



*République Algérienne Démocratique Et Populaire*  
*Ministère de L'Enseignement Supérieur et de La Recherche*  
*Scientifique*



**Université Abbes laghrour-Khenchela-**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biologie Moléculaire et cellulaire**

**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master**  
**Académique en Biologie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Option : Biochimie appliquée**

***Thème:***

***Contribution à l'exploration phytochimique et***  
***l'évaluation in vitro des activités biologiques***  
***d'une plante médicinale locale***  
***«Thapsia garganica L »***

***Présenté Par :***

***Melle ZERARI Mounia***

***Soutenu le : 07/07/2019***

**Jury de soutenance :**

**Président :** Dr. MAAMAR. Hichem (M.C.B) Université Abbes Laghrour – Khenchela-

**Encadreur :** Dr. DOUAOUYA Lilia (M.C.B) Université Abbes Laghrour – Khenchela-

**Examineur :** Mr. THABET Rachid (M.A.A) Université Abbes Laghrour – Khenchela-

**Promotion : 2018 / 2019**

## Remerciements

*« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage ».*

*Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir  
donnée*

*le pouvoir, la force et la patience ...*

*J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à mon encadreur  
Dr. DOUAOUIA.. Merci d'avoir acceptée de diriger ce travail, Merci  
pour votre encadrement sans faille tout au long du période de  
réalisation*

*de ce travail. C'est un très grand honneur et un très grand plaisir  
d'avoir*

*pu faire votre connaissance avant tout...*

*Je remercie Dr. Maamar Hichem d'avoir accepté de juger mon  
travail en tant que président.*

*Je remercie Mr. Thabet Rachid maitre de conférences. D'avoir  
accepté d'examiner ce modeste travail.*

*Je remercie tout particulièrement ma famille qui m'a toujours soutenu  
dans mes choix, et qui été présente chaque fois que cela a été nécessaire.*

*Merci Maman, Merci Papa, Merci mes Soeurs, mon Frères. C'est avec  
vous*

*que j'ai partagé mes joies, mes peines, vous m'avez soutenu grâce à votre  
présence, à votre sourire .*

♥Merci♥

# Dédicace

*Je prie Dieu tout puissant de m'accorder patience et courage  
pour finir ce mémoire*

*Je tiens à dédier ce modeste travail à ceux qui m'ont  
toujours venu en aide et sacrifié leur réussite dans ma vie*

*\*\*\* A ceux qui ont sacrifié leur vie pour que je sois, ce  
que je suis aujourd'hui, qui sont les plus chères au monde :  
mes parents...*

*\*\*\* A mon frères , mes soeurs et ses enfants*

*\*\*\* A Mes meilleures amies :*

*Sara ,SAWSEN, amel, mayssa , kenza , hadjer , asma et safiya*

*\*\*\* A toutes mes amies, lesquelles ont partagée des bons  
moments de bonheur et moment les plus difficiles pendant  
toute la période passée aux études.*

*\*\*\* A toute ma famille*

*\*\*\* A tous mes enseignants(es) et plus spécialement  
Mme. douaouia, mon maitre de mémoire qui n'a pas  
ménagé d'efforts pour l'aboutissement de ce travail.*

*Mounia*

<b>Table des matières</b>	
<b>Remerciements</b>	
<b>Dédicace</b>	
<b>Résumé</b>	<b>I</b>
<b>Abstract</b>	<b>II</b>
<b>ملخص</b>	<b>III</b>
<b>Table des matières</b>	<b>IV</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>V</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>VI</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>VII</b>
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>Synthèses bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : La phytothérapie et les plantes médicinales</b>	
<b>1. La phytothérapie</b>	<b>3</b>
<b>1.2. La phytothérapie en Algérie</b>	<b>3</b>
<b>2. Les plantes médicinales</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Généralités</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Définition médicale</b>	<b>4</b>
<b>2.3. Définition chimique</b>	<b>4</b>
<b>2.4. Définition biologique</b>	<b>4</b>
<b>3. Les métabolites primaires et secondaires</b>	<b>5</b>
<b>3.1. Les métabolites primaires</b>	<b>5</b>
<b>3. 2. Métabolites secondaires</b>	<b>6</b>
<b>3.2.1. Activités biologiques des métabolites secondaires</b>	<b>6</b>

<b>3.2.1.1. Polyphénols</b>	<b>9</b>
<b>3.2.1.2. Phénols et acides phénoliques</b>	<b>10</b>
<b>3.2.1.3. Flavonoïdes</b>	<b>11</b>
<b>3.2.1.4. Tannins</b>	<b>11</b>
<b>3.2.1.5. Coumarines</b>	<b>12</b>
<b>4. Activités biologiques des polyphénols</b>	<b>13</b>
<b>Chapitre II :Thapsia garganica</b>	
<b>1. Généralités sur les apiacées</b>	<b>15</b>
<b>1.1. Le genre <i>Thapsia</i></b>	<b>15</b>
<b>1.2. L'espèce <i>Thapsiagarganica L.</i></b>	<b>16</b>
<b>1.3. Classification botanique</b>	<b>16</b>
<b>1.4. Description</b>	<b>17</b>
<b>1.5. Métabolites secondaires</b>	<b>18</b>
<b>1.5.1. Composés phénoliques</b>	<b>18</b>
<b>1.5.2. Composés terpéniques</b>	<b>19</b>
<b>1.5.3. Huiles essentielles</b>	<b>19</b>
<b>2. Usages</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Usages traditionnels</b>	<b>20</b>
<b>2.2. Utilisations thérapeutiques</b>	<b>20</b>
<b>Chapitre III :Les activités étudiées</b>	
<b>1. L'Activité anti-oxydante</b>	<b>22</b>
<b>1.1. Les radicaux libres</b>	<b>22</b>
<b>1.2. Stress oxydatif</b>	<b>22</b>
<b>1.3. Les antioxydants</b>	<b>22</b>

<b>1.4. Classification et mécanismes d'action</b>	<b>23</b>
<b>1.4.1. Système antioxydant enzymatique</b>	<b>23</b>
<b>1.4.2. Système antioxydant non enzymatique</b>	<b>23</b>
<b>1.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante</b>	<b>24</b>
<b>1.5.1. Méthode de réduction de radical DPPH</b>	<b>24</b>
<b>1.5.2. Méthode de réduction de l'ion ferrique FRAP</b>	<b>25</b>
<b>1.5.3. Autres méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante</b>	<b>25</b>
<b>2. Activité anti Hémolitique</b>	<b>25</b>
<b>2.1. Généralités</b>	<b>25</b>
<b>2.2 . Structure et fonction des globules rouges</b>	<b>25</b>
<b>2.3. Structure de la membrane érythrocytaire</b>	<b>26</b>
<b>2.4. Échanges membranaires du globule Rouge</b>	<b>26</b>
<b>2.5. Biosynthèse du globule rouge</b>	<b>27</b>
<b>2.6. Processus d'hémolyse</b>	<b>27</b>
<b>2.6.1. Hémolyse physiologique</b>	<b>27</b>
<b>2.6.2. Hyperhémolyse</b>	<b>28</b>
<b>2.7. Les types des Anti-hémolytiques</b>	<b>28</b>
<b>2.7. 1. Anti-hémolytiques classiques</b>	<b>28</b>
<b>2.7.2. Autres anti-hémolytiques</b>	<b>29</b>
<b>3. Activité anticoagulante</b>	<b>30</b>
<b>3.1. Généralités sur la coagulation</b>	<b>30</b>
<b>3.2.1. Formation de la prothrombinase</b>	<b>31</b>
<b>3.2.2. Formation de la thrombine</b>	<b>31</b>
<b>3.2.3. Formation de la fibrine</b>	<b>31</b>
 <b>Partie expérimentale</b> <b>Chapitre I : Matériel et méthodes</b>  	

<b>1. Matériel</b>	<b>32</b>
<b>1.1. Matériel biologique</b>	<b>32</b>
<b>1.1.1. Matériel végétal</b>	<b>32</b>
<b>1.1.2. Echantillons du sang</b>	<b>33</b>
<b>1.2. Médicaments</b>	<b>33</b>
<b>1.3. Réactifs chimiques et instrumentations</b>	<b>33</b>
<b>2. Méthodes</b>	<b>33</b>
<b>2.1. Préparation de l'extrait méthanolique brut</b>	<b>33</b>
<b>2.2. Préparation de l'extrait aqueux</b>	<b>34</b>
<b>2.3. Détermination du rendement d'extraction</b>	<b>34</b>
<b>2.4. Screening phytochimique</b>	<b>35</b>
<b>2.4.1. Recherche des tanins</b>	<b>35</b>
<b>2.4.2. Recherche des saponosides</b>	<b>35</b>
<b>2.4.3. Recherche des coumarines</b>	<b>35</b>
<b>2.4.4. Recherche des composés réducteurs</b>	<b>35</b>
<b>2.4.5. Recherche des alcaloïdes</b>	<b>36</b>
<b>2.4.6. Recherche des flavonoïdes</b>	<b>36</b>
<b>2.4.7. Recherche des anthocyanes</b>	<b>36</b>
<b>2.4.8. Recherche des flavonols</b>	<b>36</b>
<b>2.4.9. Recherche des flavones</b>	<b>36</b>
<b>2.4.10. Recherche des flavonones</b>	<b>36</b>
<b>2.5. Etude quantitative</b>	<b>37</b>
<b>2.5.1. Dosage des polyphénols totaux</b>	<b>37</b>
<b>2.5.2. Dosage des flavonoïdes</b>	<b>37</b>
<b>2.6. Etude qualitative</b>	<b>38</b>
<b>2.6.1. Identification des flavonoïdes par chromatographie sur</b>	<b>38</b>

<b>couche mince(CCM)</b>	
<b>2.7. Étude <i>in vitro</i> des activités biologiques</b>	<b>39</b>
<b>2.7.1. Evaluation de l'activité antioxydante</b>	<b>39</b>
<b>2.7.1.1. Test scavenger du radical libre DPPH</b>	<b>39</b>
<b>2.7.1.2. Réduction de fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)</b>	<b>40</b>
<b>2.7.2. Evaluation de l'activité anti-hémolytique</b>	<b>40</b>
<b>2.7.2.1. Préparation des globules rouges</b>	<b>41</b>
<b>2.7.2.2. Préparation de l'extrait</b>	<b>41</b>
<b>2.7.2.3. Protocole expérimentale</b>	<b>41</b>
<b>2.7.2.4. Expression des résultats</b>	<b>42</b>
<b>2.7.3. Evaluation de l'activité anti-coagulante</b>	<b>42</b>
<b>2.7.3.1. Préparation de pool plasmatique (standard) déplaqueté</b>	<b>42</b>
<b>2.7.3.2. Evaluation de l'activité anti coagulante vis-à-vis la voie exogène</b>	<b>42</b>
<b>2.7.3.3. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène</b>	<b>43</b>
<b>2.7.4. Analyse statistique</b>	<b>44</b>
<b>Chapitre II : Résultats et discussion</b>	
<b>1. Rendement de l'extraction</b>	<b>45</b>
<b>2. Test phytochimiques</b>	<b>46</b>
<b>3. Analyse quantitative</b>	<b>50</b>
<b>4. Etude qualitative de la chromatographie sur couche mince</b>	<b>53</b>
<b>5. Étude <i>in vitro</i> des activités biologiques de <i>Thapsia garganica L</i></b>	<b>55</b>

<b>5.1. Evaluation de l'activité anti-oxydante</b>	<b>55</b>
<b>5.1.1. Test scavenger du radical libre DPPH</b>	<b>55</b>
<b>5.1.2. Réduction de fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)</b>	<b>58</b>
<b>5.2. Evaluation de l'activité antihémolytique</b>	<b>58</b>
<b>5.3. Evaluation de l'activité anticoagulante</b>	<b>60</b>
<b>5.3.1. Évaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène</b>	<b>60</b>
<b>5.3.2. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène</b>	<b>61</b>
<b>Conclusion et perspective</b>	<b>63</b>
<b>Références bibliographique</b>	<b>64</b>
<b>Annexes</b>	<b>65</b>

## Résumé

Dans le but de valoriser les plantes médicinales Algérienne, nous sommes intéressés dans cette étude d'une part, à la caractérisation qualitative et quantitative des extraits aqueux et méthanolique brut d'une plante médicinale de la pharmacopée traditionnelle récoltée de la région de Khenchela (*Thapsia garganica L*), et d'autre part, à la détermination des activités biologiques.

Le screening phytochimique réalisé a permis de mettre en évidence la présence des saponines, des tanins, des alcaloïdes des composés réducteurs et les flavonoïdes surtout de type flavones et flavonones. Ainsi, l'étude qualitative par CCM des extraits a révélé une diversité remarquable des composés flavonoïques susceptibles d'exprimer l'activité recherchée.

L'analyse quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes par le réactif du Folin-Ciocalciu et par la méthode du trichlorure d'aluminium respectivement, a dévoilé la richesse de l'extrait méthanolique par rapport à l'aqueux en polyphénols et flavonoïdes avec des teneurs égales à  $57,72 \pm 6,69 \mu\text{g EAG/mg}$  et  $47,68 \pm 4,11 \mu\text{g EQ/mg}$  d'extrait.

L'activité antioxydante obtenue a été évaluée *in vitro* via deux méthodes: le test de piégeage de radical libre DPPH et la méthode de réduction du fer (FRAP): cependant, l'oxydation du DPPH est efficacement inhibée par l'EMB avec une IC<sub>50</sub> égale à 1,68 mg/ml suivi par l'EAQ avec IC<sub>50</sub> égale à 2,1 mg/ml. Même ces résultats sont remarquables avec l'activité chélatrice du fer et le pouvoir réducteur qui ont été forts.

. L'activité antihémolytique et anticoagulante ont été avérées intéressantes pour les deux extraits notamment l'EMB.

Les activités biologiques obtenues ont été dépendantes et en bonne corrélation avec la teneur en polyphénols totaux et celle en flavonoïdes qui constituent des puissants agents antioxydants.

En conclusion; *Thapsia garganica L* est doué d'une activité antioxydante, antihémolytique et anticoagulante remarquables. De ce fait, il peut constituer une ressource naturelle afin d'atténuer les complications du stress oxydant associé ou déclenchant des maladies cardiovasculaires.

**Mots clés : *Activité anticoagulante, Activité antihémolytique, Activité antioxydante, Flavonoïdes, Thapsia garganica L.***

*Abstract*

In order to promote the Algerian medicinal plants, we are interested in this study on the one hand, the qualitative and quantitative characterization of the aqueous extracts and crude methanol of a medicinal plant of the traditional pharmacopoeia harvested from the Khenchela region (*Thapsia garganica* L), and secondly, to the determination of biological activities.

The phytochemical screening carried out made it possible to highlight the presence of saponins, tannins, alkaloids, reducing compounds and flavonoids mainly flavones and flavonones. Thus, the qualitative study by TLC extracts revealed a remarkable diversity of flavonoid compounds likely to express the desired activity.

Quantitative analysis of total polyphenols and flavonoids by the Folin-Ciocalteu reagent and by the aluminum trichloride method, respectively, revealed the richness of the methanolic extract compared to aqueous polyphenols and flavonoids with levels equal to  $57.72 \pm 6.69$   $\mu\text{g}$  EAG / mg and  $47.68 \pm 4.11$   $\mu\text{g}$  EQ / mg of extract.

The antioxidant activity obtained was evaluated *in vitro* by two methods: the DPPH free radical scavenging test and the iron reduction method (FRAP): however, the oxidation of the DPPH is effectively inhibited by the EMB with an IC<sub>50</sub> equal to 1.68 mg / ml followed by EAQ with IC<sub>50</sub> equal to 2.1 mg / ml. Even these results are noticed with the chelating activity of iron and the reducing power which have been strong.

The antihemolytic and anticoagulant activities were found to be interesting for the two extracts, in particular the EMB.

The biological activities obtained were dependent and in good correlation with the content of total polyphenols and that with flavonoids which constitute powerful antioxidant agents.

In conclusion; *Thapsia garganica* L is endowed with remarkable antioxidant, anti-hemolytic and anticoagulant activity. As a result, it can be a natural resource to mitigate the complications of oxidative stress associated with or triggering cardiovascular disease.

**Key words: Anticoagulant activity, Antihemolytic activity, Antioxidant activity, Flavonoids, Thapsia garganica L.**

## ملخص:

بههدف تقييم النباتات الطبية في الجزائر. اهتمنا في هذه الدراسة من جهة المميزات النوعية و كمية المستخلصات المائية و الميثانولية الخام للنباتات الطبية و الصيدلانية القديمة المنتقات من مدينة خنشلة. و تحديد النشاطات البيولوجية من جهة أخرى.

مجموعة الاختبارات الفيتوكيميائية تحقق تواجد "السابونين". و "التانين". و "الألكويدات" للمكونات المخفضة خاصة انواع الفلافون . كذلك الدراسة النوعية عبر CCM للمستخلصات التي تكشف تنوعا ملحوظا لمكونات فلافونية قابلة للتجربة و عملية البحث.

التحليل الكمي للبوليفينول و الفلافونويد عبر ردة فعل "فولين-سيوكالو" و عبر طريقة التريكلورير للألمنيوم .

كشفت عن ثراء المستخلص الميثانوليكي بالنسبة للمائع بالبوليفينول و الفلافونويد بمضمون يتراوح بين  $6.69 \pm 57.72$   $\mu\text{g EAG/mg}$  و  $4.11 \pm 47.68$   $\mu\text{g EQ/mg}$  من المستخلص.

النشاط الأوتني أكسيدي المنتج "الخرج خلوي" طريقتين: اختبار التفخيخ للجذر الحر DPPF و كيفية ارجاع الحديد (FRAP) . بينما تأكسد DPPH يتم تثبيطه بفعالية عبر ال EMB مع IC50 يساوي 1,68mg/ml متبعة بال IC50 تساوي 2,1mg/ml. حتى هذه النتائج قد لوحظت بنشاط نزع الحديد و قدرة ارجاعه الذي كان فعال.

- نشاط مضاد الانحلال و مضادات التخثر كانت مهتمة بمستخلصي ال EMB.
- النشاطات البيولوجية الناتجة كانت تابعة و متلازمة مع مضمون البوليفينول التام و تلك التي في الفلافونويد التي كونت مواد مضادة للأكسدة.

في النهاية: " نبتة ال درياس " هي مادة مفعمة بمضادات الأكسدة ,مضادات الانحلال و مضادات التخثر. و من هذا فإنها تعتبر منبع طبيعي لإزالة و كبح اضطرابات التوتر المسببة للأمراض القلبية و العقلية.

الكلمات المفتاحية: نشاط مضاد الانحلال. نشاط مضاد التخثر. نشاد مضاد الأكسدة . الفلافونويد. نبتة ال درياس.

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b>	<b>activités biologiques des métabolites secondaires</b>	<b>07</b>
<b>Tableau 2</b>	<b>Principales classes des polyphénols</b>	<b>10</b>
<b>Tableau 3</b>	<b>Activités biologiques des polyphénols</b>	<b>13</b>
<b>Tableau 4</b>	<b>Principaux noms vernaculaires de <i>Thapsia garganica</i> L.</b>	<b>16</b>
<b>Tableau 5</b>	<b>Quelques exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-hémolytique</b>	<b>29</b>
<b>Tableau 6</b>	<b>Rendement et caractéristiques des extraits issus de <i>Thapsia garganica</i></b>	<b>45</b>
<b>Tableau 7</b>	<b>Analyse phytochimique préliminaire de l'extrait méthanolique brut ( EMB) de <i>Thapsia garganica</i></b>	<b>46</b>
<b>Tableau 8</b>	<b>Analyse phytochimique préliminaire de l'extrait aqueux (EAq) de <i>Thapsia Garganica</i></b>	<b>48</b>
<b>Tableau 9</b>	<b>CCM de l'EMB Système solvant : BAW (40:10:50)</b>	<b>53</b>
<b>Tableau 10</b>	<b>CCM de l'EAq Système solvant : BAW (40:10:50)</b>	<b>54</b>

## Liste des figures

N° de figure	Titre	N° de page
N°01	Les principales familles de principes actifs utilisées en phytothérapie	05
N°02	Structure de base des flavonoïdes	11
N°03	Photographies des différentes parties aériennes de <i>Thapsiagarganica</i>	17
N°04	les échanges de la membrane érythrocytaire	27
N°05	Voies de la coagulation	30
N°06	la carte géographique de Khenchela montrant le lieu de récolte	32
N°07	Photo du Rotavapeur utilisé pour sécher l'extrait méthanolique brut.	34
N°08	Réduction du DPPH' par un antioxydant	39
N°09	Courbe d'étalonnage de l'acidegallique (moyenne $\pm$ SD de trois mesures).	50
N°10	Histogramme représente la teneur des extrais en polyphenols	51
N°11	Courbe d'étalonnage de la quercétine (moyenne $\pm$ SD de trois mesures).	52

<b>N°12</b>	<b>Histogramme représente la teneur des extraits en flavonoids</b>	<b>52</b>
<b>N°13</b>	<b>Photos des chromatogrammes résultant de l'analyse des extraits EMB et EAq par chromatographie sur gel silice (révélation à UV (365 nm) par le système solvant BAW (4:1:5).</b>	<b>54</b>
<b>N°14</b>	<b>Courbes présentant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration des extraits.</b>	<b>56</b>
<b>N°15</b>	<b>Histogramme représente les concentrations inhibitrices à 50% le radical DPPH des extraits.</b>	<b>56</b>
<b>N°16</b>	<b>Courbes présentant le pouvoir réducteur du fer par les extraits</b>	<b>58</b>
<b>N°17</b>	<b>Evolution de l'effet antihémolytique des extraits de <i>ThapsiagarganicaL</i> en fonction de leur concentration en comparaison avec le controle positif.</b>	<b>59</b>
<b>N°18</b>	<b>Résultat de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène</b>	<b>60</b>
<b>N°19</b>	<b>Résultat de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endoogène</b>	<b>61</b>

## Liste des abréviations

- **% PI** : Pourcentage d'Inhibition.
- **°C** : degré celsius
- **Abs** : absorbance
- **Ac As** : acide ascorbique
- **AlCl<sub>3</sub>**: Le chlorure d'aluminium
- **CCM** : Chromatographique sur Couche Mince.
- **CM** : Chloroforme / Méthanol
- **CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice.
- **CO**: monoxyde de carbone
- **DMSO** : Diméthyl Sulfoxide.
- **DPPH** : Diphényl Picrylhydrazyl (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>).
- **DZI** : Diamètre de la zone d'Inhibition.
- **E** : Extrait.
- **EMB** : extrait méthanolique brut.
- **EOA** : Espèces Oxygénées Activées.
- **EQ** : Equivalents de Quercétine.
- **ERO**: Espèces réactives d'oxygène.
- **FeCl<sub>3</sub>**: Trichlorure de fer.
- **GR** : Globule Rouge.
- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxide d'hydrogène.
- **Hb**: Hémoglobine.
- **HBPM** : Héparines de Bas Poids Moléculaire.
- **HCl** : Acide chlorhydrique
- **HPLC** : chromatographie en phase liquide à haute performance.
- **I%**: Inhibition des radicaux libres en pourcentages.
- **I<sub>2</sub>**: Diiode.
- **IC 50**: Concentration inhibitrice à 50 %.
- **KI** : Iodure de potassium.
- **MeOH** : Méthanol

- **mg EAG/mg** : microgrammes équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait
- **Mg EQ/g E** : Equivalent milligramme de quercétine par g d'extrait
- **ml** : millilitre
- **mM**: Millimolaire
- **Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : carbonate de sodium
- **ND** : Non déterminé
- **nm** : Le nanomètre
- **O<sub>2</sub>** :oxygène singulet
- **O<sub>2</sub><sup>o</sup>** : Le radical anion superoxyde
- **OH** : groupement hydroxyle
- **OH** : radical hydroxyle
- **PBS** : phosphate buffered saline
- **PBS** : Tampon Phosphate Saline.
- **pH** : potential Hydrique.
- **Pp** : Poids de la poudre en gramme (g)
- **Ps** : Poids de l'extrait sec en gramme (g)
- **Rf**: Rapport frontal.
- **SD** : Standard Déviation.
- **TCK** : Temps de Céphaline Kaolin.
- **TP** : Taux de Prothrombine.
- **TQ** : Temps de Quick.
- **tr** : tour.
- **UI** : Unité International.
- **UV** : Ultra Violet.
- **UV**: rayonnement ultrat violet
- **ZI** : Zones d'Inhibition.
- **µg** : microgramme
- **µg EQ/mg**: microgramme Equivalent par milligramme
- **µgEQ/mg d'extrait** : microgramme d'équivalents quercétine par milligramme d'extrait
- **µl**: microlitre

# *Introduction*

## **Introduction**

Depuis la nuit des temps, de nombreuses plantes sont utilisées dans les traitements traditionnels. Dans le monde entier et depuis longtemps les plantes sont utilisées en médecine naturelle, elles possèdent de réels effets thérapeutiques. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 80% de la population mondiale dépendrait de la médecine traditionnelle pour leurs premiers soins. Toujours selon l'OMS, le nombre de personnes utilisant la médecine traditionnelles et donc les plantes médicinales est, non seulement très important mais est en hausse considérable. De nos jours, c'est "une mode", même les plus jeune sont sensible à cette médecine ancestrale. **(Guo, Gao et Liu 2007; Shinde, Malpathak et Fulzele ;2010)**

Les plantes médicinales sont généralement connues et appréciées pour de nombreux avantages pour la santé, tels que la baisse de la pression artérielle, la prévention des maladies cardiovasculaires ou la réduction du risque de cancer, du fait de leur activité antioxydante. Nous pouvons donc dire que la majorité des effets de ces plantes est présente grâce à une activité antioxydante (traitement et prévention des cancers par exemple) **(Ghasemzadeh et Ghasemzadeh 2011 ; Mothana 2011 ; Prochazkova, Bousova et Wilhelmova 2011)**

Les plantes médicinales, ou une partie de ces plantes tels que les feuilles, les rhizomes, les racines, les fleurs, les fruits ou encore les graines, peuvent être utilisées de différentes façons. Nous les utilisons crues, cuites, en décoctions, en poudre séchée ou encore de façon plus élaborée, par des extrait d'agent actif, (extrait par solvant, jus, huiles essentielles....). **( Khales Athmouni, Taheni Beelghth et al ;2015).**

*Thapsia garganica* est une plante surtout connue pour ces effets diurétiques, émétiques et purgatifs, elle est utilisée en médecine traditionnelle pour de nombreuses maladies, et aussi en tant que "cure dépurative" au début du printemps. Elle est appliquée en cataplasme sur la poitrine afin de traiter les bronchites et les pneumonies. Pour des maux moins graves. D'autres utilisations traditionnelles sont sa préparation dans du lait afin d'être ingérée oralement ou encore l'utilisation de morceaux de racines pures pour calmer les douleurs dentaires. **(adjel ; Zellagui et Gherraf ;2011).**

*Thapsia garganica* possède, selon les chercheurs, de piègeur de radicaux. Ceci lui permettrait d'être une source naturelle d'antioxydants très intéressant. Le problème réside, comme nous l'avons stipulé, dans sa haute toxicité. Nous devons donc nous assurer que les antioxydants soient sûrs, que ce soit pour un usage médical ou commercial.

