



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

**MEMOIRE**

*Présenté pour l'obtention du diplôme de*

**Master académique**

**FILIERE : BIOLOGIE**

**OPTION: BIOCHIMIE APPLIQUEE**

**Thème :**

**Etude de L'activité antioxydante des extraits  
de la plante : *Alchemilla vulgaris* L**

**Présenté par :**

- MANSOURI Belgacem

- DJEMEL Rafika

**soutenu le : 04 /07/2017**

**Jury de soutenance :**

Encadreur : Mme. ARAB Yasmin M.A.B Université Abbès Laghrou\_Khenchela

Président : Mr. MAAMAR Hichem M.C.B Université Abbès Laghrou Khenchela

Examineur Mr. BOUSSAA Abdelhalim M.A.A Université Abbès Laghrou Khenchela

**Promotion : Juin 2016 /2017**

## Remerciments

*Nous remercions tout d'abord ALLAH tout puissant de m'avoir donné la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce mémoire.*

*Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué notre promotrice Mme Arab Yasmín, qu'a accepté de nous encadrer, nous le remercions infiniment pour son aide, ses orientation, sa patience et sa correction sérieuse de ce travail.*

*Nous adressons nos plus sincères remerciements à Mr Maamar Hichem, Maître Assistant à l'université Abbès Laghrour d'avoir accepter de présider le jury.*

*Nous offrons nos plus sincères remerciements à l'examineur Mr Boussaa Abdelhalim pour ses précieuses remarques qui nous a permet de corriger ce travail et pour l'assistance par des conseils objectifs et éclairés.*

*Nous remercions tous nos enseignants, pour leur patience et tous les efforts et leurs conseils pendant nos études, et nous remercions nos collègues de promotion 2 ème Biochimie appliquée (2016-2017).*

Dédicace

*Je dédie cette thèse*

*À ma femme,*

*À mes sœurs et mes frères,*

*À mes enfants : Haroune, Kawthar et Takwa*

*À mes proches amis : Aissa, Hamza, Karim, Mahmoud, Farid*

*À toute ma famille, proche ou éloignée*

*À tous les collègues de biologie*

*Belgacem*

*Dédicace*

*Je dédie cette thèse*

*À ma mère,*

*À ma sœur et mes frères,*

*À l'esprit de mon cher oncle **Lahmari Lambarek***

*À Mohamed Massil, Omar Youghorta, Djanna*

*À toute ma famille, proche ou éloignée*

*Rafika*

**Antioxidant activity's study of polyphenols isolated from *Alchemilla vulgaris L***

**Abstract**

We are interested by studying the antioxidant power of flavonic extracts of *Alchemilla vulgaris*: a plant of the Rosaceae family.

The first stage of this work is extraction of phenolic compounds then, using two solvents n-butanol and the ethyl acetate , the quantification of the total phenol contents through using the Folin-Ciocalteu reagent and flavonoids by aluminum trichloride.

The proportion of polyphenols ( **$41.1 \pm 0.009$  mg EAG / mg E**) and flavonoids ( **$4.22 \pm 0.017$  mg EAQ / mg E**) of the methanolic phase is high compared to ethyl acetate and n-butanol.

The results obtained from the study according to the DPPH ( **IC<sub>50</sub> of extract méthanolic= 20.78, acétate of éthyle = 10.50 , of n-butanol = 12.42, of acide ascorbique=15.16**) method allowed us to state that all the extracts revealed inhibitory responses at different levels of trapping the free radicals of DPPH. The acetate fractions Ethyl and butanol are the best free radical sensors than the methanolic extract.

**Key words:** *Alchemilla vulgaris* l, polyphenol, flavonoids, antioxidant activity.

## الدراسة المخبرية للنشاط المضاد للأكسدة للعديد الفينول معزول من نبات عباءة السيدة أو رجل الأسد

## ملخص

في إطار عملنا، إهتمنا بدراسة المركبات الفينولية وتقييم الخصائص المضادة للأكسدة لمستخلصات نبتة *Alchemilla vulgaris l* من عائلة الورديات. وأول خطوة في هذا العمل متمثلة في استخلاص المركبات الفينولية باستعمال مذيبين هما ن-بيوتانول وخلات الإيثيل، بعد ذلك قمنا بالتقدير الكمي للفينولات الكلية بطريقة حمض الفولان والفلافونيدات بطريقة ثلاثي كلوريد الألمونيوم معدل البوليفينول ( $0.009 \pm 41.1$  ملغ / EAG / ملغ E) وفلافونيدات ( $0.017 \pm 4.22$  ملغ / QAR / ملغ E) في مستخلص المثنول مرتفع مقارنة مع معدل مستخلصات خلوات الإيثيل ون-بيوتانول. النتائج المتحصل عليها في هذا العمل: ( $IC_{50}$  بالنسبة لمستخلص الميثانول يساوي 20.78 و بالنسبة لمستخلص خلوات الاثيل تساوي 10.50 و بالنسبة للبيوتانول تساوي 12.42 اما بالنسبة لحمض الاسكوربيك تساوي 15.16 ) أكدت بأن جميع المستخلصات النباتية المدروسة لها خصائص مضادة للأكسدة و مثبطة للجذور الحرة وفقا لطريقة DPPH ، حيث ان مستخلص خلوات الإيثيل وبيوتانول أفضل في تثبيط الجذور الحرة من مستخلص الميثانول.

**كلمات البحث:** *Alchemilla* ، البوليفينول، الفلافونويد، النشاط المضاد للأكسدة.

## Résumé

Dans le cadre de notre travail, nous sommes intéressés à l'étude du pouvoir antioxydant des extraits d'*Alchemilla vulgaris* : une plante de la famille *Rosaceae*.

La première étape de ce travail est l'extraction des composés phénoliques en utilisant deux solvants : *n*-butanol et l'acétate d'éthyle puis la quantification des teneurs en phénols totaux par l'usage de réactif du Folin-Ciocalteu et de flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium.

Le taux des polyphénols (**41.1 ± 0,009 ug EAG/mg E**) et de flavonoïdes (**4.22 ± 0,017 µg EAQ/mg E**) de la phase méthanolique est élevé par rapport à celles d'acétate d'éthyle et de *n*-butanol.

Les résultats obtenus de l'étude de l'activité antioxydante selon la méthode de DPPH ; (**IC50 de l'extrait méthanolique = 20.78, d'acétate d'éthyle = 10.50, de *n*-butanol = 12.42, d'acide ascorbique = 15.16**) nous ont permis d'affirmer que tous les extraits ont révélé des réponses inhibitrices à différents niveaux de piéger les radicaux libres de DPPH aussi, Les fractions d'acétate d'éthyle et de butanol sont les meilleurs capteurs des radicaux libres que l'extrait méthanolique.

**Mots clés:** *Alchemilla vulgaris* l, polyphénole, flavonoïdes, activité antioxydante.

**Liste des Abréviations**

<b>AA</b>	: Acide ascorbique.
<b>AcOET</b>	: Acétate d'éthyle.
<b>AMP</b>	: Adenosine monophosphate.
<b>ATP</b>	: Adénosine triphosphate.
<b>Asc•-</b>	: Radical ascorbyle.
<b>AscH-</b>	: L'ascorbate.
<b>C4H</b>	: Cinnamate 4-hydroxylase.
<b>Cl-</b>	: Anion chlorure.
<b>COX</b>	: Cyclooxygénase.
<b>DPPH</b>	: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.
<b>DOB</b>	: Densité optique du blanc
<b>DOE</b>	: Densité optique d'extrait
<b>EAA</b>	: Equivalents d'acide ascorbique.
<b>EAG</b>	: Equivalent d'acide gallique.
<b>ERO</b>	: Espèces réactives de l'oxygène.
<b>FLO•</b>	: Radical flavoxyle .
<b>GSH</b>	: Glutathion.
<b>H2O2</b>	: Peroxyde d'hydrogène.
<b>HIV</b>	: Human Immunodeficiency Virus.
<b>IC50</b>	: Concentration inhibitrice à 50 %.
<b>iNOS</b>	: Synthase inducteur .
<b>LDL</b>	: Low density lipoprotein.
<b>LOO•</b>	: Radicaux lipidiques peroxydes .
<b>LO•</b>	: Alkoxy.
<b>L•</b>	: Alkyl.
<b>MPO</b>	: Myeloperoxydase.
<b>MDA</b>	: Malonalaldéhyde.
<b>Mg EQ/g</b>	: Milligramme d'équivalent quercétine par gramme du poids sec de la plante.
<b>Ps</b>	
<b>NO•</b>	: Monoxyde d'azote.
<b>NOS</b>	: L'oxyde nitrique synthase .

<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Anion superoxyde.
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	: Oxygène singulet.
<b>*OH</b>	: Radical hydroxyle.
<b>ONOOH</b>	: Nitroperoxyde.
<b>ORAC</b>	: Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène ( <i>Oxygen Radical Absorbance</i> ).
<b>P/P</b>	: Poids sur poids.
<b>PAL</b>	: Phénylalanine ammonia-lyase.
<b>PO•</b>	: Les radicaux intermédiaires phénoxy .
<b>ROO•</b>	: Radical peroxyde.
<b>ROOH</b>	: Peroxydes organiques.
<b>SOD</b>	: L'enzyme superoxyde dismutase.
<b>SH</b>	: Sulfhydryle .
<b>Se-GPx</b>	: Glutathion peroxydase séléno-dépendante.
<b>UV</b>	: Ultraviolet.
<b>α-TH</b>	: l'α- tocophérol .
<b>α-T•</b>	: Radical α-tocophéryle .

**Liste des tableaux**

		<b>Page</b>
<b>Tableau 1</b>	Classification scientifique de <i>l'Alchemilla vulgaris</i> .L.....	<b>6</b>
<b>Tableau2</b>	Les constituants chimiques principaux d' <i>Alchemilla vulgaris</i> .l.....	<b>9</b>
<b>Tableau3</b>	Structure des squelettes des polyphénols.....	<b>12</b>
<b>Tableau4</b>	Rendements des extraits de la plante <i>Alchemilla vulgaris</i> l.....	<b>47</b>
<b>Tableau5</b>	Teneur en polyphénol des extraits méthanolique , acétate d'éthyle et n- butanolique de la plante <i>Alchemilla vulgaris</i> l.....	<b>49</b>
<b>Tableau6</b>	Teneur en flavonoïdes des extraits méthanolique , acétate d'éthyle et n- butanolique de la plante <i>Alchemilla vulgaris</i> l.....	<b>50</b>
<b>Tableau7</b>	les valeurs d'IC50 de différents extraits étudié.....	<b>52</b>

## Liste des figures

	Page
<b>Figure 1</b> <i>Alchemilla</i> .....	3
<b>Figure 2</b> la tige et la feuille d' <i>Alchemilla</i> .....	4
<b>Figure 3</b> les fleurs d' <i>Alchemilla vulgaris</i> .L.....	5
<b>Figure 4</b> les fruits d' <i>Alchemilla vulgaris</i> .L.....	5
<b>Figure 5</b> Exemple d'utilisation d' <i>Alchemilla vulgaris</i> .l.....	8
<b>Figure 6</b> Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate.....	11
<b>Figure 7</b> Structure des anthocyanosides.....	13
<b>Figure 8</b> Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B).....	13
<b>Figure9</b> Structure chimique de base des flavonoïdes.....	16
<b>Figure10</b> Les structures chimiques des principales familles des flavonoïdes.....	10
<b>Figure11</b> Piégeage des espèces réactives dérivées de l'oxygène (R•) par les flavonoïdes et la formation d'une structure stable.....	18
<b>Figure12</b> Critères structuraux essentiels pour avoir une bonne activité antiradicalaire des Flavonoïdes.....	18
<b>Figure13</b> Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques (Me <sup>+n</sup> )..	19
<b>Figure14</b> Principaux compartiments impliqués dans le métabolisme des flavonoïdes	24
<b>Figure15</b> Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques.....	26
<b>Figure16</b> Les caractéristiques structurales des flavonoïdes avec une activité de piégeage des radicaux libres élevée.....	27
<b>Figure17</b> Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées.....	28
<b>Figure18</b> Principales sources endogènes d'espèces réactives oxygénées. GSH-Px: glutathion peroxydase, SOD: superoxyde dismutase.....	30
<b>Figure19</b> Espèces réactives oxygénées et systèmes de protection permettant de limiter leur effet toxique.....	34
<b>Figure20</b> Oligoéléments nécessaires aux activités des enzymes antioxydantes.....	36
<b>Figure21</b> Structures de quelques flavonoles.....	37
<b>Figure22</b> Protocole D'extraction Des Flavonoïdes.....	42
<b>Figure23</b> protocole de dosage des composees phénolique.....	44
<b>Figure24</b> protocole de dosage des flavonoïdes.....	45
<b>Figure25</b> Equation du radical DPPH transformé en DPPHH.....	46

<b>Figure 26</b>	les différents rendements des extraits de la plante <i>Alchemilla vulgaris</i> .....	<b>47</b>
<b>Figure 27</b>	Droite d'étalonnage de l'Acide Gallique ((Moyenne $\pm$ SD de trois essais).	<b>48</b>
<b>Figure 28</b>	Droite d'étalonnage de la quercétine ((Moyenne $\pm$ SD de trois essais).....	<b>49</b>
<b>Figure 29</b>	Changement de l'activité anti-radicalaire des extraits d' <i>Alchemilla vulgaris</i> en fonction de la concentration ( moyenne $\pm$ SD de trois mesure ).	<b>52</b>
<b>Figure 30</b>	Courbe de corrélation entre l'activité antioxydante d'IC50 et la teneur en flavonoïdes des différents extraits.....	<b>54</b>

## Sommaire

Remerciements	
Dédicace	
Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction générale .....	01

### Partie I : Etude bibliographique

---

#### Chapitre I : Présentation de la Plante *l'Alchemilla vulgaris L*

I-Les Rosacées.....	03
II- Le genre <i>Alchemilla</i> .....	03
III- <i>Alchemilla vulgaris. L</i> .....	04
III.1 . Classification.....	06
III.2..Nomenclature.....	06
III.3. Ecologie et répartition géographique.....	06
III.4. Histoire de l'utilisation de <i>l'Alchémille</i> en phytothérapie.....	07
III.5.Parties utilisées.....	07
III.6.Propriétés médicinales de <i>l'Alchemella Vulgaris L</i> .....	07
III.6.1.Utilisation interne.....	07
III.6.2.Utilisation externe.....	08
III.6.3.Indications thérapeutiques usuelles.....	08
III.6.4.Autres indications thérapeutiques démontrées.....	08
III.7. Propriétés biochimiques.....	09

#### Chapitre II. Les composés phénoliques

I-Généralités.....	10
II. Biosynthèse.....	11
III. Classes des polyphénols.....	12
III.1. Anthocyanosides.....	13
III.2. Tannins.....	13
III.2.1. Tannins hydrolysables.....	13
III.2.2.Tannins condensés ou tannins catechiques ou proanthocyanidols.....	14

III.3. Phénols simples et les acides phénoliques.....	14
III.3.1. Acide phénols dérivés de l'acide benzoïque.....	14
III.3.2. Acide phénols dérivés de l'acide cinnamique.....	14
III.3.3. Phénols simples.....	14
III.4. Coumarines.....	14
III.5. Quinones.....	14
III.6. Stilbène.....	15
III.7. Lignanes.....	15
III.8. Les flavonoïdes.....	15
III.8.1. Structure.....	15
III.8.2. Classification.....	16
III.8.3. Localisation et distribution des flavonoïdes.....	17
III.8.4. Propriétés des flavonoïdes.....	17
A / Propriétés antiradicalaires.....	17
B / Propriétés chélatrices des ions métalliques.....	19
C / Propriétés antibactériennes.....	19
D / Propriétés anticancéreuses.....	20
E / Propriétés anti inflammatoires.....	21
F / Propriétés antivirales.....	21
G / Propriétés antiallergiques.....	22
H / Les flavonoïdes sont des produits nutraceutiques.....	22
I / Autres propriétés des flavonoïdes.....	22
III.8.5. Biodisponibilité des flavonoïdes.....	23
<b>Chapitre III : L'activité Antioxydante</b>	
I. Généralités.....	25
II. Activité antioxydante.....	25
II.1. Définition d 'un radical libre .....	25
II.2. Piégeage des radicaux libres.....	25
II.3. Stress oxydant .....	27
II.3.1 Implications pathologiques du stress oxydatif.....	27
II.4. Espèces réactives de l'oxygène.....	28
II.4.1. Production des espèces réactives oxygénées.....	28
II.4.2. Sources des espèces réactives oxygénées.....	30
II.4.3. Conséquences biologiques des espèces réactives oxygénées.....	31

a) Peroxydation lipidique.....	32
b) Oxydation des protéines.....	32
c) Oxydation de l'ADN.....	33
d) Oxydation des glucides.....	33
III. Les antioxydants.....	33
III.1. Antioxydants enzymatiques.....	34
III.2. Antioxydants non enzymatiques.....	35
IV. Méthode d'étude d'activité des antioxydants.....	38

## Partie II : Etude Expérimentale

### Chapitre IV : Matériel et Méthode

I. Matériel végétal.....	40
I.1.Préparation du matériel.....	40
I.2. Appareils et produits chimiques.....	40
II. Préparation des extraits.....	40
II.1. Préparation de l'extrait méthanolique.....	41
II.2.Détermination des rendements d'extractions.....	41
II.3. Méthodes de caractérisation quantitative des polyphénols.....	43
II.3.1. Dosage des polyphénols totaux.....	43
II.3.1.1.Principe.....	43
II.3.1.2.Méthode de dosage.....	43
II.3.2.dosage des flavonoïdes.....	43
II.3.2.1.principe .....	43
II.4. Méthodes de dosage des activités antioxydantes in vitro.....	45
II.4.1. Le test de piégeage du radical DPPH.....	45
II.4.1.1. Principe.....	45
II.4.1.2. Méthode de dosage.....	46
III. Traitement des données .....	46

**Chapitre V : Résultats et Discussion**

I. Détermination de rendement d'extraction.....	<b>47</b>
II. Quantification des composés phénoliques.....	<b>48</b>
II.1 .Dosage des composés phénoliques totaux.....	<b>48</b>
II.2.Teneur des extraits en flavonoïdes.....	<b>49</b>
III.L'étude du pouvoir antioxydant.....	<b>51</b>
Conclusion.....	<b>56</b>

**Références bibliographiques**

**Annexe**

## **Introduction**

Le monde végétal est constitué d'une grande quantité d'espèces. Chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents et d'intérêts variés. Ces derniers sont couramment appelés métabolites secondaires (**Alain et al., 2011**).

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. (**Harrar, 2012**). Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments. L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes (**Harrar, 2012**).

Les polyphénols sont en effet doués de multiples vertus thérapeutiques, ils jouent un rôle très important, principalement, dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires et la peroxydation lipidique. Expliquant de ce fait leur grande utilisation dans la fabrication des médicaments. Ils interviennent aussi dans la protection des plantes contre les différentes attaques microbiennes (surtout fongiques) risquant de causer la perte d'une grande quantité de végétation (**Bruneton, 1999**).

Ce travail est portée sur *L'Alchémilla vulgaris* .l , historiquement, cette plante était présumée faire renaître la virginité. Aujourd'hui, *l'Alchémilla* est toujours couramment employée en médecine populaire pour ses nombreuses propriétés : elle est réputée astringente, anti-inflammatoire et vulnérable. Ces allégations ont pour principale origine une teneur élevée en composés phénoliques (**Alain et al., 2011**).

L'objectif de ce travail est de quantifier les composés phénoliques majoritaires d'extraits *d'Alchemilla vulgaris l* puis d'évaluer leurs activités antioxydantes. Cette dernières n'a pas été abordée par aucun chercheur avant, nous avons pris cette initiative.

Notre travail se répartit donc comme suit :

- Etude botanique sur la plante « *Alchemilla vulgaris l* » (classification, description, et utilisation, .....).
- Étude chimique impliquant la définition, la structure, la classification, la biosynthèse et l'activité biochimique des flavonoïdes.

- Extraction des polyphénols et flavonoïdes contenus dans la plante étudiée.
- Dosage des polyphénole et flavonoides.
- Test de l'activité antioxydant de l'extrait étudié par la méthode DPPH.

**I- Les Rosacées :**

Les *Rosacées* (latin *Rosaceae*) sont une famille qui réunit environ 3370 espèces végétales angiospermes dicotylédones en plus de 100 genres (**Eriksson et al., 2003**). On trouve dans cette famille des plantes *herbacées* vivaces, des grimpantes, des arbustes, et des arbres. Les espèces qui la composent sont soit sauvages (sorbier, aubépine, églantier, ronce, benoîte, reine-des-prés, pimprenelle, etc...), soit fruitières (fraisier, framboisier, poirier, pommier, amandier, etc...), soit ornementales (rosiers, spirées, etc...).

Ce sont des plantes herbacées ou ligneuses, à feuilles alternes, simples ou composées, munies de stipules (pièces foliaires, au nombre de deux, situées de part et d'autre du pétiole, au point d'insertion sur la tige) (**Eriksson et al., 2003**).

**II- Le genre *Alchemilla***

Appartenant à la vaste famille et au genre *Alchemilla*, les alchémilles sont des plantes herbacées vivaces par leur système racinaire, poussant spontanément aussi bien en plaine qu'en montagne, selon les espèces. Ce genre appartient à la famille des Rosacées (**Said, 1980**).

Leur quête de la pierre philosophale, récoltaient les gouttes d'eau recueillies dans les feuilles des alchémilles. 117 variétés dicotylédones sont dénombrées en Europe, dont seulement 11 en France (**Fröhner, 1995**).



**Figure 1. *Alchemilla* (Eriksson et al., 2003).**

**III- *Alchemilla vulgaris*. L**

*Alchemilla vulgaris* L est une plante vivace, glabre ou pubescente, à tige rhizomateuse plus ou moins rameuse, émettant des tiges dressées grêles, à base parfois teintée de rouge, pouvant atteindre 10 cm à 30 cm de haut. Les feuilles basales sont vert-gris ou par endroits vert-brun, réniformes à presque semi-circulaires, d'un diamètre allant généralement jusqu'à 8 cm ou parfois jusqu'à 11 cm; elles comportent 7 à 9 ou 11 lobes et possèdent un long pétiole. Les feuilles caulinaires, de plus petite taille, portent à la base une paire de grandes stipules; elles comportent 5 à 9 lobes et possèdent un pétiole plus court ou sont sessiles. Les feuilles sont fortement pubescentes, notamment sur la face inférieure, et leur bord est grossièrement denté. Les jeunes feuilles sont repliées et présentent une pubescence blanc argenté, les feuilles plus âgées sont légèrement pubescentes et leur face inférieure présente un fin réseau de nervures proéminentes. Le pétiole, vert-gris à vert-jaune, est pubescent, d'un diamètre de 1 mm environ, avec un sillon adaxial. Les fleurs apétales, vert-jaune à vert clair, ont un diamètre de 3 mm environ. Le calice est surmonté d'un calicule à 4 pièces alternant avec 4 sépales de plus grande taille, subaigus à triangulaires. La fleur comporte 4 courtes étamines et un carpelle unique à stigmate capité. La tige creuse, de couleur vert-gris à vert-jaune, est pubescente et présente des sillons plus ou moins longitudinaux (D'Agostino *et al.*, 1998).

