

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université « Mouloud Mammeri » de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département d'Agronomie.



Mémoire de fin d'études

*Pour l'obtention du diplôme de Master
En Sciences de la nature et de la vie
Filière : Biologie
Spécialité : Biochimie
Option : Biochimie de la nutrition*

Thème

Activités biologiques des plantes médicinales :
Verbascum sinuatum L et Peganum harmala L

Réalisé par :

- OUNOUH Samira
- OUMSALEM Kahina

Membres de jury :

Promotrice	Mme.IRATNI GH.	MCB à UMMTO
Co-Promotrice	Mme.OUZID.Y.	MCB à UMBB

Année : 2021-2022

Remerciements

Avant tous, nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

Dans un premier temps, nous tenons à témoigner toute notre reconnaissance à monsieur HOUALI Karim, professeur en microbiologie à l'université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour nous avoir accueillies au sein de son laboratoire, de nous avoir fait découvrir ce sujet et d'avoir pu bénéficier de ses qualités pédagogiques.

Nous tenons également à remercier notre promotrice docteur IGHATNI Ghenima, maître assistante B à l'UMMTO qui nous a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, par sa grande patience, par sa disponibilité et ses conseils judicieuse.

Nous tenons à remercier également notre Co-promotrice docteur OUZID Yasmina, maître de conférences B à l'UMMTO qui nous a guidées durant la réalisation de ce travail, d'avoir pu bénéficier de ces précieux conseils.

Nous adressons nos sincères remerciements à tous les membres du jury de nous avoir accordé l'honneur d'évaluer notre travail, et de l'enrichir.

Nos remerciements vont également à la technicienne du laboratoire LABAB.

A la fin nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin dans l'élaboration et l'aboutissement de ce travail.

Dédicaces

Je tiens particulièrement à exprimer toute ma gratitude à ma famille dont le soutien à été essentiel tout au long de mes études, et tout particulièrement au cours de ce travail.

Mon père, je suis fière d'avoir eu un père tel que toi à mes cotés tout au long de ces années, tu m'as appris beaucoup de choses, et je suis très reconnaissante pour ton amour, patience et soutien dont tu as fais preuve à mon égard en vu de ma réussite.

Un énorme merci à ma mère, qui ma soutenue, rassurée et qui a su prendre sur elle dans les moments difficiles, merci pour ton amour et pour tout ce que tu m'as apportée

Je remercie mon mari Karim pour sa patience, et qui en se tenant à mes cotés, me soutien dans tous mes projets.

Merci ma chère fille Eline, d'avoir illuminé ma vie, je te dédie ce travail, et je prie le bon Dieu qu'il t'éclaire de savoir.

Merci mes sœurs Fazia et Saliha, mes chères frères Mohamed et Aissa, pour votre amour, soutiens, patience et aides à chaque moment de ma vie, merci d'avoir toujours cru en moi, je vous exprime ma profonde gratitude.

Un merci tout particulier à ma belle famille, belle –mère et beau-père, mes beaux-frères et belles sœurs ; à mes oncles, mes tantes.

A ma binôme Samira ; je dédie ce travail à toute notre préparation les jours et les nuits, nos larmes et nos fous rire, nos déception et nos éclats de joie, a notre belle amitié, merci Samira.

A tous mes amies, et à tous ce qui m'aiment.

Kahina

Dédicaces

Je dédie ce travail à la lumière de mes yeux, le bonheur de ma vie et ma raison d'être, ma chère maman qui m'a apportée son appui durant toutes mes années d'étude.

A mon cher papa pour ses encouragements et conseils qui m'ont données confiance et courage.

Je remercie mon mari Karim pour sa patience, et qui en se tenant à mes cotés, me soutien dans tous mes projets.

Merci mes sœurs Nabila, Sabrina, Farah et Lisia pour votre amour, soutien et aide à chaque moment de ma vie.

Un merci tout particulier à mes grands parents, mes oncles, mes tantes, mes beaux- parents et mes beaux -frères.

A ma binôme Kahina, pour toute sa patience, sa douceur, aux jours et nuits qu'on a passés ensemble en toute fraternité pour réaliser ce travail, merci Kahina.

A toutes mes amies et belles personnes qui me sont chères.

Samira

Liste des abréviations

- ERO** : Espèce réactive de l'oxygène.
- ATP** : Adénosine triphosphate.
- AGPI** : Acide gras polyinsaturé.
- UV** : Ultra-violet.
- NOS** : Nitric oxyde synthase.
- SOD** : Superoxyde dismutase.
- NO** : Oxyde d'azote.
- RNS** : Réactive nitrogène species.
- DPPH** : Diphényle picryl-hydrazyle.
- FeCL₃** : Chlorure de fer.
- HCL** : Acide chlorhydrique.
- ALCL₃** : Trichlorure d'aluminium.
- ANOVA** : Analysis numerica operation variance.

Liste des figures

N°	Intitulé de la figure	Page
1	Les différentes parties de <i>Verbascum sinuatum</i> L (DANE et YILMAZ, 2009 ; JARADAT et al, 2015).	3
2	Les différentes parties de <i>Peganum harmala</i> L.	6
3	Stress oxydant : déséquilibre de la balance oxydative (DURAND, 2018).	9
4	Schéma des différentes formes des radicaux libres (GARAIT, 2006).	12
5	Molécule d'a-tocophérol, (PINCEMAIL et al, 1998).	14
6	Structure de la vitamine C (SEKLI-BELAIDI, 2011).	14
7	Structure d'un caroténoïde (BRUNETON ,1999).	15
8	Structure de l'acide gallique (BRUNETON, 2009).	17
9	Structure de base des flavonoïdes (HELLER et FORKMAN, 1993).	17
10	La réaction inflammatoire schématisée.	19
11	Déroulement de la réaction anti-inflammatoire (BREEDVELD, 2000).	20
12	Schéma récapitulatif de l'évaluation in vitro de l'effet anti-inflammatoire (Chandra et al ,2012).	25
13	Protocole de dosage des alcaloïdes (Patel et al, 2015 et Tabasum et al, 2016).	26
14	Courbe étalon de la colchicine	26

15	Protocole d'extraction des flavonoïdes (Bahorn et <i>al</i> , 1996).	27
16	Courbe étalon de quercétine.	28
17	Courbe de l'effet antioxydant de l'acide ascorbique.	29

--	--	--

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Pages
Tableau I	Les propriétés thérapeutiques de <i>Peganum harmala L.</i>	6
Tableau II	Les métabolites secondaires de <i>Peganum harmala L.</i>	7 8
Tableau III	Tableau récapitulatifs des appareils et matériels utilisés.	22
Tableau IV	Tableau récapitulatif des réactifs et produits chimiques utilisés.	22
Tableau V	Gamme étalon de l'acide ascorbique.	24
Tableau VI	Pourcentages d'inhibitions de l'acide ascorbique (vitamine C).	28
Tableau VII	IC50 moyen en mg/ml de standard (Vitamine C) et différents extraits de feuilles des deux plantes	31

Sommaire

Sommaire

Introduction	1
Présentation des plantes étudiées :	2
1- <i>Verbascum sinuatum L</i> :	2
1-La Classification botanique :	2
2-Description des différentes parties de la plante :	2
3-Répartition géographique de la plante :	3
4-Usage traditionnel :	3
5-Principaux métabolites secondaires :	4
6 – Activités biologiques	4
2- <i>Peganum harmala L</i>	5
1-Classification systématique :	5
2- Description de la plante :	5
3-Répartition géographique	6
4-Usage traditionnel :	6
5- Métabolites secondaires de <i>Peganum harmala L</i> :	7
Chapitre 2 : Stress oxydatif et antioxydant	9
1-Stress oxydant :	9
2- Origine du stress oxydant	10

2-1-Origine endogène :.....	10
2-1-1- Respiration mitochondriale :	10
2.1-2- Lipooxygénases	10
2-1-3-Nitric oxyde synthase :	10
2-2-Origine exogène :.....	10
2-2-1- Les ultraviolets :.....	10
2-2-2- La pollution par ozone :	11
2-2-3-Herbicides et pesticides :.....	11
3-Radicaux libres :	11
3-1- Différentes formes de radicaux libres:.....	11
3-2-Principales cibles des ERO :.....	12
3-Antioxydant :	13
3-1-Différents types et source d'antioxydants.....	13
31-1-Endogène :les systèmes de défense enzymatiques des radicaux libres :	13
3-2-2-Exogène :antioxydants non enzymatiques	13
3-2-2-1-Oligoéléments :	15
3-2-2-2-Polyphénols:.....	16
Chapitre 3 :L'inflammation :.....	18
I-Matériels et méthodes :.....	21
1-Matériel végétal :	21
2-Matériel utilisé:	21
3-Réactifs et solvants :	22
4-Méthode de préparation des extraits aqueux :.....	23
5-Préparation des extraits aqueux des feuilles de <i>Peganum harmala</i> L et de <i>Verbascum sinuatum</i> L :	23
6-Evaluation de l'activité antioxydante :.....	23
7-Evaluation d'activité anti-inflammatoire :	24
8-Dosage spectrophotométrique des alcaloïdes et des flavonoïdes :	25

8-1-Dosage des alcaloïdes :.....	25
8-2-Dosage des flavonoïdes :	26
II-Résultats et discussions :	28
2-1-Evaluation in vitro de l'activité antioxydante des extraits aqueux des feuilles de <i>Peganum harmala</i> L et <i>Verbascum sinuatum</i> L :.....	28
2-2-Evaluation in vitro de l'activité anti-inflammatoire des extraits aqueux des feuilles <i>Verbascum sinuatum</i> L et <i>Peganum harmala</i> L :.....	32
2-2-1-Dosage des alcaloïdes.....	35
2-2-2-Dosage des flavonoïdes	35
Conclusion générale.....	37
Référence bibliographique.....	38

Résumé

Les plantes médicinales constituent une source immense en métabolites secondaires, qui ont plusieurs applications : médicales, agroalimentaires, pharmaceutiques, agronomiques et biotechnologiques. Ces métabolites sont à l'origine de plusieurs activités biologiques telles que l'activité antioxydante, antibactériennes, anti-inflammatoire et anti cancérigène. C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité biologiques des plantes médicinales : *Peganum harmala L* et *Verbascum sinuatum L*.

Les extraits aqueux des feuilles sont utilisés pour tester l'effet antioxydant de nos deux plantes qui est mesuré par le test DPPH.

Les extraits aqueux des feuilles de *Verbascum* et de *Peganum* contiennent des métabolites secondaires qui sont à l'origine de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire.

Mots clés : *Peganum harmala L*, *Verbascum sinuatum L*, extrait aqueux, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire.

Introduction

Les plantes médicinales constituent une source inépuisable de molécules présentant un grand intérêt pour thérapeutique.

Au cours de ces dernières années, l'intérêt pour la phytothérapie a considérablement augmenté c'est pour cela que la recherche actuelle s'intéresse à l'étude des métabolites secondaires qui constituent le principal réservoir des nouveaux médicaments.

Parmi les métabolites secondaires : les alcaloïdes et les flavonoïdes qui sont utilisées en thérapie comme antioxydants, antibactériens, antiulcéreux et anticancéreux. Ces composés conduisant aux développements de nouveaux produits puissants qui inhibent la progression de plusieurs maladies comme les tumeurs.

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer les deux activités biologiques anti-oxydante et anti-inflammatoire des extraits aqueux *Peganum harmala* et *Verbascum sinuatum* L.

Dans ce contexte, notre travail se divise en deux parties, une partie revue bibliographique rappelant les caractéristiques botaniques des deux espèces *Peganum harmala* et *Verbascum sinuatum* L ainsi que quelques aspects portant sur les poly phénols retrouvés dans la nature à savoir leurs biosynthèse, leur classification et leur propriétés chimiques. Pour ce qui est de la partie pratique dont nous décrivons la méthodologie suivie, les résultats obtenus ainsi que leur discussion et comparaison avec d'autres résultats publiés dans la littérature scientifique.

A fin de répondre à l'objectif principal de notre étude qui est l'évaluation de l'activité anti-oxydante et anti-inflammatoire pour les deux plantes, différents points critiques ont été traités :

- Evaluation in vitro de l'activité anti-inflammatoire des extraits végétaux des feuilles de *Peganum harmala* L et *Verbascum sinuatum* L.
- Evaluation in vitro de l'activité anti-oxydante des extraits végétaux.
- Dosages des flavonoïdes et des alcaloïdes des extraits aqueux des deux plantes étudiées.

Partie bibliographique

Présentation des plantes étudiées :

I-*Verbascum sinuatum* L :

Le genre *Verbascum* est le plus grand genre de la famille des Scrophulariacées, avec environ 2500 espèces dans le monde entier (TATLI et al ,2004). Le genre *Verbascum*, communément appelé molène comprend environ 360 espèces à fleurs (MIHAILAVIC Vladimir et al, 2016).

1-La Classification botanique :

La classification botanique de l'espèce *Verbascum sinuatum* L. est donnée ci-dessous selon STOODER(2015).

Super-embranchement	<i>Spermatophyta</i>
Embranchement	<i>Angiospermae</i>
Classe	<i>Eudicotyledonea</i>
Sous-classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Scrophulariaceae</i>
Tribu	<i>Verbassceae</i>
Genre	<i>Verbascum</i>
Espèce	<i>Verbascum sinuatum</i> L.