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à entreprendre ce travail, dont on a visé à démontrer la richesse de notre plante *Thapsia garganica* en flavonoïdes et en polyphénols, et

déterminer *in vitro* l'activité antioxydante, anti coagulante et anti-hémolytique des extraits aqueux et organique.

C'est dans ce contexte, que s'inscrit la présente étude dont ce manuscrit s'articule autour de deux parties: Outre l'introduction et la conclusion générale, la première partie est une synthèse bibliographique dans la quelle, sont abordés trois chapitres: la phytothérapie et les plantes médicinales, *Thapsia garganica* et les activités biologiques étudiées.

La deuxième partie est expérimentale divisée en deux chapitres; le premier présente le matériel et les méthodes analytiques utilisées pour l'extraction, identification des extrais par CCM, étude de leurs teneurs en flavonoids et polyphénols et l'évaluation *in vitro* du pouvoir anti-oxydant, anti-coagulant et anti-hémolytique des extraits aqueux et méthanolique brut, le deuxième chapitre expose les résultats obtenus suivis de la discussion.

*Synthèse*  
*bibliographique*

# *Chapitre I*

## **I. La phytothérapie et les plantes médicinales**

### **1. La phytothérapie**

Le terme phytothérapie vient du grec : (phytos) : la plante et (therapiae) : la thérapie, elle signifie le traitement ou la prévention des maladies par l'usage des plantes. La Phytothérapie utilise des plantes médicinales dans leur totalité ou certaines parties de la plante dans des buts thérapeutiques, elle compte parmi les premières et les plus anciennes méthodes curatives depuis l'aube de l'humanité. **(Frederich ; 2014).**

Historiquement, la médecine classique n'existerait pas sans la phytothérapie. C'est avec le développement ultra-rapide des sciences naturelles au XIXe siècle, et particulièrement avec les avancées de la chimie, que l'on a pu isoler des composants purifiés des plantes et produire leurs dérivés partiellement synthétiques, puis fabriquer de nouvelles molécules synthétisées chimiquement, pour finalement les introduire comme elles le sont actuellement dans l'arsenal de la médecine classique. Un grand nombre provient de la nature du moins en ce qui concerne leur structure de base. **(Kasmi ;2014).**

### **1.2. La phytothérapie en Algérie**

En Algérie les plantes occupent une place importante dans la médecine traditionnelle, qui, elle-même est largement employée dans divers domaines de la santé.

Dans les dernières années, la phytothérapie est très répandue, des herboristes sont partout et sans aucune formation spécialisée ou connaissance scientifique sur la phytothérapie, ils prescrivent des plantes et des mélanges pour toutes les maladies : diabète, rhumatisme, minceur et même les maladies incurables.

Des chiffres recueillis auprès du Centre national du registre de commerce, montrent qu'à la fin 2009, l'Algérie comptait 1926 vendeurs spécialisés dans la vente d'herbes médicinales, dont 1393 sédentaires et 533 ambulants. **(Belguitar ; 2015).**

### **2. Les plantes médicinales**

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

Les plantes médicinales sont essentiellement utilisées sous deux formes :

➤ Comme un mélange complexe contenant un large spectre de constituants (infusion, des huiles essentielles et des extraits des teintures)

➤ Pure, chimiquement définie comme des principes actifs

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

## **2.1. Généralités**

On qualifie de plante médicinale toute plante possédant des propriétés agissant sur l'organisme humain ou animal de façon bénéfique. Les plantes médicinales sont utilisées en médecine naturelle. Généralement, seule une partie de la plante est utilisée, que ce soit le bulbe, les racines, les feuilles, les graines, les fruits ou les fleurs. La branche de la médecine qui utilise des plantes médicinales est appelée phytothérapie. Parmi les principes actifs les plus courants des plantes médicinales, on peut nommer les polyphénols, les terpènes, les stéroïdes et les alcaloïdes. **(cite1)**

## **2.2. Définition médicales**

Ce sont des plantes inscrit à la pharmacopée, et qui sont considéré comme des médicaments, leur vente est exclusivement réservée aux pharmaciens, et aux herboristes **(Chevaltier ; Crouzet-Seganac ;2004)**

## **2.3. Définition chimique**

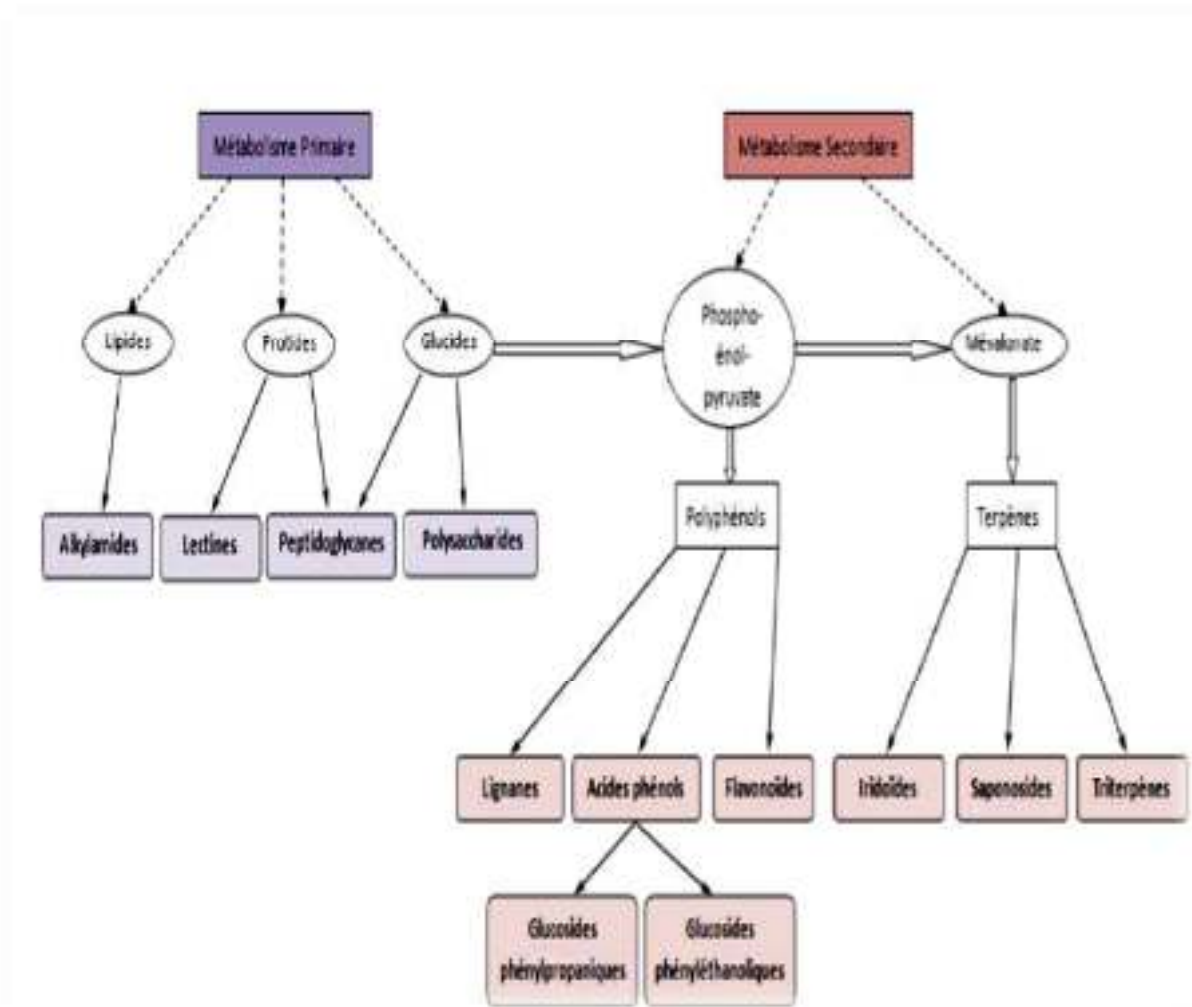
Les plantes médicinales sont des plantes possédant des molécules à l'intérieur de leur organe(feuille, fleurs....etc.) et pouvant selon des technique chimique (extraction, distillation ...)permettent à l'isolation des principes éléments actifs (huiles, alcool...) pour des buts thérapeutiques**(Benkiki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

## **2.4. Définition biologique**

Les plantes médicinales sont des végétaux connus pour leurs pouvoirs bienfaiteurs ; dont l'un de ces organes comme l'écorce, fruits ... etc. possédants des vertus curatives . **(Triki ; 2002).**

### 3. Les métabolites primaires et secondaires

Les produits naturels des plantes peuvent être classés en deux catégories, les métabolites primaires et les métabolites secondaires (**Figure 1**).



**Figure 1** : Les principales familles de principes actifs utilisées en phytothérapie (Bruneton ; 2009).

#### 3.1. Les métabolites primaires

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

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

complexes (polymères comme la cellulose, l'amidon ou les pectines), acides aminés (constitutifs des protéines), acides gras (constitutifs des lipides)...etc (Bruneton, J. (2009).

### **3. 2.Métabolites secondaires**

Les plantes produisent un grand nombre des métabolites secondaires, d'une variété structurale extraordinaire souvent complexe (Khiri et Lalaoui ; 2007).

La variation des conditions écologiques, édaphiques et climatiques, interactions entre les végétaux, entre les végétaux et les animaux sont des facteurs qui peuvent stimuler la production des métabolites secondaires. La concentration de ces derniers variée selon l'espèce, l'âge de la plante, la saison et la partie de la plante (Aneb ; 2017).

Les métabolites secondaires ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent de réactions chimiques ultérieures (Khiri et Lalaoui ;2007).

Ces composés sont localisés dans les vacuoles (flavonoïdes, alcaloïdes), dans des organites spéciaux tels que chloroplastes (avec la chlorophylle), chromoplastes (caroténoïdes) (Aneb ; 2017).

Les métabolites secondaires sont classés en plusieurs grands groupes : parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpénoïdes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activité biologique (Bouزيد ; 2009).

#### **3.2.1. Activités biologiques des métabolites secondaires**

Le spectre d'activité biologique des métabolites secondaires (Tableau 1) est très large, qui liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires et à leurs effets synergiques (Zhiri ;2006).

Tableau 1 : Activités biologiques des métabolites secondaires.

Activités biologiques		Composants chimiques	Références
Activité bactérienne	Bactériostatique	Limonène, alpha-humulène, beta-pinène	Moubarki, 2010
	Bactéricide	carvacrol, thymol, eugénol, néral, géraniol, citronnellal et cuminal	Merouane, 2013
Activité antifongique	Fongistatique	Limonène, alpha-humulène, beta-pinène	Moubarki, 2010
	Fongicide	eugénol, chavicol 4-allyl-2-6 diméthoxyphénol	Chemloul, 2014
		Phénols, alcools, cinnamaldehyde, cétone, ester, hydrocarbure	Labioud, 2016
Activité antivirale		acétate d'anéthole, carvone, bêta-caryophyllène, citral, eugénol, limonène, linalol, linalyle,	Merouane, 2013
		Quercétine, apigénine, catéchine, hespéridin, phénylpropanoïdes	Bouhaddouda, 2016
Activité anticancéreuse		l'alpha-terpinène, gammaterpinène, alpha-pinène, p-cymène, terpinéol, thymol, citral, le 1,8 -cineol	Aneb, 2017
Activité anticancéreuse		d-limonène, géraniol, alpha-humulène	Piochon, 2008
		lutéoline, quercétine,	Zeghad, 2009

	kaempférol, apigénine, taxifoline, épigallocatechine-3-gallate	
Activité insecticide	Phénothrine, pyrethrum	Jouault, 2012
	safrole et l'eugénol	Achache, 2017
Activité antiparasitaire	aldéhydes aromatiques	Leroyer, 2015
	Phénols, alcools terpéniques, cétones	Hélène, 2015
Activité anticoagulant	Cétones, coumarines	Mohammed, 2010
Activité antioxydant	alcools, éthers, cétones, tinalool, 1,8-cinéole, géraniol/nérol, citronellal, l'isomenthone, menthone, α-terpinène, γ-terpinène, l'α terpinolène	Piochon, 2008
	Phénols, polyphénols	Laib, 2011
Activité antiinflammatoire	monoterpènes hydrocarbonés, sesquiterpènes hydrocarbonés, alcools sesquiterpéniques	Roger, 2010
	Aldéhydes	Mayer, 2012
	Cétones, acides	Leroyer, 2015
	Saponosides	Touami, 2016
Activité antiseptique	Aldéhydes, terpènes	Benayad, 2013
Activité Immunostimulante	Cétones, monoterpènes	Mohammed, 2010
Activité antalgique	Aldéhydes terpéniques, acides	Leroyer, 2015
Activité antalgique	Monoterpènes, éthers	Achache, 2017
Activité antioedémateuse	Coumarine	Hamidi, 2013
	Saponosides	Touami, 2016

### 3.2.1.1. Polyphénols

- **Définition**

Le terme « phénol » regroupe un ensemble de molécules hydroxylées substituées, dérivées de benzène (phénols simples) et de ses homologues supérieurs (crésols) et de molécules à noyaux poly condensés (naphtols et naphtol sulfonés) (CEAEQ ; 2016).

Le terme « polyphénol » désigne des corps dont la molécule contient plusieurs

Fonctions Phénol. Ce sont des substances qui possèdent un ou plusieurs cycles aromatiques avec au moins un groupe hydroxyle (Urquiaga et Leighton ; 2000 ; Bennick ; 2002). D'une autre manière, les polyphénols sont des molécules composées d'au moins un groupe benzénique (six atomes de carbone liés en un hexagone, et chaque atome de carbone lié en outre à un atome d'hydrogène), dont certains hydrogènes peuvent être remplacés par des groupes hydroxyles OH (Cheynier et Sarni-Manchado ; 2006).

Les polyphénols constituent un des plus répandus groupes de substances dans les plantes. C'est une classe constituée d'environ 8 000 composés (Middleton et al ; 2000). Il devient, de plus en plus clair, que ces composés phénoliques sont essentiels à la survie de la plante, en assurant sa défense contre des attaques microbiennes et en rendant la nourriture désagréable aux prédateurs (Bennick ; 2002).

- **Classification et structures**

Plusieurs classifications des composés phénoliques basées sur des critères différents ont été proposées :

- ❖ Selon le nombre de noyaux aromatiques qu'ils contiennent, et la nature de leur squelette carboné, les classes majeures des polyphénols sont : acides phénoliques (C6-C3), flavonoïdes (C6-C3-C6), stilbènes (C6-C2-C6) et lignanes (C6-C3-C3-C6) ( Garry et al., 2003 )
- ❖ Selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base, la classification des polyphénols est la suivante (Tableau 2) :

**Tableau 2** :Principales classes des polyphénols ( Urquiaga et Leighton ;2000).

Nombre d'atomes de C	Le squelette de base	Classe
6	C6	Phénols Simple Benzoquinones
7	C6-C1	Acides phénoliques
8	C6-C2	Acetophenones Tyrosine derivatives Acide Phenylacetique
9	C6-C3	Acide Hydroxycinnamique Phenylpropenes Coumarines Isocoumarines Chromones
10	C6-C4	Naphthoquinones
13	C6-C1-C6	Xanthonnes
14	C6-C2-C6	Stilbenes Anthraquinones
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes Isoflavonoïdes
18	(C6-C3) <sub>2</sub>	Lignans Neolignans
30	(C6-C3-C6) <sub>2</sub>	Biflavonoïdes
N	(C6-C3) <sub>n</sub> (C6) <sub>n</sub> (C6-C3-C6) <sub>n</sub>	Lignins Catéchol mélanines Flavolans (Tannins condensés)

- ❖ Selon leur structure chimique, les polyphénols sont divisés en 4 classes majeures (Bennick ; 2002): phénols, acides phénoliques, flavonoïdes et tannins (tannins hydrolysables et Tannins condensés).

### 3.2.1.2. Phénols et acides phénoliques

Les phénols simples sont rares dans la nature (catéchol, phloroglucinol ...) (Krief ;2003).

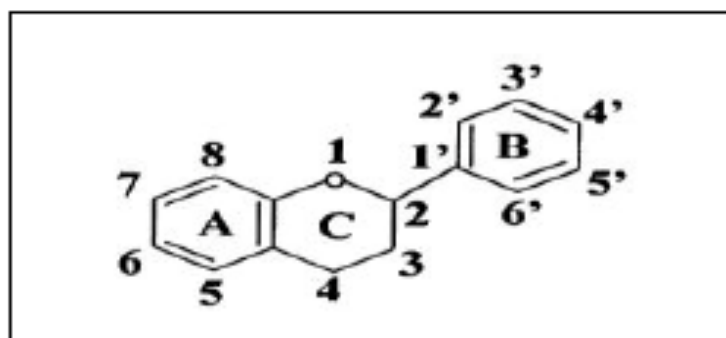
Les acides phénoliques sont tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (Samadi ; 2000). Deux classes d'acides phénoliques peuvent être distinguées: les dérivés de l'acide benzoïque (composés en C6-C1) tels que l'acide gallique élément constitutif des tanins hydrolysables ou les dérivés de l'acide cinnamique (composés en C6-C3) comme l'acide caféique qui sont souvent estérifiés .

(Figure 4) (Samadi ;2000, Scalbert et Williamson ; 2000, Garry et al ; 2003, Krief ;2003, Cheynier ;2005).

### 3.2.1.3. Flavonoïdes

Le terme flavonoïdes (du latin flavus, jaune) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (**Marfak ;2003**). Ils peuvent être considérés parmi les agents responsables des couleurs de plante à côté des chlorophylles, caroténoïdes et bêtaïnes (**Ladhem ;2016 ; Zarrouki ;2009**). On trouve les flavonoïdes, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux (**Zerargui ;2015**).

Les flavonoïdes ont une structure de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> à poids moléculaire faible. D'une autre manière, ce sont des polyphénols complexes dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C). Ce sont des dérivés du noyau flavane (noyau de base) portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides (**Figure 2**)(**Hadi ;2004 , Ladhem ;2016**).



**Figure 2** :Structure de base des flavonoïdes (**Marfak ; 2003 , Hadi ; 2004**).

### 3.2.1.4. Tannins

Le terme « tanin » vient du mot Celtique ancien pour le chêne, une source typique pour les tannins (**Hagerman ; 2002**) utilisés dans la fabrication du cuir ( **Peronny ; 2005**).

Les tannins sont des composés polyphénoliques, solubles dans l'eau mais leur solubilité varie selon le degré de polymérisation. Ils sont solubles aussi dans les alcools et l'acétone. Leurs poids moléculaires sont très élevés (500-3000 Daltons) (**Peronny ;2005** )

La caractéristique la plus déterminante des tannins est leur capacité de former des complexes (par précipitation) avec les polymères naturels comme les protéines nutritives, les enzymes digestives, les polysaccharides (l'amidon, la cellulose, l'hémicellulose...etc.), les lipides, les acides nucléiques et les acides aminés. De plus, ils sont capables de capter les ions métalliques et particulièrement le fer, les alcaloïdes (**Kumbasli ; 2005**)et les métaux lourds (**Bruneton ;1993**).

Les deux principaux groupes basés sur des différences structurales sont :

- **Tannins hydrolysables**

Les Tannins hydrolysables donnent par hydrolyse un ose et un nombre variable des molécules d'acides phénolique, acide gallique ou acide ellagique (**Zarrouki ;2009**).

Sont des esters de glucose, c'est-à-dire un noyau central de glucose (dans certain cas des polysaccharides ont été identifiés) sur lequel se fixent au moyen d'une liaison ester, des acides : acide gallique pour le groupe des gallotannins, l'acide hexahydroxydiphénique (ou ellagique) pour le groupe des ellagitannins . Leurs hydrolyses par des acides, des bases ou certains enzymes libère le glucose ainsi que les acides galliques ou phénoliques liés. Ils n'existent que chez les dicotylédones (**Bouزيد ; 2009 et Zarrouki ;2009**).

- **Tannins condensés**

On les appelle également les proanthocyanidines car les tannins condensés produisent les anthocyanidines quand on les chauffe dans des conditions acides. Ce sont des polymères de flavan-3-ols (appelés aussi catéchines) et de flavan-3,4-diols (appelés leucoanthocyanidines), ou un mélange des deux liées entre elles par des liaisons type carbone-carbone le plus souvent 4→8 ou 4→6 (**Zarrouki ;2009**). Les tannins condensés sont des polymères de très fort poids moléculaires, les plus couramment décrits faisant 5000 Da, mais on en a découvert de plus de 30 000 Da (**Peronny ;2005**). Plus le poids moléculaire des tannins condensés augmente (>5000 Da) plus ces derniers deviennent insolubles dans les solutions physiologiques et perdent leur capacité à précipiter les protéines (**Kumbasli ; 2005**).

### 3.2.1.5. Coumarines

Les coumarines tirent leur nom de « coumarou », nom vernaculaire de fève tonka (*Dipterix odorata* Wild., Fabaceae) d'où fut isolée en 1982 (**Bruneton ;1993**). Ils sont des composés aromatiques dérivant de l'acide O- hydroxy-Z- cinnamique connue dans la nomenclature interactionnelle comme 1-benzopyrane-2-one ou 1,2-benzopyrone (**Zarrouki ; 2009**).

Les coumarines sont classées principalement en coumarines simples, prénylées, furanocoumarines, pyranocoumarines . C'est une classe importante de produits naturels, elles donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché. A l'exception des algues, ces composés sont les constituants caractéristiques du règne végétal

chlorophyllien. Elles se trouvent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines (Deina et al ; 2003 , Booth et al ; 2004).

Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration et aussi selon l'espèce. Dans la cellule végétale elles sont principalement présentes sous forme glycosylée , Cette glycosylation est une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques de ces molécules. Elles sont considérées comme des phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries. Les coumarines peuvent également se trouver dans le règne animal (les glandes à sécrétion odoriférante du castor) et chez certains microorganismes (Hofmann ; 2003).