**-Caractéristiques de la feuille:**

- disposition: alterne
- forme : palmée
- contour : dentelé
- nervure : palmée



**Figure 2.** la tige et la feuille d'*Alchemilla vulgaris* L.

*L'Alchemilla vulgaris* .L fleurit de mai à juillet en cymes vaporeuses de minuscules fleurs vert anis

Pour obtenir une remontée de la floraison de septembre jusqu'aux gelées, il convient de rabattre la touffe pratiquement au ras du sol (Rothmaler, 1937).



**Figure 3.**les fleurs d'*Alchemilla vulgaris* L.

Les fruits de *l'Alchemilla vulgaris* L. sont des akènes (Rothmaler, 1937).



**Figure 4.**les fruits d'*Alchemilla vulgaris* L.

### III.1 . Classification

La classification d'*Alchemilla vulgaris*.L est la suivante (Tableau 1) (**Rothmaler, 1937**).

**Tableau 1.** Classification scientifique d'*Alchemilla vulgaris* .L.

<b>Règne</b>	Plantae
<b>classe</b>	Magnoliopsida
<b>famille</b>	<i>Rosacées (Rosaceae)</i>
<b>Espèce</b>	<i>Alchemilla vulagris</i>
<b>Sous - règne</b>	Plantes vasculaire ( Tracheobionta)
<b>Sous classe</b>	Rosidae
<b>Division</b>	Plante à graines (Spermatophyta)
<b>Super ordre</b>	Rosidés (Rosidae)
<b>Genre</b>	<i>Alchemilles (Alchemilla)</i>
<b>Nom commun</b>	<i>Alchemille vulgaire</i>
<b>Ordre</b>	Rosales (Rosales)

### III.2.Nomenclature

- **Noms anglais** : *lady's mantle* , *bear's foot* , *lion's foot*
- **Nom latin** : *Alchemilla vulgaris* L.
- **Nom arabe** : رجل الأسد . عباءة السيدة .

### III.3. Ecologie et répartition géographique:

*L'Alchemilla* est abondante dans les pâturages humides, les bois d'Europe, Sibérie, et Labrador, en Amérique du Nord et en Asie, jusqu'à une altitude de plus de 2000 m. Elle est absente en Méditerranée. Elle est présente depuis la plaine dans le Nord jusqu'aux régions alpines des montagnes de toute la France (**Zukowski, 1982**).

### III.4. Histoire d'utilisation d'*Alchemilla* en phytothérapie

*Alchemilla* doit son nom aux alchimistes qui considéraient la rosée de ses feuilles comme une eau céleste indispensable à la préparation de la pierre philosophale. Au Moyen Age, cette plante était déjà utilisée en phytothérapie, mais elle était alors censée... redonner leur virginité aux femmes et de l'éclat aux seins flétris. C'est d'ailleurs de là que vient son nom de "lady's mantle" (manteau de dame), puisque la plante était connue pour raffermir les tissus de l'appareil génital féminin en enveloppant celui-ci tel un manteau (Danie , 2007).

Alchémille apparaît en 1570 dans un traité d'Andrés Laguna de Segovia, un médecin, pharmacologue et botaniste espagnol qui la recommande en infusion pour soigner les fêlures et fractures chez les bébés et les jeunes enfants, mais aussi en poudre associée à du vin rouge pour soigner toutes sortes de blessures. C'est en fait au début du XXe siècle que le prêtre et herboriste suisse Johann Künzle a démontré son utilité dans le soulagement des douleurs prémenstruelles, mais aussi dans la préparation de l'accouchement (Danie , 2007).

### III.5.Parties utilisées

- Les parties aériennes fleuries récoltées tout l'été à la floraison. Elles sont séchées dans un endroit sec et aéré. Les jeunes feuilles fraîches peuvent être ajoutées crues aux salades.
- La racine est utilisée en teinture (Danie , 2007).

### III.6.Propriétés médicinales de l'*Alchemilla vulgaris* L

#### III.6.1.Utilisation interne

- **Anti diarrhéique** : *Alchemilla vulgaris* L est indiquée dans le cas de diarrhée bénigne, notamment chez la femme enceinte (Pierrick , 2016).
- **Astringente et calmante** : elle aide à atténuer les douleurs des règles tout comme les troubles gastro-intestinaux. Elle est également utile pour faire face au syndrome prémenstruel et aider à régulariser les règles (Pierrick , 2016).
- **Antioxydante** : les flavonoïdes présents dans *Alchemilla* aident à maintenir une bonne circulation sanguine (Pierrick , 2016).
- **Cicatrisante** : *Alchemilla vulgaris* L arrête les hémorragies, notamment celles dues à des règles trop abondantes, au moment de la préménopause par exemple (Pierrick , 2016).

### III.6.2.Utilisation externe

En utilisation externe, de par ses propriétés décongestionnantes, *Alchemilla* est conseillée pour soulager les personnes ayant les jambes lourdes, mais aussi pour traiter des affections vaginales telles que les pertes blanches. Prise en bain de bouche, elle aide également à maintenir une bonne hygiène buccale (Pierrick , 2016) .

### III.6.3.Indications thérapeutiques usuelles

*Alchemilla* peut être utilisée en cas de diarrhée bénigne, de troubles gastro-intestinaux et, surtout, de troubles gynécologiques, qu'il s'agisse de douleurs des règles, de syndrome prémenstruel, d'affections vaginales comme les pertes blanches. Elle aide également à soulager les personnes ayant les jambes lourdes et les chevilles gonflées, ainsi qu'à entretenir l'hygiène buccale et à soigner les aphtes (Pierrick , 2016).

### III.6.4.Autres indications thérapeutiques démontrées

De par sa forte teneur en tanins, l'*Alchémilla* aide à la cicatrisation des plaies et ulcères cutanés. En compresse, elle lutte contre la cellulite et s'avère aussi efficace contre les vergetures. Parmi les autres vertus reconnues à l'*Alchémilla*, notons qu'elle est utile en cas d'angine, de céphalées et pour les personnes souffrant de rhumatismes ( Pierrick, 2016).



Figure 5.Exemple d'utilisation d'*Alchemilla vulgaris* L.

### III.7. Propriétés biochimiques

L'étude phytochimique sur les extraits de la partie aérienne et les racines d' *Alchemilla vulgaris* a révélé La présence de diverses quantités des *tanins*, des *saponines*, des *résines*, des *lécithines*, des *flavonoïdes*, des *triterpènes* et de l'*acide salicylique*.

Les constituants chimiques principaux d' *Alchemilla* figurent dans le tableau 2.

( Pierrick ,2016).

**Tableau 2.**Les constituants chimiques principaux d'*Alchemilla vulgaris* L.

Famille de constituants	Constituants individuels
- <b>Tanins, 6–8%</b>	-Gallotanins et d'ellagitanins : agrimoniine, lœvigatine (dimères) et pédunculagine (monomère)
- <b>Flavonoïdes, 2 %</b>	- Glucuronyl-3 quercétol (1,18 %) et quercétol libre
- <b>Acide Polyphénol</b>	- Acide ellagique (0,36 %)

## I. Généralités :

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement (**Bruneton, 1993**). A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolés et identifiés (**Mompon et al., 1998**). Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (**Hennebelle et al., 2004**). Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 (**Harbone, 1993**).

Ils sont divisés en plusieurs catégories : *anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénols, xanthones* et autres *phloroglucinols* où les flavonoïdes représentent le groupe le plus commun et largement distribué. La grande diversité structurale des composés phénoliques rend difficile une présentation globale des méthodes qui permettent leur extraction et leur isolement, des processus mis en jeu au cours de leur biosynthèse, de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques (**Bruneton, 1993**).

Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs.

Les recherches des dix à quinze dernières années ont démontré que les composés phénoliques ne sont nullement des produits inertes du métabolisme. Ils subissent dans les tissus végétaux d'importantes variations quantitatives et qualitatives et interviennent dans de processus vitaux les plus divers. Le mode de leur action et sa signification physiologique ne sont pas encore toujours claires. Un rôle important est attribué aux phénols dans la résistance des plantes aux maladies, comme c'est le cas de la résistance du cotonnier à la maladie de flétrissement, la verticilliose. Le phénomène d'accumulation des substances phénoliques dans les tissus végétaux infectés ou dans les zones proximales est également observé à la suite de blessures causées par des facteurs mécaniques (**Brzowska et al., 1973**) et dans le cas de carence en certains éléments minéraux comme l'azote et le soufre (**Loche, 1966**).

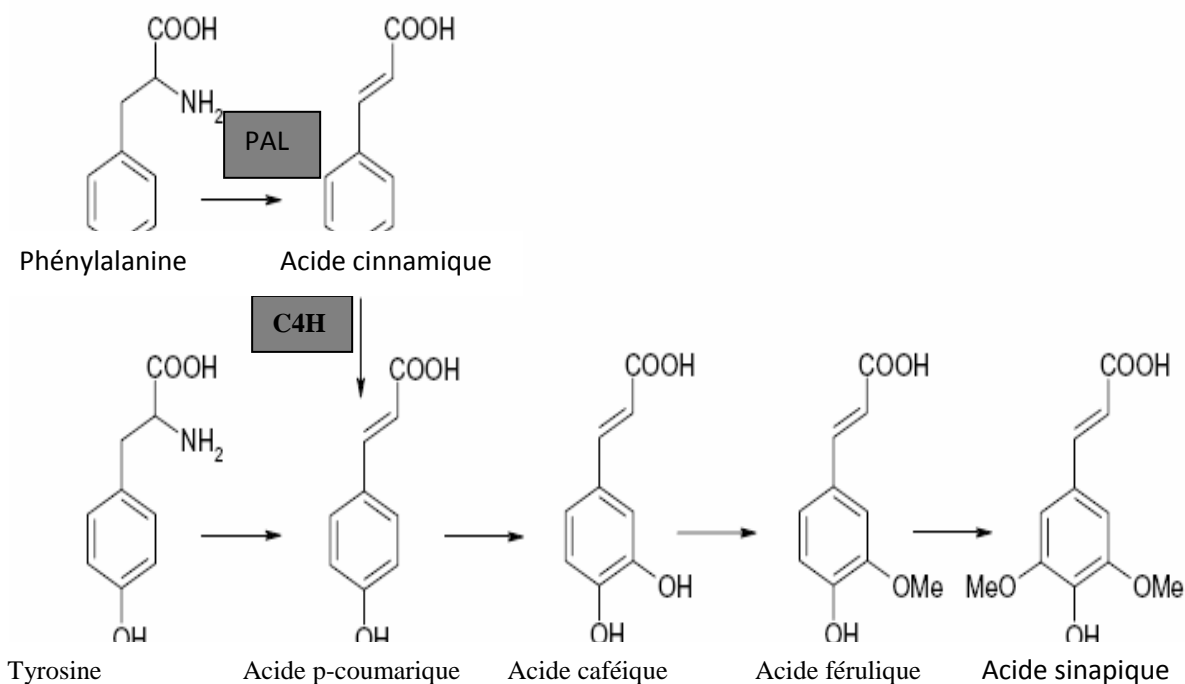
Des travaux plus anciens (**Nitsch et Nitsch, 1961; Alibert et al., 1977**) ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation. Les polyphénols sont aussi connus pour leurs effets protecteurs contre le rayonnement UV, l'effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs et pour ces propriétés antifongique et antibactérienne

(Heimeur *et al.*, 2004). Ils interviennent dans la qualité alimentaire des fruits en déterminant la saveur, nous citons : les flavanones sont responsables de l'amertume des Cistus et peuvent donner naissance par transformation chimique à des dihydrochalcones à saveur sucrée (Dubois *et al.*, 1977), les anthocyanes, composés de couleur rouge à violet, participent à la coloration des fruits mûrs et les tannins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs.

A partir des années quatre-vingt, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt des polyphénols en particulier *les flavonoïdes* dont les propriétés antioxydantes sont très marquées ( Benhammou, 2012).

## II. Biosynthèse :

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, tous dérivant de la l'acide shikimique (Figure 6). 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 benzoïque, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines (Bruneton,1993).




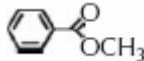
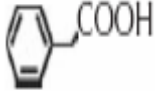
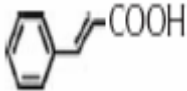
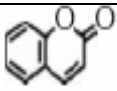
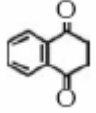
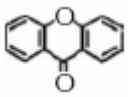
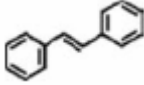
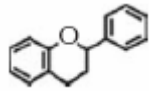
**Figure 6.** Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate (Crozier *et al.*, 2006). PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase.

### III. 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 3**).

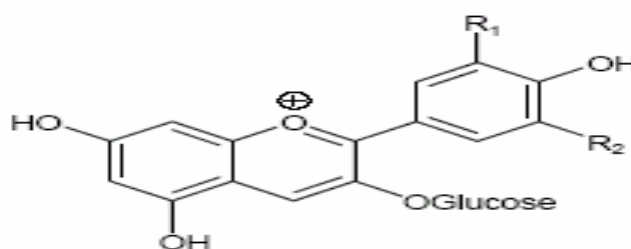
Ces molécules sont généralement trouvés conjuguées aux sucres et les acides organiques (**Benhammou. 2012**).

**Tableau 3.** Structure des squelettes des polyphénols (**Crozier et al., 2006**).

Nombre de carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C6-C1	Acides phénols	Acide gallique	
8	C6-C2	acétophénone	Gallacetophénone	
8	C6-C2	Acide phénylacétique	Acide p-hydroxyphénylacétique	
9	C6-C3	Acides hydroxycinamiques	Acide p-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	

### III.1. Anthocyanosides :

Ce sont des pigments vacuolaires rouges, roses, mauves, pourpres, bleus ou violets de la plupart des fleurs et des fruits (**Bruneton, 1993**). Ils sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique (les anthocyanosides). Leurs génines (les anthocyanidols) sont des dérivés du cation 2-phényl-benzopyrylium plus communément appelé cation flavylum. Ces pigments représentent des signaux visuels qui attirent les animaux pollinisateurs (insectes, oiseaux) (**Brouillard et al., 1997 ; Bahorum, 1997**).

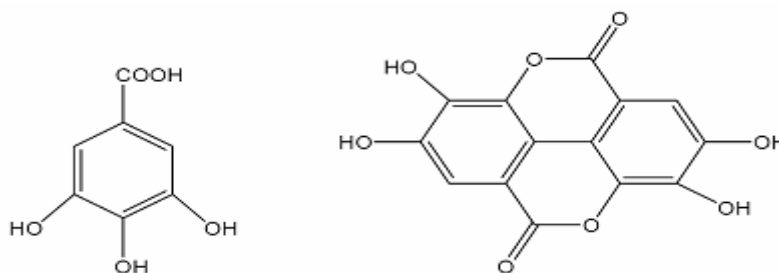


**Figure 7.** Structure des anthocyanosides.

### III.2. Tannins :

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (**Haslam, 1996 ; Cowan, 1999**). Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (**Scalbert, 1991**). On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique :

**III.2.1. Tannins hydrolysables :** qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins (**Figure 8**) (**Bruneton, 1993 ; Cowan, 1999**).



**Figure 8.** Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B).

**III.2.2. Tannins condensés ou tannins catechiques ou proanthocyanidols :** qui se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des *flavonoïdes*. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. (Bruneton, 1999).

### **III.3. Phénols simples et les acides phénoliques :**

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique. (Benhammou, 2012).

#### **III.3.1. Acide phénols dérivés de l'acide benzoïque :**

Les acides phénols en C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside. L'acide gallique et son dimère (l'acide hexahydroxydiphénique) sont les éléments constitutifs des tannins hydrolysables. D'autres aldéhydes correspondants à ces acides, comme la vanilline, est très utilisé dans le secteur pharmaceutique (Bruneton, 1993).

#### **III.3.2. Acide phénols dérivés de l'acide cinnamique :**

La plupart des acides phénols en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (acides p-coumarique, caféïque, férulique, sinapique) ont une distribution très large ; les autres (acides o-coumarique, o-férulique) sont peu fréquents (Bruneton, 1993).

#### **III.3.3. Phénols simples :**

Tels que le catéchol, guaiacol, phloroglucinol... sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (*Ericaceae*, *Rosaceae*...). Les deux phénols hydroxylés, le catéchol avec deux groupes OH et le pyrogallol avec trois, ont été montrés pour sa toxicité vis-à-vis des microorganismes (Cowan, 1999).

### **III.4. Coumarines :**

Les coumarines qui sont aussi les dérivés de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, appartiennent au groupe des composés connus par des benzo- $\alpha$ -pyrone (O'Kennedy et Thornes, 1997) et toutes sont substituées en 7 par un hydroxyle. Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin (Cowan, 1999).

### **III.5. Quinones :**

Ce sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques. Elles sont caractérisées par un motif 1,4-dicéto cyclohexa-

2,5-diéniqne (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa-3,5-diéniqne (ortho-quinones) (**Bruneton, 1993**). Elles sont ubiquitaire dans la nature, principalement dans le règne végétal et sont fortement réactifs (**Cowan, 1999**).

### **III.6. Stilbène :**

Les membres de cette famille possèdent la structure C6-C2-C6 comme les flavonoïdes, ce sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux. Les sources principales des stilbènes sont les raisins, les vins, le soja et les arachides (**Crozier et al., 2006**).

### **III.7. Lignanes :**

Ce sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques (C6-C3). Leur distribution botanique est large, plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante dix familles (**Crozier et al., 2006**).

### **III.8. Les flavonoïdes :**

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange (**Piquemal, 2008**), cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus=jaune) (**Karaali et al., 2004 ; Malešev et Kuntić, 2007**).

Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique **E.Chervreul en 1814**, mais ont été réellement découverts qu'en **1930** par **Albert Szent-Györgyui**, désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes (**Nijveldt et al., 2001**).

Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées (**Ghedira, 2005; Malešev et Kuntić, 2007**). Prés de 4000 flavonoïdes ont été décrits (**Medić-Šarić et al., 2004**).

#### **III.8.1. Structure :**

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) (**W- Erdman et al, 2007**). Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6 (**Emerenciano et al., 2007**) en formant une structure de type diphényle propane dont des

groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule (Narayana, 2001; Malešev et Kuntić, 2007).

### III.8.2. Classification :

La structure de base des flavonoïdes est le noyau du flavone (2-phenyl-benzo- $\gamma$ -pyrane) mais de point de vue classification, le groupe des flavonoïdes peut être divisé en plusieurs catégories. Cette division dépend de l'hydroxylation du noyau du flavonoïde aussi bien que du sucre lié.

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, et de ce fait, possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement phenyl-2 chromane. (Figure. 9) Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation de noyau pyranique central (Figure 10) (Krishna *et al.*, 2001).

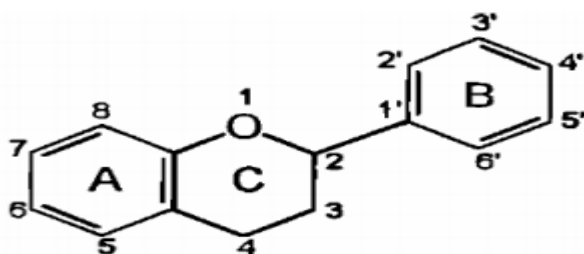


Figure 9. Structure chimique de base des flavonoïdes (Krishna *et al.*, 2001).

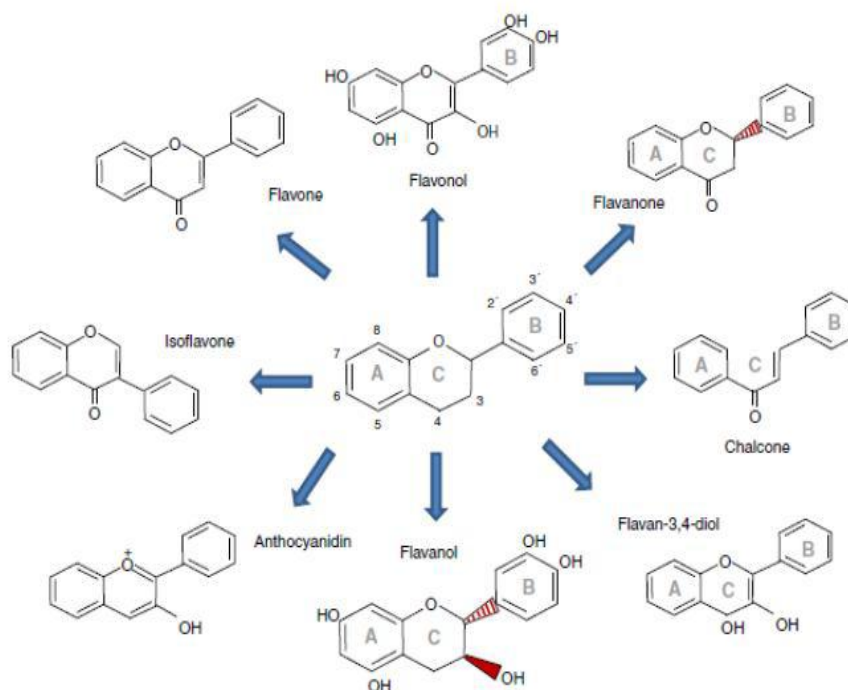


Figure 10. Les structures chimiques des principales familles des flavonoïdes (Fraga & Oteiza, 2011).

### III.8.3. Localisation et distribution des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont impliqués dans de nombreuses interactions des plantes avec les conditions biotiques et abiotiques de leur environnement, ces substances sont accumulées dans différentes parties cellulaires et tissulaires de la plante durant l'organogénèse et sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants (**Hutzler *et al.*, 1998**).

Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles (**Piquemal, 2008**), la répartition de ces composés montre des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement. Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires, tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous épidermique (**Boudet, 2000**).

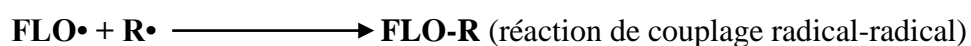
### III.8.4. Propriétés des flavonoïdes :

#### A / Propriétés antiradicalaires :

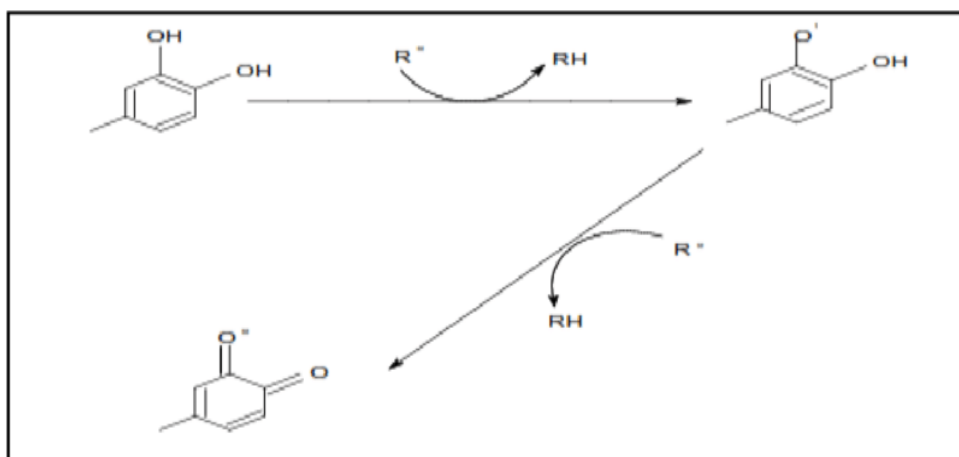
Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle selon la réaction représentée ci-dessous :



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



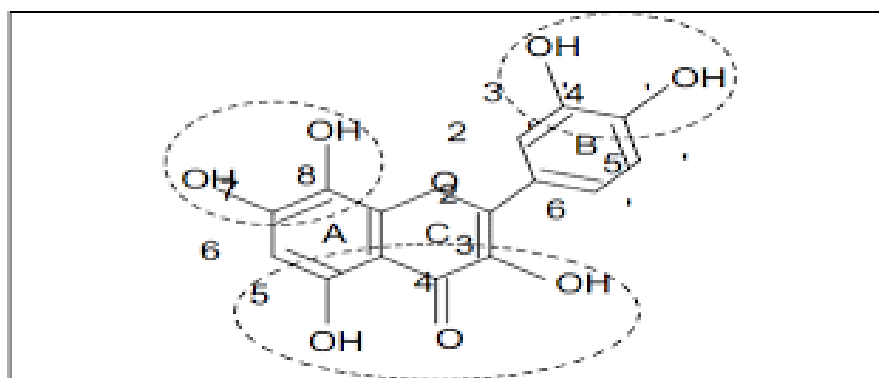
(**Amić *et al.*, 2003**)



**Figure 11.** Piégeage des espèces réactives dérivées de l'oxygène (R•) par les flavonoïdes et la formation d'une structure stable (Tiqwari, 2001).

