REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTÉ DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES

DOMAINE : SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de

Master

Filière : Biologie

Spécialité : Biochimie Appliquée.

Thème

Etude de l'activité anti-inflammatoire et anti-hémolytique de l'extrait aqueux de feuilles de *Malva sylvestris* L.

Réalisé par :

ABERRANE Sadjia et MEHALLA Massilia

Devant le jury composé de :

M^{r} HOUALI K.	Professeur	Président	UMMTO
M^{r} MOUALEK I	Maître de Conférences B	Encadreur	UMMTO
M^{me} IRATNI G.	Maitre de Conférences B	Examinatrice	UMMTO

Année universitaire
2018/2019

Remerciements

Nous tenons avant tout à remercier Dieux tout puissant, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

En premier lieu, nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à notre encadreur Mr ***MOUALEK I****, maitre de conférences à la Faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou, pour sa confiance, sa patience, son orientation, ses conseils et son aide tout au long de ce travail.*

Nous remercions également ***M^{r} HOUALI K****. professeur au département de Biochimie et de Microbiologie de l'UMMTO et directeur du laboratoire LABAB 3 pour son accueil, pour les conditions techniques mises à notre disposition durant la réalisation de ce présent travail, ainsi que pour nous l'honneur qu'il nous fait en présidant le jury de notre mémoire.*

Nos remerciements s'adressent à ***M^{lle} OUZID Y****. et L'examinatrice de notre travail* ***M^{me} IRATNI G.*** *pour leur aide si précieuse, pour leurs orientations et leur soutien.*

Enfin nous remercions toute personne ayant contribué de prêt ou de loin dans l'élaboration de ce travail.

Sommaire

Liste des abréviations
Liste des figures
Liste des tableaux

Introduction……..… 1

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Présentation de *Malva sylvestris* L.
1. Description botanique…….. 3
2. Classification systématique…….. 4
3. Noms vernaculaires…….. 4
4. Répartition géographique……. 4
5. Usages traditionnels……. 5
6. Composition phytochimique…… 6
7. Activités biologiques…… 8
7.1. Activité anti-inflammatoire……... 8
7.2. Activité cicatrisante……... 8
7.3. Activité laxative…… 8
7.4. Activité antifongique et antibactérienne……... 8
7.5. Activité anti-oxydante……... 9
7.6. Action protectrice des reins……... 9

Chapitre II : Composés phénoliques et activités biologiques
1. Généralités sur les polyphénols…… 10
2. Principales structure polyphénoliques…….. 10
3. Classification des polyphénols…… 12
3.1. Les flavonoïdes……. 12
3.2. Les acides phénoliques…….. 14
3.3. Les stilbènes…….. 15
3.4. Les lignanes……... 16
3.5. Les tanins……. 17
4. Biosynthèse des polyphénols……... 18
4.1. La voie de Shikimate……. 18
4.2. La voie de l'acétate malonate…… 18
5. Rôles et fonctions biologiques des polyphénols…….... 19
a. Chez les végétaux…….. 20
b. Chez l'être humain……... 20
5.1. Activité anti-inflammatoire……... 21
5.1.1. Définition de l'inflammation……..... 21
5.1.2. Les types d'inflammation……... 21

5.2. Les anti-inflammatoires synthétiques …….. 21
5.3. Mécanismes d'action des anti-inflammatoires naturels…… 23
5.4. L'activité anti-hémolytique…….. 23
5.4.1. Définition de l'hémolyse…… 23
5.5. Les anti-hémolytiques……... 24
5.5.1. Action des anti-hémolytiques synthétiques…… 24
5.5.2. Mécanismes physiologiques de maintien de l'intégrité de la membrane érythrocytaire……... 24
5.6. Action anti-hémolytique des polyphénols……. 25

Partie II : Partie expérimentale

1. Matériel et méthodes…… 27
1.1. Matériel……. 28
1.1.1. Matériel végétal…….. 28
1.1.2. Matériel biologique…… 28
1.1.3. Appareillage……... 28
1.1.4. Solvants, réactifs et solutions……. 29
2. Méthodes…….. 30
2.1. Séchage et broyage du matériel végétal…… 30
2.2. Préparation de l'extrait brut…….. 30
3. Dosage des polyphénols totaux…… 32
4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire…….. 33
5. Evaluation de l'activité anti-hémolytique de *Malva sylvestris*…… 34
5.1. Test de l'innocuité de l'extrait vis-à-vis des cellules érythrocytaires……... 35
5.2. Effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress osmotique…….**.....** 36
5.3. Effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress thermique……. 37

Résultats et discussions

1. Rendement de l'extraction des polyphénols……. 39
2. Teneur en polyphénols totaux (PPT)…… 39
3. Activité anti-inflammatoire…….. 40
4. Activité anti-hémolytique ……... 42
4.1. Innocuité de l'extrait vis-à-vis de la cellule érythrocytaire……... 42
4.2. Effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress osmotique …… 43
4.3. Effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress thermique…… 44

Conclusion…… 47

Références bibliographiques
Annexes

Liste des abréviations

AA	Ascorbic acid
AFR	Ascorbate Free Radical
AG	Acide gallique
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AIS	Anti-inflammatoires stéroïdiens
ATP	Adénosyl triphosphate
CMI	Concentration moyenne inhibitrice
COX	Cyclo-oxygénase
CCP	Chlorure de cétylpyridinium
COA	Coenzyme A
DO	Densité optique
EAG	Equivalent d'acide gallique par grammes d'extrait
GR	Globule rouge
GRh	Globule rouge humain
Hb	Hémoglobine
M	Masse
M.S	*Malva sylvestris*
NO	Oxyde d'azote
NOS	Oxyde nitrique synthase
Ova	Ovalbumine
PBS	Tampon phosphate salin
PLA-2	Phospholipase A-2
PMRS	Plasmic membrane redox system
PPT	Polyphénols totaux
R	Rendement
ROS	Espèces réactives d'oxygène
UV	Ultraviolet

Liste des figures

Figure 1 : Parties aériennes de *Malva sylvestris* L.…… 3
Figure 2 : Structure chimique du groupement phénolique…….. 10
Figure 3 : Les principales classes de polyphénols……... 12
Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes……... 12
Figure 5 : Structures des dérivés de l'acide benzoïque……... 14
Figure 6 : Structure de l'acide hydroxycinnamique…… 15
Figure 7 : Structures des principaux acides phénoliques……..... 15
Figure 8 : Les structures chimiques du resvératol (A), du ptérostilbène (B) et du 3'-hydroxyptérostilbène (C)……..... 16
Figure 9 : Structure des lignanes……. 16
Figure 10 : Structure des tanins hydrolysables (1-O-galloyl-4,6-hexahydroxydiphenoyl β-D-glucose (OGβDG)……..... 17
Figure 11 : Structure de tanins condensés……... 18
Figure 12 : Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols…….. 19
Figure 13 : Rôles des polyphénols dans la santé humaine…….. 20
Figure 14 : La réaction inflammatoire schématisée…… 22
Figure 15 : Représentation schématique du fonctionnement du système de redox de la membrane plasmique (PMRS). AA-ascorbic acid, AFR-ascorbate free radical…….. 25
Figure 16 : Schéma récapitulatif des protocoles expérimentaux adoptés……... 27
Figure 17 : Forme séchée et broyée de *Malva sylvestris* L……..... 30
Figure 18 : Schéma récapitulatif de l'extraction aqueuse de *Malva sylvestris L*…… 31
Figure 19 : Schéma récapitulatif du protocole de dosage des polyphénols totaux……. 33
Figure 20 : Protocole récapitulatif du test de la dénaturation thermique des protéines…... 34
Figure 21: Schéma récapitulatif du test d'innocuité de l'extrait……. 36
Figure 22 : Schéma récapitulatif des étapes de l'hémolyse induite par des solutions hypotoniques…… 37
Figure 23 : Schéma récapitulatif des étapes du test de protection vis-à-vis d'un stress thermique……..... 38
Figure 24 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique…….. 40
Figure 25 : Taux de protection contre la dénaturation thermique de l'ovalbumine en présence de l'aspirine et de l'extrait aqueux de *Malva sylvestris L*…… 41
Figure 26 : Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis du stress osmotique en fonction des différentes concentrations en extrait de *M.sylvestris*…….. 44
Figure 27: Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis la lyse par la chaleur, en présence de différentes concentrations d'aspirine et d'extrait…… 46

Liste des tableaux

Tableau I : Classification botanique de *Malva sylvestris* L.…… 4
Tableau II : Noms communs de *Malva sylvestris* L.……... 4
Tableau III : Composition phytochimique de *Malva sylvestris* L.…….. 7
Tableau IV: Principales classes des polyphénols……. 11
Tableau V : Différentes sous-classes des flavonoïdes…… 13
Tableau VI : Différents appareillages et consommables utilisés.…… 29
Tableau VII : Pourcentage d'hémolyse en fonction de la concentration d'extrait de feuilles de *Malva sylvestris* L.……... 42

Les nombreuses activités biologiques des molécules bioactives issues des végétaux expliquent l'intérêt particulier qu'elles suscitent dans de nombreux domaines qu'ils soient sanitaires, agroalimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.

Le regain d'intérêt en thérapeutique pour ces biomolécules est en rapport avec le fait que celles-ci présentent des effets secondaires limités voire inexistants. Contrairement aux molécules d'origine synthétique, qui sont connues pour leurs effets secondaires indésirables pouvant être graves, avec des occurrences de plus en plus fréquentes. Par ailleurs, les médications basées sur ces molécules se heurtent de plus en plus à des échecs thérapeutiques.

Etant donné la fréquence de leur utilisation, les anti-inflammatoires font partie des médicaments à fort impact sanitaire. Ajouté à cela le fait que leurs effets secondaires peuvent se manifester sous forme de troubles endocriniens, métaboliques, ou digestifs et peuvent aller jusqu'à des anomalies neuropsychiques à tendances dépressives.

Cet état des lieux pousse la recherche scientifique à s'orienter vers une source de molécules bioactives naturelles douées d'innocuité, comme celles issues des plantes. Ces dernières sont qualifiées de médicinales en raison de leurs nombreuses vertus thérapeutiques, attribuées aux métabolites secondaires comme les polyphénols. Constituant le système de défense des plantes, les protégeant contre un nombre important d'agressions biotiques et abiotiques, ces biomolécules sont aussi utilisées dans l'industrie cosmétique, agroalimentaire et pharmaceutique grâce à leurs nombreuses propriétés biologiques.

L'Algérie est un pays caractérisé notamment par sa grande superficie et la variation de son climat d'une région à une autre. Cela offre une grande diversité d'espèces végétales, qui se retrouvent confrontées à des variations de différentes natures, ce qui entraine une variation au sein d'une même espèce dès lors qu'elle occupe des biotopes différents. Parmi les plantes médicinales qui ornent le territoire national, on retrouve *Malva sylvestris* L., communément appelée la grande mauve. Cette plante est largement représentée dans toute l'Algérie, et de façon plus particulière en Kabylie. La grande mauve appartient à la famille des Malvacées, c'est une plante herbacée à tige érigées. Elle est utilisée en médecine traditionnelle pour ses nombreuses vertus ; cicatrisantes, émollientes et laxatives.

Prenant en compte le fait que la plante étudiée est largement utilisée en Kabylie et vu le peu de travaux se rapportant aux activités anti-inflammatoire et anti-hémolytique de la grande mauve, nous nous sommes fixé pour objectif l'évaluation de ces deux activités afin de valoriser cette ressource naturelle.

1. Description botanique

Malva sylvestris L. est une plante herbacée, vivace et bisannuelle de la famille des Malvaceae. Haute de 20 à 70 cm, cette plante se caractérise par des tiges érigées ou décombantes, et faiblement pubescentes.

Ses feuilles sont larges, arrondies de forme palmatilobée (le nombre de lobes peut varier de 3 à 7), de consistance molle.

On retrouve sur cette plante des fleurs terminales ou axillaires portées sur de longs pédoncules, minces et velus. Elles sont de couleur rose violacée (mauve), striées ou veinées de rouge (AIT YOUSSEF, 2006). Leur calicule est formé de 3 pièces courtes suivies d'un calice à 5 sépales soudées (BOTINEAU, 2011).

Les mauves ont une fine racine pivotante qui pénètre profondément dans le sol et un fruit orbiculaire, formé de nombreux carpelles accolés et déposés en anneau. Ce dernier est d'abord vert mais deviendra jaunâtre ou rougeâtre à maturité (FLORES, 2011).

La floraison de la mauve se produit entre Mai et Septembre.

Figure 1: Parties aériennes de *Malva sylvestris* L. (photos personnelles).

2. Classification systématique

La position systématique de la grande mauve est donnée dans le tableau ci-dessous :

Tableau I: Classification botanique de *Malva sylvestris* L. (GHEDIRA et GOETZ, 2016).

Règne	Plantae (plantes)
Embranchement	Magnoliophyta (Spermaphytes Angiospermes)
Division	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida*(*Dicotylédones)
Ordre	Malvales
Famille	Malvaceae
Genre	*Malva*
Espèce	*Malva sylvestris* L.

3. Noms vernaculaires

Plusieurs appellations vernaculaires sont utilisées pour désigner la plante, ce qui facilite son identification et ainsi son usage traditionnel. Ces dernières sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau II : Noms communs de *Malva sylvestris* L.

Berbère	Mejyer, amedjir (AIT YOUSSEF, 2006).
Arabe	Khoubeiza (GHEDIRA et GOETZ., 2016).
Français	Mauve, grande mauve, mauve sylvestre, mauve sauvage…(FLORES, 2011).
Anglais	Common Mallow, High Mallow (FLORES, 2011).

4. Répartition géographique

La grande mauve a une aire de répartition eurasiatique. Elle est très répondue dans toute l'Afrique du Nord, dans les pays d'Asie Occidentale, d'Asie du Nord et du Sud-ouest, ainsi que dans certains pays d'Europe.

Dans la plupart de ces pays, elle se retrouve principalement dans les friches, les lieux non cultivés, les prés et sur le bord des chemins. Elle est très commune dans toute l'Algérie, et pousse surtout dans les décombres, les champs et les cultures (AIT YOUSSEF, 2006).

Elle est nitrophile et préfère les sols pollués par les nitrates (FLORES ,2011).

5. Usages traditionnels

La grande mauve se prête à de nombreux usages comme :

5.1. Usage alimentaire

Traditionnellement utilisée comme un légume cru ou cuit en soupe (ISHTIAQ et *al*., 2007), celle-ci entre dans la composition de nombreux plats tels que le couscous. De plus, cette plante est considérée comme un bon pâturage pour l'alimentation animale (AIT YOUSSEF, 2006).

5.2. Usage thérapeutique

Malva est traditionnellement utilisée comme tonique et dans le traitement des lésions gastro-intestinales, cette dernière est largement utilisée pour ses propriétés nettoyantes du côlon (RAHIMI et *al*., 2010).

En Algérie, *Malva* est utilisée en application externe comme cicatrisant alors qu'en Tunisie, l'usage externe de cette plante porte sur la réalisation de compresses émollientes (AIT YOUSSEF, 2006).

Malva est en médecine traditionnelle utilisée en application interne dans le traitement : (BOTINEAU, 2011).

- De la toux et des inflammations des voies respiratoires ;
- De la constipation fonctionnelle ;

- Des troubles digestifs.

En application externe celle-ci est utilisée en tant que :

- Adoucissant et antiprurigineux contre les piqures d'insectes et protecteur dermatologique ;
- Antalgique local (gargarisme) des inflammations de la bouche et du pharynx ;
- Traitement contre les irritations ou gênes oculaires.

6. Composition phytochimique

Mava sylvestris contient principalement des mucilages responsables des propriétés apaisantes et émollientes de cette plante, des flavonoïdes (anthocyanes, anthocyadines) et des tanins (KÜNKELE et LOHMEYER, 2011).

- **Mucilage**

Présents en grande quantité, ceux- ci sont responsables de la pluparts des effets thérapeutiques de cette plante (GASPARRETO et *al*., 2011).

- **Flavonoïdes**

Les données relatives à la composition fine en flavonoïdes de *malva* sont peu nombreuses. Cependant, les flavonols, les flavones et les anthocyanines sont caractéristiques de cette famille, notamment *M. sylvestris* qui contient des quantités importantes de ces substances anti-oxydantes qui contribuent entre-autre à colorer les fleurs et les fruits (GASPARRETO et *al*., 2011).

- **Vitamines et autres éléments**

L'effet antioxydant de la mauve est attribué à la présence de tocophérols (vitamine E) et d'acide ascorbique (vitamine C) (BARROS et *al*., 2010).

D'autres éléments chimiques ont été identifiés à des concentrations relativement importantes tels que : le calcium, le magnésium, le fer et le potassium…etc. (DESIDERI et *al*., 2010).

Tableau III : Composition phytochimique de *Malva sylvestris* L. (GHEDIRA et GOETZ, 2016).

Feuilles	
Groupe chimique	Constituants
Mucilages (6,0-7,2%)	Polysaccharides acides de PM entre 11 000 et 10^6, fournissant par hydrolyse du glucose, du rhamnose, de l'arabinose et de l'acide galacturonique.
Flavonoïdes (210.8 mg/g)	Gossypine (gossypétine 3-sulfate-8-O-β-D-glucoside), hypolaetine 3′-sulfate, hypolaetine 4′-méthyl ether 8-O- β - D -glucuronopyranoside, hypolaetine 8-O-β-D-glucuronopyranoside et isoscutellareine 8-O- β - D – glucuronopyranoside.
Dérivés phénoliques (386,5 mg/g)	Acides 4-hydroxybenzoique, 4-méthoxybenzoique, 4-hydroxydihydro-cinnamique, férulique et Tyrosol.
Autres	Tanins et malvones
Fleurs	
Groupe chimique	**Constituants**
Mucilage (3.8-7.3%)	Polysaccharides neutres et acides de P.M. compris entre 1,3 et 1,6. 10^6. Dont l'hydrolyse fournit du galactose, du rhamnose et des acides glucuronique et galacturonique.
Flavonoïdes (46.6 mg/g)	Anthocyanines telles que la malvidine et malvine. Génistéine; myricétine; dérivés de l'apigénine, de la quercétine et du kaempférol.
Autres	Tanins et coumarines.

7. Activités biologiques

Comme toute plante médicinale *Malva sylvestris* renferme de nombreux composés bioactifs responsables de nombreuses activités thérapeutiques complémentaires ou synergiques.

7.1. Activité anti-inflammatoire

L'étude de AFSHAR et *al*. (2015) a montré que l'extrait aqueux de mauve associé au sulfadiazine induit une diminution des cellules inflammatoires au niveau des plaies induites chez la souris. Des résultats similaires ont été rapportés par (SLEIMAN et DAHER, 2009). L'administration à raison de 100 mg/kg d'extrait de la même plante à des rats présentant une inflammation induite par la carragénine, donne une inhibition de l'inflammation relativement importante de l'ordre de 60 %.

7.2. Activité cicatrisante

Il a été démontré que l'extrait de fleurs de *M.sylvesrtis* contribue dans l'accélération de la cicatrisation des brulures chez les rats. Il a été observé qu'en plus de diminuer la zone de brûlure, l'extrait induit une augmentation du taux de collagène par rapport aux témoins non traités (PIRBALOUTI et *al*., 2009).

7.3. Activité laxative

L'extrait aqueux de fleurs de *M.sylvestris* est efficace et sans danger pour le traitement de la constipation fonctionnelle (ELSAGH et *al*., 2015).

7.4. Activité antifongique et antibactérienne

L'extrait aqueux des feuilles de la mauve inhibe la croissance de L'*Aspergillus candidus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium spp*. et *Fusarium culmorum* (SOUZA et *al*., 2004).

