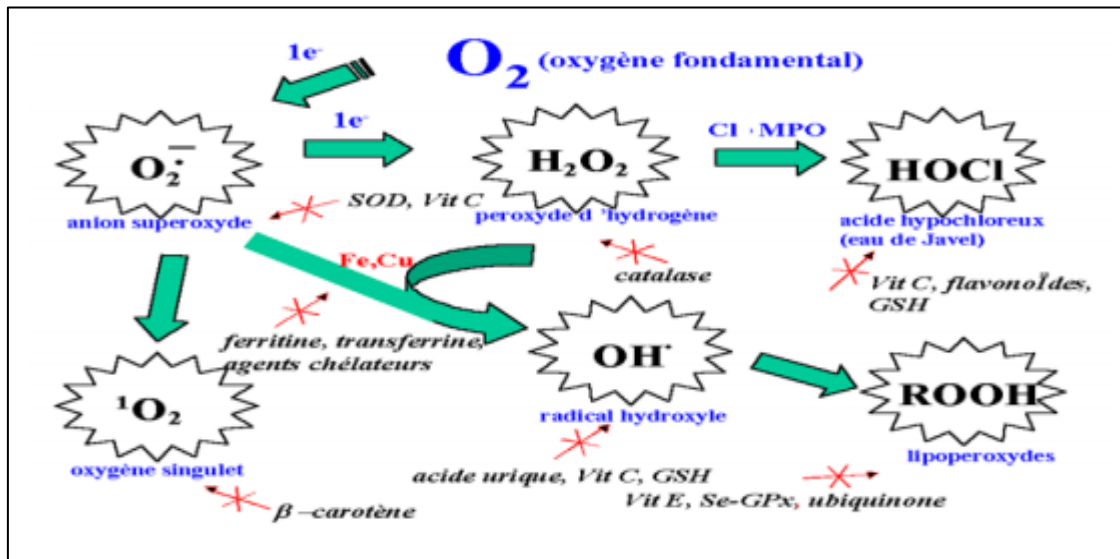


Figure 15: Aperçu des espèces oxygénées activées (EOA) dérivant de l'oxygène et systèmes de protection permettant de limiter l'effet toxique de ces espèces. GSH : glutathion, Cl^- : anion chlorure ; MPO : myéloperoxydase, SOD : superoxyde dismutase, Se-GPx : glutathion peroxydase séléno-dépendante (Pincemil, 1999).

III.3 Principales affections liées au stress oxydant

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur exprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies: cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, Parkinson, infections intestinales, rhumatisme, l'athérosclérose, le diabète (Atawodi, 2005 ; Georgetti *et al.*, 2003).

III.3.1 Athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique et multifactorielle (Varthaman *et al.*, 2008), définie par un remaniement de l'intima des grosses et moyennes artères conduisant à la formation de plaques athéromateuses (Morozova *et al.*, 2004). La théorie oxydative de l'athérosclérose décrit l'importance des ERO dans la formation de ces

plaques. En effet, les LDL (low density lipoprotein) circulantes diffusent dans la paroi vasculaire où elles vont subir des modifications oxydatives. Ces LDL oxydées perturbent alors les fonctions des cellules endothéliales, des monocytes/macrophages infiltrés et résidents et des cellules musculaires lisses (**Poli et al., 2009**). Il existe d'ailleurs une réelle relation entre l'incidence des accidents coronariens et le taux plasmatique de cholestérol-LDL. De plus, de nombreux facteurs de risque de l'athérosclérose sont des pro-oxydants, augmentant la production d'ERO par les cellules et créant ainsi un environnement oxydant dans la paroi artérielle.

III.3.2 Cancers

Le radical hydroxyle HO[•] semble être le principal responsable des dommages oxydatifs sur l'ADN. Ces espèces étant très réactives, celles-ci sont donc générées sur le site de réaction. Certaines portions de l'ADN présentent des métaux de transition (Fe, Cu) et ne sont pas protégées par les histones donc ces zones peuvent être le siège des réactions qui sont catalysées par les métaux de transition. De nombreux facteurs étant retenus comme cancérogènes agissent en produisant des espèces radicalaires. Cela peut se faire directement comme pour le tabac, après phagocytose comme l'amiante, par réaction de Fenton par des métaux carcinogènes comme le nickel, par photolyse comme les UV A et B, comme par redox-cycling lors du métabolisme comme le benzopyrène (**Favier, 2006**).

III.3.3 Diabète de type 2

Les radicaux libres sont indispensables pour certaines réactions biologiques, notamment la transduction du signal de l'insuline. Cependant, les radicaux libres peuvent être impliqués dans l'insulinorésistance.

L'insulinorésistance est une diminution de l'action de l'insuline à deux niveaux : la capture cellulaire du glucose par le muscle et le tissu adipeux et l'inhibition de la production hépatique du glucose (**Bonnard et al., 2008**).

D'autres perturbations biologiques sont observées à la suite d'un stress oxydant : baisse de la fluidité des membranes, anomalies de récepteurs, diminution de la sensibilité à l'insuline, perturbation de l'immunité cellulaire, fibrose, dépôts de lipides, affaiblissement musculaire, voire mort neuronale ou apparition de mutations. De nombreuses anomalies pathologiques sont également induites par le stress oxydant : mutations, carcinogène, malformations des

fœtus, dépôts de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôts de lipides oxydés, immunosuppression (**Favier *et al.*, 1995**).

III.4 Les antioxydants

Les antioxydants sont des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puissent réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur (**Yaacoub, 2009 ; Hellal, 2011**).

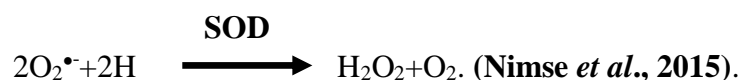
Les antioxydants existent dans les cellules vivantes, l'un ou l'autre enzymatique (le superoxyde dismutase, le glutathion peroxydase et la catalase) ou non-enzymatique (comme le glutathion et l'acide urique) comme des boueurs de ROS, pour empêcher les dégâts oxydatifs des membranes biologiques. À côté de ces antioxydants trouvés dans les cellules, les antioxydants naturels existent dans les légumes et la majeure partie d'entre eux incluant la vitamine A, la vitamine C, la vitamine E et les caroténoïdes. (**Pieme *et al.*, 2017**).

III.4.1 Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les EOR (**Garait., 2006**).

III.4.1.1 Superoxyde dismutase (SOD)

La superoxyde dismutase (SOD, EC : 1.15.1.1) (**Barry *et al.*, 1999**). Les SOD sont l'un des antioxydants les plus puissants, ils catalysent la conversion d'anions superoxydes en dioxygène et en peroxyde d'hydrogène: (**Kurutas, 2016**).



La SOD existe sous trois iso formes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme

extracellulaire (EC-SOD). Il a été montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace inter membranaire (Okado et Fridovich, 2001).

III.4.1.2 La glutathion peroxydase (GPX)

La glutathion peroxydase est une enzyme (EC 1.11.1.9) (Chaudiere, 1983). C'est une enzyme ubiquitaire. Dans la cellule, on la trouve essentiellement dans le cytosol et les mitochondries. C'est une des défenses antioxydantes les plus importantes de l'organisme (Ichai et al, 2011). La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H₂O₂ en H₂O et O₂⁻. Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG).

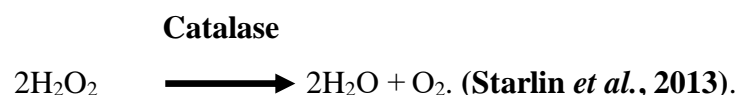


Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipidehydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique (Mates et al., 1999). La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction (Nomura et al., 2000).

III.4.1.3 La Catalase

La catalase est une enzyme (EC 1.11.1.6) (Chelikani et al., 2004). Les catalases sont localisées dans les peroxysomes et sa cible principale est le H₂O₂. Cette place est stratégique puisque c'est ici que des enzymes comme les flavines, l'urate oxydase, la glucose oxydase et les D-amino-oxydases produisent des radicaux libres H₂O₂ (Lehucher et al., 2001).

La catalase est également responsable de l'élimination d'H₂O₂ par une transformation en H₂O et O₂⁻.



Contrairement à la GPx, l'affinité de la catalase pour l'H₂O₂ est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues. (Mates et al., 1999).

Il existe de nombreuses autres enzymes antioxydantes comme les peroxyredoxines, l'hème oxygénase, le glutathion transférase, les thiorédoxines réductases ou les thiorédoxines peroxydases. La plupart de ces enzymes, de même que les enzymes de réparation des dommages oxydants, vont utiliser un donneur d'équivalent réducteur, le NADPH, qui constitue avec le glutathion les plaques tournantes de la défense antioxydante (Favier, 2003).

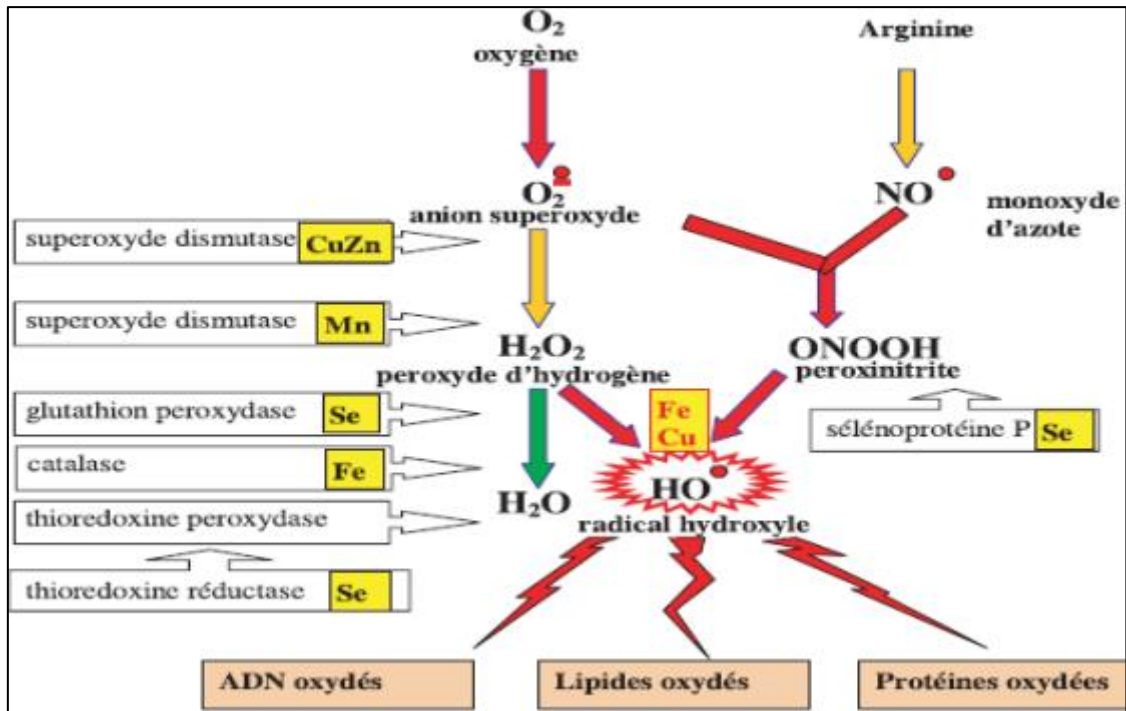


Figure 16 : Moded'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants (Favier, 2003).

III.4.2 Les antioxydants non enzymatiques

III.4.2.1 Systèmes antioxydants endogènes

Les systèmes antioxydants non-enzymatiques endogènes incluent de nombreux thiols dont le majoritaire est le glutathion, largement présent sous forme réduite, qui est capable de réagir, in vitro, avec les radicaux HO^\bullet , RO_2^\bullet , RO^\bullet , $^1\text{O}_2$, ONOO^\bullet , des radicaux centrés sur le carbone, mais aussi l'acide hypochloreux HOCl (Selvaraj *et al.*, 2006).

III.4.2.1.1 Le Glutathion (GSH)

Le glutathion est un tripeptide composé de cystéine, glutamine et glycine. C'est la plus importante des défenses antioxydantes en quantité et probablement en qualité. Il possède une activité antioxydante propre mais surtout en tant que cofacteur de la glutathion peroxydase.

Une fois oxydé en glutathion disulfure, il est réduit par la glutathion réductase en présence de NADPH. Le couple glutathion disulfure/glutathion est le principal responsable thiol de la balance redox intracellulaire (**Ichai *et al.*, 2011**). Il peut réagir chimiquement avec $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, H_2O_2 et, donc peut fonctionner directement comme un boueur de radical libre (**Sharma *et al.*, 2012**), en se liant à des métaux comme le fer et le cuivre, il permet de les désactiver d'un point de vue catalytique, et possède la capacité de régénérer certains antioxydants endogènes et exogènes (**Panfili *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004**).

Dans la cellule, environ 90% du glutathion est situé dans le cytosol, 10% dans les mitochondries et un petit pourcentage dans le réticulum endoplasmique. Environ 85% de glutathion cellulaire total est libre et non lié tandis que le reste est lié aux protéines. (**Main *et al.*, 2012**).

III.4.2.2 Systèmes antioxydants exogènes

Les antioxydants chimiques exogènes comprennent majoritairement les vitamines C et E, les caroténoïdes et des composés phénoliques (**McCall et Frei, 1999**).

III.4.2.2.1 Les vitamines

➤ La vitamine C (acide ascorbique)

La vitamine C ou acide ascorbique est une molécule hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes (non synthétisée par l'Homme). Elle est connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire (**Retsky *et al.*, 1999**). Elle est connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire. Son caractère antioxydant provient de sa forme ionisée abondante ($AscH^-$) qui peut aisément réagir avec des radicaux et produire le radical ascorbate tricarbonyle ($AscH^{\bullet}$), stabilisé par résonance. Du fait de son très faible pK, la forme non protonée radicalaire faiblement réactive est privilégiée ($Asc^{\bullet-}$), (**Valko *et al.*, 2006**).

Paradoxalement, les études in vivo de la supplémentation en vitamine C montrent, pour la plupart, une réduction de l'oxydation de l'ADN, des protéines et de la lipoperoxydation, alors que certains auteurs relatent l'effet prooxydant in vitro de cette molécule dans des milieux tamponnés contenant du fer en accélérant la réaction de Fenton (**Valko *et al.*, 2006**).

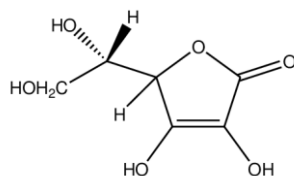


Figure 17 :acide ascorbique.

➤ La vitamine E (α -tocophérol)

La vitamine E est la molécule antioxydante liposoluble la plus abondante de notre organisme. Elle est présente dans les membranes cellulaires et circule dans le sang liée aux lipoprotéines. Elle est chargée de neutraliser les radicaux libres en excès, et agit de deux façons différentes, soit en piégeant directement les ROS, soit en régulant à la hausse les enzymes antioxydantes, telles que la SOD, la glutathion peroxydase, la catalase du foie, la glutathion-transférase et la NAD(P) H réductase (Vertuani *et al.*, 2004).

