

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaïa
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Biologie Physico-chimique



Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Pharmacologie Moléculaire

Thème

Etude de l'activité antioxydante de la partie aérienne d'*Hyoscyamus albus*

Soutenu le : 11 juin 2016

Membre de jury :

M^r M. TACHERFIOUT

MAA

Président

M^{me} H. KADJI

MCB

Examinatrice

M^{lle} S. ADRAR

MAB

Promotrice

Année Universitaire : 2015 / 2016

Remerciements

Louange à ALLAH, le miséricordieux qui nous a donné patience et courage afin d'achever ce travail.

Nous remercions tous particulièrement notre promotrice, M^{lle} Adrar S.

Pour l'honneur qu'elle nous a fait en nous encadrant, pour l'aide précieuse qu'elle nous a accordé au déroulement de ce mémoire.

On ne saura jamais la remercier assez pour son aide, sa disponibilité, son soutien et sa sympathie,

Pour ses remarques et ses conseils avisés, qui nous ont permis de mener à bien ce travail.

A vous, on vous prie de retrouver ici l'expression de notre respectueuse et profonde reconnaissance.

M^{me} Abderrahim S. et Mme Bejou F. pour nous avoir accueillies au sein de leurs Laboratoire ;

Mr TACHERFIOUT M.,

Vous nous avez fait l'honneur de présider ce jury et de juger ce travail ;

M^m KADJI H.,

On vous remercie de l'honneur que vous nous faites en acceptant d'examiner et d'évaluer ce travail ;

*A toute personne ayant participé de près ou de loin à notre formation et
à tous*

*Ceux qui nous ont apporté leurs soutiens et encouragements durant la
réalisation de ce travail.*

Kenza I. & Siham I.

Dédicaces

Avec ma gratitude et tout mon amour, je dédie ce modeste travail :

Aux deux êtres les plus chers au monde qui ont donné sens à mon existence, en m'offrant une éducation digne de confiance qui m'ont soutenu nuit et jours durant tous mon parcours.

J'espère que par ce travail, je vous rends un peu de sentiments et de fierté que j'éprouve d'être votre fille ;

*A ma très chère et unique sœur Souhila, ainsi que son mari
Lounis ;*

A mes très chères frères Zahir et Khalef ;

A ma promotrice M^{lle} Adrar qui a été toujours avec moi ;

A mes cousins et cousines.

A toute la famille Ifourah et la famille Sadji.

*A mes amis : Sabrina, Jawida, Meiem, Ouissam, Nadir, Nawal,
Arezki et Lyes.*

A ma chère collègue Siham et sa famille.

*A toute la promotion de Pharmacologie moléculaire
« 2015/2016 » ;*

A tous ceux qui sont été à mes côtés de près ou de loin.

Kenza. I

DEDICACE

Je dédie ce travail à toutes les personnes qui me sont chères :

À mes très chers parents, qui m'ont toujours aidée avec leurs encouragements et leurs patiences tout au long de mes études ;

À mes chers frères et chères belles sœurs : Hamid et Lamia ; Ferhat et Fouzia ; A/Karim et Siham ; Habib et Sidali ;

À mes nièces et mon neveu.

*Sans oublier mon cher frère qui n'est pas aujourd'hui parmi nous
Moussa.*

*À mes amis(e) : Kami ; Feirouz ; Katia ; Nanou ; Nadir ; Ouissam ;
Chabane ; Nawal ; Peter.*

*Sans oublier ma chère collègue Kenza et sa famille
À ma promotrice M^{elle} Adrar qui a été avec nous tout au long de
la réalisation de ce travail.*

À toute la promotion de la pharmacologie moléculaire

(2015 / 2016)

Siham I.

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1
Chapitre I : synthèse bibliographique	
I- GENERALITES SUR LA JUSQUIAME BLANCHE	
I-1- Généralités sur les jusquiames.....	2
I-2- Historique.....	2
I-3- Description botanique de la jusquiame blanche.....	2
I-4- Classification botanique.....	3
I-5- Les noms vernaculaires de la jusquiame blanche.....	4
I-6- Composition chimique	4
I-7- Usage thérapeutique.....	4
I-8- La toxicité.....	5
II- LES RADICAUX LIBRES	
II-1- Définition.....	6
II-2- Les principaux radicaux libres rencontres en biologie.....	6
II-2-1- Les espèces réactives de l'oxygène.....	6
II-2-2- Les espèces réactives azotées.....	8
II-3- Les principales sources des espèces réactive de l'oxygène et d'azote.....	8
II-3-1- Les sources endogènes.....	8
II-3-2- Sources exogènes.....	9
II-4- Rôle physiologique des radicaux libres.....	10
II-5- Stress oxydant	11
II-5-1- Définition.....	11
II-5-2- Conséquences biochimiques du stress oxydant.....	11
II-5-3- Pathologies liées au stress oxydant.....	13

III-LES ANTIOXYDANTS

III-1- Définition.....	14
III-2- Les systèmes antioxydants de l'organisme.....	14
III-2-1- Les systèmes antioxydants enzymatiques.....	14
III-2-2- Les antioxydants non enzymatiques.....	15
III-2-3- Les polyphénols	17
III-2-3-1- Définition.....	17
III-2-3-2- Les principales classes des composés phénoliques.....	17
III-2-3-3- Mécanismes antioxydants des polyphénols.....	20

Chapitre II : Matériels et méthodes

I-1- Matériel végétal.....	21
I-2- Séchage et broyage.....	21
I-3- Préparation des extraits.....	21
I-4- Dosage des composés phénoliques.....	23
I-4-1 –Dosage des phénols totaux.....	23
I-4-2-Dosage des flavonoïdes.....	24
I-4-3- Dosage des proanthocyanidines (tanins condensés).....	25
I-5- Evaluation des activités antioxydantes des extraits de la jusquiame blanche.....	26
I-5-1-Activité scavenging du radical DPPH [•]	27
I-5-2- Activité scavenging du radical ABTS ^{•+}	28
I-5-3- Pouvoir réducteur.....	29
I-5-4- Chélation du fer.....	30

Chapitre III : Résultats et discussion

III-1- Dosage des composés phénoliques.....	31
III-1-1- Dosages des phénols totaux.....	31
III-1-2- Dosage des proanthocyanidines.....	32
III-1-3- Dosage des flavonoïdes.....	33
III-2- L'activité antioxydante.....	34
III-2-1- L'activité scavenging du radical DPPH.....	34
III-2-2- L'activité scavenging du radical ABTS ^{•+}	36

III-2-3- Le pouvoir réducteur.....	38
III-3-4-La chélation du fer.....	38
Conclusion et perspectives.....	40
Références bibliographiques.....	41
Annexes	

Liste des abréviations

ABTS : 2, 2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphate.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AGPI : Acide gras poly insaturé.

AlCl₃ : Chlorure d'Aluminium.

AOX : Antioxydant.

BHA : Buty- hydroxyl- anisol.

CAT : Catalase.

Cu⁺ : Ion cuivre.

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl.

EAG : Equivalent acide gallique.

EC : Equivalent catéchine.

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique.

EQ : Equivalent quercétine.

ERN : Espèce réactive d'azote.

ERO : Espèces réactives d'oxygènes.

Fe³⁺ : Ferricyanure réductase.

FeCl₃ : Chlorure ferrique.

GPx : Glutathion peroxyde.

GR : Glutathion réductase.

GSH : Glutathion avec la forme réduit.

GSH : Glutathion.

GSSH : Glutathion disulfure.

H₂O : L'eau.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

H₃PM₀₁₂O₄₀ : Acide phosphomolybdique.

H₃PW₁₂O₄₀ : Acide phosphotungstique.

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance.

IC₅₀ : Concentration de l'extrait inhibitrice de 50% des radicaux libres.

M : Molaire.

Me⁺ : Ions métallique.

N : Azote.

NO[•] : Monoxyde d'azote.

NO₂[•] : Dioxyde d'azote.

O₂^{•-} : Anion superoxyde.

¹O₂ : Oxygène singulet.

OH[•] : Radical hydroxyle.

ONOO⁻ : Peroxynitrite.

RL : Radical libre.

SOD : Superoxyde dismutase.

TCA : Acide Trichloro Acétique.

Liste des figures

Figure n°	Titre	Page
01	Photographies d' <i>Hyoscyamus albus</i> .	3
02	Structure d'Hyoscyamine.	5
03	Structure de la scopolamine.	5
04	Origine des différents RL oxygénés et ERO impliqué en biologie.	10
05	Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire.	12
06	mécanisme de la peroxydation lipidique et ses produits terminaux.	12
07	lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.	13
08	Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques.	15
09	Structure des tanins condensés	19
10	principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques.	20
11	piégeage des RL par les polyphénols.	20
12	la plante d' <i>Hyoscyamus albus</i> .	21
13	schéma d'extraction d' <i>Hyoscyamus albus</i> .	22
14	protocole de dosage des polyphénols totaux.	23
15	Protocole de dosage des flavonoïdes.	24
16	Réaction chimique de la vanilline avec les tanins condensés.	25
17	protocole de dosage des proanthocyanidines.	26
18	forme libre et réduite du DPPH.	27
19	Teneurs en phénols totaux de la partie aérienne d' <i>Hyoscyamus albus</i> .	31
20	Teneurs en proanthocyanidines de la partie aérienne d' <i>Hyoscyamus albus</i> .	32
21	Teneurs en flavonoïdes dans les extraits d' <i>Hyoscyamus albus</i> .	33
22	Les pourcentages de l'activité scavenging du radical DPPH [•] des extraits de la partie aérienne d' <i>Hyoscyamus albus</i> et des standards.	34

23	Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition du radical DPPH [•] en fonction de la concentration de la BHA et de l'acide ascorbique.	35
24	Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition du radical DPPH [•] en fonction de la concentration en extrait aqueux du chloroforme d' <i>Hyoscyamus albus</i>	36
25	pourcentages d'inhibition du radical ABTS ^{•+} en fonction de la concentration des extraits de la jusquiame blanche.	37
26	Représentation graphique du pouvoir réducteur des extraits de la partie aérienne d' <i>Hyoscyamus albus</i> et de standard BHA.	38
27	Représentation graphique du chélation de fer des extraits de la partie aérienne d' <i>Hyoscyamus albus</i> et le standard EDTA.	39

Liste des tableaux

Tableau n°	Titre	Page
I	Classification botanique d' <i>Hyoscyamus albus</i> .	3
II	les noms vernaculaires d' <i>Hyoscyamus albus</i> .	4
III	différents antioxydants non enzymatiques.	16
IV	principales classes des flavonoïdes.	18
V	les valeurs des IC50 des différents extraits d' <i>Hyoscyamus albus</i>	37

Introduction

INTRODUCTION

A travers les temps, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base tels que, nourriture, abris, vêtements et aussi pour ses besoins médicaux. Les plantes possèdent d'extraordinaires vertus thérapeutiques. Leur utilisation pour le traitement de plusieurs maladies chez les êtres vivants et en particulier l'Homme est très ancienne et a toujours été faite de façon empirique (**Svoboda et Svoboda, 2000**).

De nos jours, nous comprenons de plus en plus que les plantes médicinales sont souvent liées aux produits des métabolites secondaires qui sont largement utilisés en thérapeutique, comme des agents préventifs : anti-inflammatoires, antimicrobiens, antiseptiques, mais essentiellement antioxydants qui défendent contre le stress oxydatif (**Bourgaude et al., 2001 ; Kar, 2007**).

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants en faveur des premiers, ce déséquilibre peut provoquer des dommages au niveau de l'organisme (**Pincemail, 1998**). Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydants / antioxydants afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme (**Laguerre et al., 2007**).

Hyoscyamus albus classée parmi les plantes médicinales, appartient à la famille des solanacées. Elle est utilisée pour ses nombreuses propriétés pharmacologiques (antioxydantes, anti-inflammatoires et hépatoprotectrices). Par conséquent, l'objet de notre étude consiste à évaluer l'activité antioxydante de la partie aérienne de cette plante.

Le présent travail est scindé en deux parties, la première regroupant des généralités sur la plante « jusquiame blanche » et sur les radicaux libres et antioxydants sous forme d'une synthèse bibliographique ; la seconde partie, la partie pratique a comme objectif le dosage des composés phénoliques totaux, flavonoïdes et proanthocyanidines, et la détermination de l'activité antioxydante par quatre différents tests (pouvoir réducteur, chélation du fer et l'activité scavenging des deux radicaux DPPH[•] et ABTS^{•+}).

Chapitre I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I- GENERALITES SUR LA JUSQUIAME BLANCHE**I-1- GENERALITES SUR LES JUSQUIAMES**

Les jusquiames appartiennent au genre *Hyoscyamus* et à la famille des solanacées, qui comporte environ de 2000 espèces (**Goullé et al., 2004**). Elles sont largement repartis dans le monde, aussi bien dans les zones tropicales que tempérées. Trois d'entre elles sont présentes dans la flore Algérienne : jusquiame noir (*Hyoscyamus neiger*), jusquiame blanche (*Hyoscyamus albus*) (figure1), jusquiame d'Egypte (*Hyoscyamus muticus*), connues depuis des millénaires pour leurs propriétés médicinales (**Hammiche et al., 2013**).

I-2- HISTORIQUE

En 1550 avant J.C., la jusquiame est mentionnée sur le papyrus Ebers de l'Egypte pharaonique, où elle voisine avec l'opium et le chanvre. Dès cette époque, la jusquiame est connue et utilisée comme un poison violent.

Un peu plus tard, en Grèce certaines découvertes thérapeutiques sont attribuées aux héros et aux dieux ; à Hercule, l'héracléion ou *Hyoscyamus albus*. En effet, atteints de troubles nerveux, Hercule utilisait les effets sédatifs de cette plante.

En Gaule, dès l'époque romaine, on utilise la jusquiame pour ses propriétés antinévralgiques.

Pendant la seconde guerre mondiale, la scopolamine, un alcaloïde de la jusquiame, fait perdre la volonté, responsable d'une amnésie antérograde et a été utilisée comme «sérum de vérité» (**Goullé et al., 2004**).

I-3- DESCRIPTION BOTANIQUE DE LA JUSQUIAME BLANCHE

Hyoscyamus albus (jusquiame blanche) est une plante annuelle ou bisannuelle, utilisée comme une source d'hyoscyamine, qui est un médicament anticholinergique important d'origine végétale (**Tamari et al., 2014**).

Cette variété est une plante herbacée, qui mesure de 20-80 cm de hauteur, à poils glanduleux, denses, collantes, à odeur désagréable et ayant une tige dressée et mince.

Les feuilles alternes, petites (4 à 10cm de longueur), larges, ovales, à long pétiole, à dents en encoches obtuses et de couleur vert clair.

Au printemps, la floraison donne des fleurs en forme de cloches, sessiles en épis denses se tournant d'un côté, de 1 à 3 cm de longueur, la corolle est blanc jaunâtre avec la gorge verdâtre ou brunâtre (Bayer *et al.*, 1990).

Le fruit en forme de tulipe de 1.5 à 2cm, est une capsule fermée par un opercule, elle renferme plusieurs centaines de graines.

La graine en forme triangulaire brune grisâtre, sont très petites (1mm), à surface réticulée (Hammiche *et al.*, 2013).

**(A)****(B)****(C)**

Figure 01 : photographies d'*Hyoscyamus albus* :(A) plante, (B) feuille, (C) fleurs (**Originale**).

I-4- CLASSIFICATION

Tableau I : Classification botanique d'*Hyoscyamus albus* (Kadi, 2010).

Règne	Végétal
Embranchement	Spermatophytes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Tubiflores
Famille	Solanacées
Genre	<i>Hyoscyamus</i>
Espèce	<i>Hyoscyamus Albus</i>

I-5- LES NOMS VERNACULAIRES DE LA JUSQUIAME BLANCHE

Les noms de cette plante sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau II : les noms vernaculaires d'*Hyoscyamus albus*.

Langue	Nom	références
Français	Jusquiame blanche	(Goullé <i>et al.</i> , 2004).
Anglais	White henbane	(Tamari <i>et al.</i> , 2014).
Arabe	Sikran, Bounerjouf,	(Hammiche <i>et al.</i> , 2013).
Berbère	Tesker.	(Hammiche <i>et al.</i> , 2013).
Le nom scientifique : <i>Hyoscyamus albus</i> .		

I-6- COMPOSITION CHIMIQUE :

L'analyse phytochimique révèle la présence des composés phénoliques (des flavonoïdes, des tanins condensés), des terpènes, des saponines, des alcaloïdes et des stéroïdes (**Benhouda et Yahia, 2014**).

La teneur en alcaloïdes totaux est de l'ordre de 0.04 à 0.15%. Celle de la feuille est de 0.05 à 0.15% et celle de la graine peut atteindre 0.3%.

L'hyoscyamine y est majoritaire mais la scopolamine peut représenter 25% jusqu'à 40% des alcaloïdes totaux.

La feuille de la jusquiame est particulièrement riche en matière minérale qui atteint 20%.

Par ailleurs, la plante contient 15 à 20% d'huile (**Hammiche *et al.*, 2013**).

I-7- USAGE THERAPEUTIQUE

La composition phytochimique très variée de la jusquiame lui confère plusieurs activités biologiques et effets thérapeutiques :

La jusquiame est un parasympholytique léger avec des propriétés sédatives marquées.

Par ailleurs, elle est employée jusqu'au début des années 1990 comme antispasmodique, antiasthmatique, analgésique locale, antiparkinsonien, antinévralgique (**Hammiche *et al.*, 2013**).

Les flavonoïdes ont été signalés à présenter des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, et hépatoprotectives. En outre, des tanins condensés ont été suggérées comme piègeurs de radicaux libres et anti-inflammatoires (**Benhouda et Yahia, 2014**).

L'hyoscyamine et l'atropine sont utilisées en médecine, par exemple, en ophtalmologie, dans le traitement des spasmes gastro-intestinaux, dans le traitement des intoxications aux organophosphorés et en anesthésie (**Romeike et al., 1956**).

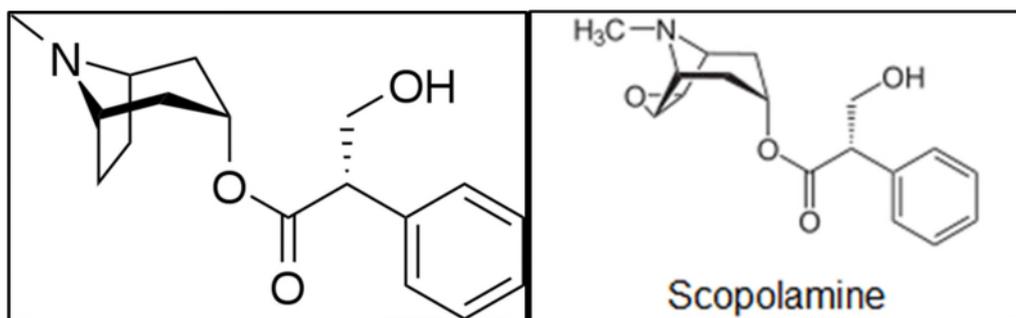


Figure 02 : structure d'Hyoscyamine [1].

Figure 03 : structure de la Scopolamine [2].

I-8- LA TOXICITE

Les végétaux (plantes et fruits) sont à l'origine d'environ 5 % des cas d'intoxication humaines (**Barguil et Anger, 2012**).

Les jusquiames sont connues pour leur toxicité. Les intoxications accidentelle sont rares car, la plante est très velue, le fruit peu attirant et l'odeur est désagréable.

En Algérie il s'agit souvent d'incident en relation avec l'usage traditionnel ou les utilisations dans un but criminel.

L'hyoscyamine est une molécule qui peut agir comme un antagoniste des récepteurs muscariniques, qui s'opposent par un blocage compétitif et réversible des récepteurs périphériques et centraux à l'action de l'acétylcholine, par contre ont une faible activité antagoniste sur les effets de l'acétylcholine sur les récepteurs nicotiniques (**Goullé et al., 2004**).