Des bains de bouche à base de chlorure de cétylpyridinium (CPC) combinés avec l'extrait *de M. sylvestris* présentent un effet antimicrobien plus fort que ceux contenant uniquement le CPC (WATANABE et *al*., 2008).

L'extrait de fleurs a un fort pouvoir antibactérien contre *Staphylococcus aureus, S.agalactiae* et *Enterobacter faecalis* avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) respectives de 192, 200 et 256 µg/ml (RASAVI et *al*., 2011).

7.5. Activité anti-oxydante

L'effet antioxydant de la mauve peut être expliqué par la présence de composés phénoliques qui grâce à leur forte tendance à céder des atomes d'hydrogène portés par les groupements hydroxyles, sont de puissants anti-radicalaires (SANDHAR et *al*., 2011).

Ces derniers par leurs actions sur les espèces réactives de l'oxygène impactent directement sur la diminution du stress oxydatif (BARROS et *al*., 2010).

7.6. Action protectrice des reins

L'extrait de *MS* protège le rein contre les effets toxiques de la gentamicine mais aussi le foie de l'effet néfaste de la néphrotoxicité (MOHAMADI YARIJANI et *al*., 2019).

1. Généralités sur les polyphénols

Les composés phénoliques forment une famille de molécules organiques largement distribuée dans le règne végétal. Ils sont qualifiés de métabolites secondaires, car ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de la plante, comme la croissance ou la reproduction, ils ne sont donc pas strictement indispensables à la vie du végétal, cependant, ils jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème. Présents dans toutes les parties de la plante, ce sont les métabolites secondaires les plus abondants du règne végétal (DAI et MUMPER, 2010).

Leur répartition qualitative et quantitative varie selon l'espèce, l'organe considéré et le stade physiologique de la plante (ROBARDS et *al*., 1999). Plus de 10 000 composés phénoliques ont été répertoriés chez les végétaux (LI et *al*., 2014) allant des molécules les plus simples comme les acides phénoliques aux substances hautement polymérisées comme les tanins (DAI et MUMPER, 2010).

2. Principales structures phénoliques

Comme leur nom l'indique, les polyphénols se caractérisent par la présence d'au moins un noyau benzénique portant au moins un groupement hydroxyle.

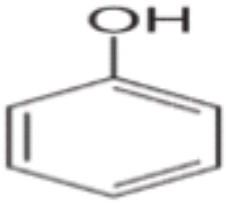
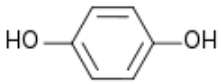
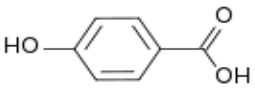
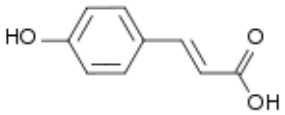
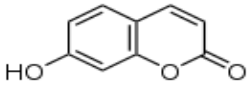
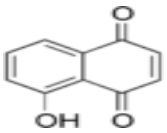
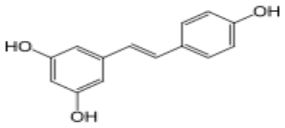
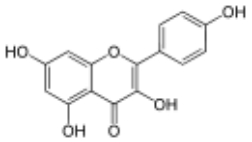
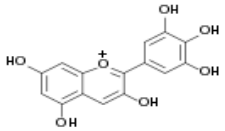
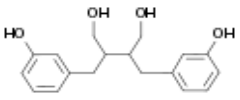
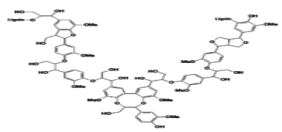
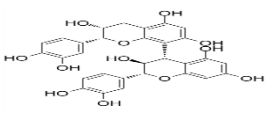


Figure 2 : Structure chimique du groupement phénolique (CHEYNIER, 2005).

Le tableau IV regroupe les principales classes de polyphénols selon MACHEIX (2005) et MANACH (2004) :

Tableau IV : Principales classes des polyphénols.

Squelette carboné	Classe	Exemple	Formule	Origine
C6	Phénols simples	Hydroquinone		Busserole
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	acide p-hydroxybenzoïque		Epices, fraises
C6-C3	Acides hydroxy-Cinnamiques	acide p-coumarique		Tomates, ail
	Coumarines	Ombelliférone		Carottes, coriandre
C6-C4	Juglone	Naphtoquinone		Noix
C6-C2-C6	Stilbénoïdes	trans-resvératrol		Raisins
C6-C3-C6	Flavonoïdes	Kæmpférol		Fraises
	Anthocyanes	Delphinidol		Raisin
(C6-C3) $_2$	Lignanes	Entérodiol		Bactéries intestinales
(C6-C3) $_n$	Lignines			Bois, fruits à noyaux
(C6-C3-C6) $_n$	Tanins condensés	Procyanidol		Raisins, kaki

3. Classification des polyphénols

Le nombre, la structure des cycles phénoliques mais aussi les éléments structuraux qui se lient à ces derniers donnent naissance à plusieurs classes et sous-classes de polyphénols, telles que les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes et les lignanes et les tannins (LI et *al.*, 2014).

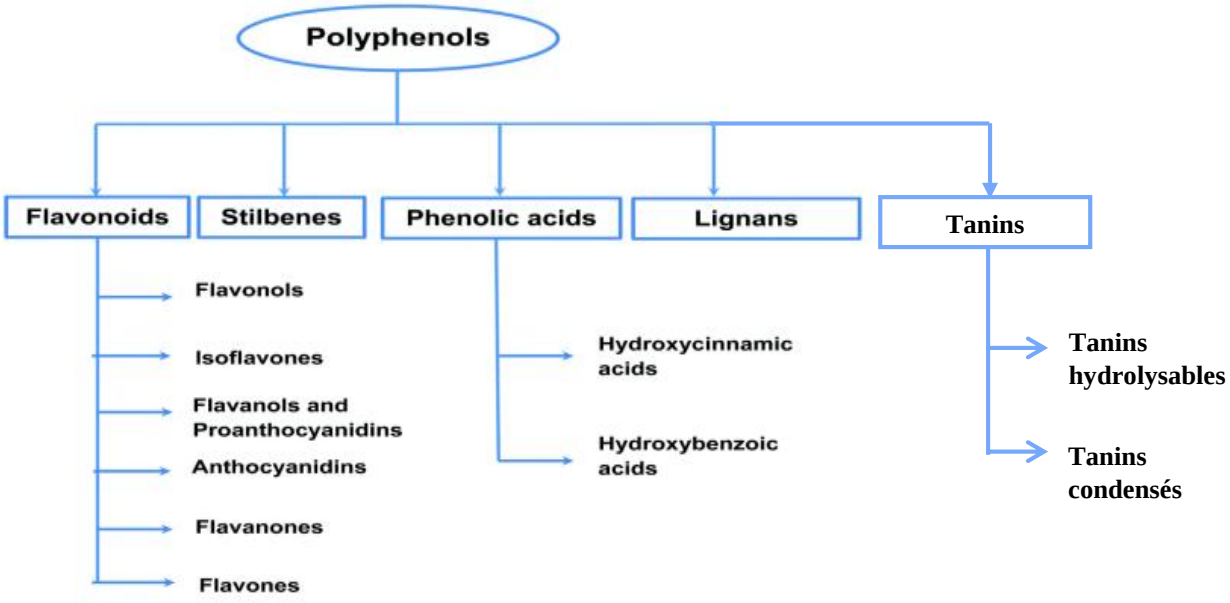


Figure 3 : Principales classes de polyphénols (OLIVER et *al*., 2016).

3.1. Les Flavonoïdes

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont responsables de la pigmentation de différentes parties de la plante (ABEDINI, 2013). Différentes sous-classes d'origine biosynthétique commune composent cette famille, celles-ci partagent un même squelette de base à quinze atomes de carbones « 2-phényl-1-benzopyrane ». Ce dernier est constitué de deux unités aromatiques (deux cycles en C6 (A et B)), reliés par un cycle pyranique central (C) en C3 (NKHILI, 2009) (figure 5).

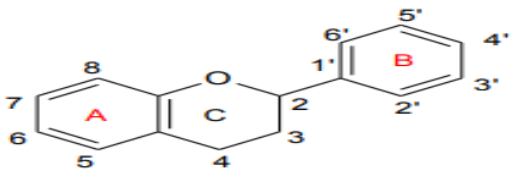
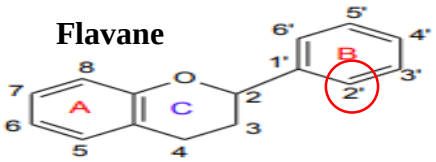
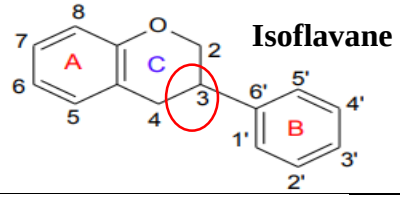
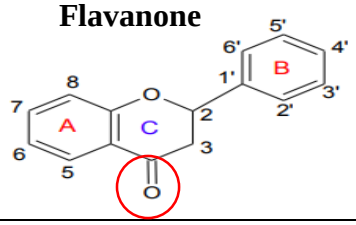
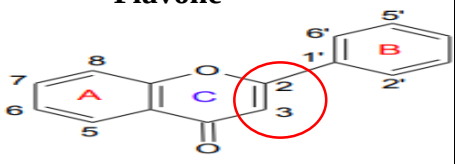
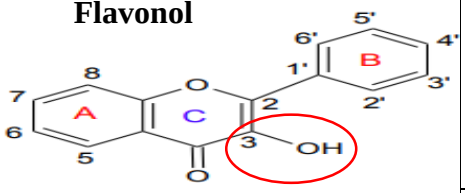
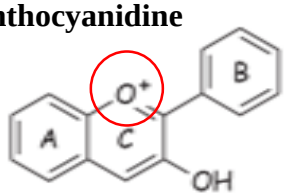
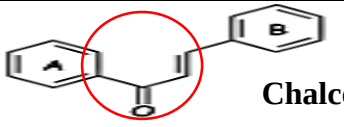


Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes (ABEDINI, 2013).

Ainsi, nous retrouvons pour les flavonoïdes 6 sous-classes réparties en fonction du nombre, de la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles…), mais aussi de la position de la liaison entre le noyau B et l'hétérocycle C (position 2 ou 3) (AKROUM, 2011). Celles-ci sont comme indiquées dans le tableau V.

Tableau V : Différentes sous-classes des flavonoïdes (LEOPOLDINI et *al*., 2011).

Flavane 	**Liaison en position 2** : les flavanes (AKROUM, 2011) : les flavan-3-ols constituent la principale sous-classe desflavanes. Ces structures varient des monomères simples catéchines à des structures polymériques comme les anthocyanidines (CROZIER, 2007).
 **Isoflavane**	**Liaison en position 3** : Les isoflavanes sont caractérisés par la liaison du cycle B au C3. Par sa structure, ce composé imite l'hormone stéroïdale « oestradiol » qui bloque l'ovulation (CROZIER, 2007).
Flavanone 	Si la position 4 du flavane porte un groupement carbonyle, la molécule est appelée flavanone (AKROUM, 2011). La structure est très réactive et subit des réactions d'hydroxylation, de glycosylation et d'O-méthylation.
Flavone 	Si la liaison de type C2-C3 dans le squelette d'un flavanone est insaturée, le composé est nommé flavone (AKROUM, 2011). Ils ont une relation structurelle très étroite avec les flavonols, mais contrairement à ces derniers, ils sont peu distribués (CROZIER, 2007).
Flavonol 	La substitution du squelette précédent en position 3 par un groupement hydroxyle nous donne le flavonol (AKROUM, 2011). Ces composés représentent la classe la plus répondue des flavonoïdes (D'ARCHIVIO, 2007).
Anthocyanidine 	Les anthocyanidines se caractérisent par la présence d'un atome d'oxygène chargé au niveau du cycle central C (LEOPOLDINI et *al*., 2011). Ce sont des pigments donnant la coloration rouge ou bleue à certains végétaux (MAZZA et *al*., 2004). Ils sont impliqués dans la protection des plantes contre la lumière excessive et jouent un rôle important dans l'attraction des insectes pollinisateurs.
 **Chalcone**	Comparativement aux autres flavonoïdes, les chalcones se caractérisent par la présence d'un noyau pyranique central ouvert (LEOPOLDINI et *al*., 2011).

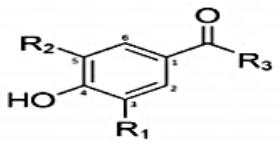
3.2. Les acides phénoliques

Le terme acide-phénolique peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et une autre hydroxylique (ABEDINI, 2013). Nous distinguons deux sous-groupes :

- ✓ Les acides hydroxybenzoïques.
- ✓ Les acides hydroxycinnamiques.

a. Les acides hydroxybenzoïques

Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure de base en C6-C3. Ils peuvent se retrouver sous forme libre ou combinée, à l'état d'esters ou d'hétérosides. Ces composés sont abondants dans les fruits et légumes, leurs principaux représentants sont l'acide salicylique et l'acide gallique (figure 8) (HOSSEINI et *al*., 2016).



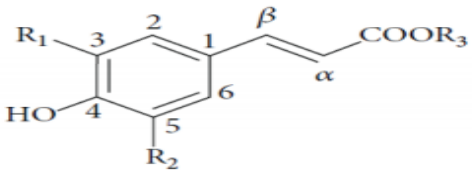
	R_1	R_2	R_3
p-Hydroxybenzoic acid	H	H	OH
Protocatechuic acid	OH	H	OH
Gallic acid	OH	OH	OH
Vanillic acid	OCH_3	H	OH
Syringic acid	OCH_3	OCH_3	OH
Methyl *p*-hydroxybenzoate	H	H	OCH_3
Methyl gallate	OH	OH	OCH_3
Ethyl protocatechuate	OH	H	OCH_2CH_3

Figure 5 : Structures des dérivés de l'acide benzoïque (FARHOOSH et *al*., 2016).

b. Les acides hydroxycinamiques

Ces composés se trouvent en abondance dans les feuilles de thé, les graines de café et le vin rouge. Ils sont souvent estérifiés et peuvent être combinés à des sucres (O-acylglucosides) (HOSSEINI et *al*., 2016). L'acide Hydrocinnamique possède plusieurs activités thérapeutiques dont l'activité anti-inflammatoire, antioxydante et cardioprotectrice (ALAM et *al*., 2016).

L'acide caféique est le principal représentant de cette famille (DAI et MUMPER, 2010) (figure 8).



	R1	R2	R3
p-Coumaric	H	H	H
Caffeicacid	**OH**	**H**	**H**
Ferulicacid	OCH3	H	H
Sinapicacid	OCH3	OCH3	H

Figure 6 : Structure de l'acide hydroxycinnamique (TEIXEIRA et *al.*, 2013).

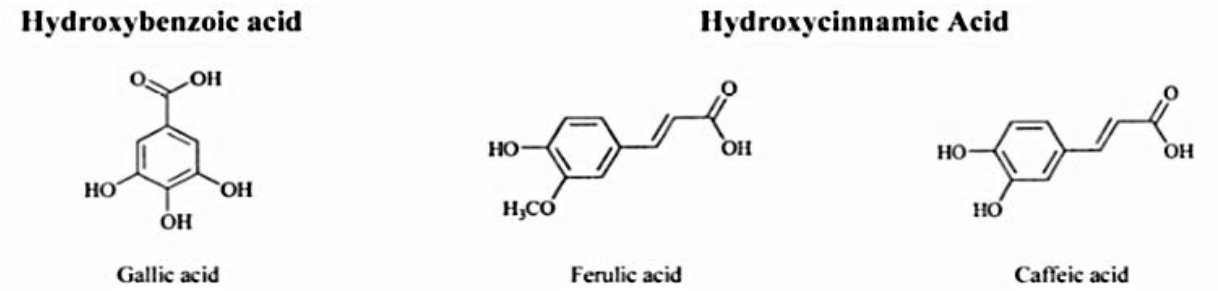


Figure 7 : Structures des principaux acides phénoliques (DAI et MUMPER, 2010).

3.3. Les stilbènes

Les stilbènes font partie d'un groupe très vaste de polyphénols, celui des dérivés de l'acide cinnamique (phénylpropanoides) (LERAY, 2010). Ces composés sont produits par les plantes en réponse aux attaques bactériennes, fongiques ou virales (CROZIER, 2007). Les membres de cette famille ont un squelette de base en C6-C2-C6 et leurs principaux représentants sont le resvératrol, le ptérostilbène et le piceatannol (figure 9).

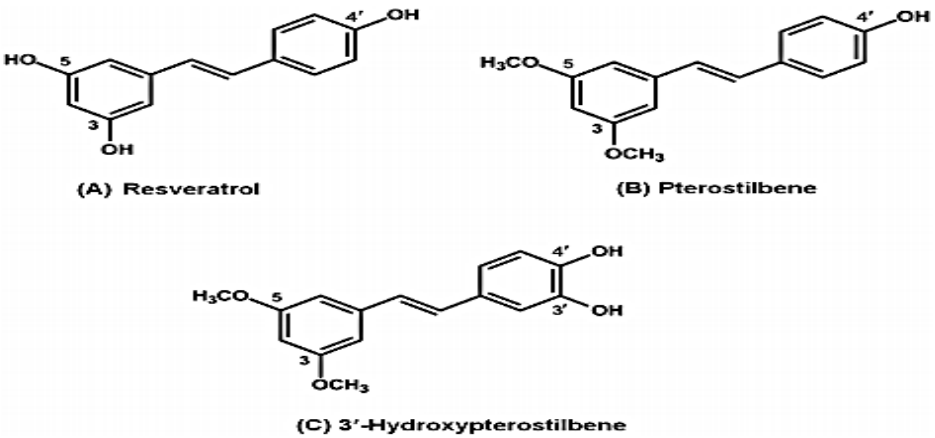


Figure 8 : Les structures chimiques du resvératol (A), du ptérostilbène (B) et du 3'-hydroxyptérostilbène (C) (TSAI et *al.*, 2017).

3.4. Les lignanes

Ces polymères sont un large groupe de produits naturels dérivés de la condensation de deux sous-unités C6-C3 (figure 10). Ces composés de haut poids moléculaire contribuent à former, avec la cellulose et les dérivés hémicellulosiques, la paroi des cellules végétales.

Les lignanes et leurs dérivés synthétiques suscitent de plus en plus d'intérêts en raison de leurs nombreuses activités biologiques, ce qui explique leur utilisation en médecine traditionnelle (CASARIN et *al*., 2014).

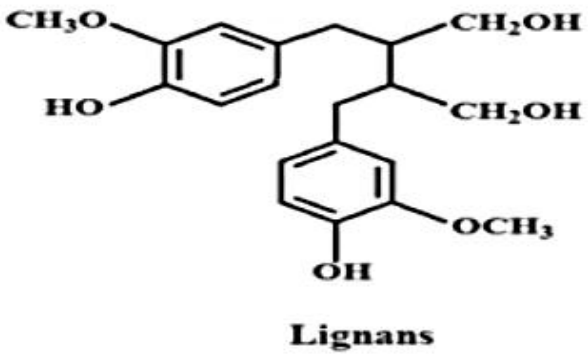


Figure 9 : Structure des lignanes **(**CASARIN et *al*., 2014).

3.5. Les tanins

Cette classe désigne un groupe de substances phénoliques très répondues dans le règne végétal (CHEYNIER, 2005), possédant au moins deux sous-unités phénoliques (KING et YOUNG, 1999). Ce sont des molécules fortement hydroxylées ayant en commun, la propriété de se complexer aux protéines et donc de les précipiter, ce qui explique leur capacité à tanner la peau (MACHEIX et *al*., 2005). En outre, les tanins s'associent à d'autres polymères organiques tels que les glucides, les acides nucléiques, les stéroïdes et les alcaloïdes, pour former avec eux des complexes stables (HASLAM, 1998).

