

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université ABDERRAHMANE MIRA- Bejaïa
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique



Memoire de Master

Filière : Biologie
Option : Biochimie Appliquée

Thème

Etude de l'activité anti-radicalaire des extraits aqueux de quatre plantes médicinales locales (Inula viscosa, Paeonia coralina, Marrubium vulgare et Cheiranthus cheiri)

Présenté par :

M^{elle} AZZOUG KAHINA.

M^{elle} BABOURI DJAZIA

Membre du jury :

Présidente : M^{me} Debbache

Promotrice: M^{elle} Lounis.

Examinatrice: M^{me} Kadji.

Examinatrice : M^{me} Benai.

Grade et lieu :

MAA à U. Béjaia

MAA à U. Béjaia

MAA à U. Béjaia

MAB à U. Béjaia

Année : 2012/2013

Remerciement

**Le grand merci s'adresse au bon dieu le tout- puissant,
de nous avoir donné la force et la patience.**

**Au terme de ce modeste travail, nous tenons à présenter nos
remerciements les plus sincère à l'égard de :**

***M^{elle} lounis*, notre promotrice, pour son suivi, son orientation.**

***M^{me} Debbache*, Pour nous avoir fait l'honneur de présider notre
jury.**

***M^{me} Kadji et M^{me} Benai*, Pour accepter d'examiner et de juger
notre travail.**

**Nous remercions chaleureusement toutes les personnes qui nous
ont aidés à la réalisation de ce travail.**

Kahina & Djazia

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

- ♥ *A mes très chers parents qui ont toujours été à mes côtés et qui m'ont donné toute la confiance et le courage tout au long de mes études.*
- ♥ *A mes adorables frères et sœurs et leur soutien.*
- ♥ *A mes aimables nièces : Sonia, Anissa, Lilla, Aida et neveux : Azzedine, Djamel surtout Rayan et Zakari.*
- ♥ *A tous mes cousins et cousines sans exception.*
- ♥ *A tous mes amis Lakhdar, Nassim, Lila.*
- ♥ *A ma chère copine et binôme Djazia avec qui j'ai réalisé ce modeste travail et toute sa famille.*
- ♥ *A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loins.*
- ♥ *A tous les professeurs et étudiants de la promotion Biochimie Appliquée 2013.*

AZZOUG. K

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

- ♥ *A mes très chers parents qui ont toujours été à mes côtés et qui m'ont donné toute la confiance et le courage tout au long de mes études.*
- ♥ *A mes adorables frères et sœurs et leur soutien.*
- ♥ *A mes aimables nièces : Mina, Zouzou, Aya, Maya et neveu : Soussou.*
- ♥ *A tous mes cousins et cousines sans exception surtout toi Mina.*
- ♥ *A tous mes amis Lakhdar, Nassim surtout Nabil, Narimane et Yasmina.*
- ♥ *A ma chère copine et binôme Kahina avec qui j'ai réalisé ce modeste travail et toute sa famille.*
- ♥ *A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loins.*
- ♥ *A tous les professeurs et étudiants de la promotion Biochimie Appliquée 2013.*

DJAZIA. B

Liste des abréviations.....	vii
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux.....	xi
Introduction.....	1

Partie théorique

Chapitre I : Les radicaux libres et le stress oxydant

I. Généralité sur les radicaux libres.....	2
I.1 . Définition	2
I.2. Classification des radicaux libres	2
I.2.1 . Radicaux libres primaires	3
I.2.1.1. Anion superoxyde (O_2^-)	4
I.2.1.2. Radical hydroxyle ($OH\cdot$).....	4
I.2.1.3. Oxygène singulet (1O_2).....	5
I.2.1.4. Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	5
I.2.2. Radicaux libres secondaires	5
I.3 . Sources de production des radicaux libres.....	6
I.4. Rôles des radicaux libres.....	7
I.5. Stress oxydant.....	8
I.5.1. Cible du stress oxydant.....	8
I.5.1.1. Lipides	8
I.5.1.2. ADN	9
I.5.1.3. Protéines	9
I.6. Pathologies liées au stress oxydant.....	9
I.6.1. Cancer.....	9
I.6.2. Maladies cardio-vasculaires.....	10
I.6.3. Diabète.....	10

Chapitre II : Les systèmes de défense

II. Systèmes de défense.....	11
II.1. Systèmes de défense enzymatiques.....	11
II.1.1. Superoxyde dismutase.....	11
II.1.2. Catalase.....	12
II.1.3. Glutathion peroxydase et réductase.....	12
II.2. Systèmes de défense non enzymatiques.....	13

II.2.1. Vitamine E.....	13
II .2.2. Vitamine C.....	13
II .2.3. Caroténoïdes.....	14
II. 2.4. Composés phénoliques.....	15
II. 2.4.1. Généralités.....	15
II. 2.4.2. Biosynthèses des composés phénoliques.....	16
II. 2.4.3. Principales classes des composés phénoliques.....	17
II. 2.4.3.1. Acides phénoliques simples.....	18
II. 2.4.3.2. Flavonoïdes.....	18
II. 2.4.3.2.1. Structure chimique et classification.....	18
II. 2.4.3.3. Tannins.....	20
II.2.4.3.3.1. Tannins hydrolysables.....	20
II. 2.4.3.3.2. Tannins condensés.....	20
II. 2.4.4. Propriétés biologiques des composés phénoliques.....	20
II. 2.4.4.1. Activité antibactérienne.....	21
II. 2.4.4.2. Activité anti-oxydante.....	22
II. 2.4.4.3. Activité anti-radicalaire.....	22

Partie pratique

Chapitre I : Matériels et Méthodes

I. Matériels et méthodes.....	24
I .1. Matériel végétal.....	24
I .1.1. Description botanique et systématique.....	24
I.1.2. Usage traditionnels.....	27
I.2. Méthodes.....	27
I.2. 1. Séchage et broyage.....	27
I.2.2. Extraction des composés phénoliques.....	27
I.2.3. Analyse phytochimique.....	28
I.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux.....	28
I.2.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	29
I.2.3.3. Evaluation de l'activité anti-radicalaire.....	30
I.2.3.3.1. Activité scavenging du DPPH.....	30
I.2.3.3.2. Activité scavenging du radical ABTS ⁺	31

Chapitre II : Résultats et discussion

II. Résultats et discussion.....	34
----------------------------------	----

II.1. Taux d'extraction.....	34
II.2. Dosage des composés phénoliques.....	35
II.2.1. Dosage des phénols totaux	35
II.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	36
II.3. Activité anti-radicalaire des extraits de quatre plantes contre le radical DPPH	37
II.4. Activité anti-radicalaire des extraits de quatre plantes contre le radical ABTS ⁺	39
II.5. Corrélations.....	41
II.5.1.Corrélation entre l'activité contre le DPPH et phénols totaux / flavonoïdes.....	41
II.5.2. Corrélacion entre l'activité contre l'ABTS ⁺ et phénols totaux / flavonoïdes.....	42
Conclusion.....	43
Références bibliographiques.....	44
Annexe.....	I

Liste des abréviations

ABTS	2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-sulfonate)
Abs	Absorbance
$^1\text{O}_2$	L'oxygène singulet
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGPI	Acides Gras Poly Insaturés
AG	Acide gallique
Al Cl₃	Trichlorure d'aluminium
Asc	Acide ascorbique (vitamine C)
ATP	Adénosine triphosphate
CAT	Catalase
Cu¹⁺	Ion cuivreux
Cu²⁺	Ion cuivrique
DPPH	1- diphenyl- 2- picrylhydrazyl
Eq	Equivalent
ERA	Espèces Réactives de l'Azote
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
Fe³⁺	Ions ferriques
Fe²⁺	Ions ferreux
FLO[·]	Radical flavoxyl
GPX	Gluthation peroxydase
GS[·]	Radical thyle
GSH	G-glutamyl-cystéinyl-glycine (glutathion réduit)
GSSH	Glutathion-disulfure
GST	Glutathion-S-transférase
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HOCl	Acide hypochloreux
LDL	Low-density lipoprotein

MPO	Myeloperoxydases
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate
Na₂ CO₃	Carbonate de sodium
NO[•]	Oxyde nitrique
O₂^{•-}	Anion superoxyde
OH[•]	Radical hydroxyl
ONOO⁻	Anion peroxydrite
P-450	Le cytochrome (enzyme)
RO[•]	Radical alkoxyde
ROO[•]	Radical peroxyde
ROOH	Hydroperoxyde
Rut	Rutine
SOD	Superoxyde dismutase
T-O[•]	Radical tocophéryle
T-OH	La vitamine E
UV	Ultraviolet
Vit C	La vitamine C
Vit E	La vitamine E
XO	Xanthine oxydase

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Schéma d'un radical libre.....	2
Figure2 :	Les formes actives de l'oxygène dans la cellule	3
Figure 3 :	Principales étapes de production des espèces réactives de l'oxygène.....	4
Figure 4 :	Les principales sources cellulaires des ERO.....	7
Figure 5 :	Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les ERO...	8
Figure 6:	Les différentes étapes de la peroxydation des lipides.....	9
Figure 7:	Sources métaboliques de production et d'élimination des radicaux libre	11
Figure 8:	Structure chimique de La vitamine E.....	13
Figure 9:	La structure chimique de l'acide ascorbique (vitamine C).....	14
Figure 10:	La structure chimique des principaux caroténoïdes.....	14
Figure 11:	La structure de base (phénol simple).....	15
Figure 12:	La voie du shikimate.....	16
Figure 13:	Structure chimique des acides phénoliques simples.....	18
Figure 14:	Structure de base des flavonoïdes.....	19
Figure 15:	Structure des principales classes des flavonoïdes.....	19
Figure16:	Photographie d' <i>Inula viscosa</i>	24
Figure 17:	Photographie de <i>Paeonia coralina</i>	25
Figure 18:	Photographie de <i>Marrubium vulgare</i>	26
Figure 19 :	Photographie <i>Cheiranthus cheiri</i>	26
Figure 20:	Protocole de dosage des polyphénols totaux.....	29
Figure 21 :	Protocole de dosage des flavonoïdes.....	30
Figure 22 :	Protocole de l'activité scavenging du DPPH.....	31
Figure 23 :	Protocole de l'activité scavenging du radical ABTS ^{·+}	32
Figure 24 :	Teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> , <i>Paeonia coralina</i> , <i>Marrubium vulgare</i> et <i>Cheiranthus cheiri</i>	35
Figure 25 :	Teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> , <i>Paeonia coralina</i> , <i>Marrubium vulgare</i> et <i>Cheiranthus cheiri</i>	36
Figure 26 :	Effet scavenger des extraits des feuilles de <i>Paeonia coralina</i> , <i>Inula viscosa</i> , <i>Marrubium vulgare</i> , <i>Cheiranthus cheiri</i> , l'acide gallique et la rutine contre le radical DPPH à 100µg/ml.....	37
Figure 27 :	Effet scavenger des extraits des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> , <i>Paeonia</i>	

<i>coralina</i> , l'acide gallique et la rutine sur le radical DPPH [•] à différentes concentration.....	38
Figure 28 : Effet scavenger des extraits des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> , <i>Marrubium vulgare</i> , <i>Paeonia coralina</i> , <i>Cheiranthus cheiri</i> et les standards l'acide gallique et la quercétine contre le radical ABTS ^{•+} à 100µg/ml.....	39
Figure 29 : Effet scavenger des extraits des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> , <i>Marrubium vulgare</i> , <i>Paeonia coralina</i> , l'acide gallique et la quercétine sur le radical ABTS ^{•+} à différentes concentration.....	40

Draft Only

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I :	Principales Classes des polyphénols.....	17
Tableau II :	Activités biologiques des composés phénoliques.....	21
Tableau III :	Usage traditionnels des plantes.....	27
Tableau IV :	Les pourcentages d'extraction des extraits des feuilles d' <i>Inula viscosa</i> , <i>Paeonia coralina</i> , <i>Marrubium vulgare</i> et <i>Cheiranthus cheiri</i>	34
Tableau V :	IC ₅₀ des extraits présentant un fort effet anti-radicalaire contre le radical DPPH et les standards.....	39
Tableau VI:	IC ₅₀ des extraits présentant un fort effet anti-radicalaire contre le radical ABTS ⁺ et les standards.....	41
Tableau VII :	Corrélation entre les phénols totaux/ flavonoïdes et l'activité anti-DPPH..	42
Tableau VIII :	Corrélation entre les phénols totaux/ flavonoïdes et l'activité anti-ABTS ⁺ ...	42

L'oxygène moléculaire est un élément essentiel pour la vie de tous les organismes aérobies, toutefois il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées radicaux libres ou encore espèces réactives de l'oxygène (ERO) (**Pastre., 2005**).

A des doses faibles, les ERO sont très utiles pour l'organisme et jouent des rôles importants dans divers mécanismes physiologiques, tels que la transduction du signal. La production physiologique des ERO est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes (superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion peroxydases....) et des molécules anti-oxydantes de petites tailles (caroténoïdes, vitamines C et polyphénols) (**Favier, 2003**). A des doses élevées, les ERO deviennent toxique pour l'organisme. En effet, la surproduction des ERO au-delà des capacités anti-oxydantes des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydant, qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies telles que les maladies cardiovasculaires et neurologiques, le diabète et le cancer (**Wilson et Salamatian, 2003**).

Les plantes médicinales sont largement utilisées en médecine traditionnelles dans les traitements du diverses pathologies et infections grâce à leurs propriétés biologiques intéressantes, représentées essentiellement par les activités anti-oxydantes et antimicrobiennes dus à leur richesse en composés bioactifs tels que les composés phénoliques (**Hennebelle et al ., 2004**).

L'objectif de notre travail vise à déterminer l'activité anti-radicalaire des extraits d'*Inula viscosa*, *Paeonia coralina*, *Marrubium vulgare* et *Cheiranthus cheiri*. Pour cela notre étude englobe deux aspects, dont le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur la quantification des composés phénoliques. Le second aspect est consacré à une évaluation de l'activité anti-radicalaire in vitro de ces composés vis-à-vis de deux radicaux libre DPPH[·] et l'ABTS⁺.

I .Généralité sur les radicaux libres :

I.1. Définition :

Un radical est une espèce chimique possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe (figure 1). La présence d'un électron célibataire confère à ces molécules la plupart du temps une grande instabilité, ce qui signifie qu'elles ont la possibilité de réagir avec de nombreux composés dans les cellules et que leur durée de vie en solution est très courte. Il a donc la capacité de capter ou céder un électron à une autre molécule de son entourage, pour être stable. (Borg et Reeber., 2004 ; Canneaux et *al.*, 2011).

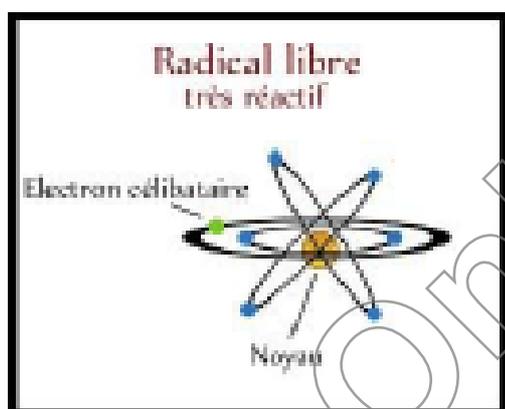


Figure 1 : Schéma d'un radical libre (Maulice, 2010).

I.2. Classification des radicaux libres :

Les espèces réactifs de l'oxygène (ERO) sont des espèces chimiques oxygénées telles que des radicaux libres, des ions oxygénés, rendus chimiquement très réactifs par la présence d'électrons de valence non appariés (Gardés -Albert et *al.*, 2003) .

On distingue deux grandes classes de radicaux libres : les radicaux libres primaires, directement formés à partir de l'oxygène, qui ont un rôle physiologique particulier et les radicaux libres secondaires ou organiques générés par l'action des radicaux libres primaires (Figure 2) (Lacan Bionov, 2001).

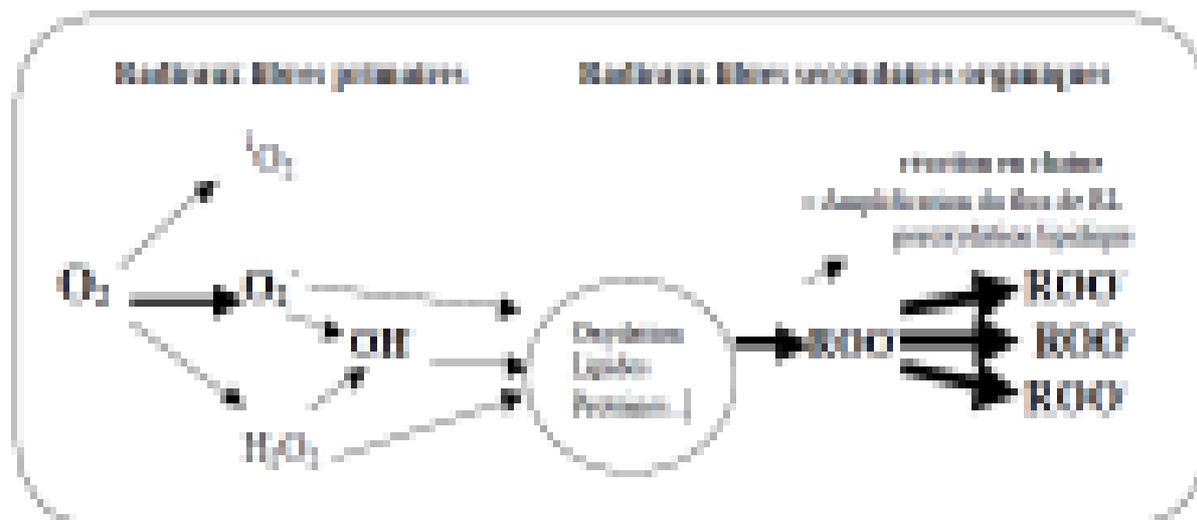


Figure2: Les formes actives de l'oxygène dans la cellule (Lacan Bionov, 2001).