Symptômes : Signes anticholinergiques, Convulsions, Tachycardie, troubles nerveux et visuels, hallucinations auditives, des éruptions cutanées, sensation de brulures au niveau de la gorge et de la bouche, de l'ivresse, un sommeil profond.

Traitement : antidote spécifique proposé est la néostigmine (prostigmine 0.5mg) qui agit au niveau central et périphérique (**Hammiche et al., 2013**).

II- LES RADICAUX LIBRES

II-1- DEFINITION

Un radical libre (RL) est une espèce chimique, capable d'avoir une existence indépendante en contenant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe. Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte (10^{-9} - 10^{-6} S). En effet, ce RL aura toujours tendance à remplir son orbitale pour devenir plus stable : soit par la perte d'un électron (espèce réductrice), ou en obtenant un électron (espèce oxydante) ; de plus, il peut lui-même s'auto-oxyder par une réaction appelée dismutation (**Goudable et Favier, 1997 ; Pierrefiche et Laborit, 1995**).

II-2- LES PRINCIPAUX RADICAUX LIBRES RENCONTRES EN BIOLOGIE

En biologie, les principaux radicaux libres rencontrés sont les espèces réactives oxygénées (**ERO**) et les espèces réactives azotées (**ERN**).

II-2-1- LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE

L'oxygène est une molécule pourtant indispensable à la vie, représente paradoxalement, une menace permanente pour les organismes aérobies (**Gardés-Albert *et al.*, 2003**), en entraînant des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées (ERO) (**Haleng *et al.*, 2007**).

En effet, c'est au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie où la majorité de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente, conduisant à la production d'eau

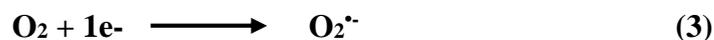


La réduction de la molécule ne peut se faire que par l'enchaînement de plusieurs étapes, donnant naissance à des intermédiaires réduits de l'oxygène (**Vamecq *et al.*, 2004**).



➤ L'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

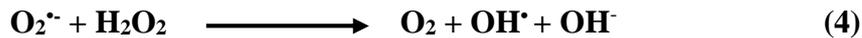
L'anion superoxyde est un radical issu d'une réduction monoélectronique, au niveau de l'ubiquinone (ou coenzyme Q) ; c'est une espèce toxique (**Gardés-Albert *et al.*, 2003**).



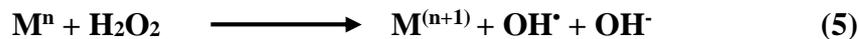
➤ Radical hydroxyle (OH[•])

Le radical hydroxyle est le composé le plus réactif. Il agit en captant un électron d'une autre molécule. Il est formé lors des réactions d'ions métalliques avec le peroxyde d'hydrogène. Elles sont décrites sous le nom de réactions d'Haber Weiss et de Fenton :

- Réaction d' Haber- Weiss :



- Réaction de Fenton :

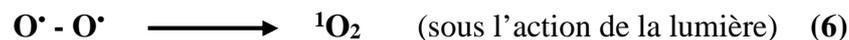


Où **M** est un ion métallique de transition (Fe²⁺ ou Cu⁺).

Le radical hydroxyle, constitue certainement le radical libre le plus toxique en biologie (**Borg et Reeber, 2008**).

➤ L'oxygène singulet (¹O₂)

L'oxygène fondamental (celui que nous respirons) possède deux électrons célibataires, sous l'impact d'un photon il peut se transformer en oxygène singulet (forme excitée de l'oxygène moléculaire). Cette molécule est instable. Il est produit principalement par photosensibilisation (risque cutané) (**Borg et Reeber, 2008**).

**➤ Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)**

Le radical superoxyde qui présente une certaine toxicité est éliminé ou tout au moins maintenu à un niveau de concentration assez bas par des enzymes appelées superoxyde dismutase (SOD), qui catalyse sa disparition par dismutation en donnant naissance à un autre radical : le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), qui est relativement toxique et moins réactif que l'anion superoxyde, mais il possède une capacité de diffusion importante, une durée de vie plus longue et il diffuse facilement à l'intérieur des cellules.



II-2-2- LES ESPECES REACTIVES AZOTEES

Les espèces réactives azotées (ERN) jouent un rôle essentiel dans la génération de radicaux libres, elles sont produites abondamment au cours des processus inflammatoires (**Rao et al., 2011**).

➤ **Le monoxyde d'azote (NO[•])**

Le monoxyde d'azote (NO[•]) est un RL qui est surtout réputé pour ses propriétés physiologiques. Or, le NO[•] interagit avec l'anion superoxyde pour donner le peroxynitrite, composé extrêmement réactif et toxique. Le NO[•] et le peroxynitrite interagissent avec des protéines et peuvent altérer leurs propriétés (**Barouki, 2006**).

➤ **Le peroxynitrite (ONOO⁻)**

Le peroxynitrite existe physiologiquement à l'état d'anion (ONOO⁻), une proportion de peroxynitrite peut exister sous la forme acide (HOONO).

Le ONOO⁻ est une espèce oxydante importante, car sa réactivité est assez proche de celle du radical hydroxyle (OH[•]), le plus réactif des ERO, donc très toxique. Il n'existe aucun système enzymatique spécifique capable de le dégrader (**Vamecq et al., 2004**).

II-3- LES PRINCIPALES SOURCES DES ERO ET DES ERN

Les sources de ces espèces peuvent être endogènes ou exogènes :

II-3-1- LES SOURCES ENDOGENES

La plus part des RL sont produits par divers mécanismes physiologiques, parmi les processus endogènes qui peuvent conduire à leurs formation, on peut citer :

➤ **La chaîne respiratoire**

La respiration mitochondriale conduit essentiellement à la réduction de l'oxygène en eau par transfert de quatre électrons par le cytochrome oxydase du complexe IV. Seulement 2 à 3 % de l'oxygène consommé par la mitochondrie sont convertis en anion superoxyde O₂^{•-} au niveau de plusieurs sites potentiels (**Bonnefont-Rousselot et al., 2002**).

➤ La Phagocytose

L'inflammation est par ailleurs, une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées lors de la réaction inflammatoire, sont le siège d'un phénomène appelé explosion oxydative (la flambé respiratoire), consistant en l'activation du complexe de la NADPH oxydase, enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anion superoxyde au niveau de la membrane cellulaire (**Favier, 2003**).

➤ Les enzymes

Un autre système enzymatique capable de générer $O_2^{\cdot-}$ par transfert d'un électron sur l'oxygène est la xanthine oxydase. L'ischémie et l'hypoxie favorisent la conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase et l'accumulation de son substrat, l'hypoxanthine. Cette enzyme apparait donc comme une source potentielle importante d'ERO (**Bonnefont-Rousselot, 2002**).

II-3-2- SOURCES EXOGENES

L'organisme humain est soumis à l'agression par différents agents extérieurs capables de donner naissance à des ERO et des ERN.

Ces agressions peuvent être : des radiations (rayon X et lumière UV), polluants de l'air (N, NO_2), solvants organiques, anesthésiques, pesticides, drogues, exercice physique intense, carences nutritionnelles (**Tessier et Garçonnet, 1995 ; Rao P et al., 2011**).

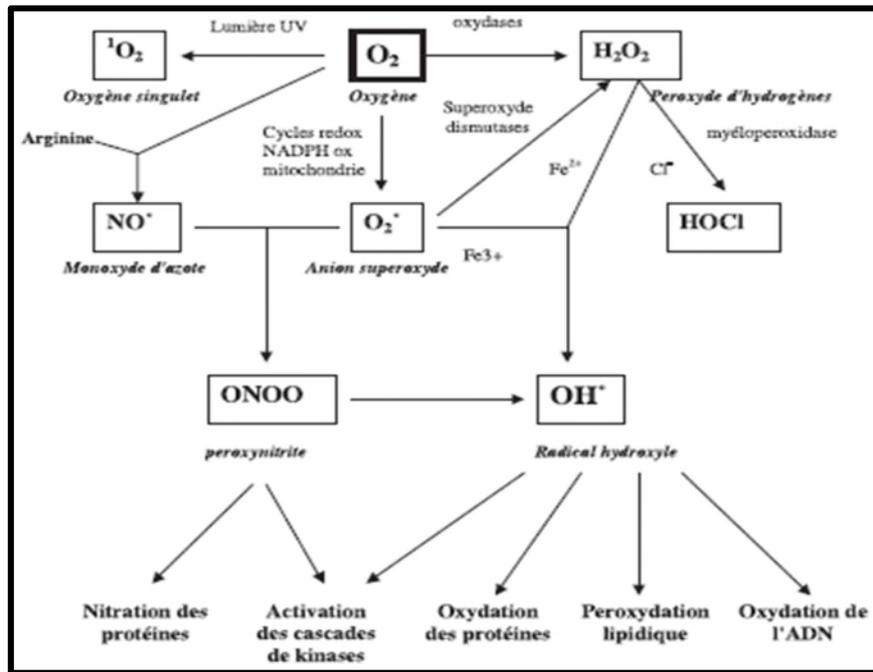


Figure 04 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003).

II-4- RÔLE PHYSIOLOGIQUE DES RADICAUX LIBRES

Le paradoxe des RL en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie (Favier, 2003).

Le métabolisme cellulaire normal de l'oxygène produit de manière continue de faibles quantités de dérivés réactifs de l'oxygène qui jouent un rôle important dans la destruction des micro-organismes et des cellules tumorales (Berger, 2006).

Ils sont ainsi impliqués dans les phénomènes d'apoptose, dans la prolifération des cellules musculaires lisses, dans l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales, ou bien encore dans l'agrégation plaquettaire.

De plus, les radicaux sont capables de modifier l'activité de certains enzymes (tyrosine kinases), conduisant en aval à activer des facteurs de transcription (protéines spécifiques) qui vont initier l'expression des gènes «redox-sensibles» (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

II-5- STRESS OXYDANT**II-5-1- DEFINITION**

En 1991, **Sies** a défini la notion de stress oxydant comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des ERO, suite à un déséquilibre lié soit à une production accrue d'ERO, soit à une diminution de la capacité de défense antioxydante (**Defraigne et Pincemail, 2007**).

II-5-2- CONSEQUENCES BIOCHIMIQUES DU STRESS OXYDANT

Dans les systèmes vivants, la production des radicaux libres oxygénés se fait de manière continue. Toutes les molécules biologiques possédant des doubles liaisons sont particulièrement affectées par les radicaux libres, entraînant la très grande réactivité de ces espèces chimiques vis-à-vis des lipides, des protéines et de l'ADN. C'est pourquoi les effets des RL sont retrouvés dans tout l'organisme et dans des pathologies très variées (**Goudable et Favier, 1997**).

➤ Effets sur les protéines

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des ERO. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine (**Haleng et al., 2007**).

Les dommages oxydatifs créés sur les protéines entraînent des modifications de leur chaîne peptidique telles que des ruptures (**Béguel, 2013**).

On constate également la formation de pont disulfures qui modifient la conformation des protéines et nuisent à leurs activités biologiques (activité enzymatique, transduction d'un signal ou système de transport) (**Borg et Reeber, 2008**).

Ces altérations protéiques perturbent les processus de signalisation et de transcription, conduisant à une dérégulation de certains gènes, (**Deby-Dupont et al., 2002**).

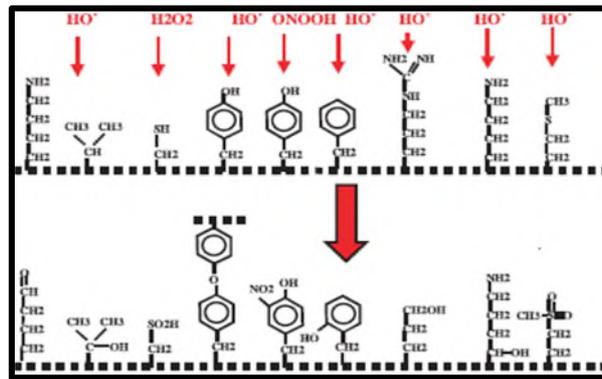


Figure 05 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d’acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

➤ Effets sur les lipides

Les lipides, et principalement leurs acides gras polyinsaturés (AGPI) sont la cible privilégiée de l’attaque par le radical hydroxyle. Ce radical est capable d’arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des AGPI pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction appelée **peroxydation lipidique**.

La peroxydation lipidique induit une altération de la fluidité, de la perméabilité et de l’excitabilité des membranes, qui conduit inévitablement à la mort cellulaire (Cillard et Cillard, 2006).

Le mécanisme de la peroxydation est résumé dans la figure 4 :

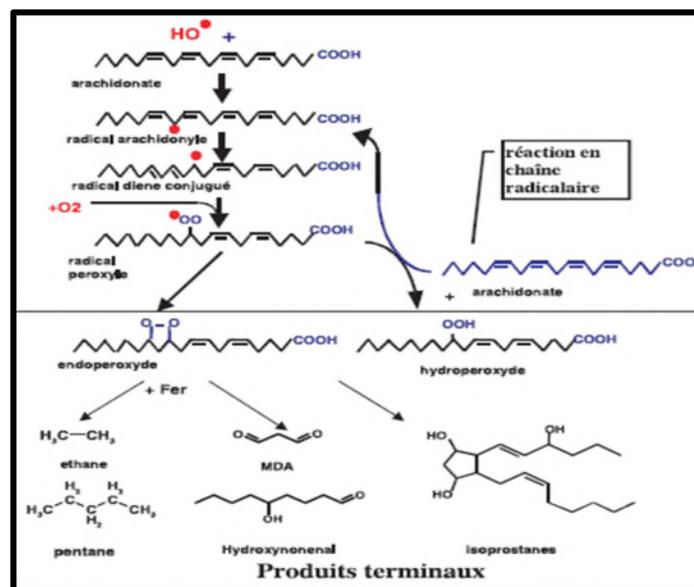


Figure 06 : mécanisme de la peroxydation lipidique et ses produits terminaux (Favier, 2003).

➤ Effets sur les acides nucléiques

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène.

L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées. Ces altérations structurales lorsqu'elles ne sont pas «réparées» entraînent à long terme des altérations géniques : cassures chromosomiques, mutations, délétions, amplifications, à l'origine d'un dysfonctionnement au niveau du métabolisme protéique (Favier, 2003 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006).

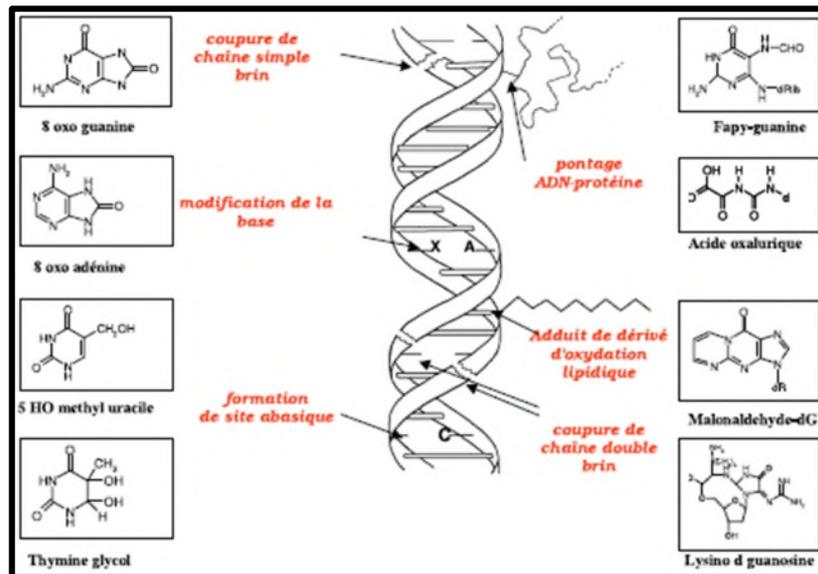


Figure 07 : lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003).

II-5-3- PATHOLOGIES LIEES AU STRESS OXYDANT

Si un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il constitue un terrain favorable au développement de pathologies diverses. Il est potentiellement impliqué dans le développement du vieillissement ou de pathologies associées au vieillissement. A titre d'exemple, l'oxydation des lipides est un facteur favorisant la survenue de maladies cardiovasculaires tandis que celle de l'ADN se retrouve dans diverses étapes qui conduisent au développement de cancer, diabète, l'hypertension, dégénérescence musculaire, asthme (Defraigne et Pincemail, 2007 ; Haleng et al., 2007).

III-LES ANTIOXYDANTS

III-1- DEFINITION

Un antioxydant (AOX) est une substance qui, ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, capable d'inhiber ou retarder significativement l'oxydation de ce dernier, en augmentant le temps au bout duquel intervient une altération décelable du produit (Choe et Min, 2009 ; Avlessi *et al.*, 2004).

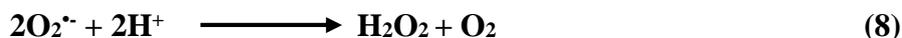
Ils sont interdépendants. En donnant un électron, ils deviennent eux-mêmes des radicaux libres qui doivent se rééquilibrer, autrement dit être réduits (Berger, 2006).

III-2- LES SYSTEMES ANTIOXYDANTS DE L'ORGANISME

III-2-1- LES SYSTEMES ANTIOXYDANTS ENZYMATIQUES

➤ Superoxyde dismutase (SOD)

La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme qui élimine l'anion superoxyde par une réaction de **dismutation**.



La réaction de dismutation se déroule principalement en deux étapes :

- Tout d'abord, l'enzyme portant un ion cuivrique se lie à un premier anion superoxyde pour former de l'oxygène. Le cuivre est réduit en ion cuivreux.



- L'enzyme portant un ion cuivreux se lie alors à un deuxième anion superoxyde pour former du peroxyde d'hydrogène. Le cuivre se repasse sous forme cuivrique.



Une réaction similaire peut se produire dans la mitochondrie avec une autre SOD qui utilise comme cofacteur des ions manganèse (Borg et Reeber, 2008).

➤ La catalase (CAT)

La catalase (CAT) est une enzyme qui permet de transformer le peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire et en eau (Vergely et Rochette, 2003 ; Matés *et al.*, 1999).



➤ La glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR)

La GPx est une sélénoprotéine (cinq isoformes) qui réduit le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau. Lors de cette réaction qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH) celle-ci se transforme en glutathion disulfure (GSSG) (Vergely et Rochette, 2003 ; Matés *et al.*, 1999).



La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir de GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (Lee et Min, 2004 ; Sorg, 2004).

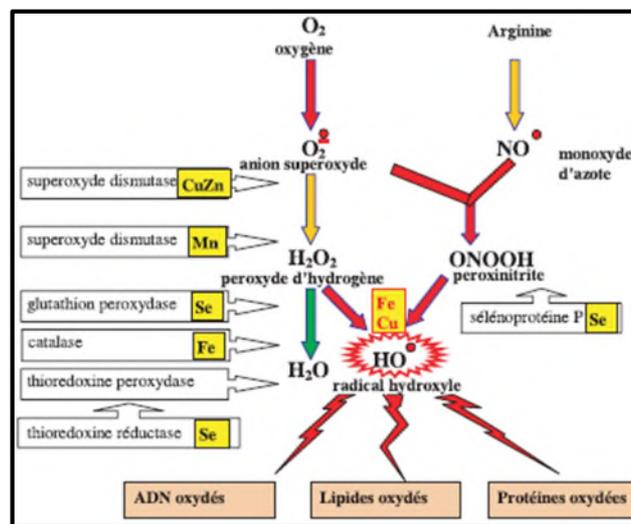
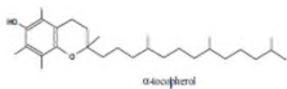
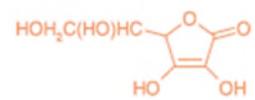
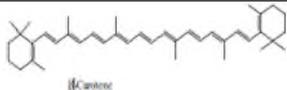
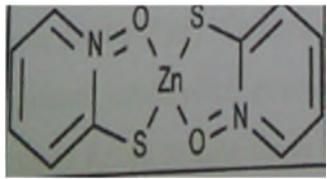
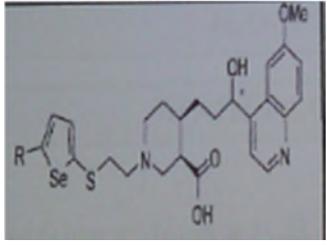


Figure 08 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

III-2-2- LES ANTIOXYDANTS NON ENZYMATIQUES

C'est la seconde ligne de défense « les piègeurs des radicaux libres » qui sont des composés pour la plupart apportés par l'alimentation et dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des ERO, limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire, on retrouve certaines vitamines : la vitamine E, C et A (Koechlin-Ramonatxo, 2006) ; à ceux-là s'ajoutent quelques oligo-éléments (zinc, sélénium) (Berger, 1997).