Le mot tanin est utilisé pour faire référence à deux classes de composés phénoliques avec des natures chimiques différentes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés.4

- **Les tanins hydrolysables**

Cette sous-classe résulte des esters du D-glucose, de l'acide gallique ou de ses dérivés en particulier l'acide éllagique (ALICE et *al*., 2015). Ce sont des molécules facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique ce qui explique leur dénomination (JIMENEZ et *al*., 2014) (figure 9).

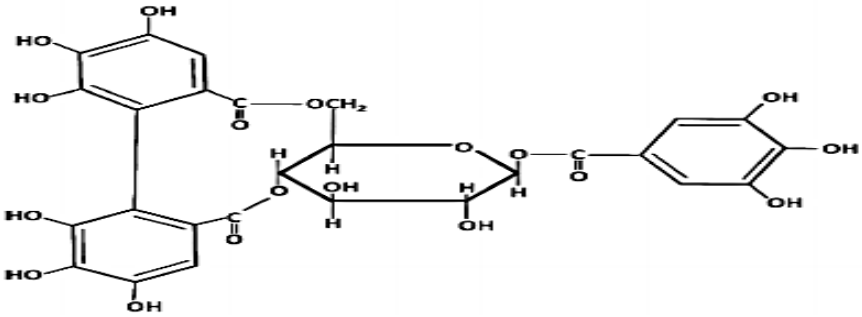


Figure 10 : Structure des tanins hydrolysables (1-O-galloyl-4,6-hexahydroxydiphenoylβ-D-glucose (OGβDG) (ARBENZ et *a*l., 2015).

- **Les tanins condensés**

Appelés aussi proanthocyanidines, ce sont des polymères de flavonoïdes (LEPOLDINI et *al*., 2011) ne possédant pas de sucres dans leurs structures. Ces composés sont obtenus par des liaisons carbone-carbone entre des unités de flavan-3-ols (BRUNETON, 1999) (figure 12).

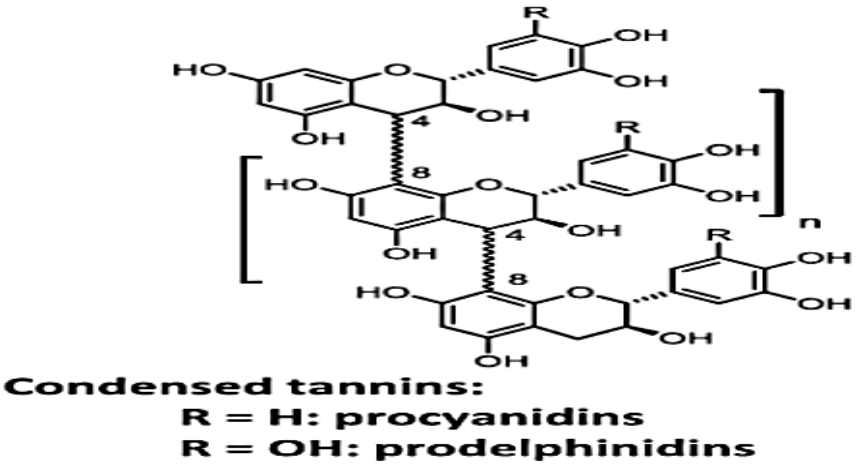


Figure 11 : Structure de tanins condensés (ROPIAK et *al*., 2017).

4. Biosynthèse des polyphénols

La biosynthèse des polyphénols se fait par deux voies principales qui sont :

4.1. La voie de Shikimate

C'est la voie de biosynthèse principale des composés aromatiques, dans les plantes et les micro-organismes, y compris les acides aminés aromatiques : la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Ce sont des métabolites primaires qui servent de précurseurs pour de nombreux produits naturels (secondaires) tels que les flavonoïdes, les acide phénoliques, les coumarines, les alcaloïdes…etc. (BRUNETON, 2009).

4.2. La voie de l'acétate malonate

Ce mode de synthèse consiste en la cyclisation des chaines polycétoniques, elles-mêmes obtenues par condensation de groupements acétates. Cette dernière étape ne se fait qu'après carboxylation de l'acétylCoA (coenzyme A) en malonylCoA. Chez les flavonoïdes, le cycle latéral (A) provient de l'enchainement de 3 acétyl-COA (MERGHEM, 2009).

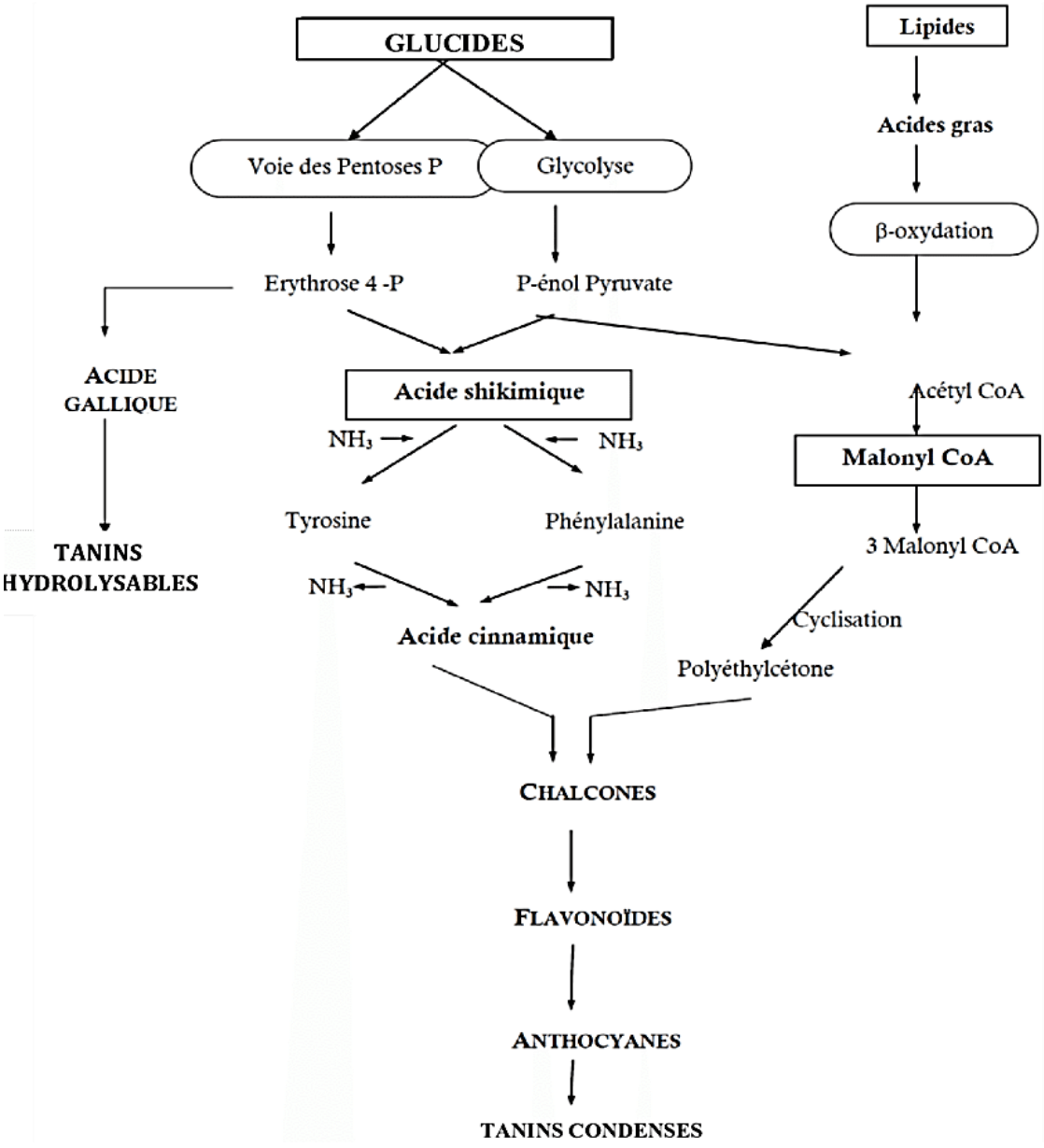


Figure 12 : Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols (CHAOUCHE, 2014).

5. Rôles et fonctions biologiques des polyphénols

Les polyphénols attirent de plus en plus l'attention des chercheurs en raison de leurs nombreuses propriétés et effets bénéfiques sur la santé humaine :

a. Chez les végétaux

Les polyphénols sont des pigments responsables des teintes des différentes parties de la plante (EDEAS, 2007). Ils jouent un rôle important dans son interaction avec son environnement, en particulier contre les radiations UV (ultraviolet), le stress oxydatif et dans la défense et la résistance des plantes vis-à-vis des agents pathogènes (CLERIVET et *al*., 2013).

b. Chez l'être humain

La consommation d'aliments riches en polyphénols réduit le développement de nombreuses pathologies (cancer, athérosclérose, maladies cardiovasculaires et hypertension…). Cela peut s'expliquer par la capacité de ces composés à modifier de nombreux facteurs impliqués dans la genèse de ces maladies. Ainsi, ils modulent l'activité de nombreuses protéines intracellulaires (les protéines kinases, les phospholipases, l'adénylate cyclase, les ATPases, les cyclo-oxygénases (COX), le cytochrome P450), ce qui est à l'origine de nombreuses activités biologiques des plantes médicales (MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002) (figure 14).

La figure ci-dessous résume les principales activités biologiques des polyphénols :

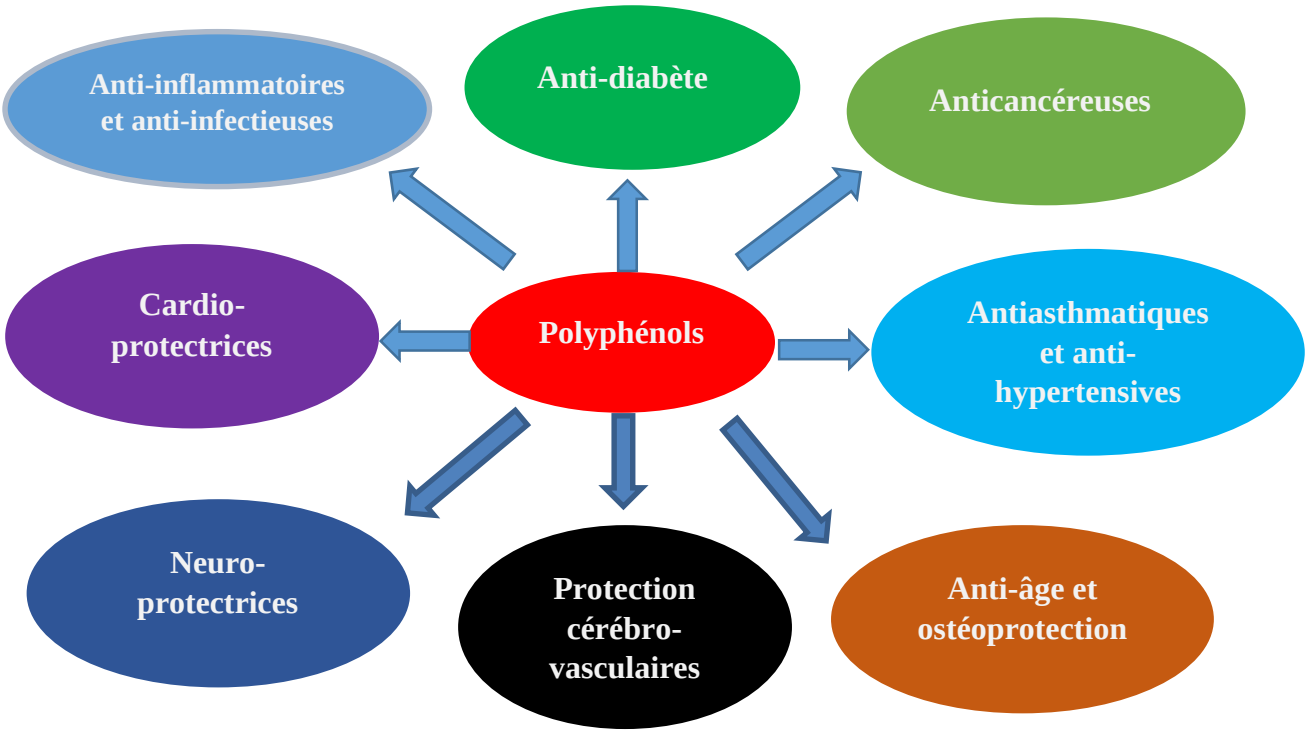


Figure 13 : Rôles des polyphénols dans la santé humaine (GAESAN et *al*., 2017).

5.1. Activité anti-inflammatoire

5.1.1. Définition de l'inflammation

La réaction inflammatoire est la réponse de l'organisme à une agression dont l'origine est physique (chaleur, froid, rayonnements 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 tels que des composés issus de la réaction immunitaire (complexes immuns, anticorps cytotoxiques, cytokines…). Quelle que soit la nature du facteur déclenchant, les manifestations de la réponse inflammatoire seront les mêmes mais avec des intensités et des durées variables (figure 15).

5.1.2. Les types d'inflammation

- ✓ **Inflammation aigue**

L'inflammation aigue est la réponse immédiate de l'organisme à un agent agresseur. Sa durée varie de quelques jours à quelques semaines, elle comporte trois phases :

- Une phase vasculaire immédiate avec dilatation et perméabilisation des vaisseaux ;
- Une phase cellulaire consécutive marquée par un afflux de polynucléaires et macrophages, libération d'enzymes, de phagocytose et production de lymphokines.
- Une phase de résolution, régénération et cicatrisation correspondant à la synthèse du collagène par les fibroblastes (WEILL et *al*., 2003 ; CHARLES et *al.*, 2010).

- ✓ **Inflammation chronique**

L'inflammation chronique est une inflammation prolongée, caractérisée par sa persistance dans le temps, elle peut durer plusieurs semaines voire plusieurs années (IWALEWA et *al.*, 2007; Charles et al., 2010). Dans ce type de réponse, les phénomènes d'inflammation, de destruction tissulaire et de réparation coexistent tout au long de l'évolution de l'inflammation, contrairement à l'inflammation aigue. Par conséquent, les tissus ne se régénèrent pas correctement et un phénomène de cicatrisation pathologique s'installe (WEILL et *al*., 2003).

5.2. Les anti-inflammatoires synthétiques

- ✓ **Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)**

En raison de ses propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et antalgiques, cette classe thérapeutique est l'une des plus utilisées dans le monde (BLAIN et *al*., 2000). La composition chimique de ces médicaments est très hétérogène, mais ils ont en commun l'inhibition non sélective des deux cyclooxygénases (COX1 et COX2) (ORTEGA et *al*., 2014).

- ✓ **Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)**

Ces composés constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien. Ce dernier est une substance dérivée du cholestérol (BLAIN et *al*., 2000). Les AIS représentent le traitement le plus efficace contre les maladies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde et les maladies auto-immunes (KESSEL et *al*., 2014).

Ces deux types d'anti-inflammatoires exposent à plusieurs effets secondaires qui peuvent parfois être graves, parmi eux nous retrouvons :

La toxicité gastro-intestinale, les troubles digestifs, les anomalies neuropsychiques, excitation avec euphorie et troubles du sommeil, des troubles de l'hémostase dus à l'aspirine ainsi que des complications rénales. C'est notamment pour ces raisons que l'on a de plus en plus recours aux traitements anti-inflammatoires de sources naturelles.

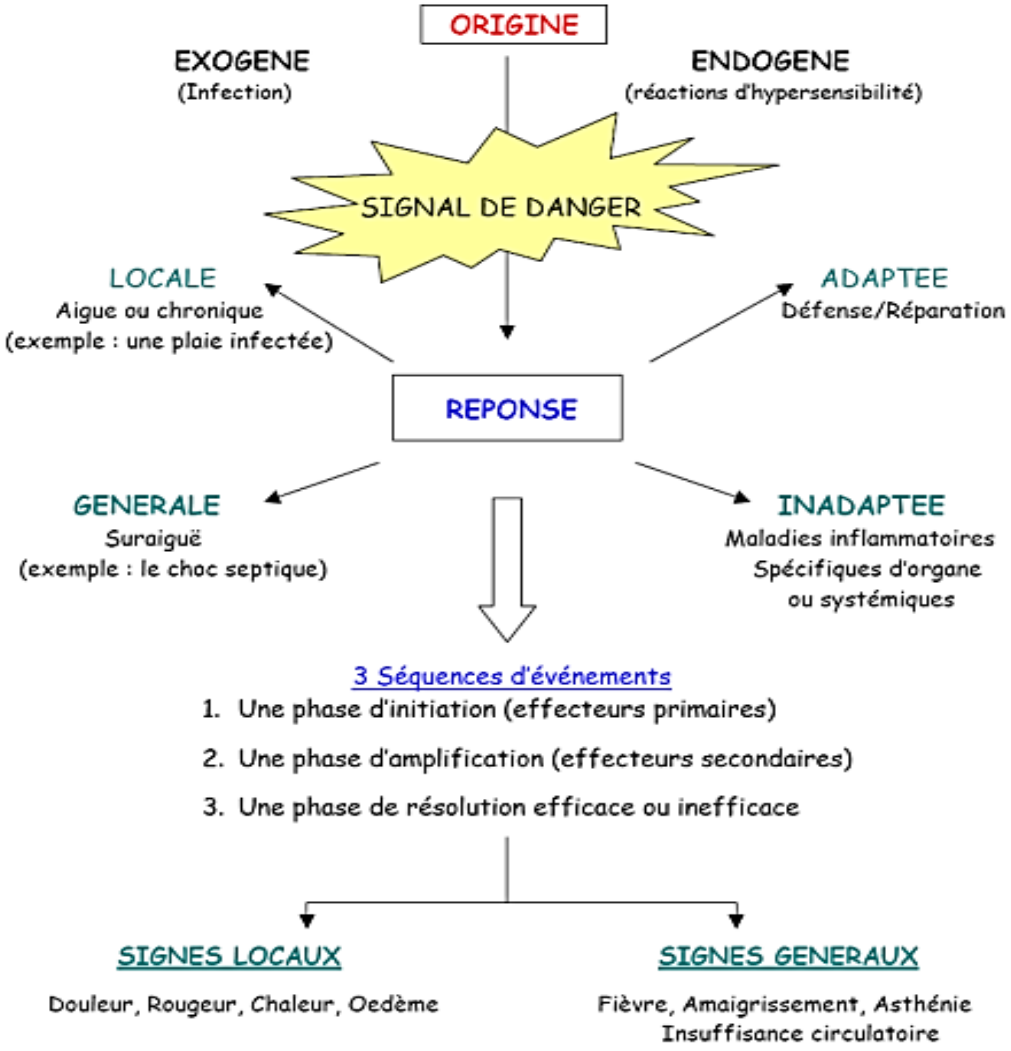


Figure 14 : La réaction inflammatoire schématisée (PRIN et *al*., 2009).

5.3. Mécanismes d'action des anti-inflammatoires naturels

Depuis toujours, l'homme a utilisé les plantes pour traiter l'inflammation. En effet, de nombreuses études comme celle menée par LANDOLFI en 1984 indiquent que les polyphénols possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le système immunitaire par plusieurs mécanismes. Cet effet passe notamment par l'inhibition de la production des Espèces Réactives d'Oxygène (ROS) et des enzymes pro-oxydantes comme les Oxydes Nitriques Synthases (NOS) et ainsi l'élimination du radical qui favorise l'inflammation et cause des dommages aux tissus (SONAR et *al*., 2016).

Sous l'action de la cyclo-oxygénase et la lipoxygénase, l'acide arachidonique est métabolisé respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Ladite étude a montré que certains polyphénols sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique.

