



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur

et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE ABBES LAGHROUR - KHENCHELA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Master académique

FILIERE : Biologie

OPTION : Biochimie appliquée

Thème

*Investigation phytochimique et étude -in vitro- de l'activité
antioxydante de la plante médicinale a récoltée dans la région
-Khenchela- (*Artemisia campestris L*)*

Présenté par

OUANNES NASSIMA

Setenu le : 04/07/2017

BOUMAARAFI SABAH

Jury de soutenance :

Présidente : Dr. Djemil Randa

M.C.B

Univ. Abbès Laghrou-Khenchela

Encadreur : Dr. Douaouya Lilia

M.C.B

Univ. Abbès Laghrou-Khenchela

Examineur : Mr. Boussaa A/Halim

M.A.A

Univ. Abbès Laghrou-Khenchela

Promotion : Juin 2017

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

1420 هـ

Remerciements :

En premier lieu, nous exprimons nos profonds remerciements à Allah le tout puissant de nous avoir donné la patience et la volonté également le courage pour arriver au bout de ce modeste travail. Car sans lui rien n'est possible.

Nos vifs remerciements s'adressent à Dr. Djemil Randa, maitre de conférences à l'université Abbes Laghrour-Khenchela, un grand honneur d'être présidente du jury de soutenance, et exprimer notre gratitude d'avoir apporté une attention particulière à ce travail.

Nous tenons à remercier vivement Dr. Douaouya Lilia, maitre de conférences à l'université Abbes Laghrour-Khenchela, pour avoir encadré et dirigé ce travail avec la plus grande rigueur scientifique, sa compréhension, son aide et sa très gentillesse durant tout au long de notre mémoire sa compétence et la qualité de ses conseils. Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre profonde gratitude tout en vous témoignant notre respect.

Un grand merci à monsieur Boussaa Abed-Elhalim, maitre assistant à l'université Abbes Laghrour-Khenchela, qu'il trouve ici l'expression de profonde reconnaissance pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous adressons notre profond remerciement aussi à l'équipe du laboratoire pédagogique de Biochimie de l'institut de Biologie à l'université de Khenchela surtout les ingénieurs Himer Lamia, Abdoun Lamia et pour l'aide qu'elles nous ont donnée et les efforts déployés pour faciliter notre travail.

Merci à toute la promotion 2ème année Biochimie appliquée (2016-2017)

Enfin, nous remercions tous les enseignants, nous leurs adressons nos sincères remerciements pour leurs patience et pour tout ce qu'il nous avons offert comme enseignements et conseils durant ce long cycle de formation et tous ceux qui ont participé de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

Merci

À ceux et celles qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans notre travail, nous les remercions du fond du cœur.

DEDICACE

Nulla œuvre n'est exaltante que celle réalisée avec le soutien moral et financier des personnes qui nous sont proches.

Je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance à :

♣ *A DIEU, pour m'avoir donné la force dans les moments difficiles et d'éditer ce mémoire.*

♣ *Mon père : Abdallah et à ma mère Khemissa qui m'ont toujours entouré et motivé à sans cesse devenir meilleur ;*

♣ *Mes frères: Khalil, Rachid, Larabi, aussi mes chères sœurs, Afifa, Hamida, Chahrazed. Warda et leurs enfants Ayoub et Sadja*

♣ *Mon cousin Sabti*

♣ *Mes amis et amies partout qui n'ont cessé de m'encourager ;*

♣ *Tous mes professeurs pour leurs disponibilités et conseils ;*

♣ *Mon encadreur Mme Douaouya Lilia pour son aide et sa précieuse attention*

♣ *Tous mes compagnons de promotion .*

♥ *Sabah*

DEDICACE

A l'aide de Dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,

j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

- ♥ *la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ; ma mère: Mebarqa qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.*
- ♥ *À mon cher père : Ali qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice, ses conseils et ses encouragements ♥.*
- ♥ *À mes chères sœurs (Amel... Warda) et qui m'ont redonnée le sourire et fait retrouver la joie de vivre et leurs hommes, à leurs enfants notamment ma nièce Hajora et mes neveux mignons : Firas Eddin et Nasso.*
- ♥ *À ma petite sœur "Sara" pour sa spontanéité, ses critiques constructives, et bien sur pour tous les moments de bonheur qu'elle m'a apportée ♥.*
- ♥ *À la plus belle et charmante ma tante Zahiya son homme et leur fille Rahaf ♥*
 - ♥ *À toute ma grande famille «Ouannes» ♥.*
- ♥ *À mes chers cousins Nounou et Djalil, Nassro qui sont toujours prêts à m'aider ♥*
 - ♥ *À la chère fille de mon oncle "Dalel" ♥.*
- ♥ *À mes collègues que je les aime follement : Abir et Khaoula, Dalia et Houda qu'ont ajoutées un gout épatant à ma vie durant depuis cinq ans , merci pour l'ambiance et la jovialité, à mes amies agréables Zohra. D et Khaoula. A, je vous adore mortellement ♥.*
- ♥ *À Mon binôme « Sabah » je ne vais jamais oublier les moments partagés pendant la préparation de notre mémoire ma chérie ♥.*
- ♥ *À la plus jolie enseignante Douaouya Lilia, un grand merci madame notamment pour ta patience et ta motivation dans tout les cas ♥*

Résumés

Résumé

L'objectif de cette étude est l'investigation phytochimique et l'évaluation *in vitro* du pouvoir antioxydant des fractions organiques de l'extrait méthanolique brut d'une plante médicinale de la pharmacopée traditionnelle, récoltée de la région de Khenchela (*Artemisia campestris* L).

Le screening phytochimique réalisé, a révélé la richesse de notre plante en métabolites secondaires dont nous avons constaté la présence des flavonoïdes, des saponines, des tanins, des alcaloïdes, des composés réducteurs et les coumarines.

Ainsi, l'étude qualitative par CCM des extraits organiques a révélée une diversité remarquable des composés flavonoïques susceptibles d'exprimer l'activité recherchée.

L'analyse quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes par le réactif du Folin-Ciocalciu et par la méthode du trichlorure d'aluminium respectivement, a dévoilé la richesse de la fraction n-butanolique par rapport à celles d'acétate d'éthyle et d'éther de pétrole en polyphénols et flavonoïdes avec des teneurs égaux à $468.737 \pm 83.049 \mu\text{g EAG/mg}$ et $74,915 \pm 16,323 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait respectivement.

L'activité antioxydante obtenue a été évaluée *in vitro* via deux méthodes : la méthode de réduction de radical libre DPPH et le test de piégeage de peroxyde d'hydrogène; Cependant, l'oxydation du DPPH est efficacement inhibée par l'extrait n-butanolique avec une IC50 égale à $2.239 \pm 0,32 \text{mg/ml}$ qui est comparable à celle du contrôle positif : acide ascorbique ($1,824 \pm 0,097 \text{mg/ml}$). Même ces résultats sont remarquables avec la neutralisation de peroxyde d'hydrogène dont l'extrait butanolique exprime la concentration IC50% la plus basse par rapport aux autres fractions à savoir $8.782 \pm 0.94 \text{mg/ml}$, notons que l'activité antiradicalaire obtenue est dépendante de la teneur en polyphénols totaux et celle en flavonoïdes.

En conclusion; L'*Artemisia campestris* L est doué d'une activité antioxydante remarquable. De ce fait, il peut constituer une ressource naturelle afin d'atténuer les complications du stress oxydant associé ou déclenchant d'autres maladies.

Mots clés : Activité antioxydante, *Artemisia campestris*, CCM, DPPH, flavonoïdes, peroxyde d'hydrogène.

Abstract

The objective of this study is the phytochemical investigation, *in vitro* evaluation of the antioxidant power of organic fractions of raw methanolic extract of a medicinal plant of traditional pharmacopoeia harvested from Khenchela region (*Artemisia campestris*).

The phytochemical screening carried out revealed the richness of our plant in secondary metabolites of which we have found the presence of flavonoids, saponins, tannins, alkaloids, reducing compounds and coumarins.

Thus, the qualitative study by TLC of the organic extracts revealed a remarkable diversity of flavonoic compounds capable of expressing the desired activity.

Quantitative analysis of total polyphenols and flavonoids by Folin-Ciocalciu reagent and aluminum trichloride method respectively, revealed the richness of n-butanol fraction compared to those of ethyl acetate and petroleum ether in polyphenols and flavonoids with contents equal to 468.737 ± 83.049 μg EAG / mg and 74.91 ± 16.32 μg EQ / mg extract respectively.

The antioxidant activity obtained was evaluated *in vitro* using two methods: the free radical reduction method DPPH and the hydrogen peroxide trapping test; However, the oxidation of DPPH is effectively inhibited by n-butanol extract with an IC₅₀ equal to 2.239 ± 0.32 mg/ml which is comparable to that of positive control: ascorbic acid (1.824 ± 0.097 mg/ml). Even these results are noticed with the neutralization of hydrogen peroxide whose butanolic extract expresses the lowest IC₅₀% concentration compared to other fractions, namely 8.503 ± 0.94 mg/ml, that the antiradical activity obtained is dependent on content of total polyphenols and that of flavonoids.

In conclusion; *Artemisia campestris* has a remarkable antioxidant activity. Therefore, it can constitute a natural resource in order to alleviate the complications of oxidative stress associated or triggering other diseases.

Key words: Antioxidant activity, *Artemisia campestris*, TLC, DPPH, flavonoids, hydrogen peroxide.

الملخص

في إطار تقييم القدرات العلاجية الطبيعية للنبذة الطبية الشيح الحقلي المستعملة في الأدوية التقليدية المتواجدة في منطقة خنشلة تم القيام بالفحص الكيميائي و اختبار الأقسام العضوية الناتجة عن المستخلص الميثانولي الخام للنبذة كمضادات للأكسدة.

كشفت الفحص الكيميائي النباتي عن ثراء النبذة بمادة الأيض الثانوية التي تحتوي على :

flavonoïdes, des saponines, des tanins, des alcaloïdes, des composés réducteurs et les coumarines.

في حين ، كشفت الدراسة النوعية بواسطة الكروماتوغرافيا للمستخلصات العضوية وجود مختلف أنواع الفلافونويدات القادرة على التعبير عن النشاط المطلوب.

كشفت التحليل الكمي لمجموع البوليفينول والفلافونويدات باستعمال كاشف فولين - سيوكاليو وطريقة ثلاثي كلوريد الألمنيوم على التوالي عن ثراء الجزء البيوتانولي بالمقارنة مع الجزئين الأخرين أسيتات الإيثيل وأثير البترول بكمية من الفلافونويدات والبوليفينول قدرت ب $83,049 \pm 468,737$ ميكروغرام ما يكافئ حمض غاليك/ مغ و $74,915 \pm 16,323$ ميكروغرام ما يكافئ الكرستين/ مغ من المستخلص على التوالي.

أثبتت النشاط المضاد للأكسدة بطريقة إرجاع الجذور الحرة باستعمال جذر DPPH وطريقة إرجاع بيروكسيد الهيدروجين انه يتم تثبيط أكسدة DPPH بقوة اختزالية كبيرة للمستخلص البيوتانولي إذ قدر التركيز المثبط ل 50 % ب $0,32 \pm 2,239$ مغ/ مل الذي هو مماثل للاختبار الإيجابي: حمض الاسكروبيك $1,824 \pm 0,097$ ميكروغرام/ مل. لوحظت هذه النتائج أيضا اثر القوة الاختزالية لبيروكسيد الهيدروجين على المستخلص البيوتانولي الذي يعبر عنه بأقل تركيز مثبط ل 50 % مقارنة مع الأقسام الأخرى ذات التركيز 0.94 ± 8.782 مغ/ مل، حيث نلاحظ أن النشاط المضاد للجذور الحرة الذي تم الحصول عليه يتعلق بمحتوى البوليفينول الكلي و مركبات الفلافونويد.

وفي الأخير نستنتج أن الشيح الحقلي لديها نشاط مضاد للأكسدة ، و هذا ما يجعلها مصدرا طبيعيا للتخفيف من حدة المشاكل التي يسببها النشاط التأكسدي أو التي تسببها أمراض أخرى.

الكلمات المفتاحية : النشاط التأكسدي، تاغوفث، الكروماتوغرافيا، DPPH، الفلافونويدات، بيروكسيد الهيدروجين.

Liste des abréviations

- + **µg EAG/mg:** Microgrammes équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait
- + ***A. campestris:*** *Artemisia campestris*
- + **Abs:** Absorbance
- + **ABTS:** 2,2-azinobis 3-ethyl-benzothiazoline 6 sulphonate
- + **Ac As:** Acide ascorbique
- + **ADN:** Acide Désoxyribonucléique.
- + **AHDP:** Acide hexahydroxydiphénique
- + **AlCl₃:** Chlorure d'aluminium
- + **BHA:** Butylhydroxyanisole
- + **BHT:** Butylhydroxytoluène
- + **CCM:** Chromatographie sur couche mince
- + **CM:** Chloroforme / Méthanol
- + **CO:** Monoxyde de carbone
- + **DPPH:** Diphénylpicryl-hydrazyl.
- + **DPPH⁺:** 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
- + **EAE:** Extrait acétate d'éthyle
- + **EAEAC:** Extrait acétate d'éthyle d'*Artemisia campestris*
- + **EBAC:** Extrait butanolique d'*Artemisia campestris*
- + **EEP:** Extrait éther de pétrole
- + **EEPAC:** Extrait éther de pétrole d'*Artemisia campestris*
- + **EMAC:** Extrait méthanolique d' *Artemisia campestris*
- + **EMB:** Extrait méthanolique brut
- + **En-Bu:** Extrait n-butanolique
- + **EOA:** Espèces Oxygénées Activées
- + **ERO:** Espèces réactives d'oxygène.
- + **FeCl₃:** Trichlorure de fer
- + **FRAP:** Ferric reducing antioxidant power

- ✚ **GABA:** Acide α aminobutyrique
- ✚ **GPX:** Glutathion peroxydase
- ✚ **GS:** Radical thiyle
- ✚ **GSH:** Glutathion.
- ✚ **GSHPX:** Glutathion peroxydase et réductase
- ✚ **GSSG:** Glutathion Disulfure
- ✚ **H₂O₂:** Peroxyde d'hydrogène
- ✚ **HCl:** Acide chlorique
- ✚ **HPLC:** Chromatographie en phase liquide à haute performance
- ✚ **I%:** Inhibition des radicaux libres en pourcentage
- ✚ **IC 50:** Concentration inhibitrice à 50 %
- ✚ **LDL:** Low-density lipoprotein ou lipoprotéine de basse densité
- ✚ **MeOH:** Méthanol
- ✚ **Na₂CO₃ :** Carbonate de sodium
- ✚ **Na₂HPO₄:** Hydrogénophosphate de sodium.
- ✚ **NADPH oxydase:** Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase.
- ✚ **NaH₂PO₄:** Dihydrogénophosphate de sodium.
- ✚ **NaPO₄:** Phosphate trisodique

- ✚ **ND:** Non déterminé
- ✚ **NH₄OH:** Ammoniaque.
- ✚ **NO :** Monoxyde d'azote
- ✚ **NO°:** Oxyde nitrique
- ✚ **NO₂:** Nitrique dioxyde
- ✚ **O₂⁻:** Radical superoxyde
- ✚ **O₂:** Oxygène singulet
- ✚ **O₂^o:** Radical anion superoxyde
- ✚ **OH:** Groupement hydroxyle
- ✚ **OH:** Radical hydroxyle
- ✚ **ONOO⁻ :** Peroxynitrite

- ✚ **ORAC:** oxygen radical absorbance capacity
- ✚ **P₄₅₀:** Cytochrome P₄₅₀
- ✚ **PBS:** Phosphate buffered saline

- ✚ **PG:** Gallate propylée
- ✚ **PH:** Potentiel d'hydrogène

- ✚ **Pp:** Poids de la poudre en gramme (g)
- ✚ **Ps:** Poids de l'extrait sec en gramme (g)

- ✚ **Rf:** Rapport frontal.
- ✚ **RMN:** Résonance magnétique nucléaire
- ✚ **RNS:** Radicaux libres azotés
- ✚ **RO°:** Alcoxyles
- ✚ **ROO°:** Peroxyle
- ✚ **ROOH:** Hydroperoxydes
- ✚ **ROS:** Radicaux libres oxygénés
- ✚ **SD:** Standard Déviation
- ✚ **SH:** Groupement thiol
- ✚ **SOD:** Superoxyde dismutase
- ✚ **TAM:** Toluène / Acide acétique / Méthanol
- ✚ **TBHQ:** Tétrabutylhydroquinone
- ✚ **TEAC:** Trolox équivalent antioxidant capacity
- ✚ **TLC:** Thin-layer chromatography
- ✚ **TRx:** Thiorédoxines
- ✚ **TRxR:** Thiorédoxine réductase-
- ✚ **UV:** Rayonnement ultraviolet
- ✚ **µg EQ/mg:** Microgramme Equivalent Quercétine par milligramme

Liste des figures

N° de figure	Titre	N° de page
N°01	Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie	07
N°02	Les principales sources des espèces réactives d'oxygène	08
N°03	Structures chimiques des antioxydants synthétiques	11
N°04	Les principales familles de principes actifs utilisées en phytothérapie : Certains Principes actifs sont des métabolites primaires, d'autres sont des métabolites secondaires	16
N°05	Squelette de base des flavonoïdes	19
N°06	photo d' <i>A.compestris</i>	24
N°07	Classification d' <i>Artemisia campestris</i> L	25
N°08	Vue générale de la plante d' <i>Artemisia campestris</i> prise à partir du site d'étude	30
N°09	Photo du Rotavapeur utilisé pour sécher l'extrait méthanolique brut.	31
N°10	Photos montrant l'extraction liquide-liquide.	32
N°11	Protocole expérimental résumant les différentes étapes d'extraction des flavonoïdes	33
N°12	Forme libre réduite du DPPH	39
N°13	: Photos des chromatogrammes résultant de l'analyse des fractions organiques par chromatographie sur gel silice (révélation à UV (365 nm) par les systèmes solvants : (A) : CM : CM : Chloroforme/Méthanol (96:4), (B) : TAM : Toluène/Acétate d'éthyle/Méthanol (50:30:10) et (C) : CM : Chloroforme/Méthanol (60:40)	47
N°14	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois mesures).	48
N°15	Histogramme représente la teneur en polyphénols totaux des fractions	48

	organiques <i>de l'Artemisia campestris</i> .	
N°16	Courbe d'étalonnage de la quercétine (moyenne \pm SD de trois mesures).	49
N°17	Histogramme représente la teneur en flavonoïdes des fractions organiques <i>de l'Artemisia campestris</i> .	50
N°18	Courbes représentent les pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration des fractions issues de l'EMB d' <i>A. campestris</i> .	51
N°19	Histogramme représente les concentrations inhibitrices 50% le peroxyde d'hydrogène des fractions issues de l'EMB d' <i>A. campestris</i> .	52
N°20	Courbes représentent les pourcentage d'inhibition du radical H ₂ O ₂ en fonction de la concentration des fractions issues de l'EMB d' <i>A. campestris</i> .	54
N°21	Histogramme représente les concentrations inhibitrices à 50% peroxyde d'hydrogène des fractions issues de l'EMB d' <i>A. campestris</i> .	54

Liste des tableaux

N° de Tableau	Titre	N° de page
N°01	Les principales espèces oxygénées réactives	06
N°02	Structure des squelettes des polyphénols	18
N°03	Teneur en polyphénols, de la partie aérienne d' <i>Artemisia campestris</i>	26
N°04	Principaux flavonoïdes rencontrés chez <i>Artemisia campestris</i>	26
N°05	Le rendement d'extrait méthanolique brut d' <i>Artemisia campestris</i>	41
N°06	Le rendement des extraits (EEP, EAE, En-Bu) d' <i>A. campestris</i>	42
N°07	Résultats des tests phytochimiques des composés constituant l'extrait méthanolique brut d' <i>Artemisia Campestris</i> .	43
N°08	CCM de l'extrait éther de pétrole Système solvant : chloroforme /méthanol (96:4) Adsorbant : Gel de silice	45
N°09	CCM de l'extrait acétate d'éthyle Système solvant : Toluène/acetate d'éthyle/Méthanol (50:30:10) Adsorbant : Gel de silice	46
N°10	CCM de l'extrait n-butanolique Système solvant : Chloroforme/Méthanol (60:40) Adsorbant : Gel de silice	47

Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Résumés.....	I
Liste des abréviations.....	X
Liste des figures.....	X
Liste des tableaux.....	X
Table des matières.....	X
Introduction.....	1
<i>Synthèse bibliographique</i>	
Chapitre I. Stress oxydatif et les antioxydants	
I. Stress oxydatif et les antioxydants.....	3
I.1- Définition de stress oxydant	3
I.2- Un radical libre.....	3
I.2.1- Différentes formes des radicaux libres	4
I.2.1.1- Radicaux libres oxygénés (ROS)	4
I.2.1.2- Radicaux libres azotés (RNS)	6
I.2.1.3- Radicaux libres soufrés	7
I.2.2- Principales sources d'espèces réactives (ROS)	8
I.2.2.1- Sources exogènes de ROS	8
I.2.2.2- Sources endogènes de ROS	9
I.3- Principales cibles des ERO.....	10
I.4- Rôles biologiques des radicaux libres	10
I.5- Les antioxydants	10
I.5.1- Définition	11
I.5.2- Les sources d'antioxydants	11
I.5.2.1- Antioxydants synthétiques	11
I.5.2.2- Antioxydants naturels	12
I.5.2.2.1- Les antioxydants enzymatiques	12
I.5.2.2.2- Les antioxydants non enzymatiques	13
Chapitre II. La phytothérapie	
II.1- Définition des plantes médicinales.....	15
II.2- Les substances naturelles des plantes et leurs activités biologiques.....	15

II.1.1- Les métabolites primaires.....	16
II.1.2- Les métabolites secondaires.....	17
II.1.2.1- Les différents types des métabolites secondaires.....	17
II.1.2.1.1- Les polyphénols.....	17
II.1.2.1.2- Les Flavonoïdes.....	18
II.1.2.1.3- Les tanins.....	20
II.1.2.1.4- Les terpènes et stéroïdes.....	21
II.1.2.1.5- Les alcaloïdes.....	22
II.1.2.1.6- Les Coumarines.....	22
II.1.2.1.7- Les Saponosides.....	23
Chapitre III. La plante médicinale sélectionnée	
III- <i>Artimisia campestris</i> L.....	24
III.1- Généralités.....	24
III.2- Description botanique.....	24
III.3- Systématique de la plante.....	25
III.4- Origine et distribution.....	25
III.5- Composition chimique.....	25
III.6- Utilisation traditionnelle.....	27
III.7- Activités biologiques.....	27
III.7.1- Activité antioxydante.....	27
III.7.2- Activité antimicrobienne et antiviral.....	28
III.7.3- Effet insecticide.....	28
III.7.4- Propriétés allélopathiques.....	29
III.7.5- Activité hypoglycémiant.....	29
III.7.6- Effet antipoisson.....	29
Partie expérimentale	
Chapitre I. Matériel et méthodes	
I.1- Matériel biologique.....	30
I.1.1- Matériel végétal.....	30
I.1.2- Réactifs chimiques et instrumentations.....	30

I.2- Méthodes.....	31
I.2.1- Préparation de l'extrait méthanolique brut.....	31
I.2.2- Fractionnement de l'extrait méthanolique brut	32
I.2.3- Détermination du rendement d'extraction	34
I.3- Etude qualitative.....	34
I.3.1- Screening phytochimique.....	34
I.3.2- Identification des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince (CCM)...	35
I.4- Etude quantitative.....	36
I.4.1- Dosage des polyphénols	36
I.4.2- Dosage des flavonoïdes	37
I.4.3- Évaluation <i>in vitro</i> de l'activité antioxydant.....	38
I.4.3.1- Test scavenger du radical libre DPPH	38
I.4.3.2- Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène	40
I.5- Etude statistique.....	40
Chapitre II. Résultats et discussion	
II.1- Détermination du rendement d'extraction.....	41
II.2- Tests de mise en évidence de certains composés phytochimiques.....	42
II.3- Etude qualitative de la chromatographie sur couche mince des fractions issues de l'extrait méthanolique brut.....	44
II.3 .1- Composés identifiés dans la fraction éther de pétrole.....	45
II.3.2- Composés identifiés dans la fraction acétate d'éthyle	45
II.3 .3- Composés identifiés dans la fraction n-butanolique	46
II.4- Résultats de l'analyse quantitative.....	48
II.4.1- Dosage des polyphénols	48
II.4.2- Dosage des flavonoïdes.....	49
II.5- Résultats de l'activité antioxydante	50
II.5.1- Effet scavenger du radical DPPH°	51
II.5.2- Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène	53
Conclusion et perspectives.....	55
Références bibliographiques.....	57
Annexe.....	XII

Synthèse

Bibliographique



Introduction



Introduction

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux oxygénés toxiques. Actuellement, il est bien admis que même si un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution (**Bonnefont-Rousselot et al., 2003**).