Tableau III : différents antioxydants non enzymatiques.

Molécule	Structure chimique	Mode d'action
Vitamines		
Vitamine E (α-tocophérol)	 <p>(Hai Liu, 2007)</p>	capte alcoxyles et peroxydes issus de la peroxydation lipidique, donc elle interrompt la chaîne de propagation radicalaire dans les membranes et les lipoprotéines soumises à un stress oxydant (Baudin, 2006).
Vitamine C (acide ascorbique)	 <p>acide ascorbique (Gardese-albert <i>et al.</i>, 2003).</p>	capable de piéger les radicaux superoxydes et hydroxyles, ainsi que régénérer la vitamine E (Podsedek, 2007). Agit en synergie avec la vitamine E pour mettre fin à la peroxydation lipidique (Ayepola, 2014).
Vitamine A (β-carotène)	 <p>(Hai Liu, 2007)</p>	Neutralise l'oxygène singulet et le radical peroxyde (Laguerre <i>et al.</i> , 2007)
Oligo-éléments		
zinc		le zinc est l'un des cofacteurs essentiels de la SOD. il peut inhiber les réactions de formation d'ERO induites par des métaux de transition comme le fer ou le cuivre (Haleng <i>et al.</i> , 2007)
sélénium		Il joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire. Cette fonction est due à sa présence dans le site actif des glutathions peroxydases séléno-dépendantes et à l'activité biologique anti radicalaire des sélénoprotéines. L'activité anti radicalaire est complétée par ses propriétés immuno-modulatrices (Roussel et Ferry, 2002).

III-2-3- LES POLYPHENOLS**III-2-3-1- DEFINITION**

Les polyphénols dont plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues, sont des produits du métabolisme secondaire des plantes (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

Ils sont synthétisés à partir de deux voies biosynthétiques :

- celle de l'acide shikimique, qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples ;
- celle issue de l'acétate, qui conduit à des poly β -coesters (poly acétates) de longueur variable menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les dihydroxy-1,8 anthraquinones ou les naphtoquinones (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

III-2-3-2- LES PRINCIPALES CLASSES DES COMPOSES PHENOLIQUES

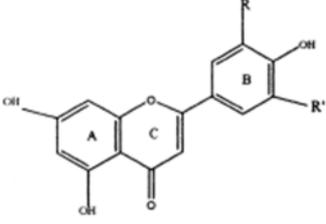
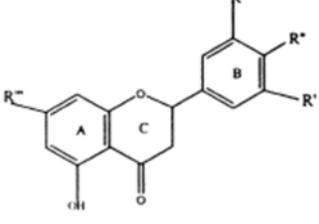
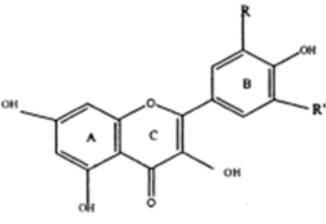
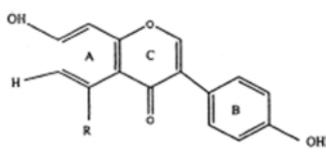
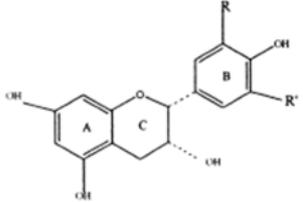
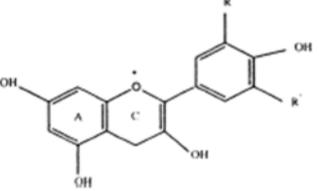
Les polyphénols sont des composés principalement de trois familles : les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Bien que non essentielles, ces substances jouent pourtant un rôle majeur dans la lutte contre le stress oxydant (**Curtay et Robin, 2000**).

➤ Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques, formés d'un squelette à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), ils comprennent plusieurs milliers de molécules regroupées en plus de dix classes dont certaines ont une très grande importance biologique (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006 ; Collin et Crouzet, 2011**).

Les principales classes des flavonoïdes sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau IV : principales classes des flavonoïdes (Aruoma et al., 2003).

Classe	Structure chimique
Flavones	
Flavanones	
Flavonols	
Isoflavones	
Flavanols	
Anthocyanidines	

➤ **Les phénols simples et les acides phénoliques**

Le terme phénolique s'adresse à des composés comportant un ou plusieurs groupements hydroxyles griffés sur un noyau benzénique, on distingue :

- **Acides hydroxybenzoïques** : Ils sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C6-C1. Ils existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides et peuvent également être intégrés dans des structures complexes.
- **Acides hydroxycinnamiques** : ils représentent une classe très importante dont la structure de base est C6-C3, qui dérive de celle de l'acide cinnamique, ils peuvent exister sous forme estérifiée par l'acide quinique (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

➤ **Les tanins**

Les tanins sont un groupe de polyphénols à haut poids moléculaire. Ce sont des molécules fortement hydroxylées, pouvant former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives.

On distingue : les tanins hydrolysables et condensés (**Alkurd et al, 2008**).

- **Les tanins hydrolysables** : qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variables d'acides phénols. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotanins soit l'acide ellagique dans le cas des ellagitanins (**Bruneton, 1993 ; Cowan, 1999**).
- **Les tanins condensés (proanthocyanidines)** : qui diffèrent fondamentalement des tanins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leurs molécules et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit de polymères flavaniques constitués d'unités de flavane-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone (**Bruneton, 1993**).

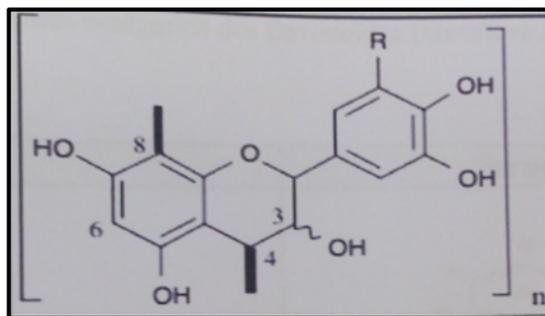


Figure 09 : Tanins condensés (**Haslam, 2007**).

III-2-3-3- MECANISMES ANTIOXYDANTS DES POLYPHENOLS

Plusieurs modes d'action de l'activité antioxydante des polyphénols ont été décrits.

➤ **Chélation des métaux de transition :**

Les polyphénols ont une activité chélatrice des métaux tels que cuivre et fer, qui, à l'état libre, peuvent être à l'origine de la production de radicaux libres par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss (Curtay et Robin, 2000).

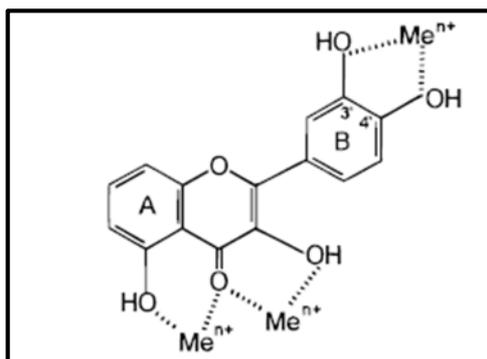


Figure 10 : principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques (Me^{n+}) (Pietta, 2000).

- **Inhibition enzymatique :** certains des polyphénols sont capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices d'ERO, comme la xanthine oxydase, la protéine kinase C, cyclooxygénase et lipooxygénase (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).
- **Piégeage des radicaux libres :** A cause de leur faible potentiel redox, les flavonoïdes sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants par transfert d'hydrogène. Les flavonoïdes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires (Javanovic *et al.*, 1994 ; Van Acker *et al.*, 1996).

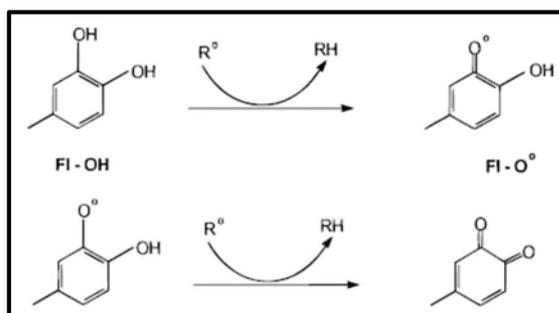


Figure 11 : piégeage des RL par les polyphénols (Pietta, 2000).

PARTIE
PRATIQUE

Chapitre II

*MATÉRIELS
ET
MÉTHODES*

II-1- MATERIEL VEGETAL

Notre étude a été réalisée sur la partie aérienne de *Hyoscyamus albus*, une plante de la famille des solanacées, qui a été récoltée en février 2016 dans deux régions de la wilaya de Bejaia à savoir : Bejaia ville et Boukhelifa.

Une photographie de la plante est illustrée dans la figure 12



Figure 12 : la plante d'*Hyoscyamus albus* (Originale).

II-2- SECHAGE ET BROUAGE

Après avoir nettoyé toute la partie aérienne de *Hyoscyamus albus* (feuilles, fleurs, tiges), cette dernière a été séchée à l'étuve à 40°C, pendant une semaine.

Le broyage a été effectué à l'aide d'un broyeur électrique, jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine.

II-3- PREPARATION DES EXTRAITS

Le protocole d'extraction suivi dans cette étude est celui de **Chiang et al., (1994)**, ayant subi quelques modifications.

a) Principe

Le principe de cette méthode se base sur l'extraction sélective liquide-solide des composés phénoliques en utilisant trois solvants de différentes polarités : l'éthanol, chloroforme et l'eau. Les étapes d'extraction qui suivront ont été réalisées à température ambiante.

b) Mode opératoire

Il s'agit de mettre 200 g de poudre d'*Hyoscyamus albus* dans 800 ml d'éthanol 96%, avec un rapport de 1/4, et la laisser macérer sous agitation magnétique pendant 24h.

Après décantation de la suspension pendant 24h, l'extrait humide a été prélevé à l'aide d'une pipette et filtré à travers un filtre en papier puis versé dans une boîte de pétri, qui sera réservé pour les tests, et le reste dans un bécher qui servira pour la deuxième étape d'extraction.

Finalement l'extrait humide a été séché à l'étuve à 40°C jusqu'à atteindre un poids constant de l'extrait sec. La deuxième étape consiste à dissoudre l'extrait sec d'éthanol dans un mélange de solvants : le chloroforme et l'eau distillée (3/1, v/v).

Après agitation et décantation pendant 24h, deux phases, organique et aqueuse, ont été observées puis récupérées et séchées (figure 13).

Il est à noter, qu'après l'extraction trois extraits ont été obtenus.

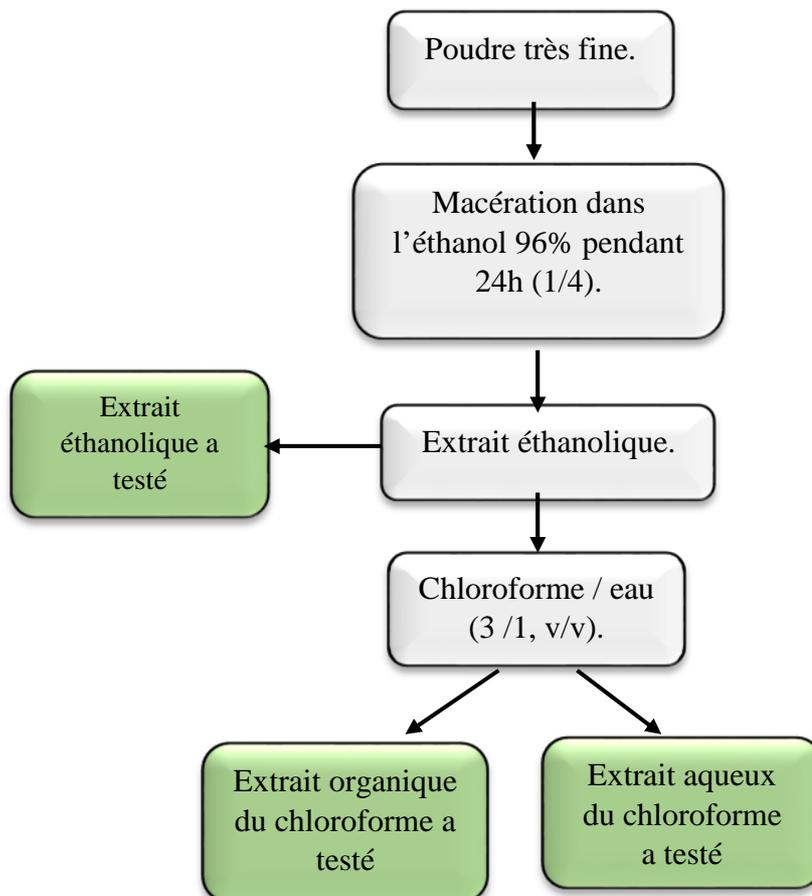


Figure 13 : schéma d'extraction d'*Hyoscyamus albus* (Chiang *et al.*, 1994).

II-4- DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES

Dans le but de déterminer la teneur en composés phénoliques des extraits de la partie aérienne d'*Hyoscyamus albus*, trois protocoles ont été suivis afin de doser les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en proanthocyanidines.

II-4-1 –Dosage des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été effectué selon la méthode citée par (Yap *et al.*, 2009) avec légères modifications (figure 14).

a) Principe

La teneur phénolique totale est déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ces essais sont basés principalement sur la réduction de réactif dans une solution alcaline (Vuorela, 2005).

Le réactif est constitué par mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Boizot et Charpentier, 2006).

b) Mode opératoire

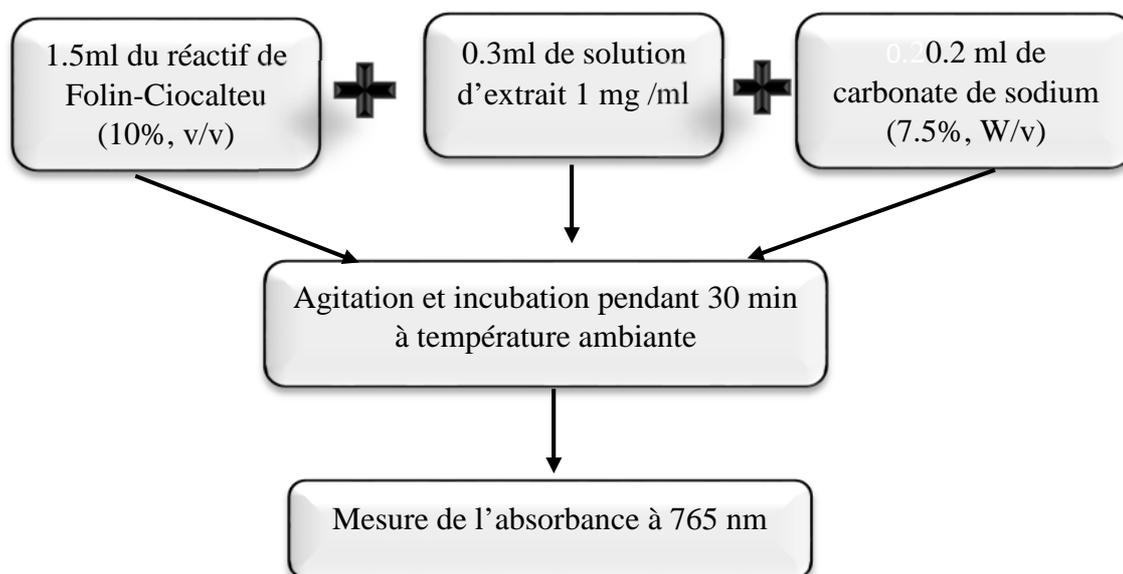


Figure 14 : protocole de dosage des polyphénols totaux (Yap *et al.*, 2009).

N.B : un blanc d'extrait a été préparé en mélangeant 0.3 ml de méthanol avec 1.5 ml de Folin-Ciocalteu et 0.2 ml de la solution de carbonate de sodium.

c) Expression des résultats

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant l'acide gallique comme standard afin de déterminer les concentrations en phénols totaux des extraits exprimées en mg équivalent acide gallique / g d'extrait.

II-4-2-Dosage des flavonoïdes

La détermination de la teneur en flavonoïdes des extraits est effectuée par la méthode de **Mimica-Dukic, (1992) in Abdou Bouba et al., (2010)** (figure 15).

a) Principe

Ce protocole se base sur la formation d'un complexe jaunâtre aluminium- flavonoïde par chélation des métaux (fer et aluminium), qui est due à la présence des groupements hydroxyles libres (**Riberau-Gayon, 1968**).

b) Mode opératoire

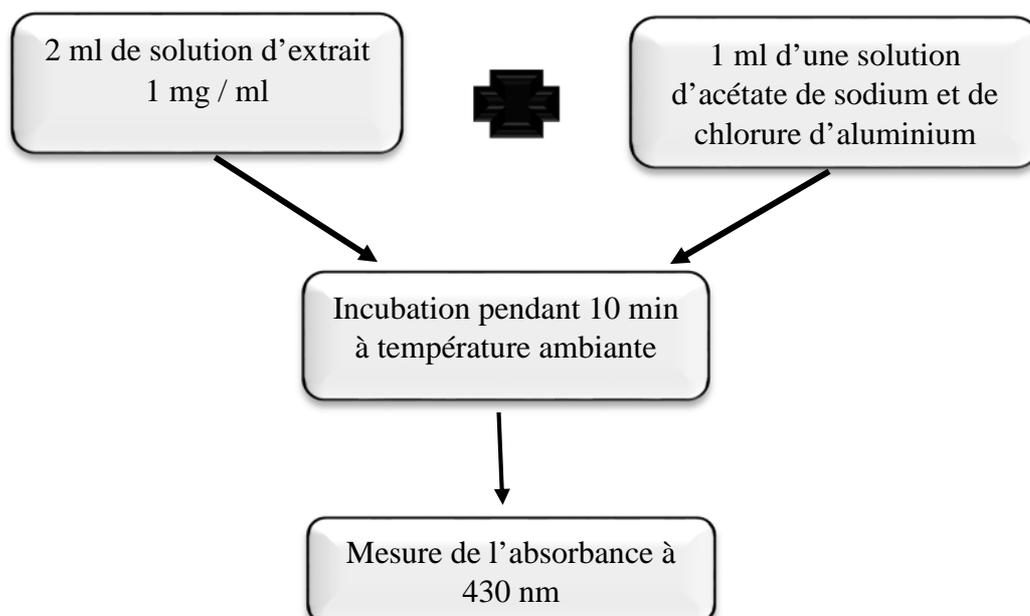


Figure 15 : Protocole de dosage des flavonoïdes (**Abdou Bouba et al., 2010**).

N.B : un blanc d'extrait a été préparé en mélangeant 2 ml de solution d'extrait avec 1 ml d'eau distillée.

c) Expression des résultats

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant la quercétine comme standard et la concentration a été exprimée en mg équivalent quercétine / g d'extrait.