I. 2. 1. Radicaux libres primaires :

Les radicaux libres primaires sont les plus dangereux car ils sont formés directement à partir de l'oxygène.

L'oxygène possède une configuration électronique particulière, avec deux électrons non appariés de spins parallèles sur ses orbitales, à cause de cette configuration définie comme état triplet, l'oxygène est une molécule très peu réactive vis-à-vis des molécules organiques (Barouki, 2006).

A partir de l'oxygène moléculaire, chaque réduction aboutit à la formation des espèces suivantes : le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) et l'oxygène singulet (1O_2) (Figure 3) (Fantaine, 2007).

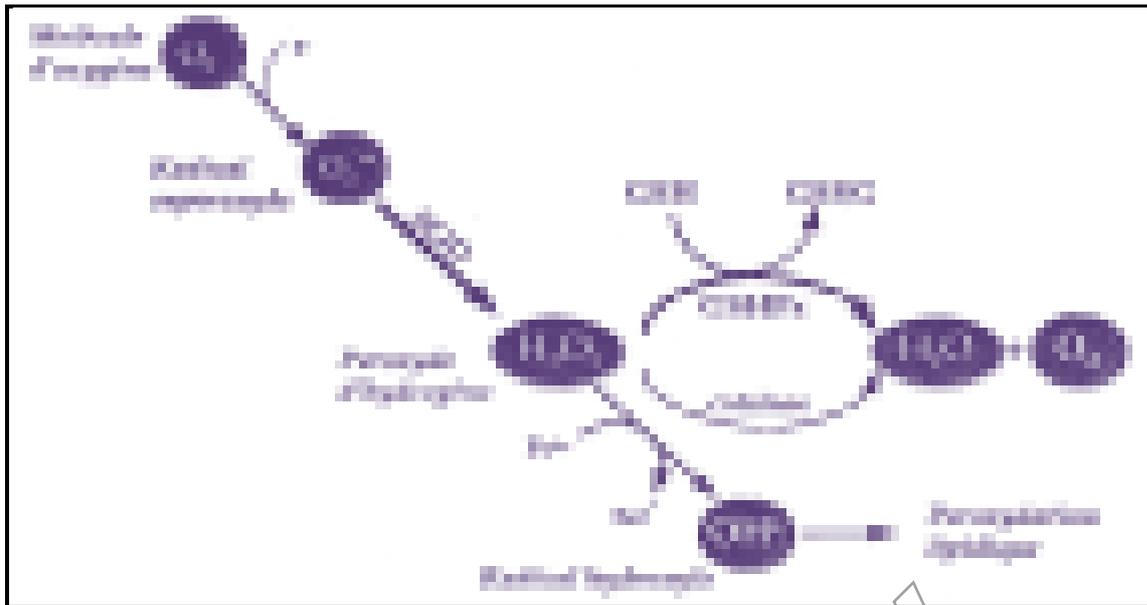
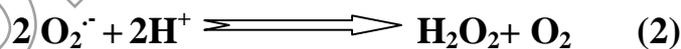


Figure 3 : Principales étapes de production des espèces réactives de l'oxygène (**Goudable et Favier, 1997**)

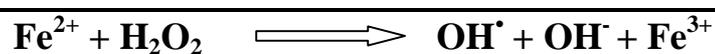
I. 2.1.1. Anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) :

Lorsque la molécule d'oxygène mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, elle peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde. Cet anion intervient comme facteur oxydant dans de nombreuses réactions (2) (**Gutteridge, 1995 et Fantaine, 2007**). L'anion superoxyde est produit au cours du métabolisme mitochondrial à la suite de la réaction (1) :



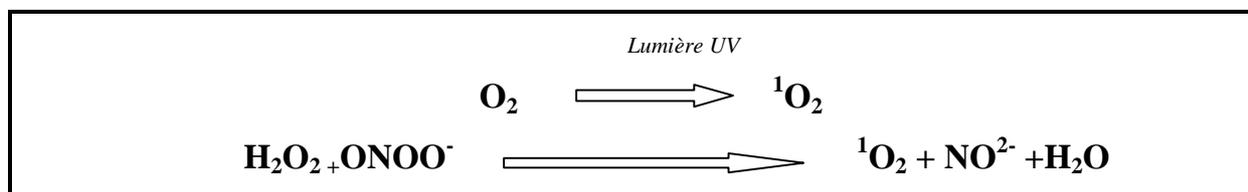
I. 2.1.2. Radical hydroxyle (OH^{\bullet}) :

Le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique (**Hadi, 2004**), il est formé à partir de l'oxygène et (H_2O_2) ou à partir de l'ion ferreux qui réagit avec le peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante (**Bartosz, 1997**).



I.2.1. 3. Oxygène singulet :

L'oxygène singulet est l'une des formes les plus réactives d' O_2 , il est très instable. L'oxygène singulet est formé par action de la lumière sur l'oxygène, il peut être produit aussi par la réaction entre divers espèces réactives de l'oxygène (Sorg, 2004).



I.2.1.4. Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2):

Le peroxyde d'hydrogène ce n'est pas un radical libre car tous ses électrons périphériques sont appariés. En présence de métaux, en particulier de fer (Fe^{2+}), il est transformé en radical hydroxyle (OH^\bullet) par la réaction de Fenton selon la réaction ci-dessous (Ré et al, 2005). Ce dernier est extrêmement réactif et va oxyder à son tour les molécules voisines, formant parfois d'autres radicaux libres (Vamecq et al., 2004).



Le peroxyde d'hydrogène résulte de la réduction à deux électrons de l'oxygène. Il peut être généré soit par (Wilson et Salamatian, 2003) :

- Dismutation de l'anion superoxyde : $O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$
- Réduction univalente de l'anion superoxyde : $O_2^{\bullet -} + e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$
- Réduction bi-électronique de l'oxygène : $O_2 + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$

Toutes ces réactions sont catalysées par le glucose oxydase.

I. 2. 2. Radicaux libres secondaires :

Les radicaux libres secondaires sont de grandes molécules, qui ne sont pas formés spontanément. Ils sont formés par l'action d'un radical libre primaire sur un composant cellulaire (acides nucléiques, lipides membranaires et protéines). Par exemple, le radical peroxyde ($R-OO^\bullet$) est formé après que O_2^- ou OH^\bullet ait agité sur un acide gras insaturé de la membrane cellulaire (Figure 2) (Lacan Bionov, 2001).

Ces radicaux libres secondaires sont quand même très dangereux puisqu'une fois formés ils sont capables de créer une réaction en chaîne où un radical peroxyde attaque une

molécule d'acide gras et la transforme en radical peroxyde ...c'est la peroxydation lipidique qui conduit si elle n'est pas contrôlée à une destruction de la membrane cellulaire.

Au niveau de la cellule, il est très important de contrôler la production de radicaux libres primaires essentiellement (O_2^-) et (H_2O_2). En effet, cela entraîne une production moins importante de radicaux libres secondaires et donc par conséquent une protection des constituants cellulaires et un maintien de l'activité biologique de la cellule (**Lacan Bionov, 2001**).

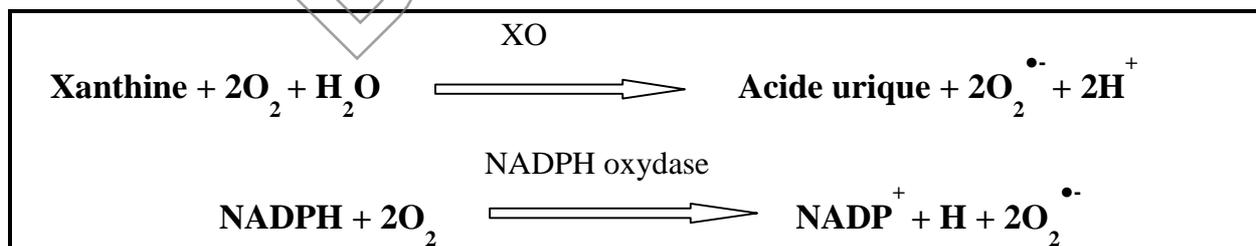
I. 3. Sources de production des radicaux libres :

La production des molécules oxydantes est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. En effet, l'organisme a besoin d'oxygène pour produire de l'énergie au cours des réactions dites de respirations oxydatives. Cependant, une faible partie de l'oxygène échappe à sa réduction en eau au niveau de la mitochondrie. Elle peut alors être à l'origine de la production de radicaux libres oxygénés (**Pastre, 2005**).

Les sources de production de radicaux libres sont classées en deux catégories : Les sources endogènes et les sources exogènes.

◆ Les sources endogènes : les radicaux libres sont des produits des réactions de l'organisme tels que, l'activation des globules blancs qui est une source très importante pour la production d'ERO et l'oxydation de l'hémoglobine (figure 4) (**Kenneth et al., 1998**).

◆ D'autres systèmes endogènes entrent en ligne dans la production massive d'ERO comme l'activation de la xanthine oxydase et la NADPH oxydase selon les réactions suivantes (**Baudin, 2006**) :



◆ Les sources exogènes : L'environnement dans lequel nous vivons mais aussi notre mode de vie sont à l'origine d'une augmentation de la production des radicaux libres dans notre organisme tels que : l'exposition prolongée au soleil et aux radiations, contacts avec des agents cancérigènes et pollution (**Baudin, 2006**).

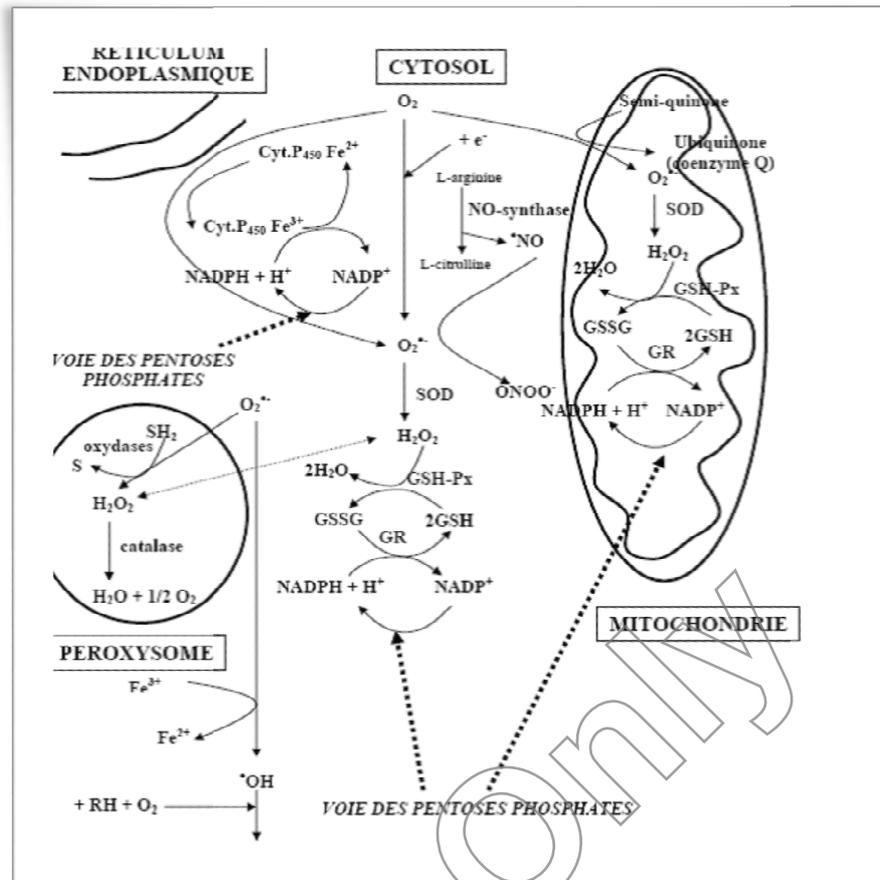


Figure 4 : Les principales sources cellulaires des ERO (Bonnefont-Rouselet et al., 2003).

I .4. Rôles des radicaux libres :

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques, car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnables comme, la régulation de gènes du mécanisme de l'apoptose et la transduction du signal cellulaire (Pincemail et Defraigne, 2004).

Ils sont produits par les cellules phagocytaires pour être utilisés dans la lutte contre les bactéries (Delattre et al., 2005).

Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales on dit que la balance antioxydants / pro-oxydants est en équilibre. S'il ya un déficit en antioxydants ou une surproduction énorme de pro-oxydants cela nous donne ce qu'on appelle « le stress oxydant » (Favier, 2003).

I. 5. Stress oxydant :

Le stress oxydant correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire induit, soit par production excessive de radicaux libres, soit par diminution de la tendance de la défense anti-oxydante (Davalos *et al.*, 2004).

I.5.1. Cibles du stress oxydant :

Les radicaux libres sont instables, donc ils cherchent à s'apparier avec un électron d'une autre molécule. Ils sont à l'origine de réactions en chaîne qui conduisent à des destructions cellulaires. Leurs structures cibles essentielles sont l'ADN, les membranes cellulaires mais aussi toutes les molécules pouvant être déstabilisées (figure 5) (Laguerre *et al.*, 2007).

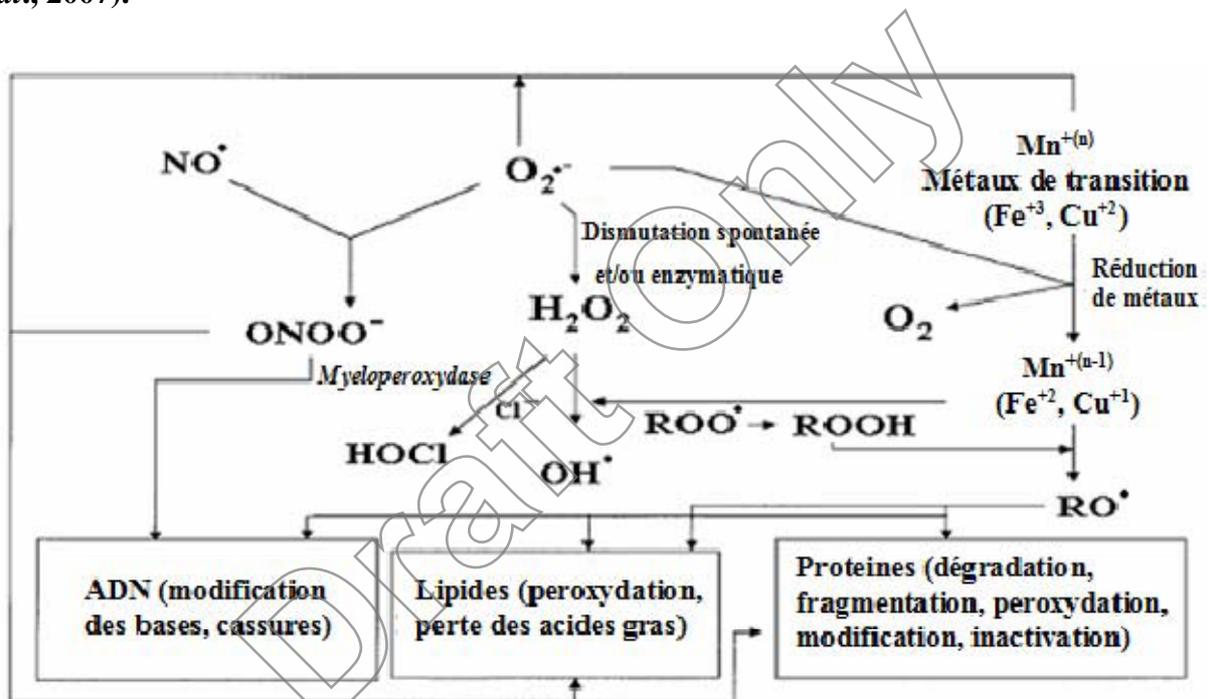


Figure 5: Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les ERO (Kohen et Nyska, 2002).

I. 5.1.1. Lipides :

Les radicaux libres peuvent attaquer les lipides et notamment les acides gras mono- et polyinsaturés (AGPI) des phospholipides membranaires. Ils sont à l'origine de réaction de peroxydation (Laguerre *et al.*, 2007). Il s'agit d'une succession de réactions radicalaires à l'origine de la libération de molécules réactives (Figure 6).

