



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABBES LAGHROUR - KHENCHELA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Master académique

FILIERE : Biologie

OPTION : Biochimie appliquée

Thème

*Investigation phytochimique et étude -in vitro- de
l'activité antioxydante des plantes médicinales de la
région de Khenchela
(Marrubium vulgare et Artemisia compestris)*

Présenté par

Belguidoum Nour el houda et Methezem Meriem

Jury de soutenance :

Présidente : M ^{me} chorfi Keltoum	(M.A.A) Univ.Abbès Laghrou-Khenchela
promotrice : M ^{me} Douaouya Lilia	(M.A.A) Univ.Abbès Laghrou-Khenchela
Examinatrice : M ^{me} Bohalit Samira	(M.A.A) Univ.Abbès Laghrou-Khenchela

Promotion :MAI 2016

Le travail à été réalisé au laboratoire de Bichimie à l'Université Abbès Laghrou
- Khenchela-

Table des matières

Dédicace.....	I
Remerciements	II
Résumés	III
Liste des abréviations	V
Liste des figures	IV
Liste des tableaux	VI
Introduction	01

Partie I. Synthèse bibliographique

Chapitre I . La phytothérapie et les substances naturelles

I. La phytothérapie.....	03
I. 1-Définition des plantes médicinales	03
I. 1.1- Définition médicale.....	03
I. 1.2-Définition chimique	03
I. 1.3-Définition biologique	03
I.2- Les substances naturelles des plantes et leur activité biologique	04
I.2.1-Les métabolites primaires	04
I.2.2-Les métabolites secondaires.....	05
I.2.2.1-Polyphénols.....	05
I.2.2.2-Les terpènes et stéroïdes	10
I.2.2.3-Alcaloïdes	11

Chapitre II. Les plantes médicinales sélectionnées

II.1- <i>Artemisa campestris</i>	12
II.1.1-Généralités	12
II.1.2-Description botanique.....	12
II.1.3-Systématique de la plante	13
II.1.4-Origine et distribution.....	13

II.1.5-Composition chimique.....	13
II.1.6-Utilisation traditionnelle	14
II.2- <i>Marrubium vulgare</i>	15
II.2.1-Généralités	15
II.2.2-Description botanique.....	15
II.2.3-Systématique de la plante	15
II.2.4- Localisation et répartition.....	16
II.2.5- Composition chimique.....	16
II.2.6- Utilisation traditionnelle	17
II.2.7- Toxicité.....	17

Chapitre III. Stress oxydatif et antioxydants

III. Stress oxydant.....	18
III.1-Historique	18
III.2-Généralités.....	18
III.3-Le stress Oxydant	19
III.4-Les radicaux libres	19
III.4.1-Source des radicaux libres.....	20
III.4.1.1-Production endogène	20
III.4.1.2-Production exogène	21
III.4.2-Rôles biologique des radicaux libres.....	22
III.5-Les marqueurs biologiques de stress oxydant.....	23
III .5.1-L'oxydation de l'ADN	23
III.5.2-L'oxydation des protéines	23
III.5.3-L'oxydation des lipides.....	23
III.6-Les antioxydants.....	24
III.6.1-Les antioxydants enzymatiques.....	24
III.6.2-Antioxydants non enzymatiques	25
III.6.3-Antioxydants d'origine végétale	25
III.6.4-Les antioxydants synthétiques.....	25
III.7-Alimentation et stress oxydant	26
III.8-Les maladies liées au stress oxydatif.....	27

Partie II. Partie expérimentale
Chapitre IV . Matériel et méthodes

IV.1-Matériel	28
IV.1.1- Matériel biologique	28
IV.1.1.1-Matériel végétal	28
IV.1.1.2- Réactifs chimiques et instrumentations.....	30
IV.2- Méthodes.....	30
IV.2.1- Préparation de l'extrait méthanolique	30
IV.2.2- Détermination du rendement d'extraction	31
IV.2.3-criblage phytochimique.....	31
IV.2.3.1- Recherche des tanins	31
IV.2.3.2- Recherche des saponosides	31
IV.2.3.3- Recherche des flavonoïdes	32
IV.2.3.4- Recherche des coumarines	32
IV.2.3.5- Recherche des composés réducteurs	32
IV.2.3.6- Recherche des alcaloïdes	32
IV.2.4- Etude qualitative	32
IV.2.4.1- Dosage des polyphénols.....	32
IV.2.4.1.1- Principe	32
IV.2.4.1.2- Expression des résultats	33
IV.2.4.2- Dosage des flavonoïdes.....	33
IV.2.4.2.1- Principe	33
IV.2.4.2.2- Expression des résultats.....	33
IV.2.5- Identification des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince (CCM)	34
IV.2.5.1- Protocole de CCM sur gel de silice.....	34
IV.2.6- Évaluation de l'activité anti-oxydante des différents extraits.....	35
IV.2.6.1- Test du piégeage du radical libre DPPH	35
IV.2.6.2-Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène.....	37
IV.2.7-Analyse statistique.....	37

Chapitre V . Résultats et Discussion

V.1- Détermination du rendement d'extraction.....	38
V.2- Résultats Criblage phytochimique	39
V.3- Résultats de l'analyse quantitative	41
V.3.1- Dosage des polyphénols totaux	41
V.3.2 Dosage des flavonoïdes-	42
V.4- Résultats de l'étude qualitative chromatographie sur couche mince	45
V.5-Résultats et discussion de l'activité anti-oxydante.....	53
V.5.1-Effet scavenger du radical DPPH.....	53
V.5.2-Activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène	60
Conclusion et perspectives	64
Références bibliographiques	
Annexe	

DEDICACE

*Je dédie ce travail A mes parents,
Pour vos mains qui ont tant travaillées,
Pour votre cœur qui m'a tant donné*

*Ama mère, mon Deuxième Souffle, qui m'a mis au monde, veillé sur
moi, et qui a su me transmettre ses valeurs et son chaleureux amour
durant toutes ces années qui m'a encouragé et qui a veillé à ce que je
réussisse à mes études, qui m'a permis de donner le meilleur de moi-même et me
surpasser. Je t'aime aujourd'hui plus qu'hier mais bien
moins que demain. Que Dieu te Garde pour nous.*

*A Mon très agréable père, qui s'est tant sacrifié pour moi, qui s'est
toujours donné du mal pour assurer mon bien être. J'espère que je suis
à la hauteur de ce qu'il attend de moi. Je t'aime papa.*

*A mon encadreur M^{me} DOUAOUYA Lilia pour leur son aide et sa très gentillesse
durant tout le long de notre étude .*

A mon cher et unique frère taki pour son aide précieuse

A mes agréables et aimables sœurs fairouz soria khaoula farida et souhila

A Paires sœurs : walid ,salah, abd alghani

A Les anges de ma vie manar, moataz, raied ,jawad et iyads

A ma proche et chère Amie et mon binôme Meriem

A mes chères amies, Hadjira ,Sara

*A mes agréables amies que j'ai vécu avec elles des beaux
moments au cours de mon cursus à lycée Khaldi mamoun walida ,samira ,bessma
,lamisse,lopi ,assia ,leila et hamada . et à l'université meriem ,wisseem, widad, hana
,hoyam rania, leila, marwa, mona,houda,manal*

à tous ceux Qui nous ont témoigné

A tous qui me connaisse de près ou de loin

Houda

Dédicace



Je dédie ce travail à ...

*Toute ma famille et particulièrement à mes parents que dieu lui prêtent
longue vie,
parents ;*

A ma très chère mère Djamila;

*Tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de
prier pour moi. Et Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver t'accorder
santé, longue vie et bonheur.*

A mon père Sadak ;

*Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon
éducation
et mon bien être. Ce travail est fruit de tes sacrifices qui tu as consentis
pour mon éducation et ma formation.*

A mon chère sœur Razika Dieu ait son âme

À mes hères sœurs Fouzia

A mes petits oiseaux Neïma et noussa

A mon frère wahab

*A mon binôme Nour El Houda qui a partagée avec moi les moments
difficiles de ce
travail et son famille.*

*A mes amais Loubna Assia Ahlem Wissem Amel Hakima Djamila Mouna
et Widad*

Sans oublier mes brave Amies de la promotion II de Biochimie

Meriem



REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH tout puissant de nous avoir donné la patience, la santé et pour nous avoir accordé la volonté et le courage pour élaborer ce travail. Car sans lui rien n'est possible.

Nous tenons à remercier vivement M^{me} DOUAOUYA Lilia maître assistante à l'université Abbes Laghrour-Khenchela, pour avoir encadré et dirigé ce travail avec la plus grande rigueur scientifique. Sa compréhension, son aide et sa très gentillesse durant tout le long de notre mémoire. Sa compétence et la qualité de ses conseils. Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre profonde gratitude tout en vous témoignant notre respect.

Nos vifs remerciements s'adressent aux membres de jury ; d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

M^{me} chorfi Keltoum un grand honneur d'être présidentet du jury de soutenance, et exprimer notre gratitude d'avoir apporté une attention particulière à ce travail

Un grand merci à M^{me} Bouhalit Samira qu'il trouve ici l'expression de profonde reconnaissance pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous adressons notre profond remerciement aussi à l'équipe du laboratoire pédagogique de Biochimie de l'institut de Biologie à l'université de khenchela surtout les ingénieurs Abd-Eennour , Bahia et Samia pour l'aide qu'ils nous ont donné et les efforts déployés pour faciliter notre travail.

Merci à toute la promotion 2^{ème} année Biochimie appliquée (2015-2016)

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

HOUDA ET MERIEM

Résumés

Résumé

Dans le cadre de la découverte de nouveaux antioxydants à partir des sources naturelles, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude des composés phénoliques et l'évaluation des propriétés antioxydants des extraits de deux plantes médicinales de la wilaya de Khenchela; *Marrubium vulgare* et *Artemisia campestris* qui sont encore utilisées dans la médecine traditionnelle.

L'étude phytochimique des extraits a révélée la présence des flavonoïdes susceptibles d'exprimer l'activité recherchée.

La première partie de cette étude concerne l'extraction et la quantification des phénols totaux, des flavonoïdes par le réactif du Folin-Ciocalcu, et par le trichlorure d'aluminium respectivement ; l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* a montré une richesse et une corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et celle en flavonoïdes avec des valeurs de $405.606 \pm 31.179 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait et $3.179 \pm 0.927 \mu\text{g EQ/ mg}$ d'extrait respectivement. Ces valeurs sont supérieures à celles de l'extrait méthanolique du *Marrubium vulgare* avec $208.102 \pm 20.299 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait et $3.046 \pm 0.457 \mu\text{g EQ/mg}$. L'étude qualitative par CCM des extraits des deux plantes à montré une diversité remarquable des composés flavonoïques.

La deuxième partie est l'étude *in vitro* de l'activité antioxydante des extraits de plantes en utilisant deux techniques: effet scavenger du radical libre DPPH et le piégeage de peroxyde d'hydrogène.

Par ailleurs, l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* a montré une très forte activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical DPPH que le *Marrubium vulgare* avec des IC50 $6.526 \mu\text{g/ml}$ et $7.53 \mu\text{g/ml}$ respectivement, par rapport à IC50 de l'acide ascorbique $4.498 \mu\text{g/ml}$, même ces résultats sont remarquée aussi avec le test de peroxyde d'hydrogène avec un pourcentage égal à 72.54% pour l'*Artemisia campestris* qui est supérieur à celui du *Marrubium vulgare* avec 40.32% pour une concentration à savoir 1mg/ml.

Mots clés : activité antioxydante, *Artemisia campestris*, flavonoïdes, *Marrubium vulgare*, polyphénols totaux.

Abstract

As part of the discovery of new antioxidants from natural sources, we were interested in this work to the study of phenolic compounds and evaluation of antioxidant properties of extracts of two medicinal plants of the Wilaya of Khenchela; *Marrubium vulgare* and *Artemisia campestris* which are still used in traditional medicine.

The study phytochemical extracts revealed the presence of flavonoids that can express the desired activity.

The first part of this study concerns the extraction and quantification of total phenols, flavonoids by the Folin-Ciocalciu reagent, and aluminum trichloride respectively; the methanol extract of *Artemisia campestris* showed richness and a correlation between levels of total polyphenols and flavonoids with $405,606 \pm 31,179 \mu\text{gEAG/mg}$ and $3,179 \pm 0,927 \mu\text{g EQ/mg}$ respectively. These values are higher than those of methanol extract of *Marrubium vulgare* with values of $208,102 \pm 20,299 \mu\text{g EAG/mg}$ and $3,046 \pm 0,457 \mu\text{g EQ/mg}$ respectively. The qualitative study by TLC showed remarkable diversity of flavonoid compounds.

The second part is the in vitro study of the antioxidant activity of plant extracts using two techniques: scavenger effect of free radical DPPH and trapping of hydrogen peroxide. Furthermore, *Artemisia campestris* extract showed a strong anti-radical activity vis-a-vis the DPPH radical as *Marrubium vulgare* with $\text{IC}_{50} 6.526 \mu\text{g} / \text{ml}$ and $7.53 \mu\text{g} / \text{ml}$ respectively, compared to IC_{50} ascorbic acid $4.498 \mu\text{g} / \text{ml}$, even these results are also noticed with hydrogen peroxide test with a percentage equal to 72.54% for *Artemisia campestris* which is greater than that of *Marrubium vulgare* with 40.32% at a concentration namely $1 \text{mg} / \text{ml}$.

Keywords: Antioxidant activity, *Artemisia campestris*, flavonoids, *Marrubium vulgare*, total polyphenols.

المخلص

في إطار اكتشاف مواد جديدة مضادة للأكسدة من المصادر الطبيعية، إهتمنا في هذا العمل بدراسة المركبات الفينولية وتقييم الخصائص المضادة للأكسدة لمستخلصات نبتتين طبيبتين في ولاية خنشلة *Artimisia campestris* اللتان تستخدمان في الطب التقليدي. قد كشفت تجارب الكيمياء النباتية عن تواجد الفلافونويدات التي تبرز النشاط المبحوث عليه.

يعتني الجزء الأول من هذه الدراسة باستخراج و تقييم كمية الفينولات الكلية، الفلافونويدات بواسطة Ciocaleu-Folin، ثلاثي كلوريد الألمونيوم على التوالي، مستخلص الميثانول *Artimisia campestris* عليها تظهر ثراء و وجود علاقة بين مستويات من إجمالي البوليفينول و الفلافونويد . حيث تتراوح القيمة ما بين 405,606±31,179 ميكرو غرام مكافئ حمض الغاليك/مغ مستخلص و 3,179± 0,927 ميكرو غرام مكافئ كارستين/مغ مستخلص. الدراسة النوعية باستعمال كروماتو غرافيا الطبقة الرقيقة مقتطفات من محطتين أظهرت تنوعا مدهشا من المركبات الفلافونويدية.

الجزء الثاني هو دراسة في المختبر من النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات النبات باستخدام طريقتين محاصرة الجذر DPPH، تثبيط ثاني أكسيد الهيدروجين وبالتالي المستخلص الميثانولي ل *Artimisia campestris* اظهر نشاط مضاد الاكسدة عالي مع محاصرة الجذر DPPH على عكس *Marrubium vulgare*, مع التركيز الممارس ل50% من الفعل المثبط ب 6,526 ميكرو غرام/مل و 7,53 ميكرو غرام/مل على التوالي. بالمقارنة مع التركيز الممارس ل 50% من الفعل المثبط لحمض الاسكوربيك 4,498 ميكرو غرام/مل. نفس هذه النتائج لوحظت مع تثبيط ثاني أكسيد الهيدروجين مع

نسبة مئوية 72.54 لـ *Artimisia campestris* التي تعتبر اعلى نسبة من *vulgare*

Marrubium بنسبة 40.32% للتركيز التالي 1مغ/مل

الكلمات المفتاحية : الفينولات الكلية ,النشاط المضادة للأكسدة, الفلافونويدات ,

,*Marrubium vulgare* , *Artimisia campestris*

Liste des abréviations

- ❖ **Abs:** Absorbance.
- ❖ **ADN:** Acide Désoxyribonucléique.
- ❖ **AHDP:** l'acide hexahydroxydiphénique.
- ❖ **AlCl₃:** Trichlorure d'aluminium.
- ❖ **AMM:** Autorisation de mise sur le marché.
- ❖ **AO:** Antioxydants.
- ❖ **BHA:** Butylhydroxyanisole.
- ❖ **BHT:** Butylhydroxytoluène.
- ❖ **BAW:** Butanol, Acide acétique, H₂O.
- ❖ **Cl:** Anion chlorure.
- ❖ **CCM:** Chromatographie sur couche mince.
- ❖ **Da :** dalton
- ❖ **DO:** Densité optique.
- ❖ **DPPH:** Diphenylpicryl-hydrazyl.
- ❖ **EOA:** Espèces oxygénées activées.
- ❖ **EQ:** Equivalent.
- ❖ **ERN:** Espèces réactives nitrogène.
- ❖ **ERO:** Espèces réactives d'oxygène.
- ❖ **FeCl₃:** Trichlorure de fer.
- ❖ **GSH:** Glutathion.
- ❖ **GSH-Px:** Glutathion peroxydase.
- ❖ **HCl:** Acide chlorique
- ❖ **HClO:** Myéloperoxydase.
- ❖ **H₂O₂:** peroxyde d'hydrogène
- ❖ **H₂SO₄:** Acide sulfurique.
- ❖ **I₂:** Diiode.
- ❖ **I%:** Inhibition des radicaux libres en pourcentages.
- ❖ **IC 50:** Concentration inhibitrice à 50 %
- ❖ **MeOH :** Méthanol.
- ❖ **mM:** Millimolaire
- ❖ **MPO:** Myéloperoxydase.
- ❖ **Na₂HPO₄:** hydrogène phosphate de sodium.

- ❖ **Na₂SO₃**: sulfite de sodium.
- ❖ **NADPH oxydase** : icotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase.
- ❖ **n-BuOH**: n- butanol.
- ❖ **ND**: Non déterminé.
- ❖ **NH₄OH**: Ammoniaque.
- ❖ **NO**: monoxyde d'azote.
- ❖ **NO₂**: dioxyde d'azote.
- ❖ **O₂⁻**:le radical superoxyde.
- ❖ **1O₂**:d'oxygène singulet.
- ❖ **PBS**: le tampon phosphate.
- ❖ **Pp**: Poids de la poudre en gramme
- ❖ **Ps**: Poids de l'extrait sec en gramme
- ❖ **Rf** :Rapport frontal.
- ❖ **RLO**: les radicaux libres de l'oxygène.
- ❖ **RO₂**: radicaux peroxydes.
- ❖ **ROS**: Production endogène.
- ❖ **Se-GPx**: glutathionperoxydase séléno-dépendante.
- ❖ **SOD**: le superoxyde dismutase.
- ❖ **TBHQ**: tétrabutylhydroquinone.
- ❖ **UV**: rayonnement ultraviolet.

Liste des figures

N° de figure	Titre	N° de page
N°01	Les principales familles de principes actifs utilisées en phytothérapie	04
N°02	Squelette de base des flavonoïdes	07
N°03	Formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et nitrogène (ERN)	20
N°04	Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène	22
N°05	Réactions enzymatiques de piégeage des espèces réactives oxygénées ERO	24
N°06	Aperçu des espèces oxygénées activées (EOA) dérivant de l'oxygène et systèmes de protection permettant de limiter l'effet toxique de ces espèces	27
N°07	Photo du Rotavapor utilisé pour sécher nos extraits méthanoliques	30
N°08	Forme libre réduite du DPPH	35
N°09	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois mesures)	41
N°10	Teneur en polyphénol totaux (mgEG/gE) dans les extraits méthanolique d' <i>Artemisia campestris</i> et de <i>Marrubium vulgare</i>	42
N°11	Courbe d'étalonnage de la quercétine (moyenne \pm SD de trois mesures)	43
N°12	Teneur en flavonoïdes totaux (mgEQ/gE) dans les extraits méthanolique d' <i>Artemisia campestris</i> et de <i>Marrubium vulgare</i>	43
N°13	courbe représente la Corrélation entre la teneur en flavonoïdes , polyphénols de l'extrait méthanolique du <i>Marrubium vulgare</i>	44
N°14	courbe représente la Corrélation entre la teneur en flavonoïde, polyphénols de l'extrait méthanolique d' <i>Artemisia campestris</i>	45

N°15	photos des chromatogrammes résultant de l'analyse de l'extrait méthanolique de <i>Marrubium vulgare</i> par chromatographie sur gel silice (révélation à UV 365 nm) par les systèmes solvants	46
N°16	photos des chromatogrammes résultant de l'analyse de l'extrait méthanolique <i>Artemisia campestris</i> par chromatographie sur gel silice (révélation à UV 365 nm) par les systèmes solvants	49
N°17	Activité antiradicalaire du test de DPPH de l'extrait méthanolique du <i>Marrubium vulgare</i>	55
N° 18	Activité antiradicalaire du test de DPPH de l'extrait méthanolique d' <i>Artemisia campestris</i>	55
N°19	Activité antiradicalaire du test de DPPH de l'acide ascorbique	56
N°20	Les concentrations des extraits méthanolique du <i>Marrubium vulgare</i> , <i>Artemisia campestris</i> et de l'acide asorbique inhibent 50 % du radical DPPH°	57
N°21	courbe représente La corrélation entre la teneur en polyphénols et le pourcentage d'inhibition de radical DPPH pour <i>Artemisia campestris</i>	59
N°22	courbe représente La corrélation entre la teneur en polyphénols et le pourcentage d'inhibition de radical DPPH pour <i>Marrubium vulgare</i>	59
N°23	Histogramme des pourcentages de piégeage du peroxyde d'hydrogène pour l'extrait méthanolique d' <i>Artemisia campestris</i>	61
N°24	Histogramme des pourcentages de piégeage de peroxyde d'hydrogène pour l'extrait méthanolique de <i>Marrubium vulgare</i>	62
N°25	Courbes représentent la corrélation entre la teneur en polyphénols , flavonoïdes et le pourcentage d'inhibition du test de peroxyde d'hydrogène pour <i>Artemisia campestris</i>	63

N°26	Courbes représentent la corrélation entre la teneur en polyphénols , flavonoïdes et le pourcentage d'inhibition de test de peroxyde d'hydrogène pour <i>Marrubium vulgare</i>	63
-------------	---	----

Liste des photos

N° de photo	Titre	N° de page
N°01	Vue générale de la plante d' <i>Artemisia campestris</i> prise à partir du site d'étude	29
N°02	Vue générale de la plante de <i>Marrubium vulgare</i> prise à partir du site d'étude.	29

Liste des tableaux

N° de Tableau	Titre	N° de page
N°01	Structure des squelettes des polyphénols	06
N°02	Le rendement des extraits méthanoliques d' <i>Artemisia campestris</i> et <i>Marrubium vulgare</i>	38
N°03	Résultats des tests phytochimiques des composés constituant de l'extrait méthanolique de <i>Marrubium vulgare</i>	39
N°04	Résultats des tests phytochimiques des composés constituant de l'extrait méthanoliques d' <i>Artemisia Campestris</i>	40
N°05	CCM de la fraction méthanolique du <i>Marrubium vulgare</i> Système solvant : BAW : Butanol, Acide acétique, H ₂ O (4 :1 :5)	47
N°06	CCM de la fraction méthanolique du <i>Marrubium vulgare</i> Système solvant : Chloroforme, Méthanol, H ₂ O (85 : 10 : 5)	47
N°07	CCM de la fraction méthanolique du <i>Marrubium vulgare</i> Système solvant : Acétone, H ₂ O (1 :1)	48
N°08	CCM de la fraction méthanolique d' <i>Artemisia campestris</i> Système solvant : BAW : Butanol, Acide acétique, H ₂ O (4 :1 :5)	50
N°09	CCM de la fraction méthanolique d' <i>Artemisia campestris</i> Système solvant : Chloroforme, Méthanol, H ₂ O (85 : 10 : 5)	51
N°10	CCM de la fraction méthanolique d' <i>Artemisia campestris</i> Système solvant : Acétone, H ₂ O (1 :1)	52
N°11	Pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante de test de DPPH de l'extrait méthanolique de <i>Marrubium vulgare</i>	53
N°12	Pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante de test de DPPH de l'extrait méthanolique d' <i>Artemisia campestris</i>	54
N°13	Pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante de test de DPPH de l'acida ascorbique	54

N°14	Les IC50 des extraits méthanolique des deux plantes et l'acide ascorbique	56
N°15	Pourcentage d'inhibition de l'activité antiradicalaire de test peroxyde d'hydrogène de l'extrait méthanolique du <i>Marrubi vulgare</i> .	60
N°16	Pourcentage d'inhibition de l'activité antiradicalaire de test de peroxyde d'hydrogène de l'extrait méthanolique d' <i>Artimisia campestris</i> .	61

Introduction

Introduction

La médecine par les plantes est l'une des plus vieilles médecines du monde. Elle représente une alternative intéressante pour traiter et soigner sans créer de nouvelles maladies. Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité, pour soulager et guérir les maladies humaines. Actuellement, le développement de la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse. De nombreuses études ont mis en évidence la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés: les métabolites secondaires ; ces composés possèdent des activités biologiques diverses, notamment ceux de l'activité antioxydante envers les radicaux libres. Ceci, vient du fait que le stress oxydant est impliqué dans un grand nombre de maladies humaines et que l'idée derrière l'utilisation de plusieurs recettes traditionnelles est non seulement le traitement des maladies, mais encore leur prévention face au vieillissement. Actuellement, la société scientifique, biologiste et chimiste, met en évidence le rôle tragique du processus oxydatif incontrôlable induit par les espèces réactives oxygénées (ERO). Ces oxydants sont à l'origine directe de différents états pathologiques tels que le vieillissement et le cancer et indirecte sur la peroxydation des lipides des denrées alimentaires. En appuyant sur cette vision, un renouveau de la phytothérapie vers cette vague verte qui produit une foule des antioxydants à fin de contrer et piéger ces oxydants [1].