L'étude de LEYVA et ses collaborateurs en 2016 a aussi démontré le rôle de certains polyphénols dans la diminution de la production d'autres médiateurs cruciaux de l'inflammation tels que les prostaglandines et les oxydes d'azote (NO). Les résultats de l'étude faite par TSAI sont complémentaires et démontrent le rôle du resvèratrol dans la suppression du facteur de nécrose tumorale TNFα et de l'interféron gamma (IFN-g) (TSAI et *al*., 2017).

Des études faites sur les feuilles de *Malva sylvestris* ont démontré une forte activité anti complément, jouant ainsi un rôle important dans la modulation la réponse inflammatoire (GONDA et *al*., 1990 ; TOMODA et *al*., 1989). De plus EL GHAOUI et ses collaborateurs ont démontré que cette plante induit une augmentation de la production d'IL-12 et d'interférons γ et inhibe la transcription d'IL-4, elle serait donc un activateur des macrophages et des lymphocytes Th1 et activerait ainsi la réponse immunitaire pour lutter contre l'inflammation (EL GHAOUI et *al*., 2008).

1.1. L'activité anti-hémolytique

5.4.1. Définition de l'hémolyse

L'hémolyse est un phénomène irréversible au cours duquel les hématies sont détruites et libèrent leur contenu cellulaire notamment l'hémoglobine (Hb). Le degré d'hémolyse peut être régulé soit par :

- ✓ Des facteurs intracellulaires qui peuvent être : l'état de la membrane, le métabolisme énergétique intracellulaire, la structure de l'hémoglobine.
- ✓ Des facteurs extracellulaires : tels que le plasma, l'état anatomique de l'appareil circulatoire et l'état fonctionnel du système mononuclé phagocytaire (macrophages, monocytes et leurs cellules souches) (AGUILAR, 2007).

On peut distinguer deux types d'hémolyses, l'une est physiologique et l'autre est pathologique (hyper hémolyse) (LIPPI et *al*., 2011).

L'hémolyse physiologique

Consiste en la destruction du globule rouge (GR) ayant atteint sa durée de vie maximale (120 jours). Le vieillissement naturel de la cellule se traduit par des modifications biochimiques, morphologiques ou de plasticité, induisant sa phagocytose par le système des phagocytes mononuclées. Ce processus n'a pas de répercussions cliniques ou biologiques et se déroule essentiellement dans la moelle osseuse, et à moindre mesure dans la rate, le foie et la circulation sanguine.

L'hémolyse pathologique

Dont la cause est le vieillissement prématuré des GR qui sont détruits de façon exagérée et indépendamment de leur âge. Cela entraine une anémie hémolytique grave (VENTAKA et *al.*, 2016).

5.5. Les anti-hémolytiques

5.5.1. Action des anti-hémolytiques synthétiques

Un médicament anti-hémolytique retarde ou inhibe la lyse des globules rouges. Plusieurs existent, nous citerons l'acide folique, le complément de fer, la vitamine B 12 et les corticoïdes (BACHHY e*t al.*, 2015).

5.5.2. Mécanismes physiologiques de maintien de l'intégrité de la membrane érythrocytaire

Une balance entre le passage actif et passif des électrolytes à travers la membrane érythrocytaire permet le maintien du volume cellulaire de l'érythrocyte. La pompe Ca^{2+} -ATP ase par exemple assure le maintien de la concentration du Ca^{2+} constante entre 30 et 60 mM à l'intérieur de la cellule par rapport à une concentration extérieure de 1.8 mM. En cas de disfonctionnement de ce transport à travers la membrane du globule rouge, cela induira l'accumulation de ces ions à l'intérieur de la cellule causant un grand nombre de pathologies dont la drépanocytose et des anémies hémolytiques (VAN DUIJIN et *al.*, 2001).

Les globules rouges, de par leurs fonctions dans l'organisme, sont particulièrement exposés aux espèces réactives d'oxygène (CHAUDHURI et *al.*, 2007).

L'érythrocyte peut éliminer les électrons à l'origine de ce stress par le complexe PMRS (Plasma Membrane Redox System) et AFR réductase (Ascorbate Free Radical), des complexes enzymatiques qui expulsent ces électrons vers le milieu extérieur (RIZVI et *al*., 2009 ; VAN DUIJIN et *al*., 2001).

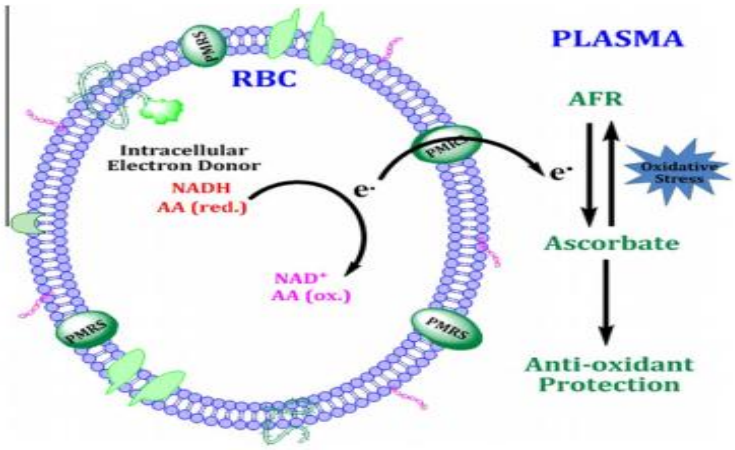


Figure 15 : Représentation schématique du fonctionnement du système de redox de la membrane plasmique (PMRS). AA-ascorbic acid (RIZVI et *al*., 2011).

5.6. Action anti-hémolytique des polyphénols

Ces dernières années, le domaine de la recherche scientifique investigue de nouvelles substances anti hémolytiques d'origine végétale, pour remplacer les anti-hémolytiques synthétiques. De nombreuses études (DEVJANI et BARKHA, 2011 ; TAY-YABA, 2016 et BELKHIR, 2017) sur différentes plantes démontrent l'effet anti-hémolytique des extraits végétaux. Néanmoins, le mécanisme d'action des biomolécules composant ces extraits n'est pas encore élucidé et plusieurs hypothèses ont été émises :

- Les polyphénols, antioxydants naturels, possèdent un effet anti-hémolytique, en stabilisant la membrane des globules rouges contre la lyse osmotique (CHAUDHURI et *al*., 2007). Cette activité est effective grâce à l'intégration dans la couche lipidique externe de la membrane érythrocytaire et modifient l'arrangement de la partie hydrophile, sans changer la fluidité de la partie hydrophobe. L'emplacement de ces composés dans la partie hydrophile de la membrane semble constituer un bouclier de protection de la cellule contre les substances toxiques en particulier les formes réactives de l'oxygène (BONARSKA-KUJAWA et *al*., 2014).

- De plus, les polyphénols pourraient agir en chélatant les métaux de transition tels que le cuivre et le fer, qui peuvent renforcer les effets oxydants par la production des radicaux hydroxyles (OH·) (Mladěnka et *al*., 2011).
- Par ailleurs, les composés phénoliques ont la capacité de se fixer sur le site actif de la NADH-cytochrome réductase, ce qui active le complexe PMRS et donc agit contre l'oxydation de l'érythrocyte (KESHARWANI et *al.,* 2012 et Fatima et *al.*, 2013).
- Une étude faite par DUCHNOWITZ et ses collaborateurs en 2012 a démontré que dans le cas d'érythrocytes provenant de patients d'hypercholestérolémiques, les polyphénols diminueraient la concentration membranaire de cholestérol, ce qui améliorerait la fluidité membranaire de l'érythrocyte. Les polyphénols peuvent se lier à la surface de la membrane de l'érythrocyte, influant ainsi sur la position du cholestérol.

Le travail expérimental que nous avons réalisé a été effectué au sein du laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologie (LABAB) de la faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou (UMMTO), durant la période comprise entre mars et mai de l'année 2019.

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés aux effets bénéfiques que l'on peut retrouver en exploitant des composés naturels. Nous avons en premier lieu déterminé la teneur en polyphénols totaux d'extraits de feuilles de *Malva sylvestris* L., pour ensuite en évaluer les effets biologiques. Le choix de cette plante a été motivé par son utilisation fréquente en médecine traditionnelle, mais aussi par le fait que peu d'études ont été menées sur l'activité anti-inflammatoire et anti-hémolytique de celle-ci. L'évaluation des propriétés biologiques s'est d'abord portée sur l'effet protecteur de l'extrait aqueux de cette plante vis-à-vis de la dénaturation thermique des protéines. Puis, nous avons mis en évidence l'effet protecteur de *Malva* vis-à-vis d'un stress osmotique et thermique.

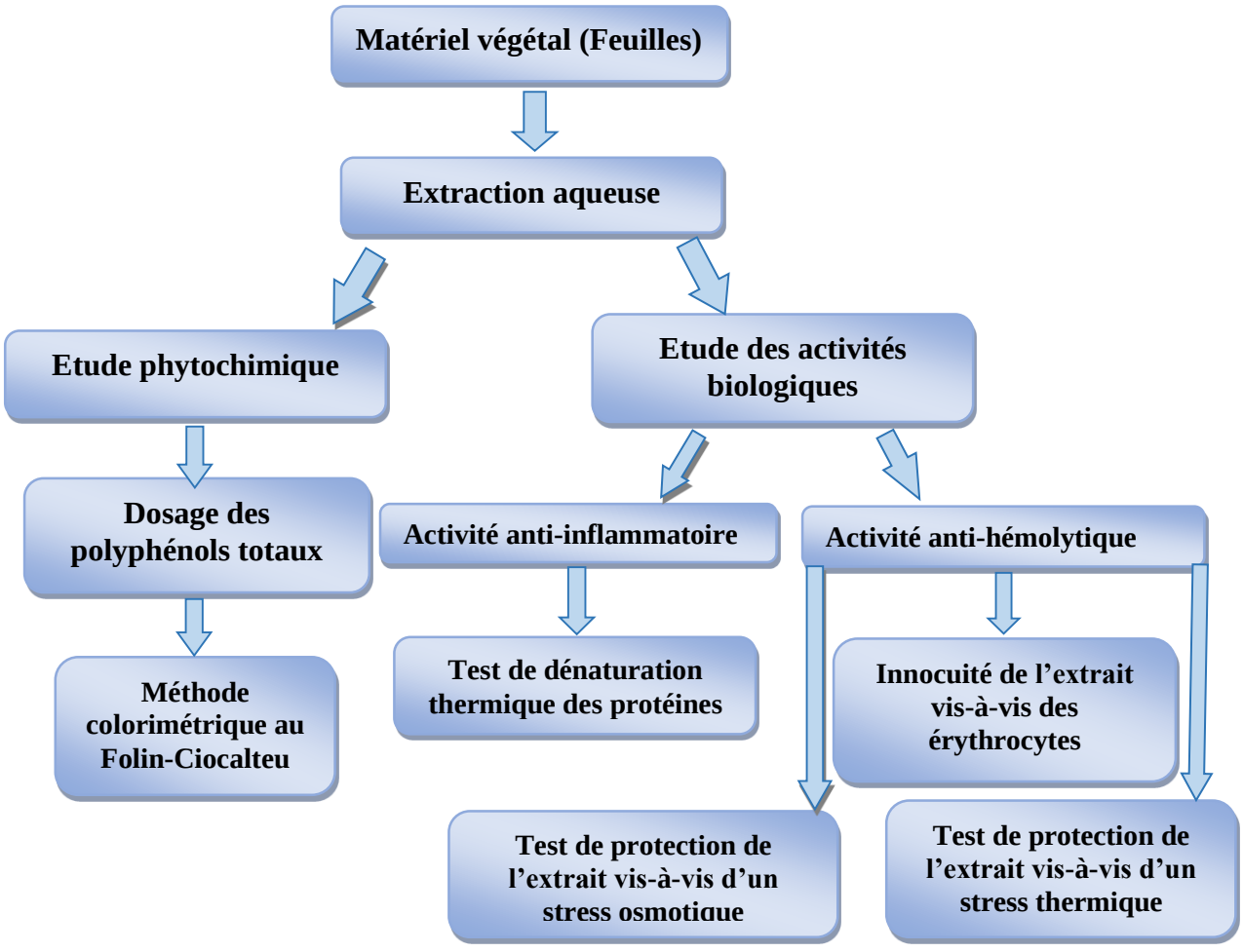


Figure 16 : Schéma récapitulatif des protocoles expérimentaux adoptés.

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

Les feuilles de *Malva sylvestris*, préalablement identifiées, ont été récoltées au mois de février 2019 dans la région de Larbâa Nath Irathen, dans la wilaya de Tizi-Ouzou (Algérie). Le choix de la zone d'échantillonnage est motivé par son éloignement de la route et de toute exploitation agricole.

Celles-ci ont été triées, lavées puis séchées à l'ombre et à température ambiante pendant près de 10 jours (jusqu'à stabilisation du poids sec). Une fois sèches, ces feuilles sont broyées puis stockées à l'abri de la lumière.

Dans cette étude, le sang utilisé provient de volontaires sains, non-fumeurs, n'ayant pas suivi de médication (pas de traitement anti-inflammatoires). Les échantillons sont récupérés dans des tubes héparinés, puis conservés à 4°C.

1.2. Appareillage

Le tableau suivant récapitule les différents et nombreux appareillages et consommables que nous avons eu à utiliser dans notre étude.

Tableau VI : Différents appareillages et consommables utilisés.

Verrerie	Eprouvettes Erlenmeyer Béchers Entonnoir Fioles Tubes à essai
Autres	Papier Whatman Micropipette réglable Barreaux magnétiques Spatule, pissette, portoirs
Appareillage	**Marque**
Balance de précision Agitateur magnétique Centrifugeuse réfrigérée Lyophilisateur Vortex Spectrophotomètre UV-visible Bain marie Congélateur à -80° C pH mètre	KERN & Sohn (Allemagne) Stuart Sigma 4-16 K (Allemagne) CHRIST alpha 1-2 (Allemagne) UV-9200 (Royaume unie) nüve bath (Turquie) nüveDF 490

1.4. Solvants, réactifs et solutions

- Eau distillée
- Acide gallique (acide 3,4, 5trihydroxybenzoïque) ;
- Folin-Ciocalteu ;
- Sels : Carbonate de sodium (Na_2 CO_3), Chlorure de sodium (NaCl), Phosphate dissodique (Na_2HPO_4) et le Phosphate monossodique (NaH_2PO_4) ;
- Aspirine ;
- Ovalbumine ;
- Saponine.

2. Méthodes

2.1. Séchage et broyage du matériel végétal

Après un séchage à l'air libre et à l'obscurité, les feuilles de *Malva* sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à obtention d'un poudre fine et homogène.

Figure 17 : Forme séchée et broyée de *Malva sylvestris* L. (photos personnelles*).*

2.2. Préparation de l'extrait brut

L'extraction est effectuée par macération, en laissant la poudre en contact pendant 24h avec un solvant approprié pour en extraire les composés bioactifs.

Dans ce travail, nous avons procédé à une extraction aqueuse où vingt grammes (20 gr) de poudre végétale sont mis à macérer dans 280 ml d'eau distillée pendant 24 h, à température ambiante et sous agitation continue.

Le macéra est ensuite filtré successivement à l'aide d'une passoire, d'un papier Wattman n°1 puis centrifugé à 2000 tours/min pendant 10 min à 4°C afin d'éliminer les débris.

Le filtrat obtenu a été réparti dans cinq cristallisoirs, congelé à -80°C pendant 24 h puis déposé dans un lyophilisateur christ alpha1-2. Le lyophilisat collecté est réparti dans des flacons en verre teinté, hermétiquement scellé puis conservé au réfrigérateur à 4°C.

La figure 18 résume les différentes étapes qui nous ont permis d'obtenir l'extrait brut.

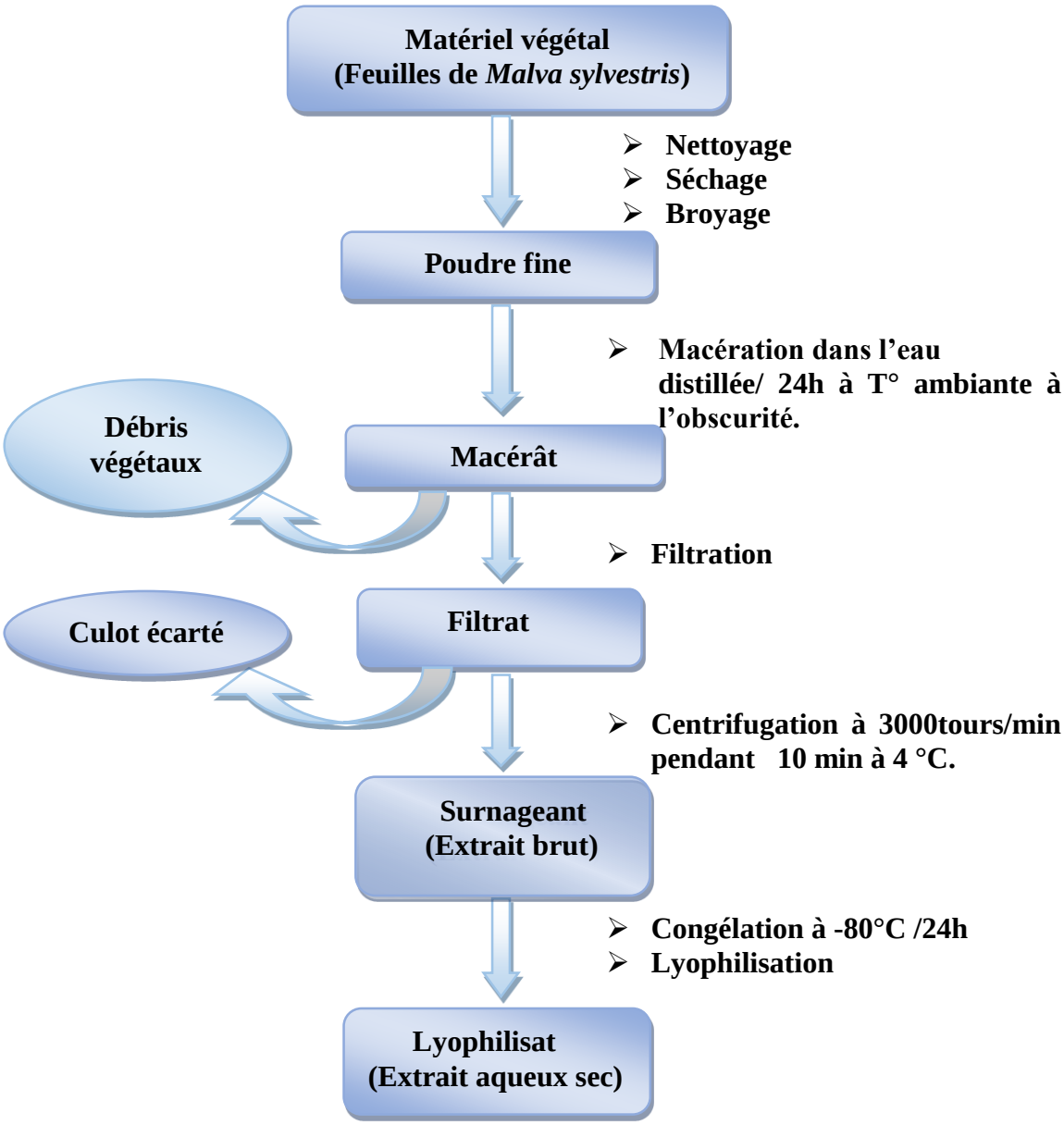


Figure 18 : Schéma récapitulatif de l'extraction aqueuse de *Malva sylvestris* L.

- **Rendement de l'extraction**

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après lyophilisation, et exprimé en pourcentage (%) par rapport à la masse initiale de la poudre soumise à l'extraction.

