



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 : BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER ACADEMIQUE

FILIERE : **Biologie**

OPTION : **Biochimie appliquée**

Thème

***Etude de l'activité anti-oxydante et anti-
inflammatoire de «Cytisus villosus»***

Présenté par :

Latreche Manal

Soutenu le *06/07/2017*

Aorabi Soumia

Jury de soutenance :

Président : Dr. MAAMR H

(M.C.A) Univ.ABBES LAGHROUR -Khenchela-

Encadreur : Mr. BOUSSAA A

(M.A.A) Univ.ABBES LAGHROUR- Khenchela-

Examineur : Mr .ABAIDIA A

(M.A.A) Univ.ABBES LAGHROUR- Khenchela-

Promotion : 2017

Remerciements

Avant tout nous remercions "Allah" tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce travail.

*Nous remercions également les membres de jury le Président Dr.MAAMAR.H.
Et Examineur Mr ABAIDIA A, Que chacun d'entre eux soit vivement remercié de nous avoir fait l'honneur d'accepter, de participer à ce jury, et le plaisir d'assister à notre soutenance. Recevez, l'expression de notre respectueuse gratitude pour l'attention et l'intérêt qui a été porté à ce travail.*

nous tenons à remercier vivement notre encadreur et enseignant Mr Boussaa A, pour son encadrement, ses nombreux conseils et ses compétences scientifiques qui nous ont aidés tout au long de ce travail. Merci pour son soutien, ses nombreux encouragements et sa confiance.

Nous adressons un grand remerciement à l'ensemble des étudiants de master 2 Biochimie, ainsi que tous les étudiants du département de biologie.

Nous tenons à remercier aussi,

Le personnel de l'institut universitaire de biologie de la wilaya de Khenchela.

Nos enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie.

Nous remercions responsables de laboratoire de l'hôpital Boushaba Ali. Pour leur permission de réalisation de la dosage dans leur laboratoire

Notre très chers parents qui ont le droit de recevoir notre chaleureux remerciements pour le courage et le sacrifice qu'ils ont consentis pendant la durée de notre études en leurs souhaitant une longue vie pleine de joie et de santé.

Dédicace

À l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu

Réaliser ce travail que je dédie :

À la lumière de mes yeux Warda, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ; ma mère, qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.

À mon cher père Djamel Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail et le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.

Je le dédie également à notre encadreur;

Boussaa Abdalhelim

À mes frères : Md Amine, Daoud, Tarek et Youssef

À mes soeurs : Nahla et Oumayma.

À mon binôme : Latreche Manal

Je vous souhaite beaucoup de bonheur et de réussite.

À toute ma famille et toute personne qui me connaisse et me considère

À mes amis : Ahlem, Imen .Z, Imen.B , Nadia, Khawla,

Soumia

Dédicace

À l'aide de dieu tout puissant , tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, c'est tous simplement que : Je dédie cette mémoire de master:

A Mon très cher Père Salah: Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail et le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.

A Ma tendre Mère Salima : Tu représente pour moi la source de Tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

A mes soeurs: Imen, Soumia, Aya

A ma cher frère : MOHAMED Djihad

Je vous souhaite beaucoup de bonheur et de réussite.

À toute ma famille. et toute personne qui me connaisse et me considère

Je le dédie également à notre encadreur ; Boussaa Abdalhelim

A ma très cher amis

A mon binôme Aorabi Soumia

A tous les membres de ma promotion.

Avec qui j'ai partagé les joies et les difficultés durant ces années

Manal

Table des matières

Résumé	I
Liste des abréviations	II
Liste des figures	III
Liste des tableaux	IV
Introduction	01

Etude Bibliographique

Chapitre I: Généralité sur la plante médicinale (Cytisus villosus)

I. 1.Les plantes <i>médicinales</i>	03
I.2..La famille de fabaceae	03
I.3. L'espèce <i>Cytisus Villosus</i>	03
I.4.Caractères morphologiques.....	03
I.5. Classification de la plante <i>Cytisus villosus</i>	04

ChapitreII: L'activité anti-oxydante

II.1. Stress oxydant.....	06
II.2. Radicaux libres.....	06
II.3. Production de radicaux libres.....	07
II.4. Espèces réactives de l'oxygène	07
II.4.1.Les espèces oxygénées réactives radicalaires	07
II.4.2.Les espèces oxygénées réactives non radicalaires.....	08
II.5. Production des espèces réactives oxygénées.....	08
II.6. Sources des espèces réactives oxygénées	09
II.7. Conséquences biologiques des espèces réactives oxygénées ...	11
II.8. Les maladies du stress oxydatif.....	12
II.9. Mécanismes d'action des espèces réactives oxygénées et le stress oxydant	13
II.10. Les antioxydants	13

II.10.1. Antioxydants enzymatiques.....	13
II.10.2. Antioxydants non enzymatiques.....	15
<i>Chapitre III: L'activité Anti-inflammatoire</i>	
III.1. Activité Anti-inflammatoire.....	18
III.2. Définition de l'inflammation	18
III.3. Manifestations cliniques.....	19
III.4.Types d'inflammation.....	19
III.4.1.L'inflammation aiguë.....	19
III.4.2. L'inflammation chronique.....	22
III.5. Implications pathologiques de l'inflammation.....	22
III.6.Thérapeutiques de l'inflammation.....	23
III.6.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	23
III.6.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens.....	23

Etude expérimentale

I.Matériels et méthodes

I. Matériel	23
I.1. Matériel végétale.....	23
I.2Réactifs.....	23
I.3.Appareillage.....	23
II. Méthodes.....	25
II.1.Préparation des extraits bruts.....	25
II.2.Calcul de rendement.....	25
II.3.Dosage des composés phénoliques.....	25
II.3.1. Dosage des polyphénols totaux	25
II.3.2. Dosage des flavonoïdes	25
II.3.3.Dosage des tannins condensés.....	26

II.4.Evaluation du pouvoir antioxydant.....	26
II.4.1.Activité antioxydante totale (TAC).....	26
II.4.2.Réduction de fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	27
II.4.3.Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).....	27
II.4.4.Activité antioxydante mesurée par le radical cation ABTS.....	29
II.5.Tests anti-inflammatoires.....	29
II.6.Analyse statistique.....	30

II. Résultats et discussion

II. 1.Extraction des composés phénoliques.....	28
II. 1.1. Détermination de rendement d'extraction.....	28
II.2.Dosage des composés phénoliques.....	31
II.2. 1.Dosage des polyphénols totaux	31
II.2. 2.Dosage des flavonoïdes	33
II.2. 3.Dosage des tannins condensés.....	34
II. 3.Evaluation du pouvoir antioxydant de <i>Cytisus Villosus</i>	35
II. 3.1.Activité antioxydante totale (TAC).....	35
II. 3.2.Réduction de fer : FRAP	36
II. 3.3.Piégeage du radical libre DPPH	37
II. 3.4.Activité antioxydante mesurée par le radical cation ABTS.....	38
II.4. Tests anti-inflammatoire.....	40
Conclusion	42
Références bibliographiques	43

Annexes

Résumé

Les activités anti-inflammatoires et antioxydant de l'extrait acétonique et aqueux de feuilles de *Cytisus villosus* ont été étudiées *in vitro*.