Les composés antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt dans le traitement de certaines pathologies, ils sont aussi utilisés pour la conservation des denrées comestibles pour l'industrie agroalimentaire (par exemple empêcher l'oxydation des lipides) [2]. Les antioxydants sont des molécules capables d'interagir sans danger avec les radicaux libres et de mettre fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées. Chaque molécule antioxydante ne peut réagir qu'avec un seul radical libre et par conséquent, il faut constamment refaire le plein de ressources antioxydants [3].

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antioxydants, les polyphénols et surtout les flavonoïdes sont des antioxydants puissants susceptibles d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules [1].

L'Algérie, pays connu par ces ressources naturelles, dispose d'une flore singulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques [4] Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve De nombreuses espèces sont utilisées en médecine traditionnelle parce qu'elles renferment plusieurs molécules douées d'activités thérapeutiques, parmi les espèces les plus connues se trouve *Artemisia campestris* et *Marrubium vulgare* qui sont largement utilisée pour traiter les troubles digestives, les ulcères, les brûlures, la diarrhée,...etc. et ont constitué le sujet de plusieurs études qui font déterminé leurs compositions chimiques [5][6][7][8], ainsi que les propriétés biologiques [9][10].

Le présent travail est une contribution dans la valorisation des principes actifs contenus dans la flore algérienne peu connue jusqu'à présent et pour atteindre ces objectifs, nous avons jugé utile de structurer le manuscrit comme suite: outre l'introduction et la conclusion générale, il est structuré en deux parties :

La première partie est une synthèse bibliographique dans laquelle sont abordés trois chapitres ; le premier aborde une étude préalable réalisée sur la phytothérapie et les métabolites secondaires, le second décrit les plantes médicinales choisies et le troisième chapitre présente les oxydants et les antioxydants.

La deuxième partie est expérimentale dans laquelle sont parvenus deux chapitres; le premier présente le matériel et les méthodes analytiques utilisées pour l'extraction, le screening phytochimique, l'identification par CCM, étude des teneurs en polyphénols ainsi qu'en flavonoïdes et l'évaluation *in vitro* du pouvoir anti-oxydant des extraits hydroalcooliques des plantes *Marrubium vulgare* et *Artemisia campestris* par deux techniques à savoir le piégeage du radical libre DPPH et le piégeage du peroxyde d'hydrogène, et enfin le deuxième chapitre expose les résultats obtenus suivis de la discussion.

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre I

La phytothérapie et les substances naturelles

I. La phytothérapie

La phytothérapie, du grec phyton qui veut dire plante therapeia qui signifie traitement, étudier l'utilisation des plantes médicinales en médecine [11].

La phytothérapie, [12], est le traitement par les plantes; c'est-à-dire par la consommation ou l'utilisation de produits préparés à partir des plantes sans passer par une étape de sélection de molécules, on ne consomme donc pas que le principe actif mais tout ce que contient la plante. Par ailleurs la phytothérapie requiert une connaissance parfaite de Substances chimiques contenues dans un organe végétal et une bonne connaissance de mode d'emploi.

Aussi une pratique basée sur les avancées scientifiques qui recherche des extraits actifs des plantes. Les extraits actifs identifiés sont standardisés. Cette pratique conduit aux phytomédicaments et selon la réglementation en vigueur dans le pays, la circulation des phytomédicaments est soumise à l'autorisation de mise sur le marché (AMM). On parle alors de Pharmacognosie ou de biologie pharmaceutique [13].

I.1- Définition des plantes médicinales

I.1.1-Définition médicale

Ce sont des plantes inscrites à la pharmacopée, et qui sont considérées comme des médicaments, leur vente est exclusivement réservée aux pharmaciens, et aux herboristes; à l'exception de 34 d'entre elles qui sont en vente libre par dérogation qu'est correspondre souvent aux plantes aromatiques utilisées dans la préparation culinaires ex : antiseptique, antigrippale... etc [14].

I.1.2-Définition chimique

Les plantes médicinales sont des plantes possédant des molécules à l'intérieur de leur organe (feuille, fleurs...etc.) et pouvant selon des techniques chimiques (extraction, distillation...) permettre à l'isolation des principes éléments actifs (huiles, alcool...) pour des buts thérapeutiques [15].

I.1.3-Définition biologique

Les plantes médicinales ce sont des végétaux connus pour leurs pouvoirs bienfaiteurs ; dont l'un de ces organes comme l'écorce, fruits... etc. possédants des vertus curatives [16].

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

Les produits naturels des plantes peuvent être classés en deux catégories, les métabolites Primaires et les métabolites secondaires :

I.2.1- 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 carbones, 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 [17].

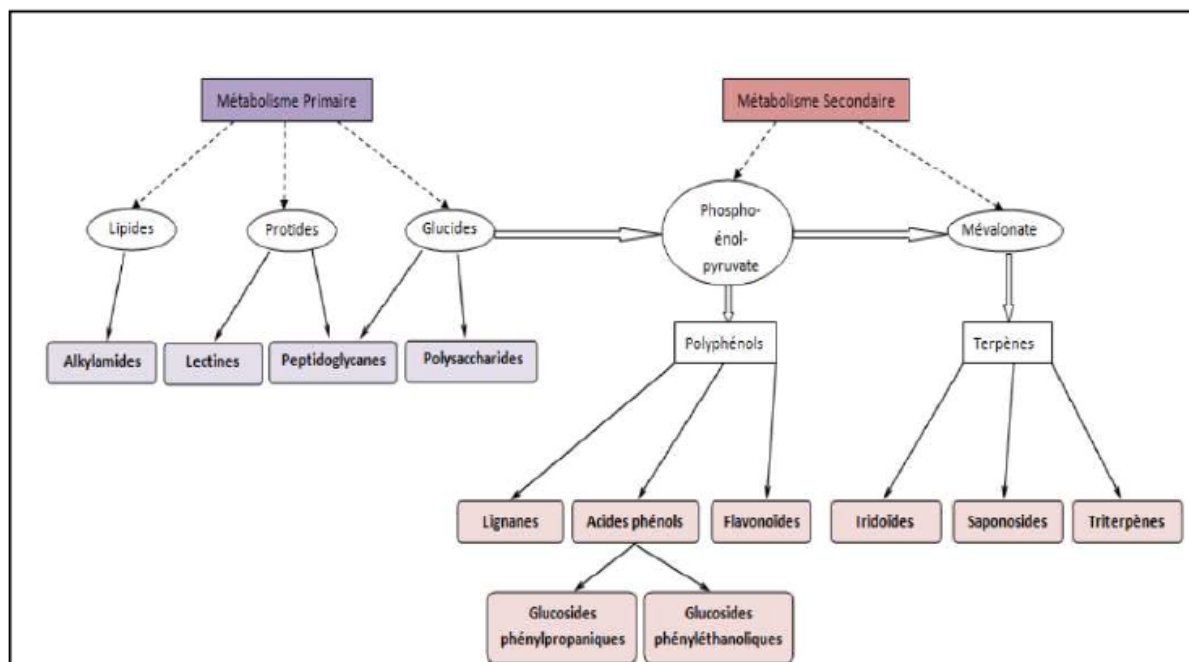


Figure 1: Les principales familles de principes actifs utilisées en phytothérapie [12].

Certains Principes actifs sont des métabolites primaires, d'autres sont des métabolites secondaires.

I.2.2- Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles : Les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes [18][19].

I.2.2.1- Polyphénols

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc [12][20].

En effet, les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus [20]. Les principales classes de composants phénoliques sont: les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines [21]. Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits [22].


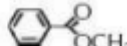

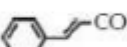
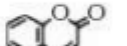




I.2.2.1.1-Biosynthèse

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, tous dérivant de la l'acide shikimique. Cette voie shikimate conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïques, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines [23].

I.2.2.1.2-Classes des polyphénols

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (**Tableau 1**). Ces molécules sont généralement trouvés conjuguées aux sucres et les acides organiques.

Tableau 1 : Structure des squelettes des polyphénols [24].

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

I.2.2.1.2.1-Flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols [25], ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides [12][26].

Du point de vue structurale, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, en effet plus de 6400 structures ont été identifiées [27].

I.2.2.1.2.1.1-Structure et classification

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo-y-pyranne [28]. Leur structure de base est celle d'un diphényl propane à 15 atomes de carbone (C₆-C₃-C₆), constitué de deux noyaux aromatiques qui désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C [29].

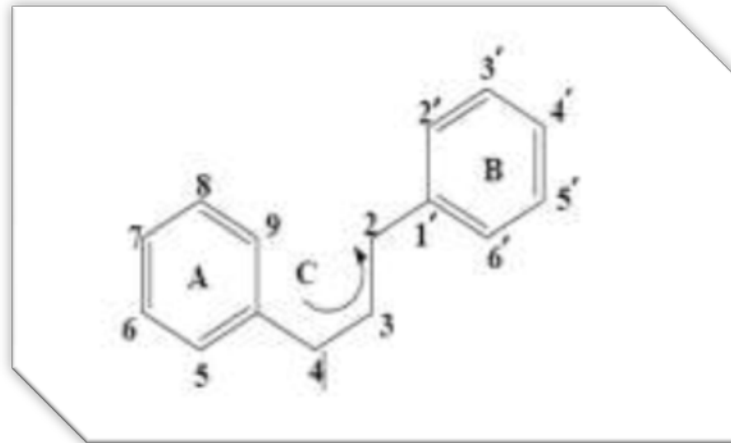


Figure 2 : Squelette de base des flavonoïdes [30].

De façon générale les flavonoïdes se trouvent soit à l'état libre, dans ce cas ils sont dits aglycones, soit sous forme de C- ou O-glycosides, et dans ce cas ils sont liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose, ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères [29].

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont: flavones, isoflavandiols, flavanols, flavondiols, aurones, chalcones, anthocyanins [31].

I.2.2.1.2.1.2-Localisation et distribution

Les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal, ils sont distribués dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs des plantes [32]. Les formes hétérosidiques des flavonoïdes, s'accumulent dans les vacuoles et selon les espèces, elles se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle. Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques [12].

I.2.2.1.2.1.3-Intérêts et effets biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines, bois... [12][33]. Certains flavonoïdes sont plus spécifiques de certains tissus. Les anthocyanes sont plutôt localisés dans les parties externes des fruits, fleurs et feuilles [34]. Les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs. Ce sont des pigments naturels au même titre que les chlorophylles (couleur verte) et les caroténoïdes (nuances jaunes et orangées). Leur fonction principale est la pigmentation des plantes (aspect esthétique). Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration par leur rôle de Co-pigments (certaines flavones et flavonols) [12][34]. Les flavonoïdes, en particulier les anthocyanes, sont les seules molécules du règne végétal capables de produire une vaste gamme de couleurs, susceptibles de donner des teintes allant du jaune-orangé au bleu, en passant par le pourpre et le rouge [34][35]. Les flavones, aurones et chalcones donnent plutôt des couleurs jaune, beiges voire blanche, ou participent aux nuances produites par les anthocyanes et les caroténoïdes [12][33]. Un des rôles de la couleur chez les plantes est d'attirer les insectes et les oiseaux, qui jouent un rôle majeur dans la pollinisation et la dispersion assurant ainsi la reproduction de l'espèce [33][36]. Les flavonoïdes, dissous dans les vacuoles à l'état d'hétérosides, s'accumulent dans les cellules épidermiques, assurant la protection des tissus contre les rayonnements solaires nocifs[24][[33] 37]. On prête à certains flavonoïdes [37].

I.2.2.1.2.2-Les tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau, cette aptitude est lié à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da [38].

I.2.2.1.2.2.1-Localisation et distribution

Les tanins sont très répandu dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les Fagacée, les rosacée [39]. Ils peuvent exister dans divers organes : l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines [40].

I.2.2.1.2.2.2-Structure chimique et classification

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

I.2.2.1.2.2.2.1-Tanins hydrolysables

Ce sont des oligo ou des polyesters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable d'acide phénolique. Le sucre est très généralement le glucose. L'acide phénolique est soit l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, soit l'acidehexydroxydiphénique (AHDP) et ses dérivés dans le cas des tanins éllagiques [12].

- Tanins galliques (Gallo tanins) : Ils donnent par l'hydrolyse des oses et de l'acide gallique.
- Tanins ellagiques (Ellagitanins) : Ils sont scindés par les enzymes en oses et en acide ellagique [38].
- Tanins condensés : Les tanins condensés sont des polymères flavanolique constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatechine et catéchine [40]. Les tanins condensés sont des molécules hydrolysables, leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre [38].

I.2.2.1.2.2.2.2-Tanins condensés (proanthocyanidines)

Ce sont des polymères ou oligomères flavanique, constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatechine et catéchine, avec un degré de polymérisation entre deux et plus de 50 unités [40]. Ces unités liées entre elles par une seule liaison carbone-carbone C4-C8 ou C4-C dans le type B des pro-anthocyanidines ; ou par une liaison interflavanique double (C4-C68 ou C4-C6) et (C2-O-C) dans le type A [12][41][42].

I.2.2.1.2.3-Les Coumarines

Elles sont issues du métabolisme de la phénylalanine via un acide cinnamique, l'acideP-coumarique.

Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et les solvants organiques tels que l'éther ou les solvants chlorés dans lesquels ils sont extractibles. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau. Elles ont un spectre UV caractéristique, fortement influencé par la nature et la position des substituant. En lumière ultra-violette, les CCM présentent destâches dont la coloration varie du bleu au pourpre en passant par le jaune.

Les coumarines sont cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes,

vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du cœur), hypotensives ; elles sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées.

L'odeur de foin fraîchement coupé de la coumarine est très utilisée en parfumerie. Elle est aussi utilisée dans les produits cosmétiques [13].

I.2.2.1.3-Effets biologiques des polyphénols

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques interviennent dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques [43]. Ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux [44], anti-allergènes, vasodilatateurs [45] et antioxydants [46]. Les composés polyphénoliques sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique.

Ils sont regroupés dans la catégorie des veinotoniques et des vasculoprotecteurs. Parmi les veinotoniques, nous citerons le Relvenet ou le Cirkant renfermant du ruténoside, le Daflont ou le Diosmilt renfermant de la diosmine. Un certain nombre de molécules polyphénoliques sont également en étude clinique comme des antiagrégants plaquettaire, ou hypotenseur sans résultats probants [47].

I.2.2.2-Les terpènes et stéroïdes

Les terpénoïdes sont une vaste famille de composés naturels près de 15000 de molécules différentes et de caractère généralement lipophiles, leurs grandes diversités due au nombre de base qui constituent la chaîne principale de formule $(C_5H_8)_n$ selon la variation de nombre n , dont les composés monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes, [48]. Ces molécules présentent en forme des huiles essentielles ; parfums et goût des plants, pigments (carotène), hormones (acide abscissique), des stérols (cholestérol) [49].

Les stéroïdes sont des triterpènes tétracycliques, possèdent moins de 30 atomes de carbone, synthétisés à partir d'un triterpène acyclique [49].

Chez toutes les plantes on trouve ces composés liés avec un groupement alcool qu'ils nommés les stérols; prenant une forme plane, glycosylée, analogues du cholestérol

qui ne diffèrent de celui-ci que par leur chaîne latérale comme : B-Sitostérol, Stigmastérol [49].

I.2.2.3-Alcaloïdes

Les alcaloïdes figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine [50]. Ce sont des substances organiques azotées, à propriétés basiques ou amers et ayant des propriétés thérapeutiques ou toxiques [51]. Ils ont des structures très diverses et dérivent de différents acides aminés ou de l'acide mévalonique en passant par différentes voies biosynthétiques [52]. De nombreux poisons dangereux comme l'atropine par exemple, sont extraite de la belladone mortellement toxique (*Atropa belladonna*) et qui peut cependant être utilisée à faible dose dans une optique thérapeutique.

Les alcaloïdes sont utilisées comme anti cancer, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) [53].

I.2.2.3.1-Nature et présence des alcaloïdes

La source principale des alcaloïdes était auparavant les plantes florales mais plusieurs composés de cette famille ont été récemment extraient des règnes animaux à savoir les insectes et les poissons. Malgré cet avancement, les alcaloïdes floraux restent les plus importantes par rapport aux restes [23][54].

En général les alcaloïdes ne se concentrent pas dans une seule partie de la plante. Ils se présentent avec des concentrations différentes dans les tiges, les fleurs, les racines et les feuilles. Cette même concentration se diffère selon la période de récolte.

Signalons que la présence des alcaloïdes dans une partie de la plantes ne prouve en aucun cas sa naissance dans ce milieu.. La présence des alcaloïdes est généralement associée à un acide organique ou à une autre entité avec un pourcentage variant entre 1 et 3 % du poids sec de la plante. Dans des cas très particuliers, notamment dans les quinquinas, ils dépassent les 10 %[12][55].

Chapitre II

Les plantes médicinales sélectionnées

II. Les plantes médicinales sélectionnées

Les plantes étudiées ont été choisies en fonction de leurs emplois très fréquents en Algérie.

II.1- *Artemisia campestris*

II.1.1-Généralités

Le genre *Artemisia* appartient à la famille des *Astéracées* : c'est l'un des genres le plus répandu et le plus étudié de cette famille; il contient un nombre variable d'espèces allant jusqu'à 400 espèces [56]. Il a été rapporté que le genre *Artemisia* est riche en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les acides cafféoylquinic, les coumarines, les huiles essentielles, les stérols et les acétylènes [57].

Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia* possèdent des propriétés thérapeutiques, elles sont non seulement utilisées dans la médecine traditionnelle, mais aussi dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique [58].

II.1.2-Description botanique

Artemisia campestris est un arbuste aromatique à tiges robustes, d'une hauteur de 30 à 80 cm. cette plante possède des capitules très petits, étroits (1 à 1,5 mm) ovoïdes ou coniques, à involucre scarieux, ne contient que 3 à 8 fleurs de couleur jaunâtre bordées de rouge, et à pédoncule muni de poils blanchâtres à brunâtre. Les feuilles d'*Artemisia campestris* sont glabres de couleur verte foncée, les inférieures dipinnatiséquées, les supérieures pinnatiséquées, les basales pétiolées et auriculées, les tiges sont ligneuses à la base striée [59][60][61].

II.1.3- Systématique de la plante

Selon Caratini [62], la plante *Artemisia campestris* est classée dans :

Règne: *Plantae*

Sous règne: *Tracheobionta*

Embranchement: *Spermatophyta*

Sous embranchement: *Magnoliophyta*

Classe: *Magnoliopsida*

Sous classe: *Asteridae*

Ordre: *Asterales*

Famille: *Asteraceae*

Sous famille: *Asteroideae*

Tribu: *Anthemideae*

Sous Tribu: *Artemisiinae*

Genre: *Artemisia*

Espèce: *Artemisia campestris* L.

II.1.4- Origine et distribution

Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia* sont des arbustes aromatiques, qui poussent de façon spontanée dans plusieurs régions de l'hémisphère nord de la terre, surtout dans les zones semi arides et le bassin méditerranéen, et s'étendent jusqu'à l'Himalaya [63], dans l'hémisphère sud elles sont trouvées en Afrique du sud, l'Australie et l'Amérique du sud, d'après, [64], *Artemisia campestris* est originaire de l'Asie.

III. 1 .5-Composition chimique

De nombreuses études chimiques ont révélé que la partie aérienne d'*Artemisia campestris* est riche en métabolites secondaires tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les huiles essentielles [65][66].

La composition chimique de l'huile essentielle varie selon le chimiotype considéré [12], elle varie également selon les conditions géographiques et climatiques (température, altitude, précipitation, hauteur, direction du vent, heures de soleil, etc.), et selon la phase de développement de la plante [67].

Plusieurs études [8][66] ont rapporté la composition des huiles essentielles d'*Artemisia campestris*, l'huile essentielle est analysée par la chromatographie en phase gazeuse

couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS), [66] ont identifié dans une espèce de Camargue (Marseille, France) 51 composés et caractérisés, les plus abondants sont : γ -terpinène, capillène, 1-phenyl-2,4-pentadiyne, spathulenol, méthyleugenol, p-cymène et β -pinène.