Il est calculé suivant la formule présentée ci-dessous :

$$R\ (\%) = [M / M_0]\ X\ 100$$

R (%) : rendement exprimé en %

M : masse en gramme de l'extrait sec obtenu

M_0 : masse en gramme de la poudre végétale utilisée (20g)

2.3. Dosage des polyphénols totaux (PPT)

Dans le but d'évaluer quantitativement le contenu en composés phénoliques de l'extrait de *Malva sylvestris*, un dosage des PPT par la méthode colorimétrique au Folin-Ciocalteu mise au point par SINGLETON et ROSSI en 1965 a été réalisé.

Un volume de 200 µl de l'extrait ou d'acide gallique a été préparé à une concentration de 100 µg/ml puis additionné de 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (dilué au dixième). Après 4 minutes, 800µl de la solution de carbonate de sodium Na_2Co_3 (75 mg/ml) sont ajoutées afin de stabiliser la réaction. Après agitation, le mélange réactionnel est incubé pendant 45 min à température ambiante et à l'obscurité. Une fois l'incubation arrivée à son terme, une lecture des densités optiques (DO) est effectuée à 760 nm.

Le protocole que nous avons appliqué est basé sur la réduction en milieu alcalin des constituants du réactif de Folin, qui sont un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Ces derniers sont réduits lors de l'oxydation des composés phénoliques, en mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène (BOIZOT et CHARPENTIER, 2006). Cela donne au mélange une couleur bleue dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon analysé. L'absorbance est mesurée à 760 nm.

Les valeurs des concentrations sont déduites par extrapolation à partir de la droite de la courbe d'étalonnage établie à l'aide de la solution de référence d'acide gallique à des concentrations allant de 10 à 100 µg/ml. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g).

La solution mère de l'échantillon à doser ainsi que la gamme étalon sont préparées le même jour et dans les mêmes conditions opératoires.

La figure 19 récapitule les différentes étapes du protocole appliqué pour le dosage des polyphénols totaux :

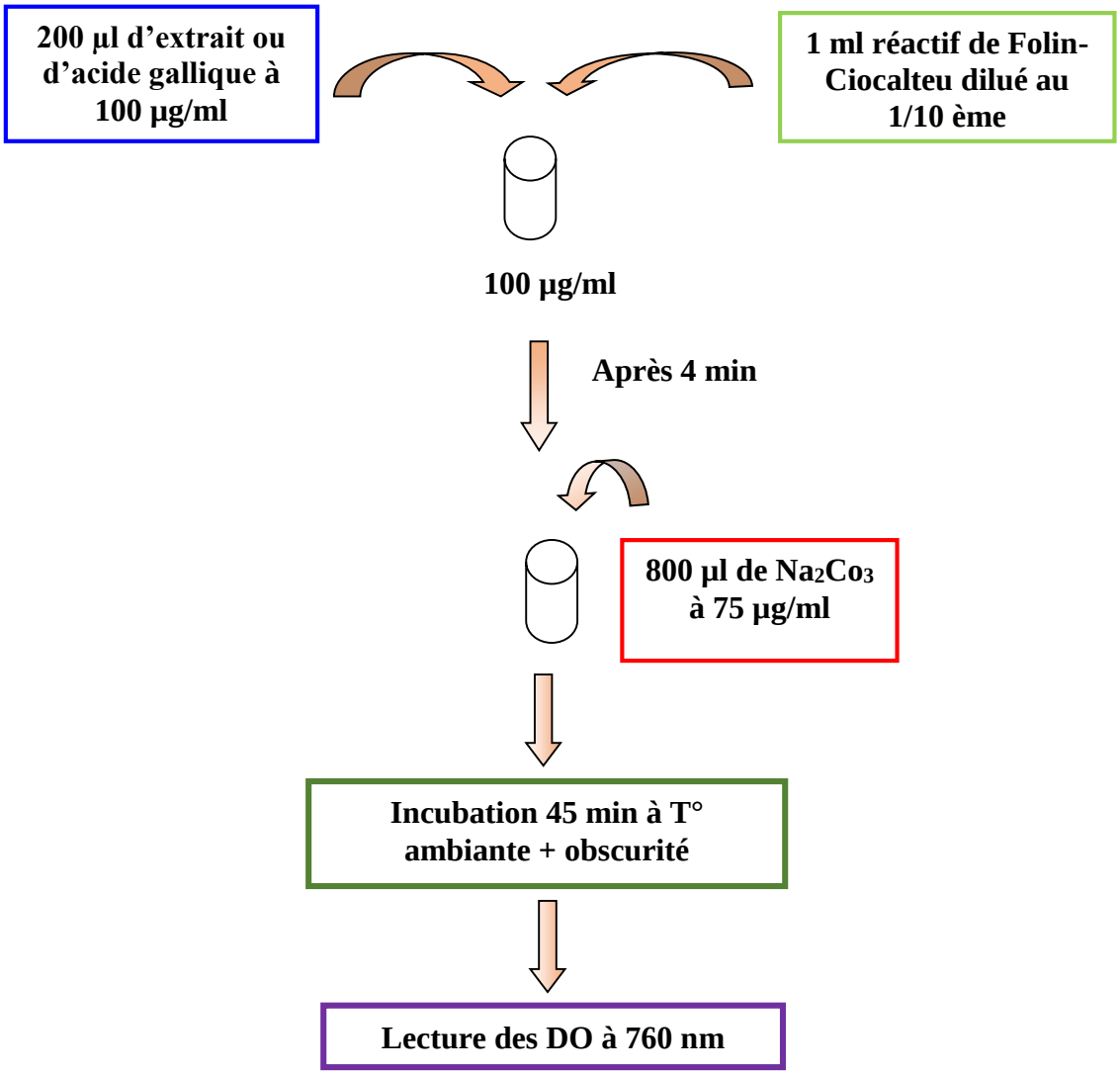


Figure 19 : Schéma récapitulatif du protocole de dosage des polyphénols totaux.

2.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

Afin d'évaluer l'activité anti inflammatoire de l'extrait végétal, nous avons appliqué le test d'inhibition de la dénaturation thermique des protéines décrit par KARTHIK et *al*. (2013).

Pour cela, une gamme de concentrations de l'extrait aqueux, allant de 3.9 à 500 µg/ml est réalisée. 1ml de chaque dilution est ajouté à 1 ml de la solution d'ovalbumine à 0.2 % préparée dans du PBS (à pH 6.4, NaCl 0.9%). Le mélange est ensuite incubé à 72°C pendant 5

min. A la fin de l'incubation, et après l'avoir vortexé, le mélange est refroidi rapidement, puis son absorbance est mesurée à 660nm.

Dans ce test, l'aspirine a été utilisée comme anti-inflammatoire de référence. L'évaluation de son activité anti-inflammatoire a été effectuée dans les mêmes conditions opératoires que celles appliquées à l'échantillon.

Les résultats enregistrés sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la dénaturation thermique de l'ovalbumine (Ova), sont calculés en utilisant l'équation ci-dessous, en se référant à un contrôle positif exempte d'extrait végétal.

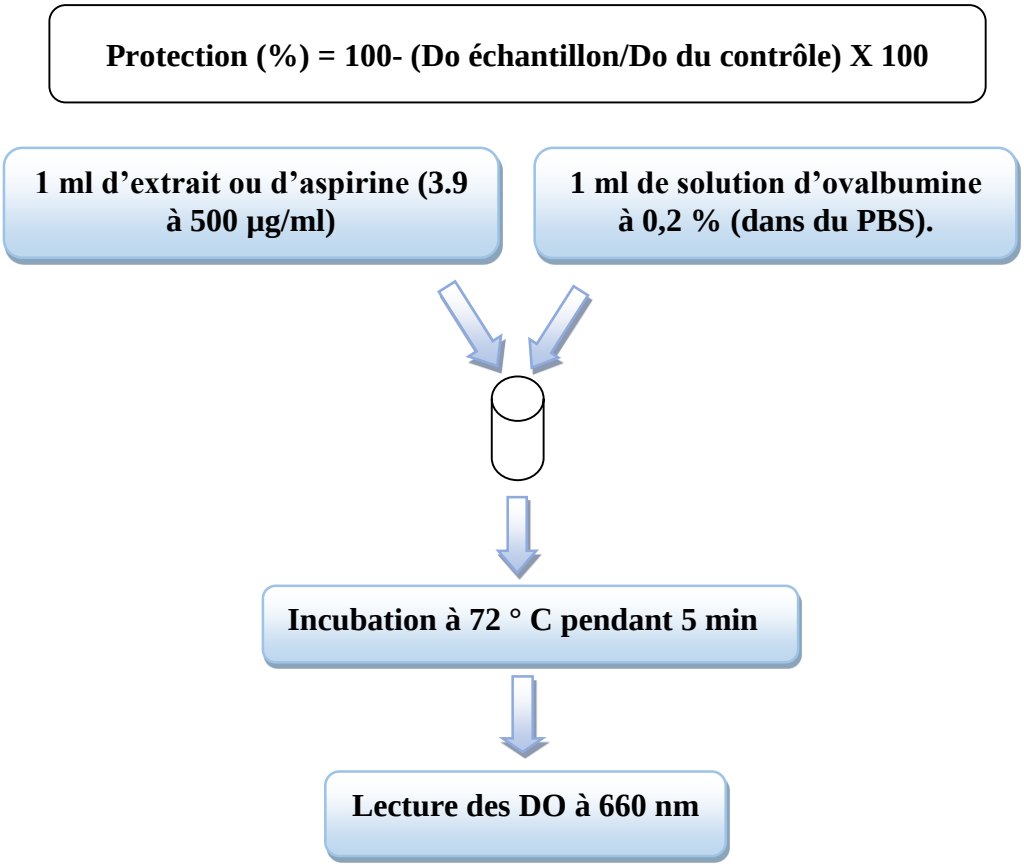


Figure 20 : Protocole récapitulatif du test de la dénaturation thermique des protéines.

2.5. Evaluation de l'activité anti-hémolytique de *Malva sylvestris*

L'étude de la protection de la membrane érythrocytaire présente un intérêt crucial dans le traitement de certaines pathologies hémolytiques.

L'objectif de cette étude est l'évaluation de la capacité de l'extrait aqueux de *Malva sylvestris* à empêcher l'hémolyse des globules rouges humais (GRh), induite d'une part par un

stress osmotique et thermique. L'utilisation des globules rouges est motivée par le fait qu'ils soient admis comme modèle cellulaire en recherche scientifique et qu'ils partagent des similitudes avec d'autres membranes cellulaires, notamment celle du lysosome (SHOBANA et VIDHYA, 2016).

L'exposition des érythrocytes à une concentration saline hypotonique et à la chaleur conduit à la rupture de leurs membranes avec libération de leur contenu cytoplasmique (hémoglobine). L'intensité de l'hémolyse est estimée par la mesure de l'absorbance de l'hémoglobine libérée.

- **Préparation de la suspension érythrocytaire**

Le sang utilisé pour préparer les suspensions sanguines a été prélevé sur des sujets sains au niveau de l'hôpital NEDIR Mohamed de Tizi-Ouzou. Une fois collecté dans des tubes héparinés, ceux-ci sont acheminés au laboratoire dans une glacière à 4°C où ils sont centrifugés à 2000 rpm pendant 10 min à 4°C pour séparer les érythrocytes des autres éléments constitutifs du sang. Après avoir retiré le plasma, le culot érythrocytaire est lavé trois fois successives avec du tampon phosphate salin (PBS) (pH 7.5 ; 0.9 % NaCl).

2.5.1. Test de l'innocuité de l'extrait vis-à-vis des cellules érythrocytaires

Avant de s'intéresser aux propriétés de stabilisation membranaire de l'extrait nous devons étudier son innocuité vis-à-vis des cellules érythrocytaires. Pour cela, une gamme de concentrations de l'extrait aqueux allant de 18.75 à 1200 µg/ml a été préparée dans un tampon phosphate (pH 7.4 ; 0.9% NaCl) à un hématocrite de 2%. Le mélange a été incubé pendant 10 min à température ambiante, puis centrifugé à 2000 rpm à 4° C pour enfin lire l'absorbance du surnageant à 540 nm.

Dans cette partie, la saponine, hémolytique de référence, à une concentration de 1200 µg/ml (témoin positif induisant 100 % d'hémolyse), a été utilisée pour déterminer le pourcentage de protection. L'évaluation de l'activité hémolytique de ces derniers a été effectuée sous les mêmes conditions opératoires. De plus, un tube sans traitement (témoin négatif induisant une hémolyse naturelle) a été préparé. Ainsi les pourcentages d'hémolyses de chacune des concentrations utilisées sont calculés suivant l'équation ci-dessous.

$$\text{Pourcentage d'hémolyse (\%)} = [Do_E - Do_{c-} / Do_{c+}] \times 100$$

Do_E : Densité optique de l'échantillon

Do_{c-} : Densité du contrôle négatif

Do_{c+} : Densité du contrôle positif.

La figure 20 représente un schéma récapitulatif des étapes suivies :

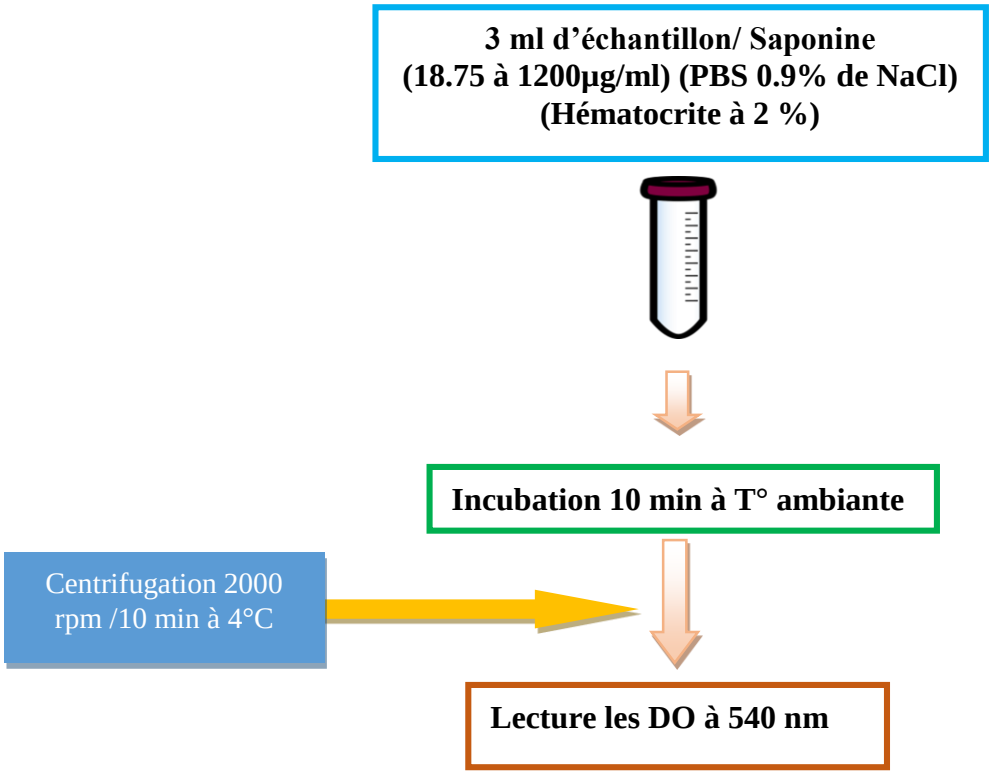


Figure 21 : Schéma récapitulatif du test d'innocuité de l'extrait.

2.5.2. Effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress osmotique

L'exposition de l'érythrocyte à un stress hypotonique aboutit à la lyse de sa membrane qui s'accompagne par le relargage de l'hémoglobine. Le test qui suit apprécie l'effet protecteur de *Malva sylvestris* vis-à-vis des cellules érythrocytaires ayant subi ce stress et cela par le suivi par spectrophotométrie de l'hémoglobine libérée.

Dans ce volet de notre étude, nous avons appliqué le protocole de FREITAS et *al.* (2008) qui consiste à générer un stress osmotique par une variation des concentrations en NaCl, utilisées allant de 0.3%, 0.5%, 0.7 % et 0.9 %.

1 ml de la suspension érythrocytaire à 2 % est mélangé à 1 ml de tampon phosphate (pH 7.4) à concentrations variables en NaCl citées précédemment, où chacune est combinée à des concentrations variables de l'extrait (18.75, 37.5, 75,150, 300, 600 et 1200 µg/ml).

Le mélange est incubé 30 min à 37 °C sous agitation douce puis centrifugé à 2000 rpm pendant 10 min à 4° C.

L'absorbance du surnageant est mesurée à 540 nm et le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse est calculé par l'équation suivante :

Inhibition de l'hémolyse (%) = (Do1 - Do2/Do1) x 100

Do1= Densité optique de la solution hypotonique de globules rouges sans l'extrait
Do2 = Densité optique de la solution hypotonique de globules rouges avec l'extrait

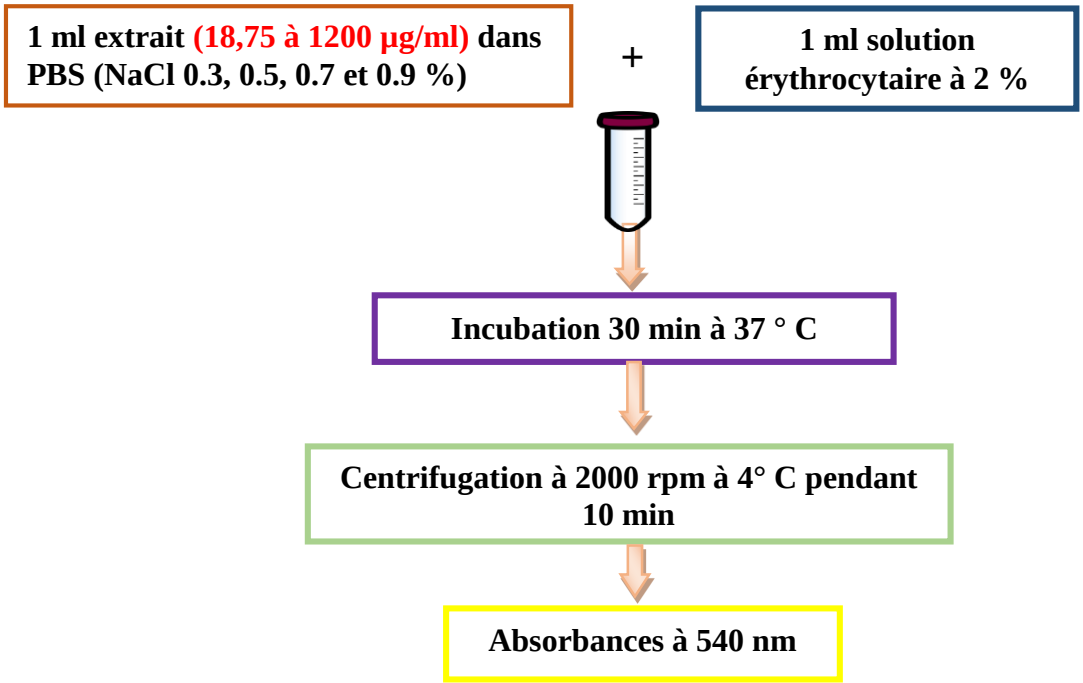


Figure 22 : Schéma récapitulatif des étapes de l'hémolyse induite par des solutions hypotoniques.

2.5.3. Effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress thermique

L'évaluation de l'activité protectrice de l'extrait vis-à-vis de l'hémolyse induite par un stress thermique est réalisée in vitro par la méthode spectrophotométrique décrite par SAKAT et *al*. (2010).

1ml d'extrait à différentes concentrations (18.75 à 1200 µg/ml) dissoutes dans un tampon phosphate (pH 7.4 ; NaCl 0.9 %) est mélangé avec 1 ml de globules rouges (RBC) (2%).
Le mélange réactionnel est incubé dans un bain-marie à 56°C pendant 30 minutes.