La première partie de cette étude concerne l'extraction et la quantification des phénols totaux, des flavonoïdes et des tannins par le réactif du Folin-Ciocalcu, par le trichlorure d'aluminium et par le test de vanilline respectivement.

La deuxième partie est l'étude de l'activité antioxydant des extraits de plantes en utilisant ainsi quatre techniques : ABTS, piégeage du radical DPPH, réduction de fer, et la quantification de la capacité antioxydant totale.

Les résultats obtenus montrent la richesse de *Cytisus villosus* en polyphénols d'extrait aqueux et acétonique dont la teneur varie entre 135.66 ± 9.13 et 124.47 ± 13.80 mg EAG/g MS respectivement.

Les méthodes de l'activité antioxydant montrent les extraits de plante étudiée présentent des propriétés antioxydants à différents niveaux : *Cytisus villosus* possède un fort piègeur des radicaux DPPH ($EC_{50} = 72.5 \pm 3.8$ mg/ml et 18.5 ± 14.44 mg/ml), les résultats de la FRAP montre que l'extrait aqueux ayant une activité réductrice plus élevée que l'extrait acétonique Pour l'activité antioxydant totale, Les résultats sont de l'ordre 42 mg EAA, 15 mg EAA pour les extraits aqueux et extrait d'acétone respectivement.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* par l'évaluation de pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines permet de conclure que les extraits étudiés de la plante inhibent la dénaturation de Bovin Sérum Albumine avec 76.19 ± 4.2 et 75.35 ± 9.3 mg/ml pour l'extrait aqueux et l'extrait d'acétone. Les résultats obtenus sont comparables à ceux obtenus pour le diclofenac de sodium, un médicament anti-inflammatoire utilisé comme standard qui exerce un pourcentage d'inhibition de 77.21 ± 14.3 mg/ml

Mots clés : *Cytisus villosus*; Polyphénols ; Flavonoïdes ; Tannins ; Activités Antioxydants ; activités anti-inflammatoires

Abstract

The anti-inflammatory and antioxidant of acetonic and aqueous extracts of leaf of *Cytisus villosus* were studied *in vitro*.

The first part of this study concerns the extraction and the quantification of total phenolic, flavonoids and tannins by the Folin-Ciocalciu reagent, the aluminium trichloride and the vanillin test respectively.

The second part is the study of the antioxidant activity of the plants extracts using for techniques: ABTS, DPPH radical scavenging, iron reducing power, and quantification of total antioxidant capacity.

The results obtained showed the richness of *Cytisus villosus* of phenolic compounds of aqueous and acétonique extracts which the content varies between 135.66 ± 9.13 and 124.47 ± 13.80 mgGAE/g DM respectively.

The antioxidant activity method showed that the plant extracts present the antioxidant properties at various levels. *Cytisus villosus* has a strong scavenging of radicals DPPH \cdot ($EC_{50} = 72.5 \pm 3.8$ mg /ml et 18.5 ± 14.44 mg/ml), the results for FRAP have shown the aqueous extract has more reducing power than acétone extract. And for the third test it was estimated 42 mg EAA, 15mg EAA for the extracts of aqueous and extract of acetone respectively.

The results of the anti-inflammatory *in vitro* by evaluating inhibition percentage of protein denaturation activity supports the conclusion that the extract of the plant studied inhibit the denaturation of bovine serum albumin with 76.19 ± 4.2 and 75.35 ± 9.3 mg/ml for aqueous and acétonique extract respectively. The results obtained are comparable to those obtained for diclofenac sodium, an anti-inflammatory drug used as a standard that has a inhibition percentage of 77.21 ± 14.3 mg/ml.

Keywords: *Cytisus villosus*; Polyphenols; Flavonoids; Tannins; antioxidant activity; anti-inflammatoire activity

ملخص

تمت دراسة نشاطية المستخلص الأسييتوني والمائي لأوراق نبتة اللزان المضادة للالتهاب و المضادة للأكسدة مخبريا

يعتني الجزء الاول من هذه الدراسة باستخراج و تقييم كمية الفينولات الكلية الفلافونويدات و التانات عن طريق كاشف فولين سيوكالتو بواسطة ثلاثي كلوريد الالمنيوم و اختبار الفانلين على التوالي.

اما الجزء الثاني فهو يخص دراسة النشاط المضادة للأكسدة لمستخلصات النبات باستخدام اربعة طرق :محاصرة الجذور الحرة, ارجاع الحديد, تقدير القدرة المضادة للأكسدة الاجمالية ABTS, النتائج التي تم الحصول عليها تظهر ثراء اللزان لكل من المستخلص المائي و الأسييتوني بالبوليفينول حيث تتراوح القيمة بين 13.80 ± 9.13 و 124.47 ± 135.66 ملغ/مل على التوالي.

تظهر اختبارات النشاط المضاد للأكسدة ان كل المستخلصات المدروسة تظهر خصائص مضادة للأكسدة في مستويات مختلفة تملك نبتة اللزان قوة المحاصرة للجذور الحرة بتراكيز 3.8 ± 72.5 ملغ/مل و 14.44 ± 18.5 ملغ/مل .

كما اظهرت النتائج ان المستخلص المائي لديه قوة إرجاعية اكبر من المستخلص الأسييتوني. بالنسبة للنشاط الاجمالي المضاد للأكسدة كانت القيم 42 و 15 ملغ/مل مكافئ حمض الاسكوربيك بالنسبة للمستخلص المائي و الأسييتوني على التوالي.

نتائج النشاط الحيوي المضاد للالتهابات مخبريا عن طريق تقييم نسبة تثبيط افساد او تمسخ البروتين تظهر ان المستخلصين المدروسين للنبتة تثبط تمسخ مصل البومين البقري مع 76.19 ± 4.2 و 75.35 ± 9.3 ملغ/مل بالنسبة للمستخلصين المائي و الأسييتوني للزان على التوالي. النتائج المحصل عليها مماثلة لتلك التي تحصل عليها ديكلوفيناك الصوديوم. دواء مضاد للالتهاب يستعمل كمعيار لديه نسبة تثبيط تقدر ب 14.3 ± 77.21 ملغ/مل

الكلمات الدالة اللزان. البوليفينول. الفلافونويدات. التانات. النشاطات المضادة للاكسدة. النشاطات المضادة للالتهاب.