En Algérie, les plantes sont utilisées depuis longtemps et leur utilisation s'inspire d'expériences des populations ainsi que de la médecine arabe classique. Ce pendant, cette utilisation ne suit pas des règles précises et ne tient pas compte des nouvelles nécessités de la thérapeutique actuelle. Beaucoup d'études se sont intéressées à l'étude des plantes utilisées en médecine traditionnelle.

Actuellement, la recherche des nouvelles substances à partir des plantes attire tous les flashes et constitue une étape substantielle dans le développement des nouveaux médicaments. Plus de 400 plantes traditionnelles utilisées pour le traitement du diabète sucré ont été enregistrées, mais seulement un petit nombre d'entre elles ont subi un enregistrement scientifique et une évaluation médicale afin de confirmer leurs efficacités. De ce fait, plusieurs phytothérapeutes à travers le monde s'intéressent à la recherche des nouvelles substances d'origine végétale pouvant avoir ce secret (**Bérubé-Gagnon, 2006**).

En s'appuyant sur cette vision, Il devient indispensable d'intensifier l'effort de recherche pour développer de nouveaux médicaments accessibles à tous, obtenus à partir des plantes locales, de formulations aisées et peu coûteuses.

C'est pourquoi nous nous sommes intéressé à entreprendre ce travail qui est subdivisé en deux parties essentielles; initié par une synthèse bibliographique où nous apportons dans le premier chapitre des généralités sur le stress oxydant, le deuxième chapitre montre l'histoire de la phytothérapie et les utilisations des plantes médicinales et le dernier chapitre expose la plante médicinale choisie «*Artimisia campestris*» et élucide sa composition en principes actifs et leurs activités biologiques.

La deuxième partie est expérimentale dans laquelle sont abordés deux chapitres; le premier présente le matériel et les méthodes analytiques utilisées pour l'extraction des flavonoïdes, leur identification par CCM, étude de leurs teneurs en polyphénols ainsi qu'en flavonoïdes et l'évaluation du pouvoir antioxydant des extraits organiques de la plante médicinale via l'effet scavenger du DPPH, et le deuxième chapitre expose les résultats obtenus suivis de la discussion.

Chapitre I

Stress oxydatif et

Les antioxydants

I. Stress oxydatif et les antioxydants

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant la matière organique (Meziti, 2007). L'oxygène est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées (EOA). Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisque, vers le milieu des années 50, Gerschman et Hartman avaient déjà évoqué la toxicité de l'oxygène et la «free radical theory» pour expliquer le processus de vieillissement. En 1969, les Américains Mc Cord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains, un système enzymatique antioxydant, le superoxyde dismutase (SOD), capable d'éliminer l'anion superoxyde, démontrant ainsi pour la première fois, que notre organisme produit des EOA. Cette découverte sera le point de départ, dans le monde entier, de nombreuses recherches sur le stress oxydant et les antioxydants (Delattre, 2005).

I.1- Définition de stress oxydant

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur destruction par des systèmes de défenses antioxydants. Les radicaux libres peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles: protéines, lipides et acides nucléiques (Wolin, 1996 ; Angelos *et al.*, 2005 ; Wolin *et al.*, 2005).

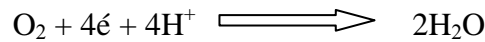
I.2- Un radical libre

Par définition, un radical libre est défini comme toute molécule ou atome possédant un ou plusieurs électrons non appariés, capables d'exister sous forme indépendante, contenant au moins un électron libre sur sa couche externe; Cela qui augmente considérablement sa réactivité par nécessité de se combiner avec un autre électron pour atteindre la stabilité selon un phénomène d'oxydation (Mac-Laren, 2007), Sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes voir quelques nanosecondes) et il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situe (exemple : $\cdot\text{OH}$) (Sayre *et al.*, 2008). Les principales espèces réactives de l'oxygène sont: le radical superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (OH), le monoxyde d'azote (NO), mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Roberts *et al.*, 2010).

I.2.1- Différentes formes des radicaux libres

I.2.1.1- Radicaux libres oxygénés (ROS)

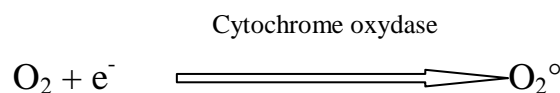
Le passage d'une molécule d'oxygène à deux molécules d'eau nécessite l'action de quatre électrons selon l'équation :



Cependant, et jusqu'à 5 % des cas, on peut assister à une réduction incomplète de l'oxygène en eau. Cette réduction incomplète aboutit à la production de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) mais surtout de l'anion superoxyde (O_2^-). La dismutation de O_2^- va donner naissance au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) puis indirectement au radical hydroxyle (OH^\bullet) (Pincemail *et al.*, 2002 ; Valko *et al.*, 2006).

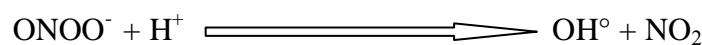
- **Le radical anion superoxyde (O_2^\bullet)**

Est la forme réduite de l'oxygène moléculaire par la réception d'un électron, c'est le premier radical formé lors du transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire (Harman, 2000). La principale source est l'explosion oxydative des cellules phagocytaires entrées en contact avec des antigènes ou des immun-complexes. Les cellules phagocytaires connues pour produire le radical superoxyde sont les polynucléaires neutrophiles, les polynucléaires éosinophiles, les monocytes et les macrophages.



L'anion superoxyde O_2^\bullet joue un rôle très important dans la génération de d'autres radicaux libres tels que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le radical hydroxyle OH^\bullet , et l'oxygène singulet O_2 (Stief, 2003).

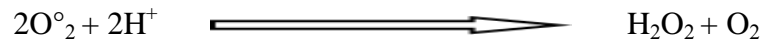
L'anion superoxyde capable de réagir avec l'oxyde nitrique pour former le peroxynitrite (ONOO^-) qui est capable de donner par la suite des composés très toxiques comme le radical hydroxyle et le dioxyde nitrique (Halliwell, 1997).



- **Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2**

Il n'a pas d'électrons non appariés et n'est donc pas un radical. A PH physiologique, tout ion peroxyde formé va se protoner pour donner immédiatement du peroxyde d'hydrogène.

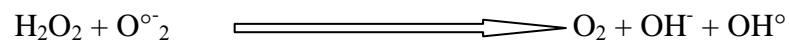
Au bilan, le peroxyde d'hydrogène est produit à partir du radical superoxyde en solution aqueuse. Cet ion provoque la dismutation de l'eau pour former du peroxyde d'hydrogène. Cet ion provoque la dismutation de l'eau pour former du peroxyde d'hydrogène et du dioxygène (**Halliwell et al., 1984**). Cette réaction est catalysée par le superoxyde dismutase.



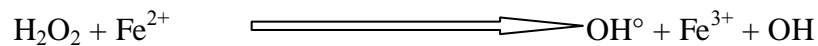
Le peroxyde d'hydrogène est un produit plus stable que les produits qui lui donnent naissance, ainsi sa réactivité est moins importante. La nature non ionique de cette molécule lui permet de traverser facilement les membranes cellulaires et ainsi de diffuser très facilement d'où une possibilité d'action à distance (**Halliwell, 1996**). Malgré une réactivité moins importante, le peroxyde d'hydrogène est un oxydant très puissant. Grâce à la myeloperoxydase des polynucléaires neutrophiles, le peroxyde d'hydrogène est couplé à un ion chlorure pour donner l'hypochlorite, un agent bactéricide (**Stief, 2003**).

- **Le radical hydroxyle OH°**

Est le radical le plus dangereux dans l'organisme, il est formé de la réaction de l'anion superoxide avec l'hydrogène peroxyde.



Ainsi la fission homolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène donne deux radicaux hydroxyles. Cette fission peut être causée par la chaleur ou par des radiations ionisantes. Cependant, une solution de peroxyde d'hydrogène avec des ions ferreux suffit à fournir des radicaux hydroxyles. Cette réaction fut observée pour la première fois par Fenton en 1894 (**Halliwell et Gutteridge, 1984 ; Vergely et al., 2003**).



Le radical hydroxyle réagit avec les lipides, polypeptides, protéines, et ADN, spécifiquement la thiamine et la guanosine (**Ashok et Ali, 1999**)

Tableau 01: Les principales espèces oxygénées réactives (**Bartosz, 2003**).

Radical	Formule
Peroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂
Anion superoxydes	O ₂ ^{o-}
Hydroxyle	OH ^o
Peroxyle	ROO ^o
Hydroperoxydes	ROOH
Alcoxyles	RO ^o
Oxygen singulet	O ₂
Oxyde nitrique	NO ^o

I.2.1.2- Radicaux libres azotés (RNS)

- **Oxyde nitrique**

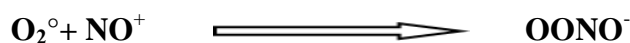
Est un radical avec un électron non apparié, il est formé par l'action du NO synthétase sur L-arginine (**Fang et al., 2002**). L'oxyde nitrique lui-même moins réactif que les autres radicaux libres, mais sa sur production dans des conditions spécifiques capable de provoquer la déplétion des principaux antioxydants au niveau du plasma, tels que l'acide ascorbique et l'acide urique et capable d'entamer la lipide peroxidation (**Halliwell et Wiseman, 1996**).

- **Nitrique dioxyde NO₂**

Formé à partir de la réaction du radical peroxyde avec NO. Le nitrique dioxyde est un puissant déclencheur de la lipide peroxidation par sa capacité d'arracher un atome d'hydrogène d'une double liaison au niveau des acides gras polyinsaturés.

- **Peroxynitrite**

La réaction du NO avec l'anion superoxyde donne naissance au peroxynitrite (**Wiernsperger, 2003**).



Le peroxynitrite est un dérivé d'oxygène très toxique qui provoque des lésions tissulaires très graves en plus de l'oxydation des LDL (**Halliwell, 1997**). Peroxynitrite

apparaît comme l'espèce la plus toxique pour les tissus au niveau des sites de l'inflammation et participe dans plusieurs désordres neurodégénératif et des lésions rénales.

Le peroxynitrite (ONOO⁻) est capable d'oxyder les protéines et les bases azotiques des brins d'ADN par une grande similarité de l'oxydation par le radical hydroxyle (**Knight, 2001**).

I.2.1.3- Radicaux libres soufrés

Ils ont comme origine l'oxydoréduction à un électron du couple disulfure/dithiol de protéines ou de petits peptides. Le principal disulfure cellulaire est le glutathion, qui est un tri peptide. Dans le milieu intracellulaire réducteur, il est présent à l'état réduit thiol (GSH). Lors d'une attaque oxydante, il se dimérise pour donner GSSG, tout en passant par le radical thiyle (GS[•]) qui est un oxydant fort, puis un disulfure (GSSG⁻) (**House et al., 2005**).

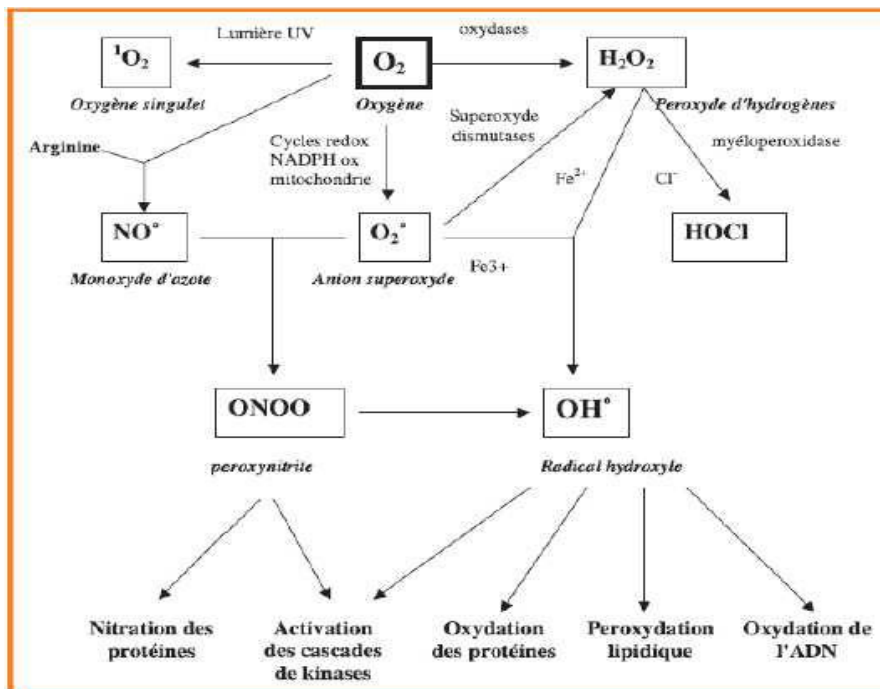
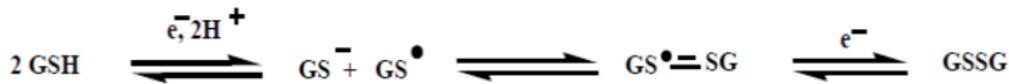


Figure 01: Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (**Favier, 2003**)

I.2.2- Principales sources d'espèces réactives (ROS)

Les principales sources des radicaux libres sont soit endogènes ou exogènes, elles sont résumées dans la (Figure 2).

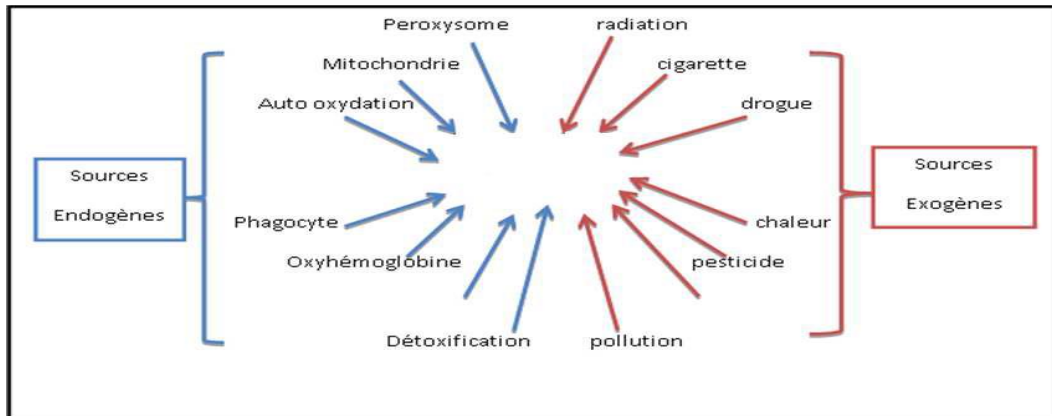


Figure 02 : Les principales sources des ERO (Humblet et Godeau, 2005).

I.2.2.1- Sources exogènes de ROS

A. Les radiations ionisantes de la lumière: les rayons X et α ionisants sont capable de générer des ERO en scindant la molécule d'eau. Lorsqu'il s'agit des rayons ultraviolets, ils forment des ERO en activant des molécules photo-sensibilisantes.

B. Le stress: les facteurs personnels et émotionnels, les traumatismes physiques...

C. L'âge: avec l'âge les cellules sont moins actives et produisent ainsi beaucoup plus d'ERO.

D. Les substances chimiques: les herbicides, insecticides...

E. L'alcool, le tabac: ils s'oxydent au niveau du cytochrome P₄₅₀. La fumée de la cigarette contient du fer et du cuivre qui stimule la production des radicaux OH°.

F. Les médicaments: ceux contenant du fer administrés en grande quantité peuvent conduire à la formation d'OH° très toxique pour l'organisme. Les antibiotiques anticancéreux, tels que les anthracyclines, sont également capables de générer des radicaux libres. La formation d'espèces radicalaires serait responsable de leur mode d'action anticancéreux et de leur toxicité (Hadi, 2004).

G. Les particules inhalées: l'amiante, la silice... sont susceptibles d'exacerber la phagocytose (Adly, 2010).

I.2.2.2- Sources endogènes de ROS

A/ La mitochondrie

C'est la source de production majeure d' $O_2^{\bullet-}$ dans la cellule intacte. Dans les conditions physiologiques, la formation de ce radical est liée à l'activité physique et par là même à l'intensité d'oxygénation. Cette production peut également s'intensifier lorsqu'interviennent des désordres mitochondriaux génétiques, inflammatoires ou nutritionnels (carence en ubiquinone) (Favier, 2003).

B/ Les NADPH oxydases

Il s'agit d'un complexe multimérique regroupant sept enzymes, présent dans de nombreux types cellulaires tels que les phagocytes, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses. (Jungbluth *et al.*, 2008).

C/ Le Réticulum endoplasmique

Le Réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent une série de réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques (Turrens, 2003). La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P₄₅₀ qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisent ainsi des ROS (Morel et Barouki, 1999).

D/ La xanthine-oxydase

Elle joue un rôle important dans la production des ROS (particulièrement $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2), lors de l'ischémie/reperfusion. (Valko *et al.*, 2006).

E/ Les peroxysomes

Les peroxysomes sont importante source de production H_2O_2 cellulaire (Boveris *et al.*, 1972). Toutefois, l' H_2O Est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale (enzyme antioxydante) afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats (Balaban *et al.*, 2005).

I.3- Principales cibles des ERO

Les causes essentielles du stress oxydatif sont d'origine (**Deshmukh, 2013**):

I.3.1- Nutritionnelle: la rupture d'équilibre peut provenir d'une défaillance nutritionnelle ou de la carence en un ou plusieurs des antioxydants apportés par la nutrition comme les vitamines ou les oligo-éléments, présents en quantité limitée dans l'alimentation.

I.3.2- Accidentelle: la surcharge en facteurs pro-oxydants (fer, acides gras) par exemple dans le cas d'inflammation ou l'exposition à des xénobiotiques pro-oxydants...

I.3.3- Génétique: des anomalies génétiques peuvent être responsables d'un mauvais codage d'une protéine enzymatique antioxydant, synthétisant un antioxydant ou régénérant un antioxydant...La production excessive de ERO provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique (**Therond, 2006 ; Adly, 2010 ; Deshmukh, 2013**).

I.4- Rôles biologiques des radicaux libres

Les ERO remplissent en effet de très nombreuses fonctions utiles qui à part la phagocytose, ont été découvertes récemment. Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes (**Favier, 2003**), à la production énergétique, au règlement de la croissance des cellules et à la signalisation intracellulaire. (**Ardestani et al., 2011**).

I.5- Les antioxydants

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des EOR est particulièrement fragile.

Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ces derniers est assuré par des systèmes d'antioxydants. (Boyd *et al.*, 2003 ; Berger, 2006).

I.5.1- Définition

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques d'ERO (Vansant *et al.*, 2004). Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule. (Favier, 2003).

I.5.2- Les sources d'antioxydants

En plus des substances propres à l'organisme représentées par les enzymes antioxydants telles que le superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase (Pastre, 2005), les médicaments, l'alimentation et les plantes sont également des sources d'antioxydants.

I.5.2.1- Antioxydants synthétiques

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. (Lisu *et al.*, 2003). Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques (Yu *et al.*, 2000). En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou cancérigènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomaux du foie et des organes extra-hépatiques (Barlow, 1990).

