

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département Biologie Physico-Chimique
Filière : Sciences Biologiques
Option : Biochimie Fondamentale



Référence :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Spécialité : Biochimie Fondamentale

Thème :

**Potentiel antioxydant
des extraits d'origine végétale**

Présenté par : **IDIR Manel**

Soutenu le : **13 Septembre 2022 à 9h00**

Devant le jury composé de :

Présidente :	M^{me} Bahloul Cheraft N.	MCB
Examinatrice :	M^{me} Sebaihi Harzoune S.	MCB
Promotrice :	M^{me} Ayouni K.	MCB

Année universitaire : 2021/2022



REMERCIEMENTS

*Je tiens en premier lieu à remercier **Dieu** le tout puissant de m'avoir procuré la santé et la volonté d'entamer et de mener ce mémoire jusqu'à sa fin.*

*J'adresse mes profondes reconnaissances et mes chaleureux remerciements à ma promotrice **M^{lle} AYOUNI Karima** pour son encouragement, ses conseils et pour les efforts qu'elle a consentie durant la réalisation de ce travail. Ce dernier est un témoignage de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance et mon respect.*

*Mes vifs remerciements vont aussi aux **membres du jury** pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner ce travail et de l'enrichir par leurs propositions. Celui ci est pour moi l'occasion de vous témoigner ma profonde gratitude.*

*Je remercie aussi tous le personnel des laboratoires de **Biochimie Appliquée, Biologie Physico-Chimique, et Techniques d'Analyses Biologiques** de l'université de Bejaia, pour m'avoir ouvert les portes et fait en sorte de mettre à notre disposition l'ensemble des moyens et produits souhaités. Votre gentillesse mérite toute admiration. Je saisis cette occasion pour vous exprimer tout mon respect.*

*Mes sincères remerciements vont également à Docteur Lalaoui K. et son personnel du laboratoire d'analyses médicales **LALAOUI** de Bejaia, d'avoir accepté de faire nos prélèvements de sang dans les meilleures conditions. Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération.*

*Au final, je tiens à remercier tout nos **enseignants** pour leur soutien fort remarqué durant ce cursus, ainsi que toute personne ayant contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce travail.*

Merci

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

A mes très chers parents :

Mon Père qui est mon exemple éternel et mon soutien moral, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir.

Ma Mère, la lumière de mes jours, la source de mes efforts, ma vie et mon bonheur.

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'affection et l'amour que j'éprouve envers vous. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

A mes chère sœurs : Yasmine et Aya et mon cher frère Amar pour leurs encouragements, soutien et sacrifices durant la réalisation de ce travail.

A la mémoire de ma grand-mère, que ta belle âme repose en paix.

A mes chers grands-parents, que Dieu vous garde et préserve.

Aux personnes dont j'ai bien aimé leur présence continue, mes aimables cousins et cousines. En témoignage de l'attachement que je vous porte.

A mes chères amies Imen et Nelly pour leurs bons conseils, leurs sens de l'humour et leurs manière de me remonter le moral.

A tous les membres de ma famille, petits et grands. Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

A ceux pour qui le cœur bat qu'il soit proche ou loin, ceux qui restent Présents même dans leur absence.

Manel

Liste des abréviations

Abs. : Absorbance

ANOVA : Analyse de la variance

E.D. : Eau distillée

Eq.A.G E. : Equivalent acide gallique

Eq.A.Asc E. : Equivalent acide ascorbique d'extrait

Eq.Trolox E. : Equivalent Trolox d'extrait

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

MDA : Malonyldialdéhyde

S.E. : Suspension érythrocytaire

SEM : Somme des écarts moyens

TBA : Acide thiobarbiturique

TPTZ : 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride

PR : Pouvoir réducteur

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Photographie des feuilles et graines de <i>Pistacia lentiscus</i>	03
02	Photographie de l'arbre et feuille ainsi que bourgeons de <i>Populus nigra</i>	06
03	Structure de base d'une fonction phénol (C ₆ H ₅ OH)	08
04	Schéma de d'extraction des métabolites primaire et secondaires des feuilles et graines de <i>P.lentiscus</i> ainsi que les bourgeons de <i>P.nigra</i>	11
05	Activité anti-oxydante équivalente au trolox (A), et pourcentage du pouvoir réducteur des extraits (bourgeons de <i>Populus</i> et feuilles et grains de <i>Pistacia</i>) (B).	16
06	Activité anti-oxydante équivalente à l'acide ascorbique (µg/mg) des extraits (A) ; pourcentage d'inhibition du radical libre par les extraits (B).	17
07	Effet induits par différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) (A) ; Taux d'MDA induits par différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) (B).	19
08	Effet hémolytique des extraits.	21
09	Effet inhibiteur des extraits des deux plantes de l'hémolyse induite par le peroxyde d'hydrogène (8mM) (A) ; taux des MDA produits en présence des extraits (B)	22

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Taxonomie de <i>Pistacia lentiscus</i> .	03
II	Taxonomie <i>Populus nigra</i> .	05
III	Les principes classes des composés phénoliques.	09
IV	Différents appareils et produits chimiques utilisés	10
V	Teneur en composés phénoliques dans les extraits de différentes plantes.	15

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	

Sommaire

Introduction	01
---------------------------	-----------

I. Synthèse bibliographique

I. 1. Les plantes médicinales	02
I. 2. <i>Pistacia lentiscus</i>	03
I. 2. 1. Utilisation traditionnelle en phytothérapie de <i>Pistacia lentiscus</i>	04
I. 2. 2. Investigations scientifiques des activités biologiques de <i>Pistacia lentiscus</i>	04
I. 3. <i>Populus nigra</i>	05
I. 3. 1. Utilisation traditionnelle en phytothérapie de <i>Populus nigra</i>	06
I. 3. 2. Investigations scientifiques des activités biologiques de <i>Populus nigra</i>	06
I. 4. Les composés phénoliques	07

II. Matériel et méthodes

II. 1. Matériel	19
II. 1. 1. Appareillage et produits chimiques.....	10
II. 1. 2. Matériel végétal.....	10
II. 1. 3. Echantillons de sang.....	11
II. 2. Méthodes	11
II. 2. 1. Dosage des phénols totaux	12
II. 2. 2. Evaluation de l'activité antioxydante.....	12
II. 2. 2. 1. Test de la capacité antioxydante par réduction du fer (FRAP)	12
II. 2. 2. 2. Test de piégeage du radical libre DPPH.....	13
II. 2. 3. Evaluation de l'activité hémolytique et anti-hémolytique des extraits	13
II. 2. 3. 1. Préparation des suspensions érythrocytaires	13
II. 2. 3. 2. Hémolyse induite par peroxyde d'oxygène (H ₂ O ₂)	13
II. 2. 3. 3. Effets des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> et <i>Populus nigra</i> sur les suspensions érythrocytaires	14
II. 2. 3. 4. Effet anti-hémolytique des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> et <i>Populus nigra</i>	14
II. 2. 3. 5. Estimation de peroxydation lipidique	15

III. Résultats et discussion

III. 1. Dosage des phénols totaux.....	15
III. 2. Evaluation de l'activité anti-oxydante	16
III. 2. 1. Test de la capacité antioxydant par réduction du fer (FRAP)	16
III. 2. 2. Test de piégeage de radical libre DPPH	17
III. 3. Résultats de l'évaluation de l'activité hémolytique et anti-hémolytique des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> , <i>Populus nigra</i>	19
III. 3. 1. Evaluation de l'effet hémolytique et taux des MDA induit par le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	19
III. 3. 2. Evaluation de l'effet hémolytique des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> , <i>Populus nigra</i> sur les suspensions érythrocytaires	20
III. 3. 3. Résultats de l'évaluation de l'effet anti-hémolytique des extraits de <i>P. lentiscus</i> et <i>P. nigra</i> et des taux des MDA après traitement des érythrocytes par les extraits et le H ₂ O ₂	22
Conclusion et perspectives	25
Références bibliographiques	27

Annexes

Résumés

Les plantes médicinales ont toujours été la source et la base de leurs remèdes pour le traitement et le soulagement de plusieurs maladies. Les connaissances disponibles sur l'utilisation des plantes et leurs préparations en médecine traditionnelle est un énorme savoir qui mérite être explorée (**Hostettman et al., 2000**). Une des particularités des plantes supérieures est leur capacité à produire un grand nombre de produits chimiques organiques de grande diversité structurale qui sont les métabolites secondaires, tels que les polyphénols, les terpènes, les stéroïdes et alcaloïdes (**Bourgaud et al., 2001**). Ces derniers, sont connus pour leurs diverses activités biologiques, tel que la protection des molécules biologiques contre leur oxydation par les radicaux libres (**Berger, 2006**). En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention de nombreuses pathologies, notamment dans le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires (**Vârban et al., 2009**).

Actuellement, plusieurs recherches à travers le monde se sont orientées vers la valorisation des substances biologiquement actives, afin d'établir des règles scientifiques pour l'usage des plantes médicinales. *Pistacia lentiscus* et *Populus nigra* sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle pour leurs diverses activités biologiques. Donc peut-on dire aussi que ces deux plantes ont un potentiel antioxydant important.

Ce travail vise à évaluer l'activité antioxydante des extraits ainsi que le dosage des phénols totaux des bourgeons de *Populus nigra* et les feuilles et graines de *Pistacia lentiscus*, en effectuant un ensemble de tests *in vitro* : test DPPH et test FRAP et un test sur un modèle membranaire (les érythrocytes), en évaluant leurs activité préventive de l'hémolyse induite par un agent oxydant, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Ce mémoire comporte deux parties principales, la première partie est consacrée à la synthèse bibliographique, regroupant l'ensemble des généralités sur ces deux plantes. Tandis que la 2^{ème} partie est dédiée à la présentation du matériel et les protocoles suivis durant le travail expérimental, suivi des résultats obtenus, leurs interprétations et discussion, afin de poser quelques conclusions et perspectives à cette étude.

I.1. Les plantes médicinales

La plante médicinale est une plante qui a un potentiel métabolique de synthétiser des substances complexes (en structure et composition) dites secondaires au niveau de plusieurs parties de ses organes (racines, tiges, feuilles,..) (Basli et al., 2012). Ces métabolites secondaires synthétisés peuvent être utilisés à des fins thérapeutiques ou comme étant précurseurs dans la synthèse de drogues utiles (Sofowora, 2010).

L'utilisation de ces fins thérapeutiques désigne la phytothérapie. Le terme «phytothérapie», mot provient du grec qui signifie *phytos* : la plante et *thérapie* : la cure ou traitement ; est néologisme inventé par Henri Leclerc au début XIX^e siècle. Depuis, le mot de phytothérapie est largement utilisée dans les milieux scientifiques (Belaiche, 1979).