Liste des abréviations

- **AINS** : Anti-inflammatoires non stéroïdiens .
- **AIS** : Anti-inflammatoires stéroïdiens .
- **Asc·** : Radical ascorbyle .
- **AscH⁻** :Ascorbate.
- **CAT** : Catalase .
- **DPPH** : 2,2'-diphényl-1- picrylhydrazyl .
- **EO** : Espèces réactives oxygénées.
- **ERO** : Espèce réactive de l'oxygène .
- **FRAP** :FerricReducingAntioxidant Power .
- **GPx** : Glutathion peroxydase.
- **GSH** : Glutathion .
- **GSH-Px**: Glutathion peroxydase .
- **GSSG** : Glutathion oxydé .
- **MPO** : Myeloperoxydase.
- **PAF** : Facteur activateur de plaquettes .
- **PNN** :Polynucléaires neutrophiles .
- **Se-GPx**: Glutathion peroxydase séléno-dépendante.
- **SOD**: Superoxydedismutase .

Liste des figures

Figure 01: Les feuilles de la plante de <i>Cytisus villosus</i>	04
Figure 02 : Les Fleurs de <i>Cytisus villosus</i>	04
Figure 3: Réactions de base intervenant lors de la synthèse et de la dégradation des EOR et des EAR.....	06
Figure4 : Principales sources endogènes d'espèces réactives oxygénées.....	10
Figure 05 : Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées.....	12
Figure 0 6 : Espèces réactives oxygénées et systèmes de protection permettant de limiter leur effet toxique.....	14
Figure 07 : Les grandes étapes de la réaction inflammatoire aiguë.....	20
Figure08 : Structure chimique du radical libre DPPH	28
Figure 09 : L'activité antioxydante totale (TAC) des extraits de <i>Cytisus villosus</i>	35
Figure 10 : Activité réductrice des extraits (acétone /eau) de <i>Cytisus villosus</i> et de l'acide ascorbique vis-à-vis du fer ferreux.....	36
Figure 11 : Activité anti radicalaire des extraits acétone et eau de <i>C.villosus</i> et et de l'acide ascorbique vis-à-vis du radical DPPH.....	37
Figure 12: Valeurs des concentrations efficaces 50% de l'activité anti radicalaire.....	38
Figure 13 : Pourcentages d'inhibition du radical libre ABTS des extraits et de Trolox à différentes concentrations.....	39
Figure14 : Pourcentage de la stabilité de BSA par les deux extraits des feuilles de <i>Cytisus villosus</i> et le Diclofenac.....	41

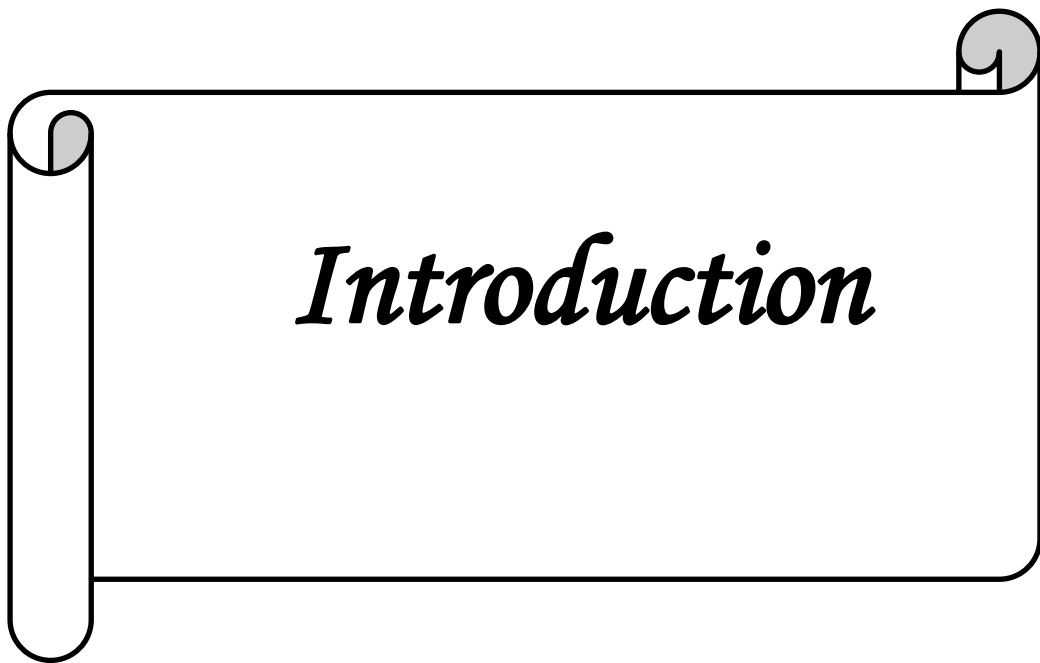
Liste des tableaux

Tableau 01 : Le rendement de l'extrait eau et acétone de *Cytisus villosus*.....**31**

Tableau 02 : Teneur des extraits de l'acétone et de l'eau de *Cytisus villosus* en polyphénols totaux.....**32**

Tableau 03 : Teneur en flavonoïdes des extraits d'acétone et de l'eau des feuilles de *Cytisus villosus*.....**34**

Tableau 04: Teneur en tannins condensés des extraits d'acétone et de l'eau des feuilles de *Cytisus villosus*.....**34**



Introduction

Introduction

Les plantes ont été utilisées comme remèdes pour les maladies humaines dans la médecine Chinoise presque 4000 à 6000 années avant la découverte des composés bioactifs tels que les flavonoïdes. Ces derniers possèdent une capacité antioxydante très importante et peuvent contribuer à une diminution du stress oxydatif *via* l'inhibition ou l'activation d'enzymes (**Koyama *et al.*, 1999**). Le concept du stress oxydant est un déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur destruction par des systèmes de défenses anti-oxydantes (**Favier,2003**). Les radicaux libres sont générés dans les mitochondries lors du transfert d'électrons, dans les cellules phagocytaires lors d'un processus inflammatoire et au cours de processus physiologiques d'oxydoréduction. Cette propriété rend les radicaux libres aptes à réagir avec différentes molécules. En effet, ils peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire de nombreuses cibles : protéines, lipides et acides nucléiques (**Bandhopadhyay *et al.*, 1999**).

Plus de 100 pathophysiologies humaines, allant de l'athérosclérose au cancer en passant par le diabète, le SIDA ou toutes les maladies à caractère inflammatoire comme l'arthrite rhumatoïde, sont liées notamment au stress oxydant (**Govindarajan *et al.*, 2005**).