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

- Structure ortho-dihydroxyphénolique du cycle B (3',4' dihydroxystructure), cette structure est importante pour l'activité antiradicalaire des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé.
- La double liaison C2-C3 conjuguée avec la fonction 4 oxo qui est responsable de la délocalisation des électrons, en améliorant ainsi la capacité antiradicalaire.
- Les groupements hydroxyles libres en C3 et C5 (Amić *et al.*, 2003).



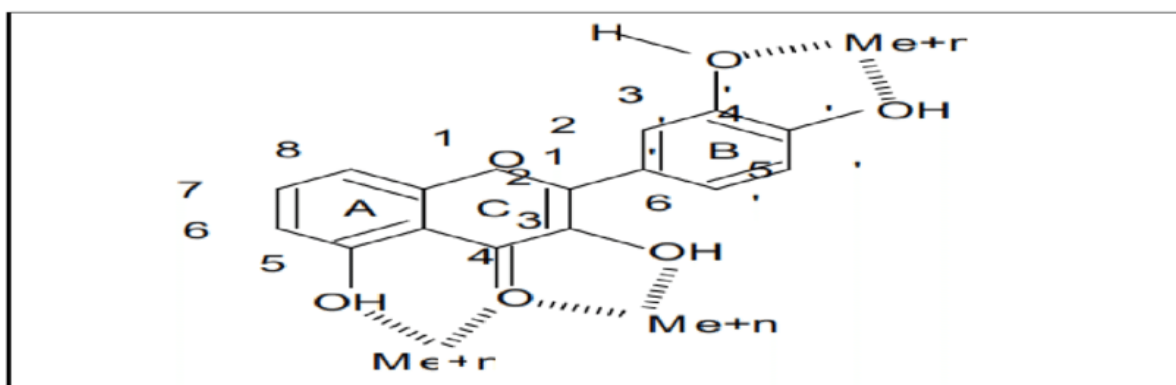
**Figure 12.** Critères structuraux essentiels pour avoir une bonne activité antiradicalaire des Flavonoïdes (Amić *et al.*, 2003).

**B / Propriétés chélatrices des ions métalliques :**

Les ions métalliques sont nécessaires pour le fonctionnement des processus biochimiques et physiologiques cellulaires, mais dans certains cas et lorsque leur mécanisme d'action n'est pas bien contrôlé ces mêmes ions peuvent être à l'origine d'une peroxydation lipidique, un stress oxydatif, ou une blessure des tissus, à titre d'exemple  $\text{Cu}^{+2}$  est un stimulateur de la peroxydation des LDL (Tiqwari, 2001).

Grâce à leur structure chimique spécifique, les flavonoïdes peuvent facilement chélater les ions métalliques en créant des composés complexes inactifs (Malešev et Kuntić, 2007) La chélation des ions métalliques nécessite trois sites principaux :

- Site situé entre le groupe 3' OH et le groupe 4' OH du cycle B.
- Site situé entre le groupe 3OH et 4 C=O de l'hétérocycle C.
- Site situé entre le groupe 5OH du cycle A et le groupe 4C=O de l'hétérocycle C.



**Figure 13.** Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques ( $\text{Me}^{+n}$ ) (Tiqwari,2001).

**C / Propriétés antibactériennes :**

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents a entraîné la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes, sous forme de métabolites secondaires dont les composés phénoliques, sont toujours utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire (Cowan, 1999).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour

inactiver les adhésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

#### **D / Propriétés anticancéreuses :**

Le cancer se présente habituellement comme une tumeur formée d'une masse cellulaire qui est l'aboutissement d'une série de transformation pouvant se dérouler pendant plusieurs années, donc la cancérogénèse est un processus complexe multi-séquentiel menant une cellule de l'état sain à un état précancéreux et finalement à un stade précoce de cancer (Pincemail *et al.*, 1999).

Depuis longtemps, on associe le cancer et le type d'alimentation, de nombreux chercheurs ont étudié le rôle des nutriments dans le développement des cancers. Plus récemment des recherches expérimentales suggèrent que les flavonoïdes sont parmi les substances susceptibles de retarder voire d'empêcher l'apparition de certains cancers, tout en réduisant d'une manière spécifique les risques d'en avoir chez les sujets humains (Decloitre, 1993 ; Hertog, 1996).

Des études montrent que certains flavonoïdes particulièrement ; lutéoline, quercétine, kaempférol, apigénine, taxifoline inhibent d'une façon marquée la lipogénèse des cellules cancéreuses, d'autres flavonoïdes sont plutôt capables d'induire l'apoptose. Certains flavanols (épigallocatechine-3-gallate) représentent des effets cytotoxiques sur les cellules cancéreuses de prostate, ces effets sont corrélés avec leur capacité à inhiber les enzymes clés lipogéniques (Brusselmans *et al.*, 2005).

L'activité anticancéreuse des flavonoïdes est assurée par l'intervention de plusieurs mécanismes :

- piégeage des radicaux libres.
- Inhibition du métabolisme d'acide arachidonique.
- Formation d'un complexe inactif avec le carcinogène (Hertog, 1996).
- Prévention de l'activation des métabolites carcinogènes.
- Inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses.
- Arrêt du cycle cellulaire des cellules cancéreuses.
- Induction de l'apoptose.
- Inhibition des processus d'angiogénèse (Ren *et al.*, 2003).

**E / Propriétés anti-inflammatoires :**

Une inflammation par définition est une réaction de défense immunitaire stéréotypée du corps à une agression (infection, brûlure, allergie...) qui se manifeste par une rougeur, un gonflement, une sensation de chaleur, une douleur qui semble pulser.

Au cours de l'inflammation, des produits bactériens déclenchent la production d'une grande quantité d'oxyde nitrique (NO) dans les macrophages et d'autres cellules sous l'action d'oxyde nitrique synthase inducteur (iNOS) (**Hämäläinen et al., 2007**), bien que la libération de (NO) est très importante pour maintenir la dilatation des vaisseaux sanguins (vasodilatation) mais des fortes concentrations peuvent conduire aux dommages oxydatifs (**Nijveldt et al., 2001**), car une fois que le NO est formé il se peut qu'il va réagir avec l'anion superoxyde conduisant à la formation de peroxy-nitrite qui provoque l'endommagement des macromolécules cellulaires. Cependant une production en excès de NO durant une inflammation chronique résulte au développement du cancer (**Tsai, 2004**).

De nombreuses études semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (**González-Gallego et al, 2007**) d'autres flavonoïdes sont capables d'inhiber l'histamine (**Kim et al, 2004**).

Les flavones et les flavonols sous forme glycosylée ou libre comme la quercétine, kaempférol, myricétine ont une activité inhibitrice de COX (Cyclooxygénase) (**Tapas et al, 2008**).

**F / Propriétés antivirales :**

La stratégie de recherche d'un composé antiviral consiste à mesurer la réduction de l'infection virale des cellules en culture, une substance peut agir à différents niveaux du cycle viral :

- au niveau de l'adsorption du virus sur la cellule hôte.
- au niveau de la pénétration du virus dans la cellule hôte.
- au niveau la de réplication du virus et la synthèse des protéines virales.
- au niveau de l'assemblage et de la sortie du virus hors de la cellule hôte.

L'activité antivirale des flavonoïdes contre HIV peut être liée directement par leurs effets sur les enzymes responsables de son réplication (HIV-1 reverse transcriptase ou HIV-1 integrase) par ailleurs d'autres flavonoïdes montraient une activité antivirale contre le virus d'influenza, HIV-1, HIV-2 (**Bylka et al., 2004**). Quercétine, apigénine, catéchine et hespéridine sont parmi les flavonoïdes caractérisés par leurs propriétés antivirales contre onze

types de virus. Les flavonoïdes aglycones pourvus d'un groupement hydroxyle libre en C3 ont montré une bonne activité antivirale, les flavanes sont généralement plus efficaces que les flavones et les flavanones contre HIV-1 et HIV-2 (**Tapas et al., 2008**).

#### **G/ Propriétés antiallergiques :**

Ces effets antiallergiques sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca<sup>2+</sup> dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des monocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase Ca<sup>2+</sup> dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme (**Marfak, 2003**).

#### **H / Les flavonoïdes sont des produits nutraceutiques :**

Le terme nutraceutique a été intervenu en 1979 par Steph De Felice (**Lin et Weng, 2006**), il s'agit d'une appellation commerciale élaborée par les industriels qui résulte de la contraction de "Nutrition" et de "Pharmaceutique" (**Bietrix, 2004**). Les nutraceutiques sont des composés qui n'ont pas une valeur calorique mais qui ont un rôle fondamental pour ce qui concerne la prévention de certaines pathologies (**Teissedre et al., 2007**).

Le rôle nutraceutique des polyphénols s'inscrit dans le cadre de ce que l'on appelle la nouvelle pharmacie qui consiste à faire un traitement préventif et non curatif, il vaut mieux que le médicament soit déjà présent dans l'organisme prêt à la défense apporté sous forme des aliments fonctionnels capables de procurer des bienfaits physiologiques démontrés ou de réduire les risques des maladies chroniques, en plus de remplir leurs fonctions nutritionnelles de base dont la consommation des fruits et des légumes riches en composés bioactifs peut être une stratégie de prévention réaliste contre de nombreuses maladies majeures. Les produits nutraceutiques fondamentaux des plantes sont les composés phénoliques, particulièrement les flavonoïdes en raison de leurs propriétés bénéfiques sur la santé humaine (**Teissedre et al., 2007**).

#### **I / Autres propriétés des flavonoïdes :**

- Protection des plantes contre les radiations UV.
- Sont impliqués dans les processus de défense de la plante contre les infections bactériennes et virales.
- Agissent comme des pigments ou des co-pigments.

- Modulation de la distribution d'auxine.
- Fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire.
- Régulation de l'élongation des tiges.
- Interviennent dans la maturité des fruits.
- Sont à l'origine des goûts amers et astringents afin de repousser les animaux .

herbivores (**Park et Cha, 2003 ; Subsamian et al., 2007 ; Yang et al., 2008**)

### III.8.5. Biodisponibilité des flavonoïdes :

Les effets santé des polyphénols dépendent essentiellement de leur biodisponibilité ; cette dernière qui signifie la part d'un nutriment présent dans un aliment qui est effectivement assimilée par l'organisme.

Selon **Wiseman (1999)** la biodisponibilité absolue (%) correspond à la proportion des molécules qui entrent dans la circulation sanguine sous leur forme intacte après leur consommation en passant à travers la paroi intestinale et le foie.

➤ **Absorption** : tous les flavonoïdes à l'exception de catéchine (flavanol) sont présents dans les plantes sous forme glycosylée (liés aux sucres par des liaisons  $\beta$  osidiques) seuls les aglycones peuvent être absorbés par l'intestin grêle, tandis que les glycosides sont hydrolysés tout d'abord en aglycones par l'intermédiaire de la microflore colique qui dispose des enzymes capables de cliver les liaisons  $\beta$  osidiques (**Wiseman, 1999 ; Urquiaga et Leighton, 2000 ; Ming, 2007**), cette même flore microbienne métabolise au même temps les aglycones libérés. Des quantités considérables de catéchines polymériques connus sous le nom de proanthocyanidines sont présents dans l'alimentation, des études montrent que les formes dimères et trimères de catéchine sont susceptibles d'être absorbés tandis que les polymères de degré de polymérisation élevé ne peuvent pas être absorbés par la paroi intestinale qu'après leurs dégradation (**Hollman, 2001**).

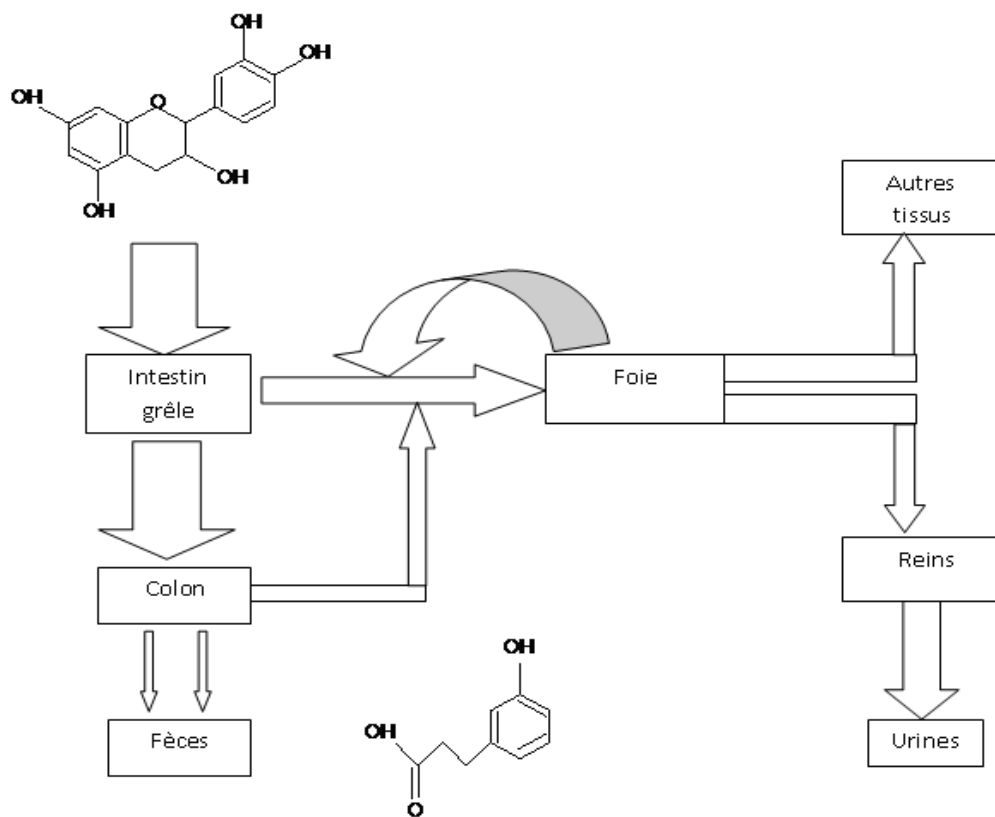
➤ **Métabolisme** : deux compartiments considérablement importants pour le métabolisme des composés phénoliques :

- **les tissus (foie et les reins)** : ou des enzymes de biotransformation agissent directement sur les flavonoïdes aglycones ainsi que sur des métabolites coliques absorbés, ces enzymes sont principalement localisés au niveau du foie, des reins, ainsi qu'au niveau de l'intestin grêle.

- **Colon** : où la microflore colique dégrade les flavonoïdes aglycones libérés (après hydrolyse des glycosides) par ouverture de leur hétérocycle aux différents endroits selon le type de flavonoïde concerné :

- Les flavonols : sont dégradés en acides phénylacétiques et acides phénylpropioniques.
- Les flavanols : produisent les valerolactones (noyau benzénique avec une chaîne latérale de cinq atomes de carbones) et des acides phénylpropioniques.
- Les flavones et les flavanones : produisent des acides phénylpropioniques.

Ces acides sont encore métabolisés aux dérivés des acides benzoïques, les groupements hydroxyles des métabolites générés subissent une conjugaison par acide glucuronique, sulfate, ou par glycine (**Hollman, 2001**). L'élimination des métabolites de polyphénols se fait par deux voies essentielles d'excrétion ; soit par voie biliaire (**Manach, 1998**) ou par voie urinaire.



**Figure 14.** Principaux compartiments impliqués dans le métabolisme des flavonoïdes (**Hollman, 2001**).

## I. Généralités :

Nos cellules et tissus peuvent être soumis à une grande variété d'agression physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dû à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène (**Walker *et al.*, 1982**).

## II. Activité antioxydante

Les antioxydants sont classés selon leur mode d'action : éliminateurs de radicaux libres, chélateurs d'ions métalliques, piègeurs d'oxygène dans des systèmes fermés. Les polyphénols, naturellement présents dans les aliments ou formés au cours des procédés de transformation sont considérés comme éliminateurs des radicaux libres (**Chew *et al.*, 2009**).

### II.1. Définition d'un radical libre :

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (**Dacosta, 2003**).

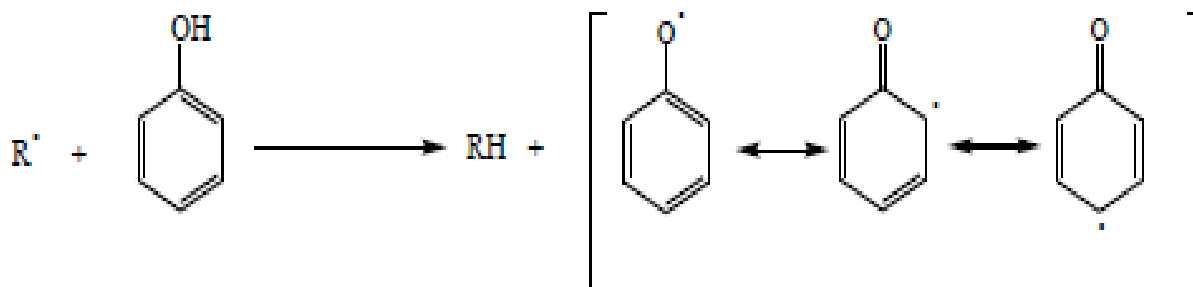
Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires (radical peroxyde  $\text{ROO}^\cdot$ , radical alkoxyde  $\text{RO}^\cdot$ ), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Novelli, 1997**).

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (ROS). Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , radical hydroxyl  $\text{OH}^\cdot$ , monoxyde d'azote  $\text{NO}^\cdot$ , mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet  $\text{LO}_2$ , peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peroxyde d'azote  $\text{ONOO}^-$  (**Favier, 2003**).

### II.2. Piégeage des radicaux libres

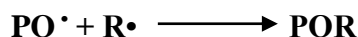
Les composés phénoliques ont des propriétés antioxydantes en raison de leur capacité à piéger les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène, le processus est radicalaire (**Sökmen *et al.*, 2012**). Ils interfèrent avec l'oxydation des lipides et d'autres molécules par la

donation rapide d'un atome d'hydrogène aux radicaux libres selon un mécanisme proposé dès 1976 par Sherwin : l'antioxydant cède formellement un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un radical intermédiaire. Il est stabilisé par ses structures mésomères conjuguées (Sökmen *et al.*, 2012).



**Figure 15.** Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques.

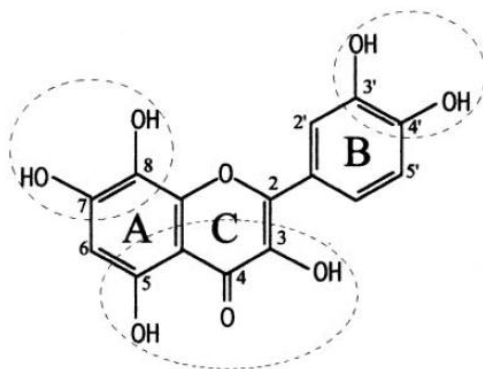
Les radicaux intermédiaires phénoxy ( $\text{PO}^\bullet$ ) sont relativement stables en raison de la résonance et donc une nouvelle réaction en chaîne n'est pas facile à initié (Dai & Mumper, 2010). Par ailleurs, ils peuvent agir avec d'autres radicaux libres selon la réaction:



Les composés phénoliques possèdent une structure chimique idéale pour le piégeage des radicaux libres, parce qu'ils possèdent:

- Des groupes phénoliques hydroxyles qui sont susceptibles de donner un atome d'hydrogène ou un électron au radical libre.
- Un système aromatique stabilisé par la résonance (Dai et Mumper, 2010).

Les flavonoïdes en général et les flavonols en particulier sont de bons piègeurs des radicaux libres (Fraga, 2007). A cause la présence de 3',4'-dihydroxy et la présence du groupe *o*-dihydroxy (structure des catéchol) sur le noyau aromatique B; ils possèdent la propriété de donneur d'électrons. En outre, la présence du 3-OH du cycle C est également bénéfique pour l'activité antioxydante des flavonoïdes. La présence de la double liaison C2-C3 conjuguée avec le groupe 4-céto est responsable de la délocalisation des électrons du noyau B, ce qui améliore encore l'activité antiradicalaire (Amic *et al.*, 2003).



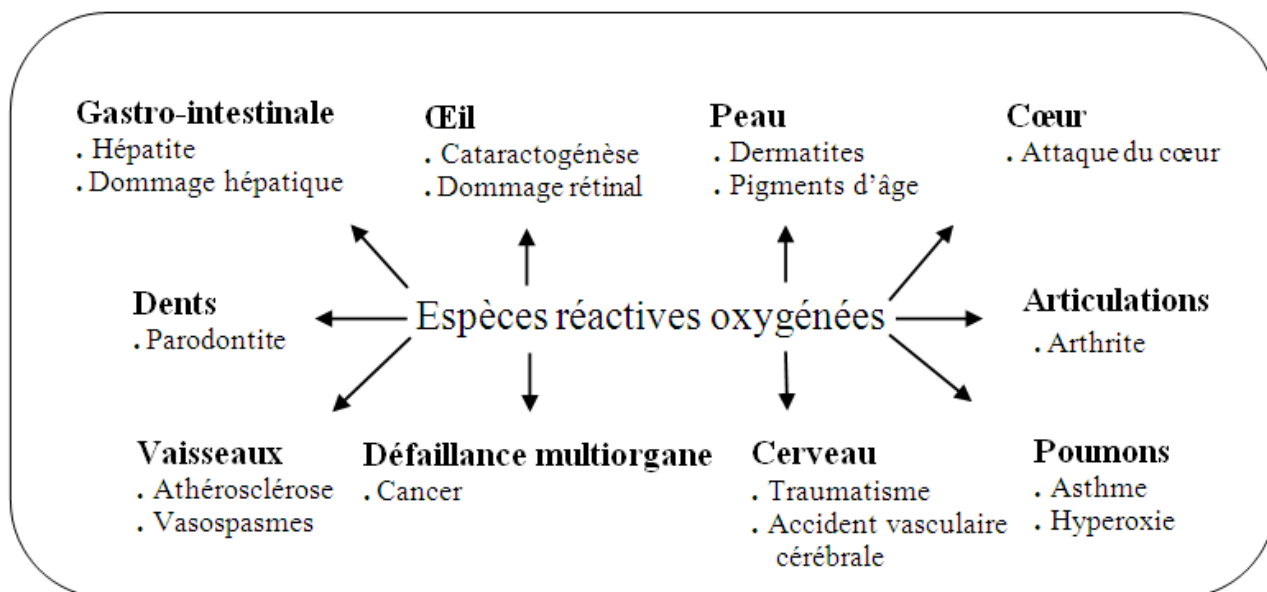
**Figure 16.** Les caractéristiques structurales des flavonoïdes avec une activité de piégeage des radicaux libres élevée (Amic *et al.*, 2003).