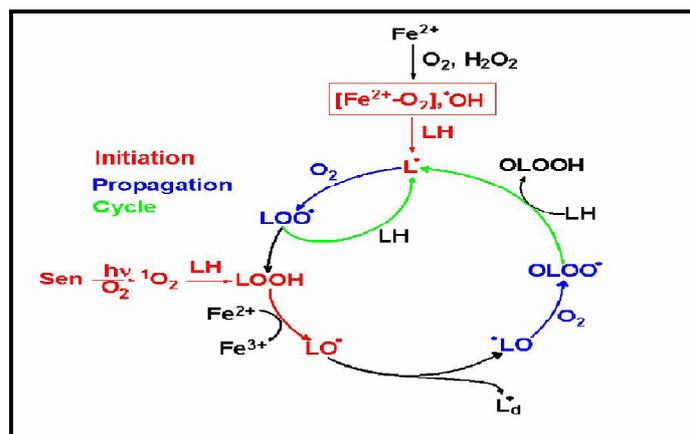


Figure 6 : Les différentes étapes de la peroxydation des lipides (Hennebelle et al., 2004)

I. 5.1.2. ADN :

Les lésions induites par le OH^\cdot sur le matériel génétique (bases modifiées, cassures simples et doubles des oligo-nucléotidique, et les ponts entre les résidus protéiques) sont impliquées dans de nombreux processus pathologiques (vieillesse, létalité cellulaire, mutagenèse, cancérogenèse) (Ré et al., 2005).

I. 5.1.3. Protéines :

Les radicaux libres peuvent réagir avec les différents acides aminés et donc altérer la structure des protéines. Les fonctions de multiples enzymes, de récepteurs et de protéines de transport cellulaire peuvent ainsi être modifiées. C'est donc toute la machinerie cellulaire qui peut être affectée (Hennebelle, 2006).

I. 6. Pathologies liées au stress oxydant :

Le stress oxydant est la principale cause initiale de nombreuses maladies souvent liées au vieillissement, cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire. Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles telles le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardio-vasculaires (Wilson et Salamatian, 2003).

I. 6.1. Cancer :

Le cancer est l'une des pathologies majeures qui apparaît avec l'âge. Les ERO présentent deux mécanismes d'action complémentaires : ils favorisent la croissance des cellules tumorales et ils modifient globalement leur environnement qui inclut les cellules de

natures variées (fibroblastes, cellules immunes) entourant les cellules néoplasiques (**Perceval, 1998**).

I. 6.2. Maladies cardio-vasculaires :

Les risques cardiovasculaires sont liés généralement au cholestérol LDL à cause des conséquences de son accumulation pathologique sur la paroi interne des artères.

Le cholestérol LDL et son oxydation jouent un grand rôle dans la formation des plaques d'athérome (**Percival, 1998**). Cette oxydation se double en fait de l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les cellules de la paroi artérielle, qui concourt fortement à l'altération des fonctions vasculaire, effecteur majeur du processus d'athérogenèse et de fragilisation des lésions athéroscléroses (**Beaudex et al., 2006**).

I.6.3. Diabète :

Le rôle des radicaux libres est de plus en plus fréquemment discuté dans l'apparition du diabète. Les espèces réactives de l'oxygène générées lors de l'hyperglycémie causent principalement des dommages de l'ADN, des protéines et des lipides (**Defraigne et Pincemail, 2008**). En plus, il est évident que dans le diabète de type 2, l'activation des voies de stress sensible par l'élévation du glucose conduit à deux niveaux de résistance à l'insuline et une diminution de la sécrétion d'insuline et la dysfonction des cellules β sécrétrice de l'insuline (**Hamadi, 2010**).

II. Systèmes de défense :

Afin de se protéger contre une exposition excessive aux radicaux libres, l'organisme peut fabriquer ses propres antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable à concentration relativement faible par rapport à un substrat, retarder ou inhiber significativement l'oxydation de ces substrats (Pincemail *et al.*, 2002). Les antioxydants impliqués peuvent être classés en deux classes : les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Berger, 2006).

II.1. Systèmes de défense enzymatique :

Trois enzymes interviennent selon un mécanisme présentant un fonctionnement en chaîne, à fin de réguler le déséquilibre moléculaire dû à la surproduction des radicaux libres qui sont : la superoxyde dismutase, la Catalase et les Glutathions peroxydase / réductase (figure 7).

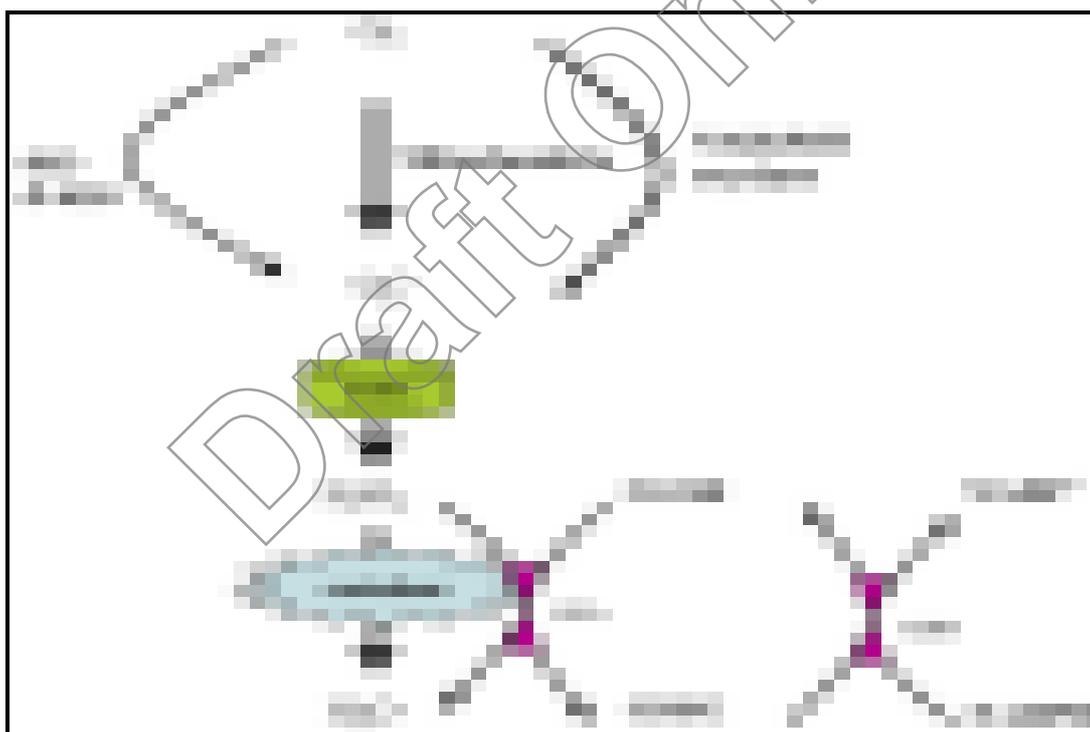
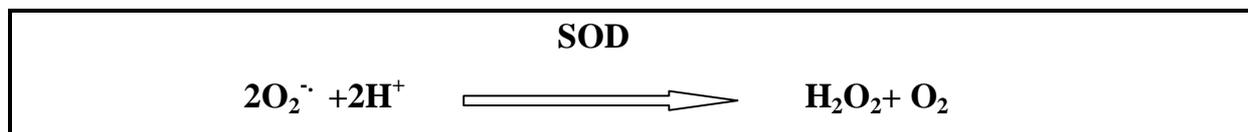


Figure 7 : Sources métaboliques de production et d'élimination des radicaux libres (Afonso *et al.*, 2007).

II.1.1. Superoxyde dismutase (SOD) :

C'est une enzyme clé dans la lutte contre les radicaux libres puisqu'elle permet l'élimination de l'ion superoxyde qui est le radical libre le plus abondant.

La SOD est l'une des enzymes les plus présentes dans tous les compartiments cellulaires où il y a une production de l' $O_2^{\cdot-}$ (Menveille-Bourg, 2005). Toutefois, l'élimination du radical superoxyde par la SOD conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène qui est toxique pour la cellule parce qu'il participe à la formation de OH^{\cdot} selon la réaction suivante :



II. 1.2. Catalase (CAT) :

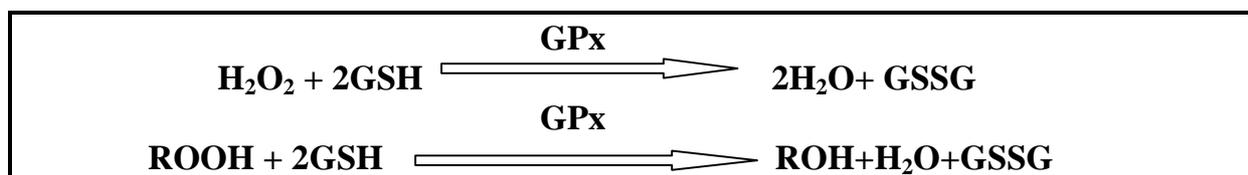
Les catalases sont la classe d'enzymes qui catalysent la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et oxygène gazeux (O_2), elles sont localisées principalement dans le peroxysome, mais elles se trouvent aussi dans le cytoplasme (Nicholls, 2012).

La catalase élimine ainsi l'excès du H_2O_2 , en présence d'ions ferreux, afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier selon la réaction suivante :



II.1.3. Glutathion Peroxydase et réductase:

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. Le rôle de la glutathion peroxydase (GPx) est de réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools. Lors de cette réaction, qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celles-ci se transforment en glutathion-disulfure (GSSG) selon les réactions suivantes (Cimen, 2008) :



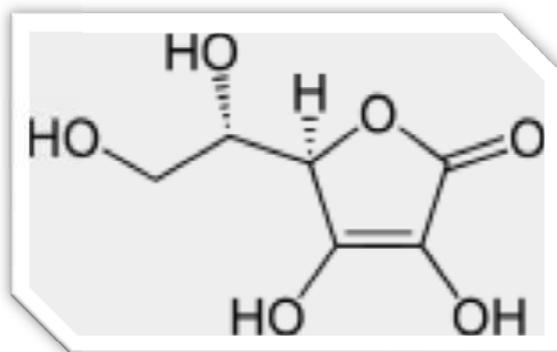


Figure 9 : La structure chimique de l'acide ascorbique (Cutray et Robin, 2000).

II. 2.3. Caroténoïdes :

Les caroténoïdes sont des substances naturelles liposolubles jouant un rôle de pigment de couleur jaune à rouge dans beaucoup de fruits et légumes. Les caroténoïdes sont des molécules très auto-oxydables dont la dégradation est favorisée par la présence d'acides gras polyinsaturés (Kloer et Schulz, 2006).

Les caroténoïdes à des doses suffisantes peuvent prévenir de l'oxydation lipidique et empêcher le stress oxydant. La photoprotection des caroténoïdes provient de leur capacité de piéger et de désactiver les espèces oxygénées réactives telles que l'oxygène singulet, formé au cours d'une exposition à la lumière. Les principaux caroténoïdes sont l' α - et la β -carotène, la lutéine, la zéaxanthine, la cryptoxanthine et le lycopène (figure 10) (Notas et al., 2006).

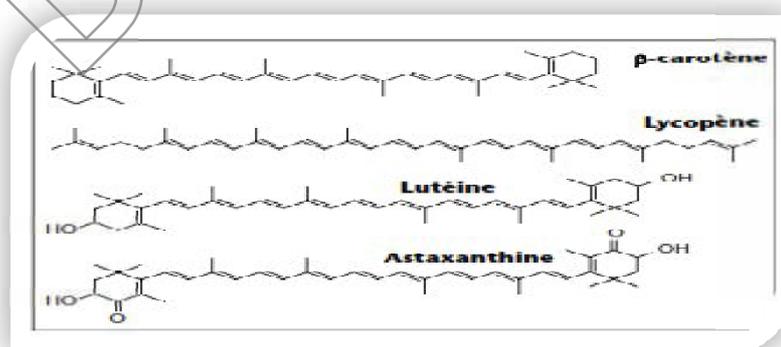


Figure 10: La structure chimique des principaux caroténoïdes (Léger, 2006)

II. 2.4. Composés phénoliques :

II. 2.4.1. Généralités:

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires, Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits et graines) (**Edeas, 2007**). Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tanins.

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (**Bourgou et al., 2008**). La structure des composés phénoliques varie à partir des molécules simples (acides phénoliques simples) (Figure 11) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés).

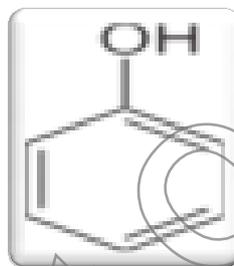


Figure 11: La structure de base (phénol simple) (**Paul, 1994**)

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement, ils participent de manière très efficace à la :

➔ Tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel (**Macheix et al, 2005**).

➔ Défense contre les champignons.

➔ Croissance cellulaire, ils possèdent aussi des propriétés anti-oxydantes.

Chez l'homme, ces molécules jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur) (**Bruneton ,1996**)

II. 2.4.2. Biosynthèse des composés phénoliques :

1. Voie des Shikimates

C'est la voie la plus courante, elle conduit les oses aux acides aminés aromatiques puis, par désamination de ces derniers aux acides cinnamiques et leur dérivés: coumarines, lignines et lignanes (Figure 12) (Floss, 1997).

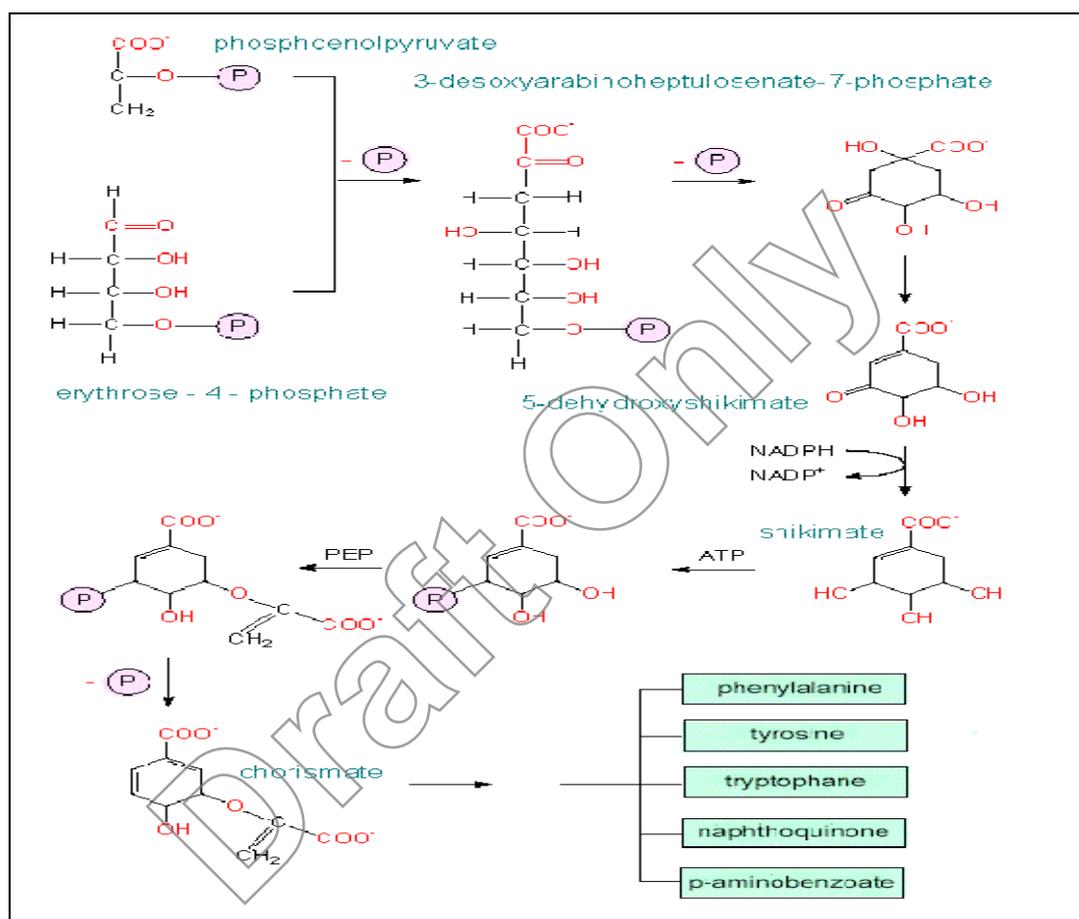


Figure 12 : La voie du shikimate (Floss, 1997)

2. Voie des acétates

La voie des acétates conduit à des poly acétates, qui engendrent par cyclisation des composés souvent polycycliques : isocoumarine, quinone et xanthone (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

De plus, la diversité structurale des composés phénoliques est plus accrue par la possibilité d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composés d'origine mixte : les flavonoïdes

II. 2.4.3. Principales classes des composés phénoliques :

Selon le nombre d'atomes du carbone dans le squelette de base, la classification des polyphénols est présentée dans le tableau suivant :

Tableau I : Principales classes des polyphénols (Harborne, 1989 ; Macheix et al., 1990).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C6	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	p-hydroxybenzoïques	Épices, fraises
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acide caféique Scopolétine	Pomme de terre Pomme, Citrus
C6-C4	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C6-C2-C6	Stilbènes	Resvératrol	vigne
C6-C3-C6	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétine, cyanidine Daidzéine	Fruits, légumes, fleurs Soja, pois
(C6-C3) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C6-C3) _n	Lignines	//	Bois, fruits à noyau
(C6-C3-C6) _n	Tanins condensés	//	Raisin, Kaki

Selon leur structure chimique, les polyphénols sont divisés en 4 classes majeures: Phénols, flavonoïdes, acides phénolique, et les tanins.