2-Description des différentes parties de la plante :

L'espèce *Verbascum sinuatum* L. est une plante herbacée, bisannuelle hémicryptophyte qui peut atteindre 2m de hauteur (MOSSERAY, 1935)

Le terme « *Verbascum* » vient de *Barbascum* et signifie barbu en référence au fait que la plante est couverte d'un duvet cotonneux et que les étamines soient barbues (ALIPIEVA et al, 2014). Les Fleurs sont jaunes soufres avec des étamines violettes .Elles sont groupées par 2 à 5 en glomérules espacés, elles sont solitaires, apicales avec un pédoncule court .Le fruit est une capsule portant plusieurs graines (MOSSERAY, 1935). La floraison se fait en Mai et en aout (DANE et YIMMAZ, 2009 ; REMAL, 2014) (figure1).

Partie bibliographique



Figure1 : Les différentes parties de *Verbascum sinuatum*L.(DANE et YILMAZ,2009 ; JARADAT et al.,2015)

A :Fleurs B :Etamines C :Fruits D :Feuilles

3-Répartition géographique de la plante :

La plupart des espèces de *Verbascum* ont une aire de distribution très restreinte et sont majoritairement endémiques. On trouve cependant des espèces à large distribution naturellement présentes sur trois continents comme *Verbascum sinuatum* L. qui est présente en Turquie, en Europe et en Afrique du nord. Elle est très commune dans le Tell algérien (REMAL, 2014), elle se rencontre particulièrement dans la région méditerranéenne et les terrains chaud, sec et bien exposés au soleil (DUBOCHET, 1850 ; GUY, 2012).

4-Usage traditionnel :

Les espèces appartenant au genre *Verbascum* sont très utilisées en phytothérapie (POLLETI ,1988).les feuilles, les racines et les fleurs sont les parties de la plante les plus connues par leurs vertus thérapeutiques.

Pour les feuilles : Usage externe, soulagement des douleurs rhumatismales et sciatiques.

Et pour les racines et les fleurs : Action sur les maladies oculaires et activités antiseptiques, antispasmodiques et analgésiques et action sur les troubles hépatiques.

Partie bibliographique

5-Principaux métabolites secondaires :

Il est connu que les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires constitués de protéines, glucides et lipides. Ces composés, appartiennent à des groupes chimiques variés (Alcaloïdes, terpènes, composés phénoliques...etc.) (MACHEIX *et al*, 2005). Bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants.

Les espèces du genre *Verbascum* renferment huit principaux groupes phytochimiques, tels que les saponines, les iridoïdes, les glucosides mono terpéniques, les glucosides, les flavonoïdes, les stéroïdes, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les acides gras et autres. Il ressort des études faites sur ces espèces que les métabolites secondaires sont constitués de saponosides et d'iridoïdes.

6-Activités biologiques :

Plusieurs activités biologiques ont été déterminées à partir d'extraits issus de différentes espèces du genre *Verbascum*, à savoir les activités anti oxydantes, anti-inflammatoires, antivirales, antimicrobiennes, anti tumorales, antiulcéreuses ; et ceci grâce aux composés biologiquement actifs que renferment ces extraits, tels que les flavonoïdes, les glycosides phényléthaniques, les néolignanes, les saponines, les glycosides iridoïdes et mono terpéniques (TATLI. et AKDERMIR., 2006).

L'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Verbascum sinuatum* L a été mise en évidence par l'étude de Senator et collaborateurs (2007). Cet extrait est composé de cinq principes actifs ayant pour noms : *Verbascoside*, *Sinuatol*, *ajugol*, *luteoline 7-O-β-D* glucoside et aucubin.

Partie bibliographique

2 : *Peganum harmala* L :

1-Classification systématique :

Selon the Angiosperme phylogénie group (2009), la systématique de *Peganum harmala* L est la suivante :

Règne :	plantes
Embranchement :	<i>Spermaphytes</i>
Sous-embranchement :	<i>Angiospermes</i>
Classe :	<i>Eudicotylédones</i>
Sous-classe :	<i>Malvides</i>
Ordre :	<i>Sapindales</i>
Famille :	<i>Zygophyllaceae</i>
Genre :	<i>Peganum</i>
Espèce :	<i>Peganum harmala</i> L

2-Description de la plante :

Peganum harmala L est une plante herbacée vivace, glabre, à racine pivotantes, à tige ordinairement peu rameuses de 30 à 90 cm de haut, à odeur forte désagréable qui rappelle celle de la rue (ACHOUR et al, 2012).

Les feuilles sont de couleur vert claire, sont allongées et irrégulièrement divisées en multiples lanières très fines (MANSOUR et SOUDABE ,2012 ; KEMASSI et al.2013).La plante présente des fleurs blanches sales grandes avec des sépales inégaux persistants qui dépassent la corolle. Les pétales sont blanc jaunâtres à nervures jaunes, oblongs et subsymétriques. Les fleurs sont monoïques dotées de quinze étamines à anthères longues de 8 mm à filets très élargis et plats dans leur partie inférieure. Le gynécée est de 8-9 mm de longueur et des ovaires globuleux de trois loges. Les fruits sont des petites capsules globulaires déprimées au sommet renferment des graines noires (MAIRE ,1933 ; CHOPRA et al, 1960 ; OZENDA, 1991) (Figure 2).

Partie bibliographique

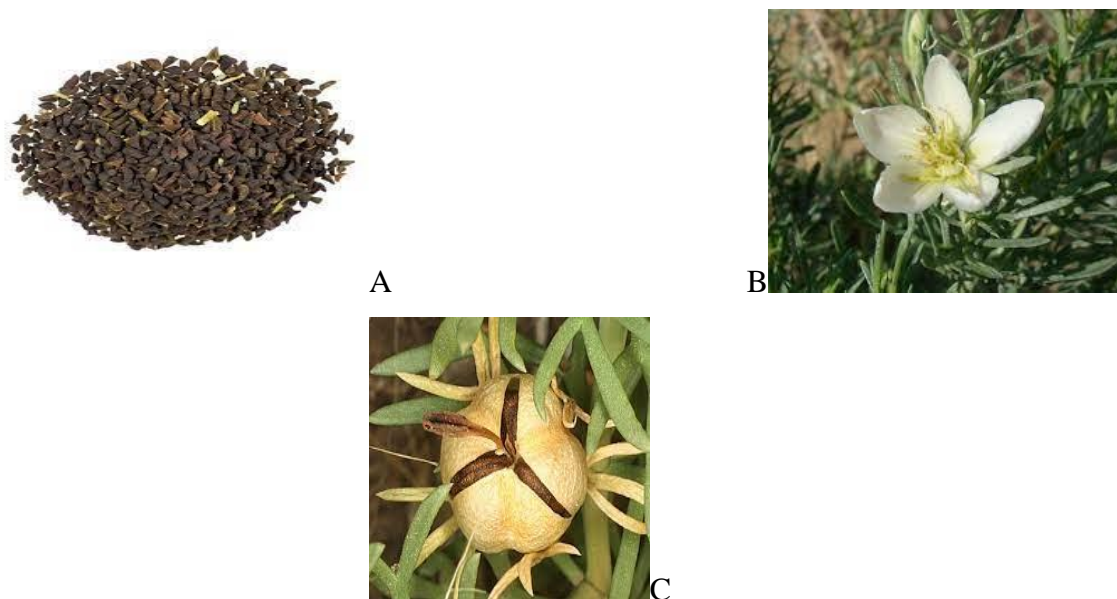


Figure 2 : Les différentes parties de *Peganum harmala* L.

A : Grains B : Fleurs C : Fruits

3 : Répartition géographique :

Espèce cosmopolite, *Peganum harmala* L est largement distribuée à travers le monde, généralement dans le nord du continent africain et jusqu'au nord des Indes et Mandchourie (BRUNETON, 2009). En Algérie, elle est commune aux hauts plateaux, au Sahara septentrional et méridional et aux montagnes du Sahara central. Elle est réputée pour les terrains sableux, dans les lits d'oued et à l'intérieur des agglomérations (OZENDA, 1991).

4-Usage traditionnel :

Peganum harmala L. communément appelée « Harmel », présente un intérêt en médecine traditionnelle algérienne et maghrébine pour traiter plusieurs troubles. Ses propriétés thérapeutiques sont consignées dans le tableau I.

Tableau I: Les propriétés thérapeutiques de *Peganum harmala* L.

Types de troubles	Propriétés thérapeutiques	Références bibliographiques
Troubles généraux	Hypnotique, antipyrétique, antalgique et antitussif	(HAMMICHE et al. 2013)
Troubles gynécologiques	Emménagogue, abortif, utilisé contre la stérilité	(GOEL et al. 2009)

Partie bibliographique

	fémnine et l'impuissance sexuelle	
Troubles digestifs	Agit contre les coliques, diarrhée infantile du nourrisson	(GOEL et al. 2009)
Troubles cutanés	Antiseptique et cicatrisant, pour traiter des dermatoses (eczéma), des brulures, conjonctivite purulente et blépharite	(MONSEF et al, 2004)
Troubles infectieux	Antipaludique, anthelminthique, utilisé pour traiter le tétanos néonatal, les oreillons, les conjonctives purulentes et blépharites	(MONSEF et al, 2004)
Autres maladies	Agit contre le diabète, hypertension artérielle, empoisonnement, rhumatisme et problèmes nerveux Peut atténuer les tremblements de la maladie de Parkinson	(ISERIN, 2001)

5-Métabolites secondaires de *Péganum harmala L* :

L'analyse phytochimique des extraits de plantes à montré la présence d'alcaloïdes. Les alcaloïdes ont un taux beaucoup plus élevé dans la graine (3 à 4 %) que dans la racine, la tige, (0,36 %) et la feuille (0,52 %). Parmi les alcaloïdes trouvés chez *Peganum harmala L*, on peut recenser : l'harmane, l'harmine, et harmalol (tableau !). La teneur en alcaloïdes s'élève brusquement en été, durant la phase de mûrissement du fruit, au moment de la récolte de la graine. Des études ont conduit à l'isolement des différents composés chimiques des graines de

Partie bibliographique

Peganum, ses feuilles, fleurs, tiges et racines (SHAO et al, 2013). Toutes les parties de la plante *Peganum harmala* L, sont considérées comme toxiques .La teneur des alcaloïdes est maximale en été.

Différentes classes de métabolites secondaires ont été mises en évidence chez la plante de *Peganum harmala* L .Dont les alcaloïdes représentent les constituants les plus importants. Ces métabolites secondaires ainsi que leurs activités biologiques sont consignés dans le tableau suivant :

Tableau II : Les métabolites secondaires de *Peganum harmala* L.

Métabolites Secondaires	Molécules Identifiées	Activités biologiques reconnues	Références Bibliographiques
Alcaloïdes	B-carbolines	Antalgique	(FAROUK et al, 2009)
	Quinazolines	Antioxydante	(BAGHIANI et al, 2012)
Antibactérienne		(DARABPOUR et al, 2011)	
Antiparasitaire		(RAHIMI-MOGHADAM et al, 2011)	
Polyphénols	Flavonoïdes	Rôle « veinoactif »	(BRUNETON, 2009)
	Coumarines	Anti-œdémateuse	(SCHWEITZER-STENNER et UVERSKY, 2012)
	Quinones	Antibactérienne et antivirale	
Saponosides	NI	Antibactérienne et antitumorale	(BRUNETON, 2009)
Caroténoïdes	a –carotène, B-carotène	Activités	(PICKARD et al,

Partie bibliographique

		antitumorale	2009)
Huiles fixes	Terpènes et stéroïdes	Activité contre l'hypertension, le diabète, les anuries	(ASHTON, 2012)

NI : Non identifié

Chapitre 2: Stress oxydative et anti oxydative :

1. Stress oxydant :

Le stress oxydatif est caractérisé par un déséquilibre entre la production des espèces radicalaires et les capacités de défense antioxydante de l'organisme (figure 2) (BEAUDEUX et DURAND, 2011). La production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) est utile, mais peut être néfaste pour l'organisme lors d'une production excessive et en l'absence de mécanismes de défense. C'est ce que l'on appelle le stress oxydatif. Celui-ci peut causer des dégâts irréversibles pour la cellule et un déséquilibre complet dans l'organisme, comme le déséquilibre du transport d'électrons ou la vitesse de réaction des enzymes, qui entraîne la perte des fonctions de la cellule, ainsi qu'un vieillissement prématuré. Une des principales fonctions déclenchées par le stress oxydatif est la mort cellulaire programmée ou apoptose (GUILLOUTY, 2016). Il peut aussi favoriser la survenue de pathologies (cancers, maladies cardiovasculaires, maladies dégénératives) (BELAICH et BOUJRAF, 2016).

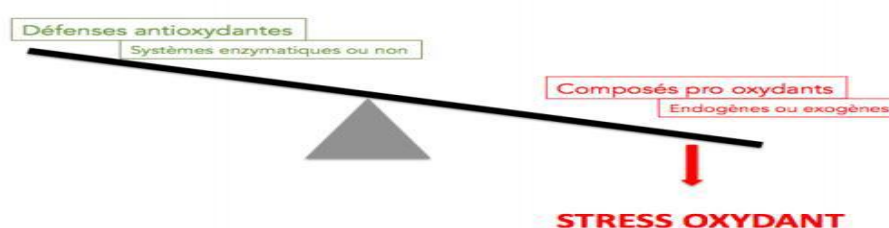


Figure 3 : stress oxydant : Déséquilibre de la balance oxydative (DURAND, 2018).