### II.3. Stress oxydant

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes de l'organisme en faveur des premiers, ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles (Pincemail *et al.*, 1999). Le stress oxydatif est un fonctionnement de l'organisme qui est normal tant qu'il ne dépasse pas certaines limites. En effet, tous les organismes vivants qui consomment de l'oxygène produisent des radicaux libres qui sont de petites substances chimiques très oxydées par le contact avec l'oxygène, et dont nos cellules savent normalement très bien se débarrasser. Le stress oxydatif devient anormal lorsque les cellules sont soit dépassées par la quantité de radicaux libres à éliminer, soit ne disposent pas de ressources antioxydantes (vitamines, oligoéléments, enzymes) suffisantes pour les éliminer.

#### II.3.1 Implications pathologiques du stress oxydatif

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreuses pathologies (figure 17) comme facteur déclenchant ou associé à des complications (Favier, 2003). Il peut être associé à l'athérosclérose, l'asthme, l'arthrite, la cataractogénèse, l'hyperoxie, l'hépatite, l'attaque cardiaque, les vasospasmes, les traumatismes, les accidents vasculaires cérébraux, les pigments d'âge, les dermatites, les dommages de la rétine, les parodontites et les cancers (Cohen *et al.*, 2000; Packer et Weber, 2001). Néanmoins, la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux (Favier, 2003)



**Figure 17.** Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées (Lee *et al.*, 2004).

## II.4. Espèces réactives de l'oxygène

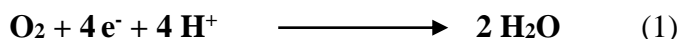
Les espèces réactives oxygénées (ERO) incluant les radicaux libres comme le radical hydroxyl (OH), le radical superoxyde ( $O_2$ ) et sa forme protonnée ( $HO_2$ ), le radical peroxy ( $ROO$ ) et les espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et l'oxygène singulet ( $LO_2$ ) sont des molécules hautement réactives (Chu *et al.*, 2010).

Dans tous les systèmes vivants aérobies, ces espèces sont produites habituellement par voie endogène durant le métabolisme cellulaire (Kumari et Kakkar, 2008). Les ERO sont aussi produites dans des circonstances pathologiques intrinsèques telles que le dysfonctionnement de la mitochondrie et l'involution thymique favorisant l'inflammation chronique (Montagnier, 2009). Des facteurs exogènes à savoir les polluants environnementaux, les radiations, les solvants organiques, le tabac ainsi que les agents pathogènes sont aussi incriminés dans la production des ERO (Ansari, 1997).

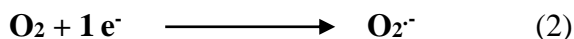
Les espèces réactives du nitrogène incluent le radical monoxyde d'azote (NO), l'anion peroxynitrite ( $ONOO^-$ ), le radical dioxyde d'azote ( $NO_2$ ) et d'autres oxydes d'azote sont produits par la réaction du monoxyde d'azote avec  $O_2$  (Wiseman et Halliwell, 1996; Simon *et al.*, 2000).

### II.4.1. Production des espèces réactives oxygénées

La majeure partie de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente conduisant à la production d'eau (réaction 1). Cette réaction est catalysée par la cytochrome oxydase, accepteur final d'électrons présent dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne mitochondriale (Gardès-Albert *et al.*, 2003).



Toutefois, cette chaîne de transport peut laisser fuir une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène. C'est ainsi qu'environ 2% de l'oxygène subit une réduction monoélectronique (réaction 2) conduisant à la formation du radical superoxyde  $\text{O}_2\cdot^-$  au niveau de l'ubiquinone (Cadenas et Davies, 2000).



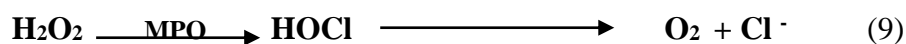
Le radical superoxyde est soumis à une réaction de dismutation catalysée par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) pour former le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  (réaction 3). Le  $\text{H}_2\text{O}_2$  peut traverser les membranes biologiques et former le plus puissant des espèces réactives, le radical hydroxyle ( $\text{OH}\cdot$ ), par interaction avec les métaux de transition comme  $\text{Fe}^{2+}$  (réaction 4) et  $\text{Cu}^+$  (réaction 5) via la réaction de Fenton. Le  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{O}_2\cdot^-$  donnent aussi naissance au radical hydroxyle (réaction 6) via une réaction dite de Haber et Weiss (Gardès-Albert *et al.*, 2003; Ahsan *et al.*, 2003).



La concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$  est régulée par des enzymes telles que la catalase (CAT) présente dans les peroxysomes et la glutathion peroxydase (GPx) essentiellement localisée dans le cytosol. La catalase accélère la réaction de dismutation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en oxygène et en eau (réaction 7), tandis que la glutathion peroxydase accélère la réaction d'oxydation du glutathion (GSH) par l'eau oxygénée (réaction 8) (Gardès-Albert *et al.*, 2003).



L'eau oxygénée est aussi convertit par la myeloperoxydase (MPO), dans les neutrophiles, en acide hypochloreux ( $\text{HOCl}$ ), un très fort oxydant qui agit comme agent bactéricide dans les cellules phagocytaires (réaction 9). La réaction de  $\text{HOCl}$  avec  $\text{H}_2\text{O}_2$  résulte en la production de  $1\text{O}_2$  (Ahsan *et al.*, 2003).



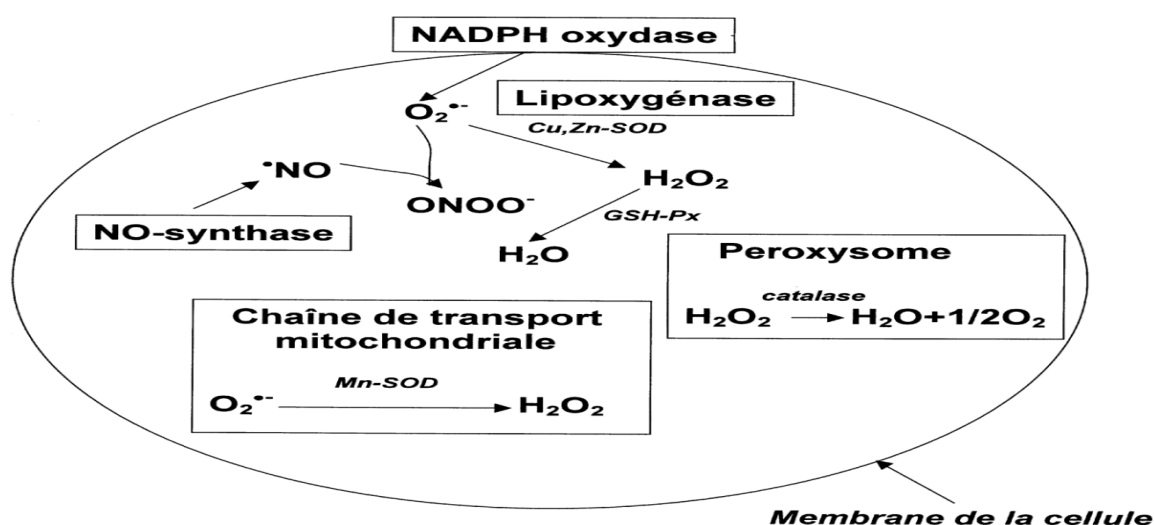
D'autre part, le monoxyde d'azote (NO.) est une petite molécule générée dans les tissus biologiques par l'oxyde nitrique synthase (NOS) lors du métabolisme de l'arginine en citruline (Guzik *et al.*, 2003). le monoxyde d'azote est un radical réactif abondant qui agit comme une importante molécule de signalisation dans une large gamme de processus physiologiques incluant la transmission nerveuse, la régulation de la pression sanguine, les mécanismes de défense, la relaxation des muscles lisses et la régulation immunitaire (Bergendi *et al.*, 1999). Le monoxyde d'azote peut réagir avec l'anion superoxyde (réaction 10) pour former le peroxyde nitrite (ONOO-) qui peut à son tour générer des composés toxiques tels que le dioxyde d'azote (réaction 11) (Halliwell, 1997).



#### II.4.2. Sources des espèces réactives oxygénées

Les ERO sont produites par différentes sources tant endogènes (figure 18) qu'exogènes:

a) La mitochondrie est la source majeure de la production cellulaire de l'anion superoxyde, principalement du à la réduction partielle de NADH déshydrogénase et la réduction partielle de l'ubiquinone /ubisemiquinone / ubiquinol par le complexe I et III respectivement (Roede et Jones, 2010). Par ailleurs, les peroxysomes semblent être les sources endogènes majeures des ERO (principalement H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) via la β-oxydation des acides gras (Beckman et Ames, 1998; Gulcin *et al.*, 2006).



**Figure 18.** Principales sources endogènes d'espèces réactives oxygénées. GSH-Px: glutathion peroxydase, SOD: superoxyde dismutase (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2002).

- b)** L'inflammation est par ailleurs une source importante d'ERO. Rodrigo et ses collaborateurs (2011) ont rapporté que lors des processus inflammatoires, les neutrophiles activés produisent l'anion superoxyde via l'action de la NADPH oxydase liée à la membrane sur l'oxygène moléculaire. Les neutrophiles produisent aussi le radical de monoxyde d'azote qui est à l'origine d'une molécule plus réactive, le peroxyde d'azote (ONOO<sup>-</sup>), un puissant oxydant qui peut se décomposer pour former le radical hydroxyle (voir la réaction 11).
- c)** Plusieurs systèmes enzymatiques produisent les ERO au cours des réactions biochimiques. Le cytochrome P450 peut réduire directement O<sub>2</sub> en O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en causant le stress oxydatif (**Goeptar et al., 1995**). Le cytochrome P450 peut aussi prendre une voie alternative appelée "cycles redox" dans lesquels un substrat accepte un électron du cytochrome P450 et le transfère à l'oxygène générant l'anion superoxyde (**Beckman et Ames, 1998**).
- d)** Au cours du catabolisme des purines, la xanthine oxydoréductase catalyse l'hydroxylation oxydative de l'hypoxanthine en xanthine et par la suite de la xanthine en acide urique en produisant l'anion superoxyde (**Vorbach et al., 2003; Chan, 2003**).
- e)** Durant le métabolisme de l'acide arachidonique, les lipooxygénases et les cyclooxygénases génèrent des ERO (**Ahsan et al., 2003; Lee et al., 2004**). De plus, dans des conditions normales, l'oxyde nitrique synthase convertit l'arginine en citruline et en monoxyde d'azote (**Guzik et al., 2003**).
- f)** Les métaux toxiques (chrome, vanadium, cuivre) et aussi le fer libres génèrent en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> les radicaux HO<sup>•</sup> par la réaction de Fenton. La plupart des métaux de transition, en particulier le fer et le cuivre, sont des cofacteurs essentiels aux enzymes. Dans leur forme libre, ces ions peuvent, dans les systèmes biologiques, faciliter le transfert d'électrons aux macromolécules susceptibles comme les protéines, les lipides et l'ADN (**Zadak et al., 2009**).
- g)** Les facteurs environnementaux tels que le tabagisme, les radiations UV, les médicaments, les réactifs chimiques, les solvants industriels et la pollution sont des sources exogènes des ERO qui peuvent causer l'oxydation des composants biologiques (**Zadak et al., 2009**).

#### **II.4.3. Conséquences biologiques des espèces réactives oxygénées**

La surproduction des ERO est responsable des lésions directes des molécules biologiques ainsi que des lésions cytotoxiques et mutagènes par les produits libérés, notamment lors de l'oxydation des lipides.

L'anion radicalaire superoxyde comme le monoxyde d'azote ne sont pas très réactifs, mais constituent des précurseurs d'autres espèces plus réactives. Les radicaux hydroxyles sont au contraire les plus dommageables pouvant s'attaquer à toutes les molécules biologiques à savoir l'ADN, les protéines et les lipides (**Gardès-Albert et al., 2003; Ahsan et al., 2003**).

En fait, **Verdan et ses collaborateurs (2011)** ont rapporté que la réaction de Fenton productrice de radicaux hydroxyles est la cause primaire de la mort cellulaire par l'endommagement de l'ADN.

Par ailleurs, la réactivité du peroxyde d'hydrogène réside dans sa capacité de traverser facilement les membranes cellulaires des organites dans le cytoplasme et par conséquent il oxyde un nombre élevé de composés et structures cellulaires (**Gião et al., 2010**).

#### **a) Peroxydation lipidique**

Parmi les cibles les plus susceptibles à l'action des ERO sont les acides gras polyinsaturés comme l'acide linoléique et l'acide arachidonique. L'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir d'une molécule d'acide gras polyinsaturé initie le processus de la peroxydation lipidique. Un atome d'hydrogène est pris d'une deuxième molécule d'acide gras polyinsaturé résultant en un nouveau radical libre (**Ahsan et al., 2003**). Ces radicaux peuvent déclencher une chaîne de réactions de peroxydation au niveau des acides gras des phospholipides membranaires, conduisant à l'altération de la membrane et la perte de l'organisation de sa structure de bicouche lipidique qui est nécessaire à la fonction des enzymes liées et des récepteurs (**Evans, 2000**). Dans une première étape de la peroxydation, les acides gras se transforment en peroxydes lipidiques puis sous l'action des métaux de transition ils se décomposent en une série de sous-produits à savoir les aldéhydes et les hydrocarbures. La malonedialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (HNE) sont des exemples d'aldéhydes résultants de la peroxydation lipidique et sont utilisés comme marqueurs suivis lors de la détection de peroxydation lipidique chez les patients (**Pincemail et al., 1999**). Les ERO ainsi que la MDA et le HNE peuvent aussi oxyder les lipoprotéines de faible densité (LDL), riches en acides gras polyinsaturés causant un nombre de changements structuraux et fonctionnels (**Aruoma, 1999**). Ces LDL modifiées sont reconnues par les macrophages au sein desquels elles s'accumulent en formant des cellules spumeuses. En s'accumulant dans l'espace interstitiel, ces cellules contribuent au développement de l'athérosclérose (**Pincemail et al., 1999**).

#### **b) Oxydation des protéines**

Les structures (primaire, secondaire et tertiaire) et les fonctions des protéines sont aussi altérées par les ERO. Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. L'oxydation protéique catalysée par les ions métalliques conduit à l'addition de groupes carbonyles, la formation des liaisons croisées et la fragmentation des chaînes peptidiques. Les produits de la

peroxydation lipidique peuvent réagir avec le groupement sulphydryle de la cystéine ou avec les acides aminés basiques (histidine, lysine) affectant leurs caractéristiques biologiques (Ahsan *et al.*, 2003). Le dommage oxydatif des protéines peut affecter la fonction des récepteurs, des enzymes et des protéines de transport, etc., et peut même générer de nouveaux antigènes qui provoquent des réponses immunitaires (Aruoma, 1999; Favier, 2003). Les produits du dommage oxydatif des protéines peuvent contribuer au dommage secondaire comme l'inactivation des enzymes de réparation de l'ADN et la perte de fidélité des ADN polymérasés (Aruoma, 1999).

D'autre part, la surproduction des espèces réactives du nitrogène conduit aux réactions de nitrosylation des protéines et par conséquent à l'altération de leurs structures et l'inhibition de leurs fonctions (Valko *et al.*, 2007).

#### **c) Oxydation de l'ADN**

Le dommage oxydatif aux acides nucléiques inclue l'addition des bases et des groupes de sucres, cassures au niveau de la simple et double hélice ainsi que la formation des liaisons croisées avec d'autres molécules (Beckman et Ames, 1998). La thymine et la guanine sont plus susceptibles aux modifications suivies de la cytosine et l'adénine. La thymine glycol est le produit d'oxydation majeur, et sa présence dans l'urine sert d'indicateur du dommage de l'ADN. La réduction de la guanine résulte de l'ouverture de sa structure cyclique formant le formamidopyrimidine. Son oxydation, cependant, conduit à la formation du 8-hydroxy-2' déoxyguanosine, un produit majeur dont la présence dans l'urine sert de bio-marqueur du dommage oxydatif de l'ADN et qui est capable d'induire des mutations spécifiques conduisant au développement du cancer (Pincemail *et al.*, 1999).

#### **d) Oxydation des glucides**

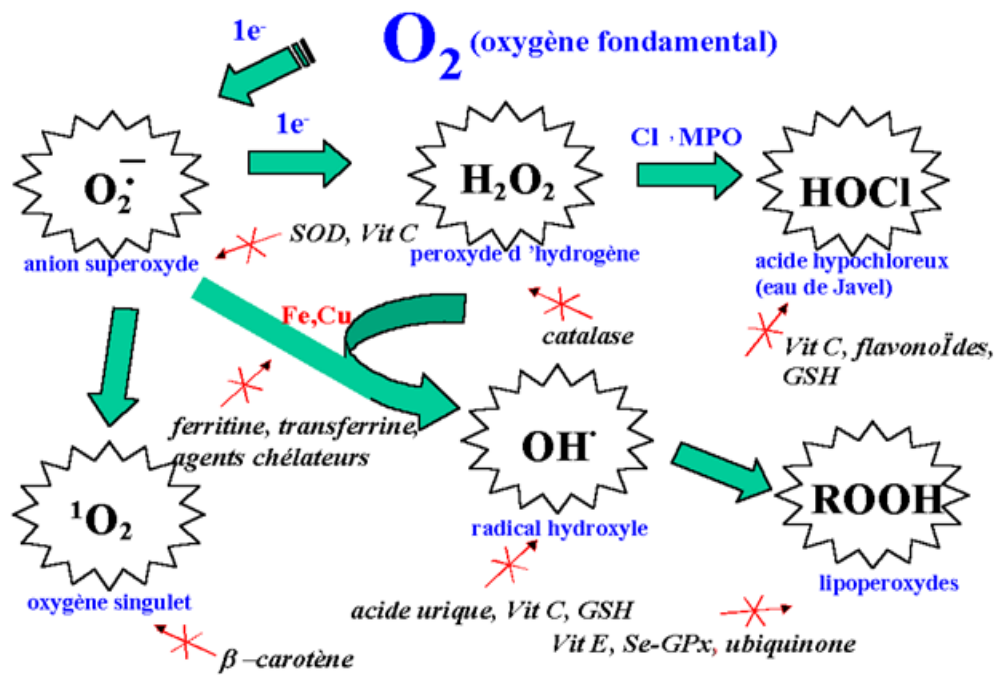
Le glucose peut s'oxyder en présence des ions métalliques conduisant à la libération des cétoaldéhydes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et OH. qui peuvent entraîner la coupure des protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde. Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Favier, 2003).

### **III. Les antioxydants**

Pour contourner les dommages causés par les ERO, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants (figure 19). Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible (Halliwell et Gutteridge, 2007). Ainsi, les antioxydants servent à contrôler le niveau des espèces réactives pour minimiser le dommage oxydatif (Tang et Halliwell, 2010).

### III.1. Antioxydants enzymatiques

Les superoxyde dismutases (SODs) sont une classe d'enzymes apparentées qui catalysent la dégradation de l'anion superoxyde en  $O_2$  et  $H_2O_2$ . Les cellules humaines possèdent une enzyme SOD mitochondriale ayant le manganèse dans son site actif (MnSOD) ainsi qu'une enzyme SOD cytosolique et une SOD extracellulaire ayant le cuivre et le zinc (Cu-ZnSOD) comme coenzymes (Favier, 2003). Due à sa relative stabilité, le  $H_2O_2$  produit par les SODs est régulé enzymatiquement par les catalases et les peroxydases (Blokina *et al.*, 2003). Les catalases sont des enzymes localisées dans les peroxysomes et catalysent la conversion du  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$ . Tandis que les glutathion peroxydases éliminent le  $H_2O_2$  par son utilisation dans l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) et requièrent le sélénium dans leur site actif pour cette activité (Aruoma, 1999). La glutathion réductase, qui est une enzyme contenant le FAD, génère GSH à partir de GSSG via le NADPH comme source de pouvoir réducteur (Aruoma, 1999).



**Figure 19.** Espèces réactives oxygénées et systèmes de protection permettant de limiter leur effet toxique. GSH: glutathion,  $Cl^-$ : anion chlorure, MPO: myéloperoxydase, SOD: superoxyde dismutase, Se-GPx: glutathion peroxydase séléno-dépendante

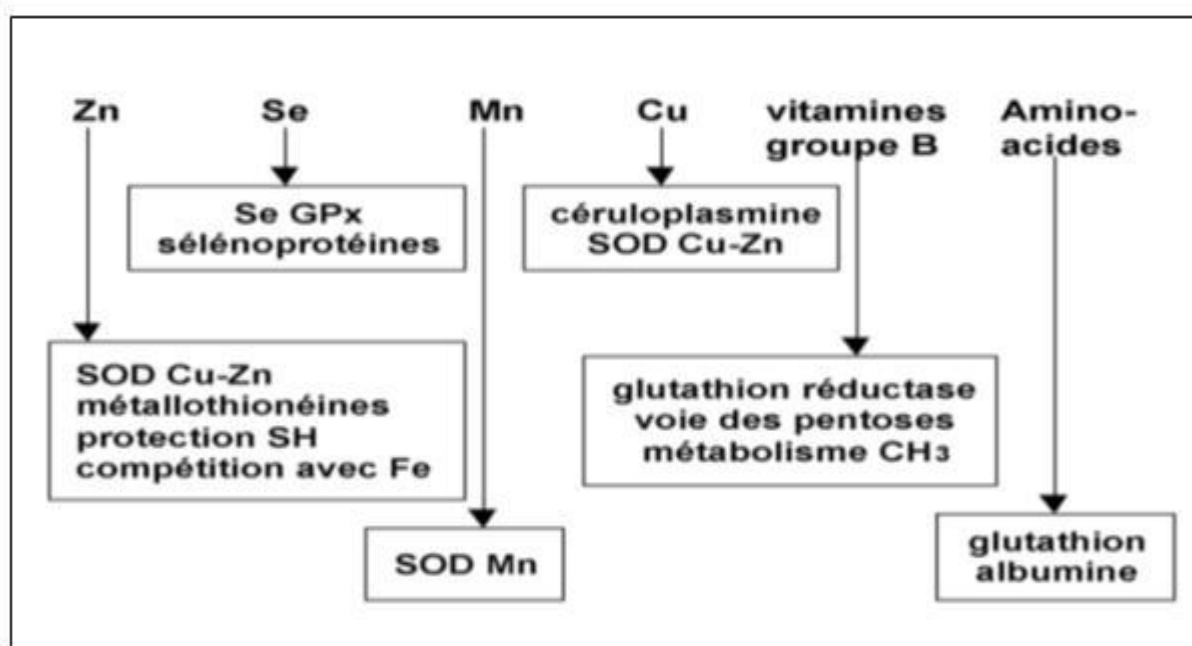
(Pincemail *et al.*, 1999).

