



Université Mohamed Khider Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : science de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biochimie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :

Amina Oum Elkheir MENANI
Feriel FERCHICHI

Le : 10/10/2020

Thème

**Evaluation des exo-interactions et d'activité
antioxydante d'un remède traditionnel**

Jury :

M.	Bilal BENAMOR	MCB	Université de Biskra	Président
Mme.	Hayat TRABSA	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
M.	Redouan REBAI	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Avant tout, nous remercions dieu tout puissant de nous avoir donné la force, la persistance et nous a permit d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

*Nos vifs remerciements et notre profonde gratitude particulièrement à Mme **TRABSA Hayat** qui nous a encadrées depuis les premiers instants. Sa pédagogie, son dévouement, ses précieux conseils, ses encouragements, sa patience, sa disponibilité et sa gentillesse ont été importants pour nous et largement contribué à l'évolution de cette étude.*

*On remercie profondément Monsieur Bilal **BENAMOR** maître de conférence B au département de Biologie. Université de Biskra pour avoir accepté d'être président du jury de notre mémoire.*

*On remercie également docteur Redouan **REBAI** maître de conférence B au département de Biologie. Université de Biskra pour avoir accepté de juger ce travail.*

*On remercie également Mr **FADLAOUI Haroun**, botaniste dans le centre de Recherche Scientifique et Techniques sur les Régions Aride (**CRSTRA**) pour l'identification des plantes.*

On remercie notre famille pour la collection des différentes plantes.

DEDICACE

Nous avons le grand plaisir de dédier ce mémoire à tous ceux qui nous sont chers :

À nos mères en qui, nous avons toujours vu la source d'affection, de soutien dans les bons et mauvais moments, tendresse et amour dans notre vie.

À nos pères, pour leurs soutiens durant toutes ces années d'études.

*Notre enseignante **Trabsa Hayat** d'être à côté de nous en tous moments, on vous dédie ce travail avec tous nos vœux de bonheur et de santé*

À nos sœurs : Hadil et Omaima

À nos frères : Amine, Mohamed et Bilel

À tous oncles, tante, cousine et cousin

*Notre plus profonde affection à nos chères amies **Wissam** et **Fatima***

À notre fabuleuse équipe de travail pour leurs soutiens et aide

À tous ceux qu'on aime

Amina et Feriel

Table des matières

Liste des Tableaux	I
Liste des Figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction	1
Chapitre 1 : Stress oxydant	
1.1. Définition.....	3
1.2. Radicaux libres.....	3
1.3. Formes des radicaux libres.....	3
1.3.1. Espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	3
1.3.2. Espèces réactives de l'azote (RNS).....	3
1.4. Sources des radicaux libres.....	4
1.4.1. Sources endogène.....	4
1.4.1.1. Mitochondriale.....	4
1.4.1.2. Phagocytose.....	5
1.4.1.3. Xanthine oxydase (XO).....	5
1.4.1.4. Oxyde nitrique synthase (NOS).....	5
1.4.2. Sources exogène.....	5
1.5. Rôle physiologique et pathologique des ROS.....	5
1.6. Antioxydants.....	6
1.6.1. Enzymatiques.....	6
1.6.1.1. Glutathion peroxydase (GPx).....	6
1.6.1.2. Superoxyde dismutase (SOD).....	6
1.6.1.3. Catalase.....	6
1.6.2. Non enzymatiques.....	6
1.6.2.1. Vitamine C (acide ascorbique).....	6
1.6.2.2. Vitamine E (tocophérol).....	6
1.6.2.3. Polyphénols.....	6
Chapitre 2 : Plantes médicinales	
2.1. Généralités sur la phytothérapie.....	7
2.2. Plantes médicinales utilisées.....	7
2.3. Utilisation traditionnelle.....	8
Chapitre 3 : Matériel et méthodes	
3.1. Matériels.....	9

3.1.1. Matériel biologique	9
3.1.2. Matériel chimique	9
3.1.3. Appareillage.....	10
3.2. Méthodes	10
3.2.1. Préparation du remède	10
3.2.2. Préparation des broyats	10
3.2.3. Préparation des extraits bruts par décoction (DP)	10
3.2.4. Préparation de l'extrait brut hydro-alcoolique (EBr-R).....	10
3.2.5. Fractionnement de l'EBr-R par lavage liquide-liquide.....	11
3.3. Dosage des flavonoïdes	12
3.4. Tests d'activité antioxydante	13
3.4.1. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH)	13
3.4.2. Teste d'activité chélatrice (Ferrozine)	13
3.5. Analyse statistique.....	14
Chapitre 4 : Résultats et discussions	
4.1. Rendement d'extraction et de fractionnement.....	15
4.1.1. Rendement d'extraction aqueuse	15
4.1.2. Rendement d'extraction hydro-alcoolique.....	16
4.1.2.1. Rendement du fractionnement de l'EBr-R par lavage liquide-liquide	17
4.3. Dosage des flavonoïdes	17
4.4. Tests d'activité antioxydante	20
4.4.1. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH)	20
4.4.2. Test de chélation des métaux (Ferrozine)	27
Conclusion	34
Références bibliographique	

Liste des Tableaux

Tableau 1. Différents types des espèces réactives.	4
Tableau 2. Classification des plantes médicinales étudiées.	7
Tableau 3. Plantes médicinales utilisées.	9
Tableau 4. Pourcentage de rendement d'extraction aqueuse par décoction (DP).	15
Tableau 5. Rendement des extraits obtenus à partir une décoction de différentes plantes médicinales.	16
Tableau 6. Rendements des fractions issues de lavage liquide-liquide avec différents solvants par rapport au poids d'EBr-R.	17
Tableau 7. Dosage des flavonoïdes des extraits (DP).	19
Tableau 8. Taux des flavonoïdes d'EBr-R et les fractions.	19
Tableau 9. Pourcentages d'inhibition de quelques extraits aqueux des mêmes plantes.	23
Tableau 10. IC ₅₀ d'activité anti-radicalaire <i>vis-à-vis</i> le DPPH des extraits d'autres plantes étudiés.	25

Liste des Figures

Figure 1. Sites de production des ROS au niveau de la chaîne respiratoire (Garait, 2006).	4
Figure 2. Etapes de la préparation d'extrait brut hydro-alcoolique du remède.....	11
Figure 3. Etapes de fractionnement de l'EBr-R par lavage liquide-liquide	12
Figure 4. Courbe d'étalonnage d'interaction de la quercétine avec l'AlCl ₃	18
Figure 5. Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Congo, 2012).	20
Figure 6. Activité anti-radicalaire des extraits aqueux des plantes (P1, P2, P3, P4, P5 et P6)	21
Figure 7. Activité anti-radicalaire des extraits aqueux des plantes (P7, P8, P9 et R)	22
Figure 8. IC ₅₀ du radical DPPH par les extraits aqueux de différentes plantes utilisées avec le remède.	23
Figure 9. Activité anti-radicalaire des deux extraits bruts du remède.....	24
Figure 10. Activité anti-radicalaire des fractions RHx et RCh	25
Figure 11. Activité anti-radicalaire des fractions RAe et RAq	26
Figure 12. IC ₅₀ du radical DPPH par EBr-R et ces fractions	26
Figure 13. Chélation des ions ferreux des extraits aqueux des plants (P1, P2, P3, P4, P5 et P6)	28
Figure 14. Chélation des ions ferreux des extraits aqueux des plantes (P7, P8, P9 et R)	29
Figure 15. Concentration effective qui exprime 50 % de chélation des ions ferreux par les extraits aqueux des différentes plantes utilisées avec le remède.....	30
Figure 16. Chélation des ions ferreux par les fractions d'EBr-R	31
Figure 17. Concentration effective qui exprime 50 % de chélation des ions ferreux par l'extrait d'EBr-R et ses fractions.....	32

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
CAT	Catalase
CQ	Concentration de Quercétine
CRSTRA	Centre de Recherche Scientifique et Techniques sur les Régions Aride
Cu	Cuivre
DO	Densité Optique
DP	Plante Décocté
DPPH	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DR	Remède Décocté
EBr	Extrait Brut
EBr-R	Extrait Brut du Remède
EC₅₀	Concentration Effective qui chélate 50 % de Fe ²⁺
EQ	Equivalent de Quercétine
ERO	Espèces Réactives d'Oxygène
Ext	Extrait
Fe	Fer
FeCl₂	Chlorure du Fer
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
I %	Pourcentage
IC₅₀	Concentration inhibitrice de 50 %
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Oxyde Nitrique Synthase
Nox	NADPH-oxydase
O₂⁻/O₂^{·-}	Anion Superoxyde
OH[·]	Radical hydroxyle
ONOO⁻	Peroxynitrite
P1	<i>Mentha spicata</i>
P2	<i>Quercus ilex</i>
P3	<i>Cistus salviifolius</i>
P4	<i>Eriobotrya japonica</i>

P5	<i>Olea europea</i>
P6	<i>Mentha rotundifolia</i>
P7	<i>Artémisia compestris</i>
P8	<i>Rosmarinus officinalis</i>
P9	<i>Mentha pelegium</i>
R	Remède
RAe	Fraction d'Acétate éthyle
RAq	Fraction Aqueuse
RCh	Fraction Chloroformique
RHx	Fraction Hexanique
ROH	Peroxyde organique
ROOH	Peroxyde organique
RNS	Reactive nitrogene species
ROS	Reactive oxygene species
SOD	Superoxyde dismutase
XO	Xanthine oxydase

Introduction

Introduction

À travers les siècles, différentes pathologies sont devenues la plus grande menace pour la santé humaine notamment les maladies inflammatoires, le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, diabète, vieillissement et les multiples effets indésirables de certains traitements chimiques médicamenteux. Ces maladies sont liées à des changements structurels dans les mitochondries, accompagnés par des altérations des propriétés biophysiques de la membrane, Ces perturbations altèrent l'homéostasie cellulaire et la fonction mitochondriale et augmentent la vulnérabilité au stress oxydatif (Tan *et al.*, 2018).

Le stress oxydatif est généralement considéré comme le point de départ de l'apparition de plusieurs maladies et joue certainement un rôle majeur dans leur développement ainsi que les troubles chroniques et dégénératifs. Des modifications des lipides cellulaires sont signalées, ainsi qu'une dégradation de l'ADN et des protéines ce qui contribue à l'instabilité génomique cellulaire et à la cancérogenèse, grâce à la promotion de la prolifération cellulaire aberrante, de l'apoptose et de la croissance cellulaire incontrôlée (Sahoo *et al.*, 2013).

La médecine traditionnelle dans le monde est révélée par une vaste activité de recherches sur différentes espèces végétales et leurs principes thérapeutiques. L'homme a pu développer l'utilisation des plantes ainsi que les remèdes traditionnels comme source essentielle de médicaments. Aujourd'hui, des principes actifs de ces plantes entrent dans la composition d'une grande partie de médicaments et produits de soins, grâce à leur richesse en métabolites secondaires potentiels. En effet, plusieurs travaux scientifiques sont menés sur les plantes médicinales pour la recherche et la valorisation de nouvelles molécules. Ces dernières représentent les principaux groupes avec diverses bioactivités, notamment des activités antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses (Simioni *et al.*, 2018).

L'extraction et le fractionnement des principes actifs à partir de la matière végétale, notamment le cas des molécules antioxydantes qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêts, sont des étapes très importantes dans l'isolement et l'identification de ces composés, ainsi que la révélation des différentes interactions qui peuvent exister entre les différents constituants d'une plante médicinale. La majorité des recherches scientifiques qui valorise les ressources naturelles (végétale) se base sur une nouvelle stratégie de purification et d'identification des molécules active présente dans une plantes après l'avoir testé, en proposant des nouvelles combinaisons (endo-interaction) synergétiques. Malheureusement, actuellement la recherche

sur les remèdes traditionnels et les combinaisons entre les plants (exo-interaction) est négligée, la négligence des études sur les interactions établies entre les constituants d'un exo-mélange naturel, l'influence de différentes conditions d'extraction et de fractionnement sur les rendements et les activités biologiques orientent ce travail pour valoriser l'effet de ces paramètres.

L'objectif principal de cette étude est d'élucider la comparaison entre les exo-interactions exercé entre neuf plantes médicinale séparées qui appartiennent à les familles des Lamiacées, Fagacées, Cistacées, Rosacées, Oléacées, et Astéracées, et leur combinaison en remède traditionnel. La première étape a été basée sur l'extraction des biomolécules en utilisant deux systèmes : aqueux et hydro-alcoolique, le fractionnement de l'extrait brute hydro-alcoolique de remède à base de méthode lavage liquide-liquide à l'aide des différents solvants à polarité croissante ainsi qu'une séparation par des techniques chromatographiques. La deuxième étape base sur l'évaluation des activités biologiques des extraits et des fractions obtenus par les tests d'activité antioxydante *in vitro* et *in vivo* sur des souris (120 souris male et 60 souris femelle avec des poids entre 25 et 30 g), qui ont été déjà adapté pendant 15 jours et l'activité antimicrobienne. Mais à cause de l'apparition de la pandémie « Covid-19 » en Algérie, les travaux pratiques de cette étude s'est arrêté le 12/03/2020. La partie réalisée c'est les extractions dans les deux systèmes, fractionnement de l'extrait brute hydro-alcoolique par lavage liquide-liquide, ensuite l'impact de ces méthodes sur la concentration des flavonoïdes et sur l'activité antioxydante des extraits de neuf plantes médicinales et le remède au moyen de deux méthodes : celle d'activité anti-radicalaire (DPPH) et la méthode de chélation des métaux (Ferrozine).

Partie bibliographique
Chapitre 1 :
Stress oxydant

Chapitre 1 : Stress oxydant

1.1. Définition

Un stress oxydant se définit comme l'incapacité de l'organisme de se défendre contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) en raison de la perturbation d'équilibre endogène entre ces derniers et les agents oxydants (AO). Ce déséquilibre conduit potentiellement à des dégâts structuraux et fonctionnels (Bensakhria, 2018).

1.2. Radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules ou atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe. Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique (Koechlin, 2006).

1.3. Formes des radicaux libres

Dans la cellule, les espèces radicalaires se forme naturellement, et joue un rôle particulier en physiologie, c'est les radicaux primaires qui sont transformés par certaines réactions sur les composés biochimiques cellulaires en radicaux secondaires. Mais il y a d'autre classification qui se base sur les types des radicaux (Tableau 1) qui sont divisés en deux groupes principales : des radicaux dérivé de l'oxygène (Reactive oxygen species : ROS) et des radicaux dérivé d'autres atomes comme l'azote (Reactive nitrogene species : RNS) (Yan, 2014).

1.3.1. Espèces réactives de l'oxygène (ROS)

L'oxygène joue un rôle essentiel dans l'évolution des formes vivantes en aérobiose. Cet oxygène permet aux mitochondries d'arracher des électrons à la matière organique pour fabriquer de l'énergie. Cependant, ce même oxygène peut devenir un poison parce qu'il est à l'origine des molécules extrêmement agressives, toxiques pour l'organisme, sont les ROS, mais ces molécules jouent un double rôle dans la physiologie des organismes, se comportant d'une part, comme des acteurs des voies de signalisation cellulaire, et d'autre part, comme des produits toxiques s'accumulant sous conditions de stress (Mittler, 2017).

1.3.2. Espèces réactives de l'azote (RNS)

L'oxyde nitrique, un RNS, produit à partir de la L-arginine, de l'oxygène et du NADPH par trois principales isoformes de l'oxyde nitrique synthase (NOS) (Adams *et al.*, 2015).

L'oxyde nitrique, identifié tôt comme une molécule de signalisation dans la modulation des vaisseaux sanguins et maintenant connu comme un régulateur d'importants processus physiologiques, peut médier la toxicité cellulaire endommageant les enzymes métaboliques et générant par réaction avec le superoxyde, le peroxyde nitrite (Di Meo *et al.*, 2016).