D'après Akrouit [8], les constituants les plus abondants d'une espèce de Tunisie sont : β -pinène (24, 2-27,9 %), p-cymène (17.4-22.3%) et α -pinène (4.1-11.0%), ces constituants représentent plus de 45 % de l'huile totale.

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

Les flavonoïdes identifiés chez *Artemisia campestris* sont: flavone (apéginie), flavonol (kaempférol 7-méthyle), flavanone (naringénine), dihydroflavonols (taxifoline-7-méthyle)

[68]. Les feuilles d'*Artemisia campestris* contiennent aussi des alcaloïdes, des saponines [69].

II.1.6- Utilisation traditionnelle

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

En usage local *Artemisia campestris* est utilisée pour traiter les troubles digestives, les ulcères et les douleurs menstruelles [70]. Elle est également utilisée dans le traitement de diabète [71].

La partie aérienne est utilisée dans le traitement de brûlures, de la diarrhée, les morsures de serpents, les piqûres de scorpions, l'eczéma, la gastroentérite, la dysenterie, le rhumatisme, elle est utilisée également pour traiter les infections urinaires, la fièvre et la toux [72].

Selon Saoudi [73] ,la consommation journalière d'une décoction préparée à partir des tiges et feuille.

II.2- *Marrubium vulgare*

II.2.1- Généralités

Le genre *Marrubium* appartient à la famille des *lamiacées*, comprenant plus de 30 espèces différentes largement distribués dans les régions d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie [74].

Le genre *Marrubium* comporte quelque 40 espèces, répandues principalement le long de la méditerranée, les zones tempérées du continent eurasien et quelques pays d'Amérique Latine [75][76].

II.2.2- Description botanique

Le Marrube vulgaire [synonyme: *Marrubium album* (Cariot et Saintlorge)] est une plante, d'aspect blanchâtre à odeur forte et désagréable, de 30 à 80cm de hauteur. Ses fleurs blanches, relativement petites, apparaissent du mois de Mai jusqu'au mois de Septembre, et parfois encore en hiver. Les feuilles ont toutes un pétiole [77][78].

Les feuilles sont ovales, arrondies, souvent un peu cordées à la base, feutrées à la face intérieure [61].

Toute la plante dégage une odeur forte, sa saveur est âcre (qui irrite les organes du goût et de l'odorat) et amère [79].

II.2.3- La systématique de la plante

Selon Judd [80], la position systématique de l'espèce *Marrubium vulgare* est :

Régne : *Plantae*

Sous règne : *Tracheobiontes*

Embranchement : *Spermatophytes*

Division : *Magnoliophytes*

Classe : *Magnolipsides*

Sous classe : *Asteridae*

Ordre : *Lamiales*

Famille : *lamiaceae*

Genre : *Marrubium*

Espèce : *Marrubium vulgare*

Nom binomial: *Marrubium vulgare*

Nom vernaculaire algérien: *Meriwet*

Nom vernaculaire français: *Marrube blanc*

Les noms donnés à la plante sont les suivants : en Algérie est connue par le nom Marriouth [81], Merrîwt au Maroc [82], Marroubia en Tunisie [78] En Anglais : Harehound, en Italien : Marrubio. Selon [83], le *Marrube* est composé de deux mots hébreux : mar, rob, suc amer.

II.2.4- Localisation et répartition

Elle pousse dans toute l'Afrique du Nord, au centre et au Sud-ouest de l'Asie et aux Canaries. Elle est naturalisée dans l'Amérique du Nord et dans l'Amérique du Sud [83]. Cette plante est commune dans toute l'Algérie et presque dans toute l'Europe en dehors de l'extrême Nord, Australie et New Zélande [84].

Elle se trouve aussi au Maroc et en Tunisie, surtout en région méditerranéenne [77]. Répandues principalement le long de la méditerranée, les zones tempérées du continent eurasiatique et quelques pays d'Amérique Latine [75][76].

II.2.5- Composition chimique

La partie aérienne du *Marrube blanc* contient plusieurs métabolites secondaires tels que les diterpènes dont la marrubine responsable de la majorité des propriétés biologiques du *Marrubium vulgare*) [85], les flavonoïdes (apigénine et lutéoline) [86], ainsi que plusieurs phénylpropanoïdes esters tels que les verbascosides) [87].

On y trouve des diterpènes amers de la série des furanolabdanes et surtout des composés de lactones : marrubiine principalement et son précurseur préfuranique, la prémarrubiine, mais aussi du pérégrinol, du vulgarol, du marrubénol et du marrubiol. Il y a également des Hétérosides flavoniques du quercétol, de la lurtéoline ou de l'apigénine, mais aussi des lactoylflavones, et quelques dérivés de l'acide ursolique. En outre il y a des

tanins spécifiques des *Lamiacées* et dérivés de l'acide hydroxycinnamique (juste à 7%) (Acide chlorogénique, caféique, caféylquinique, mais absence d'acide rosmarinique). Toutefois la présence d'une faible quantité d'huiles essentielles comportant différents composés monoterpéniques (moins de 1% : α -pinène, camphène, limonène) [88].

II.2.6- Utilisation traditionnelle

Marrubium vulgare est largement utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement des troubles digestifs, la perte de l'appétit et la dyspepsie [89]. Elle est également employée comme antinocicepti [90], antihypertenseur [91], antispasmodique [92], antioedematogénique [93], analgésique [76], insecticide [94], anti-inflammatoire [95], antimicrobien [75][96][97], antioxydant [98], antifongique [99], antileucémique [100] et dans de nombreuses autres activités biologiques.

Le *Marrube vulgare* est une prescrit dans le traitement des difficultés respiratoires, des bronchites, des bronchectasies, des bronchites asthmatiformes des toux sèches et de la coqueluche. Il fluidifie les mucosités. La décoction est employée comme antidiabétique [82].

Le *Marrubium vulgare* est indiqué pour les dermatoses, eczéma chronique, hystérie [101].

II.2.7- Toxicité

C'est une plante amère à caractère salin et ne peut donc pas être toléré s'il ya une gastroentérite ou des situations de nausées ou de vomissements ou encore en cas de dyspepsie [79].

Chapitre III
Stress oxydatif et
antioxydants

III. Stress oxydatif et antioxydants

III.1- Historique

Les radicaux libres, espèces réactives d'oxygène (ERO), le stress oxydant et les antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public. Ces notions ne sont toute fois pas nouvelles puisqu'il faut rappeler que dans le milieu des années 50, **R. Gerschman** puis **D. Hartman** évoquaient déjà la toxicité de l'oxygène et la « free radical theory » pour expliquer le processus du vieillissement. En **1969**, les Américains **Mc Cord** et **Fridovich** isolent à partir de globules rouges humains un système enzymatique antioxydant la SOD, démontrant ainsi pour la première fois que notre organisme produit bel et bien des ERO dont il doit se protéger. Cette découverte sera le point de départ d'une intense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants [102]. Il existe de nos jours un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire [103].

III.2-Généralités

L'oxygène (O₂) est indispensable à la plupart des espèces vivantes, fournit un énorme pouvoir métabolique pour la production d'énergie. Cependant, en raison de sa conformation chimique, la molécule d'O₂ peut, dans certaines circonstances, s'avérer toxique. Cette toxicité est induite des éléments réactifs, instables et pro-oxydants : les radicaux libres de l'oxygène (RLO) ou espèces réactives de l'oxygène (ERO). Dérivés pour la plupart de l'O₂' et produits par divers mécanismes physiologiques; ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable.

Inopportunément, ils peuvent induire des dommages oxydatifs souvent irréversibles au niveau d'un grand nombre de substrats biologiques. Afin que les ERO n'exercent pas de façon incontrôlée leurs effets délétères, l'organisme dispose d'un vaste réseau de défense constitué par les Antioxydants (AO). Dans les circonstances quotidiennes normales, des ERO sont produits en permanence en faible quantité, et cette production physiologique est

parfaitement maîtrisée par les AO qui sont produits d'ailleurs en fonction des radicaux générés. La balance oxydants/antioxydants est alors en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en AO ou par suite d'une surproduction d'ERO, le déséquilibre observé correspond au "stress oxydatif [104].

III.3-Le stress Oxydant

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les processus biochimiques de production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et ceux qui sont responsables de leur contrôle et élimination [105][106][107][108]. Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation des oxydants ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants [109]. L'équilibre ou homéostasie redox est perturbé et les cellules deviennent vulnérables aux attaques par les ERO [110].

III.4-Les radicaux libres

Par définition, un radical libre est défini comme toute molécule ou atome possédant un ou plusieurs électrons non appariés, capables d'exister sous forme indépendante, contenant au moins un électron libre sur sa couche externe (ou contenant deux électrons de même spin dans une case quantique). Cela qui augmente considérablement sa réactivité par nécessité de se combiner avec un autre électron pour atteindre la stabilité selon un phénomène d'oxydation [110][111], Sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes voir quelques nanosecondes) et il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situe (exemple : $\cdot\text{OH}$) [105][110] [112]. Les principales espèces réactives de l'oxygène sont: le radical superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (OH), le monoxyde d'azote (NO), mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [113].

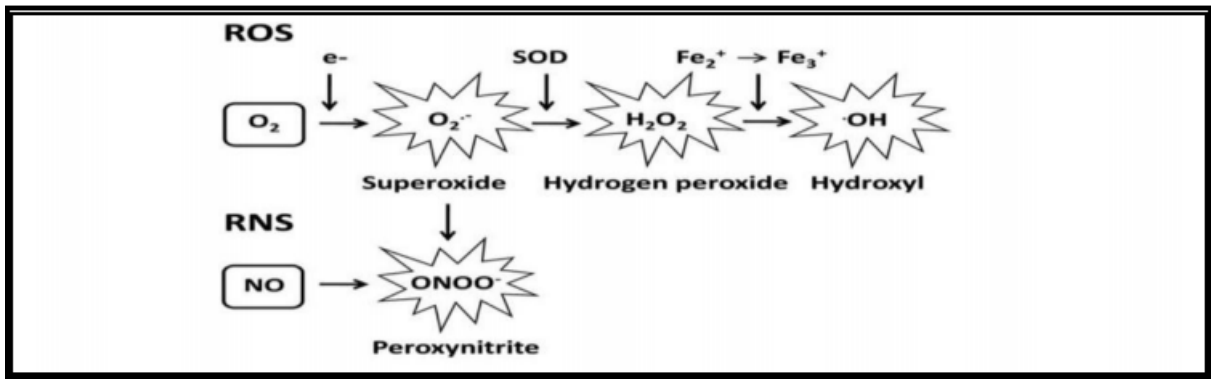


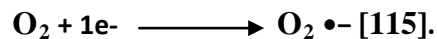
Figure 03: Formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et nitrogène (ERN)[114].

III.4.1-Source des radicaux libres

On distingue deux types de production des radicaux libres :

III.4.1.1-Production endogène

L'une des sources majeures des ROS est la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette production résulte de l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire. Une telle réaction est catalysée par le cytochrome oxydase mitochondrial.

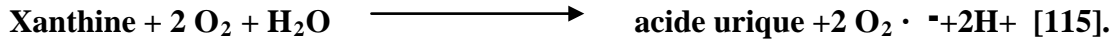


Autres chaînes du transport d'électrons (ex : peroxydases et microsomes) contribuent de b5 et P450 cytochromes. Les aérobie cellulaire la dans $\bullet\text{O}_2$ du production la a également la chaîne du transport d'électron des microsomes peuvent produire des ROS quand ils interrompent le cycle redox normal et détournent le flux d'électrons vers l'O₂ [116].

D'autre part les ROS peuvent se produire au cours des processus pathologiques ou la production du radical répond à une stimulation et intervient dans le processus inflammatoire (NADPH oxydase et xanthine oxydase) [117]. Les cellules phagocytaires activées sont le siège d'un phénomène appelé "explosion oxydative", consistant en l'activation du complexe NADPH oxydase, enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes au niveau de la membrane cellulaire. Ce mécanisme lorsqu'il est contrôlé est capital dans la lutte infectieuse car il permet la phagocytose des bactéries et des corps étrangers [102].

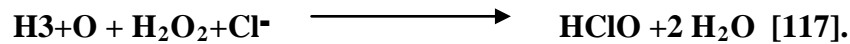
D'ailleurs le système xanthine/xanthine oxydase permet aussi la production de l'anion superoxyde :

Xanthine oxydase



Une autre espèce réactive oxygénée produite au cours de l'inflammation est le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ; en vue de réagir directement ou de produire l'acide hypochloreux par l'intervention de myéloperoxydase. Cette espèce (HClO) est caractérisée par un pouvoir oxydant nettement plus élevé que le H_2O_2 .

myéloperoxydase



Le monoxyde d'azote est produit aussi par un système enzymatique NO synthétase (NOS), à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages [102].

D'autres systèmes sont capables de produire les ROS, citons par exemple : les réactions catalysées par les lipooxygénases et cyclooxygénases dans la voie de synthèse des leucotriènes, et prostaglandines [118] ; les aldéhydes oxydases ou les protéines hémiques qui peuvent oxyder leur fer (I) en fer (III) avec production du radical $\text{O}_2 \cdot^-$ [117]. C'est ainsi l'auto-oxydation des monoamines (dopamine, épinéphrine, et norépinéphrine) ; et l'hémoglobine en présence de traces de métaux peut également être à l'origine de la production des ROS [119].

III.4.1.2- Production exogène

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres. Les rayonnements UV (ultra-violet) induisent la synthèse de radicaux libres et de molécules génératrices de radicaux libres par l'intermédiaire d'agents photo-sensibilisants. Les radiations ionisantes provoquent également la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène [120]. L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes [121]. Des toxiques tels que l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO_2), présents dans notre environnement (goudron,

tabac, polluants industriels), sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires [121].

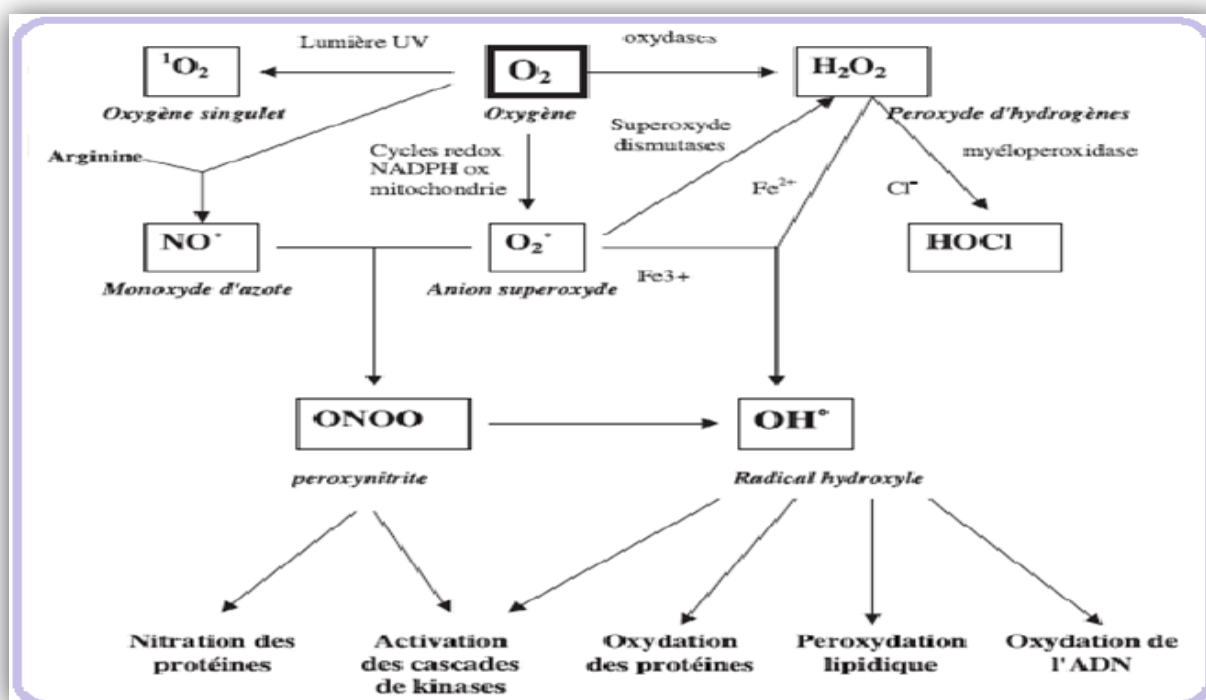


Figure04 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène[102].

III.4.2- Rôles biologique des radicaux libres

Le paradoxe des radicaux libres en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie. Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions utiles qui à part la phagocytose, ont été découvertes récemment. Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes [102], à la production énergétique, au règlement de la croissance des cellules et à la signalisation intracellulaire [122][123][124].

III.5- Les marqueurs biologiques de stress oxydant

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines, de lipides et des glucides, mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. La mise en évidence des dérivés de l'oxydation de ces différents substrats seront donc des marqueurs de la présence d'un stress oxydant [125].

III.5.1-L'oxydation de l'ADN

Les radicaux libres peuvent induire des effets mutagènes ou l'arrêt des réplifications de l'ADN.

Ils agissent en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN protéines [126]. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, ce qui donne naissance à un grand nombre de bases modifiées.

Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés.

Les radicaux libres peuvent aussi attaquer les protéines qui sont très nombreuses à entrer en contact avec l'ADN pour le protéger (histones) ou pour le lire (enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription), entraîne des pontages des protéines. comme ils peuvent attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin [102][127].

III.5.2- L'oxydation des protéines

L'action des radicaux libres a lieu sur les chaînes latérales de certains acides aminés comme le thiol des cystéines. A proximité des sites de liaison d'ions métalliques peuvent se dérouler des réactions d'oxydation qui produisent des acides aminés anormaux. Les radicaux libres sont également responsables de la formation de ponts disulfures qui modifient la conformation des protéines et nuisent à leur activité biologique (activité enzymatique, transduction d'un signal ou système de transport) [128].

III.5.3-L'oxydation des lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones

situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. Cette réaction appelée peroxydation lipidique se déroule en plusieurs étapes.

III.6-Les antioxydants

Les antioxydants sont définis comme l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement à faibles doses la production, de limiter la propagation ou de détruire les ERO[102]. Il est clair que tous les systèmes biologiques, dans leurs environnements oxygénés, ont élaboré des mécanismes pour contrer les conséquences potentiellement délétères des agents pro oxydants [129]. On distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule.

III.6.1-Les antioxydants enzymatiques

L'un des systèmes de défense antioxydants enzymatiques est constitué de trois enzymes : le superoxyde dismutase SOD, la glutathion peroxydase GSH-Px et la catalase. Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire [130].

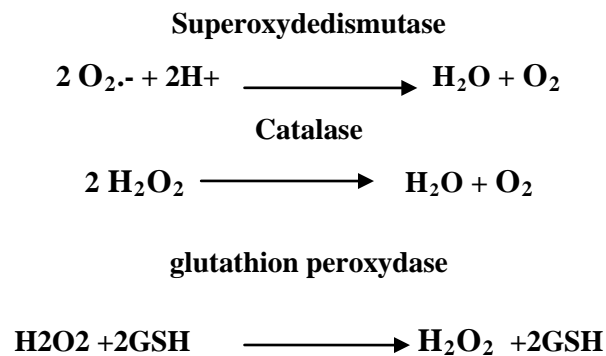


Figure 05: Réactions enzymatiques de piégeage des espèces réactives oxygénées ERO[131].

Il existe de nombreuses autres enzymes antioxydantes comme les peroxyredoxines, l'hème oxygénase, le glutathion transférase, les thiorédoxines réductases ou les thiorédoxines peroxydases. La plupart de ces enzymes, de même que les enzymes de réparation des dommages oxydants, vont utiliser un donneur d'équivalent réducteur, le NADPH, qui constitue avec le glutathion les plaques tournantes de la défense antioxydante [102].

III.6.2-Antioxydants non enzymatiques

Ce groupe d'antioxydants est constitué de plusieurs composés capables de réagir directement ou indirectement avec les ERO. Le mécanisme indirect implique la chélation des métaux de transition ce qui empêche la production du radical hydroxyle, hautement toxique [132]. Certains composés antioxydants comme les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables. La vitamine piégeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système. Ainsi, la vitamine E est régénérée par la vitamine C qui est elle-même régénérée par des enzymes, les ascorbates réductases. Ce type d'antioxydant est appelé piégeur « scavenger » pour les Anglo-saxons. De très nombreux composés alimentaires peuvent aussi avoir ce comportement : polyphénols, alcaloïdes Il existe de plus des composés endogènes synthétisés par les cellules et jouant le même rôle ; le plus important est le glutathion réduit qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le NO• [102][133].

III.6.3-Antioxydants d'origine végétale

Les caroténoïdes et les polyphénols constituent de vastes familles de composés (plusieurs centaines) parmi lesquels se trouvent le β -carotène, l'acide caféique et la quercétine. Les caroténoïdes et les polyphénols sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$ et peroxydes $\text{RO}_2 \cdot$. Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique, mais d'une manière moins efficace que celle de l' α -tocophérol. En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire [134].

III.6.4-Les antioxydants synthétiques

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matière de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture. Cependant, il a été montré que ces

antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques [135]. En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomaux du foie et des organes extrahépatiques [136]. Le BHT présenterait des effets carcinogènes chez le rat [137].

III.7-Alimentation et stress oxydant

La production des ERO peut se faire au niveau cellulaire en réponse à divers stimuli, tel que la surcharge métabolique elle-même provoquée par une surabondance de macronutriments. En effet, lorsque l'apport calorique dépasse la dépense énergétique, l'augmentation induite par le substrat en excès active le cycle de Krebs ce qui provoque la formation des ERO. Ainsi, l'ingestion excessive de macronutriments induit la production des ERO [138]. Dans ce sens, une étude a démontré que l'ingestion de 75g de glucose induit une augmentation de la production de superoxyde dans les leucocytes, libérés ensuite dans le milieu extracellulaire [139]. Une réponse similaire a également été observée suite à l'ingestion des graisses saturées [139]. Une réponse similaire a également été observée suite à l'ingestion des graisses saturées [140]. Ainsi, un repas riche en graisse et en glucides induit une réponse oxydatif et inflammatoire plus intense et prolongée avec une production accrue des ERO chez les patients obèses par rapport aux sujets normo-pondérés [141]. Pour cela, il est possible de choisir des aliments antioxydants et non inflammatoire à fin de minimiser l'inflammation et le stress oxydatif postprandial. L'avènement de la biologie moléculaire montre le rôle de certaine molécule de petite taille dans la défense antioxydante, en effet cette défense peut être renforcée par des apports exogènes. Le schéma suivant montre qu'une bonne alimentation fourni directement l'essentiel des éléments pouvant assurer une bonne défense antioxydante. Cette alimentation garantie :

- ◆ Un apport en Vitamines A et C, les caroténoïdes et flavonoïdes qui ont pour rôle la neutralisation des entités radicalaires en les piégeant (Scavangers).
- ◆ Les oligoéléments tels que le Fer, Sélénium, Cuivre, Zinc et le Manganèse indispensables Pour l'activité des enzymes antioxydantes (Cu, Zn-SOD, Se-GPx). Sur la base de ces données, les scientifiques accordent de plus en plus d'importance à une alimentation riche en fruits et légumes, cette constatation amène donc une réflexion importante sur l'effet d'une thérapie antioxydante à long terme dans le cadre de la

prévention de pathologies où le stress oxydatif est impliqué (ex : maladies cardiovasculaires). Dans cette optique l'étude SUVIMAX a proposé d'évaluer quel sera l'impact d'une prise journalière pendant 8 ans de d'un mélange d'antioxydants à des doses physiologiques (30mg de Vit E, 120 mg de Vit C, 6 mg de b-Carotène, 100µg de sélénium et 20 mg de Zinc sur l'incidence de l'apparition des maladies cardiovasculaires [142].