### III.2. Antioxydants non enzymatiques

- **Le glutathion :** Le glutathion est un tripeptide dont la fonction thiol lui confère un rôle d'antioxydant, voire, de réducteur (donneur d'électron ou d'atome H), qu'il exerce vis-à-vis de nombreuses espèces oxydées, et en particulier vis-à-vis de l'eau oxygénée et des radicaux hydroxyles (**Gardès-Albert *et al.*, 2003**). Toutefois, le rôle protecteur de GSH semble provenir de sa capacité à réagir avec les radicaux. Dans ce cas, un phénomène de "réparation" des radicaux R· en produits réduits RH se produit (**Lal, 1994**).
- **L'acide ascorbique :** L'ascorbate (vitamine C) est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés aussi bien hautement réactifs tels que les radicaux OH· que très peu réactifs tels que les radicaux O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>. Sa capacité de donation d'électrons dans une large gamme de réactions enzymatiques et non enzymatiques le qualifie de meilleur agent de détoxification des radicaux oxygénés dans la phase aqueuse (**Blokhina *et al.*, 2003**). En réagissant avec ces divers radicaux, l'ascorbate (AscH<sup>-</sup>) est oxydé en radical ascorbyle (Asc·<sup>-</sup>) qui est relativement inerte vis-à-vis des molécules biologiques. De plus, l'ascorbate est muni d'une propriété importante: la réparation de deux autres antioxydants, le glutathion (GSH) et l' $\alpha$ -tocophérol ( $\alpha$ -TH) à partir de leurs formes radicalaires. L'ascorbate est recyclé, tout au moins en partie, par dismutation du radical ascorbyle (**Gardès-Albert *et al.*, 2003**).
- **Le  $\alpha$ -tocophérol :** Parmi les tocophérols naturels, le  $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) est le plus efficace in vivo. Son rôle essentiel est de capter les radicaux lipidiques peroxydes (LOO·) alkoxyl (LO·) et alkyl (L·) qui propagent les chaînes de peroxydation lipidique. La réaction entre les radicaux lipidiques et le  $\alpha$ -tocophérol ( $\alpha$ -TH) se passe au niveau de l'interphase membrane-eau ou ce dernier perd un atome d'hydrogène et se transforme en radical  $\alpha$ -tocophéryle ( $\alpha$ -T·), tandis que le radical peroxyde est réduit en une molécule d'hydroperoxyde (**Blokhina *et al.*, 2003**). Le recyclage de la vitamine E par des systèmes réducteurs dont le plus important est l'ascorbate lui permet de jouer son rôle d'antioxydant à plusieurs reprises (**Gardès-Albert *et al.*, 2003**).
- **Les caroténoïdes :** Les caroténoïdes tels que le  $\beta$ -carotène constituent une vaste famille de composés qui sont généralement des bons capteurs de radicaux hydroxyles et peroxydes ce qui les rend susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique. En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capter l'oxygène singulet, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire. L'ensemble de ces propriétés antioxydantes permet d'expliquer, en partie, les bénéfices apportés par les régimes alimentaires basés sur une consommation de fruits, de légumes, de thé et d'autres produits végétaux (**Gardès-Albert *et al.*, 2003**).

- **Les oligoéléments :** Les oligoéléments ou les éléments-trace (zinc, sélénium, cuivre, manganèse) constituent des cofacteurs nécessaires aux activités des enzymes antioxydantes (figure 20). D'autres constituants de l'alimentation, comme les vitamines du groupe B, le chrome ou le magnésium agissent comme des antioxydants indirects via la régulation de l'homocystéinémie (vitamines du groupe B), l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (chrome) ou la lutte contre l'inflammation (magnésium).

La synthèse du glutathion, un des antioxydants le plus important de l'organisme, dépend fortement de l'apport nutritionnel en acides aminés tels que la méthionine (**Roussel, 2009**).



**Figure 20.** Oligoéléments nécessaires aux activités des enzymes antioxydantes

(Roussel, 2009).

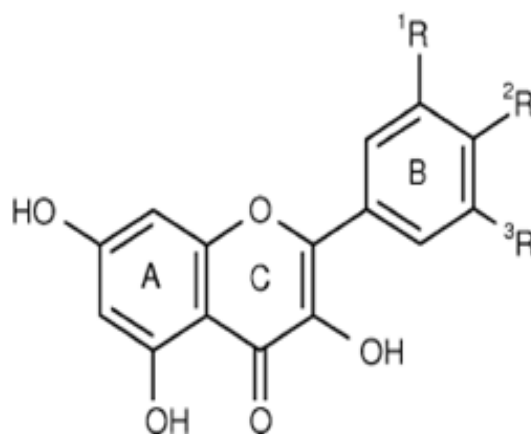
- **Les protéines plasmatiques :** Les transferrines sont des protéines plasmatiques douées d'activité antioxydante car elles possèdent une capacité de fixation importante au fer. Elles se trouvent saturées à 30% en ce métal de transition de sorte qu'il n'est pas possible de trouver du fer libre dans le sang de sujets sains.

Dans des cas pathologiques, le fer peut être libéré de ces protéines de transport (ferritine, lactoferrine) et se retrouver dans le sang sous une forme libre capable d'initier des réactions productrices de ERO (**Pincemail et al., 1999**).

- **Les polyphénols :** Plusieurs études épidémiologiques ont montré qu'il y a un rapport inverse entre la prise d'aliments riches en polyphénols (les fruits et les légumes) et le risque des maladies liées à l'âge comme les maladies neurodégénératives (**Hu, 2003; Bubonja-**

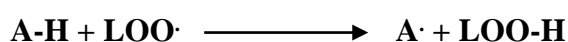
**Sonje *et al.*, 2011**). Cette relation est souvent attribuée aux puissantes activités anti-oxydantes des flavonoïdes et d'autres polyphénols associées à leurs propriétés redox permettant d'éliminer les effets d'espèces réactives de l'oxygène (**Ketsawatsakul *et al.*, 2000**) ainsi que de chélater les différents métaux de transition (**Gulcin *et al.*, 2010**).

Les flavonoïdes sont de puissants antioxydants vis-à-vis des radicaux libres dus à leur propriété de donation d'atomes d'hydrogène disponibles dans les substituants hydroxyles de leurs groupes phénoliques (**Sandhar *et al.*, 2011**). Leur capacité de donation d'hydrogène augmente avec l'augmentation de l'hydroxylation de leurs cycles phénoliques. Cette caractéristique structurale peut être observée dans les flavonoles comme le kaempférol quercétine et myricétine ou l'activité antioxydante est croissante en fonction du nombre des groupements OH dans la molécule (figure 21) (**Le *et al.*, 2007**).



**Figure 21.** Structures de quelques flavonoles. Kaempférol: 2R=OH, 1R =3R =H; Quérétine: 1R=2R=OH, 3R=H; Myricétine: 1R=2R=3R=OH.

En outre, les polyphénols agissent contre la peroxydation lipidique de deux façons: par la protection des lipides cibles contre les initiateurs de l'oxydation ou par stabulation de la phase de propagation. Dans le premier cas, les antioxydants dits préventifs entravent la formation des ERO ou éliminent les espèces réactives responsables de l'initiation de l'oxydation comme  $O^{\cdot-2}$ ,  $^1O_2$  et  $OH^{\cdot}$ . Dans le second cas, les antioxydants dits briseurs de chaîne perdent généralement un atome d'hydrogène en faveur des radicaux propagateurs de l'oxydation ( $LOO^{\cdot}$ ) pour stopper la propagation de la peroxydation (**Laguerre, 2007**) selon la réaction ci-dessous.



Les flavonoïdes exercent des effets antioxydants aussi par la chélation des ions métalliques. Il a été postulé par Verdan et ses collaborateurs (2011) que la quercétine et myricétine forment des complexes avec les différents métaux ( $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ , etc.) via les groupements hydroxyle des trois cycles: les groupes hydroxyles du cycle B ainsi que les groupes 3-hydroxy-4-céto et 5-hydroxy-4-céto des cycles A et C. Néanmoins, les deux groupes 3-hydroxy et 5-hydroxy sont particulièrement intéressants car ils sont en compétition pour la fixation du métal .

En plus, les flavonoïdes sont des inhibiteurs des enzymes impliquées dans la production des ERO. En effet, **Sandhar et ses collaborateurs (2011)** ont rapporté que les flavonoles quercétine, kaempferol et galangine, ainsi que le flavone apigénine sont des inhibiteurs des enzymes du cytochrome P450 impliquées dans la production des ERO.

#### **IV. Méthode d'étude d'activité des antioxydants :**

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer l'activité antioxydante des aliments et les systèmes biologiques (**Ali *et al.*, 2008 ; Scherer et Godoy, 2009**). Elles peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes : soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron (**Sanchez-Moreno, 2002 ; Huang *et al.*, 2005**).

Les techniques du premier groupe sont employées pour évaluer la peroxydation lipidique en utilisant un substrat lipidique ou lipoprotéique. La quantification de cette propriété est exprimée par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation (**Sanchez-Moreno et Larrauri, 1998**).

Alors, les méthodes du deuxième groupe sont celles qui interviennent dans la mesure de l'habilité du piégeage des radicaux libres. Elles comportent le balayage du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), de l'acide hypochloreux (HOCl), de l'hydroxyle ( $^{\circ}OH$ ), des anions superoxyde ( $O^{\circ-2}$ ), du peroxyde ( $ROO^{\circ}$ ) et de l'oxyde nitrique ( $NO^{\circ}$ ) (**Sanchez-Moreno, 2002**).

Parmi ces techniques, nous citons :

- la méthode d'ORAC (Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène) (**Cao *et al.*, 1993**).
- la méthode d'ABTS (2,2-azinobis (3-éthyle-benzothiazoline-6-sulphonate) ou TEAC (Capacité antioxydante équivalente de Trolox) (**Miller *et al.*, 1993**)
- la méthode FRAP (Capacités réductrices ferriques d'antioxydants) (**Benzie et Strain, 1996**).
- La méthode du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (**Brand-Williams *et al.*, 1995**).

- la méthode de DMPD (Balayage du radical cation N, N- dimethyl-phenylenediamine) (**Li et al ., 1994**).
- la méthode TOSC (Capacité du piégeage des oxy-radicaux totaux)(**Winston et al ., 1998**).
- la méthode TRAP (Paramètre du piégeage du radical total) (**Wayner et al., 1985**).
- la méthode photochimiluminescence (PCL) (**Popov et al ., 1987**)
- la méthode d'hémolyse (**Charfi, 1995**).

**I. Matériel végétal :**

Notre travail expérimental ayant pour objet l'étude de l'activité antioxydant des extraits de la Plante médicinale *Alchemilla Vulgaris.L* obtenus à partir d'une phytothérapeutes .

L'étude expérimental a été effectuée au sein du laboratoire de Biochimie, Université Abbés Laghrour - Khenchela.

**I.1.Préparation du matériel :**

La partie aérienne sèche de la plante est récupérée, stockée dans des bocaux fermés hermétiquement et placée dans un endroit à l'abri de la lumière et de la chaleur avant son utilisation après son broyage.

**I. 2. Appareils et produits chimiques**

<b>Réactifs</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hexane</li> <li>➤ Méthanol ou éthanol</li> <li>➤ Chloroforme</li> <li>➤ Acétates d'éthyle</li> <li>➤ 1-butanol</li> <li>➤ <math>\text{Na}_2\text{CO}_3</math>: préparé dans l'eau distillée</li> <li>➤ Réactif de Folin ciocalteau: dilué au 1/19 avec de l'eau distillée.</li> <li>➤ <math>\text{AlCl}_3</math>: préparé Dans le méthanol.</li> <li>➤ Solution de DPPH préparée dans Le méthanol</li> <li>➤ Acides ascorbique</li> </ul>
<b>Appareillage</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Balance de précision</li> <li>➤ Rota vapeur.</li> <li>➤ Spectrophotomètre</li> </ul>

### I.3. Préparation des extraits.

#### I.3.1 Préparation de l'extrait méthanolique

La partie aérienne de la plantes (20g) fraîchement récoltée sont mise à macérer dans un mélange méthanol/eau (80 :20 V/V) pendant 48 heures à température ambiante. L'extrait hydroalcoolique est récupéré après filtration du mélange, le méthanol est éliminé du filtrat par évaporation à l'aire pendant 24h permettant ainsi d'obtenir l'extrait méthanolique qui est conservé à température ambiante pour le dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes (Cetkovic *et al.*, 2007).

#### I.3.2.Préparation des l'extraits aqueuses .

Les différentes étapes de la préparation des phases n-hexane, chloroformique, acétate d'éthyle et *n*-butanolique de la partie aérienne du plante selon la méthode suivante :

La quantité de matériel végétal obtenue (50 g) a subit une macération dans un mélange hydroalcoolique (Ethanol/Eau ; 80 : 20 ; v/v) pendant 72 heures. La macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas de 24 heures.

L'homogénat est filtré sur du papier filtre Wattman N°1.

Les trois extraits hydroalcooliques sont additionnés et évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température de 40 - 50 °C. L'extrait sec est conservé après l'ajout de 20ml d'eau distillé, a température ambiante.

La solution ainsi obtenue et filtré puis laissée au repos pendant une nuit pour décantation. Cette décantation permet le dépôt des lipides, de la chlorophylle, des polyphénols, des flavonoïdes.

Après filtration on obtient une solution aqueuse claire. Cette phase aqueuse subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par n-hexane, le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. Les quatre phases organiques récupérées sont séchées.

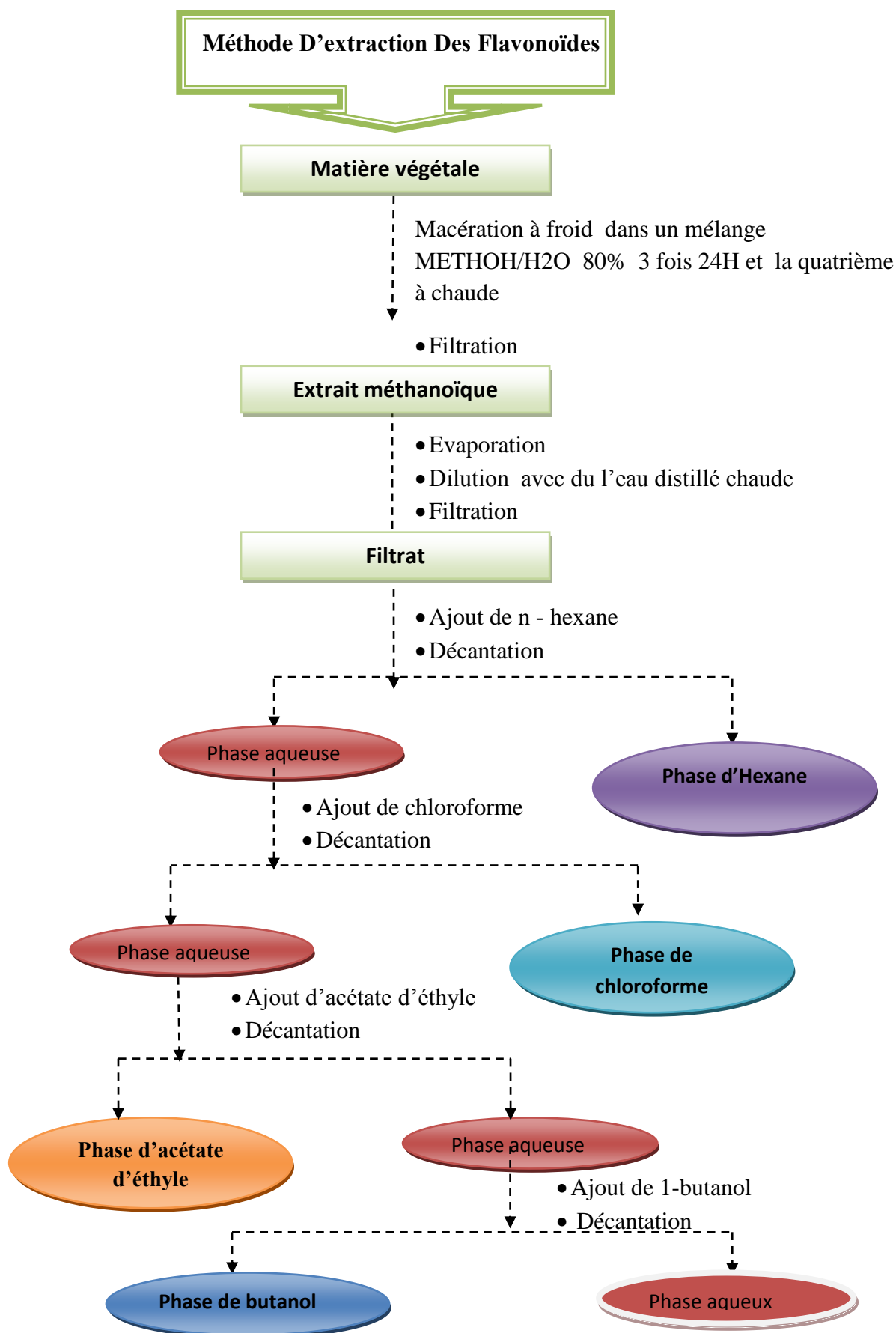


Figure22. Protocole D'extraction Des Flavonoïdes (Cetkovic *et al.*, 2007).

#### I.4. Détermination des rendements d'extractions

Le rendement des extraits est le rapport entre le poids de l'extrait sec et le poids de la solution . Il est exprimé en pourcentage 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 solution en gramme (g).

## II. Méthodes de caractérisation quantitative des polyphénols :

La caractérisation quantitative des différentes phases de la plantes a été réalisée de la Manière suivante :

### II.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit en 1965 par Singleton et Rossi. Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines plus diverses.

#### II.1.1. Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$ ). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleu de tungstène et demolybdène (Ribéreau, 1968). La coloration produite, dont l'absorption maximum à environ 760-765 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Boizot et Charpentier, 2006).

#### II.1.2. Méthode de dosage

Les polyphénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie, dont la concentration est de 1mg /1ml, suivant le protocole appliqué en 2006 par Wong et ses collaborateurs. Brièvement 200µl de chaque extrait (dissous dans le méthanol) ont été ajoutés à 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu 1/19 . Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 4 minutes.

Après l'incubation 800 µl de la solution de carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7.5%) a été ajoutée. Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 2 heures dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance de tous les extraits a été mesurée par un spectrophotomètre (VIS BECKMAN Modèle 34) à 765 nm.

La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations (0-200 µg/ml), dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage. Les résultats sont ainsi

exprimés en ug d'équivalent d'acide gallique par 1mg poids sec de l'extrait (ug EAG/1mg EXS). Toutes les mesures sont répétées 3 fois.

## II.2.dosage des flavonoïdes :

La méthode de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) cité par (Djeridane *et al.*, 2006) et (Boudiaf, 2006) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits.

### II.2.1 Principe :

1 ml 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' $\text{AlCl}_3$  (2% dans le méthanol). Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation.

Le blanc est préparé de la même façon sauf que l'extrait est remplacé par le solvant.

La quantification des flavonoïdes à été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y = a x + b$ ) réalisé par un standard d'étalon "la quercétine" à différentes concentrations (0,5,10,15,20,25,30,35,40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EQ}/\text{mg}$ )

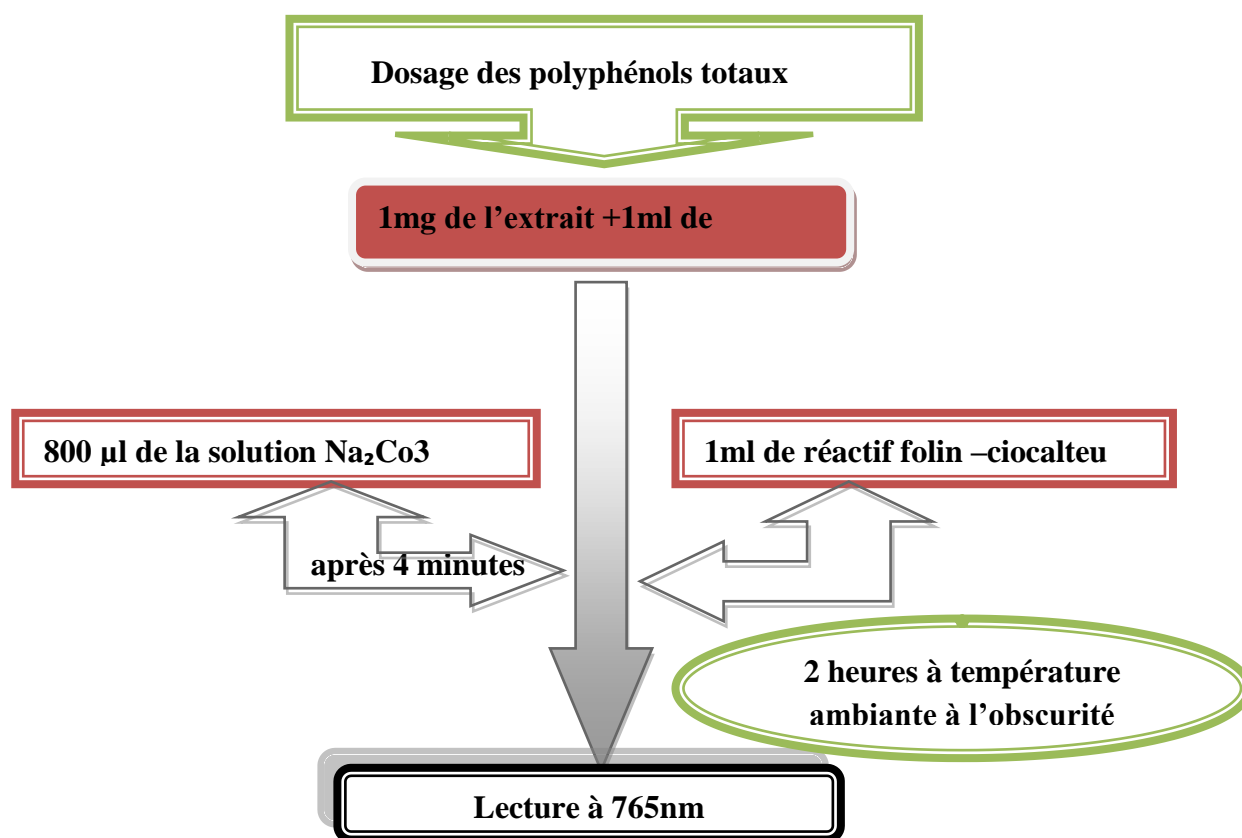


Figure 23. protocole de dosage des composés phénoliques (Wong *et al.*, 2006).