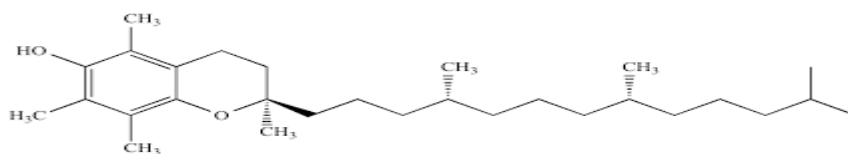


Figure 18: Structures chimiques des tocophérols.

Elle joue un rôle protecteur des structures membranaires et des lipoprotéines. Elle prévient l'apparition d'hydroperoxydes (Yoshida *et al.*, 1999 ; Kaiser *et al.*, 1990). L' α -tocophérol est le principal antioxydant contenu dans les LDL. Chaque particule de LDL contient en moyenne de 6 à 12 molécules de vitamine E (Halliwell *et al.*, 1995). La vitamine E interrompt la chaîne de propagation radicalaire dans les membranes en limitant la peroxydation des acides gras polyinsaturés (Burton *et al.*, 1982). En effet, la cinétique de cette étape de propagation étant lente (Sahnoun *et al.*, 1997) la vitamine E peut l'arrêter, en réparant le radical peroxy ($AGPIOO^{\bullet}$) par la formation d'hydroperoxyde ($AGPI-OOH$).

De plus, il faut noter que la vitamine C associée à la vitamine E régénère la forme réduite de l' α -tocophérol par une réaction de transfert d'hydrogène (Dreher et Junod, 1996).

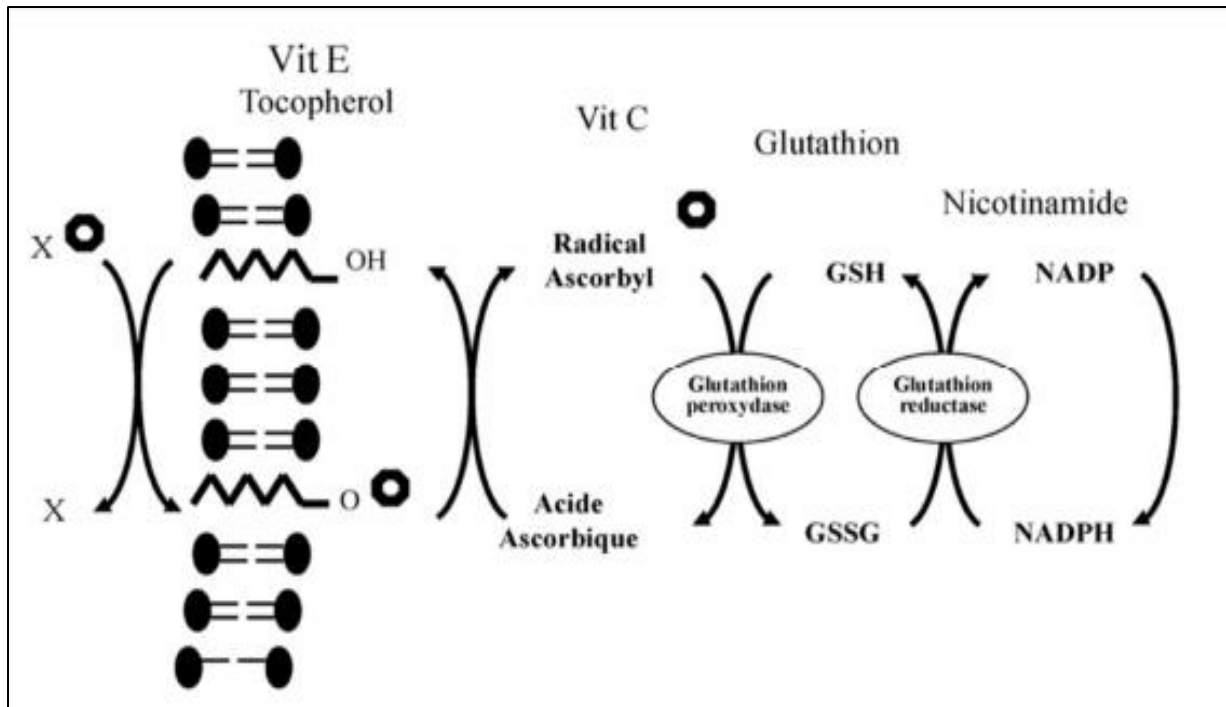


Figure 19: Réactions d'élimination des radicaux lipidiques par les vitamines E, C et Glutathion (Leverse, 2009).

III.4.2.2.2 Les oligo-éléments

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes anti oxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action pro oxydante (réaction de Fenton, d'Haber-Weiss) (Ji *et al.*, 1999).

III.4.2.2.3 Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments issus des plantes et microorganismes, et sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles. On en dénombre environ 600 présents dans la nature (Léger, 2006). Leur rôle protecteur dans les systèmes biologiques implique la désactivation d'espèces électroniquement activées telles $l'O_2$ et la désactivation d'espèces chimiques réactives telles les radicaux peroxydes (ROO^{\cdot}) et alkyles (R^{\cdot}), qui peuvent être générés à l'intérieur des cellules et occasionner des dommages oxydatifs (Rousselet *al.*, 2005) par simple addition électrophile et transfert d'électron. Ils permettent, en

particulier, de neutraliser l'oxygène singulet (Valko *et al.*, 2006). Ils protègent également contre les réactions de photosensibilisation. Ils ont en effet la capacité de neutraliser par un procédé de transfert d'énergie des espèces qui se trouvent dans un état excité (Rousselet *et al.*, 2005).

III.4.2.2.4 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques, et en particulier les flavonoïdes, sont des métabolites secondaires des plantes caractérisés par une structure commune de type 2-phénylbenzopyrane. Leur capacité antioxydante réside dans leur faculté à « terminer » les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons, et à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique (Leopoldini *et al.*, 2011).

- **Les flavonoïdes:** Les relations structure activités antioxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité antioxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation (Igor, 2002).
- **Les tanins :** ce sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (Cavin, 1999).
- **Les coumarines :** les coumarines sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Les conditions structurales requises pour l'activité antiperoxydante des coumarines sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes (Igor, 2002).
- **Les phénols :** Parmi les dérivés phénoliques, le resvératrol est le composé qui est le plus étudié. En effet, ce stilbène, isolé du raisin possède de fortes propriétés antioxydantes (Igor, 2002).
- **Les xanthones :** La manguiférine est une xanthone qui possède la propriété d'inhibition envers la peroxydation des lipides, ainsi que des propriétés de capteurs de radicaux libres contre les anions super oxydes (Diallo, 2005).

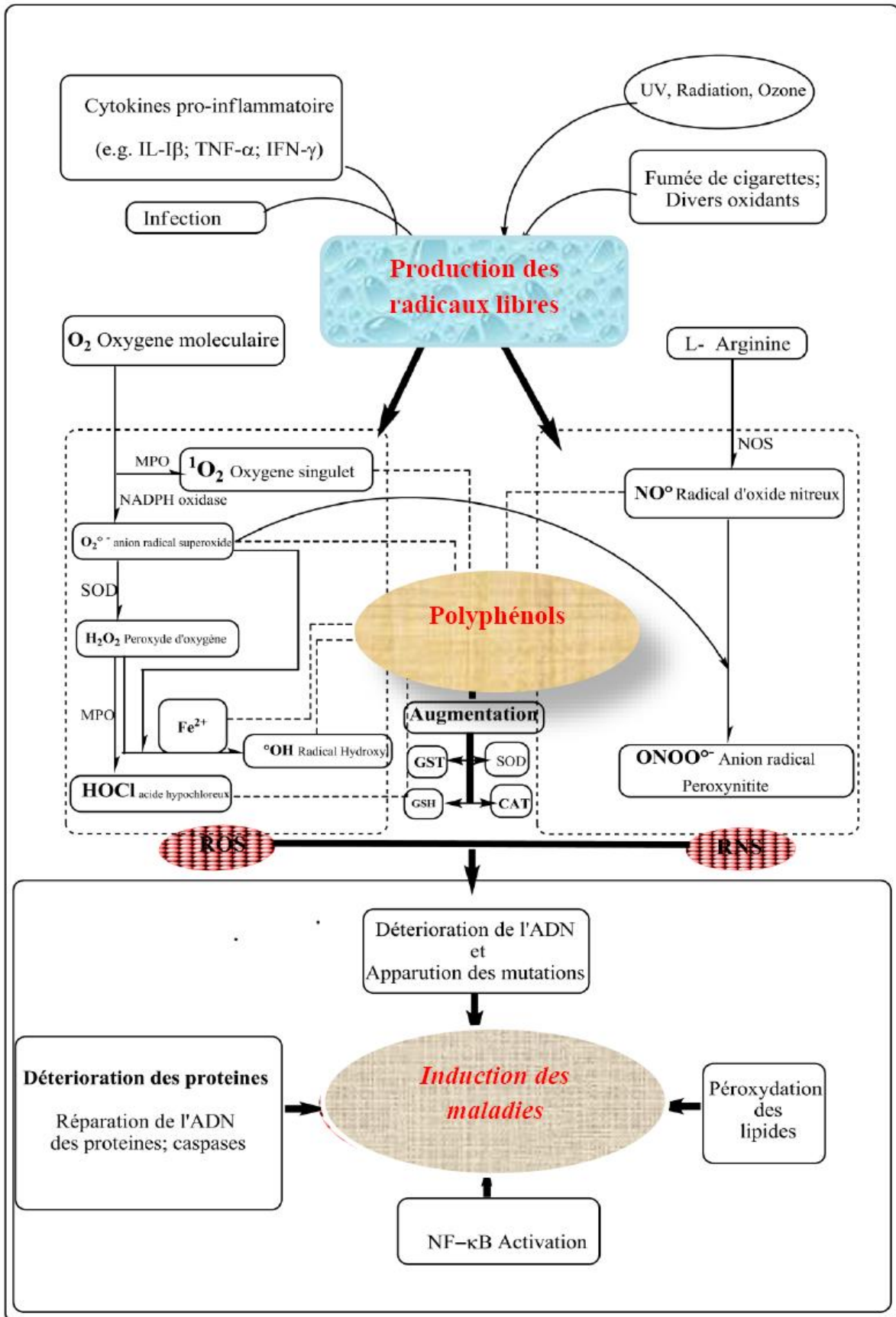


Figure 20 : Métabolites secondaires et prévention des certaines maladies.

III.5 Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante

Certaines méthodes pratiques ont été développées pour une quantification rapide, simple et fiable de la capacité antioxydante *in vitro* et *in vivo*. En général, les méthodes pour déterminer la capacité antioxydante totale ont été divisées en deux groupes principaux : les tests basés sur une réaction de transfert d'un seul électron et les tests basés sur un transfert d'atome d'hydrogène (Huang *et al.*, 2005 ; Prior *et al.*, 2005).

III.5.1 Test du 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)

Le teste de DPPH est le plus ancien des tests indirecte pour détermination de l'activité antioxydante. Le DPPH a été suggéré la première fois en 1950 comme un produit naturel donneur de proton Plus tard. (Roginsky et Lissi, 2005).

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH.) est un radical stable et de couleur violette en solution, il fut l'un des premiers radicaux libres utilisés dans l'étude visant à déterminer la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Blois, 1958). La stabilité de ce radical résulte de la délocalisation importante de l'électron célibataire sur la totalité de la molécule empêchant ainsi la dimérisation de se produire comme c'est souvent le cas pour les autres radicaux. D'autre part, cette délocalisation est à l'origine de la coloration violette en solution éthanolique ou méthanolique caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à 517 nm.

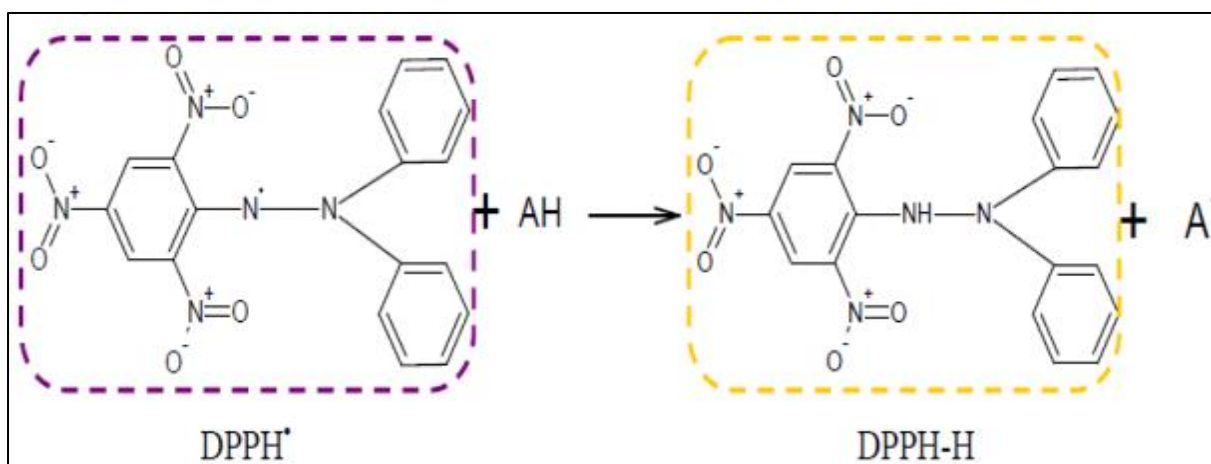


Figure 21: Mécanisme réactionnel entre l'espèce radicalaire DPPH[•] et un antioxydant (AH) (Thomas, 2011).

III.5.2 Test de l'activité antiradicalaire pour le radical ABTS^{•+}

L'ABTS^{•+} est un radical libre stable. Il est très utilisé pour évaluer le pouvoir antioxydant des fluides biologiques, des huiles essentielles, des extraits ou bien des composés purs (Rice-Evans *et al.*, 1995).

La méthode de piégeage du radical ABTS est basée sur la neutralisation d'un radical-cation (ABTS^{•+}) résultant de l'oxydation du chromophore synthétique l'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). Cette réaction est suivie par spectrophotométrie à 734 nm (Re *et al.*, 1999).

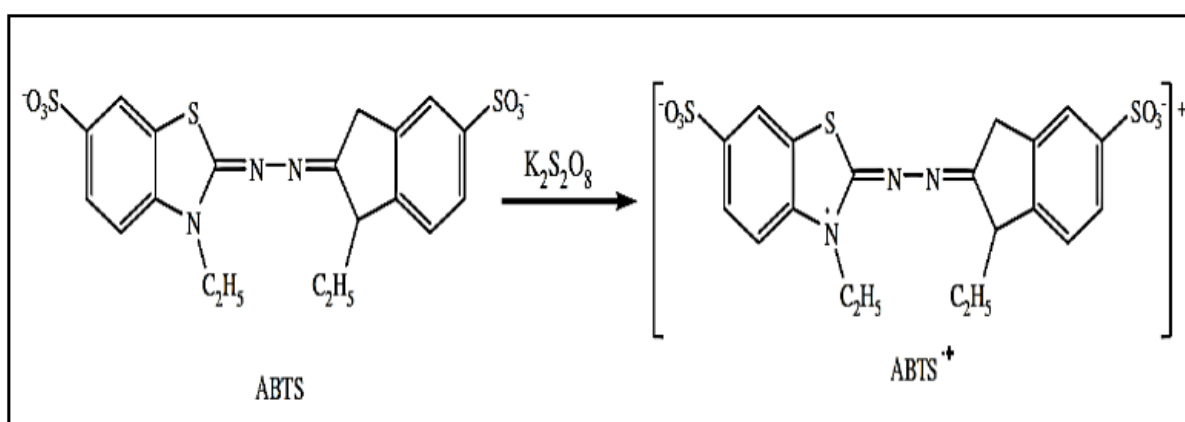


Figure 22: oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de ABTS^{•+} (Gülçin, 2012).