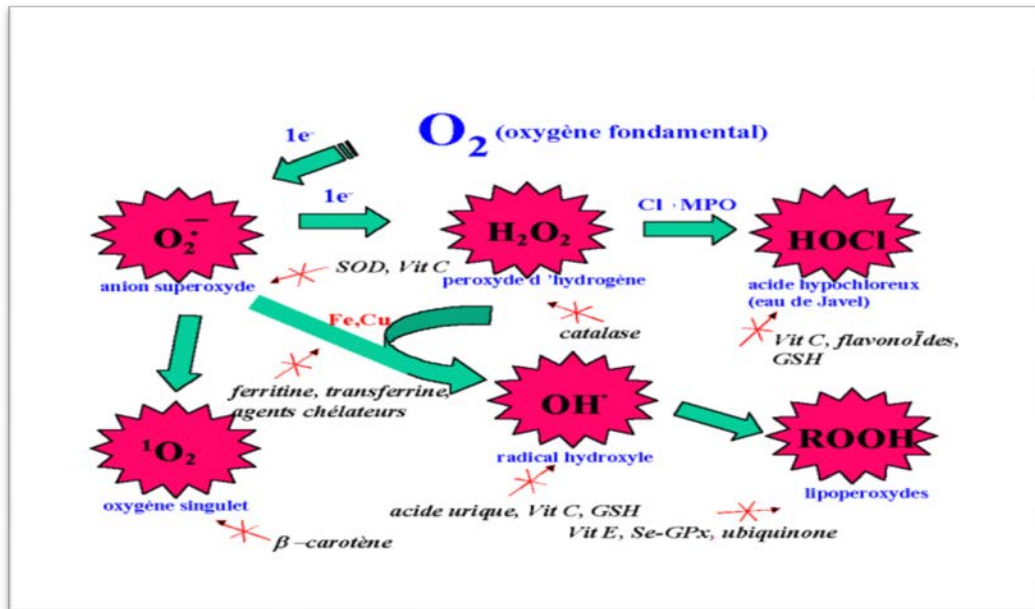


Figure 06: Aperçu des espèces oxygénées activées (EOA) dérivant de l'oxygène et systèmes de protection permettant de limiter l'effet toxique de ces espèces [143].

III.8-Les maladies liées au stress oxydatif

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydatif sera la principale cause initiale de plusieurs maladies: cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, Parkinson, infections intestinales, rhumatisme, l'athérosclérose, le diabète [144][145].

Partie II

Partie expérimentale

Chapitre IV

Matériel et méthodes

IV. Matériel et méthodes

Notre travail expérimental ayant pour objet l'investigation pytochimique et l'étude in vitro de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique brut de deux plantes médicinales *Marrubium vulgare* et *Artemisia campestris*. L'étude expérimentale a été effectuée au sein du laboratoire de Biochimie, Université Abbés Laghrour - Khenchela.

IV .1- Matériel

IV .1.1- Matériel biologique

IV .1.1.1- Matériel végétal

Il est constitué des feuilles et tige de *Marrubium vulgare* et *Artemisia campestris*, récoltées au cours du mois de novembre 2016 de la région de KHENCHELA (BAGHAI)

IV .1.1.2- Réactifs chimiques et instrumentations

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits: FeCl₃, acide sulfurique (H₂SO₄), HCl, acide acétique, NH₄OH, KI, I₂, Acétone , acide formique, Na₂SO₃, AlCl₃, acide orthophosphorique, méthanol, n-butanol, acétate d'éthyle, chloroforme, Acétone, Plaque CCM, acide ascorbique, quercetine le radical 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl radical (DPPH) ; Réactif de Folin-Ciocalteu, l'acide gallique, carbonate de sodium (Na₂CO₃), chlorure d'aluminium (AlCl₃), H₂O₂, tompon phosphate (Na₂HPO₄-2 H₂O₂ / KH₂PO₄).

Parmi l'appareillage utilisé : Rotavapeur (Hahnvapor (KIT LAB), Spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau (Jenway 6305 UV/VIS), Chambre d'observation UV « 264/365 nm » (Vilber Courmat), Bain Marie (Memmert (31702/uk), Etuve (Memmert), Autoclave. pHmètre (HanwAinstrument) ,Balance analytique (OHAUS), agitateur magnétique (Scilogex MS7-H550-pro), vortex(Velp Sientifica).



Photo1: Vue générale de la plante d'*Artemisia campestris* prise à partir du site d'étude.



Photo2: Vue générale de la plante de *Marrubium vulgare* prise à partir du site d'étude.

IV.2- Méthodes

IV.2.1- Préparation de l'extrait méthanolique

Les feuilles et les tiges de deux plantes fraîchement récoltées sont conservées à l'ombre dans un endroit sec et aéré, ensuite elles ont été broyées dans un broyeur électrique pour l'obtention d'une poudre très fine, la poudre obtenue a été placée dans un flacon en verre bien hermétique.

86.002 et 150 g de la poudre de la partie aérienne des deux plantes médicinales *Marrubium vulgare* et *Artemisia campestris* respectivement sont mise à macérer dans un mélange méthanol/eau (7 :3 V/V) 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, le méthanol est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite en utilisant un rotavapeur à la température 50°C permettant ainsi d'obtenir l'extrait méthanolique qui est conservé à +5°C.



Figure 07: du Rotavapor utilisé pour sécher nos extraits méthanoliques.

IV.2.2-Détermination du rendement d'extraction

Le rendement des extraits méthanoliques est le rapport entre le poids de l'extrait sec et le poids de la plante en poudre utilisée. Il est exprimé en pourcentage selon la formule suivante :

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

Où : **P_s** : Poids de l'extrait sec en gramme (g).

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

IV.2.3- criblage 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 sont réalisés sur l'extrait brut méthanolique de *Marrubium vulgare* et *Artemisia campestris* et les résultats obtenus ont été évalués comme suit :

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

IV.2.3.1- Recherche des tanins

2 à 3 gouttes de la solution de FeCl₃ à 2%, sont ajoutées à 2 ml de l'extrait brut méthanolique. La solution obtenue est reposée pendant quelques minutes. Le test est considéré positif s'il ya l'apparition d'une coloration bleue-noire et un précipité [146].

IV.2.3.2-Recherche des saponosides

- Test 1 : 5 ml de l'extrait brut méthanolique sont mélangés avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 min. La formation d'une mousse persistante après 15 min confirme la présence des saponosides [146].
- 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 [147].

IV.2.3.3- Recherche des flavonoïdes

5 ml de l'extrait méthanolique sont traités avec quelques gouttes d' AlCl_3 (1%). La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur jaune[148].

IV.2.3.4- Recherche des coumarines

Les résidus secs sont dissous dans l'eau distillée par chauffage. Après refroidissement, la solution obtenue est répartie dans 2 tubes à essai. Le premier sert de témoin et on ajoute 05 ml de NH_4OH 10% dans le 2eme tube. L'apparition d'une fluorescence bleue ou verte à la lampe UV 365 nm indique la présence des coumarines [149][150].

IV.2.3.5-Recherche des composés réducteurs

Ce test est basé sur la réaction de Keller-Kiliani, 5 ml d'acide acétique contenant des traces de FeCl_3 et 5 ml d'acide sulfurique contenant des traces de FeCl_3 sont ajoutés à 1 ml de l'extrait. La présence des composés réducteurs est confirmée par la formation de deux phases, une colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique)[147].

IV.2.3.6-Recherche des alcaloïdes

Ce test est fait pour révéler la présence ou l'absence des alcaloïdes sels. 5 ml d' HCl (2N) sont ajoutés à l'extrait et chauffé dans un bain marie. Après la filtration, le filtrat est traité avec le réactif de Wagner (2g de KI et 1,27g d' I_2 solubilisé dans 100 ml d'eau distillée). La présence de turbidité ou de précipitation indique la présence des alcaloïdes sels [148].

IV.2.4- Etude quantitative

IV.2.4.1- Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin Ciocalteu selon la méthode citée par Wong [151].

IV.2.4.1.1- Principe

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis en utilisant l'essai de Folin-Denis ou généralement Folin-

Ciocalteu .Ces essais sont basés principalement sur la réduction du réactif acide phosphotungstique phosphomolybdique (reactif Folin) dans une solution alcaline [152].

Brièvement 200 µl de chaque extrait (dissous dans le méthanol) ont été ajoutés à 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué. Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 4 minutes.

Après l'incubation 800 µl de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (7,5g /l) a été ajoutée. Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 2 heures dans l'obscurité et température ambiante. L'absorbance des extraits a été mesurée par un Spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau (JENWAY 6305 UV/VIS)à 765 nm.

IV.2.4.1.2- Expression des résultats

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

IV.2.4.2- Dosage des flavonoïdes

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) cité par Djeridane [153] est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits.

IV.2.4.2.1-Principe

1ml de chaque extrait et du standard (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables a été ajouté à un volume égal d'une solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation.

IV.2.4.2.2-Expression des résultats

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

IV.2.5- Identification des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince (CCM)

Cette méthode se repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile qui est en générale un mélange de solvant, adapté au type de séparation rechercher, 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.

IV.2.5.1- Protocole de CCM sur gel de silice

Les analyses par CCM ont été effectuées avec des plaques de silica gel, sur support rigide en aluminium 20/20 Cm.

- L'extrait est déposé à l'aide d'une micropipette (2 µl) à des points repères à 1.5 cm du bord inférieur de la plaque.
- les plaques sont placées dans les cuves de développement, à environ 0,5 cm de hauteur. dans les quelles se trouve 3 systèmes de migration appelés phase mobile constitué de :
 - BAW : Butanol, Acide acétique, H₂O (4 : 1 : 5).
 - Chloroforme, Méthanol, H₂O (85 : 10 : 5).
 - Acétone, H₂O (1 : 1).

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

Pour chaque spot on a calculé le facteur de rétention qui est égal à la distance parcourue par le constituant/la distance parcourue par le solvant. Les rapports frontaux des spots sont comparés à ceux des témoins permettant ainsi l'identification des constituants de différents extraits [154].

IV.2.6 - Évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits

L'activité antioxydant ne doit pas être conclue sur la base d'un seul modèle de test antioxydant. Et en pratique, plusieurs essais in vitro procédures sont menés pour évaluer les activités antioxydants avec les échantillons d'intérêt. Un autre aspect est qu'antioxydant des modèles de test varient dans les différents points de vue

deux tests différents ont été utilisés pour évaluer l'activité antioxydante des extraits: le test de DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl) et le Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène.

IV.2.6.1 - Test du piégeage du radical libre DPPH

Dans cette analyse la capacité anti-oxydante est déterminée par l'activité du balayage des radicaux libres à été mesurée 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 [155].

IV.2.6.1.1 - Principe

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH(2.2 diphenyl 1 picryl hydrazyl (Figure11) de couleur violette se réduit en 2.2 diphenyl 1 picryl hydrazyl de couleur jaune. [156].

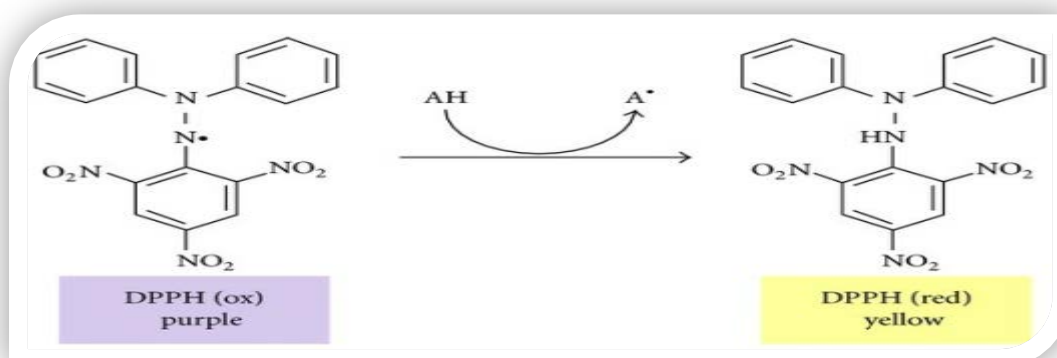
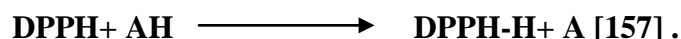


Figure 08: Forme libre réduite du DPPH [151].

Ce radical est un oxydant qui peut être réduit par l'antioxydant (AH) selon la réaction suivante :



(AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphenyle picryl hydrazine (jaune) [158]. L'activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par Lopes-Lutz et [159].

IV.2.6.1.2- Méthode

Le DPPH est solubilisé dans le méthanol pour avoir une solution de 0,3 Mm. Dans des tubes on introduit 2,5 ml de chaque extrait (1mg/ml) d'une solution méthanolique mère de $C_1 = 10$ mg/ml de l'extrait, les dilutions $C_2 = 8$ mg/ml, $C_3 = 6$ mg/ml, $C_4 = 4$ mg/ml, $C_5 = 2$ mg/ml,. A chaque volume de 1,5 ml de la solution méthanolique du DPPH, un volume de 15 μ l de chaque concentration préparée de l'extrait est ajouté. Après agitation et incubation à la température ambiante pendant 30 min, les densités optiques des mélanges réactionnels sont mesurées par le spectrophotomètre à 517nm contre un blanc préparé dans les même.

Le contrôle négatif est composé de 1ml de la solution méthanolique au DPPH et de 2,5 ml de méthanol. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard qui est l'acide ascorbique.

IV.2.6.1.3- L'expression des résultats

En présence d'un antioxydant la force d'absorption est diminuée et la décoloration résultante est stoechiométrique en ce qui concerne le nombre d'électrons captés [155].

Les résultats sont exprimés en tant que l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I%) en utilisant la formule suivante :

Inhibition % = $[(A_1 - A_0 / A_1) \times 100]$ [160].

Ou :

- **A0**: Absorbance d'échantillon.
- **A1**: Absorbance du control négatif.

La valeur IC 50, à été déterminée pour chaque extrait, est définie comme étant la concentration de substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur), les valeurs IC 50 moyennes ont été calculées par les régressions linéaires de trois essais séparés ou l'abscisse est représentée par la concentration des extrais testés et l'ordonnée par l'activité antioxydante en pourcentage [161].

IV.2.6.2 - Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 scavenging activity)

Le peroxyde d'hydrogène est un dérivé non-radicalaire d'oxygène et considéré comme toxique pour les cellules car il permet la formation des radicaux hydroxyles à l'intérieur de la cellule. [162].

IV.2.6.2.1 - Principe

Une des méthodes les plus communes pour évaluer la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène est basée sur l'absorption de cette molécule dans le domaine de l'UV. Comme la concentration de H₂O₂ diminue par les composés piègeurs, la valeur d'absorbance de ce dernier à 230nm diminue également. Néanmoins il est tout à fait normal que les échantillons absorbent également à cette longueur d'onde, exigeant ainsi l'exécution d'une mesure blanche [163].

IV.2.6.2.2 - Dosage

Une solution de 20µl de peroxyde d'hydrogène est préparé dans le tompon phosphate. Un millilitre (1ml) extrait (fraction ou standard) à différentes concentrations dans le méthanol est additionné à 2ml solution PBS.L'absorbance est lue après 10min contre un blanc sans peroxyde d'hydrogène .Le pourcentage de piégeage (I%)est calculé par la formule suivante: $I(\%) = [(Abs\ contrôle - Abs\ test) / Abs\ contrôle] \times 100$.

IV.2.7-Analyse statistique

Chaque expérience est répétée trois fois et les valeurs sont représentées par la moyenne \pm écart type.

Chapitre V

Résultats

et discussion

V. Résultats et discussion

Le présent travail porte sur l'étude phytochimique et l'évaluation in vitro de l'activité anti-oxydante des extraits de la partie aérienne des plantes médicinales endémiques *Artemisia campestris* et *Marrubium vulgare*.

V.1-Détermination du rendement d'extraction

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

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

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

L'extrait a été préparé à partir de la poudre de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* et *Marrubium vulgare*. Les résultats sont représentés dans le tableau 2.

Tableau 02 : Le rendement des extraits méthanoliques d'*Artemisia campestris* et *Marrubium vulgare*.

La plante	Le poids du matériel végétal en (g)	Le poids des extraits en (g)	Le rendement en (%)
<i>Artemisia campestris</i>	150	21.98	14.65
<i>Marrubium vulgare</i>	86.002	15.11	17.57

L'opération de l'extraction du matériel végétal d'*Artemisia campestris* et *Marrubium vulgare* à l'aide du méthanol a permis d'obtenir des résidus secs d'extrait brut de 21.98 g et 15.11g respectivement. Le calcul des rendements en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne des plantes (Tableau 2) a montré que l'échantillon de *Marrubium vulgare* fourni un taux d'environ 17.57 %, plus élevé que celui obtenu à partir d'*Artemisia campestris*, qui est de 14.65%. Dans notre étude où l'extraction est réalisée à froid par simple macération [164], qui est une méthode discontinue dont le solvant devrait être remplacé jusqu'à ce que la matière végétale soit épuisée [165]; donc il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie de manière générale. En effet, le rendement n'est pas relatif; il varie en fonction

de l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites (de son métabolisme) et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou fractionnement et de sa polarité [151].

V.2-Criblage phytochimique

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés qui existent dans les feuilles et les tiges d'*Artimisia campestris* et *Marrubium vulgare*, 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 3 et 4.

Tableau 03 : Résultats des tests phytochimiques des composés constituant de l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare*.

Extrait méthanolique de <i>Marrubium vulgare</i>		
Métabolites secondaire	Résultat	Observation
Les saponosides	(+)	Formation d'une mousse persistante après 15 min
Les flavonoïdes	(+)	Apparition d'une coloration jaune
Les tanins	(+)	Apparition d'une coloration bleu noir et un précipité après 3 min
Les composés réducteurs	(+)	Apparition de deux phases séparées (colorée rouge et l'autre en bleu vert)
Les alcaloïdes	(+)	Apparition d'une turbidité et d'un précipité avec le réactif de Wagner
Les coumarines	(-)	Absence d'une fluorescence bleue ou vert à la lampe UV

Tableau 04: Résultats des tests phytochimiques des composés constituant de l'extrait méthanoliques d'*Artemisia Campestris* .

Extrait méthanolique d' <i>Artemisia Campestris</i>		
Métabolites secondaire	Résultat	Observation
Les saponosides	(+)	Formation d'une mousse persistante après 15 min
Les flavonoïdes	(+)	Apparition d'une coloration jaune
Les tanins	(+)	Apparition d'une coloration bleu noir et un précipité après 3 min
Les composés réducteurs	(+)	Apparition de deux phases séparées (colorée rouge et l'autre en bleu vert)
Les alcaloïdes	(+)	Apparition d'une turbidité et d'un précipité avec le réactif de Wagner
Les coumarines	(+)	Présence d'une fluorescence bleue ou vert à la lampe UV

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

Les résultats de l'étude phytochimique d'*Artemisia Campestris* et *Marrubium vulgare* a montré que dans les feuilles et les tiges de ces plantes, la recherche des alcaloïdes, composés réducteurs, flavonoïdes, tanins et saponosides ,a été positive dans les deux plantes ce qui confirme les travaux de Belkassam [166] qui a été révélé la présence de flavonoïdes, saponosides et les tanins dans *Artemisia campestris* et *Marrubium vulgare*. Les coumarines sont des classes de familles chimiques fortement caractérisées dans *Artemisia Campestris* mais totalement absente dans les feuilles et les tiges de *Marrubium vulgare*.

La présence de ces composés chimiques dans les deux extraits pourrait être responsable des propriétés pharmacologiques observées. Qui sont à leurs tours responsables pour divers vertus pharmacologiques observés dans les travaux de Chitemerere , Mukanganyama , Marjorie

[167][168]. Aussi ça pourrait expliquer son utilisation traditionnelle pour soigner de nombreuses maladies telles que: la fièvre, contre les vers intestinaux, antispasmodique...etc [15][166][169][170].

V.3-Résultats de l'analyse quantitative

V.3.1- Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux des extraits bruts d'*Artimisia campestris* et de *Marrubium vulgare* ont été effectués 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[171].

L'acide gallique est le standard le plus souvent employé dans la méthode de Folin-Ciocalteu [172].

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait méthanolique a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Figure 12**) et exprimé en microgramme par millilitre d'extrait équivalent en acide gallique ($\mu\text{g EAG/ ml E}$).

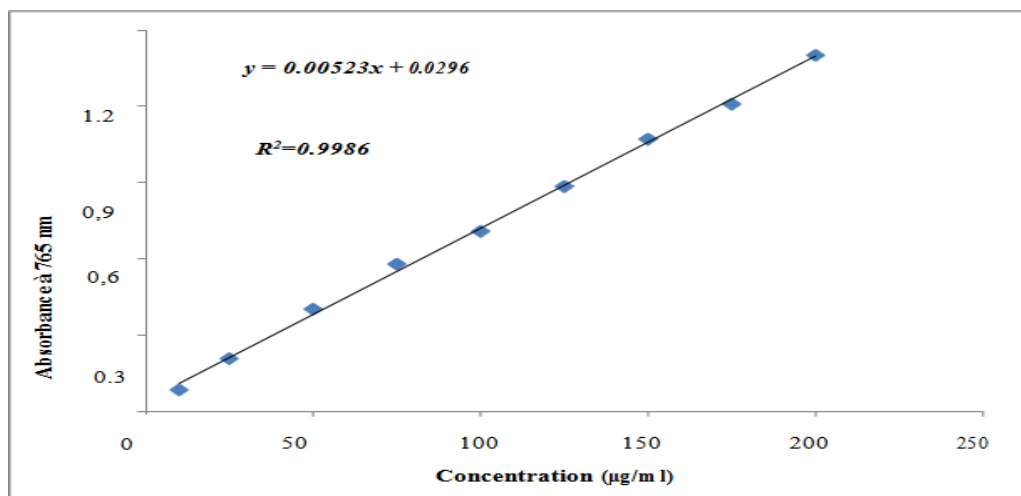


Figure 09 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois mesures).