II-4-3- Dosage des proanthocyanidines (tanins condensés)

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode citée par (Sun *et al.*, 1998) in Oyedimi et Afolayan, (2011) avec quelques modifications (figure 17).

a) Principe

Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm. La réactivité de la vanilline avec les tanins n'implique que la première unité du polymère (figure 16) (Ba *et al.*, 2010).

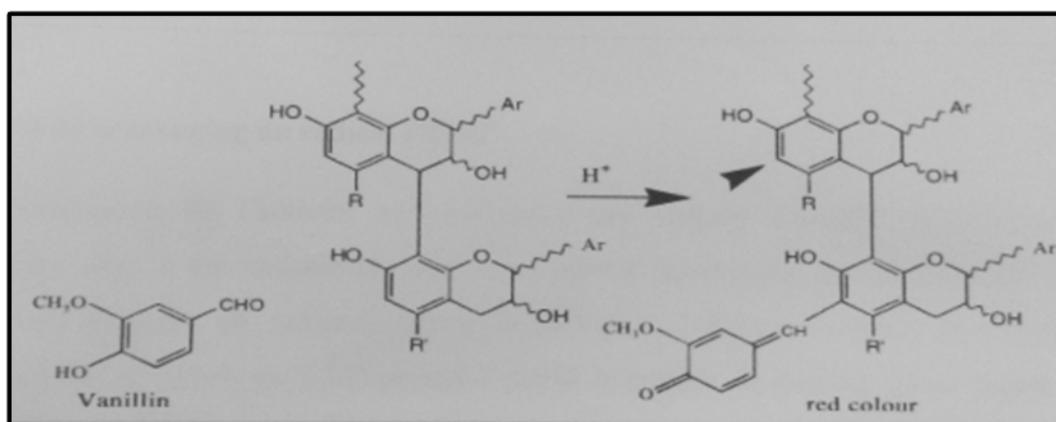


Figure 16 : Réaction chimique de la vanilline avec les tanins condensés (Schofield *et al.*, 2001).

b) mode opératoire

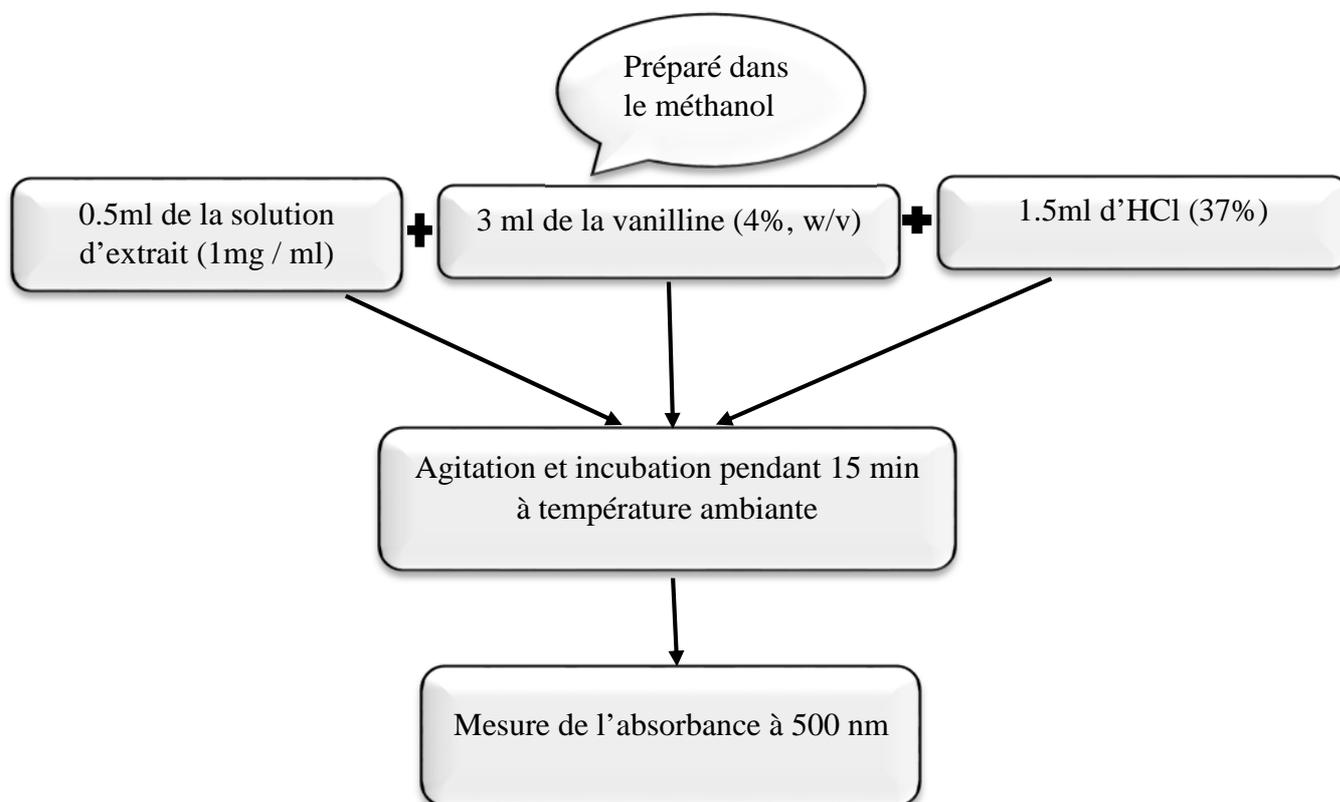


Figure 17 : protocole de dosage des pro-antocyanidines (Oyedim et Afolayan, 2001).

N.B : un blanc d'extrait a été préparé en mélangeant 0.5 ml de la solution d'extrait avec 3 ml de méthanol et 1.5 ml d'HCl.

c) Expression des résultats

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant la catéchine comme standard, et la concentration a été exprimée en mg équivalent catéchine / g d'extrait.

II-5- EVALUATION DES ACTIVITES ANTIOXYDANTES DES EXTRAITS DE LA JUSQUIAME BLANCHE

L'activité antioxydante a été évaluée en testant l'activité scavenging du radical DPPH[•], ABTS^{•+}, pouvoir réducteur des extraits et la chélation du fer.

II-5-1-Activité scavenging du radical DPPH*

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits d'*Hyoscyamus albus* a été réalisée en mesurant l'activité scavenging du radical DPPH*. En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH* (2,2- diphenyl-1-picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazine de couleur jaune (Figure 18) (Athamena *et al.*, 2010).

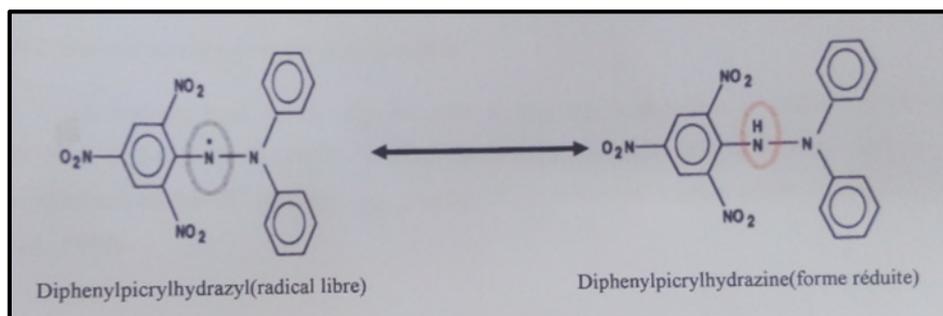


Figure 18 : forme libre et réduite du DPPH (Molyneux, 2004).

La mesure de l'activité scavenging du radical DPPH* a été effectuée en suivant le protocole de Hemalatha *et al.*,(2010).

a) Mode opératoire

Une solution de DPPH (0.1mM) a été préparée dans le méthanol, et 1 ml de cette solution a été ajouté à 3 ml de solution d'extrait à différentes concentrations. Après incubation pendant 30 min et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 517 nm.

N.B : Un contrôle (blanc général) a été préparé en remplaçant la solution d'extrait par du méthanol.

Un blanc pour chaque extrait a été préparé en mélangeant 1 ml de méthanol avec 3 ml de solution d'extrait.

b) Expression des résultats

L'acide ascorbique et la BHA ont été utilisés comme standards et à différentes concentrations. Le pourcentage de l'activité scavenging du radical DPPH* de chaque extrait a été calculé comme suit :

$$\% \text{ de l'activité scavenging du radical DPPH} = (A_c - (A_t - A_e) / A_c) \times 100$$

Où :

Ac : Absorbance du contrôle ; c'est l'absorbance du blanc contenant seulement le DPPH.

At : Absorbance du test ; c'est l'absorbance de la solution de DPPH contenant l'extrait.

Ae : Absorbance de l'extrait ; c'est l'absorbance de la solution de l'extrait sans le DPPH.

II-5-2- Activité scavenging du radical ABTS^{•+}

Le Protocol suivi est celui de **Nenadis et al., (2004) in Le et al., (2007)** avec quelques modifications

a) Principe

Le test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+} (2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphate) de coloration bleu-vert en le transformant en ABTS⁺ incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant (**Re et al., 1999**).

b) Protocole

Une solution d'ABTS (7mM) a été préparée en mélangeant 72mg de l'ABTS avec 13.24mg de persulfate de potassium (2.45mM) dans 20ml d'eau distillée, et laisser incuber pendant 16h à l'obscurité. La solution d'ABTS^{•+} (7mM) est diluée avec l'eau distillée jusqu'à atteindre une absorbance de 0.7 ± 0.02 à 734nm. 1.9ml de cette solution a été ajouté à 600µl de solution d'extrait à différentes concentrations. Après incubation pendant 7min et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 734nm. Le blanc a été préparé en remplaçant la solution d'extrait par du méthanol.

c) Expression des résultats

Le Trolox (acide 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylique), analogue de la vitamine E a été utilisé comme standard à différentes concentrations (**Miller et al., 1997**).

Le pourcentage de l'activité scavenging de l'ABTS^{•+} de chaque extrait a été calculé comme suit :

$$\% \text{ de l'activité scavenging de l'ABTS}^{\bullet+} = [Ac + At / Ac] \times 100$$

Où :

Ac : absorbance du blanc.

At : absorbance du test.

II-5-3- Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits de *Hyoscyamus albus* a été déterminé selon le protocole d'Oyaïzu (1986) in Ogunlana et Ogunlana, (2008) avec quelques modifications.

a) Principe

Les extraits qui possèdent un potentiel réducteur réagissent avec le Ferricyanure de potassium (Fe^{3+}) pour former le Ferrocyanure de potassium (Fe^{2+}), qui réagit ensuite avec le chlorure ferrique ($FeCl_3$) pour donner un complexe ferrique ferreux mesurable à 700nm (Jayanthi et Lalittha, 2011).

b) Mode opératoire

1ml de solution d'extrait (100 μ l/ml) a été mélangé avec 2.5ml de solution tampon phosphate (0.2M ; PH = 6.6) et 2.5ml de solution de Ferricyanure de potassium à 1% ($K_3Fe(CN)_6$). Le mélange a été incubé à 50°C pendant 20min, puis les tubes à essais ont été retirés en leur rajoutant 2.5ml d'acide trichloracétique à 10% (TCA).

2.5ml du surnageant ont été ajoutés à 2.5ml d'eau distillée et 0.5ml de $FeCl_3$ à 0.1% et la mesure de l'absorbance a été effectuée à 700nm. Un blanc a été préparé en remplaçant l'extrait par le méthanol, et le BHA a été utilisée comme standard. Le pouvoir réducteur des extraits augmente avec l'augmentation de l'absorbance.

II-5-4- Chélation du fer

La chélation du fer des extraits d'*Hyoscyamus albus* a été déterminée selon le protocole **Dinis et al., (1994)** Avec quelques modifications.

a) Protocole

1ml de solution d'extrait (0.1mg/ml) a été mélangé avec 400µl de de la solution de FeCl₂ (0.2mM) et 1ml d'eau distillée. Après agitation, 400 µl de Ferrozine (5mM) ont été ajoutés au mélange.

Après agitation et incubation pendant 10min, la mesure de l'absorbance a été faite à 562nm.

N.B : Un control a été préparé en remplaçant la solution d'extrait par du méthanol.

Un blanc pour chaque extrait a été préparé en mélangeant 1.8ml d'eau distillée avec 1ml de solution d'extrait.

b) Expression des résultats

L'EDTA a été utilisé comme standard et a différentes concentrations (0.1mg/ml et 1mg/ml).

Le pourcentage de chélation du fer de chaque extrait a été calculé comme suit :

$$\% \text{ de chélation} = [\text{Ac} (\text{At}-\text{Ac})] / \text{Ac} \times 100$$

Où :

Ac : absorbance du control.

At : absorbance du test.

II-6- Etude statistique :

Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon analysé et les résultats ont été exprimés sous la forme : moyenne ± ecartype. Des comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant le test d'Anova. Les différences ont été vérifiées à $\alpha \leq 0.05$. Les valeurs des IC₅₀ ont été calculées en utilisant le test Origine 8. La comparaison bivariée a été réalisée par le calcul de coefficient de corrélation.

Chapitre III

RESULTATS

ET

DISCUSSIONS

RESULTATS ET DISCUSSIONS

III-1- DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES

III-1-1- DOSAGES DES PHENOLS TOTAUX

Les teneurs en phénols totaux des extraits de la parties aérienne d'*Hyoscyamus albus*, exprimées en mg équivalent acide gallique / g d'extrait, sont représentées dans la figure ci – dessous :

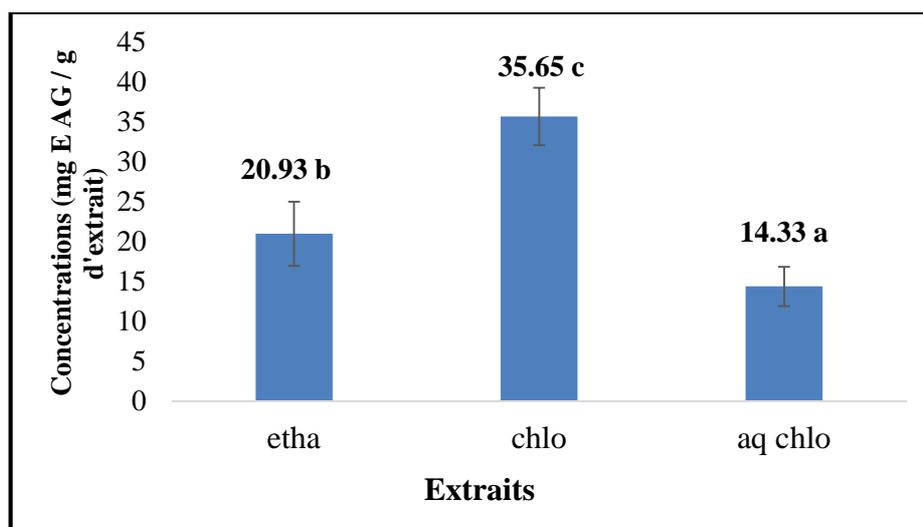


Figure 19 : Teneurs en phénols totaux de la partie aérienne d'*Hyoscyamus albus*.

Une vue d'ensemble de la représentation graphique nous laisse remarquer que les teneurs en phénols totaux sont comprises entre 14.33 ± 2.45 mg EAG / g d'extrait (aqueux de chloroforme) et 35.65 ± 3.60 mg EAG / g d'extrait (organique de chloroforme).

L'étude d'**Alghazeer et al., (2012)**, a montrée qu'un extrait des feuilles d'*Hyoscyamus albus* a laissé apparaitre une teneur en phénols totaux de 48.54 ± 7.82 mg EAG / de poudre qui est supérieure à celle obtenue par notre étude qui est de 35.65 ± 3.60 mg EAG / g d'extrait organique du chloroforme. Cette différence peut être expliquée par :

- La méthode d'extraction : utilisation d'une solution methanolique.
- Région de la récolte : **Alghazeer et al., 2012** ont récolté la plante à partir de différents endroits de la Libye.
- La période de la récolte : la plante a été récoltée entre le printemps et le début de l'été 2009.

La teneur en phénols totaux de la partie aérienne d'*Hyoscyamus albus* est donnée par l'extrait organique ($35,65 \pm 3,61$ mg EAG/g d'extrait) que par l'extrait aqueux du chloroforme ($14,33 \pm 2,45$ mg EAG/g d'extrait), cela peut être expliqué par la présence des tannins hydrolysables (non mesurés), qui constituent des structures polycycliques d'où leurs caractères légèrement hydrophobe donc, se solubilisent dans les solvants organiques (figure 20).

Il est à signalé que la concentration en phénols totaux de l'extrait éthanolique d'*Hyoscyamus albus* est légèrement inférieure ($20,93 \pm 4,03$ mg EAG/g d'extrait) par rapport à l'extrait organique, cela pourrait être expliqué par le fait que les composés phénoliques n'ont pas été entièrement révélés par le réactif du Folin-Ciocalteu dans l'extrait éthanolique, car il y aurait un encombrement stérique résultant de la présence de macromolécules (lipides).

III-1-2- DOSAGE DES PROANTHOCYANIDINES

Les résultats de dosage des proanthocyanidines de la partie aérienne d'*Hyoscyamus albus*, exprimés en mg équivalent catéchine (EC) / g d'extrait, sont représentés dans la figure ci-dessous :

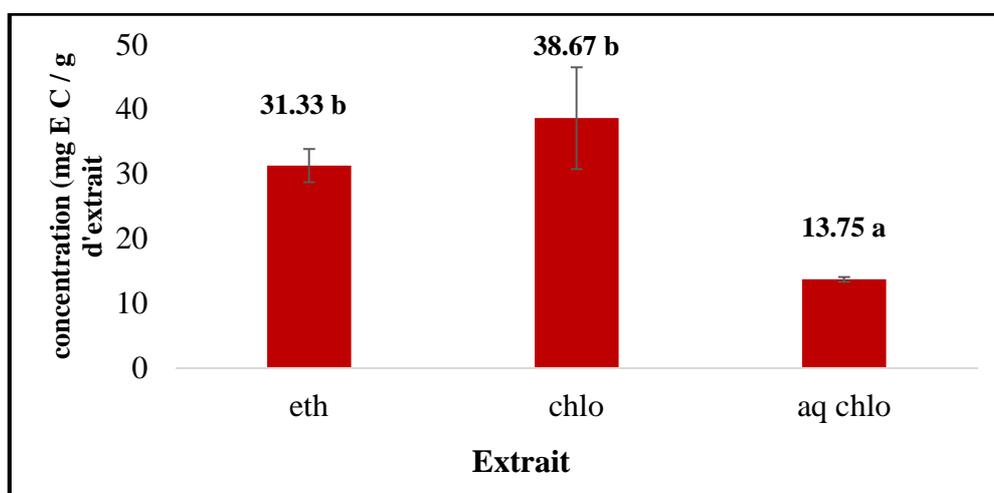


Figure 20 : Teneurs en proanthocyanidines de la partie aérienne d'*Hyoscyamus albus*.

Les résultats de la figure révèlent que la plante présente des teneurs faibles en proanthocyanidines, allant de ($13,75 \pm 0,35$ à $38,66 \pm 7,86$) mg équivalent catéchine (EC) / g d'extrait.

Nous remarquons d'après la figure que l'extrait organique de la jusquiame blanche a donné une quantité plus élevée par rapport aux deux autres extraits, cela serait due aux structures

polycycliques des tanins qui ont un caractère hydrophobe donc, se solubilisent dans les solvants apolaires (Gue *et al.*, 2008).

En outre, l'extrait éthanolique de la jusquiame blanche a montré une concentration légèrement inférieure à celle de l'extrait organique, étant donné que le réactif révélateur (la vanilline) réagit uniquement avec la première unité du polymère des proanthocyanidines, à cause de l'encombrement stérique engendré et de la possibilité d'interaction des proanthocyanidines entre elles.