Les coumarines sont solubles dans les solvants organiques tels que l'éther, les solvants chlorés et les alcooles. Leurs formes hétérocycliques sont plus ou moins solubles dans l'eau. Elles ont une absorption caractéristique en UV vue leurs structures aromatique (Zarrouki ; 2009).

#### 4. Activités biologiques des polyphénols

Les activités biologiques de principales classes des polyphénols sont représentées dans le (tableau 3).

Tableau 3 :Activités biologiques des polyphénols

Composant phénolique	Activité biologique	Référence
Acide phénolique	Antibactériennes Antifongiques Antioxydants	Badereddine <i>et al.</i> , 2014
	antiulcéreuses antiparasitaires	Nsemi Muanda, 2010
	Anti tumorales antiparasitaires antibactériennes anti-inflammatoires analgésiques hypotenseurs antivirales diurétiques antioxydants antithrombotique anti-allergique anticarcinogène	Nsemi Muanda, 2010
	anti-ulcère	Yezza <i>et al.</i> , 2014
	antispasmodiques	Hamza <i>et al.</i> , 2015

Flavonoïdes	anti-hépatotoxique activité hypocholestérolémiante activité antidiabétique activité antimutotique activité anxiolytique	Zoughlache, 2009
	Activités estrogéniques anti-estrogéniques Activité sur les maladies neuro-dégénératives Activité insecticide	Morel, 2011
	anti-influenza	Khaldi, 2015
	Vasodilatateur	Tigrine, 2014
Coumarine	Protectrices vasculaires, anti- inflammatoires, anti parasitaires analgésiques anti œdémateuses	Nsemi Muanda, 2010
Tanin	Anticoagulant Antioxydant Inductrice de l'apoptose Anti diarrhéique Anti tumorales Immunostimulant Antimutagène Anti hypertensive Antiinflammatoire Anti virale Antibactérienne Antifongique	Biaye, 2002
	antiulcéreuse stabilisation du collagène	Hamza <i>et al.</i> , 2015
	cicatrisant	Aissous <i>et al.</i> , 2016
Lignine	Antiviral, anticancéreux, antimicrobien antioxydant	Aissous <i>et al.</i> , 2016

# *Chapitre II*

## Chapitre II : *Thapsia garganica*

### 1 . Généralités sur les apiacées

Cette vaste famille a été créée par Antoine Laurent de Jussieu en 1789 sous le nom d'Umbelliferae, en relation avec la structure en ombelles des inflorescences, puis nommée Apiacées par John Lindley en 1836 (Boitineau ; 2010) .

La famille des Apiacées (*Apiaceae*), appelées aussi Ombellifères (*Umbelliferae*), est une famille de plantes dicotylédones, qui comptent près de 3 000 espèces qui se répartissent essentiellement dans les régions tempérées du monde mais surtout dans l'hémisphère Nord. C'est une famille relativement homogène, caractérisée notamment par son inflorescence typique, l'ombelle.(Guignard ;1998 , Judd *et al* ; 2002).

Les apiacées sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces. Les feuilles sont alternes, composées, pennées, palmées ou simples.

Les fleurs sont blanches, jaunâtres, verdâtres ou rosées, généralement hermaphrodites, mais parfois uni sexuées .Les racines, tiges et feuilles sont parcourues par des canaux sécréteurs qui contiennent un mélange d'essence et de résine.

Les tiges sont à entre -noeuds souvent creux, à canaux sécréteurs contenant des huiles essentielles et des résines, des saponines triterpéniques, des coumarines, des polyacétylènes falcarinone, des monoterpènes et des ses quiterpenes ; à umbelliférose (trisaccharide) comme élément de réserve (Gaussen *et al* ; 1982 , Guignard ; 1998 , Judd *et al* ; 2002).

#### 1.1. Le genre *Thapsia*

*Thapsia* est un genre de plantes à fleurs avec 41 espèces, appartenant à la famille des apiacées. Ils sont originaires d'Afrique, d'Asie et d'Europe. *Thapsia garganica* L. est une espèce répandue dans le bassin méditerranéen, qui a pour habitat le bord des routes et les champs (Gómez ; 2007).

*Thapsia* est une herbe robuste de 1 a 2 mètres, vivace ; les parties aériennes sont glabres, les feuilles lisses, finement découpées en étroites lanières. Les ombelles jaunes atteignent 25 cm de diamètre elles sont nues a la base.(Quezel , Santa ; 1962–1963) .

*Thapsia garganica* L. est présente au Maroc, en Algérie, en Tunisie et en Lybie (Dobignard et Chatelain ; 2011).), mais aussi en Turquie, en Espagne, au Portugal, en Italie et en Grèce (Hand ;2011).

Très commun dans tout le pourtour méditerranéen, surtout abondant dans le Maghreb et, plus particulièrement, en Algérie où il est adapté à la sécheresse méditerranéenne et à l'aridité des steppes et des montagnes sahariennes; tous les sols lui conviennent, depuis les sables maritimes jusqu'aux sables sahariens du nord en passant par toutes les formes d'argiles sèches ou gorgées d'eau (Merad, Hammiche ; 1992), le plus recherché était celui des montagnes de Kabylie et des Aurès.

### 1.2. L'espèce *Thapsia garganica* L.

D'après (Lauzer ; 1868), le nom *Thapsia garganica* L. est composé de deux mots :

- Thapsia : tiré de l'île de Thapsos où elle fut découverte pour la première fois.
- Garganica : épithète donnée par rapport au nom d'une montagne en Italie « Gargano » où elle se trouve en abondance. (Soubeiran et Regwuld ; 1988).

**Tableau 4** : Principaux noms vernaculaires de *Thapsia garganica* L.

Langue	Nom	Référence
Arabe	Bou nâfa ou Derias بونا فعاوردرياس	(Wassel et Ahmed ; 1974, Rohlfs ; 2002) .
Anglais	False fennel	
Berbère	Aderyes	(Hseini, Kahouadji, Lahssissene et Tijane ; 2007).
Français	Thapsie ou Faux fenouil	

### 1.3. Classification botanique

La systématique botanique permet de classer *Thapsia garganica* parmi les systèmes du règne végétal en se référant à la classification de (Gómez ; 2007).

Division : **Angiospermes**

Classe : **Dicotylédones**

Sous-classe : **Archychlamideae**

Ordre: **Umbelliflorales**

Famille: **Umbelliferae = Apiaceae**

Genre : ***Thapsia***

Espèce : ***Thapsia garganica***

#### 1.4. Description

C'est une Plante vivace, à tige florifère dressée, peu ramifiée, atteignant environ 1,50 m de haut. Elle possède de grandes feuilles en touffes, très découpées, à division linéaires pourvues d'un pétiole en gaine à la base, les supérieurs sont réduits à la gaine épaisse, d'un vert grisâtre comme la tige. Les fleurs sont petites, jaunes disposées en grandes ombelles presque sphériques. Les fruits sont ovales, atteignent plus de 2 cm de long, largement ailés. Les racines sont en forme de rhizomes (**figure 3**). La floraison a lieu entre avril et juillet (**Meftah et al ; 2001**).



**Figure 3:** Photographies des différentes parties aériennes de *Thapsia garganica*.L

## 1.5. Métabolites secondaires

### 1.5.1. Composés phénoliques

(Djeridane *et al* ;2007) ont révélé que la composition phénolique des extraits éthanoliques de *Thapsia garganica* était relativement faible, soit de 2,5 mg équivalent d'acide gallique par 1g de matière sèche. Lors de cette même étude, ils se sont intéressés à la nature des composés phénoliques. L'analyse HPLC de ces extraits a révélé que les flavonoïdes représentent 98% (m/m) des composés phénoliques totaux avec détection de la quercétine, que les dérivés de l'acide hydroxycinnamique représentent 2%(m/m) des composés phénoliques totaux et que les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque sont inexistant.

Liu *et al* ;2006) ont quant à eux montré l'existence d'esters de phénylpropanoïdes dans les extraits de *Thapsia garganica* L.

- **Acides phénoliques**

Les études phytochimiques effectuées sur *Thapsia garganica* L. ont révélé que les extraits de cette dernière contiennent des dérivés de l'acide hydroxycinnamique qui représentent 2% des composés phénoliques totaux tandis que les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque sont inexistant (Stocker *et al* ; 2004).

Différents phénylpropanoïdes ont été isolés à partir des plantes appartenant aux Apiacées y compris *Thapsia garganica* L. Il s'agit d'une classe de composés phénoliques, synthétisée à partir de la phénylalanine (Liu *et al* ; 2006). Ce sont des composantes structurales des parois cellulaires (Hahlbrock et Scheel ;1989). L'étude cytotoxique des substances bioactives de *Thapsia garganica* L. a révélé que les phénylpropanoïdes isolés à partir de leurs fruits sont cytotoxiques (Liu *et al* ; 2006).

- **Flavonoïdes**

Les parties aériennes de *Thapsia garganica* L. sont riches en flavonoïdes tels que les flavones et les flavonoles (Harrorne et Williams ; 1972 , Stocker *et al* ; 2004 , Djeridane *et al* ; 2006). Les flavonoïdes sont un groupe de composés naturels, plus de 6 000, qui sont quasiment universels chez les plantes (Erlund ; 2004). Ils comportent un squelette de carbone C6-C3-C6, ou plus précisément une fonction phénylbenzopyrane (Marais *et al* ;2006). Les flavonoïdes constituent des pigments responsables de la coloration jaune, orange et rouge des différents organes végétaux (Ghedira ;2005).

- **Coumarines**

Les racines de *Thapsia garganica* L. contiennent des composés appelés les coumarines

(Larsen et Sandberg ; 1970). Ils se trouvent libres ou sous forme hétérosides dans beaucoup de famille dicotylédones, surtout chez les Apiacées. Ces molécules sont très complexes (Bruneton ; 1999 , Ojala *et al* ; 2000). Ils tirent leur nom de «coumarou», nom vernaculaire de la fève tonka d'où fut isolée en 1820. Les coumarines sont issues du métabolisme de la phénylalanine via un acide cinnamique qui est l'acide 4-coumarique (Bruneton ; 1999).

### 1.5.2. Composés terpéniques

Les composés terpéniques que l'on retrouve essentiellement chez le genre *Thapsia* sont des lactones sesquiterpéniques (Ladjel *et al* ; 2011). Ces composés constituent un groupe numériquement important de substances à environ 3000 structures connues qui furent décrites dans les anciens traités de matières Médicinales, sous le nom évocateur de « principes amers ». Leurs structures sont très variées, mais se rattachent toutes au produit de cyclisation, cyclodécadiénylique du pyrophosphate farnésyle (FPP) (Bruneton ; 1993).

Les composants dominants de cette plante sont des thapsigargines qui appartiennent au groupe des guaianolides, et des thapsigargines (Rubal *et al* ; 2007), ainsi que les constituants volatiles suivants : les lactones sesquiterpènes  $\delta$ -cadinene,  $\alpha$ - et  $\delta$ -guaïene, elemol et guaiols (Drew *et al* ; 2009)

La thapsigargine (Tg) est une molécule naturelle très importante. Cette molécule est un inhibiteur puissant et spécifique de l'enzyme calcium ATPase endo/sarcoplasmique (SERCA) qui entraîne la mort cellulaire, elle est utilisée comme un nouveau moyen chimiothérapeutique de cancer et en particulier celui de la prostate (Anthony *et al* ; 2013).

La thapsigargine (Tc) est un autre sesquiterpène lactone qui présente une similitude structurale et fonctionnelle avec la Tg, la comparaison entre la structure de ces deux composés a révélé que la seule différence entre eux est la présence de quatre groupements méthylènes dans l'acyl (R) de Tc et six dans le Tg (Ali *et al* ; 1985).

### 1.5.3. Huiles essentielles

*Thapsia garganica* L. renferme des huiles essentielles (HE) qui sont principalement des monoterpènes. Les HE connues aussi sous le nom d'huiles volatiles, sont des mélanges complexes oxygénés et hydrocarbures de formule générale  $(C_5H_8)_n$  (Schulz *et al* ; 2004). Les constituants dominant des différents parties aériennes de *Thapsia garganica* L sont pvinylguaïacolà 59-63%, Linalol à 6-8% et 1,4-diméthylazulène à 6-7% (Ladjel *et al* ; 2011). L'huile essentielle extraite des racines contient principalement de l'élimicine (54 à 73 %) et de la latifolone (20–32%) (Avato *et al* ; 2001).

## 2. Usages

### 2.1. Usages traditionnels

L'écorce de racine trouve encore quelques emplois en médecine traditionnelle maghrébine, pour traiter la stérilité féminine, les douleurs rhumatismales, les entorses et surtout, pour les maladies pulmonaires graves.

La racine fraîche est enfouie dans des cendres chaudes jusqu'à ramollissement et exsudation de la résine ; elle est, alors, grossièrement broyée et placée dans une gaze ; Ce cataplasme, appliqué sur le thorax préalablement enduit d'huile d'olive, y est maintenu jusqu'à sensation de brûlure. On renouvelle chaque jour si nécessaire. Pour les enfants, on utilise la racine privée de son écorce . (**Hammiche ; 1991**)

*Thapsia garganica* est une plante surtout connue pour ces effets diurétiques, émétiques et purgatifs .(S. Ladjel, A. Zellagui and N. Gherraf, 2011)

En Algérie elle est utilisée en médecine traditionnelle pour de nombreuses maladies. En Kabylie, par exemple nous l'utilisons en tant que "cure dépurative" au début du printemps . Il est aussi appliqué en cataplasme sur la poitrine afin de traiter les bronchites et les pneumonies. Pour des maux moins graves, elle est parfois macérée dans de l'huile afin d'être utilisée en massage ou ingérée en très petite quantité. D'autres utilisations traditionnelles sont sa préparation dans du lait ou de la hume afin d'être ingérée oralement ou encore l'utilisation de morceaux de racines pures pour calmer les douleurs dentaires.( **Ladjel, Zellagui et Gherraf ; 2011**).

### 2.2. Utilisations thérapeutiques

La résine figurait, sous forme d'extrait mou, la pharmacopée française 1937est servait à préparer divers papiers révulsifs, sparadraps et topiques utilisés en usage externe. Elle n'est plus utilisée depuis longtemps .La plante fait l'objet d'investigations dans le traitement du cancer de la prostate ; les données précliniques semblent prometteuses, une remission dans l'évolution de la tumeur apparaît avec une toxicité minimale (**Isaacs ;2005**)]. Les chercheurs ont connu, à partir de la thapsigargine, l'un des principes du thapsia, une pro-drogue appelée G202. La G202 est hydrolysée par une carboxypeptidase membranaire, spécifique des cellules cancéreuses prostatiques ; cette hydrolyse active la G202 qui inhibe la pompe SERCA ce qui induit la mort de ces cellules (**Denmeade et al ;2012**)

La plante est utilisée pour combattre les toux et bronchites rebelles ainsi que les rhumatismes, la rage et la stérilité féminine. On l'utilise également, mélangée à de la farine et

à du son, en cataplasmes, contre les morsures d'animaux venimeux ou enragés (**Bammi et Douira ;2002**).

# *Chapitre III*

### III. Les Activités biologique

#### 1. L'Activité anti-oxydante

##### 1.1. Les radicaux libres

Le radical libre est une espèce caractérisée par une instabilité et/ou un pouvoir oxydant fort, il se différencie par la présence d'un électron non apparié sur la couche électronique la plus externe. Les espèces réactive oxygénées (ERO) proviennent de produits dérivés de réactions enzymatiques essentielles, principalement de processus métaboliques endogènes. Leur formation initiale se base sur la réduction d'oxygène moléculaire. Parmi toutes les ERO, on distingue un ensemble restreint de ces composés que nous appelons radicaux primaires à savoir : l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ), le monoxyde d'azote ( $NO^{\bullet}$ ), le radical peroxy ( $ROO^{\bullet}$ ) et le radical alkoxy ( $RO^{\bullet}$ ).

Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires tels que l'oxygène singulet  $^1O_2$ , le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le nitroperoxyde ( $ONOOH$ ), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Favier ; 2003**).

##### 1.2. Stress oxydatif

Le stress oxydatif correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces réactives oxygénées (ERO) et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières (**Haleng et al., 2007**). Il déclenche des pathologies nombreuses comme l'athérosclérose, le cancer, les maladies inflammatoires et l'infertilité masculine (**Kmonícková et al ; 2008**).

Le stress oxydant est un déséquilibre de la balance entre le système de défense des antioxydants et la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (**power et al ;2010**), cela entraîne des lésion biochimiques au niveau des cellules de l'organisme du fait de leur conséquence sur le plan moléculaires, telle que les altérations au niveau des protéines, l'apparition des cassures sur l'ADN, ou des atteintes de l'intégrité de la membrane cellulaire par l'induction de la peroxydation lipidique (**Shilpa et al ;2017**).

##### 1.3. Les antioxydants

Les antioxydants sont des substances capables de retarder et d'empêcher l'oxydation des macromolécules principalement les lipides, les protéines et l'ADN. Elles protègent les tissus des dommages causés par l'oxygène et/ou les radicaux libres (**Adil et al ; 2007**).

## 1.4. Classification et mécanismes d'action

### 1.4.1. Système antioxydant enzymatique

- **Superoxyde dismutase SOD** : C'est une métalloprotéine contenant du manganèse, cuivre et de zinc. Elle élimine le radical superoxyde  $O_2^-$  en le transformant en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).
- **Glutathion peroxydase: soit par la peroxydase GSH-Px**: qui consiste à l'élimination du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le hydroperoxyde lipidique ( $ROOH$ ), en association avec le glutathion pour donner respectivement une molécule d'eau et ( $ROH$ ), soit par l'enzyme réductase, par la régénération du glutathion réduit ( $GHS$ ).
- **Catalase** : Transformation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en simple molécule d'eau.

### 1.4.2. Système antioxydant non enzymatique

- **Vitamine C**

La vitamine C est un excellent piègeur des ERO ( $HO\cdot$  ou  $O_2\cdot^-$ ). Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques (**Haleng et al ; 2007**).

- **Polyphénols**

Les polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la germination des graines...etc (**Boizot et Charpentier ;2006**).

Les actions protectrices des polyphénols peuvent comprendre :

- Inhibition des E.R.O ( $1O_2$ ) ;
- Piégeage des radicaux libres ;
- Chélation des ions métalliques responsables de la production des ERO ;
- Inhibition des enzymes responsables de la production des ERO (**Pokorny et al ; 2001, Magalha et al ; 2008**)

#### - Flavonoïdes

L'appellation « Flavonoïde » qui en latin (= flavus) est dû à leur couleur jaune qu'ils engendrent (Wilson ; 1987), formés par un squelette de base à 15 atomes de carbones. Ces composés représentent le groupe de composés phénoliques le plus diversifié : plus de 4000 flavonoïdes ont déjà été identifiés (Harborne ;1989 , Sarni-Manchado et Cheynier ; 2006). Les flavonoïdes stabilisent les RL grâce à leur groupement hydroxyles fortement réactif. Ils sont également capables de chélater les ions métalliques libres au niveau de l'organisme (Derbel et Ghedira ;2005).

#### - Tanins

Les tanins sont des composés phénoliques. Le terme « tannin » ou « tanin » vient de la source de tanins utilisés pour le tannage des peaux d'animaux en cuir. Dans ce processus, les molécules de tanins se lient aux protéines par des liaisons résistantes aux attaques fongiques et bactériennes (Dangles et al ;1992). Les tanins sont classés en deux groupes majeurs : les tanins hydrolysables, font intervenir des liaisons de type ester entre un groupement phénolique et un groupement hydroxyle des glucides (Min et Hart ; 2003) ; les tanins condensés sont des polymères d'unité flavaniques, le plus souvent liées entre elles par des liaisons C4-C8 ; ils sont résistants à l'hydrolyse (Bruneton ; 1987).

#### • Les caroténoïdes

Plus de 600 caroténoïdes différents ont été isolés à partir de sources naturelles, les caroténoïdes dérivent d'une structure linéaire (C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>) avec de nombreuses doubles liaisons (Haleng et al ; 2007). Ce sont des piègeurs de l' (1O<sub>2</sub>) et de (LOO•), et peuvent également neutraliser les radicaux libres. Le lycopène piège les radicaux libres avec de (1O<sub>2</sub>) dans les tissus rétiniens, prévenant la dégénérescence, qui est la première cause de cécité chez la personne âgée (Landrum et al ; 1997, Blumberg ; 2007).

### 1.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes ont été développées pour tester la capacité de piégeage d'un radical libre et l'activité antioxydante totale d'un extrait de plante (Oszmianski et al ; 2007). Parmi ces méthodes :

#### 1.5.1. Méthode de réduction de radical DPPH

Le composé chimique 2,2- diphényl -1-picrylhydrazyle (DPPH) possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Cette délocalisation en solution provoque aussi la couleur bleue violette bien caractéristique de la solution de DPPH. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette due à une recombinaison des radicaux DPPH, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm (Popovici et al., 2009) En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyle) de couleur violette se réduit en 2,2 diphényl -1- picryl hydrazine de couleur jaune (Maataoui et al ; 2006 )

### **1.5.2. Méthode de réduction de l'ion ferrique FRAP**

Cette méthode est fondée sur l'aptitude des extraits à réduire le fer ferrique dans le complexe (Fe<sup>3+</sup>-TPTZ) en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) par les antioxydants qui donne la couleur bleue pour le complexe produit (Fe<sup>2+</sup>-TPTZ). Le mécanisme est connu comme étant un indicateur de l'activité réductrice d'électron caractéristique de l'action antioxydante des polyphénols (Yildirim et al ; 2001).

### **1.5.3. Autres méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante**

- Test de blanchissement de  $\beta$  carotène.
- ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacit

## **2. Activité anti Hémolytique**

### **2.1. Généralités**

Le sang est un liquide vital visqueux et fluide de pH compris entre 7.35 et 7.45, qui coule dans les artères et les veines, pèse 8% du poids corporel humain et son volume varie de 5 à 6L chez l'homme et de 4 à 5L chez la femme. Il est composé de cellules représentant les éléments figurés du sang en suspension dans une matrice extracellulaire liquide, le plasma. Ce dernier représente 55% du volume sanguin. Les cellules sanguines occupent 45% du volume sanguin total chez l'adulte. On peut distinguer 3 catégories de cellules variant par leur morphologie et leur fonction ; les thrombocytes (plaquettes), les leucocytes (globules blancs) et les érythrocytes (les globules rouges) (Béraud ; 2014).

### **2.2 .Structure et fonction des globules rouges**

Les globules rouges également appelés hématies ou érythrocytes sont de petites cellules anucléées, de forme biconcave contenant essentiellement l'hémoglobine, un pigment

respiratoire qui assure le transport d'un élément indispensable à la vie, l'oxygène, des poumons aux tissus, et aussi le transport du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) des tissus aux poumons. Ces cellules mesurant 7µm du diamètre et 2µm d'épaisseur, baignent dans le sang à une concentration d'environ 5 millions de cellules par mm<sup>3</sup>. Le nombre constant de ces cellules dans la circulation sanguine est le résultat d'un équilibre dynamique entre leur production dans l'os et leur élimination de la circulation sanguine à la fin de leur cycle de vie qui dure 120 jours. (**Girasole et al ; 2012**).

### **2.3. Structure de la membrane érythrocytaire**

L'intégrité de la membrane cellulaire et le maintien de sa structure est indispensable au bon fonctionnement de la cellule, ceci est particulièrement vrai pour le globule rouge. La membrane érythrocytaire est constituée d'une bicouche phospholipidique opposée par leur pôle hydrophobe. Les parties hydrophiles regardent la périphérie de la bicouche. La face externe de la bicouche est dirigée vers le cytoplasme, est en contact avec le cytosquelette protéique globulaire. Des molécules de cholestérol viennent se positionner dans les zones hydrophobes. Cette bicouche est également traversée de part en part par des protéines transmembranaires, sur ces protéines se fixent des sucres qui déterminent les groupes sanguins. Les plus importantes protéines membranaires des érythrocytes sont la bande 3 qui présente un antiport pour le passage des ions du chlore (Cl<sup>-</sup>) et les sialoglyco-protéines qui jouent le rôle de transporteurs de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>).

### **2.4. Échanges membranaires du globule Rouge**

Les transports transmembranaires peuvent être regroupés en deux mécanismes(**Figure4**) : les transports passifs selon le gradient de concentration et les transports actifs contre le gradient de concentration. La pompe à sodium correspond à une ATPase magnésium dépendante qui permet la sortie de 3 Na<sup>+</sup> du globule rouge et l'entrée de 2 K<sup>+</sup>. Le fonctionnement de cette pompe nécessite un apport énergétique fourni par l'ATP issu de la glycolyse anaérobie. Il existe également une pompe ATPase magnésium-dépendante qui rejette hors de l'hématie un ion Ca<sup>2+</sup>. Le transport des anions, notamment les ions Cl<sup>-</sup> et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, s'effectue au niveau de la protéine 3 transmembranaire. La sortie d'acide carbonique est contrebalancée par une entrée d'ions Cl<sup>-</sup>. La protéine 3 permet également le transport de l'eau à travers la membrane érythrocytaire. (**Lenormand ; 2001 ,Portier et al ; 2007**).