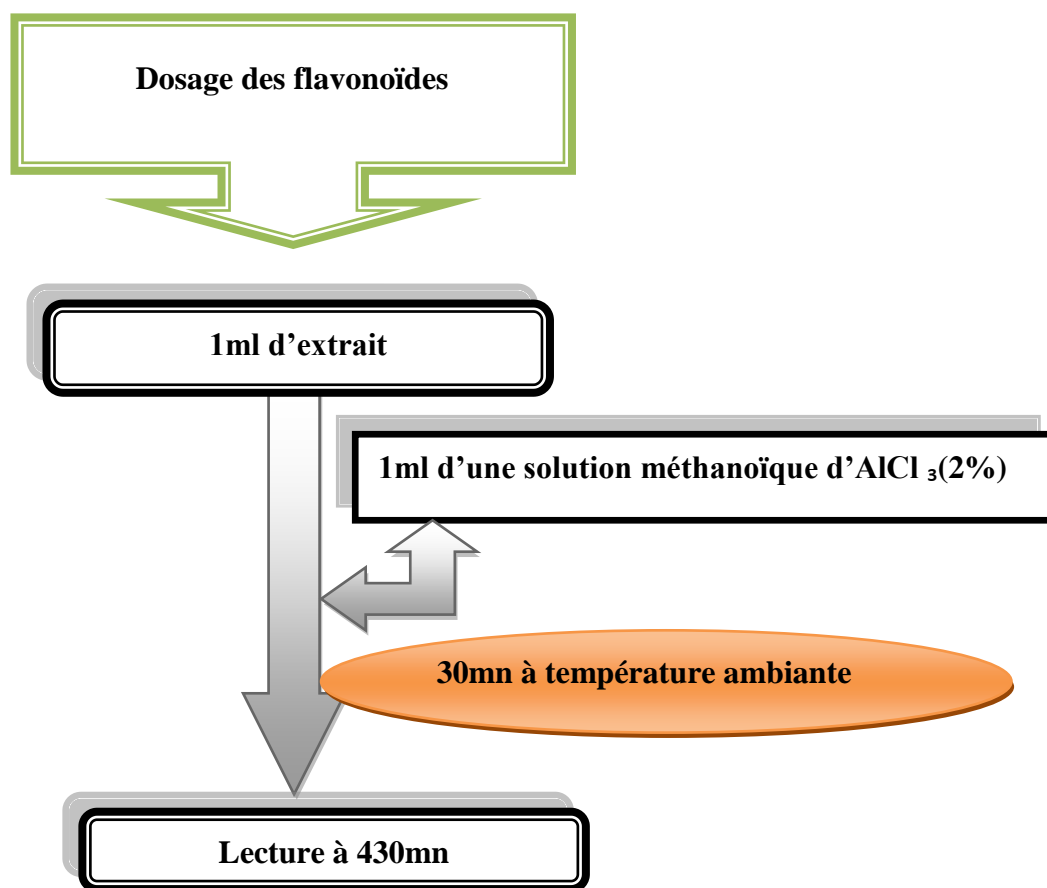


Figure 24. protocole de dosage des flavonoïdes (Djeridane *et al.*, 2006).

### II.3. Méthodes de dosage des activités antioxydantes *in vitro*

#### II.3.1. Le test de piégeage du radical DPPH

##### II.3.1.1. Principe

Le test DPPH (**2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl**) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante.

En effet, le DPPH se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. La présence de ces radicaux DPPH• donne lieu à une coloration violette foncée de la solution. La réduction des radicaux DPPH• par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution (Molyneux, 2004). Le changement de couleur peut être suivi par spectrophotométrie à 517nm et de cette façon le potentiel antioxydant d'une substance ou un extrait de plante peut être déterminée (Popovici *et al.*, 2010 ; Molyneux, 2004).



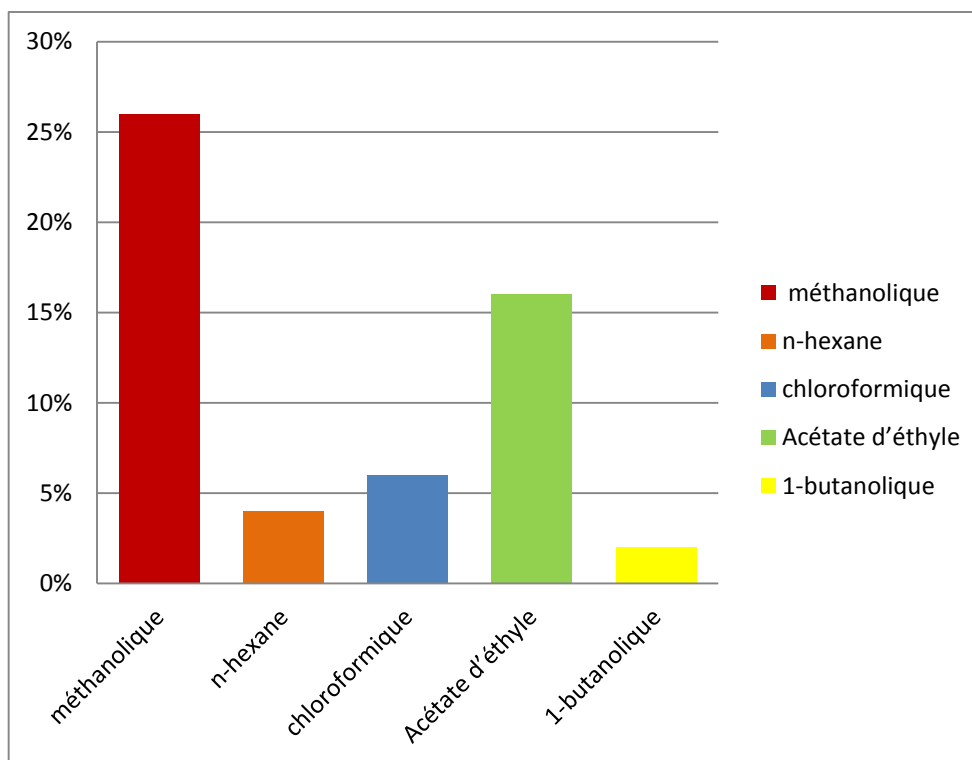
### I. Détermination de rendement d'extraction:

L'extraction et la préparation des phases *n*-hexane, chloroformique, acétate d'éthyle et *n*-butanolique de la partie aérienne du plante a permet d'obtenir des extraits de différente couleurs, vert fonce, marron, jaune et un extrait méthanolique vert foncé.

Le rendement de ces extraits après le séchage à l'air ont été déterminés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 4.** Rendements des extraits de la plante *Alchemilla vulgaris L.*

Matière végétale (g)	Extrait	Couleur	Masse (g)	Rendement %
20g	méthanolique	Vert foncé	6.185	26%
	<i>n</i> -hexane	Vert foncé	2g	4%
50g	chloroformique	Vert claire	3g	6%
	Acétate d'éthyle	marron	8g	16%
	<i>n</i> -butanolique	jaune	1g	2%



**Figure26.** les différents rendements des extraits de la plante *Alchemilla vulgaris L.*

Les résultats obtenus montrent que le rendement en extrait méthanolique (26%) est légèrement supérieur à celui des extraits *n*-hexane (4%), chloroformiques (6%), acétate d'éthyle (16%) et *n*-butanolique (2%).

D'une manière générale, les teneurs en extraits secs varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille mais également en fonction des paramètres due aux techniques d'extraction utilisées, et à la composition chimique qui diffère d'un extrait à l'autre, la température, le solvant d'extraction, la taille des particules.

Il a été démontré que pour l'extraction par les solvants à température élevée permettait d'obtenir des rendements plus élevés en extraits secs que lorsqu'ils sont obtenu à température ambiante aussi la méthode de macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait tout en préservant la bio-activité de ses constituants (Majhenic *et al.*, 2007).

## II. Quantification des composés phénoliques :

### II.1 .Dosage des composés phénoliques totaux :

La teneur en phénols totaux, des extraits méthanolique, acétate d'éthyle et *n*-butanolique estimée par la méthode de Folin- Ciocalteu pour chaque extrait à partir d'une gamme étalon établie avec différentes concentrations d'acide gallique .

Les résultats obtenus sont exprimés en  $\mu\text{g}$  équivalent d'acide gallique par mg de l'extrait ( $\mu\text{g EAG/mg E}$ ). En plus de sa sensibilité, cette méthode de dosage représente une productibilité puisque l'absorbance est étroitement corrélée à la concentration de l'acide gallique utilisé dans la gamme étalon,  $R^2 = 0,998$ .

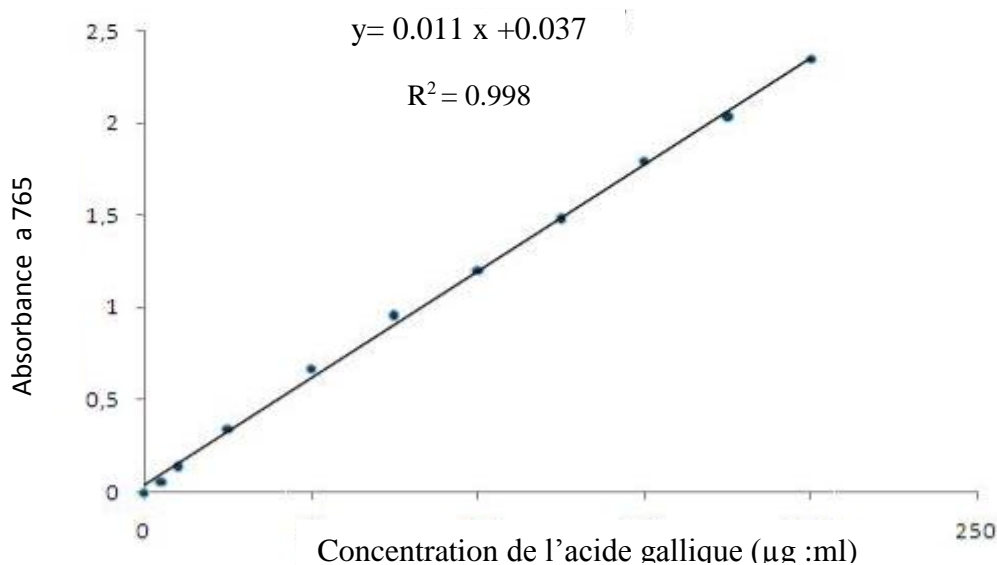


Figure 27. Droite d'étalonnage de l'Acide Gallique ((Moyenne  $\pm$  SD de trois essais).

Les résultats sont montrés dans le tableau ci-dessus

**Tableau 5.** Teneur en polyphénol des extraits méthanolique , acétate d'éthyle et n-butanolique de la plante *Alchemilla vulgaris L.*

Extrait	Polyphénol( ug EAG/mg E)
acétate d'éthyle	40.72 ± 0,012
méthanolique	41.1 ± 0,009
n-butanolique	16 ± 0,011

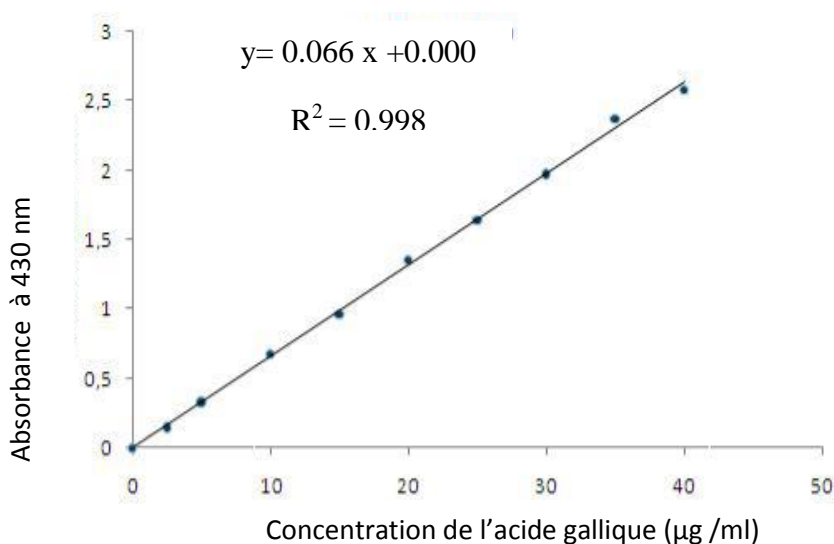
D'après les résultats, on peut constater que tous les extraits de la plante étudiés, sont riches en polyphénols mais avec des quantités différentes.

La (tableau 5) montre que l'extrait méthanolique possède la plus haute teneur en polyphénols ( $41.1 \pm 0,009$  ug EAG/mg E ), suivi par l'extrait acétate d'éthyle ( $40.72 \pm 0,012$  ug EAG/mg E ) et enfin l'extrait n-butanolique ( $16 \pm 0,011$  ug EAG/mg E ).

## II.2.Teneur des extraits en flavonoïdes

La quantification de flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y=ax$ ) réalisé par une solution étalon (Quercitine) à différents concentration.

La teneur en flavonoïdes de chaque extrait a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalent en Quercitine par gramme d'extrait , la mesure de la densité optique a été effectuée à la longueur d'onde de 415nm.



**Figure 28.** Droite d'étalonnage de la quercétine ((Moyenne ± SD de trois essais).

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 6.** Teneur en flavonoïdes des extraits méthanolique , acétate d'éthyle et *n*-butanolique de la plante *Alchemilla vulgaris l*

<i>Extrait</i>	<i>Flavonoïdes</i> ( ug EQ/mg E)
<b>méthanolique</b>	<b>4.22±0.017</b>
<b>acétate d'éthyle</b>	<b>2.28±0.002</b>
<b><i>n</i>-butanolique</b>	<b>0.93±0.002</b>

D'après les résultats du (**tableau 6**) que la quantité de flavonoïdes varie entre **4.22** et **0.93** ug EQ/mg E de la matière sèche. Le taux de flavonoïdes le plus élevé ont été détecté dans l'extrait méthanolique, il est 2 fois supérieur à celle trouver dans la fraction d'acétate d'éthyle (**2.28** ug EQ/mg E) aussi bien dans l'extrait *n*-butanol (**0.93** ug EQ/mg E).

#### **Discussion :**

les extraits de la plante contenant une faible quantité des flavonoïdes par rapport aux composés phénoliques totaux , il doit contenir d'autres classes de composé phénoliques ce qui a confirmé par (**Wichtl et al.,2003**) ; (**Bruneton,2009**) qui trouvent que cette drogue est riche en tanins hydrolysables (agrimoniine, pédunculagine, laevigatine ) représentant au minimum 6% de ses constituants exprimés en pyrogallol (**Wichtl et al., 2003**) ; (**Bruneton,2009**).Elle contient aussi des flavonoïdes (environ 2%) tels que glycosides et quercétine libres (**Wichtl et al.,2003**) .On note aussi la présence de triterpènes (**Bruneton,2009**) . Des proanthocyanidines sont aussi identifiés ainsi que de nombreux composés phénoliques (acides gallique, ellagique, chlorogénique) **Moller C. et al., (2009)**.

Aussi **Okuda et al ., 1992** a montré que les tannins hydrolysables sont largement distribuer dans la famille des *Rosaceae* spécialement dans *A. vulgaris*.

L'extrait méthanoïque indique la présence des différentes groupes fonctionnels tel que les alcènes, les alcools, les esters, les acides carboxyliques, les composé nitrés, les composants aliphatiques et les alcanes (**Altameme et al ., 2015**) Cependant il est plus riche en polyphénols que les 2 autres fraction d'acétate d'éthyle et de butanol, cela due à la faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes

d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines etc. (**Gomez et al., 2006**).

La teneur en polyphénols et en flavonoïdes peut être influencée par d'autres paramètres :

Le solvant d'extraction élu des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique (**Djeridane et al., 2007**). Le dosage par ce réactif donne donc une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (**Tawaha et al., 2007**).

La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux. (**Lee et al., 2003**). Selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stades de développement (**Robards et al., 1999 ; Gresele et al., 2011**). le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante. (**miliauskas et al., 2004**).

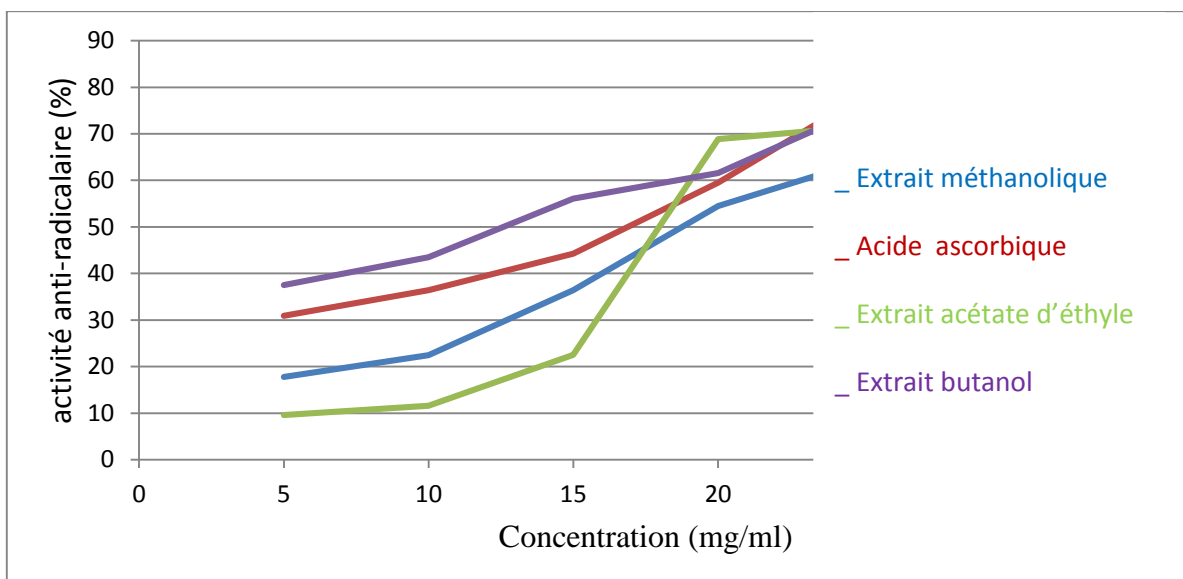
les facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies, etc. (**miliauskas et al., 2004**).

Il a été prouvé que les teneurs des phénols totaux et des flavonoïdes sont élevées lorsque le milieu de vie de la plante n'est pas adéquat, dans ce cas la plante favorise la synthèse des métabolites secondaires afin de s'adapter et survivre (**Tim et al., 2005 ; Piquemal 2008**).

### **III.L'étude du pouvoir antioxydant :**

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation (**Rice-Evans CA, et al., 1995**). De nombreuses méthodes sont utilisées actuellement pour évaluer cette activité. Le radical DPPH a été largement utilisé pour l'étude de l'activité antiradicalaire des différents extraits végétaux. Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure activité antioxydante des composés phénoliques (**Brand-Williams W, et al., C 1995**). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. La réduction de ce radical s'accompagne par son passage de la couleur violette caractéristique de la solution de DPPH à la couleur jaune mesurable par spectrophotométrie à 517 nm. À partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition en utilisant la formule donnée auparavant. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes

représentées sur la (Figures 29) qui montrent la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de nos extraits.



**Figure 29.** Changement de l'activité anti-radicalaire des extraits d'alchemilla vulgaris en fonction de la concentration ( moyenne±SD de trois mesure ).

Nous avons déterminé graphiquement la concentration correspondante à 50 % d'inhibition (IC50), L'extrait possédant la valeur IC50 la plus basse, exerce l'activité anti-radicalaire la plus puissante.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 7.** les valeurs d'IC50 de différents extraits étudié

Phase	IC50 (mg/ml)
méthanolique	20.78
acétate d'éthyle	10.50
n-butanolique	12.42
A.ascorbique	15.16

**Discussion :**

Des études minimales sont apportées sur cette plante, donc Il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie .

L'activité antiradicalaire d'extrait méthanolique pourrait s'expliquer par la richesse de la plante en tanins hydrolysables représentant au minimum 6% de ses constituants Par

ailleurs, Uchida et ses collaborateurs suggèrent que les tanins ont une action de piégeage radicalaire sur le radical 1-1 diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (De Bruyne et al., 1999). Se qui a démontrer par latache qui ce trouve que le genre *Alchemille* Les activités anti-radicalaires et antioxydantes semblant fortement liées à la teneur en tanin 1, tanin hydrolysable.

1-L'étude montre que les extraits méthanoliques sont moins actifs que les autres extraits acétate et butanol au contraire de ce qui a trouvé Ondrejovic et al. (2009) que les extraits méthanoliques sont plus actifs que les autres extraits d'acétate. Il faut toute fois souligner qu'il ne s'agit ni de même solvant ni de même protocoles d'activité, même la durée de conservation et la température pourrait expliquer l'écart observé entre nos résultats et ceux de la bibliographie .

2- l'activité de la fraction butanol est due à leur composition en flavonoïdes glycolisé contient aussi des flavonoïdes (environ 2%) tels que glycosides d'où( D'Agostino et al., 1998) qui permet d'identifier ' flavonoïdes de type glycosile quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside, quercetin-3-O-β-Drutinoside, quercetin-3-O-α-D-arabinofuranoside, 3-Okaempferol- 6''-O-(p-coumaroyl)-β-D-glucopyranoside dans cette drogue .

3- l'extrait acétate d'éthyle est plus actif que celle de butanol( Shahidi et Naczk, 2006) montre que les formes aglycones des flavonoïdes trouvés le plus souvent dans les fractions d'acétate d'éthyle sont les plus actives que les formes glycosylées.

Généralement, les polyphénols avec un nombre élevé des groupements hydroxyles présentent l'activité antioxydante la plus élevée (Heim et al., 2002) due à leur pouvoir de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres (Torres de pinedo et al., 2007), ce qui peut expliquer en partie que l'activité anti-radicalaire est dépendante du nombre, de la position et de la nature des substituant sur les cycles B et C (groupements hydroxyles, metaxylés, glycosylés) et le degré de polymérisation (Popovici et al., 2010). Ainsi, l'effet antioxydant n'est pas seulement dose-dépendant mais également structure-dépendant (Rodriguez-Bernaldo et al.,2010).

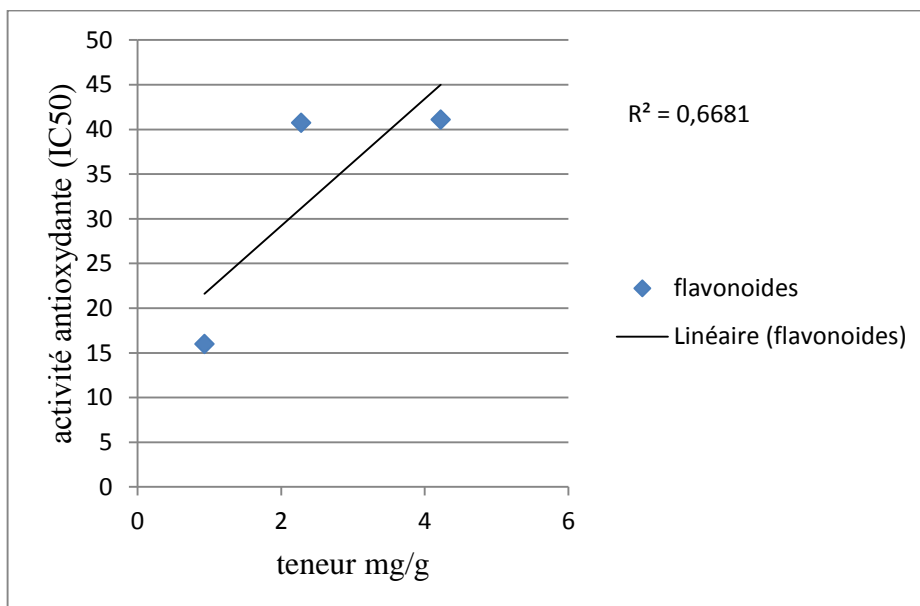
La teneur des polyphénols totaux des extraits du cumin s'est corrélée significativement ( $R^2 = 0.977$ ) avec leurs activité anti-radicalaire. De même pour les extraits du romarin avec un coefficient de corrélation égale à 0.997.