II. 2.4.3.1. Acides phénoliques simples :

Les acides phénoliques sont rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles. Ils comportent deux groupes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (figure 13) (Bruneton, 1993).

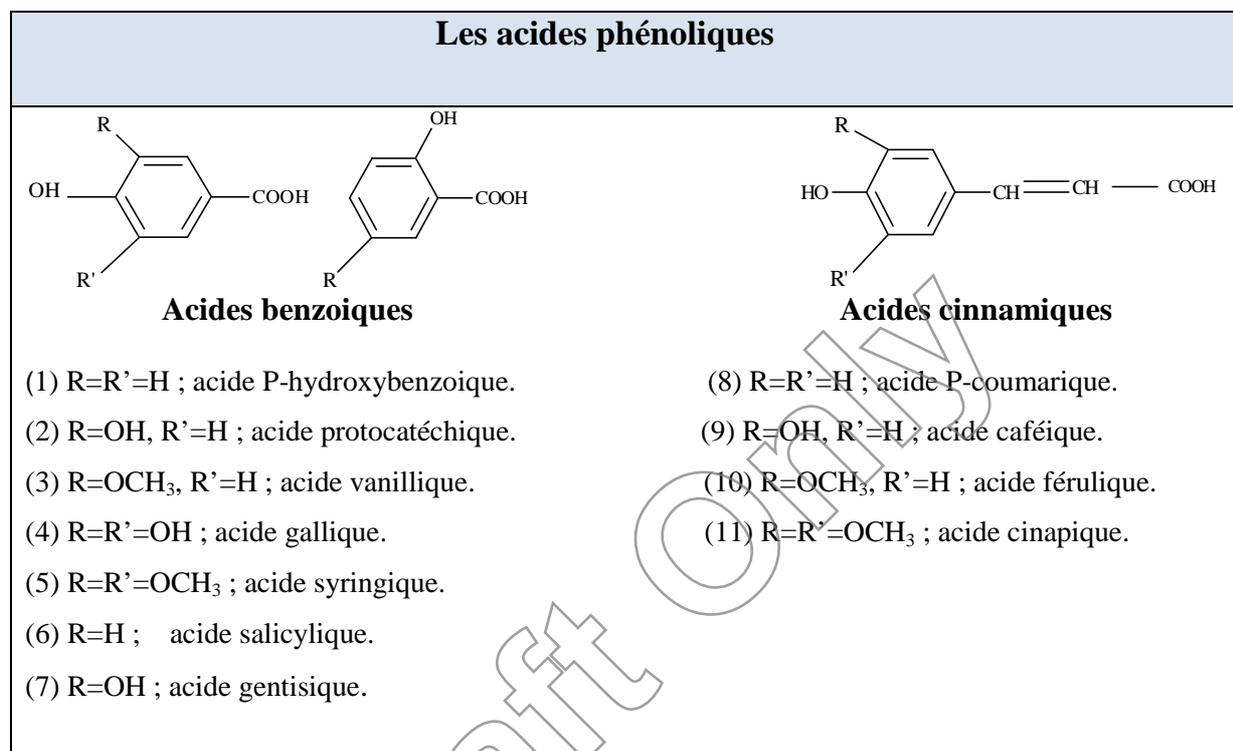


Figure 13 : Structure chimique des acides phénoliques simples (Laguerre et al, 2007).

II. 2.4.3.2. Flavonoïdes :

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ces derniers sont des produits largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés quotidiennement. Il y en a plus de 600 à avoir été décrits chez les plantes (Iris, 2004).

II. 2.4.3.2.1. Structure chimique et classification des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont caractérisés par la présence de deux cycles benzène qui sont liés par un pont en 3 carbones (Figure14) (Chira et al., 2008).

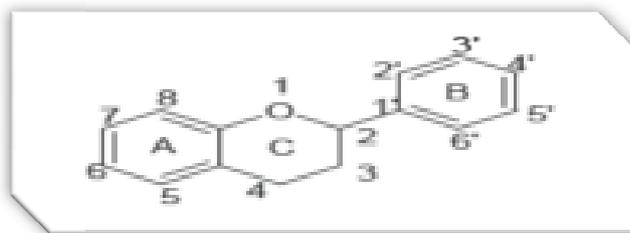


Figure14 : Structure de base des flavonoïdes (Adam *et al.*, 2007).

Sur la base de la position et des modifications de ces cycles, plus de 4.000 flavonoïdes ont été découvertes jusqu'à présent et qui peuvent être divisés en plusieurs classes (figure 15)

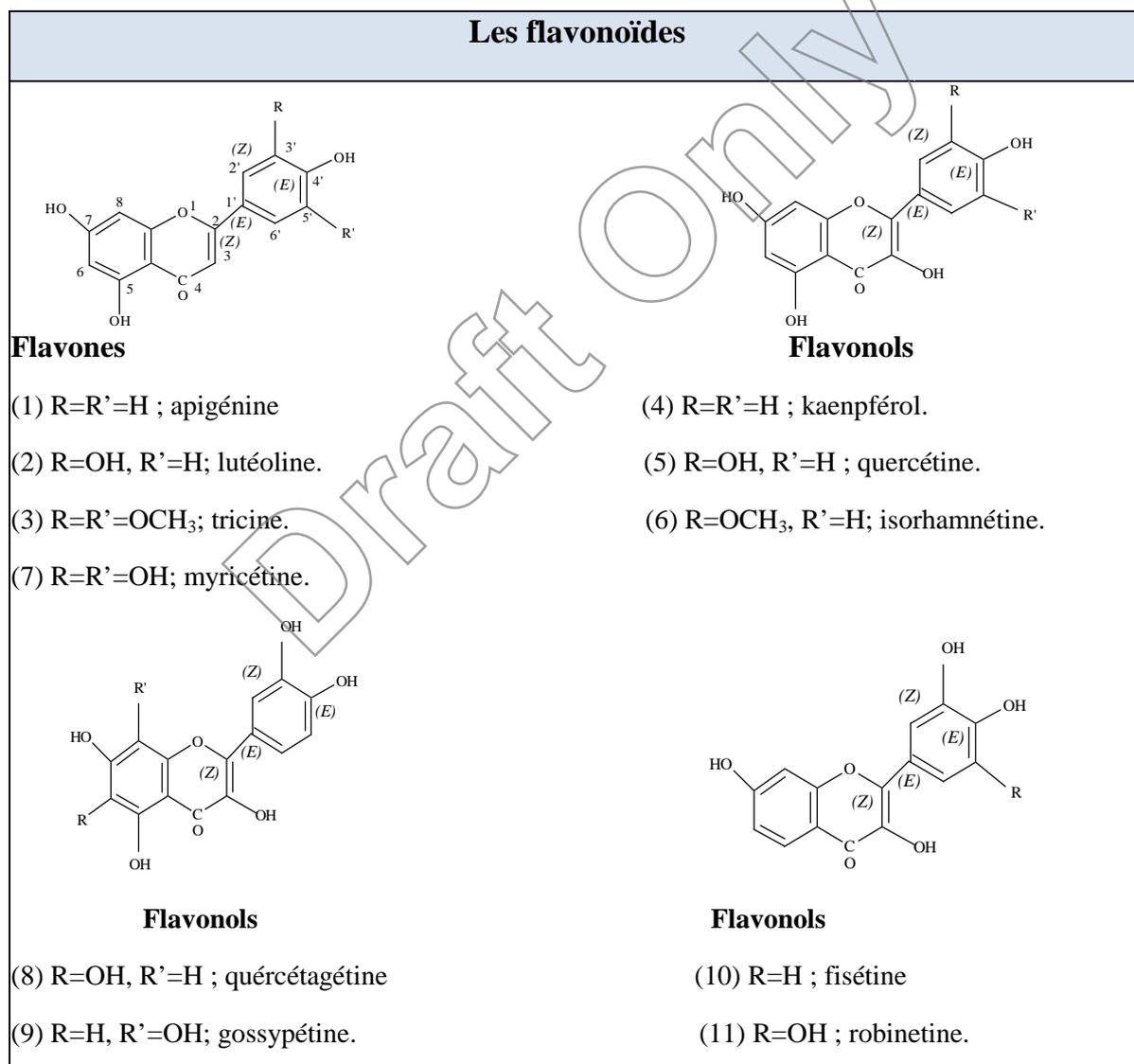


Figure 15 : Structure des principales classes des flavonoïdes (lopez-Posad *et al.* , 2008)

II. 2.4.3.3. Tanins :

Les tanins sont des métabolites secondaires importants dans le règne végétal qui peuvent avoir une grande influence sur la valeur nutritive de légumineuses fourragères. Les tanins ont un grand nombre de groupe hydroxyl phénolique libre qui forment des liaisons hydrogène fortes avec les protéines et les précipiter (**Krause et al., 2005**).

Il est classique de distinguer deux grands groupes de tanins, différent à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition qui sont : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Pascale et Veronique, 2006**).

II. 2.4.3.3.1. Tanins hydrolysables :

Les tanins hydrolysables sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (alcaline ou bien acide) ou enzymatique. Ils libèrent alors une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique (cas de gallotanins) soit un dimère de ce même acide, l'acide ellagique (cas des tanins ellagique) et une partie non phénolique (souvent du glucose ou de l'acide quinique) (**Hennebelle et al., 2005**).

II.2.4.3.3.2. Tanins condensés :

Les tanins condensés ou proanthocyanidines sont des polymères d'unités flavaniques les plus souvent liées entre elle par des liaisons C4-C6 ou C4-C8. Contrairement aux tanins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse et seules des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. (**Macheix, 1996**).

II.2.4.4. Propriétés biologiques des composés phénoliques :

Les composés phénoliques ont été rapportés pour leurs multiples effets biologiques : activité anti-oxydante, anti-inflammatoire, antimicrobienne, antibactérienne et anti-radicalaire (tableau II).

Tableau II : Activités biologiques des composés phénoliques (Bahorun ,1997)

Polyphénols	Activités
Acides phénols (Cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes Antifongiques Antioxydantes
Coumarines	Protectrices vasculaires et antioedemateuses
Flavonoïdes	Anti- inflammatoires Antioxydantes, Anti-carcinogènes Anti-tumorales Hypotenseur et diurétiques
Anthocyane	Protectrices capillaro veineux
Proanthocyanidines	Antioxydantes Antifongiques Anti-tumorals Anti-inflammatoires Effets stabilisants sur le collagène
Tanins galliques et catéchiques	Antioxydantes

II.2.4.4.1. Activité antibactérienne :

L'effet toxique des composés phénoliques sur les micro-organismes dépend de ces derniers (leur poids moléculaire, leur concentration, et leur solubilité), de l'espèce microbienne considérée et des conditions du milieu.

Pour être plus actif, l'agent antimicrobien doit se fixer sur l'enveloppe externe du micro-organisme et la traverser. Cette fixation entraîne des changements de charges électriques de la membrane de la bactérie (**Barouki, 2006**). L'effet antibactérien des composés phénoliques met en jeu trois mécanismes (**Hadi, 2004**) :

- ◆ L'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes,
- ◆ La séquestration de substrats nécessaires à la croissance microbienne,
- ◆ L'inhibition du métabolisme microbien.

II.2.4.4.2. Activité anti-oxydante :

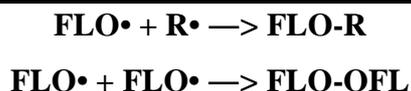
L'intérêt métabolique des antioxydants alimentaires fait à l'heure actuelle l'objet d'un grand nombre de travaux, et parmi ces antioxydants les plus puissants, les flavonoïdes qui préviennent efficacement la peroxydation lipidique puisqu'ils peuvent réagir avec la plupart des radicaux libres susceptibles d'arracher un hydrogène sur le groupement (CH₂) situé entre les deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés, pour former des espèces radicalaires intermédiaires peu réactives (Edeas, 2007). De plus, ils pourraient agir en chélatant les métaux de transition tels que le cuivre et le fer (Bruneton, 2009).

II.2.4.4.3. Activité anti-radicalaires :

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donner un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle selon la réaction représentée ci-dessous (Milane, 2004) :



Cette réaction de piégeage donne une molécule stable (RH) et un radical flavoxyl (FLO•), ce dernier va subir un changement de structure par résonance ; redistribution des électrons impaires sur le noyau aromatique pour donner des molécules de faible réactivité par rapport aux (R•); en outre les radicaux flavoxyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs (Amié *et al*, 2003) :



La propriété anti-radicalaire des flavonoïdes est étroitement liée à leur structure, en particulier au phénomène de résonance électronique stabilisant exercé par les noyaux aromatiques, cette activité nécessite :

- Structure ortho-dihydroxyphénolique du cycle B (3',4' dihydroxystructure), cette structure est importante pour l'activité anti-radicalaire des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé.
- La double liaison C2-C3 conjuguée avec la fonction 4 oxo qui est responsable de la délocalisation des électrons, en améliorant ainsi la capacité anti-radicalaire.
- Les groupements hydroxyles libres en C3 et C5

A titre d'exemple ; la quercétine et la myricétine répondent à tous ces critères nécessaires pour avoir une activité anti-radicalaire efficace et importante (**Amié *et al*, 2003**).

Draft Only

I. Matériels et méthodes

I.1 Matériel végétal :

Le matériel végétal utilisé dans cette présente étude est les feuilles de quatre plantes médicinales : *Inula viscosa*, *Paeonia coralina*, *Marrubium vulgare* et *Cheiranthus cheiri*, leur récolte a été réalisée en : avril 2012 à Amizour, avril 2011 à Djurdjura, avril 2012 à Fénéaia et mars 2012 au Parc National de Gouraya, respectivement, loin de toute pollution susceptibles de modifier la composition chimiques des espèces.

I.1.1. Description botanique et systématique :

➤ *Inula viscosa*

Inula viscosa est une plante annuelle, herbacée, visqueuse et glanduleuse, à odeur forte qui appartient à la famille des Astéracées (Quezel et santa, 1963). Elle est appelée aussi *Dittrichia viscosa* et elle est connue sous le nom d'inule visqueuse. Ses feuilles alternes sont allongées et lancéolées et ces fleurs sont linguiformes jaunes (figure 16), on la trouve souvent sur les jachères humides, bords des chemins en formant des populations (Kattouf et al, 2009).



Figure 16 : Photographie d'*Inula viscosa*.

La classification:

Règne :	Plantae	Famille :	<i>Asteraceae</i>
Division :	Magnoliophyta	Genre :	<i>Inula</i>
Classe :	Magnoliopsida	Espèce :	<i>Inula viscosa</i>
Ordre :	Asterales		

➤ *Paeonia coralina*

Paeonia coralina dénommée pivoine mâle de russo, est une plante herbacée. Les feuilles inférieures sont biternées et les supérieures sont ternées. Les fleurs solitaires, terminales, vont du rouge au rose, elles sont pollinisées par les insectes (figure 17). La floraison se fait en une semaine, entre avril et juin.



Figure 17 : Photographie de *Paeonia coralina*

La systématique :

Régne :	Plantae	Famille :	<i>Paeoniaceae</i>
Division :	Magnoliophyta	Genre :	<i>Paeonia</i>
Classe :	Magnoliopsida	Espèce :	<i>Paeonia coralina</i>
Ordre :	Dilleniales		

➤ *Marrubium vulgare*

Marrubium vulgare surnommée le marrube blanc, est une plante herbacée, vivace, pouvant atteindre 80cm de hauteur, à tige quadrangulaire cotonneuse. Les feuilles pétiolées, ovales ou arrondies. Les fleurs petites, blanches (Figure 18). Toute la plante dégage une odeur forte, sa saveur et âcre (qui irrite les organes du gout et de l'odorat).



Figure 18 : Photographie de *Marrubium vulgare*

La classification :

Régne :	Plantae	Ordre :	Lamiales
Sous-regne :	Tracheobionta	Famille :	Lamiaceae
Division :	Magnoliophyta	Genre :	<i>Marrubium</i>
Classe :	Magnoliopsida	Espèce :	<i>Marrubium vulgare</i>
Sous-classe :	Asteridae		

➤ ***Cheiranthus cheiri***

Cheiranthus cheiri qui est sous le nom commun de giroflée des murailles, est une plante herbacée, hermaphrodite, bisannuelle ou vivace, à poils appliqués, tige dressée, rameuse, anguleuse, presque ligneuse à la base. Les feuilles sont alternes, courtement pétiolées, entières, lancéolées-aigues (figure 19).



Figure 19 : Photographie de *Cheiranthus cheiri*

La classification :

Régne :	Plantae	Famille :	<i>Brassicaceae</i>
Division :	Magnoliophyta	Genre :	<i>Cheiranthus</i>
Classe :	Magnoliopsida	Espèce :	<i>Cheiranthus cheiri</i>
Ordre :	Brassicales		

I.1.2. Usage traditionnels :**Tableau III :** Usage traditionnels des plantes.