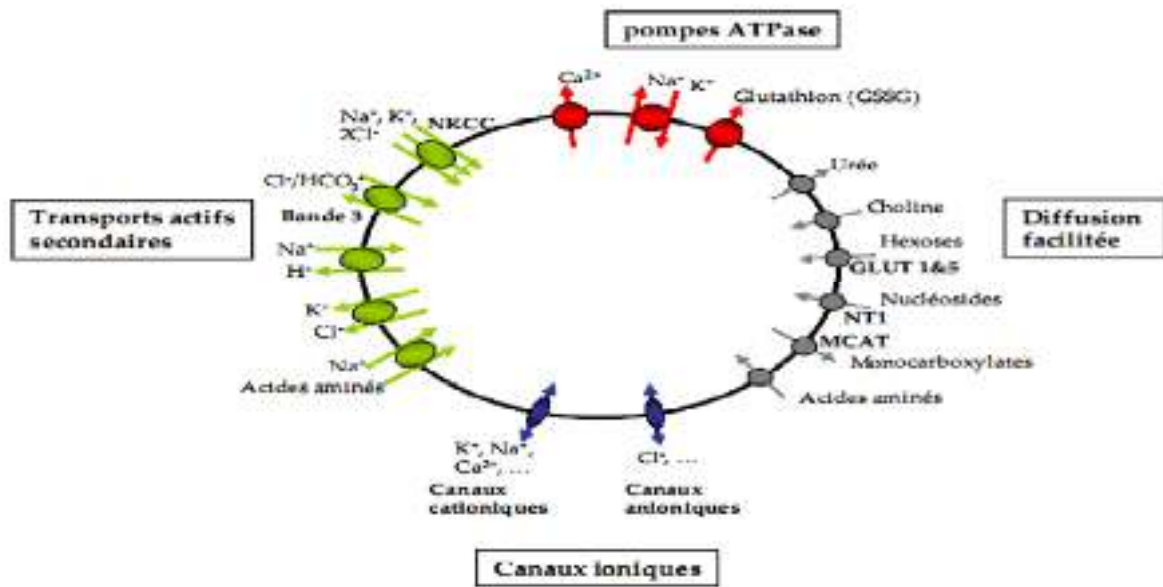


Figure 4: les échanges de la membrane érythrocytaire (Jauréguiberry ; 2015)

## 2.5. Biosynthèse du globule rouge

L'érythropoïèse est un processus complexe qui a lieu dans la moelle osseuse et aboutit à la formation de 100 milliards des érythrocytes par jour. Les érythrocytes sont formés à partir de cellules souches multipotentes. Sous l'action d'une hormone, l'érythropoïétine, les globules rouges se différencient et perdent leur noyau, formant des réticulocytes qui entrent dans la circulation sanguine et terminent leur maturation en 24 à 48h. comme cette maturation peut se produire dans la rate, avec synthèse d'hémoglobine puis la perte des mitochondries et des ribosomes, après maturation les globules rouges migrent dans le sang ou ils surviennent généralement entre 100 et 120 jours. (Courtois et al ; 2007)

## 2.6. Processus d'hémolyse

### 2.6.1. hémolyse physiologique

L'accumulation de modifications de la membrane du globule rouge au cours du vieillissement (peroxydation lipidique membranaire, perte de résidus d'acide sialique et formation de néoantigènes de sénescence) sont autant de signaux qui permettent aux macrophages d'identifier les globules rouges à éliminer par phagocytose avec réutilisation des composants (Beaumont et Canonne-Hergaux ; 2005).

L'hémolyse (hémo : sang ; lyse : perturbation) est un phénomène physiologique irréversible qui aboutit à la rupture de la membrane des hématies provoquant la libération des éléments intra-érythrocytaires dans le plasma notamment l'hémoglobine, Ce phénomène est détecté visuellement en montrant une teinte rose à rouge dans l'échantillon après centrifugation ou en mesurant la densité optique de surnageant (hémoglobine) par spectrophotométrie (**Mezzou et al ; 2006**). L'hémolyse est manifestée par une augmentation des taux sériques en hémoglobine associée à une augmentation du lactate déshydrogénase (LDH), de phosphate et de la créatine kinase(CK) (**Ali et al ; 2014**), et aussi par une diminution du taux d'haptoglobine et d'hémoglobine glycosylée. L'hémoglobine libérée lors de l'hémolyse est dégradée en bilirubine non conjuguée, ou bien sous forme d'un complexe avec l'haptoglobine qui est éliminée rapidement par le foie (**Marchand et al ; 1980**).

### **2.6.2. Hyperhémolyse**

L'hyperhémolyse est le dépassement du processus physiologique de lyse des GR qui devient pathologique, ce phénomène est dû à une destruction excessive des hématies ou à un raccourcissement de leur durée de vie. Il peut se dérouler dans les vaisseaux (intravasculaire) ; l'hémoglobine libérée se lie alors à l'haptoglobine. Comme, il peut se manifester hors des vaisseaux (extravasculaire), notamment au niveau de la rate (**Béraud ; 2014**).

Un déséquilibre dans les proportions des radicaux libres générés et le répertoire antioxydant inhérent au système explique la diminution de la durée de vie des globules rouges pendant de nombreuses pathologies hyperhémolytiques (**Hebbani et al ; 2014**).

## **2.7. les types des Anti-hémolytiques**

### **2.7. 1. Anti-hémolytiques classiques**

L'anémie hémolytique est un sujet relativement complexe qui demande obligatoirement une investigation spécialisée pour déterminer des traitements appropriés, il y a autant de traitements qu'il y a de causes. Un certain nombre de substances synthétiques antihémolytiques qui réduit l'hyper-hémolyse, sont disponibles. Le choix du traitement se porte notamment sur la prescription de fer, de vitamine B12 et d'acide folique. (**Federici et al ; 2007, Leporrier ; 2008**).

- Le fer : Le rôle physiologique du fer est la synthèse de l'hème dans la mitochondrie.
- Le  $Fe^{2+}$  et la protoporphyrine vont donner l'hème, qui passe alors dans le cytoplasme.
- L'hème ensuite s'associe aux sous unités de globine  $\alpha$  et  $\beta$  pour former l'hémoglobine.

- Quand l'équilibre en fer est rompu (manque d'apport ou pertes élevées), l'organisme fait appel aux stocks de ferritine et d'hémosidérine. Lorsque ces stocks sont épuisés, on observe alors une diminution du fer plasmique ; l'érythropoïèse est ralentie, les érythroblastes s'appauvrissent en granules ferrugineux et les sidéroblastes disparaissent progressivement, l'anémie s'installe.
- La vitamine B12 et B9 (cobalamine et acide folique) : Ces deux vitamines dites anti mégaloblastiques sont indispensables à la physiologie de l'hématopoïèse. En cas de carence de l'une de ces deux vitamines une hématopoïèse inefficace s'installe aboutissant à un état pathologique nommé « anémie mégaloblastique » où les taux sanguins de plaquettes, de globules blancs et des globules rouges seront diminués.
- La conséquence commune aux modes d'action de la vitamine B12 et des folates est d'intervenir au niveau cellulaire dans la synthèse de l'ADN, une carence de ces vitamines se traduira par un trouble cellulaire très particulier dans lequel la division cellulaire (ADN) sera affectée (**Dubost et Dupuis ; 2011**).

### 2.7.2. Autres anti-hémolytiques

L'étude et la recherche de substances anti-hémolytiques d'origine végétale est en plein essor. En effet, des études entrepris ont montrés que les plantes constituent un réservoir de substances à potentiel anti-hémolytique dont les mécanismes d'action restent dans l'ensemble à déterminer. Quelques exemples en sont cités dans( **le Tableau 5**)

**Tableau 5** : Quelques exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-hémolytique

Matrice végétale	Tests utilisés	Effets	références
Fleur de <i>Albutinus indicum</i>	Hémolyse induite par Na Cl	Activité Anti-hémolytique : 70,24% à 1mg/ml d'extrait	Vidhya et Shobana, 2016
Feuilles, tige, fleur de <i>Gymnemas ylvestre</i>	Hémolyse induite par le H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Activité anti hémolytique : IC50=29,83 g/ml	(James et Alewo 2014)
Fleur de <i>Cassia auriculata</i>	Hémolyse induite par le Na Cl	Activité Anti-hémolytique : 64% à 500µg/ml d'extrait	(Rani et al., 2014)
Extrait de <i>Amnona muricata</i>	Hémolyse par TritonX100	Activité Anti-hémolytique : 85,7% à 500 µg/ml d'extrait	(Muthu et Duraira, 2015)
Extraits de <i>Oryza sativa</i>	Hémolyse induite par le Na Cl	Effet Anti-hémolytique : 63,77% à 500µg/ml	(Rahman, Eswaraiah et al., 2015)
Fruit de <i>Persea americana</i>	Hémolyse induite par le H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Effet anti-hémolytique IC50=0,0422mg/ml	( Nabavi et al., 2013)
Feuilles de <i>Piber betel</i>	Hémolyse induite par le H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Activité Anti-hémolytique : 40.6% pour une concentration de 5mg/ml	(Chakraborty et Shah , 2011)

### 3. Activité anticoagulante

#### 3.1. Généralité sur la coagulation

L'hémostase regroupe différents mécanismes qui assurent la prévention des saignements spontanés et l'arrêt des hémorragies en cas de rupture de la continuité de la paroi vasculaire et la réparation de la brèche vasculaire. Elle comprend différentes étapes : vasoconstriction, adhésion, agrégation plaquettaire et coagulation (Kramoroff ; 1999).

La coagulation est activée lors d'une brèche vasculaire, pour consolider l'agrégat plaquettaire afin de colmater la brèche et arrêter le saignement du sang (Lemaoui ; 2011), par l'activation en chaîne de facteurs plasmatiques de la coagulation, circulant sous forme de précurseurs inactifs (Chalal, et Chibout ; 2017).

#### 3.2. Mécanismes de la coagulation

La coagulation plasmatique consiste en une cascade enzymatique (Figure 5) (Patrick ; 2002) :

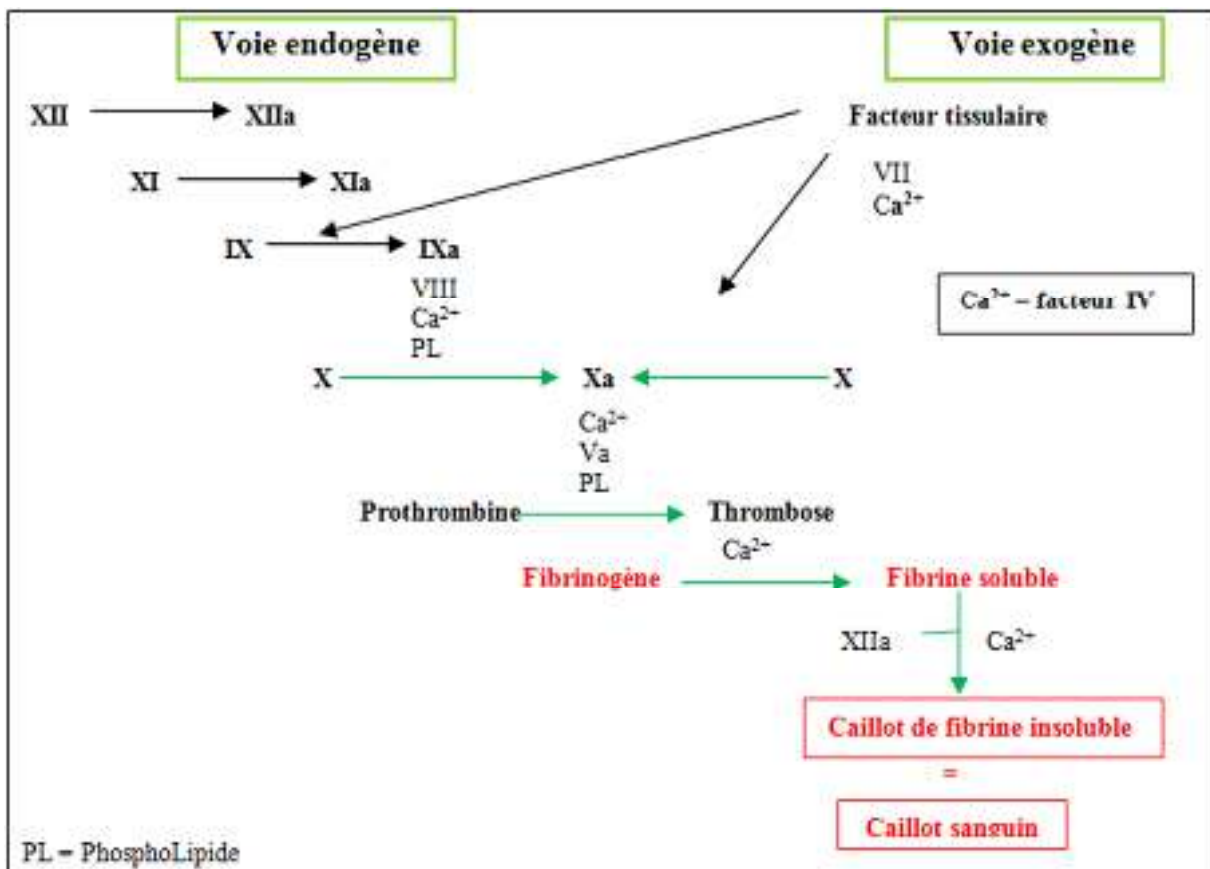


Figure 5 : Voies de la coagulation (Lemaoui ; 2011).

### 3.2.1. Formation de la prothrombinase

Elle résulte de l'association, sur une matrice de phospholipides, du facteur Stuart (Xa), de la proaccélérine (Va) et de calcium. L'association de ces facteurs peut être déclenchée par deux mécanismes (**Patrick ;2002**) :

- **Voie exogène**

C'est le contact du plasma et du facteur tissulaire avec le facteur VII a qui va entraîner l'activation du facteur X. celui-ci va alors former la prothrombinase en s'associant au facteur Va en présence de  $Ca^{2+}$  (**Patrick ; 2002**).

- **Voie endogène**

Cette voie est déclenchée par l'activation du facteur XII lors de ce contact aux matrice sous-endothéliale, une activation qui conduit par la suite à l'activation de pré-kallikréine en kalikriéne qui à son tour peut activer le facteur XII. Le facteur XII activé catalyse la transformation de la forme zymogène du facteur XI à la forme protéolytique activée qui active par la suite le facteur IX. Ce dernier se lie à la surface de phospholipides anioniques des plaquettes par l'intermédiaire des ions calcium et forme, en présence de son cofacteur, le facteur VIII le complexe tenase qui est responsable de l'activation du facteur X.

Ce dernier forme avec son cofacteur, le facteur V (pro-accélérine), les phospholipides plaquettaires et par l'intermédiaire aussi des ions de calcium le complexe prothrombinase qui catalyse la transformation de prothrombine (facteur II) en thrombine (**Tlili ;2015**).

### 3.2.2. Formation de la thrombine

Elle résulte de l'action de la prothrombinase sur la prothrombine (**Patrick ; 2002**).

### 3.2.3. Formation de la fibrine

La thrombine formée catalyse la conversion de fibrinogène en monomères de fibrine qui s'associent les uns aux autres grâce à des liaisons hydrogène pour former un réseau fibrineux instable, où le facteur XIIIa (le facteur stabilisateur de fibrine) préalablement activé par la thrombine intervient pour la solidification du caillot fibrineux par l'établissement de liaisons covalentes entre les différentes molécules de fibrine (**Tlili ; 2015**).

*Partie*  
*expérimentale*

# *Chapitre I*

## I. Matériel et méthodes

Le travail expérimental, ayant pour objet l'investigation phytochimique et l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante, antihémolytique et anticoagulante des extraits aqueux et méthanolique brut de la plante médicinale *Thapsia garganica* L. La partie expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie à l'université Abbes Laghrour – Khenchela.

### 1. Matériel

#### 1.1. Matériel biologique

##### 1.1.1. Matériel végétal

Il est constitué de la partie aérienne (feuilles et tiges) de la plante *Thapsia garganica* L, récoltée au cours du mois de mars 2019 de la région M'toussa-Ain Touila-Khenchela (Latitude 35°35'58"N Longitude 7°14'42"E) et identifiée par Dr. Zeraeb Azzeddine maître de conférences à la faculté de sciences de la nature et de la vie, Université Abbés Laghrour - Khenchela. La plante fraîchement récoltée a été séchée dans un endroit sec et aéré à l'abri de l'humidité et de la lumière du soleil puis pulvérisée au broyeur pour obtenir une poudre fine, cette dernière est conservée dans un flacon en verre bien hermétique jusqu'à son utilisation.



**Figure 6 :** Carte géographique de Khenchela montrant le lieu de récolte (Google maps)

### 1.1.2. Echantillons du sang

Six échantillons de sang ont été recueillis à partir des personnes saines pour l'évaluation de l'activité anti hémolytique et anticoagulante des extraits.

### 1.2. Médicaments

Deux médicaments ont été utilisés comme contrôle positif pour l'évaluation des activités antihémolytique et anticoagulante

- Le médicament anticoagulant « Lovenox » de concentration 2000 UI pour l'activité anticoagulante ;
- Le médicament antihémolytique «Dicynone » de concentration 250 mg pour l'activité antihémolytique.

### 1.3. Réactifs chimiques et instrumentations

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits: FeCl<sub>3</sub>, HCl, acide acétique, NaOH, NH<sub>4</sub>OH, KI, I<sub>2</sub>, NaCl, AlCl<sub>3</sub>, diméthyl sulfoxyde (DMSO), quercétine, chloroforme, toluène, acétone, éthanol, dichlorométhane, hexane, Folin-Ciocalteu, trichlorure de fer, Diphénylpicryl-hydrazyl, carbonate de sodium, toluène, trichlorure d'aluminium, méthanol, n-butanol, Éther de pétrole, acétate d'éthyle, chloroforme, acide sulfurique, ammoniac, tampon phosphate, acide ascorbique, acide gallique, acide acétique, acide chlorique, Wagner et des plaques CCM.; proviennent tous de Sigma-Aldrich.

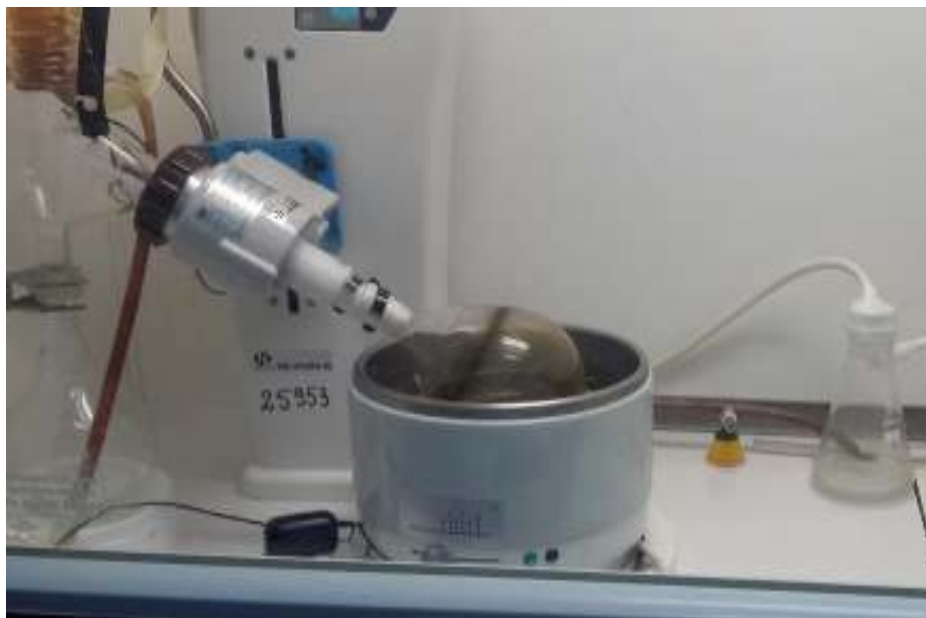
Parmi l'appareillage utilisé: Rota vapeur (HAHNVAPOR), Spectrophotomètre (spectrum SP-UV 2005), Chambre d'observation UV « 264/365 nm » (VILBER LOURMAT), Bain Marie (nive bath, MEMMERT), Etuve universelle de 5 à 220°C avec ventilation (MEMMERT), Agitateur magnétique (SCIOLOGEX), Vortex (VELP), Balance analytique (OHAUS), Balance (KERN PCB), Centrifugeuses (EZ Swing 3K, Rotofix 32 A), Réfrigérateurs (Liebherr), Plaque chauffante (LabTech), Autoclave (Raypa) et pH mètre (Hanna instruments).

## 2. Méthodes

### 2.1. Préparation de l'extrait méthanolique brut

100 g de la poudre de la partie aérienne de la plante médicinale *Thapsia garganica* L. mises à macérer dans un mélange méthanol /eau (7:3) pendant 24 heures à température ambiante. Cette opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant. L'extrait

hydroalcoolique est récupéré dans un premier temps après filtration du mélange dont le méthanol est éliminé par évaporation sous pression réduite via un rotavapeur à la température 45°C (**Figure 7**) permettant ainsi d'obtenir l'extrait méthanolique brut qui est conservé à -4°C (**Markham ;1982**)



**Figure 7:** Photo du Rotavapeur utilisé pour sécher l'extrait méthanolique brut.

## 2.2. Préparation de l'extrait aqueux

Elle est basée sur la préparation d'une infusion, en mettant 50 g de la poudre végétale dans 500 ml d'eau distillée bouillante pendant 30 min. Après refroidissement et filtration, le filtrat récupéré est évaporé à sec dans l'étuve à 50°C (**Boubacar, Souley ; 2005**).

## 2.3. Détermination du rendement d'extraction

Le résidu ou la poudre obtenue des extraits est pesée pour la détermination du rendement selon la formule suivante :

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

Où : **P<sub>s</sub>** : Poids de l'extrait sec en gramme (g)

**P<sub>p</sub>** : Poids de la poudre en gramme (g).

## 2.4. Screening phytochimique

Le screening chimique est un ensemble de réactions chimiques qui permettent d'identifier la présence des principales catégories des substances chimiques naturelles contenues dans une plante et responsables de propriétés pharmacologiques. Les tests phytochimiques qualitatifs sont réalisés sur les deux extraits et les résultats obtenus ont été évalués comme suit:

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

### 2.4.1. Recherche des tanins

2 à 3 gouttes de la solution de  $\text{FeCl}_3$  à 2%, sont ajoutées à 2 ml de chaque extrait. La solution obtenue est reposée pendant quelques minutes. Le test est considéré positif s'il ya l'apparition d'une coloration bleue-noire et un précipité (**Akrout; 2011**)

### 2.4.2. Recherche des saponosides

- Test 1 : 5 ml de chaque extraits sont mélangés avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 min. La formation d'une mousse persistante après 15 min confirme la présence des saponosides . (**Naili,M ; 2010**).
- Test 2 : 5 ml de l'extrait sont mélangés avec 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. Une couleur rouge-marronne de la couche d'interface indique la présence des triterpènes hétérosidiques. (**Ben Sassi ;2007**)

### 2.4.3. Recherche des coumarines

Les résidus secs sont dissous dans l'eau distillée par chauffage. Après refroidissement, la solution obtenue été répartie dans 2 tubes à essai. Le premier sert de témoin et on ajoute 05ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  10% dans le 2eme tube. L'apparition d'une fluorescence bleue ou verte à la lampe UV 365 nm indique la présence des coumarines . (**Donrop; 2007**)

### 2.4.4. Recherche des composés réducteurs

Ce test est basé sur la réaction de Keller-Kiliani, 5 ml d'acide acétique contenant des traces de  $\text{FeCl}_3$  et 5 ml d'acide sulfurique contenant des traces de  $\text{FeCl}_3$  sont ajoutés à 1 ml de l'extrait. La présence des composés réducteurs est confirmé par la formation de

deux phases, une colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique) **(Romero; 2005)**.