La phytothérapie est le traitement curatif ou préventif des maladies et des troubles subjectifs par l'utilisation de préparations obtenues à partir de plantes entières ou d'organes de plantes – feuilles, fleurs, racines, fruits, graine en raison de leurs propriétés contenant plusieurs principes actifs (Fintelman et Welss, 2004).

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. Sans oublier que les hommes n'ont eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria.

Au XX^e siècle, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus. La phytothérapie propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, est souvent associée aux traitements classiques. Elle a connu au XX^e siècle un renouveau exceptionnel en Occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite (Iserin, 2001).

Parmi les plantes médicinales les plus importantes et les plus utilisées en médecine traditionnelle et moderne en vu de leurs activités anti-oxydantes et richesse en métabolites secondaires, on s'est intéressé à *Pistacia lentiscus* et *Populus nigra*.

I.2. *Pistacia lentiscus*

Pistacia lentiscus, appelé communément le pistachier lentisque, appartient au genre *Pistacia* de la famille Anacardiaceae (**Tableau I**). C'est un arbrisseau à feuillage persistant dioïque, très ramifié, jusqu'à 3m, ou arbre jusqu'à 6m, son fruit est une drupe de 4mm de long, de couleur rouge à noir (Figure 1 A et B). La résine du tronc est récoltée et utilisée dans des colles spécialisées ou pour des pansements (**Beyer et al., 2010 ; Bozorgi et al., 2013**). Il est connu en Algérie sous différents noms vernaculaires dépendant des régions. Dans la région de Jijel : *Tro* ou *Troo* ; et dans la région la Kabylie *Amadagh* et son fruit est dénommé *Tidekt* (**Bensalem 2015**).

Pistacia lentiscus est largement distribué dans le bassin méditerranéenne : de l'Asie et régions méditerranéennes de l'Europe ; nord-africain jusqu'aux Canaries (**Ansari et Seddiqui, 2012**). En Algérie, il pousse à l'état sauvage, sur tout type de sol des régions subhumide et semi-aride (**Amara et al., 2019**).

Tableau I: Taxonomie de *Pistacia lentiscus* (**Quezel et Santa, 1963**).

Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophyte
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotymédone
Sous Classe	Apétale
Ordre	Spindales
Famille	Anacardiacea
Genre	<i>Pistacia</i>
Espèce	<i>Pistacia lentiscus</i>



Figure 01 : Photographie des feuilles et graines de *Pistacia lentiscus* (www.depositphotos.com consulté le 27/10/2022).

I.2.1. Utilisation traditionnelle en phytothérapie de *Pistacia lentiscus*

Pistacia lentiscus est connu depuis l'antiquité pour ses propriétés médicinales ; en effet les médecines traditionnelles pratiquées de part et d'autre des rives de la méditerranée attribuent au lentisque des vertus dans le traitement des ulcères, l'hypertension, la toux, les maux de gorge, l'eczéma, les calculs rénaux et la jaunisse (Gardeli et al 2008).

- Le mastic a été utilisé par les guérisseurs traditionnelles pour soulager les douleurs abdominales hautes, l'ulcère duodénal et les maux d'estomac (Al-Habbal et al 1984), tandis que la résine du mastic ; vu que le mastic est composé de 90% de résine et 2% de huile volatile ; est utilisé comme encens ; également comme conservateur et édulcorant pour l'haleine (Al-Habbal et al., 1984. Bozorgi et al., 2013).
- Le fruit du pistachier est utilisé pour traiter la grippe, le rhumatisme, l'eczéma, la diarrhée et les infections de la gorge (Bozorgi et al., 2013).
- Les feuilles et l'écorce sont employées, en décoction ou en poudre, dans le traitement des maux de ventre, de l'intestin, de diarrhée et du diabète (Lahsissen et al., 2009). Les feuilles sont aussi utilisées pour traiter l'eczéma, les infections de la gorge et comme un puissant antiulcéreux (Kivçak et Akay, 2005).

I.2.2. Investigations des activités biologiques de *Pistacia lentiscus*

Plusieurs études et recherches ont été apportées sur les propriétés et activités biologiques de *Pistacia lentiscus* dont ; la gomme du son mastic contient des composés qui inhibent la prolifération et induit la mort cellulaire des cellules cancéreuses plus précisément celles du colon (Balan et al 2007). L'extrait phénolique et l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* inhibent la croissance d'agents pathogènes humains et peuvent être utilisées comme composés thérapeutiques ou désinfectants contre les micro-organismes ; tandis que l'extrait des feuilles de *P.lentiscus* présente une activité antifongique contre quelques bactéries en inhibant leurs croissance (Cakir et al., 2003 ; Mezni et al., 2015 ; Bouyahya et al., 2019). Les polyphénols isolés de *Pistacia lentiscus* (acide galliques et 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose), ont une activité inhibitrice de la mutagénicité et la génotoxicité dans des essais, *in vitro* (Bozorgi et al., 2013). L'extrait de résine de *P.lentiscus* a montré aussi une activité anti-inflammatoire sur les

cellules endothéliales aortiques humaines et a une activité inhibitrice sur l'expression des molécules d'adhésions TNF- α stimulé les cellules endothéliales aortiques humaines. Cette activité anti-inflammatoire est dû à la présence des flavonoïdes dans différentes parties de pistachier. Ces flavonoïdes ont un effet inhibiteur sur des enzymes de régulation importantes, dont certains sont des puissants inhibiteurs de la production des prostaglandines, des molécules pro-inflammatoire très actives (Manthey, 2000 ; Bozorgi et al., 2013). Ainsi que les différentes parties de *P.lentiscus* ont montré aussi une richesse en polyphénols, flavonoides et tannins, ce qui lui confère un potentiel antioxydant élevé. Il présente aussi un pouvoir réducteur, une activité inhibitrice contre les dommages causé par le H₂O₂ dans la lignée cellulaire, avec une efficacité aussi que celle de la quercétine et l'acide gallique (Atmani et al., 2009 ; Bozorgi et al., 2013 ; Remila et al., 2015).

I.3. *Populus nigra*

Populus nigra aussi connu sous le nom de «peuplier noir », est un membre de la famille des Salicaceae (Jekovic et Mastelic, 2003). Le peuplier est un arbre des terrains humides, à rameaux étalés ou dressés, à cimes parfois pyramidales, à écorces plus au moins claire, avec des feuilles triangulaires assez coriaces luisantes. Ces fleurs sont groupées en chatons protégés par des bourgeons jaune brun résineux. Le fruit est une capsule (Bézanger et al., 1980).

Le peuplier noir est un arbre qui pousse dans les régions froides ; en Europe (le sud et le centre), Nord d'Afrique et d'Asie arrivé jusqu'à l'Himalaya et l'Amérique de Nord jusqu'au Mexique (Jerkovix et Mastelic, 2003 ; Brosse et Pelt 2010).

Tableau II : Taxonomie de *Populus nigra* (Quezel et Santa, 1962).

Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiosperme
Classe	Dicotylédone
Sous classe	Monochlamide
Ordre	Salicales
Famille	Salicacées
Genre	<i>Populus</i>
Espèce	<i>Populus nigra</i>



Figure 2 : Photographie de l'arbre et feuille ainsi que bourgeons de *Populus nigra* (www.depositphotos consulté le 27/10/2022).

I.3.1. Utilisation traditionnelle en phytothérapie de *Populus nigra*

Populus nigra présente une bonne source biologique en composés actifs, qui peuvent être utilisés en thérapeutique et pharmaceutique en raison de leur richesse et leur diversité en composition des métabolites secondaires (Boumghar et al., 2019).

- Depuis l'antiquité, les décoction et extraits de bourgeons de peuplier noir était utilisés pour la cicatrisation des plaies, soulagement des symptômes de la dermatite, traitement des rhumatismes et des infections des voies respiratoires. Et vu sa richesse en composés phénoliques, cela lui attribue un avantage potentiel sur le vieillissement cutané, car il a une forte modulation de la transcription des gènes impliqués dans l'activité anti-oxydante de défense, réponses inflammatoires et renouvellement cellulaire (Xavier et al., 2011 ; Stanciauskaitė et al., 2021).
- L'extrait méthanolique des feuilles de Peuplier noir a montré des effets très variables sur la mortalité des formes de *Toxoptera aurantii*. Cet extrait est riche en composants phénoliques, ce qui lui confère une toxicité envers les insectes, en agissant sur leur croissance, leur développement et leur fécondité (Arab et al., 2018).

I.3.2. Investigations des activités biologiques de *Populus nigra*

Plusieurs recherches et travaux ont été apportés sur les propriétés thérapeutiques ainsi les activités biologiques de *Populus nigra* dont ; les extraits éthanoliques des

bourgeons de Peuplier noir ont montré une forte activité anti-inflammatoire, qui est due à sa richesse en flavonoïdes (Debbache et al., 2013), et l'extrait méthanolique des bourgeons a montré une activité antimicrobienne, qui peut être à l'origine d'une action synergique entre certains composants phénoliques (Debbache et al., 2014 ; Stanciauskaite et al., 2021). D'autres travaux ont montré que l'extrait aqueux des bourgeons de *Populus nigra* est doté d'une activité antioxydante dose dépendante et d'une activité antiradicalaire dues à l'acide caféique et p-coumarique identifiés comme les principaux composants antioxydants (Dudonné et al., 2011). Ce même extrait était plus efficace que les standards utilisés (catéchine et mannitol) dans le piègeage *in vitro* de l' H_2O_2 et la formation du radical hydroxyle (OH) impliqué dans la peroxydation lipidique qui affecte la fluidité des membranes. L'activité antioxydante a aussi été mise en évidence par la méthode de peroxydation de l'acide linoléique induite par le fer. Cette propriété antioxydante contribue dans l'effet anti-inflammatoire que possède cet extrait (Debbache et al., 2014). Cette activité antioxydante est médiatisée par la présence de composés phénoliques, qui est soutenue par la teneur élevée en composants phénoliques totaux dans la fraction aqueuse de son extrait (Xavier et al., 2011 ; Debbache et al., 2014 ; Stanciauskaite et al., 2021). L'exsudat des bourgeons de nombreuses espèces de genre *Populus* a longtemps été utilisées pour traitement des plaies et des ulcères. Cette activité est due au phénol des acides carboxyliques et flavonoïdes (Isidorov et Vinogorova 2003).

I. 4. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des composés phytochimiques qui sont présents dans tous les organes de la plante : racines, tiges, feuilles et fruits (Beta et al., 2005). Ils présentent plusieurs propriétés physiologiques parmi elles l'activité antioxydante, due à leurs capacités de réduire la concentration des radicaux libres et les éliminer ainsi que les dommages dus aux radiations (Parr and Bolwell, 2000).

Ces molécules font partie des classes des métabolites secondaires, qui à leur tour jouent un rôle majeur dans l'adaptation des plantes à leur environnement (Bourgad et al., 2001 ; Guerriero et al., 2018).