Espèce	Usage traditionnel
<i>Inula viscosa</i>	- Effet anti-inflammatoire - Effet antioxydant - Effet antidiabétique - Effet antibactérien et antifongique
<i>Paeonia coralina</i>	- Antiseptique - Effet contre la toux et pour traiter les hémorroïdes.
<i>Marrubium vulgare</i>	- Utilisée pour le traitement des maladies diabétiques, contre les fièvres et les diarrhées. - Utilisée contre les maux de dents et sur les abcès. - Effet antirhumatismale - Effet antiseptique pulmonaire.
<i>Cheiranthus cheiri</i>	- Cardiotonique - Un diurétique - Effet antiviral contre les agents de l'herpès et les poliomyélites

I.2. Méthodes :**I.2.1 Séchage et broyage :**

Après avoir bien nettoyé les plantes (enlever les tiges), les feuilles ont été séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière. La matière sèche a été ensuite réduite en poudre fine à l'aide d'un moulin électrique.

I.2.2 Extraction des composés phénoliques :

L'extraction des composés phénoliques des feuilles d'*Inula viscosa*, *Paeonia coralina*, *Marubium vulgare* et *Cheiranthus cheiri* a été réalisée selon le protocole de **Jouad et al. (2002)**, c'est une extraction par décoction. 5g de la poudre fine ont été bouillis dans 100 ml

d'eau distillée pendant 15 min. Après décantation, le surnageant a été filtré à l'aide d'un papier filtre puis séché à l'air libre et à l'abri de la lumière.

Le pourcentage d'extraction a été calculé selon la formule ci-dessous :

$$\% \text{ d'extraction} = [(P_1 - P_0) / m] \times 100$$

P_1 : Poids de la boîte de pétri et l'extrait après évaporation.

P_0 : Poids vide de la boîte de pétri.

m : Poids de la poudre.

I.2.3 Analyse phytochimique :

I.2.3.1 Dosage des phénols totaux :

La quantité de phénols totaux a été déterminée selon le protocole de **Djéridane et al., (2006)**. La méthode est basée sur l'utilisation de réactif de folin-ciocalteu, un acide de couleur jaune, constitué de poly hétérocycles acides contenant l'acide phosphotungestique $H_3PM_{12}O_{40}$ et l'acide phosphomolybdique $H_3PW_{12}O_{40}$. L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleu est proportionnelle au taux de composés phénoliques (**Ribereau-Gayon, 1968**).

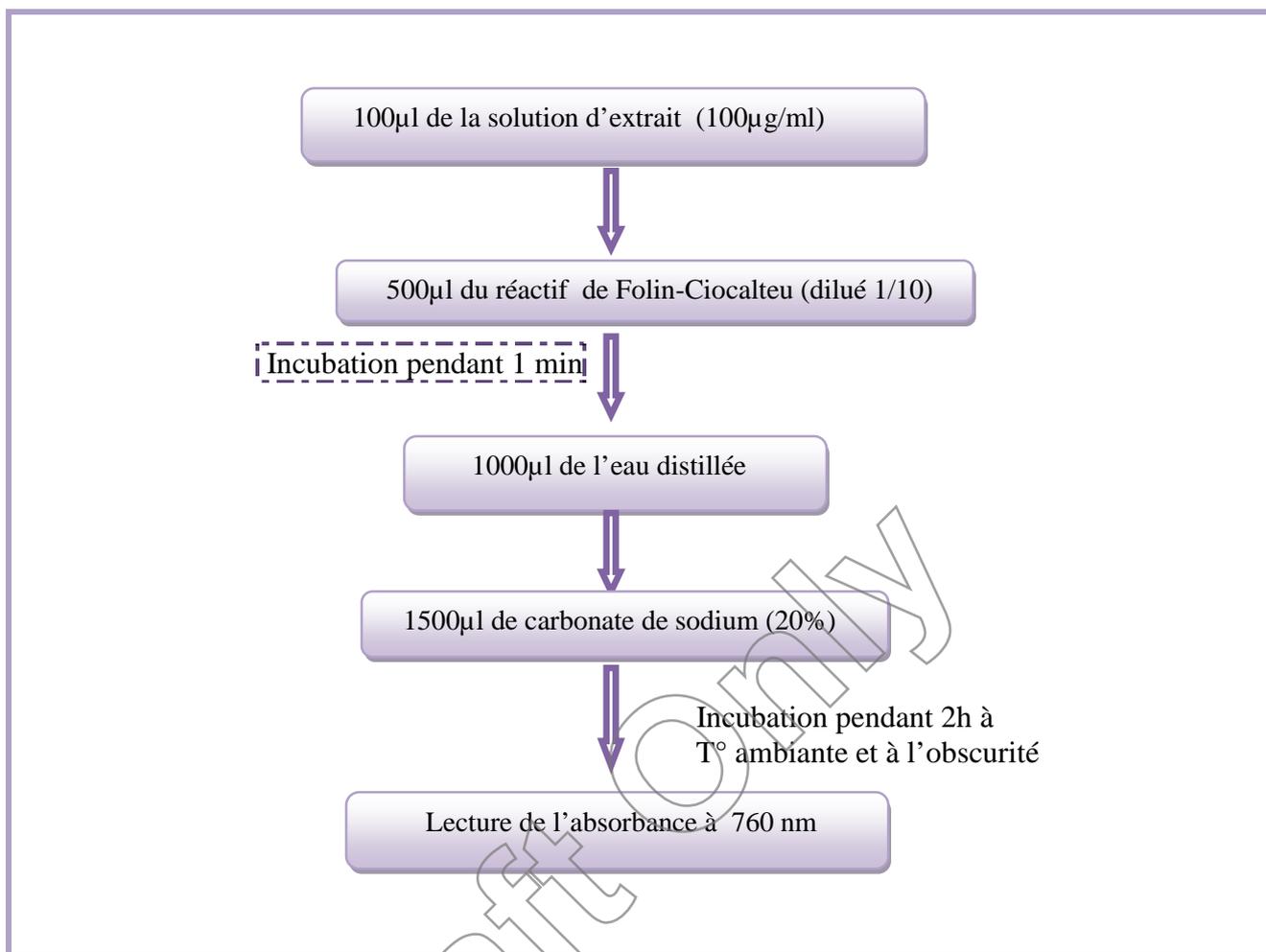
Mode opératoire :

Figure 20: Protocole de dosage des phénols totaux (Djéridane et al., 2006).

Le contenu en phénols totaux a été déterminé à partir d'une courbe d'étalonnage en utilisant l'acide gallique comme standard (annexe 1). Les résultats ont été exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg eq AG/g d'extrait). Tous les essais ont été effectués trois fois.

I.2.3.2 Dosage des flavonoïdes :

Le dosage des flavonoïdes a été déterminé avec la méthode de chlorure d'aluminium (AlCl_3) adaptée par Djéridane et al., (2006). Une méthode spectrophotométrique qui se base sur la capacité des flavonoïdes à former des complexes de couleur jaunâtre avec le chlorure d'aluminium dont l'absorbance est à la longueur d'onde de 430 nm.

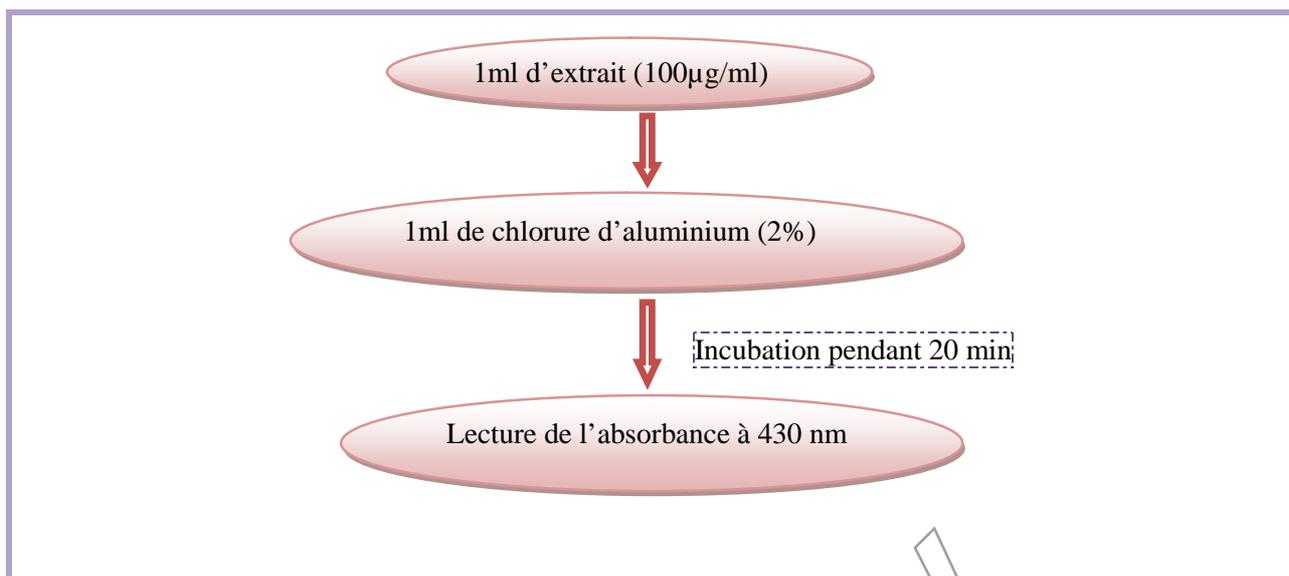
Mode opératoire :

Figure 21 : Protocole de dosage des flavonoïdes (Djeridane *et al.*, 2006).

Une courbe d'étalonnage a été réalisée avec la rutine (Annexe 2). Les teneurs en flavonoïdes ont été exprimées en mg équivalent rutine par gramme d'extrait (mg eq Rut/g d'extrait) et tous les essais ont été effectués trois fois.

I.2.3.3 Evaluation de l'activité anti-radicalaire :**I.2.3.3.1. Activité scavenger du DPPH :**

Le DPPH est un radical libre organique stable, généralement utilisé pour évaluer l'activité anti-radicalaire de toute substance *in-vitro*. En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2 diphenyl-1-picryl hydrazyl) de couleur violette (forme oxydée) se réduit en 2,2 diphenyl-1-picryl hydrazine de couleur jaune (Athamena *et al.*, 2010).

L'effet des extraits de nos plantes sur le radical synthétique DPPH a été mesuré en utilisant la méthode de Masuda *et al.* (1999) in Maisuthisakul *et al.* (2007).

Le contrôle qui est constitué de la solution du DPPH sans extrait, est mesuré à une longueur d'onde de 517nm.

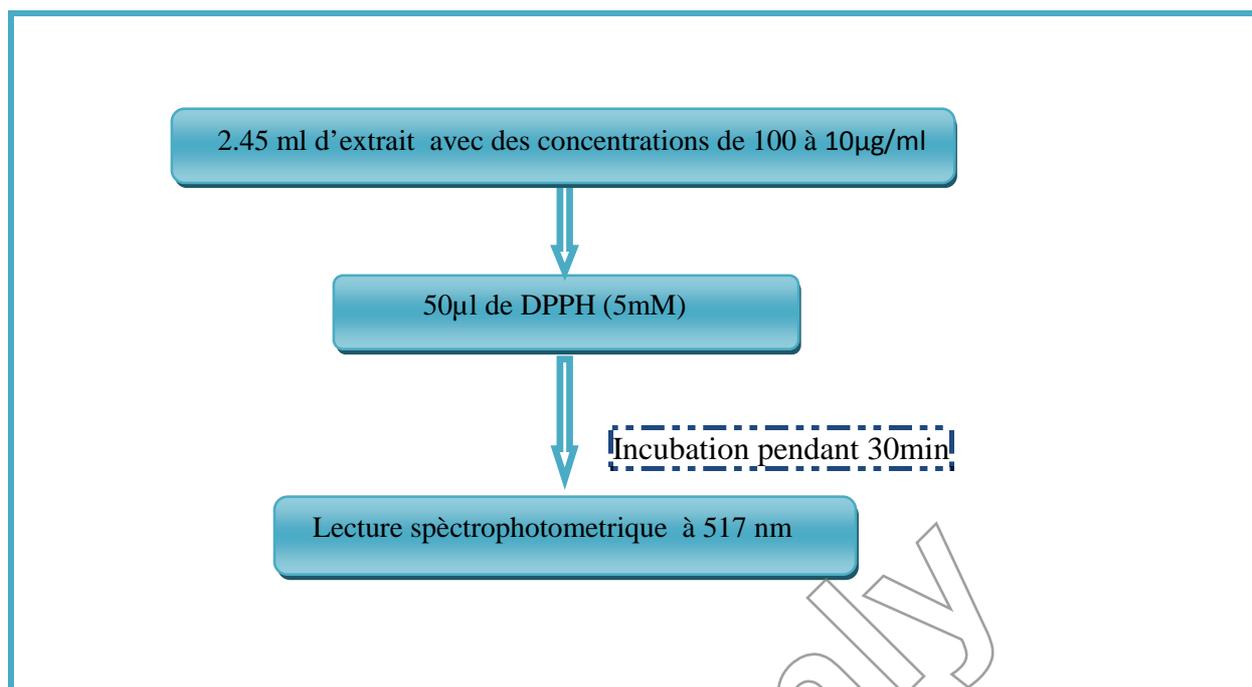
Mode opératoire :

Figure 22 : Protocole de l'activité scavenging du DPPH (Masuda *et al.*, 1999)

Le pourcentage scavenger du DPPH a été calculé selon la formule suivante :

$$(\%) \text{ scavenger du DPPH} = [A_0 - (A_1 - A_S) / A_0] * 100$$

Avec :

A_0 : Absorbance de la solution contrôle (DPPH sans extrait)

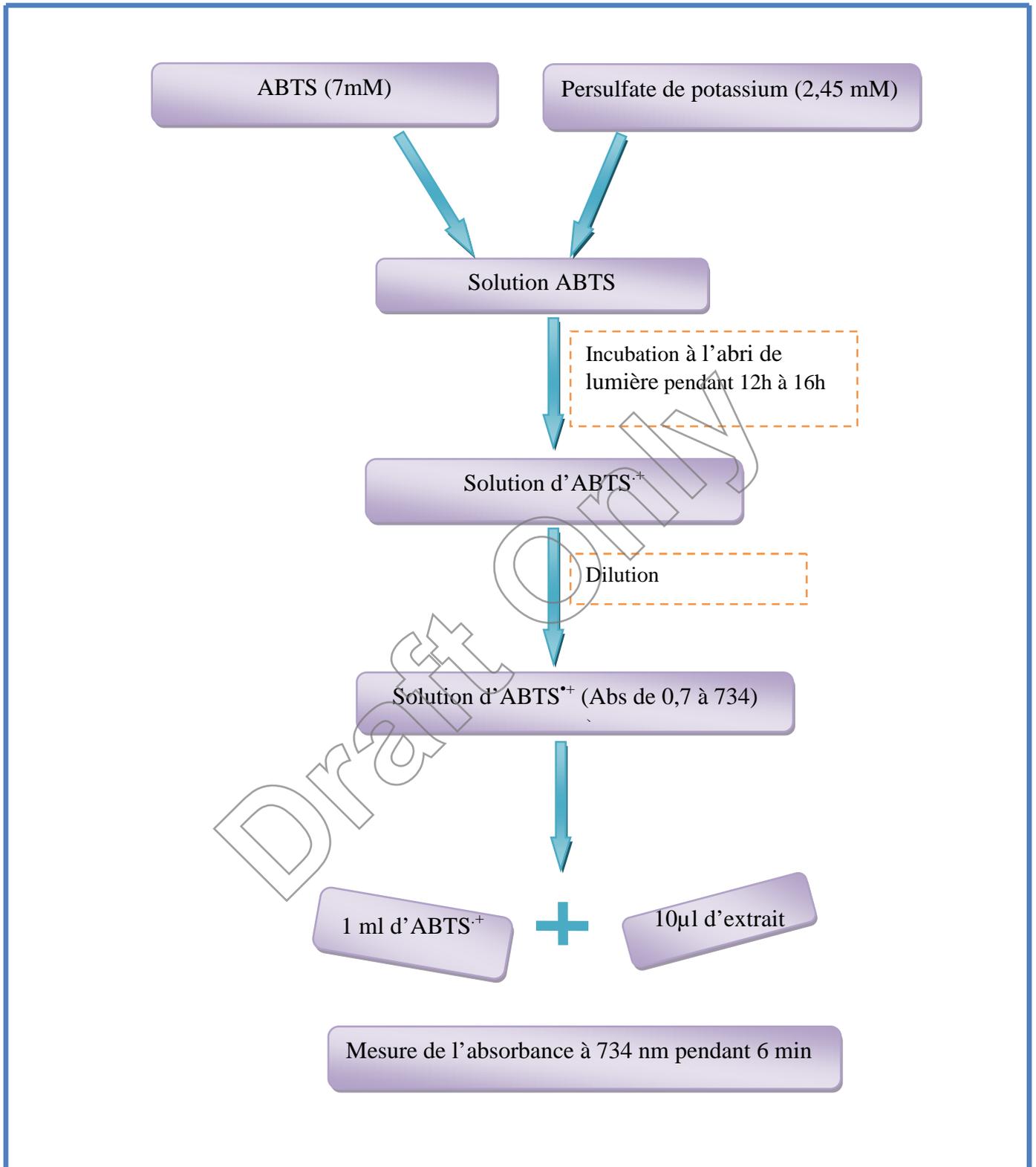
A_1 : Absorbance du DPPH+ extrait

A_S : Absorbance de l'extrait sans DPPH

I.2.3.3.2 Activité scavenger du radical $ABTS^{\cdot+}$

L'activité scavenging du radical $ABTS^{\cdot+}$ sur les extraits des feuilles de nos plantes ainsi que le contrôle (ABTS sans extrait) ont été mesurés par la méthode de Ré *et al.* (1999), qui se base sur la décoloration de la solution d' $ABTS^{\cdot+}$ qui est le résultat de sa réduction par les antioxydants. La diminution de l'absorbance de la solution du radical cationique $ABTS^{\cdot+}$ traduit l'effet de l'échantillon antioxydant.