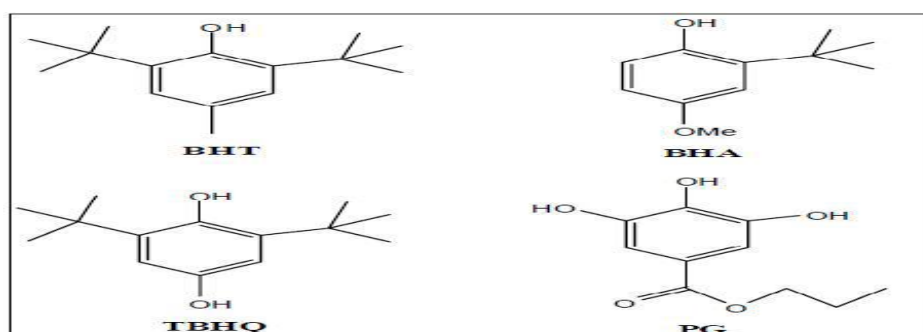


Figure 03: Structures chimiques des antioxydants synthétiques (Amrani, 2012)

I.5.2.2- Antioxydants naturels

L'organisme possède des systèmes de défense très efficaces, de deux types :

Les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques. Ces antioxydants sont d'autant plus importants que certains peuvent être utilisés en thérapeutique pour tenter de prévenir le stress oxydatif (**Diplock, 1991**).

I.5.2.2.1- Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les EROs (**Hamadi, 2010**).

a) Les superoxydes dismutases (SOD)

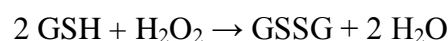
La famille des superoxyde dismutases comporte trois isoformes (SOD₁, SOD₂, SOD₃) dont le rôle est la dismutation de deux anions superoxyde en espèces oxygénées moins réactives que sont H₂O₂ et O₂ (**Antwerpe, 2006**).

b) Les catalases

La catalase est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes. Elle catalyse la réaction de détoxification du H₂O₂ (généralement produit par la SOD). Elle est surtout présente au niveau des globules rouges et du foie (**Soulère et al., 2002**).

c) La glutathion peroxydase et réductase (GSHPX)

Les enzymes de cette famille sont Selenium (Se)-dépendante. La glutathion peroxydase (GPX) est présente dans le cytoplasme où elle joue un rôle majeur dans la régulation de l'état redox physiologique intracellulaire des cellules vasculaires. Elle catalyse la réduction des hydroperoxydes (H₂O₂), et des peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène.



d) L'hème oxygénase

L'hème oxygénase dégrade l'hème (pro-oxydant) en biliverdine, puis en bilirubine qui est un antioxydant, en CO et en fer, et peut prévenir l'oxydation des LDLs. On distingue

l'hème oxygénase constitutive et inductible. Cette dernière est induite par le stress oxydant et les oxLDLs, et possède un effet antiathérogène chez la souris.

e) Les thiorédoxines (TRx) et la thiorédoxine réductase (TRxR)

Les thiorédoxines sont des enzymes à activité antioxydante intrinsèque comme toutes les protéines à groupement thiol (-SH). Elles jouent aussi un rôle important dans la régulation du système immunitaire. Une fois oxydée, la thiorédoxine est réduite par la thiorédoxine réductase (TRxR) qui est une enzyme possédant un groupement sélénocystéine dans son site actif. La TRxR intervient aussi dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène et dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique (**Souza, 2010**)

I.5.2.2.2- Les antioxydants non enzymatiques

Certaines substances ingérées sont utilisées par l'organisme comme antioxydants. Ce sont principalement :

a) Vitamine C

L'acide ascorbique et ses dérivés; Il peut être d'origine naturelle (fruits et légumes) ou synthétique. L'acide L-ascorbique (vitamine C) et son dérivé le palmitate d'ascorbyle, ils sont des antioxydants utilisés en synergie. Il possède un caractère acide et intervient dans les échanges d'oxydoréduction grâce à sa fonction ène-diol. L'acide ascorbique s'oxyde en acide déshydroascorbique, prévenant ainsi l'oxydation d'autres substances moins réactives (**Portes et Fernández-Kelly, 2008**)

b) Vitamine E

Elle prévient la peroxydation des lipides membranaires in vivo en capturant les radicaux peroxydes. Elle est présente dans les huiles végétales, les noix, les amandes, les graines, le lait, les œufs et les légumes à feuilles vertes (**Ahmet, 2003**)

c) Glutathion

Le glutathion joue un rôle majeur dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation en situation de stress oxydant, son rôle protecteur et détoxifiant résulte principalement de sa fonction de coenzyme des GSHPX. (**Stamler et Slivka, 1996**)

d) Les oligoéléments

Le cuivre, le zinc, le manganèse, le sélénium et le fer sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Ces oligoéléments jouent le rôle de cofacteur pour maintenir l'activité catalytique des enzymes antioxydantes (**Garait et al., 2007**).

e) Les caroténoïdes

Se sont des pigments issus des plantes et microorganismes, et sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles. L'activité antioxydante de ceux-ci est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de réagir avec les radicaux ROO° , HO° , O_2° , R° par simple addition électrophile et transfert d'électron. Ils permettent, en particulier, de neutraliser l'oxygène singulet (**Valko et al., 2006**).

f) Acide Urique

L'acide urique est un piègeur de 1°O_2 , des radicaux peroxydes et hydroxydes (RO_2° et HO°), La réaction de l'acide urique avec ces ROS génère des radicaux moins réactifs que HO° (**Powers et Jackson, 2008**).

g) Les composés phénoliques

La propriété antioxydante des flavonoïdes la mieux décrite est leur capacité à piéger les radicaux libres : radical hydroxyle, l'anion superoxyde et les radicaux peroxydes. Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C_3OH) fortement réactif. Ils peuvent également protéger les membranes cellulaires par leur action à différents niveaux sur la peroxydation lipidique. (**Chekir-Ghedira et al., 2005**). Elle contribue aussi à l'inhibition de l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) qui sont impliquées dans l'athérogénèse (**Rehab et al., 2012**).

Chapitre I.I

La phytothérapie



II. La phytothérapie

Le terme phytothérapie vient du grec : (*phytos*) : la plante et (*therapiae*) : la thérapie, elle signifie le traitement ou la prévention des maladies par l'usage des plantes. (Kasmi et Saadaoui, 2014).

La Phytothérapie utilise des plantes médicinales dans leur totalité ou certaines parties de la plante dans des buts thérapeutiques, elle compte parmi les premières et les plus anciennes méthodes curatives depuis l'aube de l'humanité.

Historiquement, la médecine classique n'existerait pas sans la phytothérapie. C'est avec le développement ultra-rapide des sciences naturelles au XIXe siècle, et particulièrement avec les avancées de la chimie, que l'on a pu isoler des composants purifiés des plantes et produire leurs dérivés partiellement synthétiques, puis fabriquer de nouvelles molécules synthétisées chimiquement, pour finalement les introduire comme elles le sont actuellement dans l'arsenal de la médecine classique. Un grand nombre proviennent de la nature du moins en ce qui concerne leur structure de base.

II.1- Définition des plantes médicinales

Les plantes médicinales sont des plantes possédant des molécules à l'intérieur de leur organe (feuille, fleurs...etc.) et pouvant selon des techniques chimiques (extraction, distillation...) permettre à l'isolation des principes actifs (huiles, alcool...) pour des buts thérapeutiques. (Benkiki, 2006).

Les plantes médicinales sont essentiellement utilisées sous deux formes :

- Comme un mélange complexe contenant un large spectre de constituants (infusion, des huiles essentielles et des extraits des teintures)
- Pure, chimiquement définie comme des principes actifs

Les composés purs sont généralement utilisés quand les principes actifs des plantes produisent une forte et spécifique activité ou bien avaient un faible indice thérapeutique. (Nadia, 2009).

II.2- Les substances naturelles des plantes et leurs activités biologiques

Les produits naturels des plantes peuvent être classés en deux catégories, les métabolites primaires et les métabolites secondaires (Figure 4).

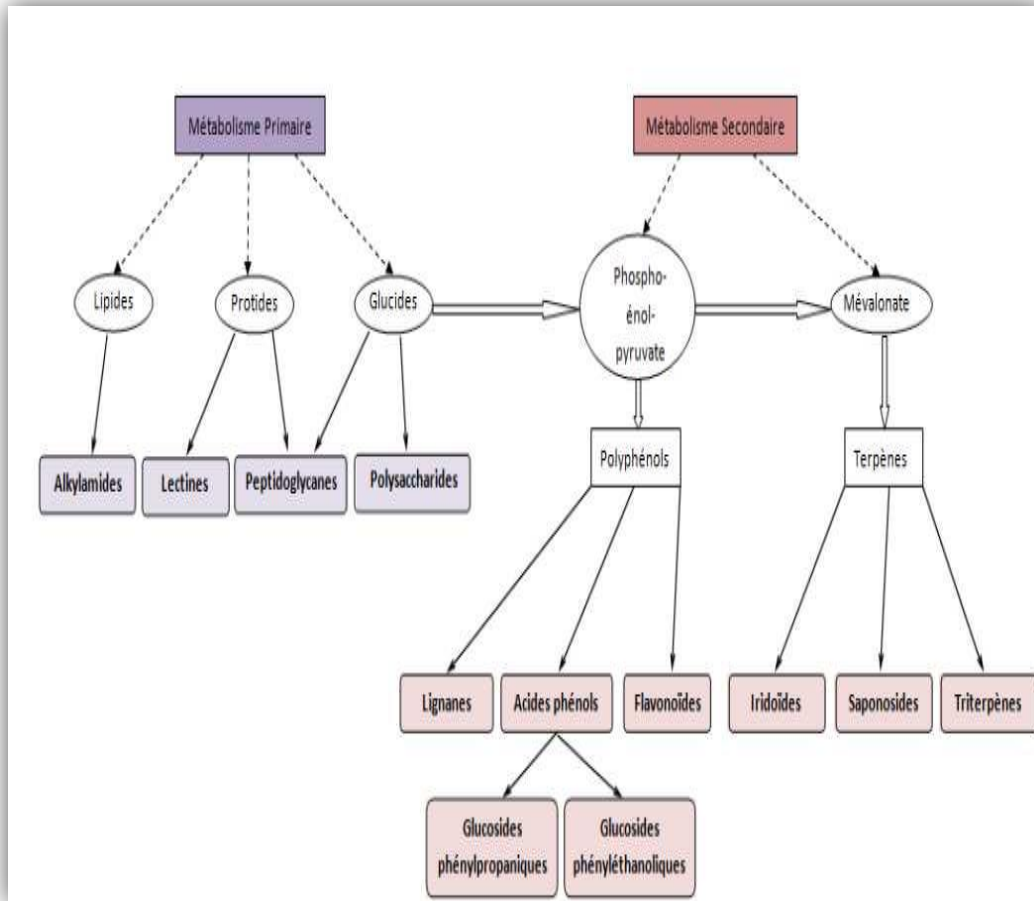


Figure 04 : Les principales familles de principes actifs utilisées en phytothérapie : Certains Principes actifs sont des métabolites primaires, d'autres sont des métabolites secondaires (**Bruneton, 1999**)

II.1.1- Les métabolites primaires

Les plantes utilisent l'énergie du rayonnement solaire, le dioxyde de carbone présent dans l'atmosphère, l'eau et les éléments inorganiques du sol qu'elles absorbent par les racines (eau, éléments inorganiques) et par les feuilles (dioxyde de carbone).

Le processus de base est la photosynthèse qui fixe le carbone contenu dans le dioxyde de carbone atmosphérique, en le combinant aux atomes d'hydrogène contenus dans les molécules d'eau. Les premiers produits formés par la photosynthèse sont des hydrates de carbone, de faible masse moléculaire (oses). C'est à partir de ces oses (ou sucres) que sont ensuite formés tous les métabolites primaires nécessaires.

A la survie de la plante : glucides complexes (polymères comme la cellulose, l'amidon ou les pectines), acides aminés (constitutifs des protéines), acides gras (constitutifs des lipides), etc. (**Bruneton, 2009**)

II.1.2- Les métabolites secondaires

Les plantes produisent un grand nombre de substances appelées métabolites secondaires. Ces métabolites secondaires végétaux peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes. Ils participent de manière très efficace, à la tolérance des végétaux à des stress variés (attaques de pathogènes, prédateurs d'insectes, sécheresse, lumière UV, etc.) (**Tirichine, 2010**).

Ils sont divisés principalement en trois grandes familles : Les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes. (**Lutge et al., 2002 ; Abderrazak et Joël, 2007**).

II.1.2.1- Les différents types des métabolites secondaires

Chez les végétaux, les composés secondaires regroupent plusieurs dizaines de milliers de molécules différentes, généralement rassemblés en superfamilles chimiques tel que les polyphénols, les terpènes, les stérols et les alcaloïdes, etc.

II.1.2.1.1- Les polyphénols

Les polyphénols sont des composés phénoliques hydrosolubles et ayant outre les propriétés habituelles des phénols (**Dangles et Brouillard, 1994**), ils sont produits par les plantes afin d'accomplir des fonctions précises, les plus notoires étant : Défense contre les moisissures et les bactéries phytopathogènes, la résistance à l'attaque des insectes et l'attraction des pollinisateurs. (**Bahorun, 1997**).

Les polyphénols sont répartis en plusieurs classes: Les flavonoïdes, Les acides phénoliques de types benzoïques ou cinnamiques les tanins, les hydrolysables, les stilbenes, les lignines et les subérines, Ces classes montrent une extrême variété d'activités biologiques (**Queiroz-Monici et al., 2005**), tel que; des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, (**Babar et al., 2007**), anti-allergènes, vasodilatateurs (**Falleh et al., 2008**), et antioxydants. (**Gomez-Caravaca et al., 2006**).


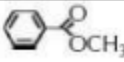

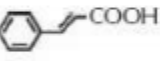
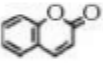
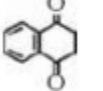
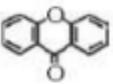
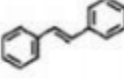
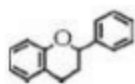
II.1.2.1.1.1- Biosynthèse

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, tous dérivant de la l'acide shikimique. Cette voie shikimate conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïques, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines (**Bruneton, 1993**).

II.1.2.1.1.2- Classes des polyphénols

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (**Tableau 2**). Ces molécules sont généralement trouvés conjuguées aux sucres et les acides organiques.

Tableau 02: Structure des squelettes des polyphénols (**Crozier et al., 1997**).

Nombre de Carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de Base
7	C6-C1	Acides phénols	Acide gallique	
8	C6-C2	Acétophénonnes	Gallacetophénone	
8	C6-C2	Acide phénylacétique	Acide p-hydroxyphényl acétique	
9	C6-C3	Acides hydroxycinamiques	Acide Coumarique	
9	C6-C3	Coumarines	Esculitine	
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone	
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiférine	
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Resveratrol	
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes	Naringénine	

II.1.2.1.2- Les Flavonoïdes

Les flavonoïdes au sens large sont des pigments quasiment universels des végétaux (**Rice-Evans et Miller, 1996**). Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones et les anthocyanes. Ces diverses structures se rencontrent à la fois sous forme libre (aglycone) ou sous forme de glycosides.

II.1.2.1.2.1- Structure et classification

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo-y-pyranne (**Skerget *et al.*, 2005**). Leur structure de base est celle d'un diphényl propane à 15 atomes de carbone (C₆-C₃-C₆), constitué de deux noyaux aromatiques qui désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C (**Dacosta, 2003**).

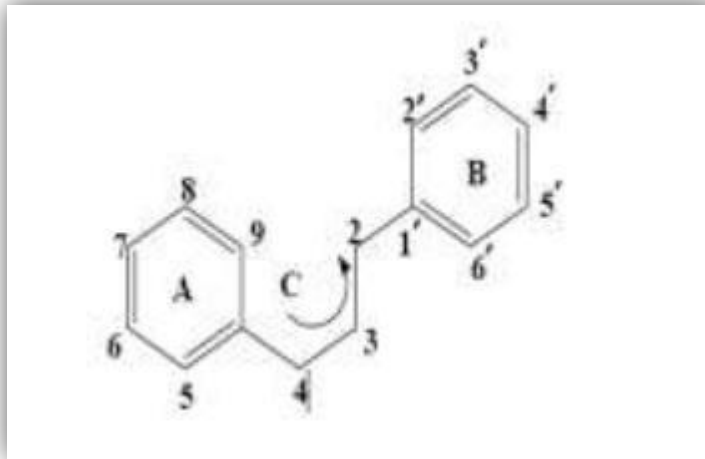


Figure 05 : Squelette de base des flavonoïdes (**Chebrouk, 2009**).

De façon générale les flavonoïdes se trouvent soit à l'état libre, dans ce cas ils sont dits aglycones, soit sous forme de C- ou O-glycosides, et dans ce cas ils sont liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose, ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères (**Dacosta, 2003**). Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont : flavones, isoflavandiols, flavanols, flavandiols, aurones, chalcones, anthocyanins (**Effendi et Yajun, 2008**).

II.1.2.1.2.2- Intérêts et effets biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines, bois... (**Grotewold, 2006**). Certains flavonoïdes sont plus spécifiques de certains tissus. Les anthocyanes sont plutôt localisés dans les parties externes des fruits, fleurs et feuilles.

Les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs. Ce sont des pigments naturels au même titre que les chlorophylles (couleur verte) et les caroténoïdes (nuances jaunes et orangées). Leur fonction principale est la pigmentation des plantes (aspect esthétique). Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration par leur rôle de Co-pigments (certaines flavones et flavonols) (**Grace *et al.*, 1996**).

Les flavonoïdes, en particulier les anthocyanes, sont les seules molécules du règne végétal capables de produire une vaste gamme de couleurs, susceptibles de donner des teintes allant du jaune-orangé au bleu, en passant par le pourpre et le rouge (**Luigia et Giuseppe, 2006**) .

Les flavones, aurones et chalcones donnent plutôt des couleurs jaune, beiges voire blanche, ou participent aux nuances produites par les anthocyanes et les caroténoïdes (**Grotewold, 2006**).

Un des rôles de la couleur chez les plantes est d'attirer les insectes et les oiseaux, qui Jouent un rôle majeur dans la pollinisation et la dispersion assurant ainsi la reproduction de l'espèce (**Jaime et al., 2007**).

Les flavonoïdes, dissous dans les vacuoles à l'état d'hétérosides, s'accumulent dans les cellules épidermiques, assurant la protection des tissus contre les rayonnements solaires nocifs. On prête à certains flavonoïdes (phytoalexines), un rôle de défense contre les prédateurs et les pathogènes (**Stobiecki et al., 2006**).

II.1.2.1.3- Les tanins

Les tanins sont des métabolites secondaires polyphénoliques très répandus dans le règne végétal, (**Ghestem et al., 2001 ; Khanbabae et Ree, 2001**), hydrosolubles de masse molaire entre 500-2000D. A la base de leur caractéristique structurale, il est possible de diviser les tanins en 2 groupes : Tanins condensés (pro-anthocyanidines) qui sont des polymères ou oligomères flavanique avec un degré de polymérisation entre deux et plus de 50 unités et les tanins hydrolysables qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénolique. Tous les organes végétaux peuvent en renfermer (l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits, les racines, les graines) (**Khanbabae et Ree, 2001**). Les tanins sont présents dans une variété de plantes utilisées dans l'alimentation notamment les céréales et légumineuses et les fruits comme (**Peronny, 2005**). Le rôle biologique des tanins dans la plante est lié à sa propre protection contre les infections, les insectes et les animaux herbivores (**Khanbabae et Ree, 2001**), en plus de la protection contre les attaques fongiques et bactériennes. (**Peronny, 2005**).

Les tanins montrent plusieurs activités biologiques ils ont un effet anti-diarrhéique, vasoconstricteurs, antiseptique, (**Okuda et al., 1983**), antioxydantes antiparasitaires, antimicrobienne (**Hatano et Mesbahi, 2005**). Les tanins ont aussi des propriétés proches de celles des flavonoïdes : augmentation de la résistance capillaire, diminution de la perméabilité capillaire et stabilisation du collagène. (**Bruneton, 1999**).

II.1.2.1.3.1- Structure chimique et classification

A la base de leur caractéristique structurale, il est possible de diviser les tanins en 2 groupes:

II.1.2.1.3.1.1- Tanins hydrolysables

Ce sont des oligo ou des polyesters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable d'acide phénolique. Le sucre est très généralement le glucose. L'acide phénolique est soit l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, soit l'acide hexahydroxydiphénique (AHDP) et ses dérivés dans le cas tanins éllagiques (**Bruneton, 1999**).

- Tanins galliques (Gallo tanins): Ils donnent par l'hydrolyse des oses et de l'acide gallique.
- Tanins ellagiques (Ellagitanins) : Ils sont scindés par les enzymes en oses et en acide ellagique (**Paris et al., 1986**).
- Tanins condensés: Les tanins condensés sont des polymères flavanolique constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatechine et catéchine (**Khanbabae et Ree, 2001**). Les tanins condensés sont des molécules hydrolysables, leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre (**Paris et al., 1986**).

II.1.2.1.3.1.2- Tanins condensés (proanthocyanidines)

Ce sont des polymères ou oligomères flavanique, constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatechine et catéchine, avec un degré de polymérisation entre deux et plus de 50 unités (**Khanbabae et Ree, 2001**). Ces unités liées entre elles par une seule liaison carbone carbone C4-C8 ou C4-C dans le type B des pro-anthocyanidines ; ou par une liaison interflavanique double (C4-C6⁸ ou C4-C6) et (C2-O-C) dans le type A (**Bruneton, 1999 ; Xie et Dixon, 2005 ; Vivas et al., 2006**).

II.1.2.1.4- Les terpènes et stéroïdes

Les terpénoïdes sont une vaste famille de composés naturels près de 15000 de molécules différentes et de caractère généralement lipophiles, leurs grandes diversités due au nombre de base qui constituent la chaîne principal de formule (C₅H₈)ⁿ selon la variation de nombre n, dont les composés monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes, (**Wichtl et Anton, 2009**). Ces molécules présentent en forme des huiles essentielles ; parfums et goût des plants, pigments (carotène), hormones (acide abscissique), des stéroïdes (cholestérol). Les stéroïdes sont des triterpènes tétracycliques, possèdent moins de 30 atomes de carbone, synthétisés à partir d'un triterpène acyclique.