Tableau 1. Différents types des espèces réactives (Di Meo *et al.*, 2016).

Espèces radicalaires		Espèces non radicalaires	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Superoxyde	$O_2^{\cdot -}$	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radicale hydroxyle	OH^{\cdot}	Acide hypochloreux	$HOCl$
Monoxyde d'azote	NO	Peroxyde nitrite	HNO_3^-
Dioxyde d'azote	NO_2	Peroxyde organique	$ROOH$

1.4. Sources des radicaux libres

Les êtres humains sont constamment exposés aux radicaux libres. En effet, les sources des radicaux libres sont variées : la pollution atmosphérique, le rayonnement UV, les radiations ionisantes, le métabolisme cellulaire (activité mitochondriale, réactions enzymatiques), l'inflammation et les métaux toxiques (Thorin *et al.*, 2010).

1.4.1. Sources endogène

1.4.1.1. Mitochondriale

De nombreuses études suggèrent que la mitochondrie est la source principale des ROS endogènes. Environ 80 % de l'oxygène respiré subit une réduction tétravalente (Figure 1), soit l'ajout de 4 électrons qui conduit à la production d'eau (Widlansky et Gutterman, 2011).

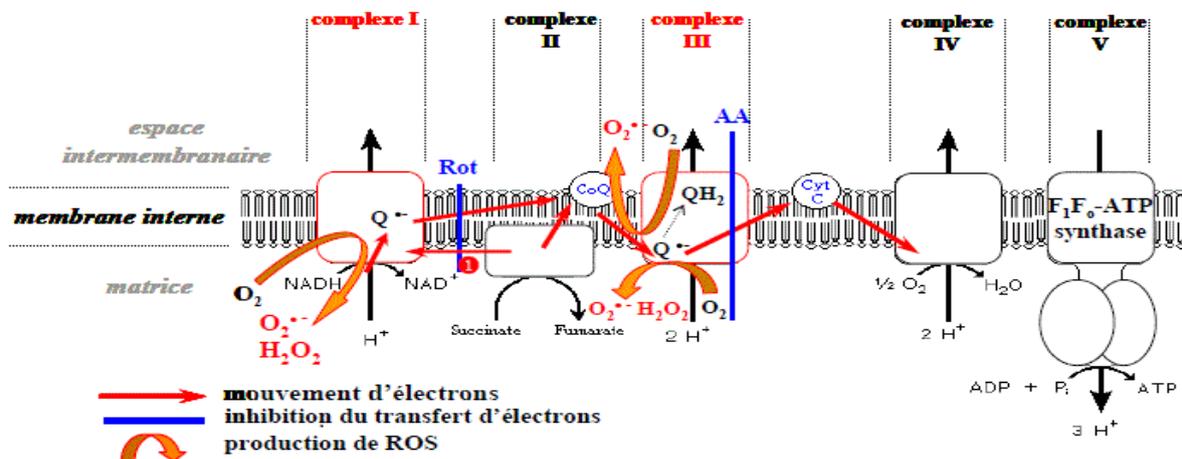


Figure 1. Sites de production des ROS au niveau de la chaîne respiratoire (Garait, 2006).

1.4.1.2. Phagocytose

C'est un processus cellulaire qui permet l'ingestion et l'élimination des particules étrangères, Celui-ci se fait par certains leucocytes et en particulier les macrophages. La NADPH-oxydase (Nox) est composée de différentes sous-unités cytosoliques et membranaires qui s'assemblent à la membrane du phagosome. L'activation du système enzymatique de la Nox dans l'explosion oxydative entraîne la production des formes réactives de l'oxygène (Guillouty, 2016).

1.4.1.3. Xanthine oxydase (XO)

Est une enzyme qui utilise l'oxygène moléculaire comme un accepteur d'électrons en produisant l' $O_2^{\cdot-}$ au cours de l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et xanthine en acide urique (O'Mahony *et al.*, 2013).

1.4.1.4. Oxyde nitrique synthase (NOS)

Est un générateur important du l'oxyde Nitrique (NO), à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages. Le NO permet la production des autres RNS tel que le peroxydrite $ONOO^-$ (De Marco, 2013).

1.4.2. Sources exogène

Les êtres vivants sont exposés à des polluants (fumée de tabac, alcool), rayons ultraviolets, les métaux tels que le fer (Fe), cuivre (Cu) et différentes expositions aux pesticide et herbicides (Guillouty, 2016).

1.5. Rôle physiologique et pathologique des ROS

Dans les conditions optimales les ROS jouent un rôle indispensable dans la transmission du signal. Des messagers extracellulaires (messagers humoraux ou premiers messagers) déclenchent un signal par action sur un récepteur transmembranaire qui, en changeant de structure, initiera un signal qui va se propager dans la cellule jusqu'aux sites effecteurs (seconds messagers). Grâce à ces mécanismes, une bonne coordination s'établit dans le comportement des cellules constitutives d'un tissu. Les mitochondries sont souvent impliquées dans ces processus, notamment l'apoptose, et utilisent les ROS comme étapes normales. Si la balance redox de la cellule est affectée par une élévation trop marquée des ROS, des dommages peuvent être causés aux structures biologiques par ces agents oxydants. Des concentrations anormales de ROS dans les mitochondries peuvent amorcer l'apoptose, via l'ouverture du mégapore, libérant le cytochrome c dans le cytosol. Le déséquilibre de la

balance antioxydants/oxydants en faveur de ces derniers a été impliqué dans le vieillissement et dans diverses maladies dégénératives (Di Meo *et al.*, 2016).

1.6. Antioxydants

1.6.1. Enzymatiques

1.6.1.1. Glutathion peroxydase (GPx)

La Glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme présente dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries. Elle assure la transformation des hydroperoxydes organiques, lipidiques notamment, de type ROOH en ROH (Belkhiri, 2010).

1.6.1.2. Superoxyde dismutase (SOD)

Est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation du superoxyde (O_2^-) en oxygène et peroxyde d'hydrogène (Zerargui, 2015).

1.6.1.3. Catalase

La catalase (CAT) est une enzyme qui catalyse la décomposition du H_2O_2 en H_2O et O_2 , elle se trouve dans les hématies et dans les peroxysomes de nombreux tissus et cellules (Tokarz et Kaarniranta, 2013).

1.6.2. Non enzymatiques

1.6.2.1. Vitamine C (acide ascorbique)

La vitamine C, acide L-ascorbique, est un composé organique hydrosoluble, actifs à faible dose dans l'organisme et participent au maintien de l'équilibre vital. La vitamine C est connue pour son pouvoir antioxydant contre les radicaux libre (Schwartz, 2016).

1.6.2.2. Vitamine E (tocophérol)

C'est un antioxydant liposoluble trouvé principalement sur les membranes cellulaires. Il est donc impliqués dans la réduction de la peroxydation lipidique (Guillouty, 2016).

1.6.2.3. Polyphénols

Les polyphénols constituent le groupe de métabolites le plus large, les flavonoïdes comme la classe la plus active, les tannins, les esters d'hydroxycinnamates et les lignines. En effet, les antioxydants phénoliques interfèrent dans l'oxydation des lipides et d'autres molécules par le transfert rapide d'un atome d'hydrogène aux radicaux (Saffidine, 2015).

Chapitre 2 :

Plantes médicinales

Chapitre 2 : Plantes médicinales

2.1. Généralités sur la phytothérapie

Depuis siècles, les plantes médicinales représentent une source importante pour la découverte des médicaments (Cheriti *et al.*, 2005). L'expression «phytothérapie» se rapporte aux pratiques et méthodes qui impliquent l'usage de plantes, séparément ou en association, pour se soigner et prévenir des maladies (Chevallier, 1997).

2.2. Plantes médicinales utilisées

Un remède constitué de 9 plantes médicinales (Tableau 2) à été utilisé pour étudier l'activité antioxydante des extraits issues des plantes ainsi que leur combinaison en remède.

Tableau 2. Classification des plantes médicinales étudiées (Quezel et Santa, 1963).

Non commun	Nom scientifique	Aspect morphologique	Classification
Menth verte	<i>Mentha spicata</i>		Règne : Plantae Classe : Magnoliopsida Ordre : Lamiales Famille : Lamiaceae Genre : Mentha Espèce : <i>Mentha spicata</i>
Chêne vert	<i>Quercus ilex</i>		Règne : Plantae Classe : Magnoliopsida Ordre : Fagales Famille : Fagaceae Genre : Quercus Espèce : <i>Quercus ilex</i>
Ciste	<i>Cistus salviifolius</i>		Règne : Plantae Classe : Magnoliopsida Ordre : Violales Famille : Cistaceae Genre : Cistus Espèce : <i>Cistus salviifolius</i>
Bibacier	<i>Eriobotrya japonica</i>		Règne : Plantae Classe : Magnoliopsida Ordre : Rosales Famille : Rosaceae Genre : Eriobotrya Espèce : <i>Eriobotrya japonica</i>

olivier	<i>Olea europea</i>		Règne : Plantae Classe : Equisetopsida Ordre : Lamiales Famille : Oleaceae Genre : Olea Espèce : <i>Olea europea</i>
Menth à feuille ronde	<i>Mentha rotundifolia</i>		Règne : Plantae Classe : Magnoliopsida Ordre : Lamiales Famille : Lamiaceae Genre : Mentha Espèce : <i>Mentha rotundifolia</i>
Armoise des champs	<i>Artémisia compestris</i>		Règne : Plantae Classe : Magnoliopsida Ordre : Asterales Famille : Asteraceae Genre : Artemisia Espèce : <i>Artemisia campestris</i>
Romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>		Règne : Plantae Classe : Magnoliopsida Ordre : Lamiales Famille : Lamiaceae Genre : Rosmarinus Espèce : <i>Rosmarinus officinalis</i>
Pouliot	<i>Mentha pelegium</i>		Règne : Plantae Classe : Magnoliopsida Ordre : Lamiales Famille : Lamiaceae Genre : Mentha Espèce : <i>Mentha pelegium</i>

2.3. Utilisation traditionnelle

Les parties de plantes les plus utilisés sont les grains, les fruits, les fleurs, les feuilles, les tiges, et les écorces. La forme la plus courante du remède phytothérapeute est l'infusion. Les herboristes préparent aussi des suppositoires, des inhalations, des lotions, des comprimés et des préparations liquides. De nombreuses affections peuvent être traitées notamment le rhum, la grippe, l'insomnie, les nausées, vomissement et encore d'autres maladies (Boughendjioua, 2001).

Partie expérimentale

Chapitre 3 :

Matériel et méthodes

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

3.1. Matériels

3.1.1. Matériel biologique

La récolte de la partie aérienne (feuilles) des différentes plantes constituant le remède (Tableau 3) a été effectuée entre les mois de Juillet et Août 2019 aux différentes régions : Ichemoul (Arris wilaya de Batna), Mdoukel (Barika wilaya de Batna), Oued El Taga (wilaya de Batna) et Douwsen (wilaya de Biskra). Les vouchers des parties aériennes ont été préparés et stockés dans un milieu sec à l'abri de la lumière puis ils ont été identifiés par le botaniste Mr. Fadlaoui Haroun au Centre de Recherche Scientifique et Techniques sur les Régions Arides (CRSTRA).

Tableau 3. Plantes médicinales utilisées.

Nom commun	Régions	Nom scientifique	Code
Menth verte	Ichemoul	<i>Mentha spicata</i>	P1
Chêne	Ichemoul	<i>Quercus ilex</i>	P2
ciste	Ichemoul	<i>Cistus salviifolius</i>	P3
Bibacier	Mdoukel	<i>Eriobotrya japonica</i>	P4
olivier	Douwsen	<i>Olea europea</i>	P5
Menth à feuille ronde	Oued El Taga	<i>Mentha rotundifolia</i>	P6
Aurône	Ichemoul	<i>Artémisia compestris</i>	P7
Romarin	Ichemoul	<i>Rosmarinus officinalis</i>	P8
Pouliot	Oued El Taga	<i>Mentha pelegium</i>	P9
Remède	/	/	R

3.1.2. Matériel chimique

Les produits utilisés pour la réalisation de ce travail : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Ferrozine, Acétate d'éthyle, éthanol, hexane, quercitrine, obtenues de (SIGMA-ALDRICH). Chloroforme (LOBA CHEMIE), méthanol (EMSURE), chlorure du fer (FeCl₂) de (AnalaR NORMAPUR) et chlorure d'aluminium (AlCl₃) de (BIOCHEM).

3.1.3. Appareillage

Balance numérique (SCOUT SE-OHAUS), rotavapeur (HEIDOLPH), balance analytique (KERN-ABJ), spectrophotomètre UV-Visible (UV-2005 J.P.SELECTA), plaque chauffante (ISOLAB), vortex (Velp Scientifica).

3.2. Méthodes

3.2.1. Préparation du remède

La préparation de remède a été effectuée par le mélange de quantités égales de chaque plante collectée, ce mélange a été codé comme R et stocké dans un endroit sec et sombre.

3.2.2. Préparation des broyats

Les feuilles des plantes et de remède ont été nettoyées et séchées à température ambiante et à l'abri de la lumière, ensuite elles ont été broyées à l'aide d'un hachoir pour obtenir leurs broyats. Les broyats ont été codés et stockés dans un endroit sec et sombre.

3.2.3. Préparation des extraits bruts par décoction (DP)

Le broyat de chaque plante et de remède (10 g) a été introduit dans 150 ml d'eau distillée bouillante et portée à l'ébullition pendant deux minutes (Tamert et Latreche, 2016), deux répétitions pour chaque décoction ont été réalisées. Ensuite, ces derniers ont été laissés refroidir pendant 15 min, le mélange a été filtré à l'aide d'un papier filtre. Les filtrats obtenus ont été mis à l'évaporation à 55 °C pour éliminer le maximum d'eau, puis ils ont été séchés à 45 °C pendant 48 h et après conservés à 4 °C jusqu'à leur utilisation. Les extraits obtenus ont été codés de DP1 jusqu'à DP9 et DR pour les plantes de P1 jusqu'à P9 et le remède respectivement.

3.2.4. Préparation de l'extrait brut hydro-alcoolique (EBr-R)

Le broyat du remède (10 g) a été macéré avec 150 ml d'éthanol/eau (80/20 % respectivement). Le mélange a été laissé macérer pendant 24 h sous agitation à 4 °C. Ensuite, le mélange a été filtré à l'aide d'un papier filtre. Le filtrat obtenu a été conservé à 4 °C tandis que le précipité a été soumis à une deuxième extraction avec 150 ml d'éthanol/eau (50/50 %, respectivement). Le deuxième filtrat a été mélangé avec le premier et le deuxième précipité a été jeté. Le filtrat obtenu a été mis à l'évaporation à 40 °C pour éliminer le maximum du solvant. L'extrait obtenu pour le remède est considéré comme étant l'extrait brut hydro-

alcoolique (EBr-R) (Figure 2). Un volume de ce dernier a été séché et conservé à 4 °C et le reste a subi un fractionnement avec différents solvants (Andersen et Markham, 2005).