Mode opératoire :

**Figure 23** : Protocole de l'activité scavenging du radical ABTS^{•+} (Ré et al., 1999)

Le pourcentage de l'activité scavenging de l'ABTS^{·+} a été calculé par l'équation suivante :

$$(\%) \text{ scavenging de l'ABTS}^{\cdot+} = [(A_{con} - A_{test}) / A_{con}]$$

Avec :

A_{con} : Absorbance de la solution contrôle (ABTS^{·+} sans extrait).

A_{test} : Absorbance de l'échantillon (ABTS^{·+} en présence d'extrait).

Draft Only

II. Résultats et discussion :

II.1 Taux d'extraction :

Les feuilles de nos plantes ont été séchées à une température ambiante et à l'abri de la lumière, pour assurer une meilleur élimination d'eau tout en préservant la composition en composés phénoliques, sans provoquer leur volatilisation et dégradation.

Les taux d'extraction obtenus à partir des feuilles de chaque plante sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau IV : Les pourcentages d'extraction des extraits des feuilles d'*Inula viscosa*, *Paeonia coralina*, *Marrubium vulgare* et *Cheiranthus cheiri*.

Plantes	Taux d'extraction des principes actifs des feuilles (%)
<i>Inula viscosa</i>	7,4
<i>Paeonia coralina</i>	13,8
<i>Marrubium vulgare</i>	9,8
<i>Cheiranthus cheiri</i>	17,4

D'après les résultats figurant dans le tableau IV, on constate qu'un faible taux a été obtenu à partir des extraits des feuilles d'*Inula viscosa* et *Marrubium vulgare* (7,4%) et (9,8%), respectivement, par la suite on note que les taux les plus élevés ont été obtenus à partir des extraits des feuilles de *Paeonia coralina* (13,8%) et *Cheiranthus cheiri* (17,4%).

D'après les travaux effectués par **Alali et al., (2007)**, le rendement en extrait méthanolique d'*Inula viscosa* et *Marrubium vulgare* est de (43,9%) et (11,8 %), respectivement, qui sont des rendements plus élevés à ceux obtenus avec l'eau. Cela montre que le méthanol est le meilleur solvant convenable pour l'extraction des composés de ces deux plantes, ce qui est dû à la capacité du méthanol à extraire les molécules de type polaire et apolaire, alors que l'eau extrait que les molécules polaires, comme il existe d'autres paramètres qui peuvent influencer sur le rendement d'extraction tels que la température, l'endroit et la période de récolte.

Le critère de taux d'extraction n'est pas suffisant pour préconiser la richesse d'un extrait en composés phénoliques car les extraits des plantes contiennent d'autres composés. Cette évidence est montrée dans l'étude des dosages des phénols totaux et des flavonoïdes.

II.2. Dosage des composés phénoliques

II.2.1. Dosage des phénols totaux

Les teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles d'*Inula viscosa*, *Paeonia coralina*, *Marrubium vulgare* et *Cheiranthus cheiri* ont été déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage, établie en utilisant l'acide gallique comme référence.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure suivante :

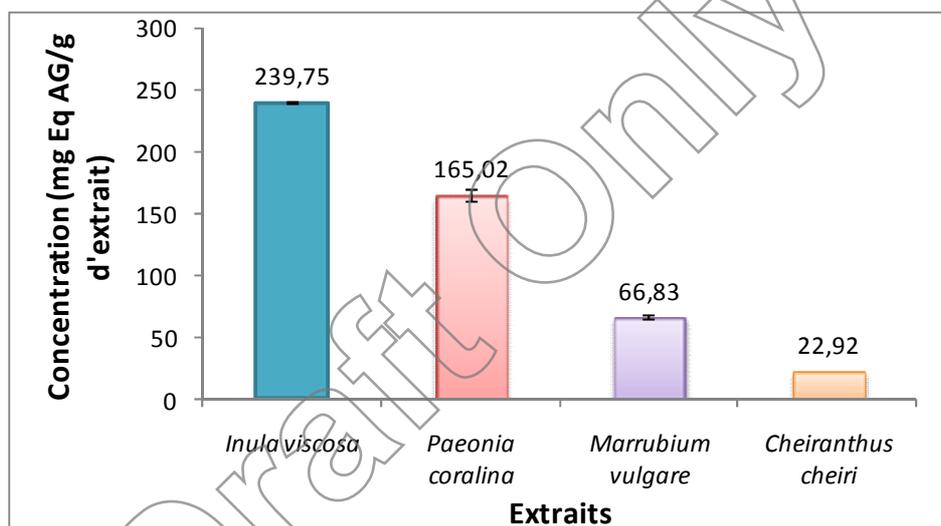


Figure 24 : Teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles d'*Inula viscosa*, *Paeonia coralina*, *Marrubium vulgare* et *Cheiranthus cheiri*.

D'après ces résultats on constate que le contenu le plus élevé en phénols totaux est enregistré au niveau de l'extrait d'*Inula viscosa* suivi de l'extrait de *Paeonia coralina* dont les concentrations sont 239,75 et 165,02 mg eq acide gallique/ g d'extrait, respectivement, et la teneur la plus faible a été obtenue avec l'extrait de *Cheiranthus cheiri* avec 22,92 mg eq acide gallique/ g d'extrait.

En comparaison avec des travaux effectués par **Alali et al., (2007)**, en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction, les résultats montrent que les teneurs des phénols totaux dans les feuilles d'*Inula viscosa* et *Marrubium vulgare* sont de 43,9 mg eq AG/g de

poudre et de 11,8 mg eq AG/g de la matière sèche, respectivement. Ces résultats sont largement supérieurs à ceux obtenus dans les extraits aqueux dont leur teneurs sont de 17,74 mg eq AG/ g de poudre et 6,54 mg eq AG / g de poudre pour les deux extraits, respectivement. Cela pourrait être dû au type de solvant utilisé. Donc il ya plus de composés moins polaires pour *Inula viscosa* et *Marrubium vulgare*, dont ils présentent presque la moitié des valeurs obtenus dans les résultats de l'étude précédente.

II.2.2. Dosage des flavonoïdes

L'évaluation des teneurs des extraits des feuilles d'*Inula viscosa*, *Paeonia coralina*, *Marrubium vulgare* et *Cheiranthus cheiri* en flavonoïdes a été estimée selon la courbe d'étalonnage réalisée avec la rutine et les valeurs sont exprimées en mg eq rutine/g d'extrait.

Les résultats sont représentés dans la figure suivante :

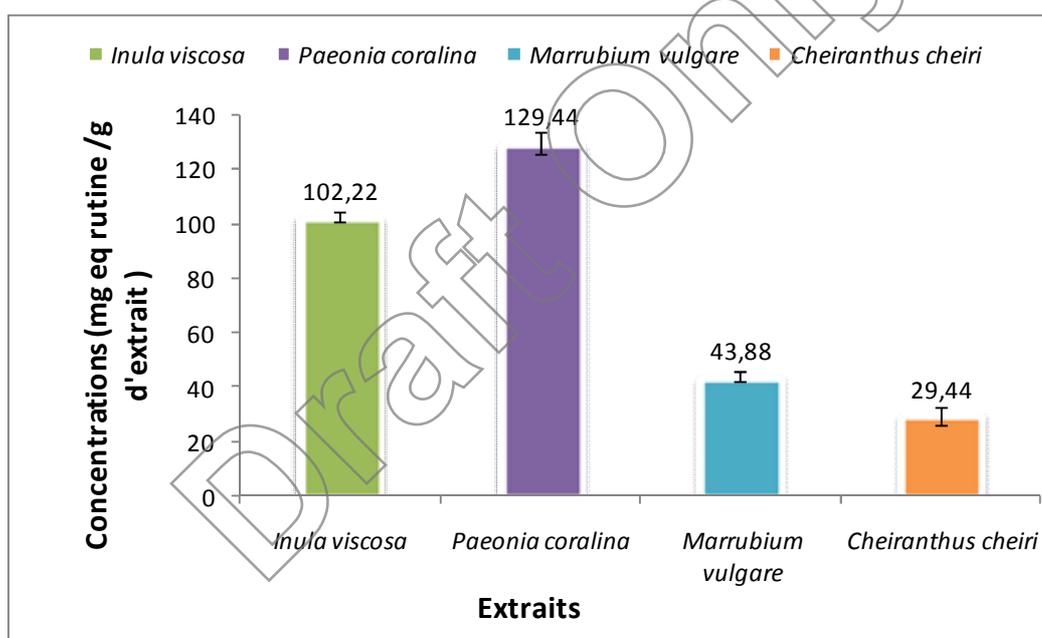


Figure 25 : Teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles d'*Inula viscosa*, *Paeonia coralina*, *Marrubium vulgare* et *Cheiranthus cheiri*.

D'après la figure ci-dessus, il ressort que les extraits des feuilles de *Paeonia coralina* et *Inula viscosa* possèdent un taux très important en flavonoïdes avec (129,44) et (102,22) mg eq rutine/g d'extrait, respectivement, par rapport aux extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* et *Cheiranthus cheiri*, qui montrent des taux très faibles de (43,88) et (29,44) mg eq rutine/g d'extrait, respectivement.

Les résultats obtenus dans cette présente étude montrent que la teneur en flavonoïdes des extraits des feuilles d'*Inula viscosa* et *Marrubium vulgare* sont de 7,56 mg eq Rut/ g de poudre et de 4,30 mg eq Rut / g de poudre, respectivement. Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus en comparaison aux travaux réalisés au sein de notre Université dont le méthanol est le solvant utilisé pour l'extraction et les concentrations obtenues sont de 9,86 mg eq quercétine /g de la poudre et 7,03mg eq quercétine / g de la matière sèche, respectivement. Cela veut dire que nos extraits présentent plus de flavonoïdes polaires.

II.3. Activité anti-radicalaire des extraits des quatre plantes contre le radical DPPH

D'après la figure suivante, on constate que les extraits d'*Inula viscosa* et *Paeonia coralina* testés à une concentration de 100 μ g/ml présentent une grande activité anti DPPH, de 89,66% et 92,02 %, respectivement similaire à celle des standards. L'extrait de *Marrubium vulgare* exhibe une activité très faible avec 25,25%, alors que l'extrait aqueux de *Cheiranthus cheiri* ne présente aucun effet sur le radical DPPH.

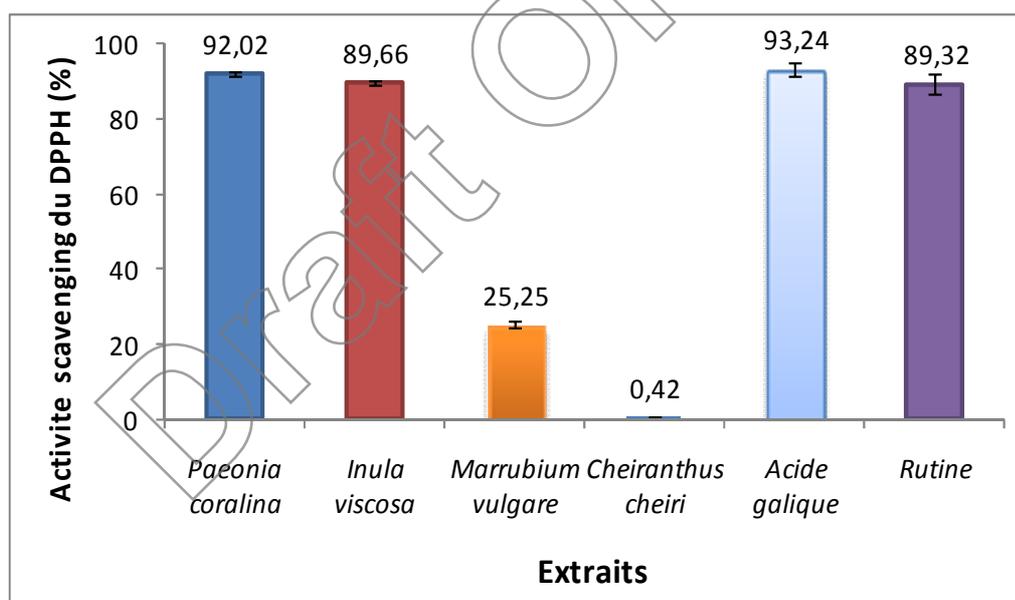


Figure 26 : Effet scavenger des extraits des feuilles de *Paeonia coralina*, *Inula viscosa*, *Marrubium vulgare*, *Cheiranthus cheiri*, l'acide gallique et la rutine contre le radical DPPH à 100 μ g/ml.

Les résultats enregistrés dans la figure ci-dessous, nous montrent le potentiel scavenger que pourrait exercer nos extraits sur le radical DPPH, à différentes concentrations.

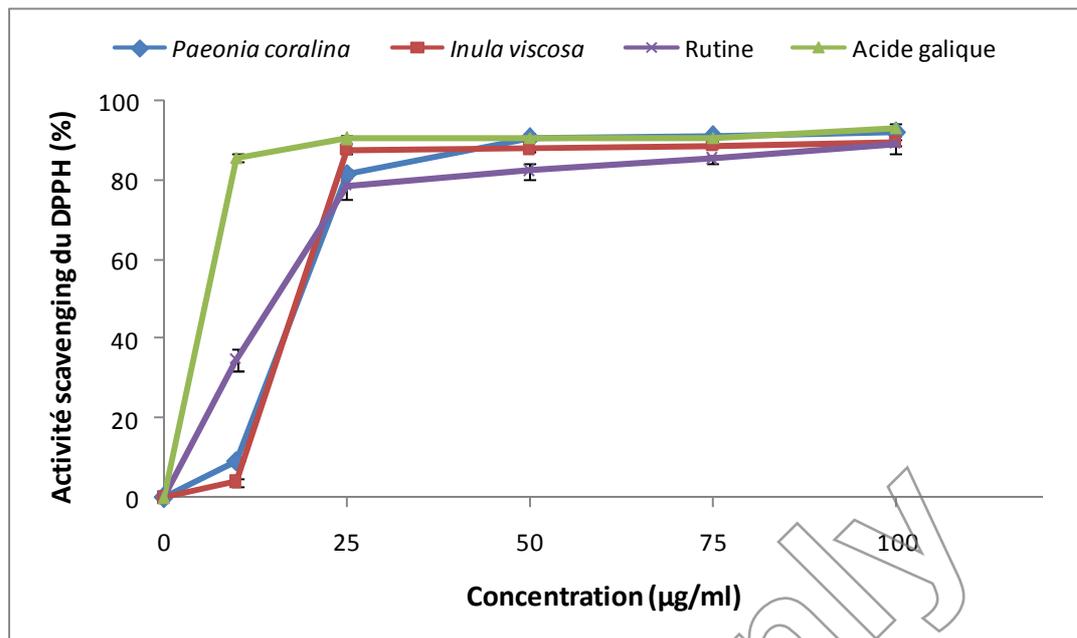


Figure 27 : Effet scavenger des extraits des feuilles d'*Inula viscosa*, *Paeonia coralina*, l'acide gallique et la rutine sur le radical DPPH à différentes concentrations.

Les courbes obtenus ont enregistré des pourcentages scavenger proportionnelles aux concentrations ; plus la concentration augmente plus l'effet scavenging augmente. Au-delà d'une concentration de 50 µg/ml, l'activité scavenging d'*Inula viscosa* et *Paeonia coralina* se stabilise et atteint un maximum avec 87,96 % et de 90,41%, respectivement.

Quand aux molécules de références, l'activité anti DPPH de l'acide gallique est maximale et se stabilise au-delà de 25 µg/ml qui est de 90,50% et cette valeur est légèrement supérieure à celle des extraits. Et que le rutine se stabilise et atteint son maximum au-delà de 50 µg/ml qui est de 82,39%.

La valeur IC_{50} est définie comme étant la concentration d'inhibition de l'effet scavenger à 50% du radical DPPH. Les IC_{50} sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger, dont les valeurs faibles reflètent un pouvoir anti-radicalaire important.

Tableau V: IC₅₀ des extraits et les standards présentant un fort effet anti-radicalaire contre le radical DPPH.