Actuellement, la majorité des recherches en nutrition sont basées sur le lien entre la composition de certains aliments et la prévention de divers dysfonctionnements métaboliques qui se traduit généralement par des pathologies (**Shahidi et Miraliakbari, 2004**).

Plusieurs pays d'Afrique y compris l'Algérie mènent des Investigations visant à développer des médicaments issus de plantes de médecine traditionnelle. En réalisant des études phytochimiques, pharmaco-toxicologiques et cliniques pour la mise au point de médicaments traditionnels améliorés (M.T.A.). En 1978, l'Organisation Mondiale de la Santé (**O.M.S.**) s'est résolument engagée à revaloriser la pharmacopée traditionnelle afin de pouvoir satisfaire aux besoins de santé des populations. Les plantes médicinales ont toujours eu un rôle de grande importance sur la santé (**Carillon, 2000**). À l'heure actuelle, les substances naturelles dans les plantes sont encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles représentent près de 60% des médicaments, dont nous disposons (**O.M.S, 2000**). Les 40% restants ou médicaments de synthèse sont souvent nées de la synthèse chimique de molécules ou parties de molécules naturelles prises comme tête de séries (**Fouché *et al.*,2000**).

A condition physiologique, le pouvoir oxydant des radicaux libres est contrebalancé par de nombreux antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques, on peut notamment citer certaines vitamines (C, E et bêta-carotène), mais aussi les phyto-nutriments (polyphénols,caroténoïdes...), les oligo-éléments (sélénium, zinc, cuivre,...), etc. (Mauro,

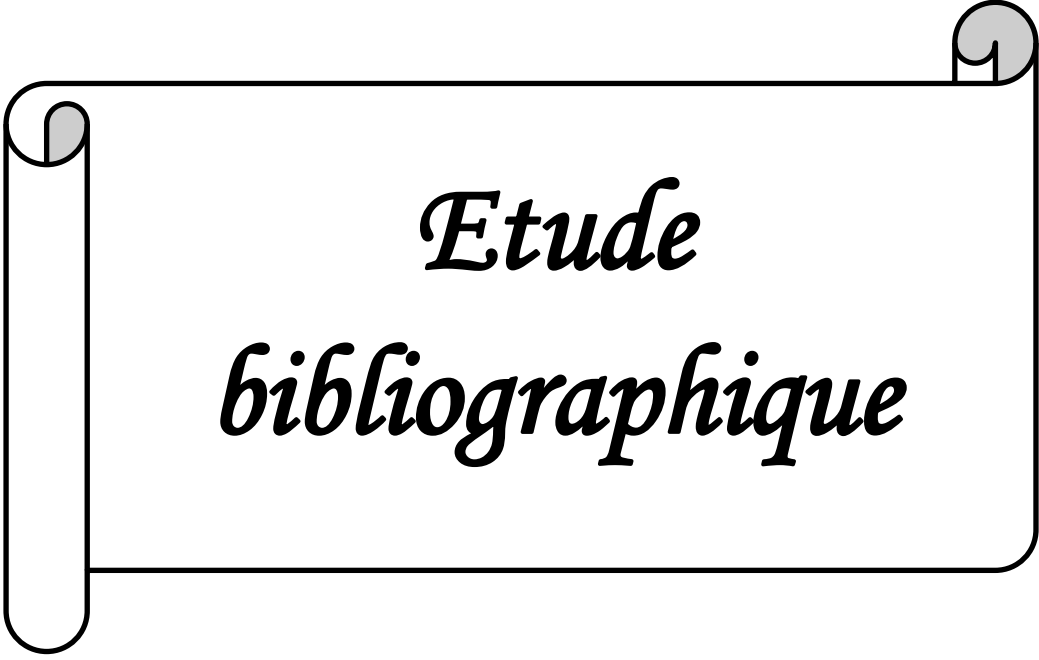
2006). Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation. Ils possèdent des propriétés antioxydantes et sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (tabac, pollution, infections...). L'effet protecteur des fruits et légumes vis-à-vis des maladies de civilisation (maladies cardiovasculaires, diabète...) serait d'ailleurs lié à la présence de très nombreux polyphénols, vitamines et oligo-éléments dans ces aliments (Favier, 2003).

Cependant, il y a une préoccupation concernant les effets indésirables des molécules synthétiques destinées à la lutte contre le stress oxydant et les infections bactériennes.

Il semble donc important de trouver une alternative à l'utilisation des antioxydants synthétiques et des antibiotiques classiques. Les remèdes à base de plantes constituent une alternative dans les systèmes de soins primaires et donc, une voie prometteuse pour le développement des médicaments traditionnellement améliorés. Récemment, beaucoup de chercheurs s'intéressent aux plantes médicinales pour leur richesse en antioxydants naturels à savoir les polyphénols, les flavonoïdes, les tannins, etc. qui possèdent des activités antioxydantes et antimicrobiennes. De ce fait, l'exploitation de nouvelles molécules bioactives ayant des effets secondaires limités ou inexistantes depuis des sources naturelles et leur adoption comme une alternative thérapeutique aux molécules synthétiques sont devenues des objectifs prioritaires pour les recherches scientifiques et les industries alimentaires et pharmaceutiques. (Benbrinis ,2012).

Le présent travail a été entrepris afin d'évaluer les activités antioxydantes et anti-inflammatoires des extraits de la plante *Cytisus villosus* largement utilisée en médecine traditionnelle en Algérie. Les objectifs de la présente étude sont :

- Préparation des extraits acétonique et aqueux de la plante *Cytisus villosus*
- Evaluation de la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins des extraits aqueux et acétonique *Cytisus Villosus*
- Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Cytisus villosus* par les tests de DPPH, chélation du fer ferreux FRAP, et le test de l'activité anti-oxydante totale TAC et enfin le pouvoir réducteur par l'utilisation de l' ABTS.
- Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits de *Cytisus villosus* par des différentes tests *in vitro*.



*Etude
bibliographique*



Chapitre I

I. 1. Les plantes médicinales

Les plantes médicinales sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Leur action provient de leurs composés chimiques (métabolites primaires ou secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents (SANGO, 2006).

I.2. La famille de Fabaceae

Les légumineuses (Fabacées) constituent la troisième superfamille par ordre d'importance chez les angiospermes. Elles comprennent plus de 750 genres et 17000 à 20000 espèces de formes et types de croissance très diversifiées (Doyle, 1994; Ladjudieet al, 1998).

Sur la base de leurs caractéristiques florales, la famille est divisée en trois sous-familles :

✓ La sous-famille des Mimosoïdeae, comprend environ 3 000 espèces regroupées dans quelques 77 genres (Cannon, 2008).