L'élément structural fondamental des composés phénoliques qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique, auquel est directement lié au moins un

groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction (ester ; éther ; hétéroside...) (Figure 3) (Bruneton, 1986).

La structure des composés phénoliques va du simple noyau aromatique jusqu'aux tanins complexes de très haut poids moléculaire, et ils peuvent être classés par le nombre et l'arrangement des atomes de carbone qui le compose, en fonction de la nature de leurs squelette carboné et en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique (Chira et al., 2018).

Selon Harbon 1980, les polyphénols peuvent être divisés en au moins 10 classes différents en fonction de leur structure chimique (Bravo, 1998), dont on peut citer certaines dans le tableau III;

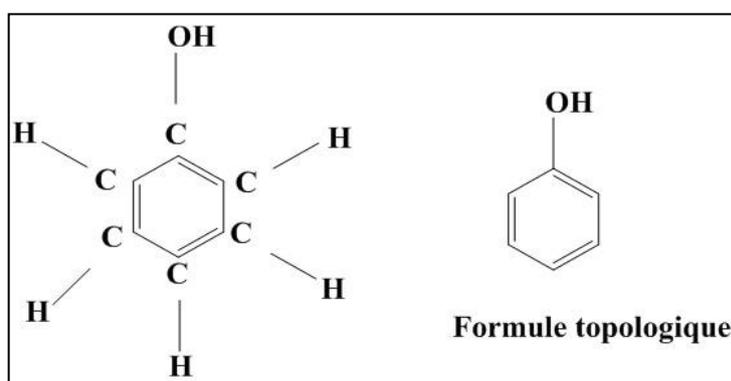
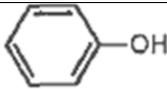
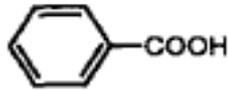
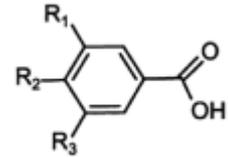
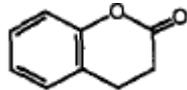
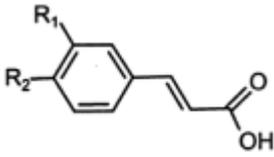
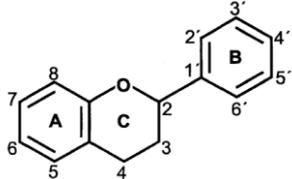
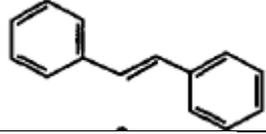
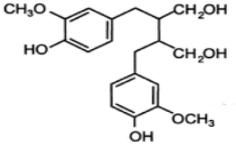
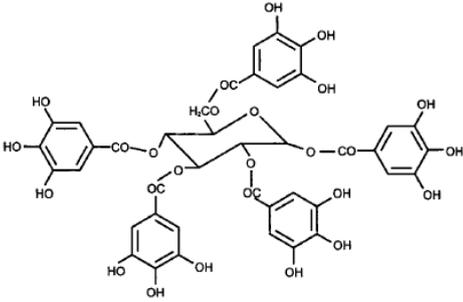


Figure 3 : Structure de base d'une fonction phénol (C₆H₅OH) (Chira et al., 2018).

Tableau III : Les principales classes des composés phénoliques (Bravo, 1998 ; Cutrim et Cortez, 2018).

Chaîne carbonée	Classe	Structure
C6	Phénol simple	
C6-C1	Acide phénolique	
	Acide hydroxybenzoïque	
	Acide hydroxycinnamique	
C6-C3	Coumarine	
C6-C3-C6	Flavonoïde	
C6-C2-C6	Stilbens	
(C6-C3) n	Lignins	
(C15)	Tanins	

Donc l'objectif s'est d'évaluer l'activité antioxydante des extraits de ces plantes en effectuant un semble de tests *in vitro*.

II.1. Matériel

II.1.1. Appareillage et produits chimiques

Pour la réalisation de ce travail, plusieurs produits chimiques et appareils ont été utilisés, ils sont cités dans le tableau suivant :

Tableau IV : Différents appareils et produits chimiques utilisés

Produits chimiques	Appareils et matériel divers
-Acide acétique	-Agitateur
-Acétate de potassium ($C_2H_3KO_2$)	-Bain-marie
-Acide ascorbique /Acide gallique	-Balance analytique
-Acide thiobarbiturique (TBA)	-Barreaux magnétiques
-Acide trichloracétique (TCA)	-Becher
-Azide de sodium (N_3Na)	-Centrifugeuse
-Carbonate de sodium ($NaCO_3$)	-Erlenmeyer
-Chlorure d'hydrogène (HCl)	-Eprouvette
-Chlorure de sodium (NaCl)	-Etuve
-Chlorure ferrique ($FeCl_3 ; 6H_2O$)	-Gants
-Dihydrogène-phosphate de sodium (KH_2PO_4)	-Microplaque 96 puits
-Eau distillé	-Micropipette (50 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)
-Ethanol (96%)	-pH-mètre
-Folin Ciocalteu	-Spectrophotomètre UV-Vis
-Hydrogène-phosphate de sodium ($NaHPO_4$)	-Sonicateur
-Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 35%	-Tubes à hémolyse
-Sodium acétate (CH_3COONa)	-Tubes à Eppendoff
-TPTZ	-Tubes héparinés
	-Vortex

II.1.2. Matériel végétal

Les feuilles de *P.lentiscuss* et bourgeons *P.nigra* ont été récolté en mars 2020 dans la forêt de la province de Tizi Neftah à Amizour, Bejaia (Algérie) tandis que les graines de *P.lentiscus* ont été récoltées en décembre 2020. Les feuilles ont été séchées à l'air libre dans l'obscurité à température ambiante, les bourgeons et graines ont été séchés dans des tubes. Ils ont été broyées jusqu'à l'obtention d'une poudre fine de 63 μ m à l'aide d'un broyeur c (KIKA Labortechnic, Staufen, Allemagne) et une tamiseuse électrique.

A partir des poudres fines sèches, l'extraction par épuisement a été menée par le procédé Soxhlet avec l'éthanol (80%), dans l'objectif d'optimiser l'extraction des métabolites bioactifs, particulièrement les composés phénoliques. L'extrait récupéré a été séché par rotavapeur pour éliminer l'éthanol, ensuite congelé à -80°C, pour continuer le séchage de la fraction aqueuse par lyophilisation. Le protocole d'extraction suivi est résumé dans la figure 4.

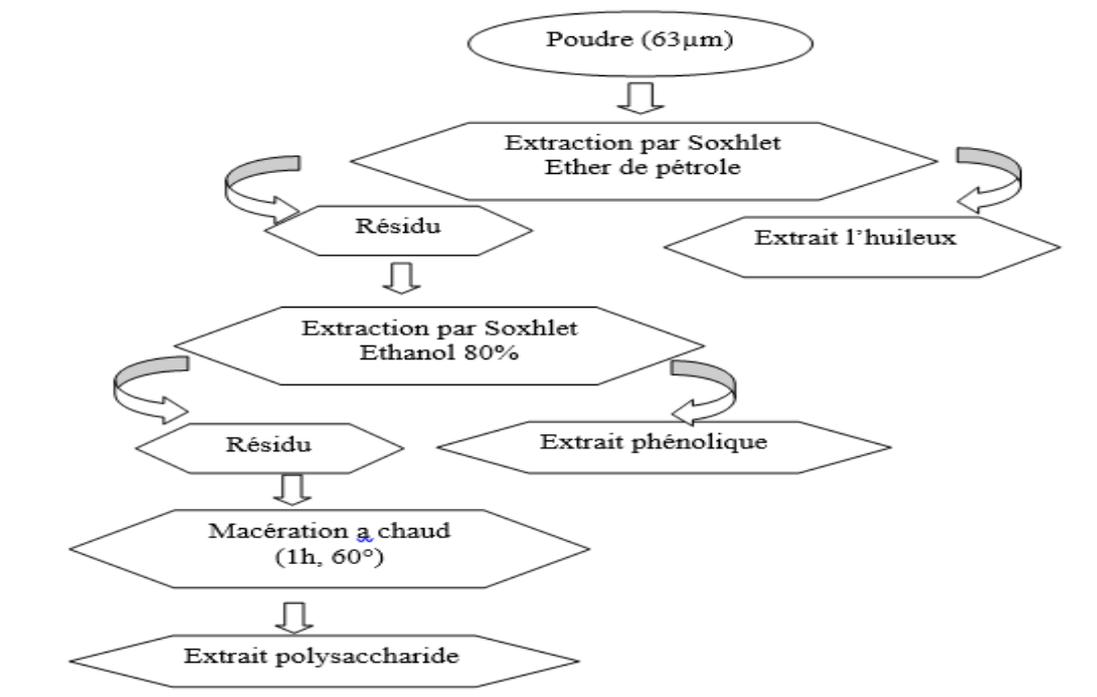


Figure 4 : Schéma de d'extraction des métabolites primaire et secondaires des feuilles et graines de *P.lentiscus* ainsi que les bourgeons de *P.nigra*

II.1.3. Echantillons sanguins

Les échantillons du sang ont été prélevés au niveau du laboratoire d'analyses médicales de Docteur Lalaoui (Bejaia), à partir de 6 individus volontaires de différents sexe et âge. La manipulation a été effectuée au sein du laboratoire de Biochimie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université de Bejaia.

II.2. Méthodes

Les différentes étapes réalisées dans cette étude sont : le dosage des phénols totaux, l'évaluation de l'activité anti-oxydante (pouvoir réducteur et activité anti-radical DPPH),

activité hémolytique et anti-hémolytiques de ces extraits de *Pistacia lentiscus* (graines et feuilles) et *Populus nigra* (bourgeons).

II.2.1. Dosage des phénols totaux

La teneur en phénols totaux des différents extraits de plantes ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu, décrite par **Kahkonen et al. (1999)**. Elle est basée sur la réduction des acides phosphomolybdiques ($H_3PMO_{12}O_{14}$) et phosphotungstiques ($H_3PW_{12}O_{40}$) du réactif de Folin-Ciocalteu par les phénols présents dans la solution d'extrait dans un milieu alcalin. 200 μ l de la solution d'extrait ont été ajoutés à un mélange de 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu (1N) et 800 μ l de carbonate de sodium (7,5%), vortéxés et incubé pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité.

Les absorbances relatives à l'intensité de la couleur bleue du complexe formé ont été enregistrées à 760 nm et la quantité des phénols totaux a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage (**Annexe 1**), en utilisant l'acide gallique comme standard et les teneurs en phénols totaux sont exprimées en μ g équivalent acide gallique / mg d'extrait sec (μ g Eq.AG/mg d'ext.).