Extraits	IC ₅₀ (µg/ml)
<i>Inula viscosa</i>	18
<i>Paeonia coralina</i>	18,5
Acide gallique	6
Rutine	15

Selon le tableau V, les IC₅₀ obtenues pour les deux extraits d'*Inula viscosa* et *Paeonia coralina* sont respectivement, 18 et 18,5 µg/ml, qui sont largement proches à celle de la rutine (15µg/ml) et cela correspond à un potentiel antioxydant important.

II.4. Activité anti-radicalaire des extraits de quatre plantes contre le radical ABTS^{•+} :

L'activité anti-oxydante totale d'une molécule est déduite par sa capacité à inhiber le radical cationique ABTS^{•+} de coloration bleu-vert en le transformant en ABTS^{•+} incolore en présence de proton issu d'un antioxydant (Ré et al., 1999).

Les résultats des tests d'activité scavenging du radical ABTS^{•+} par les extraits des feuilles d'*Inula viscosa*, *Paeonia coralina*, *Marrubium vulgare* et *Cheiranthus cheiri* à 100 µg/ml sont illustrés dans la figure suivante :

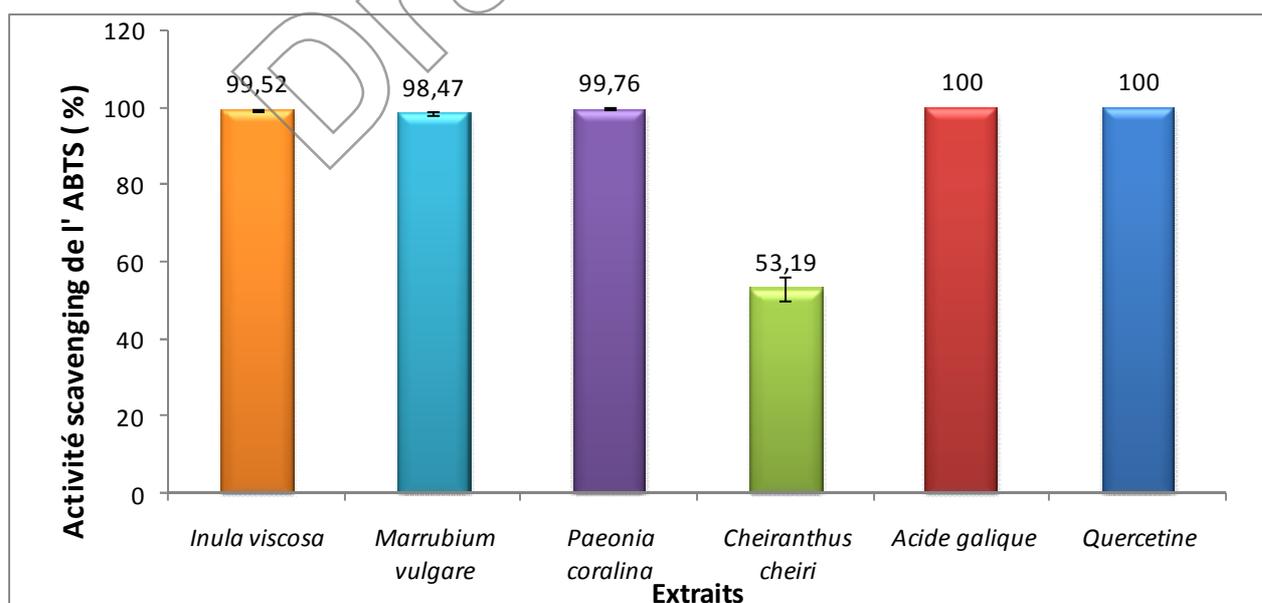


Figure 28 : Effet scavenger des extraits des feuilles d'*Inula viscosa*, *Marrubium vulgare*, *Paeonia coralina*, *Cheiranthus cheiri* et les standards l'acide gallique et la quercétine contre le radical ABTS^{•+} à 100µg/ml.

D'après la figure ci-dessus, on constate que à l'exception de *Cheiranthus cheiri* qui exhibe une activité de $53,19 \pm 3,1\%$, tous les extraits présentent une très bonne activité inhibitrice contre le radical $ABTS^{\cdot+}$ avec $99,76 \pm 0,21\%$ pour *Paeonia coralina*, $99,52 \pm 0,30\%$ pour *Inula viscosa* et $98,47 \pm 0,35\%$ pour *Marrubium vulgare*. Ces valeurs sont similaires aux pourcentages obtenus avec les standards.

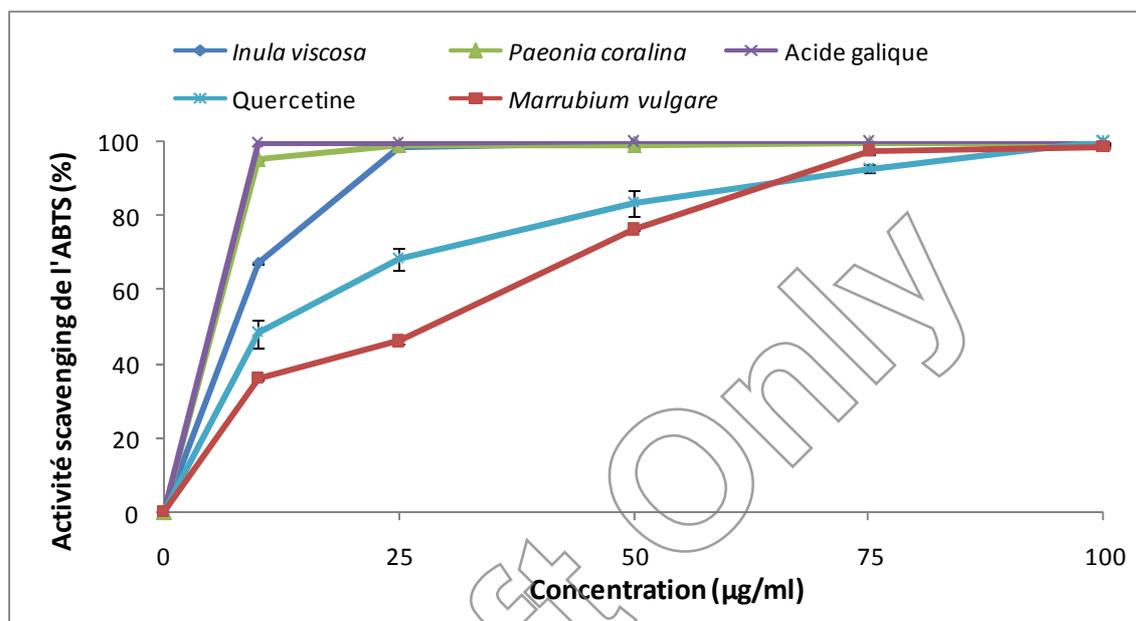


Figure 29 : Effet scavenger des extraits des feuilles d'*Inula viscosa*, *Marrubium vulgare*, *Paeonia coralina*, l'acide gallique et la quercétine sur le radical $ABTS^{\cdot+}$ à différentes concentration.

Les courbes obtenus dans la figure 29 ont enregistré des pourcentages scavenger proportionnels aux concentrations des extraits; plus la concentration augmente plus l'effet scavenging augmente, mais au-delà d'une concentration de $75\mu\text{g/ml}$ l'activité scavenging d'*Inula viscosa* et *Marrubium vulgare* se stabilise et atteint un maximum de $99,47\%$ et de $97,37\%$, respectivement, alors que *Paeonia coralina* se stabilise et atteint un maximum de $98,85\%$ à une concentration de $25\mu\text{g/ml}$.

Quand aux molécules de références, l'activité anti $ABTS^{\cdot+}$ est maximale et se stabilise au-delà de $10\mu\text{g/ml}$ pour l'acide gallique, et à $75\mu\text{g/ml}$ pour la quercétine.

Selon **Djéridane et ses collaborateurs (2006)**, les résultats obtenus dans une étude effectuée sur la capacité scavenging du radical $ABTS^{\cdot+}$ de quelques plantes médicinales algériennes, montrent que l'activité anti-oxydante ne dépend pas seulement de la

concentration des composés phénoliques mais aussi de leur structure et des interactions qui peuvent y avoir lieu entre eux .

En comparaison avec des études effectuées par **Alali et al., (2007)** sur plusieurs familles des plantes médicinales ont montrées que *Inula viscosa* et *Marrubium vulgare* possèdent une forte activité contre le radical ABTS⁺ dont les résultats obtenus sont de 247,8µmol eq trolox / g⁻¹ de matière sèche et de 53,9 µmol eq trolox / g⁻¹de la matière sèche, respectivement. Cela due à la capacité des composés de ces plantes a piégé le radical ABTS⁺.

Tableau VI: IC₅₀ des extraits présentant un fort effet anti-radicalaire contre le radical ABTS⁺ et les standards .

<i>Extraits</i>	<i>IC₅₀ (µg/ml)</i>
<i>Inula viscosa</i>	7
<i>Paeonia coralina</i>	5
<i>Marrubium vulgare</i>	28
Acide gallique	5
Quercétine	11

Selon le tableau VI, Les meilleures valeurs d'IC₅₀ sont observées pour les deux extraits, *Paeonia coralina* avec 5µg/ml qui est similaire à celle de l'acide gallique et *Inula viscosa* avec 7µg/ml qui est largement proche à celle de l'acide gallique, qui correspondent à un potentiel antioxydant très important, cela pourrait être dû à la nature chimique des composés phénoliques, essentiellement au nombre et à la position des groupements hydroxyles au niveau de ces composés.

II.5 Corrélations :

Des coefficients de corrélations ont été calculés afin de trouver une relation entre la teneur en composés phénoliques des extraits et leurs activités scavenging contre les radicaux DPPH et l'ABTS⁺.

II.5.1 Corrélation entre l'activité contre le DPPH et phénols totaux /flavonoïdes :

Les corrélations entre les teneurs en phénols totaux et flavonoïdes des différents extraits et activité scavenging du DPPH sont représentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau VII : Corrélation entre les phénols totaux/ flavonoïdes et l'activité anti-DPPH.

Les polyphénols	DPPH
Phénols totaux	0,942
Flavonoïdes	0,972

D'après les résultats, on observe des coefficients de corrélation très importants (phénols $R=0,942$) et (flavonoïdes $R=0,972$), ceci indique bien que l'activité scavenging du DPPH est liée directement à la concentration en phénols totaux et en flavonoïdes.

I.5.2 Corrélation entre l'activité contre l'ABTS^{·+} et phénols totaux /flavonoïdes :

Les corrélations entre les teneurs en phénols totaux et flavonoïdes des différents extraits et leur activité scavenging de l'ABTS^{·+} sont représentées dans le tableau ci-dessous

Tableau VIII : Corrélation entre les phénols totaux/ flavonoïdes et l'activité anti-ABTS^{·+}.

Les polyphénols	ABTS
Phénols totaux	0,702
Flavonoïdes	0,676

En ce qui concerne la relation entre les composés phénoliques et l'activité scavenging des extraits des feuilles d'*Inula viscosa*, *Paeonia coralina*, *Marrubium vulgare* et *Cheiranthus cheiri*, on observe une corrélation importante avec un coefficient de corrélation de $R= 0,702$ pour les phénols totaux et $R= 0,676$ pour les flavonoïdes. On remarque bien que malgré les teneurs faibles en phénols totaux et en flavonoïdes de l'extrait de *Marrubium vulgare* avec 66,83mg eq AG/g d'extrait et 43,88 mg eq Rutine/g d'extrait, respectivement, il présente un pourcentage d'inhibition contre le radical ABTS^{·+} élevé. Donc l'activité scavenging anti-ABTS^{·+} ne dépend pas de la quantité des composés phénoliques mais de la qualité de ces composés.

A

Adam, V., Mikelova, R., Hubalek, J., Hanustiak, P., Beklova, M., Hodek, P., Horna, A., Trnkova, L., Stiborova, M., Zeman, L., and Kizek R., (2007). Utilizing of Square Wave Voltammetry to Detect Flavonoids in the Presence of Human Urine. (7) 2402-2418 ISSN 1424-8220.

Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., and Lomri, A., (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxyde dismutase : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du rhumatisme*, (74) : 636-643.

Alali, F.; Tawaha, K.; El-Elimat, T.; Syouf, M.; El-Fayad, M.; Abulaila, K.; Nielsen, S. J.; Wheaton, W. D.; Falkinham III, J. O. and Oberlies, N. H., (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants: an ICBG project *Natural Product Research*. (21), 1121-1131.

Amié D., Davidović-Amié D., Bešlo D., and Trinajstić N., (2003). Structure–Radical scavenging activity relationships of flavonoids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA*. 76 (1): 55-61.

Athamena, 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) : 69 - 81.

B

Bahorun, T., (1997). Substances naturelles actives : La flore mauricienne, Une source d'approvisionnement potentielle, AMAS food and agricultural research council, *Université de Maurice*.

Barouki, R., (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Medecine / Sciences*. France : 266-72.

Bartosz, G., (1997). Oxidative stress in plants. Department of Molecular Biophysics, Poland. *Acta Physiologiae & Plantarum*. Vol. 19. NO. 1:47-64.

Baudin, B., (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Mt. Cardio*, 2 (1) : 43-52.

Beaudaux, J.L., Delattre, J., Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Legrand, A. and Peynet, J., (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *immuno- analyse & biologie spécialisée*, (21) : 144-150.

Berger, M.M., (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme*, (20):48–53.

Bonnefont, Rousselot., Théron, D., and Delattre, P. J., (2003). Radicaux libres et anti-oxydants. IN : Biochimie pathologique, aspects moléculaires et cellulaires. Ed: *Médecine-sciences*. Flammarion. Paris. Pp: 59-81.

Borg, J. et Reeber, A., (2004). Intéraction des métabolismes et stress oxydant. In : *Biochimie métabolique*. P : 198-234.

Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila, A., Skandrani, I., Falleh, H., and Marzouk, B., (2008). Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. *Department of Biochemistry and Molecular Biology, Tunisia .C. R. Biologies (331):* 48–55.

Bruneton, J., (1993). Pharmacognosie et phytochimie, plantes médicinales. Paris, France : Lavoisier. 278-279.

Bruneton, J., (1996) .Plante toxique, végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. *Londres Editions Tec, et Doc, New-York, Paris.*

Bruneton, J., (2009). Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4^e éd., revue et augmentée, Paris, *Tec & Doc - Éditions médicales internationales*, 1288 p.

C

Canneaux, S., Wallet, A., Ribaucour, M., and Louis, F., (2011). A theoretical study of the NCN ($^3\Sigma^-$) biradical thermochemical properties: Implications for combustion chemistry, *Computational and Theoretical Chemistry, (967):* 67-74.

Chira, K., Suh, JH., Saucier, C., and Teissedre, PL., (2008). Les polyphénols du raisin. Laboratoire de chimie appliquée, 351, cours de la Libération, F-33405 Talence Cedex, France. **(6):** 75–82.

Cimen, B.M.Y., (2008). Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta, (390) :* 1-11.

Curtay, JP., Robin, JM., (2000). Intérêt des complexes antioxydants. *Centre d'Etude et de Développement de la Nutrithérapie.*

Cuvelier, C., Dotreppe, O., and Istasse, L., (2003). Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. Université de Liège B43, Sart-Tilman, 4000 Liège, Belgique. *Ann. Méd. Vét, (147)* 315-324.

D

Davalos, A., Gomez-Cordoves, C., and Bartolome, B., (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *J Agric Food Chem, (1):*48-54.

Defraigne, J.O., Pincemail, J., (2008). Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Synthèse (10):* 10-19.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjmi, B., Vidal, N., Lesgards, JF., Stocker, P., (2006). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol, (224):* 801-809.

Delattre, J., Beaudoux, J.L, and Bonnefont-Rousselot., (2005). Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. *Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales Paris, 1 - 405.*

E

Edeas, M., (2007). Les polyphénols et les polyphénols de thé, Président de la Société française des antioxydants, 15, rue de la Paix, 75002 Paris, France. (5): 264–270

F

Favier, A., (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*: 108-115.

Floss H. G., (1997). Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway. *Natural Product Reports*, (14) : 433-434.

Fontaine, E., (2007). Chapitre XIX : Radicaux libres .*Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. 251-257.

G

Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z. and Jore, J., (2003). Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *Mécanisme biochimique*, 91-96.

Goudable, J. et Favier, A., (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique Metabolisme*, (11): 115-120.

Gutteridge, J.M.C., (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, (41): 1919-28.

H

Hadi M., (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat en Sciences : Université Louis Pasteur Domaine : Pharmacochimie* p. 23-24.

Hamadi. N., (2010). Effet du resveratrol sur les defenses antioxydantes chez les rats rendus diabétiques par l'injection de la streptozotocine. *Thèse en vue de l'obtention du diplôme de magistère en biologie cellulaire et moléculaire* (Université Montouri Constantine Alger).

Harborne, JB., (1989). General procedures and measurement of total phenolics. *In: Harborne JB. Plant Phenolics*. Academic Press, Londres, 1-28.

Hennebelle.T., Sahpaz. S., and Bailleul. F., (2004). Les polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie* (1) :3-6.