III-1-3- DOSAGE DES FLAVONOIDES

Le contenu en flavonoïdes des extraits d'*Hyoscyamus albus*, exprimé en mg équivalent quercétine (EQ) / g d'extrait, est représenté dans la figure suivante :

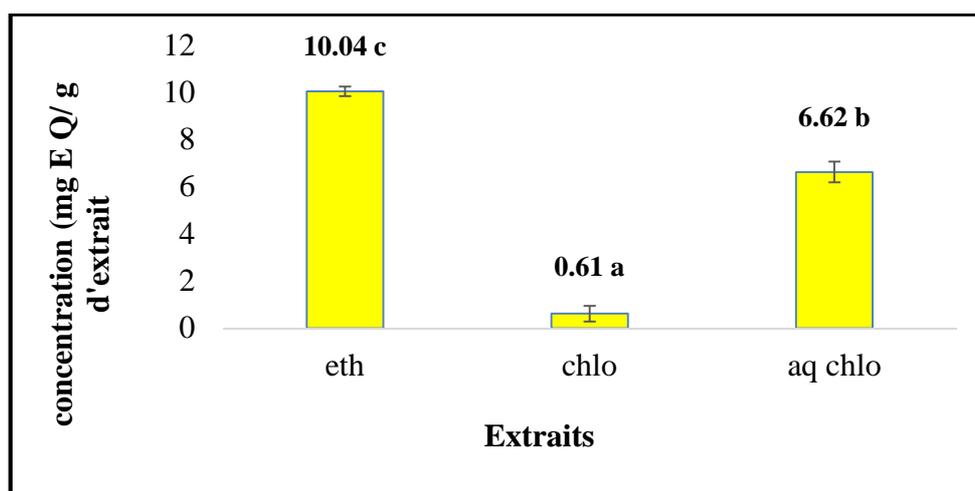


Figure 21 : Teneurs en flavonoïdes dans les extraits de la partie aérienne d'*Hyoscyamus albus*.

D'après cette figure, la plante présente des teneurs appréciables en flavonoïdes.

Nous constatons que le taux le plus élevé a été obtenu par l'extrait éthanolique ($10,05 \pm 0,21$ mg EQ / g) étant donné que c'est le précurseur, donc englobe la totalité des composés phénoliques.

En outre, l'extrait aqueux du chloroforme a montré une concentration ($6,62 \pm 0,44$ mg EQ / g) nettement supérieur à celle de l'extrait organique ($0,61 \pm 0,33$ mg EQ / g), cela serait fait que les flavonoïdes sont de très petites molécules très polaire, résultant de leur richesse en groupement hydroxyle, donc se solubilisent dans les solvants polaires que apolaires.

III-2- L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

III-2-1- L'ACTIVITE SCAVENGING DU RADICAL DPPH[•]

Le DPPH[•] est largement utilisé pour examiner la capacité des composés, d'agir en tant que piègeur ou donateur d'hydrogène et d'évaluer l'activité antioxydante.

L'étude de l'activité scavenging du radical DPPH[•] selon le protocole de **Hemalatha et al., (2010)**, nous a donné les résultats exprimés dans le figure suivante :

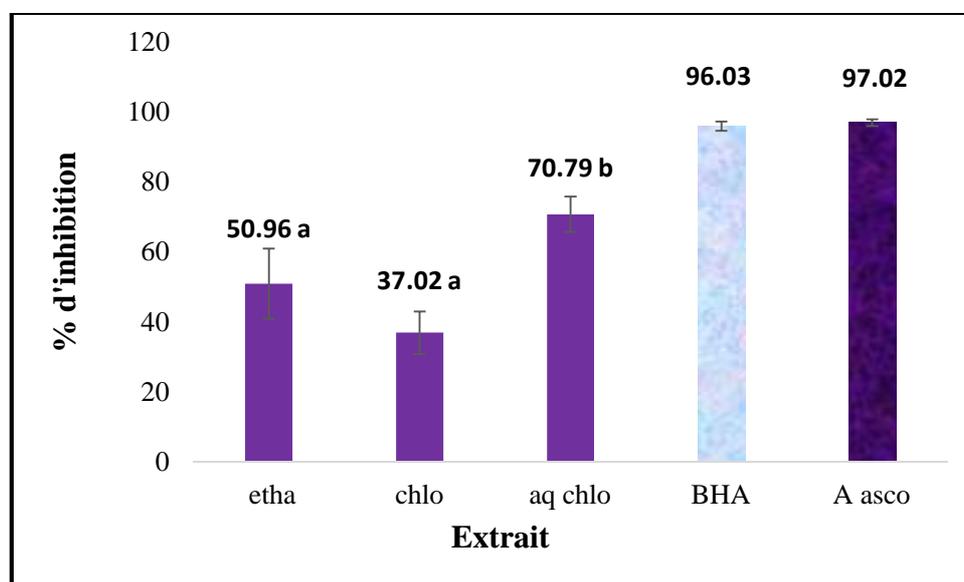


Figure 22 : Les pourcentages de l'activité scavenging du radical DPPH[•] des extraits de la partie aérienne d'*Hyoscyamus albus* et des standards.

Une vue d'ensemble de cette représentation graphique, nous laisse remarquer que tous les extraits d'*Hyoscyamus albus* ont révélé une forte activité scavenging du radical DPPH[•] à 100µg/ml comparativement aux standards utilisés : l'acide ascorbique et la BHA qui ont donné des pourcentages d'inhibition de 97,01% ± 0,95% et de 96,02% ± 1,34% respectivement (à 100ug/ml).

L'inhibition du radical DPPH[•] par les extraits de la plante montre que l'extrait aqueux du chloroforme a exhibé les pourcentages d'inhibition les plus importants ($70,79\% \pm 5,06\%$) en comparaison avec l'extrait éthanolique et organique, étant donné leur richesse en flavonoïdes qui sont connus pour leur très bonne activité antioxydante, mais il ne faut pas négliger le pourcentage d'inhibition des extraits éthanoliques ($50,96 \pm 10,04\%$) qui contiennent la totalité des composés phénoliques (extrait brute) mais, il a donné un pourcentage inférieur à celui de l'aqueux, cela il serait due à l'encombrement stérique. Par ailleurs, il existe une corrélation positive avec les teneurs en tanins condensés ($R= 0,96$) et en phénols totaux ($R= 0,95$) qui sont des puissants antioxydants, vu leurs richesses en groupement OH donateurs d'électrons et d'hydrogènes.

➤ DETERMINATION DES IC₅₀

La IC₅₀ est la concentration de substrat qui inhibe 50% de l'activité des radicaux DPPH[•].

Les IC₅₀ de l'activité du DPPH sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs les plus faibles reflètent un effet anti-radicalaire important.

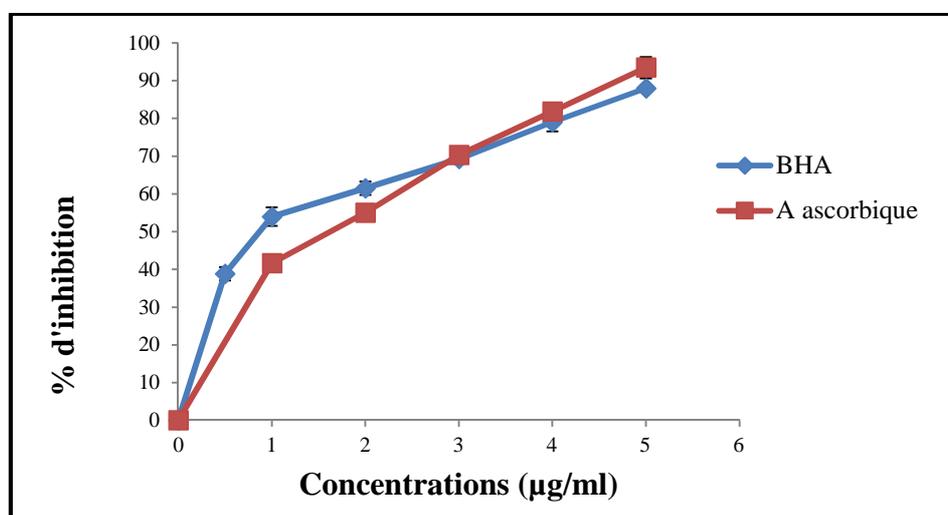


Figure 23 : Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition du radical DPPH[•] en fonction de la concentration de la BHA et de l'acide ascorbique.

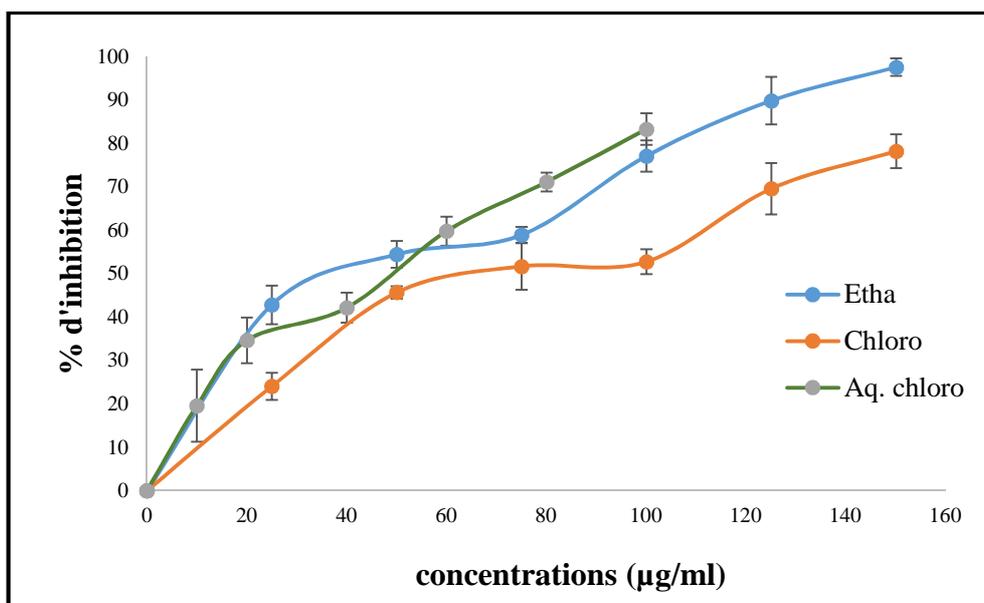


Figure 24 : Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition du radical DPPH• en fonction de la concentration des extraits d'*Hyoscyamus albus*.

Les figures ci-dessus montrent que la variation de l'activité scavenging du radical DPPH• des extraits d'*Hyoscyamus albus* et des standards (acide ascorbique et BHA) est dépendante de la concentration, avec l'IC₅₀ de l'extrait aqueux du chloroforme (44.01 µg / ml) qui est loin de celle des standards utilisés qui sont 0.98µg / ml et 1.61µg / ml pour la BHA et l'acide ascorbique respectivement.

II-3-2- L'ACTIVITE SCAVENGING DU RADICAL ABTS^{•+}

Le radical ABTS^{•+} est largement utilisé pour déterminer l'activité antioxydante des extraits des plantes. L'ABTS^{•+}, en contact avec un donneur d'hydrogène conduit à la forme réduite de l'ABTS et à la décoloration de la solution à 734 nm. Les résultats de l'activité anti radicalaire, vis-à-vis du radical ABTS^{•+} des différents extraits sont représentés dans la figure suivante :

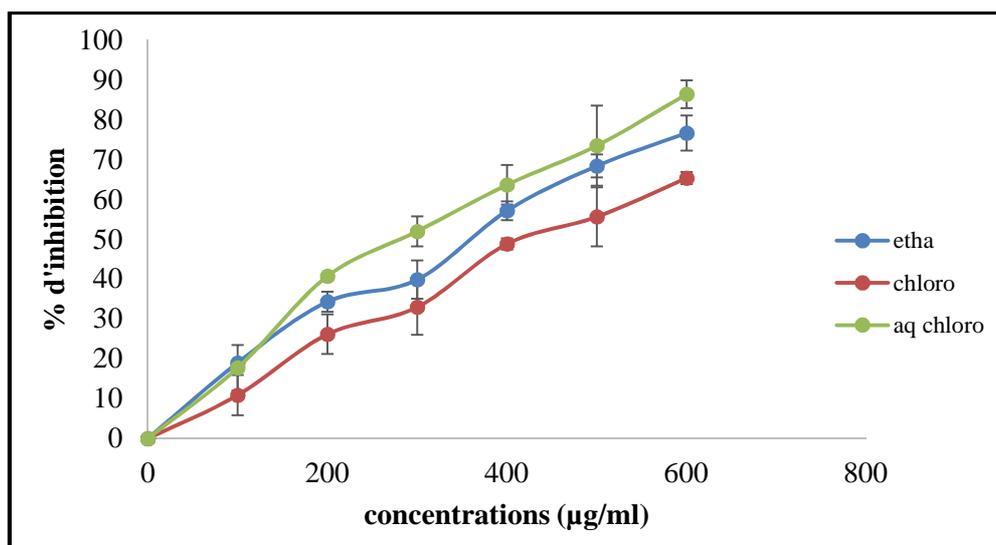


Figure 25 : pourcentages d'inhibition du radical ABTS^{•+} en fonction de la concentration des extraits de la jusquiame blanche.

D'après la figure, l'activité scavenging du radical ABTS^{•+} est proportionnelle aux concentrations des extraits, avec des IC₅₀ indiquées dans le tableau V, qui sont largement supérieures à celle obtenue par le Trolox (9.72 µg / ml). Le tableau V indique que l'extrait aqueux du chloroforme a une activité très forte en comparaison avec les deux autres extraits ; cela revient à sa richesse en flavonoïdes.

Tableau V : les valeurs des IC₅₀ des différents extraits d'*Hyoscyamus albus*

Extraits	IC ₅₀ en µg / ml
Extrait éthanolique	343.75
Extrait organique du chloroforme	431.55
Extrait aqueux du chloroforme	287.88

Effectivement, ces résultats sont d'autant plus confirmés par l'existence d'une corrélation positive entre les teneurs en flavonoïdes (R = 0.97) et les pourcentages scavenging du radical ABTS^{•+}.

III-2-3- LE POUVOIR REDUCTEUR

Le pouvoir réducteur est basé sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) par transfert d'un électron ou donner un atome d'hydrogène, qui se traduit par une coloration verte-bleuâtre.

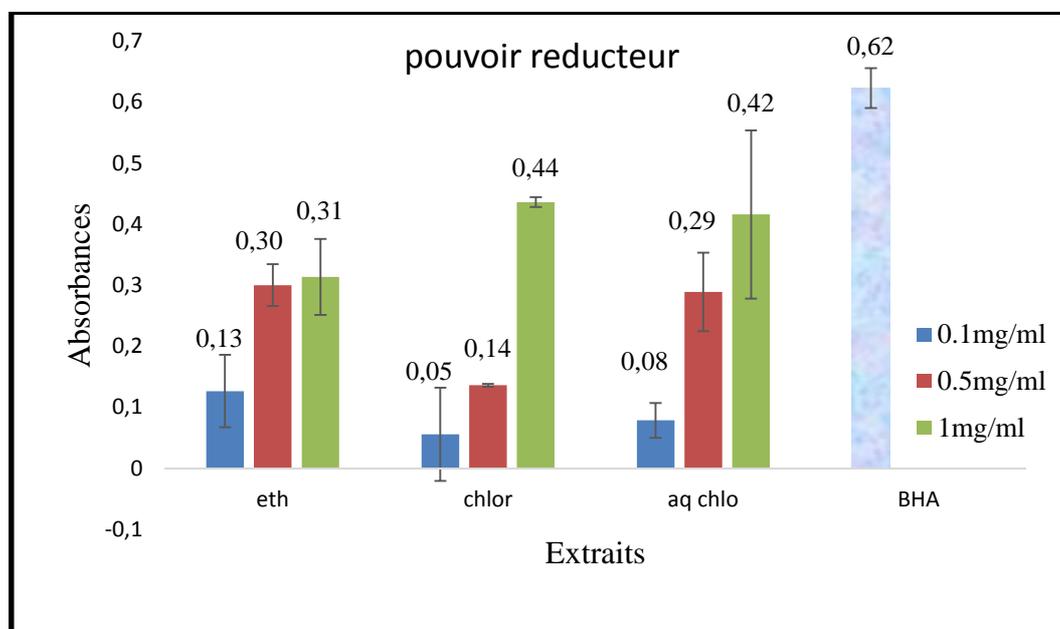


Figure 26 : Représentation graphique du pouvoir réducteur des extraits de la partie aérienne d'*Hyoscyamus albus* et de standard BHA.

Une vue d'ensemble de la représentation graphique nous permet de déduire que le pouvoir réducteur de notre plante est satisfaisant comparativement au standard utilisé (BHA).

D'après les résultats obtenus, nous pouvons constater en premier lieu que le pouvoir réducteur est proportionnel à la concentration.

Concernant nos échantillons, c'est l'extrait organique du chloroforme qui a exhibé le pouvoir réducteur le plus élevé, étant donné que c'est lui qui est le plus riche en tanins condensés et en phénols totaux, qui sont riches en groupements OH donneur d'électrons et d'hydrogènes (Erol *et al.*, 2010).

III-3-4-LA CHELATION DU FER

Le protocole de chélation du fer est un test qui met en évidence la capacité d'une molécule des extraits à chélater le fer, permet ainsi d'apprécier l'activité antioxydante de l'extrait testé. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure ci-dessous :

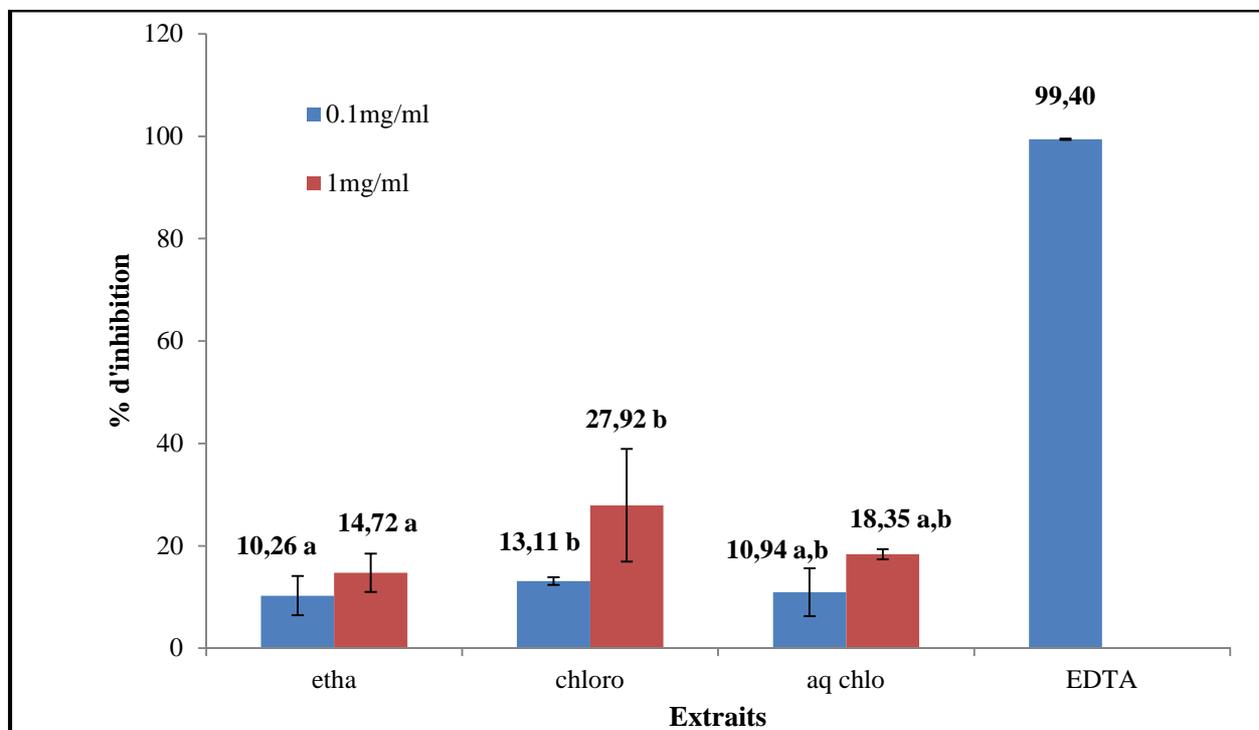


Figure 27 : Représentation graphique du chélation de fer des extraits de la partie aérienne d'*Hyoscyamus albus* et le standard EDTA.