Chez toutes les plantes on trouve ces composés liées avec un groupement alcool qu'ils nommés les stérols ; prenant une forme plane, glycosylée, analogues du cholestérol qui ne diffèrent de celui-ci que par leur chaîne latérale comme : B-Sitostérol, Stigmastérol (Hopkins, 2003).

II.1.2.1.5- Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des métabolites décrivent des matières protéiques. (Bouloux, 2000), On les trouve principalement chez les végétaux, mais aussi chez les animaux et chez certains micro-organismes.

Leur structure chimique de base est un hétérocycle azoté sauf pour quelques substances dans lesquelles l'azote est extra cyclique (c'est le cas de la colchicine et de l'éphédrine par exemple). Il existe plus de six mille alcaloïdes mais ce chiffre est en constante augmentation (Judd *et al.*, 2002).

Les alcaloïdes sont utilisés dans plusieurs médicaments, ils affectent chez l'être humain le système nerveux particulièrement les transmetteurs chimiques tels l'acétyl choline, norepinephrine, acide α aminobutyrique (GABA), dopamine et la serotonine d'autres effets pharmacologiques sont attribués également aux alcaloïdes telles que l'effet analgésique (cocaïne), anticholinergique (atropine), anti-malaria (quinine), antihypertensive (réserpine), antitussive (codéine), stimulant centrale (caféine), dépressant cardiaque et diurétique narcotique (morphine), anti-tumeur et sympathomimétique (éphédrine). (Badiaga *et al.*, 2011).

On distingue:

- Les alcaloïdes vrais qui sont des substances d'origine naturelle et de distribution restreinte, de structure souvent complexe, azotée (atome d'azote inclus dans un hétérocycle) et de caractère basique
- Les pseudo-alcaloïdes qui sont des métabolites présentant les caractéristiques des alcaloïdes vrais, excepté leur origine biosynthétique
- Les proto-alcaloïdes qui sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique, ont une réaction basique et sont élaboré in vivo à partir d'acides aminés (Bruneton, 2009).

II.1.2.1.6- Les Coumarines

Les coumarines sont des substances naturelles connues, Il s'agit de composés à neuf atomes de carbone possédant le noyau benzo (2 H) -1 pyranone-2. (Hamimed, 2009).

Les coumarines se localisent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines, elles sont fréquemment à l'origine des hétérosides. **(Benkiki, 2006).**

Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. **(Belfadel, 2013).**

Les coumarines sont des composés aromatiques dérivant de l'acide O-hydroxy Zcinnamique, de même que la coumarine elle-même dérive de l'acide orthocoumarinique. **(Mansour et al., 2009)**

II.1.2.1.7- Les Saponosides

Mot latin « sapon », l'herbe à savon. Ils sont des métabolites secondaires hétérosidiques présents dans de nombreuses plantes et quelques organismes marins. Ces molécules sont connues pour leur propriété tensio-active ou encore leur capacité à lyser les globules rouges (hémolyse). **(Belfadel, 2013).**

L'hydrolyse d'une saponine, par l'action d'un acide ou d'enzyme, produit un sucre ou plusieurs (dont souvent le glucose) et un aglycone nommé sapogénine selon que cette dernière étant, soit un triterpène, soit un stéroïde. On distingue les saponines triterpènes et les saponines stéroïdiques, certains auteurs distinguent une troisième catégorie de saponines ; celles des amines stéroïdiques qui sont traitées par d'autres comme des alcaloïdes stéroïdiques. **(Saihi R, 2011).**

Chapitre I.I.I

La plante médicinale

sélectionnée



III. *Artemisia campestris* L

III.1- Généralités

Le genre *Artemisia* appartient à la famille des Astéracées: c'est l'un des genres le plus répandu et le plus étudié de cette famille; il contient un nombre variable d'espèces allant jusqu'à 400 espèces (Mucciarelli et Maffei, 2002).

Il a été rapporté que le genre *Artemisia* est riche en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les acides cafféoylquinic, les coumarines, les huiles essentielles, les stérols et les acétylènes (Kundan et Anupam, 2010).

Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia* possèdent des propriétés thérapeutiques, elles sont non seulement utilisées dans la médecine traditionnelle, mais aussi dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Mirjalili et al., 2007).

III.2- Description botanique

Artemisia campestris est un arbuste aromatique à tiges robustes, d'une hauteur de 30 à 80 cm. cette plante possède des capitules très petits, étroits (1 à 1,5 mm) ovoïdes ou coniques, à involucre scarieux, ne contient que 3 à 8 fleurs de couleur jaunâtre bordées de rouge, et à pédoncule muni de poils blanchâtres à brunâtre. Les feuilles d'*Artemisia campestris* sont glabres de couleur verte foncée, les inférieures dipinnatiséquées, les supérieures pinnatiséquées, les basales pétiolées et auriculées, les tiges sont ligneuses à la base striée (Quezel et Santa, 1962 ; Ozenda, 1983 ; David, 1994).



Figure 06: photo d'A.compestris

III.3- Systématique de la plante

Selon **Caratini (1971)**, la plante *Artemisia campestris* est classée dans:

Règne: Plantae	Ordre: Asterales
Sous règne: Tracheobionta	Famille: Asteraceae
Embranchement: Spermatophyta	Sous famille: Asteroideae
Sous embranchement: Magnoliophyta	Tribu: Anthemideae
Classe: Magnoliopsida	Sous Tribu: Artemisiinae
Sous classe: Asteridae	Genre: <i>Artemisia</i>
Espèce: <i>Artemisia campestris</i> L.	

Figure 07: Classification d'*Artemisia campestris* L (**Caratini, 1971**).

III.4- Origine et distribution

Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia* sont des arbustes aromatiques, qui poussent de façon spontanée dans plusieurs régions de l'hémisphère nord de la terre, surtout dans les zones semi arides et le bassin méditerranéen, et s'étendent jusqu'à l'Himalaya (**Vernin et al, 1995**), dans l'hémisphère sud elles sont trouvées en Afrique du sud, l'Australie et l'Amérique du sud, d'après **Kyeong et al (2007)**, *Artemisia campestris* est originaire de l'Asie.

III.5- Composition chimique

L'utilisation des solvants à polarité différente, suivie par des étapes de fractionnements et l'emploi de différentes techniques de chromatographie permettent d'extraire, séparer et identifier les différents composés présents dans les extraits de plantes. De nombreuses études chimiques ont révélé que la partie aérienne d'*Artemisia campestris* est riche en métabolites secondaires tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les huiles essentielles (**Joao et al., 1998 ; Juteau et al., 2002**).

La composition chimique de l'huile essentielle varie selon le chimio type considéré (**Bruneton, 1999**), elle varie également selon les conditions géographiques et climatiques (température, altitude, précipitation, hauteur, direction du vent, heures de soleil, etc.), et selon la phase de développement de la plante (**Jerkovic et al., 2003**).

Plusieurs études (Akrouit *et al.*, 2001 ; Juteau *et al.*, 2002) ont rapporté la composition des huiles essentielles d'*Artemisia campestris*, l'huile essentielle est analysée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS), (Juteau *et al.*, 2002) ont identifié dans une espèce de Camargue (Marseille, France) 51 composés caractérisés, les plus abondants sont : γ -terpinène, capillène, 1-phenyl-2,4-pentadiyne, spathulenol, methyleugenol, p-cymène et β -pinène.

D'après Akrouit *et al.* (2001) les constituants les plus abondants d'une espèce de Tunisie sont : β -pinène (24,2-27,9 %), p-cymène (17.4–22.3%) et α -pinène (4.1–11.0%), ces constituants représentent plus de 45 % de l'huile totale.

Le contenu phénolique total, les flavonoïdes, les dérivés hydroxycinnamiques, les dérivés hydrox benzoïques de l'extrait éthanolique (80%) de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* ont été déterminés par des méthodes spectrophotométriques.

Les flavonoïdes identifiés chez *Artemisia campestris* sont: flavone (apégénine), flavonol (kaempférol 7-méthyle), flavanone (naringénine), dihydroflavonols (taxifoline-7-méthyle) (Tableau 4) (Valant *et al.*, 2003).

Les feuilles d'*Artemisia campestris* contiennent aussi des alcaloïdes, des saponines. (Naili *et al.*, 2010).

Tableau 03: Teneur en polyphénols, de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* (Djeridane *et al.*, 2007).

Plante	Phénols totaux a	Flavonoïdes b	Dérivés hydrox cinnamiques c	Dérivés hydrox benzoïques d
<i>Artemisia Campestris</i>	103.4	5	95	0

a: mg EAG/g ps, b : EQ (m/m), c : EAC (m/m), d : EAG (m/m).

Tableau 04: Principaux flavonoïdes rencontrés chez *Artemisia campestris*

Flavonoïdes	Références
- Flavanone: 5, 8, 4'-trihydroxyflavanone.	- Rauter <i>et al.</i> , 1989.
-Acétophénone:3-acetyl-4 hydroxyacétophénone.	- Hurabielle <i>et al.</i> , 1982.
-Flavones:5,7-dihydroxy-3, 4'-dimethoxyflavone.	- Ferchichi <i>et al.</i> , 2006.
- Flavonol: Kaempférol-7méthyl.	- Valant-V <i>et al.</i> , 2003.
- Dihydroflavonol: 7-methyl aromadendrin.	- Hurabielle <i>et al.</i> , 1982.

III.6- Utilisation traditionnelle

Artemisia campestris est une plante utilisée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies:

En usage local *Artemisia campestris* est utilisée pour traiter les troubles digestives, les ulcères et les douleurs menstruelles (**Dob et al., 2005**). Elle est également utilisée dans le traitement de diabète (**Sefi et al., 2010**).

La partie aérienne est utilisée dans le traitement de brûlures, de la diarrhée, les morsures de serpents, les piqûres de scorpions, l'eczéma, la gastroentérite, la dysenterie, le rhumatisme, elle est utilisée également pour traiter les infections urinaires, la fièvre et la toux (**Ben Sassi et al., 2007**).

Selon (**Saoudi et al., 2010**) la consommation journalière d'une décoction préparée à partir des tiges et feuilles d'*A. campestris* permet de réduire les symptômes digestifs.

III.7- Activités biologiques

En plus de leurs utilisations traditionnelles, *Artemisia campestris* possède de nombreuses propriétés biologiques, parmi lesquelles on cite les plus importantes :

III.7.1- Activité antioxydante

La partie aérienne d'*Artemisia campestris* possède des activités antioxydantes significatives. En effet cette plante est riche en composés doués d'activité antioxydante tels que: les flavonoïdes, les polyphénols et les tanins, ces différents constituants exercent ses actions antioxydantes en inhibant la production de l'anion superoxyde, l'hydroxyle, comme ils inhibent la peroxydation lipidique au niveau des microsomes (**Bruneton, 1999**).

Dans une étude faite par **Aniya et ses collaborateurs (2000)**, l'activité antioxydante de l'extrait aqueux d'*Artemisa campestris* a été testée par la méthode de DPPH (2,2-diphényl-1-1-picrylhydrazyl), les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux possède une activité antioxydante élevée.

De leurs coté **Akrout et al (2011)** ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* (huile essentielle, extrait aqueux, extrait éthanolique 50%) en utilisant trois méthodes différentes: la méthode de DPPH, la technique de décoloration du β -carotène et la méthode d'ABTS (2,2 azinobis-3-ethyl benzthiazoline-

6-sulphonicacid), ils ont trouvé que l'huile d'*Artemisia campestris* possède une faible activité antioxydante, alors que les extraits aqueux et organique montrent une activité antioxydante importante en comparaison à celle de l'huile essentielle.

III.7.2- Activité antimicrobienne et antiviral

Artemisia campestris est une plante médicinale utilisée dans le traitement de nombreuses infections telles que les infections urinaire. **Naili et al (2010)** ont testé l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Artemisia campestris*, ils ont trouvé que l'activité de cet extrait a été plus efficace contre les bactéries gram positif (*Staphylococcus aureus*) que les bactéries gram négatif (*Escherichia coli*).

Ben-Sassi et al (2007) ont étudié l'activité antibactérienne de quatre extraits organiques (méthanol, acétate éthyle, acétone, chloroforme) de 23 plantes médicinales dont *Artemisia campestris* contre 14 bactéries gram positif et gram négatif. Les résultats ont montré que l'extrait d'acétone est le seul qui montre une action inhibitrice contre trois types de bactéries: *S. epidermidis*, *S. saprophiticus* et *S. aureus*.

En outre *Artemisia campestris* possède des propriétés antifongiques, **Kyeong et ses collaborateurs (2007)** ont étudié l'effet antifongique de l'extrait aqueux des racines d'*Artemisia campestris* sur des champignons de mycorhize, les résultats obtenus montrent que l'extrait aqueux possède un potentiel antifongique.

Les plantes du genre *Artemisia* contiennent un sesquiterpène lactone appelé: *Artemisinine*, ce composant constitue le métabolite secondaire le plus important chez toutes les espèces *Artemisia*, il est considéré comme une drogue antimalariale très efficace contre le parasite qui cause la malaria: le *Plasmodium falciparum* (**Donrop et Day, 2007**). L'artémisinine possède également plusieurs activités, il est efficace contre les maladies infectieuses telle que l'hépatite B (**Rmoero et al., 2005**).

III.7.3- Effet insecticide

Une étude récente a été réalisée par **Pavela (2009)**, où l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* a été testé pour son activité contre les femelles adultes d'une espèce de moustique *Culex quinquefasciatus*, cet extrait a montré un degré de répulsion très intéressant contre ces parasites vecteurs de plusieurs maladies comme la malaria.

III.7.4- Propriétés allélopathiques

Les plantes du genre *Artemisia* possèdent des propriétés allélopathiques par inhibition de la croissance et la germination de certaines plantes de l'entourage, Ces propriétés sont dues probablement à la présence d'acide phénolique, et d'autres composants polaires (Kyeong *et al.*, 2007).

III.7.5- Activité hypoglycémiant

Sefi et ses collaborateurs (2010) ont trouvé que l'extrait aqueux des feuilles d'*Artemisia campestris*, diminue le taux de glucose dans le plasma des rats chez lesquels le diabète est induit par l'alloxane monohydrate, ils ont trouvé également que la diminution de la concentration de glucose s'accompagne d'une part d'une diminution des taux de triglycérides et des lipoprotéines de faibles densité (LDL), et d'autre part d'une augmentation du niveau de l'insuline, ce qui peut prévenir les complications du diabète.

III.7.6- Effet antipoison

Les extraits d'acétate d'éthyle, éthanol, méthanol et de dichlorométhane, des feuilles d'*Artemisia campestris* ont été testés pour ses capacités de neutralisation de venin de scorpion et de vipère, les résultats obtenus ont montré que l'extrait éthanolique, inhibe l'activité de dégradation des globules rouges contre le venin du scorpion *Androctonus australis garzonii*, des résultats similaire ont été obtenus pour l'extrait de dichlorométhane pour la neutralisation de venin de la vipère *Macroviper alebetina* (Memmi *et al.*, 2007).

Partie

Expérimentale



Chapitre I

Matériel et

méthodes

Matériel et Méthodes

Notre travail ayant pour objet l'investigation phytochimique et l'étude *in vitro* du pouvoir antioxydant des extraits organiques d'une plante médicinale *Artemisia campestris*. L'étude expérimentale a été effectuée au sein du laboratoire de Biochimie, Université Abbés Laghrour - Khenchela.

I.1- Matériel biologique

I.1.1- Matériel végétal

Il est constitué des feuilles et des tiges de la plante *Artemisia campestris*, récoltée au cours de mois de mars en 2017 de la région d'Ouled Rechache (Zoui), Wilaya de Khenchela (**Figure 8**). La plante fraîchement récoltée est séchée à l'ombre dans un endroit sec et aéré, après son séchage, la plante a été broyée à l'aide d'un broyeur électrique pour l'obtention d'une poudre, cette dernière est conservée dans un flacon en verre bien hermétique jusqu'à son utilisation.



Figure 08 : Vue générale de la plante *d'Artemisia campestris* prise à partir du site d'étude (Boumaarafi et Ouannes, 2017).

I.1.2-Réactifs chimiques et instrumentations

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits: Eau distillée, Folin-Ciocalteu, Trichlorure de fer, peroxyde d'hydrogène,

Diphénylpicryl-hydrazyl, Carbonate de sodium, Toluène, Trichlorure d'aluminium, méthanol, n-butanol, Éther de pétrole, acétate d'éthyle, chloroforme, Acide sulfurique, Ammoniaque, Tampon phosphate, Acide ascorbique, Acide acétique, Acide chlorique, Wagner (2g de Iodure de potassium et 1,27g d'I₂ solubilisé dans 100 ml d'eau distillée).et des plaques CCM.

Parmi l'appareillage utilisé : Rota vapeur (HAHNVAPOR), spectrophotomètre UV

Vis à double faisceau 1200 avec accessoires (UNICO 1200 UV/VIS), Chambre d'observation UV (VILBER COURMAT), Etuve universelle de 5 à 220°C avec Ventilation (MEMMERT), vortex avec plateau et Balance (OHAUS), pH mètres (Hanna), Congélateur (LIEBHERR), Balance analytique avec chambre de pesée (Aventurer), la Hôte (KIT LAB) et réfrigérateur inox ventilé (LIEBHERR).

I.2- Méthodes

I.2.1- Préparation de l'extrait méthanolique brut

300g de la poudre de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* sont mises à macérer dans un mélange méthanol/eau distillée (7:3) pendant 24heures. L'extrait hydro alcoolique est récupéré dans un premier temps après filtration du mélange. Cette opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant. Le méthanol est ensuite éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite via un rotavapeur à une température de 50°C (Tadeg *et al.*, 2005). L'extrait obtenu a été conservé à -4°C jusqu'à son utilisation.



Figure 09: Photo du Rotavapeur utilisé pour sécher l'extrait méthanolique brut.

I.2.2- Fractionnement de l'extrait méthanolique brut

L'extrait méthanolique brut est mélangé avec de l'eau distillée bouillante et laissé à température ambiante pendant 24 heures. Après filtration, l'extrait brut est épuisé par des extractions liquide-liquide successives par 3 solvants organiques de polarité croissante (éther de pétrole, acétate d'éthyle et n-butanol) (**Figure 10**). Les différentes étapes de cette extraction sont résumées dans la (**Figure 11**).

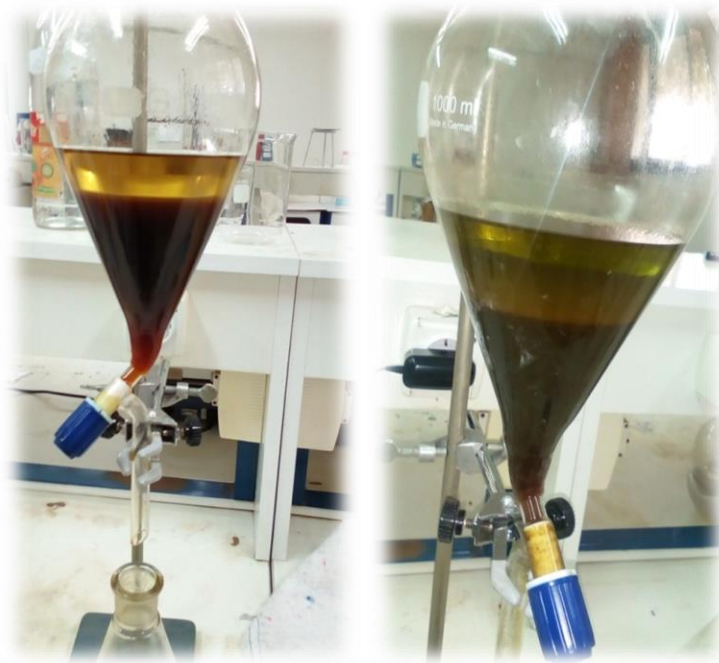


Figure 10: Photos montrant l'extraction liquide-liquide (Ouannes et Boumaarafi, 2017).