Selon (Turkmen et al., 2007) les polyphénols semble être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale. (Turkmen et al., 2007) ont constaté que les extraits du thé noir ayant une activité antioxydante très élevée, ont également un contenu plus élevé en polyphénols. Les autres

composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés, par ce que la synergie entre les différents produits chimiques l'un avec l'autre devrait être pris en considération dans l'activité biologique (**Bourgou et al., 2008**).

D'un autre coté, la fraction phénolique n'incorpore pas tous les antioxydants et les interactions synergiques entre les antioxydants dans un mélange fait que l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration, mais également de la structure et la nature des antioxydants (**Falleh et al., 2008**).

On a essayé de trouver une corrélation linéaire entre les valeurs d'IC50 et les teneurs en flavonoïdes, le graphe avec le coefficient de corrélation est présent dans la figure suivante :



**Figure 30.** Courbe de corrélation entre l'activité antioxydante d'IC50 et la teneur en flavonoïdes des différents extraits.

Selon (**Brunneton, 2009**) la famille des composés phénolique est dotée de nombreuses activités biologiques. Nous avons donc voulu vérifier s'il y a une corrélation positive entre l'activité antioxydante et la teneur en flavonoïdes totaux de notre plante.

D'après ces résultats, on remarque qu'il existe une moyenne corrélation entre les valeurs d'IC50 du test DPPH et de la teneur en flavonoïdes ( $R^2 = 0.668$ ). Ceci peut être expliqué par la présence des molécules antioxydantes actives autres que les flavonoïdes.

L'activité antioxydante est dû à la synergie des composés phénoliques dans les extraits et dépend non seulement de la concentration mais aussi de la structure de ces molécules (**Rice-Evans *et al.*,1997**) .

Selon (**Turkmen *et al.*, 2007**) les polyphénols semble être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale.. Les autres composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés, par ce que la synergie entre les différents produits chimiques l'un avec l'autre devrait être pris en considération dans l'activité biologique (**Bourgou *et al.*, 2008**).

## Conclusion

Les plantes aromatiques et médicinales sont la source de la majorité des antioxydants naturels et elles restent encore sous exploitées dans le domaine médicale .Dans l'industrie pharmaceutique, sachant que les anti oxydants sembleraient de manière significative à la prévention des maladies, le développement de nouveaux médicaments à base d'antioxydants d'origine naturelle doit être à l'ordre de jour.

Dans le cadre de notre travail, nous sommes intéressés à l'étude du pouvoir antioxydant des extraits flavoniques d'*Alchemilla vulgaris* une plante de la famille *Rosaceae*.

La première étape qui consiste à l'extraction des composés phénoliques suite à une macération puis un fractionnement afin d'obtenir les par quatre factions ; d' hexane, de chloroforme, d'acétate d'éthyle et de n-butanol. Le rendement est calculé pour chaque extrait ou chaque fraction.

La quantification par des méthodes spectrophotométriques nous a permis de déterminer les teneurs en phénols totaux par l'usage de réactif du Folin-Ciocalteu et la teneur flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium

Les résultats obtenus révèlent que les extraits sont plus riche en polyphénols que les flavonoïdes .ou l'extrait de brut méthanolique a enregistré la grande teneur en polyphénols et en flavonoïdes.

Les résultats obtenus de l'étude de l'activité antioxydante nous amène à avancer les conclusions suivantes :

- Tous les extraits ont révélé des réponses inhibitrices à différents niveaux à piéger les radicaux DPPH
- Les fractions d'acétate d'éthyle et de butanol sont les meilleurs capteurs des radicaux libres que l'extrait méthanolique.

D'où nos perspectives seraient donc intéressant de réaliser d'autres études plus approfondies et complémentaires de diverses activités biologiques de ces composés phénoliques de cette plante *in vitro* et *in vivo*, et aussi d'identifier les structures moléculaires de par la combinaison d'autres méthodes physico-chimiques à savoir la spectrophotométrie IR, la RMN et ses séquences bidimensionnelles ainsi que la spectrométrie de masse qui peuvent donner une indication importante sur la nature des composés et leurs mode de substitution.

A

- Ahsan .H., Ali. A., et Ali .R .(2003).** Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical and Experimental Immunology*, 131 ; p : 398-404.
- Ali-Shtayeh. M.S., Jamous R.M. (2008).** **Traditional Arabic Palestinian Herbal Medicine.** Biodiversity and Environmental Research center (BERC), Palestine,
- Altameme. H. J., Hameed .I .H., et Abu-serag N .A. (2015).** Analysis of bioactive phytochemical compounds Of two medicinal plants, *Equisetum arvense* and *Alchemilla vulgaris* Seeds using gas chromatography-mass spectrometry and fourier-transform infrared spectroscopy *Malays. Appl. Biol. ,* 44(4) ; p: 47–58
- Amić .D., Davidović-Amić. D., Bešlo. D. et Trinajstić .N. (2003).** Structure–Radical scavenging activity relationships of flavonoids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA.*, 76 (1) ; p: 55-61.
- Ansari .K. N. (1997).** The free radicals-the hidden culprits-an update. *Indian Journal of Medical Sciences*, **51** ;p : 319-336.
- Athamena. S., Chalghem. I., Kassah-Laouar. A., Laroui. S., et Khebri. S. (2010).** Activite anti-oxydante et antimicrobienne d’extraits de *cuminum cyminum* L. *Lebanese science journal*,**11** (1) ;p : 69 – 81.
- Aruoma. O. I .(1999).** Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, **8** (1) ;p : 53-63.

B

- Balasundram.N., Sundram. K., et Samman. S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-product : antioxidant activity, occurrence; and potential uses. *Food Chemistry*, 9 ;p : 191 – 120.
- Baskan .S., Öztekin N., et Erim F. B. (2007).** Determination of carnosic acid and rosmarinic acid in sage by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, **101** ; p :1748-1752.
- Beckman .K .B., et Ames. B. N. (1998).** The Free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, **78** (2) ; p :547-581.
- Benzie. I. F. F. et Strain. J. J. (1996).** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239 ;p: 70-76.
- Bergendi. L., Beneš .L., Ďuračková .Z. et Ferenčík. M .(1999).** Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences*, **65** ;p : 1865-1874.
- Benhammou.N. (2012).** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l’Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Tlemcen (Algérie),p :21-22.

- Benlarbi. F.(2004).**Caractérisation des lipides et des phénols de quelques groupes d'oliviers d'Algérie.Mémoire de magister.Laboratoire des sciences fondamentales. Université de Laghouat, p : 70-86-88
- Bietrix. J.( 2004).** Utilisation des nutraceutiques dans la gestion de l'arthrose du cheval. Thèse de docteur vétérinaire de l'université Claude-Bernard de Lyon. P :51.
- Blokhina .O., Virolainen .E. et Fagerstedt .K. V .(2003).** Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review. *Annals of Botany*, **91** ; p :179-194.
- Boizot .N., et Charpentier .J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre fougère. Le cahier des techniques de l'Inra . p : 79-82. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
- Bonnefont-Rousselot .D., Peynet .J., Beaudoux .J .L., Thérond .P., Legrand. A .et Delattre .J. (2002).** Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **16**, p :260-267.
- Boudet . A. M.(2000).** L'usine chimique. 9<sup>ème</sup> conférence de l'université de tous les savoirs.France. p :1-16.
- Bougandoura. N., et Bendimerad. N. (2012).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.)* Briq. *Nature & Technologie*,(9),p : 14 – 19.
- Bourgou. S., Ksouri. R., Bellila.A., Skandrani. I., Falleh. H., Marzouk. B. 2008.** Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa*L. shoots and roots.C. R. Biologies, 331 ;p: 48–55.
- Bors .W., Saran. M. (1987).** Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radic Res Commun.* 2 ; p:289–294.
- Brand-Williams .W., Cuvelier. M.E., Berset .C.( 1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebenson Wiss Technol.*;28 ;p:25–30.
- Bruneton. J. (2009).** Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales. 4<sup>ème</sup> édition. Edition *Lavoisier Tec & Doc. Médicales Internationales, Paris*, p 261 , 308 , 571.
- Brusselmans. K., Vrolix .R., Verhoeven. G. et Swinnen J. V. (2005).** Induction of cancer cellapoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal of biological chemistry.* 280(7) ; p: 5636-5645.
- Brzozowska. J., Hanower. P., Tanguy.J. (1973).** Polyphenols des feuilles de cotonniers et influence sur leur composition d'un choc hydrique ou nutritionnel. *Phytochemistry*, 12 ;p: 2353-2357.

- Bruneton. J. (2009)**, Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Ed. TEC & DOC, Paris .p : 445-453 et p : 469 ; 365
- Bubonja-Sonje. M., Giacometti. J., et Abram. M. (2011)**. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, 127 ;p : 1821-1827
- Bylka .W., Mathawska I. et Pilewski N. A.( 2004)**. Natural flavonoid as antimicrobial agents. *Journal of the American Nutraceutical Association.*, 7(2) ; p: 24-26.

C

- Cadenas. E ., Davies. J. A. (2000)**. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine* , **29** ; p :222-230.
- Cao. G.H., Alessio. H.M., Cutler. R.G. (1993)**. Oxygen-Radical Absorbency Capacity Assay for antioxidants. *Free Radical Biol Med*, 14 ;p: 303-311.
- Cetkovic .G., Canadanovic-Brunet. J., Djilas. S., Savatovic. S., Mandic.A., Tumbas .V.(2008)**.Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. *Food Chemistry*, :109 ; p ;340-347.
- Charfi. D., (1995)**. Effet des eaux usées traitées sur les caractéristiques physico-chimiques du sol et sur la physiologie de quelques espèces végétales cultivées au périmètre d'ElHajeb (Sfax). Thèse en écologie végétale, Fac. Sci. de Sfax.
- Chi . J.G., Dooling .E.C., Gilles .F.H. (1977)**. Gyral development of the human brain. *Ann Neurol*. 1 ; p : 86–93.
- Chu. W. L., Lim .Y .W., Radhakrishnan. A .K. et Lim .P. E. (2010)**. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10 (53) ; p : 2-8.
- Cohen. S. Y., Souied. E et Quentel, G. (2014)**. Dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)/ Myopie et étiologies de la néovascularisation choroïdienne. Edition *Lavoisier Médecinesciences publications*, p 77.
- Cowan. M. (1999)**.Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev*, **12**(4) ; p :564-582.
- Crozier.A., Clifford. M.N., Ashihara. H. (2006)**. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd.

D

- Dacosta. Y.(2003)**. Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris p :.317. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
- Dai. J. et Mumper. R. J. (2010)**. Plant Phenolics : Extraction, Analysis and Their Antioxydant and Anticancer Proprieties. *Molecules*, **15** (10) ;p :7313 – 7352.

- D'Agostino. M., Dini .J., Ramundo. E., Senatore. F.(1998)** .Flavonoid Glycosides of *Alchemilla vulgaris* L. *Phytother Res.* 12 ;p:162–163.
- Danie.P. (2007)** . Effects of *Alchemilla vulgaris* and glycerine on epithelial and myofibroblast cell growth and cutaneous lesion healing in rats ,21 ; P : 369–373.
- Decloitre .F. (1993)**. Impact des facteurs alimentaires sur les mécanismes de la cancérogénèse : bases d'une prévention des cancers par l'alimentation.Cahiers de Nutrition et de diététique, 28(2) ;p : 85-95.
- Depeint. F., Gee .J. M., Williamson .G. et Johson I. T. (2002)**. Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proceeding of the Nutrition Society.*, 61 ;p : 97-103.
- Djeridane. A., Yousfi. M., Nadjemi .B., Vidal. N., Lesgards. J. F. et Stocker P. (2007)**. Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.*; 224 ;p: 801-809.
- Dubois. G.E., Grosbay. G.A., Saffron. P. (1977)**. Non nutritive Sweeteners: Taste Structure relation ships with for some new simple dihydrochalcones. *Science*, 195 ;p: 397- 399.
- Duckstein. S., E. Lotter., U. Mayer., U. Lindequist. et F. Stintzing, (2013)**. Phenolic constituents from *Alchemilla vulgaris* L.and *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. at different dates of harvest.*Z. Naturforsch. C*, 68 ; p: 529-540.

E

- Emerenciano. V. P., Barbosa .K. O., Scotti .M. T. et Ferriro M. J. P. (2007)**. Self organising maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae : a classification of tribes using flavonoid data. *Journal of brazilian chemical society*, 18(5) ; p: 891-899.
- Eriksson, T., M. S. Hibbs., A. D. Yoder., C. F. Delwiche. et M. J. Donoghue.( 2003)** .The Phylogeny of Rosoideae (Rosaceae) based on sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA and the trnL/F region of chloroplast DNA. *International Journal of Plant Sciences*, 164 ;p: 197-211.
- Evans .W. J. (2000)**. Vitamin E, vitamin C and exercise. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72 ;p :647-652.

F

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

- 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 ;p: 372-379.
- Fraga. C. G. (2007).** Plant polyphenols: How to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions. *IUBMB Life*, 59 (4-5) ;p :308–315.
- Fraga.C. J., et Oteiza,P. I. (2011).**Dietary flavonoides: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, : 51 ;p :813–823.
- Fröhner .S. (1995).***Alchemilla* L. In: Hegi G, editor. *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Berlin-Vien: Blackwell, Wissenschafts-Verlag.
- Fraisse .D., Heitz. A., Carnat. A., Carnat. A .P., Lamaison. J. L.(2000).** Quercetin 3-arabinopyranoside, a major flavonoid compound from *Alchemilla xanthochlora*. *Fitoterapia.*;71:p :463–464

## G

- Gardès-Albert. M., Bonnefont-Rousselot .D., Abedinzadeh .Z. et Jore .D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'actualité chimique,p :91-96.
- Gião. M .S., Leitão. I ., Pereira .A., Borges. A.B., Guedes .C .J ., Fernandes .J. C., Belo L., Santos-Silva .A., Hogg. T. A., Pintado. M .E. et Malcata. F. X. (2010).** Plant aqueous extracts: Antioxidant capacity via haemolysis and bacteriophage, P:22 protection. *Food Control*, 21 ;p : 633-638.
- Gulcin. I, Huyut.Z., Elmastas .M. et Aboul –Enein. H .Y. (2010).** Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*,3 ;p : 43-53.
- Gião. M .S., Leitão .I. , Pereira. A., Borges .A. B., Guedes. C. J. , Fernandes .J .C., Belo .L, Santos-Silva .A., Hogg .T. A., Pintado. M .E et Malcata .F. X. (2010).** Plant aqueous extracts: Antioxidant capacity via haemolysis and bacteriophage P22 protection. *Food Control*, 21 ;p : 633-638.
- Ghedira. K. (2005)** .Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytother*, 3 ;p: 162-169.
- 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 ;p: 1220-1234.

**Gresele .P., Cerletti . C., Guglielmini .G., Pignatelli . P., DE Gaetano . G. et Violi. F. (2011).** Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update. *J. of Nutr. Biochem.*, 22 ; p: 201–211.

H

**Halliwell. B. et Gutteridge .J M. C .(2007).** *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press, Oxford (fourth edition).

**Han. X., Shen T., Lou. H. (2007).** Dietary polyphenols and their biological significance. *Int J MolSci*, 8(9) ;p : 950-988

**Harborne. J. B. (1967).** Comparative biochemistry of flavonoids-V: Luteolin 5- glucoside and its occurrence in the umbelliferae. *Phytochemistry*, 6 (11) ;p : 1569 – 1573.

**Haslam. E. (1996).** Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat Pro*, 59:p: 205 215.

**Heim, E. K., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002).** Flavonoïds antioxydants : chemistry; metabolism and structure-activity relations hips .*The journal of Nutritional Biochemistry*, 13 ; p :572 –584.

**Heimeur.N., Idrissi Hassani. L.M., Amine Serghini. M. (2004).** Les polyphénols de *Pyrus mamorensis* (Rosaceae). *Reviews in Biology and Biotechnology*, 3 (1) ;p : 37-42.

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

**Hertog. M. G. (1996).** Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proceeding of the nutrition society*, 55(1B) ;p : 385-397.

**Hoffmann. L., Besseau. S., Geoffroy. P., Ritzenthaler .C., Meyer. D., Lapierre .C., Pollet B. et Legrand. M.2004.** Silencing of hydroxycinnamoyl coenzyme A shikimate / quinate hydroxycinnamoyl transferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant cell*, 16(6) ; p :1446-1465.

**Hollman P. C. H. 2001.** Evidence for health benefits of plant phenols : local or systemic effects. *Journal of the science of food and agriculture*, 81 ;p:825-842.

**Hämäläinen .M., Nieminen .R., Vuorela. P., Heinonen .M. et Moilanen .E.( 2007).** Anti-inflammatory effects of flavonoids : genistein, kaempferol, quercetin and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages.*Mediators of inflammation.*, (1) ;p: 1-10.

**Hu. F .B. (2003).** Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78 ; p :544-551.

**Hutzler. P., Fishbach. R., Heller.W., Jungblut. T. P.,Reuber. S., Schmitz .R., Veit. M., Weissenböck. G. et Schnitzler J. P. (1998).** Tissue localisation of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of experimental botany.*, 49(323) ;p : 953-965

## K

**Karaali . Boyacioălu. D., Günez .G. et Özçelik. B.(2004).** Flavonoids in fruit and vegetables : their impact on food quality, nutrition and health–STREP or CA. European commission's the 6th framework programme for research. Istanbul technical university.Turkey.

**Ketsawatsakul. U., Whiteman. M .et Halliwell .B. (2000).** A reevaluation of the peroxynitrite scavenging activity of some dietary phenolics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279 ;p : 692-699.

**Kim. H. P., Son. K. H., Chang. H. W. et Kang S. S. (2004).** Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, 96(3) ;p : 229-245.

**Krishna .D., Chaluvadi .M., Raj .N. et Sripal .R .(2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological , biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol*, 33 ;p: 2-16.

**Kumari .A. et Kakkar .P. (2008).** Screening of antioxidant potential of selected barks of Indian medicinal plants by multiple in vitro assays. *Biomedical and environmental sciences*,21 ;p : 24-29.

## L

**Laguerre. M, Lecomte. J .et Villeneuve .P. (2007).** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46 ;p :244-282.

**Le .K, Chiu. F. et Ng. K (2007).** Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105 ;p : 353-363

- Lee. J., Koo. N. et Min. D. B. (2004).** Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*,3 (1) ;p :21-33.
- Lee. K.W., Kim .Y.J., Lee .H.J., et Lee. C.Y.( 2003).** Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chemistry*, 51 ;p : 7292-7295.
- Li. C., Oldham. C.D., May. S.W.N. (1994).** N-Dimethyl-1,4-phenylenediamine as an alternative reductant for peptidylglycine. Alpha-amidating mono-oxygenase catalysis. *Biochem. J*, 300 ;p: 31-36.
- Li. C.Y., Jackson. R.M. (2002).** Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury.*Am. J. Physiol.-Cell Physiol*, 282 ;p: C227–C241.
- Li. H. B., Wong. C. C., Cheng. K. W., Chen. F.(2008).** Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants.*LWT*, 41 ;p : 385–390.
- Lin .J. K. et Weng. M. S. (2006).** The science of flavonoïds : Flavonoïds as nutraceuticals. Ed Springer. P : 213
- Loche. J. (1966).** Contribution à l'étude des polyphénols de la plante de tabac (Seita, ed). *Ann de la direction des études et de l'équipement, France*, 3 ; p: 15.
- M
- Malešev .D. et Kuntić .V. (2007).** Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions.*Journal of the serbian chemical society*. 72 (10) ;p : 921-939.
- Manach .C. (1998).** Biodisponibilité des flavonoïdes. Thèse de doctorat de l'université de Clermont Ferrand France.
- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., Kefalas, P. (2005).** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chem*, 89 (3) ;p: 411–420.
- Majhenic. L, kerget. M.S., et Knez Z. (2007).** Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chem*, 104 ;p:1258-1268.
- Marfak. A.(2003).** Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec LesRadicaux issus des Alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de LIMOGES.p :187

- Medić-Šarić M., Jasprica .I., Smolčić-Bubalo. A. et Monar A. (2004).** Optimisation of chromatography of flavonoids and phenolic acids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA.*, 77(1-2) ; p: 361-366.
- Miller.N. J., Rice-Evans. C., Davies. M. J., Gopinathan. V., Milner, A. (1993).** A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*, 84 ;p: 407–412.
- Miliauskas. G., Venskutonis. P.R., et Van Beek. T.A. (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry*, **85** ;p : 231-237.
- Ming .H. (2007).** Commentary : bioavailability of flavonoids and polyphenols: call to arms. *molecular pharmaceutics.*, 4(6) ; p: 803-806.
- Moller .C. et al. (2009),** Characterisation of Tannin-Containing Herbal Drugs by HPLC, *Phytochemical analysis*, 20 ;p : 231–239
- Mompon. B., Lemaire. B., Mengal. P., Surbled, M. (1998).** Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. Ed. INRA, Paris (les Colloques, N° 87).
- Montagnier. L. (2009).** Oxidative stress in preventive medicine. *Free Radical Research*,43 ;p : 27-97.

N

- Narayana .K. R., Reddy M. S., Chaluvadi .M. R. et Krishna D. R.( 2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology* ,33 ;p:2-16.
- Nijveldt. R. J., Nood., E., Hoorn. D. E., Boelens. P. G., Norren. K., Leeuwen. P. (2001).** Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin Nutr* , 74 ;p :418–425.
- Nitsch. J.P., Nitsch. C. (1961).** Synergistes naturels des auxines et des gibberellines. *Bull. Soc. Fr* , 26 ;p: 2237-2240.
- Novelli .G. P.( 1997).** Role of free radicals in septic shock. *J. Physiol.Pharmacol*,48 ;p: 517-527.

O

- O’Kennedy. R., et Thornes. R.D. (1997).** Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action. John Wiley & Sons Inc. New York. N.Y.

**Okuda .T., Yoshida. T., Hatano. T., Iwasaki .M., Kubo. M., Orime .T., Yoshizaki. M., et Naruhashi . N. (1992)**, Hydrolysable tannins as chemotaxonomic markers in the Rosaceae. *Phytochemistry*, **31** ; p :3091 – 3096.

P

**Park. H. J. et Cha. H. C. (2003)**. Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. *Korean journal of biological society.*, **7** ; p :327-330.

**Pierrick. H.(2016)** .Alchémille - Propriétés et effets secondaires , *Journal des Femmes Santé*.

**Pincemail. J., Meurisse. M., Imet. R. L. et Defraigne .J. O. (1999)**. Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. vaisseaux, cœur, poumons., **4** (4).

**Piquemal .G. (2008)**. Les flavonoïdes (en ligne) : [http://www.detoursante.com/index.php?Option=com\\_content&view=article&id=166&Itemid=215'](http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=215)

**Popov. I., Lewin. G., Baehr. R. (1987)**. Photochemiluminescent detection of antiradical activity. I. Assay of superoxide dismutase. *Biomed Biochim Acta*, **46** ;p: 775–779

**Popovici. C., Saykova. I., et Tylkowskib. (2010)**.Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, (4) ;p : 1 –8.

R

**Ren .W., Qiao. Z., Wang. H., Zhu .L. et Zhang. L.( 2003)**. Flavonoids : Promising anticancer agents. *Medicinal research reviews.*, **23**(4) ; p: 519-539.

**Rothmaler. W. (1937)**. Systematische Vorarbeiten zu einer Monographie der Gattung *Alchemilla* (L.) Scop. VII. Aufteilung der Gattung und Nomenklatur. *Repertorium novarum specierum regni vegetabilis* **42**(11-15 ) ;p: 164-173.