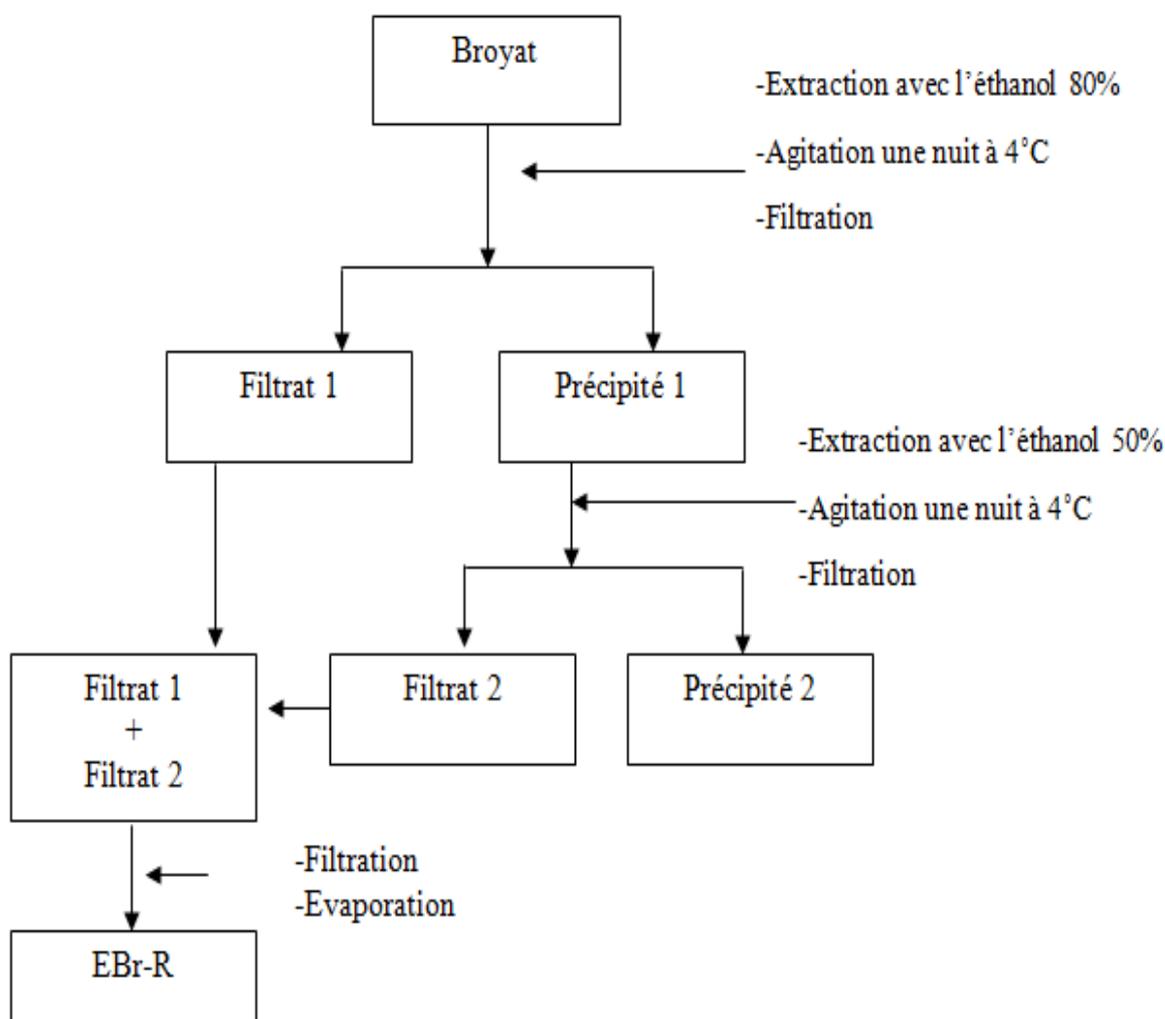


Figure 2. Etapes de la préparation d'extrait brut hydro-alcoolique du remède. (EBr-R) : extrait brut hydro-alcoolique du remède.

3.2.5. Fractionnement de l'EBr-R par lavage liquide-liquide

L'EBr-R a été initialement mélangée avec l'hexane, dans une ampoule à décanté, le mélange a été laissé décanter, et la phase organique a été récupérée. L'extraction est refaite plusieurs fois jusqu'à ce que le solvant (hexane) devienne transparent. L'hexane est par la suite évaporé et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction de l'hexane (RHx). La phase aqueuse résiduelle est soumise à une autre extraction par le chloroforme, et enfin par l'acétate d'éthyle en suivant les mêmes étapes que la première extraction par l'hexane. Quatre fractions sont obtenues : la fraction d'hexane (RHx), la fraction du chloroforme (RCh), la fraction de l'acétate d'éthyle (RAe) et la fraction aqueuse (RAq) résiduelle (Figure 3). Les

quatre fractions ont été évaporé à 40 °C, séchées à 45 °C et conservées à 4 °C jusqu'à leur utilisation (Trabsa, 2015).

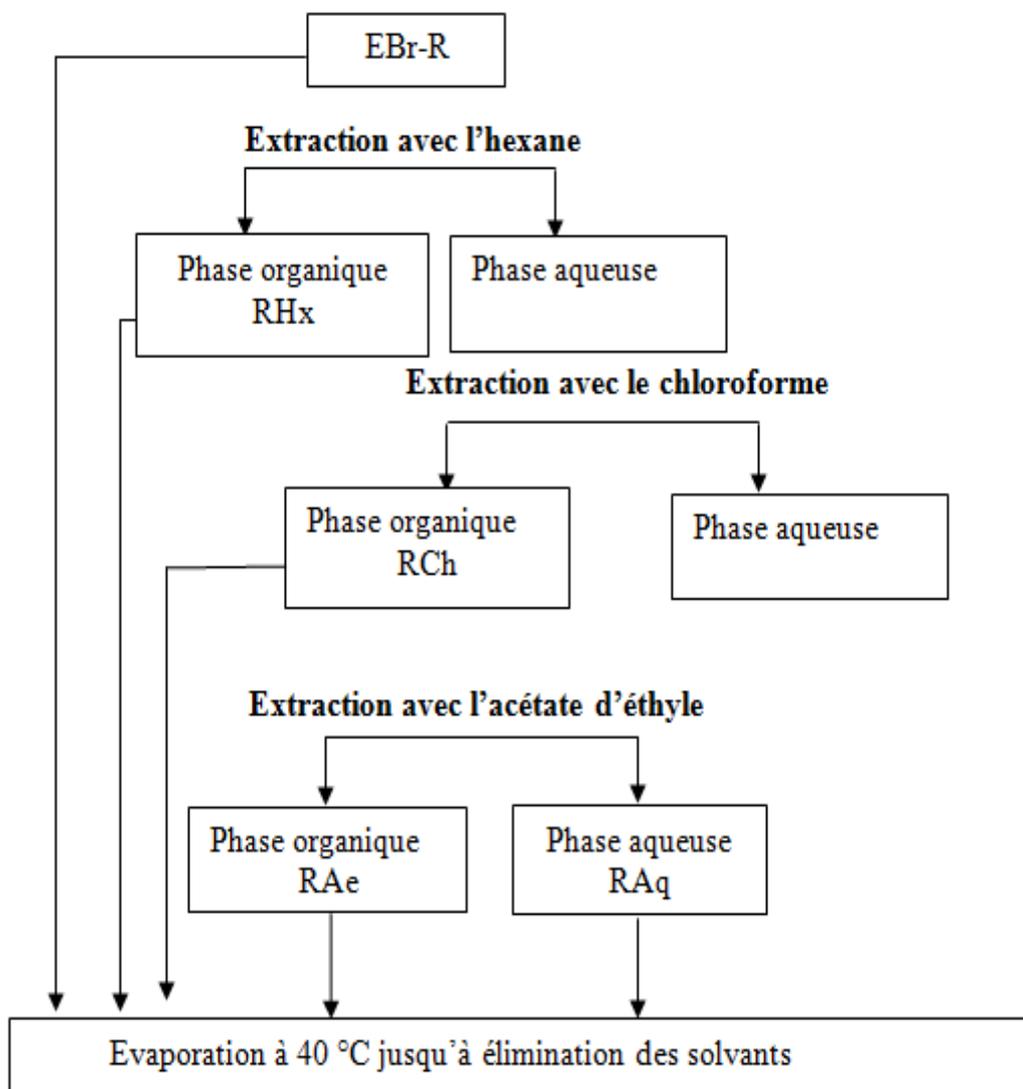


Figure 3. Etapes de fractionnement de l'EBr-R par lavage liquide-liquide. (RHx) : fraction d'hexane, (RCh) : fraction du chloroforme, (RAe) : fraction de l'acétate d'éthyle et (RAq) : fraction aqueuse résiduelle.

3.3. Dosage des flavonoïdes

La détermination de la teneur en flavonoïdes de tous les extraits est effectuée par la méthode colorimétrique décrite par Arvouet *et al.* (1994). Brièvement, 1V de chaque extrait avec des dilutions convenables est ajouté à 1V d'AlCl₃ (2 % dans l'éthanol). Après 10 minutes d'incubation à température ambiante en obscurité. L'absorbance est lue à 430 nm.

La concentration des flavonoïdes a été déduite à partir de la gamme d'étalonnage effectuée par quercétine à différentes concentrations de 1 à 50 µg/ml, dans les mêmes

conditions et les mêmes étapes du dosage. Les résultats sont ainsi exprimés en microgramme d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg}$).

3.4. Tests d'activité antioxydante

3.4.1. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH)

Le test d'activité anti-radicalaire est une méthode simple et la plus utilisée pour tester l'activité antioxydante dans différents extraits des plantes. Dans ce test, l'effet piègeur de radical DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) est suivi spectrophotométriquement à une longueur d'onde 517 nm par la décoloration de radical DPPH de couleur violet au couleur jaune donc une diminution dans l'absorbance en présence d'un antioxydant. Pour évaluer l'activité antioxydante des extraits des plantes, des gammes de concentration ont été réalisées pour tous les extraits. Ensuite 50 μl de chaque teste été incubé avec 950 μl de solution méthanolique de DPPH à 0.004 % pendant 30 min. Après l'incubation, une lecture au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 517 nm a été faite. Le pourcentage d'inhibition (% I) du radical DPPH par les extraits a été calculé comme suit :

$$\% I = [(AC - AE) / AC] \times 100$$

AC : absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif).

AE : absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon).

La concentration inhibitrice (IC_{50}) qui réduit 50 % du radical DPPH a été calculée.

3.4.2. Teste d'activité chélatrice (Ferrozine)

La capacité chélatrice des extraits est mesurée en suivant l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferrozine après incubation des échantillons, à différents concentrations, avec le fer divalent selon la méthode de Decker et Welch (1990).

Les solutions d'échantillons (300 μl) sont initialement mélangées avec un volume de FeCl_2 (0.6 mM dans l'eau distillée) et 540 μl d'éthanol. Après 5 min, un volume de ferrozine (5 mM dans l'eau distillée) est additionné aux milieux réactionnel, le mélange est bien agité puis laissé pour réagir pendant 10 min à température ambiante permettant ainsi la formation de complexe avec une couleur violet (Fe(II)-Ferrozine) ayant un maximum d'absorption à 562 nm. Par ailleurs, le contrôle négatif contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester. L'effet séquestrant des échantillons vis-à-vis du fer est exprimé en pourcentage de chélation selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Chélation} = [(AC - AE) / AC] \times 100$$

AE : absorbance en présence de l'extrait

AC : absorbance en absence de l'extrait

La concentration effective (EC₅₀) qui chélate 50 % de Fe²⁺ a été calculée.

3.5. Analyse statistique

Les valeurs ont été en général exprimées en moyenne \pm SD. Les résultats des différents tests ont été analysés par ANOVA univariée, suivie par le test de Tukey's pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées statistiquement significatives. La comparaison effectuée des moyennes a été déterminée grâce au logiciel « Graphpad Prism » version 8.0.

Chapitre 4 :

Résultats et discussion

Chapitre 4 : Résultats et discussions

4.1. Rendement d'extraction et de fractionnement

4.1.1. Rendement d'extraction aqueuse

Une extraction aqueuse par décoction a été effectuée pour toutes les plantes et le remède. En effet, les molécules récupérées sont des molécules hydrosolubles comprends des polyphénols et flavonoïdes, Par ailleurs, l'extrait aqueux ne renferme pas uniquement des polyphénols et des flavonoïdes, il contient également d'autres substances naturelles, ces substances peuvent être des tanins, des saponines ou carbohydrates (Békro *et al.*, 2007). Les calculs effectués des rendements sont exprimés en pourcentage de rendement par rapport au poids total de la poudre végétale et en gramme d'extrait par un kilogramme de la poudre sec de la plante (Tableau 4).

Tableau 4. Pourcentage de rendement d'extraction aqueuse par décoction (DP).

Plante	% Rendements/Poids totale	Rendement g/Kg
DP1	23.6 ± 0.01	236 ± 1.41
DP2	9.55 ± 0.03	95.5 ± 3.53
DP3	6.40 ± 0.02	64 ± 2.82
DP4	13.95 ± 0.02	139.5 ± 2.12
DP5	14.95 ± 0.16	149.5 ± 16.26
DP6	14.95 ± 0.20	149.5 ± 20.50
DP7	16.7 ± 0.08	167 ± 8.48
DP8	9.35 ± 0.02	93.5 ± 2.12
DP9	18.25 ± 0.12	182.5 ± 12.02
DR	14.2 ± 0.22	142 ± 22.62

Les résultats présentés dans le tableau montrent que les rendements des extraits varient considérablement d'une plante à une autre, les pourcentages des rendements sont compris entre 6.40 ± 0.02 % et 23.6 ± 0.01 %. Le rendement le plus élevé a été obtenu par la plante *Mentha spicata* (P1), tandis que le rendement de la plante *Cistus salviifolius* (P3) est le plus faible.

Une comparaison entre les extraits montre que les plantes P5 et P6 présentent presque le même rendement, d'autre part, les plantes P8 et P2 donnent un rendement proche avec 0.2 % de différence. Ainsi que, la comparaison entre les plantes P1, P6 et P9 a indiqué que le rendement de la P6 est inférieur à celle de la P9 et celui-ci exprime un rendement inférieur à

celui de la P1. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus à partir d'autres espèces différentes que les plantes étudiées (Tableau 5).

Tableau 5. Rendement des extraits obtenus à partir une décoction de différentes plantes médicinales.

Plante	Rendement de décoction %	Référence
<i>Satureja calamintha</i>	6,99	
<i>Origanum vulgare</i>	4,55	(Tamert et Latreche, 2016)
<i>Thymus serpyllum</i>	12,21	
<i>Euphorbia helioscopia</i>	24.2	(Bourgou <i>et al.</i> , 2016)

La comparaison entre les pourcentages de rendements entre les espèces utilisées et les espèces indiquées dans le tableau 5 montre que toutes les espèces utilisées enregistrent un rendement supérieur à celui d'*Origanum vulgare* et inférieure à celui d'*Euphorbia helioscopia*, en plus les deux plantes P2 et P8 exprime des rendements inférieurs à celui de *Thymus serpyllum* et la P3 a un rendement proche de *Satureja calamintha*. Etant donné que toutes les plantes de P1 à P9 et remède avec les plantes ont soumis les mêmes conditions d'extraction, donc cette différence des résultats est traduits par l'influence significative de l'espèce sur le rendement d'extraction même si les plantes sont du même genre ou famille. Aussi, elle due à la richesse de chaque plantes en molécules hydrosolubles, ainsi qu'elle peut être également due au d'autres facteurs tels que la durée de séchage, granulométrie du broyat, la température et la durée d'extraction (Yaya et Sorho, 2017).

La comparaison entre le rendement pratique de remède (14.2 %) et le rendement théorique (calculé à partir des rendements pratiques individuels des plantes) de remède (14.1 %) ne montre aucune différence significative, mais ce résultat ne confirme pas que l'exo-extraction réalisé a été assuré le partage de tous les biomolécules des différentes plantes homogènement.