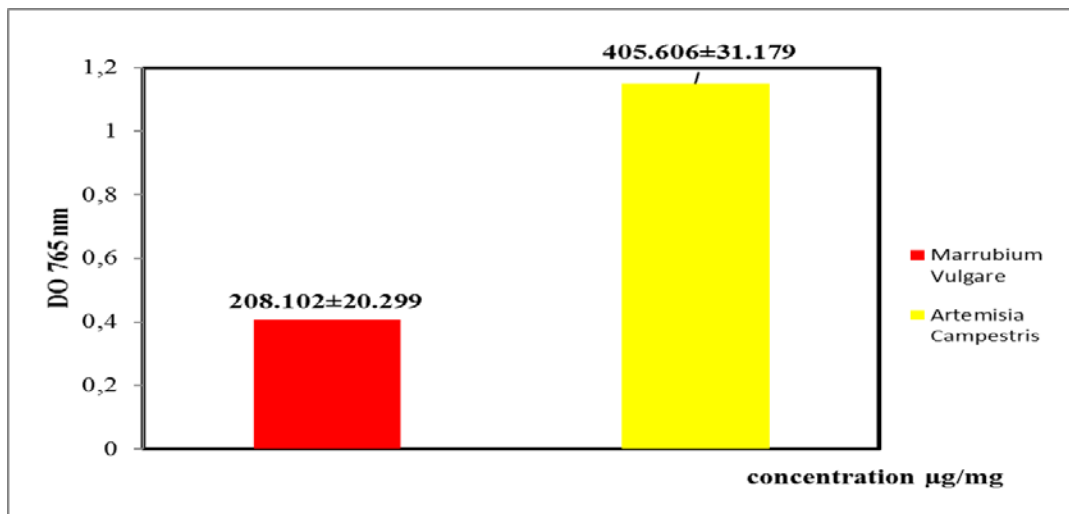


Figure 10 : Teneur en polyphénol totaux (mgEG/gE) dans les extraits méthanolique d'*Artemisia campestris* et de *Marrubium vulgare*

La teneur en polyphénols a été calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**figure 12**) $Y=0.00523+0.0296$.

La détermination quantitative des phénols totaux par la méthode colorimétrique montre que l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* a fourni un taux d'environ (405.606±0.333µg EA/ mg extrait) qui est plus élevé et plus riche que celui obtenu à partir de l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* égal à (208.102±0.168 µg EA/ mg extrait).

Le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement d'une plante à une autre, cela peut être attribué à plusieurs facteurs :

Facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies...etc. [173]. Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante [174].

La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux [175].

V.3.2- Dosage des flavonoïdes

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 [176].

L'étude quantitative d'*Artimisia campestris* et *Marrubium vulgare* au moyen des dosages spectrophotométriques, selon la méthode de trichlorure d'aluminium avaient pour objectif la détermination de la teneur totale des flavonoïdes. Une courbe d'étalonnage (**Figure14**) a été tracée pour cet objectif, établie avec la quercétine à différentes concentrations. Des mesures de densité pour chaque fraction réalisées à 430 nm. Les quantités des flavonoïdes correspondants ont été rapportées en équivalent microgramme de quercétine par milligramme d'extrait (Figure8) et déterminés par l'équation de type: $y = a x + b$.

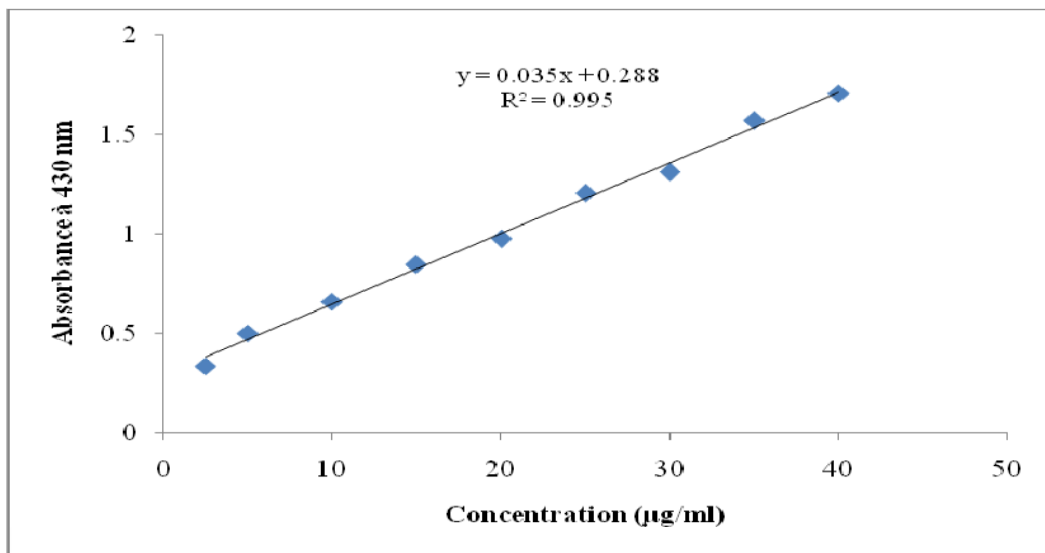


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de la quercétine (moyenne \pm SD de trois mesures).

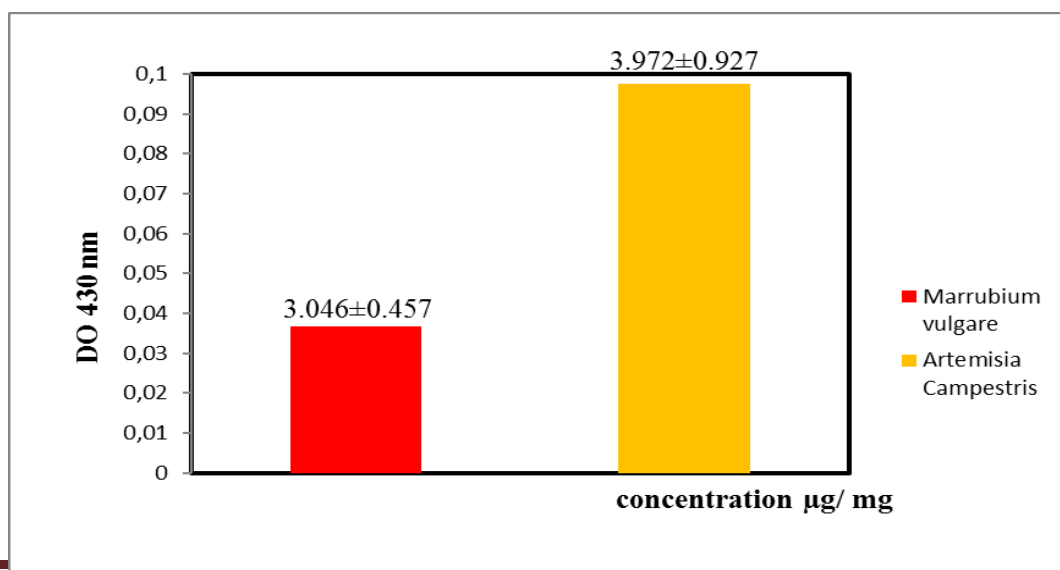


Figure 12 : Teneur en flavonoïdes totaux (mgEQ/gE) dans les extraits méthanolique d'*Artemisia campestris* et de *Marrubium vulgare*.

La teneur en composés flavonoïques de chaque extrait méthanolique a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de la quercitine et exprimé en microgramme par milligramme d'extrait équivalent en quercétine ($\mu\text{g EQ}/\text{mg E}$) à partir de l'équation de régression $y=0.035x+288$.

La détermination quantitative des flavonoïdes par la méthode du trichlorure révèle que l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* a fournit un taux d'environ ($3.972 \pm 0.0192 \mu\text{g EQ}/\text{mg extract}$) plus élevé que celui obtenu à partir de l'extrait méthanolique du *Marrubium vulgare* qui est de ($3.046 \pm 0.0212 \mu\text{g EQ}/\text{mg extract}$).

Nous remarquons que l'espèce la plus significativement riche en flavonoïdes est *Artemisia campestris*. Alors que les plante *Marrubium vulgare* restent relativement riche en flavonoïde par rapport à *Artemisia campestris* ceci est peut être lié au climat de la région ou à la méthode utilisée qui ne donne pas une composition quantitative complète des extraits [177].

Suivant les figures ci-dessous (16,17) Nous pouvons suggérer, qu'il y a une remarquable corrélation entre les flavonoïdes et polyphénols des deux plantes étudiées avec ($r^2=0,948$) pour *Artemisia campestris* et ($r^2=0,987$) pour *Marrubium vulgare* respectivement.

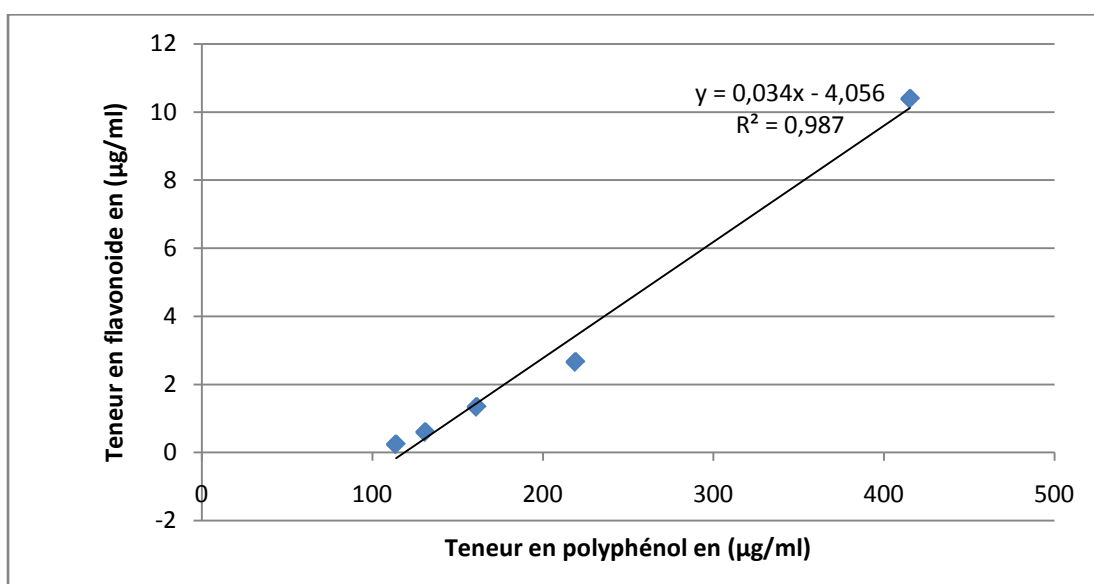


Figure13 : courbe représente la corrélation entre la teneur en flavonoïdes, polyphénols de l'extrait méthanolique du *Marrubium vulgare*

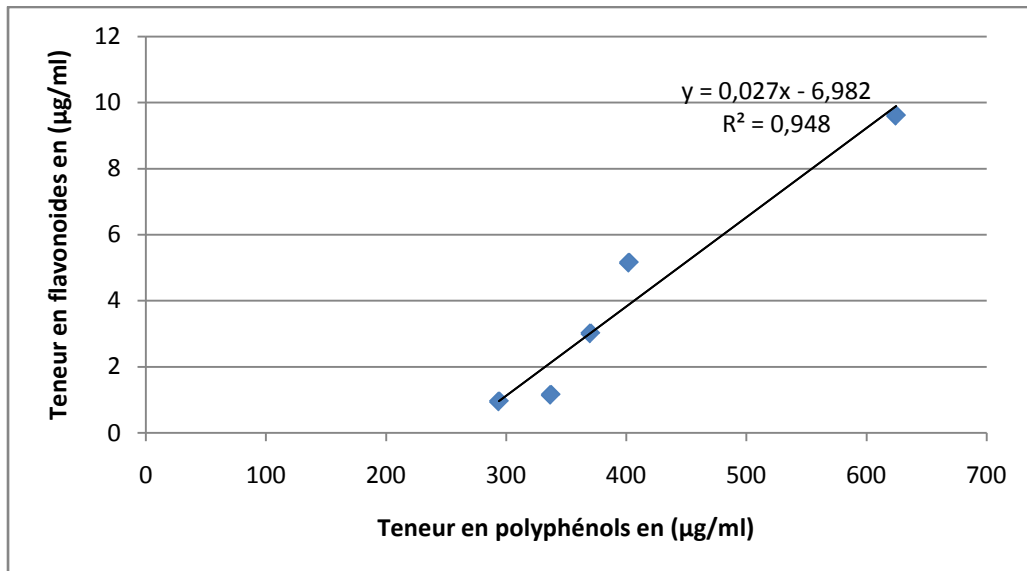


Figure 14 : courbe représente la corrélation entre la teneur en flavonoïdes, polyphénols de l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris*.

V.4- Résultats de l'étude qualitative chromatographie sur couche mince des extraits méthanoliques des plantes *Marrubium vulgare* et *Artemisia Campestris*

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[178].

La CCM nous a permis d'avoir les empreintes flavoniques des extraits méthanolique des parties aériennes des plantes *Marrubium vulgare* et *Artemisia campestris*, l'identification des composés était basée sur la comparaison des Rf's 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 5-6-7-8-9-10 résumant les résultats du CCM.

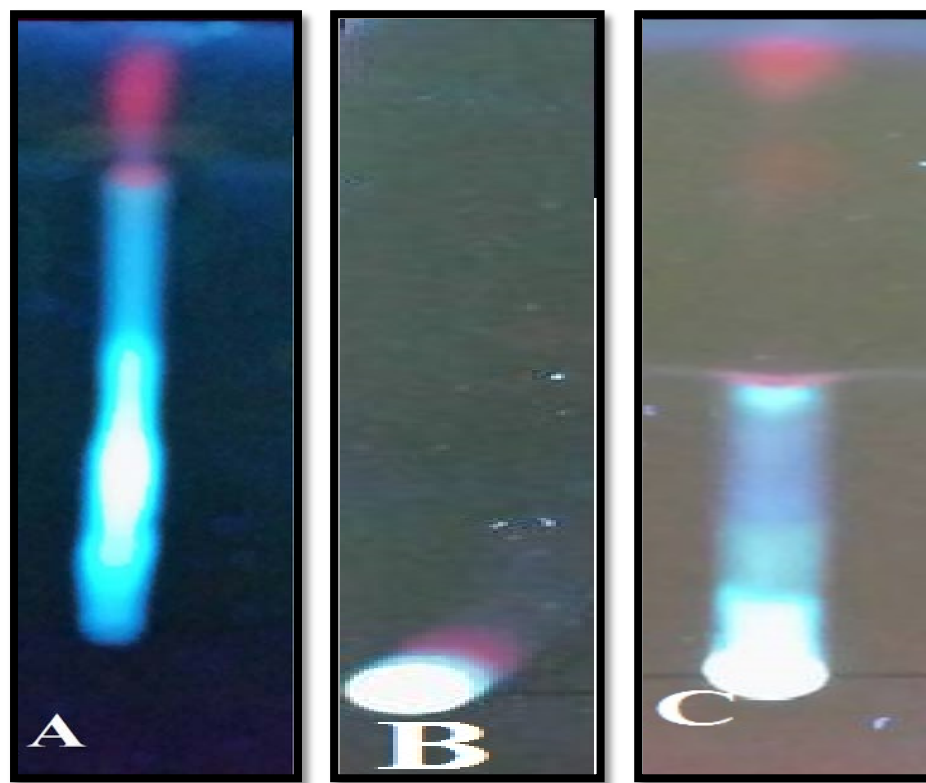
1) Composés identifiés chez *Marrubium vulgare*

Figure 15 : des chromatogrammes résultants de l'analyse du l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* par chromatographie sur gel silice (révélation à UV 365) nm par les systèmes solvants: (A): BAW : Butanol, Acide acétique, H₂O (4 :1 :5), (B): Chloroforme, Méthanol, H₂O (85 : 10 : 5) et (C): Acétone, H₂O (1 :1)

Tableau 05 : CCM de l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare*

Système solvant : BAW : Butanol, Acide acétique, H₂O (4 :1 :5).

Adsorbant : Gel de silice.

Couleur sous UV 365 (nm)	Rapport frontal (cm)	Type de flavonoïde possible
Spot1 : pourpre sombre	0.43	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones, chalcones
Spot2 : mauve	0.49	Anthocyanidine 3-glycosides
Spot3 : bleu blanc fluorescent	0.56	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones, acide phénol
Spot4 : rouge	0.86	Anthocyanidine 3-glycosides
Spot5 : rouge	0.92	Anthocyanidine 3-glycosides

Cinq spots ont été ségrégués des dépôts de l'extrait méthanolique par le système de solvant utilisé (BAW : Butanol, Acide acétique, H₂O (4 : 1 : 5)) appartenant aux différentes classes flavoniques, mais une grande partie appartiennent probablement surtout aux classes des Anthocyanidine 3-glycosides.

Tableau 06: CCM de l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare*

Système solvant : Chloroforme, Méthanol, H₂O (85 : 10 : 5) .

Adsorbant : Gel de silice

Couleur sous UV 365 (nm)	Rapport frontal (cm)	Type de flavonoïde possible
Spot1 : Violet	0.22	Anthocyanidine 3-glycosides

Un seul spot a été ségrégué des dépôts de l'extrait méthanolique par le système de solvant utilisé (Chloroforme, Méthanol, H₂O (85 : 10 : 5) appartenant à la classe des anthocyanidine 3-glycosides.

Tableau 07: CCM de l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare*

Système solvant : Acétone, H₂O (1 :1).

Adsorbant : Gel de silice.

Couleur sous UV 365 (nm)	Rapport frontal (cm)	Type de flavonoïde possible
Spot1 : bleu	0.36	Acide phénol
Spot2 : rouge vif	0.44	Anthocyanidine 3-glycosides
Spot3 : rouge vif	0.54	Anthocyanidine 3-glycosides
Spot4 : mauve	0.90	Anthocyanidine 3-glycosides
Spot5 : rose pale	0.94	Anthocyanidine 3,5-diglycosides

Cinq spots ont été ségrégués des dépôts de l'extrait méthanolique par le système de solvant utilisé (Acétone, H₂O (1 :1) appartenant aux différentes classes des anthocyanidine 3-glycosides et d'acide phénol.

Après une simple comparaison entre les trois systèmes, il apparaît clair et évident que la tache mauve (violet), qui correspond aux anthocyanidine 3-glycosides est commune.

D'après les résultats de ces tableaux (5-6-7), le système qui a donné la meilleure séparation est celui de (BAW : Butanol, Acide acétique, H₂O (4 :1 :5) par ce qu'il a permis la séparation de 05 taches ce qui explique la solubilité différentielle des composés flavonoïque dans ce système.

1) Composés identifiés chez *Artemisia Campestris*

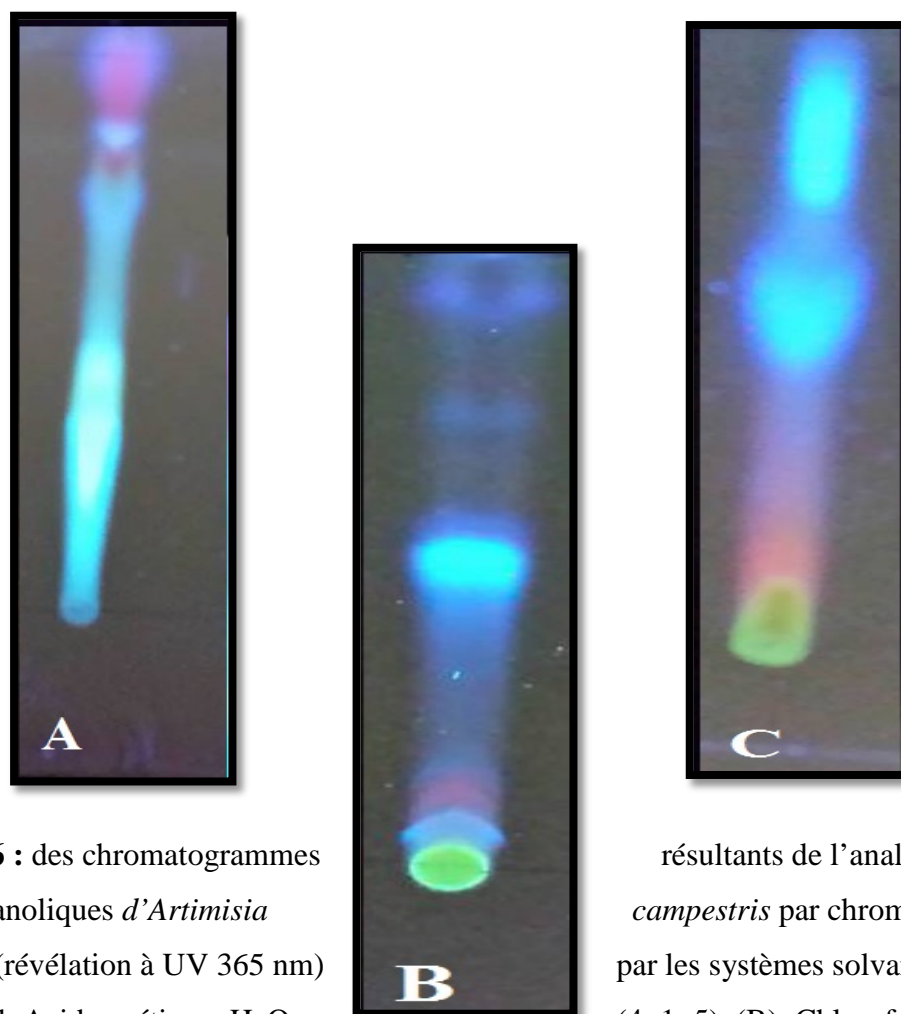


Figure 16 : des chromatogrammes
méthanoliques d'*Artemisia*
gel silice (révélation à UV 365 nm)
Butanol, Acide acétique, H₂O

résultants de l'analyse d'extrait
campestris par chromatographie sur
par les systèmes solvants: (A): BAW :
(4 :1 :5), (B): Chloroforme, Méthanol,
H₂O (85 : 10 : 5) et (C): Acétone, H₂O (1 :1)

Tableau 08 : CCM de l'extrait méthanolique d'*Artemisia Campestris*

Système solvant : BAW : Butanol, Acide acétique, H₂O (4 :1 :5)

Adsorbant : Gel de silice

Couleur sous UV 365 (nm)	Rapport frontal (cm)	Type de flavonoïde possible
Spot1 : bleu blanc fluorescent	0.56	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones
Spot2 : bleu blanc fluorescent	0.65	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones
Spot3 : pourpre sombre	0.69	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones, chalcones
Spot4 : bleu blanc fluorescent	0.77	Flavonols, flavonones, isoflavone, flavanones
Spot5 : mauve	0.82	Anthocyanidine 3-glycosides
Spot6 : rouge	0.86	Anthocyanidine 3-glycosides
Spot7 : rouge	0.92	Anthocyanidine 3-glycosides

Sept spots ont été ségrégués des dépôts de l'extrait méthanolique par le système de solvant utilisé (BAW : Butanol, Acide acétique, H₂O (4 : 1 : 5)) appartenant aux différentes classes flavoniques, mais une grande partie appartiennent probablement surtout aux classes des flavonols, flavonones, isoflavone et flavanones.