II.2.2. Evaluation de l'activité anti-oxydante

II.2.2.1. Test de la capacité réductrice ferrique d'antioxydants (FRAP)

Test FRAP (*Ferrique reducing antioxidant power*) est un test colorimétrique qui permet de mesurer la capacité d'un antioxydant à réduire le complexe incolore $[Fe_3-TPTZ]$ en $[Fe_2-TPTZ]$ coloré en bleue intense qui peut être mesuré à une longueur d'onde de 593 nm (**Maksimovič et al., 2009**). Cette méthode a été réalisée sur microplaque de 96 puits suivant la méthode décrite par **Vercruyssen et al. (2009)** en mélangeant 20 μ l d'extrait avec 180 μ l de la solution FRAP. La solution FRAP a été préparé en mélangeant 10ml d'un tampon acétate (300mM pH ajusté à 3,6 en ajoutant l'acide acétique), 1ml chlorure ferrique hexahydraté (20mM dans l'eau distillé) et 1ml de TPTZ (10mM dans 40mM HCl). L'absorbance a été mesurée après 8min à 593nm et les résultats ont été calculés en utilisant Trolox comme standard (**Annexe 2**) et se sont exprimés en équivalent Trolox/mg d'extrait sec.

II.2.2.2. Test de piégeage de radical libre DPPH

Dans ce test, le radical 2,2 diphényle-1-picrylhydrazyl de couleur violet est réduit par un composé antioxydant réducteur pour avoir une hydrazine d'une couleur jaune (Luis et al., 2008). Sur microplaque de 96 puits, on met 180µl de solution DPPH à 25mM et 20µl d'extraits à différentes concentrations, on laisse incubé pendant 30 minutes et on mesure l'absorbance à 515 nm. L'activité anti-radicalaire des extraits a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage (Annexe 3), en utilisant l'acide ascorbique comme standard et les résultats ont été exprimés en µg/ml équivalent acide ascorbique et en pourcentage d'inhibition, calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{Inhibition} = \frac{[\text{Abs. DPPH} - \text{Abs. Test (DPPH + extrait)}]}{\text{Abs. DPPH}} * 100$$

II.2.3. Evaluation de l'activité hémolytique et anti-hémolytique des extraits

Les tests hémolytiques et anti-hémolytiques sur les érythrocytes ont été réalisés selon le protocole de Rafat et al. (2009), décrit par Sundaram et al. (2011).

II.2.3.1. Préparation des suspensions érythrocytaires

Les échantillons de sang humain ont été recueillis dans des tubes héparinés et centrifugés à 1500 rpm pendant 10 min, afin d'éliminer le surnageant, puis le culot globulaire a été lavé trois fois par centrifugation (à 3500 rpm/10 min), avec une solution saline de tampon phosphate à pH=7,4 (0,58 mM de KH₂PO₄, 3,4 mM de NaHPO₄, 150 mM de NaCl et 1 mM d'azide de sodium) et remis en suspensions dans le même tampon à un hématocrite de 10%.

II.2.3.2. Hémolyse induite par peroxyde l'oxygène (H₂O₂)

L'hémolyse a été réalisée avec le H₂O₂ comme initiateur de peroxydation lipidique. Une prise de 250 µl de la suspension érythrocytaire a été soumise à une attaque oxydante radicalaire par addition de 500 µl de H₂O₂ à différentes concentrations (1mM-10mM) et laissée incubée à 37 °C pendant 3 h. Un témoin négatif et un témoin positif ont été préparés en substituant la solution H₂O₂ par la solution tampon phosphate saline et de l'eau distillée, respectivement. Après incubation, le volume des différents échantillons a été ajusté à 4,5 ml

par la solution tampon. L'hémoglobine libérée dans le surnageant a été mesurée à 540 nm, après centrifugation à 2000 rpm pendant 10 min.

II.2.3.3. Effet des extraits de *Pistacia lentiscus* et *Populus nigra* sur les suspensions érythrocytaires

La même procédure expérimentale a été reprise avec des concentrations croissantes des deux extraits *Pistacia lentiscus* et *Populus nigra* préparés dans du tampon phosphate. Le taux d'hémolyse induite par différentes concentrations des extraits a été calculé en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse totale, selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = \frac{\text{Abs. de l'hémolyse de l'extrait} - \text{Abs. du témoin négatif}}{\text{Abs. de l'hémolyse totale}} * 100$$

II.2.3.4. Effet anti-hémolytique des extraits de *P.lentiscus* et *P.nigra*

Dans cette partie, la résistance des érythrocytes à l'attaque radicalaire en présence de différentes concentrations des extraits de *Pistacia lentiscus* et *Populus nigra* qui ne présentent pas un effet hémolytique a été effectuée, selon le même protocole précédent.

Elle consiste à ajouter, un volume de 500 µl d'extrait végétal à 250 µl de la suspension érythrocytaire. Après 30 min de préincubation à 37 °C, 500 µl de H₂O₂ à 8 mM ont été additionnées au milieu réactionnel et le mélange est remis en incubation jusqu'à 3 h. Un témoin négatif (préparé avec du tampon phosphate) et un témoin positif (préparé avec de l'eau distillée) ont été réalisés en parallèle. Après incubation, le volume de tous les essais a été ajusté à 4,5 ml.

L'hémolyse a été mesurée à 540 nm après centrifugations à 2000 rpm pendant 10 mins, et l'inhibition de l'hémolyse a été calculée comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition d'hémolyse} = \frac{(\% \text{ d'hémolyse H}_2\text{O}_2 - \% \text{ d'hémolyse l'extrait})}{\% \text{ d'hémolyse H}_2\text{O}_2} * 100$$

II.2.3.5. Estimation de peroxydation lipidique

Afin d'évaluer le taux de la peroxydation lipidique, le dosage des malondialdéhydes (MDA) résultants a été réalisé selon le protocole de **Tebekeme et Diepreye (2012)**.

Un mélange de 500 μl d'extrait avec 250 μl de la suspension érythrocytaire ont été incubés 30 min à 37 °C, puis 500 μl d' H_2O_2 ont été ajoutés et le mélange a été réincubé à nouveau pour une heure. Le mélange par la suite a été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min. 500 μl de surnageant ont été récupérés et additionnés à un volume de 2 ml de la solution TBA pour le remettre en incubation à 100 °C pendant 1 heure.

Après refroidissement et centrifugation, l'absorbance du surnageant a été mesurée par un spectrophotomètre à 532 nm. La quantité des MDA produite a été estimée par la conversion des absorbances en concentrations de MDA exprimées en $\mu\text{mol/ml}$ de suspension érythrocytaire, par le coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 1,56 \cdot 10^{-5} \text{cm} \cdot \text{nmol}^{-1}$ (Sawas et **Pentyala, 2004**). Cette démarche expérimentale a été réalisée en parallèle avec tous les tests hémolytiques, sauf celui des extraits et anti-hémolytiques cités précédemment.

III.1. Dosage des phénols totaux

Les teneurs en polyphénols des extraits des de *Pistacia lentiscus* (feuilles et graines) et bourgeons de *Populus nigra* ont été estimés par un dosage colorimétrique de Folin-Ciocalteu, les résultats sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau V : Teneurs en composés phénoliques dans les extraits de différentes plantes

Extraits	Teneurs en phénols totaux ($\mu\text{g Eq. AG/mg E.}$)	
	250 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$
<i>Populus nigra</i> (Bourgeons)	3,65 \pm 0,04	20,65 \pm 0,03
<i>Pistacia lentiscus</i> (Feuilles)	8,18 \pm 0,08	27,62 \pm 0,07
<i>Pistacia lentiscus</i> (Graines)	10,68 \pm 0,11	25,03 \pm 0,03

- Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type. $\mu\text{g Eq. AG/mg E.}$: microgramme Equivalent Acide gallique par milligramme d'extrait.

Les teneurs en phénols totaux obtenus dans le tableau ci-dessus montrent que les extraits des deux plantes présentent des taux importants en phénols totaux dans les deux concentrations testées (250 ; 500 $\mu\text{g/ml}$), avec une teneur deux fois plus importante (8,18 et 10,68 $\mu\text{g Eq. AG./mg E}$ respectivement) en extraits de feuille et graine de *Pistacia lentiscus*, comparativement à l'extrait des bourgeons de *Populus nigra* à une concentration de 250 $\mu\text{g/ml}$. Ainsi pour la concentration de 500 $\mu\text{g/ml}$, une légère augmentation en phénols totaux dans l'extrait de pistachier (feuilles : 27,62 et graines : 25,03 $\mu\text{g Eq. AG./mg E}$), par rapport aux bourgeons de *Populus* (20,65 $\mu\text{g Eq. AG./mg E}$).

III. 2. Evaluation et interprétation de l'activité anti-oxydante

III.2.1. Test de capacité antioxydante par réduction du fer (FRAP)

C'est une analyse de l'activité anti-oxydante rapide, et reproductible basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} , les résultats sont présentés dans la figure suivante :

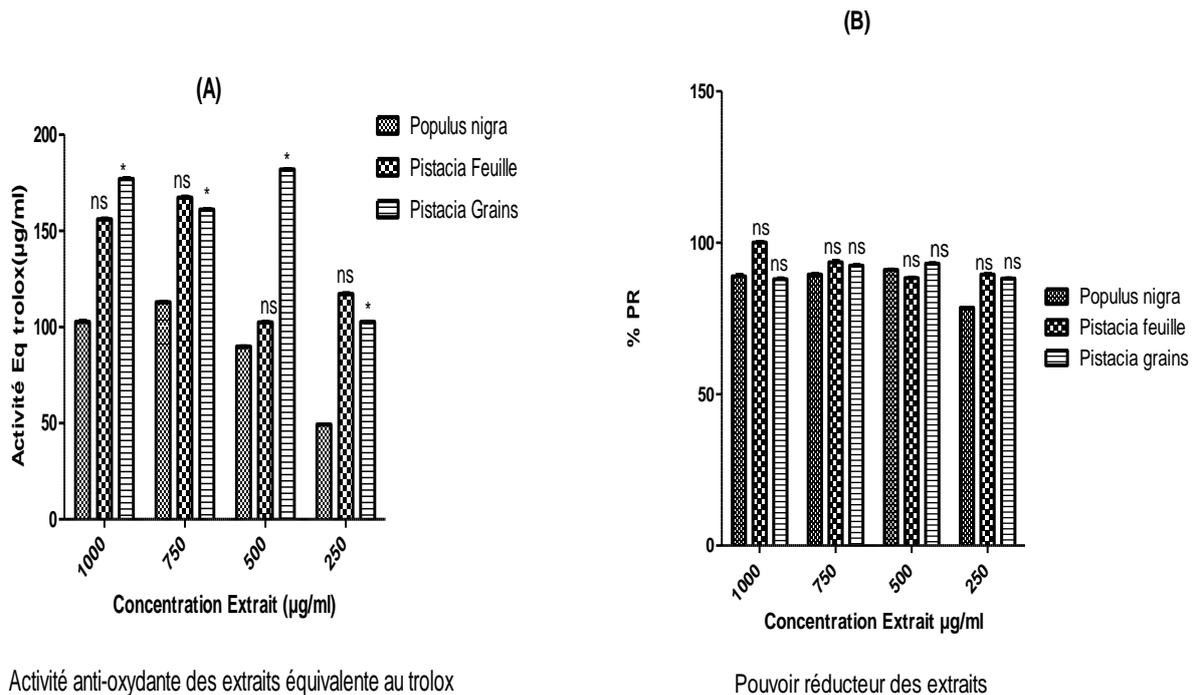


Figure 5 : Activité anti-oxydante équivalente à Trolox(A), et pourcentage du pouvoir réducteur des extraits (bourgeons de *Populus* et feuilles et graines de *Pistacia*) (B) résultant du test FRAP. Toutes les valeurs sont exprimées par une moyenne \pm SD (n=3). *P<0,05 indique une différence significative comparé au *Populus nigra*, ns : non significative comparé au *Populus nigra* par le test ANOVA one way, avec le post-test de Dunnett du logiciel de GraphPadPrism.5.3.