Partie bibliographique

2 Origine du stress oxydant

2.1 Origine endogène

2-1-1- Respiration mitochondriale

Les mitochondries sont des organites intracellulaires qui permettent principalement la synthèse d'énergie cellulaire, par la production d'Adénosine TriPhosphate (ATP). Elles convertissent de l'énergie issue des oxydations en molécule d'ATP, qui est nécessaire à la cellule.

2-1-2- Lipooxygénases

Les Lipooxygénases présentent aussi une source importante de production d'ERO dans les parois vasculaires. Ces enzymes catalysent l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) ou des acides gras estérifiés, comme les esters de cholestérol et celles trouvées dans les phospholipides, pour donner des dérivés d'acides gras hydro peroxydes toxiques pour la cellule (MADAMANCHI *et al.* 2005).

2-1 -3- Nitric oxide synthase

Nitric Oxide Synthase (NOS), générateur important du radical monoxyde d'azote (NO•), interagit avec l'anion superoxyde pour donner le peroxynitrite, composé extrêmement réactif et toxique. Le NO• et le peroxynitrite interagissent avec des protéines et peuvent altérer leurs propriétés (FAVIER, 2003).

2.2 Origine exogène

2-2-1- Les ultraviolets

Les rayons ultraviolets (UV) sont absorbés par des chromophores des molécules végétales, qui vont alors être excités pour fournir un oxygène singulet. Ils réduisent également l'oxygène (O₂) en anion superoxyde (O₂⁻), qui sera rapidement transformé par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), qui sera réduit à son tour en radical hydroxyle (OH) par la réaction de Fenton (GAMBINI et GRANIER, 2013).

Partie bibliographique

2-2-2- La pollution par ozone

L'ozone O₃ est un gaz très réactif, formé par réaction photochimique dans l'air à partir d'oxydes d'azote (NO_x) et de composés organiques volatiles. Les indices d'exposition à l'ozone pour la végétation qui ont été utilisés sont basés sur la concentration d'ozone dans l'air entourant les feuilles et les aiguilles.

2-2-3- Herbicides et pesticides

Les pesticides regroupent l'ensemble de substances qui sont utilisées pour prévenir, contrôler ou éliminer les organismes jugés indésirables. Les herbicides sont employés pour détruire les espèces adventices dites mauvaises herbes (VIALA, 1998).

2. Radicaux libres :

Un radical libre est un atome ou une molécule qui porte sur sa couche électronique périphérique un ou plusieurs électrons non appariés (ZWEIER et TALUNKDAR, 2006), c'est-à-dire non couplés à un électron de spin opposé. Cela entraîne une très haute réactivité chimique avec les éléments voisins (AFANAS'EV, 2009). Ces radicaux peuvent être dérivés de l'oxygène : les ERO ou d'autres atomes comme l'azote (Reactive Nitrogen Species : RNS) (FAVIER, 2003). Du fait de leur caractère très électrophile, les espèces radicalaires vont tenter de rattraper leurs électrons célibataires, en agressant toute molécule susceptible de se faire arracher un électron (LEHUCHER-MICHEL *et al.*, 2001).

L'espèce agressée devient à son tour radicalaire, initiant de cette façon un processus de réaction en chaîne qui se caractérise par trois étapes : (i) initiation, (ii) propagation et (iii) terminaison provoquant enfin une perturbation de la cellule vivante (KOECHLI-RAMONATXO, 2006).

2.1 Différentes formes de radicaux libres

Les radicaux libres sont regroupés en deux catégories l'une est appelée radicaux primaires et l'autre radicaux secondaires, qui se forme par réaction des radicaux primaires avec des composés biochimiques de la cellule (FAVIER, 2003).

Plusieurs réactions biologiques impliquent l'oxydation de substrats, où l'accepteur d'électrons est l'oxygène moléculaire (O₂). Ces types de réactions sont catalysés par un groupe

Partie bibliographique

d'enzymes métallo protéiques appelées "oxydases". Plus de 90% de l'oxygène consommé par les cellules est catalytiquement réduit par quatre électrons pour produire deux molécules d'eau. Cependant, l'O₂ peut être réduit par moins de quatre électrons, par certaines oxydases, donnant ainsi naissance à des espèces oxygénées, partiellement réduites et hautement réactives appelées espèces réactives de l'oxygène (TANIYAMA *et al.* 2003).

Les ERO sont soit radicalaires, qui sont des radicaux libres de l'oxygène à proprement dit comme le Superoxyde d'oxygène (O₂⁻) et le radical hydroxyle (OH⁻), ou les dérivés oxygénés non radicalaires, qui peuvent être des précurseurs de radicaux tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'oxygène singulet (figure 4)

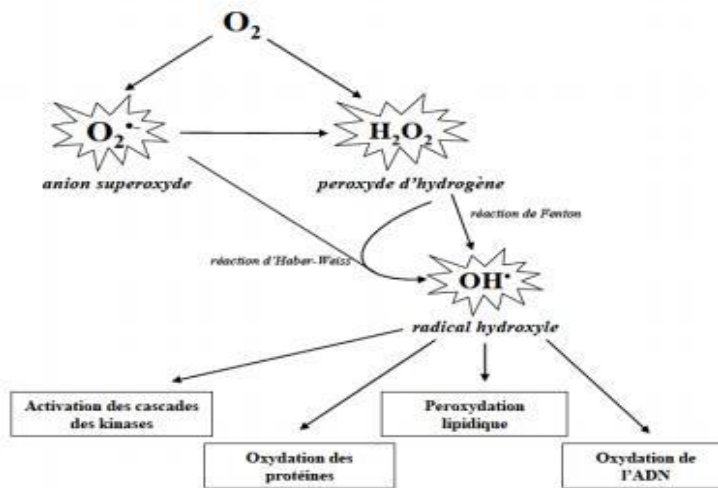


Figure 4 : Schéma des différentes formes des radicaux libres (GARAIT, 2006).

2.3 Principales cibles des ERO

Le radical hydroxyle cible principalement les acides gras polyinsaturés des lipides, en arrachant un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, c'est la peroxydation lipidique. Le déplacement des doubles liaisons provoque une augmentation croissante de la perméabilité des membranes cellulaires induisant une altération irréversible des propriétés fonctionnelles de la cellule, pouvant aller jusqu'à la lyse complète. La peroxydation lipidique aboutit à la formation de nombreux dérivés toxiques. Parmi ces dérivés, le malondialdéhyde (MDA) qui a une demi-vie plus longue que celle des radicaux libres et le 4-

Partie bibliographique

hydroxynonéal (4-HNE), qui se propage dans tous les tissus et en grande quantités (FAVIER, 2003).

3. Antioxydant :

Un antioxydant désigne une molécule qui empêche l'oxydation de substances chimiques à leurs contacts. Ils sont présents sous de nombreuses formes et peuvent intervenir en prévention de la formation des radicaux libres, aussi bien que pour participer à leur élimination (WAINSTEN, 2009).

3.1 Différents types et sources d'antioxydants

3.1.1 Endogène : les systèmes de défense enzymatiques des radicaux libres

❖ Superoxyde dismutase (SOD)

SOD est une enzyme primaire essentielle qui réagit contre les produits toxiques du métabolisme cellulaire (SEIB *et al*, 2006). Il s'agit d'une des premières lignes de défense contre les ERO. Leur cible privilégiée est l'anion Superoxydes (O_2^-), qu'elle transforme en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (JOHNSON et GIULIVI, 2005).

❖ Catalases

Les catalases sont localisées dans les peroxysomes. L'activité de la catalase est coordonnée avec la concentration en H_2O_2 (LEHUCHER-MICHEL *et al*, 2001).

❖ Glutathion peroxydase

Les glutathion peroxydases sont localisées dans le cytosol, le réticulum endoplasmique et dans la membrane interne des mitochondries. Elles permettent de réduire H_2O_2 en H_2O , en parallèle de l'oxydation du glutathion (THEROND, 2003).

3.2.2 Exogène : antioxydants non enzymatiques

❖ Vitamine E

La vitamine E est un mélange de molécules comptant principalement α -tocophérol (figure 3), β tocophérol, γ -tocophérol ou encore δ -tocophérol (RICCIARELLI, 2001, (figure 5).

Partie bibliographique

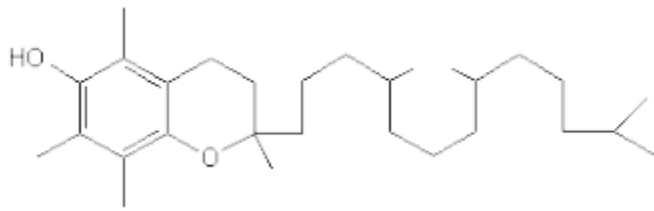


Figure 5 : molécule d' α -tocophérol, (PINCEMAIL *et al*, 1998).

La forme α est biologiquement la molécule la plus active de la vitamine E. Elle est liposoluble et se fixe à la membrane cellulaire et inhibe la chaîne de réactions de peroxydation des lipides, en capturant un radical lipidique peroxyde (LOO°). Elle devient à son tour un radical moins actif que le LOO° et pourra alors être prise en charge par une autre molécule antioxydante (EVANS, 2000).

❖ Vitamine C

L'acide L-ascorbique de formule $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ présente deux carbones asymétriques, une fonction lactone, deux fonctions alcool, puis une fonction ène-diol ($\text{HO} - \text{C} = \text{C} = \text{OH}$) (figure 4). C'est cette dernière fonction qui est responsable de son activité biologique par ses propriétés réductrices (MARC *et al*. 2004), (figure6).

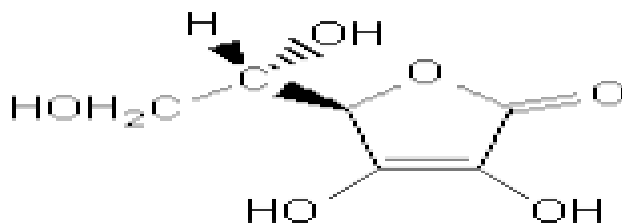


Figure 6: structure de la vitamine C (SEKLI-BELAIDI, 2011).

La vitamine C est hydrosoluble et localisée dans le cytosol et le fluide extracellulaire, elle capte directement l' O_2^- et l' OH^- (COMHAIR et ERZURUM, 2002). Elle empêche l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL), produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Elle peut aussi réduire le radical α -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (EVANS, 2000).

❖ Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles jaunes, orangés à rouges, synthétisés par les plantes et les microorganismes (figure 5). En plus de leur activité de provitamine A, les caroténoïdes sont capables d'inactiver l'oxygène singulet et les radicaux libres en neutralisant

Partie bibliographique

l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (CUZZOCREA *et al.* 2001).(figure 7) .

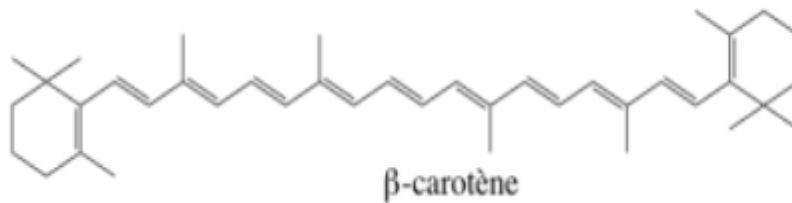


Figure 7 : structure d'un caroténoïde (BRUNETON, 1999).

3.2.2.1 Oligoéléments

Les oligo-éléments ne sont pas des antioxydants en tant que tels, mais agissent comme cofacteurs des enzymes constituant la première ligne de défense face aux attaques oxydatives. Il s'agit en réalité de catalyseurs redox de ces enzymes. Leur apport par l'alimentation permet donc de maintenir le bon fonctionnement de la machinerie antioxydante cellulaire et donc l'équilibre oxydatif (GUILLOUTY, 2016).

Les oligoéléments antioxydants sont des micronutriments qui sont fortement impliqués dans l'homéostasie énergétique. Ce sont des cofacteurs indispensables pour des réactions métaboliques d'enzymes antioxydantes, comme le superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase. Il s'agit principalement du cuivre, du manganèse, du sélénium et du zinc (GUILLOUTY, 2016).

❖ Le cuivre

Le cuivre favorise la synthèse des protéines et entre dans différents processus métaboliques de la plante. Il se comporte également comme un antioxydant, en stimulant la superoxyde dismutase, protégeant ainsi la cellule contre l'effet toxique des radicaux libres (DUSEK *et al.* 2015).

❖ Le manganèse

Les fonctions du manganèse, composant essentiel de nombreuses enzymes, concernent la synthèse de protéines (FITSANAKIS *et al.*, 2009). Lorsque l'on observe un déficit ou une diminution de la biodisponibilité du manganèse dans les tissus riches en mitochondries, on observe parallèlement une inactivation du superoxyde dismutase-manganèse (SOD-Mn), ce qui peut augmenter le stress oxydant (GUILLOUTY, 2016).

Partie bibliographique

❖ Le sélénium

Le sélénium ressemble au soufre, auquel il peut se substituer. Il est métabolisé par les plantes en petite quantité et il remplace le soufre pour former les acides aminés. Le sélénium permet à l'organisme de produire la glutathion peroxydase qui contribue à préserver les cellules de l'oxydation par les radicaux libres, notamment celles pour lesquelles l'élimination des toxines est indispensable à leur bon fonctionnement (THEROND, 2003).