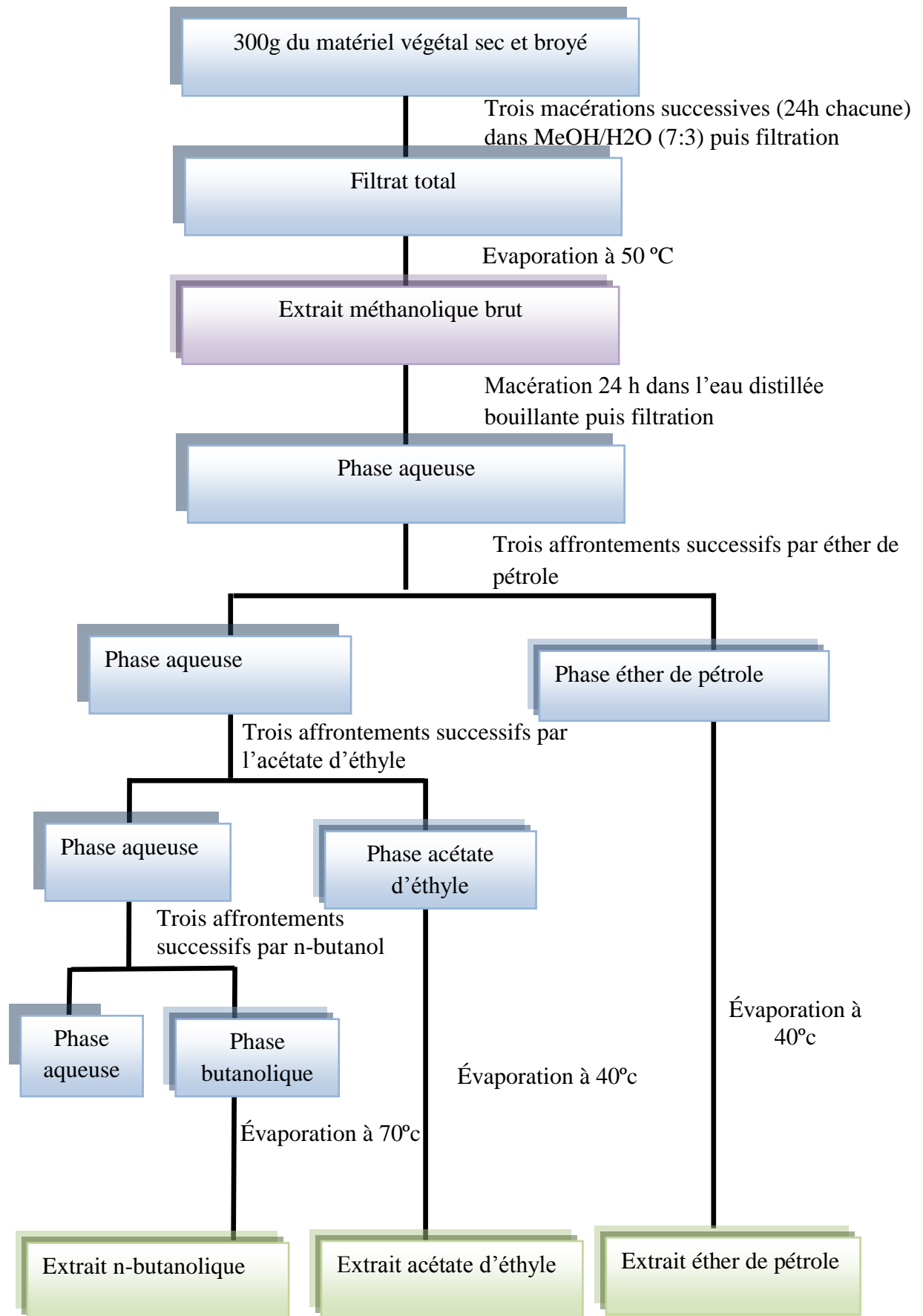


Figure 11 : Protocole expérimental résumant les différentes étapes de fractionnement des flavonoïdes

I.2.3- Détermination du rendement d'extraction

Le résidu ou la poudre obtenus des extraits d'éther du pétrole, d'acétate d'éthyle et de n-butanol sont pesés pour la détermination du rendement selon la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \text{Ps} / \text{Pp} \times 100$$

Où :

Ps: Poids de l'extrait sec en gramme (g)

Pp : Poids de la poudre en gramme (g).

I.3- Etude qualitative

I.3.1- Screening phytochimique

Le screening chimique est un ensemble de réactions chimiques qui permettent d'identifier la présence des principales catégories des substances chimiques naturelles contenues dans une plante et responsables de propriétés pharmacologiques.

Les tests phytochimiques qualitatifs sont réalisés sur l'extrait brut méthanolique d'*Artemisia campestris* et les résultats obtenus ont été évalués comme suit :

+ : Positif ; - : Négatif ; ND : Non déterminé.

I.3.1.1- Recherche des tanins

2 à 3 gouttes de la solution de FeCl₃ à 2%, sont ajoutées à 2 ml de l'extrait brut méthanolique. La solution obtenue est reposée pendant quelques minutes et le test est considéré positif s'il y a l'apparition d'une coloration bleue-noire et un précipité

I.3.1.2- Recherche des saponosides

- **Test 1** : 5 ml de l'extrait brut méthanolique sont mélangés avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 min. La formation d'une mousse persistante après 15 min confirme la présence des saponosides (**Karumi et al., 2004**).

- **Test 2** : 5 ml de l'extrait sont mélangés avec 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. Une couleur rouge-marronne de la couche d'interface indique la présence des triterpènes hétérosidiques (**Edeoga et al., 2005**).

I.3.1.3- Recherche des flavonoïdes

5 ml de l'extrait méthanolique sont traités avec quelques gouttes d' AlCl_3 (1%). La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur jaune (**Benmehdi, 2001**).

I.3.1.4- Recherche des coumarines

L'extrait sec est dissout dans l'eau distillée par chauffage, après refroidissement, la solution obtenue est répartie dans 2 tubes à essai. Le premier sert de témoin et on ajoute 05 ml de NH_4OH 10% dans le 2^{ème} tube. L'apparition d'une fluorescence bleue ou verte à la lampe UV 365 nm indique la présence des coumarines (**Ciulei, 1982; Wagner et Blatt, 1996**).

I.3.1.5- Recherche des composés réducteurs

Ce test est basé sur la réaction de Keller-Kiliani, 5 ml d'acide acétique contenant des quelque fragment de FeCl_3 et 5 ml d'acide sulfurique contenant des fragments de FeCl_3 sont ajoutés à 1 ml de l'extrait. La présence des composés réducteurs est confirmé par la formation de deux phases, une colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique) (**Yrjönen, 2004**).

I.3.1.6- Recherche des alcaloïdes

Ce test est fait pour révéler la présence ou l'absence des alcaloïdes sels 5 ml d' HCl (2N) sont ajoutés à l'extrait et chauffer dans un bain marie. Après la filtration, le filtrat est traité avec le réactif de Wagner (2g de KI et 1,27g d' I_2 solubilisé dans 100 ml d'eau distillée). La présence de turbidité ou de précipitation indique la présence des alcaloïdes sels (**Mohammedi, 2006**).

I.3.2- Identification des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince (CCM)

Cette méthode se repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile qui est en générale un mélange de solvant, adapté au type de séparation recherché, et leur affinité, vis-à-vis la phase stationnaire qui peut être un gel de silice ou de polyamide. Les techniques chromatographiques ne sont pas suffisantes pour identifier un produit mais elles apportent

des renseignements (Rapport frontal-Rf- et coloration) susceptibles d'orienter vers une hypothèse de structures (Wong *et al.*, 2006).

Les analyses par CCM ont été effectuées avec des plaques gel de silice, sur support rigide en aluminium 10/5 cm dont chaque extrait a été déposé à l'aide d'une micropipette (2 µl) à des points repères à 1.5 cm du bord inférieur de la plaque.

Les plaques sont ensuite placées dans les cuves de développement, à environ 0,5 cm de hauteur dans lesquelles se trouve la phase mobile dont trois systèmes de migration différents ont été utilisés selon les extraits :

Extrait Ether de pétrole : CM : Chloroforme /Méthanol (96/ 4).

Extrait Acétate d'éthyle : TAM : Toluène / Acide acétique / Méthanol (50 /30 /10).

Extrait n-Butanolique : CM : chloroforme / méthanol (60/ 40).

Après développement, les plaques sont séchées, puis visualisées séparément par une révélation physique sous lampe UV à 254 nm et 365 nm.

Pour chaque spot on a calculé le facteur de rétention qui est égal à la distance parcourue par le constituant sur la distance parcourue par le solvant et les rapports frontaux des spots, ainsi l'identification des constituants de différents extraits (Vuorela *et al.*, 2005).

I.4- Etude quantitative

I.4.1- Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique FolinCiocalteu selon la méthode de Wong (2006).

I.4.1.1- Principe

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis en utilisant l'essai de Folin-Denis ou généralement Folin Ciocalteu .Ces essais sont basés principalement sur la réduction du réactif acide phosphotungstique phosphomolybdique (réactif Folin) dans une solution alcaline (Vuorela *et al.*, 2005).

Réalisation de l'essai

Le réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué dans l'eau distillée. A partir d'une solution méthanolique mère de:

$C_1 = 0.25$ mg/ml de chaque extrait

ont été diluées: $C_2 = 0.2$ mg/ml, $C_3 = 0.15$ mg/ml, $C_4 = 0.1$ mg/ml, $C_5 = 0.05$ mg/ml.

Brièvement 200 μ l de chaque extrait (dissous dans le méthanol) ont été ajoutés à 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu. Les solutions ont été mélangées et incubés pendant 4 minutes.

Après l'incubation 800 μ l de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (7,5g /l) a été ajoutée .Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 2 heures dans l'obscurité température ambiante. L'absorbance des extraits a été mesurée par un spectrophotomètre à 765 nm.

I.4.1.2- Expression des résultats

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec le standard étalon l'acide gallique (5-200 μ g /ml) et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ g EAG /mg).

I.4.2- Dosage des flavonoïdes

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) cité par **Djeridane (2006)** est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits.

Réalisation de l'essai

Le réactif trichlorure d'aluminium (AlCl_3) est solubilisé dans du méthanol absolu pour avoir une solution de 2 g/ 100 ml. A partir d'une solution méthanolique mère de:

$C_1 = 1$ mg/ml de chaque extrait.

Pour chaque extrait les dilutions suivantes ont été préparées: $C_2= 0.8$ mg/ml, $C_3= 0.6$ mg/ml, $C_4= 0.4$ mg/ml, $C_5= 0.2$ mg/ml.

I.4.2.1- Principe

1ml de chaque extrait et du standard (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables a été ajouté à un volume égal d'une solution d' AlCl_3 (2% dans le

méthanol).Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation.

IV.4.2.2- Expression des résultats

La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax + b$) réalisé par un standard étalon "la quercétine" à différentes concentrations (1.75 40 μ g/ml) dans les mêmes conditions que l'échantillon .Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (μ g EQ/mg).

I.4.3- Évaluation in vitro de l'activité antioxydant

L'activité antioxydant ne doit pas être conclue sur la base d'un seul modèle de test antioxydant et en pratique, plusieurs essais *in vitro* sont menés pour évaluer l'activité antioxydant avec les échantillons d'intérêt. Deux tests différents ont été utilisés pour évaluer l'activité antioxydants des extraits: le test de DPPH (2,2-diphényl-1 -picrylhydrazyl), le test de piégeage du peroxyde d'hydrogène.

I.4.3.1- Test scavenger du radical libre DPPH

Dans cette analyse la capacité anti-oxydante est déterminée par l'activité du balayage des radicaux libres en employant le radical libre stable DPPH (C₁₈H₁₂N₅O₆) qui est l'un des essais principaux employés pour explorer l'utilisation des extraits d'herbes comme antioxydants (**Bastos *et al.*, 2007**).

I.4.3.1.1- Principe

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2.2 diphenyl 1 picrylhydrazyl) (**Figure 12**) de couleur violette se réduit en 2.2 diphenyl 1 picrylhydrazyl de couleur jaune (**Maataoui *et al.*, 2006**). L'activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par (**Lopes-Lutz *et al.*, 2008**).

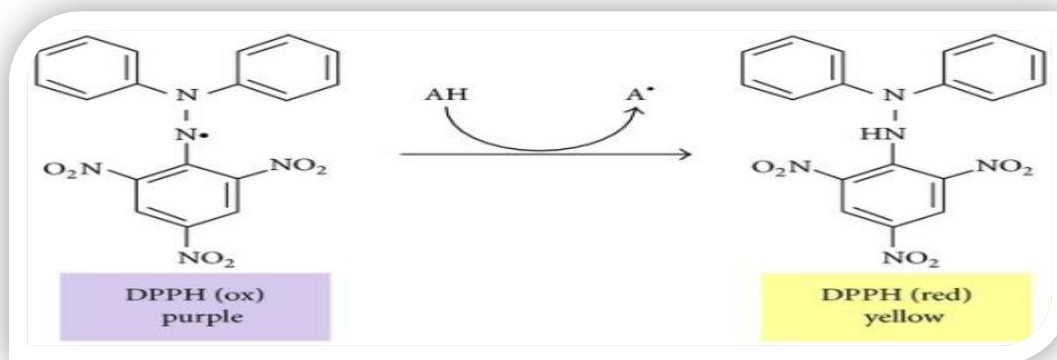


Figure12 : Forme libre réduite du DPPH (Mohammedi, 2006)

I.4.3.1.2- Méthode

Le DPPH est solubilisé dans le méthanol pour avoir une solution de 0,3 mM. Dans des tubes on introduit 15 μ l de chaque extrait (A partir d'une solution méthanolique mère de $C_1=10$ mg/ml de chaque extrait est solubilisé dans le méthanol, les dilutions suivantes ont été préparées : $C_2 = 8$ mg/ml, $C_3 = 6$ mg/ml, $C_4 = 4$ mg/ml, $C_5 = 2$ mg/ml). Et on ajoute 1.5ml de la solution méthanolique au DPPH. Après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

Le contrôle négatif est composé de 1.5 ml de la solution méthanolique de DPPH et de 15 μ l de méthanol. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard qui est l'acide ascorbique.

I.4.3.1.3- L'expression des résultats

En présence d'un antioxydant, l'intensité d'absorption est diminuée et la décoloration résultante est stœchiométrique en ce qui concerne le nombre d'électrons captés (Bastos *et al.*, 2007). Les résultats sont exprimés en tant que l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante (Wang *et al.*, 2006) :

$$I\% = [(Abs\ Control\ négatif - Abs\ Echantillon) / Abs\ Control\ négatif] \times 100$$

La valeur IC 50 est définie comme étant la concentration de l'extrait qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur), les valeurs IC 50 moyennes ont été calculées par les régressions linéaires de trois essais séparés où l'abscisse est représentée par la concentration de l'extrait testé et l'ordonnée par l'activité antioxydante en pourcentage (Mensor *et al.*, 2001).

I.4.3.2- Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est un dérivé non-radicalaire d'oxygène et considéré comme toxique pour les cellules car il permet la formation des radicaux hydroxyles à l'intérieur de la cellule (**Shrinivas et Suresh, 2011**).

I.4.3.2.1- Principe

Une des méthodes les plus communes pour évaluer la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène est basée sur l'absorption de cette molécule dans le domaine de l'UV. Comme la concentration de H₂O₂ diminue par les composés piégeurs, la valeur d'absorbance de ce dernier à 230nm diminue également. Néanmoins il est tout à fait normal que les échantillons absorbent également à cette longueur d'onde, exigeant ainsi l'exécution contre un blanc (**Magalhães et al., 2008**).

I.4.3.2.2- Dosage

Une solution de 10 mM de peroxyde d'hydrogène est préparée dans le tampon phosphate (pH 7,4). Un millilitre d'extrait ou standard à différentes concentrations dans le méthanol est additionné à 2ml solution PBS. L'absorbance est lue après 10 min contre un blanc sans peroxyde d'hydrogène. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard (**Bumrela et Naik, 2011**). Le pourcentage de piégeage (I%) est calculé par la formule suivante :

$$I\% = [(Abs\ contrôle - Abs\ test) / Abs\ contrôle] \times 100$$

I.5- Représentation statistique

Chaque expérience a été répétée deux ou trois fois et les valeurs sont représentées par la moyenne \pm écart type.

Chapitre I.I

Résultats et

Discussion

II. Résultats et discussion

Ce travail expérimental, ayant pour objet l'étude phytochimique et l'évaluation *in vitro* de l'activité anti-oxydante des fractions organiques issues de l'extrait méthanolique brut de la partie aérienne de la plante médicinale «*Artimisia campestris* L.».

II.1- Détermination du rendement d'extraction

- a. L'extrait méthanolique brut (**EMB**) a été préparé à partir de la poudre de la partie aérienne d'*Artimisia campestris* en utilisant la méthode de macération dont le rendement est représenté dans le **tableau 05**.

Tableau 05 : Le rendement d'extrait méthanolique brut (**EMB**) d'*Artimisia campestris*

La plante	Le poids du matériel végétal en (g)	Le poids d'extraction sec en (g)	Le rendement en (%)
<i>Artimisia campestris</i>	300	50	16.66

L'opération de l'extraction du matériel végétal d'*Artimisia campestris* à l'aide du méthanol a permis d'obtenir un résidu sec d'extrait brut de 50 g . Le calcul du rendement en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante (**Tableau 5**) a montré que l'*Artimisia campestris* a fourni un taux d'environ 16.66%. Dans notre étude où l'extraction est réalisée à température ambiante par simple macération qui est une méthode discontinue dont le solvant devrait être remplacée jusqu'à ce que la matière végétale soit épuisée (**Gazi et al., 2004**); donc il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie de manière générale. En effet, le rendement est relatif; il varie en fonction de l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites (de son métabolisme) et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou fractionnement et de sa polarité (**Mohammedi, 2006**).

- b. L'extraction des flavonoïdes de l'*Artimisia campestris* à été effectuée par les solvants organiques via le fractionnement de l'extrait méthanolique brut ; La partition liquide-liquide a permis d'extraire trois fractions : éther de pétrole, acétate d'éthyle et la fraction n-butanolique. Les résultats sont représentés dans le **tableau 06**.

Tableau 06: Le rendement d'extraction (**EEP, EAE, En-Bu**) d'*A. campestris*

La plante	Le poids du matériel végétal en (g)	Abréviation d'extrait	Couleur et aspect d'extrait	Poids d'extraction en (g)	Rendement en (%)
<i>Artemisia campestris</i>	300	EEP	Verdâtre (liquide)	25	8.33
		EAE	Vert (visqueux)	10	3.33
		En-Bu	Marron (consistant)	6	2







L'opération de l'extraction des flavonoïdes à partir du matériel végétal d'*Artemisia campestris* à l'aide des solvants organiques a permis d'obtenir des résidus secs des extraits d'éther de pétrole (25g), d'acétate d'éthyle (10g) et de n-butanolique avec 6g qui correspond respectivement aux rendements 8.33%, 3.33% et 2 %.

Selon **Newman et Markham (1982)**. Les flavonoïdes que pourraient contenir les différentes fractions issue de l'extrait méthanolique seraient comme suit: l'extrait éther de pétrole qui est en générale constitué des flavonoïdes aglycones hautement méthylés, l'acétate d'éthyle est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes aglycones ou flavonoïdes mono O-glycosides et partiellement di-O-glycosides, tandis que le n-butanol est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes les plus polaires (di, tri, et tétra-glycosylés).

II.2- Tests de mise en évidence de certains composés phytochimiques

Le screening phytochimique réalisé sur **EMB** consiste à détecter les différentes familles de composés qui existent dans les feuilles et les tiges d'*Artemisia campestris* par des réactions de précipitation ou de coloration, en utilisant des réactifs spécifiques à chaque famille de composés, les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 07**.

Tableau 07: Résultats des tests phytochimiques des composés constituant l'extrait méthanolique brut d'*Artemisia Campestris*.

Tests phytochimiques		EMB		Observation	
Les saponosides	Test de la mousse	Formation d'une mousse persistante après 15 min			(+)
Les flavonoïdes	AlCl ₃	Apparition d'une coloration jaune			(+)
Les tanins	FeCl ₃	Apparition d'une coloration bleue noire et un précipité après 3 min			(+)
Les composés réducteurs	Acide sulfurique d'acide acétique FeCl ₃	Apparition de 2 phases: brune- rouge et bleue-verte			(+)
Les alcaloïdes	Wagner	Précipitation			(+)
Les coumarines	NH ₄ OH 10%		Présence d'une fluorescence bleue ou verte à la lampe UV		(+)

Les résultats sont interprétés comme suit: (+) Réaction positive, (-) Réaction négative.

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de quelques métabolites secondaire au niveau des tissus végétaux de la plante étudiée.

La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation, un changement de couleur ou un examen sous la lumière ultraviolette.

L'étude phytochimique de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de l'*Artemisia campestris* a montré que cette plante contient des tanins, des saponosides, des flavonoïdes, des alcaloïdes sels, des coumarines et en fin les composés réducteurs ce qui confirme les travaux de **Akrout et ses collaborateurs (2011)**. La richesse de cet extrait en composés chimiques peut expliquer son utilisation traditionnelle pour traiter les troubles digestives, la diarrhée, le rhumatisme,...etc.

II.3- Etude qualitative de la chromatographie sur couche mince par CCM issues de l'extrait méthanolique brut

Le développement de la méthode pour la chromatographie sur couche mince commence non seulement par le choix de la phase mobile de séparation mais aussi le choix de la phase stationnaire, la technique de développement choisie, dimension de la chambre de développement et de l'espace vapeur ont un effet prononcé sur la séparation (**Yrjönen, 2004**).

La CCM nous a permis d'avoir les empreintes flavoniques des différentes fractions issue de l'extrait méthanolique brut seraient comme suit: l'extrait éther de pétrole , l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait n-butanolique de la partie aérienne d'*Artemisia campestris*, l'identification des composés était basée sur la comparaison des R_fs et couleurs observés sous lampe UV des taches apparues sur la plaque en utilisant plusieurs systèmes d'élution de polarité différente.

Suivant la révélation des plaques, les spots ont été visualisés sous une lampe UV à la longueur d'onde 365 nm, dont elle révèle les taches fluorescentes et visible et les **tableaux 8-9-10** résumant les résultats du CCM.

II.3 .1- Composés identifiés dans la fraction éther de pétrole

Tableau 08 : CCM de l'extrait éther de pétrole Système solvant : chloroforme /méthanol (96:4)

Adsorbant : Gel de silice

Couleur sous UV 365 (nm)	Rapport frontal (cm)	Type de flavonoïde possible
Rouge	0.067	Anthocyanidine 3-glycosides
Bleu	0.581	Acide phénol
Bleu	0.797	Acide phénol
Rouge	0.878	Anthocyanidine 3-glycosides

Quatre spots ont été ségrégués des dépôts de l'extrait **éther de pétrole** par le système des solvants utilisés chloroforme/méthanol (96 :4) appartenant aux différentes classes flavoniques (**Figure17 : A**).

II.3 .2- Composés identifiés dans la fraction acétate d'éthyle

Dix spots ont été ségrégués des dépôts de l'extrait d'acétate d'éthyle par le système de solvant utilisé (TAM: Toluène /Acétate d'éthyle/Méthanol (50:30:10)) appartenant aux différentes classes flavoniques (**Figure17 : B**).