La figure 4 représente les résultats du test FRAP réalisé sur différents extraits de plantes et à différentes concentrations. Dans la figure A, on trouve les résultats qui montrent l'activité anti-oxydante équivalente au Trolox, qui sont importants et proches chez tous les extraits, à des concentrations élevées (1000 et 750µg/ml) avec une activité qui atteint 176,93 µg E.Trx/mg E pour l'extrait le plus fort (graines de Pistacia). Cette activité commence à diminuer diluant la concentration à 500µg/ml pour les extraits des bourgeons de *Populus* et feuilles de *Pistacia* (89,74µg E.Trx/mg et 102,28µg E.Trx/mg, respectivement), ce qui n'est pas le cas des graines de *Pistacia* où elles marquent une légère augmentation pour atteindre 181,85 µg

E.Trx/mg.E. A 250 μ g/ml, on remarque une diminution significative de l'activité dans tous les extraits comparé aux plus fortes concentrations.

L'évolution du pouvoir réducteur des extraits (figure 4B) a montré une meilleure activité pour l'extrait des feuilles de Pistacia par rapport aux autres extraits à la concentration de 1000 μ g/ml qui est une activité de 100%. Par contre dans les autres concentrations, elle se stabilise dans tous les extraits enregistrant un pouvoir réducteur similaire.

III. 2. 2. Test de piégeage de radical libre DPPH

Le DPPH est un radical libre stable avec une bande d'absorption à 517 nm. Il perd cette absorption lorsqu'il est réduit par un antioxydant. La méthode DPPH est employée couramment pour déterminer l'activité anti-radicalaire des composés phénoliques purifiés ainsi que des extraits de plantes naturels (**Brand-Williams et al, 1995 ; Fukumoto et Mazza, 2000**). Les résultats sont rapportés dans la figure ci-dessous :

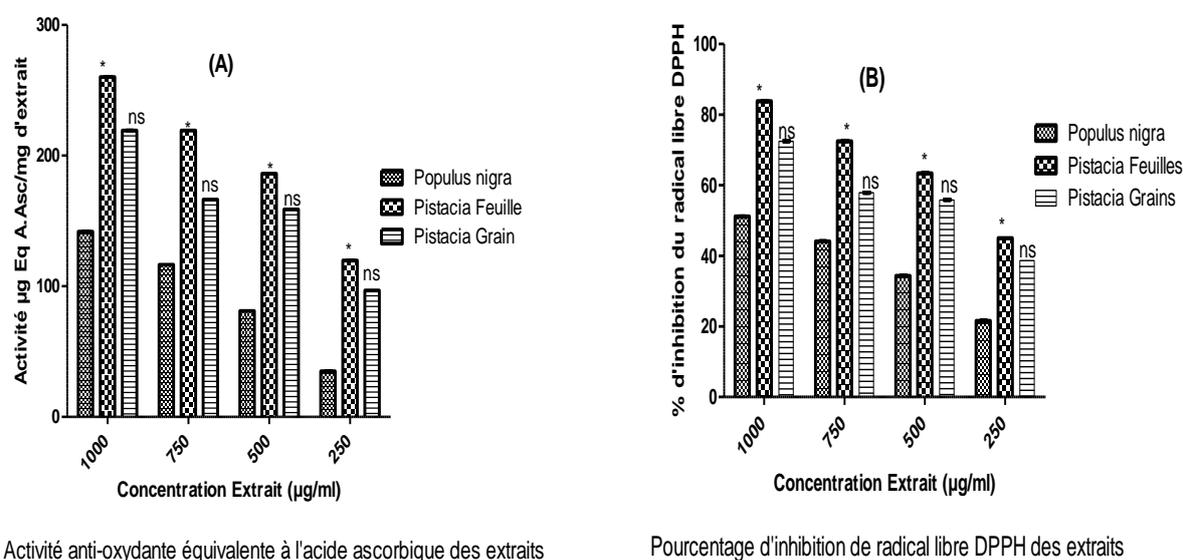


Figure 6 : Activité anti-oxydante équivalente à l'acide ascorbique (μ g/mg) des extraits (A) ; pourcentage d'inhibition du radical libre par les extraits (B) résultantes du test anti-radicalaire DPPH. Toutes les valeurs sont exprimées par une moyenne \pm SD (n=3). *P<0,05 indique une différence significative comparé au *Populus nigra*, ns : non significative comparé au *Populus nigra* par le test ANOVA one way, avec le post-test de Dunnett du logiciel de GraphPadPrism.5.3.

Cette figure représente les résultats du test DPPH réalisés sur différentes concentrations des extraits. A toutes les concentrations testées (figure 5B), les différents extraits ont exhibé une activité anti-radicalaire intéressante avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 80% pour l'extrait des feuilles et des graines de *Pistacia*, contre un faible pouvoir anti-radicalaire enregistré par l'extrait des bourgeons de *Populus* avec des pourcentages de 51,10 ; 44,07 ; 34,31 et de 21,54 à des concentrations de 1000 ; 750 ; 500 et de 250 µg/ml, respectivement.

Les extraits ont une activité équivalente à l'acide ascorbique remarquable (figure 5A), dont on remarque qu'elle est proportionnelle aux concentrations des différents extraits, dans lequel on constate qu'elle est assez importante aux concentrations les plus élevées. L'extrait des bourgeons de *Populus* présente l'activité la plus importante dans toutes les concentrations comparants aux autres extraits de *Pistacia* avec une activité qui atteint 260 µg.E. A.Asc/mg E dans la concentration la plus importante.

D'après les résultats des tests effectués, une teneur élevée en phénol totaux est trouvée dans les feuilles et graines de *Pistacia lentiscus*, ainsi que les bourgeons de *Populus nigra*, ceci peut être dû à la solubilité des phénols qui dépendent principalement du nombre de groupement hydroxyles, de leur faible poids moléculaire et de la longueur de chaîne carbonique du squelette de base (Mohammedi et Atik, 2011). Ceci est en accord avec l'étude de Atmani et al.(2009) qui ont démontré une activité anti-oxydante remarquable dans ces extraits, notamment ceux de *Pistacia lentiscus*.

Par ailleurs, d'autres études antérieures ont montrés que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité anti-oxydante potentielle. Donc le pouvoir réducteur de ces extraits est probablement dû à la présence de groupements hydroxyles dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électrons. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des radicaux libres oxydants (Bougandoura et Bendimerad, 2012).

III.3. Résultats de l'évaluation des activités hémolytiques et anti-hémolytiques des extraits de *P.lentiscus* et *P.nigra*

III.3.1. Evaluation de l'effet hémolytique et taux des MDA induits par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Différentes concentrations du H_2O_2 ont été testées sur des érythrocytes humains pour évaluer leur activité hémolytique et le dosage des MDA résultants. Les taux d'hémolyse obtenus sont représentés dans les histogrammes des figures suivantes :

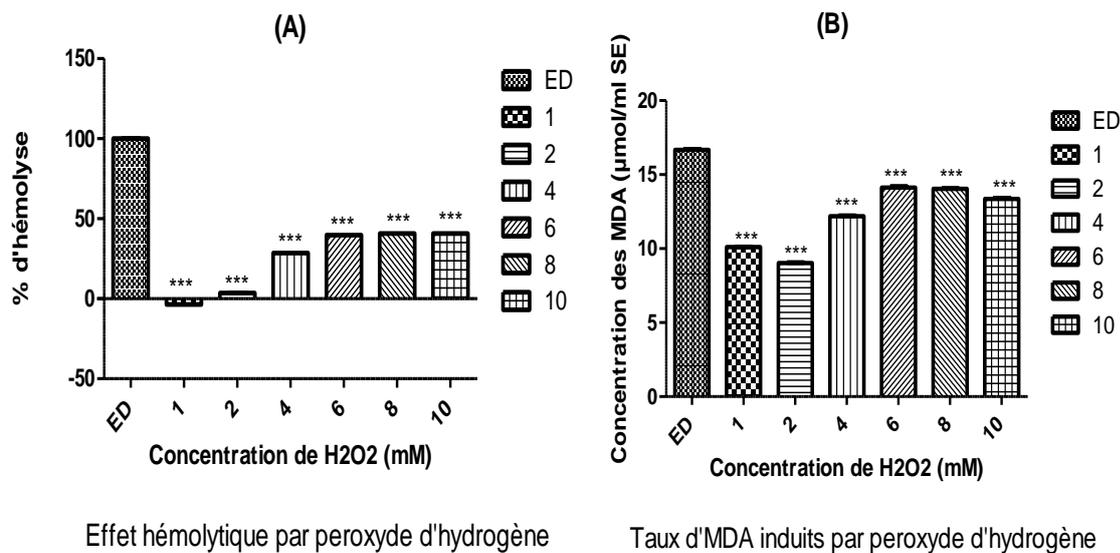


Figure 7 : Effet hémolytique induits par différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (A) ; Taux d'MDA induits par différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (B) ; toutes les valeurs sont exprimées par moyenne \pm SEM (n=5); ***P<0,005 indique une différence significative comparé au ED (Eau distillée), par le test ANOVA *one way*, avec le post-test de Dunnett du logiciel de GraphPadPrism.5.3.

Les résultats représentés dans la figure 6, montrent différents taux d'hémolyse en fonction de la concentration de H_2O_2 appliquée. En effet, la cytotoxicité du H_2O_2 aux concentrations de 1 et 2 mM sont les plus faibles. Le taux d'hémolyse commence à s'augmenter à partir de la concentration de 4mM et se stabilise pour avoir un taux d'hémolyse optimale entre 6 et 10mM dont l'activité hémolytique est similaire.