Après incubation, les tubes sont immédiatement refroidis à l'eau de robinet, puis centrifugés pendant 10 minutes à 4°C et l'absorbance du surnageant est estimée à 540 nm.

La détermination du pourcentage de protection s'est faite en utilisant l'aspirine comme anti-hémolytique de référence. L'évaluation de l'activité anti-hémolytique de l'aspirine a été effectuée dans les mêmes conditions opératoires que celles utilisées pour l'échantillon de plante.

Parallèlement, un control positif a été réalisé en remplaçant l'eau physiologique par 1 ml d'eau distillée provoquant ainsi une hémolyse totale (100 %).

Le pourcentage de protection contre l'hémolyse induite par la chaleur est calculé en utilisant l'équation suivante :

Protection (%)= 100- (Do échantillon/Do contrôle) x 100

La figure 23 récapitule des différentes étapes suivies lors de la réalisation de ce test.

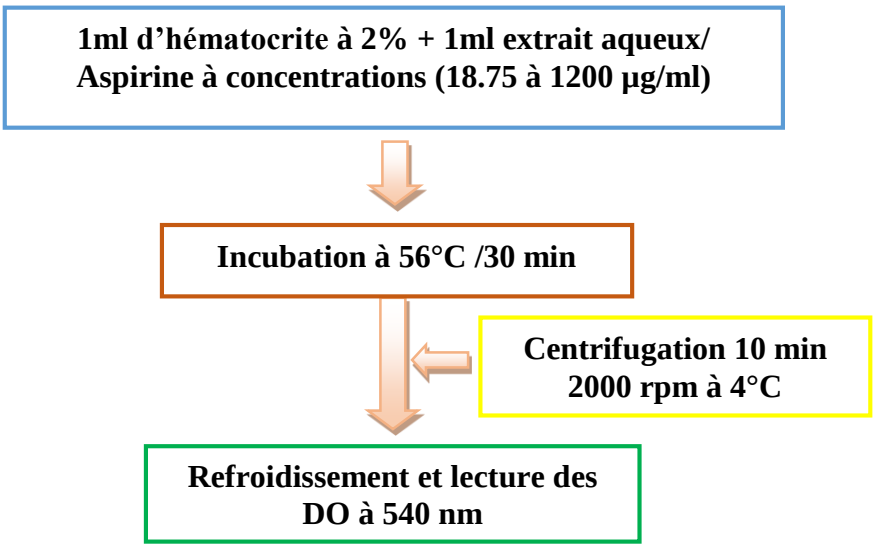


Figure 23 : Schéma récapitulatif des étapes du test de protection vis-à-vis d'un stress thermique.

3. Evaluation statistique des résultats

Tous les résultats sont exprimés en moyennes ± l'erreur standard de la moyenne (M ±S.E.M). Pour le test anti-inflammatoire et celui de la stabilité membranaire du globule rouge vis-à-vis d'un stress thermique, l'analyse statistique a été effectuée en utilisant le logiciel STATISTICA par l'analyse de la variance par (ANOVA).

1. Le rendement

L'extraction aqueuse nous a permis d'extraire des molécules à haute valeur biologique. Ces dernières se trouvent dissoutes dans le solvant d'extraction (eau) et sont récupérées par lyophilisation.

Le rendement correspond à la masse d'extrait après lyophilisation. Il se rapporte à la masse initiale de l'échantillon soumis à l'extraction et est exprimé en pourcentage. Dans notre travail ce dernier a été déterminé à 13.67 %, ce taux est élevé par rapport à celui rapporté par BEGHDAD et *al*. (2014) (5%), par contre il reste relativement proche de celui rapporté par MEZITI (2018) sur l'extrait aqueux de *Malva parviflora* (19%).

2. Teneur en polyphénols totaux (PPT)

La teneur en PPT de l'extrait aqueux de *Malva sylvestris* est déterminée par dosage colorimétrique au Folin-Ciocalteu par la méthode de SINGLETON et ROSSI (1965).

Ce réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes de tungstène et de molybdène de couleur bleue (RIBEREAU-GAYON, 1968).

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de PTT présents dans l'extrait végétal, et est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 760 nm.

La courbe d'étalonnage présentée ci-dessous, représente la variation de l'absorbance de l'acide gallique (AG) en fonction de sa concentration. En plus de sa sensibilité, le protocole est reproductif puisque l'absorbance est étroitement corrélée à la concentration de l'acide gallique utilisée dans la gamme étalon, R^2=0.9982.

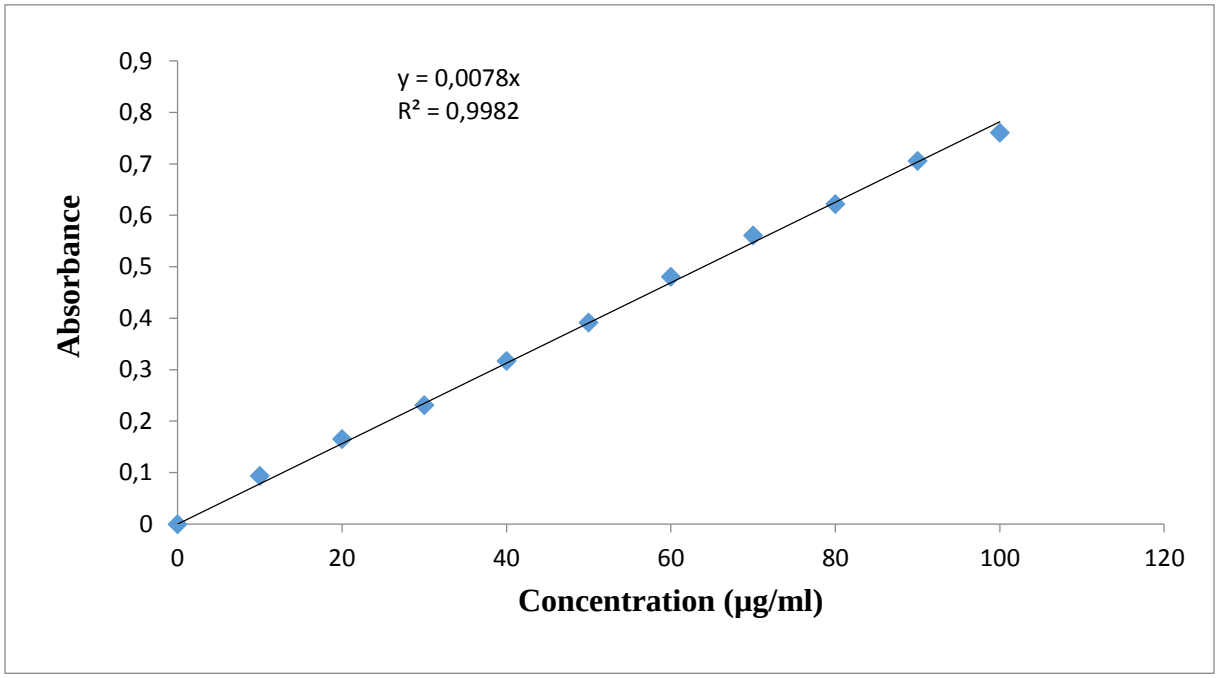


Figure 24 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

L'extrait aqueux de feuilles de *M. sylvestris* est caractérisé par une teneur en polyphénols totaux de 153.02± 2.88 mg EAG/g MS. Celle-ci est relativement supérieure à celle rapportée par BEGHDAD et *al*. (2014) (24.123±0.718 mg EAG/g MS). La teneur ainsi que la composition des extrais végétaux en ces composés phénoliques sont étroitement liées à la diversité des activités biologiques exprimées par les extraits végétaux (CABRAL et *al*., 2012).

2. Activité anti-inflammatoire

L'activité anti inflammatoire de la grande mauve a été déterminée par la méthode d'inhibition de la dénaturation thermique des protéines, décrite par KARTHIK et *al*. (2013).

La figure 25 représente la variation du pourcentage de protection vis-à-vis de la dénaturation thermique de l'ovalbumine en fonction des différentes concentrations en extrait. Ces résultats sont comparés à ceux enregistrés pour l'aspirine, considérée dans ce test comme molécule de référence.

Les résultats que nous avons enregistrés montrent que l'aspirine exprime des pourcentages de protection allant de 37.35 à 92.95 % à des concentrations variant de 3.9 à 500 µg/ml. Comparativement, les valeurs de protection pour l'extrait aux mêmes concentrations restent relativement proches et varient de 24.85±.098 à 80.88±1.91%.

L'étude statistique a révélé une différence très hautement significative entre les deux agents anti-inflammatoires pour toutes les concentrations considérées (P-value=0.00000).

Par rapport aux travaux de MOUALEK et *al.* (2016) sur *Arbutus unedo* avec un pourcentage de protection de 74.28±0.86 % à 500 µg/ml, notre extrait présente une protection relativement supérieure.

Ces résultats sont comparables à ceux de HABIBUR et *al*. (2015) pour l'extrait *d'Oryza sativa* où il a enregistré une protection de l'ordre de 84.15%. Cependant, notre extrait présente une protection relativement supérieure par rapport à celle rapportée par KALAVANI et *al*., (2016) pour l'extrait de *Pithecellobium dulce* (62.80 %).

D'après ces résultats, l'extrait aqueux de *M.sylvestris* contribuerait à l'inhibition de la dénaturation des protéines. Il serait donc capable d'inhiber la production d'auto- antigènes protéiques induisant une réponse immunitaire et participant ainsi à l'entretien de l'inflammation ce qui a pour incidence de nombreuses maladies inflammatoires notamment la polyarthrite rhumatoïde (SHARMA et *al.*, 2011 ; HABIBUR et *al*., 2015).

La figure 25 illustre le taux de protection contre la dénaturation thermique de l'ovalbumine en présence de l'aspirine et de l'extrait aqueux de *Malva sylvestris* L.

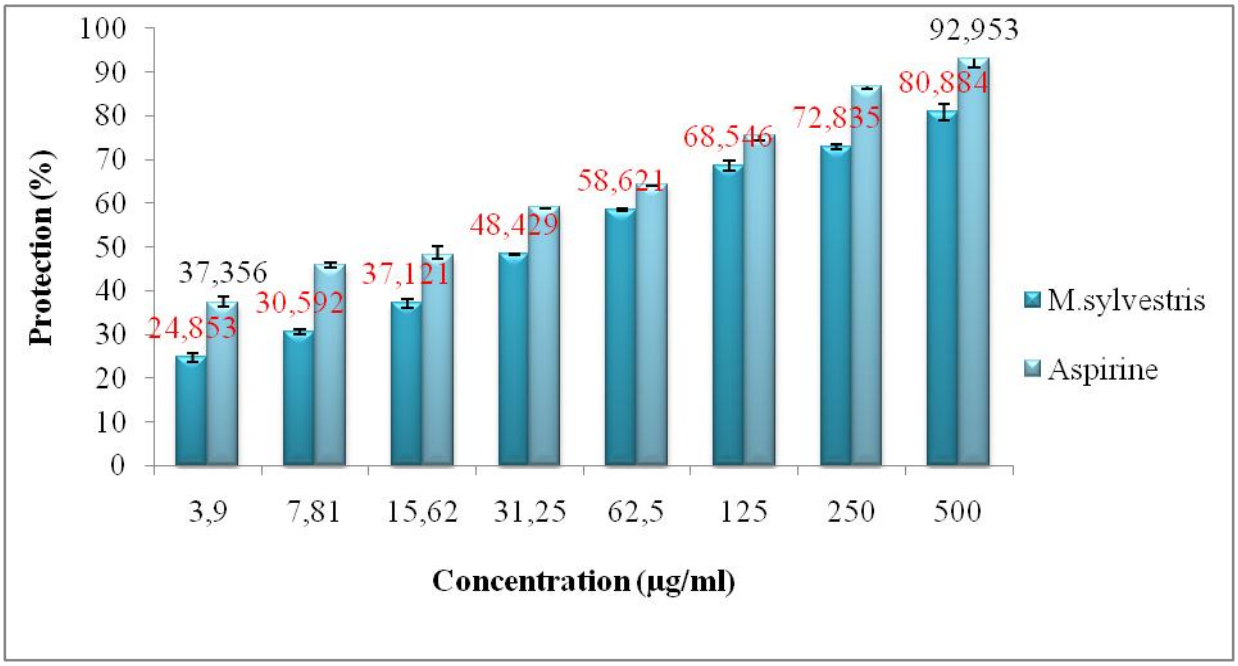


Figure 25 : Taux de protection contre la dénaturation thermique de l'ovalbumine en présence de l'aspirine et de l'extrait aqueux de *Malva sylvestris* L.

3. Activité anti-hémolytique

3.1. Innocuité de l'extrait vis-à-vis de la cellule érythrocytaire

Les taux d'hémolyse obtenus après incubation des érythrocytes en présence d'extrait végétal sont calculés en référence à un témoin positif (GR avec de la saponine) et à un témoin négatif (GR sans traitement). Ces résultats sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau VII : Pourcentage d'hémolyse en fonction de la concentration d'extrait de feuilles de *Malva sylvestris* L.

Concentration de l'extrait végétal (µg /ml)	Hémolyse (%)
37.5	0.98 ±0.29
75	1.75± 0.26
150	1.98 ±0.48
300	2.61 ±0.64
600	3.10± 0.25
1200	10.01±1.26

Ces résultats indiquent que l'extrait de plante présente une activité hémolytique modérée, allant de 0.98±0.29% à 10.01±1.26%. La lyse des érythrocytes est proportionnelle à l'augmentation de la concentration d'extrait. Dans les travaux de GANGWAR et *al.* (2014) sur l'extrait de *Mallotus philippenensis,* nous retrouvons une hémolyse de 14% à la concentration de 100 µg /ml, ce taux est considéré comme non hémolytique et cet effet protecteur pourrait être attribué aux composés phénoliques, cependant le mécanisme reste non élucidé.

Selon BONARSKA-KUJAWA et *al.* (2011), les composés phénoliques s'incorporent dans la couche hydrophile externe et n'ont aucun effet sur la fluidité de la partie hydrophobe. Ainsi l'action protectrice des ces composés en ce qui concerne les membranes biologiques dépend du taux d'incorporation dans la partie hydrophile de cette dernière.

L'incorporation des composés phénoliques de l'extrait dans la partie hydrophile de la membrane semble constituer un bouclier protecteur de la cellule vis-à-vis des substances agressives exogènes, tels que les radicaux libres (LOUERRED et *al.*, 2016).

4.2. Effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress osmotique

Un milieu hypotonique est un milieu dont la pression osmotique est plus faible que la pression intracellulaire ; ce déséquilibre induit une diffusion de l'eau vers l'intérieur de la cellule (milieu hypertonique) à travers la membrane.

L'entrée massive d'eau dans l'hématie entraîne son gonflement puis son éclatement et la libération de son contenu cytoplasmique notamment l'hémoglobine c'est le phénomène d'hémolyse. Ce dernier est observé à des concentrations en NaCl inférieures à 0.9%.

L'influence de l'extrait de *Malva sylvestris* sur la lyse osmotique des hématies est déterminée en mesurant l'inhibition de l'hémolyse à des concentrations croissantes de solutions salines.

Les résultats obtenus dans ce volet sont présentés dans la figure 26 et expriment le pourcentage de protection vis-à-vis de l'hémolyse induite par hypotonicité en fonction des concentrations en extrait.

Nous notons une croissance proportionnelle entre la concentration en extrait et le pourcentage de protection pour toutes les concentrations salines utilisées.

L'effet protecteur maximal est enregistré à une concentration de 1200µg/ml. Ce dernier est respectivement de 79.57±0.43% ; 80.48 ±1.64% ; 60.3 ±2.71% et 66.12±1.54% pour les concentrations en NaCl suivantes 0.3% ; 0.5% ; 0.7% et 0.9%. Ces données indiquent un effet protecteur relativement important de l'extrait vis-à-vis de l'hémolyse induite par les solutions hypotoniques aux concentrations de 0.3 et 0.5% en NaCl.

Ces résultats sont comparables à ceux enregistrés par MOUALEK et *al* (2016) sur l'extrait aqueux d'*Arbutus unedo*, avec des pourcentages de protection qui sont respectivement de 46.15, 79.53, 70.78, 71.95 et 76.46 % aux concentrations de 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 et 0.9 % de NaCl.

Dans le même axe, l'étude de IRATNI et *al.* (2015) sur l'extrait aqueux de *Pistacia lentiscus* ne montre un effet protecteur des hématies qu'à une concentration en extrait de 3mg/ml. Alors que dans notre étude la concentration minimale effective est de 18.75 µg/ml.

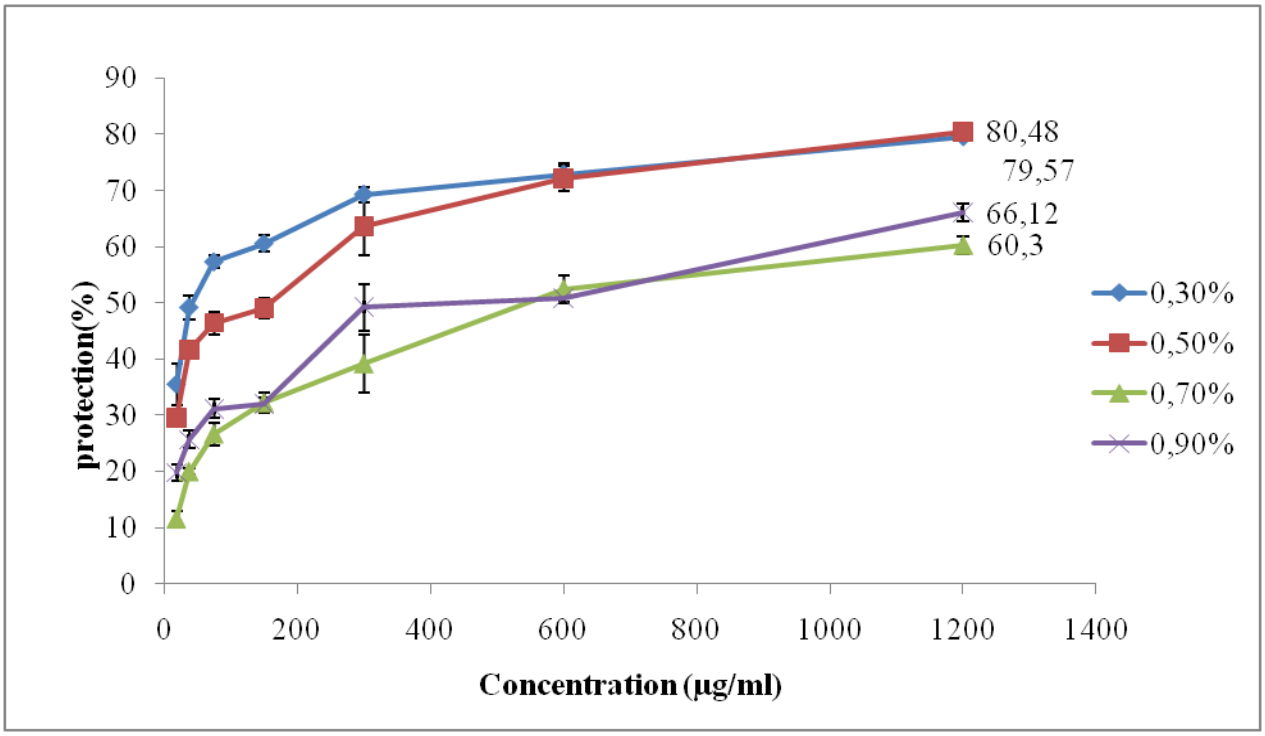


Figure 26 : Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis du stress osmotique en fonction des différentes concentrations en extrait de *M.sylvestris*.