Une vue d'ensemble de cette figure nous laisse remarquer que l'activité chélatrice de la plante est très faible, cela revient à la nature biochimique des composés phénoliques des extraits, bien qu'ils contiennent des quantités appréciables en phénols totaux (**Brighente et al., 2007**).

La structure de ces composés ne donne pas une bonne chélation de fer contrairement au standard (EDTA) qui a donné un pourcentage de chélation de $99.40 \pm 0.1\%$.

Nous constatons également, que c'est l'extrait organique du chloroforme qui a donné la plus forte activité chélatrice étant donné sa richesse en tanins condensés et en phénols totaux, riches en groupements OH qui sont des chélateurs du fer.

En effet, il existe une corrélation positive entre la teneur en phénols totaux et la chélation du fer ($R=0.86$).

CONCLUSION

et

Perspectives

Conclusion et perspectives

Les plantes aromatiques et médicinales restent toujours une source fiable de la majorité des antioxydants naturels et elles restent encore sous exploités dans le domaine médical.

Hyoscyamus albus est l'une de ces plantes, appartenant à la famille des solanacées, l'une des familles les plus importantes, utilisées depuis longtemps à des fins thérapeutiques.

Notre étude est axée vers l'extraction des composés phénoliques de la partie aérienne d'*Hyoscyamus albus*, ainsi qu'au dosage des différents composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes et les tanins condensés) et l'évaluation de l'activité antioxydante (test du DPPH, ABTS, pouvoir réducteur et chélation du fer).

Ainsi notre travail nous a permis d'obtenir les résultats suivants :

- ✓ L'évaluation de la teneur en phénols totaux en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu indique que la plante présente des teneurs appréciables en phénols totaux et en flavonoïdes.
- ✓ Concernant l'activité antioxydante, tous les extraits d'*Hyoscyamus albus* ont dévoilé une très forte activité scavenging du radical DPPH• à 100 µg/ml par rapport aux standards utilisés, l'IC₅₀ de l'extrait aqueux du chloroforme est estimée à 44.01 µg/ml.
- ✓ L'extrait aqueux du chloroforme exerce une forte activité vis-à-vis du radical ABTS^{•+} à 100 µg/ml en comparaison avec l'activité enregistrée par le standard (Trolox).
- ✓ Cependant, ces extraits ont un pouvoir réducteur satisfaisant et une activité chélatrice du fer très faible.

Ce travail nous a permis d'avoir un aperçu général sur les teneurs en composés phénoliques, la nature biochimique et l'activité antioxydante d'*Hyoscyamus albus*.

Il serait alors intéressant d'approfondir les recherches sur ses propriétés pharmacologiques, en utilisant d'autres méthodes plus performantes d'extraction, de purification et d'identification telles que : HPLC, RMN, ou encore la spectrométrie de masse. Ainsi que de réaliser des études *in vivo* afin d'étudier l'efficacité et la toxicité de cette plante, de démontrer et d'évaluer d'autres activités biologiques, des composés phénoliques et des alcaloïdes.

Références
Bibliographiques

Références bibliographiques

- ❖ *Alghazeer, R., El-Saltani, H., Nabeel, S., Al-Najjar, A. and Hebail, F. (2012). Antioxidant and antimicrobial properties of five medicinal Libyan plants extracts. Natural Science, 4 (5): 324 – 335.*
- ❖ *Alkurd, A. R., Takruri, R. H., and Al – Ayyed, H. (2008). Tannin contents of selected plants used in Jordan. Jordan Journal of Agricultural Sciences, 4 (3): 265 – 274.*
- ❖ *Althamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui. S., and Khebri. S. (2010). Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum Cyminum L.* Lebanese Science Journal, 11 (1) : 69 – 81.*
- ❖ *Aruoma, I. O., Bahorun, T. and Jen, L. S. (2003). Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. Mutation Research, 544: 203 – 215.*
- ❖ *Avlessi, F., Dangou, J., Wotto, V. D., Alitonou, G. A., Sohounhloue, D. K., Menut, C. (2004). Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Wild) Hook. C. R. Chimie, 7: 1057 – 1061.*
- ❖ *Barguil, Y. and Anger J.-P. (2012). Traité de toxicologie médico-judiciaire. 661-688.*
- ❖ *Barouki, R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. Medecine / sciences, 22 : 266 – 272.*
- ❖ *Baudin, B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. mt cardio, 2 (1) : 43 – 52.*
- ❖ *Bayer, E., Buttler, K.P., Finkenzeller, X. and Grau, G. (1990). Guide de la flore méditerranéenne.*
- ❖ *Béguel, J-P. (2012). Etude de la capacité antioxydante en lien avec la reproduction chez l'huitre creuse. 11 : 115 – 20.*
- ❖ *Benhouda, A. and Yahia, M. (2014). Toxicity, analgesic and anti-pyretic activities of methanolic extract from *Hyoscyamus albus* leaves in albinos rats. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 6 (3) : 121-127.*
- ❖ *Berger, M. M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. Nutrition clinique et métabolisme, 20 : 48 – 53.*
- ❖ *Boizot, N. and Charpentier, J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. INRA – Amélioration, Génétique et Physiologique Forestières, Laboratoire d'Analyse Biochimique.*

- ❖ Bonnefont, R. D., Peynet, J., Beaudeau, J. L., Thérond, P., Legrand, A. and Delattre, J. (2002). Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16 : 260 – 267.
- ❖ Borg, J. and Reeber, A. (2008). *Biochimie métabolique*. Paris : Ellipes edition. 257–273.
- ❖ Bourgaude, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites : a historical perspective. *Plant Science*, 161 : 839 – 851.
- ❖ Brighente, I.M.C., Dias, M., Verdi, L.G. and Pizzolati, M.G. (2007). Antioxidant activity and total phenolic con-tent of some Brazilian species. *Pharmaceutical Biology*, 45 : 156 - 161.
- ❖ Brunton, J. (2009). *pharmacognosie phytochimie, plantes médicinales*. 4^{ème} édition Lavoisier. Paris. 1268.
- ❖ Chiang, H.C., Lo, Y.J. and Lu, F.J. (1994). Xanthine oxidase inhibitors from the leavs of *Also philaspinulosa* (Hook) Tryon. *Enzyme inhibition*, 8 (1) : 61 – 71.
- ❖ Choe, E. and Min, D. B. (2009). Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 8 : 345 – 358.
- ❖ Cillard, J. and Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Groupe de Recherche en Thérapeutique Anticancéreuse, GRETAC, Faculté de pharmacie, Rennes*, 13 (1) : 24 – 29.
- ❖ Colin, S. and Crouzet, J. (2011). *Les polyphénols et procédés*. Ed Lavoisier. Paris : 5 – 10.
- ❖ Cowan, M.M. (1999). plant products as antimicrobial agents. *American Society for Microbiology*, 12 (4) : 564-582.
- ❖ Curtay, J. P. and Robin, J. M. (2000). Interet des complexes antioxydants. Centre d’Etude et de Développement de la Nutrithérapie.
- ❖ Defraigne, J.O. and Pincemail, J. (2007). Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Rev Med Liege*. 62 : 4.
- ❖ Dupont, G. D., Deby, C. and Lamy, M. (2002). Données actuelles sur la toxicité de l’oxygène. *Réanimation*, 11 : 28 – 39.
- ❖ Erol, N.T., Sari, F. and Velioglu, Y.S. (2010). Polyphenols, alkaloids and antioxidant activity of diferent grades turkish black tea. **GIDA**, 35 (3) : 161 - 168.
- ❖ Favier, A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L’actualité chimique*. 108 – 115.

- ❖ Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z. and Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?. *L'actualité chimique*, 91-96.
- ❖ Goudable, J. and Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Metabol*, 11 : 115-20.
- ❖ Goullé, J-P., Pépin, G., Dumestre Toulet, V. and Lacroix, C. (2004). Botanique, chimie et toxicologie des solanacées hallucinogènes : belladone, datura, jusquiame, mandragore. *Annales de Toxicologie Analytique*, 16 (1) : 22-35.
- ❖ Gu, H.F., Li, C.M., Xu, Y.J., Hu, W.F., Chen, M.H., and Wan, Q.H. (2008). Structural features and antioxidant activity of tannin from persimmon pulp. *Food Research International*, 41 : 208 – 817.
- ❖ Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., Chapelle, J.P. (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liege*, 62 (10) : 628 - 638.
- ❖ Hammiche, V., Merad, R. and Azzouz, M. (2013). *Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen*. Paris : 237-263.
- ❖ Hemalatha, S., Lalitha, P. and Arulpriya, P. (2010). Antioxidant activities of the extracts of the aerial roots of *Pothosaurea* (Linden ex Andre). *Der Pharma Chemica*, 2 (6) : 84-89.
- ❖ Javanovic, V., steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B. and simic, M.G. (1994). Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc*, 166 : 4846-4851.
- ❖ Jayanthi, P. and Lalitha, P. (2010). Reducing power of the solvent extracts of Eichhornia Crassipes (Mart) solms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences*, 3 (3) :126 – 128.
- ❖ Kadi, K. (2010). Contribution à l'étude de l'effet promoteur des phytohormones sur l'accumulation des composés actifs de la jusquiame blanche (*Hyoscyamus albus*). Thèse de doctorat, filière biologie végétale, Université Mentouri Constantine, 124.
- ❖ Kar, A. (2007). *Pharmacognosy and pharmabiotechnologie*. 2eme edition. New Age International Publishers. 1 – 30.
- ❖ Laguerre, M., Lecomte, J. and Lecomte, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46 : 244 – 282.

- ❖ Laguerre, M., López-Giraldo, L. J., Lecomte, J., Pina, M. and Villeneuve, P. (2007). Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *OCL*, 14 (5) : 278 – 292.
- ❖ Le, K., Chiu, F. and Ng, K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructuslicii*. *Food Chemistry*, 105 : 353 – 363.
- ❖ Lee, J., Koo, N., and Min, D.B. (2004). Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 3 : 21 – 33.
- ❖ Liu, H. R. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46 : 207 – 219.
- ❖ **M**artin, S. and Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, 51 : 304 – 315.
- ❖ Matés, J. M., Gomez, P. C. and Castro, N. I. (1999). Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry*, 32 (8) : 595 – 603.
- ❖ Miller, N.J. and Rice-Evans, C. (1997). Factor influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. *Free Radical Biol. Med*, 26 : 195-199.
- ❖ Molyneux, P. (2004). The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol*, 26 (2) : 211 – 219.
- ❖ **O**gunlana, O.E., and Ogunlana, O. O. (2008). In vitro assessment of antioxidant activity of *Newbouldia*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2 (8) : 176 – 179.
- ❖ Oyedemi, S. and Afolayan, A.J. (2011). In vitro Antioxidant Activity of Aqueous Leaves Extract of *Leonotis* (L.)R. Br. *International Journal of Pharmacology*, 7 (2) : 248 – 256.
- ❖ **P**errefiche, G. and Laborit, H. (1995). Oxygen free radicals, melatonin, and aging. *Experimental Gerontology*. 30 : 213-227.
- ❖ Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod*, 63 : 1035 – 1042.
- ❖ Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K, Jean-Olivier Defraigne, J-O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16 : 233 – 239.
- ❖ Podsedek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables : A review. *LWT*, 40 : 1 – 11.

- ❖ Ramonatxo, K. C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20 : 165 – 177.
- ❖ Rao, S. P., Kalva, S., Yerramilli, A., Mamidi, S. (2011). Free Radicals and Tissue Damage : Role of Antioxidants. *Free Rad. Antiox*, 1 (1) : 2 – 7.
- ❖ Ré, D. B., Nafia, I., Nieoullon, A., Kerkerian, G. L. and Aissouni, H. L. (2005). Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 24 : 502 – 509.
- ❖ Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26 (9/10) : 1231 – 1237.
- ❖ Ribéreau- gayon, P. (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*. Paris : Dunod : 91 – 107.
- ❖ Romeik, A. (1956). *Flora*. 143 – 67.
- ❖ Roussel, A. M. and Ferry, M. (2002). Stress oxydant et vieillissement. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16 : 285 – 291.
- ❖ Sarni-Manchado, P. and Cheynier, V. (2006). *Les polyphénols en agroalimentaire*. Ed Lavoisier. Paris : 266 – 268.
- ❖ Schofield, P., Mbugua, D.M. and Pell, A.N. (2001). Analysis of condensed tannins : a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91 : 21 – 40.
- ❖ Sorg, O. (2004). Oxidative stress : a theoretical model or a biological reality ?. *comptes rendus biologiques*, 327 :649-662.
- ❖ Strauss, A. (1989). In : Y.P.S. Bajaj (Ed), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer, Berlin. 7 : 286 – 314.
- ❖ Svoboda, K. and Svoboda, T. (2000). Secretory structure of aromatic and medicinal plants. *Microscopix Publication*. 7 – 12.
- ❖ Tamari, N., Mine, A., Sako, A., Tamagawa, S., Tabira, Y. and Kitamura, Y. (2014). Possible Application of the Medicinal Plant *Hyoscyamus albus* in Phytoremediation : Excess Copper Compensates for Iron. Deficiency, Depending on the Light Conditions. *American Journal of Plant Sciences*, 5 : 3812-3822.

- ❖ Tessier, F. and Marconnet, P. (1995). Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & Sports*. 10 : 1-13.
- ❖ Vamecq, J., Vallée, L., Storme, L., Gelé, P., Borde, R. (2004). Les acteurs immédiats du stress oxydatif. *La Lettre du Pharmacologue*, 18 (1) : 16 - 23.
- ❖ Van Acker, S. A. B.E., Van Den Berg, D. J., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, H. D., Van Bennes, W. P., Van Der Vijgh, W. J. F., and Bast, A. (1996). Structural aspect of antioxydant activity of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20 (3) : 331– 342.
- ❖ Vergely, C. and Rochette, L. (2003). Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire. *Médecine thérapeutique Cardiologie*, 1 (3).
- ❖ Vuorela, S. (2005). Analysis, isolation and bioactivities of rapessed phenolics (dessertation). EKT series 1343. University of Helsinki. Departement of Applied Chemistry and Microbiology.
- ❖ Yap, C.F., Ho, C.W., Aida, W.M., Chan, S.W., Lee, C.Y. and Leong, Y.S. (2009). Optimisation of extraction condition of total phenolic compounds from star fruit (*Averrhoacarambola L.*) residus. *Sains Malaysiana*, 38 (4) : 511 – 520.
- ❖ [1] <https://en.wikipedia.org/wiki/Hyoscyamine#/media/File:Hyoscyamine.svg>
- ❖ [2] <http://www.neurosoup.com/scopolamine/>

Annexes

ANNEXES

Annexe n° 1 : préparation de la solution de Folin-Ciocalteu (10%, v/v)

- La solution de Folin-Ciocalteu est préparée comme suit :
10ml de Folin-Ciocalteu + 90ml d'eau distillée.

Annexe n°2 : préparation de la solution au chlorure d'aluminium

- 133mg $AlCl_3$ + 400mg d'acétate de sodium dans 100ml d'eau distillée.

Annexe n° 3 : préparation de la solution de la vanilline (4%, w/v)

- 4g de la vanilline + 100ml de méthanol.

Annexe n° 4 : préparation de la solution de DPPH (0.1mM)

- 11.83mg de DPPH + 300ml du méthanol.

Annexe n°5 : préparation de la solution mère d'ABTS^{•+}

- La solution mère d'ABTS^{•+} (7mM) : 72mg de l'ABTS + 13.24mg de persulfate de potassium (2.45 mM) dans 20ml d'eau distillée, et laisser incuber pendant 16h à l'obscurité.
Cette solution est diluée jusqu'à atteindre une absorbance de 0.7 ± 0.02 à 734 nm.

Annexes N° 6 : Courbes d'étalonnage utilisées pour le calcul des teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés.

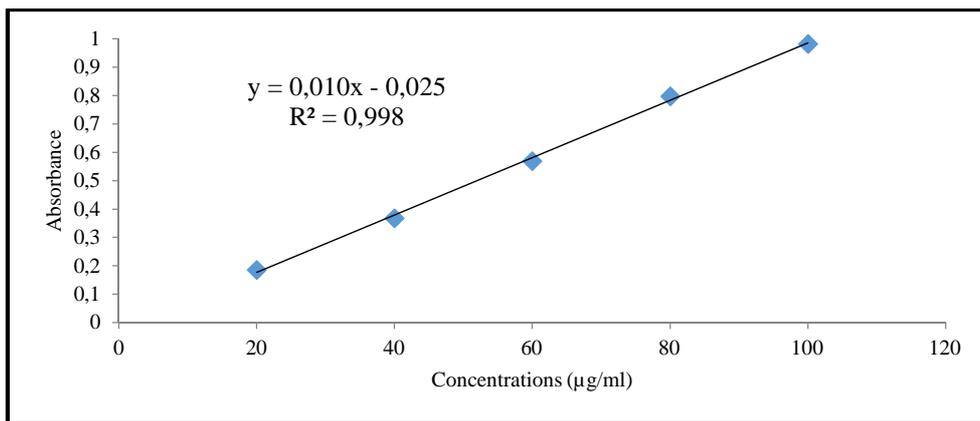


Figure 01 : Courbe d'étalonnage avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux ($\lambda=765\text{nm}$).

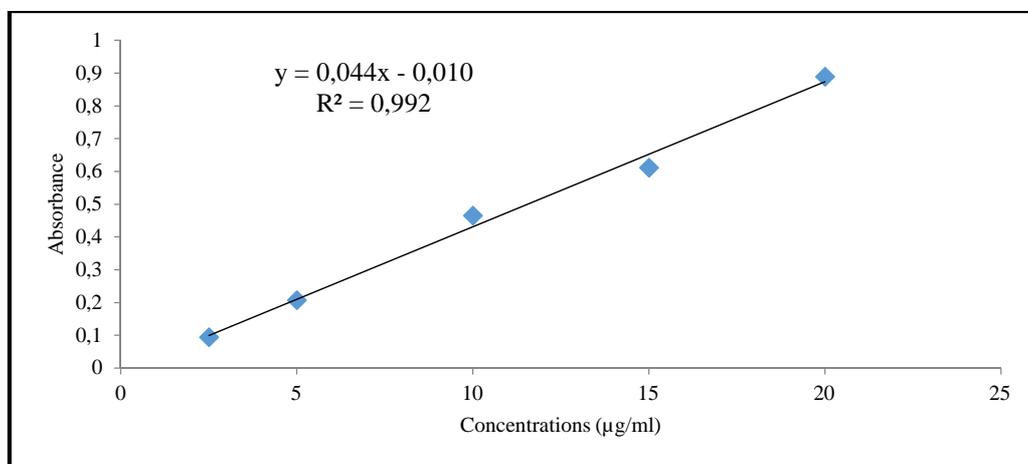


Figure 02 : Courbe d'étalonnage avec la quercétine pour le dosage des flavonoïdes ($\lambda = 430 \text{ nm}$).