Hennebelle,T, ,, Sahpaz,S., and Bailleul, F., (2005). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, BP 83, 59006 Lille Cedex, France. (1): 3-6.

Hennebelle, T., (2006). Investigation chimique chimiotaxonomique et pharmacologique de lamiales productrices d'antioxydants : *Marrubium peregrinum, Ballota larendana, Ballota*

pseudodictamnus (Lamiacées) et *Lipia alba* (Verbénacées). Thèse de doctorat en Chimie Organique et Macromolécule, de l'université Lille 1(France) p19

I

Iris Erlund., (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. Department of Health and Functional Capacity, National Public Health Institute, Mannerheimintie 166, 00300 Helsinki, Finland

J

Jayakumar, T., Thomas, P.A and Geraldine, P., (2009). In vitro antioxidant activite of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *pleurotus ostreatus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* (10): 228-234

Jones, M., (2004). Natural protection against harmful oxidation .*Technical Manager Europe, ADM Natural Health and Nutrition Church Manorway Erith Kent DA8 1DL, UK, VOL. 11 N° 6 NO.*

Jouad H, Maghrani M, Eddouks M., (2002). Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* (81):351-6.

K

Kattouf J., Belmoukhtar M., Harnafi H., Mekhfi H., Ziyati A., Aziz M., Bnouham M. and Legssyer A., (2009). Effet antihypertenseur des feuilles d'*Inula viscosa*. *Phytothérapie,* n° 7, p.309-312.

Kenneth, B., Bechman., Brucen., and Ame., (1998). The Free Radical. Theory of Aging Physiological reviews. California: Vol. 78, No. 2.

Kloer, DP., Schulz,GE., (2006). Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. *Cell. Mol. Life Sci.* (63): 2291–2303.

Kohen, R., Nyska, A., (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology,* (30): 620-650.

Krause. Smith,WJM., Brooker,JD., and Mc Sweeney,CS., (2005). Tolerance mechanisms of streptococci to hydrolysable and condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology :* 59–75.

L

Lacan Bionov. D., (2001). Oxydants /Antioxydants : un équilibre important. 1-5

Laguerre, M., Lecomte, J., and Villeneuve P., (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. Université Montpellier 2, F-34000 Montpellier. France. *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 anti-oxydante. *OCL*, **14 (5)**: 278- 292.

Léger, C.L., (2006). Antioxydants d'origine alimentaire : diversité, modes d'actions antioxydantes, interaction. *Oléagineux, corp gras, lipides*. **13 (1)** :59-69.

Lopez-Posadas, R., Ballester, I., Ana Clara Abadia-Molina, A-C., Dolores Suarez, M., Zarguelo, A., Martinez-Augustin, O., and Sanchez de Medina, F., (2008). Effect of flavonoids on rat splnocytes, a structure-activity relationship study. *Biochemical pharmacology (76)*: 495-506.

M

Macheix. J.J., (1996). Les composés phénoliques des végétaux: quelles perspectives à la fin du XX^e siècle. *Acta Bot Gallica*, **(143)**:473-479.

Macheix, J.J., Fleuriet, A and Billot, J., (1990). Fruit phenolics, CRC press, Boca Roton. In : les polyphenols en agroalimentaire Sarni-Manchado P, Cheynier V.2006., *Tec et Doc Lavoisier-Paris*.

Macheix J.J, Fleuriet, A, and Jay-Allemand C., (2005). Les composés phénoliques des végétaux. Chapter 2. Biosynthèse et accumulation des composés phénoliques. *Presses polytechniques et universitaires romandes, CH-1015 Lausanne*.

Maisuthisakul, M., M. Suttajit and R. Pongsawatmanit., (2007). Assessment of phenolic content and free radicalscavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*. **(100)**: 1409.1418.

Martin, S., Andriantsitohaina, R., (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium, université Louis-Pasteur, 74, route du Rhin, 67401 Illkirch, France.

Masuda, T., S. Yonemori, Y. Oyama, Y. Takeda, T. Tanaka and T. Andoh., (1999). Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: activity of the leaf extracts from seashore plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **(47)**: 1749-1754.

Maulice., (2010). De l'étiquette à l'assiette : comprendre ce que l'on mange. *Au coeur de la Scienc*.

Menvielle-Bourg, JF., (2005). La superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale. France. *Phytothérapie*: **(3)**: 118-121.

Milane E., (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. *Thèse soutenue en vue d'obtention du grade de docteur de l'université de Louis Pasteur Strasbourg (I)* : 11-268.

N

Nicholls, P. (2012). Classical catalase: Ancient and modern .Department of Biological Sciences, *University of Essex, Colchester Essex CO4 3SQ, UK*.

Notas, G., Koutroubakis, IE., Kouroumalis, EA., (2006). Oxydants and antioxydant in liver disease .In: Antioxydants: New Research, *Editor: Harold V. Panglossi. PP .1 -48 ISBN 1-59454-999-0 Nova science publishers, Inc.*

P

Pascale SM., Véronique C., (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. *Editions TEC&DOC. Lavoisier, Paris, pp2, 9.*

Pastre, J.O.C., (2005). Intérêt de la supplementation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse. P116.*

Paul Arnaud., (1994). Cours de chimie organique. Pp, 312 et 471.

Percival, M., (1998). Antioxydants. *Clinical Nutrition Insights. p. NUT031 1/96 Rev. 10/98.*

Pincemail, J., Bonjean,K ., Cayeux, K., and Defraigne, JO., (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante : Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme, (16) : 233–239.*

Pincemail. J., Defraigne. J.O., (2004). Les antioxydants : un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène. Université de liège, *service de chirurgie cardiovasculaire, probiox SA.Sart Tilman 4000 Liège, Belgique 1: 1*

Q

Quezel P., Santa S., (1963). Nouvelle flore de l'Algerie et des régions désertiques méridionales. *Editions du Centre National de la recherche scientifique. P :35-40.*

R

Ré, DB., Nafia, I., Nicoullon, A., Le Goff, LK., and Had-Aissouni, L., (2005). Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation, (24) : 502–509.*

Ré, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C., (1999). Antioxydant activity applying an improved ABTS Radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medecine. (26): 1231-1237.*

Ribereau-Gayon., (1968). Notions générales sur les composés phénoliques. In «Les composés phénoliques des végétaux ». *Ed Dunod, p. 1-27.*

Roussel, AM., Ferry, M., (2002). Stress oxydant et vieillissement. France. *Nutrition clinique et métabolisme (16) 285–291.*

S

Sorg O., (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendusa Biology, (327): 649-662.*

V

Vamecq, J., Vallée, L., Storme, L., Gelé, P., and Bordet, R., (2004). Les acteurs immédiats du stress oxydatif Key players in oxidative stress. *La Lettre du Pharmacologue*, Volume 18 - n° 1.

W

Wilson. A., Salamatian. L., (2003). Les Radicaux Libres : Une question d'équilibre. Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines. *Dess IST. 37.*

<http://savoir.fr/proprietes-medicinales-du-marrube-blanc-marrubium-vulgare-l>

<http://www.homéopathie.com/traitements/cheiranthus-cheiri.html>.

fr.wikipedia.org/wiki/Paeonia_mascula.

www.surechem.org/index.php?...inula.

Draft Only

Suite à l'extraction des composés phénoliques des feuilles d'*Inula viscosa*, *Marrubium vulgare*, *Paeonia coralina* et *Cheiranthus cheiri*, nous avons constaté que les taux les plus élevés en polyphénols et flavonoïdes sont localisés au niveau des extraits d'*Inula viscosa* et *Paeonia coralina*.

Dans le but de déterminer l'activité anti-radicalaire des extraits des feuilles de ces plantes, deux tests d'activité contre le radical DPPH[·] et le radical ABTS^{·+} ont été réalisés.

Les résultats de l'activité contre DPPH à une concentration de 100µg/ml, ont révélé que les extraits d'*Inula viscosa* et *Paeonia coralina* présentent une meilleure activité avec 89,66 % et 92,02 %, respectivement, qui sont comparable à celle de l'acide gallique et la rutine. Par contre les deux autres extraits présentent une très faible activité.

Une corrélation importante a été observée entre la teneur des extraits en composés phénoliques et l'activité contre le DPPH (0,942 pour les phénols totaux et de 0,972 pour les flavonoïdes), cela indique qu'il existe une relation étroite entre la teneur des extraits en ces composés et leur activité anti-DPPH.

Cependant, l'étude de l'activité anti ABTS^{·+} a révélé que tous les extraits de nos plantes, à l'exception de l'extrait de *Cheiranthus cheiri*, exhibent des activités supérieures dont les meilleures ont été obtenues avec les extraits d'*Inula viscosa*, *Paeonia coralina* et *Marrubium vulgare* avec 99,52%, 99,76%, 98,47%, respectivement, à une concentration de 100µg/ml. Les valeurs IC₅₀ confirment que l'extrait de *Paeonia coralina* exerce un potentiel anti- ABTS^{·+} très important (IC₅₀=5µg/ml) par rapport aux extraits d'*Inula viscosa* et *Marrubium vulgare*, présentant une IC₅₀= 7µg/ml, 28µg/ml, respectivement.

Ces deux activités peuvent être attribuées à la présence des composés phénoliques dans les extraits, en effet l'activité anti- DPPH est en relation étroite avec la teneur des extraits en composés phénols totaux et en flavonoïdes. Alors que, l'activité scavenging du radical ABTS^{·+} est en relation moyenne avec la teneur des extraits en composés phénoliques, ce qui met également en jeu la nature chimique de ces composés.

Au terme de ce travail, on conclut que les extraits d'*Inula viscosa* et *Paeonia coralina* sont capables d'avoir une activité contre le radical DPPH et l'ABTS^{·+}, ce qui confirme leurs effets thérapeutiques, comme elles peuvent être une source d'antioxydants naturels pour l'utilisation médicale. Alors il serait donc intéressant d'approfondir cette étude afin d'isoler les principes actifs, ainsi de réaliser des tests, in vivo, pour vérifier la toxicité de ces plantes.

Annexe 1 :

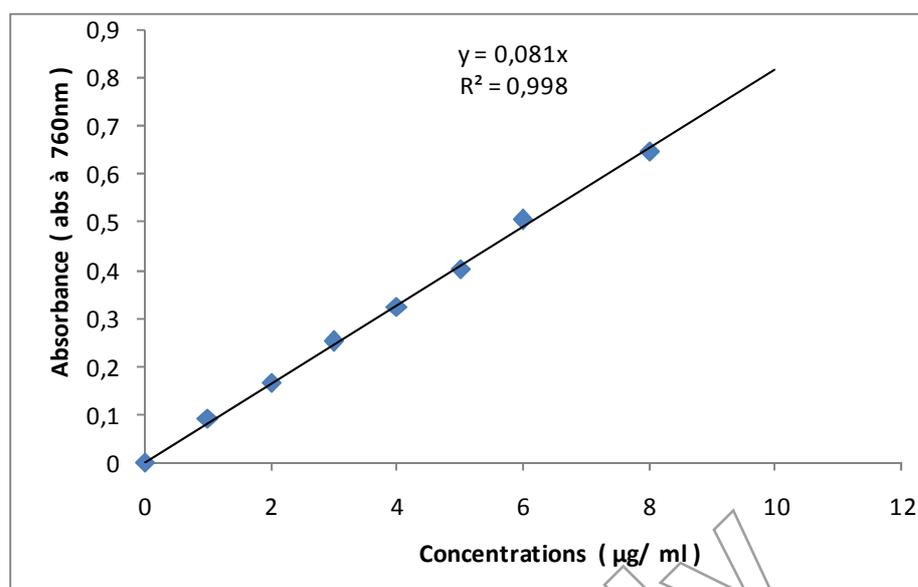


Figure n°1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

Annexe 2 :

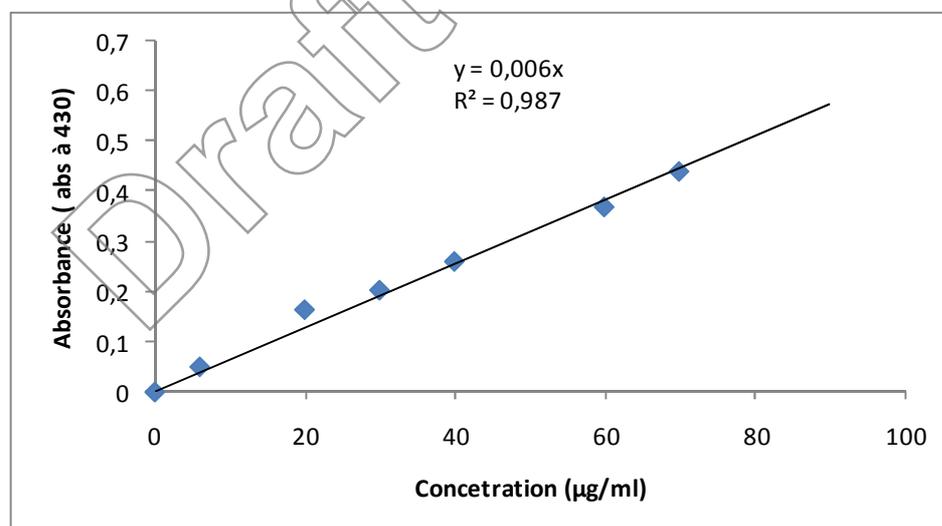


Figure n°2 : Courbe d'étalonnage de la rutin pour le dosage des flavonoïdes.

Résumé

L'utilisation des feuilles d'*Inula viscosa*, *Paeonia coralina*, *Marrubium vulgare* et *Cheiranthus cheiri* dans la médecine traditionnelle est d'une importance majeure en Algérie, d'où l'intérêt de mener une étude sur les composés phénoliques présents dans leur extraits aqueux.

Ce présent travail est basé sur l'extraction des composés phénoliques contenus dans les extraits des feuilles de nos plantes, en utilisant la méthode d'extraction par décoction.

Le dosage des extraits aqueux, ont fait ressortir des taux différents dont les plus riches en phénols totaux et flavonoïdes ont été obtenus avec les extraits d'*Inula viscosa* et *Paeonia coralina* avec 239,75 mg eq AG/g d'extrait et 165,02mg eq AG / g d'extrait pour les phénols totaux et de 102,22mg eq Rut/ g d'extrait et de 129,44mg eq Rut/ g d'extrait pour les flavonoïdes, respectivement.

L'activité anti-radicalaire des extraits a été évaluée par deux tests (test de DPPH et l'ABTS⁺). Les deux extraits d'*Inula viscosa* et *Paeonia coralina* ont présenté une activité anti-radicalaire très importante dont leurs pourcentages sont de 89,66% et de 92,02%, respectivement, à 100µg/ml. Une très bonne corrélation a été enregistrée entre leurs teneurs en composés phénoliques et l'activité contre le radical DPPH, cela indique que ces composés contribuent à cette activité. Les extraits d'*Inula viscosa*, *Paeonia coralina* et *Marrubium vulgare* exhibent une forte activité contre le radical ABTS⁺ avec 99,52%, 99,76% et 98,76% respectivement, à 100µg/ml, dont *Paeonia coralina* présente un potentiel très important contre l'ABTS⁺ par rapport aux autres extraits avec une IC₅₀ de 5µg/ml similaire à celle de l'acide gallique.

Mots clés : *Inula viscosa*, *Paeonia coralina*, *Marrubium vulgare*, *Cheiranthus cheiri*, composés phénoliques, activité anti-radicalaire.

Abstract

The use of the leaves of *Inula viscosa*, *Paeonia coralina*, *Marrubium vulgare* and *Cheiranthus cheiri* in traditional medicine is of an major importance in Algeria, from where interest to undertake a study on the phenolic compounds present in their aqueous extracts.

This present work is based on the extraction of the phenolic compounds contained in the extracts of the leaves of our plants, by using the method of extraction by decoction.

The proportioning of the aqueous extracts, emphasized different rates of which richest in total phenols and flavonoïdes was obtained with the extracts of *Inula viscosa* and *Paeonia coralina* with 239,75 Mg eq AG/g of extract and 165,02mg eq AG/G of extract for total phenols and who are of 102,22mg eq Rut/G of extract and 129,44mg eq Rut/G of extract for the flavonoïdes, respectively.

The anti-ridicalizing activity of the extracts was evaluated by two tests (test of DPPH and the ABTS.+). The two extracts of *Inula viscosa* and *Paeonia coralina* have an important anti-ridicalizing activity against the radical DPPH whose their values are of 89,66% and 92,02%, respectively, with 100µg/ml. A correlation between the content of phenolic compounds and the activity against radical DPPH is important (0,942 for total phenols and of 0,972 for the flavonoïdes) that indicates that these compounds interact against radical DPPH. And the extracts of *Inula viscosa*, *Paeonia coralina* and *Marrubium vulgare* have a very important activity against radical ABTS.+ with 99,52%,99,76% and 98,76% respectively, with 100µg/ml, whose *Paeonia coralina* has a very important potential against the ABTS.+ compared to the other extracts with a IC₅₀ of 5µg/ml.

Key words: *Inula viscosa*, *Paeonia coralina*, *Marrubium vulgare*, *Cheiranthus cheiri*, compounds phenolic, anti-ridicalizing activity.