III.5.3 Test de Blanchissement de la Béta-carotène

Le potentiel antioxydant d'un extrait végétal peut être évalué par la détermination de la capacité d'inhibition de l'oxydation du β-carotène. Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique produit des radicaux peroxydes qui attaquent les onze doubles liaisons du β-carotène, ce qui entraîne une décoloration de cette dernière mesurée spectrophotométriquement à 470 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchiment du β-carotène (Kubola et Siriamornpun, 2008).

III.5.4 Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

La méthode CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) est basée sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue du complexe néocuproéne (NC), cuivre (Cu⁺²) Nc₂-

Cu^{2+} . En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre-néocuproéne est réduit et cette réaction est quantifiée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm (Apak *et al.*, 2004). Le principe de ce test se base sur la conversion des hydroxyles phénoliques en quinones à travers la réduction du complexe Cu^{2+} -Nc, produisant ainsi un complexe chromogène de Cu^{+} -Nc qui absorbe à 450 nm (Figure 23).

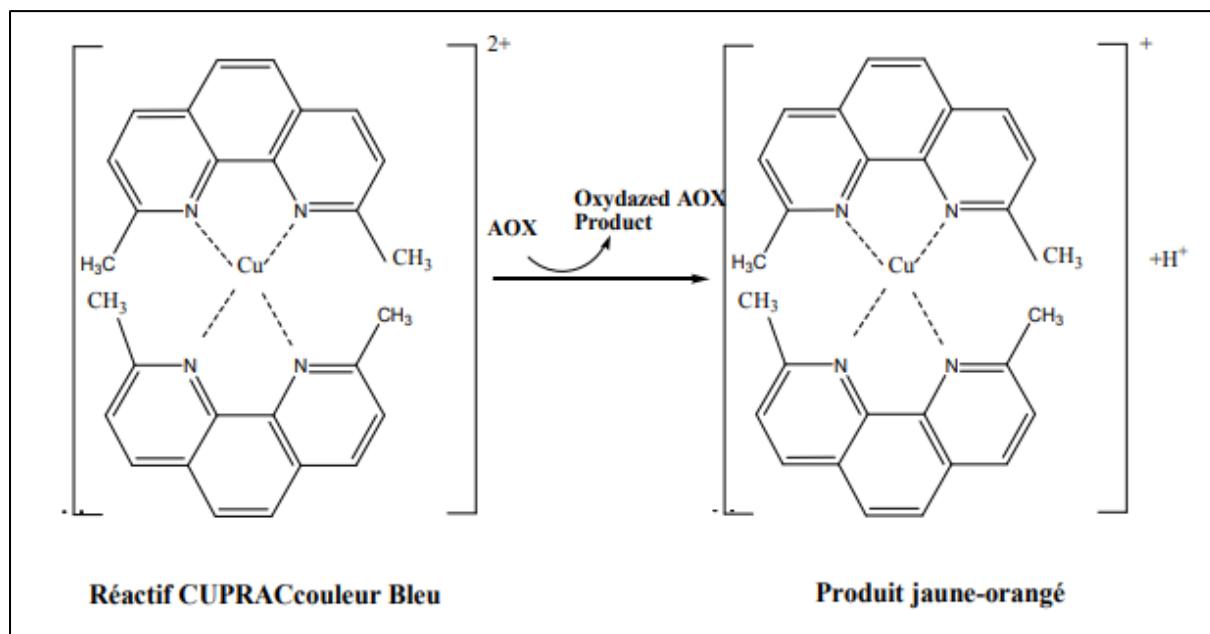


Figure 23 : Réaction de CUPRAC par une molécule antioxydante.

CHAPITRE : 04

Matériels et Méthodes

IV.1 Aperçu et but de travail

Après une recherche bibliographique exhaustive notre espèce du genre *Hedera* n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique ni biologique, antérieure. Ce présent travail a pour but de rechercher de nouvelles molécules et de mettre en évidence les activités biologiques présentes dans cette espèce en vue de valoriser la richesse végétale de l'Algérie en plantes médicinales endémiques.

Après l'extraction des parties aériennes, l'extrait brut de *Hedera* a été fractionné en utilisant la technique de Chromatographie Liquide sous Vides sur phase inverse (VLC).

Notre étude a porté aussi sur le dépistage de l'activité antioxydante par 2 méthodes (DPPH^{*}, et CUPRAC) de l'extrait brut méthanolique ainsi que une fraction chromatographique provenant de cet extrait.

IV.2 Matériel et méthode

IV.2.1 Matériel végétale

IV.2.1.1 Récolte de la plante du genre *Hedera*

Les parties aériennes de la plante du genre *Hedera* ont été récoltées dans la région de Château d'anglais au Nord-Est de la wilaya d'Annaba au mois de Juin 2019. L'identification botanique de la plante étudiée a été réalisée par Monsieur KABOUCHE Kamel.

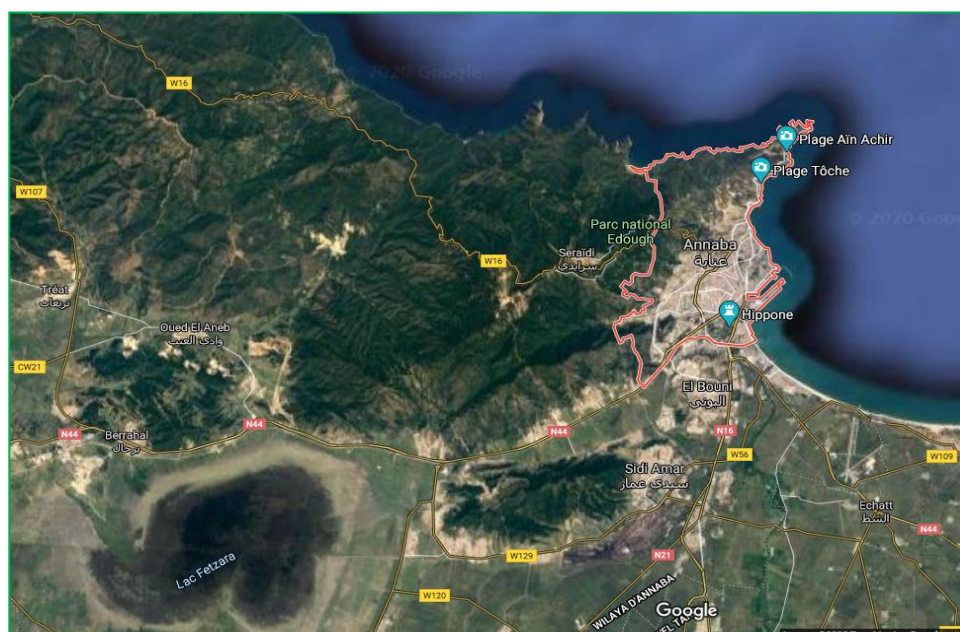


Figure 24 : Wilaya d'Annaba (Google Earth; 2020) [1].

IV.2.2 Matériel Chromatographique

IV.2.2.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM), est une méthode d'analyse qui permet d'avoir des informations sur la composition chimique et la pureté des fractions analysées.

Des plaques de silice prêtes à l'emploi ont été employées :

Plaque de silice en phase normale (SiO_2) sur support aluminium (Silice 60 F254, Merck) (20x20 cm).

Des systèmes de solvants ont été utilisés pour faire éluer les extraits, fractions et composés sur les plaques CCM, soit des systèmes binaire ou tertiaire solvants selon le type des produits et leurs polarités.

Les systèmes utilisés sont :

CHCl_3 : MeOH: H_2O : 70: 30: 5

CHCl_3 : MeOH: 80: 20

AcOEt: MeOH: H_2O : 100:10: 10.

L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm), avant la révélation par un révélateur à base de la vanilline sulfurique (1 g de la vanilline, dissous dans 100 mL de l'éthanol additionnée 2 mL d'acide sulfurique).

IV.2.2.2 Chromatographie liquide sous vide (VLC)

La chromatographie liquide sous vide (VLC : Vacuum Liquid Chromatography) est une technique de fractionnement majeure et rapide. D'habitude elle est préconisée pour fractionner grossièrement les extraits. On utilise dans cette technique un entonnoir en verre contenant un disque fritté (porosité $\text{N}^\circ 4$), une fiole à vide afin de récupérer les fractions et une pompe ou une trompe à eau pour créer le vide L'entonnoir est rempli avec le gel de silice en phase inverse (RP-18 43-60 μm , Merck). La silice est éluee avec un système de solvants polaire H_2O : MeOH (70 : 20 à 0 : 100).

IV.2.3 Méthode physico-chimique

IV.2.3.1 Spectrophotométrie UV visible

Les spectres UV-visible des composés isolés sont enregistrés dans le MeOH sur un spectrophotomètre (NICOLET évolution 100). Grâce à son monochromateur, le lecteur offre une grande sensibilité aux essais.

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, un lecteur de microplaque de type Perkin Elmer (EnSpire Alpha Plate Reader) multimode, des microplaques en plastique de 96 puits et des micropipettes réglables ont été utilisés au cours de l'exploration de l'activité antioxydante.

IV.3 Etude phytochimique de la plante du genre *Hedera*

IV.3.1 Extraction par macération à froid

Les parties aériennes et racines de la plante (1000 g) sont séchées et broyées finement puis mises à macérer dans un mélange (MeOH/H₂O:80/20). Cette macération est répétée 4 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas 48 heures. Après filtration et concentration à sec à température de 45 °C, La solution extractive obtenue est concentrée par évaporation pour donner 150 g d'extrait brut. Le protocole suivi figure dans les photos ci-dessous (Figure25 ; 26).



Figure 25: Etapes de macération et de filtration des parties aériennes de la plante du genre *Hedera*.



Figure 26: Procédé de concentration des filtrats hydroalcooliques.

- **Fractionnement de l'extrait méthanolique brut de la plante du Genre *Hedera* :**

12 g de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Hedera* ont été fractionnés par VLC en phase inverse C₁₈ avec l'éluant H₂O-MeOH (70/30, 60/40, 40/60, 20/80, 0/100 : v/v). Des fractions de 200 ml (*3) sont recueillies pour chaque mélange.



Figure 27: Fractionnement de l'extrait brut par VLC.

Ces fractions subissent une chromatographie sur couche mince (CCM) avec plusieurs systèmes. Les chromatogrammes obtenus sont visualisés sous la lumière UV à 254 nm puis révélées à la vanilline sulfurique à 1% puis chauffées à 100 °C.

IV.4 Mise en évidence des polyphénols

L'estimation de la teneur en composés phénoliques totaux a été réalisée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu décrite dans la littérature (**singleton et al.,1999**). Cette méthode est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO_4^{2-}) phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) de réactif de Folin par les groupement oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (**Georgé et al., 2005**).

Brièvement, 125µl de l'échantillon est mélangée avec 500 µl d'eau distillée et 125µl de réactif de Folin-Ciocalteu. Après une agitation du mélange suivie d'un repos de 3 minutes on rajoute 125µl d'une solution de carbonate de sodium à 2 %. Enfin le mélange obtenu est ajusté par de l'eau distillée à 3 ml. 3 ml du réactif de Folin-Ciocalteu à 1 N sont additionnés; après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la lecture des densités optiques (DO) est faite à 760 nm contre un blanc.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions expérimentales en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à concentrations finales allant de de 50 à 500 µg/ml. La teneur des composés phénoliques est exprimée en équivalents de mg d'acide gallique (EAG) /g de plante sèche. Tous les essais sont reproduits au moins trois fois (**Kim et al., 2003**).

IV.5 Evaluation de l'activité antioxydante de l'espèce du genre *Hedera*

A travers notre étude bibliographique, il apparaît clairement qu'une seule méthode ne suffit pas ni pour caractériser les propensions antioxydantes *in vitro* et *in vivo*, ni ne peut donner une prévision complète de l'efficacité antioxydante. L'utilisation de plus d'une méthode est donc nécessaire et nous avons choisi le test du CUPRAC et du DPPH pour leur facilité de mise en œuvre pour évaluer l'activité antioxydante de notre extrait brut et la fraction 60/40 de la VLC, ceci nous permettra de mieux généraliser les résultats.

Les résultats, sauf pour le dosage CUPRAC, ont été enregistrés à la concentration 50% d'inhibition (IC_{50}). L'activité antioxydante de l'extrait et la fraction 60/40 de la VLC, a été comparée à celle de standard le BHA.

IV.5.1 Test de piégeage du radical 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)

Le test chimique que nous avons utilisé pour déceler la présence de composés antioxydants dans l'extrait brut et la fraction 60/40 de la VLC, repose sur le principe de la réduction des radicaux libres fournis par le 1, 1'-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) (Takao *et al.*, 1994).

Le développement des plaques CCM a été réalisé dans des systèmes de solvants différents. Après migration, les chromatogrammes ont été séchés et pulvérisés avec une solution méthanolique de DPPH. En présence de substances antioxydantes, le DPPH est réduit et passe de la couleur pourpre (violette sombre) au jaune. Sur les plaques CCM, les zones d'activités anti-radicalaires apparaissent en jaune clair sur fond violet après un temps de 30 min.

➤ Dosage de l'activité anti radicalaire par le test DPPH

Le pouvoir antioxydant de nos extrait à été testé par la méthode de blois (Zhu *et al.*, 2002). Méthode au DPPH (Blois, 1958). Avec quelque modification ce radical libre stable (Figure 28) possède une coloration violette foncée, lorsqu'il est réduit, la coloration devient jaune pale (Öztürket *et al.*, 2011).

Ainsi, 40 µl de chaque échantillon à des concentrations décroissantes, y compris le BHA, ont été additionnés à 160 µl d'une solution méthanolique de DPPH (0,1mM) préalablement déposée dans chacun des puits d'une microplaque. Un témoin négatif est préparé en parallèle en remplaçant les 40 µl d'échantillon par du méthanol. Après une incubation de 30 min à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesuré à 517 nm. Les tests sont pratiqués en triplicata.