Tableau 09 : CCM de l'extrait acétate d'éthyle

Système solvant : Toluène/acétate d'éthyle/Méthanol

(50:30:10)

Adsorbant : Gel de silice

Couleur sous UV 365(nm)	Rapport frontal (cm)	Type de flavonoïde possible
Rouge	0.074	Anthocyanidine 3-glycosides
Bleu Fluorescent	0.246	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones, acide phénol
Pourpre	0.456	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones, chalcones
Bleu	0.617	Flavonols, Acide phénol
Pourpre Sombre	0.679	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones, chalcones
Bleu	0.790	Flavonols, Acide phénol
Rouge	0.839	Anthocyanidine 3-glycosides
Mauve	0.876	Anthocyanidine 3-glycosides
Rouge	0.913	Anthocyanidine 3-glycosides
Mauve	0.962	Anthocyanidine 3-glycosides

II.3 .3- Composés identifiés dans la fraction n-butanolique

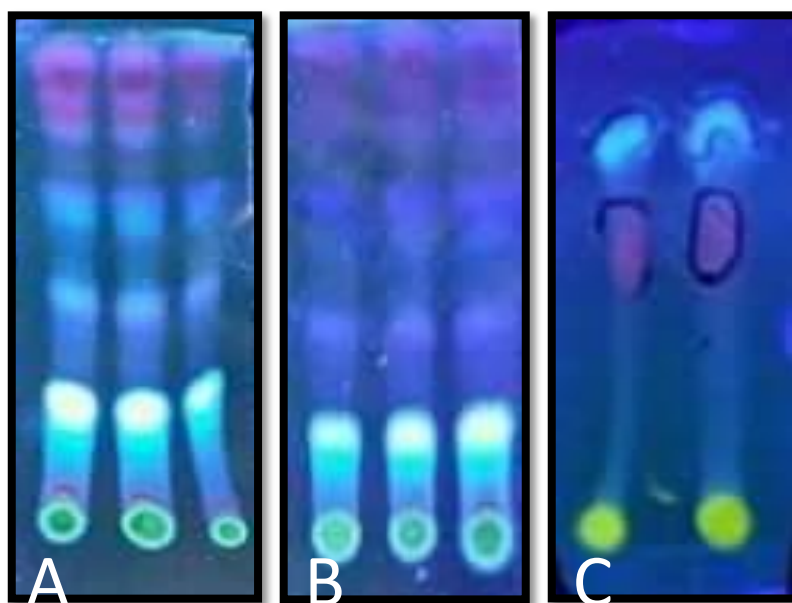
Deux spots de dépôt de l'extrait de n-butanol ont été révélés par le système de solvant utilisé Chloroforme/Méthanol (60 :40) qui font partie des flavonols, flavonones, isoflavone flavanones, acide phénol ou des anthocyanidine 3-glycosides (**Figure17 : C**).

Tableau 10 : CCM de l'extrait n-butanolique

Système solvant : Chloroforme/Méthanol (60:40)

Adsorbant : Gel de silice

Couleur sous UV 365(nm)	Rapport frontal (cm)	Type de flavonoïde possible
Bleu fluorescent	0.642	Flavonols, flavonones, isoflavone flavanones, acide phénol
Rouge	0.929	Anthocyanidine 3-glycosides

**Figure13** : Photos des chromatogrammes résultant de l'analyse des fractions organiques par chromatographie sur gel silice (révélation à UV (365 nm) par les systèmes solvants :

(A) : CM : CM : Chloroforme/Méthanol (96:4),

(B) : TAM : Toluène/Acétate d'éthyle/Méthanol (50:30:10) et

(C) : CM : Chloroforme/Méthanol (60:40)

II.4- Résultats de l'analyse quantitative

II.4.1- Dosage des polyphénols

La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax + b$) réalisée par une solution étalon (l'acide gallique) à différentes concentrations (**Figure 13**).

La teneur en polyphénols totaux de chaque fraction (**Figure 14**) est exprimée en microgrammes équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG /mg}$).

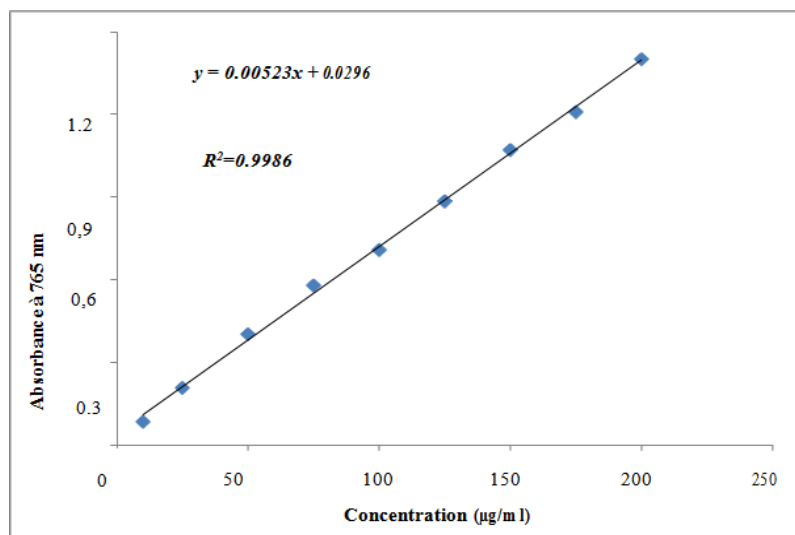


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois mesures).

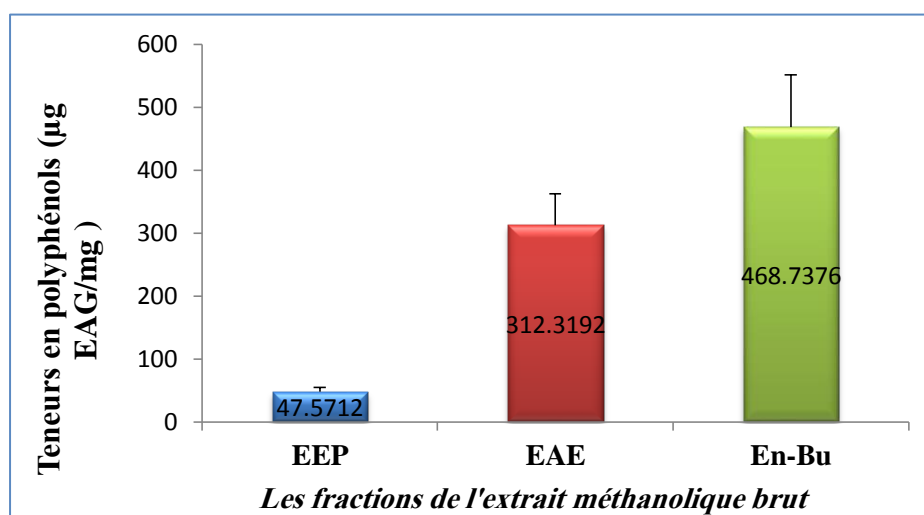


Figure 15 : Histogramme représente la teneur en polyphénols totaux des fractions organiques de l'*Artemisia campestris*.

Le dosage des polyphénols totaux des extraits d'*Artemisia campestris* a été effectué selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols des plantes médicinales et les

nourritures (Blasa *et al.*, 2007). L'acide gallique est le standard le plus souvent employé dans la méthode de Folin-Ciocalteu (Maisutthisakul *et al.*, 2008).

Les résultats du dosage des polyphénols montrent que la fraction n-butanolique est très riche avec une teneur de 468.737 ± 83.049 $\mu\text{g EAG /mg}$, suivi par la fraction acétate d'éthyle qui présente aussi une bonne teneur (312.319 ± 50.119 $\mu\text{g EAG /mg}$), cependant seulement 47.571 ± 7.290 $\mu\text{g EAG /mg}$ d'extrait sont trouvés dans la fraction d'éther de pétrole.

II.4.2- Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes présents dans les fractions organiques de notre plante *Artemisia Campestris* ont été évalués par la méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al.*, 1996) dont la quantification a été fait en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax+b$) réalisée par un standard étalon "la quercétine" à différentes concentrations (1.75-40 $\mu\text{g/ml}$) dans les mêmes conditions que l'échantillon.

La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalents quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait). (Figure 15)

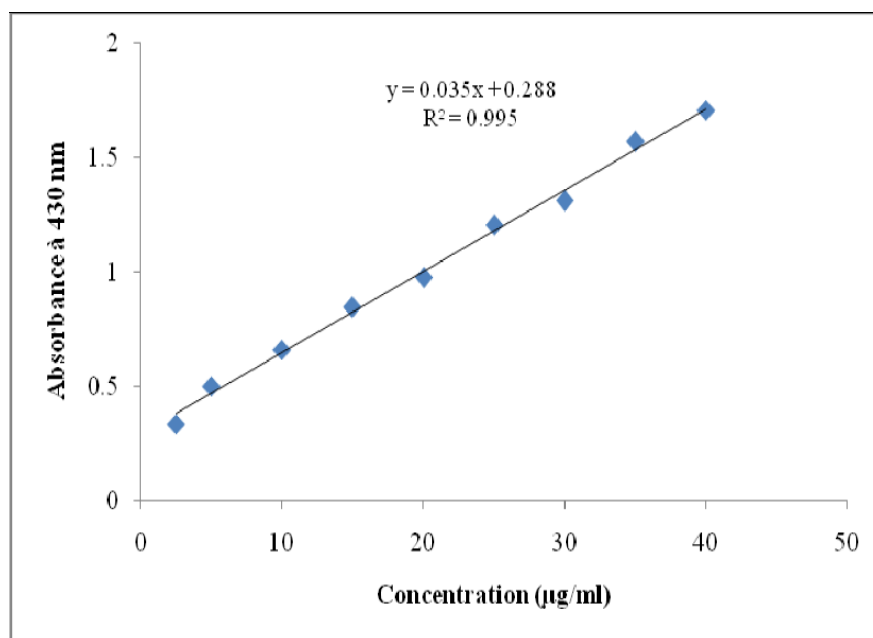


Figure 16 : Courbe d'étalonnage de la quercétine (moyenne \pm SD de trois mesures).

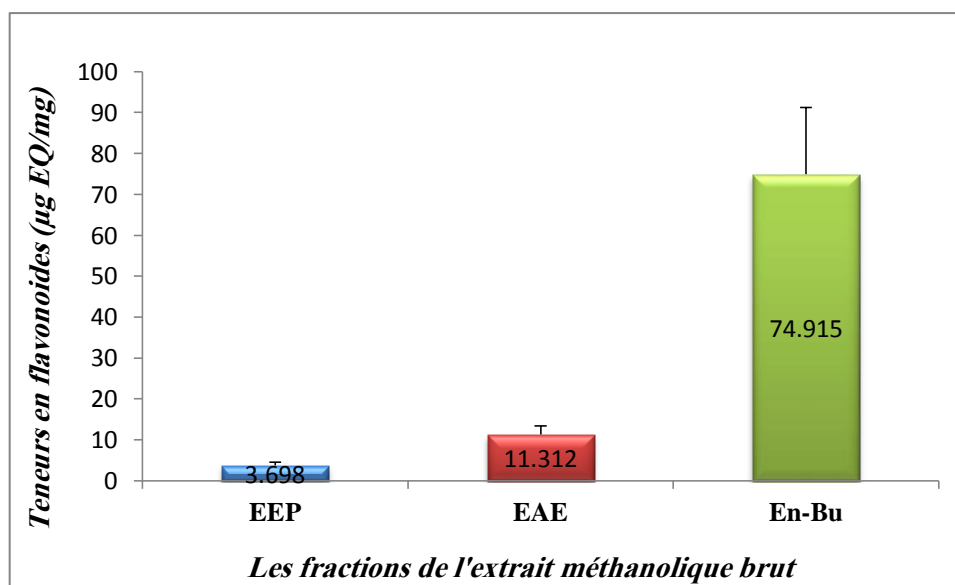


Figure 17 : Histogramme représente la teneur en flavonoïdes des fractions organiques de *l'Artemisia campestris*.

La raison principale pour la quelle on a choisi cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (**Gomez-Caravaca et al., 2006**). La détermination quantitative des flavonoïdes par la méthode du trichlorure révèle une richesse de l'extrait n-butanolique avec un taux de 74.915 ± 16.323 µg EQ/mg d'extrait suivi par l'extrait acétate d'éthyle avec environ 11.312 ± 2.118 µg EQ/mg d'extrait et enfin l'extrait éther de pétrole caractérisé avec la teneur la plus faible en flavonoïdes à raison de 3.698 ± 0.808 µg EQ/mg d'extrait.

Le groupe des composés phénoliques est l'un des groupes ubiquitaires le plus largement distribués chez les végétaux et les antioxydants extraits des plantes sont en majeure partie des composés phénoliques dont les flavonoïdes, les tannins et les acides phénols (**Poblocka-Olech et al., 2016**).

II.5- Résultats de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées expérimentalement pour la détermination *in vitro* de l'activité antioxydante, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres, par exemple : FRAP (Ferric reducing antioxidant power), ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TEAC (Trolox équivalent antioxidant capacity) ou ABTS (2,2-azinobis 3-ethyl-benzothiazoline 6 sulphonate) et DPPH⁺ (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) etc. Il est à indiquer que différentes méthodes donnent des résultats assez

différents et devraient être appliquées préférentiellement pour la comparaison de produits similaires (Georgieva *et al.*, 2010).

II.5.1- Effet scavenger du radical DPPH°

L'activité antioxydante des fractions issues de l'extrait méthanolique brut de l'*Artemisia campestris* vis-à-vis le radical stable DPPH à été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm.

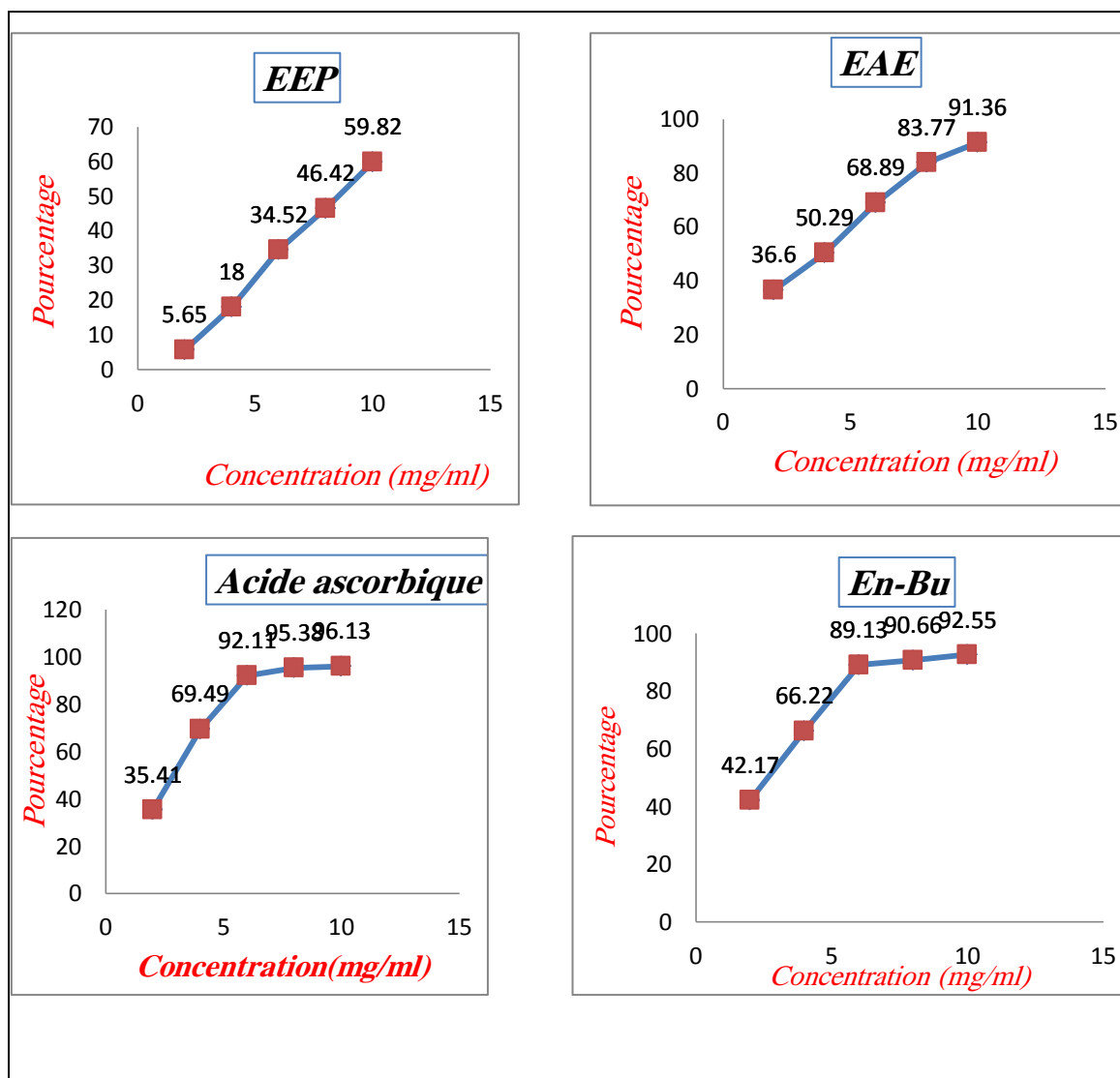


Figure 18: Courbes représentées les pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration des fractions issues de l'EMB d'*A. campestris*.

La valeur d'IC₅₀ (concentration inhibitrice à 50%) est déterminé graphiquement à partir de la courbe [% inhibition = f(Concentration)] dont une valeur faible d'IC₅₀ indique une activité antiradicalaire puissante (**figure 18**).

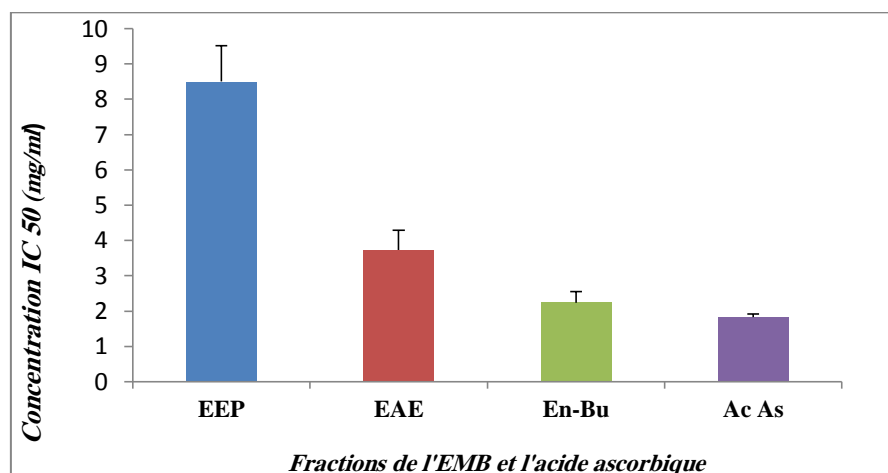


Figure 19: Histogramme représente les concentrations inhibitrices à 50% le radical DPPH^o des fractions issues de l'EMB d'*A. campestris*.

L'activité antiradicalaire par la même façon est mesurée pour l'acide ascorbique, pris comme antioxydant de référence. Ce dernier a manifesté *in vitro* une capacité très puissante sur le radical libre DPPH, justifiée par la valeur IC₅₀ la plus réduite obtenue expérimentalement par cette méthode ($1,824 \pm 0,097$ mg/ml). Ce standard (ac. ascorbique) demeure le piègeur le plus efficace, dirigé contre les radicaux libres dans les systèmes biologiques hydrosolubles.

Nos résultats suggèrent que parmi les trois extraits de l'*Artemisia campestris* ; la fraction butanolique représente l'extrait le plus actif avec une IC₅₀ égale à $2.239 \pm 0,32$ mg/ml comparable à celle du contrôle positif, une activité intermédiaire a été obtenue avec la fraction d'acétate d'éthyle avec une IC₅₀% de $3.735 \pm 0,54$ mg/ml, par contre l'activité antiradicalaire la plus faible a été exprimée par la fraction de l'éther de pétrole ($8.503 \pm 1,02$ mg/ml) qui est 4 fois moins active par rapport à la fraction butanolique.

Le DPPH est un radical libre stable, accepte un électron ou un proton pour donner une molécule diamagnétique stable. Il est très utilisé dans le criblage des activités de piégeage des radicaux libres. Dans cet essai les antioxydants réduisent et décolorent le radical DPPH, à un composé jaune le diphenyl picryl hydrazine, l'ampleur de la réaction dépendra de la capacité des antioxydants de donner l'hydrogène (**Ardestani et al.**,

2007). Le degré de décoloration exprime le potentiel de piégeage de l'antioxydant. Les terpèneoïdes, flavonoïdes, alcaloïdes et les tannins sont considérés comme des substances potentiellement antioxydantes. Ce pendant, la présence de ces substances indique que nos fractions sont dotées d'une activité antioxydante. Les piègeurs les plus efficaces du radical libre DPPH sont ceux possédant les valeurs IC50 les plus basses (Markowicz *et al.*, 2007).

Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant (Tsimogiannis and Oreopoulou, 2006; Kouri *et al.*, 2007). Quelques composés se réagissent très vite avec le DPPH en réduisant un nombre de molécules de DPPH égal à celui des groupements hydroxyles de l'antioxydant (Bondet *et al.*, 1997). L'effet scavenger des flavonoïdes sur les radicaux libres dépend de la présence des groupements OH libres, en particulier 3-OH, avec une configuration 3',4'-orthodihydroxy (Heim *et al.*, 2002).

II.5.2- Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène

Les résultats de l'activité antioxydant tracent dans la **figure19** et expriment la capacité de détoxification *in vitro* du peroxyde d'hydrogène par les échantillons et l'acide ascorbique comme étant un contrôle positif. Cette molécule très réactive est un générateur de dérivés oxygénés très toxiques tel que le radical hydroxyle.