Il a été démontré que l'incorporation des composés phénoliques notamment les flavonoïdes dans la membrane des érythrocytes améliore la stabilité de ces dernières contre la lyse hypotonique. Cette propriété peut s'expliquer par l'augmentation du rapport volume/ surface des cellules qui pourrait être obtenu soit par l'expansion de la membrane ou le rétrécissement de la cellule. De plus, la déformabilité et le volume cellulaire des érythrocytes sont étroitement liés au contenu intracellulaire en calcium. Par conséquent, nous pouvons penser que l'effet protecteur de l'extrait serait dû à la capacité de ce dernier à modifier l'afflux de calcium dans les érythrocytes (CHOPADE et *al*., 2012).

4.3. Effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress thermique

L'effet stabilisant de l'extrait aqueux de la plante étudiée face à la lyse érythrocytaire induite par la chaleur est illustré dans la figure 26. Ces résultats sont exprimés en pourcentage de protection par rapport à la concentration en extrait végétal utilisé et comparés au standard (l'aspirine).

Pour des concentrations allant de 18.75 à 1200 µg/ml l'extrait a montré une activité anti -hémolytique significative et dose dépendante, avec des pourcentages de protection allant de (33.07±2.23 à 95.25±2.00 %). Ces données sont nettement supérieures à celles de l'aspirine (24.48 à 62.97 %).

L'étude statistique a révélé une différence hautement significative entre les deux agents anti-inflammatoires pour toutes les concentrations considérées avec une P-value=0.0000.

Cette efficacité a été aussi retrouvée par MOUALEK et *al.* (2016) pour l'extrait aqueux d'*Arbutus unedo* (79.66±1.92%). Contrairement aux travaux de SHARMA et *al*. (2011) sur l'extrait de *Operculina turpethum*, qui rapportent un pourcentage de protection de 42.86%.

D'après GERSHFELD et MURAYAMA (1988) les érythrocytes exposés à des températures relativement élevées, se déforment progressivement pour devenir sphériques. Ainsi la perturbation de leurs membranes diminue leur capacité à résister à l'hémolyse.

L'effet protecteur contre la lyse érythrocytaire induite par la chaleur peut s'expliquer par l'interaction de l'extrait avec les protéines membranaires inhibant ainsi leur dénaturation (LEPOCK et *al*., 1989).

De plus, les polyphénols retarderaient la solubilisation et inhiberaient l'oxydation de la trame lipidique. Ajouté à cela la résistance membranaire se trouve être proportionnelle au taux d'incorporation des polyphénols.

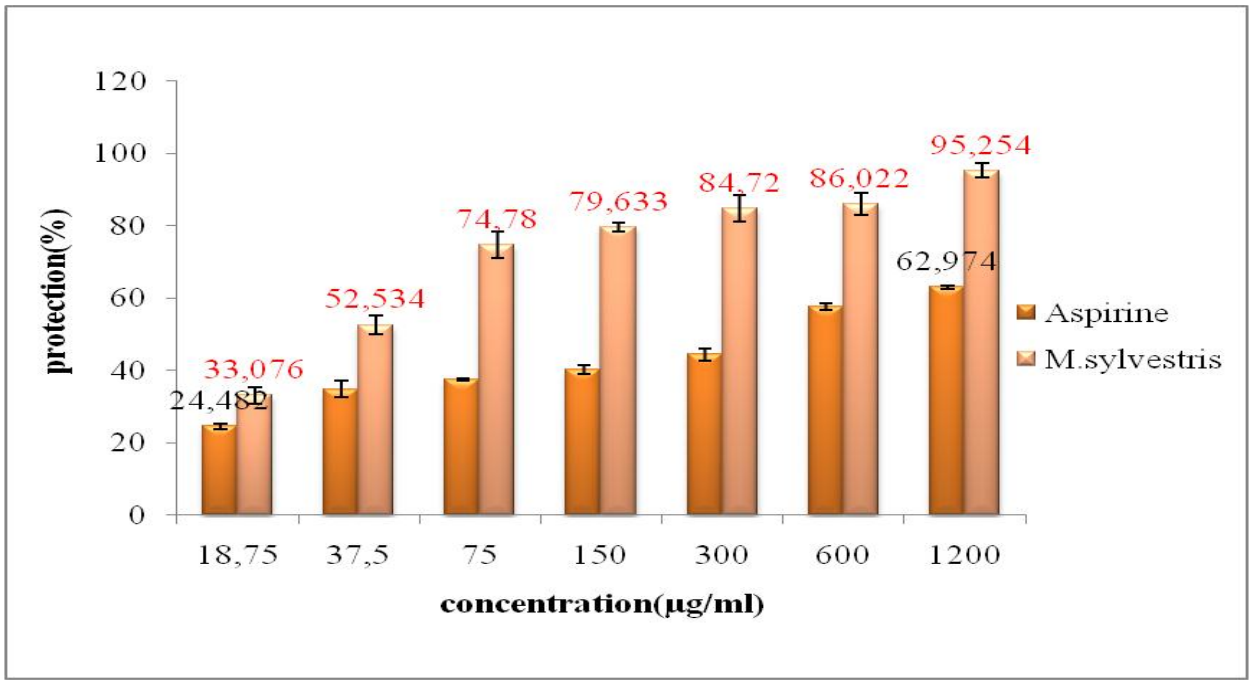


Figure 27 : Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis de la lyse induite par un stress thermique en présence des différentes concentrations d'aspirine et d'extrait.

Les lysosomes sont des organites cellulaires, présents dans le cytosol de toutes les cellules eucaryotes animales à l'exception des hématies. Ils ont pour fonction d'effectuer la digestion intracellulaire grâce à une quarantaine d'enzymes (lipases, protéases, nucléases, glycosidases, phosphatases, sulfatases), dont le relargage est impliqué dans le processus inflammatoire.

Vu les similitudes existant entre la membrane érythrocytaire et la membrane lysosomale, l'effet de l'extrait sur la stabilisation des hématies pourrait être extrapolé à la stabilisation de la membrane lysosomale. Cette stabilisation est importante pour limiter la réponse inflammatoire en empêchant la libération des constituants lysosomaux (KUMAR et *al*., 2011).

Selon VIDHYA et *al*. (2016), l'activité anti-hémolytique des extraits végétaux serait probablement due à leur effet inhibiteur sur les enzymes impliquées dans la production des médiateurs chimiques de l'inflammation ainsi que sur le métabolisme de l'acide arachidonique.

Certains polyphénols se fixent sur les protéines membranaires induisant un changement de leur conformation (CHAUDHURI et *al*., 2007). D'autres se lient à la PLA2 par desinteractions hydrophobes avec trois acides aminés du site actif de l'enzyme (DA SILVA et *al*., 2008).

L'étude des activités biologiques des plantes médicinales a augmenté considérablement ces dernières années et cela dans divers pays notamment en Algérie. Ce regain d'intérêt montre que les molécules isolées à partir des plantes médicinales sont prometteuses et intéressantes en thérapie alternative ou comme model pour la synthèse de nouvelles substances bioactives.

L'objectif assigné à cette étude est l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire et anti-hémolytique de l'extrait aqueux des feuilles de *Malva sylvestris* L. utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement de plusieurs maladies.

Pour se faire, dans un premier temps, un dosage des polyphénols totaux par la méthode colorimétrique au réactif de Folin-Ciocalteu a été effectué. Celui-ci a montré que l'extrait aqueux de la grande mauve contient une teneur importante en ces métabolites bioactifs, évalués à un taux de 153.02± 2.88 mg EAG/g de matière sèche.

En ce qui concerne l'activité anti-inflammatoire, celle-ci a été évaluée par deux tests : Le premier étant l'inhibition de la dénaturation thermique de l'ovalbumine qui a été estimée à un pourcentage de 80.88±1.91% à 500 µg/ml et le deuxième est la stabilisation de la membrane érythrocytaire vis-à-vis de la chaleur ou nous avons enregistré des pourcentages de protection variant entre 33.07±2.23 et 95.25±2.00%.

Dans un second volet de notre étude, nous avons testé la cytotoxicité de notre extrait sur la base d'un model cellulaire érythrocytaire. La sensibilité érythrocytaire a été relevée à différentes concentrations en extrait. Cette étude a montré que l'extrait de plante ne provoque qu'une hémolyse modérée avec des pourcentages compris entre 0.98 à 10.01%.

Pour ce qui est de l'activité anti-hémolytique, les résultats montrent que l'extrait possède un effet protecteur relativement important vis-à-vis de l'hémolyse induite par un stress hypotonique (80.48 ±1.64% à une concentration en NaCl de 0.5%) et thermique (95.25%). Nous pouvons dire ainsi que l'extrait exprime un effet stabilisateur de la membrane du globule rouge et pourrait donc aussi avoir le même potentiel vis-à-vis de la membrane lysosomale dont le contenu est réputé pour être impliqué dans l'inflammation.

En perspectives, des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de ces effets anti-inflammatoires et anti-hémolytiques. Ces études doivent être orientées vers l'identification qualitative et quantitative des composés phénoliques présents dans cet extrait par des techniques analytiques plus performantes telles que la HPLC et la Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

A

- **ABEDINI A. (2013).** Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*hyptis atrorubens Poit*. (*Lamiaceae*), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes ; diplôme de doctorat ; université de Lille ; France.

- **ADLERCREUTZ H. et MAZUR W. (1997).** Phyto-oestrogens and Western diseases. *Annual Medecine*; 29:95-120.

- **AFSAR T., RAZAK S., KHAN M. R., MAWASH S., ALMAJWAl A., SHABIR M. et HAQ I. U. (2016).** Evaluation of antioxidant, anti-hemolytic and anticancer activity of various solvent extracts of *Acacia hydaspica* R. Parker aerial parts. *Complementary and Alternative Medicine*, 16(1).

- **AFSHAR M., RAVARIAN B., ZARDAST M., MOALLEM SA., FARD MH. et VALAVI M. (2015).** Evaluation of cutaneous wound healing activity of *Malva sylvestris* aqueous extract in BALB/c mice. *Iran Journal of Basic Medecine Science* 18: 616–22 25.

- **AGUILAR M. (2007).** Erythrocytes -MB7 : Hématologie. Faculté de médecine ; Montpellier, France.

- **AIT YOUCEF M. (2006).** Plantes médicinales de Kabylie. Ibis press, Paris ; p199-202.

- **AKROUM S. (2011).** Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturels ; diplôme de doctorat ; université Mentouri ; Constantine ; Algérie.

- **ALAM M.A., SUBHAN N., HOSSAIN H., HOSSAIN M., REZA H. M., RAHMAN M.M. et ULLAH M.O. (2016).** Hydroxycinnamic acid derivatives: A potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutrition & Metabolism*, 13 (1).

- **ARBENZ A. et AVEROUS L. (2015).** Chemical modification of tannins to elaborate aromatic biobased macromolecular architectures, *Green Chemistry*, p26-46.

B

- **BACHY E., HOUOT R. et DONY A. (2015).** Hématologie adulte et pédiatrique, Onco Hématologie (Ellipses) 9,44-46.

- **BARROS L., CARVALHO A. M. et FERREIRAI. C. F. R. (2010).** Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of *Malva sylvestris*: A comparative study of the nutraceutical potential and composition. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1466–1472.

- **BAVARESCO L. (2003).** Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. *Drugs under experiment and clinical research* ; 29:181-7.

- **BEGHDAD M.C., BENAMMAR C., BENSALAH F., SABRI F.Z., BELARBI M. et CHEMAT F. (2014).** Antioxidant activity, phenolic and flavonoid content in leaves, flowers, stems and seeds of mallow (*Malva sylvestris* L.) from North Western of Algeria. *African Journal of Biotechnology*. 13(3), 486-491.

- **BELKHIRI F., BAGHIANI A., ZERROUG M. et ARRAR L. (2017).** Investigation of antihemolytic, xanthine oxydase inhibition, antioxidant and antimicrobial properties of *Salva verbenaca L*. aerial part extracts.*African Journal of traditional, complementary and alternative medicine*;14 (2) : 273–281.

- **BENSO B., ROSALEN P.L., ALENCAR S.M. et MURATA R.M. (2015).** *Malva sylvestris* inhibits inflammatory response in oral Human cells. An *In vitro* infection model. *PLoS ONE* ; 10(10).

- **BLAIN H., JOUZEAU Y.J., NETTER P. et JEANDEL C. (2000).** Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives. *La revue de médecine interne.* Volume 21, n° 11. P978-988.

- **BNOUHAM M., MERHFOUR F.Z., ELACHOUI M., LEGSSYER A., LAMNAOUER D. et ZIYYET A. (2006).** Toxic effects of some medicinal plants used in Moroccan traditional medicine. *Moroccan journal of Biology* ; 2(3): 21-30.

- **BOIZOT N. et CHARPENTIER J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un forestier. Le cahier des techniques de l'Inra. 79-82.

- **BONARSKA-KUJAWA D., PRUCHNIK H., OSZMIANSKI J., SARAPUK J. et KLESZCZYNSKA H. (2010).** Changes Caused by Fruit Extracts in the Lipid Phase of Biological and Model Membranes. *Food Biophysics*; 6(1), 58–67.

- **BOTINEAU M. (2010).** Guides des plantes médicinales. Lavoisier, France : 128-129.

- **BRUNETON J. (2009).** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 4e éd. Cachan: Tec & Doc. Lavoisier.

C

- **CABRAC I.S.R., OLDONI J.L.C., ALEN CAC S.M.D., ROSALEN P.C. et IKEGAKI M. (2012).** The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian Properties (G6 and G12). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*; 48(3); 557-564.

- **CASARIN E., DALL'ACQUA S., SMEJKAL K., ŠLAPETOVA T., INNOCENTI G. et CARRARA M. (2014)**. Molecular mechanisms of antiproliferative effects induced by Schisandra-derived dibenzocyclooctadiene lignans deoxyschisandrin and gomisin N in human tumour cell lines. *Fitoterapia.* p241–247.

- **CHAKRABORTY D. et SHAH B. (2011).** Antimicrobial, antioxydative and antihemolytic activity of *Piper betel* leaf extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 0975-1491.

- **CHAOUCHE T.M. (2014).** Etude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales. Analyse par HPLC-SM les extraits les plus actifs ; diplôme de Doctorat ; université Abou Bakr Belkaid, Tlemcen, Algérie.

- **CHARLES N.S., PETER A.W. et DEREK W.G. (2010).** Fundamentals of Inflammation. Cambridge University Press. 2-3.

- **CHAUDHURI S., BANERJEE A., BASU K., SENGUPTA B. et SENGUPTA P.K. (2007).** Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*; 41(1), 42-48.

- **CHEYNIER V. (2005).** Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1). 223-229.

- **CHOPADE A.R., SONTAKKE P.M. et SAYYAD F.J. (2012).** Membrane stabilising activity and protein denaturation: A Possible Mechanism of Action for the Anti-Inflammatory Activity of *Phyllanthus amarus. Journal of Krishna Institute of Medical Sciences University*, 1 (1), 67-72.

- **CLERIVET A., ALAMI I., BRETON F., GARCIA D. et SANIER C. (2013)**. Les composés phénoliques et la résistance des plantes aux agents pathogènes. *Acta Botanica Gallica*. 2166-3408.

- **CORTELL J.M. et KENNEDY J.A. (2006)**. Effect of shading on accumulation of Flavonoïd compounds in (*Vitis vinifera L.)* pinot noir fruit and extraction in a model system. *Journal of Agriulture and Food Chemistry* ; 54:8510-20.

- **CROUZET J. et COLLIN S. (2011).** Polyphénols et Procédés. Editions Te & Doc. Paris.

- **CROZIER A., JAGANATHI. et CLIFFORD M. (2007).** Phenols, Polyphenols and Tannins: Chapiter 1 in book: Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and role in the Human diet. Oxford, United Kingdom, Black well publishing; p.383.

D

- **DAI J. et MUMPER R. J. (2010).** Plant Phenolics: Extraction, analysis and their antioxydant and anticancer properties. *Molecules*; 15(10), 7313-52.

- **D'ARCHIVIO M., FILESI C., DI BENEDETTO R., GARGIULO R. et MASELLA R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto superiore di sanità.* 43. 348-61.

- **DA SILVA S. L., CALGAROTTO A. K., CHAAR J. S. et MARANGONI S. (2008).** Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA2 activity. *Toxicon*, 52(6), 655–666.

- **DELMAS D., LANCON A., COLIN D., JANNIN B. et LATRUFFE N. (2006).** Resveratrol as a chemopreventive agent: A promising molecule for fighting cancer. Current Drug Targets ; 7:423-42.

- **DESIDERI D., MELI M. A. et ROSELLI C. (2010)**. Determination of essential and non-essential elements in some medicinal plants by polarised X ray fluorescence spectrometer (EDPXRF). *Microchemical Journal*, 95(2), 174–180.

E

- **EDEAS M. (2007).** Les polyphenols et les polyphenols de thé. *Phytothérapie*. 5, 264270.

- **EISEN B., UNGAR Y. et SHIMONI E. (2003)**. Stability of isofavones in soy milk stored at elevated and ambient temperatures. *Journal Agriculture and Food Chemistry*; 51:2212-5.

- **EL GHAOUI W.B., GHANEM E.B., CHEDID L.A. et ABDELNOOR A.M. (2008).** The effects of *Alcea rosea* L., *Malva sylvestris* L. and *Salvia libanotica* L. water extracts on the production of anti-egg albumin antibodies, interleukin 4, gamma interferon and interleukin12 in BALB/c mice. *Phytotherapy Research*. 22 (12), 1599604.

- **ELSAGH M., FARTOOKZADEH M. R., KAMALINEJAD M., ANUSHIRAVANI M., FEIZI A., BEHBAHANI F. et ADIBI, P. (2015).** Efficacy of the *Malva sylvestris* L. flowers aqueous extract for functional constipation: A placebo-controlled trial. *Complementary Therapies* in *Clinical Practice*, 21(2), 105–111.

F

- **FARHOOSH R., JOHNY S., ASNAASHARI M., MOLAAHMADIBA-HRASEMAN N. ET SHARIF A. (2016).** Structure–antioxidant activity relationships of o-hydroxyl, o-methoxy, and alkyl ester derivatives of p-hydroxybenzoic acid. *Food Chemistry*. 194. 128-134.

- **FATIMA M., KESHARWANI R.K., MISRA K. et RIZVI S.I. (2013).** Protective effect of the aflavin on erythrocytes subjected to in vitro oxidative stress. *Biochemistry research international*; 1–7.

- **FLORES M. (2011)**. *Malva sylvestris L.* et autres mauves de France; Diplôme d'état de docteur en pharmacie ; Université de Nantes; France ; p.36-184.

- **FRANKEL E., GERMAN J., KINSELLA J., PARKS E. et KANNER J. (1993).** Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet*, 341(8843), 454–457.

- **FREITAS M.V., NETTO RDE C., DA COSTA HUSS J.C., DE SOUZA T.M., COSTA J.O., FIRMINO C.B. et PENHA-SILVA N. (2007).** Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicology in Vitro*, 22(1), 219–224.

G

- **GANESAN K. et XU B. (2017).** A critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans. *Nutrients*. P.1-17.

- **GANGWAR M., GAUTAM M.K., SHARMA A.K., TRIPATHI Y.B., GOEL R.K. et NATH G. (2014).** Antioxidant capacity and radical scavenging effect of polyphenol rich *Mallotus philippenensis* fruit extract on human erythrocytes*:* An in vitro study. *The Scientific World Journal*, 1–12.

- **GASPARETTO JC, MARTINS CA, HAYASHI SS, OTUKY MF. et PONTAROLO R. (2011).** Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva sylvestris* L. a millennial herbal medicine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(2), 172–189.

- **GERSHFELD N.L. et MURAYAMA M. (1988).** Thermal instability of red blood cell membrane bilayers: Temperature dependance of hemolysis. *Journal of Membrane Biology*; 101(1); 67-72.

- **GHEDIRA K. et GOETZ P. (2016).** *Malva sylvestris* L. (Malvaceae) : Mauve. *Phytothérapie*, 14(1), 68–72.