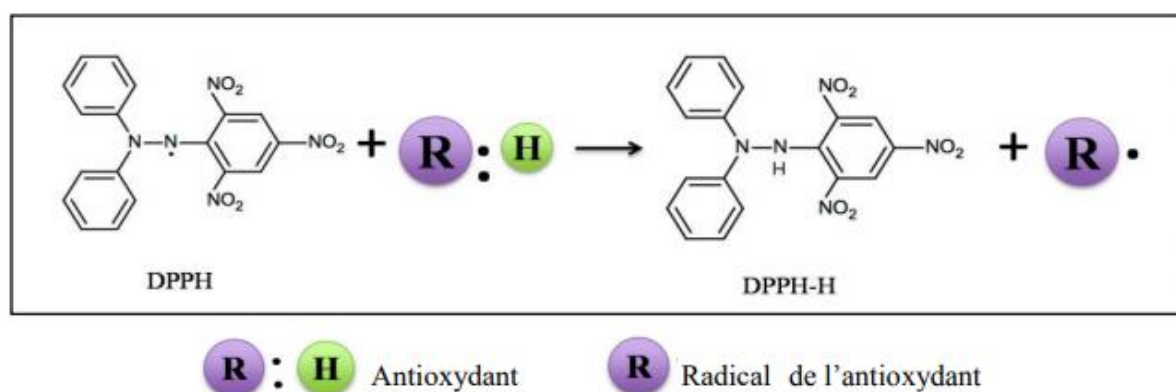


Figure 28: Mécanisme de la réaction de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) avec un antioxydant.

Le pourcentage de l'activité antiradicalaire de DPPH a été calculé comme suit :

$$\text{APR (\%)} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Extrait}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

Où A_{DPPH} est l'absorbance de la solution DPPH, et A_{Extrait} est l'absorbance de l'échantillon à une concentration donnée.

IV.5.2 Test de la capacité antioxydante par réduction de l'ion cuprique (CUPRAC)

La capacité antioxydante réductrice du cuivre est basée sur la réduction du Cu (II) en Cu (I) en présence d'un antioxydant, où l'absorbance est enregistrée à la longueur d'onde maximale de 450 nm (Apak *et al.*, 2004)..

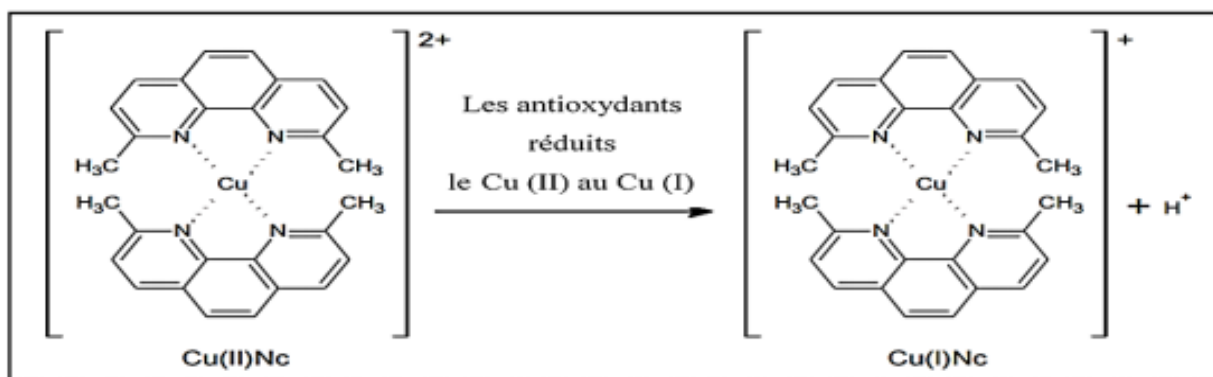


Figure 29:Réduction du complexe néocuproïne / cuivre (II) (Özyürek *et al.*, 2011).

Brièvement, dans les plaques de 96 unités, des solutions ont été ajoutées : 50 μl de Cu(II) (10 mM), 50 μl de néocuproïne (7.5 mM), 60 μl de tampon NH_4Ac (1 M, $\text{pH} = 7$), et 40 μl de l'extrait à différentes concentrations. Après une heure du temps et à l'aide d'un lecteur de microplaques, l'absorbance a été enregistrée à 450 nm. Les résultats ont été calculés à titre de $A_{0.5}$ ($\mu\text{g}/\text{ml}$) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

CHAPITRE : 05

Résultats et Discussion

V.1 Rendement d'extrait brut

Le rendement d'extraction correspond au pourcentage des principes actifs dissouts dans un solvant organique et/ou aqueux utilisé pour l'extraction. Il est déterminé à partir du poids de l'extrait sec par rapport au poids de la matière végétale sèche réduit en poudre (**Abe *et al.*, 2010**).

Le rendement est exprimé en pourcentage massique par rapport à la quantité de matière sèche selon la formule:

$$R (\%) = [M1/ M0] \times 100$$

R % : Rendement en extraits exprimée en g /100g de matière sèche.

M1 : quantité de l'extrait récupérée exprimée en g.

M0 : quantité de la poudre végétale utilisée pour l'extraction exprimée en g.

Le processus de macération nous a permis d'extraire à partir de 640 g(M0) des parties aériennes (feuilles) de la plante du genre *Hedera* une masse (M1) de 150 g de couleur vert foncée très visqueuse qui donne un rendement à l'ordre de **23.43%**.

En général, le calcul des rendements permet d'apprécier les extraits totaux qu'on peut tirer de chaque espèce. Ces rendements permettent également d'envisager la quantité d'organes à prélever en cas de besoin pour une éventuelle étude ultérieure, ce qui, rendrait l'utilisation rationnelle.

V.2 Fractionnement de l'extrait méthanolique

Un premier fractionnement de l'extrait méthanolique (12 g) a été réalisé par l'utilisation de la chromatographie liquide sous vide (VLC) sur silice greffée C₁₈, avec le mélange H₂O/MeOH (70/30,60/40, 40/60, 20/80, 0/100).

Chaque fraction a été analysée par chromatographie sur couche mince (CCM) (figures 30 ; 31 ; 32) afin d'avoir une idée sur la richesse de chaque fraction.

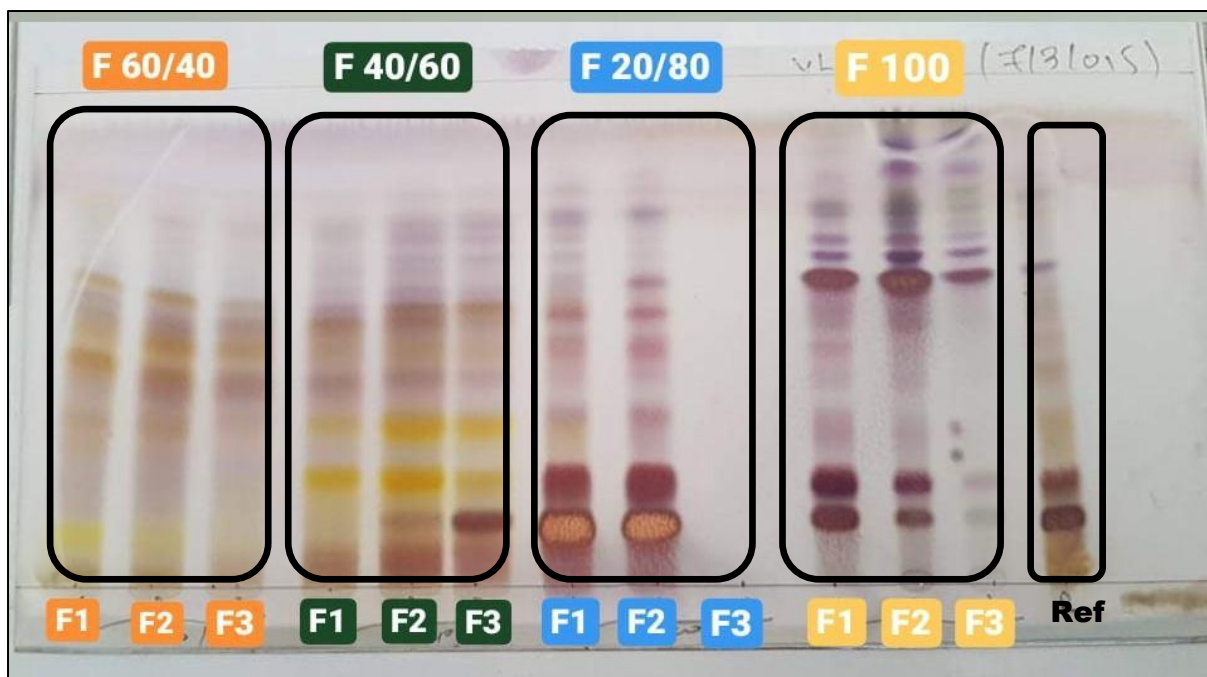


Figure 30 : Chromatogramme des fractions de la VLC de l'extrait brut (Système d'élution : CHCl_3 : MeOH : H_2O (7:3:0.5)).

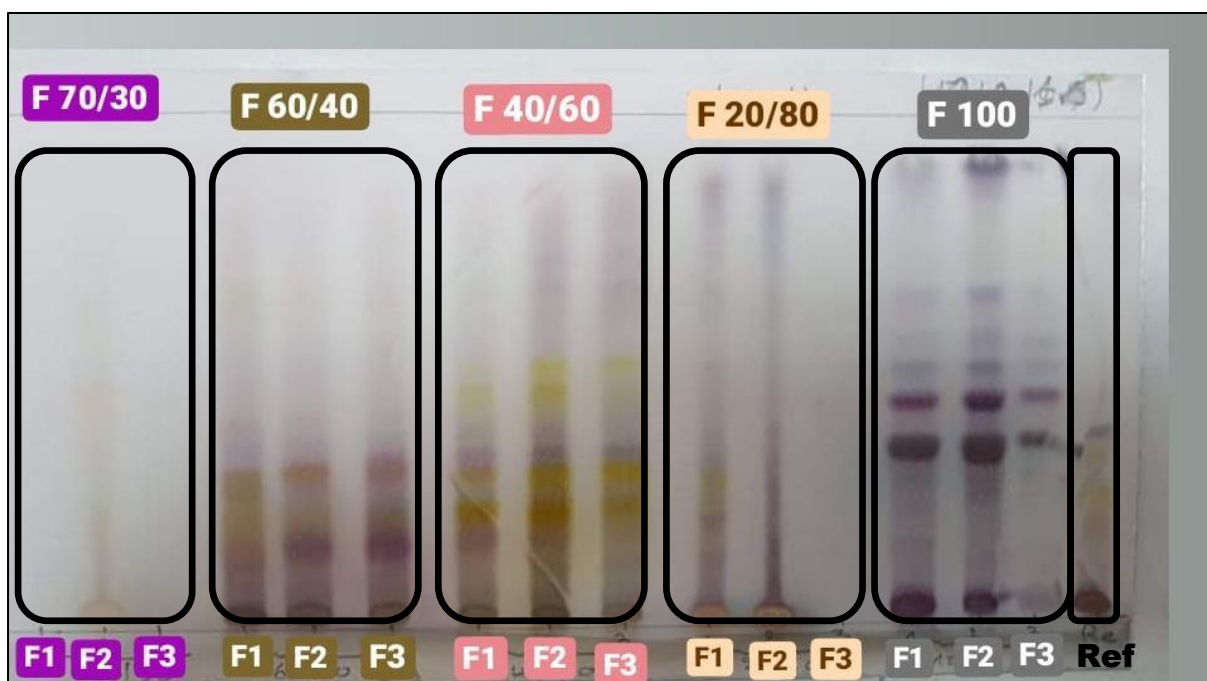


Figure 31: Chromatogramme des fractions de la VLC de l'extrait brut (Système d'élution : Acétate : MeOH : H_2O (10 :1 :1)).



Figure 32: Chromatogramme des fractions de la VLC de l'extrait brut (Système d'élution : CHCl_3 : MeOH (8 :2)).

La chromatographie sur couche mince après la révélation par l'UV à 254-365 nm et la vanilline sulfurique a montrée plusieurs taches dans chaque fraction de type flavonoides (les fractions 60/40 et 40/60), saponosides et terpenoides (les fractions 20/80 et 100%). Ce type de métabolites secondaires a été mis en évidence et purifiés à partir de plusieurs espèces de la famille des Araliaceae (Wang *et al.*, 2019).

V.3 Dosage des polyphénols totaux

L'étude quantitative de l'extrait méthanolique et de la fraction 60/40 de la VLC, préparé à partir des parties aériennes de la plante du genre *Hedera* au moyen du dosage spectrophotométrique avait pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leur sont attribués.

La teneur en polyphénols est enregistrée en équivalent d'Ac gallique en microgramme par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG}/\text{mg d'extrait}$). La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits végétaux (figure 33 et 34).

Les résultats du dosage des polyphénols totaux montrent que fraction 60/40 est la plus riche en composés phénoliques ($148.46 \pm 0,5096 \mu\text{g EAG}/\text{mg d'extrait}$), suivi par l'extrait méthanolique ($65,76 \pm 2,16 \mu\text{g EAG}/\text{mg d'extrait}$).

D'après ces résultats obtenus, nous avons remarqué que la plante étudiée a présenté une teneur en polyphénols estimée légèrement moyenne. En interrogeant les différentes bases de données bibliographiques, nous n'avons pas trouvé d'articles qui ont étudié les parties aériennes de notre espèce du genre *Hedera* en matière d'étude phytochimique ou biologique.

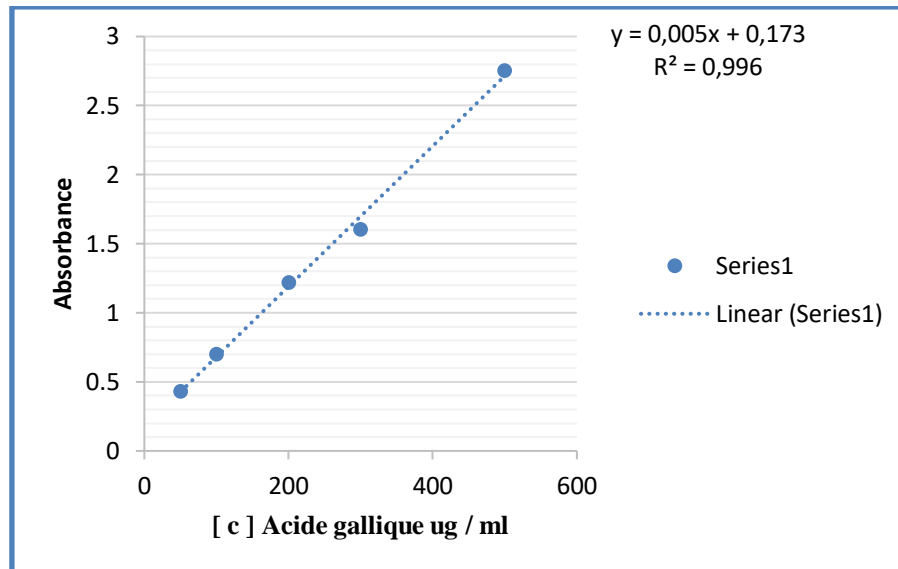


Figure 33 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois essais).