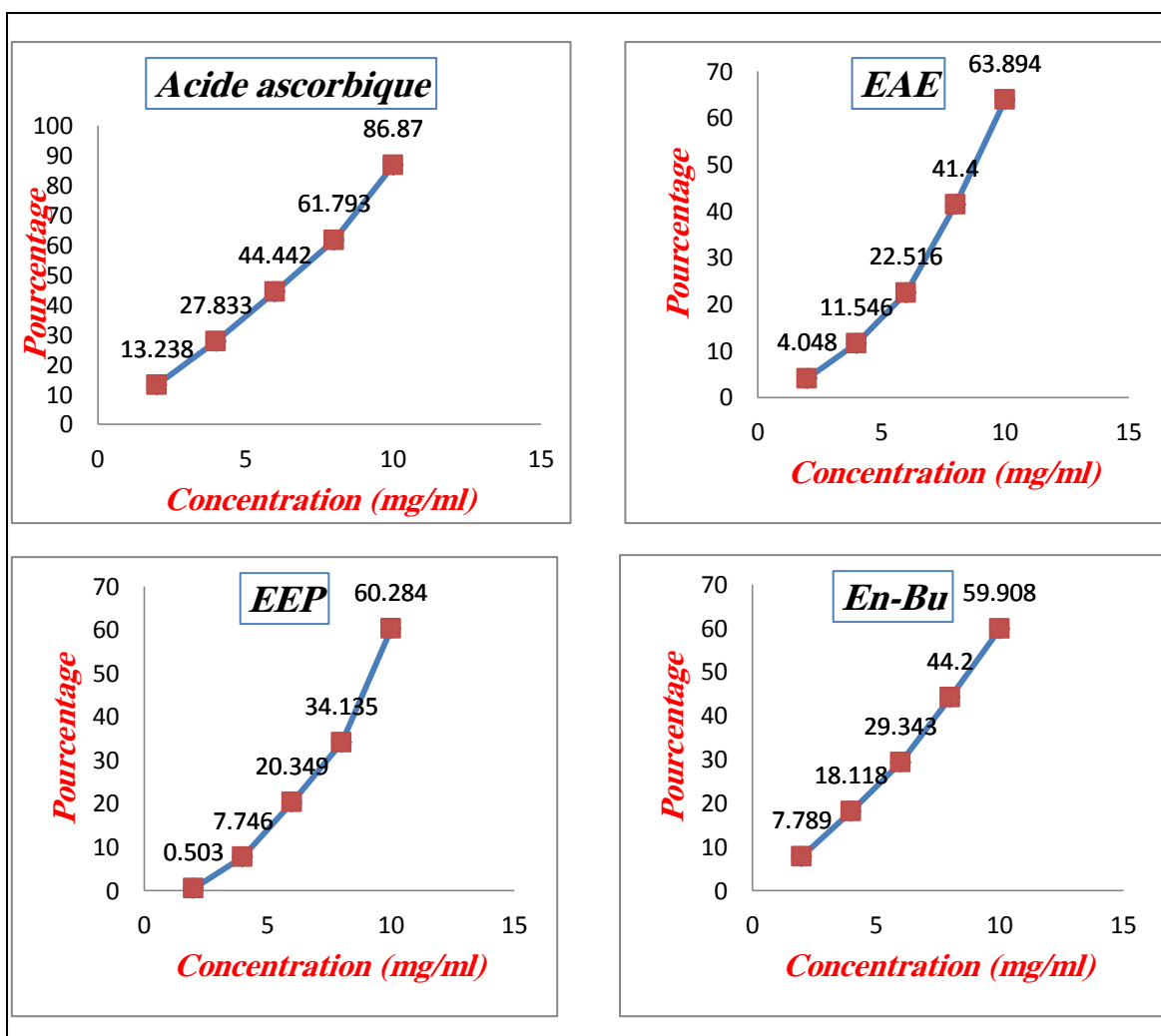


Figure 20: Courbes représentes les pourcentage d'inhibition du radical H_2O_2 en fonction de la concentration des fractions issues de l'EMB d'*A. campestris*.

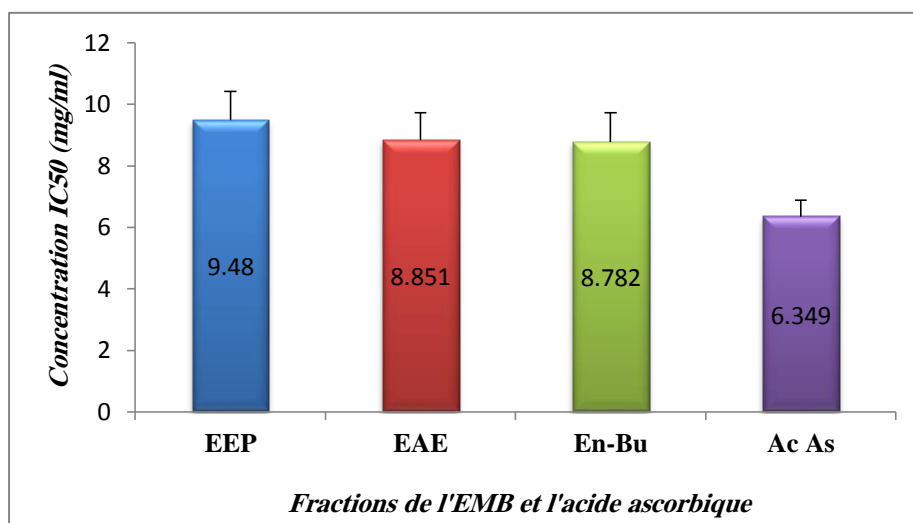


Figure 21 : Histogramme représente les concentrations inhibitrices à 50% peroxyde d'hydrogène des fractions issues de l'EMB d'*A. campestris*.

Nos résultats indiquent que les trois extraits de l'*Artemisia campestris* présente une activité remarquable vis-à-vis du piégeage du H₂O₂. L'activité antioxydante par la même méthode est mesurée pour l'acide ascorbique, pris comme antioxydant de référence. Ce dernier a manifesté *in vitro* une capacité très puissante sur le peroxyde d'hydrogène, justifiée par la valeur IC₅₀ la plus basse obtenue expérimentalement par cette méthode (6.349±0.54mg/ml).

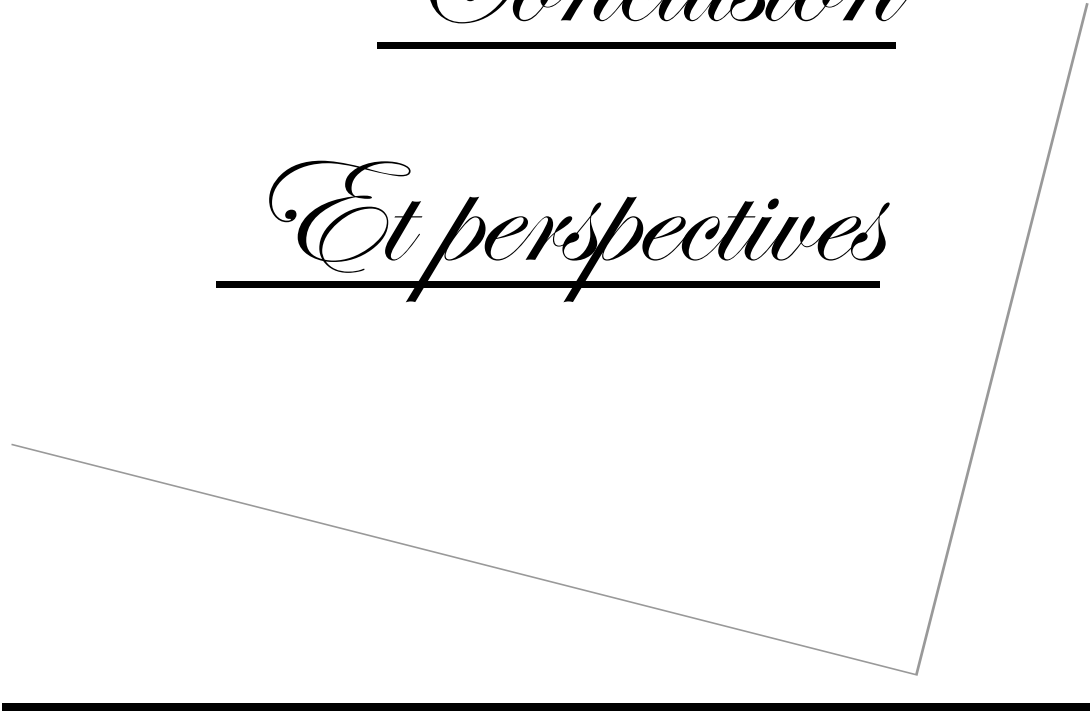
Parmi les trois extraits de l'*Artemisia campestris* l'extrait butanolique représente l'extrait le plus actif avec une IC₅₀ (8.782±0.94 mg/ml), Une activité intermédiaire a été obtenue avec l'extrait d'acétate d'éthyle avec une IC₅₀ de 8.851±0.87 mg/ml d'extrait), par contre l'activité antiradicalaire la plus faible a été exprimée par extrait de l'éther de pétrole IC₅₀ (9.480±0.934mg/ml).

En comparaison avec antioxydant standard (Acide ascorbique), tous les extraits testés s'avèrent actifs.

Le peroxyde d'hydrogène; cette molécule qui n'est pas vraiment très réactive, peut devenir très toxique pour nos cellules en augmentant le taux de l'espèce oxygénée potentiellement toxique par sa haute réactivité, le radical hydroxyl : cette petite molécule est capable d'inactiver directement des enzymes par oxydation des groupements thiols (-SH). L'activité antioxydante dépend des interactions entre les différents antioxydants (**Mohammedi, 2013**).

Conclusion

Et perspectives



Conclusion et perspectives

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et est devenue aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et, d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce et sans effets secondaires. Les extraits naturels issus des plantes contiennent une variété de composés phénoliques auxquelles on attribue un pouvoir antioxydant. Ces molécules naturelles de nature phénolique sont très recherchées en phytothérapie vu les effets secondaires des médicaments et les séquelles néfastes des antioxydants de synthèse à savoir le BHA, le BHT et l'acide ascorbique.

Dans le présent travail, on s'est intéressé à l'investigation phytochimique et l'exploration *in vitro* d'éventuel effet antioxydant des flavonoïdes issus à partir du fractionnement de l'extrait méthanolique brut de la partie aérienne de l'*Artemisia campestris* récoltée de la région de Khenchela, et à la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que:

- ↳ Le screening phytochimique réalisé, a révélé la richesse de notre plante en métabolites secondaires dont nous avons constaté la présence des flavonoïdes, des saponines, des tanins, des alcaloïdes des composés réducteurs et les coumarines. Ainsi, le criblage par la CCM des extraits organiques a révélée la présence des différentes classes flavonoïques susceptibles d'exprimer l'activité recherchée.
- ↳ L'analyse quantitative a dévoilée que la fraction n-butanolique est la plus riche en polyphénols totaux avec une teneur égale à 468.737 ± 83.049 $\mu\text{g EAG /mg}$, suivie par la fraction acétate d'éthyle et celle d'éther de pétrole avec 312.319 ± 50.119 μg et 47.517 ± 7.290 mg EAG /g d'extrait respectivement. Cependant, le dosage des flavonoïdes révélant une concentration de $74,91 \pm 16,32$ $\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait pour la fraction n-butanolique, par la suite, l'extrait acétate d'éthyle avec environ $11,312 \pm 2,648$ $\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait et enfin l'extrait éther de pétrole qui est caractérisé par la teneur la plus faible en flavonoïdes à raison de $3,698 \pm 1,01$ $\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait.
- ↳ L'activité antioxydante des fractions d'*Artemisia campestris* a été évaluée *in vitro* par deux méthodes : la méthode de réduction de radical libre DPPH et le test de piégeage

de peroxyde d'hydrogène; pour le premier test les résultats ont montré que l'oxydation du DPPH est efficacement inhibée par l'extrait n-butanolique avec une IC50 égale à $2.239 \pm 0,32$ mg/ml comparable à celle du contrôle positif : acide ascorbique ($1,824 \pm 0,097$ mg/ml). Même ces résultats sont remarquables avec la neutralisation de peroxyde d'hydrogène dont l'extrait butanolique exprime la concentration IC50% la plus basse par rapport aux autres fractions à savoir 8.782 ± 0.94 mg/ml.

- ↳ L'activité antiradicalaire obtenue est dépendante de la teneur en polyphénols totaux et celle en flavonoïdes.

À la suite de ces résultats, il serait donc intéressant d'étendre l'éventail des tests antioxydants ainsi que l'isolement et la caractérisation des composés actifs dans nos fractions par l'HPLC et la RMN en vue d'identifier les principes actifs responsables des différentes activités biologiques de cette plante. L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur l'activité antioxydante.

Références

Bibliographiques

- Abderrazak, M., Joël, R. (2007).** La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. 177p.
- Adly, A. (2010).** Oxidative Stress and Disease: An Up dated Review. Research Journal of Immunology. 3: 129-145.
- Ahmet, I., Anis, I., Malik, A., Nawaz, S.A., Choudhary, M.I. (2003).** Cholinesterase inhibitory constituents from *Onosmodium hispidum*. Chem. Pharmaceut. Bull. 51(4):412-414.
- Akrout, A., Chemli, R.C., Chrief., and Hammami, M. (2001).** Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. J. Flavour Fragr. 16: 337-39.
- Akrout, A., Gonzalez, L. A., El Jani, H., and Madrid, P. C. (2011).** Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*. 49(2):342-347.
- Amrani, R. (2012).** Etude comparative des composés phénoliques et étude du pouvoir antioxydant de quelque variété de dattes d'Algérie, master académique, université d'Ouargla. Pp 110-111.
- Angelos, M. G., Kutala, V. K., Torres, C. A., He, G., Stoner, J. D., Mohammad, M., and Kuppusamy, P. (2006).** Hypoxic reperfusion of the ischemic heart and oxygen radical generation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 59(1):341.
- Aniya, Y., Shimabukuro, M., Shimoji, M., Kohatsu, M., Gyamfi, M.A., and Miyagi, C. (2000).** Antioxidant and hepatoprotective actions of the medicinal herb *Artemisia campestris* from the Okinawa Islands. J. Biol. Pharm. Bull. 23(3):309–312.
- Antwerpe, P.V. (2006).** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système Myeloperoxydase / Peroxyde d'hydrogène / Chlorure. Thèse de doctorat. Université libre de Bruxelles. Pp 3-5.
- Ardestani, A., and Yazdanparast, R. (2007).** Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. Food Chem. 104: 21-29.
- Ardestani, A., Lautz, D. B., and Tavakkolizadeh, A. (2011).** Band revision versus Roux-en-Y gastric bypass conversion as salvage operation after laparoscopic adjustable gastric banding. *Surgery for Obesity and Related Diseases*. 7(1):33-37.
- Ashok, B., Ali, R. (1999).** The aging paradox: free radical theory of aging. Exp Gerontol. 34: 293–303.

- Babar-Ali, M., Hahn, E.J., Paek, K.Y. (2007).** Methyl Jasmonate and Salicylic Acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. Pp 607-621.
- Badiaga, S., Botelho-Nevers, E., Cassir, N., Minodier, P., Laporte, R., Gautret, P., and Brouqui, P. (2011).** Measles among healthcare workers: a potential for nosocomial outbreaks. *Euro Surveill.* 16(2):19764.
- Bahorun, T. (1997).** Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and agricultural research council, Réduit, Mauritius. Pp 83-94.
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., ... and Pinkas, M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-forschung.* 46(11):1086-1089.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., and Funkel, T. (2005).** Mitochondria, oxidants and aging cell. 120: 483-495.
- Barlow, S.M. (1990).** Toxicological aspects of antioxidant used as food additives. Ed. Hudson, B.J.F, Food antioxidants. Pp 253-307.
- Bartosz, G. (2003).** Generation of reactive oxygen species in biological systems. Comments on Toxicology. Pp 9-21.
- Bastos, D. H., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A., Cunha, I. B., Carvalho, P. O., and Eberlin, M. N. (2007).** Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba maté (*Ilexparaguariensis*) and green tea (*Cameliasinensis*) extracts. *Molecules.* 12(3):423-432.
- Belfadel, A. (2013).** Etude phytochimique et évaluation in vitro de l'activité antibactérienne de la partie aérienne de la plante médicinale (*Rutamontana*). Mémoire de master en microbiologie, Université Abbès Laghroue Khenchela. Pp 1-4.
- Ben Sassi, A., Harzallah-Skhiri, F., and Aouni, M. (2007).** Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. *J. Pharmaco. Bio.* 45(5):421-428.
- Benkiki, N. (2006).** Etudes phytochimique des plantes médicinales Algériennes, ruta monta matricaria, pubescens et hypericumperfoliatien. Pp7-8.
- Benmehdi, A. (2001).** Identification des principes actifs des extraits des plantes médicinales. *Phytochimie.* 6: 11-27.

- Berger, C., Song, Z., Li, X., Wu, X., Brown, N., Naud, C., and Conrad, E. H. (2006).** Electronic confinement and coherence in patterned epitaxial graphene. *Science*. 312(5777):1191-1196.
- Bérubé-Gagnon, J. (2006)** Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables. Quebec.
- Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, M. P., and Piatti, E. (2007).** Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. *Food Chemistry*. 104(4):1635-1640.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., and Berset, C. (1997).** Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. *LWT-Food Science and Technology*. 30(6):609-615.
- Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Delattre, J. (2003)** Radicaux libres et anti-oxydants. In : Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires. Médecine-sciences. Flammarion (Ed). Paris, pp 59-81.
- Boubelli, S. (2009).** Identification et mise en évidence des formations hydrogéologiques de la wilaya de Khenchela (Nord-Est algérien). Analyse et synthèse de données. Mémoire de Magister, Université Badji Mokhtar-Annaba.
- Bouloux, M. (2000).** Les alcaloïdes dosage de la quinine dans les écorces de quinquina, travaux pratiques de chimie végétale. Pp 1-2.
- Boveris, A., Oshino, N., and Chance, B. (1972).** The cellular production of hydrogen peroxyde *Biochem J*. Pp 128-617.
- Boyd, B., Ford, C., Koepke, M.C., Gary, K., Horn, E., McAnalley, S., et McAnalley B. (2003).** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *Glyco Science and Nutrition*. 4(6):17-20.
- Bruneton, J. (1993).** Pharmacognosie, phytochimie Plantes médicinales, technique et documentation. Lavoisier. Paris. 2: 266- 275.
- Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie Phytochimie plantes médicinales. 3ème édition, Tec and Doc, Paris. Pp 199-388.
- Bruneton, J. (2009).** J. pharmacopée, photochimie, plantes médicinales, 4ème éd. *Lavoisier, paris*. Pp 366-424.

- Bumrela, S., Naik, S. (2011).** Identification of β -carotene and β -sitosterol in methanolic
- Caratini, R. (1971).** Bordsencyclopedia. Ed Bodas. Belgique. 23: 137-195.
- Chebrouk, F. (2009).** Caractérisations analytiques de quelques composés polyphénoliques et terpéniques issus de la plante *Marrubium deserti* de la région de Ghardaïa. Magister. Université Kasdi Merbah Ouargla.
- Chekir-Ghedira, L., Kilani, S., Ammar, R. B., Bouhlel, I., Abdelwahed, A., Hayder, N., Mahmoud, A. (2005).** Investigation of extracts from (Tunisian) *Cyperus rotundus* as antimutagens and radical scavengers. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 20(3):478-484.
- Ciulei, I. (1982).** Praticalmanuals on the industrial utilization of chemical and aromatic plants, Methodology for analysis of vegetable drugs Ed, ministry of Chemical industry, Bucharest. 67p.
- Crozier, A., Jensen, E., Lean, M. E., and Mc-Donald, M. S. (1997).** Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 761(1-2):315-321.
- Dacosta, Y. (2003).** Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. 317p.
- Dangles, O., and Brouillard, R. (1994).** Anthocyanin molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging. *Food Chemistry*. 51(4):365-371.
- David, A., Hervé, M. (1994).** Flore du suisse. Ed, Du Griffon Neuchâtel. Suisse. 428p.
- Delattre, J., Beaudoux, J.L., Bonnefont-Rousselot, D. (2005).** Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques. Ed. Tec et Doc, Lavoisier. Paris. 547 p.
- Deshmukh, L., Rode, S., Wagh, P., Thakur, P., and Bandawane, D. (2013).** Oxidative stress and antioxidants in focus: are view. *Inventi Impact: Molecular Pharmacology*.
- Diplok, A.T. (1991).** Antioxydant nutriments and disease prevention: an Overview. *Am J Clin Nutr*.53 (suppl). 189: 150-155.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., and Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*. 97(4):654-660.

- Djeridane, A., Yousfi, M., Najemi, B., Vidal, N., Lesgards, J.F., and Stocker P. (2007).** Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic Compounds and their antioxidant activity .Eur. Food Res. Technol. 224: 801-809.
- Dob, T., Dahmane, D., Berramdane, T., and Chelghoum, C. (2005).** Chemical Composition of the Essential Oil of *Artemisia campestris* L. from Algeria. J. Pharm. Bio. 43(6):512–514.
- Donrop, A.M., Day, N.P. (2007).** The treatment of severe malaria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg . 101: 633-634.
- Edeoga, H. O., Okwu, D. E., and Mbaebie, B. O. (2005).** Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African journal of biotechnology*. 4(7):685-688.
- Effendi, L., Yajun, Y. (2008).** Functional expression of a P₄₅₀ flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli* .Metab.Eng. 8: 172-181.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba,M., Abdelly,C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. C. R. Biologies. 331: 372-379.
- Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G. (2002).** Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition. 18: 872–879.
- Favier, A. (2003).** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Mécanismes biochimiques. L'actualité Chimique. Pp 108-115.
- Ferchichi, L., Merza, J., Landreau, A., Le Ray, A.M., Legseir, B., Seraphin, D., and Richomme, P. (2006).** Occurrence of isocoumarinic and phenolic derivatives in *Artemisia campestris* L. sub sp. *campestris*. Biochem Syst. And Ecol. 34: 829-832.
- Garait, B., Gonsolin, D., Couturier, K., Rondel, S., Novel-Chaté, V., Peltier, S., and Favier, R. (2007).** High dietary sucrose triggers hyperinsulinemia, increases myocardial β -oxidation, reduces glycolytic flux and delays post-ischemic contractile recovery. *Molecular and cellular biochemistry*. 295(1-2):217-228.