❖ Le zinc

Le zinc intervient dans la synthèse des protéines et de l'amidon des végétaux. Il protège aussi la plante des stress oxydants en conditions de forte lumière et de sécheresse. Du fait de la liaison avec des protéines, le zinc est impliqué aussi dans de nombreuses réactions métaboliques par l'intermédiaire de métallo enzymes, notamment l'anhydrase carbonique ou le superoxyde dismutase, précurseurs de la chaîne des radicaux libres. C'est de cette façon que le zinc est impliqué comme un antioxydant (BOSCO *et al.*, 2010).

3.2.2. 2Poly phénols

Les poly phénols ou composés phénoliques forment le groupe de composés phytochimiques le plus important chez les plantes. C'est aussi le groupe avec le plus grand nombre de substances et une large distribution dans le règne des végétaux (BETA *et al.*, 2005).

Les poly phénols sont des molécules organiques hydrosolubles. Ils sont issus du métabolisme secondaire des plantes. Ils forment un ensemble de molécules comportant au moins un groupe phénolique dans leur structure et sont en général de haut poids moléculaire (HOFFMANN, 2003).

Les poly phénols sont présents en faible concentration dans le plasmodesme du végétal et sont principalement retrouvés sous forme conjuguée. Leurs interactions avec des cibles protéiques leur assure des effets antiathérogéniques, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques et anti-cancérigènes (STEVENSON et HURST, 2007).

❖ **Acides phénoliques**

Les acides phénoliques sont des composés simples, formés par un seul noyau phénolique et au moins un groupement dont un parmi eux se termine par une fonction acide. Le nombre de carbone dans la chaîne renfermant la fonction acide définit le type d'acide phénolique : l'acide gallique (figure 6), l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide protocatéchique et l'acide sinapique (HSU *et al.*, 2006 et HALE, 2003) ,(figure8)

Partie bibliographique

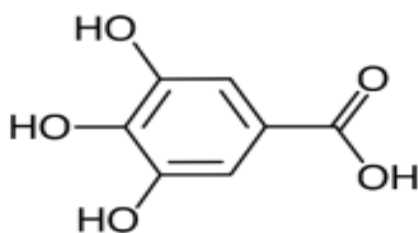


Figure 8 : structure de l'acide gallique (BRUNETON, 2009).

Les acides phénoliques sont contenus dans un certain nombre de plantes médicinales. Ils ont plusieurs effets, par exemple antioxydants et anti-inflammatoires (PSOTOVÀ *et al.* 2003). Il existe des acides phénoliques anticancéreux tel que : l'acide férulique, l'acide caféique et l'acide gallique (HALE, 2003).

❖ Flavonoïdes

Les flavonoïdes (figure 7) représentent le groupe le plus vaste et le plus distribué dans le règne végétal (LAWSON, 2006). Ce sont des pigments qui sont responsables de la coloration des fruits et des fleurs.

Les flavonoïdes ont plusieurs rôles tels que la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV, mais aussi un rôle dans la défense des plantes contre les microorganismes pathogènes (Figure 9)

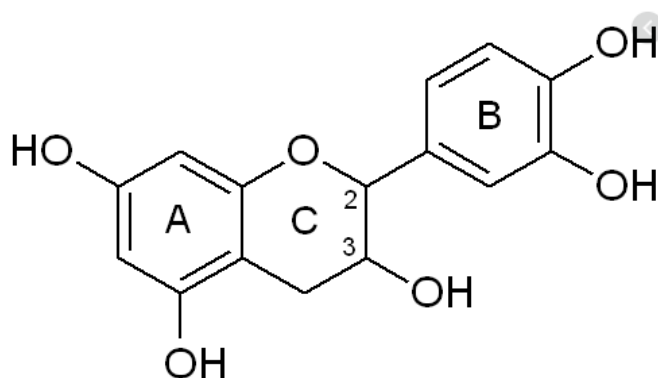


Figure 9 : structure de base des flavonoïdes (HELLER et FORKMAN, 1993).

Les flavonoïdes expriment les propriétés anti oxydantes par : (i) le piégeage direct des ERO, (ii) la suppression de la formation des ERO par l'inhibition de quelques enzymes ou par

Partie bibliographique

chélation des ions métalliques impliqués dans la production des ERO, (iii) la protection des systèmes de défense antioxydants de l'organisme (COTELLE, 2001).

❖ Tanins

Les tanins sont caractérisés par leur capacité antioxydante et leur propriété thérapeutique (COWAN, 1999). Les tannins sont subdivisés en deux classes différentes distribuées chez les végétaux supérieurs : (i) tanins hydrolysables, qui sont des esters d'un sucre (généralement le glucose) et de molécules d'acide phénolique (acide gallique dans le cas des tanins galliques, ou acide hétéroxydiphénique (HHDP) dans le cas des tannins ellagiques), (ii) tanins condensés, qui ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes.

Chapitre 3 :L'inflammation

L'inflammation ou réaction inflammatoire est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression. Ce processus comprend :

Des phénomènes généraux : exprimé biologiquement par le syndrome inflammatoire et cliniquement de façon variable, le plus souvent par de la fièvre et éventuellement une altération de l'état général.

Des phénomènes locaux : L'inflammation se déroule dans le tissu conjonctif vascularisé.

Les tissus dépourvus de vaisseaux (cartilage, cornée) sont incapables de développer une réaction inflammatoire complète. Les tissus épithéliaux n'ont pas de rôle actif dans le déroulement de la réaction inflammatoire mais ils peuvent être altérés par l'agression qui déclenche l'inflammation puis être réparés au cours de la phase terminale de l'inflammation.

La réponse inflammatoire peut être divisée en trois phases :

- Une phase d'initiation : qui fait suite à un signal de danger d'origine exogène ou endogène et qui met en jeu des effecteurs primaires.
- Une phase d'amplification avec la mobilisation et l'activation d'effecteurs secondaires.
- Une phase de résolution et de réparation qui tend à restaurer l'intégrité du tissu agressé.

Partie bibliographique

L'inflammation est un mécanisme mis en jeu pour favoriser l'élimination de l'infection et /ou la réparation des tissus lésés. C'est un processus normalement véhiculé par des cellules dites inflammatoire telles que les macrophages et les neutrophiles mais aussi par les cellules endothéliales. (Figure 10)

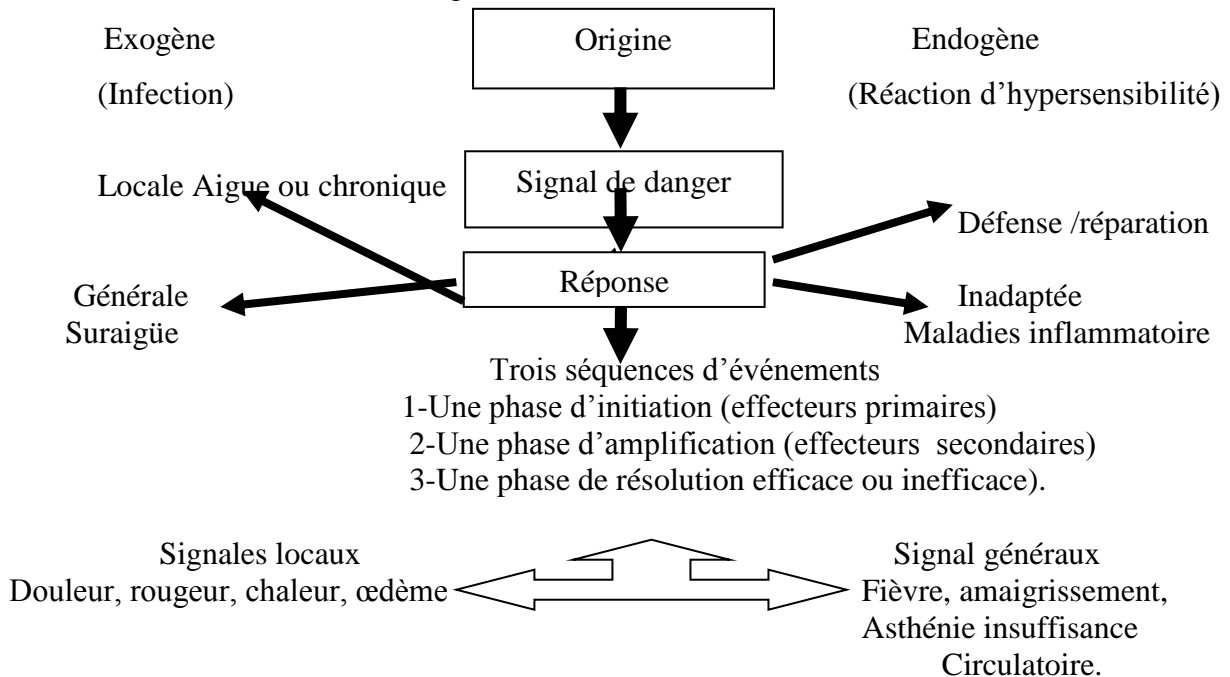


Figure 10 : la réaction inflammatoire schématisée

Les causes de la réaction inflammatoire sont multiples et aboutissent à des lésions cellulaires et tissulaires irréversibles. Parmi ces causes nous pouvons citer :

- Infection : contamination par des micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons)
- Agents physiques : traumatisme, chaleur, froid, radiation ;
- Agents chimiques : caustiques, toxines, venins ;
- Corps étrangers : exogènes ou endogènes modifiés ;
- Défaut de vascularisation : réaction inflammatoire secondaire à une nécrose par ischémie (HOFFMANN, 1999).

L'inflammation fait intervenir des cellules, des vaisseaux, des modifications de la matrice extracellulaire et de nombreux médiateurs chimiques qui peuvent être pro ou anti-inflammatoires et qui peuvent modifier ou entretenir la réponse inflammatoire.

Quelque soit son siège, et la nature de l'agent pathogène, le déroulement d'une réaction inflammatoire présente des caractères morphologiques généraux et des mécanismes communs. Néanmoins, les différentes étapes présentent des variations liées à la nature de l'agent

Partie bibliographique

pathogène, à l'organe où se déroule la réaction inflammatoire, au terrain physiologique de l'hôte. Tous ces éléments conditionnent l'intensité, la durée de la réaction inflammatoire et l'aspect lésionnel.

(figure11)

Partie bibliographique

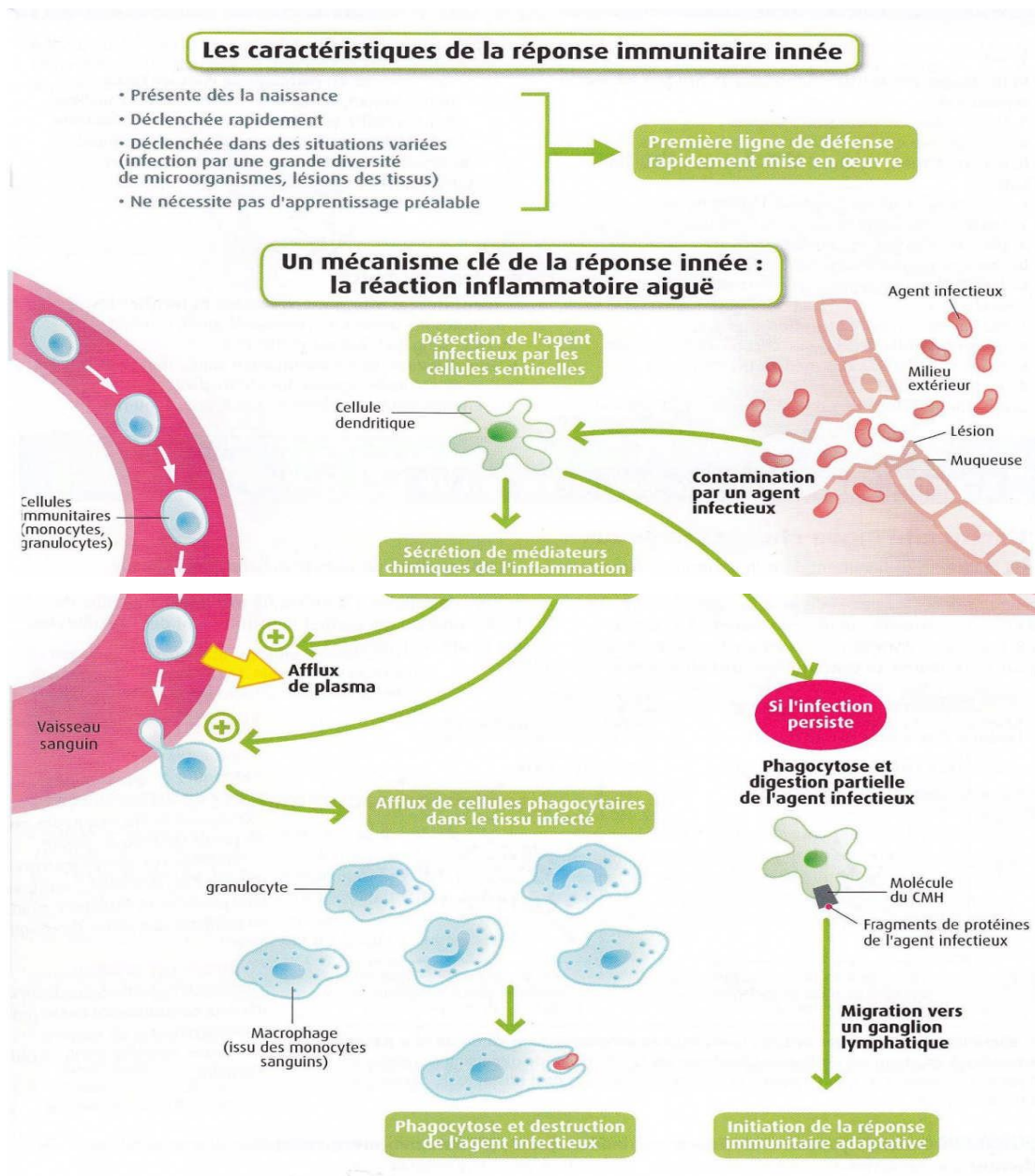


Figure 11 : Déroulement de la réaction anti-inflammatoire (BREEDVELD., 2000).