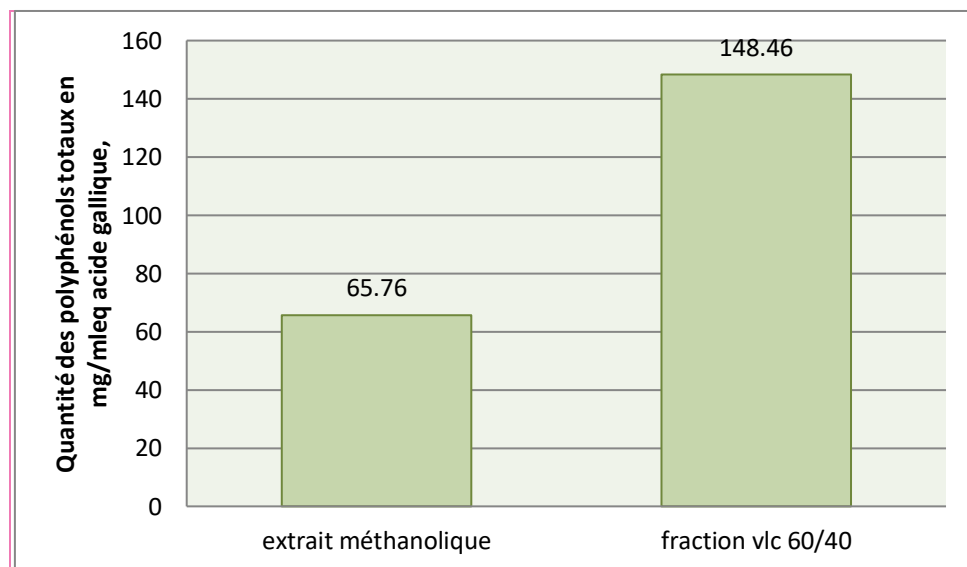


Figure 34 : Teneurs en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique et de la fraction VLC 60/40 en mg/ml eq acide gallique.

V.4 Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique et la fraction 60/40 de la VLC a été déterminée par deux méthodes, il est bien claire qu'une seule méthode n'est pas suffisante pour caractériser le potentiel antioxydant d'un échantillon.

V.4.1 Test de l'activité scavenger du radical DPPH'

- Mise en évidence de l'activité

L'activité anti radicalaire a été mise en évidence grâce à une révélation des plaques CCM de l'extrait méthanolique et la fraction 60/40 de la VLC par une solution de DPPH (figure 35).

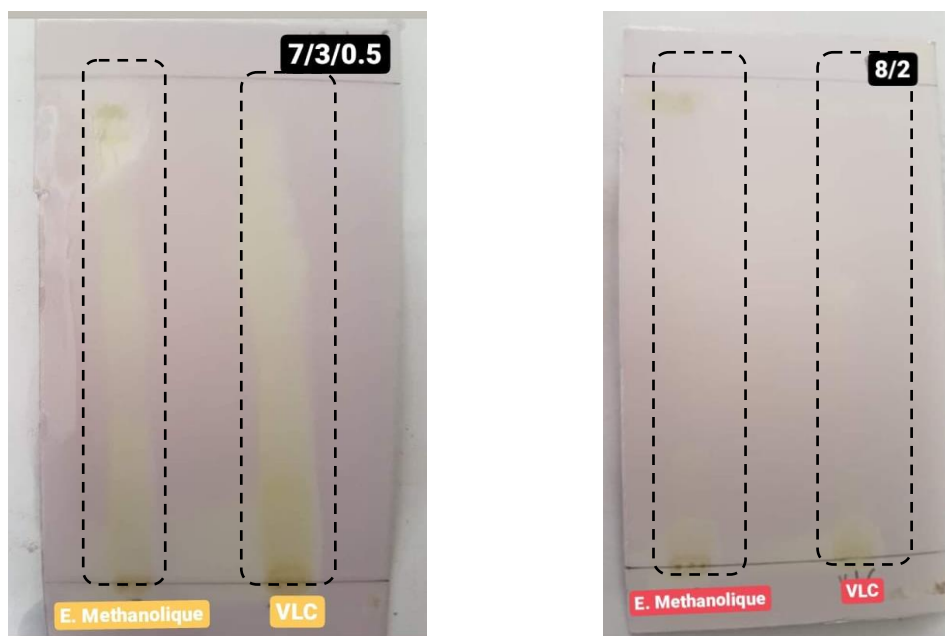


Figure 35 : Plaque CCM développée par deux systèmes (CHCl_3 : MeOH : H_2O (7 :3 :0) et CHCl_3 : MeOH (8 :2) révéle par le DPPH.

Les zones claires sur un fond violet montre la activité antiradicalaire des deux extraits notamment fraction 60/40 ceci nous a encouragé à doser l'activité antiradicalaire des deux extraits.

- **Dosage de l'activité scavenger du radical DPPH**

L'évaluation de l'activité antioxydante est basée sur le pouvoir inhibiteur des extraits sur le DPPH. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de DPPH. Ce pourcentage de DPPH permet d'utiliser le paramètre CI_{50} qui est défini comme la concentration de substrat qui cause une perte de 50% d'activité de DPPH.

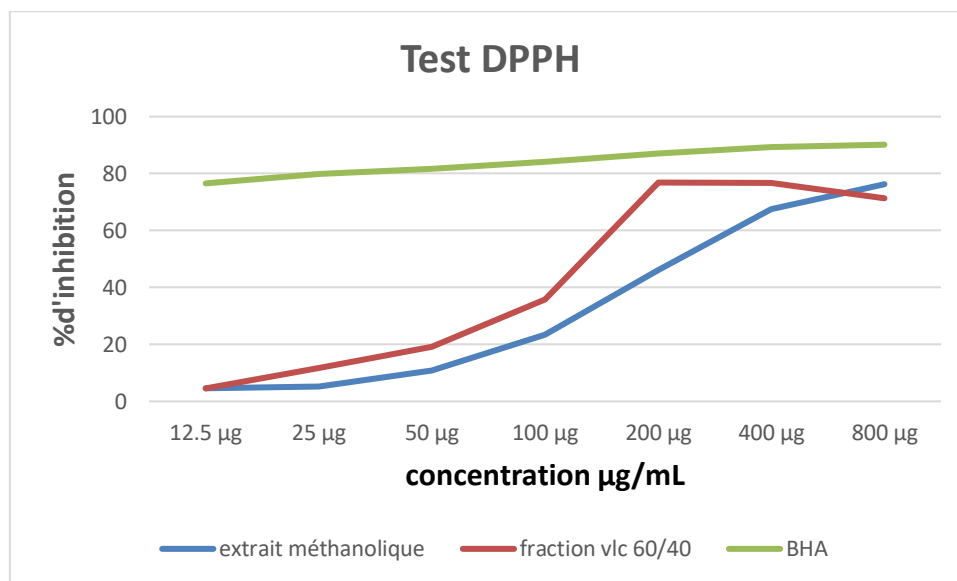


Figure 36 : Courbe de pourcentage d'inhibition du DPPH par différents extrait de plante.

La figure 36 révèle que tous les échantillons testés ont une activité antiradicalaire dose dépendante vis-à-vis du DPPH'.

Les résultats obtenus ont été également utilisés pour la détermination de la valeur d' IC_{50} , ce qui permettra par la suite une évaluation de l'activité des échantillons par rapport à celle du standard BHA.

✚ Détermination des IC_{50}

Les valeurs d' IC_{50} exprimées en µg/ml sont déterminées graphiquement à l'aide d'un logiciel statistique (OriginePro 8) permettant une analyse de la droite de régression non linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction du logarithme décimal des différentes concentrations préparées (Figure 38). Plus la valeur de IC_{50} est faible plus l'activité antioxydante de l'échantillon est forte.

Les valeurs de l'IC₅₀ de chaque extrait ainsi que celle de BHA sont classés par ordre croissant sous forme d'histogramme (Figure 37).

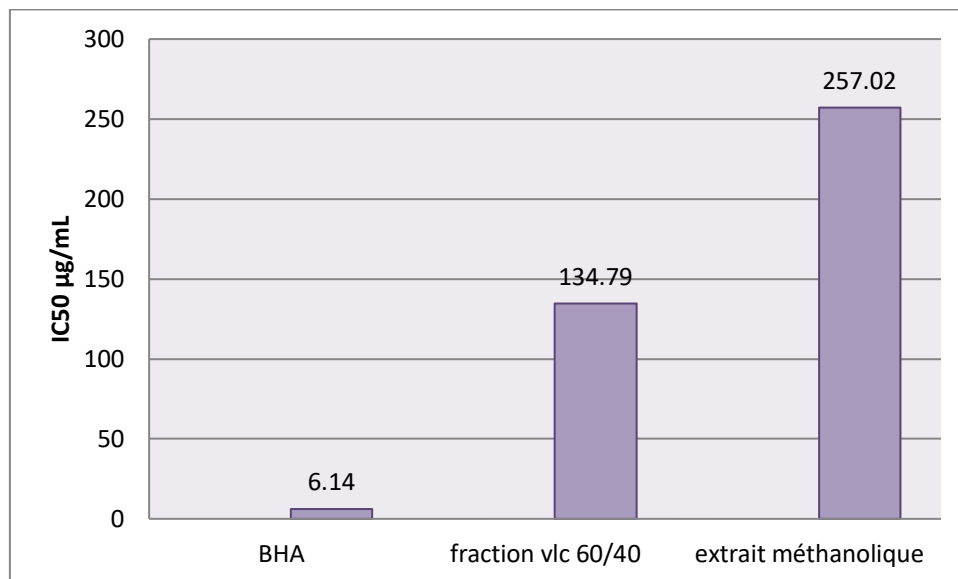


Figure 37 : Valeurs des IC₅₀ µg/ml en ordre croissant.

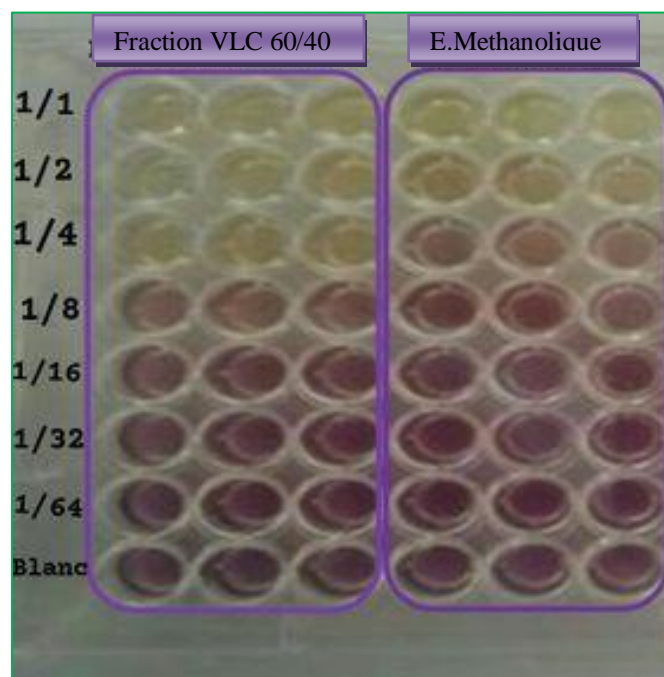


Figure 38 : Palaque du test DPPH.

Parmi les extraits testés, la fraction 60/40 de la VLC représente la fraction la plus active avec une IC₅₀ de l'ordre de 134,79 µg/ml en confirmant le résultat du CCM de criblage phytochimique suivi par l'extrait méthanolique avec une IC₅₀ de 257,02 µg/ml. En comparaison avec le standard, tous les extraits testés s'avèrent moins actifs.

V.4.2 Teste de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

L'activité réductrice a été étudiée par une méthode impliquant un réactif beaucoup plus stable et facilement accessible (le complexe $[\text{Cu}^{2+}\text{-Nc}]$) que le réactif radicalaire chromogène DPPH. En mesurant la capacité de réduction cuprique d'un échantillon à 450 nm, ce test peut indirectement mais efficacement refléter le pouvoir antioxydant total de l'échantillon même si aucune espèce radicalaire n'est impliquée dans le test (Apak et al., 2013).

Les résultats sont représentés par ordre croissant sous forme d'un histogramme (Figure 39).

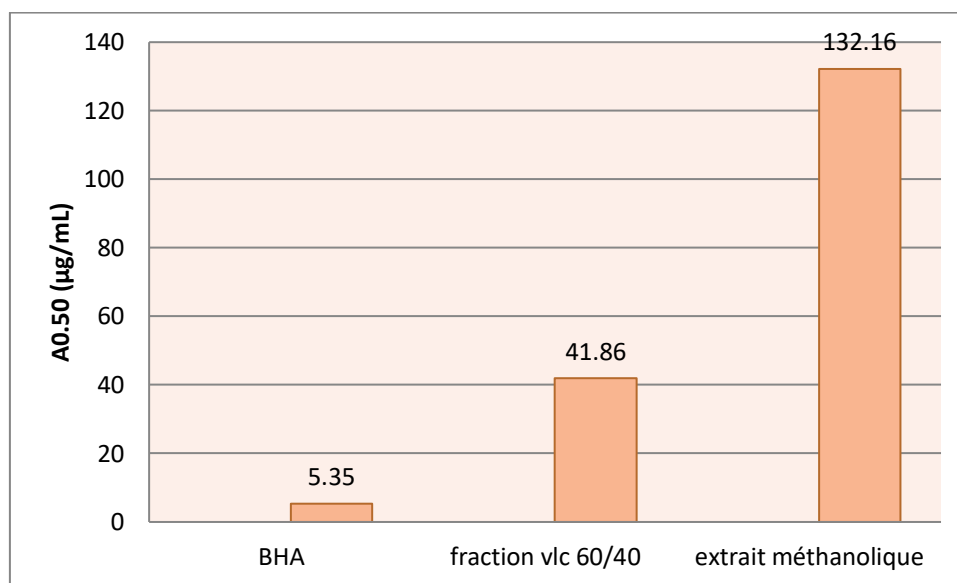


Figure 39: Valeurs des $A_{0.50}$ exprimées en classer en ordre croissant.

L'activité CUPRAC indique une relation inverse entre les $A_{0.5}$ et la capacité antioxydante des échantillons testés. La figure ci-dessous illustre le virage de la couleur par rapport au blanc confirmant ainsi les résultats du test.

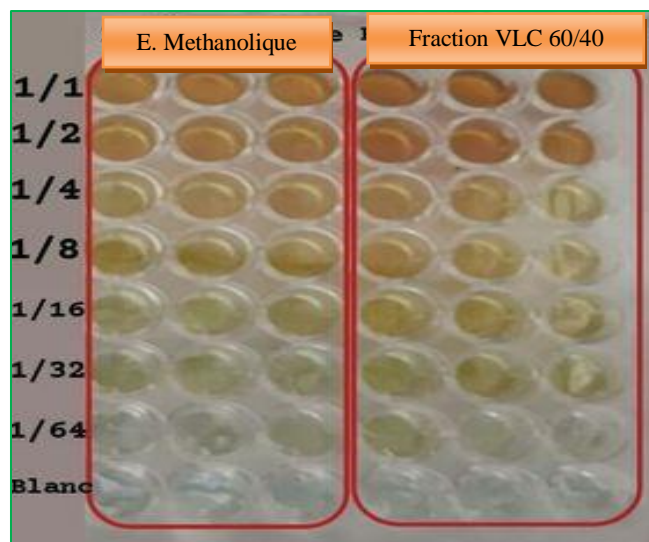


Figure 40:Palque du test CUPRAC.

A partir de la figure 39 on peut déduire que l'extrait méthanolique ($A_{0.5} = 132,16 \pm 20,10 \mu\text{g/mL}$) et la fraction 60/40 ($A_{0.5} = 41,86 \pm 22,48 \mu\text{g/mL}$) montrent un pouvoir réducteur de cuivre. Toutefois le BHA présente la plus forte activité réductrice de cuivre.