Tableau 09: CCM de l'extrait méthanolique d'*Artemisia Campestris*

Système solvant : Chloroforme, Méthanol, H₂O (85 : 10 : 5)

Adsorbant : Gel de silice

Couleur sous UV 365 (nm)	Rapport frontal (cm)	Type de flavonoïde possible
Spot1 : bleu	0.05	Acide phénol
Spot2 : mauve	0.11	Anthocyanidine 3-glycosides
Spot3 : bleu	0.14	Flavonols, Acide phénol
Spot4 : mauve	0.17	Anthocyanidine 3-glycosides
Spot5 : violet	0.55	Flavones
Spot6 : bleu	0.65	Acide phénol
Spot7 : mauve	0.77	Anthocyanidine 3-glycosides

Sept spots ont été ségrégués des dépôts de l'extrait méthanolique par le système de solvant utilisé (Chloroforme, Méthanol, H₂O (85 : 10 : 5) appartenant aux classes flavoniques, mais une grande partie appartiennent probablement surtout aux classes des acides phénols, et anthocyanidine 3-glycosides.

Tableau 10 : CCM de l'extrait méthanolique d'*Artemisia Campestris*

Système solvant : Acétone, H₂O (1 :1).

Adsorbant : Gel de silice.

Couleur sous UV 365 (nm)	Rapport frontal (cm)	Type de flavonoïde possible
Spot1 : bleu	0.36	Acide phénol
Spot2 : rose	0.53	Anthocyanidine 3-glycosides
Spot3 : bleu	0.77	
Spot4 : jaune	0.84	Flavonols
Spot5 : bleu	0.98	Acide phénol

Cinq spots ont été ségrégués des dépôts de l'extrait méthanolique par le système desolvant utilisé (Acétone, H₂O (1 : 1)) appartenant aux différentes classes des anthocyanidine 3-glycosides et de acide phénol et des flavonols.

D'après les résultats des tableaux (8-9-10), le système qui a donné la meilleure séparation est celui de BAW : Butanol, Acide acétique, H₂O (4 : 1 : 5) par ce qu'il a permis la séparation de 07 taches de différentes classes mieux que le deuxième système chloroforme, méthanol, H₂O (85 : 10 : 5) celui qui sépare à son tour 07 taches moins intéressantes que le premier, ce qui explique la solubilité différentielle des composés flavonoïques dans ce système.

Après l'analyse des résultats obtenus, la CCM confirme la présence et la richesse des plantes en flavonoïdes déjà mis en évidence préalablement par des tests phytochimiques. La bonne séparation apparaît dans les systèmes polaires prouve que les flavonoïdes existants sont de nature beaucoup plus polaire.

En effet, les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène [179] et permet de l'augmentation de l'activité antiradicalaire des plantes médicinales .

V.5-Résultats et discussion de l'activité antioxydante

Tests, *in vitro*, de l'activité antioxydante

L'étude du pouvoir anti-oxydant *in vitro* de notre extrait a été évaluée par deux méthodes différentes à savoir le test de la réduction du radical libre DPPH et celui du piégeage du peroxyde d'hydrogène.

V.5.1-Effet scavenger du radical DPPH

La méthode DPPH a été choisie, en raison de sa simplicité, rapidité, sensibilité et de sa reproductibilité, mais aussi parce que les mesures IC50 exprimées en mg/ml sont comparables entre elles et non pas seulement à celle d'une référence.

Pour détecter l'activité antiradicalaire des extraits méthanoliques d'*Artimisia campestris* et de *Marrubium vulgare*, nous avons utilisé le 2,2-diphényl-2-picrylhydrazyle(DPPH), un radical qui est généralement l'un des substrats les plus utilisés pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse [180].

L'activité antioxydante de ces extraits vis-à-vis du radical DPPH à été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm selon la réaction suivante :

Tableau11 : Pourcentage d'inhibitionde l'activite antioxydante de test de DPPH de l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare*.

Concentration (µg /ml)	2	4	6	8	10
<i>Marrubium vulgare</i>					
Pourcentage d'inhibition (%)	4,497	29,10	44,84	48,16	67,74

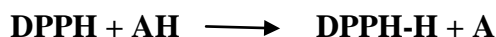


Tableau 12: Pourcentage d'inhibitionde l'activite antioxydante de test de DPPH de l'extrait méthanolique d'*Artimisia campestris*

Concentration (ug /ml)	2	4	6	8	10
<i>Artimisia campestris</i>					
Pourcentage d'inhibition (%)	2,77	28,57	33,91	70,315	86,955

Tableau 13: Pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante de test de DPPH de l'acide ascorbique

Concentration (ug /ml)	2	4	6	8	10
Acide ascorbique					
Pourcentage d'inhibition (%)	32.98	54.63	69.072	89.69	96.9

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèlent que les extraits méthanoliques d'*Artimisia campestris* et de *Marrubium vulgare* possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante et les IC50 de chacun des différents extraits ont été déterminées.

Les valeurs d'IC50 (concentration inhibitrice à 50%) sont déterminés graphiquement à partir de la courbe [% inhibition = f (Concentration)] (Figures 20,21). Une valeur faible d'IC50 indique une activité antioxydante forte.

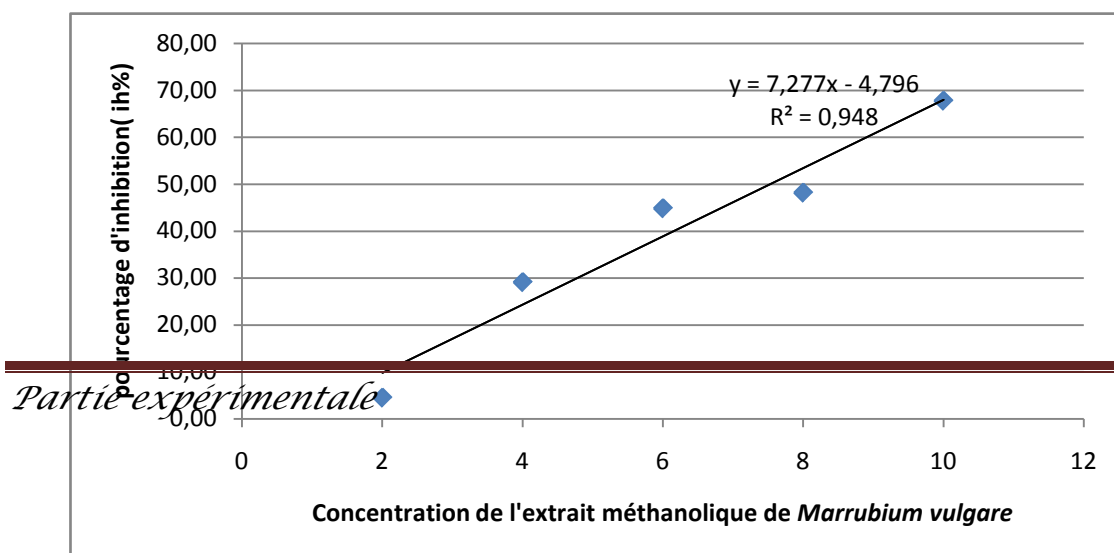


Figure17: Activité antiradicalaire du test de DPPH de l'extrait méthanolique du *Marrubium vulgare*.

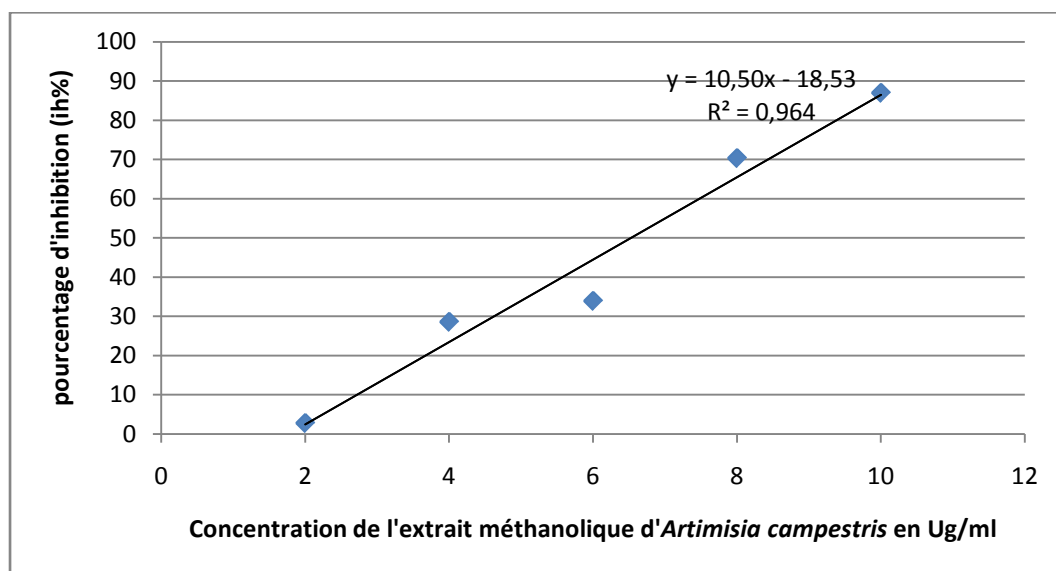


Figure 18 : Activité antiradicalaire du test de DPPH de l'extrait méthanolique d'*Artimisia campestris*

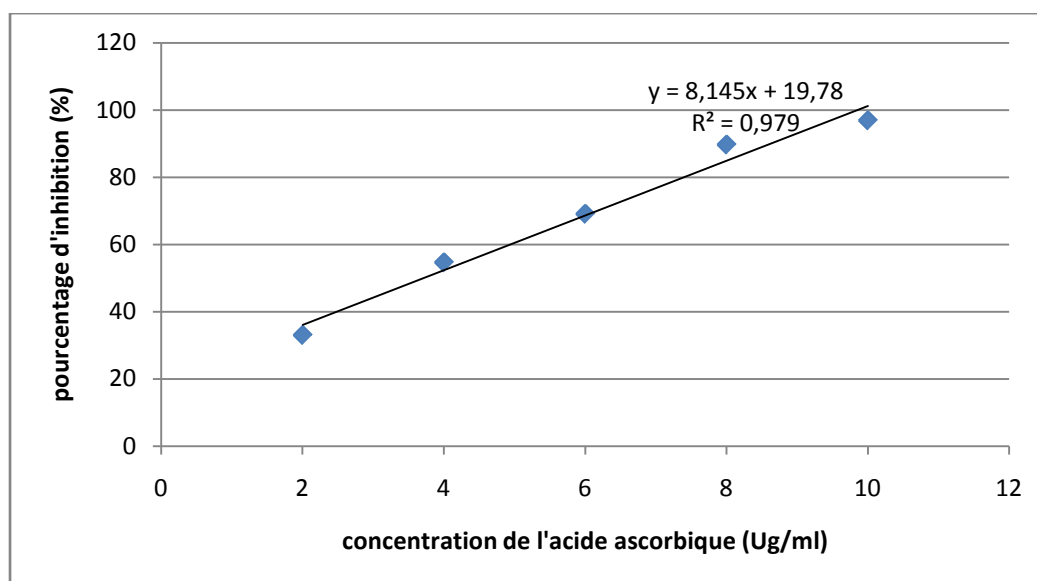


Figure 19 : Activité antiradicalaire du test de DPPH de l'acide ascorbique

Tableau14 : Les IC50 des extraits méthanolique des deux plantes et l'acide ascorbique

Phase	IC50 (µg/ml)
<i>Artemisia campestris</i>	6,526
<i>Marrubium vulgare</i>	7,53
Acide ascorbique	3.71

Nos résultats indiquent que l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* présente une activité remarquable vis-à-vis du piégeage du DPPH avec un IC50 de 6.526 µg/ml. Ceci est en parfaite concordance avec les résultats de Akrouf, Gonzalez, El Jani, Madrid [10] ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits d'*Artemisia campestris*, ils ont trouvé une pouvoir antioxydant très élevé; alors que le pouvoir anti-radicalaire a été enregistré avec notre extrait méthanolique du *Marrubium vulgare* est important que celui obtenu avec l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* avec un IC50 de 7.53µg/ml. L'activité antioxydante par la même méthode est mesurée pour l'acide ascorbique, pris comme antioxydant de référence. Ce dernier

à manifesté in vitro une capacité très puissante sur le radical libre DPPH, , justifiée par la valeur IC50 la plus basse obtenue expérimentalement par cette méthode (3.71µg/ml). Ce standard (ac. ascorbique) demeure le piègeur le plus efficace, dirigé contre les radicaux libres dans les systèmes biologiques hydrosolubles. Les résultats de cette activité sont en accord avec d'autres études des travaux réalisés par Orhan[181] , affirment que l'extrait méthanolique est moins actif que l'extrait acétonique de *Marrubium vulgare*. Contrairement, avec les résultats de Boudjelal [74] obtenus à partir de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Marrubium vulgare* qui a montré une activité antioxydante élevée avec une valeur d'IC50 de l'ordre de 0,49 mg/ml.

L'activité anti-radicalaire des extraits est donc relativement dépendante de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes. Par exemple l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* qui représente la fraction la plus faible en polyphénols, possède l'effet scavenger le plus bas par rapport à l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* qui représente la fraction la plus riche en polyphénol et donc possède l'effet scavenger le plus fort.

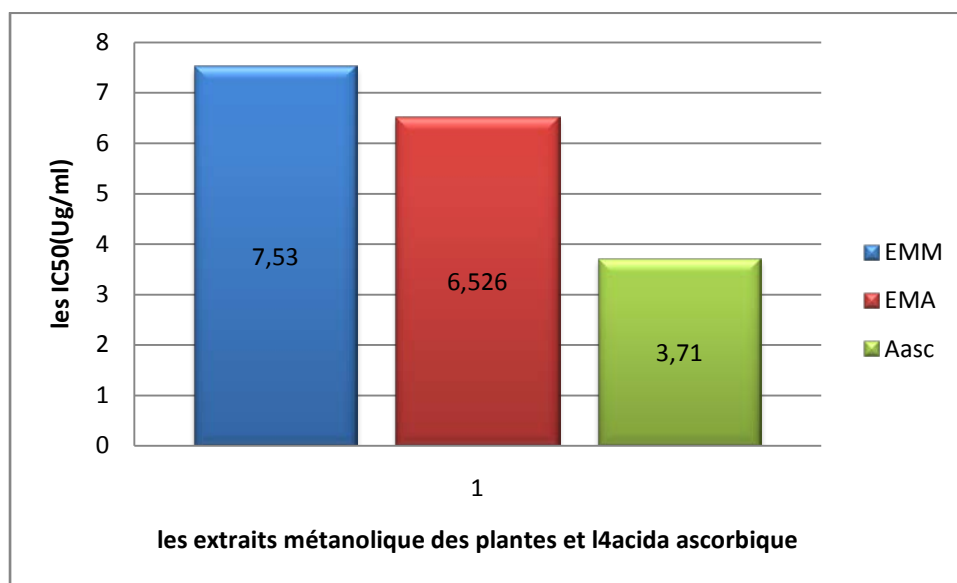


Figure20 : Les concentrations des extraits méthanolique de *Marrubium vulgare*, *Artemisia campestris* et de l'acide asorbique inhibent 50 % du radical DPPH°. (**EMM**: Extrait méthanolique du *Marrubium vulgare*, **EMA**: Extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* , **Aasc**: Acide ascorbique)

Globalement, les résultats obtenus dans le présent travail indiquent l'existence d'une corrélation linéaire remarquable et significative entre le pouvoir antiradicalaire des extraits méthanolique d'*Artemisia campestris* et de *Marrubium vulgare* et leur teneur en composés phénoliques ($r^2 = 0,979$) et en flavonoïdes ($r^2 = 0,999$). Pour *Artemisia campestris* et pour *Marrubium vulgare* la teneur en composé phénolique ($r^2 = 0,904$) et en flavonoïdes ($r^2 = 0,957$) respectivement.

En effet, les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène [179]. L'effet scavenger des flavonoïdes est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capable de réduire les radicaux libres par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyle, [182]. En outre, dans le but d'identifier les sites potentiels au sein des flavonoïdes qui sont responsables sur l'effet antiradicalaire vis-à-vis du radical DPPH, plusieurs travaux ont étudié la cinétique et le mécanisme réactionnel des flavonoïdes avec ce radical stable. De plus, Amič [183] ont mis en évidence la relation structure fonction de 29 flavonoïdes (flavones, flavonols et flavanones) et leurs capacités de piéger le DPPH. Les résultats de cette étude ont montré que les flavonoïdes les plus efficaces sont ceux qui renferment des groupements 3',4'- dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3-OH sur le cycle C.

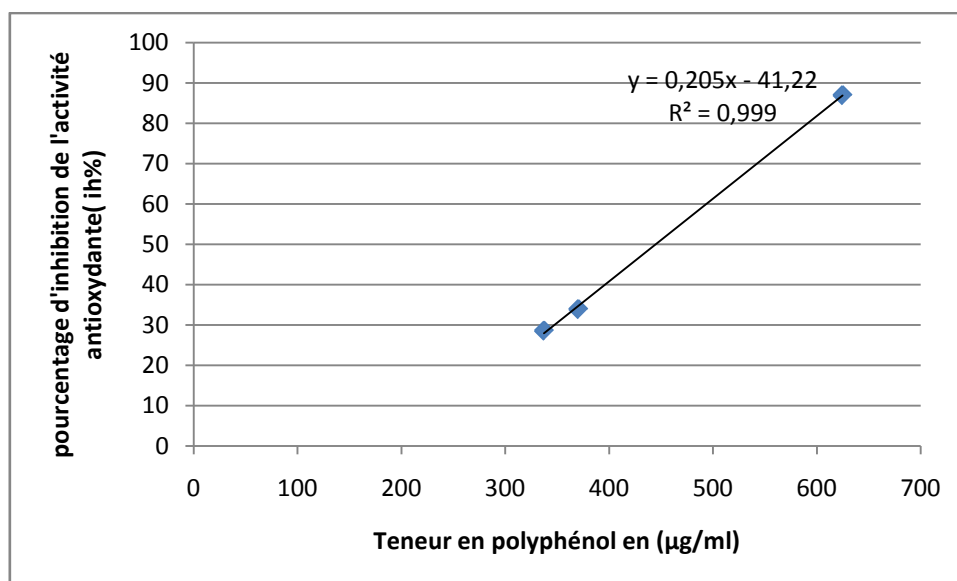


Figure 21 : courbe représente La corrélation entre la teneur en polyphénols et le pourcentage d'inhibition de radical DPPH pour *Artemisia campestris*

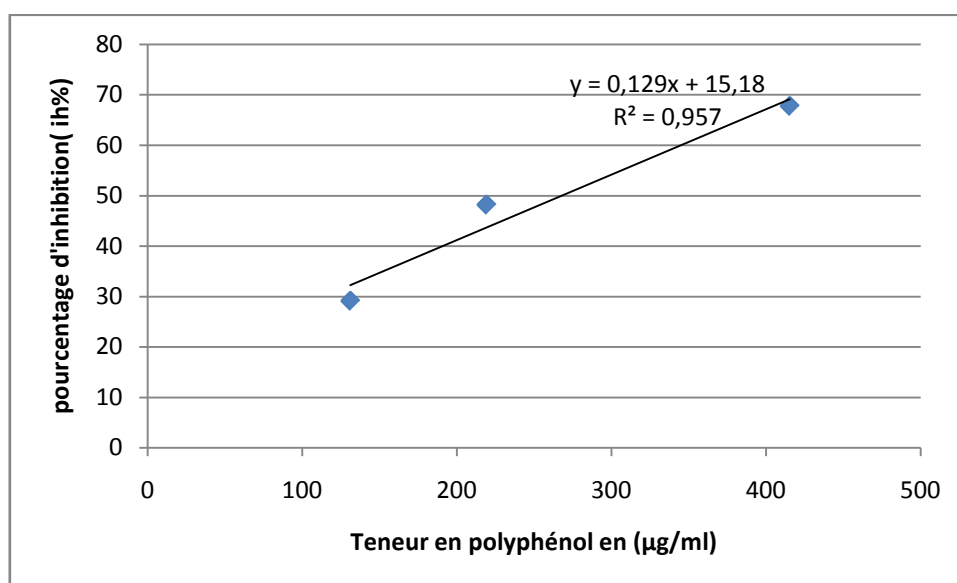


Figure 22 : courbe représente La corrélation entre la teneur en polyphénols et le pourcentage d'inhibition de radical DPPH pour *Marrubium vulgare*

V.5.2-Activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène

Bien que le peroxyde d'hydrogène ne soit pas un radical libre proprement dit, mais il représente une source importante des radicaux libres hydroxyles qui sont toxiques, surtout en présence d'ions métalliques comme le cuivre ou le fer. Aussi, le peroxyde d'hydrogène peut traverser les membranes cellulaires et peut donc oxyder et endommager de nombreux composés cellulaires.

Dans la présente étude, on soumet cette molécule qui est plutôt toxique à l'effet des antioxydants présents dans les extraits végétaux et on suit l'évolution de la réaction en fonction du temps (10 minutes) puis on calcule le pourcentage du piégeage du H₂O₂.

La diminution de ce pourcentage est proportionnelle à la diminution de l'absorbance, cette dernière est due à la molécule de H₂O₂ qui absorbe dans l'UV à 230 nm [184]. Les résultats trouvés montrent qu'au cours de la réaction l'absorbance à 230 nm diminue en fonction du temps. Cela prouve que le peroxyde d'hydrogène cause de cette absorbance.