✓ La sous-famille des Caesalpinoïdeae, considérée comme la plus primitive, regroupe environ 4200 espèces dans quelques 162 genres (Simon, 2005; Cannon, 2008).

✓ La sous-famille des Papilionoïdeae, d'une évolution plus récente, comprend quelques 14.000 espèces aux fleurs irrégulières, regroupées dans environ 476 genres (Lewis et al., 2003).

En effet, la fixation de l'azote via la symbiose légumineuses-rhizobium permet aux plantes de cette famille d'obtenir des taux élevés en azote ammoniacal au niveau de leurs racines en fonction de la demande de leur métabolisme. Cette famille est composée de variétés horticoles et beaucoup d'espèces sont récoltées dans un but alimentaire, tant pour l'alimentation humaine (haricot, pois, fève, soja) qu'animale (trèfle, luzerne, sainfoin), pour leur huile (arachide, soja), leurs fibres, comme combustible, pour leur bois, leur utilisation en médecine (spartéine extraite du genêt à balais, réglisse) ou en chimie (Wojciechowski et al., 2004).

I.3. L' espèce *Cytisus Villosus*

Cytisus est un genre de plantes de la famille des *Fabaceae*. Ses espèces sont généralement appelées « genêts » ou « cytises ». C'est le genre du genêt à balais. Il contient 27 espèces parmi eux : *Cytisus candicans* , *Cytisus battandieri* .Au cours de son histoire taxinomique, *Cytisus villosus* a parfois été groupé avec *C. ardoinoi* et *C. sauzeanus* (Briquet, 1894).

C'est un arbrisseau qui croît sur les coteaux, dans les haies ou dans les bois de la région méditerranéenne, généralement non loin du littoral. Les feuilles ont trois folioles velues sur les deux faces, mais faiblement sur le dessus (figure 01) (Site 1).

I.4. Caractères morphologique

I.4.1. Feuilles

Les feuilles sont composées soit unifoliolées soit trifoliolées. Le nombre de folioles varie en fonction de la position des feuilles ainsi que leur ordre d'apparition sur le rameau chez certaines espèces. (Gaëlle Auvray ,2011)



Figure 01: Les feuilles de la plante de *Cytisus villosus* (site 1).

I.4.2. Fleurs

Les taxons du groupe villosus arborent majoritairement des fleurs jaunes. Les inflorescences sont des grappes réduites à une ou deux fleurs sur des axes très courts (Gaëlle Auvray ,2011).



Figure 02 : Les Fleurs de *Cytisus villosus* (site 2).

I.5. Classification de la plante

La classification botanique de l'espèce *Cytisus villosus* est la suivante (**ITIS : *Cytisus* Desf**).

Règne : Plantae .

Sous règne : Tracheobianta .

Division : Magnoliophyta .

Classe : Magnoliopsida .

Sous classe : Rosidae .

Ordre : Fabaies .

Famille : Fabacea .

Genre : *Cytisus*.

Espèce : *Cytisus villosus*



Chapitre II

II.1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes de l'organisme en faveur des premiers, ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles (Pincemail *et al.*, 1999).

II.2. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. La molécule d'oxygène (ou dioxygène, O₂) présente la particularité d'avoir la structure d'un biradical libre, en raison de ses deux électrons célibataires situés sur les deux orbitales de plus grande énergie (Rezaire, 2012).

Ne possédant qu'un seul électron sur ses orbitales, l'oxyde d'azote (NO) est un radical peu réactif, synthétisé à partir d'un atome d'azote et d'une molécule d'oxygène. Dans les phénomènes de stress oxydant prenant place dans les milieux biologiques, les radicaux libres qui interviennent, partagent pour caractéristique celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène ou d'azote. Ceci leur confère la dénomination d'espèces réactives de l'oxygène (EOR ou ROS) ou de l'azote (EAR ou RNS) (Figure3) (Rezaire, 2012).

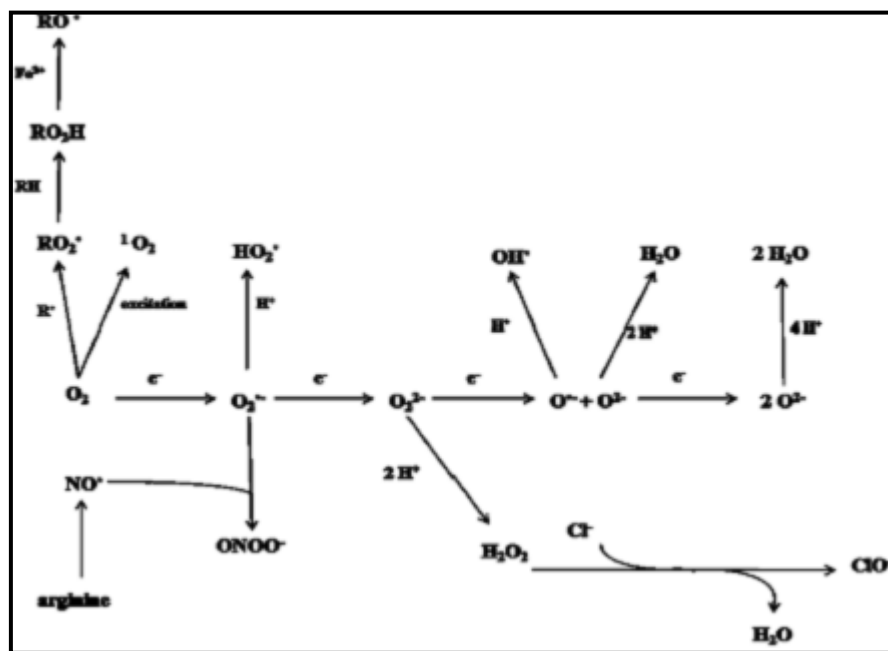


Figure 3 : Réactions de base intervenant lors de la synthèse et de la dégradation des EOR et des EAR adapté de (Smirnoff, 2005).

II.3. Production de radicaux libres

On distingue alors deux grands groupes de molécules réactives impliquées dans le stress oxydant: les espèces radicalaires et les espèces non-radicalaires. La réactivité d'un radical libre varie d'un radical à un autre et dépend de l'environnement où ils se trouvent. Leurs constantes de vitesse réactionnelle sont très élevées (10⁵ à 10¹⁰ mol⁻¹.L.s⁻¹) (**Delattre et al., 2005**).

Les espèces réactives oxygénées (ERO) incluant les radicaux libres comme le radical hydroxyl (OH[•]), le radical superoxyde (O₂[•]) et sa forme protonnée (HO₂[•]), le radical peroxy (ROO[•]) et les espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'oxygène singulet (¹O₂) sont des molécules hautement réactives (**Chu et al., 2010**).