En partant de ces résultats, on peut déduire que les variations de la capacité antioxydante des différents échantillons testés comparativement à celles des témoins (BHA) pourrait être principalement due à la présence et à la teneur de composés phénoliques notamment dans la fraction 60/40, d'où l'intérêt de la soumettre à une purification.

Conclusion générale

Conclusion générale

Conclusion générale

Le présent travail porte sur l'investigation phytochimique et activité antioxydante de la plante médicinale *Hedera* appartenant à la famille Araliaceae Cette famille est connue par sa richesse en divers métabolites secondaires d'un grand intérêt biologique tels que les saponosides et les flavonoïdes.

Le criblage phytochimique préliminaire par chromatographie sur CCM, a montré la présence de : flavonoïdes, saponosides, stérols et terpènes. A l'exception des alcaloïdes et tanins, toutes les autres familles chimiques sont présentes. Le fractionnement de l'extrait méthanolique des parties aérienne de *Hedera* a été essentiellement fondé sur l'utilisation conjointe des techniques chromatographiques.

- ❖ chromatographie liquide sous vide sur phase inverse C₁₈ (VLC)
- ❖ chromatographie chromatographique sur plaques analytique de silice normale (CCM)

Le dosage des phénols totaux de l'extrait méthanolique et de la fraction 60/40 a révélé des teneurs limités dans notre espèce.

L'activité antioxydante des extraits méthanolique et de la fraction 60/40 des parties aériennes de notre espèce a été évaluée par deux tests : le test DPPH et CUPRAC. Cette étude a révélé que l'extrait méthanolique et de la fraction 60/40 présentent une activité antioxydante moyenne par rapport à l'antioxydant standard.

Partant de ces résultats encourageants il serait donc intéressant de mener une étude plus approfondie sur cette espèce du genre *Hedera*, afin de mieux identifier et exploiter les métabolites secondaires en générale et les saponosides en particuliers.

Résumé

Le présent travail s'articule autour de la connaissance de la composition phytochimique et l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique des parties aériennes d'une plante médicinale Algérienne du genre *Hedera* appartenant à la famille des Araliaceae connue pour sa richesse en métabolites secondaires biologiquement actifs comme les flavonoïdes et les saponosides

Ce travail a permis la caractérisation par les méthodes chromatographiques (VLC et CCM) de différentes familles de métabolites secondaires.

L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique ainsi que la fraction 60/40 a été évaluée par les méthodes de DPPH et CUPRAC.

Mots clés : Araliaceae, *Hedera* VLC, CCM, flavonoïdes, saponosides, Activité antioxydante.

Abstract

This work is based on the knowledge of the phytochemical composition and antioxidant activity of the ethanolic extract of the aerial parts of an Algerian medicinal plant of the genus *Hederabelong* to the Araliaceae family, known for its richness on various secondary metabolites with interesting biological activities such as flavonoïds and saponosids.

This work allowed the characterization by chromatographic methods (TLC and VLC), of different families of secondary metabolites.

The methanolic extract and 60/40 fraction were evaluated for their antioxidant activities using DPPH and CUPRAC methods.

Keywords: Araliaceae, *Hedera*, VLC, CCM, flavonoïds, saponosids antioxidant activities

المخلص

يعتمد هذا العمل على معرفة التركيب الكيميائي والنشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الإيثانولي للأجزاء الهوائية لنبات طبي جزائري من جنس *Hedera* الذي ينتمي إلى عائلة Araliaceae. المعروفة بغناها بمنتجات الايض الثانوي ذات نشاط بيولوجي فعال مثل الفلافونويدات و الصابونوزيدات. استطعنا باستخدام مختلف الطرق الكروماتوغرافية الطبقة الرقيقة والكروماتوغرافية السائلة تحت الضغط من تحديد مختلف عائلات الايض الثانوي.

تم تقدير النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصين الميثانولي و60/40 ذلك عن طريق اختبار،

DPPH وCUPRAC

اظهرت الدراسة الفيتوكيميائية تواجد العديد من عناصر الميتابوليزم الثانوي في الجزء الهوائي للنبته مثل عديدات الفينول

الكلمات المفتاحية Araliaceae، *Hedera*، مثل الفلافونويدات، الصابونوزيدات، النشاط المضاد للأكسدة.

Références bibliographiques

-A-

Abe, Y., Kawashima, S., Takeda, K., Sekine, M., & Hori, M. (2010).Dependence of surface-loss probability of hydrogen atom on pressures in very high frequency parallel-plate capacitively coupled plasma. *Applied physics express*, 3(10), 106001.

Amellal, M., Bronner, C., Briancon, F., Haag, M., Anton, R., & Landry, Y. (1985).Inhibition of mast cell histamine release by flavonoids and biflavonoids. *Planta Medica*, 51(01), 16-20.

Andres, A., Donovan, S. M., & Kuhlenschmidt, M. S. (2009).Soy isoflavones and virus infections. *The Journal of nutritional biochemistry*, 20(8), 563-569.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, 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 of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7970-7981.

Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., & Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 85(5), 957-998.

Armstrong, R. C., & Swallow, A. J. (1969). Pulse-and gamma-radiolysis of aqueous solutions of tryptophan. *Radiation Research*, 40(3), 563-579.

Asongalem, E. A., Foyet, H. S., Ngogang, J., Folefoc, G. N., Dimo, T. H. É. O. P. H. I. L. E., & Kamtchouing, P. I. E. R. R. E. (2004). Analgesic and antiinflammatory activities of *Erigeron floribundus*. *Journal of ethnopharmacology*, 91(2-3), 301-308.

Atawodi, S. E. (2005). Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 4(2), 128-133.

Avery S.V. (2011). Les cibles moléculaires du stress oxydatif *Biochemical Journal*. 434(2): 201- 210. Doi:10.1042 / BJ20101695.

-B-

Barry, H., John, G., Free. Radic. (1999). Biol. Med., Oxford University Press, USA.

Baudin, B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *mt cardio*, 2(1), 43-52.

Références bibliographiques

- Beaudeau, J. L., Delattre, J., Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Legrand, A., & Peynet, J. (2006).** Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 21(3), 144-150.
- Beil, W., Birkholz, C., & Sewing, K. F. (1995).** Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and Helicobacter pylori growth. *Arzneimittel-forschung*, 45(6), 697-700.
- Beretz, A., & Cazenave, J. P. (1991).** Old and new natural products as the source of modern antithrombotic drugs. *Planta medica*, 57(S 1), S68-S72.
- Berg PA, Daniel PT. (1988).** Plant Flavonoids in Biology and Medicine II. Progress in Clinical and Biological Research, Cody V, Middleton E, Harborne JB (Eds) 280 157-171. Liss AR Inc., New York.
- Berrens, L., De la Cuadra, B., & Gallego, M. T. (1997).** Complement inactivation by allergenic plant pollen extracts. *Life sciences*, 60(17), 1497-1503.
- Biyiti, L. F., Meko'o, D. J. L., Tamzc, V., & Amvam Zollo, P. H. (2004).** Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises. *Pharm. Med. Trad. Afr*, 13, 11-20.
- Blois, M. S. (1958).** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Bohm, B. A. (1998).** *Introduction to flavonoids*. Harwood Academic Publishers.
- Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA*, 79-82.
- Bonnard, C., Durand, A., Peyrol, S., Chanseume, E., Chauvin, M. A., Morio, B., & Rieusset, J. (2008).** Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *The Journal of clinical investigation*, 118(2), 789-800.
- Boucelha, L., Djebbar, R. (2014).** Les espèces réactives d'oxygène (ros) : dr jekkyl and mister hyde ou comment l'oxygène peut-il devenir toxique Thèse. Laboratoire de Physiologie et Biologie des Organismes, Faculté des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB).
- Boullard, B. (1997).** Plantes et champignons, éd. ESTEM.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

Références bibliographiques

Brot, N., & Weissbach, H. (2000). Peptide methionine sulfoxide reductase: biochemistry and physiological role. *Peptide Science*, 55(4), 288-296.

Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales 2^{ème} édition (No. 581.634 B7).

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} édition, éditeur Technique et Documentation, Paris.

Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4^e éd.). *Tec & Doc/Lavoisier, Paris*, 279-281.

Burton, G. W., Joyce, A., & Ingold, K. U. (1982). First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet (London, England)*, 2(8293), 327-327.

-C-

Cavin, A. (1999). Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: *Tinospora crispa* (Menispermaceae) *Merremia emarginata* (Convolvulaceae) et *Orophea enneandra* (Annonaceae) (Doctoral dissertation, Université de Lausanne, Faculté des sciences).

Chaudhry, P. S., Cabrera, J., Juliani, H. R., & Varma, S. D. (1983). Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochemical Pharmacology*, 32(13), 1995-1998.

Chaudiere, J., & Tappel, A. L. (1983). Purification and characterization of selenium-glutathione peroxidase from hamster liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 226(2), 448-457.

Chazan, J. B. (1971). Répartition des sapogénines triterpéniques dans quelques genres d'araliacées de Madagascar. *Phytochemistry*, 10(9), 2111-2116.

Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(2), 192-208.

Chinese Pharmacopoeia Commission. (1979). Pharmacopoeia of the Peoples Republic of China: 1977. *Beijing: People's Medical Publishing House*.

Christopher, R., Nyandoro, S. S., Chacha, M., & De Koning, C. B. (2014). A new cinnamoylglycoflavonoid, antimycobacterial and antioxidant constituents from *Heritiera littoralis* leaf extracts. *Natural Product Research*, 28(6), 351-358.

Chwalek, M. (2004). Hémisynthèse de saponosides à hédéragénine. Etude de l'influence de la chaîne osidique sur l'activité hémolytique (Doctoral dissertation, Reims).

Références bibliographiques

- Cioaca, C. (1978).** The saponins of *Hedera helix* with antibacterial activity. *Die pharmazie*, 33(9), 609.
- Clement, J., & SH Clement, E. (2014).** The medicinal chemistry of genus *Aralia*. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14(24), 2783-2801.
- Couplan, F. (2012).** *Les plantes et leurs noms: Histoires insolites*. Editions Quae.
- Cronquist, A., & Takhtadziân, A. L. (1981).** An integrated system of classification of flowering plants. *Columbia university press*.
- Cruz, T., Galvez, J., Ocete, M. A., Crespo, M. E., de Medina, F. H. S., & Zarzuelo, A. (1998).** Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. *Life sciences*, 62(7), 687-695.
- Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 343-356.
- Cuyckens, F., & Claeys, M. (2004).** Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass spectrometry*, 39(1), 1-15.

-D-

- Damintoti, K., Mamoudou, H.D., Jacques, S., Saydou, Y., Souleymane, S., et Alfred, S.T. (2005).** Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Mémoire de l'université de Burkina Faso.
- Damre, A. S., Gokhale, A. B., Phadke, A. S., Kulkarni, K. R., & Saraf, M. N. (2003).** Studies on the immunomodulatory activity of flavonoidal fraction of *Tephrosia purpurea*. *Fitoterapia*, 74(3), 257-261.
- Das, M. K., & Roychoudhury, A. (2014).** ROS and responses of antioxidant as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci*, 2, 1-13.
- De Medina, F. S., Vera, B., Galvez, J., & Zarzuelo, A. (2002).** Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sciences*, 70(26), 3097-3108.
- Delmas, F., Di Giorgio, C., Elias, R., Gasquet, M., Azas, N., Mshvildadze, V., & Timon-David, P. (2000).** Antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, α -hederin, β -hederin and hederacolchiside A1, as compared to their action on mammalian cells cultured in vitro. *Planta medica*, 66(04), 343-347.

Références bibliographiques

- Delporte, C., Backhouse, N., Erazo, S., Negrete, R., Vidal, P., Silva, X., & Munoz, O. (2005).** Analgesic–antiinflammatory properties of *Proustia pyrifolia*. *Journal of ethnopharmacology*, 99(1), 119-124.
- Deng, S., Yu, B., Xie, J., & Hui, Y. (1999).** Highly efficient glycosylation of sapogenins. *The Journal of Organic Chemistry*, 64(19), 7265-7266.
- Dewick, P. M. (2002).** The biosynthesis of C 5–C 25 terpenoid compounds. *Natural product reports*, 19(2), 181-222.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., & Capasso, F. (1999).** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, 65(4), 337-353.
- Diallo, A. (2005).** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd.(Myrtaceae). *PhD. of the University Bamako, Mali*, 38-47.
- Ding, E. L., Hutfless, S. M., Ding, X., & Girotra, S. (2006).** Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Nutrition & metabolism*, 3(1), 2.
- Dreher, D., & Junod, A. F. (1996).** Role of oxygen free radicals in cancer development. *European Journal of cancer*, 32(1), 30-38.
- Droge, W. (2002).** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.
- Duchnowicz, P., Broncel, M., Podśędek, A., & Koter-Michalak, M. (2012).** Hypolipidemic and antioxidant effects of hydroxycinnamic acids, quercetin, and cyanidin 3-glucoside in hypercholesterolemic erythrocytes (in vitro study). *European journal of nutrition*, 51(4), 435-443.
- Dupont, F., & Guignard, J. L. (2007).** Botanique: systématique moléculaire. Elsevier Health Sciences.

-E-

- Ellis, G. P. (Ed.). (2009).** Chromenes, chromanones, and chromones (Vol. 100). John Wiley & Sons.
- Enoiu, M. (2001).** *Rôle pro-oxydant de la gamma-glutamyltransférase et de la gamma-glutamyltransférase" related" dans la peroxydation lipidique* (Doctoral dissertation, Université Henri Poincaré-Nancy 1).
- Estrada, A., Katselis, G. S., Laarveld, B., & Barl, B. (2000).** Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 23(1), 27-43.

Références bibliographiques

-F-

Facino, R. M., Carini, M., Traldi, P., Pelli, B., Gioia, B., & Arlandini, E. (1987).Confirmative assay and quantitative determination of Hedera Helix L. saponins (α -hederin, hederacosides B and C) in raw plant extracts and in cosmetic formulations by EI and CAD MIKE spectrometry. *Biomedical & Environmental Mass Spectrometry*, 14(4), 187-194.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*, (11/12), 108-117.

Favier, A. (2006, November). Stress oxydant et pathologies humaines. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 64, No. 6, pp. 390-396). Elsevier Masson.

Favier, A., Cadet, J., Kalaryanaman, R., Fontecave, M., Pierre, J.L. (1995).Analysis of Free Radicals in Biological Systems. New-York : Birkhauser.

Finkel, T. (2000). Redox-dependent signal transduction. *FEBS letters*, 476(1-2), 52-54.

Folts, J. D. (2002). Potential health benefits from the flavonoids in grape products on vascular disease. In *Flavonoids in cell function* (pp. 95-111). Springer, Boston, MA.

Formica, J. V., & Regelson, W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and chemical toxicology*, 33(12), 1061-1080.

Foti, M. C., Daquino, C., & Geraci, C. (2004). Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH• radical in alcoholic solutions. *The Journal of organic chemistry*, 69(7), 2309-2314.

Friesenecker, B., & Tsai, A. G. (1995). Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg. *International Journal of Microcirculation*, 15(Suppl. 1), 17-21.

Fulbert, J. C., & Cals, M. J. (1992).Les radicaux libres en biologie clinique: origin, rôle pathogène et moyens de défense. *Pathologie et biologie*, 40(1), 66-77.