#### **2.4.5. Recherche des alcaloïdes**

Ce test est fait pour révéler la présence ou l'absence des alcaloïdes sels. 5 ml d'HCl (2N) sont ajoutés à l'extrait et chauffé dans un bain marie. Après la filtration, le filtrate est traité avec le réactif de Wagner (2g de KI et 1,27g d'I<sub>2</sub> solubilisé dans 100 ml d'eau distillée). La présence de turbidité ou de précipitation indique la présence des alcaloïdes sels **(Pavela;2009)**.

#### **2.4.6. Recherche des flavonoïdes**

5 ml de chaque extrait sont traités avec quelques gouttes d'AlCl<sub>3</sub> (1%). La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur jaune **(Kyeong ; 2007)**

#### **2.4.7. Recherche des anthocyanes**

2 ml d'extrait a été traités avec 2ml de HCl (2N) et quelques gouttes de NH<sub>4</sub>OH. Un test positif est révélé par une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacée **(Mellouk ; 2013)**.

#### **2.4.8. Recherche des flavonols**

0,5 ml du HCl concentré ont été additionnés à 5 ml d'extrait. La couleur rouge pourpre après incubation dans un bain marie pendant 30 minutes, à température entre 80 – 90 C° indique la présence des flavonols **(Guessoum et Lecheheb ; 2015)**.

#### **2.4.9. Recherche des flavones**

Quelques gouttes de KOH ont été ajoutées à un 1 ml d'extrait. La couleur orange indique la présence des flavones **(Mellouk ; 2013)**.

#### **2.4.10. Recherche des flavonones**

Quelques gouttes de FeCl<sub>3</sub> ont été ajoutées à un 1 ml d'extrait. La couleur rouge violacé indique la présence des flavonones. Si le résultat est négatif cela indique la présence de chalcone ou isoflavone **(Mellouk ;2013)**.

## 2.5. Etude quantitative

### 2.5.1. Dosage des polyphénols totaux

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

#### - Principe

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

Brièvement 200 µl de chaque extrait (dissous dans le méthanol) ont été ajoutés à 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 10%. Les solutions ont été mélangées et incubés pendant 4 minutes. Après l'incubation 800µl de la solution de carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,5g /l) a été ajoutée .Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 2 heures dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance des extraits a été mesurée par un spectrophotomètre à 765 nm.

#### - Expression des résultats

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec le standard étalon l'acide gallique (2 à 5 µg ml) et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAGmg).

### 2.5.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) cité par Djeridane ( Kyeong; 2007) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits.

#### - Principe

1ml de chaque extrait et du standard (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables a été ajouté à un volume égal d'une solution d'AlCl<sub>3</sub> (2% dans le méthanol).Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation.

### - Expression des résultats

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

## 2.6. Etude qualitative

### 2.6.1. Identification des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince (CCM)

Cette méthode se repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile qui est en général un mélange des solvants, adapté au type de séparation recherchée, et leur affinité vis-à-vis la phase stationnaire qui peut être un gel de silice ou de polyamide. Les techniques chromatographiques ne sont pas suffisantes pour identifier un produit mais elles apportent des renseignements (Rapport frontal -Rf- et coloration) susceptibles d'orienter vers une hypothèse de structures.

Les analyses par CCM ont été effectuées avec des plaques de silica gel, sur support rigide en aluminium 20/20 cm dont chaque extrait a été déposé à l'aide d'une micropipette (2  $\mu$ l) à des points repères à 1.5 cm du bord inférieur de la plaque.

Les plaques sont ensuite placées dans les cuves de développement, à environ 0,5 cm de hauteur dans les quelles se trouve la phase mobile dont cinq systèmes de migration différents ont été utilisés selon les extraits méthanolique et aqueux.

**Phase 1:** Acétate d'éthyl; acide formique; acide acétique ; l'eau distillée (25/3/3/7)

**Phase 2:** Butanol; acide acétique; l'eau distillée (4/1/5)

**Phase 3:** Acétone; l'eau distillée (10/10)

**Phase 4:** Butanol; acide acétique; l'eau distillée (10/15/25)

**Phase 5:** Acétate d'éthyl; acide acétique glacial ; acide formique ; l'eau distillée (25/3/3/7)

Le meilleur système utilisé et qui a donné une bonne séparation c'est :

**Phase 2: Butanol; acide acétique; l'eau distillée (4/1/5)**

Après développement, les plaques sont séchées, puis visualisées séparément par une révélation physique sous lampe UV à 264 et 365nm.

Pour chaque spot on a calculé le facteur de rétention qui est égal à la distance parcourue par le constituant sur la distance parcourue par le solvant et les rapports frontaux des spots sont comparés à ceux des témoins permettant ainsi l'identification des

constituants des deux extraits (Sefi, M. 2010).

## 2.7. Étude *in vitro* des activités biologiques

### 2.7.1. Evaluation de l'activité antioxydante

#### 2.7.1.1. Test scavenger du radical libre DPPH

Dans cette analyse la capacité anti-oxydante est déterminée par l'activité du balayage des radicaux libres en employant le radical libre stable DPPH ( $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ) qui est l'un des essais principaux employés pour explorer l'utilisation des extraits d'herbes comme antioxydants (Bastos *et al*; 2007)

#### - Principe

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2 diphenyl 1 picrylhydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 diphenyl 1 picrylhydrazyl de couleur jaune (Maataoui *et al*; 2006). L'activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par (Lopes-Lutz *et al*; 2008)

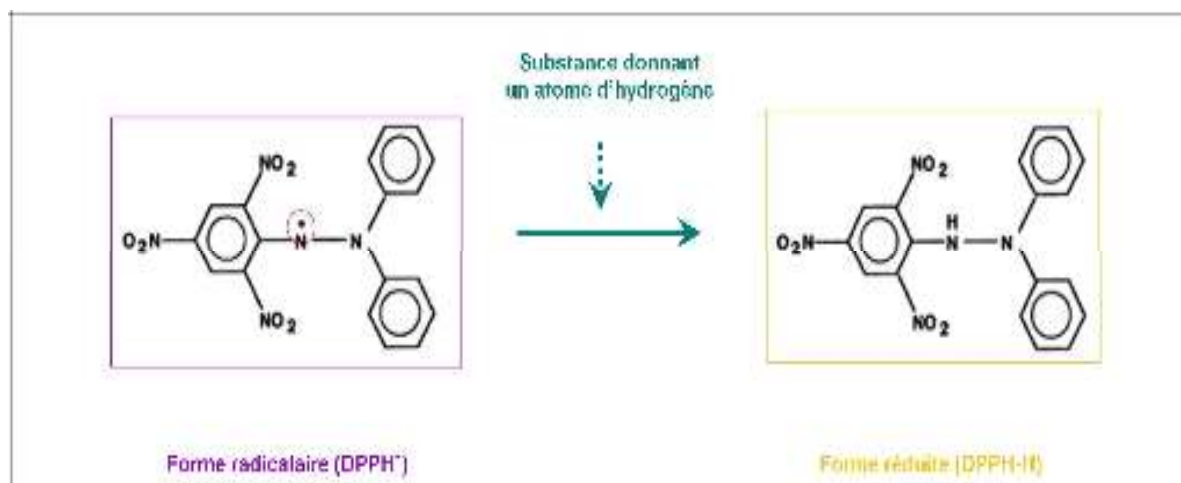


Figure 8 : Réduction du DPPH par un antioxydant (Molyneux ; 2004)

#### - Méthode

Le DPPH est solubilisé dans le méthanol pour avoir une solution de 0,2mM. Dans des tubes on introduit 50µl de chaque extrait (A partir d'une solution méthanolique mère de  $C_1=2\text{mg/ml}$  de chaque extrait est solubilisé dans le méthanol, les dilutions suivantes ont été préparées:  $C_2=1.5\text{mg/ml}$ ,  $C_3=1\text{mg/ml}$ ,  $C_4=0.75\text{mg/ml}$ ,  $C_5=0.5\text{mg/ml}$ ). Et on ajoute 950µl de la solution méthanolique au DPPH. Après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 515nm.

Le contrôle négatif est composé de 950µl de la solution méthanolique de DPPH et de 50 µl de méthanol. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard qui est l'acide ascorbique.

#### - **L'expression des résultats**

En présence d'un antioxydant, l'intensité d'absorption est diminuée et la décoloration résultante est stœchiométrique en ce qui concerne le nombre d'électrons captés (**Bastos et al; 2004**) Les résultats sont exprimés en tant que l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante. (**Wang et al; 2006**)

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

La valeur IC 50 est définie comme étant la concentration de l'extrait qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur), les valeurs IC50 moyennes ont été calculées par les régressions linéaires de trois essais séparés où l'abscisse est représentée par la concentration de l'extrait testé et l'ordonnée par l'activité antioxydante en pourcentage (**Mensor et al; 2001**)

#### **2.7.1.2. Réduction de fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)**

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée par (**Oyaizu ;1986**). 1 ml de chaque concentrations de chaque extrait est mélangé avec 2,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6) et 2,5 ml de solution de ferricyanure de potassium ( $K_3Fe(CN)_6$ ) à 1%. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 30 min. Après, 2,5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné.

Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. 2,5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de  $FeCl_3$  (0,1%).

L'absorbance est mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions opératoires. Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonctions des différentes concentrations utilisées pour chaque fruit.

L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées. (**Yildirim et al ;2001**).

#### **2.7.2. Evaluation de l'activité anti-hémolytique**

L'effet anti-hémolytique des extraits a été réalisé selon la méthode de (**Yang et al ; 2005**) :

**2.7.2.1. Préparation des globules rouges**

- 5 ml de sang d'une personne saine ont été recueillis dans des tubes traités à l'EDTA, puis centrifugés pendant 5 min à 1000 tr/min.
- Le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé trois fois avec du tampon phosphate saline (PBS) (0,2 M et pH 7,4) (Annexe 1) puis remis en suspension dans une solution saline (4 %).
- L'opération de lavage a consisté en une série de centrifugation à 1000 tr/min pendant 5 min de la suspension du culot dans le PBS.
- Après la dernière centrifugation, 0,4 ml du culot ont été additionné à 9,6 ml de tampon phosphate saline (0,2 M à un pH de 7,4) pour obtenir une solution érythrocytaire d'hématocrite à 4%.

**2.7.2.2. Préparation de l'extrait**

Différentes concentrations des extraits (1 mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25 mg/ml) ont été préparés dans le PBS.

**2.7.2.3. Protocole expérimentale**

Les différentes étapes de l'essai sont :

- Mettre dans des tubes 1 ml de la solution érythrocytaire préparée avec 0,5 ml des extraits (dilué avec le PBS) à différentes concentration initiales ;
- Incuber les tubes à 37 °C pendant 20 min ;
- Ajouter 0,5 ml de la solution de NaCl (2 %) dilué avec le PBS au mélange réactionnelle;
- Centrifuger les tubes à 1000 tr/min pendant 10 min ;
- Récupérer le surnageant
- Lire l'absorbance du surnageant (la fuite d'hémoglobine) de chaque tube à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre ;
- L'hémolyse relative à été évalué en comparaison avec l'hémolyse induit par NaCl en absence des extraits (contrôle négatif).
- Un médicament anti-hémolytique (Dicynone 250 mg) dissout dans le tampon PBS et en absence des extraits a été utilisé comme contrôle positif.
- Chaque série d'expérience a été effectuée en triplicata et le % d'inhibition de l'hémolyse par les extraits a été calculé.

#### 2.7.2.4. Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé selon la formule suivante (Miki *et al* ;1987) :

$$\% \text{ d'inhibition} = (A_c - A_{\text{ext}} / A_c) 100$$

$A_c$ : absorbance du control négatif.

$A_{\text{ext}}$ : absorbance de l'extrait.

#### 2.7.3. Evaluation de l'activité anti-coagulante

L'activité anti coagulante des extraits a été évalué *in vitro* vis-à-vis la voie exogène et endogène de la coagulation, et ceci sur un pool des plasmas normaux déplaquettés et à l'aide de 2 tests globales et chronométriques, le temps de Quick (TQ) ou nommé également Taux de Prothrombine (TP), et le Temps de Céphaline Kaolin (TCK).

##### 2.7.3.1. Préparation de pool plasmatique (standard) déplaquetté

Le pool plasmatique déplaquetté est un mélange de plasma déplaquetté des volontaires sains adultes non traités, dont les TQ et TCK sont normaux et comparables.

Le sang de chaque volontaire a été prélevé par ponction veineuse dans un tube en plastique sur en solution anti coagulante de citrate de sodium à 3,2 % et à raison de 1 volume pour 3 volumes du sang. Le sang est ensuite centrifugé pendant 10 min à 3000 tr/min pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes.

##### 2.7.3.2. Evaluation de l'activité anti coagulante vis-à-vis la voie exogène

L'activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène de la coagulation à été évalué en utilisant un test de coagulation de Quick (TK) ou le temps de prothrombine (TP) qui permet une exploration globale des facteurs de la voie exogène de la coagulation (Brummel *et al* ; 2002).

##### - Principe de l'essai

Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37 °C d'un plasma pauvre en plaquette en présence d'un mélange de facteurs tissulaires et des phospholipides (la thromboplastine). Les facteurs de la voie exogène sont donc activés et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot est mesuré. Un temps de coagulation allongé par rapport à

celui du contrôle négatif explique que l'extrait exerce un effet anticoagulant vis-à-vis de cette voie de coagulation.

- **Protocole expérimentale**

Effet des extraits sur la voie exogène de la coagulation a été évalué selon les étapes suivantes; 10 µl de chaque extrait (0,5 mg/ml) préparé dans le DMSO ont été additionné à 90 µl du plasma standard, le mélange a été incubé à 37 °C durant 15 min. Après l'incubation, la coagulation a été déclenchée par l'addition de 200 µl de thromboplastine pré incubé à 37 °C pendant 15 min. Le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot a été alors mesuré visuellement à l'aide du chronomètre.

### **2.7.3.3. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène**

Le test du temps de Céphaline Kaolin (TCK) est un test qui permet d'explorer l'activité des facteurs plasmatiques de voie endogène.

- **Principe de l'essai**

Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37 °C d'un plasma pauvre en plaquette en présence d'un mélange de facteurs tissulaires et des phospholipides (la thromboplastine) et de calcium. Le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot est mesuré. Un temps de coagulation allongé par rapport à celui du contrôle négatif explique que nos extraits exercent un effet anticoagulant vis-à-vis de cette voie de coagulation.

- **Protocole expérimentale**

L'effet des extraits sur la voie endogène de la coagulation a été évalué selon les étapes suivantes :

10 µl de chaque extrait (0,5 mg/ml) préparé dans le DMSO ont été additionné à 90 µl du plasma pauvre en plaquettes qui est ensuite incubé à 37 °C durant 15 min. Après l'incubation, 100 µl d'une solution de céphaline Kaolin ont été additionnés puis le mélange est réincubé à 37 °C pendant 3 min et la coagulation est alors déclenchée par l'addition de 100 µl d'une solution aqueuse de 0,025 M CaCl<sub>2</sub>

Le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot a été alors mesuré visuellement à l'aide du chronomètre.

Un médicament anticoagulant « Lovenox » de concentration 2000 UI dissout dans le DMSO a été utilisé comme contrôle positif.

**2.7.4. Analyse statistique**

Toutes les expériences ont été faites en triple sauf pour étude de l'activité antibactérienne qui a été faite en doublet. Les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  (déviatoin standard (n=3) .

# *Chapitre II*

## II. Résultats et discussion

Le présent travail porte sur l'étude phytochimique et l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante, antihémolytique et anticoagulante de l'extrait méthanolique brut (**EMB**) et l'extrait aqueux (**EAq**) de la partie aérienne de la plante médicinale «*Thapsia garganica L.*».

### 1. Rendement de l'extraction

Le rendement de l'extraction, la couleur et l'aspect des extraits sont représentés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 6 :** Rendement et caractéristiques des extraits issus de *Thapsia garganica*

La plante	Extrait	Couleur	Aspect	Poids de l'extrait en (g)	Rendement
<i>Thapsia garganica</i>	<b>EMB</b>	marron	visqueux	12	12%
	<b>EAq</b>	marron	Pâteux	26	52%

L'opération de l'extraction des flavonoïdes à partir du matériel végétal de *Thapsia garganica L* a permis d'obtenir des résidus dont le poids de l'extrait méthanolique brut est de 12g et l'extrait aqueux avec 26g qui correspond respectivement aux rendements 12% et 52 %.

L'extraction des polyphénols à partir des plantes est influencée par la méthode d'extraction, la nature du solvant, le diamètre des particules de l'échantillon, la durée et les conditions de stockage ainsi que la présence de substances interférentes (**Naczk et Shahidi ; 2004**).





L'extrait méthanolique brut (**EMB**) a été préparé à partir de la poudre de la partie aérienne de notre plante en utilisant la méthode de macération à froid dont le solvant devrait être remplacé jusqu'à ce que la matière végétale soit épuisée (**100**) et l'extrait aqueux obtenu (**EAq**) est le résultat d'une simple infusion à 10%, suivant la méthode de Drissa et ses collaborateurs (2004). En effet, le rendement n'est pas relatif; il varie en fonction de la






localisation géographique de l'espèce végétale, le degré de maturité, la génétique, le climat, la période de récolte, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites (de son métabolisme) et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou fractionnement et de sa polarité (**Bagad;2011**)


## 2. Test phytochimiques

Le screening phytochimique réalisé sur **EMB** et **l'EAq** consiste à détecter les différentes familles de composés qui existent dans les feuilles et les tiges de *Thapsia garganica* par des réactions de précipitation ou de coloration, en utilisant des réactifs spécifiques à chaque famille de composés, les résultats obtenus sont représentés dans les **tableaux 7 et 8**.

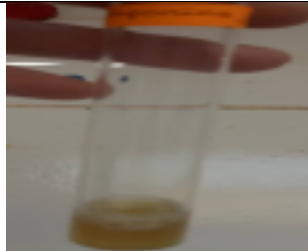



**Tableau 7** : Analyse phytochimique préliminaire de l'extrait méthanolique brut (**EMB**) de *Thapsia garganica*




Tests phytochimiques			Résultats		
<b>saponosides</b>	Test 1	Test de la mousse	(+)	Formation d'une mousse persistante après 15 min	
	Test 2		(+)	Apparition d'une coloration rouge marron	
<b>Flavonoïdes</b>		AlCl <sub>3</sub>	(+)	Apparition d'une coloration jaune	
<b>Tanins</b>		FeCl <sub>3</sub>	(+)	Apparition d'une coloration bleue noire et un précipité après 3 min	

<b>Composés réducteurs</b>	Acide sulfurique Acide acétique FeCl <sub>3</sub>	(+)	Apparition de 2 phases: brune- rouge et bleue-verte	
<b>Alcaloïdes</b>	Wagner	(+)	Précipitation	
<b>Coumarines</b>	NH <sub>4</sub> OH 10%	(-)	Absence d'une fluorescence bleue ou verte sous lampe UV	
<b>Anthocyanes</b>	HCl (2N) NH <sub>4</sub> OH	(-)	Absence du virage de couleur au bleu – violace	
<b>flavonols</b>	HCl concentré	(-)	Absence de la couleur rouge pourpre	
<b>Flavones</b>	KOH	(+)	Apparition d'une couleur orange	

<b>Flavonones</b>	FeCl <sub>3</sub>	(+)	Apparition d'une couleur rouge violacée	
-------------------	-------------------	-----	---	---

**Tableau 8 :** Analyse phytochimique préliminaire de l'extrait aqueux (EAq) de *Thapsia garganica*

Tests phytochimiques			Résultats		
<b>Saponosides</b>	Test 1	Test de la mousse	(+)	Formation d'une mousse persistante après 15 min	
	Test 2		(+)	Apparition d'une coloration rouge marron	
<b>Flavonoïdes</b>		AlCl <sub>3</sub>	(+)	Apparition d'une coloration jaune	
<b>Tanins</b>		FeCl <sub>3</sub>	(+)	Apparition d'une coloration bleue noire et un précipité après 3 min	

<b>Composés réducteurs</b>	Acide sulfurique et d'acide acétique $\text{FeCl}_3$	(+)	Absence de l'apparition de 2 phases: brune- rouge et bleue-verte	
<b>Alcaloïdes</b>	Wagner	(+)	Précipitation	
<b>Coumarines</b>	$\text{NH}_4\text{OH}$ 10%	(-)	Absence d'une fluorescence bleue ou verte sous lampe UV	
<b>Anthocyanes</b>	$\text{HCl}$ (2N) $\text{NH}_4\text{OH}$	(-)	Absence du virage de couleur au bleu – violace	
<b>flavonols</b>	$\text{HCl}$ concentré	(-)	Absence de la couleur rouge pourpre	
<b>Flavones</b>	$\text{KOH}$	(+)	Apparition d'une couleur orange	
<b>Flavonones</b>	$\text{FeCl}_3$	(+)	Apparition d'une couleur rouge violacée	

Les résultats sont exprimés selon:

- Réaction positive (+)
- Réaction négative (-)
- Non déterminé (ND)

La présence de ces métabolites permet de justifier l'utilisation de *Thapsia garganica* comme substance anti-allergique, antioxydante, anti-inflammatoire et anti-spasmodique (Hamza *et al* ;2015).

### 3. Analyse quantitative

#### - Dosage des polyphénols totaux

La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y=ax +b$ ) réalisée par une solution étalon (l'acide gallique) à différentes concentrations (Figure 09) dont la teneur en polyphénols totaux des deux extraits (Figure10) est exprimée en microgrammes équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EAG /mg}$ ).

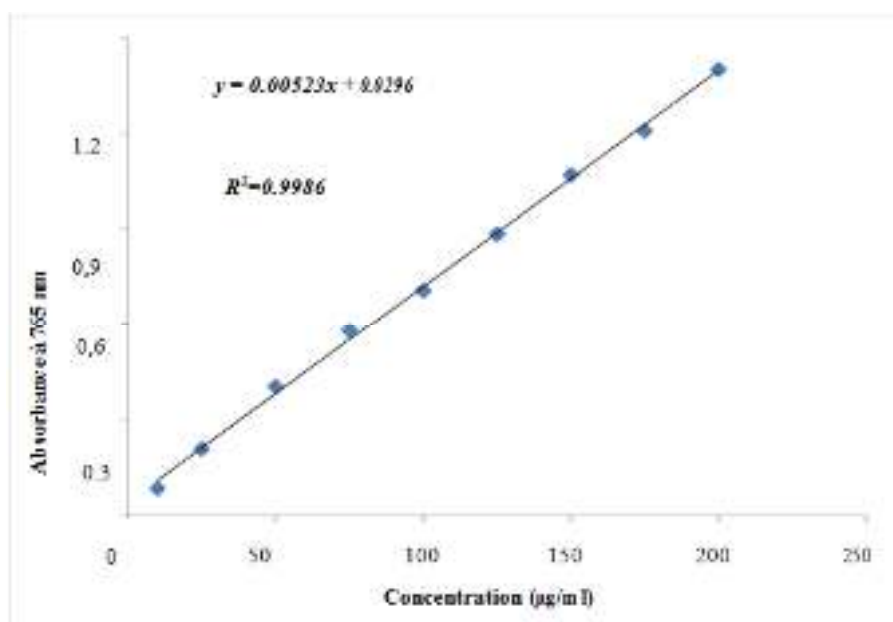
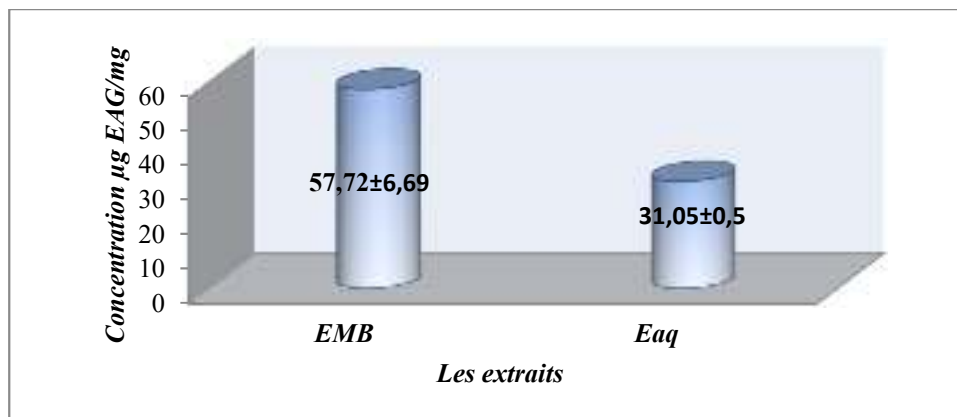


Figure 09 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne  $\pm$  SD de trois mesures).

Le dosage des polyphénols totaux des extraits de *Thapsia garganica* a été effectué selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes

conçue pour déterminer la teneur en polyphénols des plantes médicinales et les nourritures (Blasa *et al* ; 2007). L'acide gallique est le standard le plus souvent employé dans la méthode de Folin-Ciocalteu (Maisutthisakul *et al* ; 2008).