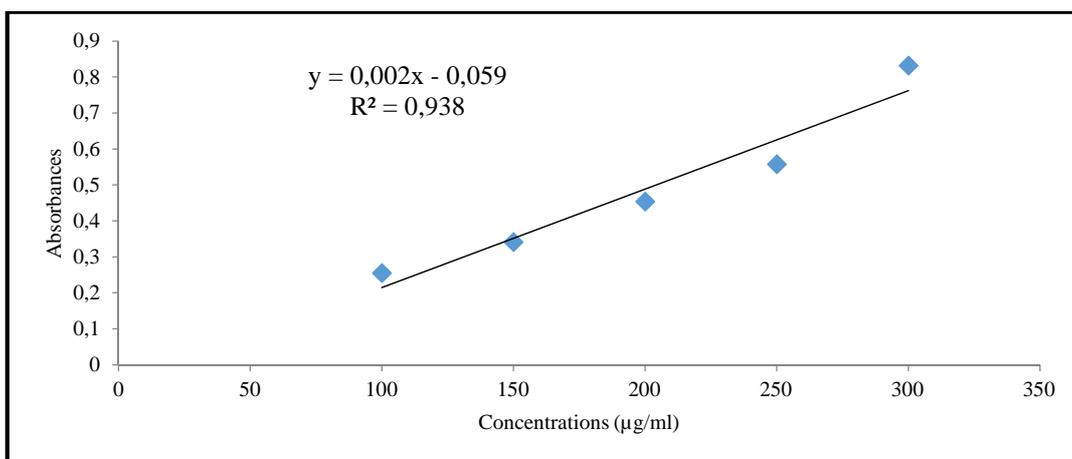


Figure 03 : Courbe d'étalonnage avec la catéchine pour les proanthocyanidines ($\lambda = 500 \text{ nm}$).

Annexes N°7 : Courbes de calcul de l'IC50 dans l'activité scavenging du radical DPPH.

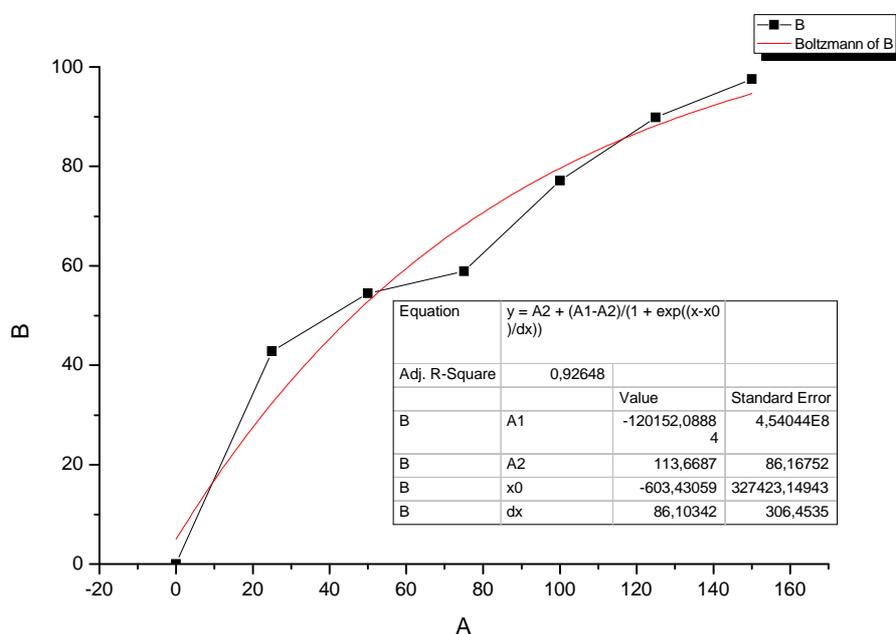


Figure 04 : courbe pour le calcul de l'IC50 de l'extrait éthanolique.

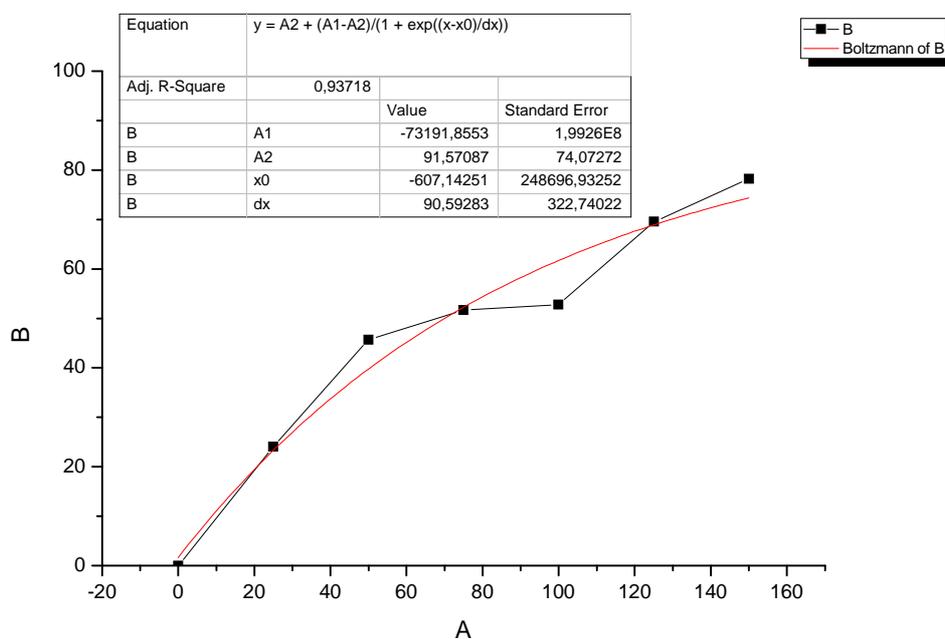


Figure 05 : courbe pour le calcul de l'IC50 de l'extrait organique du chloroforme.

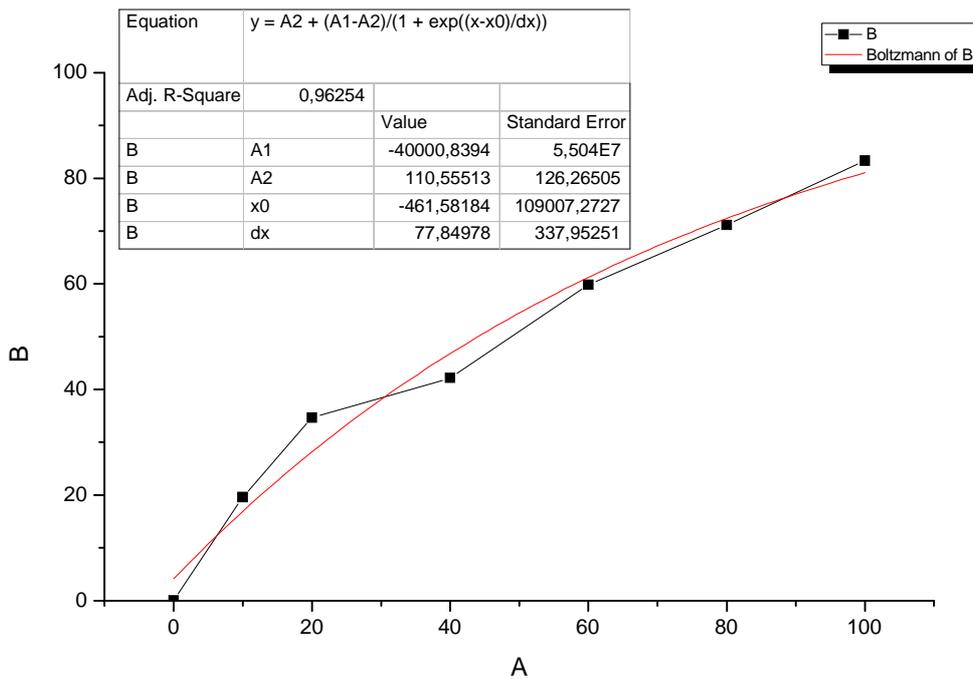


Figure 06 : courbe pour le calcul de l'IC50 de l'extrait aqueux du chloroforme.

Annexes N°8 : Courbes de calcul de l'IC50 dans l'activité scavenging du radical ABTS^{•+}

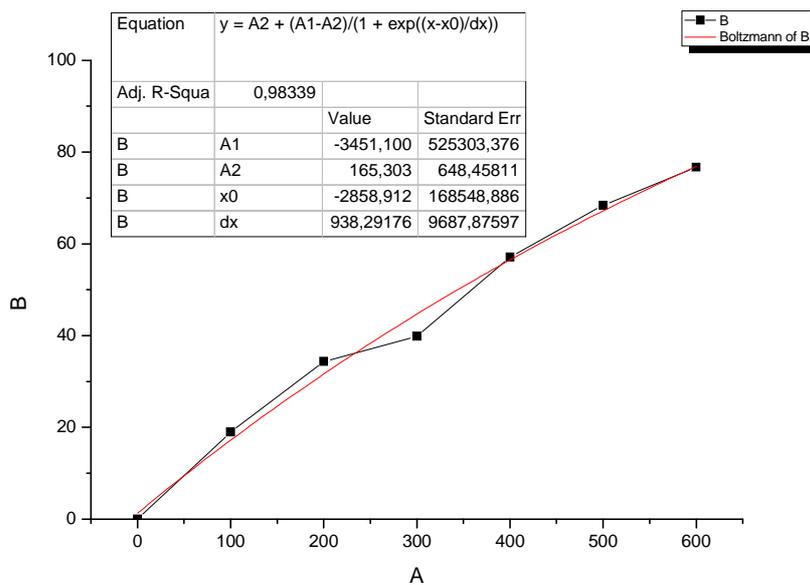


Figure 07 : courbe pour le calcul de l'IC50 de l'extrait éthanolique.

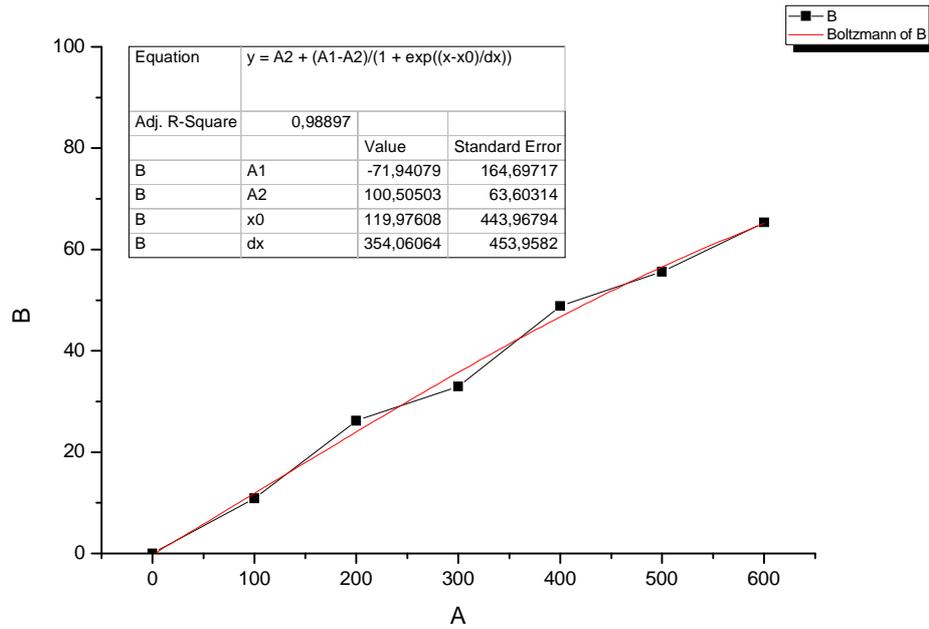


Figure 08 : courbe pour le calcul de l'IC50 de l'extrait organique du chloroforme.

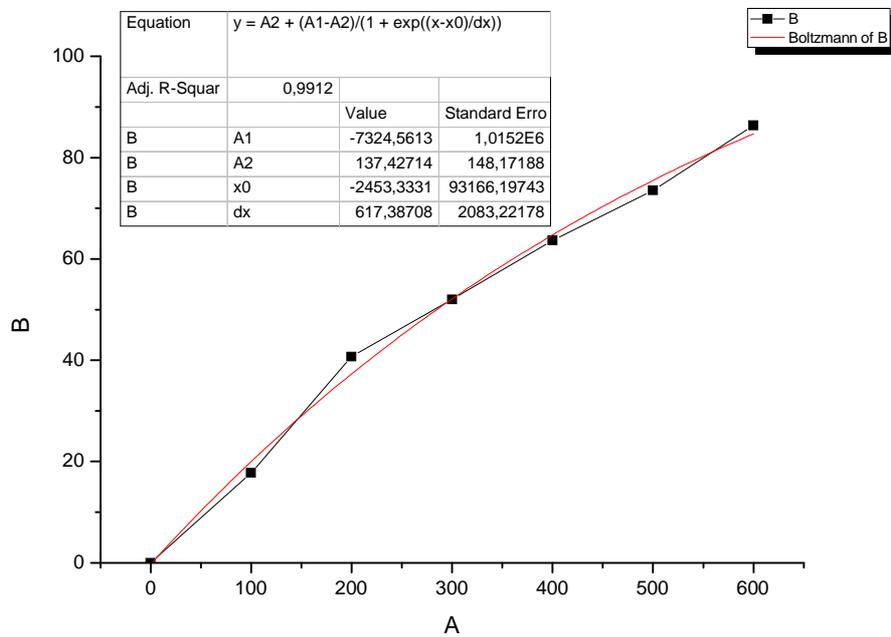


Figure 09 : courbe pour le calcul de l'IC50 de l'extrait aqueux du chloroforme.

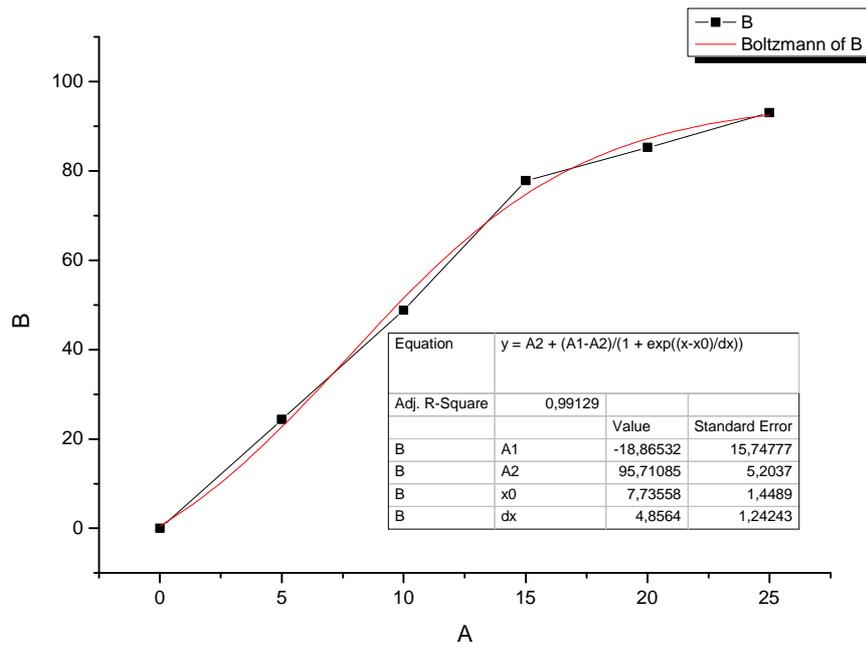


Figure 10 : courbe pour le calcul de l'IC50 du Trolox.

Annexes N°9 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en phénols totaux, en flavonoïdes et en proanthocyanidines des extraits.

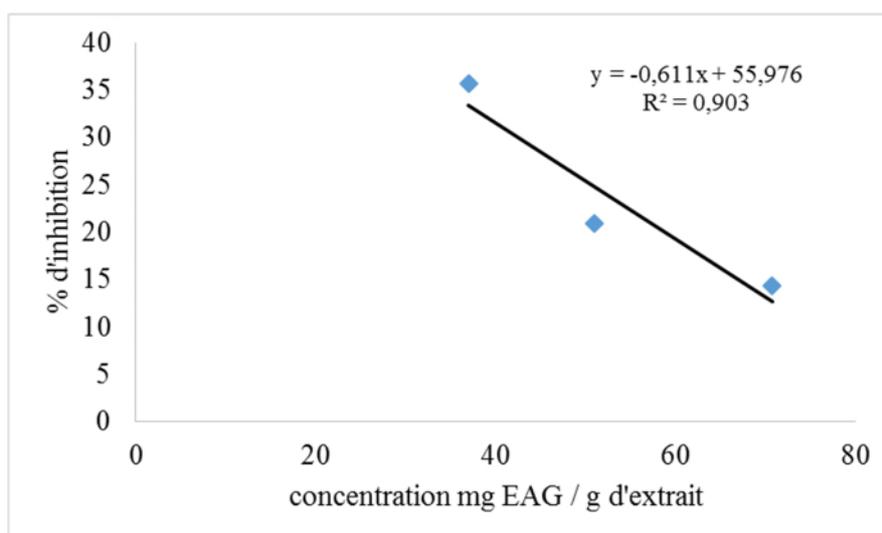


Figure 11 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en phénols totaux.

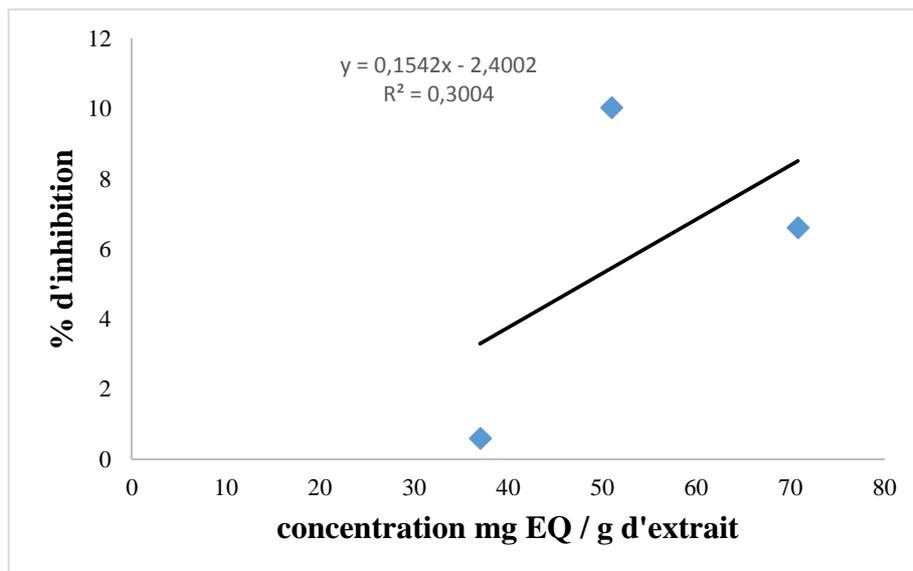


Figure 12 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en flavonoïdes.

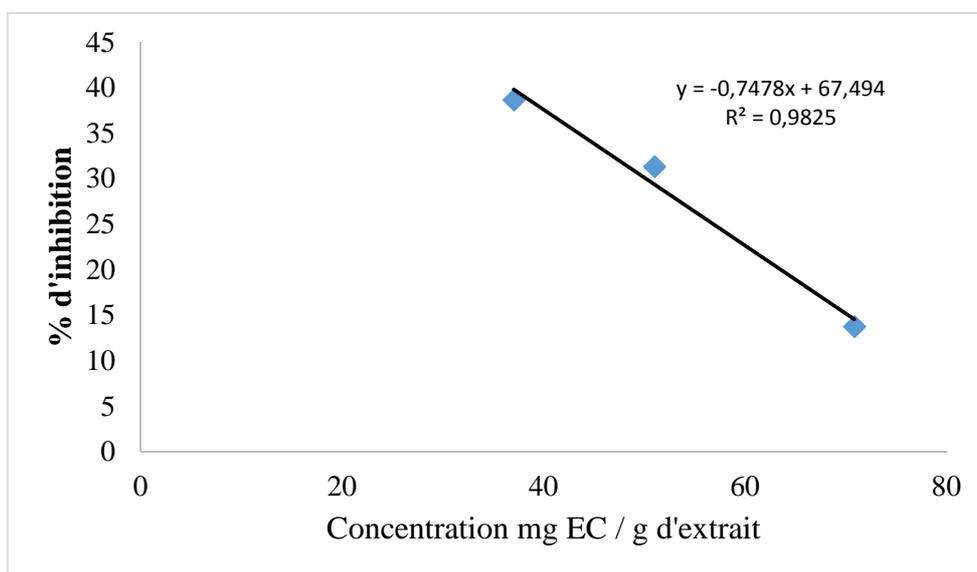


Figure 13 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en tanins condensés.