-G-

Gaidi, G., Miyamoto, T., Rustaiyan, A., Laurens, V., & Lacaille-Dubois, M. A. (2000).Two new biologically active triterpene saponins from *Acanthophyllum squarrosum*. *Journal of natural products*, 63(11), 1497-1502.

Galati, E. M., Monforte, M. T., Kirjavainen, S., Forestieri, A. M., Trovato, A., & Tripodo, M. M. (1994). Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid.(Note I): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco (Societa chimica italiana: 1989)*, 40(11), 709.

Références bibliographiques

Galleano, M., Calabro, V., Prince, P. D., Litterio, M. C., Piotrkowski, B., Vazquez-Prieto, M. A., ... & Fraga, C. G. (2012). Flavonoids and metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1259(1), 87-94.

Garait, B. (2006). *Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®* (Doctoral dissertation).

Georgé, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 53(5), 1370-1373.

Georgetti, S. R., Casagrande, R., Di Mambro, V. M., Azzolini, A. E., & Fonseca, M. J. (2003). Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *Aaps Pharmsci*, 5(2), 111.

Gepdiremen, A., Mshvildadze, V., Süleyman, H., & Elias, R. (2005). Acute anti-inflammatory activity of four saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F in carrageenan-induced rat paw edema. *Phytomedicine*, 12(6-7), 440-

GJ, B. (2011). Jauniaux. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 25, 28.

Gonzalez-Paramas, M, A., Santos-Buelga, C., Duenas, M., & Gonzalez-Manzano, S. (2011). Analysis of flavonoids in foods and biological samples. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 11(14), 1239-1255.

Grayer, R. J., & Harborne, J. B. (1994). A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982–1993. *Phytochemistry*, 37(1), 19-42.

Greunke, C., Hage-Hülsmann, A., Sorkalla, T., Keksel, N., Häberlein, F., & Häberlein, H. (2015). A systematic study on the influence of the main ingredients of an ivy leaves dry extract on the β 2-adrenergic responsiveness of human airway smooth muscle cells. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 31, 92-98.

Guelcin, Í., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., & Elias, R. (2004). Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F. *Planta medica*, 70(6), 561-563.

Guelcin, Í., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., & Elias, R. (2004). Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F. *Planta medica*, 70(6), 561-563.

Gülcin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of toxicology*, 86(3), 345-391.

Références bibliographiques

-H-

- Häberlein, H. (2008).** Hedera helix–mode of action evidenced by cell biological and biophysical investigations. *Przewodnik Lekarza/Guide for GPs*, 11(1), 255-256.
- Halliwell, B. (1995).** Oxidation of low-density lipoproteins: questions of initiation, propagation, and the effect of antioxidants. *The American journal of clinical nutrition*, 61(3), 670S-677S.
- Han, Y. (2005).** Ginkgo terpene component has an anti-inflammatory effect on *Candida albicans*-caused arthritic inflammation. *International immunopharmacology*, 5(6), 1049-1056.
- Harbone, J. B. (1993).** *Introduction to ecological biochemistry*. Academic press.
- Harman, D. (2002).** Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Science's SAGE KE*, 2002(37), 14.
- Hecker, M., Runkel, F., & Völp, A. (2002).** Behandlung chronischer Bronchitis mit einem Spezialextrakt aus Efeublättern–multizentrische Anwendungsbeobachtung mit 1350 Patienten. *Complementary Medicine Research*, 9(2), 77-84.
- Hellal, Z. (2011).** *Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (Sardina pilchardus)* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- Hemingway, R. W. P. E. Laks, S. J. Branham (1992).** Plant polyphenols: Synthesis, properties, sinificance. *Springer Science & Busines Media, Germany. Livre*.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3-6.
- Hockenberry ,M. J., Taylor., O.A.Gudy , P.M., Ross , A.K ; Pasvogel , A., Montgomery , D., Ribbeck ,P., MC carthy., Kand Moore., I . (2013).** Fe²⁺ – Isoprostanes Amesure of oxidative stress in children.
- Hollman, P. C. H., & Arts, I. C. W. (2000).** Flavonols, flavones and flavanols–nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1081-1093.
- Hollman, P. C. H., & Katan, M. B. (1997).** Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 51(8), 305-310.
- Hostettmann, K. (1980).** Saponins with molluscicidal activity from *Hedera helix*L. *Helvetica Chimica Acta*, 63(3), 606-609.

Références bibliographiques

Hostettmann, K., & Marston, A. (1995). *Chemistry and pharmacology of natural products* (Vol. 548, pp. 326-327). Cambridge, UK:: Cambridge University Press.

Huan, V. D., Yamamura, S., Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki, K., Nham, N. T., & Chau, H. M. (1998). Oleanane saponins from *Polyscias fruticosa*. *Phytochemistry*, 47(3), 451-457.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.

Huang, H. C., Liao, S. C., Chang, F. R., Kuo, Y. H., & Wu, Y. C. (2003). Molluscicidal saponins from *Sapindus mukorossi*, inhibitory agents of golden apple snails, *Pomacea canaliculata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 4916-4919.

Huggins, T. G., Wells-Knecht, M. C., Detorie, N. A., Baynes, J. W., & Thorpe, S. R. (1993). Formation of o-tyrosine and dityrosine in proteins during radiolytic and metal-catalyzed oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17), 12341-12347.

-I-

Ichai, C., Quintard, H., & Orban, J. C. (2011). *Désordres métaboliques et réanimation: de la physiopathologie au traitement* (pp. 427-428). Springer-Verlag France.

Igor Passi L B. (2002). Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae). Thèse Pharmacie, Bamako; 133 P.

Iwashina, T. (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, 113(3), 287.

Javillier M. (1969). *Traité de biochimie générale. Volume 3, partie 2, Masson, France*

Jay, D. B., Papaharalambus, C. A., Seidel-Rogol, B., Dikalova, A. E., Lassègue, B., & Griendling, K. K. (2008). Nox5 mediates PDGF-induced proliferation in human aortic smooth muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(3), 329-335.

Ji LL Fu R., Mitchell EW. (1999). Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J. Appl Physiol*, 73:1854-1859.

Jiménez-González, L., Álvarez-Corral, M., Muñoz-Dorado, M., & Rodríguez-García, I. (2008). Pterocarpan: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), 125-154.

Julien, J., Gasquet, M., Maillard, C., Balansard, G., & Timon-David, P. (1985). Extracts of the ivy plant, *Hedera helix*, and their anthelmintic activity on liver flukes. *Planta medica*, 51(03), 205-208.

Références bibliographiques

-K-

Kaipnazarov, T.N., Uteniyazov, K.K., Saatov, Z. (2004). The structure of cyclostipuloside E from *tragacantha stipulosa* Boriss. In: International conference on saponins. Phytochemistry and application of plant saponins. Pulaway: Institute of soil science and plant cultivation, pp 82.

Kaiser, S., Di Mascio, P., Murphy, M. E., & Sies, H. (1990). Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 277(1), 101-108.

Khdair, A., Mohammad, M. K., Tawaha, K., Al-Hamarsheh, E., AlKhatib, H. S., Al-khalidi, B., & Hudaib, M. (2010). A validated RP HPLC-PAD method for the determination of hederacoside C in Ivy-Thyme cough syrup. *International journal of analytical chemistry*, 2010.

Kim, D. O., Jeong, S. W., & Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food chemistry*, 81(3), 321-326.

Kim, Y. E., Kim, D. K., Seo, Y. K., & Lee, J. H. (2014). U.S. Patent No. 8,623,425. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.

Kotani, M., Matsumoto, M., Fujita, A., Higa, S., Wang, W., Suemura, M., & Tanaka, T. (2000). Persimmon leaf extract and astragaloside inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(1), 159-166.

Kubola, J., & Siriamornpun, S. (2008). Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food chemistry*, 110(4), 881-890.

Kuo, Y. C., Yang, L. M., & Lin, L. C. (2004). Isolation and immunomodulatory effect of flavonoids from *Syzygium samarangense*. *Planta medica*, 70(12), 1237-1239.

Kurutas, E. B. (2015). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition journal*, 15(1), 1-22.

-L-

Lacaille-Dubois, M. A. (1999). Saponins as immunoadjuvants and immunostimulants. In *Immunomodulatory agents from plants* (pp. 243-272). Birkhäuser, Basel.

Références bibliographiques

- Lacaille-Dubois, M. A. (2000).** Biologically and pharmacologically active saponins from plants: recent advances. In *Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants* (pp. 205-218). Springer, Dordrecht.
- Lacaille-Dubois, M. A., Hanquet, B., Rustaiyan, A., & Wagner, H. (1993).** Squarroside A, a biologically active triterpene saponin from *Acanthophyllum squarrosum*. *Phytochemistry*, *34*(2), 489-495.
- Leger, C. L. (1996).** Oxydations, substances à fonctions antioxydantes et stress oxydatif: relations avec le vieillissement: revue critique: Lipides et santé. *OCL. Oléagineux, corps gras, lipides*, *3*(3), 182-195.
- Lehucher-Michel, M. P., Lesgards, J. F., Delubac, O., Stocker, P., & Durand, P. (2001).** Stress oxydant et pathologies humaines: Bilan et perspectives préventives. *La Presse médicale* (1983), *30*(21), 1076-1081.
- Lehucher-Michel, M. P., Lesgards, J. F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., & Prost, M. (2001).** Oxidative stress and human disease. Current knowledge and perspectives for prevention. *Presse medicale (Paris, France: 1983)*, *30*(21), 1076.
- Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M. (2011).** The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, *125*(2), 288-306.
- Leverve, X. (2009).** Stress oxydant et antioxydants?. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, *44*(5), 219-224.
- Li, M., Han, X., & Yu, B. (2003).** Synthesis of monomethylated dioscin derivatives and their antitumor activities. *Carbohydrate research*, *338*(2), 117-121.
- Li, T., Pan, H., Feng, Y., Li, H., & Zhao, Y. (2015).** Bioactivity-guided isolation of anticancer constituents from *Hedera nepalensis* K. Koch. *South African Journal of Botany*, *100*, 87-93.
- Liu, B., & Wendel, J. F. (2000).** Retrotransposon activation followed by rapid repression in introgressed rice plants. *Genome*, *43*(5), 874-880.
- Liu, H., Zhang, L., & Lu, S. (2012).** Evaluation of antioxidant and immunity activities of quercetin in isoproterenol-treated rats. *Molecules*, *17*(4), 4281-4291.

-M-

- Mabile, L., Meilhac, O., Escargueil-Blanc, I., Troly, M., Pieraggi, M. T., Salvayre, R., & Nègre-Salvayre, A. (1997).** Mitochondrial function is involved in LDL oxidation mediated by

Références bibliographiques

human cultured endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 17(8), 1575-1582.

Magid, A. A. (2005). *Étude chimique de deux Caryocar de Guyane et d'un Guioa de Nouvelle Calédonie* (Doctoral dissertation, UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE).

Main, P. A., Angley, M. T., O'Doherty, C. E., Thomas, P., & Fenech, M. (2012). The potential role of the antioxidant and detoxification properties of glutathione in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition & Metabolism*, 9(1), 35.

Majester-Savornin, B., Elias, R., Diaz-Lanza, A. M., Balansard, G., Gasquet, M., & Delmas, F. (1991). Saponins of the ivy plant, *Hedera helix*, and their leishmanicidal activity. *Planta medica*, 57(03), 260-262.

Malecky, M. (1951). Saponosides stéroïdes et triterpéniques de synthèse. Thèse de Doctorat. Ecole Polytechnique Fédérale, Zurich, Suisse.

Markram, H., Wang, Y., & Tsodyks, M. (1998). Differential signaling via the same axon of neocortical pyramidal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(9), 5323-5328.

Mastuda, H., Morikawa, T., Ueda, K., Managi, H., & Yoshikawa, M. (2002). Structural requirements of flavonoids for inhibition of antigen-induced degranulation, TNF- α and IL-4 production from RBL-2H3 cells. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 10(10), 3123-3128.

Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., & De Castro, I. N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*, 32(8), 595-603.

Mazat, J. P., & Ransac, S. (2010). Le complexe bc1 de la chaîne respiratoire mitochondriale fonctionne selon l'hypothèse du cycle Q de Mitchell-La preuve par une approche stochastique?. *médecine/sciences*, 26(12), 1079-1086.

McCall, M. R., & Frei, B. (1999). Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(7-8), 1034-1053.

Mendel, M., Chłopecka, M., Dziekan, N., & Wiechetek, M. (2011). The effect of the whole extract of common ivy (*Hedera helix*) leaves and selected active substances on the motoric activity of rat isolated stomach strips. *Journal of ethnopharmacology*, 134(3), 796-802.

Middleton Jr, E. (1993). The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. *The flavonoids: advances in research since 1986*, 337-370.

Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.

Références bibliographiques

Mladěnka, P., Zatloukalová, L., Filipský, T., & Hrdina, R. (2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(6), 963-975.

Mompon, B., Lemaire, B., Mengal, P., & Surbled, M. (1998).Extraction des polyphénols: du laboratoire à la production industrielle. *COLLOQUES-INRA*, 31-44.

Morozova S, Suc-Royer I, Auwerx J. (2004). Modulateurs du métabolisme du cholestérol et avenir du traitement de l'athérosclérose. *Med Sci (Paris)*; 20: 685-90.

Morris, C. J., Earl, J. R., Trenam, C. W., & Blake, D. R. (1995). Reactive oxygen species and iron—a dangerous partnership in inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 27(2), 109-122.

Mors, W. B., Do Nascimento, M. C., Pereira, B. M. R., & Pereira, N. A. (2000). Plant natural products active against snake bite—the molecular approach. *Phytochemistry*, 55(6), 627-642.

-N-

Nicolas, A. N., & Plunkett, G. M. (2009). The demise of subfamily Hydrocotoyloideae (Apiaceae) and the re-alignment of its genera across the entire order Apiales. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53(1), 134-151.

Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Rsc Advances*, 5(35), 27986-28006.

NOMURA, K., IMAI, H., KOUMURA, T., KOBAYASHI, T., & NAKAGAWA, Y. (2000).Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochemical Journal*, 351(1), 183-193.

-O-

Obermeier, M. T., White, R. E., & Yang, C. S. (1995). Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities. *Xenobiotica*, 25(6), 575-584.

Okado-Matsumoto, A., & Fridovich, I. (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver Cu, Zn-SOD in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38388-38393.

Ong, K. C., & Khoo, H. E. (1997). Biological effects of myricetin. *General Pharmacology: The Vascular System*, 29(2), 121-126.

Références bibliographiques

Ong, K. C., & Khoo, H. E. (2000). Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life sciences*, 67(14), 1695-1705.

Opara, E. C. (2002). Oxidative stress, micronutrients, diabetes mellitus and its complications. *The journal of the Royal Society for the Promotion of Health*, 122(1), 28-34.

Oyedemi, S. O., & Afolayan, A. J. (2011). Antibacterial and antioxidant activities of hydroalcoholic stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 4(12), 952-958.

Öztürk, M., Kolak, U., Topçu, G., Öksüz, S., & Choudhary, M. I. (2011). Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical-scavenging activity-guided fractionation. *Food Chemistry*, 126(1), 31-38.