4.1.2. Rendement d'extraction hydro-alcoolique

Une extraction à été effectuée par macération hydro-alcoolique (éthanol-eau) de la poudre de R, le partage des molécules entre les deux phases est basé sur le degré de solubilité de chaque molécule. Cette extraction peut récupérer et des molécules hydrosolubles et des molécules qui ont une polarité identique ou inférieur à celle d'éthanol (polarité 5.2). Ces molécules sont généralement des flavonoïdes, des stérols, de tri-terpènes, coumarines et des tannins (Belattar, 2020). Le calcul du pourcentage de rendement par rapport au poids total de

remède sec montre que l'EBr-R présente un rendement de 20.02 ± 0.37 %. La comparaison de ce dernier avec le rendement de l'extrait aqueux a révélé que l'EBr-R présente le rendement le plus élevé que le DR à cause de sa capacité à récupérer des molécules hydrosolubles et des molécules soluble dans l'éthanol. Ces résultats expliquent également la variation du rendement en fonction des systèmes d'extractions (décoction ou hydro-alcoolique).

4.1.2.1. Rendement du fractionnement de l'EBr-R par lavage liquide-liquide

La comparaison entre les résultats des rendements obtenus (Tableau 6) par apport au poids d'EBr-R montre que l'extrait RAq présente le rendement le plus élevé suivi par l'extrait RAe puis le RHx et enfin le RCh qui a le rendement le plus faible. D'après ces résultats, on constate que l'EBr-R est riche en molécules polaires (fraction aqueuse). Selon Trabsa (2015), la fraction aqueuse contient des flavonoïdes hautement polaires di, tri et tetra-flavonoïdes glycosylés. Des flavonoïdes glycosylés principalement mono, di et tri glycosylés de polarité moyenne dans la fraction RAe. Des flavonoïdes aglycones dans la fraction RCh et la partie des graisses et de flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés dans la fraction RHx.

Tableau 6. Rendements des fractions issues de lavage liquide-liquide avec différents solvants par rapport au poids d'EBr-R.

Fractions	% Rendement/poids d'EBr-R
RHx	8.03 ± 1.26
RCh	4.73 ± 2.48
RAe	16.09 ± 6.62
RAq	46.88 ± 8.07

4.3. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent la plus vaste classe de composés phénoliques. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Structuralement, ils se répartissent en plusieurs classes variées de molécules. En plus les flavonoïdes sont caractérisés par un large spectre d'activités biologiques et pharmacologiques multiple (les activités antimicrobiennes, cytotoxiques, anti-inflammatoires et anti tumorales), mais l'activité la mieux décrite presque tous les groupes des flavonoïdes est leur capacité à agir comme des antioxydants puissants qui peuvent protéger le corps humain des radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène (Hama Hamadou *et al.*, 2018).

L'estimation quantitative des flavonoïdes dans tous les extraits et les fractions a été réalisé selon la méthode du trichlorure d'aluminium, la quercétine a été utilisée comme étalon. Le principe de cette méthode colorimétrique est basé sur la capacité d' AlCl_3 à former un

complexe jaune avec les molécules flavonoïdiques. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde 430 nm. La teneur en flavonoïdes a été déterminé à l'aide d'une courbe standard des absorbances en fonction de la concentration en quercétine $DO = f(CQ)$, et exprimé en microgramme équivalent de la quercétine par un milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ}/\text{mg Ext}$) (Figure 4).

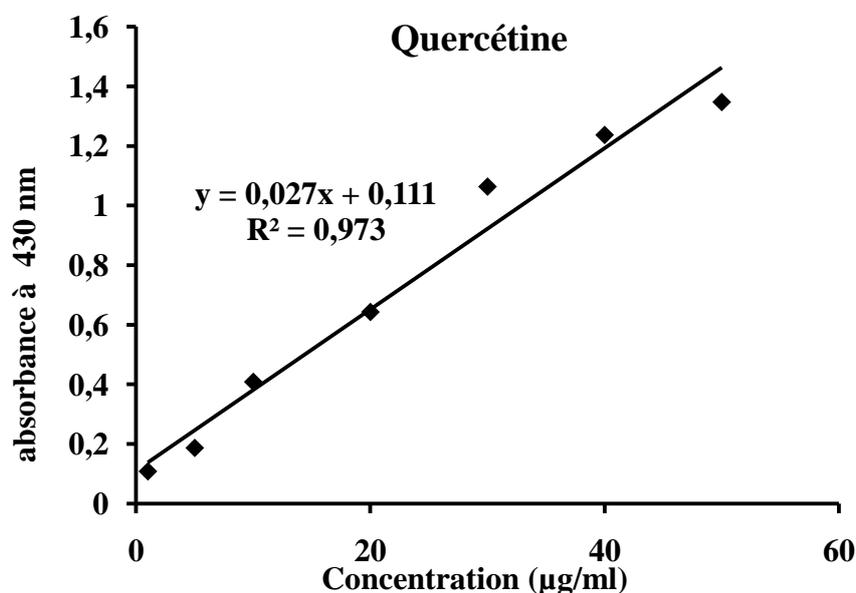


Figure 4. Courbe d'étalonnage d'interaction de la quercétine avec l' AlCl_3 . Chaque point des deux courbes représente la moyenne \pm SD ($n = 3$).

Les résultats de dosages des flavonoïdes pour tous les extraits aqueux qui sont présentés dans le tableau 7 montrent une variation remarquable entre ces différents extraits, s'est prouvé être dans l'ordre décroissant suivant : DP3, DP6, DP7, DR, DP1, DP8, DP5, DP2, DP9, DP4.

L'extrait DP3 présente la teneur la plus importante en flavonoïdes, ainsi, DP2, DP5 et DP8 représente presque la même dose en molécules flavonoïdiques, et enfin la teneur la plus faible revient au DP4 de l'*Eriobotrya japonica*. Cependant, la teneur en flavonoïdes de la DP3 et DP6 seules est 2.3 et 1.3 fois plus élevée que celle de DR. Cela peut être dû soit à cause d'une interaction de compétition. Soit au cours d'extraction il n'y avait pas la récupération de toutes les molécules de nature flavonoïdiques. Donc, la méthode d'extraction, l'utilisation des plantes seuls ou en remède influence sur la teneur des flavonoïdes.

Autre comparaison montre que la quantité des flavonoïdes présents dans la DP3 est supérieure à celle de la *Globulaire alypum* ($10.58 \mu\text{g EQ}/\text{mg Ext}$), et *Cistus salviifolius* ($4.85 \mu\text{g EQ}/\text{mg Ext}$). Mais inférieure à celle trouvée dans l'extrait méthanoïque de *Cistus salviifolius* ($14.13 \mu\text{g EQ}/\text{mg Ext}$) (Kada, 2018).

Tableau 7. Dosage des flavonoïdes des extraits (DP).

Extrait	Taux des flavonoïdes ($\mu\text{g EQ/mg Ext}$)
DP1	$4,642 \pm 0.018$
DP2	$3,399 \pm 0.022$
DP3	$11,189 \pm 0.027$
DP4	$2,465 \pm 0.027$
DP5	$3,663 \pm 0.042$
DP6	$6,402 \pm 0.005$
DP7	$4,987 \pm 0.031$
DP8	$3,909 \pm 0.023$
DP9	$3,381 \pm 0.013$
DR	$4,831 \pm 0.105$

Les résultats de fractionnement d'EBr-R présentés dans le tableau 8 ci dessous montrent que les concentrations des flavonoïdes varient entre $0.09 \pm 0.001 \mu\text{g EQ/mg Ext}$ et $1 \pm 0.001 \mu\text{g EQ/mg Ext}$. D'après les données du tableau, l'ordre décroissant des teneurs en flavonoïdes pour les fractions est comme suit : RHx, RAe, EBr-R, RAq, RCh.

Tableau 8. Taux des flavonoïdes d'EBr-R et les fractions.

Extrait	Taux des flavonoïdes ($\mu\text{g EQ/mg Ext}$)
EBr-R	0.164 ± 0.001
RHx	1.002 ± 0.001
RCh	0.098 ± 0.001
RAe	0.412 ± 0.002
RAq	0.112 ± 0.001

Les résultats de dosage des flavonoïdes des deux extraits du remède montrent que le DR présente une teneur 30 fois plus élevée à celle d'EBr-R. Cela peut signifier que le remède est riche en flavonoïdes hydrosolubles.

Les doses des flavonoïdes pour les fractions indiquent que la teneur la plus élevée existe dans la fraction RHx, tandis que la teneur la plus faible dans la fraction RCh. D'autre part les

deux fractions d'EBr-R et RAq présentent des teneurs très proches de flavonoïdes mais ces teneurs sont inférieures à celle de la RAe. Alors qu'une autre étude révèle que la fraction hexanique de l'extrait de *Rhanterium adpressum* est la moins riche en flavonoïdes avec une quantité de 0.03 µg d'équivalent de rutine par mg de matière sèche (µg ER/mg MS), tandis que la fraction d'acétate d'éthyle du même extrait présente la quantité la plus élevée des flavonoïdes avec 4.94 µg ER/mg MS (Hamia *et al.*, 2014). Cela montre que la fraction hexanique n'a pas toujours la teneur la plus élevée chez les différentes plantes. Selon Markham, (1982) les composés qui pourraient contenir l'extrait d'hexane sont en générale des flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés. Cela peut déduire que l'EBr-R est plus riche en flavonoïdes aglycone hautement méthoxylés et pauvre en flavonoïdes glycosylés. En conclusion, la différence des doses en flavonoïdes dépend du type des flavonoïdes présente dans la matière végétale et le solvant organique utilisé pour l'extraction, autrement dit le degré de la polarité des solvants organiques (Saidi, 2019).

4.4. Tests d'activité antioxydante

4.4.1. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH)

Le test de DPPH est fréquemment utilisé pour mieux évaluer l'activité antioxydante. Il permet de mesurer le pouvoir anti-radicalaire : la capacité d'un antioxydant à réduire le radical chimique DPPH qui accepte un électron ou un proton pour devenir une molécule non radicalaire (Figure 5), la capacité de réduire ce radical est déterminée par la diminution d'absorbance à 517 nm (Krache *et al.*, 2018).

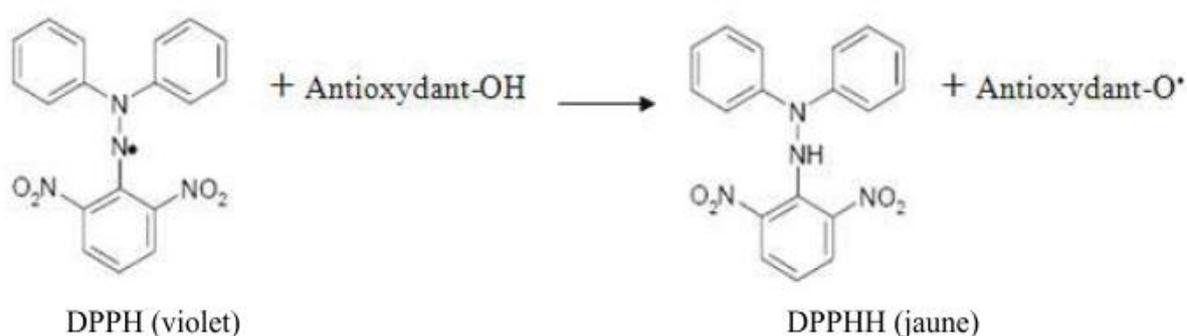


Figure 5. Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Congo, 2012).

Les résultats obtenus de la cinétique d'inhibition ont montré que les extraits utilisés présentent une activité anti-radicalaire dose dépendante (Figure 6 et 7).

La plante *Mentha spicata* (P1) exprime un pourcentage d'inhibition égale à 92.271 ± 1.160 % (Figure 6) à une concentration de 50 µg/ml, tandis que la plante *Rosmarinus*

officinalis (P8) présente une capacité réductrice puissante (Figure 7), à la même concentration, elle atteint un pourcentage d'inhibition égale à 94.176 ± 0.406 %. Pour le reste des extraits décoctés, ils ont montré un pouvoir réducteur aussi important, à une concentration de $100 \mu\text{g/ml}$ ils sont classés comme suit : $P6 \geq P7 \geq P9 \geq P2 \geq P4$ avec des pourcentages entre 94.430 ± 0.179 % et 88.848 ± 1.436 %, tandis que la plante P3 présente un pouvoir réducteur modéré par rapport aux autres plantes par un pourcentage égal à 84.080 ± 0.714 %.

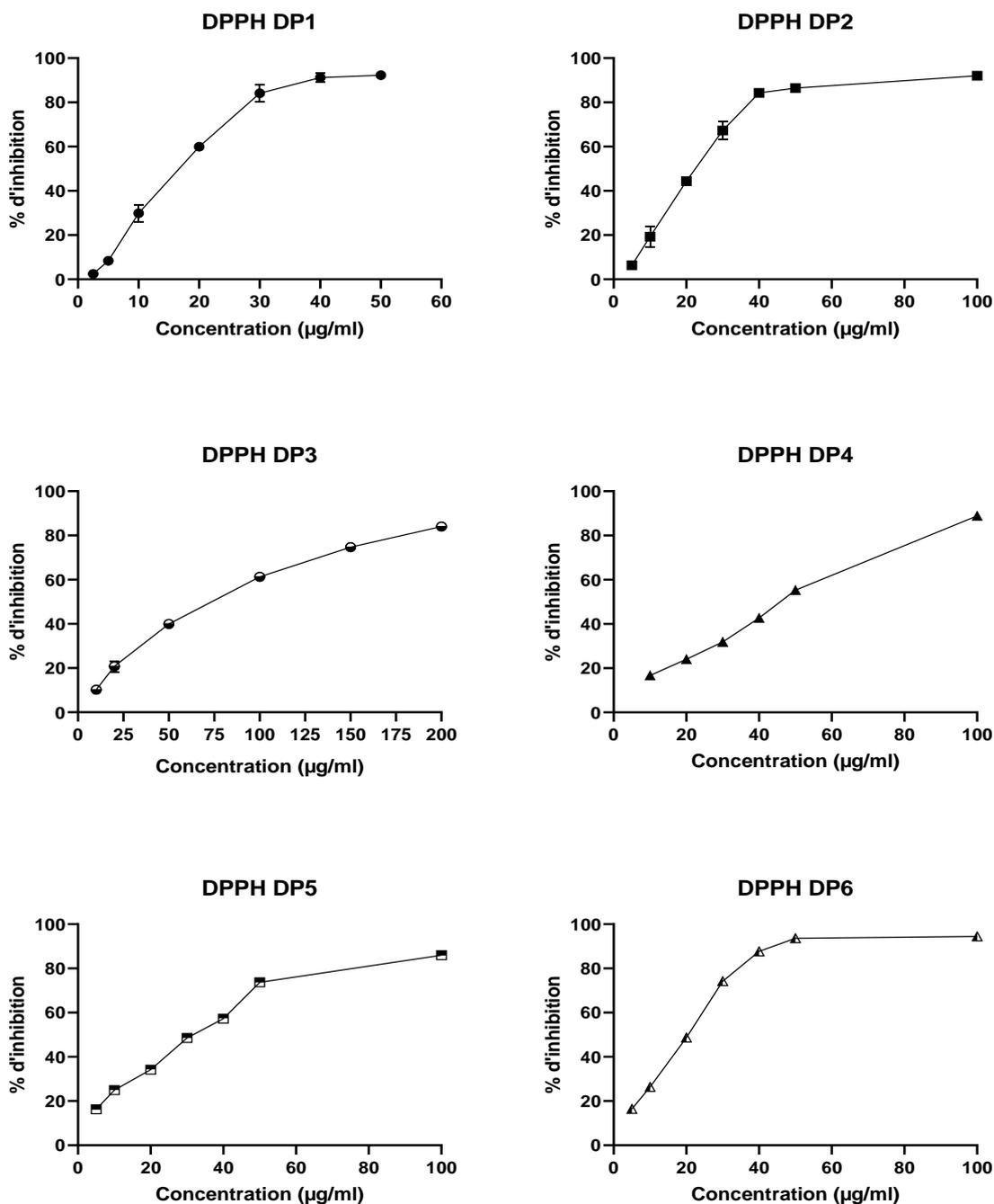


Figure 6. Activité anti-radicalaire des extraits aqueux des plantes (P1, P2, P3, P4, P5 et P6). Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3).