Dans tous les systèmes vivants aérobies, ces espèces sont produites habituellement par voie endogène durant le métabolisme cellulaire (**Kumari et Kakkar, 2008**).

Des facteurs exogènes à savoir les polluants environnementaux, les radiations, les solvants organiques, le tabac ainsi que les agents pathogènes sont aussi incriminés dans la production des ERO (**Ansari, 1997**).

Les espèces réactives du nitrogène incluent le radical monoxyde d'azote (NO[•]), l'anion peroxynitrite (ONOO⁻), le radical dioxyde d'azote (NO₂[•]) et d'autres oxydes d'azote sont produits par la réaction du monoxyde d'azote avec O₂[•] (**Wiseman et Halliwell, 1996; Simon et al., 2000**).

II.4. Espèces réactives de l'oxygène

II.4.1. Les espèces oxygénées réactives radicalaires

L'anion radical superoxyde (O₂^{•-}) est le résultat de l'apport d'un électron supplémentaire à la structure initiale de l'oxygène. Malgré une réactivité moyenne, ce radical a quelques cibles privilégiées telles que le cytochrome c (Fe³⁺), l'ascorbate et surtout le superoxyde dismutase.

Plus réactif que le précédent, le radical perhydroxyle HO₂[•] est obtenu après protonation de ce dernier à pH inférieur à 4,8 (pK_a (HO₂[•]/ O₂^{•-}) = 4,8) (**Rezaire, 2012**).

La réduction mono électronique du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ donne naissance au radical hydroxyle HO[•] et à l'anion basique non radicalaire OH⁻ en présence d'un catalyseur (réaction de Fenton : H₂O₂ + Fe²⁺ → HO[•] + Fe³⁺ + OH⁻). Cette espèce chimique particulièrement réactive joue un rôle majeur dans la peroxydation lipidique et la destruction du matériel génétique (**Hennebelle, 2006**).

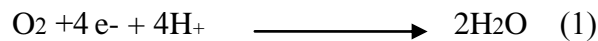
II.4.2. Les espèces oxygénées non radicalaires

L'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, qui est la forme diamagnétique 19 de l'oxygène, est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes. Bien qu'il ne soit pas un radical, il joue un rôle dans le vieillissement cutané et certaines maladies liées à l'âge (**Choe et Min, 2005 ; Hennebelle, 2006**).

Sous sa forme moléculaire, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est également toxique, en particulier à cause de sa transformation en radical hydroxyle en présence de cations métalliques Fe^{2+} et Cu^+ , lors de réactions de type « Fenton » (**Wardman et Candeias, 1996**).

II.5. Production des espèces réactives oxygénées

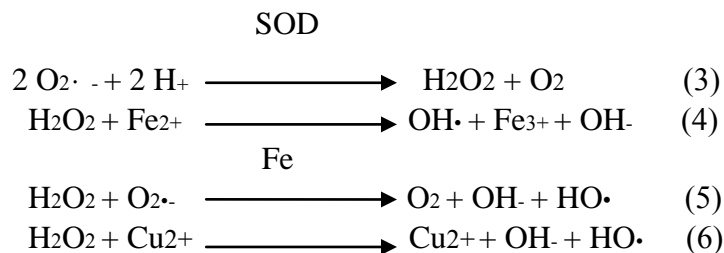
La majeure partie de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente conduisant à la production d'eau (réaction 1). Cette réaction est catalysée par la cytochrome oxydase, accepteur final d'électrons présent dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane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



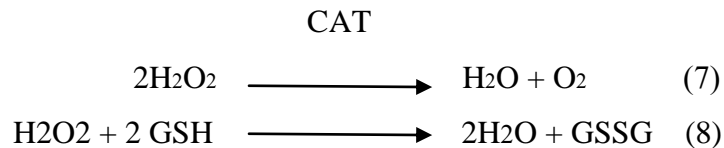
Toutefois, cette chaîne de transport peut laisser fuir une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène. C'est ainsi qu'environ 2% de l'oxygène subit une réduction monoélectronique (réaction 2) conduisant à la formation du radical superoxyde O_2^- au niveau de l'ubiquinone (**Cadenas et Davies, 2000**).



Le radical superoxyde est soumis à une réaction de dismutation catalysée par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) pour former le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (réaction 3). Le H_2O_2 peut traverser les membranes biologiques et former le plus puissant des espèces réactives, le radical hydroxyle (OH^\bullet), par interaction avec les métaux de transition comme Fe^{2+} (réaction 4) et Cu^+ (réaction 5) via la réaction de Fenton. Le H_2O_2 et O_2^- donnent aussi naissance au radical hydroxyle (réaction 6) via une réaction dite de Haber et Weiss (**Gardès-Albert et al., 2003; Ahsan et al., 2003**).



La concentration de H₂O₂ est régulée par des enzymes telles que la catalase (CAT) présente dans les peroxysomes et la glutathion peroxydase (GPx) essentiellement localisée dans le cytosol. La catalase accélère la réaction de dismutation de H₂O₂ en oxygène et en eau (réaction 7), tandis que la glutathion peroxydase accélère la réaction d'oxydation du glutathion (GSH) par l'eau oxygénée (réaction 8) (**Gardès-Albert *et al.*, 2003**).



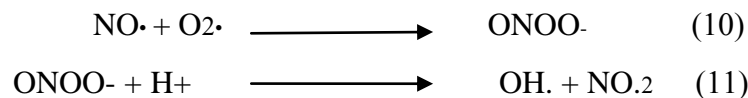
L'eau oxygénée est aussi convertit par la myeloperoxydase (MPO), dans les neutrophiles, en acide hypochloreux (HOCl), un très fort oxydant qui agit comme agent bactéricide dans les cellules phagocytaires (réaction 9). La réaction de HOCl avec H₂O₂ résulte en la production de ¹O₂ (**Ahsan *et al.*, 2003**).



D'autre part, le monoxyde d'azote (NO[•]) est une petite molécule générée dans les tissus biologiques par l'oxyde nitrique synthase (NOS) lors du métabolisme de l'arginine en citruline (**Guzik *et al.*, 2003**).

le monoxyde d'azote est un radical réactif abondant qui agit comme une importante molécule de signalisation dans une large gamme de processus physiologiques incluant la transmission nerveuse, la régulation de la pression sanguine, les mécanismes de défense, la relaxation des muscles lisses et la régulation immunitaire (**Bergendi *et al.*, 1999**).

Le monoxyde d'azote peut réagir avec l'anion superoxyde (réaction 10) pour former le peroxynitrite (ONOO[•]) qui peut à son tour générer des composés toxiques tels que le dioxyde d'azote (réaction 11) (**Halliwell, 2007**).