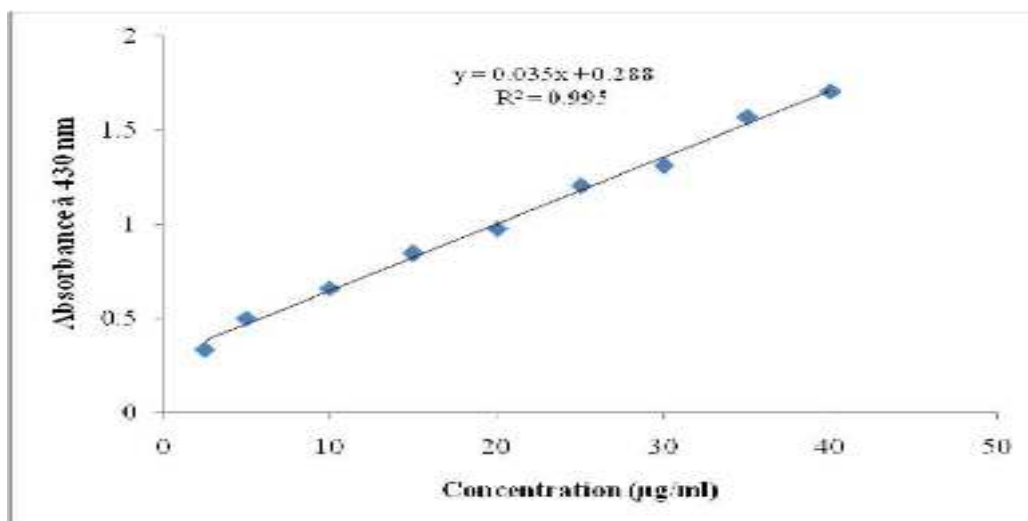
**Figure 10:** Histogramme représente la teneur des extraits en polyphénols

Une vue d'ensemble de la représentation graphique nous laisse remarquer que les teneurs en phénols totaux de *Thapsia garganica L* sont comprises entre  $31,05 \pm 0,5 \mu\text{g}$  équivalent acidegallique/mg d'extrait (**Eaq**) et  $57,72 \pm 6,69 \mu\text{g}$  équivalent acide gallique /mg d'extrait (**EMB**).

Une étude qui a été effectuée par Djeridane et ses collègues (2006), ces derniers ont trouvé des valeurs très inférieures à nos résultats soient seulement de  $7,63 \pm 0,61 \text{mg EAG/g}$  d'extrait sec et cela en utilisant l'éthanol 70%, cette différence peut ainsi être expliquée par le solvant utilisé, la région de la récolte qui est la ville de Laghouat (sahara), la période de récolte (juin) et enfin la délipidation de l'extrait de manière à nedoser que les polyphénols, car le follin-Ciocalteu n'est pas spécifique qu'aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec ce dernier et donner un taux apparent élevé en polyphénols (Tawaha. *Etal* ; 2007).

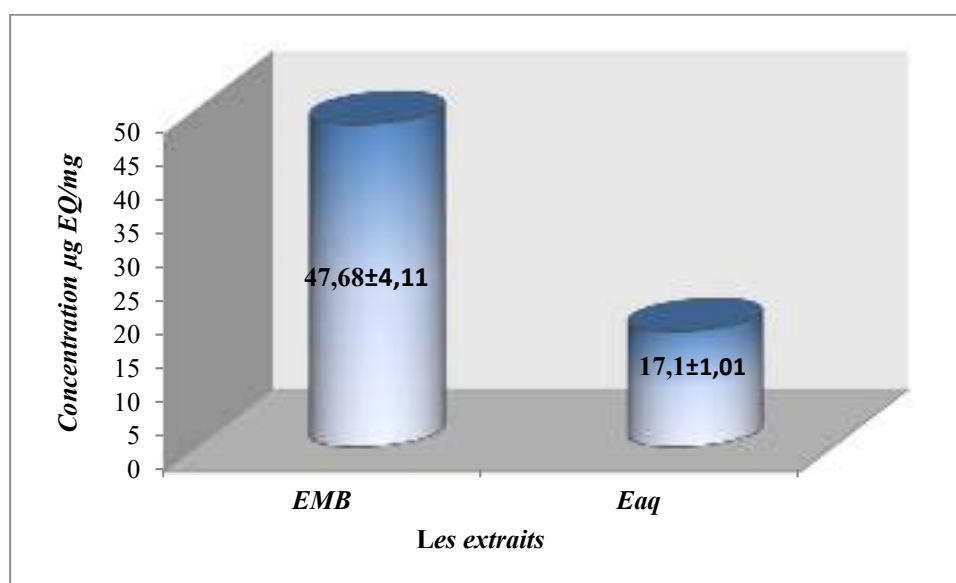
#### - Dosage des flavonoïdes

La quantification des composés flavoniques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y = ax + b$ ) réalisée par une solution étalon (la quercétine) à différentes concentrations (**Figure11**) dont la teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalents quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EQ/mg}$  d'extrait).



**Figure 11** : Courbe d'étalonnage de la quercétine (moyenne  $\pm$  SD de trois mesures).

La raison principale pour la quelle, on a choisi cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (Gomez-Caravaca *et al*;2006).



**Figure 12** : Histogramme représente la teneur des extraits en flavonoïdes

La détermination quantitative des flavonoïdes par la méthode du trichlorure révèle une richesse de l'extrait EMB avec un taux de 47,68  $\pm$  4,11 µg EQ/mg d'extrait par rapport à l'extrait aqueux avec une teneur faible à raison de 17,1  $\pm$  1,01 µgEQ/mg d'extrait (Figure12).

Les flavonoïdes sont des pigments naturels largement répandus chez les plantes. Ils protègent l'organisme contre les dommages oxydatifs tels que les rayons ultraviolets, la pollution de l'environnement, les produits chimiques, etc. (Martínez-Flórez *etal*;2002).

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

L'étude réalisée par **Djeridane et al., 2007** a montré que 98% des polyphénols totaux de la partie aérienne de *Thapsia garganica L.* sont des flavonoïdes, ceci serait évident étant donné que c'est la partie aérienne qui joue un rôle important dans la protection contre les rayonnements solaires (**Ryan et al., 2002**) et que ce groupe de composés phénoliques intervient dans la coloration des feuilles et des pétales des fleurs (**Havsteen ; 2002, Gervaise ; 2004**).

#### 4. Etude qualitative de la chromatographie sur couche mince

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

La CCM nous a permis d'avoir les empreintes flavoniques des différents extraits dont l'identification des composés était basée sur la comparaison des R<sub>f</sub> et couleurs observés sous lampe UV des taches apparues sur la plaque en utilisant plusieurs systèmes d'élution de polarité différente.

Suivant la révélation des plaques, les spots ont été visualisés sous une lampe UV à la longueur d'onde 365 nm, dont elle révèle les taches fluorescentes et visible et les **tableaux 09-10** résument les résultats du CCM.

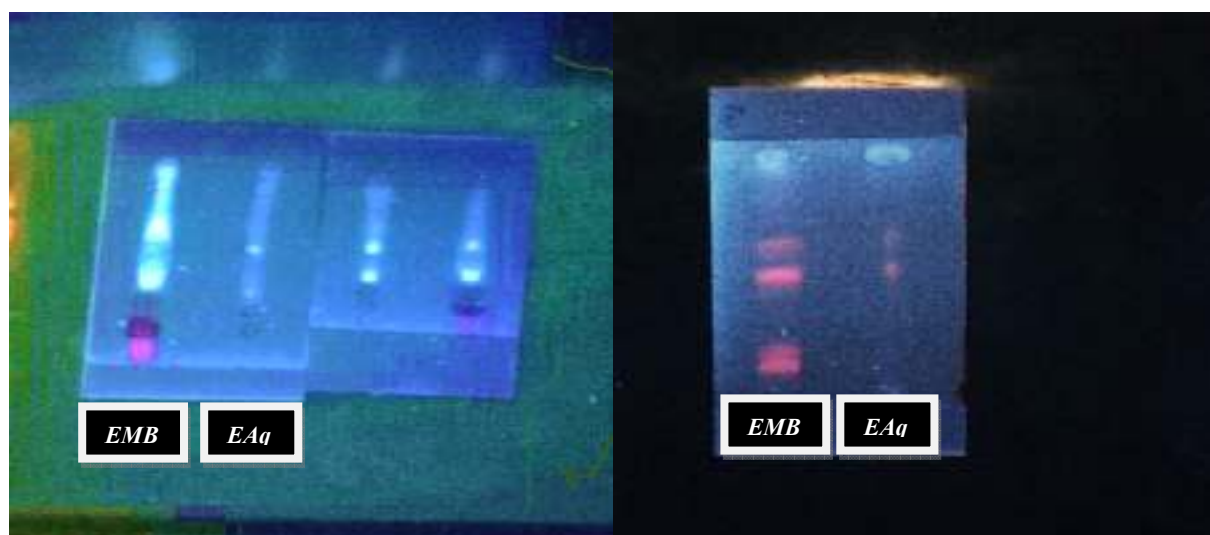
**Tableau 9 :** CCM de l'EMB Système solvant : BAW (40:10:50)

Couleur sous UV 365 (nm)	Rapport frontal (cm)	Type de flavonoïde possible
Rouge	0.074	Anthocyanidine 3-glycosides
Rouge	0.387	Anthocyanidine 3-glycosides
Bleu	0.53	Acide phénol
Bleu	0.61	Acide phénol

Rouge	0.66	Anthocyanidine 3-glycosides
Bleu fluorescent	0.72	Flavonols, flavonones,
Bleu fluorescent	0.78	isoflavone, flavanones,
Bleu fluorescent	0.92	acide phénol

**Tableau 10** : CCM de l'EAq Système solvant : BAW (40:10:50)

Couleur sous UV 365(nm)	Rapport frontal (cm)	Type de flavonoïde possible
Bleu	0.41	Anthocyanidine 3-glycosides
Bleu	0.55	Anthocyanidine 3-glycosides
Bleu Fluorescent	0.63	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones, acide phénol
Rouge	0.70	Flavonols, Acide phénol
Bleu fluorescent	0.81	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones, chalcones



**Figure 13** : Photos des chromatogrammes résultant de l'analyse des extraits **EMB** et **EAq** par chromatographie sur gel silice (révélation à UV (365 nm) par le système solvant BAW (4:1:5))

## 5. Étude *in vitro* des activités biologiques de *Thapsia garganica* L

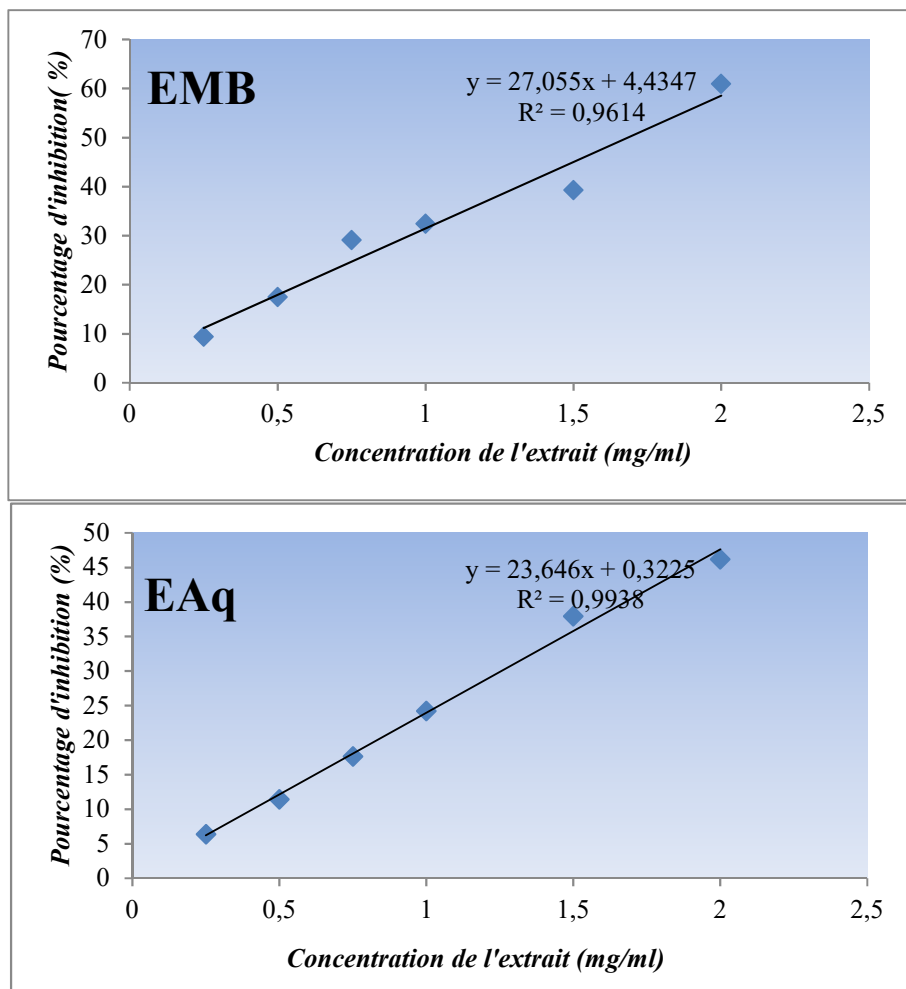
### 5.1. Evaluation de l'activité anti-oxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées expérimentalement pour la détermination *in vitro* de l'activité antioxydante, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres, par exemple : FRAP (Ferric reducing antioxidant power), ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TEAC (Trolox équivalent antioxidant capacity) ou ABTS (2,2-azinobis 3-ethyl-benzothiazoline 6 sulphonate) et DPPH<sup>+</sup> (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) etc. Il est à indiquer que différentes méthodes donnent des résultats assez différents et devraient être appliquées préférentiellement pour la comparaison de produits similaires (**Georgieva *et al* ; 2010**).

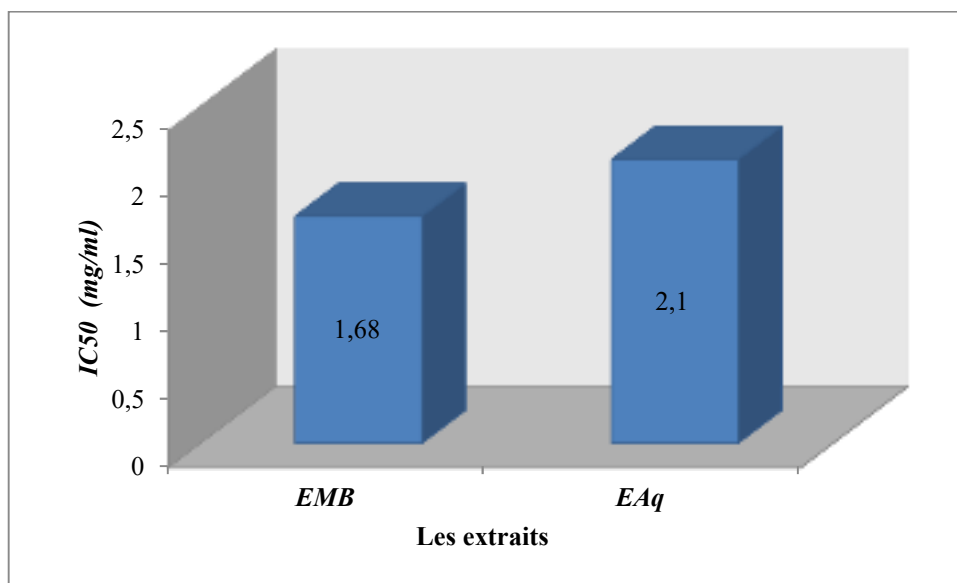
#### 5.1.1. Test scavenger du radical libre DPPH

L'activité antioxydante des extraits EMB et EAq de *Thapsia garganica* L vis-à-vis le radical stable DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm selon la réaction suivante : **DPPH + AH → DPPH-H + A**

La valeur d'IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice à 50%) est déterminé graphiquement à partir de la courbe [% inhibition = f (Concentration)] dont une valeur faible d'IC<sub>50</sub> indique une activité anti-radicalaire puissante (**figure14, figure15**).



**Figure 14 :** Courbes présentant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration des extraits.



**Figure 15 :** Histogramme représente les concentrations inhibitrices à 50% le radical DPPH des extraits.

L'activité anti-radicalaire par la même façon est mesurée pour l'acide ascorbique, pris comme antioxydant de référence. Ce dernier a manifesté *in vitro* une capacité très puissante sur le radical libre DPPH, justifiée par la valeur IC<sub>50</sub> la plus réduite obtenue expérimentalement par cette méthode (IC<sub>50</sub>=1,61 µg/ml). Ce standard (ac.ascorbique) demeure le piègeur le plus efficace, dirigé contre les radicaux libres dans les systèmes biologiques hydrosolubles.

A partir de cette figure, nous constatons que les deux extraits de *Thapsia garganica* ont exhibé une très forte activité scavenging du radical DPPH comparativement au pourcentage d'inhibition montré par le standard utilisé : l'acide ascorbique qui a donné une inhibition de 97.01%±0.95% à 100µg/ml

Aussi nous déduisons que c'est l'extrait méthanolique de la partie aérienne qui a donné le pourcentage le plus élevé parce que c'est l'extrait brut, il a montré la plus grande teneur en phénols totaux (57.72±6.69 µg équivalent acide gallique /mg d'extrait).

Le DPPH est un radical libre stable, accepte un électron ou un proton pour donner une molécule diamagnétique stable. Il est très utilisé dans le criblage des activités de piégeage des radicaux libres. Dans cet essai les antioxydants réduisent et décolorent le radical DPPH, à un composé jaune le diphenyl picryl hydrazine, l'ampleur de la réaction dépendra de la capacité des antioxydants de donner l'hydrogène (Ardestani *et al* ; 2007). Le degré de décoloration exprime le potentiel de piégeage de l'antioxydant. Les terpénoïdes, flavonoïdes, alcaloïdes et les tannins sont considérés comme des substances potentiellement antioxydantes. Cependant, la présence de ces substances indique que nos fractions sont dotées d'une activité antioxydante. Les piègeurs les plus efficaces du radical libre DPPH sont ceux possédant les valeurs IC<sub>50</sub> les plus basses (Markowicz *et al* ; 2007).

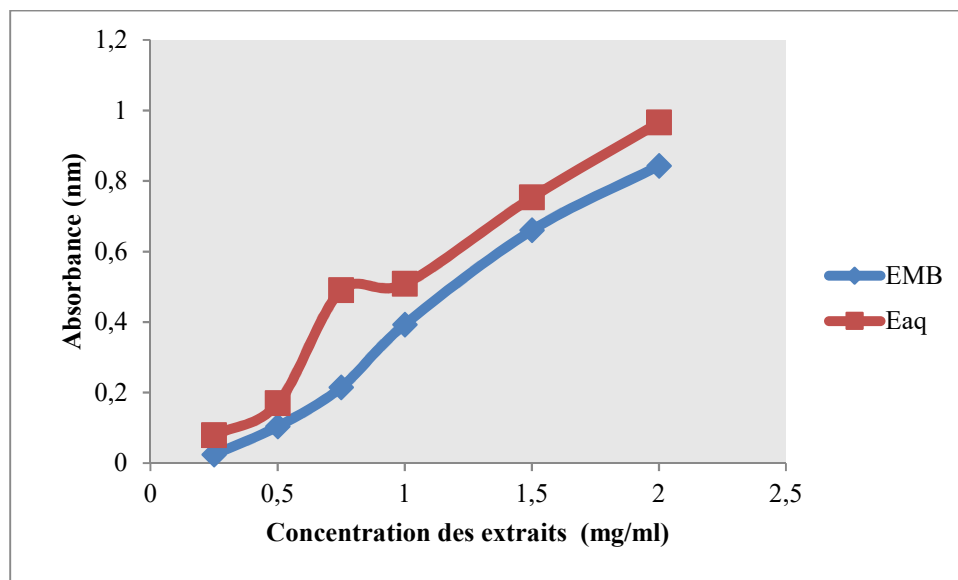
Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant (Tsimogiannis and Oreopoulou ;2006, Kourietal ;2007).

Quelques composés se réagissent très vite avec le DPPH en réduisant un nombre de molécules de DPPH égal à celui des groupements hydroxy les de l'antioxydant (Bondet *et al* ; 1997).

L'effets scavenger des flavonoïdes sur les radicaux libres dépend de la présence des groupements OH libres, en particulier 3-OH, avec une configuration 3',4' -rthodihydroxy (Heimetal ; 2002).

### 5.1.2. Réduction de fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

L'évaluation de l'activité antioxydante par réduction de fer est une méthode facile et reproductible, pour cela elle est très utilisée pour distinguer les extraits les plus actifs (Liu et al ; 2007).



**Figure 16 :** Courbes présentant le pouvoir réducteur du fer par les extraits.

Les pouvoirs réducteurs sont mesurés à 700 nm. On assiste à une augmentation de la densité optique des extraits à partir de la concentration de 0,25 mg /ml, cette absorbance continue à augmenter proportionnellement à la concentration de la solution jusqu'à la fin de l'expérimentation (Figure16). Ces courbes mettent ainsi en évidence une relation proportionnelle entre l'augmentation de la concentration et la réduction de l'absorbance dans les échantillons étudiés.

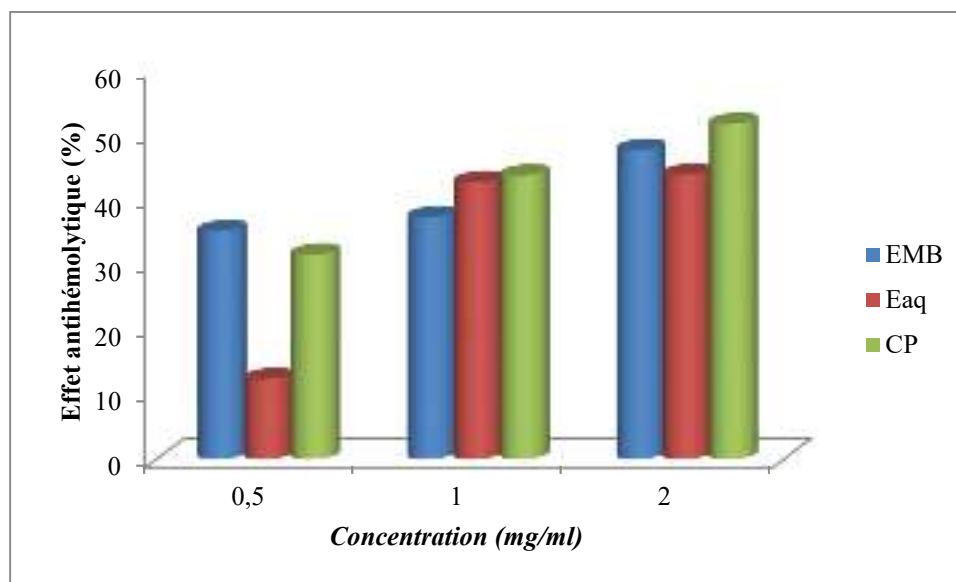
De manière générale, la concentration des antioxydants, ainsi que le nombre de groupements hydroxyles des composés phénoliques et leurs position spatiale contrôlent l'intensité du pouvoir réducteur (Kranl et al ;2005).

### 5.2. Evaluation de l'activité antihémolytique

Le choix d'étudier l'activité antihémolytique de l'extrait de la plante *Thapsia garganica* Lest motivé en raison de son utilisation déclarée en médecine traditionnelle.

Les résultats relatifs de l'effet antihémolytique en fonction de concentration, dans un milieu tampon phosphate saline PBS (0,2 M et Ph 7,4) contenant une suspension

érythrocytaire, incubé à 37 °C et en présence des différentes concentrations des deux extraits EMB et EAq (0,25 mg/ml ; 0,5 mg/ml et 1 mg/ml), comparées à un témoin négatif (tube contenant le PBS, solution érythrocytaire et NaCl à 5%), et un témoin positif (tube contenant le PBS, solution érythrocytaire et un médicament antihémolytique) sont représenté dans la **figure 17**



**Figure 17** : Evolution de l'effet antihémolytique des extraits de *Thapsia garganica L* en fonction de leur concentration en comparaison avec le contrôle positif.