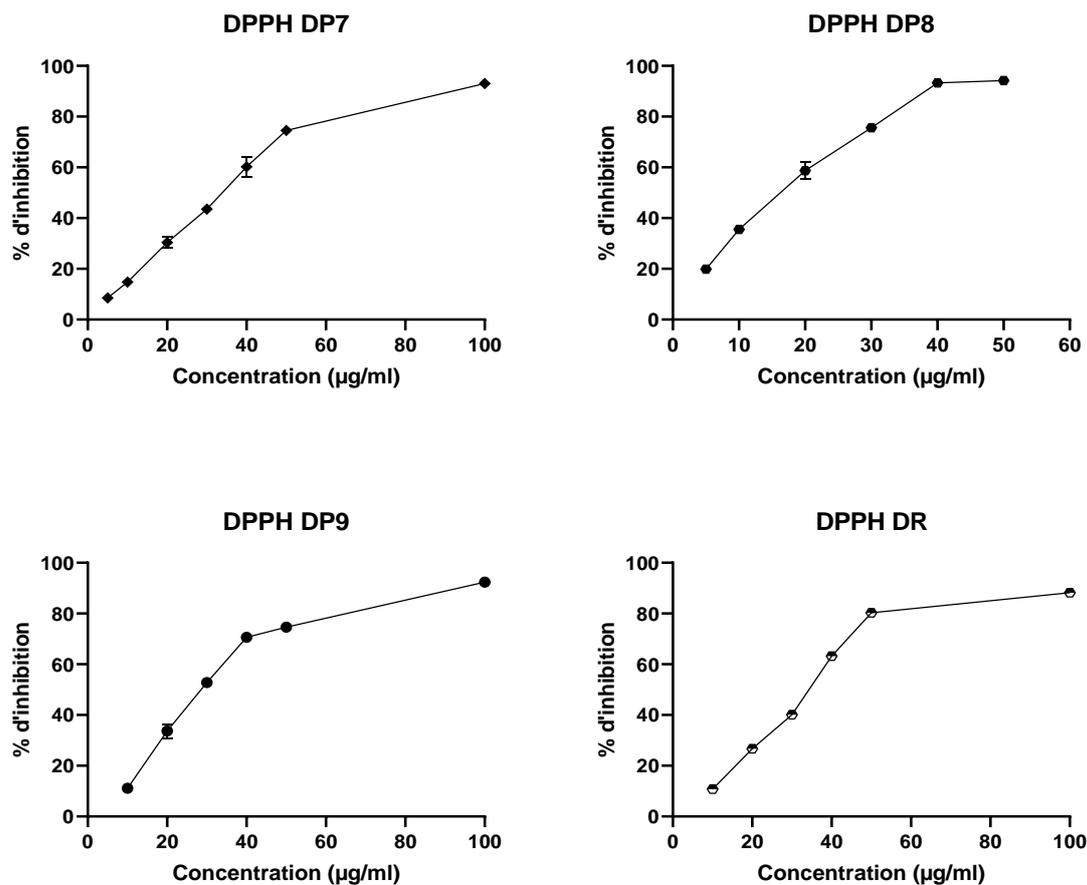


Figure 7. Activité anti-radicalaire des extraits aqueux des plantes (P7, P8, P9 et R). Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3).

L' IC_{50} est définie comme la concentration d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de la concentration initiale de DPPH. C'est un paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydant d'un extrait, plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est élevé (Martinez *et al.*, 2020).

Les résultats obtenus d' IC_{50} de chaque extrait (Figure 8) ont montré que les deux extraits DP1 et DP8 possèdent les valeurs $IC_{50} = 17.821 \pm 0.520 \mu\text{g/ml}$ et $IC_{50} = 17.785 \pm 0.389 \mu\text{g/ml}$ respectivement, cette différence non significative entre ces deux extraits montre qu'ils ont une activité réductrice la plus puissante parmi les extraits aqueux. Suivie par les extraits DP6, DP2, DP9, DP5, DP7, et DP4 qui ont des valeurs variées entre $IC_{50} = 20.673 \pm 0.071 \mu\text{g/ml}$ et $IC_{50} = 49.956 \pm 0.686 \mu\text{g/ml}$, tandis que le DP3 possède la valeur la plus grande et donc l'activité la plus faible avec une $IC_{50} = 85.058 \pm 0.510 \mu\text{g/ml}$.

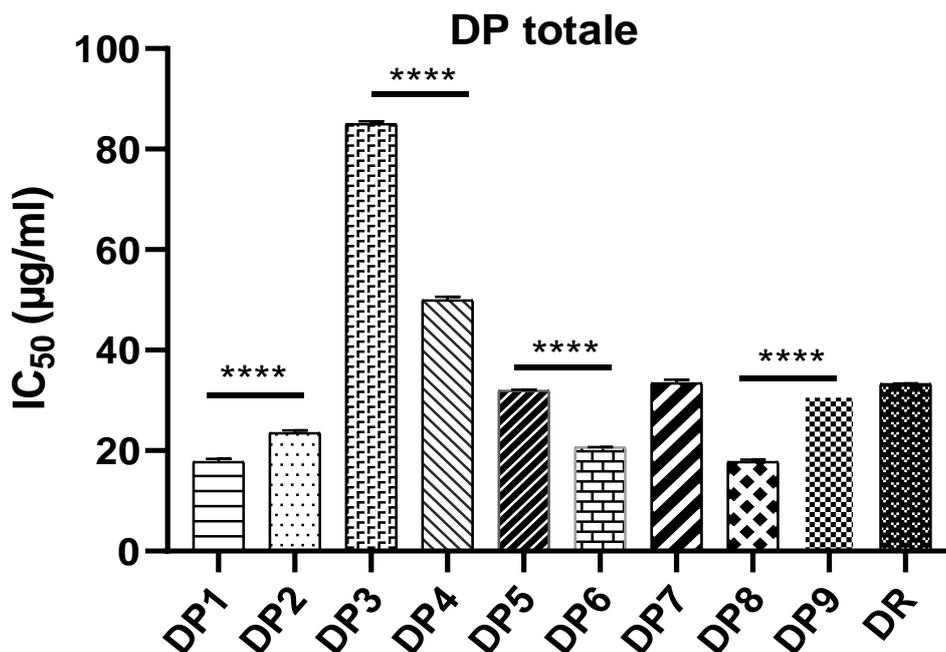


Figure 8. IC₅₀ du radical DPPH par les extraits aqueux de différentes plantes utilisées avec le remède. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3). **** : $p \leq 0.0001$.

La comparaison avec des travaux précédents sur les mêmes plantes utilisées (Tableau 9), montre que la capacité anti-radicalaire des extraits des plantes P6, P7, P8 et P9 est supérieurs à celle obtenue dans les travaux précédents, tandis que l'extrait issue de la plante P3 présente une activité anti-radicalaire inférieure à celle obtenu dans d'autres travaux. Cette différence peut être liée aux conditions météorologiques, la nature de la région et le sol ou la plante est cultivé. D'après Bourgou et ces collaborateurs (2016), la méthode d'extraction a une influence sur l'activité anti-radicalaire, ils ont montré l'existence de plusieurs facteurs tels que la durée et le type des solvants utilisé.

Tableau 9. Pourcentages d'inhibition de quelques extraits aqueux des mêmes plantes.

Plante	Code	Concentration (µg/ml)	% d'inhibition	Référence
<i>Cistus salviifolius</i>	DP3	25	≥ 90 %	(Kada, 2018)
<i>Mentha rotundifolia</i>	DP6	200	≤ 20 %	(Seladji, 2014)
<i>Artemisia campestris</i>	DP7	500	≤ 60 %	(Berrouane, 2014)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	DP8	200	79.62 %	(Makhloufi, 2013)
<i>Mentha plegium</i>	DP9	2000	79.28 %	(Tamert et Latreche, 2016)

Bien que, le remède R renferme toutes les plantes utilisées, donc l'estimation des résultats d'activité anti-radicalaire du R donne la plus forte activité inhibitrice. Mais pratiquement des résultats ont montré que la plupart des extraits de plantes ont exprimé des activités plus fortes à celle du R, d'autre terme ces extraits n'ont pas exprimé leur activité dans le mélange naturel. Alors, cela peut être du à l'extraction qui n'a pas récupéré toutes les molécules actifs (différence quantitatifs), D'un autre côté, le calcul de valeur d'IC₅₀ théorique de remède en utilisant les valeurs pratiques individuelles des plantes montre une IC₅₀ = 38.271 µg/ml, qui est supérieurs à leur valeur pratique (33.306 µg/ml), cela est peut être expliqué par une exo-interaction synergétique entre les biomolécules des différents plantes.

Pour le remède (R), l'extrait EBr-R présente une capacité réductrice plus importante que celle de DR, à une concentration de 50 µg/ml il atteint un pourcentage égale à 83.240 ± 0.233 % avec une IC₅₀ = 23.082 ± 0.284 µg/ml tandis que le DR atteint un pourcentage égale à 88.177 ± 0.887 % à une concentration deux fois plus élevé avec une IC₅₀ = 33.306 ± 0.081 µg/ml (Figure 9).

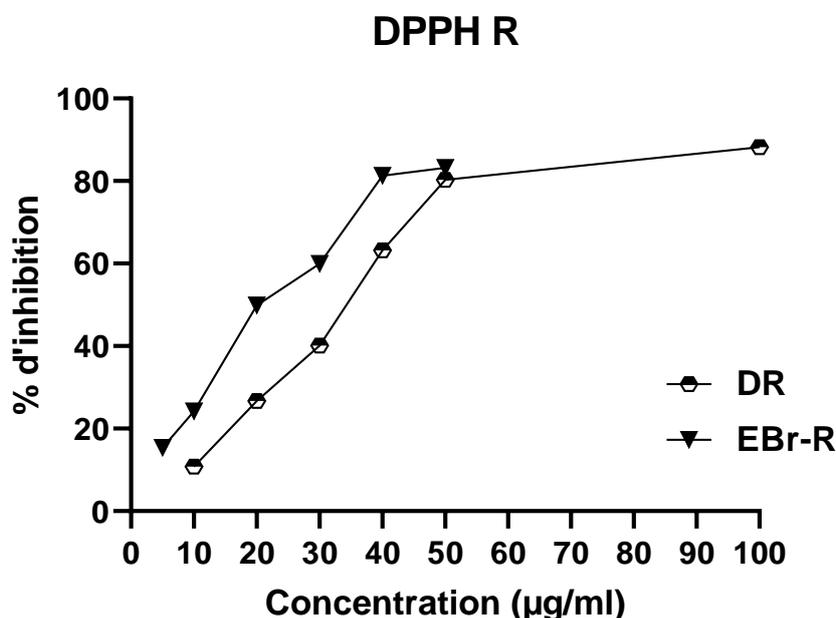


Figure 9. Activité anti-radicalaire des deux extraits bruts du remède. Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n=3). (DR) : extrait brut décocté du remède, (EBr-R) : extrait brut hydro-alcoolique du remède.

La comparaison avec d'autres résultats qui ont été obtenus par la méthode de DPPH sur des extraits aqueux des différentes plantes (Tableau 10) ont montré que tous les extraits aqueux utilisés ont une activité supérieure à celle des extraits de *Sideritis syriaca* et *Thymus*

vulgaris. Le DP4 possède une activité proche de ceux de *Plectranthus barbatus* et *Globularia alypum* tandis que le DP3 enregistre une activité inférieure à celle de ces deux derniers.

L'EBr-R a une activité deux fois inférieure à celle de l'*Origanum glandulosum* et deux fois supérieure à celle de l'*Euphorbia helioscopia*. Ces résultats montrent également l'influence de la méthode d'extraction sur l'activité anti-radicalaire, ils expriment que l'extraction hydro-alcoolique récupère des molécules qui ont une bonne activité anti-radicalaire.

Tableau 10. IC₅₀ d'activité anti-radicalaire vis-à-vis le DPPH des extraits d'autres plantes étudiés.

Extrait	Plante	IC ₅₀ (µg/ml)	Référence
Aqueux	<i>Sideritis syriaca</i>	468	(Goulas <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Thymus vulgaris</i>	112.3	(Martins <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Plectranthus barbatus</i>	45.8 ± 0.5	(Falé, 2009)
	<i>Globularia alypum</i>	0.67 ± 51.97	(Kada, 2018)
Hydro-alcoolique	<i>Origanum glandulosum</i>	12,8 ± 0,2	(Krimat <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Euphorbia helioscopia</i>	30.53	(Bourgou <i>et al.</i> , 2016)

D'un autre part, l'analyse des fractions issue du lavage liquide - liquide montre aussi une activité anti-radicalaire dose dépendante (Figure 10,11). Les résultats obtenus montrent que la fraction RAe exerce la capacité la plus importante parmi les fractions, à une faible concentration elle atteint un pourcentage égale à 93.980 ± 0.322 % suivit par RCh et RAq ayant une activité de 83.844 ± 0.214 % et 83.128 ± 0.432 %, respectivement et d'une même concentration, et enfin la fraction RHx qui l'activité la plus faible. Cela peut être due au type de solvant c'est-à-dire l'acétate d'éthyle récupère des molécules qui ont une activité inhibitrice importante.

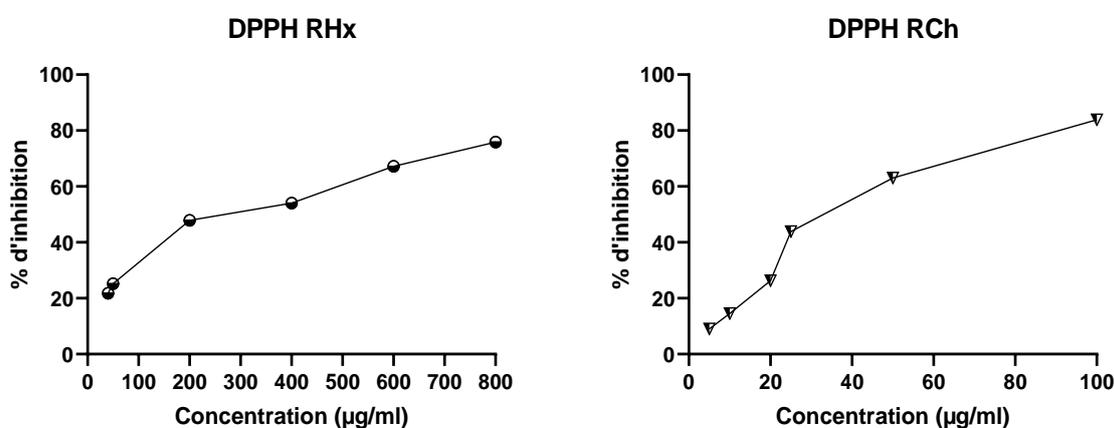


Figure 10. Activité anti-radicalaire des fractions RHx et RCh. Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n=3). (RHx) : fraction d'hexane, (RCh) : fraction de chloroforme.