II.6. Sources des espèces réactives oxygénées

Les ERO sont produites par différentes sources tant endogènes (figure 4) qu'exogènes :

- a) La mitochondrie est la source majeure de la production cellulaire de l'anion superoxyde, principalement du à la réduction partielle de NADH déshydrogénase et la réduction partielle de l'ubiquinone/ubisemiquinone/ubiquinol par le complexe I et III respectivement [**Roede et Jones, 2010**].

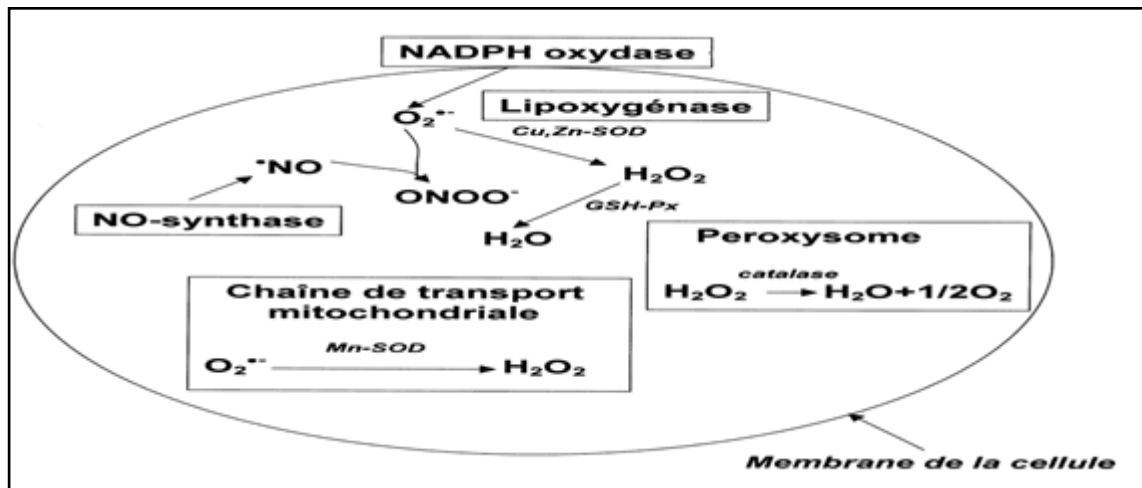


Figure 04 : Principales sources endogènes d'espèces réactives oxygénées. GSH-Px: glutathion peroxydase, SOD: superoxyde dismutase (Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2002).

- **b)** L'inflammation est par ailleurs une source importante d'ERO. Lors des processus inflammatoires, les neutrophiles activés produisent l'anion superoxyde via l'action de la NADPH oxydase liée à la membrane sur l'oxygène moléculaire. Les neutrophiles produisent aussi le radical de monoxyde d'azote qui est à l'origine d'une molécule plus réactive, le peroxyde d'azote ($ONOO^-$), un puissant oxydant qui peut se décomposer pour former le radical hydroxyle (voir la réaction 11) (Rodrigo *et al.*, 2011).

- **c)** Plusieurs systèmes enzymatiques produisent les ERO au cours des réactions biochimiques. Le cytochrome P450 peut réduire directement O_2 en $O_2^{\bullet-}$ en causant le stress oxydatif, il peut aussi prendre une voie alternative appelée "cycles redox" qui conduit à la génération de l'anion superoxyde (Goepfert *et al.*, 1995; Beckman and Ames, 1998).

- **d)** Au cours du catabolisme des purines, la xanthine oxydoréductase catalyse l'hydroxylation oxydative de l'hypoxanthine en xanthine et par la suite de la xanthine en acide urique en produisant l'anion superoxyde (Chan, 2003 ; Vorbach *et al.*, 2003).

- **e)** Durant le métabolisme de l'acide arachidonique, les lipoxygénases et les cyclooxygénases génèrent des ERO (Ahsan *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004).

- **f)** Les métaux toxiques (chrome, vanadium, cuivre) et aussi le fer libres génèrent en présence d' H_2O_2 les radicaux HO^\bullet par la réaction de Fenton. La plupart des métaux de transition, en particulier le fer et le cuivre, sont des cofacteurs essentiels aux enzymes. Dans leur forme libre, ces ions peuvent, dans les systèmes biologiques, faciliter le transfert d'électrons aux macromolécules susceptibles comme les protéines, les lipides et l'ADN (Zadak *et al.*, 2009).

- **g)** Les facteurs environnementaux tels que le tabagisme, les radiations UV, les médicaments, les réactifs chimiques, les solvants industriels et la pollution sont des sources

exogènes des ERO qui peuvent causer l'oxydation des composants biologiques (**Zadak et al., 2009**).

II.7. Conséquences biologiques des espèces réactives oxygénées

La surproduction des ERO est responsable des lésions directes des molécules biologiques ainsi que des lésions cytotoxiques et mutagènes par les produits libérés, notamment lors de l'oxydation des lipides. L'anion radicalaire superoxyde comme le monoxyde d'azote ne sont pas très réactifs, mais constituent des précurseurs d'autres espèces plus réactives. Les radicaux hydroxyles sont au contraire les plus dommageables pouvant s'attaquer à toutes les molécules biologiques à savoir l'ADN, les protéines et les lipides (**Gardès-Albert et al., 2003; Ahsan et al., 2003**).

• a) Peroxydation lipidique

Parmi les cibles les plus susceptibles à l'action des ERO sont les acides gras polyinsaturés comme l'acide linoléique et l'acide arachidonique. L'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir d'une molécule d'acide gras polyinsaturé initie le processus de la peroxydation lipidique. Un atome d'hydrogène est pris d'une deuxième molécule d'acide gras polyinsaturé résultant en un nouveau radical libre (**Ahsan et al., 2003**).

Ces radicaux peuvent déclencher une chaîne de réactions de peroxydation au niveau des acides gras des phospholipides membranaires, conduisant à l'altération de la membrane et la perte de l'organisation de sa structure de bicouche lipidique qui est nécessaire à la fonction des enzymes liées et des récepteurs (**Evans, 2000**).

• b) Oxydation des protéines

Les structures et les fonctions des protéines sont aussi altérées par les ERO. Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. L'oxydation protéique catalysée par les ions métalliques conduit à l'addition de groupes carbonyles, la formation des liaisons croisées et la fragmentation des chaînes peptidiques. Les produits de la peroxydation lipidique peuvent réagir avec le groupement sulfhydryle de la cystéine ou avec les acides aminés basiques (histidine, lysine) affectant leurs caractéristiques biologiques (**Ahsan et al., 2003**).