- Gazi, M. R., Kanda, K., and Kato, F. (2004).** Optimisation of various cultural conditions on growth and antioxidant activity generation by *Saccharomyces cerevisiae* IFO 2373. *J. Biol. Sci.* 4(2):224-228.
- GEORGIEVA, S., GODJEVARGOVA, T., MITA, D. G., et al. (2010).** Non-isothermal bioremediation of waters polluted by phenol and some of its derivatives by laccase covalently immobilized on polypropylene membranes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66(1):210-218.
- Ghestem, A., Segun, E., Paris, M., Orecchioni, A.M. (2001).** Le préparateur en pharmacie: Botanique-Pharmacognosie Phytothérapie - Homéopathie. La voisier Tec et Doc, Paris. 273p.
- Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2006).** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1220-1234.
- Grace, K., Pereira-Paulo, M., and Donate., and Sergio, E., and Galembeck. (1996).** electronic structure of hydroxylated derivatives of the flavylumcation, *Journal of Molecular Structure (Theochem)*.
- Grotewold, E. (2006).** The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol.Review. Pub Med PMID: 166697.* 57: 761-80.
- Hadi, M. (2004).** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques, Thèse de doctorat en Sciences de Pharmaco chimie. Université Louis Pasteur stras bourg. 1: 13-36.
- Halliwell, B. (1997).** Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev.* 55: 44–49.
- Halliwell, B., and Wiseman, H. (1996).** Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal.* 313(1):17.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1984).** Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1–14.
- Hamadi, N. (2010).** Effet du resveratrol sur les défenses antioxydantes chez les rats rendus diabétiques par l'injection de la streptozotocine, Thèse en vue de l'obtention du diplôme de magistère en biologie cellulaire et moléculaire. Université Mentouri Constantine. Pp 10-20.

- Hamimed, S. (2009).** Caractérisation chimique des principes à effet antidermatophyte des racines *d'Anacycluspyrethrum L.*, mémoire de magister, Université de Mentouri, Constantine. 138p.
- Harman, D. (2000).** Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci.* 928: 1–21.
- Hatano, Y., and Mesbahi, M. (2005).** Agreement over random networks. *IEEE Transactions on Automatic Control.* 50(11):1867-1872.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., and Bobilya, D. J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry.* 13(10):572-584.
- Hopkins, W. (2003).** Physiologie végétale. 2^{ème} édition américaine, de Boeck et Lancier S A, Paris. 514p.
- House, J. I., Knorr, W., Prentice, I. C., and Holland, E. A. (2005).** Long-term sensitivity of soil carbon turnover to warming. *Nature.* 433(7023):298-301.
- Humblet, M.F., Godeau, J.M. (2005).** L'haptoglobine, marqueur protéique de l'inflammation aiguë, dans l'espèce bovine, *Ann. Méd. Vêt.* 149: 20-33.
- Hurabielle, M., and Eberle, J. (1982).** Flavonoids of *Artemisia campestris ssp. glutinosa*. *Planta Med.* 46(2):124–125.
- Jaime, A., Yanez., Preston, K. (2007).** Andrews, Neal M. Davies, Methods of analysis and separation of chiral flavonoids, *Journal of Chromatography B.* 848: 159–181.
- Jerkovic, J., Mastelic, M., Juteau, F., Masotti, V., and Viano, J. (2003).** Chemical variability of *Artemisia vulgaris L.* essential oils originated from the Mediterranean area of France and Croatia *Flavour. Fragr. J.* (18):436–440.
- Joa, O.M., Vasconcelos., Artur, M.S.S., and Jose, A.S.C. (1998).** Chromones and flavones from *Artemisia campestris Sub spMaritima*. *Phytochemistry.* 49(5):1421-1424.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Steven, P. (2002).** Botanique systématique: Une perspective phylogénétique. 1^{ere} Ed : Paris et Bruxelles. Pp 369-384.
- Jungbluth, H., Wallgren-Pettersson, C., and Laporte, J. (2008).** Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet journal of rare diseases.* 3(1):26.
- Juteau, F., Masotti, V., Bessière, J.M., Viano, J. (2002).** Compositional characteristics of the essential oil of *Artemisia campestris var. glutinosa*. *Bioch. Syst. Ecol.* (30):1065-1070.

- Karumi, Y., Onyeyili, P., Ougubuaaja, V. (2004).** Identification of active principles of *M.balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. *J Med Sci.* 4(3):179-182.
- Kasmi, N., Saadaoui, S. (2014).** Étude phytochimique et évaluation de l'activité anti oxydante et anti inflammatoire d'extrait méthanolique de deux plantes médicinales *Rutamontana(Clus.L)* et *Thymus algériensis Boiss.* Mémoire de master en Biochimie appliqué, Université Abbès Laghoure Khenchela, 3p.
- Khanbabae, K., and Ree, T.R. (2001).** Tannins: Classification and Defenition. *Journal of Royal Society of Chemistry.* (cited in Djemai Zoueglache S, 2008). 18: 641-649.
- Knight, T.R., Kurtz, A., Bajt, M.L., Hinson, J.A., Jaeschke, H. (2001).** Vascular and hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen-induced liver in jury: role of mitochondrial oxidant stress. *Toxicol Sci.* 62: 212–220.
- Kouri, G., Sierra, B. D. L. C., and Guzman, M. G. (2007).** Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Archives of virology.* 152(3):533-542.
- Kundan, S., and Anupam S. (2010).** The Genus *Artemisia*: A Comprehensive Review. *J. Pharm. Biol.* Pp1-9.
- Kyeong, W.Y., Anwar, M., and Jong, H.K. (2007).** Effects of the Aqueous Extract from *Artemisia campestris* ssp. *Caudata* on Mycorrhizal Fungi Colonization and Growth of Sand Dune Grasses. *J. Plant. Biology.* 50(3):358-361.
- Lisu, W., Jui, H.Y., Hsiao, L.L., Ming, J.W. (2003).** Antioxydant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifeca* Gertn), *Journal of food and drug analysis,* 11(1):60-61.
- Lopes-Lutz, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., and Kolodziejczyk, P. P. (2008).** Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry.* 69(8):1732-1738.
- Luigia, L., Giuseppe, V. (2006).** Extraction And Identification of anthocyanins from *Smilax aspera* L. berries, *Food Chemistry.* Pp 226–231.
- Lutge, U., Kluge, M., Bauer, G. (2002).** *Botanique 3ème Ed : Technique et documentation.* Lavoisier .Paris. 211p.
- Maataoui, B. S., and Hmyene, A. et Hilali, S. 2006.** Activites anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie *Opuntia ficus indica.* *Lebanese Science Journal,* 7(1): 3-8.

- Mac-Laren, D. (2007).** Advances in sports and exercise scienceseries. Nutrition and Sport. Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F. Elsevier.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., and Lima, J. L. (2008).** Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica chimica acta.* 613(1):1-19.
- Maisuthisakul, P., Pasuk, S., and Ritthiruangdej, P. (2008).** Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *Journal of Food Composition and Analysis.* 21(3):229-240.
- Mansour, R., Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Nygren, K., and Van der Poel, S. (2009).** The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009. *Human Reproduction,* 343p.
- Markham, E.P., John Newman.,** "Phase equilibriums for aqueous solutions of ammonia and carbon dioxide". *Industrial and Engineering Chemistry Process Design and Development* 21. 4(1982):764-770.
- Markowitz, V. M., Ivanova, N. N., Szeto, E., Palaniappan, K., Chu, K., Dalevi, D., ... and Lykidis, A. (2007).** IMG/M: a data management and analysis system for metagenomes. *Nucleic acids research.* 36(1):534-538.
- Memmi, A., Sansa, G., Rjeibi, I., El-ayeb M., Srairi-Abid, N., Bellasfer, Z., and Fekhih, A. (2007).** Use of medicinal plants against scorpionic and ophidianvenoms. *Arch. In st. Pasteur. Tunis.* 84(1-4):49-55.
- Mensor, L. L., Menezes, F. S., Leitão, G. G., Reis, A. S., Santos, T. C., Coube, C. S., and Leitão, S. G. (2001).** Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy research.* 15(2):127-130.
- Meziti, A. (2007).** Activité antioxydant des extraits des graines de *Nigella sativa* L'Etude in vitro et in vivo. Mémoire de Magister Université de Batna. Pp 30-67.
- Mirjalili, M.H., Tabatabaei, S.M.F., Hadian, J., Nejad, S.E., and Sonboli, A. (2007).** Phenological Variation of the essential oil of *Artemisia scoparia* from Iran. *J. Essent. Oil Res.* 19: 326–329.

- Mohammedi, Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de Magister. Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen. 105p
- MOHAMMEDI, Z. (2013).** *Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie* (Doctoral dissertation).
- Morel, Y., and Baronki, R. (1999).** Repression of gene expression by oxidative Stress. *Biochem J* 342 Pt. 3: 481-496.
- Mucciarelli, M., and Maffei, M. (2002).** *Artemisia: Introduction to the Genus* Ed Colin W.W. in Taylor and Francis. Ed. London and New York. 18: 10-16.
- Nadia, Z. (2009).** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne, Mémoire de magister (Ecole doctorale) de Biotechnologie végétale. Université Mentouri Constantine. Pp 17-32.
- Naili, M.B., Alghazeer, O.A., Saleh, N.A., Al-Najjar, A.Y. (2010).** Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arab. J. Chem.* 3: 79–84.
- Okuda, K., Nakashima, T., Kojiro, M., Jimi, A., Yamaguchi, R., Sakamoto, K., and Ikari, T. (1983).** Pathology of hepatocellular carcinoma in Japan: 232 consecutive cases autopsied in ten years. *Cancer.* 51(5):863-877.
- Ozenda, P. (1983).** Flore du Sahara Ed : éditions du centre nationale de la recherche scientifique –Paris. 441p.
- Paris, M., Hurabielle, M., and Paris, R. R. (1986).** Abrégé de matière médicale: Monographies (2. partie): plantes actives sur le système nerveux, sur l'appareil digestif, plantes cardiotoniques, plantes antiparasitaires, plantes insecticides, antibiotiques et antitumoraux d'origine végétale. Masson. 2: 256- 266.
- Pastre, J.O. (2005).** Interret de la supplementation en antioxydants dans les aliments des carnivores domestiques. Thèse de doctorat. Université Paul-Sabatier de Toulouse. Pp 14-26.
- Pavela, R. (2009).** Larvicidal effects of some Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Saylarvae (Diptera: Culicidae). *J. Parasitol Res.* 105: 887–892.

- Peronny, S. (2005).** La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta). Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle. Discipline Eco-Ethologie . 151p.
- Pincemail, j., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, j.O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense anti-oxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*. 16: 233-239.
- Poblocka-Olech, L., Glód, D., Żebrowska, M. E., Sznitowska, M., and Krauze-Baranowska, M. (2016).** TLC determination of flavonoids from different cultivars of *Allium cepa* and *Allium ascalonicum*. *Acta pharmaceutica*, 66(4):543-554.
- Portes, A., and Fernández-Kelly, P. (2008).** No margin for error: Educational and occupational achievement among disadvantaged children of immigrants. *The Annals of the American Academy of Political and Social Science*. 620(1):12-36.
- Powers, S. K., and Jackson, M. J. (2008).** Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*. 88(4):1243-1276.
- Queiroz-Monici, K.S., Costa, G.E.A., Da-Silva, N., Reis, S.M.P.M., et De-Oliveira, A.C., (2005).** Bifidogenic effect of dietary fiber and resistant starch from leguminous on the intestinal microbiota of rats. *Nutrition*. 21:602-609.
- Quezel., Santa. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie. Ed : éditions du centre national de la recherche scientifique . Paris. Tome I. 990p.
- Rauter, A.P., Branco, I., Tostao, Z., Pais, M.S., Gonzalez, A.G., et Bermejo, J.B. (1989).** Flavonoids from *Artemisia campestris* Sub sp *Maritima*. *Phytochemistry*. 28(8):2173-2175.

Références bibliographiques

- Rehab, A., Agag, T., Akelah, A., and Mostafa, S. (2012).** Flexible polybenzoxazine thermosets containing pendent aliphatic chains. *Polymer International*. 61(1):124-128.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. (1996).** Antioxidant activities of flavonoids as bioactive Radical Research. 22: 375-383.
- Roberts, R.A., Smith, R.A., and Safe, S. (2010).** Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. *Toxicology*. 276: 285-94.

Romero, M.R., Efferth, T., Serrano, M.A., Castano, B., Macias, R.I., Briz, O., and Marin, J. (2005). Effect of artemisinin artesunate as inhibitors of hepatitis B virus production in an “invitro” system. *Antivir Res.* 68: 75-83.

Saihi, R. (2011). Étude phytochimique, extraction des produits actifs de la plante *Artemisia campestris* de la région de Djelfa. Mise en évidence de l'activité biologique, mémoire de magister, Université d'Oran, Oran. 76p.

Saoudi, M., Allagui, M.S., Abdel-mouleh, A., Jamoussi, K., and El-Feki, A. (2010). Protective effects of aqueous extract of *Artemisia capestris* a gains tpufferfishlagocephalus extract-inducedoxidative damage in rats. *Exp. Tox. Pathol.* 62: 601–605.

Sayre, L.M., Moreira, P.I., Smith, M.A., and Perry, G. (2008). Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Ann Ist Super Sanità.* 41(2):143-164.

Sefi, M., Fetoui, H., Makni, M., and Najiba-Zeghal, N. (2010). Mitigating effects of Antioxidant properties of *Artemisia campestris* leafextract on hyperlipidemia, advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induceddiabetic rats. *J. Food. Chem. Toxicol.* 48: 1986–1993.

Shrinivas, B., and Suresh, R.N. (2011). Identification of 3-carotene and 3-sitosterol in methanolic extract of *Dipteracanthuspatulus* (Jacq) nees and theirrole in antimicrobial and antioxidant activity. *International Journal of Phytomedicine.* Pp 3-20.

Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M.,Hras, A., Simonic, M and Knez Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chem.* 89: 191-198.

Soulère, L., Viodé, C., Périé, J., and Hoffmann, P. (2002). Selective Inhibition of Fe-versus Cu/Zn- Superoxide Dismutases by 2,3-Dihydroxybenzoic Acid Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 50: 578-582.

Souza, J.A, Vindis, C., Ne`gre-Salvayre, A., Rye, K.A., Couturier, M., Therond, P., Chantepie, S., Salvayre, R., Chapman, M.J., and Kontush, A. (2010). Small, dense HDL 3 particle sattenuate apoptosis in endothelial cells: pivotalrole of apolipoproteinA-I. *J Cell Mol Med.* 14: 608–620.

Stamler, J. S., and Slivka, A. (1996). Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutrition Reviews.* 54(1):1-30.

- Stief, T.W. (2003).** The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med Hypoth.* 60: 567–572.
- Stobiecki, M.S., Kerhoas, L., Kachlicki, P., Muth, D., Einhorn, J., and Mueller, B. (2006).** Roeber, Profiling of phenolic glycosidic conjugates in leaves of *Arabidopsis thaliana* using LC/MS, *Metabolomics*. Pp 197-219.
- Su, Y. C., Ho, C. L., and Wang, E. I. (2006).** Analysis of leaf essential oils from the indigenous ve conifers of Taiwan. *Flavour and fragrance journal.* 21(3):447-452.
- Tadeg, H., Mohammed, E., Asres, K., and Gebre-Mariam, T. (2005).** Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. *Journal of ethnopharmacology.* 100(1):168-175.
- Therond, P. (2006).** Oxidative stress and damages to biomolecules (lipids, proteins, DNA). *Ann Pharm Fr.* 64(6):383-9.
- Tirichine, H. (2010).** Etude ethnobotanique, activité antioxydant et analyse phytochimique de quelques cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) du Sud-Est algérien. Mémoire de master en Ecophysiologie végétale, Université d'Oran. 14p.
- Tsimogiannis, D., Stavrakaki, M., and Oreopoulou, V. (2006).** Isolation and characterisation of antioxidant components from oregano (*Origanum heracleoticum*). *International journal of food science and technology.* 41(1):39-48.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology.* 552(2):335-344.
- Valant-Vetschera, K.M., Fischer, R., and Wollenweber, E. (2003).** Exudate flavonoids inspecies of *Artemisia* (Asteraceae-Anthemideae): new results and chemosystematic interpretation. *Biochem. Syst. Ecol.* 31: 487-498.
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., and Mazur, M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions.* 160(1):1-40.
- Vansant, G., Heinloth, A. N., Irwin, R. D., Boorman, G. A., Nettesheim, P., Fannin, R. D., Sieber, S. O. (2004).** Gene expression profiling of rat livers reveals indicators of potential adverse effects. *Toxicological Sciences.* 80(1):193-202.

- Vergely, C., Goirand, F., Ecarnot-Laubriet, A., Renard, C. Moreau, J.C., Guillard, D. (2003).** NF {kappa} B activation in hydrogen peroxide-treated human endothelial cells. *Experi Biol and Med.* 228: 855-865.
- Vernin, G., Merad, O., Vernin, G. M. F., Zamkotsian, R. M., and Parkanyi, C. (1995).** GC-MS analysis of *Artemisia herba alba* Asso essential oils from Algeria. *Developments in Food Science.* 37: 147-205.
- Vivas, N., Nonier, M. F., Pianet, I., de Gaulejac, N. V., and Fouquet, É. (2006).** Proanthocyanidins from *Quercus petraea* and *Q. robur* heartwood: quantification and structures. *Comptes Rendus Chimie.* 9(1):120-126.
- Vuorela, S., Kreander, K., Karonen, M., Nieminen, R., Hämäläinen, M., Galkin, A., Laitinen, L., Salminen, J., Moilanen, E., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P., and Heinonen, M. (2005).** Preclinical evaluation of rapeseed, raspberry, and pine barkphenolics for health related effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53(15):5922-5931.
- Wagner, H., Blatt, S. (1996).** Plant druganalysis: athinlayer chromatography atlas. Springer Science and Business Media. 384p.
- Wichtl, M., Anton, R. (2009).** Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Édition LAVOISIR, Paris. Pp 38- 41.
- Wiernsperger, N.F. (2003).** Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab.* 29: 579-85.
- Wolin, M.S. (1996).** Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. *Microcirculation.* 3(1):1-17.
- Wolin, M.S., Ahmad, M., Gupte, S.A. (2005).** Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing mechanisms: basic concepts, current controversies, and potential importance of cytosolic NADPH. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 289(2):159-173.
- Wong, C. C., Li, H. B., Cheng, K. W., and Chen, F. (2006).** Systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. 12: 120-130.
- Xie, D. Y., and Dixon, R. A. (2005).** Proanthocyanidin biosynthesis—still more questions than answers. *Phytochemistry.* 66(18):2127-2144.

Yrjönen, T. (2004). Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural products .Dissertationes, Biocentri Viikki Universitatis Helsingiensis. Pp 32-64.

Yu, R., Mandlekar, S., and Kong, A. N. T. (2000). Molecular mechanisms of butylated hydroxyanisole-induced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c. *Molecular pharmacology*. 58(2):431-437.

Annexe



ANNEXE 01: Préparation du tompon phosphate

Réactifs

Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Eau distillée

Principe

On dissous 0.464g de NaH_2PO_4 et 0.870g de Na_2HPO_4 dans un litre d'eau distillée. On confirmé que le PH de la solution égal a sept par un PH mètre.

ANNEXE 02: Appareillage



Spectrophotomètre



Vortex



Balance analytique



Rotavapor



Chambre UV

Noms et prénoms : OUANNES NASSIMA BOUMAARAFI SABAH	Date de soutenance : 28/6/2017
Master: Biochimie Appliquée	
<p style="text-align: center;">Thème</p> <p style="text-align: center;">Investigation phytochimique et étude -in vitro- de l'activité antioxydante de la plante médicinale de la région de Khenchela <i>(Artemisia campestris L)</i></p>	
<p style="text-align: center;">Résumé</p> <p>L'objectif de cette étude est l'investigation phytochimique et l'évaluation <i>in vitro</i> du pouvoir antioxydant des fractions organiques de l'extrait méthanolique brut d'une plante médicinale de la pharmacopée traditionnelle, récoltée de la région de Khenchela (<i>Artemisia campestris L</i>).</p> <p>Le screening phytochimique réalisé, a révélé la richesse de notre plante en métabolites secondaires dont nous avons constaté la présence des flavonoïdes, des saponines, des tanins, des alcaloïdes, des composés réducteurs et les coumarines.</p> <p>Ainsi, l'étude qualitative par CCM des extraits organiques a révélée une diversité remarquable des composés flavonoïques susceptibles d'exprimer l'activité recherchée.</p> <p>L'analyse quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes par le réactif du Folin-Ciocalcu et par la méthode du trichlorure d'aluminium respectivement, a dévoilé la richesse de la fraction n-butanolique par rapport à celles d'acétate d'éthyle et d'éther de pétrole en polyphénols et flavonoïdes avec des teneurs égaux à $468.737 \pm 83.049 \mu\text{g EAG /mg}$ et $74,91 \pm 16,32 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait respectivement.</p> <p>L'activité antioxydante obtenue a été évaluée <i>in vitro</i> via deux méthodes : la méthode de réduction de radical libre DPPH et le test de piégeage de peroxyde d'hydrogène; Cependant, l'oxydation du DPPH est efficacement inhibée par l'extrait n-butanolique avec une IC50 égale à $2.239 \pm 0,32 \text{mg/ml}$ qui est comparable à celle du contrôle positif : acide ascorbique ($1,824 \pm 0,097 \text{mg/ml}$). Même ces résultats sont remarquables avec la neutralisation de peroxyde d'hydrogène dont l'extrait butanolique exprime la concentration IC50% la plus basse par rapport aux autres fractions à savoir $8.782 \pm 0.94 \text{mg/ml}$, notons que l'activité antiradicalaire obtenue est dépendante de la teneur en polyphénols totaux et celle en flavonoïdes.</p> <p>En conclusion; L'<i>Artemisia campestris L</i> est doué d'une activité antioxydante remarquable. De ce fait, il peut constituer une ressource naturelle afin d'atténuer les complications du stress oxydant associé ou déclenchant d'autres maladies.</p>	
Mots clés : Activité antioxydante, <i>Artemisia campestris</i> , CCM, DPPH, flavonoïdes, peroxyde d'hydrogène.	