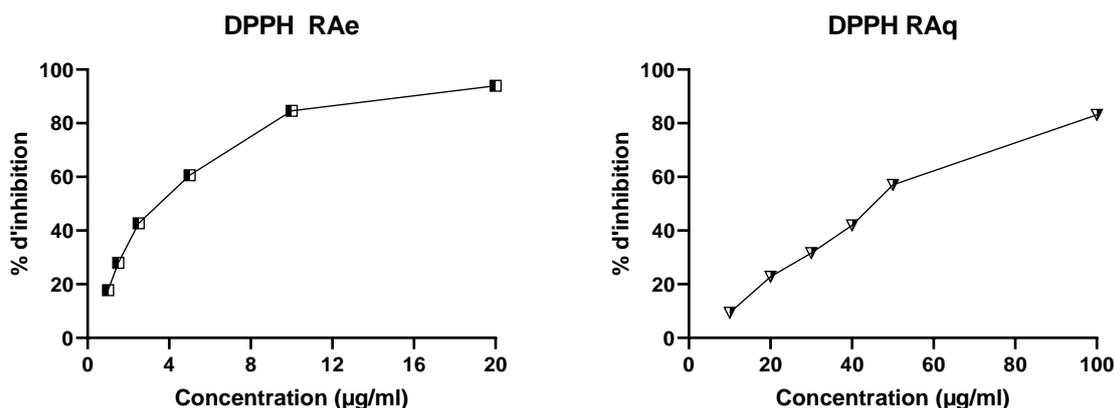


Figure 11. Activité anti-radicalaire des fractions RAe et RAq. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3). (RAe) : fraction d'acetate d'éthyle, (RAq) : fraction aqueuse résiduelle.

La comparaison entre les IC_{50} des fractions (Figure 12) montre que la fraction RAe possède une activité 5.1 fois plus élevée que celle de EBr-R et la fraction RCh exprime une activité proche de ce dernier, tandis que les deux fractions RAq et RHx possèdent une activité 2.3 fois et 16 fois plus inférieure. Cela peut être expliqué par le démasquage de l'activité de RAe par le fractionnement.

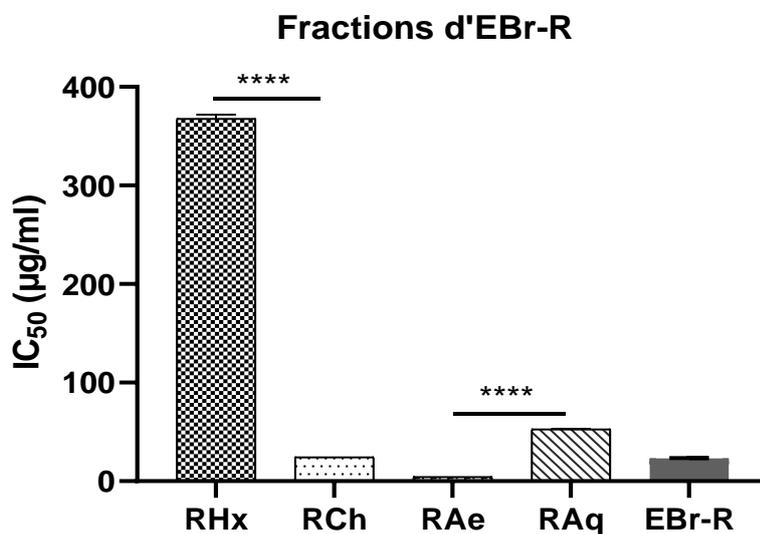


Figure 12. IC_{50} du radical DPPH par EBr-R et ces fractions. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3). **** : $p \leq 0.0001$.

La projection des résultats de DPPH sur les résultats de dosage montre que le DP3 présente la concentration la plus élevée en flavonoïdes mais elle ne présente pas l'activité d'inhibition la plus forte. Les deux extraits DP1 et DP8 présentent l'activité inhibitrice la plus forte malgré leurs faibles teneurs en flavonoïdes.

Entre DR et EBr-R, l'extrait DR présente un teneur de flavonoïdes presque 30 fois plus supérieur qu'EBr-R mais leur activité inhibitrice est très proche de l'ordre de 4 % de différence, ainsi que la fraction RHx présente la teneur la plus élevée aux flavonoïdes mais l'activité inhibitrice la plus faible parmi les fractions. Ces résultats peuvent être expliqués par la présence de certaines classes des flavonoïdes très actives ou d'autres molécules non flavonoïdiques dans les extraits qui exercent cette activité et la concentration en flavonoïdes n'est pas toujours proportionnelle avec l'activité inhibitrice.

Tamart *et al.*, (2016) ont rapporté que les polyphénols contribuent significativement à l'activité antiradicalaire de quelques plantes de la famille des lamiacées, ils ont noté que plusieurs substances tels que l'acide rosmarinique, l'acide carnosique et l'acide caféique possèdent des activités élevées du piégeage du radical libre, et qui sont aussi responsable des cinétiques les plus rapides. D'un autre part, les plantes qui possèdent une bonne activité antiradicalaire malgré leurs faible teneur en flavonoïdes peuvent renfermer des flavonoïdes très actifs qui leur confère cette activité tels que les flavones comme l'apigénine, le lutéoline et leurs glucosides, les flavane méthoxylé comme pectolinarinagine et les flavonoles méthoxylé en position 7 glycosyl (Rosa, 2000).

4.4.2. Test de chélation des métaux (Ferrozine)

L'activité de chélation du fer ferreux a été mesurée par l'inhibition de la formation du complexe Fe^{2+} -ferrozine après l'incubation de tout les extraits avec le Fe^{2+} selon la méthode de Welch (1990). En effet le ferrozine forme avec le fer libre présent dans le milieu réactionnel un complexe ferrozine- Fe^{2+} de couleur violette intense. Cependant, en présence des agents chélatant, la formation du complexe est perturbée de telle sorte que l'intensité du couleur se diminue. La mesure de la réduction de la couleur permet l'estimation de l'activité de chélation de l'agent chélatant (Khadhri, 2013).

Les résultats obtenus de la détermination de l'activité chélatrice (Figure 13,14) montrent que les extraits étudiés possèdent une activité chélatrice par la capture des ions ferreux avant qu'ils soient complexés avec la ferrozine.

D'après les résultats, les effets de chélation maximale ont été marqué par les extraits de DP3 et DP7 avec 59.007 ± 0.179 % et 85.105 ± 0.623 % à une concentration de 0.15 mg/ml et 0.25 mg/ml respectivement. Le reste des extraits ont aussi montré un pouvoir chélateur important des ions Fe^{2+} , à une concentration de 0.31 mg/ml, ils sont classé dans l'ordre suivant : DP2 > DP6 > DP8 > DP5 > DP4 > DP1 avec des pourcentages de chélation entre

88.404 \pm 0.618 % et 91.904 \pm 0.385 %. Par contre le DP9 exerce l'effet chélateur le plus faible de 80.870 \pm 0.684 % à la concentration de 0.638 mg/ml.

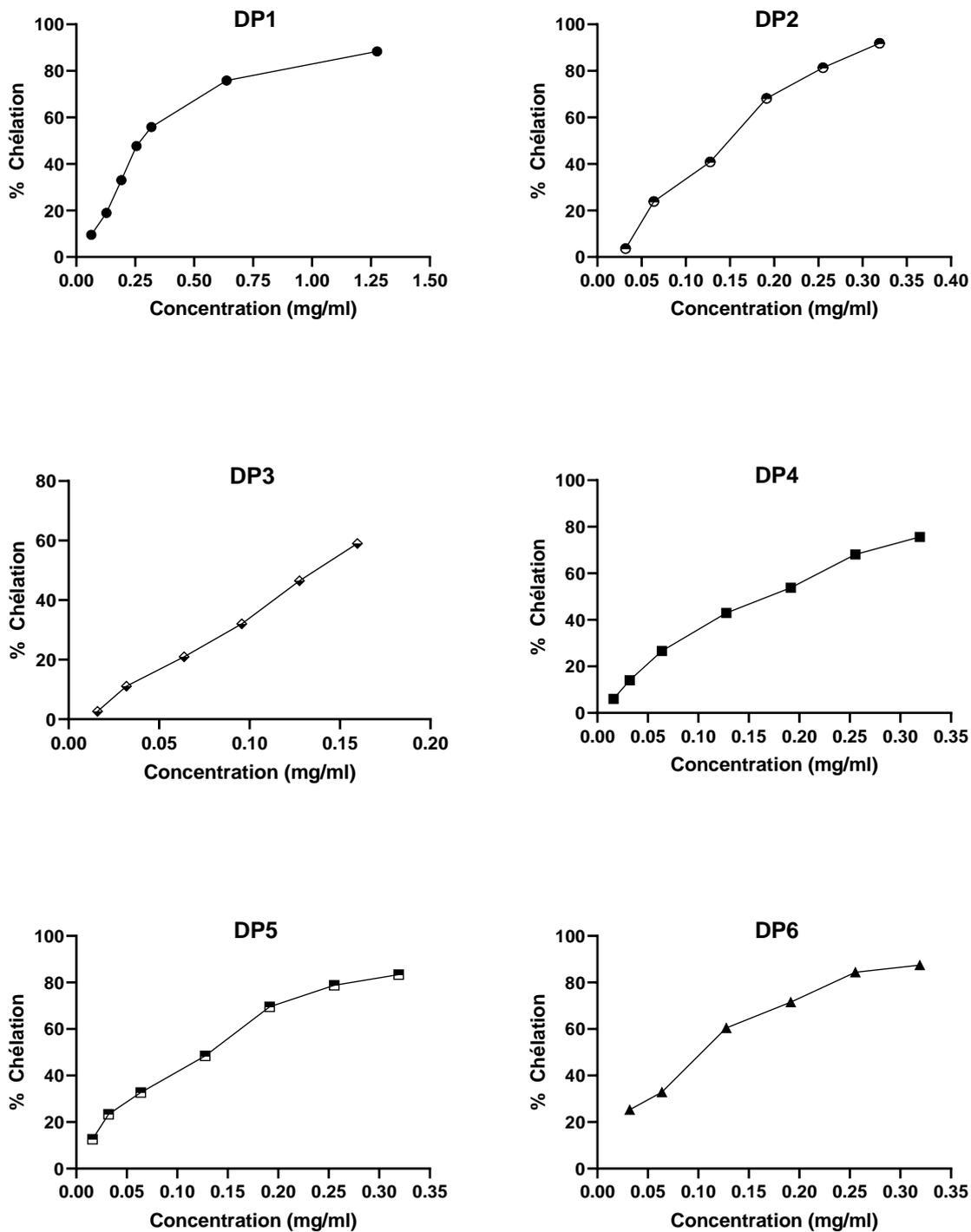


Figure 13. Chélation des ions ferreux par les extraits aqueux des plants (P1, P2, P3, P4, P5 et P6). Les résultats exprimés en moyenne \pm SD (n = 3).

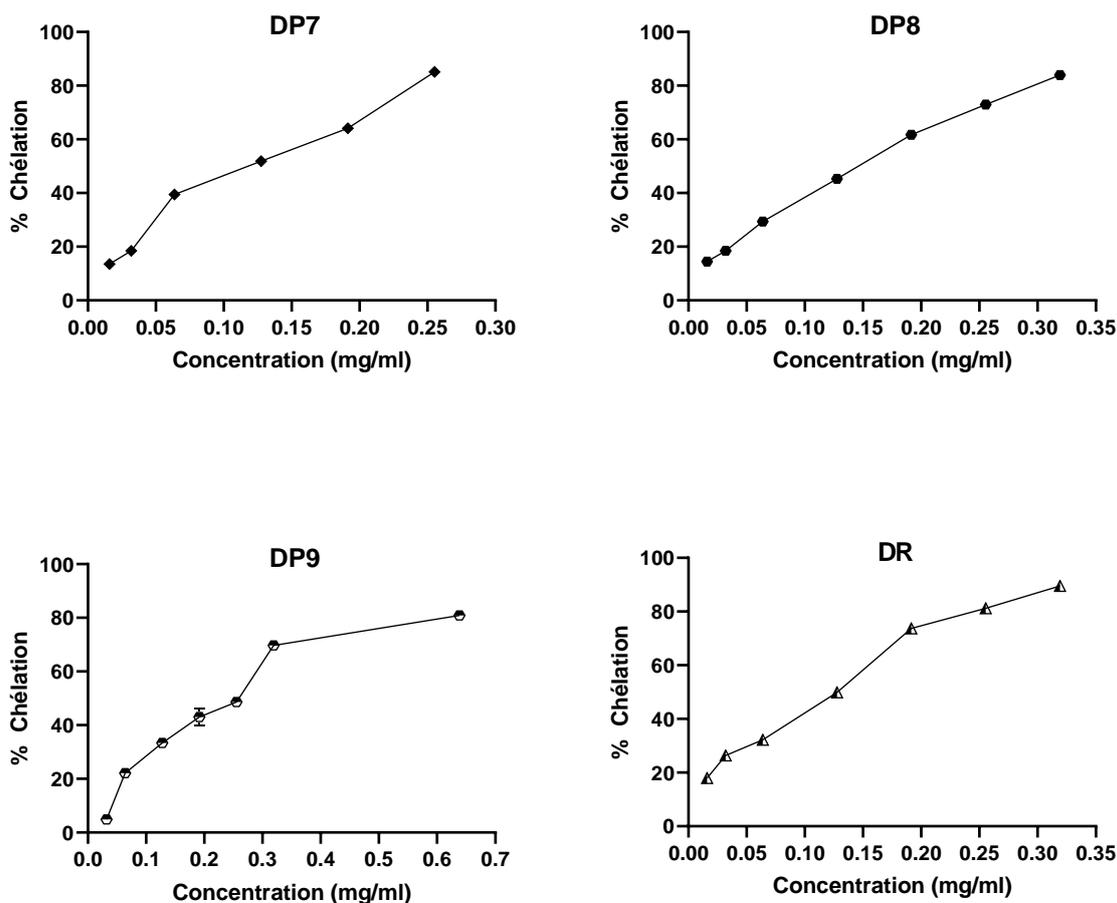


Figure 14. Chélation des ions ferreux par les extraits aqueux des plantes (P7, P8, P9 et R). Les résultats exprimés en moyenne \pm SD ($n = 3$).

Dans la nature, le Fer peut être trouvé en tant qu'ion ferreux ou ferrique ou d'autre, et la forme de l'ion ferrique prédominant dans les aliments. L'ion ferreux bivalent joue un rôle important en tant que catalyseurs des processus oxydatifs, conduisant à la formation de radicaux superoxydes et d'anions hydroxyles par des réactions de Fenton. Il est rapporté que les radicaux libres générés provoqueraient la peroxydation lipidique et les dommages d'ADN (Gülçin *et al.*, 2010). Les chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre impliqués dans la génération de radicaux libres peuvent prévenir les oxydations. Ces chélateurs forment des composés de coordination avec les métaux en inhibant ainsi le cycle redox du métal ou forment des complexes métalliques insolubles. Les flavonoïdes sont de bons chélateurs du fer ce qui est un des mécanismes de leur activité antioxydante (Ferrali *et al.*, 1997).

Les EC_{50} de chaque extrait (Figure 15) ont montré que l'extrait DP3 possède une valeur $EC_{50} = 0.788 \pm 0.004$ mg/ml et donc l'activité chélatrice la plus puissante parmi les extraits

aqueux, suivie par les extraits DP2, DP7, DP6, DP5, DP8, DP4 et DP1 qui expriment des valeurs variant entre $EC_{50} = 0.880 \pm 0.003$ mg/ml et $EC_{50} = 1.294 \pm 0.018$ mg/ml, tandis que le DP9 (*Mentha pelegium*) montre l'activité la plus faible avec une valeur plus grande $EC_{50} = 1.441 \pm 0.010$ mg/ml.