A de faibles et moyennes concentrations, les résultats ont montré une augmentation légère et modérée de l'hémolyse, respectivement, indiquée par la libération d'hémoglobine. La capacité de H_2O_2 à diffuser à travers la membrane des érythrocytes lui permet d'oxyder les ions métalliques de transition pour pouvoir former un radical hydroxyle réactif (réaction de Fenton). Ce dernier à son tour est un

puissant oxydant, qui en réagissant avec les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires peut initier la peroxydation lipidique et éventuellement provoquer des lésions cellulaires, ainsi la libération de l'hémoglobine (Blasa *et al.*, 2007).

Toutes les concentrations H_2O_2 testées pour leurs effets hémolytiques ont été accompagnées par des tests de dosage des MDA, un marqueur de peroxydation lipidique. Les résultats montrent une augmentation du pourcentage de taux des MDA en fonction des différentes concentrations d' H_2O_2 , allant de 1 à 4mM, puis elle se stabilise de 6mM jusqu'à 10mM. Suite à l'analyse de ces résultats, la concentration de 8mM a été choisie pour représenter l'hémolyse optimale dans les tests anti-hémolytiques.

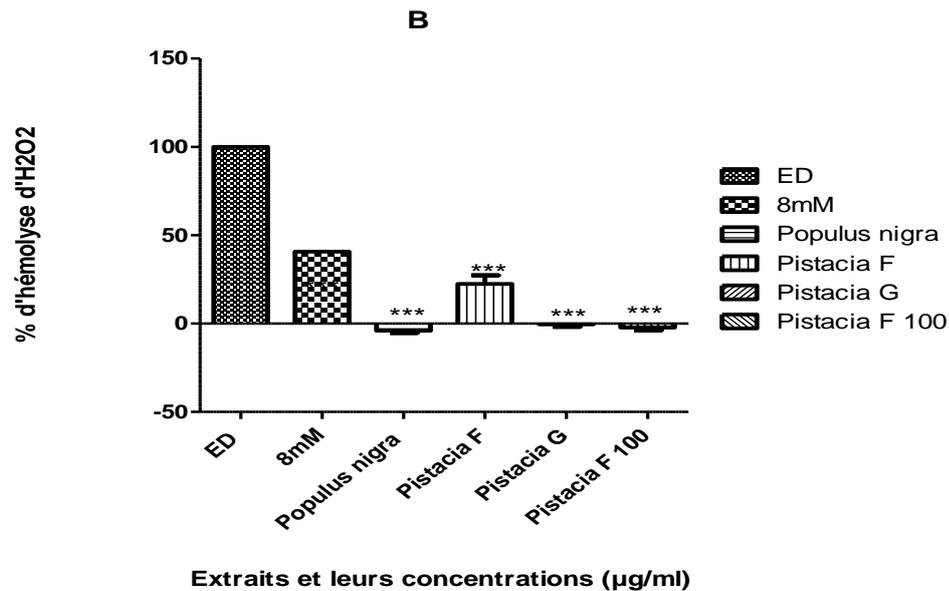
L'hémolyse des membranes lipidiques des érythrocytes par le H_2O_2 , peut provoquer de nombreuses conséquences, en décomposant les hydroperoxydes instables, pour donner de nouveaux radicaux libres provoquant des oxydations des biomolécules, mais aussi des aldéhydes réactifs, dont on peut citer le plus connu, qui est le malondialdéhyde (MDA). (Cillard et Cillard, 2006).

La plupart des dosages visant à déterminer la concentration de MDA ont été développés sur la base de sa dérivation avec l'acide thiobarbiturique (TBA), la condensation de ces deux molécules donne naissance à un produit de fluorescence rouge facilement dosable par spectrophotométrie, en raison de sa forte absorbance (Janero 1990).

Donc les résultats obtenus sur l'évaluation des taux des MDA, peuvent être expliqués par le fait qu'ils soient associés à la peroxydation lipidique est proportionnelle aux nombre de cellules lysées, dépendant aussi des concentrations croissantes de H_2O_2 ; puisque ces MDA sont principalement les produits terminaux de la décomposition des acides gras polyinsaturés.

III.3.2. Evaluation de l'effet hémolytique des extraits de *Pistacia lentiscus* et *Populus nigra* sur les suspensions érythrocytaires

Différentes concentrations des extraits de *Populus nigra* et *Pistacia lentiscus* ont été testées sur des érythrocytes humains pour évaluer leur activité hémolytique. Les résultats sont présentés dans la figure suivante :



Effets hémolytiques induits par les extraits

Figure 8 : Effet hémolytique des extraits ; toutes les valeurs sont exprimées par une moyenne \pm SEM (n=4) ; *** p < 0,005 indique une différence significative, comparé au H₂O₂ (8mM), ***p<0,005 indique une différence significative, comparé au ED (Eau distillée) par le test ANOVA *one way*, avec le post-test de Dunnett du logiciel de GraphPadPrism.5.3

D'après les résultats de l'extrait de bourgeons de *Populus nigra* et de feuilles et graines de *Pistacia lentiscus*, on constate que le pourcentage de l'effet hémolytique est presque nul à la concentration de 500µg/ml comparé à celui d'eau distillée (ED) et H₂O₂ à 8mM. Par contre, à cette concentration l'extrait de feuilles de Pistacia a montré un effet hémolytique assez important avec un pourcentage de 22%, mais en le diluant à la concentration de 100µg/ml, le pourcentage de l'effet hémolytique diminue, ce qui veut dire que l'extrait des feuilles de Pistacia a une activité cytotoxique et un effet hémolytique à de fortes concentrations, ainsi qu'il peut être de même pour les autres extraits. Plusieurs études ont montré des résultats controversés d'antioxydants exogènes, en discutant que le type, la posologie et la matrice de ces antioxydants peuvent être des facteurs déterminants qui influencent sur l'équilibre entre les effets bénéfiques et délétères de ces composés naturels, et dépendent intimement de leurs concentrations (Bouayed et Bohn, 2010).

III.2.3. Résultats de l'évaluation de l'effet anti-hémolytique des extraits de *P. lentiscus* et *P. nigra* et des taux des MDA après traitement des érythrocytes par les extraits et le H₂O₂

Les pourcentages d'hémolyse observés chez les érythrocytes humains traités avec le peroxyde d'hydrogène (8mM), après leur réincubation avec les extraits des bourgeons de *Populus* et feuilles et graines de *Pistacia* à la concentration de 500µg/ml (*Populus* et graines de *Pistacia*) et 100µg/ml (feuilles de *Pistacia*), sont présents dans la figure suivante :

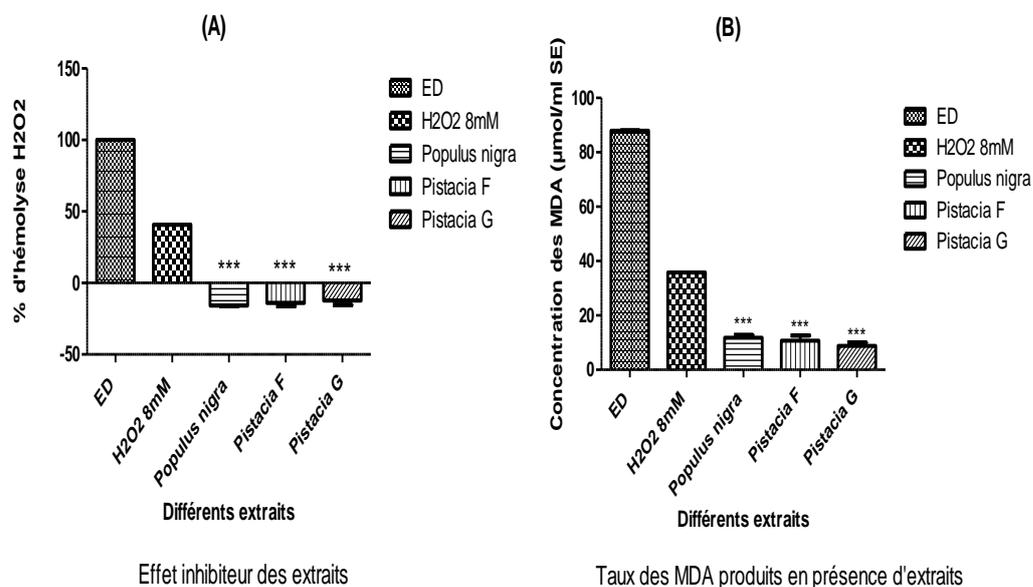


Figure 9 : Effet inhibiteur des extraits des deux plantes de l'hémolyse induite par le peroxyde d'hydrogène (8mM) (A); taux des MDA produits en présence des extraits (B); toutes les valeurs sont exprimées par une moyenne \pm SEM (n=5), ***p < 0,005 indique une différence significative, comparé au H₂O₂ (8mM), ***p < 0,005 indique une différence significative, comparé au T+ED par le test ANOVA *one way*, avec le post-test de Dunnett du logiciel de GraphPadPrism.5.3.

D'après l'histogramme de la figure 11 (A), le pourcentage d'hémolyse des érythrocytes provoquée par H₂O₂ présente un pourcentage faible ou presque nul en présence de tous les extraits testés, comparés à celui de l'eau distillée et H₂O₂ (8Mm). Le taux des MDA produites par l'hémolyse des érythrocytes, a été à de faibles concentrations comparables à celle produite par l'eau distillée et H₂O₂ à 8Mm, ce qui signifie que les extraits ont augmenté la résistance des érythrocytes à l'effet néfaste du H₂O₂, en protégeant la membrane lipidique des globules rouges et en réduisant la concentration d'H₂O₂ présente.

De nombreux composés naturels, y compris les composés phénoliques ont été étudiés pour leurs potentiels antioxydants impliqués dans la protection des membranes biologiques. Les érythrocytes sont un moyen pratique et fréquent utilisé comme modèle d'étude du stress oxydatif, en raison de leurs disponibilités et de leur simplicité. De plus, les érythrocytes soient très sensibles à la peroxydation à cause de leur membranes qui sont riches en acides gras polyinsaturés, leur exposition continue à de fortes concentrations d'oxygène et au fait qu'ils contiennent un catalyseur puissant de métal de transition (**Clemens et Waller, 1987**). Cette activité anti-hémolytique peut être due aux composés phénoliques. D'ailleurs **Zhang et al. (1997)** ont des résultats qui confirment que les polyphénols ont une activité anti-hémolytique, en examinant les polyphénols du thé vert *in vitro*.

De nos jours, un grand nombre de plantes médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives.

La quantification des composés phénoliques dans les extraits des bourgeons de *P. nigra*, feuilles et graines de *P. lentiscus* a révélé la présence des phénols totaux en quantité plus importante dans l'extrait de feuilles de *P. lentiscus* par rapport aux autres extraits.

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire et du pouvoir réducteur ont présenté des résultats significatifs. L'extrait de feuilles de *P. lentiscus* a montré la meilleure activité anti-radicalaire, par contre l'extrait de graines de *P. lentiscus* a présenté le meilleur pouvoir réducteur.

L'étude de la toxicité des différents extraits a montré que l'extrait des feuilles de *Pistacia lentiscus* présente un effet hémolytique de 22% par rapport aux autres extraits à la concentration de 500µg/ml.