Partie expérimentale

Nous avons mené une étude analytique, réalisée au sein du laboratoire du département de biologie (laboratoire LABAB), faculté des sciences biologiques et agronomiques de l'université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou.

Nous nous sommes intéressés aux activités biologiques issues des métabolites secondaires d'origine végétale. Nous avons évalué in vitro les effets biologiques des extraits aqueux de feuilles de deux plantes médicinales à savoir *Peganum harmala* L et *Verbascum sinuatum* L. Nous avons ainsi mis en évidence leurs activités antioxydantes et anti-inflammatoire, ainsi que le dosage des alcaloïdes et des flavonoïdes des extraits aqueux de ces plantes.

1 - Matériel et méthodes :

1-Matériel végétal :

La récolte de la plante *Peganum harmala* L a été effectuée au mois d'avril 2015 dans la région de Timzerth dans la wilaya de Laghouat. Les feuilles de *Verbascum sinuatum* L ont été récoltées au mois de mai 2017 à Addekar Asif El Hemmam dans la wilaya de Bejaia.

La partie aérienne des deux plantes sont nettoyées ensuite séchées à l'ombre, à l'abri de l'humidité et à une température ambiante puis conservées dans des sacs en papier jusqu'à l'utilisation.

2-Matériel utilisé :

Appareillages et autres matériels utilisés dans notre travail se résument dans le tableau suivant :

Tableau III : tableau récapitulatifs des appareils et matériels utilisés.

Partie expérimentale

Appareillage	Verre	Autres matériels
Lyophilisateur	Erlenmeyer	Filtre
Spectrophotomètre	Fiole jaugée	
Centrifugeuse	Entonnoir	Papier de Wattman
Agitateur magnétique	Tubes à essais	
Balance de précision	Flacons en verre	Pipette
	Bécher	
	Eprouvette graduée	

3-Réactifs et solvants :

Les réactifs et produits chimiques utilisés lors de notre étude sont cités dans le tableau suivant :

Tableau IV : tableau récapitulatif des réactifs et produits chimiques utilisés.

Réactifs et produits chimiques	Rôle
Eau distillée	Utilisée pour les interventions pouvant nécessiter une hygiène irréprochable et comme solvant pour l'extraction aqueuse.
Ovalbumine	Joue un rôle dans la coagulation du blanc.
Ethanol (96°)/Méthanol	Extraction des polyphénols par solvant.
Acide ascorbique (Vitamine C)	Un puissant antioxydant qui lutte contre les radicaux libres.
DPPH (0,002%)	Mesurer le pouvoir anti-radicalaire de molécules pures ou d'extraits végétaux.
Acide acétyle salicylique(Aspirine)	Utilisé comme standard dans l'activité anti-inflammatoire.
FeCl₃	Utilisé dans le dosage des alcaloïdes.
HCl	Utilisé dans le dosage des alcaloïdes.
AlCl₃	Utilisé dans le dosage des flavonoïdes.

Partie expérimentale

4-Méthode de préparation des extraits aqueux :

5-Préparation des extraits aqueux des feuilles de *Peganum harmala L* et *Verbascum sinuatum L* :

Pour préparer les extraits aqueux de *Peganum harmala L*. et de *Verbascum sinuatum L*, on pèse 10 g de poudre des feuilles de chaque plante, les solubiliser dans 100 ml de l'eau distillée pour *Peganum* et 200 ml de l'eau distillée pour *Verbascum*. Après incubation de ces deux mélanges à température ambiante pendant 24 h, les macérâts sont ensuite filtrés à l'aide d'une passoire et du papier Wattman .L'extrait aqueux de *Verbascum* obtenue est directement porté à congélation à -80°C tandis que celui de *Peganum* est centrifugé deux fois (3000g /10 min) Puis congelé à -80°C

Après congélation, les deux extraits sont lyophilisés.Les lyophilisats obtenus sont conservés à 4°C.

6-Evaluation de l'activité antioxydante :

❖ Piégeage du radical libre par DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazil) :

Afin d'étudier l'activité anti-radicalaire de nos extraits, nous avons utilisé la méthode basée sur le DPPH, la méthode 2-2-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un test standard utilisé pour évaluer les propriétés antioxydantes.

Elle est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2-2-diphényle-1-picrylhydrazil (DPPH).Ce dernier est un radical stable soluble dans le méthanol ou éthanol qui présente une absorption à 515 nm qui lui confère une coloration violette, cette couleur passe du violet au jaune lorsque le DPPH est réduit en diphenypicrylhydrazine par un capteur de radicaux libres, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu. Ce changement de couleur est suivi par spectroscopie UV-visible. La réaction peut être résumée sous la forme de l'équation :



Où AH est un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH pour le transformer au DPPH-H.

Du point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH est recommandé pour des composés contenant les groupes SH, NH et OH.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'acide ascorbique (Vitamine C) comme un antioxydant standard. L'évaluation de l'activité anti-radicalaire en utilisant la méthode DPPH

Partie expérimentale

est exprimée en pourcentage d'inhibition (I%) selon la relation suivante (Bouhlali et *al.*, 2016) :

$$\% I = (\text{Abs C contrôle} - \text{Abs test} / \text{Abs contrôle}) \times 100$$

L'indice **IC50** (inhibitory concentration) montre les concentrations de l'antioxydant qui sont nécessaire pour faire décroître la concentration initiale du DPPH. De 50% (Sanchemoreno et *al.*, 1998).

Pour préparer la solution mère de la vitamine C on a utilisé 1g d'acide ascorbique dans 50ml d'éthanol dans un bécher et on le met dans l'homogénéisateur afin d'obtenir une solution mère homogène d'une concentration de 20mg/ml.

❖ Une gamme d'étalon de l'acide ascorbique a été préparée selon le tableau suivant :

Tableau V: gamme étalon de l'acide ascorbique.

Tube	1	2	3	4	5	6	4
Concentration en µg/ml	30	60	90	120	150	180	200
Volume de la solution mère en µl	150	300	450	600	750	900	1000
Volume d'éthanol ajouté en µl	850	700	550	400	250	100	0

7- Evaluation d'activité anti inflammatoire :

L'évaluation in vitro de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée selon le protocole Chandra et *al.*, (2012) . Les différentes étapes sont résumées dans la figure suivante :

1 ml de solution d'ovalbumine à 2% Préparée dans de l'eau distillée

+

1 ml de solution d'extrait à différentes concentrations (100-200-300-400-500µg/ml)



Incubation à 72°C pendant 5 min dans un bain marine et refroidissement immédiat dans L'eau froide



Partie expérimentale

Lecture des absorbances au spectrophotomètre à 660 nm.

Figure 12 : Schéma récapitulatif de l'évaluation in vitro de l'effet anti-inflammatoire

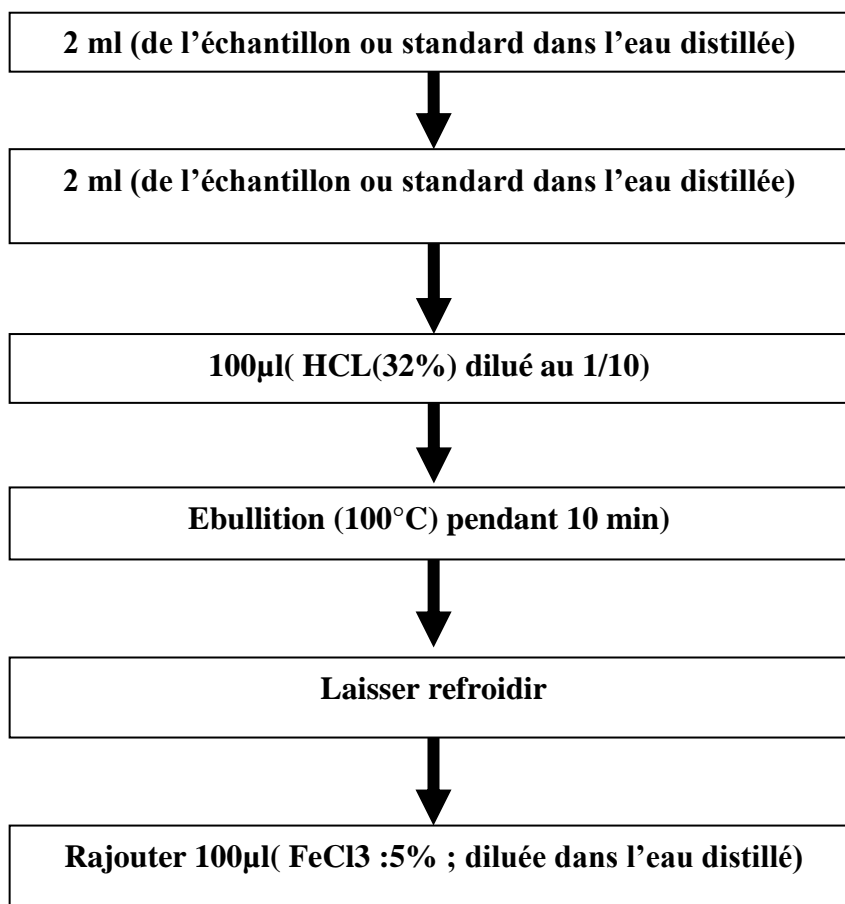
(Chandra et *al.*, 2012)

8-Dosage spectrophotométrique des alcaloïdes et des flavonoïdes :

8-1-Dosage des alcaloïdes :

L'estimation de la teneur en alcaloïdes a été effectuée et déterminée par la méthode spectrophotométrique suivant le protocole de PATEL et *al*(2015) ; TABASUM et *al*(2016) optimisé par nos soins. Le principe du dosage repose sur la réaction des alcaloïdes avec le chlorure ferrique (FeCl_3) et leur capacité à former des complexes colorés.

L'intensité de la couleur dont l'absorbance maximale est de 380 nm est proportionnelle à la quantité des complexes formés dans la fraction végétale d'alcaloïdes et nos s'extrait aqueux. Le dosage des alcaloïdes dans nos échantillons est basé sur l'utilisation d'une courbe étalon, cette dernière est réalisée en utilisant la colchicine comme standard à différentes concentrations (20-40-60-80-100-120 $\mu\text{g/ml}$). Selon le protocole suivant :



Partie expérimentale



Lecture des absorbances à 380 nm

Figure 13 : protocole de dosage des alcaloïdes (Patel et *al.*2015 et Tabasum et *al.*, 2016).

Les concentrations des alcaloïdes sont déduites à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la colchicine et sont exprimés en microgramme équivalent de colchicine par milligramme d'extrait.

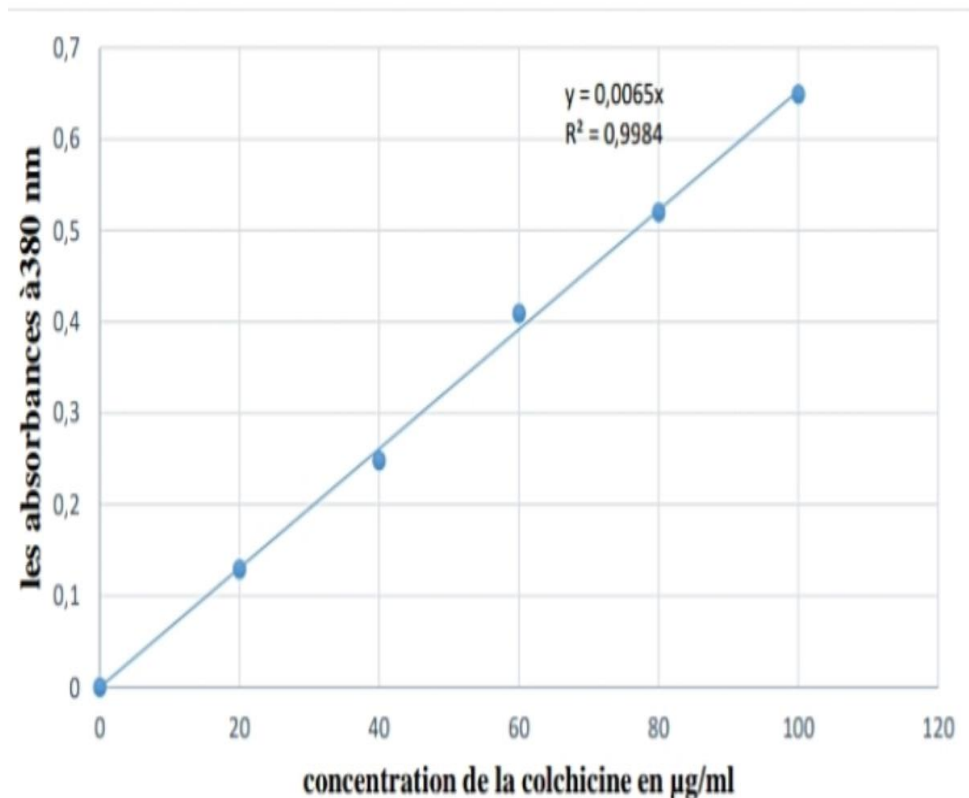


Figure14: courbe étalon de la colchicine

8-2-Dosage des flavonoïdes :

Le dosage des flavonoïdes est effectué suivant le protocole de BAHORUN et *al.*(1996).