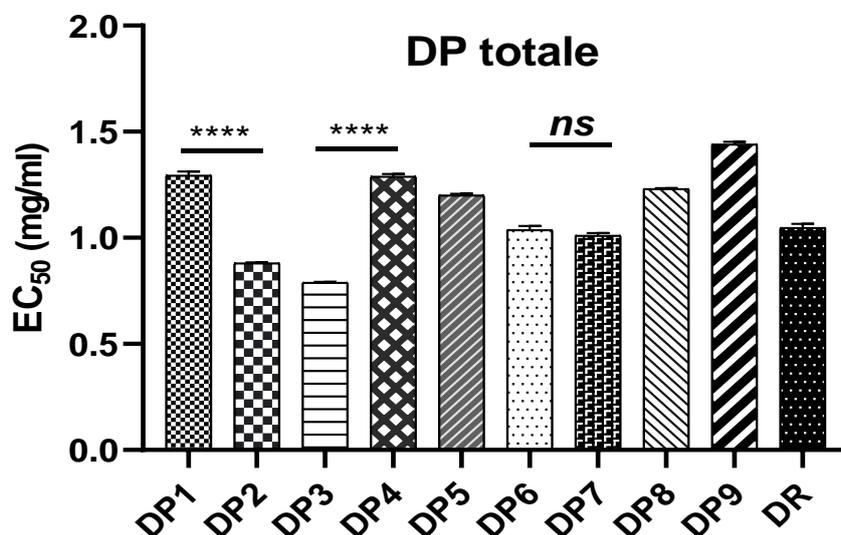


Figure 15. Concentration effective qui exprime 50 % de chélation des ions ferreux par les extraits aqueux des différentes plantes utilisées avec le remède. Chaque valeur exprime la moyenne \pm SD (n = 3), **** : $p \leq 0.0001$, ns : non significatif.

La comparaison des résultats obtenus avec les résultats d'étude de Kada (2018) montre que tous les extraits aqueux testés présentent une activité inférieure à celle des extraits aqueux de *Globularia alypum* et *Hertia cheirifolia* avec des $EC_{50} = 0.526$ mg/ml et $EC_{50} = 0.627$ mg/ml, respectivement, à une concentration de 0.25 mg/ml.

L'estimation de la valeur d' EC_{50} théorique de remède montre une EC_{50} égale à 4.252 mg/ml qui est supérieure à leur valeur pratique (3.700 mg/ml), cela est peut-être dû à une synergie moléculaire entre les différentes plantes.

Pour le remède, l'extrait DR présente une capacité de chélation supérieure à celle de EBr-R, à une concentration de 0.319 mg/ml, le DR atteint un pourcentage égal à 89.513 ± 0.188 % avec une $EC_{50} = 1.046 \pm 0.018$ mg/ml, tandis que EBr-R présente une activité plus faible avec un pourcentage égal à 67.878 ± 0.996 % et $EC_{50} = 6.170 \pm 0.438$ mg/ml mais à une concentration 4 fois plus supérieure, ce qui suggère que l'extraction aqueuse permet la récupération des molécules actives ou agit positivement sur le pouvoir chélateur grâce à la présence des composés solubles dans l'eau ayant un effet chélateur. Les groupements

hydrosolubles possèdent un caractère nucléophile élevé qui leur confère la capacité chélatrice (Ozen *et al.*, 2011).

D'autre part, l'analyse des fractions issue du lavage liquide - liquide (Figure 16) montre aussi une activité chélatrice des ions Fe^{2+} dose dépendante.

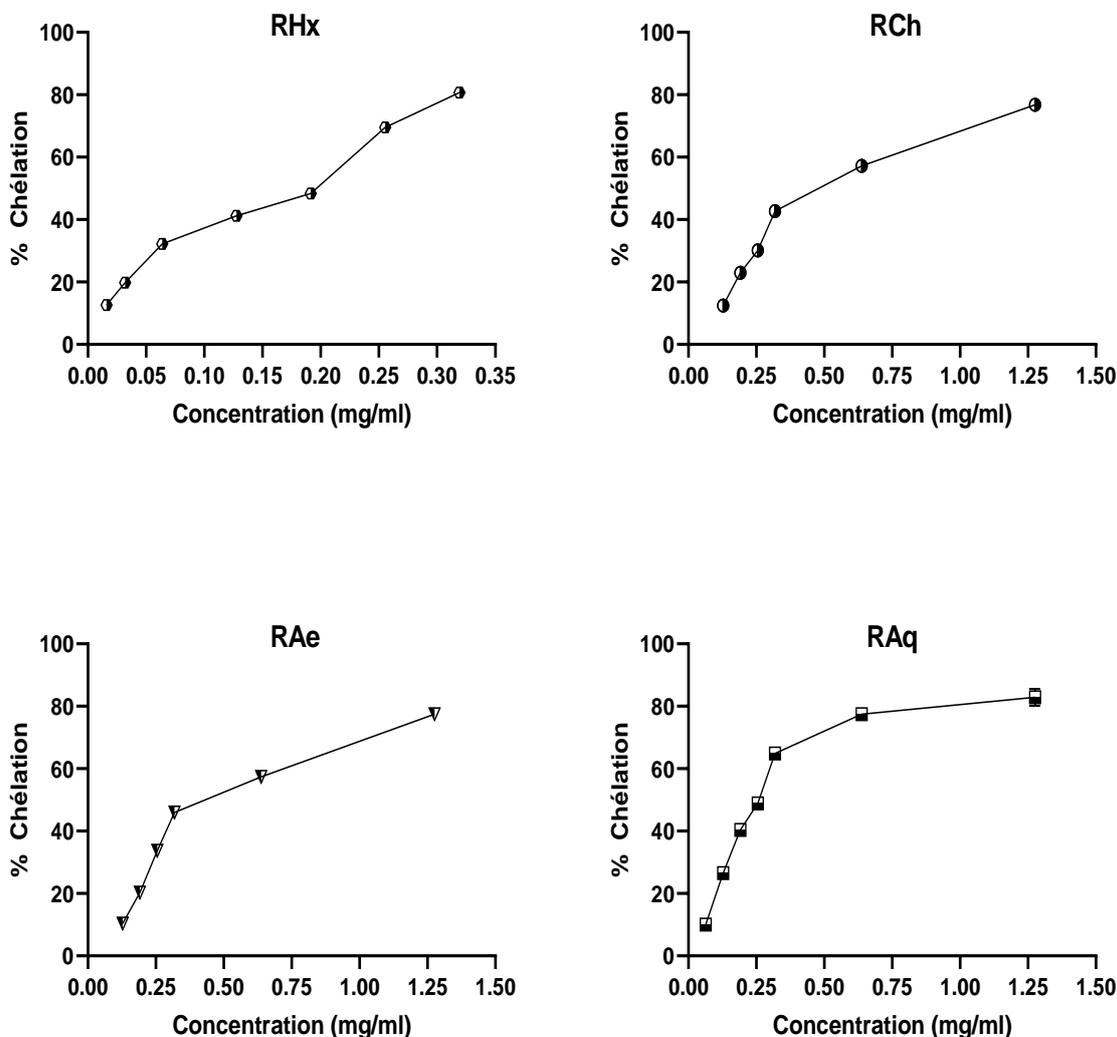


Figure 16. Chélation des ions ferreux par les fractions d'EBr-R. Chaque valeur exprime la moyenne \pm SD (n=3).

D'après ces résultats, la capacité chélatrice la plus forte est celle de la fraction RHx avec un pourcentage égale à 80.677 ± 1.047 % à une concentration faible 0.31 mg/ml, par la suite et à 1.27 mg/ml le reste des fractions sont classées comme suit : la RAq suivi par RCh puis RAe avec des pourcentages de 82.833 ± 2.728 %, 76.818 ± 0.546 % et 77.496 ± 0.580 % respectivement. La comparaison entre les EC_{50} des fractions (Figure 17) montrent que la fraction la plus active est RHx avec une $EC_{50} = 1.351 \pm 0.021$ mg/ml, suivie par RAq, RAe et

RCh qui présentent des EC_{50} de l'ordre de 1.446 ± 0.009 mg/ml, 2.718 ± 0.029 mg/ml et 2.743 ± 0.016 mg/ml respectivement et elles sont 1.07, 2.01 et 2.03 fois moins active que RHx. La comparaison des activités enregistrées par les fractions avec celle d'EBr-R montre que ce dernier exerce un masquage sur le pouvoir chélateur et donc le fractionnement agit positivement sur l'activité chélatrice permettant le démasquage de cette activité.

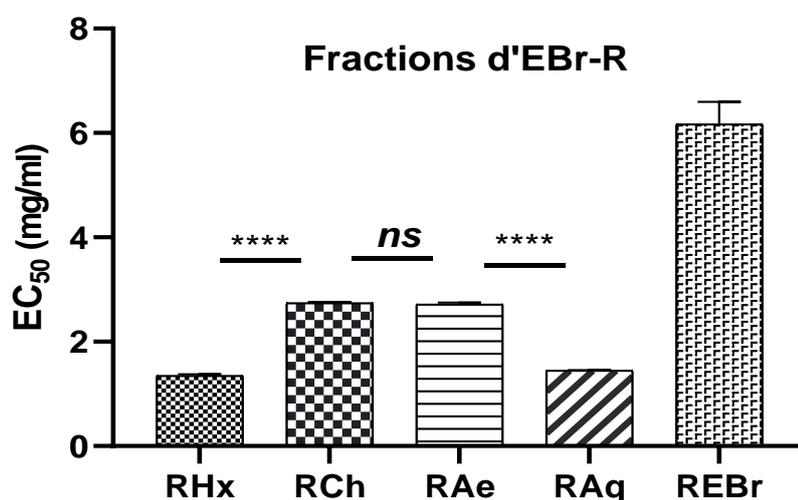


Figure 17. Concentration effective qui exprime 50 % de chélation des ions ferreux par l'extrait d'EBr-R et ses fractions. Chaque valeur exprime la moyenne \pm SD (n=3), **** : $p \leq 0.0001$, ns : non significatif.

La projection des résultats de teste de chélation sur les résultats de dosage des flavonoïdes montre que le DP3 possède l'activité chélatrice la plus importante parmi les extraits aqueux, ainsi que la fraction RHx enregistre un pouvoir aussi important parmi les fractions. Aussi, la comparaison entre le DR et EBr-R montre que le DR présente une activité 5 fois plus supérieur à celle de EBr-R. Ces activités peuvent être également dues à leur importante teneur en flavonoïdes. Les flavonoïdes exerce des effets antioxydants par la chélation des ions métallique, les effets antioxydants des flavonoles sont due à leur pouvoir de fixer des différents métaux à plusieurs sites comme la quercétine qui forme des complexe avec le Fe^{2+} via les groupements hydroxyles à trois cycles : les groupes hydroxyles du cycle B, les groupes 3-hydroxy-4-céto et 5-hydroxy-4-céto des cycles A et C (Verdan *et al.*, 2011).

D'un autre part, les DP2 et DP5 possèdent des teneurs faibles en flavonoïdes mais présentent des activités chélatrices significativement remarquable. Aussi, les extraits DP6 et DP7 enregistrent des activités de chélation statistiquement non significative malgré que leurs concentrations en flavonoïdes est différentes de l'ordre de $1.50 \mu\text{g EQ/mg Ext}$ de différence. Ces résultats peuvent indiquer une absence de proportionnalité entre l'activité chélatrice et la

concentration en flavonoïdes et donc le pouvoir chélateur n'est pas toujours lié avec la teneur de flavonoïdes. D'après Watanabe (2008), les mucilages sont des polysaccharides hydrosolubles caractérisés par leurs propriétés chélatrice. Les acides aminés aussi sont capables de séquestrer des métaux de transition (Wong *et al.*, 2006)

Conclusion

Conclusion

De nos jours, les plantes médicinales trouvent de nombreuses applications dans divers domaines. L'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source importante de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments. Certaines plantes médicinales contiennent des constituants qui leur confèrent un effet anti oxydant pourraient neutraliser l'excès des radicaux libres liés à des maladies dangereuses. Ce travail est axé sur la mise en évidence des propriétés anti-oxydantes des broyats de 9 plantes médicinales (P1 à P9) et leur remède (R). Les étapes de cette étude sont :

D'abord, l'extraction aqueuse par décoction (DP) à partir les feuilles de 9 plantes et de remède montrent que la plante P1 *Mentha spicata* possède le rendement en molécules hydrosolubles le plus élevé à ceux des autres plantes et aussi supérieur à celui du R. Pour les deux extraits bruts de R, l'EBr-R présente le bon rendement par rapport au DR car il regroupe des molécules hydrosolubles et les molécules solubles dans l'alcool. Par la suite le fractionnement d'EBr-R a révélé que la fraction aqueuse RAq qui représente le bon rendement par rapport aux autres fractions. Alors, la différence de rendement d'extraction est influencée par certains facteurs tels que l'écosystème, la plante et le type de solvant.

Puis, l'analyse quantitative (par dosage spectrophotométrique) des flavonoïdes présentent dans chaque plante et le remède a montré que l'extrait de la plante P3 est le plus concentré en flavonoïdes parmi les extraits aqueux, ainsi que la DP3 et DP6 sont plus riches en flavonoïdes par rapport au remède. Pour les fractions, la dose des flavonoïdes la plus importante a été enregistrée par la fraction hexanique RHx, le type des flavonoïdes qui pourraient être dans l'extrait d'hexane sont des flavonoïdes aglycone hautement méthoxylés, ce qui montre que l'EBr-R est riche en majorité des flavonoïdes aglycone hautement méthoxylés.

Bien que les résultats de rendement de l'exo-extraction ont été homogènes, les résultats de dosage révèlent que l'exo-extraction n'a pas récupéré toutes les molécules flavonoïdiques contrairement à l'extraction séparée des différentes plantes qui ont exprimé des doses plus importantes en flavonoïdes.

Par la suite, tous les extraits des plantes préparés dans ce travail sont utilisés pour le but d'évaluer l'effet antioxydant de chaque extrait seul et comparé avec l'effet antioxydant issue de leur combinaison en remède :

Premièrement, l'étude du pouvoir anti radicalaire par la méthode de DPPH. Les résultats du test d'activité anti-radicalaire DPPH ont montré que tous les extraits ont une activité inhibitrice, et que les extrait DP8 de *Rosmarinus officinalis* et DP1 sont les plus actives parmi les extraits décoctés avec les meilleures IC_{50} . D'autre part, l'analyse des fractions issue du lavage liquide - liquide montre que la fraction d'acétate d'éthyle (RAe) qui a la capacité réductrice la plus forte parmi les fractions, ce qui montre que le solvant acétate d'éthyle avoir obtenus les molécules réductrice plus puissantes. Pour le remède l'extrait EBr-R présente une capacité réductrice plus importante que celle de DR avec une IC_{50} plus faible.

Deuxième test, l'estimation de l'activité chélatrice de métaux par la méthode de chlorure d'aluminium à montré que l'extrait DP3 de la plante *Cistus salviifolius* possède une forte activité chélatrice par rapport aux autres extraits aqueux, d'une autre part, parmi les fractions celle de la RHx présente l'activité chélatrice la plus importante avec l' EC_{50} la plus faible par rapport aux autres fractions. Ce qui indique que le fractionnement agit positivement et permet le démasquage de cette activité. Ensuite, les résultats des deux extrait DR et EBr-R du remède à montré que le DR qui a la capacité chélatrice la plus élevé. Cela peut conclure que les molécules solubles dans l'eau ayant un effet chélateur plus important.