Özyürek, M., Güçlü, K., Tütem, E., Başkan, K. S., Erçağ, E., Celik, S. E., & Apak, R. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical methods*, 3(11), 2439-2453.

-P-

Paech, K., & Tracey, M. V. (1956). *Modern Methods of Plant Analysis, Vols 1-4*. Springer-Verlag.

Panfilì, G., Fratianni, A., & Irano, M. (2003). Normal phase high-performance liquid chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14), 3940-3944.

Parvu, M., Vlase, L., Parvu, A. E., Rosca-Casian, O., Gheldiu, A. M., & Parvu, O. (2015). Phenolic compounds and antifungal activity of *Hedera helix* L.(Ivy) flowers and fruits. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 43(1), 53-58.

Payne, W. W., Geissman, T. A., Lucas, A. J., & Saitoh, T. (1973). Chemosystematics and taxonomy of *Ambrosia chamissonis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1(1), 21-33.

Pelzer, L. E., Guardia, T., Juarez, A. O., & Guerreiro, E. (1998). Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *Il Farmaco*, 53(6), 421-424.

Pelzer, L. E., Guardia, T., Juarez, A. O., & Guerreiro, E. (1998). Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *Il Farmaco*, 53(6), 421-424.

Pieme, C. A., Tatangmo, J. A., Simo, G., Nya, P. C. B., Moor, V. J. A., Moukette, B. M., & Sobngwi, E. (2017). Relationship between hyperglycemia, antioxidant capacity and some enzymatic and non-enzymatic antioxidants in African patients with type 2 diabetes. *BMC Research Notes*, 10(1), 141.

Références bibliographiques

- Pietta, P. G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.
- Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., & Defraigne, J. O. (1999).** Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, 4(4), 6-11.
- Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., & Defraigne, J. O. (1999).** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, 4(5), 12-23.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015).** The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.
- Poli, G., Sottero, B., Gargiulo, S., & Leonarduzzi, G. (2009).** Cholesterol oxidation products in the vascular remodeling due to atherosclerosis. *Molecular aspects of medicine*, 30(3), 180-189.
- Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowski, B. (2010).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.

-Q-

- Quezel, P., & Santa, S. (1963).** *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales* (No. 581.965 Q8).

-R-

- 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 biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Retsky, K. L., Chen, K., Zeind, J., & Frei, B. (1999).** Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1-2), 90-98.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010).** Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free radical biology and medicine*, 49(11), 1603-1616.
- Rice-evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., & Pridham, J. B. (1995).** The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free radical research*, 22(4), 375-383.

Références bibliographiques

Rippe, O., & Madejsky, M. (2006). Die Kräuterkunde des Paracelsus: Therapie mit Heilpflanzen nach abendländischer Tradition; Naturphilosophie, Signaturenlehre, Astrologie der Heilkräuter, Alchimie und Spagirik, Magie mit Heilpflanzen, Heilpraxis. AT-Verlag.

Roberts J. C. (1996). The chemistry of paper. *Royal Society of Chemistry, England.*

Robinet, F. G. (2004). Métabolites des terpénoïdes chez les caprins. Thèse de Doctorat. Université de Paris, France

Roginsky, V., & Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food chemistry*, 92(2), 235-254.

Roussel, A., Neve, J., Hinnering, I., Delattre, J., Beaudoux, J. L., & Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Antioxydants et nutrition. *Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques*, 261-280.

-S-

Sahnoun, Z., Jamoussi, K., & Zeghal, K. M. (1997). Free radicals and antioxidants: human physiology, pathology and therapeutic aspects. *Thérapie*, 52(4), 251-270.

Schiavone, S., Jaquet, V., Trabace, L., & Krause, K. H. (2013). Severe life stress and oxidative stress in the brain: from animal models to human pathology. *Antioxidants & redox signaling*, 18(12), 1475-1490.

Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., & Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free radical research*, 36(2), 177-187.

Selvaraj, N., Bobby, Z., & Sathiyapriya, V. (2006). Effect of lipid peroxides and antioxidants on glycation of hemoglobin: an in vitro study on human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*, 366(1-2), 190-195.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012.

Shih, C. M., Lin, H., Liang, Y. C., Lee, W. S., Bi, W. F., & Juan, S. H. (2004). Concentration-dependent differential effects of quercetin on rat aortic smooth muscle cells. *European journal of pharmacology*, 496(1-3), 41-48.

Shin, J. E., Kim, J. M., Bae, E. A., Hyun, Y. J., & Kim, D. H. (2005). In vitro inhibitory effect of flavonoids on growth, infection and vacuolation of *Helicobacter pylori*. *Planta medica*, 71(03), 197-201.

Sieben, A., Prenner, L., Sorkalla, T., Wolf, A., Jakobs, D., Runkel, F., & Häberlein, H. (2009). α -Hederin, but not hederacoside C and hederagenin from *Hedera helix*, affects the

Références bibliographiques

binding behavior, dynamics, and regulation of β 2-adrenergic receptors. *Biochemistry*, 48(15), 3477-3482.

Signorini, C., De Felice, C., Durand, T., Oger, C., Galano, J. M., Leoncini, S., ... & Hayek, J. (2013). Isoprostanes and 4-hydroxy-2-nonenal: markers or mediators of disease? Focus on Rett syndrome as a model of autism spectrum disorder. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology*. (299), 152-178.

Smith, A. R., Shenvi, S. V., Widlansky, M., Suh, J. H., & Hagen, T. M. (2004). Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Current medicinal chemistry*, 11(9), 1135-1146.

Sparg, S., Light, M. E., & Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of ethnopharmacology*, 94(2-3), 219-243.

Stadtman, E. R., & Berlett, B. S. (1991). Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 266(26), 17201-17211.

Starlin, T. H. A. N. G. A. R. A. J. A. N., & Gopalakrishnan, V. K. (2013). Enzymatic and non-enzymatic antioxidant properties of *Tylophora pauciflora* wight and arn.—an in vitro study. *Asian J. Pharm. Clin. Res*, 6(4), 68-71.

Stasia, M. J. (2007). La granulomatose septique chronique X+—Un fabuleux modèle d'étude de l'activation du complexe NADPH oxydase. *médecine/sciences*, 23(5), 526-532.

Stauss-Grabo, M., & Atiye, S. (2009). Ivy, a traditionally used medicinal plant in modern phytotherapy. *Zeitschrift für Phytotherapie*, 30(6), 289-291.

St-Louis, R. (2011). *Implication des espèces réactives de l'oxygène dans le contrôle central de l'osmorégulation* (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).

Stoclet, J. C., Chataigneau, T., Ndiaye, M., Oak, M. H., El Bedoui, J., Chataigneau, M., & Schini-Kerth, V. B. (2004). Vascular protection by dietary polyphenols. *European journal of pharmacology*, 500(1-3), 299-313.

Sugimoto, S., Yamano, Y., Khalil, H. E., Otsuka, H., Kamel, M. S., & Matsunami, K. (2017). Chemical structures of constituents from the leaves of *Polyscias balfouriana*. *Journal of natural medicines*, 71(3), 558-563.

Süleyman, H., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., & Elias, R. (2003). Acute and chronic antiinflammatory profile of the ivy plant, *Hedera helix*, in rats. *Phytomedicine*, 10(5), 370-374.

Références bibliographiques

Sun, H. P., Li, F., Cao, X. J., Ruan, Q. M., & Zhong, X. H. (2015). Analysis of genetic relations and evaluation of medicinal value among Hedera plants in China by sequence related amplified polymorphism markers and high performance liquid chromatography detection. *Biochemical Systematics and Ecology*, 63, 38-44.

-T-

Takao, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A., & Sakata, K. (1994). A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(10), 1780-1783.

Tamer, F. M. D. (2003). Free radicals, Types, sources and damaging reactions, Internal Medicine Articles.

Thilakarathna, S. H., & Rupasinghe, H. P. (2013). Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients*, 5(9), 3367-3387.

Thomas M. (2011). Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*), Thèse de Doctorat en Chimie Analytique – Phytochimie l'université d'Orléans.

Timon-David, P., Julien, J., Gasquet, M., Balansard, G., & Bernard, P. (1980). Research of antifungal activity from several active principle extracts from climbing ivy: *Hedera helix* L. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 38(6), 545-552.

Tomofuji, T., Ekuni, D., Irie, K., Azuma, T., Endo, Y., Tamaki, N., ... & Morita, M. (2009). Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. *Journal of periodontology*, 80(11), 1799-1808.

Traxer, O., Huet, B., Poindexter, J., Pak, C. Y., & Pearle, M. S. (2003). Effect of ascorbic acid consumption on urinary stone risk factors. *The Journal of urology*, 170(2), 397-401.

Trute, A., Gross, J., Mutschler, E., & Nahrstedt, A. (1997). In vitro antispasmodic compounds of the dry extract obtained from *Hedera helix*. *Planta medica*, 63(02), 125-129.

-U-

Uddin, G., Rauf, A., Qaisar, M., Latif, A., & Ali, M. (2011). Preliminary phytochemical screening and antimicrobial activity of *Hedera helix* L. *Middle East Journal of Scientific Research*, 8(1), 198-202.

Ursini, F., Tubaro, F., Rong, J., & Sevanian, A. (1999). Optimization of nutrition: polyphenols and vascular protection. *Nutrition reviews*, 57(8), 241-249.

-V-

Références bibliographiques

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry*, 266(1-2), 37-56.

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

Varthaman, A., Khallou-Laschet, J., Thauinat, O., Caligiuri, G., & Nicoletti, A. (2008). L'athérogenèse-Une maladie dysimmunitaire. *médecine/sciences*, 24(2), 169-176.

Verpoorte, R., Contin, A., & Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry reviews*, 1(1), 13-25.

Vertuani, S., Angusti, A., & Manfredini, S. (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Current pharmaceutical design*, 10(14), 1677-1694.

Villani, P., Orsiere, T., Sari-Minodier, I., Bouvenot, G., & Botta, A. (2001). In vitro study of the antimutagenic activity of alphahederin. In *Annales de biologie clinique* (Vol. 59, No. 3, pp. 285-289).

Villar, A., Gasco, M. A., & Alcaraz, M. J. (1987). Some aspects of the inhibitory activity of hypolaetin-8-glucoside in acute inflammation. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 39(7), 502-507.

Villiers, B. J., Van Vuuren, S. F., Van Zyl, R. L., & Van Wyk, B. E. (2010). Antimicrobial and antimalarial activity of *Cussonia* species (Araliaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 129(2), 189-196.

Vitor, R. F., Mota-Filipe, H., Teixeira, G., Borges, C., Rodrigues, A. I., Teixeira, A., & Paulo, A. (2004). Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(2-3), 363-370.

Voutquenne, L., Lavaud, C., Massiot, G., & Men-Olivier, L. L. (2002). Structure-activity relationships of haemolytic saponins. *Pharmaceutical Biology*, 40(4), 253-262.

-W-

Wang Yan,^b Chun-Lei Zhanga,^c Yan-Fei Liua, Dong Lianga,^d Guo-Ru Shia, Xin Wanga, Ruo-Yun Chena, Feng-Zhong Wangb, De-Quan Yua, (2019). *Biochemical Systematics and Ecology* 83 (2019) 7-9

Wang, H. B., Yao, H., Bao, G. H., Zhang, H. P., & Qin, G. W. (2004). Flavone glucosides with immunomodulatory activity from the leaves of *Pleioblastus amarus*. *Phytochemistry*, 65(7), 969-974.

Références bibliographiques

Wattenberg, L. W. (1992). Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer research*, 52(7 Supplement), 2085s-2091s.

Wattenberg, L. W., Hanley, A. B., Barany, G., Sparnins, V. L., Lam, L. K., & Fenwick, G. R. (1985). Inhibition of carcinogenesis by some minor dietary constituents. In *Princess Takamatsu Symposia* (Vol. 16, p. 193).

Wen Jun, Gregory M. Plunkett, Anthony D. Mitchell and Steven J. Wagstaff (2001). *Systematic Botany* Vol. 26, No. 1 (Jan. - Mar., 2001), pp. 144-167.

Wen, J., & Zimmer, E. A. (1996). Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the ginseng genus, Araliaceae): inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular phylogenetics and evolution*, 6(2), 167-177.

-Y-

Yaacoub, R. (2009). Impact nutritionnel et sanitaire de la torréfaction des fruits et graines oléagineux: intérêt de la fluorescence comme outil de contrôle des composés néoformés (Doctoral dissertation, Paris, AgroParisTech).

Yamamura, S., Ozawa, K., Ohtani, K., Kasai, R., & Yamasaki, K. (1998). Antihistaminic flavones and aliphatic glycosides from *Mentha spicata*. *Phytochemistry*, 48(1), 131-136.

Yao, K., De Luca, V., & Brisson, N. (1995). Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. *The Plant Cell*, 7(11), 1787-1799.

Yoshida, H., Ishikawa, T., Hosoai, H., Suzukawa, M., Ayaori, M., Hisada, T., ... & Nakajima, K. (1999). Inhibitory effect of tea flavonoids on the ability of cells to oxidize low density lipoprotein. *Biochemical Pharmacology*, 58(11), 1695-1703.

Youdim, K. A., McDonald, J., Kalt, W., & Joseph, J. A. (2002). Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(5), 282-288.

Yui, S., Ubukata, K., Hodono, K., Kitahara, M., Mimaki, Y., Kuroda, M., & Yamazaki, M. (2001). Macrophage-oriented cytotoxic activity of novel triterpene saponins extracted from roots of *Securidaca inappendiculata*. *International immunopharmacology*, 1(11), 1989-2000.

-Z-

Zerargui, F. (2018). Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis* L. et caractérisation des substances bioactives (Doctoral dissertation).

Références bibliographiques

Zhu, Q. Y., Hackman, R. M., Ensunsa, J. L., Holt, R. R., & Keen, C. L. (2002). Antioxidative activities of oolong tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6929-6934.

[1]

<https://www.google.fr/maps/place/Annaba/@36.8943702,7.7311679,31951m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x12f007bb034e7571:0x28fddce8b255b712!8m2!3d36.9142081!4d7.7426673>

Année universitaire :
2019/2020

Présenté par :
Aklouche Nour El Houda
Boussouf Romaïssa

Etude phytochimique et activité antioxydante d'une plante médicinale Algérienne du genre *Hedera* (Araliaceae)

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

Résumé

Le présent travail s'articule autour de la connaissance de la composition phytochimique et l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique des parties aériennes d'une plante médicinale Algérienne du genre *Hedera* appartenant à la famille des Araliaceae connue pour sa richesse en métabolites secondaires biologiquement actifs comme les flavonoïdes et les saponosides

Ce travail a permis la caractérisation par les méthodes chromatographiques (VLC et CCM) de différentes familles de métabolites secondaires.

L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique ainsi que la fraction 60/40 a été évaluée par les méthodes de DPPH et CUPRAC.

Mots clés : Araliaceae, *Hedera* VLC, CCM, flavonoïdes, saponosides, Activité antioxydante.

Laboratoire de recherche : Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques.

Jury d'évaluation :

TENIOU Soumia

BOUTAGHANE Naima

MOSBAH Asma

MAA. UFM Constantine

MCA. UFM Constantine

MCA. UFM Constantine

Président

Rapporteur

Examineur