Les résultats obtenus (**Figure17**), montrent que les pourcentages d'effets antihémolytiques sont directement proportionnels à l'augmentation des concentrations des extraits. Il est à noter que l'extrait a présenté un effet inhibiteur d'hémolyse par toutes les concentrations étudiées. A des concentrations de 0,5 mg/ml et 1 mg/ml, nous avons enregistré un pourcentage d'inhibition d'hémolyse faible à l'ordre de 12,1 % pour l'EAq par rapport au contrôle positif qui donne pour les mêmes concentrations des pourcentages d'inhibitions à l'ordre de 31,4% .

(Zhang et al ;1997) ont trouvé que l'activité anti-hémolytique pourrait être attribuée aux flavonoïdes qui possèdent une activité anti-oxydante importante. Selon une étude menée par (Asgary et al ;2005) ; la rutine a entraîné une inhibition de l'hémolyse de 42,5% à une concentration de 10 µg/ml uniquement. De même, ils ont démontré que la quercétine a inhibé l'hémolyse de 35,5% et le kaempférol a inhibé l'hémolyse de 26,9 % à la concentration maximale (10 µg/ml).

Cette activité anti-hémolytique pourrait être attribuée également aux tannins ; des études ont montré que les tannins ont eu une inhibition très forte de la formation des corps de Heinz, cette même étude a révélé une corrélation élevée entre le pourcentage d'inhibition des corps de Heinz et la concentration en tannins (Chalal et Chibout ;2017).

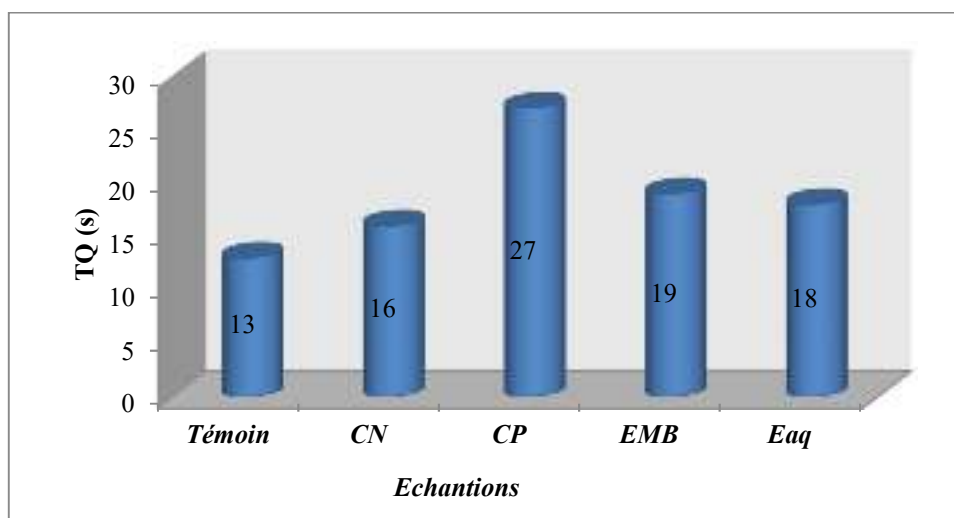
Nos résultats sont en accord avec les résultats de (Zhang et al ; 1997), (Zubair et al ; 2013) ; (Khenfer et Medjouel ;2016) et (Chalal et Chibout ; 2017) où les extraits de plusieurs plantes médicinales étudiées ont montrées des effets antihémolytiques contre les érythrocytes humains. C'est une justification scientifique à l'utilisation de cette plante dans la médecine traditionnelle contre certaines troubles d'hémolyse.

### 5.3. Evaluation de l'activité anticoagulante

Le pouvoir anticoagulant de *Thapsia garganica L* a été évalué *in vitro* vis-à-vis de la voie exogène et la voie endogène de la coagulation à l'aide de deux tests chronométriques, le TQ et le TCK respectivement. Un temps de coagulation allongé par rapport au contrôle négatif traduit une activité anticoagulante du matériel testé (Tlili ;2015).

#### 5.3.1. Évaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène

L'évaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène a été réalisée à l'aide du test de temps de Quick (TQ), qui explore la voie extrinsèque (VII) et la voie commune (X, V, II, fibrinogène) de la coagulation sanguine où le facteur tissulaire (thromboplastine) est le déclencheur de cette voie (Manallah ; 2012). Les résultats sont présentés dans la **figure.18**

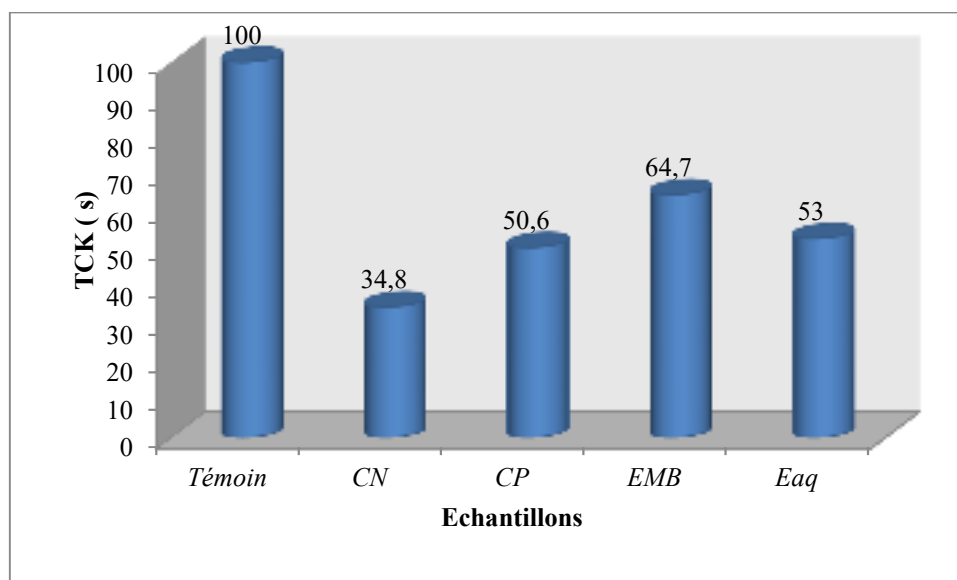


**Figure 18** : Résultat de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène.

La figure présente les résultats de l'activité anticoagulante, on note que les deux extraits donnent un TQ supérieur à celui du control négatif (16s) et du témoin (13) avec un TQ égal à 50,6s. Donc, nos extraits testés ont une activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène.

### 5.3.2. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène

L'évaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène est réalisée à l'aide du test de Temps de céphaline Kaolin (TCK). Cette voie de coagulation est activée par le contact entre le facteur XII et l'activateur qui est le kaolin (substitut du collagène et de tissu conjonctif in vivo). Cette interaction induit l'activation du facteur XII et par conséquence l'activation séquentielle des facteurs XI, IX, X et la thrombine (Lemaoui ; 2011). Les résultats sont représentés dans la figure 19



**Figure 19 :** Résultat de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène.

A partir de la figure 20, Nous avons constaté une valeur à l'ordre de 53s et 64,7 pour le TCK de l'Eaq et EMB respectivement par rapport à celui de CN à 34,8s et de CP à 50,6 s. Donc, les extraits testé sont une bonne activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène.

L'évaluation de l'effet anticoagulant des extraits de *Thapsia garganica* Là l'aide des deux tests (TQ, TCK) a montré que ces extraits ont une importante activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène et exogène par apport au control positif. Ce dernier est appartient au groupe des héparines exactement les Héparines de Bas Poids Moléculaire (HBPM) qui

forment un complexe avec l'anticoagulant physiologique l'antithrombine III qu'inhibe particulièrement le facteur Xa et à moindre degré la thrombine (**Manallah ; 2012**).

L'activité anticoagulante de *Thapsia garganica* est due à sa richesse aux flavonoïdes; ces derniers participent à la prévention des maladies cardiovasculaires; ils inhibent l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose, améliorent le fonctionnement de l'endothélium la couche cellulaire et assure le bon fonctionnement du système vasculaire en réduisant les risques d'athérosclérose. De plus, les rapports épidémiologiques ont démontré que les gens peuvent avoir une incidence plus limitée en maladies du cœur, s'ils ont une ingestion diététique élevée en flavonoïdes (**Manallah ; 2012**). Il présente un remplaceant d'origine naturelle des anticoagulants utilisés qui sont obtenues par différents procédés chimiques ou enzymatiques (**Zandecki ; 2006**).

*Conclusion et  
perspectives*

### *Conclusion et perspectives*

Les plantes médicinales restent toujours une source fiable de principes actifs, *Thapsiagarganica L.* est l'une de ces plantes, utilisée depuis longtemps à des fins thérapeutiques, mais les études phytochimiques de cette plante restent jusqu'à présent insuffisantes. Dans le présent travail, on s'est intéressé à l'investigation phytochimique et l'exploration *in vitro* d'éventuel effet antioxydant, antihémolytique et anticoagulant de l'extrait méthanolique brut et l'extrait aqueux de la partie aérienne de *Thapsiagarganica L* récoltée de la région de Khenchela, et à la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que:

Le screening phytochimique réalisé, a révélé la richesse de notre plante en métabolites secondaires dont nous avons constaté la présence des saponines, des tanins, des alcaloïdes des composés réducteurs et les flavonoïdes surtout de type flavones et flavonones. Ainsi, le criblage des extraits par la CCM a révélé la présence des différentes classes flavonoïques susceptibles d'exprimer l'activité recherchée.

L'analyse quantitative a dévoilé que l'extrait méthanolique brut est plus riche en polyphénols totaux et en flavonoïdes par rapport à l'extrait aqueux.

Quant à l'activité antioxydante, nous déduisons que les résultats ont montré que l'oxydation du DPPH est efficacement inhibée par les deux extraits avec des IC50 réduites et ils ont démontré un pouvoir réducteur du Fer considérable; cela a été en bonne corrélation avec le contenu en flavonoïdes qui constituent des puissants agents antioxydants.

L'estimation de l'activité anti-hémolytique et anticoagulante *in vitro*, a révélé un pouvoir important pour l'EMB, ce qui permet d'entrer dans une préparation thérapeutique qui sert à la guérison des maladies hémolytiques et son utilité contre les complications des maladies thrombotiques.

Par ailleurs, les résultats de cette étude reste préliminaire et ne constituent qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, donc, de nombreuse perspective expérimentales écoulent de cette recherche. En fait, des études plus approfondies nécessaires concluant plusieurs points à savoir:

- Caractérisation quantitative des flavonoïdes par des méthodes de séparation plus performantes (CLHP, CL/SM, CG/SM...);
- Evaluer et tester ces molécules actives pour d'autres propriétés biologiques *in vivo* dans le cadre d'application pharmacologique et industrielle;
- Faire une étude comparative avec les autres fractions extraites à partir la même plante.

*Références  
bibliographiques*

## Références bibliographiques

### A

**Ardestani, A., and Yazdanparast, R. (2007).** Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem.* 104: 21-29

**Avato P., Fanizzi F. P. et Rosito I. (2001).** The Genus *Thapsia* as a source of petroselinic acid. Vol: 36. Pp: 45-850.

**Aneb M. (2017).** Caractérisation phytochimique et propriétés antiproliférative, antibactérienne et antiparasitaire de seize plantes médicinales. Thèse de Doctorat, option biochimie ethnopharmacologie. Université Mohammed V-Maroc.23.69.104p

**Achache W. (2017).** Effet insecticide des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* sur l'insecte ravageur de blé en post-récolte *Tribolium castaneum*. Mémoire de Master, option Gestion qualitative des productions agricoles. Université Djilali Bounamaa de Khemis-Miliana, Maroc.13. 14. 48 p.

**Aissous A. et Bechara R. (2016).** Caractérisation chimique et activités biologiques d'extrait brut hydroalcoolique des graines de *Lepidium sativum*. Master en biochimie moléculaire et sante. Université des Frères Mentouri Constantine. 16.18p.

**Anthony O, Raphael G, Xavier C, Meriane D, Ardisson J, Boutefnouchet S et Deguin B.(2013).** Large scale purification of the SERCA inhibitor Thapsigargin from *Thapsia garganica* L. roots using centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography* 13, 1-24

**Ali H., Christensen S. B., Foreman I. J. C., Pearce F. L., Piotrowski W. et Thastrup O. (1985).** The ability of thapsigargin and thapsigarginin to activate cells involved in the inflammatory response. *Br. J. Pharmac.* 85, 705-712

**Ali, D., É, Sacchetto., E, Dumontet., D, carrer., J, Orsonneau., O, Delaroche., E, Bigot-corbel. (2014).** Interférence de l'hémolyse sur le dosage de vingt-deux paramètres biochimiques. *Annales de biologie clinique*

**Akrout, A. (2011).** Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaeahirsuta* from southern of Tunisia. *J. Food. Chem. Tox.* 49: 342-347

**Asgary S., Naden G.H. et Askan N. (2005).** Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Experimental cardiology.* 10. 88p.

### B

**Bagad, Y.(2011).** Investigation of anti inflammatory and analgesic activity of antimicrobial activities. *J. Pharmac. Bio.* 45 (5): 421-428

**Bammi J. et Douira A., (2002).** Contribution a la connaissance de la flore vasculaire de la forêt de l'Achach, plateau central (MAROC). Malaga, Acta Botanica Malacatina. Vol :29.Pp :23-41

**Bastos, D. H., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A., Cunha, I. B., Carvalho, P. O., and Eberlin, M. N. (2007).** Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba maté (*Ilexparaguariensis*) and green tea (*Cameliasinensis*) extracts. *Molecules*. 12(3):423-

**Beaumont, C. et F. Canonne-Hergaux (2005).** "Erythrophagocytose et recyclage du fer héminique dans les conditions normales et pathologiques; régulation par l'hepcidine." *Transfusion clinique et biologique* 12(2): 123-130.

**Belguitar, M. (2015).** Les plantes médicinales de la région de Ksar Chellala, Tiaret. Mem. Master. Université de Tiaret. 60p.

Ben Sassi,A.(2007). Investigation of some medicinal plants from Tunisia for

**Benkiki, N (2006).** Etudes phytochimique des plantes médicinales Algériennes, ruta montana, matricaria, pubescens et hypericumperfoliatien. Pp7-

**Benkiki, N. (2006).** Etudephytochimique des plantes médicinales algériennes: Rutamontana, Matricariapubescens et Hypericumperfoliatum .Thèse de doctorat, Sciences de la Nature et de la Vie.Batna.

**Benkiki, N. (2006).** Etudephytochimique des plantes médicinales algériennes : Rutamontana,Matricariapubescens et Hypericumperfoliatum, Doctoral dissertation, Université El Hadj Lakhdar de Batna 1

**Bennick, A. (2002).** Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13, 184-196.

**Béraud, J.(2014).** Le technicien d'analyses biomédicales, 2ème édition, P. 628-650, ISBN: 978-2-7430-1299\_1.

**Biaye M. (2002).** Action pharmacologique des tanins. Docteur en pharmacie.

**Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, M. P., and Piatti, E. (2007).** Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. *Food Chemistry*.104(4) :1635-1196

**Blumberg, J. and Frei, B. (2007).** why clinical trials of vitamin E and cardiovascular diseases may be fatally flawed. Commentary on "the Relationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stress in Humans. *Free radical Biology and Medicine*, 43: 1374-1376.

**Boitineau, M.,** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 2010.

**Boizot, N. et Charpentier, J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques : 79-82.

**Booth N.LL., Dejan N..., Richard B..., Stoci E.. (2004)** New lanthanide complexes of 4 methyl 7 hydroxy coumarin and their pharmacological activity.. Clinical Pharmacology and Therapeutics , , Vol.. 50;; pp 120 - 123..

**Boubacar S.A. (2004).** Etude de la Phytochimie et des activités biologiques de *Combretum glutinosum* Per. Ex DC (Combretaceae). Thèse de pharmacie, Bamako, 65 p.

**Bouhaddouda N. (2016).** Activités antioxydante et antimicrobienne de deux plantes du sol

**Bouزيد W. (2009).** Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Crataegus brideliaairyshawii* (Euphorbiaceae). J pharm Res.4 (5) :1326-1332.

**Bruneton J. (1987).** Eléments de phytochimie et Pharmacognosie. Techniques et documentation. Ed. Lavoisier pp. 261- 267

**Bruneton J., (1993).** "Pharmacognosie, phytochimie, Plantes médicinales" (2e édition). Tec et Doc., Lavoisier, Paris, 915.

**Bruneton J. (1993).** Les composés phénoliques. In « pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales ». 2ème édition Lavoisier, Paris : p212-226

**Bruneton J. (1993).** Eléments de phytochimie et de pharmacologie. Technique et

**Bruneton J. (1999).** Parmacognosie Phytochimie Plantes médicinales. Edition: Tec& Doc.Paris, 1120 p

**Bruneton, J. (2008).** Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales 3ème édition , techniques et Documentation. Lavoisier. France : 239-783.

**Bruneton, J. (2009).** Pharmacognosie, phytomédecine des plantes médicinales vendues sur les marchés de Douala, Cameroun. Journal of Applied Biosciences.37 :2496-2507.

## C

**Chakraborty, D., et B, Shah (2011).** "Antimicrobial, antioxidative and antihemolytic activity of Piper betel leaf extracts." International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 3(3): 192-19

**Chalal F, Chibout M. (2017).** Effet préventif de pathologies hémolytiques liées au stress oxydatif des extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*. Mémoire de Master. Option biochimie physiopathologie. Université A. MIRA, Bejaia.36 p.

**Chemloul F. (2014).** Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* de la région de Tlemcen. Mémoire de master en Agronomie. Université Abou Beker Belkaid. 11 p.

**Chevaltier L, Crouzet-Segnac. (2004).** Les médicaments à base des plantes. 2ème édition, 25-30.

**Cheyrier V and.. Sarni - Manchado(2005)** P Les polyphénols en agroalimentaire.. Ed.. Tec & Doc,, Paris,, ,, p.. 2 - 10..

**Courtois, G., J, Vandekerckhove., M, Dussiot., J, Kersual., S, Coulon., Z, Belaid., Y, Zermati, J, Ribeil., O, Hermine. (2007).** "L'érythroïèse tardive: une mort avortée?" *Hématologie* 13(6): 400-408

## **D**

**Dangles, O., Stoeckel, C., Wigand, M.C. et Brouillard, R. (1992).** Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. *Tetrahedron Lett*, 33 : 522-730

**Deina M., Rosa A., Casu V., Cottiglia F., Bonsignore L. (2003),** Natural product:: their chemistry and biological significance.. *Journal of the American Oil Chemistry Society* , Vol.. 80;; pp 65 - 70..

**DEINA, M., ROSA, A., CASU, V., COTTIGLIA, F., BONSIGNORE, L. (2003):** Natural product: their chemistry and biological significance. *Journal of the American Oil Chemistry Society*. 80:65-70

**Denmeade SR, Mhaka AM, Rosen DM et al. (2012)** Engineering a prostate-specific membrane antigen-activated tumor endothelial cell prodrug for cancer therapy. *Sci Transl Med* 4: 140ra86

**Denmeade S. R., Isaacs J.T. et Christensen S.B. (2007).** Cytotoxic phenylpropanoids and an additional thapsigargin analogue isolated from *Thapsiagarganica*. *Phytochemistry*. 67 :

**Derbal, S. E. T., Ghedira, K. (2005).** Les phytonutriments et leurs impacts sur la santé. *Phytothérapie et nutrition*,1 : 28-34.

**Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards J.F. & Stocker P. (2007).** Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*. 224: 801–809.

**Dobignard A. et Chatelain C., (2011).** Index synonymique et bibliographique de la flore d'Afrique du Nord. Vol. 1, 2, 3, vol. 4 et 5 in pres.

**Donrop, A. (2007).** The treatment of severe malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* .101: 633-634.

**Drew D.P., Krichau N., Reichwald K. et Simonsen H.T. (2009).** Guaianolides in apiaceae: perspectives on pharmacology and biosynthesis. *Phytochem.Rev.* 8:581–599.

**Dubost, É.; et A, Dupuis (2011).** "La prise en charge des anémies par carence." *Actualités pharmaceutiques hospitalières* 7(26): 10-17

## **E**

**Erlund I. (2004).**The flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutrition Research*, 24, 851-874.

## **F**

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

**Federici, L., N, H, Loukili., J, Zimmer., S, Affenberger., F, Maloisel., E, Andrés. (2007).** "Manifestations hématologiques de la carence en vitamine B12: données personnelles et revue de la littérature." *La Revue de médecine interne* 28(4): 225-231.

**Frederich, M. (2014).** Les plantes qui nous soignent : de la tradition à la médecine moderne

## **G**

**Garry G, Duthie, Peter T, Gardner J, Janet A et Kyle M. (2003).** Plantflavonoïdes Chez *Urticadioica L.* Evaluation de leur Pouvoir antibactérien.

**Gausson H., Lerog J.-L. & Ozenda P. (1982).** Précis de botanique : Végétaux supérieurs. 2<sup>ème</sup> Ed. Masson. 387-389.

**Georgieva, S., Godjevargova, T., MITA, D. G., et al(2010).** Non-isothermal bioremediation of waters polluted by phenol and some of its derivatives by laccase covalently immobilized on polypropylene membranes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66(1) :210-218

**Gervaise Y. (2004).** Analyse des antioxydants naturels dans les matières premières et les produits. Polyphénols-Euroforum. are they the new magicbullet? UK. Proceedings of the Nutrition Society, 62. 599 p.

**Ghasemzadeh A and N. Ghasemzadeh (2011).** Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human, *Journal of Medicinal Plants Research*. 5, 6697–6703

**Ghedira K. (2005).** Les flavonoïdes : Structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4, 162-169.

**Girasole, M., S, Dinarelli., G, Boumis. (2012).** "Structure and function in native and pathological erythrocytes: a quantitative view from the nanoscale." *Micron* 43(12): 1273-1286.

**Gómez F. L. M. (2007).** Síntesis de análogos de las taspigarginas. Mémoire en vue d'obtention du grade de doctorat en chimie. Département de chimie organique. Faculté des sciences. Université de Cádiz. puerto real. Espagne

**Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2006).** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1220-1234

**Guessoum D et Lecheheb H. (2015).** Contribution à l'étude phytochimique des polyphénols: Mémoire du Master. Option métabolisme secondaire et molécule bioactive. Université des Frères Mentouri-Constantine-Algérie. 46 p.

**Guignard J.-L. (1998).** Abrégés botaniques. 11<sup>ème</sup> Ed. Masson. 166-171. ISBN : 2-225-83519-5.

**Guillermo M. et Massanet A. (2007).** Pyran-2-one and four monoterpenoids from *Thapsia transtagana* and their implication in the biosynthesis of transtaganolides *Phytochemistry*, 68: 2480–2486

**Guo, B. M. Gao and C.Z. Liu (2007).** In vitro propagation of an endangered medicinal plant *Saussurea involucre* Kar. Et Kir, *Plant Cell Reports*. 26, 261–265. Badji Mokhtar-Annaba. 22.23 p

## H

**Hadi M. (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; étude et applications thérapeutique. Thèse de doctorat, spécialité : pharmacochimie, Université Louis Pasteurs. 155p

**Hagerman A.E. (2002).** Tannin chemistry. Department for chemistry and biochemistry Miami University Oxford, OH45056 USA

**Hahlbrock K. & Scheel D. (1989).** Physiology and Molecular Biology of Phenyl-propanoid Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 40: 347–69.

**Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., Chapelle, J. P. (2007).** *Med Liege* ,62 (10) : 628-638.

**Hamidi A.,, 2012** - Etude phytochimique et activité biologique de la plante *Limoniastrum guyonianum* , Magister en chimie organique , Unvi Kasdi Merbah Ouargla p48

**Hamliche V (1991)** Pathologie hivernale et pharmacopée traditionnelle traditionnelle dans les montagnes kabyles. 3e séminaire national sur les ressources phylogénétiques, Alger 17–18 juin

**Hamza. K et Meziani. A. (2015).** Etude de l'activité biologique de l'extrait aqueux des feuilles de *Zizyphus lotus* L. Mémoire de master en biochimie moléculaire et santé. Université des Frères Mentouri-Constantine. 13.18 p

**Hamza. K et Meziani. A. (2015).** Etude de l'activité biologique de l'extrait aqueux Université des Frères Mentouri-Constantine. 13.18 p.

**Hand R., (2011).** Apiaceae. in: Euro +Med Plantbase – the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. *Biophysics in press*.

**Harborne, J. B. (1989).** Recent advances in chemical ecology. *Nat. Prod. Rep*, 25 (7) : 85-109.

**Harrorne J B et Williams C A. (1972).** Flavonoid patterns in the fruits of The Umbelliferae. *Phytochemistry*, 11, 1741-1750.