Le principe de cette méthode repose sur la capacité des flavonoïdes à chélater les métaux (chlorure d'aluminium $AlCl_3$) et de former ainsi un complexe de coloration jaunâtre.

Partie expérimentale

L'intensité de la couleur dont l'absorbance maximale est de 430 nm est proportionnelle à la quantité des complexes formés. La concentration des flavonoïdes ainsi déduite à partir d'une courbe d'étalonnage (figure 16) réalisée par un standard représenté par la quercétine à différentes concentrations (10-60 µg/ml). Les densités optiques obtenues pour le dosage d'alcaloïdes ainsi que les flavonoïdes sont la moyenne de trois essais plus au moins une erreur standard.

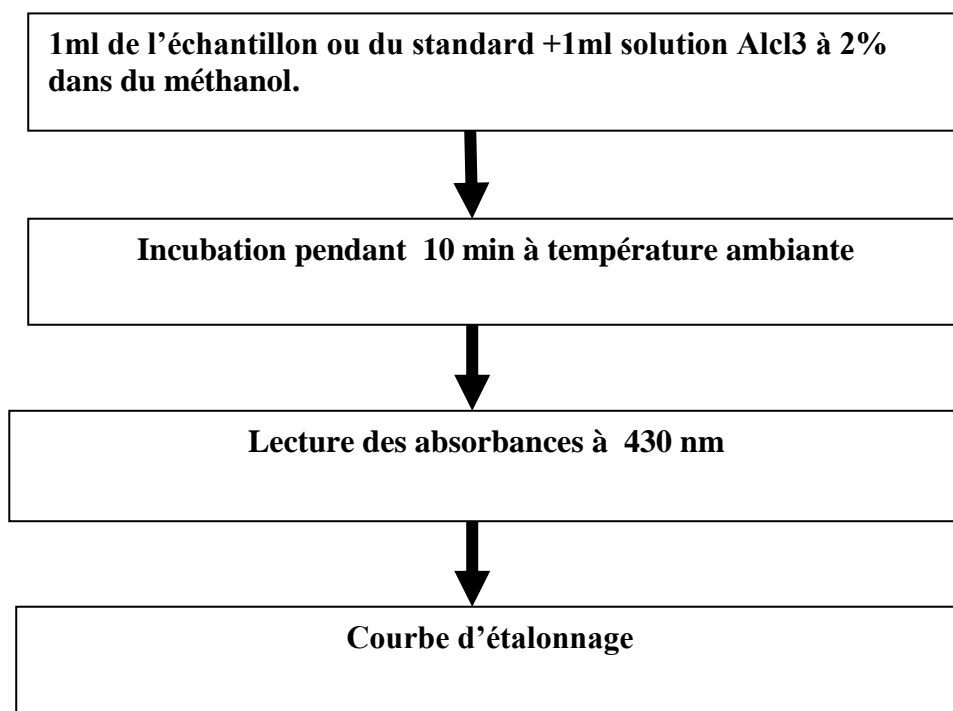
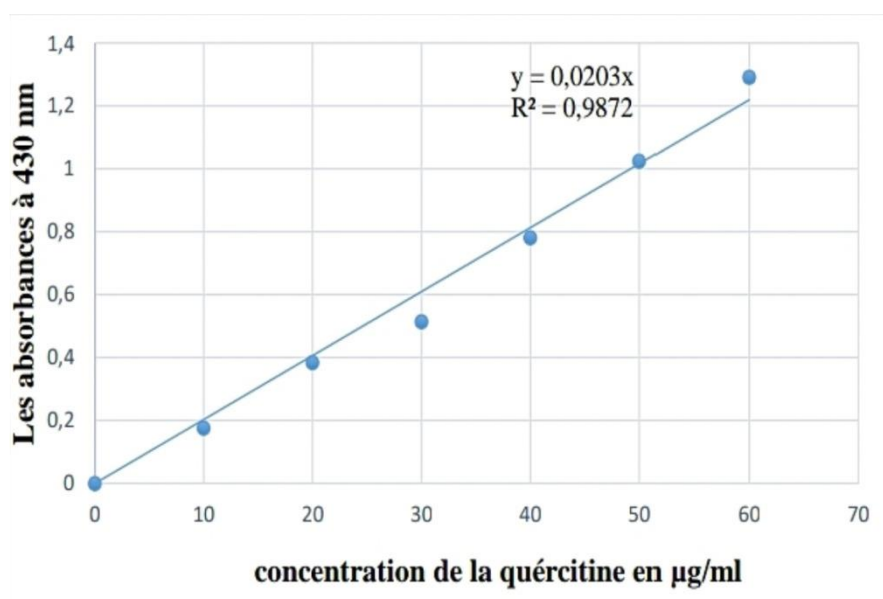


Figure 15 : protocole d'extraction des flavonoïdes (Bahorm et *al.* 1996).

Les concentration des flavonoïdes sont déduites à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine, et sont exprimées en microgramme équivalents par milligramme d'extrait.

Figure 16: courbe étalon de quercétine.

Partie expérimentale



II-Résultats et discussions :

2-1-Evaluation in vitro de l'activité antioxydant des extraits aqueux des feuilles de *Peganum harmala L* et *Verbascum sinuatum L* :

La mesure de l'absorbance (ou densité optique DO) a été effectuée par spectrophotométrie à 515 nm, à partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages.

Les extraits aqueux des feuilles de nos deux plantes révèlent un effet antioxydant d'un pourcentage d'inhibition, allant de 77,466% à 93,066% pour *Verbascum sinuatum L*, et de 99,354% à 99,870% pour *Peganum harmala L*.

L'acide ascorbique est utilisé comme standard ayant un pourcentage d'inhibition allant de $26,93 \pm 0,014\%$ à $79,860 \pm 0,008\%$. Les pourcentages d'inhibition de l'activité ascorbique sont déterminés dans le tableau VI.

Tableau VI : pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique (vitamine c).

[] mg/ml	0,03	0,06	0,09	0,12	0,15	0,18	0,2
%I±ES	26,930± 0,014	25,590± 0,002	36,960± 0,005	48,78± 0,015	60,700± 0,011	70,250± 0,020	79,860± 0,008

Partie expérimentale

ES : erreur standard

(Figure17)

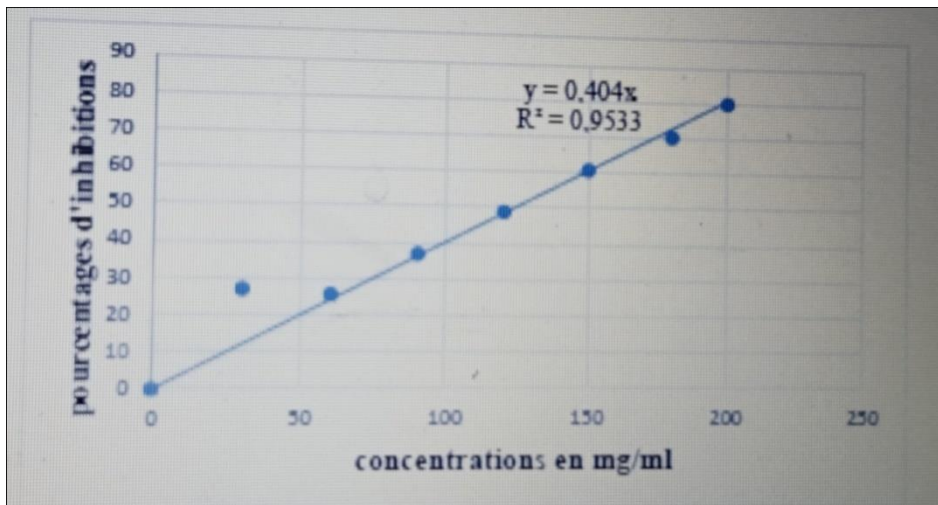


Figure 17 : courbe de l'effet antioxydant de l'acide ascorbique.

Selon les résultats des pourcentages d'inhibition (tableau VI) on constate que la vitamine c à une activité antioxydant très élevé de $79,860 \pm 0,008\%$

Partie expérimentale

Les antioxydants sont des protecteurs chimiques dont la fonction est d'empêcher les ERO (espèces réactives de l'oxygène) d'atteindre leurs cibles biologiques (ADN, lipides et protéines). Leur efficacité est étroitement liée à leur aptitude à capter les radicaux libres.

(Gardes et al, 2003)

Les composés antioxydants sont définis comme toutes substances qui présentent à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat (Halliwell, 1990).

Le composé chimique 2,2-diphényle-1-picrylhydrozyle (DPPH) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques, il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères. DPPH* reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire, la délocalisation provoque aussi la couleur bleu bien caractéristique de la solution de DPPH*.

La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue (Cristina et al, 2009)

(Stankovic et al 2012), montrent que l'extrait analysé est un mélange de plusieurs composés par rapport au standard utilisé pour la comparaison

En effet cette propriété antioxydante est en relation directe avec la structure chimique de ces molécules (Cosio et al, 2006).

Les résultats des activités antioxydantes sont généralement exprimés en fonction d'une molécule de référence possédant une grande propriété antioxydante (Holmi, 2015).

L'activité anti-radicalaire des différents extraits et de l'antioxydant standard (acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée en suivant la réduction de ce radical DPPH en composés DPPH-H. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti-radicalaires, tous les extraits manifestent un pouvoir anti-radicalaire envers le DPPH. Signalons que plus la valeur de l'IC 50 est moins importante, plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

L'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées (Suhaj, 2006 Tadhani, Potel, et Subhash, 2007).

Partie expérimentale

Les moyennes des IC50 :

L'étude de la variation de l'activité anti-radicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (IC 50) est faible plus l'extrait est puissant vis-à-vis des radicaux libre.

La valeur IC50 est la concentration qui assure la réduction de 50% du DPPH, déterminée graphiquement pour chaque extrait à partir de la courbe du pourcentage de réduction en fonction de la concentration (samarth et al, 2008)

Les teneurs moyennes des IC50 en mg/ml des extraits aqueux des feuilles de nos deux plantes présente une activité antioxydante moyenne avec des IC50 de l'ordre 0.394 ± 0.0175 mg/ml pour *Verbascum sinuatum* L, 0.194 ± 0.0175 mg/ml pour *Peganum harmala* L. Ces résultats sont représentés dans le tableau VII suivant :

Tableau VII : IC50 moyen en mg/ml de standard (vitamine C) et des différents extraits de feuilles de nos deux plantes étudiées.

	Standard	<i>Verbascum</i>	<i>harmala</i>
IC50±ES (mg/ml)	0.126±0.006	0.0394±0.0175	0.194±0.0175

D'après les résultats illustrés dans le tableau VII on constate que *Verbascum* a un effet antioxydant plus élevé d'un IC50 0.0394 ± 0.0175 mg/ml par rapport au *harmala* 0.194 ± 0.0175 mg/ml et moins élevé par rapport à notre standard de 0.126 ± 0.006 mg/ml.

Ces résultats indiquent que *Verbascum* est doté d'une activité antioxydante remarquable par rapport au *harmala*.

Comparativement au standard dont l'IC50 est de $0,126 \pm 0,006$ mg/ml, notre extrait avec une IC50 de $0,194 \pm 0,0175$ mg/ml est relativement moins efficace vis-à-vis des radicaux hydroxyles.

Un effet anti-radicalaire contre le radical stable DPPH de 90% dépassant même l'effet des molécules utilisés comme référents exprimant des IC50 0,002 et 0,003 mg/ml un effet plus élevé par rapport à nos résultats de 0,188 et 0,164 mg/ml.

L'extrait aqueux de *Verbascum sinuatum* L, testé au DPPH à une capacité antioxydante élevée des IC50 calculé qui est de $0,0098 \pm 0,0007$ mg/ml.

Il ressort de nos résultats que l'activité antioxydante des extraits aqueux de *Verbascum sinuatum* L et de *Peganum harmala* L, est légèrement inférieure par rapport à ceux obtenues avec l'acide ascorbique. Néanmoins nos extraits aqueux reste dotés d'une capacité antioxydante relativement importante comparativement à la vitamine C.

Partie expérimentale

Les IC50 sont inversement proportionnelles à l'effet antioxydant dont les valeurs faibles reflètent un effet anti radicalaire important (villano et al, 2007).

En effet ; certains auteurs désignant une augmentation de cette activité antioxydante explique cela par la formation des nouveaux composés à activité antioxydante qui influencent positivement sur l'espèce végétal en renforçant sa défense antioxydante (Tomaino et al ,2005).