Les tests biologiques réalisés *in vitro* sur le sang humain ont prouvé des effets anti-hémolytiques intéressants dans tous les extraits avec un pourcentage presque égal, accompagnés d'un pouvoir antioxydant exprimé par la protection des membranes érythrocytaires et par conséquent, inhiber l'hémolyse confirmée par le taux réduit de la production des MDA. Suite à ces résultats et potentiel enregistré, les bourgeons de *Populus nigra* ainsi que les feuilles et graines de *Pistacia lentiscus* présentent une activité antioxydante remarquable et constituent donc des sources prometteuses d'antioxydants pour les domaines thérapeutiques et pharmacologiques.

En perspectives, ces résultats restent partiels et d'autres travaux sur ces extraits s'imposent au niveau pharmacologique et chimique, donc il serait intéressant à l'avenir d'approfondir l'étude phytochimique qui consiste en la purification, l'identification et la caractérisation des composés actifs impliqués dans le pouvoir hémolytique et anti-hémolytique de *Populus nigra* et *Pistacia lentiscus*.

Il serait aussi judicieux de compléter cette étude par l'optimisation des activités obtenues en fonctions des paramètres cinétiques et expérimentaux influençant le mécanisme anti-hémolytique de ces extraits.

-A-

Al-Habbal MJ, Al-Habbal Z, Huwez FU. A double-blind controlled clinical trial of mastic and placebo in the treatment of duodenal ulcer. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*. **1984**; 11:541 -544.

Amara N, Benzima A, Anb C, Belkhir H. Activité antimicrobienne de l'huile essentielle des fruits du pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.). *AgroBiology*, **2019** : 1669-1679.

Ansari NSH, Siddiqui, AN. *Pistacia lentiscus*: A Review on Phytochemistry and Pharmacological Properties. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **2012**, 4:16-20.

Arab K, Bouchnak O, Yahyaoui K, Laoufi R, Benhabyles N, Bendifallah L. Évaluation de l'effet de l'extrait méthanolique des feuilles du peuplier noir (*Populus nigra* L.) Sur le puceron noir des agrumes *Toxoptera aurantii* (boyer de fonscolombe, 1841). *Agrobiologia*. **2018**.

Atmani D, Debbache N, Boudaoud H, Lounis H, Ayouni K, Berboucha M, Chaher N, Atmani D. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Elsevier: Food chemistry*. **2009** ; 112 : 303-309.

-B-

Basli A, Chibane M, Madani K, Oukil N. Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*. **2012** ;10:2–9.

Belaiche P. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Paris ; *Maloine S.D.Editeur*.**1979** :3

Berger MM. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **2006** ; 20 (1) : 48–53.

Beyer E, Butter KP, Fikezelle X, Garau J. Guide de la flore méditerranéenne. *Dalahaux et Nestlé*. **2010**, 287p.

Bézanger-Beauquesne L, Pinkas M, Torck M, Trottin F. Plantes médicinales des régions tempérées. Paris : Maloine S.A. Editeur.1980.

Beta T, Nam SH, Dexter JE, Sapirstein HD. Phenolic content and anti-oxidant activity of pearled wheat and roller milled fractions. *Cereal chemistry*. **2005**, 82(4):390–39.

Blasa M, Candiracci, M, Accorsi, A, Piacentina, M, Piatti, E. Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. *Food Chemistry* ; **2007** : 104(4) :1635–1640.

Bougandoura N, Bendimerad N. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Revue « Nature & Technologie*. **2012**. n° 09/Juin **2013** : 14 à 19.

Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Elsevier: Plant science*. **2001**, Page 839-851.

Bouyahya A , Asseman ACC, Mezouni H, Bourais I, Et-Touys A, Fellah H, Benjouad A, Dakka N, Bakri Y. Could volatile compounds from leaves and fruits of *Pistacia lentiscus* constitute a novel source of anticancer, antioxidant, antiparasitic and antibacterial drugs. *Elsevier: Industriels crops and products*. **2019**, 128: 62-69.

Bozorgi M, Mamariani Z, Mobli M, Surmaghi MHS, Shams-Aredekani MR, Rahimi R. Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): A Review of Their Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology. *Hindawi*. **2013**, 33p.

Bensalem, G. L'huile de lentisque (*Pistacia Lentiscus* L.) dans l'est algérien : Caractéristiques physico-chimiques et composition en acide gras. **2015**, 2-139p

Bouayed J, Bohn T. Exogenous Antioxidants—Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2010**, 3(4): 228–237.

Boumghar N, Behidj N, Ksouri R. Antimicrobial and antibiofilm activities of phenolic compounds extracted from *Populus nigra* and *Populus alba* buds (Algeria). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*. **2019**, 55: 1-10.

Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, **1998**, 56 (11): 317-333.

Brosse J, Pelt J M, Larousse des arbres Paris : Edition Larousse **2010**

Bruneton J. Élément de phytochimie et de pharmacognosie. Paris :Edition *Lavoisier*. **1986**.

-C-

Cakir A, Kordali S, Zengin H, Duru ME. Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Elsevier: Fitoterapia*. **2003**, 164–167.

Chira K, Suh JH, Saucier C, Teissedre PL. Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, **2008**, 6: 75–82.

Cillard J, Cillard P. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Dossier*. **2006**, 13 :24-29.

Clemens MR, Waller HD. Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chemistry and Physics of Lipids*; **1987**, 45(2-4), 251–268.

Cutrim SC, Cortez MAS. A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International journal of dairy technology*. **2018**, 71: 1-15

-D-

Debbache-Benaida. N, Atmani-Kilani. D, Schini-Keirth .S .B, Djebbli. N. Atmani. D, Pharmacological potential of *Populus nigra* extract as antioxidant, antiinflammatory, cardiovascular and hepatoprotective agent. *Elsevier: Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* ;2013; 3(9):697-704.

Debbache. N, Atmani. D, Atmani. D. Chemical analysis and biological activities of *Populus nigra*, flower buds extracts as source of propolis in Algeria. *Elsevier: Industriel crops and products.*2014; V°53 : 85-92.

Dudonné, S., Poupard, P., Philippe, C., Woillez, M., Richard, T., Mérillon, J.M., Vitrac, X. Phenolic composition and antioxidant properties of poplar bud (*Populus nigra*) extract: individual antioxidant contribution of phenolics and transcriptional effect on skin aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2011, 59: 4527–4536.

-F-

Fintelmann V, Weiss RF. Manuel pratique de phytothérapie. *Vigot* , 2004, p3/438p.

Fukumoto, LR, Mazza, G. Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds†. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(8): 3597–3604.

-J-

Janero DJ. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 1990, 9(6): 515–540.

Jerkovic I, Josip M. Volatile compounds from leaf-buds of *Populus nigra* L. (Salicaceae). *Elsevier: phytochemistry.* 2003, 63: 103-113.

-G-

Gardeli C, Papageorgion V, Mllonchos A, Theodosis K, Komaitis M, Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Elsevier. Food Chemistry*, 2008, 107: 1120–1130.

Guerriero G, Berni B, Muñoz-Sanchez JA, Apone F, Abdel-Salam E M, Qahtan AA, Alatar AA, Cantini C, Cai G, Hausman JF, Siddiqui KS, Hernández-Sotomayor SM, Faisal M. Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. *MDPI: Journal genes.*2018, 9(309) :1-22.

-H-

Hostettmann K, Marston A, Ndjoko K, Wolfender JL. The Potential of African Plants as a Source of Drugs. *Current Organic Chemistry*, 2000, 4 :973-1010 .

-I-

Iserin P. Encyclopédie des plantes médicinales. Paris : *Larousse*, **2001**, p10/335p.

Isidorov VA, Vinogorova Vera T. GC-MS Analysis of Compounds Extracted from Buds of *Populus balsamifera* and *Populus nigra*. *Compounds from Buds of Two Populus Species*. **2003**.

-K-

Kähkönen MP, Hopia, AI, Vuorela, HJ, Rauha, JP, Pihlaja, K, Kujala, T S, Heinonen, M. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**; 47(10), 3954–3962.

Kivçak B, Akay S. Quantitative determination of α -tocopherol in *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. chia, and *Pistacia terebinthus* by TLC-densitometry and colorimetry. *Elsevier:Fitoterapia*. **2005**, 76 :62 – 66.

-L-

Lahsissen H, Kahouadji A, Tijane M, Hseini S. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental). *Revue de botanique*. Edition Lejeunia. **2009**, 0457-4184.

-M-

Maksimovic Z, Malencic D, Kovacevic N. Polyphenol contents and antioxidant activity of Maydis stigma extracts. *Bioresource Technology*. **2005**, 96 : 873–877.

Manthey JA. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirculation*. **2000**.

Mezni F, Aouadhi C, Khouja ML, Khaldi A, Maaroufi A. *In vitro* antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. edible oil and phenolic extract. *Taylor & Francis: Natural Product Research*. **2015**, 29(6), 565–570.

-P-

Pantazis P, Balana KV, Prince J, Hana Z, Dimas K , Cladaras M, Wyche JH, Sitaras NM. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated *in vitro* with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. chia. *Elsevier:Phytomedicine*. **2007**, 14 :263–272.

Parr JA, Bolwell GP. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2000**, 80:985-1012.

-Q-

Quezel P et Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique*.**1963**, Paris C-N.R.S.2 Volume p1170.

-R-

Rafat A, Philip K, Muniandy S. Antioxidant potential and content of phenolic compounds in ethanolic extracts of selected parts of *Andrographis paniculata*. **2010**, 4(3): 197-202.

Remila. S, Richard. T, Azib. L, Atmani. D, Connat. J-L, Dalemasure. S, Atmani-Kilani. D. Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. *Elsevier: European journal of integrative medicine*.2015; V°7: 274-286.

-S-

Sawas, A.H., Pentyala, S.N. Evaluation of lipid peroxidation in red blood cells by monitoring the uptake of sucrose and phenol red. *Journal of Applied Toxicology*, **2004**, 24:223–229.

Sundaram S, Anjum S, Dwivedi P, Kumar Rai KG. Antioxidant Activity and Protective effect of Banana Peel against Oxidative Hemolysis of Human Erythrocyte at Different Stages of Ripening. *Appl Biochem Biotechnol*, **2011**, 164:1192–1206.

Sofowora A. Plantes médicinales et médecine traditionnelle d’Afrique. Paris: Edition Karthala. **2010**.

Stanciauskaite M, Mindaugas M, Mindaugas L, Liudas I, Marija I, Kristina. R. Extracts of Poplar Buds (*Populus balsamifera* L., *Populus nigra* L.) and Lithuanian Propolis: Comparison of Their Composition and Biological Activities. **2021**, *Multidisciplinary Digital Publishing Instituts:Plants*.