Nous avons étudié l'activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène des extraits méthanolique d'*Artimisia campestris* et de *Marrubium vulgare* et les résultats des pourcentages d'inhibition sont rapportés dans les tableaux (14,15) et les figures (25,26)

Tableau15 : Pourcentage d'inhibition de l'activité antiradicalaire de test de peroxyde d'hydrogène de l'extrait méthanolique du *Marrubium vulgare*

Concentration (mg /ml)	0,25	0,5	1
<i>Marrubium Vulgare</i>			
Pourcentage d'inhibition(Ih%)	2,22	12	40,30

Tableau 16 : Pourcentage d'inhibition de l'activité antiradicalaire de test de peroxyde d'hydrogène de l'extrait méthanolique d'*Artimisia campestris*

Concentration (mg /ml) <i>Artimisia campestris</i>	0,25	0,5	1
Pourcentage d'inhibition(Ih%)	5,01	17,24	72,54

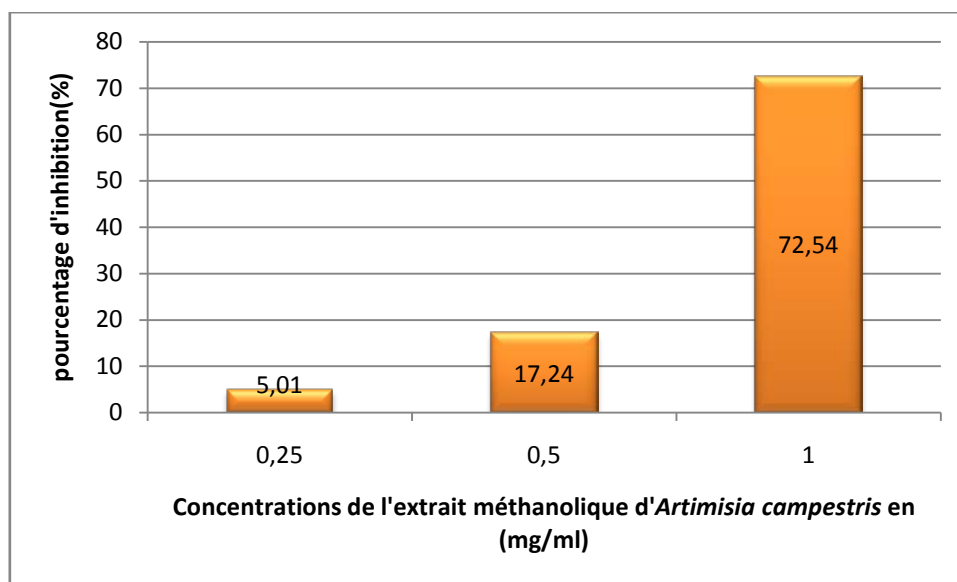


Figure 23: Histogramme des pourcentages de piégeage du peroxyde d'hydrogène pour l'extrait méthanolique d'*Artimisia campestris*

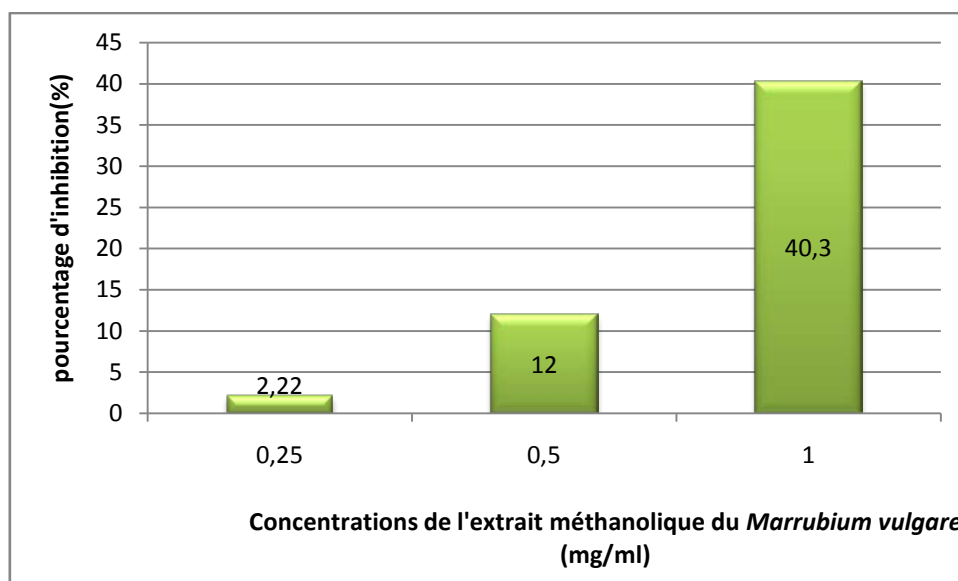


Figure24 : Histogramme des pourcentages de piégeage peroxyde d'hydrogène pour l'extrait méthanolique du *Marrubium vulgare*

D'après les résultats, illustrées dans les tableaux et les figures, pour les fractions méthanoliques des plantes *Artemisia campestris* et *Marrubium vulgare*, les pourcentages d'inhibition du peroxyde d'hydrogène sont de 2.22, 12 et 40.4% respectivement des concentrations 250 et 500 et 1000 $\mu\text{g/ml}$ pour *Marrubium vulgare* et de 5.01, 17.24 et 72.54% respectivement avec les mêmes concentrations pour *Artemisia campestris*. On constate que la fraction méthanolique d'*Artemisia campestris* était la plus efficace par rapport à l'extrait méthanolique du *Marrubium vulgare* et que l'effet inhibiteur du peroxyde d'hydrogène, pour les deux plantes, obtenu est dose-dépendant. Ces résultats sont compatibles avec ceux de l'effet scavenger du DPPH.

Globalement, les résultats obtenus dans le présent travail indiquent l'existence d'une corrélation linéaire remarquable et significative entre le pouvoir antiradicalaire des extraits méthanolique d'*Artemisia campestris* et de *Marrubium vulgare* avec leur teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes ($r^2 = 0,997$, $r^2 = 0,968$) ($r^2 = 0,99$ et $r^2 = 0,87$) pour *Artemisia campestris* et *Marrubium vulgare* respectivement.

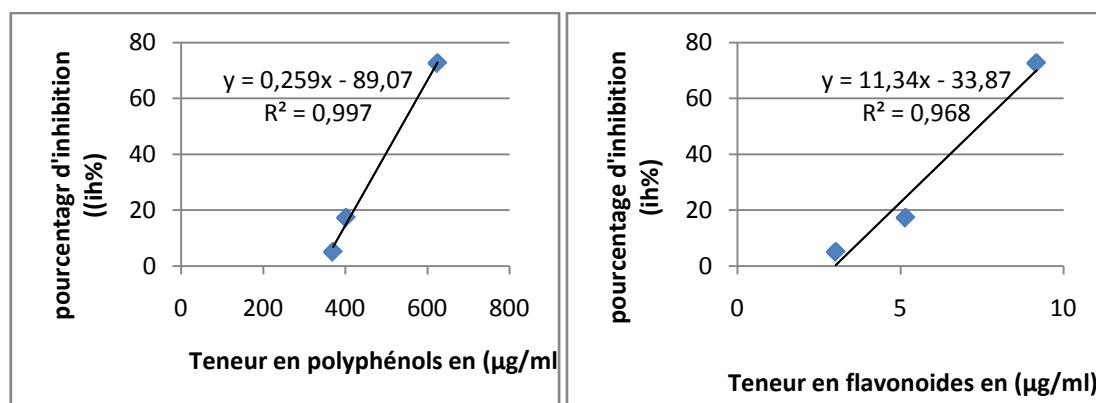


Figure 25 : Courbes représentent la corrélation entre la teneur en polyphénols, flavonoïdes et le pourcentage d'inhibition pour *Artemisia campestris*

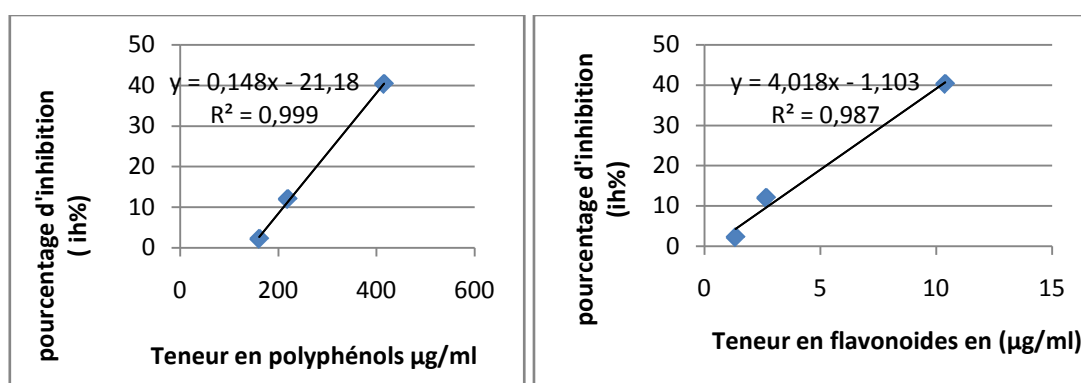


Figure 26: Courbes représentent la corrélation entre la teneur en polyphénols, flavonoïdes et le pourcentage d'inhibition pour *Marrubium vulgare*

*Conclusion et
perspectives*

Conclusion et perspectives

A l'issue de la présente étude qui contribue à la valorisation des plantes médicinales de notre pays, nos investigations ont porté sur l'activité antioxydante des extraits méthanoliques des deux plantes.

Dans le présent travail, différents aspects d'*Artemisia campestris* et de *Marrubium vulgare* ont été étudiés; l'extraction de la partie aérienne de ces plantes a permis d'obtenir des rendements qui diffèrent en fonction l'espèce végétale et une richesse en métabolites secondaires alors que l'analyse quantitative de l'extrait hydrométhanolique est représentée par le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes révélant une concentration de 3.972 µg/mg et 3,046 µg/mg en flavonoïdes pour l'*Artemisia campestris* et *Marrubium vulgare* respectivement, et une concentration de 405.606 µg /mg et 208,102 µg/mg de polyphénols totaux d'*Artemisia campestris* et *Marrubium vulgare* respectivement.

L'activité antioxydante des extraits méthanolique d'*Artemisia campestris* et de *Marrubium vulgare* a été évaluée *in vitro* par deux méthodes : la méthode de réduction de radical libre DPPH et le test de piégeage de peroxyde d'hydrogène; pour le premier test les résultats ont montré que l'oxydation du DPPH est efficacement inhibée par les extraits des plantes. Par ailleurs, l'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* a montré une très forte activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical DPPH que le *Marrubium vulgare* avec des IC50 6.526µg/ml et 7.53µg/ml respectivement, par rapport à IC50 de l'acide ascorbique 3,71µg/ml, même ces résultats sont remarquée aussi avec le test de peroxyde d'hydrogène avec un pourcentage égal à 72.54% pour l'*Artemisia campestris* qui est supérieur à celui du *Marrubium vulgare* avec 40.32% pour une concentration à savoir 1mg/ml.

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

*Références
bibliographiques*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] **Iserin L.** Identification, préparation, soins. Larousse des plantes médicinales. 2001; 10.
- [2] **Pan Y, Wang K, Huang S, Wang H, Mu X, He C, Ji X, Zhang J and Huang F.** Antioxydant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel, *Food Chemistry*. 2008; 106: 1264-70.
- [3] **Pelli K et Lyly M.** Les antioxydants dans l'alimentation. VTT Biotechnology Finlande. 2003; 3: 9.
- [4] **Gaussen H, et Leroy H. F.** Précis de botanique. végétaux supérieurs. 1982 2^{ème} Ed : Masson. Paris; 426.
- [5] **Pascual J.T, Gonzalez M, Muriel M.R and Bellid I.S.** Phenolic derivatives from *Artemisia campestris* Subsp *Glutinosa*. *Phytochemistry*. 1984; 23(8): 1819-21.
- [6] **Rauter A.P, Branco I, Tostao Z, Pais M.S, Gonzalez A.G et Bermejo J.B.** Flavonoids from *Artemisia campestris* Subsp *Maritima*. *Phytochemistry*. 1989; 28 (8): 2173-75.
- [7] **Joa O.M, Vasconcelos, Artur M.S.S and Jose A.S.C.** Chromones and flavones from *Artemisia campestris* Subsp *Maritima*. *Phytochemistry*. 1998; 49(5): 1421-24.
- [8] **Akrout A, Chemli R.C, Chrief and Hammami M.** Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. *J. Flavour Fragr.* 2001; 16: 337-39.
- [9] **Sefi M, Fetoui H, Makni M, Najiba and Zeghal N.** 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.* 2010; 48: 1986-93.
- [10] **Akrout A, Gonzalez L.A, El Jani H.J and Madrid P.C.** Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaeahirsuta* from southern of Tunisia. *J. Food. Chem. Tox.* 2011; 49: 342-47.
- [11] **Frederich M.V. Janvier. espace Duesberg. 2014.**
- [12] **Bruneton J.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. En 3^{ème} Ed. Lavoisier, éditeur : Techniques et Documentation. Paris. 1999;199-388.

- [13] **Kansole M.** Etude Ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques *lamiaceae* du Burkinafaso : cas de leucas *Martinicensis*(Jacquin) R. Brown, *Hoslundia Opposita*. 2009.
- [14] **Chevaltier L.C et crouzet-segana.** les médicaments a base des plantes. 2004; 2: 25-30.
- [15] **Benkiki N.** études phytochimique des plantes médicinales Algériennes, *ruta montana matricaria* , pubescens et hypericumperfoliatien. 2006; 7-8.
- [16] **Triki A.S.** Effets biologique de polyphénols extraits des plantes médicinales (*Ranunculus repens* L et *Thymus*) responsable de certaines pathologie, thèse agister , université Mentouri Constantine. 2002; 33-53.
- [17] **Bruneton J.** Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, revue et augmentée, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales. 2009; 4: 1288.
- [18] **Lutge U, Kluge M, et Bauer G.** Technique et documentation. Botanique 3^{ème} Ed. Lavoisier .Paris. 2002; 211.
- [19] **Abderrazak M et Joël R.** La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. 2007; 177.
- [20] **Lugasi ., Hovari J, Sagik, and Biro L.** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases J. Acta. biologica. szegediensis . 2003; 47(14):119-25.
- [21] **Tapiero H, Tew K.D, Nguyen B.G and Mathé G.** Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies? Biomed. pharmacother. 2002; 56: 200-07.
- [22] **Boizot N et Charpentier J.P.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. Le cahier des techniques de l'Inra . 2006; 79-82.
- [23] **Bruneton.** Pharmacognosie, phytochimie Plantes médicinales, technique et documentation. Lavoisier. Paris. 1993; 2: 266- 275.
- [24] **Crozier, Einar Jensen, Michael E.J, Lean, Morag S and Mcdonald.** Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A . 1997; 761- 315-21.
- [25] **Seyoum A, Asres K and El-Fiky F.K.** Structure– radical scavenging activity relationships of flavonoids. Phytochemistry. 2006; 67: 2058-70.

- [26] **Ghestem A, Seguin E, Paris M and Orecchioni A.M.** Le préparateur en pharmacie dossier 2ème Ed TEC&DOC. Paris. (Cited in Djemai Zoueglache S, 2008). 2001; 275.
- [27] **Harborne J.B and Williams C.A.** Advances in flavonoid research since 1992 *Phytochemistry*. 2000; 55: 481-504.
- [28] **Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras A.R, Simonic M and Knez Z.** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chem.* 2005; 89: 191-8.
- [29] **Dacosta Y.** Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008). 2003; 317.
- [30] **Chebrouk F.** Caractérisations analytiques de quelques composés polyphénoliques et terpéniques issus de la plante *Marrubium deserti* de la région de Ghardaïa. Magister. Université Kasdi Merbah Ouargla. 2009.
- [31] **Effendi L and Yajun Y.** Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 2008; 8:172-81.
- [32] **Medic-Saric M, Jasprica I, Smolic-Bubalo A, and Momar A.** Optimization of chromatographic conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. *Croatica Chemica Acta*. (cited in Mohammedi Z, 2005). 2003; 77 (1-2):361-6.
- [33] **Grotewold E.** The genetics and biochemistry of floral pigments. Erich Grotewold, *The Science of Flavonoids*, Springer, *Annu Rev Plant Biol.* 2006; 57:761-80.
- [34] **Grace k, Pereira Paulo M, Donate Sergio E, and Galembeck E.** *The Science of Flavonoids*, Springer. 2006.
- [35] **Luigia Longo and Giuseppe Vasapollo.** Extraction and identification of anthocyanins from *Smilax aspera* L. berries, *Food Chemistry*. 2006; 226-31.
- [36] **Jaime A and Yanez.** Preston; Andrews, Neal M. Davies, *Methods of analysis and separation of chiral flavonoids*, *Journal of Chromatography B*. 2007; 8(48): 159-81.
- [37] **Stobiecki M, A Skirycz, L Kerhoas, P Kachlick, D Muth, J Einhorn And B. Mueller.** Roeber, Profiling of phenolic glycosidic conjugates in leaves of *Arabidopsis thaliana* using LC/MS, *Metabolomics*. 2006; 197-219.
- [38] **Paris M et M Hurabielle.** *Abrégé de matière médicale*. Masson. 1986; 2: 256- 266.

- [39]Ghestem A, Seguin E, Paris M, and Orecchioni A.M. Le préparateur en pharmacie dossier. Paris; 2 :275.
- [40]Khanbabae K and REE T.R. Tannins: Classification and Defenition. Journal of Royal Society of Chemistry. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008). 2001; 18: 641-49.
- [41]Xie D.Y and Dixon R.A. Proanthocyanidins biosynthesis-still more question thananswers .Phytochemistry. 2005; 66: 2127-44.
- [42]Vivas N, Nonier M.F, Pianet I, Vivas de Gaulejac N et Fouquet E. Proanthocy anidinsfrom Quercuspetr. 2006.
- [43]Bahorun T. Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and agricultural resarch council, Réduit, Mauritius. 1997; 83-94.
- [44]Babar Ali M, Hahn E.J and Paek K.Y. Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in Panax ginseng Bioreactor Root Suspension Cultures. Molécules. 2007; 607-621.
- [45]Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M and Abdelly C. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .C. R. Biologies. 2008; 331: 372-79.
- [46]Gómez-Caravaca A.M, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, and Fernández-Gutiérrez, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2006; 41: 1220- 34.
- [47]Martin S et Andriantsitohaina R. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polybvg au niveau de l'endothélium. Annales de cardiologie et d'angéiologie. 2002.
- [48]Wichtl M et Anton R. Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale. science et thérapeutique. Édition LAVOISIR, Paris. 2009; 38-41.
- [49]Hopkins W.G. Physiologie végétale. 2ème édition américaine, de Boeck et Lancier S A, Paris. 2003; 514.
- [50]Guignard J.L. Abrégé botanique, 9 èmeédition. Édition Masson, Paris. 1994; 204.

- [51] **Delille L.** les plantes médicinales d'Algérie. Édition BERTI. Alger. 2007; 122.
- [52] **Judd W.S, Campbell C.S, Kellogg E.A et Stevens P.** Botanique Systématique, une perspective phylogénétique. Edition De Boeck Université. 2002; 84 -7, 396-99.
- [53] **Iserin P.** Encyclopédie des plantes médicinales, Larousse VUEF, 2^{ème} Ed., Paris. 2001; 14-275.
- [54] **Kirrmann J, Cantacuzene P and Duhamel.** Chimie organique fonctions complexes, éd. Librairie Colin. Paris. 1975;3: 197-199.
- [55] **Vallet.** Contribution à l'étude de la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques chez le *Datura innoxia* Mill, transformation par *agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes* et culture de chevelus lacunaires, mémoire D.E.A. Université de Picardie Jules Vienne. 1996; 1-32.
- [56] **Mucciarelli M and Maffei M.** *Artemisia*: Introduction to the Genus Vol. 18 Ed Colin W.W. in Taylor & Francis. Ed. London and New York. 2002; 10-6.
- [57] **Kundan S and Anupam S.** The Genus *Artemisia*: A Comprehensive Review. J. Pharm. Biol. 2010; 1-9.
- [58] **Mirjalili M.H, Tabatabaei S.M.F, Hadian J, Nejad S and Sonboli A.** Phenological Variation of the essential oil of *Artemisia scoparia* from Iran. *J. Essent. Oil Res.* 2007; 19: 326-29.
- [59] **David A et Hervé M.** Flore de la suisse. Ed Du Griffon Neuchâtel. Suisse. 1994; 428.
- [60] **Ozenda P.** Flore du Sahara Ed : éditions du centre nationale de la recherche scientifique. Paris. 1983; 441.
- [61] **Quezel et Santa.** Nouvelle flore de l'Algérie Ed : éditions du centre nationale de la recherche scientifique .Paris. 1962; I: 990.
- [62] **Caratini R.** Bordasencyclopedie. Ed *Bodas*. Belgique. 1971; 23: 137-95.
- [63] **Vernin G, Merad O, Vernin G.M.F, Zamkotsian R.M and Parkanyi C.** GC-MS analysis of *Artemisia herba-alba* Asso essential oils from Algeria. *Dev. Food Sci.* 1995; 37: 147-205.

- [64]Kyeong W.Y, Anwar M and Jong H.K. Effects of the Aqueous Extract from *Artemisia campestris ssp. caudata* on Mycorrhizal Fungi Colonization and Growth of Sand Dune Grasses. *J. Plant. Biology* . 2007; 50 (3): 358-61.
- [65]Joa O.M, Vasconcelo., Artur M.S.S and Jose A.S.C. Chromones and flavones from *Artemisia campestris* Subsp *Maritima*. *Phytochemistr* . 1998; 49 (5): 1421-24.
- [66]Juteau F, Masotti V, Bessière J.M and Viano J. Compositional characteristics of the essential oil of *Artemisia campestris var. glutinosa*. *Bioch. Syst. Eco.* 2002; 1 (30): 1065-70.
- [67]Jerkovic J, Mastelic M, Milos, Juteau F, Masotti V and Viano J. Chemical variability of *Artemisia vulgaris* L. essential oils originated from the Mediterranean area of France and Croatia *Flavour. Fragr. J.* 2003; 18: 436-40.
- [68]Valant-Vetschera K.M, Fischer R and Wollenweber E. Exudate flavonoids in species of *Artemisia* (*Asteraceae-Anthemideae*): new results and chemosystematic interpretation. *Biochem. Syst. Eco* . 2003; 31: 487-98.
- [69]Naili M.B, Alghazeer O.A, Saleh N.A and Al-Najjar A.Y. Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (*Astraceae*) and *Ziziphus lotus* (*Rhamnaceae*). *Arab. J.* 2010;3: 79-84.
- [70]Dob T, Dahmane D, Berramdane T and Chelghoum C. Chemical Composition of the Essential Oil of *Artemisia campestris* L. from Algeria. *J. Pharm. Bio.* 2005; 43(6): 512-14.
- [71]Sefi M, Fetoui H, Makni M and Najiba Zeghal N. 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.* 2010; 48: 1986-93.
- [72]Ben Sassi A, Harzallah-Skhiri F, and Aouni M. Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. *J. Pharmaco. Bio.* 2007; 45 (5): 421-28.
- [73]Saoudi M, Allagui M.S, Abdelmouleh A, Jamoussi K, and El Feki A. Protective effects of aqueous extract of *Artemisia campestris* against puffer fish *Lagocephalus lagocephalus* extract-induced oxidative damage in rats. *Exp.Tox.Pathol.* 2010; 62: 601-05.