Les antioxydants sont divisés en deux groupes : les primaires et les secondaires (Gramza,et Korczak,2005).les poly phénols peuvent d'une part être classés comme antioxydant primaires car ils interrompent la chaîne radicalaire et former un radical stable en cédant un hydrogène ou un électron et d'autre part comme antioxydants secondaires car ils peuvent complexer.

Piéger ou décomposer diverses molécules impliquées dans la production des radicaux libres (oxygène, ions métalliques, peroxydes).selon Hu, (2011) les polyphénols peuvent exercer leur pouvoir antioxydant de deux façon :

- Soit directement en piégeant et désactivant les molécules réactives de l'oxygène.
- Soit indirectement en influant et améliorant l'expression d'enzymes antioxydants et de protéines cytoprotectrices.

En effet, les poly phénols sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal qui ont une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé (Koechlin-Ramonatxo et al, 2006).

Les propriétés anti oxydantes des poly phénols sont étroitement liées à leurs structures chimiques (Rice et al, 1995 ;Acker et al,1996).

Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la production et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires, ils sont également utilisés comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Suhaj, 2006).

2-2-Evaluation in vitro de l'activité anti-inflammatoire des extraits aqueux des feuilles *Verbascum sinuatum L* et *Peganum harmala L* :

La détermination de l'activité anti-inflammatoire des extraits végétaux se fait selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines qui est présenté sous forme de

Partie expérimentale

pourcentage allons de 40,518 % et 28,064% pour *Verbascum sinuatum* L et 43,544% et 53,423% pour *Peganum harmala* L. A partir de ces résultats on peut conclure que la plante *Peganum harmala* L présente un effet anti-inflammatoire que la plante de *Verbascum sinuatum* L.

Les extraits *Peganum harmala* L et *Verbascum sinuatum* L ont la capacité de la production d'auto-antigène par l'inhibition de la dénaturation des protéines.

L'activité inhibitrice de la dénaturation de l'ovalbumine est peut être attribuée à la présence de différents composés bioactifs tels que les flavonoïdes et les tanins (sangeetha, 2011).

Les plantes médicinales à propriétés anti-inflammatoires sont utilisées afin d'éviter plusieurs effets néfastes associés aux anti-inflammatoires synthétiques de nombreuses investigations indiquent que les activités anti-inflammatoires des plantes pourraient être attribuées à leur contenu en composés phytochimiques (Geng et al, 2014).

La réaction inflammatoire est la réponse de l'organisme à une agression dont l'origine est physique (chaleur, froid, rayonnement, ionisants...) ou exogène par des éléments solides (des pathogènes microbiens, des piqûres d'insecte, des produits chimiques ou biologiques) ou liée à des éléments endogènes tel que des composés issus de la réaction immunitaire (complexes immuns, anti corps cytotoxiques, cytokine (Rizvi et al, 2011)).

L'inflammation est la première ligne de défense de l'organisme, elle est souvent suivie par une vasodilatation qui permet aux cellules et à certaines molécules de migrer du sang vers les tissus où elles s'attaquent, favorisant les rougeurs, la chaleur et la douleur (Pacheco-Sanchez et al, 2006 ; Geng et al, 2014)

L'activité anti-inflammatoire des extraits pourrait être due à l'interaction de certains composants avec deux sites présents au niveau de certaines protéines comme l'ovalbumine, de liaisons riches en tyrosine, thréonine et lysine ont rapportés que les composants des plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle, exercent leurs effets pharmaceutiques grâce à leur capacité de se lier aux protéines plasmatiques (Williams et al., 2002 ; Lu et al., 2008).

L'activation in contrôlée ou pour changée de l'inflammation peut entraîner des altérations dangereuses, tel que la méthode de la dénaturation des protéines, ces derniers subissent une perte de leur structure, entraînant l'exposition l'auto-antigènes, montrent que la méthode de dénaturation des protéines est la plus couramment utilisée pour l'évaluation in vitro de l'activité anti-inflammatoire des extraits végétaux (Clos et al., 2012 ; Rathisre et al, 2013).

Partie expérimentale

Les structures spéciales des protéines (conformation) sont sensibles à l'environnement (chaleurs, ph, force ionique, solvant ect..) et changent alors de façon irréversible de forme : dénaturation.

L'ovalbumine de l'œuf est une protéine de réserve, globulaire, soluble dans l'eau .Elle est sensible à l'élévation de la température (coagulation thermique).la destruction de ponts disulfure inter ou intramoléculaire au cours du chauffage par échanges irréversible et la polymérisation désordonnées qui en résulte conduit à une de sa solubilité. Lors des syndromes inflammatoires une hypo albuminé est aperçue, ce qui suppose sa dénaturation au cours de l'inflammation (Cuq, 2006).

La dénaturation des protéines est une cause d'inflammation (Barros et al.,2008 ;Bagad et al.,2011)

La production d'auto-antigène dans les maladies inflammatoires peut être due à la dénaturation des protéines in vivo .Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à l'altération des liaisons électrostatique , hydrogène , hydrophobe et disulfure qui maintien la structure tridimensionnelle de protéines (Mizushima,1964 ;Bassos et al ,2008).Les agents possédant des propriétés protectives contre la dénaturation protéique , seraient de bons candidats pour le développement de nouvelles molécules anti-inflammatoires (chandra et al.,2012)

La dénaturation des protéines est un processus dans lequel les protéines perdent leur structure tertiaire et leur structure secondaire par application de stress ou des composés externes, comme un acide ou une base forte, un sel inorganique concentré, un solvant organique ou de la chaleur. La plupart des protéines biologique perdent leur fonction biologique lorsque elles sont dénaturées (Leelaprakash et al, 2011). Sous l'action d'un traitement thermique, l'albumine peut subir des changements de conformation associés à un mauvais repliement de la structure tridimensionnelle (Militello et al, 2003).

Les différentes études menées sur les effets protecteurs des poly phénols dans ces contextes pathologiques ont montrés que ceux-ci diminuaient les marqueurs de l'inflammation et agissaient sur de nombreuses cibles moléculaires au centre des voies de signalisation de l'inflammation. (Lenoir, 2011).

Le traitement actuel de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non stéroïdiens comme l'aspirine. Ces molécules bien qu'étant efficaces présentent le plus souvent des effets indésirables qui peuvent gêner leur utilisation au long cours (Gaziano ; Gibson, 2006).

Partie expérimentale

2-2-1-dosage des alcaloïdes

Pour le dosage des alcaloïdes des extraits aqueux des feuilles de nos deux plantes, on obtient comme pourcentage d'inhibition 97,447% pour *Peganum harmala* L et 92,452% pour *Verbascum sinuatum* L , donc la plante *Peganum harmala* L est riche en alcaloïdes que la plante de *Verbascum sinuatum* L.

L'étude quantitative des extraits aqueux au moyen des dosages spectrophotométriques, suivant le protocole de Patel et al. 2015 et Tabasum et al. , 2016.

Les concentrations des alcaloïdes sont déduites à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la colchicine, et sont exprimées en milligramme équivalents de colchicine par gramme alcaloïdes.

Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation $y=0.0065x$ avec un coefficient de corrélation $R^2 =0.9984$.

L'importance de ces plantes réside dans le fait qu'ils possèdent de puissantes activités biologiques même à faible doses (Bouchelta et al, 2005).

Elles sont utilisées par exemple comme antidépresseurs, stimulant anesthésiques, anti-tumoraux, antipaludiques etc.(Bruneton et al.,1999).

Le rôle des alcaloïdes dans les végétaux demeure peu connu. En effet, leur fréquente toxicité, même à faible dose, est souvent l'argument principal pour mettre en évidence la fonction de défense contre la prédation dans les interactions plante-herbivore (Bouchelta et al. 2005).

2-2-2-le dosage des flavonoïdes :

Pour le dosage des flavonoïdes des extraits aqueux des feuilles de nos deux plantes, on obtient comme résultats 11,085µg.EQ/mg d'extrait pour *Peganum harmala* L, et de 21,257µg.EQ/mg d'extrait.

Selon les résultats obtenus on remarque que *Verbascum sinuatum* L a une concentration importante en flavonoïdes 21,257µg.EQ/mg d'extrait et une concentration de 11,085µg.EQ/mg d'extrait .Donc *Verbascum sinuatum* L a une concentration plus abondante en flavonoïdes par rapport au *Peganum harmala* L.

Et pour les pourcentages d'inhibition on obtient 98,493% et 97,260% pour *Verbascum sinuatum* L, et de 93,150% et 86,301% pour *Peganum harmala* L. A partir de ces résultats on peut conclure que la plante *Verbascum sinuatum* L a plus de flavonoïdes que *Peganum harmala* L qui a plus d'alcaloïdes.

Partie expérimentale

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode colorimétrique. La quercétine est considérée comme control positif, qui a permis de réaliser la courbe d'étalonnage, et de la calcul de la teneur de flavonoïde dans notre extrait.

L'étude quantitative des extraits aqueux au moyen des dosages spectrophotométriques, selon la méthode de trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ avaient pour objectif la détermination de la teneur totale des flavonoïdes. Une courbe d'étalonnage a été tracée pour cet objectif, établie avec la quercitrine à différentes concentrations. Des mesures de densité pour chaque fraction réalisées à 430 nm.

Les quantités des flavonoïdes correspondantes ont été rapportées et exprimées en microgramme équivalent de quercitrine par milligramme d'extrait. Les résultats obtenus 10,971 $\mu g.EQ/mg$ d'extrait pour *Peganum harmala* L et de 21,942 $\mu g.EQ/mg$ d'extrait pour *Verbascum sinuatum* L sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation : $y=0,0203x$ avec un coefficient de corrélation $R^2=0,9872$.

Les flavonoïdes sont des pigments quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs et des fruits. Ils existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides (Fiorucci, 2006). Grâce à leurs fortes tendances à céder des atomes d'hydrogène portés par les groupements hydroxyle, sont de puissants agents anti-radicaux (Sandhar *et al.* 2011).

Ils constituent un groupe de substances très importantes qui présentent un grand intérêt dans beaucoup de domaines. Leurs propriétés antioxydantes, antivirale, antibactérienne, tinctoriale, les prédestinent à des utilisations dans les industries pharmaceutiques, agroalimentaires, cosmétiques (Pietta, 2000).

Une des caractéristiques structurales des flavonoïdes est la variabilité du taux d'hydroxylation des cycles phénoliques suivant le flavonoïde considéré. Cette caractéristique influe directement sur la capacité donatrice en hydrogène et donc sur le potentiel anti-radicalaire (Le *et al.* 2007).

Des recherches récentes ont démontré que les flavonoïdes, notamment les flavonols, peuvent prévenir de la douleur musculaire en accélérant la réparation des tissus au niveau moléculaire. De manière spécifique, ils inhibent l'enzyme NOS responsable de la synthèse de l'oxyde nitrique, qui est déclencheur chimique de l'inflammation. D'autres études, affirment l'action inhibitrice de ces flavonoïdes, plus particulièrement la lutéoline, l'apigénine, catéchine, sur la cyclo-oxygénase, une enzyme synthétique des molécules impliquées fortement dans le processus inflammatoire (Scalbert *et al.*, 2005).

Conclusion générale

Conclusion générale

Les résultats obtenus à l'issue de ce travail montrent que les extraits aqueux *verbascum sinuatum* L et *Peganum harmala* L ont un pouvoir antioxydant et anti-inflammatoire intéressant et variable, 40.518% et 28.064 pour *Verbbascum sinuatum* L, et pour *Peganum harmala* L est de 43.544% et 53.425% pour l'activité anti-inflammatoire, et pour l'activité antioxydante varie de 99,354% et 99,870% pour *Peganum harmala* L, et de 93,066% et 77,466% pour *Verbascum sinuatum* L, ce dernier augmente avec l'augmentation des concentrations de l'extrait testé. Cette activité antioxydante est probablement liée à la richesse de nos extraits en métabolites secondaires.

Des extraits aqueux des feuilles de *Peganum harmala* L et de *Verbascum sinuatum* L sont préparés, l'effet antioxydant de ces composés est déterminé par le test Diphényle picrylhydrazyle DPPH. L'ensemble de nos différents extraits aqueux ont révélé divers concentration, *Verbascum sinuatum* L de $0,0394 \pm 0,0175$ mg/ml, et de $0,194 \pm 0,0175$ mg/ml. Cependant l'extrait aqueux de *Verbascum sinuatum* L a marqué une forte activité par rapport a la plante de *Peganum harmala* L.

Les résultats obtenus à l'issue de ce travail montent que les extraits préparés ont un pouvoir antioxydant et anti-inflammatoire intéressant et variable, ce dernier augmente avec l'augmentation des concentrations de l'extrait testé. Cette activité est probablement liée à une richesse de nos extraits en métabolites secondaires. Dans ce contexte la présence des flavonoïdes est de $11,085 \mu\text{g.EQ/mg}$ d'extrait pour *Peganum harmala* L, et pour *Verbascum sinuatum* L et $22,514 \mu\text{g.EQ/mg}$ d'extrait, et des alcaloïdes $10,857 \mu\text{g.EQ/mg}$ d'extrait pour *Peganum harmala* L, et $21,142 \mu\text{g.EQ/mg}$ d'extrait pour *Verbascum sinuatum* L.