Annexes N°10 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS^{•+} et la teneur en phénols totaux, en flavonoïdes et en proanthocyanidines des extraits.

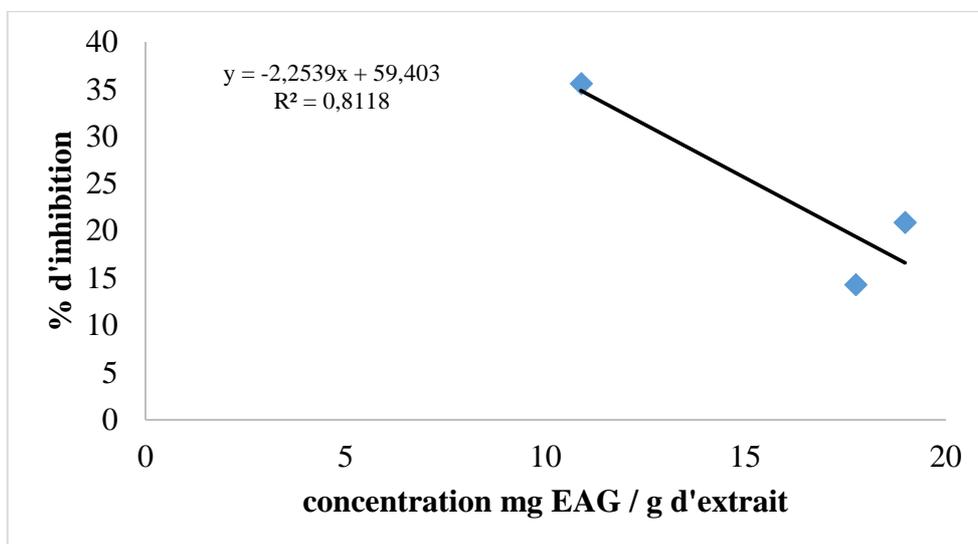


Figure 14 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS^{•+} et la teneur en phénols totaux.

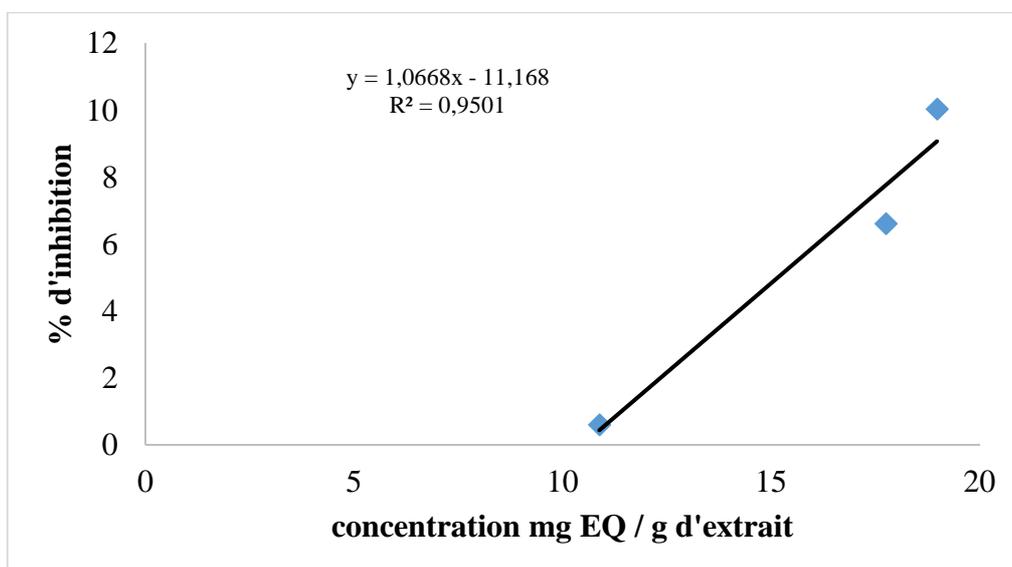


Figure 15 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS^{•+} et la teneur en flavonoïdes.

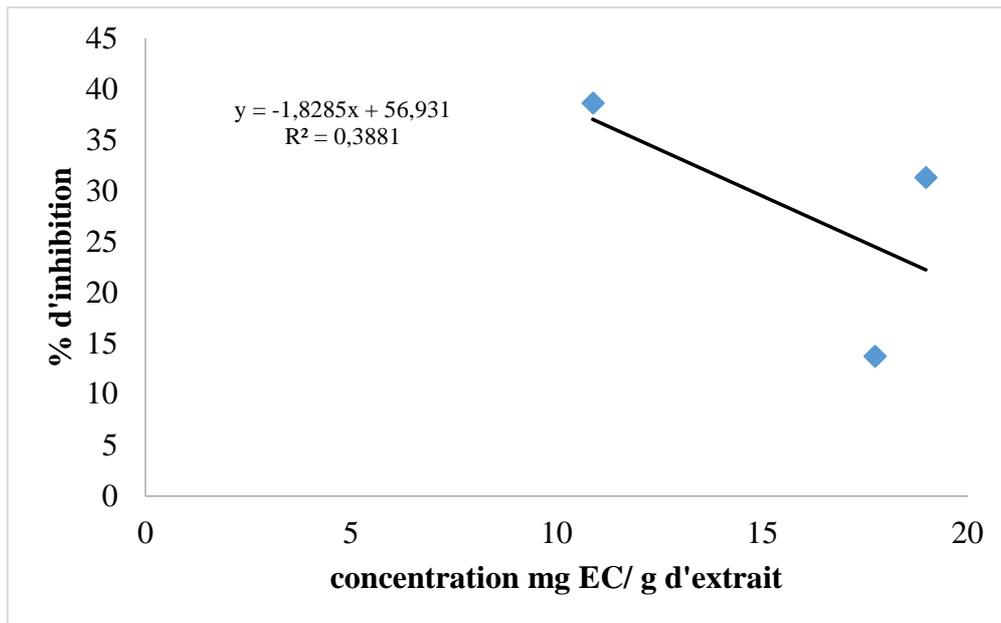


Figure 16 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS•+ et la teneur en proanthocyanidines.

Annexes N°11 : Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en phénols totaux, en flavonoïdes et en proanthocyanidines des extraits.

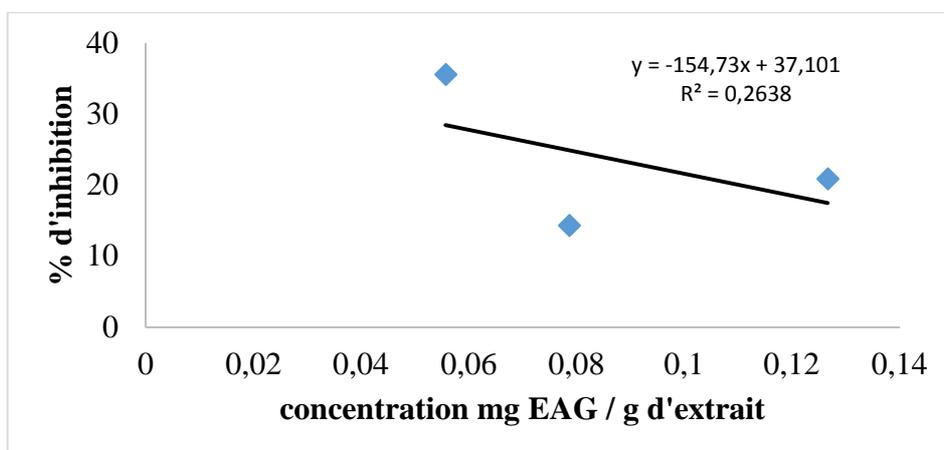


Figure 17 : Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en phénols totaux.

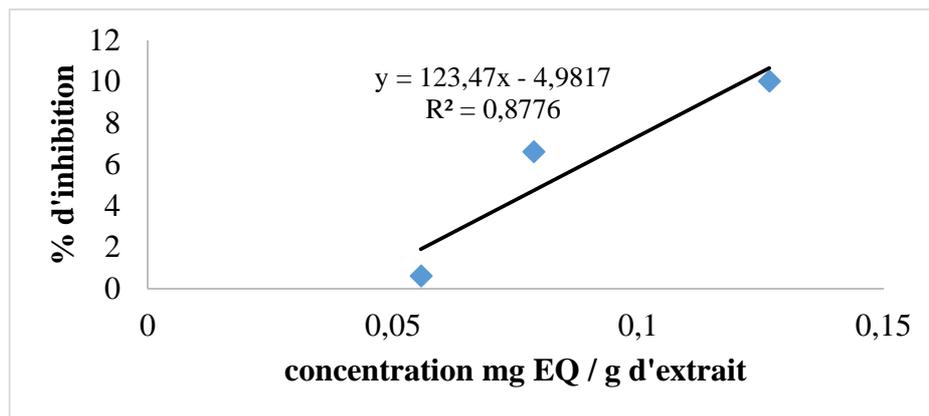


Figure 18 : Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en flavonoïdes.

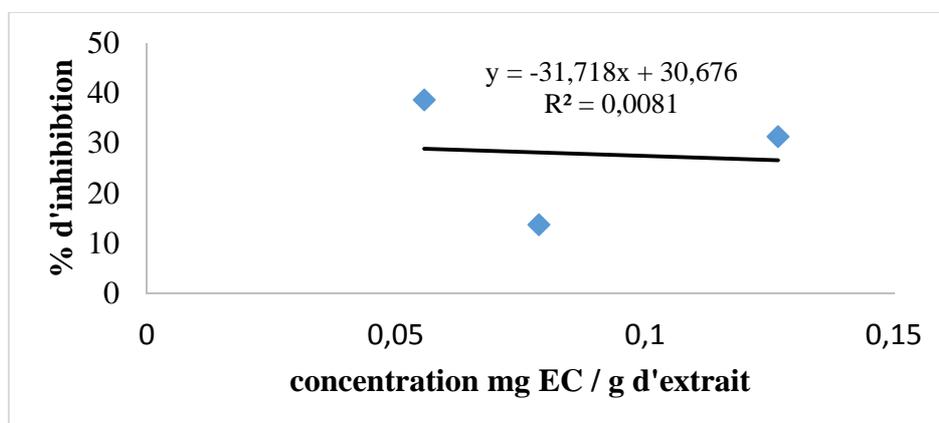


Figure 19 : Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en tanins condensés.

Annexes N°12 : Courbe de corrélation entre la chélation fer et la teneur en phénols totaux, en flavonoïdes et en proanthocyanidines des extraits.

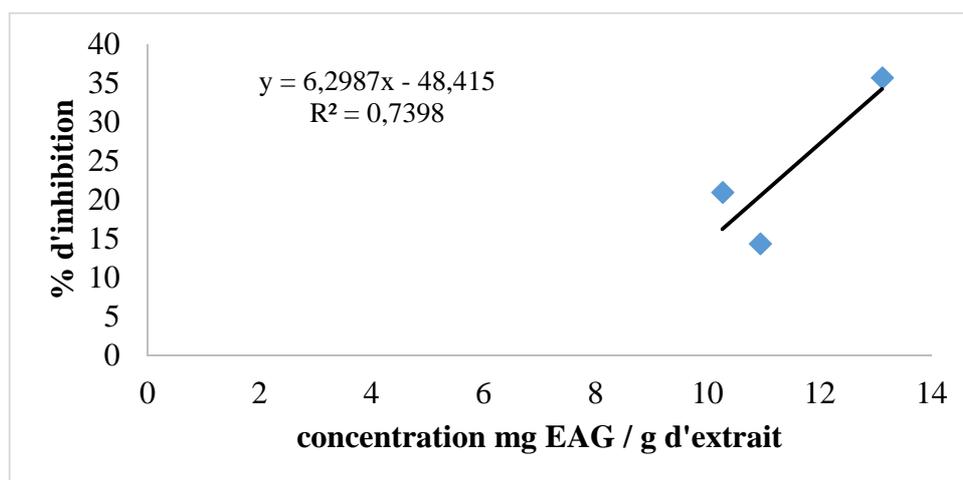


Figure 20 : Courbe de corrélation entre la chélation du fer et la teneur en phénols totaux.

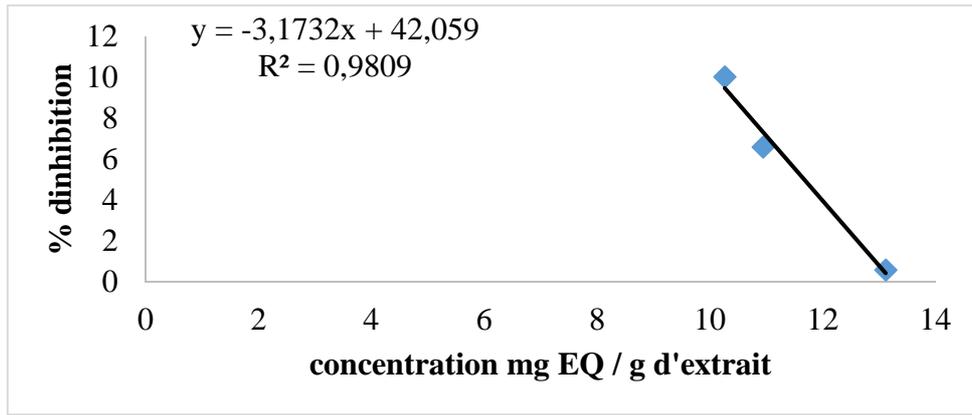


Figure 21 : Courbe de corrélation entre la chélation du fer et la teneur en flavonoïdes.

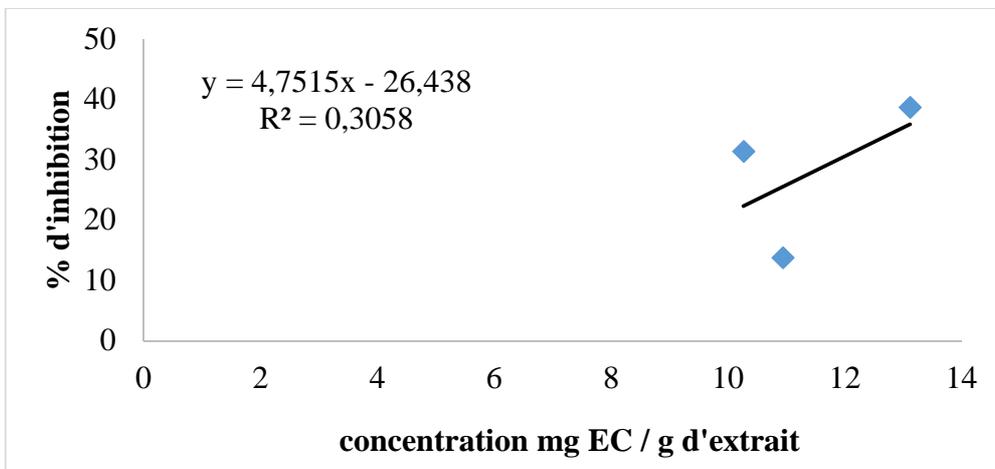


Figure 22 : Courbe de corrélation entre la chélation du fer et la teneur en tanins condensés.

Résumé

Les antioxydants jouent un rôle fondamental dans l'élimination de l'excès toxique en espèces réactives de l'oxygène à l'origine de diverses maladies dégénératives. Ainsi, l'exploitation des molécules végétales naturelles serait très bénéfique pour la santé humaine. Par conséquent, on s'est intéressé à l'évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques extraits à partir d'une plante médicinale locale, *Hyoscyamus albus*, et cela en faisant deux types de manipulations, après, bien évidemment, avoir obtenu les différents extraits de la partie aérienne de notre plante. D'abord, on a effectué le dosage des composés phénoliques (phénol totaux, flavonoïdes, et tanins condensés) pour pouvoir faire une appréciation qualitative et quantitative ; puis, on est passé à la mesure de l'activité antioxydante des extraits en réalisant quatre tests : le pouvoir réducteur, chélation du fer et l'activité scavenging des deux radicaux DPPH[•] et ABTS^{•+}. Les résultats expérimentaux des extraits d'*Hyoscyamus albus* ont révélé des teneurs appréciables en phénols totaux et en flavonoïdes, et des concentrations faibles en tanins condensés. Quant aux activités antioxydantes de la plante, les extraits ont été de très bons scavengers du radical DPPH[•] et du radical ABTS^{•+}. En revanche, le pouvoir réducteur et l'activité chélatrice du fer ont été modérés et faibles respectivement. Ces constatations nous laissent imaginer des études plus poussées sur des extraits d'une panoplie de plantes médicinales afin d'en bénéficier d'avantage.

Mots clés : *Hyoscyamus albus*, radicaux libres, antioxydants, composés phénoliques, DPPH.

Abstract

The antioxidants play a basic role in the elimination of the toxic reactive oxygen species excess. Thus, the exploitation of natural plant molecules will be very beneficial for the human health. Therefore, we were interested by the evaluation of the antioxidant activity of the phenolic compounds extracted from our local medicinal plant, *Hyoscyamus albus* that by doing two types of manipulations, of course, after getting the aerial part of *Hyoscyamus albus* extracts. First, we quantified the phenolic compounds amounts (total phenolic, flavonoids and condensed tannins), in order to make a qualitative and a quantitative assessment. Then we realized the antioxidant activity assays such as: the DPPH[•] and the ABTS^{•+} radical scavenging activity, the reducing power and iron chelation. The experimental results of *Hyoscyamus albus* extracts showed significant levels of total phenols and flavonoids, and low concentrations of condensed tannins. As for the antioxidant activities of the plant extracts were of very good scavengers of radicals DPPH[•] and ABTS^{•+}. However, the reducing power and chelating activity of iron were moderate and low respectively. These findings suggest we imagine further studies on extracts of a variety of medicinal plants in order to get advantage.

Keywords: *Hyoscyamus albus*, free radicals, antioxidants, phenolic compounds, DPPH.

ملخص

مضادات الأكسدة تلعب دورا أساسيا في القضاء على أنواع رد الفعل الأكسجين السامة الزائدة المسؤولة عن العديد من الأمراض التنكسية. وهكذا، فإن استخدام الجزيئات النباتية الطبيعية قد تكون مفيدة جدا لصحة الإنسان. لذلك، كان هناك اهتمام في تقييم النشاط المضاد للأكسدة لمركبات الفينول المستخرج من العشب المحلي، السكران الأبيض، وذلك عن طريق جعل نوعين من العمليات، بالطبع بعد الحصول على مستخلصات مختلفة من الجزء العلوي من النبات. أولاً، قمنا بتحديد المركبات الفينولية (الفينول الكلي، الفلافونويد، والتنيك المكثفة) من أجل إجراء تقييم النوعي والكمي. ثم انتقلنا لقياس النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات وذلك عن طريق إجراء أربعة اختبارات: قوة الأرجاع، خلب الحديد و الحد من النشاط

الجزري DPPH و ABTS. وأظهرت النتائج التجريبية ان مستخلصات السكران الأبيض

تحتوي على كمية معتبرة من الفينولات الإجمالية والفلافونيدات، وتركيزات منخفضة من التنيك المكثف. أما بالنسبة للأنشطة المضادة للأكسدة من جدا ضد الجزرين ABTS و DPPH و من ناحية أخرى، كانت قوة الأرجاع معتدلة. المستخلصات النباتية كانت جيدة

و نشاط خلب الحديد ضعيف. و هذه النتائج تسمح لنا بتصور المزيد من الدراسات على مستخلصات مجموعة من النباتات الطبية المتنوعة للاستفادة أكثر.

الكلمات المفتاحية: السكران الأبيض، الجذور الحرة، المضاد للأكسدة، المركبات الفينولية