- **GONDA R., TOMODA M., SHIMIZU N. et KANARI M. (1990).** Characterization of an acidic polysaccharide from the seeds of *Malva verticillata* stimulating the phagocytic activity of cells of the RES. *Planta Medica*; 56(1), 736.

H

- **HABIBUR R.M., ESWARAIAH C. et DUTTA A.M. (2015)**. In-vitro anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *Oryza sativa*. Var. Joha Rice (An Aromatic Indigenous Rice of Assam). *American-Eurasian Journal of Agriulture & Environtal Science*, 15 (1): 115-121.

- **HASLAM E. (1998)**. Pratical polyphenolics: From structure to molecular recognition and physiological action. Editions Cambridge University Press ; Cambridge ; United Kingdom ; 422p.

- **HEINONEN S., NURMI T., LIUKKONEN K., POUTANEN K., WAHALA K., DEYAMA T., NISHIBE S. et ADLERCREUTZ H. (2001).** In vitro metabolism of plants lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *Journal Agriculture Food Chemestry*; 49:3178-86.

- **HOSSEINI R., MOOSAVI F., RAJAIAN F. H., SILVA T., MAGALHÃES D., SASO L., MIRI R., BORGES F. et FIRUZI O. (2016)**. Discovery of neurotrophic agents based on hydroxycinnamic acid scaffold. Medicinal and natural products chemistry research center, p1-39.

- **HYNES M.J. et O'COINCEANAINN M. (2001).** The kinetics and mechanisms of the reaction of iron (III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and catechin. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 85: 131–142.

- **IRATNI AICHE G., MOUALEK I., MESTAR GUECHAOUI N., MEZAACHE AICHOUR S., ZERROUG M.M. et HOUALI K. (2015).** In vitro evaluation of biological activities of *Pistacia lentiscus* aqueous extract. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 7(11), 133-139.

- **ISERIN P. (2001).** Larousse-Encyclopédie des plantes médicinales : identifications, préparations, soins. 2ème édition. Larousse-Bordas.

- **ISHTIAQ M., HANIF W., KHAN A., ASHRAF M. et ANSAR M.B. (2007).** An ethnomedicinal survey and documentation of important medicinal folklore food phytonims of flora of Samahni Valley (Azad Kashmir) Pakistan. *Pakistan Journal of Biological Science*: 2241–2256. 31.

- **IWALEWA E.O., MCGAW L. J., NAIDOO V. et ELOFF J. N. (2007).** Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology* ; 6(25), 1532-1545.

K

- **KALAVANI R., BANU R.S., JEYANTHI K.A., SANKARI T.U. et KANNA A.V. (2016).** Evaluation of anti-inflammatory and antibacterial activity of *Pithecellobuim dulce* (Benth) extract. *Biotechnological Research*, 2(4), 148-154.

- **KARTHIK K., KUMAR B. R. P., PRIYA V. R., KUMAR S.K. et RATHORE R. S. B. (2013).** Evaluation of anti-inflammatory activity of canthium parviflorum by in-vitro method. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 2320 – 3471.

- **KESSEL L., TENDAL B., JORGENSEN K.J., ERNGAARD D., FLESNER P. ANDRESEN J.L. et HJORTDAL J. (2014).** Post-cataract prevention of inflammation and macular edema by steroid and nonsteroidal antiinflammatory eye drops. *Ophthalmology*, 121(10); 1915-1924.

- **KESHARWANI R., SINGH D., MISRA K. et RIZVI S. I. (2012).** Plant polyphenols as electron donors for erythrocyte plasma membrane redox system: Validation through in silico approach. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, 2(1), 12.

- **KING A. et YOUNG G. (1999).** Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of American dietetic association*, 99(2), 213–218.

- **KUMAR V., BHAT Z.A., KUMAR D., BOHRA P. et SHEELA S. (2011).** In vitro anti-inflammatory activity of leaf axtracts of *Basella alba* llin. Var. Alba; international *Journal of Drug Developpement & Research*. 3(2): 176-179.

- **KÜNKELE U. et LOHMEYER T. R. (2007).** Plantes médicinales : Identification, récolte, propriétés et emplois. Editions Parragon. Chine, 319 p.

L

- **LANDOLFI R., MOWER R.L. et STEINER M. (1984).** Modification of plateletfunction and arachidonic acid metabolism by bioflavoids. *Biochimical Pharmacology*, 33-(9). 1525-1530.

- **LAUGHTON MJ., EVANS PJ., MORONEY MA., HOULT JR. et HALLIWELL B. (1991).** Inhibition of mammalian lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxydant activity and to iron ion-reducing ability; *Biochemical Pharmacology* ; volume 42, n° 1673-1681.

- **LEOPOLDINI M., RUSSO N. et TOSCANO M. (2011).** The molecular bases of working mechanism of natural polyphenolic antioxydants. *Food Chemistry* ; 125(2) ; 288–306.

- **LERAY C. (2010).** Les lipides dans le monde vivant. Editions Lavoisier TEC & DOC, p5.

- **LEPOCK J., FREY H.E., BAYNE H.E. et MARKUS J. (1989)**. Relationship of hyperthermia-induced hemolysis of human erythrocytes to the thermal denaturation of membrane proteins. *Biochimica and Biophysica Acta* (BBA); 980(2), 191-201.

- **LEYVA-LOPEZ N., GUTIERREZ-GRIJALYA E.P., AMBRIZ-PEREZ D.L. et HREDIA J.B. (2016).** Flavonoids as cytokine modulators: A Possible Therapy for inflammation-related diseases. *International journal of molecular sciences*. p1-15.

- **LI A.N., LI S., ZHANG Y.J, XU X.R., CHEN Y.M. et LI H.B. (2014).** Resources and Biological activities of Natural Polyphenols. *Nutrients* ; 6(12), 6020-6047.

- **LIPPI G., AVANZINI P., PAVESI F., BARDI M., IPPOLITO L., ALOE R. et FAVALORO E.J. (2011).** Studies on in vitro hemolysis and utility of corrective formulas for reporting results on hemolyzed specimens. *Biochemia medica*: 21, 297-305.

- **LOUERRED Y., HADI R. et KAID-HARCHE M. (2016)**. Etude de la peroxydation lipidique chez une plante médicinale *Haloxylon scoparium* POMEL. *Journal of Bioresources Valorisation*.1(1), 28-33.

M

- **MACHEIZ J.J, FLEURIET A. et JAY-ALLEMAND C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Presse Polytechniques et universitaires Romandes*. P7 ; (1-181).

- **MADHURI V., DARSHAN S.K. et KENT L.E. (2008**). Health effects of foods rich in polyphenols. In: Wild-type food in health promotion and disease prevention. *Humana Press Inc*., Totowa, p393-412.

- **MALGORZATA K. (2017).** Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues. *European Journal of Biological Research*; 7 (2): 108-123.

- **MANACH C., SCALBERT A., MORAND C., REMESY C. et JIMENEZ L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79(5). 727-4.

- **MAZZA G., CACACE J.E. et KAY C.D. (2004).** Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids. *Journal AOAC International*; 87:129-45.

- **MARTIN S. et ANDRIANTSITOHAINA R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. Annales de Cardiologie. 51, 304-315

- **MERGHEN R. (2009).** Eléments de biochimie végétale. Editions Bohaeddine. p111-123. Alger, Algérie.

- **MEZITI H. (2018).** Evaluation de l'effet anti-inflammatoire et antioxydant des extraits de *Malva parviflora* L. ; Diplôme de Magister ; université FERHAT ABBAS, Sétif, Algérie.
- **MLADENKA P., MACAKOVA K., FILIPSKÝ T., ZATLOUKALOVA L., JAHODAR L., BOVICELLI P. et SASO L. (2011).** In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of inorganic biochemistry,* 105(5), 693-701.
- **MOHAMADI YARIJAN Z., NAJAF H., SHACKEBAE D., MADANI S.H., MODARRESI M. et JASSEMI S. V. (2019).** Amelioration of renal and hepatic function, oxidative stress, inflammation and histopathologic damages by *Malva sylvestris* extract in gentamicin induced renal toxicity. *Biomedical Pharmacotherapy, 112, 108635.*
- **MOUALEK I., IRATNI AICHE G., MESTAR GUECHAOUI N., LAHCENE S. et HOUALI K. (2016).** Antioxidant and anti-inflammatory activities of Arbutus unedo aqueous extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(11): 937–944.

N

- **NKHILI E. (2009).** Polyphénols de l'Alimentation: Extraction, interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant ; diplôme de doctorat; Montpellier ; France.

O

- **OLIVER S., VITTORIO O., CIRILLOE G. et BOYER C. (2016).** Enhancing the therapeutic effects of polyphenols with macromolecules. *Polymer Chemestry*, 7(8), 1529-1544.
- **ORGOGOZO JM., DARTIGUES J.F., LAFONT S., LETENNEUR L., COMMENGES D., SALAMON R., RENAUD S. et BRETELER M.B. (1997).** Wine consumption and dementia in the elderly: A prospective community study in the Bordeaux area. *Revue de Neurologie*; volume 153, n^{o} 185-192.

- **ORTEGA N., DOÑA I., MORENO E., AUDICANA M.T., BARASONA M.J., BERGES-GIMENO M.P., BLANCA-LOPEZ N., LOBERA T., PADIAL A., ROSADO A. et TORRES M.J. (2014).** Practical guidelines for diagnosing hypersensitivity reactions to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 24 (5); 308-323.

P

- **PIRBALOUTI A.G., YOUSEFI M., NAZARI H., KARIMI I. et KOOHPATEH A. (2009).** Evaluation of Burn Healing Propertiesof *Arnebia euchromaand Malva sylvestris*. *Electronic Journal of Biology*; 5(3); 62-63.

- **PRIN L., HACHULLA E., HENNACHE B., BONNOTTE B., DUBUCQUOI S., ABBAL M., FAURE G. et BOULETREAU P. (2009).** Réaction inflammatoire ; Université de Lorraine.

R

- **RAHIMI R., SHAMS-ARDEKANI M.R. et ABDOLLAHI M. (2010).** A review of the efficacy of traditional Iranian medicine for inflammatory bowel disease. *World Journal Gastroenterol*.16:4504–4515.

- **RASAVIM S., ZARRINI G., MOLAVI G. et GHASMI G. (2011).** Bioactivity of *Malva Sylvestris* L., a Medicinal Plant from Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 14(06): 574-579.

- **RIBEREAU-GAYON J. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris, p 245.

- **RIZVI S.I., KUMAR D., CHAKRAVARTI S. et SINGH P. (2011).** Erythrocyte plasma membrane redox system may determine maximum life span. *Medical Hypotheses*, 76(4), 547–549.

- **ROY M.K.M.T., KOIDE M., RAO T.P., OKUBO T., OGASAWARA Y. et JUNEJA L.R. (2010).** ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: Relationship between total polyphenol and individual catechin content. *Inernational Journal of Food Science and Nutition*; 61; 109–124.

- **ROBARDS K., PRENZLER P.D., TUCKER G., SWATSITANG P. et GLOVER W. (1999).** Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* ; 66(4) ; 401-36

- **ROBBINS R. J. (2003).** Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2866–2887.

- **ROPIAK H.M., LACHMANN P., RAMSAY A., GREEN R. J. et MUELLER-HARVEY I. (2017).** Identification of Structural Features of Condensed Tannins That Affect Protein Aggregation. *PLOS ONE*, 12(1).

S

- **SAKAT S., JUVEKAR A.R. et GAMBHIRE M.N. (2010).** In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of Oxalis corniculata Linn. *International Journal of Pharmacology and Pharmacological Sciences*. 2(1):146-155.

- **SANDHAR H.K., KUMAR B., PRASHER S., TIWARI P., SALHAN M. et SHARMA P. (2011).** A reveiw of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *International Pharmceutica Sciencia*; 1(1); 25-41.

- **SHOBANA S. et VIDHYA R. (2016).** Evaluation of in vitro hemolytic activity of different parts of *Abutilon indicum* (Linn.). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*; 5(5): 1182-1196.

- **SHARMA V. et MANU S. (2013).** In vitro anti- arthritic and hemolysis preventing membrane stabilising efficacy of ethanolic extract of *Operculina turpethum. World Journal of pharmacy & Pharmaceutical Sciences*; 2(1); 102-112.

- **SINGLETON V.L. et ROSSI J.A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acide attributes of minced meat stored in air modified atmospheres. *Journal Applied Microbiology*; 91; 1011-1022.

- **SLEIMAN N.H. et DAHER C.F. (2009*).*** *Malva sylvestris* water extract: a potential anti-inflammatory and anti-ulcerogenic remedy. *Planta Med* ; 75.

- **SLUSARCZYK S., HAJNOS M., SKALICKA-WOZNIAK K. et MATKOWSKI A.B.B.A. (2009).** Antioxidant activity of polyphenols from *Lycopus lucidus Turcz*. *Food Chemistry*, 113, 134–138.

- **SONAR K. et PUROHIT D. (2016).** Therapeutic effect of flavonoids as antiinflammatory agents. *World journal of pharmacy and pharmaceutical science*. Volume 5; 2278 – 4357.

- **SOUZA GC., HAASAP., VON POSER GL., SCHAPOVAL EE. et ELISABETSKY E. (2004).** Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*; 90: 135–143.

- **TEIXEIRA J., GASPAR A., GARRIDO E., GARRIDO J. et BORGES F. (2013).** Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. *Bio Med research international*. 1-11.

- Third mondial Conference on Polyphénols Applications (2006). The Mondial Society for Antioxidants in Nutrition and Health (ISANH).

- **TOMODA M., GONDA R., SHIMIZU N. et YAMADA H. (1989).** Plantes mucilages XLII. An anti-complementary mucilage from the leaves of *Malva sylvestris* var. Mauritiana; *Chemical Pharmacology Bull*, 37(11), 3029, 3032.

- **TSAI H.Y, HO C.T. et CHEN Y.K. (2017).** Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene. *Journal of food and drug analysis*, 25(1), 134-147.

V

- **VAUZOUR D. (2004).** Etude des propriétés biologiques des constituants des vins de Champagne ; diplôme de doctorat ; université de Montpellier ; France.

- **VENKATA N., RAMESH T., SUDHAKAR P., SANDEEP B. et DIVAKART. (2016).** Evaluation of Anti hemolytic activity, antibacterial activity and phytochemical investigation of *Acalypha indica* methanolic leaf extract. p18.

- **VIDHYA R., et SHOBANA S. (2016).** Evaluation of in vitro hemolytic activity of different parts of *Abutilon indicum* (LINN.). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*; 5(5), 1182-1196.

W

- **WATANABE E., TANOMARU JM., NASCIMENTO AP., MATOBA-JUNIOR F., TANOMARU-FILHO M. et YOKO ITO.I. (2008).** Determination of the maximum inhibitory dilution of cetylpyridinium chloride-based mouthwashes against *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. *Journal of Applied Oral Science*; 16: 275–279.

- **WEILL B., BATTEUX F. et DHAINAUT J. (2003).** Immun-pathologies et réactions Inflammatoires. Editions de Boeck, Paris. 12-23p.

Z

- **ZERBATO M. (2009).** Intérêt du dosage par micro-méthode de la Protéine C Réactive au cabinet de pédiatrie. Diplôme de doctorat ; université HENRI POINCARÉ; NANCY; France.

Annexes

Annexe I :

Préparation des solutions de travail :

- Solution de PBS : Préparée en mélangeant progressivement 0.26 g de NaH_2PO_4 avec 2.17 g de Na_2HPO_4 et 8.17 g de NaCl dans 1litre de H_2O, jusqu'à l'obtention d'un pH de 7.4.
- Solutions à différentes concentrations de NaCl :0.9 % de NaCl (0.9 % g de NaCl dans 100 ml de PBS à pH 7.4), 0.7 % de NaCl (0.7 % g de NaCl dans 100 ml de PBS), 0.5 % de NaCl (0.5 % g de NaCl dans 100 ml de PBS) et 0.3 % de NaCl (0.3 g de NaCl dans 100 ml de PBS).
- Solution d'aspirine : 0.05 g d'aspirine dans 100 ml de PBS à pH 7.4 et 0,9 % de NaCl.

- Solution d'ovalbumine : 0.05 g d'ovalbumine dans 100 ml de PBS à pH 7.4 et 0,9 % de NaCl.
- Solution de saponine : 0.12 g d'ovalbumine dans 100 ml de PBS à pH 7.4 et 0,9 % de NaCl.

Annexe II : Résultats de l'analyse statistique du test de protection de l'extrait vis-à-vis de l'inflammation
Les résultats statistiques ont obtenus par le test d'ANOVA à un facteur :

Concentration 1 : 3.9 µg/ml.

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	5804,940	1	5804,940	9306,949	0,000000
asp et extr	234,488	1	234,488	375,949	0,000042
Erreur	2,495	4	0,624		

Concentration 2 : 7.81 µg/ml.

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	8785,261	1	8785,261	21127,18	0,000000
asp et extr2	353,250	1	353,250	849,51	0,000008
Erreur	1,663	4	0,416		

Concentration 3: 15.62 µg/ml.

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	10942,47	1	10942,47	13024,80	0,000000
asp et extr3	187,06	1	187,06	222,66	0,000117
Erreur	3,36	4	0,84		

Concentration 4 : 31.25 µg/ml.

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	17327,82	1	17327,82	133266,0	0,000000
asp et extr4	169,21	1	169,21	1301,4	0,000004
Erreur	0,52	4	0,13		

Concentration 5: 62.5 µg/ml.

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	22745,68	1	22745,68	368550,1	0,000000
asp et extr5	43,14	1	43,14	699,0	0,000012
Erreur	0,25	4	0,06		

Concentration 6 : 125 µg/ml.

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	24796,17	1	24796,17	29726,07	0,000000
asp et extr6	75,73	2	37,87	45,39	0,005721
Erreur	2,50	3	0,83		

Concentration 7: 250 µg/ml.

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	38142,99	1	38142,99	84086,21	0,000000
asp et extr7	285,34	1	285,34	629,04	0,000015
Erreur	1,81	4	0,45		

Concentration 8 : 500 µg/ml.

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	45329,48	1	45329,48	23450,59	0,000000
asp et extr8	218,48	1	218,48	113,03	0,000443
Erreur	7,73	4	1,93		

Annexe 3 : Résultats de l'analyse statistique du test de l'effet du stress thermique sur hémolyse

Concentration 1 : 18.75 µg/ml.

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	4958,858	1	4958,858	873,1418	0,000008
asp et ext	57,493	1	57,493	10,1232	0,033481
Erreur	22,717	4	5,679		

Concentration 2 : 37.5 µg/ml.

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	9872,872	1	9872,872	2099,805	0,000001
asp et ext	859,709	1	859,709	182,847	0,000173
Erreur	18,807	4	4,702		

Concentration 3 : **75 µg/ml.**

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	18711,65	1	18711,65	1938,180	0,000002
asp et ext	1860,64	1	1860,64	192,728	0,000156
Erreur	38,62	4	9,65		

Concentration 4 : **150 µg/ml**

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	21538,36	1	21538,36	13148,20	0,000000
asp et ext	2332,95	1	2332,95	1424,16	0,000003
Erreur	6,55	4	1,64		

Concentration 5 : 300 µg/ml.

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	25343,24	1	25343,24	10080,85	0,000000
asp et ext	2908,75	1	2908,75	1157,02	0,000004
Erreur	10,06	4	2,51		

Concentration 6 : **600 µg/ml.**

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	27164,84	1	27164,84	1453,423	0,000003
asp et ext	1931,17	1	1931,17	103,325	0,000528
Erreur	74,76	4	18,69		

Concentration 7 : **1200 µg/ml.**

Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	35458,90	1	35458,90	12811,66	0,000000
asp et ext	2026,80	1	2026,80	732,30	0,000011
Erreur	11,07	4	2,77		