- [74]**Boudjelal A, Henchiri C, Siracusa L, Sari M and Ruberto G.** Compositional analysis and in vivo antidiabetic Activity of Wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. *Fitoterapia*. 2012, 83: 286-92.
- [75]**Rigano D, Formisano C, Basile A, Lavitola A, Senatore F, Rosselli S and Bruno M.** Antibacterial activity of flavonoids and phenylpropanoids from *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum*, *J. Phytother. Res.* 2006 21: 395-97.
- [76]**Meyre-silva C, Yunes R.A, Schlemper V, Campos-buzzi F and Cechinel V.** Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* (*Lamiaceae*), *IL Farmaco*. 2005; 60 (4) : 321-26.
- [77]**Bonnier G.** Flore Complète La Végétation de la France, Suisse et Belgique. 1990; 09 : 25-6.
- [78]**Boukef M.K.** Médecine Traditionnelle et Pharmacopée, Les plantes de la médecine traditionnelle tunisienne, Agence de Coopération Culturelle et Technique. Paris. France. 1986;163-64.
- [79]**Aouadhi S.** mémoire Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle étude de 57 plantes recommandées par les herboristes. 2010.
- [80]**Judd W.S, Campbell C.S, Kellogg E.A and Steven P.** Botanique systématique : Une perspective phylogénétique. 1ere Ed. Paris et Bruxelles. 2002; 369-84.
- [81]**Quezel P et Santa S.** La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed : CNRS. Paris . 1963; II: 360-361.
- [82]**Bellakhdar J.** Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires, La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ed. Le Fennecet Ibio Press, impression : Dunes France. 1997; 341.
- [83]**Bonnier G.** La Végétation de la France, Flore Complète. Suisse et Belgique. Paris. 1909; 09: 25-6.
- [84]**Baba issa F.** Encyclopédie des plantes utiles, Flore d'Algerie et du Maghreb. Edition Edas. 1999; 368.
- [85]**Çitoğlu G.S and Aksit F.** Occurence of *marrubiin* and *ladanein* in *Marrubium trachyticum* Boiss. from Turkey. *Biochem Syst Ecol*. 2002; 30: 885-86.

- [86]Nawwar M.A.M, El-Mousallamy A.M.D, Barakat H.H, Buddrus J and Linscheid M. Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry*. 1989; 28: 3201-06.
- [87]Papoutis Z, Kassi E, Mitakou S, Aligiannis N, Tsiapara A and Chrousos G.P. Acteoside and martynoside exhibit estrogenic/antiestrogenic properties. *J. Steroid Biochem Mol Biol*. 2006; 98: 63-71.
- [88]Wichtl M et Anton R. *Plantes thérapeutiques : Traditions, Pratique officinale, Sciences et Thérapeutique*. 2^e Ed : TEC & DOC. Paris. 2003; 1-364.
- [89]Raynaud J. *Prescription et conseil en phytothérapie*. 2007; 215.
- [90]Dejesus R.A, Cechinel-filho V, Oliveira A.E and Schlemper V. Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubium vulgare*, *Phytomedicine*. 2000; 7: 111-15.
- [91]El bardai S, Lyoussi B, Wibo M and Morel N. Comparative Study of the antihypertensive activity of *Marrubium vulgare* and of the dihydropyridine calcium antagonist amlodipine in spontaneously hypertensive rat, *Clin. Exp. Hypertens* . 2004; 6: 465-74.
- [92]Rigano D, Aviello G, Bruno M, Formisano C, Rosselli S, Capasso R, Senatore F, Izzo A.A and Borrelli F. Antispasmodic Effects and Structure–Activity Relationships of Labdane Diterpenoids from *Marrubium globosum ssp. libanoticum*, *J. Nat. Prod.*, Vol. 2009; 72: 1477-81.
- [93]Stulzer H, Tagliari M, Zampirolo J, Cechinel-filho V and Schlemper V. Antioedematogenic effect of *marrubiin* obtained from *Marrubium vulgare*, *J. Ethnopharmacol*. 2006; 108 (3): 379-84.
- [94]Pavela R. Insecticidal activity of certain medicinal plants. *Fitoterapia*. 2004; 75: 745-49.
- [95]Sahpaz S, Hennebelle T and Bailleul F. Marruboside, a new phenylethanoid glycoside from *Marrubium vulgare* L. *Natural Product Letters* . 2002; 16(3): 195-9.
- [96]Quave C, Plano L, Pantuso T and Bennett B. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillinresistant *Staphylococcus aureus*, *J. Ethnopharmacol* . 2008; 118 (3): 418-28.

- [97]Warda K, Markouk M, Bekkouche K, Larhsini M, Abbad A, Romane A and Bouskraoui M. Antibacterial evaluation of selected Moroccan medicinal plants against *Streptococcus pneumoniae*, *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 2009; 3 (3): 101-04.
- [98]Weel K.C.G, Venskutonis P.R, Pukalskas A, Gruzdiene D and Linssen J.P.H.. Antioxidant activity of horehound (*Marrubium vulgare*) grown in Lithuania, *J. Fett/Lipid.* 1999; 101 (10) : 395-400.
- [99]Edziri H, Ammar S, Groh P, Mahjoub M.A, Mastouri M, Gutmann L, Zine M and Aouni M. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Marrubium alysson* and *Retama retama* in Tunisia, *Pak. J. Biol. Sci.* 2007; 10: 1759-62.
- [100]Alkhatib R, Joha S, Cheok M, Roumy V, Idziorek T, Preudhomme C, Quesnel B, Sahpaz S, Bailleul F and Hennebelle T. Activity of Ladanein on Leukemia Cell Lines and Its Occurrence in *Marrubium vulgare*, *Planta Medica.* 2010; 76 (1): 86-87.
- [101]Valnet J. Phytothérapie. traitement des maladies par les plantes, Ed. Maloine S. A. Paris. 1983.
- [102]Favier A. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité en chimie.* 2003; 108-15.
- [103]Guinebert E, Durand P, Prost M, Grinand R and Bernigault R. Mesure de la résistance aux radicaux libres. *Sixièmes Journées de la Recherche Avicole.* 2005; 554-58.
- [104]Halliwell B. The antioxidant paradox: less paradoxical now. *Br J Clin Pharmacol.* 2013; 75(3):637-44.
- [105]Sayre L.M, Moreira P.I, Smith M.A and Perry G. Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Ann Ist Super Sanità.* 2008; 41(2) : 143-164.
- [106]Bloomer RJ and Fisher-Wellman K.H. Blood Oxidative Stress Biomarkers: Influence of Sex, Training Status, and Dietary Intake. *Gender Medicine.* 2008; 5(3): 218-28.
- [107]Browne R.W, Bloom M.S, Schisterman E.F, Hovey K, Trevisan M, Wu C, Liu A and Wactawski-Wende J. Analytical and biological variation of biomarkers of oxidative stress during the menstrual cycle. *Biomarkers.* 2008; 2: 160-83.

- [108]**Powers S.K, Smuder A.J, Kavazis A.N and Hudson M.B.** Experimental guidelines for studies designed to investigate the impact of antioxidant supplementation on exercise performance. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 2010; 20: 2-14.
- [109]**Kirschvink N, Moffarts B and Lekeux P.** The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal*. 2008; 177 : 178-91.
- [110]**Mac Laren D.** Advances in sports and exercise science series. Nutrition and Sport. 8. Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F. Elsevier. 2007.
- [111]**Finaud J, Lac G and Filaire E.** Oxidative Stress. Relationship with Exercise and Training. 2006; 36 (4) : 327-58.
- [112]**Goto M, Ueda K, Hashimoto T, Fujiwara S, Matsuyama K, Kometani T and Kanazaw K.** A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'- deoxythymidine. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008; 45: 1318-25.
- [113]**Roberts R.A, Smith R.A and Safe S.** Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. *Toxicology*. 2010; 276 : 285-94.
- [114]**Codoner-Franch P, Pons-Morales S, Boix-Garcia L and Valls-Bellés V.** Oxidant/antioxidant status in obese children compared to pediatric patients with type 1 diabetes. *Pediatric Diabete*. 2010; 11 (4): 251-7.
- [115]**Marfak A.** Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les Radicaux issus des Alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de LIMOGES. 2003;187.
- [116]**Sevanian A, Nordenbrand K, Kim E, Ernester L and Hochstein P.** Microsomal lipid peroxidation : The role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. *Free Radic Biol Med*. 1990; 8:145-52.
- [117]**Antwerpen P.V.** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique : Ciblage du système myeloperoxydase /peroxyde d'hydrogène /chlorure. Thèse de Doctorat .Université libre de Bruxelles. 2006; 122.
- [118]**Babior B.M, Lambeth J.D and Nauseef W.** The neutrophil NADPH Oxidase. *Arch Biochem Biophys* . 2002; 397: 342-44.

- [119] **Gueye P.M.** Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-erythrocytaire sur le globule rouge .Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur Strosbourg. 2007; 247.
- [120] **Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P and Lomri A.** Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases, *Revue du Rhumatisme* . 2007; 74 :636-43.
- [121] **Hadi M.** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques, Thèse pour obtenir le titre de docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur, Domaine: Pharmacochimie, Université Strasbourg. 2004; I :155.
- [122] **Ardestani A and Yazdanparast R..** Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem.* 2007; 104: 21 -29.
- [123] **Touafek O.** Etude phytochimique de plantes médicinales du nord et du sud algérien. Thèse de doctorat. Université de Constantine. 2010; 9-12-76.
- [124] **Marfak A.** Radiolyse gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation des depsides. Thèse de doctorat Université de Limoges. 2011; 6-7-27-45.
- [125] **Cano N, Barnoud D, Schneider S.M, Vasson M.P, Hasselmann M and Lerverve X.** Traité de nutrition artificielle de l'adulte 3 ème édition. 2007; XVII :1189.
- [126] **Krippeit-Drews P, Lang F, Haussinger D, and Drews G.** H₂O₂ induced hyperpolarization of pancreatic B-cells .*Pflugers Arch.* 1994; 426: 552-54.
- [127] **Rehman A, Nourooz J and Moller W.** Increased oxidative damage to all DNA. bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Lett.* 1999; 448: 120-22.
- [128] **Jacques B et André R.** Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. 2004; 217-19- 20-23-25.
- [129] **Rizzo A.M, Berselli P and Zava S.** 2011 Endogenous antioxidants and radical scavengers. *Adv Exp Med Biol.*, (698) : 52-67.
- [130] **Lehucher-Michel M.P, Lesgards J.F et Delubac O.** Stress oxydant et pathologies humaines. *Press Med.* 2001; 30 : 1076-081.

- [131] **Halliwell B.** Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine, Ed 4. Oxford : Clarendon Press. 2006.
- [132] **Kohen R and Nyska A.** Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002; 30: 620-50.
- [133] **Flora S.J.S.** Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxi Med Cel Long.* 2009; 4 :191-206.
- [134] **Gardès-Albert M, Dominique B.R, Zohreh Abedinzadeh Z et Daniel J.D.** Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique *L'actualité chimique.* 2003; 91-96.
- [135] **Yu R, Mandlekar S and Tony Kong A.N.** Molecular mechanisms of butylated hydroxyanisole-induced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c. *Molecular Pharmacology.* 2000; 58: 431-437.
- [136] **Barlow S.M.** Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. Ed. Hudson . B.J.F. *Food Antioxidants.* 1990; 253-307.
- [137] **Ito N, Fukushima S and Tsuda H.** "Carcinogenicity and modification of the carcinogenic responses by BHA, BHT and other antioxidants". *CRC Critical Reviews in Toxicology.* 1985; 15: 109-50.
- [138] **Codoner-Franch P, Valls-Belles V, Arilla Codoner A and Alonso-Eglesiás E.** Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Translational Research* December. 2011.
- [139] **Mohanty P, Hamouda W and Garg R.** Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85 : 2970-3.
- [140] **Mohanty P, Ghanim H and Hamouda W.** Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes mononuclear cells. *Am J Clin Nutr.* 2002; 75: 767-72.
- [141] **Patel C, Ghanim H and Ravishankar S.** Prolonged reactive oxygen species generation and nuclear factor-Kappa B activation after a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92: 4476-9.

- [142] **Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K et Defraigne J.O.** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. 2002; 16: 233-39.
- [143] **Pincemail J.** Espèces oxygénées en médecine humaine: une approche didactique. Vaisseaux, Coeur, Poumon. 1998; 3: 133-8.
- [144] **Atawodi S. E.** Antioxidant potential of African plants. *African J. of Biotec.* 2005; 2:128-33.
- [145] **Georgetti S.R, Casagrande R, Di Mambro V.M, Azzolini E.C.S and Fonseca Maria J.V.** Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemilumin escence medhod. *AAPS Pharm Sc.* 2003; 2:5.
- [146] **karumi Y, Onyeyili PA and Ogugbuaja VO.** Identification of active principles of *M.balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. *JMed Sci.* 2004; 4(3): 179-82.
- [147] **Edeaga H.O, Okwu D.E and Mbaebie B.O.** Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African journal of biotechnology.* 2005; 4(7) :685-88.
- [148] **Bemahdi A.** Identification des Principes actifs des extraits des plantes medicinales. *Phytochimie.* 2001; 6:11-27.
- [149] **Wagner H and Bladt S.** Plant drug analysis: a thin layer chromatography. Atlas, Second edit. Springer. 1996; 384.
- [150] **Ciulei Ioan.** Pratical manuals on the industrial utilization of chemical and aromatic plants. Methodology for analysis of vegetable drugs Ed. ministry of chemical industry, Bucharest. 1982; 67.
- [151] **Mohammedi Z.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de magister. Tlemcen. 2006; 49-50.
- [152] **Wong C.C, Li H.B, Cheng K.W and Chen F.** A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. 2006; 12:120-30.
- [153] **Vuorela S.** Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics. Helsinki. 2005.

- [154]Djeridane A, Yous M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P and Vidal N. Antioxidant activity of some Algerian compounds. Food Chem. medicinal plants extracts containing phenolic. 2006; 97: 654-60.
- [155]Markowicz Bastos D.H, Saldanha L.A, Catharino R.R, Sawaya A.C.H, Cunha I.B.S, Carvalho P.O and Eberlin M.N. Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules*. 2007; 12: 423-32.
- [156]Maataoui B. S, Hmyene A and Hilali S. Activites anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*. 2006; 7: 3-8.
- [157]Celiktas O.Y, Hames Kocabas E.E, Bedir E, Vardar Sukan F, Ozek T and Baser K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem*. 2007; 100: 553-59.
- [158]Brand-William W, Cuelier M.E and Berset C. Use free radical method to evaluate antioxydant activity. *Lebensm. Wiss. Technol*. 1995; 28: 25-30.
- [159]Lopes-Lutz D, Alviano D, Alviono C.S and Kolodziejczyk P.P. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*. 2008; 69: 1732-38.
- [160]Wang S.Y, Wu J.H, Shyur L.F, Kuo Y.H and Chang S.T. Antioxidant Activity of Abietane-Type Diterpenes from Heartwood of *Taiwania cryptomerioides* Hayata *Holzforschung*. 2002; 56 (5).
- [161]Mensor L.L, Menezes F.S, Leitao G.G, Reis A.S, Santos T.C, Coube C.S and Leitao S.G. Screening of Barazilan plant extracts for antioxydant isoactivite by the yse of DPPH freeradical mrthod. *Phy-tother.Res*. 2001; 15: 127-30.
- [162]Shrinivas B and Suresh R.N. Identification of 3-carotene and 3-sitosterol in methanolic extract of *Dipteracanthus patulus* (Jacq) nees and their role in antimicrobial and antioxidant activity. *International Journal of Phytomedicine*. 2011; 3: 20.
- [163]Malgalhaes L.M, Segundo M.A, Reis S and Lima J. Methodological aspects about vitro evaluation of antioxidant properties . *Analytica Chemical Acta*. 2008; 613:1-19.
- [164]Su Y.C., Ho C.L and Wang E.I.C. Analysis of leaf essential oils from the indigenous five conifers of Taiwan, *Flavour Fragr. J*. 2006; 21(3): 447-52.

- [165]Gazi M. R , Kanda K et Kato F. Optimisation of Various Cultural Conditions on Growth and Antioxydant Activity Generation by *Saccharomyces cerevisiae* IFO 2373 . Journal of Biological Sciences. 2004; 4(2): 224-28.
- [166]Belkassam A, Zellagui A, Gherraf N, Lahouel M and Rhouati S. Essential oil composition of Algerian *Ruta montana* (Clus.) L. And it's antibacterial effects on microorganisms respon sible for respiratory infections. Advances in Natural and Applied Sciences. 2011; 5(3): 264-68.
- [167]Chitemerere T and Mukanganyama S. In Vitro Antibacterial activity of selected medicinal plants from Zimbabwe. The African Journal of Plant Science and Biotechnology. 2011; 5:1-7.
- [168]Marjorie M. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1999; 12: 564-82.
- [169]Kambouche N, Merah B, Bellahouel S, Bouayed J, Dicko A, Derdour A, Younos C and Soulimani R. Chemical composition and antioxidant potential of *Ruta montana* L. essential oil from Algeria. Journal of Medicinal Food. 2008; 11(3): 593-95.
- [170]Claisse R. Plante à usage dermatologique de la pharmacopée traditionnelle marocaine. Médicaments et aliments : l'approche ethnopharmacologique. 1993; 24(27) : 172-73.
- [171]Blasa M, Candiracci M, Accorsi A, Piacenti M.P and Piatti E. Honey flavonoids as protecion agents against oxidative damage to human red blood cells.Food Chemistry. 2007; 104:1635-40.
- [172]Maisutthisakul P, Pasuk S and Rithiruangdej P. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. J. Food Comp. Anal. 2008;21: 229-40.
- [173]Ebrahimi M, Rajion M.A, Goh Y.M and Sazili A.Q. Carcass quality of Malaysian Kacang crossbred goats fed diets supplemented with oil palm fronds. Proceedings of the 29th Malaysian Society for Animal Production (MSAP) Annual Conference: 25-27 May, Penang, Malaysia. 2008; 116-18.

- [174]Miliauskas G, Yenkutonis P.R and Van beek T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plants extracts. Food Chem. 2004; 85:231-237.
- [175]Lee S.B, Cho K.S, Kim E and Chung J. blistry encodes Drosophila tensin protein and interacts with integrin and the JNK signaling pathway during wing development. Development. 2003; 130(17): 4001-10.
- [176]Gomez C.M, Gomez R.M, Arraez R.D, Segura C.A and Fernandez G.A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. J Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2006; 41:1220-34.
- [177]Wu X, Beecher G.R, Holden J.M, Haytowitz, D.B, Gebhardt S.E and Prior R.L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. J. Agricultural and Food Chem. 2004; 52: 4026-37.
- [178]Yrjonen T. Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural products. Conference room 513 at viikki info center. Faculty of pharmacy of the university Helsinki. 2004; 64.
- [179]Javanovic S.V, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B and Simic M.J. Flavonoids as antioxidants. Journal of the American Chemical Society. 1994; 116: 4846-51.
- [180]Bozin N, Mimica -Dukic I and Samojlik A. Goran and R. Igetic, Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum L., Alliaceae*), Food Chemistry. 2008; 111: 925-29.
- [181]Orhan E, Belhatab R.3, Senol F.S, Gülpinar A.R, Hosbas S and Kartal 2010. Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare subsp. glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia species*. Industrial Crops and Products.2010; 32: 566-71.
- [182]Siddhuraju P and Becker K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata (L.) Walp.*) seed extracts. Food Chemistry ;101(1) : 10-19.
- [183]Amič D, Davidovic´-Amic´ D, Beslo D, and Trinajstić N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. Croatica Chemica Acta. 2003;76: 55-61.

[184]Malecky M. Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins ; Thèse de Doctorat de l'Institut des Sciences et Industries de Vivant et de l'Environnement (Agr. Paris. Tech), INRA. 2008; 27-35.

Annexe

Annexe

Préparation de Tampon phosphate (0,066 M, pH 7,5)

9,46g de disodium hydrogenophosphate dodecahydré ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dans 1L d'eau distillée .9,06 g de potassium phosphate monobasique (KH_2PO_4) dans 1L d'eau distillée. Prendre un grand bécher sur (1L) y verser environ 1L de la solution de potassium phosphate.

Mettre le bécher sur un agitateur magnétique .Utiliser un pHmètre précis. Le pH doit être proche de 4,5. Ajouter goutte à goutte la solution de sodium hydrogénophosphate jusqu'à l'obtention du pH désiré (de 5,3 à 8).

Année Universitaire: 2015 /2016	Présenter Par : Belguidoum Nour El Houda Methezem Meriem
<p align="center">Thème : Investigation phytochimique et étude -in vitro- de l'activité antioxydante des plantes médicinales de la région de Khenchela (<i>Marrubium vulgare</i> et <i>Artemisia campestris</i>)</p>	
<p align="center">Mémoire présente en vue l'obtention du diplôme master en Biochimie appliquée</p>	
<p>Résumé :</p> <p>Dans le cadre de la découverte de nouveaux antioxydants à partir des sources naturelles, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude des composés phénoliques et l'évaluation des propriétés antioxydants des extraits de deux plantes médicinales de la wilaya de Khenchela; <i>Marrubium vulgare</i> et <i>Artemisia campestris</i> qui sont encore utilisées dans la médecine traditionnelle.</p> <p>L'étude phytochimique des extraits a révélée la présence des flavonoïdes susceptibles d'exprimer l'activité recherchée.</p> <p>La première partie de cette étude concerne l'extraction et la quantification des phénols totaux, des flavonoïdes par le réactif du Folin-Ciocalcu, et par le trichlorure d'aluminium respectivement ; l'extrait méthanolique d'<i>Artemisia campestris</i> a montré une richesse et une corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et celle en flavonoïdes avec des valeurs de $405.606 \pm 31.179 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait et $3.179 \pm 0.927 \mu\text{g EQ/ mg}$ d'extrait respectivement. Ces valeurs sont supérieures à celles de l'extrait méthanolique du <i>Marrubium vulgare</i> avec $208.102 \pm 20.299 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait et $3.046 \pm 0.457 \mu\text{g EQ/mg}$. L'étude qualitative par CCM des extraits des deux plantes à montré une diversité remarquable des composés flavonoïques.</p> <p>La deuxième partie est l'étude <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante des extraits de plantes en utilisant deux techniques: effet scavenger du radical libre DPPH et le piégeage de peroxyde d'hydrogène.</p> <p>Par ailleurs, l'extrait méthanolique d'<i>Artemisia campestris</i> a montré une très forte activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical DPPH que le <i>Marrubium vulgare</i> avec des IC_{50} $6.526 \mu\text{g/ml}$ et $7.53 \mu\text{g/ml}$ respectivement, par rapport à IC_{50} de l'acide ascorbique $4.498 \mu\text{g/ml}$, même ces résultats sont remarquées aussi le test de peroxyde d'hydrogène avec un pourcentage égal à 72.54% pour l'<i>Artemisia campestris</i> qui est supérieur à celui du <i>Marrubium vulgare</i> avec 40.32% pour une concentration à savoir 1mg/ml.</p>	
<p>Mots clés : activité antioxydante, <i>Artemisia campestris</i>, flavonoïdes, <i>Marrubium vulgare</i>, polyphénols totaux</p>	
<p>Laboratoire de Biochimie, Département de Biologie moléculaire et cellulaire, Faculté des Sciences, Université AbbèsLaghrour khenchela</p>	
<p>Date De Soutenance : 24/05/2016</p>	