A la fin, on peut conclure que *Peganum harmala* L et *Verbascum sinuatum* L, représentent une source naturelle prometteuse de molécules chimiques bioactives, notamment les alcaloïdes fournissant des activités biologiques importantes multiples.

Ces caractéristiques importantes de *Peganum harmala* L, et de *Verbascum sinuatum* L. Font de ces plantes un patrimoine riche à préserver et à valoriser.

Référence Bibliographique

- **Bahoru T., Grinier B., Trotin F., Brunet G., Pin T., Luncky M., Vasseur J., Cazin C., et Pinkas M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations *Arzneimittel-Forschung*. 46(11), 1086- 1089.
- **Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J.C. et Pinkas M. (1996).** "Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations". *Arzneimittel Forschung*, 46: 1086-1089. □ **BRUNETON J. (2009).** *Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales*. 4e éd. Cachan: Tec & Doc. Lavoisier
- **BRUNETON J. (1999).** *Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales*. 3e éd. Tec & Doc Lavoisier.1120. Paris.
- **BARROS L., CARVALHO A.M. et FERREIRA ICFR. (2011).** Comparing the Composition and bioactivity of *Crataegus monogyna* flowers and fruits used in folk Medicine. *Phytochem Anal*, 122(2). 181-8.
- **BARROS L, DUEÑAS M, CARVALHO AM, FERREIRA ICFR. et SANTOSBUELGA BEAUDEUX J.L. and DURAND G. (2011).** *Biochimie médicale - Marqueurs actuels et perspectives* ed. 02 ; médecine sciences publications / Lavoisier.
- **BETA T., NAM S., DEXTER J.E. and SAPIRSTEIN H.D. (2005).** Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal. Chem.*, **82**, 390-393.
- **Bouchelta A et al. (2005).** Effets biocides des alcaloïdes, des saponines et des flavonoïdes extraits de *Capsicum frutescens* L.(Solanaceae) sur *Bemisia tabaci* (Gennadius)(Homoptera: Aleyrodidae). *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 9(4), 259-269.
- **Bouhlali E., Sellam K., Bammou M., Alem C et Folali-Zehzouti Y. (2016).** In vitro Antioxidant and anti-inflammatory properties of selected Moroccan medicinal plants. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 6 (05), 156-162.
- **Bruneton J. (1999).** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Editions médicale Internationales. 3 éme Ed. Paris, 810p.

Référence bibliographique

- Chandra S., Chatterjee P., Dey P et Bhattacharya S. (2012).** Evaluation of in vitro anti inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 178-180.
- Chandra S., Chatterjee P., Dey P et Bhattacharya S. (2012).** Evaluation of in vitro anti inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 178-180.
- COMHAIR S.A.A. and ERZURUM S.C. (2002).** Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol., **283**, 246-255.
- Cosio M.S., Buratti S., Mannino S. et Benedetti S. (2006).** Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. Food chemistry. 97, p. 725-731.
- Cristina Popovici., Ilonka Saykova. Et Bartek Tylkowski. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Revue de génie industriel 2009, 4, 25-39.
- Cotelle N. (2001).** Role of flavonoids in oxidative stress. Curr. Top. Med. Chem., **1**, 569-590.
- COWAN M.M. (1999).** Plant products as antimicrobiol agents. Clin. Microb. Rev., **12**, 564-582.

- C. (2012).** Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. Food Chem Toxicol, 50(5). 1576-82.
- DARABPOUR E., BAVI A.P, MOTAMEDI H. and SEYYED NEJAD S.M. (2011).** Antibacterial activity of different parts of *Peganum harmala* L. Growing in Iran against multi-drug resistant bacteria. EXCLI. J., **10**, 252-263.
- DUSEK P., ROOS P., LITWIN T., SCHNEIDER S., FLATEN T. and AASETH J. (2015).** The neurotoxicity of iron, copper and manganese in Parkinson's and Wilson's diseases. J. Trac. Elem. Medic. Bio., **31**, 193-203.
- EVANS W.J. (2000).** Vitamin E, vitamin C, and exercise. Am. J. Clin. Nutr. **72**, 647-652.
- FAROUK L., LAROUBI A., OUACHRIF A., ABOUFATIMA R., BENHARREF A. and CHAIT A. (2009).** Study on Antinociceptive Activity of Different Extracts of *Peganum Harmala* and Possible Mechanism of Action. Iran. J. Pharma. Therap., **8**, 29-35.

Référence bibliographique

- FAVIER A. (2003)**. Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actu. chimi.*, 108-115.
- FITSANAKIS V., ZHANG N., GARCIA S. and ASCHNER M. (2009)**. Manganese (Mn) and Iron (Fe): Interdependency of Transport and Regulation. *Neurot. Res.*, **18(2)**, 124-131.
- FRANKEL E.N. and MEYER A.S. (2000)**. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agri.*, **80**, 1925-1940.
- GAMBINI J. and GRANIER R. (2013)**. Effets indésirables des rayons X. EMC – radio. *Imag. Médi. : Princi. Techn. – Radiopro.*, 1-20.
- GARAIT B. (2006)**. Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'université JOSEPH FOURIER. France.
- Geng Y., Zhu S., Lu Z., Xu H., Shi Js et Xu Zh. (2014)**. Anti-inflammatory Activity of Mycelial Extracts from Medicinal Mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 319— 325.
- GOEL N., SINGH N. and SAINI R. (2009)**. Efficient in vitro multiplication of Syrian Rue (*Peganum harmala* L.) using 6 benzylaminopurine pre-conditioned seedling explants. *Nat. Sci.*, **7(7)**, 1545-0740.
- GUILLOUTY, A. (2016)**. Plantes médicinales et antioxydants. Thèse de doctorat : Docteur en pharmacie. Toulouse : Université Toulouse III Paul Sabatier., 14-36.
- GUZY R. and SCHUMACKER P. (2006)**. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exper. Physio.*, **91(5)**, 807-819.
- HALE A. L. (2003)**. Screening Potato Genotype for Antioxidant Activity, Identification of the Responsible Compounds, and Differentiating Russet Norkotah Strains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis. Dissertation submitted to the Office of Graduate Studies of Tex Halliwel B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews*. **52(8)**, 253-265. as A&M University Genetics., 260.
- HAMMICHE V. and MERAD R. (1997)**. *Peganum harmala* L. Laboratoire de botanique médicale, INESSM d'Alger. Ed MO Rambourg Schepens.

Référence bibliographique

- HELLER W. and FORKMANN G. (1993).** The flavonoids. Advances in research since 1986. In Harborne JB. Secondary Plant Products. Encyclopedia of plant physiology. Ed. Chapman & Hall, London., 399-425.
- HOFFMANN L. (2003).** Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes ; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : 85 shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Biologie cellulaire. Université Louis Pasteur - Strasbourg I, Français.
- HOUZE P., BAUD F., MOUY R., BISMUTH C., BOURDON R. and SCHERRMANN J. (1990).** Toxicokinetics of Paraquat in Humans. Hum. Exper. Toxicol., **9(1)**, 5-12.
- HSU C., HUANG S. and YEN G. (2006).** Inhibitory Effect of Phenolic Acids on the Proliferation of 3T3-L1 Preadipocytes in Relation to Their Antioxidant Activity. J. Agric. Food Chem., **54(12)**, 4191-4197.
- OHNSON F. and GIULIVI C. (2005).** Superoxide dismutases and their impact upon human health. Molec. Asp. of Med., **26(4-5)**, 340-352.
- Koechlin-Ramonatxo C. (2006)** Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. Nutrition Clinique et Métabolique. 20, 165- 177.

- LAWSON A.M. (2006).** Etude phytochimique d'une fabacée tropicale, *Lonchocarpus Nicou*, évaluation biologique préliminaire. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'université de Limoges. Limoges. France.
- LEHUCHER-MICHEL M. P., LESGARDS J. F., DELUBAC O., STOCKER P., DURAND P. and PROST M. (2001).** Stress oxydant et pathologies humaines : Bilan et perspectives préventives. Pres. Médi., **30(21)**., 1076-1081.
- Leelaprakash G. ET Mohan Dass S. (2011).** In vitro anti-inflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*. Int.J. Drug Dev & Res, 3 (3): 189-196.
- Lenoir L. (2011).** Effet protecteur des polyphénols de la verveine odorante dans un modèle d'inflammation colique chez le rat: Université d'Auvergne-Clermont-Ferrand I.
- MADAMANCHI N.R., VENDROV A. and RUNGE M.S. (2005).** Oxidative Stress and Vascular Disease. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., **25**, 29.

Référence bibliographique

- **MACHEIX J.J., FLEURIET A. and JAY-ALLEMAND C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Romandes. Suisse., 4-10.
- **MAIRE R. (1933).** Études sur la flore et la végétation du Sahara central, Impr. La Typo-lit., 1, 272.
- **MARC F., DAVIN A., DEGLENE-BENBRAHIM L., FERRAND C., BACCAUNAUD M. and FRITSCH P. (2004).** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. Méd. Sci., 20(4), 458-463.
- **Militello, V., Vetri V. et Leone M. (2003).** Conformational changes involved in thermal aggregation processes of bovine serum albumin. Biophys. Chem, 105: 133- 141.
- **Mizushima Y. (1964).** Inhibition de la dénaturation de protéines par des agents antirhumatiques ou antiphlogistiques. Arch Int PharmacodynTher, 149,1-7.
- **OZENDA P. (1991).** Flore et végétation du Sahara 3^{ème} édition, augmentée. Ed CNRS, Paris., 662.
- **Pacheco-Sanchez M. (2006).** Polysaccharides ayant une activité immunomodulatrice chez les champignons indigènes du québec. Thèse de Doctorat, Université Laval Québec, Canada. 119 p.
- **Patel R. K., Patel J.B. et Trivedi P. D. (2015).** Spectrophotometric method for estimation of total alkaloids in the *Tinospora cordifolia* M. and its formulations.

- **PINCEMAIL J. MEURISSE M. LIMET R. and DEFRAIGNE JO. (1998).** Fumée de cigarette : une source potentielle de production d'espèces oxygénées activées. Médisp., 78, 37-9.
- **PSOTOVÀ J., LASOVSKY J. and VICAR J. (2003).** Metal-Chelating Properties, Electrochemical Behavior, Scavenging and Cytoprotective Activities of Six Natural Phenolics. Biomed. Papers., 147(2), 147 -153.
- **SANCHEZ-MORENO C., LARRAURI J.A. and SAURA-CALIXTO F. (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. J. Sci. Tech. Intern., (8),121-137.
- **Scalbert A., Johnson IT. et Saltmarsh M. (2005).** Polyphenols: antioxidants and beyond. American Journal of Clinical Nutrition. 2005a;81:215S—217S. Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Critical Reviews in Food Science and Nutrition.287—306.

Référence bibliographique

- SEIB K.L., WU H.J., KIDD S.P., APICELLA M.A., JENNINGS M.P. and MCEWAN A.G. (2006). Defenses against Oxidative Stress in *Neisseria gonorrhoeae*: a System Tailored for a Challenging Environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70** (2), 344-361.
- SEKLI-BELAIDI F. (2011). “Fonctionnalisation de Surfaces D’électrodes Par Un Film de poly (3,4 -éthylènedioxythiophène) PEDOT Pour L’élaboration de Microcapteur Spécifique Des Acides Ascorbique et Urique : Application à L’étude Des Propriétés Antioxydantes Du Sérum Sanguin.”. Thèse en Chimie. Université de Toulouse. Toulouse.
- SHAO H., HUANG X., ZHANG Y. and ZHANG C. (2013). Main Alkaloids of *Peganum harmala* L. and their different effects on Dicot and Monocot crops. *Molec.*, **18**, 2623-2634.
- STEVENSON D. and HURST R. (2007). Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more. *Cellul. Molec. Life Sci.*, **64**(22), 2900-2916.
- Suhaj M. (2006). Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 531–537.
- Tabasum S.H ., Khare S . et Jain K. (2016). Spectrophotometric quantification of total phenolic, flavonoid and alkaloid contents of *Abrus precatorius* L. seeds. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2(9), 371-374.
- TANIYAMA Y. and GRIENGLING K.K. (2003). Reactive Oxygen Species in the Vasculature Molecular and Cellular Mechanisms. *Hypert.*, **42**, 1075.
- THEROND P. (2003). Le sélénium : Un oligo-élément essentiel pour la santé humaine. *Cah. Nutr. Diét.*, **38** (4), 250-256.
- THEROND P. (2003). Le sélénium : Un oligo-élément essentiel pour la santé humaine. *Cah. Nutr. Diét.*, **38** (4), 250-256.
- WAINSTEN, J. (2009). *Le Larousse Médical*. Paris : Larousse.
- Williams L., Connara O., Latore L., Dennis O., Ringer S., Whittaker J.A., Conard J., Vogler B., Rosner H et Kraus W. (2008). The in vitro Anti-denaturation Effects Induced by Natural Products and Nonsteroidal Compounds in Heat Treated (Immunogenic) Bovine Serum Albumin is Proposed as a Screening Assay for the Detection of Anti-inflammatory Compounds, without the use of Animals, in the Early Stages of the Drug Discovery Process. *West Indian Med J*. 57 (4), 327- 331.
- ZWEIER J.L. and HASSAN TALUKDER M.A. (2006). The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovas. Res.*, **70**(2), 181-190.