-T-

Tebekeme O, Diepreye E. Reduction of hydrogen peroxide–induced erythrocyte damage by *Carica papaya* leaf extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **2012**, 2(6): 449–453.

-V-

Vârban DI, Duda M, Vârban R, Muntean S. Research Concerning the Organic Technology for *Satureja Hortensis* L. *Culture Bulletin UASVM Agriculture*, **2009**, 66(2): 225- 229.

Vercruysse L, Smagghe G, Beckers T, Camp JV. Antioxidative and ACE inhibitory activities in enzymatic hydrolysates of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *Food Chemistry*, **2009**,114 :38–43.

-X-

Xavier V, Stephanie D, Pascal P, Philippe C, Marion W, Tristan R, Jean-Michel M. Phenolic Composition and antioxidant properties of poplar bud (*Populus nigra*) extract:

individual antioxidant contribution of phenolics and transcriptional effect on skin aging. *Journal of agriculture and food chemistry*.**2011**, 59: 4527–4536.

-Z-

Zhang A, Zhu QY, Luk YS, Ho KY, Fung KP, Chen, ZY Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. *Life Sciences*, **1997**; 61(4) : 383–394.

Résumé

Pistacia lentiscus et *Populus nigra* sont des plantes médicinales appartenant à la famille des Anacardiaceae et Salicacées, respectivement, et utilisées en thérapeutique comme antioxydants. Dans cette présente étude, on s'est intéressé, d'une part à l'évaluation des composés phénoliques ainsi que l'activité anti-radicalaire par DPPH et pouvoir réducteur antioxydant dans les extraits de graines et de feuilles du pistachier, ainsi que les bourgeons du peuplier, et d'autres parts à l'évaluation de l'activité anti-hémolytique *in vitro* induite par le peroxyde d'oxygène (8mM) sur un modèle membranaire des érythrocytes humains.

Les résultats ont montrés que l'extrait de *P.lentiscuss* a une teneur en composés phénoliques plus importante comparés à celui du peuplier, notamment l'extrait des graines qui a montré une activité anti-radicalaire importante par rapport aux autres, tandis que celui des feuilles de *P.lentiscuss* a enregistré un pouvoir réducteur le plus élevé. L'extrait de feuilles de *P.lentiscuss* a exhibé un effet toxique de 22% pour la concentration de 500µg/ml, tandis que les autres extraits n'ont présenté aucun effet hémolytique à cette concentration. Pour l'activité anti-hémolytique, tous les extraits ont montré des effets remarquables pour les extraits des bourgeons de *P.nigra* et feuilles, grains de *P.lentiscuss*, respectivement.

En conclusion, ces résultats montrent et prouvent que *Pistacia lentiscus* et *Populus nigra* présentent une activité antioxydante importante ainsi qu'une activité anti-hémolytique.

Mots clés : *P. lentiscus*, *P. nigra*, antioxydante, anti-hémolytique, Polyphénols, H₂O₂

Abstrat

Pistacia lentiscus and *Populus nigra* are medicinal plants belonging to the families of Anardiaceae and Salicaceae, respectively, and used therapeutically as an antioxidant. In this current study we were interested on one hand in the evaluation of phenolics compounds as well as the anti-radical activity by DPPH and antioxidant reducing power tests in the extract of pistachio seeds and leaves, besides buds of poplar, and in the other hand in the evaluation of the *in vitro* anti-hemolytic activity induced by oxygen peroxide (8mM) using a membrane model of human erythrocytes.

The results showed that *P.lentiscuss* extract has a higher content of phenolic compounds compared to the poplar, in particular, the seeds extract showed a significant anti-radical activity compared to the others extract, while *P.lentiscuss* leaves recorded the highest reducing power. The *P.lentiscuss* leaves extract exhibited a toxic effect of 22% at 500µg/ml, while the other extracts didn't show any hemolytic effect at this concentration. For the anti-hemolytic activity, whole extracts showed remarkable effects.

In conclusion, these results show prove that *Pistacia lentiscus* and *Populus nigra* exhibit significant antioxidant activity as well as anti-hemolytic activity.

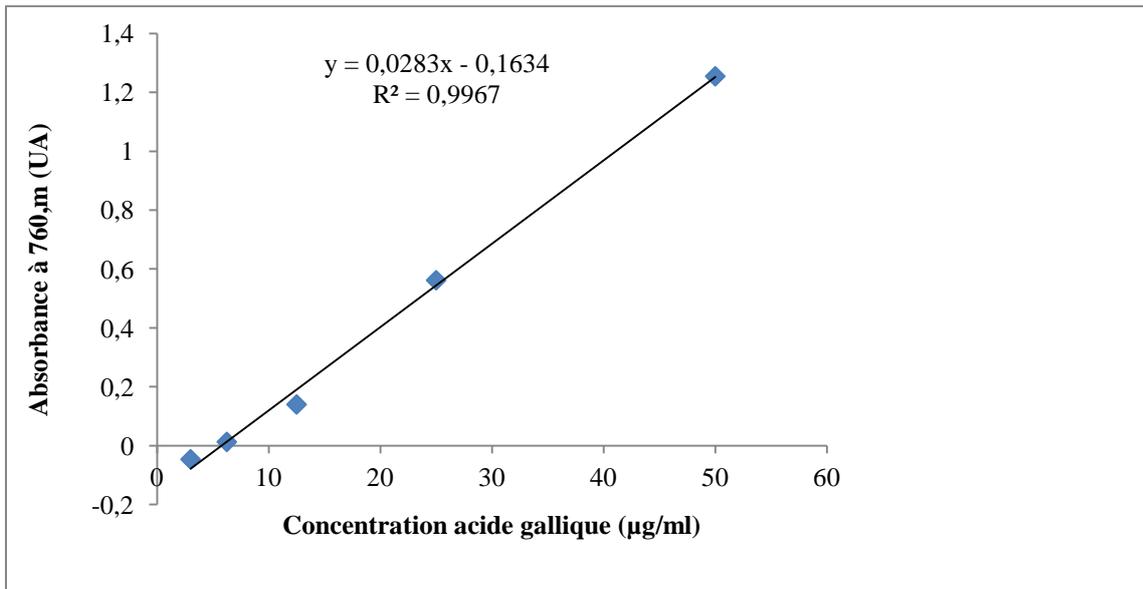
Key words: *P. lentiscus*, *P. nigra*, antioxidant, anti-hemolytic, phenolics, H₂O₂.

ملخص

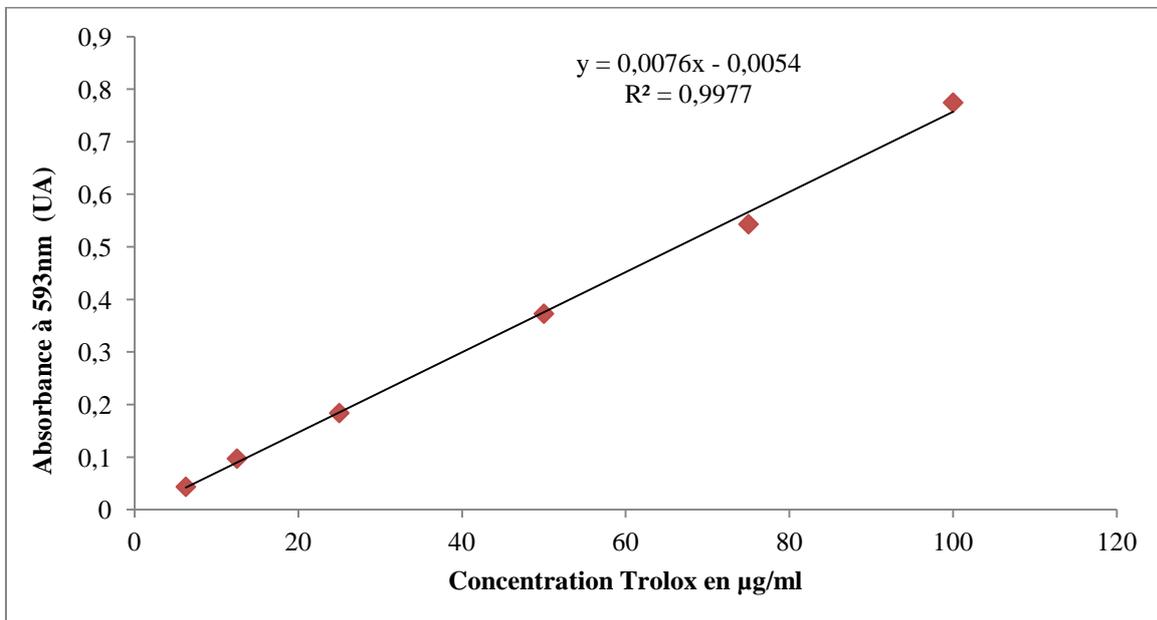
نبات الضر و نبات الحور هم من النباتات الطبية التي تنتمي إلى فصيلة Anacardiaceae و Salicaceae على التوالي ، وتستخدم علاجياً كمضاد للأكسدة. في هذه الدراسة الحالية ، كنا مهتمين من ناحية لتقييم المركبات الفينولية وكذلك النشاط المضاد للجذور بواسطة DPPH ومضادات الأكسدة التي تقلل القوة في مستخلصات بذور وأوراق الضر ، وكذلك براعم الحور ، و من ناحية أخرى في تقييم النشاط المضاد للانحلال في المختبر الناجم عن بيروكسيد الأكسجين (8 ملي مولار) على نموذج غشاء لكريات الدم الحمراء البشرية. أظهرت النتائج أن مستخلص الضر يحتوي على نسبة عالية من المركبات الفينولية مقارنة بمستخلص الحور. على وجه الخصوص ، أظهر مستخلص البذور نشاطاً معنوياً مضاداً للجذور مقارنة بالآخرين ، بينما سجل مستخلص أوراق الضر أعلى قوة اختزال. أظهر مستخلص أوراق الفستق تأثيراً ساماً بنسبة 22٪ لتركييز 500 ميكروغرام / مل ، بينما لم تظهر المستخلصات الأخرى أي تأثير انحلاي عند هذا التركيز. بالنسبة للنشاط المضاد للانحلال ، أظهرت جميع المستخلصات تأثيرات ملحوظة بلغت 15٪ ، - 13٪ ، - 12٪ لمستخلصات براعم الحور وأوراق بذور الضر على التوالي. في الختام ، تظهر هذه النتائج وتثبت أن نبات الضر و نبات الحور يظهران نشاطاً كبيراً مضاداً للأكسدة بالإضافة إلى نشاط مضاد للدم.

الكلمات الرئيسية بيستاشيا لنتسكس، بوبلوس نيقرا، نشاطاً مضاداً للأكسدة، نشاط مضاد للدم، الفينول، بيروكسيد الهيدروجين.

Annexe I : Courbe d'étalonnage pour le dosage des phénols totaux



Annexe II : Courbe d'étalonnage pour le test FRAP



Annexe III : Courbe d'étalonnage pour le test DPPH