**Ribereau .G. P.(1968)**. Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris, p :254 .

**Rice-Evans.C. (2001)**. Flavonoid as Antioxidants. *Current medicinal chemistry*. **8** ;p: 797-807.

**Robards . K.A., Paul . D., Prenzler . A., Greg tucker. B., Prasan .swatsitang .B., et William .g. (1999)**. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chem.*, **66** ;p :401-436

**Roede. J. R et Jones. D. P. (2010)**. Reactive species and mitochondrial dysfunction: echanisticsignificance of 4-hydroxynonenal. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **51** ;p : 380-390.

**Roussel. A. M. (2009)**. Qui manque d'antioxydants, et comment le savoir ? *Cahiers de nutrition et de diététique*, p: 7

**Ryan, M. T., Muller. H., et Pfanner. N. (1999).** Functionalstaging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *J BiolChem*, 274 (29) ; p : 20619–20627.

**S**

**SAID .C. (1980).** Quelques aspects de l'écologie florale chez les Rosaceae. II. Etude morphologique et histologique comparée chez *Alchemilla vulgaris* L. et *Sibbaldia procumbens* L, p : 227- 236 - Départ./Région : , Bulletin de la Société Botanique de France, 5, Tome 127 - Fascicule 3.

**Sandhar .H K., Kumar .B ., Prasher .S., Tiwari. P., Salhan .M. et Sharma .P .(2011).** A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*,1 (1) ; p :25-41.

**Sanchez-Moreno. C., Larrauri. J. A. (1998).** Main methods used in lipid oxidation determination. *Food Sci. Technol. Int*, 4 ; p : 391-399.

**Sanchez-Moreno. C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci Food. Agric*, 76 ;p : 270–276.

**Sanchez-Moreno. C., Larrauri. J.A., Saura-Calixto. F. (1999).** Free radical scavenging capacity of selectes red, rosé and white wines. *J. Sci Food Agric*,79 ;p : 1301-1304.

**Scalbert. A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, **30** ;p : 3875-3883.

**Singleton. V.L., Ross. J.A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult*16 ;p : 144-158.

**Sokmen .A., Gulluce .M., Askin Akpulat .H., Daferera .D., Tepe. B., Polissiou .M., Sokmen. M. et Sahin F. (2004).** The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*.*Food Control.*; 15 ; p : 627-634.

**Subsamanian. S., Stacey. G. et Yu O. (2007).** Distinct crucial roles of flavonoids duringlegume nodulation. *Trends in plant science.*, 12(7) ;p : 282-283.

**Sousa. A.F.,Gandini . A. et al.,(2008).**Synthesis and characterization of novel biopolyesters from suberin and model comonomers. *Chemsuschem*, 1 (12) ; p :1020–1025

**T**

**Tang. S. Y. et Halliwell. B. (2010).** Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394 ;p :1 -5.

- Takeuchi. H., Lu .Z. G. et Fujita T.( 2004).** New monoterpene glycoside from the aerial parts of Thyme (*Thymus vulgaris* L). *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 68 (5) ; p: 1113-1134.
- Tapas. A. R., Sakarkar. D. M. et Kakde. R. B. (2008).** Flavonoids as nutraceuticals. *Topical journal of pharmaceutical research* ., 7(3) ;p : 1089-1099.
- Tawaha. K., Alali. F.Q., Gharaibeh. M., Mohammad. M., El-Elimat. T. (2007)** Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.* (in press).
- Teissedre .P. L., Vizzini .M. I., Di Mago .D., La Neve.I., Giammanco. S., La Guardia .M. et Ginmanco .M. (2007).** Composition de vins rouges siliciens et leurs propriétés nutraceutiques. 8 th international enology symposium. June 25, 26 and 27. Bordeaux.
- Tim. T. P. C., et Lamb A. J. (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*., 26 ; p: 343-356.
- Tiqwari. A. K.( 2001).** Imbalance in antioxidant defence and human diseases : Multiple approach of natural antioxidants therapy. *Current science*, 81 (9) ; p: 1179-1181.
- Tsai .T. H., Tsai. P. G. et Ho. S. C. (2004).** Antioxidant and anti-inflammatory activities of several commonly used species. *Journal of food science*. 70(1) ; p: C93-C97.
- Torres De Pinedo. A., Pen alver.P., et Morales. J. C. (2007)** Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: structure-activity relationship. *Food Chem*,103 ; p : 55–61.
- Turkmen. N., Velioglu. Y. S, Sari. F., Polat.G. 2007.** Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12 ;p: 484-496.

U

- Ulve. Ph.( 2016) .** Baseflor. Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France. Version : 09 février 2017. <http://www.tela-botanica.org>
- Urquiaga. I. et Leighton.F. (2000).** Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*., 33(2) ;p : 55-64

V

- Vorbach. C, Harrison. R. et Capecchi .M .R (2003).** Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends in Immunology*, 24 ;p :512-517.

W

- W –Erdman. J., Balentine .J. D., Arab. L., Beecher .G., Dwyer .J. T., Folts . J., Harnly.,Hollman .J.P., L –Keen. C., Mazza. G., Messina .M., Scalbert. A., Vita .J., Williamson .G. et Burrowes J. (2007).** Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. Journal of Nutrition., 137(3) ; p: 718 -737.
- Winkel-Shirley. B. (2001).** Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. Plant Physiology., 126 ; p:485-493.
- Wissemann H.( 1999).** The bioavailability of non–nutrient plant factors : dietary flavonoids and phyto-oestrogens. Proceeding and Nutrition Society., 58 ; p:139-146.
- Walker. J.E.,M . Saraste .M.J., Runs wick. et N.J. Gay . (1982).** Distantly related sequences in the lpha-and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring nzymes and a common nucleotide binding fold. Embo J, 1 (8) ;p: 945-951
- Winston. G.W., Regoli. F., Dugas. A. J., Fong . J. H., Blanchard. K. A. (1998).** A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. Free Radical Biol. Med, 24 ;p: 480–493 .
- Wichtl .M. et al., (2003),** Plantes thérapeutiques, tradition, pratique officinale, science et thérapeutique, Ed. TEC & DOC, 2ème édition, p :14-16
- Wayner. D. D. M., Burton. G. W., Ingold. K.U. et Locke. S. (1985).** Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation. FEBS Letters, 187 ;p: 33-37.

Y

- Yang. R. Y., Lin S. et Kuo .G.( 2008).** Content and distribution of flavonoids among 91 edibles plant species. Asia of pacific journal of clinical nutrition., 17 (S1) ; p: 275-279.

Z

- Zadak. Z., Hyspler .R., Ticha. A., Hronek. M., Fikrova. P., Rathouska. J., Hrnčiarikova. D. et Stetina. R. (2009).** Antioxidants and vitamins in clinical conditions. Physiological Research, 58 ;p : 13-17.
- Zukowski. W. et M. Palus, (1982).** Distribution of the species *Alchemilla* L. in north-western Poland. *Fragm. Florist Geobot.*,28 ;p : 509-534 (Pl).

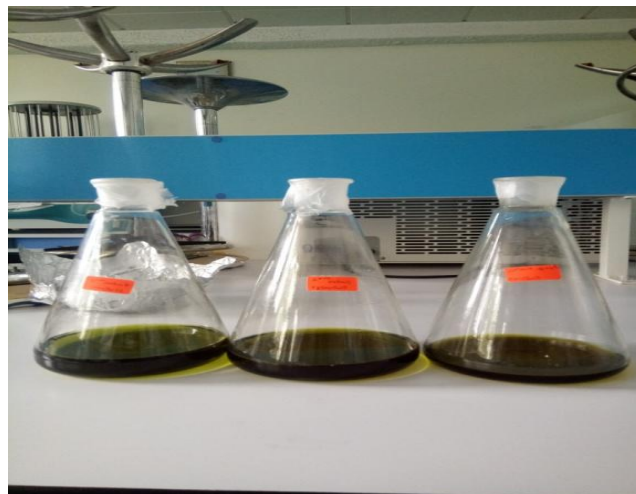
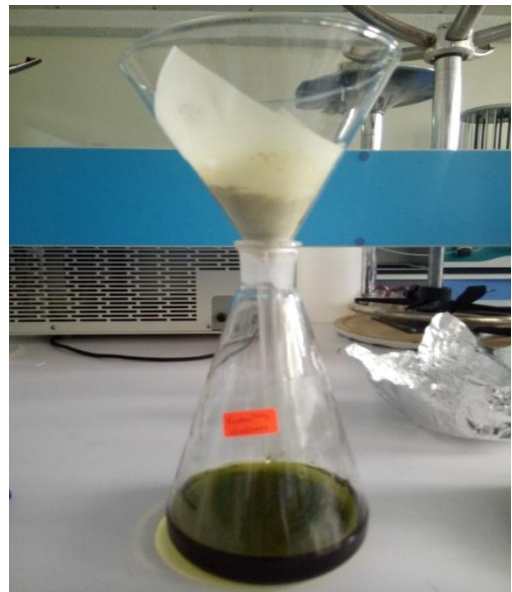
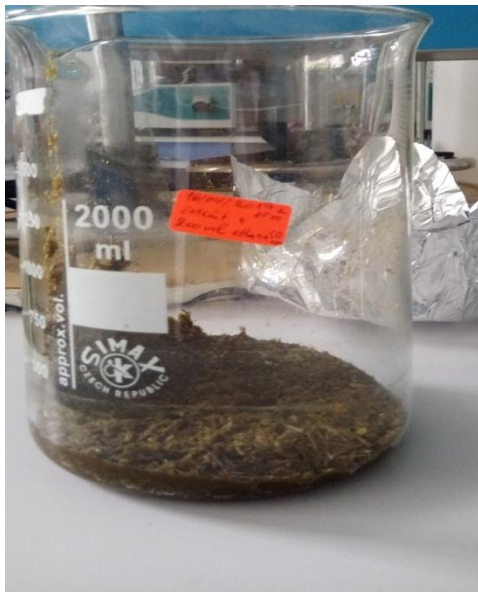
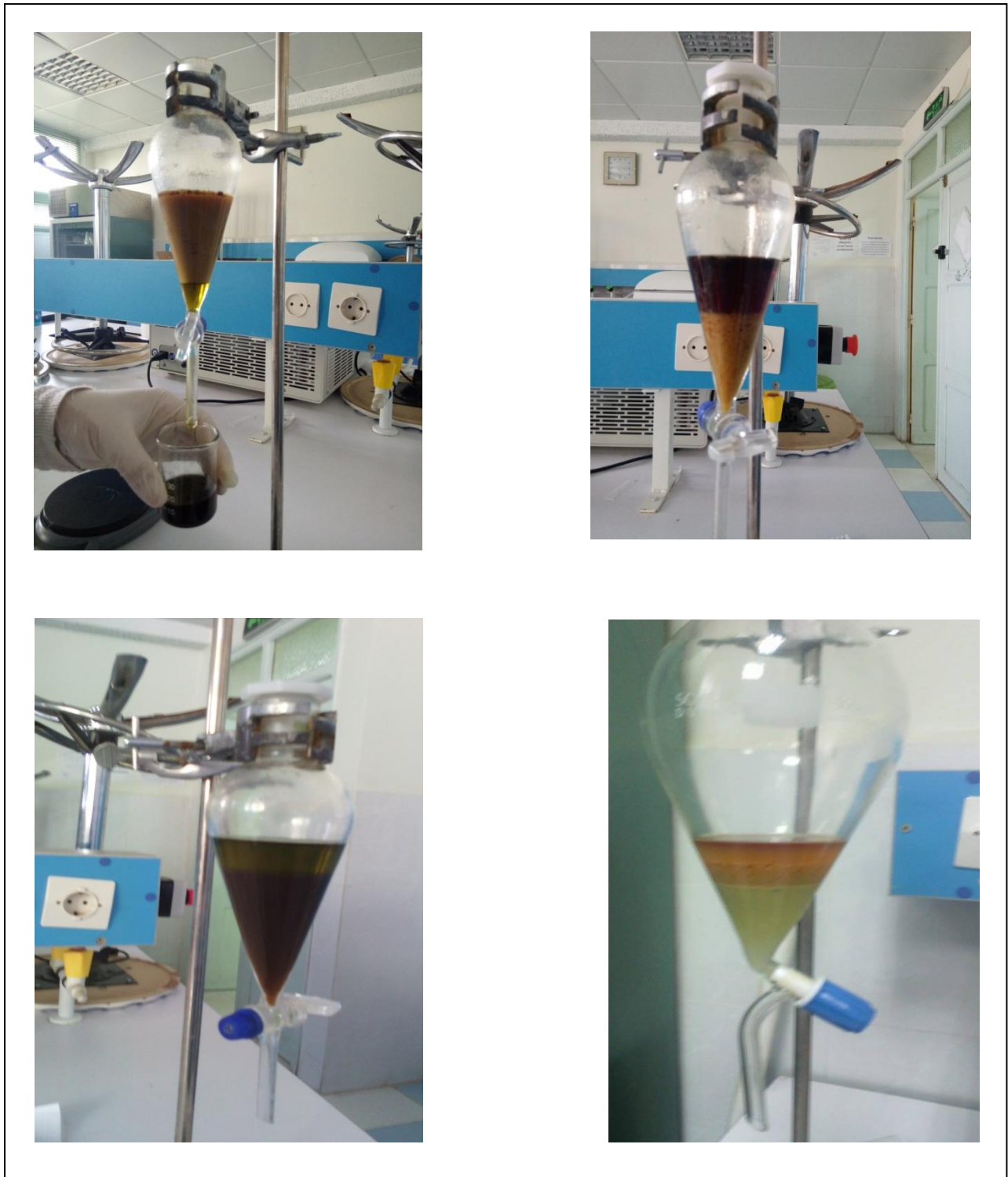


Figure 1. les étapes de macération, filtration, séchage .



**Figure 2.** Les différentes phases de l'extraction liquide- liquide.

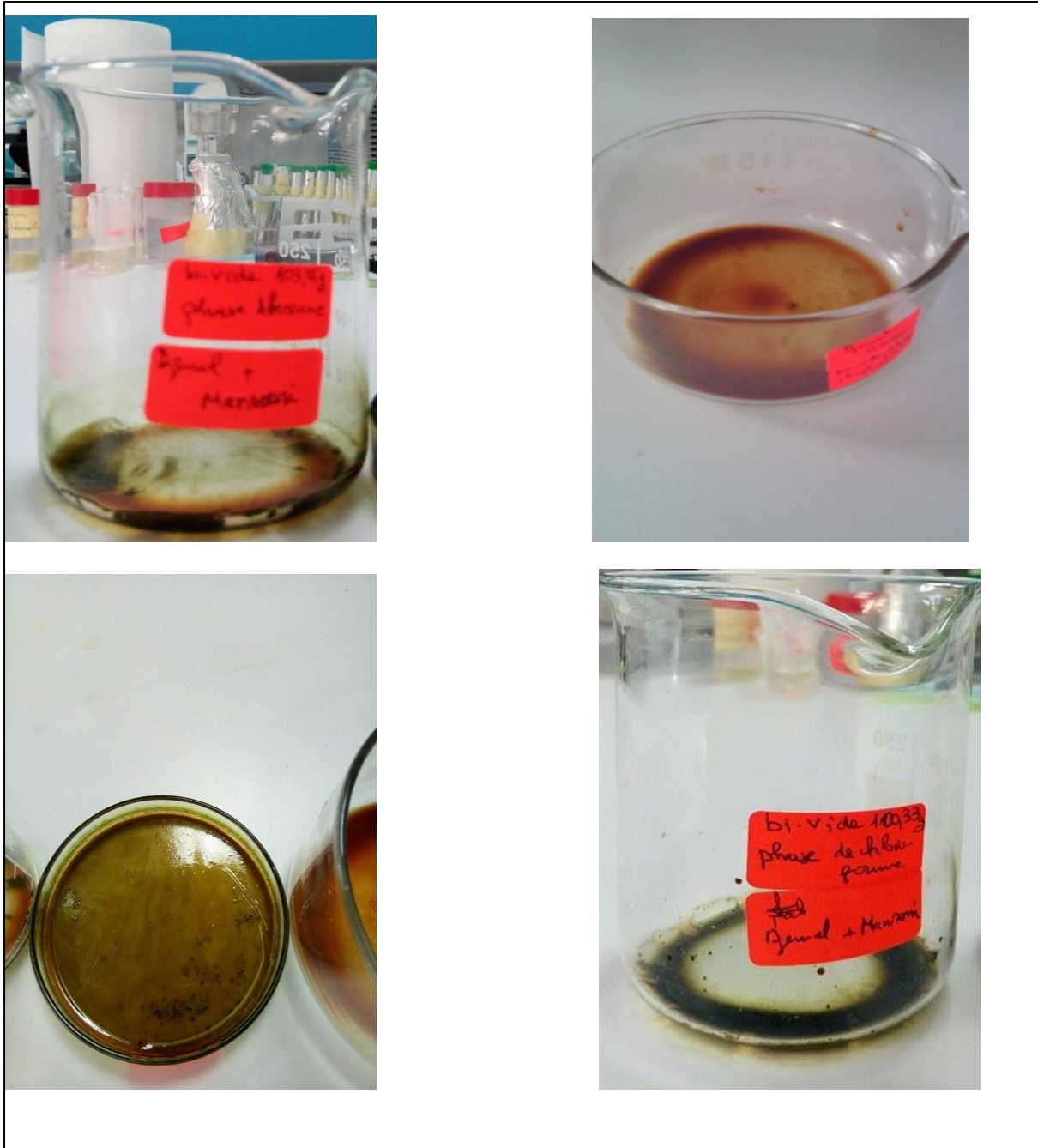
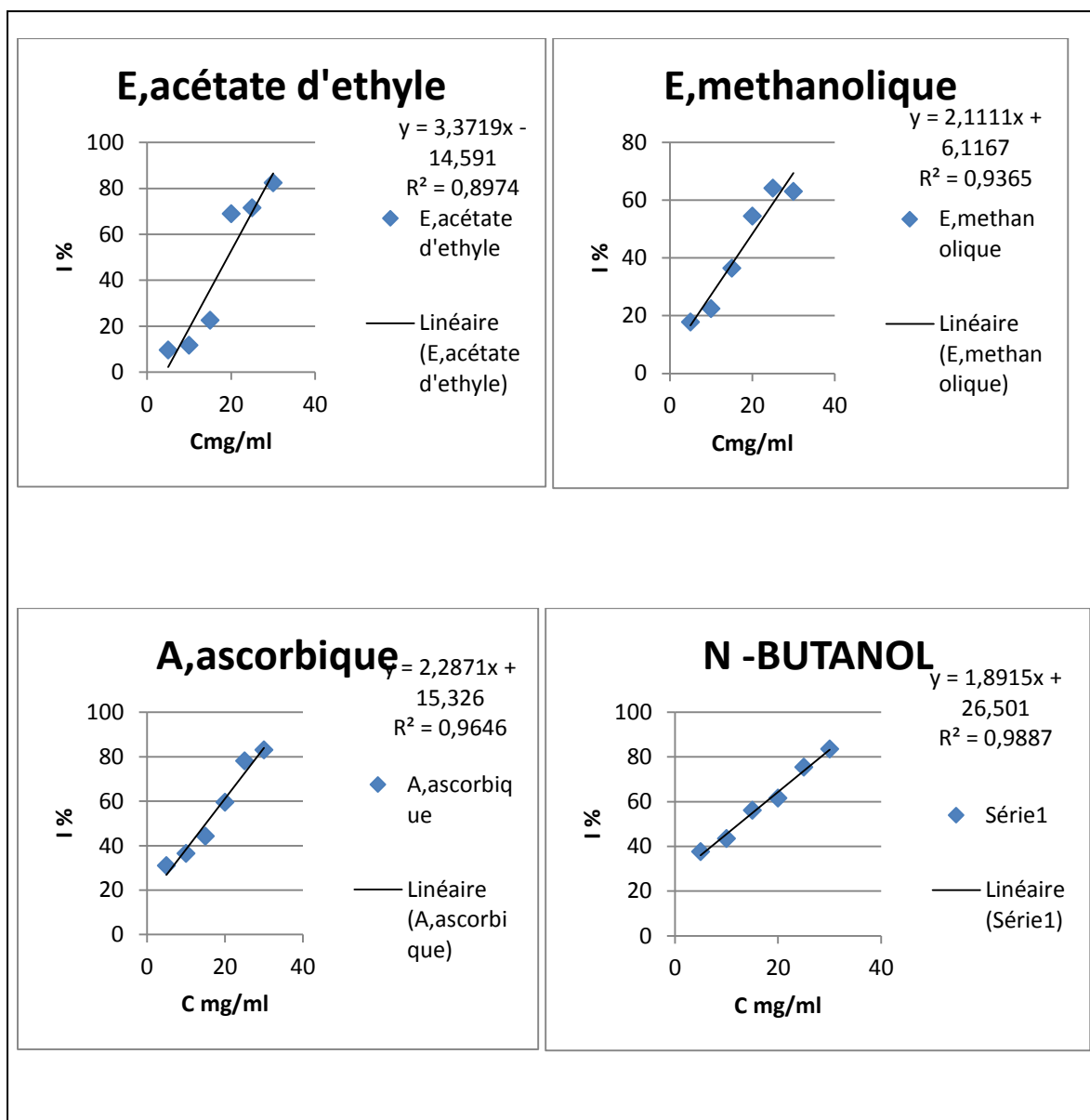


Figure 3. Les extraits obtenus.



**Figure 4.** Courbes représentant le pouvoir d'inhibition des différents extraits.

- **MANSOURI Belgacem**
- **DJEMEL Rafika**

soutenu: 04 /07/ 2017

## **Diplôme master académique en Biochimie Appliquée**

---

**Thème : L'activité antioxydante des extraits de la plante : *Alchemilla Vulgaris L***

### **Résumé**

Dans le cadre de notre travail, nous sommes intéressés à l'étude du pouvoir antioxydant des extraits d'*Alchemilla vulgaris* : une plante de la famille *Rosaceae*.

La première étape de ce travail est l'extraction des composés phénoliques en utilisant deux solvants : n-butanol et l'acétate d'éthyle puis la quantification des teneurs en phénols totaux par l'usage de réactif du Folin-Ciocalteu et de flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium.

Le taux des polyphénols (**41.1 ± 0,009 ug EAG/mg E**) et de flavonoïdes (**4.22 ± 0,017 µg EAQ/mg E**) de la phase méthanolique est élevé par rapport à celles d'acétate d'éthyle et de n-butanol.

Les résultats obtenus de l'étude de l'activité antioxydante selon la méthode de DPPH ; (**IC50 de l'extrait méthanolique = 20.78, d'acétate d'éthyle = 10.50, de n-butanol =12.42, d'acide ascorbique=15.16**) nous ont permis d'affirmer que tous les extraits ont révélé des réponses inhibitrices à différents niveaux de piéger les radicaux libres de DPPH aussi, Les fractions d'acétate d'éthyle et de butanol sont les meilleurs capteurs des radicaux libres que l'extrait méthanolique.

**Mots clés:** *Alchemilla vulgaris* l, polyphénole, flavonoïdes, activité antioxydante.

**Promotrice :** Mme. ARAB Yasmin                      M.A.B    Université Abbès Laghrour Khenchela

### **Jury de soutenance :**

**Directeur :** Mr. MAAMAR Hichem                      M.C.B    Université Abbès Laghrour Khenchela

**Examineur :** Mr. BOUSSAA Abdelhalim                      M.A.A    Université Abbès Laghrour Khenchela