**Havsteen B. H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids

**Hebbani, A, V., V, D, Reddy., V, Nallanchakravarthula. (2014).** "In Vitro Anti-hemolytic Activity of Terminalia arjuna (Roxb.) Wt. & Arn. Bark Powder Aqueous Extract." *Ind. J. Adv. Chem. Sci* 3: 02-108

**Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., and Bobilya, D. J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*. 13(10) :572-584.

**Hoffman L.( 2003)** Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes.. Thèse de doctorat.. Strasbourg, 2003,, pp 245..

**Hseini S., Kahouadji A., Lahssissene H. et Tijane M. (2007).** Analyses floristique et ethnobotanique des plantes vasculaires médicinales utilisées dans la région de Rabat (Maroc occidental). *Lazaroa*, 28 : 93-100.)

## I

**Isaacs JT (2005)** New strategies for the medical treatment of prostate cancer. *BJU International Suppl* 2: 35–4

## J

**James, O., et I, M, Alewo. (2014).** "In vitro antihemolytic activity of gymnema sylvestre extracts against hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induced haemolysis in human erythrocytes." *Am. J. Phytomed. Clin. Ther* 2: 861-869.

**Jauréguiberry, S. (2015).** Rétention et " pitting " splénique des globules rouges au cours du paludisme aigu traité par dérivé de l'artémisinine, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.

**Judd W. S., Campbell C. S., Kellogg E. A. & Stevens P. (2002).** Botanique systématique : Une perspective phylogénétique. 387-390. ISBN : 2-7445-0123-9.

## K

**Kasmi,N.(2014).** étude phytochimique et évaluation de l'activité anti oxydante et anti inflammatoire d'extrait méthanolique de deux plantes médicinales Rutamontana(Clus.L).et Thymus algériensisBoiss. Thèse de master, Sciences de la Nature et de la Vie. Khenchela.

**Khaldi. F. Z. (2015).** Evaluation de l'activité antioxydant et anti inflammatoire des plantes médicinales algériennes *Thymus vulgaris*, *Matricaria recutita* *Anethum graveolens*. Mémoire de master biologie cellulaire et physiopathologie. Université frères Mentouri-Constantine. 22 p.

**Khales ATHMOUNI, Taheni BEELGHITH et al. (2015)** , Effect of solvent polarity in the content of biomolecules and antioxydant activity of *Thapsia garganica* (Apiaceae), Algerian Journal of Natural Products 3:3 194-208

**Khenfer S. et Medjouel M. (2016).** Optimisation des conditions d'extraction des compositions phénoliques d'une plante médicinale de la région sud de Sahara Algérien. Mémoire de Master. Option biochimie appliquée. Université Kasdi Merbah-Ouargla-Algérie. 57 p.

**Khiri Fet Lalaoui B. (2007).**Activité antimicrobienne des polyphénols le cas d'extrait d'*Arbutus unedo*. Mémoire d'Ingénieur. Option contrôle de qualité et analyse. Université Abderrahmane Mira-Bejaia-Algérie. 42 p.

**Kmoníčková E, Melkusová P, Harmatha J, Vokáč K, Farghali H et Zídek Z. (2008).** Inhibitor of sarco-endoplasmic et B M iculum  $Ca^{2+}$  ATPase thapsigargin stimulates Production of nitric oxide and secretion of interferon-gamma. *European Journal of Pharmacology*, 588, 85-92.

**Kmoníčková E, Melkusová P, Harmatha J, Vokáč K, Farghali H et Zídek Z. (2008).**Inhibitor of sarco-endoplasmic et B M iculum  $Ca^{2+}$  ATPase thapsigargin stimulates Production of nitric oxide and secretion of interferon-gamma. *European Journal of Pharmacology*, 588, 85-92.

**Kranl k., Schlesier k., Bitsch R., Hermann H., Rohe M. et Bohm V.(2005).**Comparing antioxydative food additive and secondary. 93: 171-175.

**Krief S. (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Muséum National d'Histoire Naturelle. Thèse de Doctorat.

**Kumbasli .M.2005-** etudes sur les composés polyphenoliques en relation avec l'alimentation de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (these de doctorat des sciences foretieres .faculte de foresterie et de geomatique universite laval .Quebec,176p

**Kyeong ,W.(2007).** Effects of the Aqueous Extract from *Artemisia campestris* ssp.caudata on Mycorrhizal Fungi Colonization and Growth of Sand Dune Grasses. *J. Plant.Biology*. 50 (3): 358-361

## L

**Labiod. R. (2016).** Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide. Thèse de doctorat en biochimie. Université Badji Mokhtar-Annaba. 1.19.20.75.78.79 p

**Ladhem H. (2016).** Contribution à l'étude de l'effet antibactérien et antioxydant de l'extrait aqueux de *Tetraclinis articulata* (Thuya de Berbérie). Mémoire de Master, option sciences des aliments. Université de Tlemcen, Algérie. 1. 22.52 p.

**Ladjel S, Zellagui A et Gherraf N. (2011).** Reinvestigation of essential oil content of *Thapsia garganica* grown in the east of Algeria. *Revue des sciences fondamentales et appliquées*, 3, 30-

**Laib Imène. (2011).** Etude des activités antioxydants et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs, mémoire de magister en sciences alimentaires. Institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires- Constantine. 26 p.

**Landrum, J.T., Bone, R.A. and Joa, H.A . (1997).** A one year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement. *Exp Eye Res* : 57-62.

**Larsen P K et Sandberg F. (1970).** Constituents of umbelliferous plants. *Act chem. Scand* 24, 1113-1114

**Lemaoui. A. (2011).** Activités antioxydante et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa*. L. Algérienne. Magister en biochimie. Université Ferhat Abbas – Sétif. 1. 23. 24. 62.

**Lemaoui. A. (2011).** Activités antioxydante et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa*. L. Algérienne. Magister en biochimie. Université Ferhat Abbas – Sétif. 1. 23. 24. 62.

**Lenormand, G. (2001).** Elasticité du squelette du globule rouge humain-une étude par pinces optiques, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.

**Leporrier, M. (2008).** "Anémies hémolytiques auto-immunes." *Hématologie* 14(6): 432-441.

**Leroy, L. (2015).** Rendre accessible les savoirs contenus dans les manuels scolaires aux élèves à besoins éducatifs particuliers : des pratiques contrastées à interroger. *Spirale*, 55, 153-164.

**Li, B., B, Smith., M, Hossain. (2006).** "Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme assisted extraction method." *Separation and Purification Technology* 48(2): 189-196

**Lopes-Lutz, D., S. Alviano, D., S. Alviano, C., P. Kolodziejczyk, P. 2008.** Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 69 :1732-1738

## M

**Maataoui, B.S., Hmyene, A., Hilali, S. 2006.** Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*, 7(1): 3-8.

- Magalha , L., Segundo, M., Reis, S. et Lima Jose L. F. C. (2008).** Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxydant properties. *Analytica chimica acta*, 613 : 1-19
- Maisuthisakul, P., Pasuk, S., and Ritthiruangdej, P. (2008).** Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *Journal of Food Composition and Analysis*.21(3) :229-240
- Manallah A. (2012).** Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de
- Marais J P J, Deavours B, Dixon R A et Ferreira D. (2006).**The Stereochemistry of Flavonoïds *In* The science of flavonoïds. Edition : BS/DH. USA, 1-46.
- Marchand, A., R, S, Galen., F, V, Lente. (1980).** "The predictive value of serum haptoglobin in hemolytic disease." *Jama* 243(19): 1909-1911.
- Marfak. A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité
- Markham ,k.(1982).** **Techniques of flavonoids identification. Academic press: 1-113**
- Markowitz, V. M., Ivanova, N. N., Szeto, E., Palaniappan, K., Chu, K., Dalevi, D., ... and Lykidis, A. (2007).** IMG/M: a data management and analysis system for metagenomes. *Nucleic acids research*. 36(1) :534 -538
- Martínez-Flórez S., González-Gallego J., Culebras J.M. et Tuñón M.J. (2002).** Losflavonoïdes: propiedades y accionesantioxydants. *Nutr. Hosp.* 17:271-278.
- Mayer A, et al. (2010)** Uniform transitions of the general RNA polymerase II transcription complex. *Nat Struct Mol Biol* 17(10):1272-8.
- Meftah T., Sengui R., Djennas A. &Benabbes O. (2001).**Connaissance, valorisation et contrôle de l'utilisation de la flore sauvage en médecine traditionnelle (plantes médicinales).Programme U.I.C.N. pour l'Afrique du nord.
- Mellouk K. (2013).** Étude des activités antioxydante et antimicrobienne des flavonoïdes et des fractions flavoniques de la partie aérienne dela pulpe d'olive *Olea europaea* L. Mémoire de Magister. Option biochimie
- MENSOR, L.I., MENEZES, F.S., LEITAO, G.G., REIS, A.S., DOS SANTOS, T., COUBE, C.S., LEITAO, S.G., (2001).** Screening of Brazilian plants extracts for antioxydants activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.*, 15, 127-130
- Merad R, Hammiche V (1992)** The inventory of toxic plants of Algeria. *Recent advances in toxinology research* 3: 7–11
- Mezzou, H., A, B, Khelifa., F, Neffati., W, Douki., A, Ben Amor., M, F, Najjar. (2006).**"Détermination de l'hémoglobine plasmatique et évaluation spectrophotométrique de lhémolyse en biochimie clinique." *Revue Francophone des Laboratoires* 2006(386): 59-64.

**Miki, M., Tamai, H., Mino, M., Yamamoto, Y., Niki, E . (1987).**: Free-radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by alpha-tocopherol. *Arch. Biochem. Biophys.* 258: 373–380,

**Min, B. R., D. Miller, S. P. Hart, G. Tomita, E. Loetz, and T. Sahl.** (2003)b. The effect of grazing forage containing condensed tannins on gastro-intestinal parasite infection in Angora does. *Vet. Para- sitol.* (In press)

**Mohammed. J. (2010).** Extraction et caractérisation de la composition des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* & *Juniperus oxycedrus* du Moyen Atlas. Mémoire de master Sciences et Techniques. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. 24. 25p.

**Molyneux P. (2004).** The use of the stable free radical DiPhenylPicrylHydrazyl(DPPH), for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn. Journal of Science and Technology.* 26(2). 211 P

**Mothana R.A.A. (2011).** Anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant activities of the endemic Soqotraen *Boswellia elongata* Balf. and *Jatropha unicostata* Balf. in different experimental models, *Food and Chemical Toxicology.* 49, 2594–2599.

**Moubarki. N. (2010).** Extraction des huiles essentielles de thymus fontanesii et application à la formulation d'une forme médicamenteuse- antimicrobienne, mémoire de magister en génie des procédés chimiques et pharmaceutiques. Université de M'hamed Bougara-Boumardes. 9 p.

**Muthu, S., et B, Duraira (2015).** "Inhibitory effect of hydroethanolic extracts of *Annona muricata* on human platelet aggregation and hemolysis in vitro." *Int J Pharm Pharm Res* 2: 207-213 Thèse de Doctorat

## N

**N. Shinde, N. Malpathak and D.P Fulzele (2010).** Determination of isoflavone and antioxidant activity in *Psoralea corylifolia* L. callus cultures, *Food Chemistry.* 118, 128–132.

**Nadia Z. (2009).** Etude du contenu poly-phénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne, Thèse de magister, Ecole doctorale. Constantine

**Nisrin BENAYAD (2013 )** Évaluation de l'activité insecticide et antibactérienne des plantes aromatiques et médicinales Marocaines ; Extraction de métabolites secondaires des champignons endophytiques isolés de plantes Marocaines et activité anticancéreuse ; these de doctorat

**Nacz M. et Shahid F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in foods. *Journal of chromatography A.* 1054: 95-111.

**Nabavi, S, F., S, M, Nabavi., W, Setzer., S, A, Nabavi., S, A, Nabavi., M, A, Ebrahimzadeh. (2013).** "Antioxidant and antihemolytic activity of lipid-soluble bioactive substances in avocado fruits." *Fruits* 68(3): 185-193.

**Naili, M. (2010).** Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arab. J. Chem.* 3: 79–84.

## O

**Ojala T, Remes S, Haansuu P, Vuorela H, Hiltunen R, Haahtela K et Vuorela P. (2000).** Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 299-305.

**Oszmianski, J., Wojdylo, A., Lamer-zarawska, E. et Swiader, K. (2007).** Antioxydant tannins from Rosaceae plant roots. *Food chemistry* 100 : 579-583

**O. Yesil-Celiktas, P. Nartop, A. Gurel, E. Bedir and F. Vardar-Sukan (2007).** Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis* calli, *Journal of Plant Physiology*. 164, 1536–1542

**Oyaizu, M. (1986)** Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition* 44: 307-315.

## P

**P. Horcajada, C. Serre, M. Vallet-Regí, M. Sebban, F. Taulelle, G. (2006), Férey** Metal-organic frameworks as efficient materials for drug delivery *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45 (36) pp. 5974-5978

**Pavela, R. (2009).** Larvicidal effects of some Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *J. Parasitol Res.* 105: 887–892

**Peronny S. 2005.** La perception gustative et la consommation des tannins chez le maki (*Lemur catta*). Thèse de doctorat, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, p. 12.

**Piché, R. (2002).** Etude Phytochimique et Activité Antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus* et *s. speculatus*

**Piochon M., 2008.** Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore aurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. *Thèse de doctorat.* Université du Québec, pp. 5-9.

**Poblocka-Olech, L , Glód, D , Żebrowska, M E , Sznitowska, M , and Krauze-Baranowska, M. (2016).** TLC determination of flavonoids from different cultivars of *Allium cepa* and *Allium ascalonicum*. *Acta pharmaceutica*, 66(4) :543-554

**Pokorny, J., Yanixhlieva, N. and Gordon, M. H. (2001).** Antioxydants in food: practical applications. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. New York, USA : 108-109.

**Popovici C., Saykova I., Tylkowski B., 2009.** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*. (4) :8p.

**Portier, K., N, Kirschvink., N, Fellmann., J, Coudert., P, Legeux. (2007).** Paramètres influençant la structure et la fonction du globule rouge chez le cheval. Annales de Médecine Vétérinaire, Université de Liège

**Power JD( 2010)** Fair DA, Schlaggar BL, Petersen SE. The development of human functional brain networks. *Neuron.* ;67:735–748

**Prochazkova, D I. Bousova and N. Wilhelmova (2011).** Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids, *Fitoterapia.* 82, 513–523.

## Q

**Quezel P, Santa S (1962–1963)** Nouvelle flore de l’Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris

## R

**Rahman, H., M, C, Eswaraiah., A, M, Dutta.(2015).** "In-vitro anti-inflammatory and antiarthritic activity of *Oryza sativa* var. joha rice (an aromatic indigenous rice of assam)." *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 15(1): 115-121.

**Rani, A, A., S, M, J, Punitha., M, Rema. (2014).** "Anti-inflammatory activity of flower extract of *Cassia auriculata*-an in vitro study." *Int. Res. J. Pharm. Appl. Sci.* 4: 57-60.

**Rohlfs G. (2002).** Voyages et explorations au Sahara. 253 p.

**Romero, M.(2005).** Effect of artemisininartesanate as inhibitors of hepatitis B virusproduction in an “invitro” system.*Antivir Res.* 68: 75-83

**Rout, G.R. Samantaray and P. Das (2000).** In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *BiotechnologyAdvances.* 18, 91–120

**Rubal J., Moreno D., Guerra F. M., Zacarias D. J., Saouf A., Akssira M., Mellou F.R., Ryan D., Antolovich M., Prenzler P., Robards k. et Lavee S. (2002).** Biotransformations transtagana and their implication in the biosynthesis of transtaganolides *Phytochemistry*,68: 2480–2486

## S

**Said, T. (2010).** Etude ethnobotanique, activité antioxydante et analyse phytochimique de quelques cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) du Sud-Est Algérien .Thèse de doctorat. Oran

**Samadi A. (2000).** Etude de l’extrait chloroformique d’Oudneyaaficana.Université El Hadj Lakhdar Batna. Thèse de Magister Scalbert A. (1999). Alimentation et vieillissement. Colloque Clermont Ferrand.

**Sarni-Manchado, P. et Cheynier, V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire, Ed. Lavoisier (Tec & Doc), Paris : 300-398

**Scalbert A & Williamson G (2000)** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130, 2073S–2085S.

**Scalbert A et Gary W. (2000).** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. U.K. *J. Nutr*, 130. 2073 p.

**Schulz H, Baranska M, Blez H H, Rosch P, Strehle A M, et Popp J. (2004).** Chemotaxonomic characterization of essential oil plant by vibrational spectroscopy measurements. *Vibrational Spectroscopy*, 35, 81-86.

**Sefi, M. (2010).** Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extract on hyperlipidemia, advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *J. Food.Chem.Toxicol.*48: 1986–1993

**Shobana, S et R, Vidhya (2016).** "Evaluation of In Vitro Hemolytic Activity Of Different Parts of *Abutilon indicum* (Linn.)." *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5(5): 1182-1196

**Soubeiran E et Regwuld J. (1988).** *Traité de pharmacie*. Edition : Masson. Paris, 1170p.

**Stocker P, Yousfi M, Djerridane O, Perrier J, Amziani R, El Boustani S et Moulin A.(2004).** Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie*, 86, 919-925

## **T**

**Tawaha K., Alali F., Gharaibeh M., Mohammad M. et El-Elimat T. (2007).** Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104:1372–1378.

**Tigrine C. (2014).** Effets anticancéreux et chimio protecteur de l'extrait polyphénolique, riche en flavonoïdes, des feuilles de *Cléome arabica*. Thèse de doctorat en science. Université Ferhat Abbas Sétif. 34 p.

**Tlili ML. (2015).** Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergulariatomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional). Mémoire de magister en biologie biochimie et analyse de bioproduits. Université Kasdi Merbah – Ouargla. 27.82 p

**Touami O. (2016).** Etude des propriétés phyto thérapeutiques de la plante médicinale *Malva Sylvestris*. Mémoire de master chimie organique et chimie des matériaux organiques. Université de Larbi Tébessi-Tébessa. 13 p.

**Triki, A. (2002).** Effets biologiques de polyphénols extraits des plantes médicinales : *Ranunculus repens* L et *Thymus* responsable de certaines pathologies, thèse Magister, Université Mentouri de Constantine.

## U

**Urquiaga I et Leighton F. (2000).** Plant polyphenolantioxidants and oxidative stress. *Biol. Res.* . 33: 55–64

## V

**Verpoorte, R. A. Contin and J. Memelink (2002).** Biotechnology for the production of plant secondary metabolites, *Phytochemistry Reviews*. 1, 13–25.

**Vuorela S, Salminen H, Mäkelä M, Kivikari R., Karonen M & Heinonen, M. (2005).** Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53(22) :8492-8497.

## W

**Wassel G.M et Ahmed S.S. (1974).** *Thapsia*, (F), *Tahpsiagarganica* (L), *Smooth thapsia* (E), Fa. Ombellifère. Vol: 29. Pp: 504-541

**Wilson, A. (1987).** Flavonoids pigments in chalkhill blue (*Lysandra coridonpoda*) and other lycaenid butterflies. *J. Chem. Ecol*, 13 (3) : 473-493

**Wong C.C., LI H.B., CHENG K.W. et CHEN F., 2006-**A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem*. 97 : 705-711

## Y

**Yeza S, Bouchama S. (2014).** Index des métabolites secondaires végétaux. Mémoire de licence biochimie fondamentale et appliquée. Université KasdiMerbah –Ouargla. 10 p.

**Yildirim A, Mavi A, Kara AA (2001).** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J. Agric. Food Chem*. 49(8): 4083-4089.

**Yildirim A., Mavi A., Kara AA.( 2001)** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 9: 4083-4089.

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

## Z

**ZANDECKI M(2006).** Métabolisme du fer chez l’homme, Faculté de Médecine – CHU 49000 Angers France.. Hématologie biologique. France. 10p.

**Zarrouki N. (2009).** Contribution à l'étude phytochimique de la plante *Tetraclinis articulata*, activité biologique et biochimique de la plante. Mémoire de magister en chimie organique. Université d'Oran. 46 p

**Zeghad N. (2009).** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de Magister en biotechnologie végétale. Université Mentouri-Constantine. 26.28. 84 p.

**Zerargui F. (2015).** Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis* L. et caractérisation des substances bioactives. Thèse de Doctorat en Biochimie. Université Farhet Abbes-Sétif 1-Algérie. 126 p.

**Zhang A, Zhou Q Y, Luk Y S, Fung K.P. et Chen K.Y. (1997).** Inhibitory effects of jasmine Green tea epicatechin isomers on free radical induced lysis of red blood cells. *Life sciences*. 61. 383 p.

**Zheng G., et Wang S.Y. (2001).** Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal agricultur food chemistry*. 49, 5165-5170.

**Zhiri A. (2006).** Les huiles essentielles: un pouvoir antimicrobien avéré. *Natural News*. Science, Nutrition, Prévention et Santé, Edité par la Fondation pour le libre choix, 12, p:8.

### **Site web**

<http://sante-medecine.journaldesfemmes.com/contents/805-phytotherapie-principes-et-precautions>

# *Annexes*

## Annexe 1

Phosphate buffer saline (PBS) est une solution isotonique et non toxique utilisée couramment en biochimie. Il s'agit d'un soluté physiologique contenant du chlorure de sodium, du phosphate disodique, du phosphate dipotassique et de chlorure de potassium.

Il est utilisé pour lavage ou dilution des cellules.

Pour la préparation de PBS à pH égale à 7.2 on a besoin de :

- 13.21g/l de la base  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .
- 20.29g/l de l'acide  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ .
- 80g/l de  $\text{NaCl}$ .
- 2g/l de  $\text{KCl}$ .

Dissoudre les composants dans 500ml de l'eau distillé, en agitant jusqu'il s'homogénéise à l'aide d'un agitateur et conservé à 4°C dans des fioles propre au réfrigérateur, jusqu'au moment de l'utilisation. Il ne faut pas congeler, surchauffés, conditionner dans des fioles présentant une fissure ...etc.

Pour faciliter la préparation, il y a des comprimés commerciaux de tampon PBS qui donne une solution PBS prête à l'emploi après leur dissolution dans une certaine quantité de l'eau.

Nom et prénom : ZERARI Mounia

Date de soutenance :  
07/07/2019

Master Académique en : Biochimie Appliquée

## Contribution à l'exploration phytochimique et l'évaluation *in vitro* des activités biologiques d'une plante médicinale locale «*Thapsiagarganica L* »

### Résumé

Dans le but de valoriser les plantes médicinales Algérienne, nous sommes intéressés dans cette étude d'une part, à la caractérisation qualitative et quantitative des extraits aqueux et méthanolique brut d'une plante médicinale de la pharmacopée traditionnelle récoltée de la région de Khenchela (*Thapsia garganica L*), et d'autre part, à la détermination des activités biologiques.

Le screening phytochimique réalisé a permis de mettre en évidence la présence des saponines, des tanins, des alcaloïdes des composés réducteurs et les flavonoïdes surtout de type flavones et flavonones. Ainsi, l'étude qualitative par CCM des extraits a révélé une diversité remarquable des composés flavonoïques susceptibles d'exprimer l'activité recherchée.

L'analyse quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes par le réactif du Folin-Ciocalciu et par la méthode du trichlorure d'aluminium respectivement, a dévoilé la richesse de l'extrait méthanolique par rapport à l'aqueux en polyphénols et flavonoïdes avec des teneurs égaux à  $57,72 \pm 6,69 \mu\text{g EAG/mg}$  et  $47,68 \pm 4,11 \mu\text{g EQ/mg}$  d'extrait.

L'activité antioxydante obtenue a été évaluée *in vitro* via deux méthodes: le test de piégeage de radical libre DPPH et la méthode de réduction du fer (FRAP): cependant, l'oxydation du DPPH est efficacement inhibée par l'EMB avec une IC50 égale à  $1,68 \text{mg/ml}$  suivi par l'EAq avec IC50 égale à  $2,1 \text{mg/ml}$ . Même ces résultats sont remarquables avec l'activité chélatrice du fer et le pouvoir réducteur qui ont été forts.

. L'activité antihémolytique et anticoagulante ont été avérées intéressantes pour les deux extraits notamment l'EMB.

Les activités biologiques obtenues ont été dépendantes et en bonne corrélation avec la teneur en polyphénols totaux et celle en flavonoïdes qui constituent des puissants agents antioxydants.

En conclusion; *Thapsia garganica L* est doué d'une activité antioxydante, antihémolytique et anticoagulante remarquables. De ce fait, il peut constituer une ressource naturelle à fin d'atténuer les complications du stress oxydant associé ou déclenchant des maladies cardiovasculaires.

**Mots clés:** Activité anticoagulante, Activité antihémolytique, Activité antioxydante, Flavonoïdes, *Thapsiagarganica L*.