Les résultats des testes d'activité antioxydante ont montré l'effet d'exo-extraction dans l'établissement des exo-interactions synergétiques entre les molécules présentes dans le mélange naturel. Autre coté le fractionnement par lavage liquide offre le dévoilement de nouvelles fractions avec une activité plus importante. Donc cette étude a permis de signaler l'effet de l'exo-interaction entre les différentes plantes dans l'amélioration de l'activité antioxydante par un synergisme et que le fractionnement conduira à un démasquage de cette activité. Ces résultats nécessitent d'être approfondis par :

- ✓ Des études phytochimique avancée pour l'isolement, purification et l'identification des diverses molécules responsables de différentes activités en utilisant des techniques chromatographiques.
- ✓ L'étude des mécanismes d'actions sur les médiateurs inflammatoire, les enzymes impliqués dans la production des ROS et sur le système antioxydant *in vivo*.
- ✓ Etudier le risque de toxicité des extraits pour voir la possibilité de leur utilisation en domaine pharmaceutique ou leur implication dans la conservation des produits destinés à la consommation.
- ✓ Etudier d'autres activités biologiques telles que l'activité anti microbienne.

Références Bibliographique

Références

- Adams L., Franco M.C. et Estevez A.G. (2015). Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Experimental Biology and Medicine*, 240(6) : 711–717.
- Andersen Ø.M. et Markham K.R. (2005). Flavonoids : Chemistry, biochemistry and applications, 263-318.
- Arvouet-Grand A., Vennat B., Pourrat A. et Legret P. (1994). Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *Journal de pharmacie de Belgique*, 49(6) : 462–468.
- Békro Y.A., Békro M., Jannat A., Boua B.B., Fezan H., Tra B. et Ehouan E.É. (2007). Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae). 217–225.
- Belattar H. (2020). Etude phytochimique de feuilles d'*Olea europaea* L. var Chemlel d'Algérie. January 2016.
- Belkhiri N. 2010. these de doctorat. Derivés phénoliques a activités antiatherogenes. Toulouse III - Paul Sabatier.
- Bensakhria A. 2018. Toxicologie Générale - Le Stress Oxydatif. Algérie, p.70-86.
- Berrouane N.E.H. 2014. Etude de l'effet protecteur de l'extrait d'*Artemisia campestris* sur le stress oxydant induit chez le rat par le tétrachlorure de carbone. Thèse de magister, Ecole Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach - Alger, 129 p.
- Bourgou S., Serairi Beji R., Medini F. et Ksouri R. 2016. Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of New Sciences*, 28(12) : 1649–1655.
- Boughendjioua H. 2001. Les plantes médicinales utilisées pour les soins de la peau . Inventaire et extraction des principes actifs de *Citrus limon* , *Cinnamomum zeylanicum*. Thèse de magister, Université Badji-Mokhtar - Annaba, 106 p.
- Cheriti A., Belboukhari N. et Hacini S. 2005. Savoir traditionnel et valorisation des plantes médicinales du sud ouest algerien. *Annales de L'université de Bechar*, 1- 4.
- Chevallier A. 1997. Enciclopedia de plantas medicinales : guía práctica de consulta con más de 550 hierbas clave y sus usos medicinales. In Biblioteca educación y salud.Madrid, 334 p.
- Congo M. 2012. Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliferative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica* L. (Salvadoraceae).Thèse de doctorat. Université de Ouagadougou, p 42.

- De Marco F. 2013. Oxidative stress and HPV carcinogenesis. *Viruses*, 5(2) : 708–731.
- Di Meo S., Reed T.T., Venditti P. et Victor V. M. 2016. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 44 p.
- Falé L., Borges C., Madeira P.J.A., Ascensao L., Araujo M.E.M. et Serralheiro M.L.M. 2009. L'acide rosmarinique, la scutellaréine 4'-méthyl éther 7- O -glucuronide et la (16S) - coleon E sont les principaux composés responsables de l'activité antiacétylcholinestérase et antioxydante de la tisane de *Plectranthus barbatus* («falso boldo»). *114(3)* : 798–805.
- Ferrali M., Signorini C., Caciotti B., Sugherini L., Ciccoli L., Giachetti D. et Comporti M. 1997. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters*, 416(2) : 123–129.
- Garait B. 2006. *Le stress oxydant induit par voie métabolique (regimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la glisodin: Biologie Cellulaire*. Doctorat, Université Joseph Fourier, Grenoble, 195p.
- Goulas V., Exarchou V., Kanetis L. et Gerothanassis I. P. 2014. Evaluation of the phytochemical content, antioxidant activity and antimicrobial properties of mountain tea (*Sideritis syriaca*) decoction. *Journal of Functional Foods*, 6(1) : 248–258.
- Gülçin I., Huyut Z., Elmastaş M. et Aboul-Enein H.Y. 2010. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(1) : 43–53.
- Guillouty A. 2016. *Plantes médicinales et antioxydants*. Pharmacie. pour le diplôme d'état de docteur, université Toulouse III Paul Sabatier, France. 101.
- Hama Hamadou H., Moutari S.K., Maman Manzo L., Moussa I., Adamou R. et Khalid I. 2018. Criblage phytochimique et dosage des polyphénols du *Detarium microcarpum* Guill. et Perr. utilisé dans le traitement des maladies parasitaires au Niger. 11.
- Hamia C., Guergab A., Rennane N.E., Birache M., Haddad M., Saidi M. et Yousfi M. 2014. Influence des solvants sur le contenu en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits du *Rhanterium adpressum*. *Annales Des Sciences et Technologies*, 33–39.
- Kada S. 2018. *Recherche d'extraits de plantes médicinales doués d'activités biologiques*. Thèse de Doctorat En Sciences Biologiques, université Ferhat Abbas Sétif 1. 172 p.
- Khadhri A., EL mokni R. et Smiti S. 2013. Composés phénoliques et activités antioxydantes de deux extraits de chardon à glu: *Atractylis gummifera*. *Revue Soc. Sci. Nat de Tunisie*. (36) : 44-52.
- Koehlin-Ramonatxo C. 2006. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique*

- et Metabolisme*, 20(4) : 165–177.
- Krache I., Boussoulim N., Trabsa H., Ouhida S., Baghiani A. et Arrar L. (2018). Antioxidant, Antihemolytic, Antihyperuricemic, Anti-inflammatory Activity of Algerian Germander Methanolic Extract. *Annual Research and Review in Biology*, 23(5) : 1–14.
- Krimat S., Metidji H., Tigrine C., Dahmane D., Nouasri A. et Dob T. 2017. Analyse chimique, activités antioxydante, anti-inflammatoire et cytotoxique d'extrait hydrométhanolique d'*Origanum glandulosum* Desf. Chemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of hydromethanolic extract of *Origanum glandulo*. *Phytothérapie*.
- Makhloufi A. 2013. Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Doctorat d'état en biologie, Université Abou Baker Belkaid Tlemcen. 166 p.
- Markham K.R. 1982. Techniques of flavonoid identification (Chapitre 1 et 2) : Academic Press, London pp. 1–113.
- Martinez-Morales F., Alonso-Castro A.J., Zapata-Morales J.R., Carranza-Álvarez C. et Aragon-Martinez O.H. 2020. Use of standardized units for a correct interpretation of IC₅₀ values obtained from the inhibition of the DPPH radical by natural antioxidants. *Chemical Papers*, 74(10) : 3325–3334.
- Martins N., Barros L., Santos-buelga C., Henriques M., Silva S. et Ferreira, Isabel C. F. R. 2014. Decoction , infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme : Antioxydant and antibacterial activities, and phenolic characterisation. *Food Chemistry*, (167) : 131-137
- Mittler R. 2017. ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22(1) : 11–19.
- O'Mahony J.A., Fox P.F. et Kelly A. L. 2013. Indigenous Enzymes of Milk BT - Advanced Dairy Chemistry. Volume 1A: Proteins: Basic Aspects, 4th Edition, pp. 337–385. Springer US.
- Ozen T., Demirtas I. et Aksit, H. 2011. Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var . *skorpilii*. *Food Chemistry*, 124(1) : 58–64.
- Quezel F et Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'algérie des régions désertique méridional Tome I, II. Éd, CNRS, Paris, 1087 p.
- Rosa M., Giner P., José L. et Cañavate R. 2000. La *Santolina Chamaecyparissus* : Especie mediterranea con potenciales aplicaciones terapeuticas en procesos inflamatorios y

- transtornos digestivos. *revista de fitoterapia*, 1, 27–34.
- Saffidine K. 2015. Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus caeruleus* L. et de *Plantago major* L. Doctorat en Sciences. Université Ferhat Abbas Sétif. 92 p.
- Sahoo S., Ghosh G., Das D. et Nayak S. 2013. Phytochemical investigation and *In vitro* antioxidant activity of an indigenous medicinal plant *Alpinia nigra* B.L. Burt. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(11) : 871–876.
- Saidi I. 2019. Caractérisation et valorisation d'une plante de la famille des fabaceae : *Gleditsia triacanthos* de la région de Sidi Bel Abbès : Extraction des substances bioactives. PhD Thesis, Université Djillali Liabès Sidi Bel Abbés. 188 p.
- Schwartz E. 2016. La Vitamine C. Dess De Cosmetologie Monographie. 27 p.
- Seladji M. 2014. Etude phytochimique, activité anti oxydantes et anti microbienne des extrait de cinq plantes médicinales et analyse de leurs huiles essentielles. Université Abou Baker Belkaid Telemcen. 156 p.
- Simioni C., Zauli G., Martelli A. M., Vitale M., Sacchetti G., Gonelli A. et Neri L.M. 2018. Oxidative stress: Role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget*, 9(24) :17181–17198.
- Tamert A. et Latreche A. 2016. Activité antioxydante des extraits de six Lamiaceae aromatiques de l'Algérie occidentale. *Phytotherapie*, 1–8.
- Tan B.L., Norhaizan M.E., Liew W.P.P. et Rahman H.S. 2018. Antioxidant and oxidative stress: A mutual interplay in age-related diseases. *Frontiers in Pharmacology*. 28 p.
- Thorin-Trescases N., Voghel G., Farhat N., Drouin A., Gendron M.È. et Thorin É. 2010. Âge Et Stress Oxydant. *Médecine/Sciences*, 26(10) : 875–880.
- Tokarz P. et Kaarniranta K. 2013. Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). 461–482.
- Trabsa H. 2015. Activité antioxydante et anti-inflammatoire des fractions des plantes médicinales : *Sedum sediforme* et *Lycium arabicum*. Thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif 1. 100 p.
- Verdan A.M., Wang H.C., García C.R., Henry W.P. et Brumaghim J.L. 2011. Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105(10) : 1314–1322.
- Watanabe T., Misawa S., Hiradate S. et Osaki M. 2008. Characterization of root mucilage from *Melastoma malabathricum*, with emphasis on its roles in aluminum accumulation.

The New Phytologist, 178 : 581–589.

- Widlansky M.E. et Gutterman, D.D. 2011. Regulation of endothelial function by mitochondrial reactive oxygen species. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15(6) : 1517–1530.
- Wong S.P., Leong L.P. et William Koh J.H. 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*, 99(4) : 775–783.
- Yan L. J. 2014. Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. *Redox Biology*, 2(1) : 165–169.
- Yaya S. et Sorho S. 2017. Détermination des paramètres influençant le rendement d'extraction hydro-alcoolique des métabolites secondaires de *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae) et *Tridax procumbens* linn (Asteraceae) Kouwelton Patrick Franck Olivier Koné , Yaya Soro et Sorho. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim.*, 15–22.
- Zerargui, F. 2015. Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis* L. et caractérisation des substances bioactives, Thèse Doctorat en Sciences. Ferhat Abbas Sétif 1. 126 p.

ملخص

تهدف هذه الدراسة الى تقييم النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات تسع نباتات طبية ومزيجها في العلاج. تم الاستخلاص المائي للأجزاء الهوائية لجميع النباتات ومزيج العلاج، و النقع المائي الكحولي للعلاج وحده. بعد هذه المرحلة تم تجزئة المستخلص المائي الكحولي الخام للعلاج بواسطة تقنية التقسيم السائل-السائل بمذيبات عضوية متزايدة القطبية. كما تم إجراء تحليل لوني لجميع المستخلصات باستخدام تقنية $AlCl_3$. أظهر تحليل DPPH نشاطا ملحوظ لجميع المستخلصات، حيث أظهر قياس النشاط المثبط (I %) فعالية *Rosmarinus officinalis*. ثم أشار نشاط الاستحلاب المقدر باختبار ferrozine إلى أن *Cistus salviifolius* أظهر نشاطاً جيداً مع $EC_{50} = 0.004 \pm 0.788$ mg/ml. تُظهر الحسابات تفاعلاً خارجياً تآزرياً بين الجزئيات الحيوية للنباتات المختلفة تم إثباته من خلال الاختبارين. ثم أظهر قياس النشاط التثبيطي و المخلب كفاءة الأقسام مقارنة بالمستخلص المائي الكحولي الخام. لذا فإن تجزئة العلاج يؤدي إلى الكشف عن أقسام أكثر نشاطاً. في الختام، مثل أهمية دراسات التفاعل الداخلي للجزئيات الحيوية النباتية، يمكن للعلاج المكون من النباتات المختلفة إعطاء تفاعلات خارجية جديدة بين الجزئيات النشطة.

الكلمات المفتاحية : المزيج، الكسر، النشاط المضاد للأكسدة، DPPH، ferrozine، تفاعلات خارجية، الكشف.

Résumé

La présente étude a été désignée pour l'évaluation de l'effet antioxydant des extraits des parties aérienne de neufs plantes médicinales et leur combinaison en remède. Les broyats ont été soumis à une extraction aqueuse par décoction pour toutes les plantes et le remède et une macération hydro-alcoolique pour le remède seul. Après un fractionnement de l'extrait brut hydro-alcoolique (EBR-R) par lavage liquide-liquide avec différents solvants à polarité croissante. L'analyse de tous les extraits et les fractions a été faite à l'aide d'un dosage colorimétrique par $AlCl_3$. Le teste de DPPH a révélé que tous les extraits expriment des activités remarquables, la mesure de l'activité inhibitrice a montré l'efficacité de la *Rosmarinus officinalis*. Puis l'activité chélatrice estimée par teste de ferrozine indique que la plante *Cistus salviifolius* représente une bonne activité avec $EC_{50} = 0.788 \pm 0.004$ mg/ml. Des calculs montrent une exo-interaction synergétique entre les biomolécules de différentes plantes prouvé par les deux testes. Ensuite la mesure des pourcentages d'inhibition et de chélation a montré l'efficacité des fractions par rapport à l'extrait brut hydro-alcoolique. Donc le fractionnement conduit à un démasquage qui donne une fraction plus active. En conclusion, comme les études d'endo-interactions des biomolécules d'une plante, un remède de différentes plantes peut donner des nouvelles exo-interactions entres différentes molécules bioactives.

Mots clés : Remède, Fractionnement, Activité antioxydante, DPPH, ferrozine, exo-interaction, démasquage.

Abstract

This study was appointed for the evaluation of the antioxidant effect of extracts from the aerial parts of nine medicinal plants and their combination in remedy. The ground material was subjected to aqueous extraction by decoction for all plants and the remedy and hydro-alcoholic maceration for the remedy alone. After fractionation of the crude hydro-alcoholic extract (EBR-R) by liquid-liquid lavage with different organics solvents with increasing polarity. Analysis of all extracts was performed using an $AlCl_3$ colorimetric assay. The DPPH test revealed that all extracts express remarkable activities, measurement of inhibitory activity showed effectiveness of *Rosmarinus officinalis*. Then the chelating activity estimated by ferrozine test indicates that *Cistus salviifolius* represents a good activity with $EC_{50} = 0.788 \pm 0.004$ mg/ml. Calculations show a synergistic exo-interaction between the biomolecules of different plants proven by the two tests. Then the measurement of pourcentage of inhibition and chelation showed the effectiveness of the fractions compared to the crude hydro-alcoholic extract. So fractionation leads to unmasking and gives more active fraction. In conclusion, like endo-interaction studies of plant biomolecules, a remedy of different plants can give new exo-interactions between different bioactive molecules.

Key words : Remedy, fractionation, antioxidant effect, DPPH, ferrozine, exo-interaction, unmasking