Le dommage oxydatif des protéines peut affecter la fonction des récepteurs, des enzymes et des protéines de transport, etc., et peut même générer de nouveaux antigènes qui provoquent des réponses immunitaires (**Aruoma, 1999; Favier, 2003**).

Les produits du dommage oxydatif des protéines peuvent contribuer au dommage secondaire comme l'inactivation des enzymes de réparation de l'ADN et la perte de fidélité des ADN polymérase (**Aruoma, 1999**).

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

Le dommage oxydatif aux acides nucléiques inclue l'addition des bases et des groupes de sucres, cassures au niveau de la simple et double hélice ainsi que la formation des liaisons croisées avec d'autres molécules (**Beckman et Ames, 1998**).

- **d) Oxydation des glucides**

Le glucose peut s'oxyder en présence des ions métalliques conduisant à la libération des cétoaldéhydes, H_2O_2 et OH^\cdot qui peuvent entraîner la coupure des protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde. Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (**Favier, 2003**).

II.8. Les maladies liées au stress oxydant

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreuses pathologies (figure 05) comme facteur déclenchant ou associé à des complications. Il peut être associé à l'athérosclérose, l'asthme, l'arthrite, la cataractogénèse, l'hyperoxie, l'hépatite, l'attaque cardiaque, les vasospasmes, les traumatismes, les accidents vasculaires cérébraux, les pigments d'âge, les dermatites, les dommages de la rétine, les parodontites et les cancers. Néanmoins, la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux (**Cohen et al., 2000; Packer et Weber, 2001 ; Favier, 2003**).

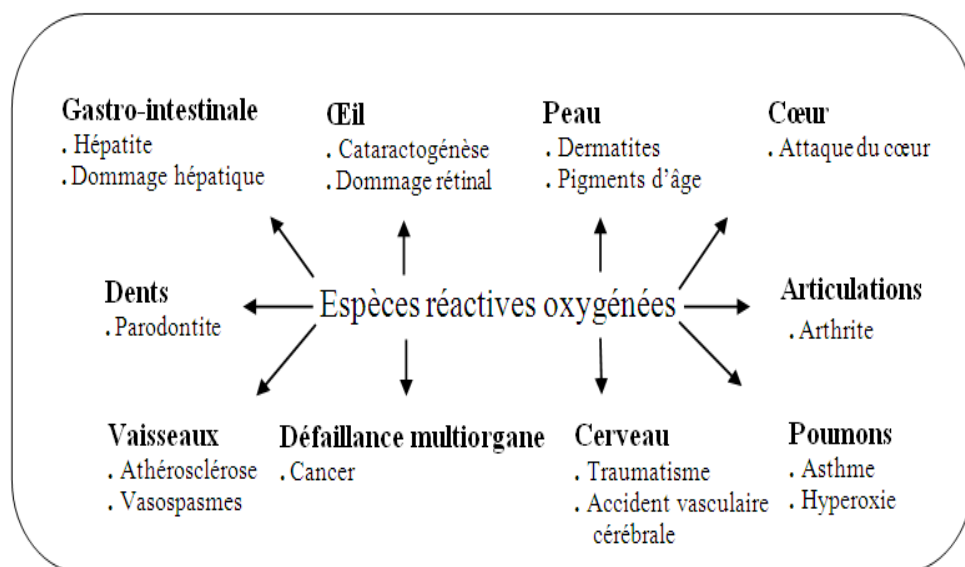


Figure 05 : Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées (**Lee et al., 2004**).

II.9. Mécanismes d'action des espèces réactives oxygénées et le stress oxydatif

Les EOR et ERN sont connues pour jouer un double rôle dans les systèmes biologiques, puisqu'ils peuvent être à la fois nocifs mais aussi bénéfiques, voire indispensables pour les organismes vivants (Valko *et al.*, 2004) :

- Bénéfiques, lorsqu'ils sont impliqués dans des rôles physiologiques au niveau des réponses cellulaires telles que la lutte contre des agents infectieux et leur fonction dans les systèmes de signalisation cellulaire,
- Nocifs, lorsqu'il y a un déséquilibre entre la balance des ERO et ERN et les systèmes de défense, avec comme conséquence l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (ADN, protéines, lipides) en lien avec l'apparition de nombreuses maladies graves (cancer, artériosclérose, arthrite, maladies neurodégénératives) : c'est le stress oxydatif (Evans et Halliwell, 1999). Quelles que soient leurs fonctions, ces molécules jouent donc un rôle indispensable chez tous les êtres vivants. Les notions les plus essentielles vont être développées ci-après ;

De nombreux ligands extracellulaires sont capables d'induire la production cellulaire d'ERO, après interaction avec leur récepteur spécifique. Ces ERO contribuent donc à la transduction du signal, mais assurent également l'amplification de ce signal. Par exemple, cela va se traduire par l'activation de la NADPH oxydase qui formera l'anion superoxyde, et contribuera à l'activation de phosphorylases, dont les cibles sont des protéines.

En résumé, les mécanismes d'action principaux des ERO sont alors de déclencher ou d'amplifier un signal intracellulaire par deux mécanismes principaux (par modification de l'équilibre rédox intracellulaire et par modification oxydative des protéines). Les ERO sont également à l'origine de l'action bactéricide par les leucocytes (Delattre *et al.*, 2005c).

II.10. Les antioxydants

Pour contourner les dommages causés par les ERO, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants (figure 3). Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible. Ainsi, ils servent à contrôler le niveau des espèces réactives pour minimiser le dommage oxydatif (Halliwell et Gutteridge, 2007 ; Tang et Halliwell, 2010).

II.10.1. Antioxydants enzymatiques

Les superoxyde dismutases (SODs) sont une classe d'enzymes apparentées qui catalysent la dégradation de l'anion superoxyde en O_2 et H_2O_2 . Les cellules humaines possèdent une enzyme SOD mitochondriale ayant le manganèse dans son site actif (MnSOD) ainsi qu'une

enzyme SOD cytosolique et une SOD extracellulaire ayant le cuivre et le zinc (Cu-ZnSOD) comme coenzymes (Favier, 2003).

Due à sa relative stabilité, le H_2O_2 produit par les SODs est régulé enzymatiquement par les catalases et les peroxydases (Blokhina *et al.*, 2003).

Les catalases sont des enzymes localisées dans les peroxysomes et catalysent la conversion du H_2O_2 en H_2O et O_2 . Tandis que les glutathion peroxydases éliminent le H_2O_2 par son utilisation dans l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) et requièrent le sélénium dans leur site actif pour cette activité. La glutathion réductase, qui est une enzyme contenant le FAD, génère GSH à partir de GSSG via le NADPH comme source de pouvoir réducteur (Aruoma, 1999).

Ces enzymes sont le principal système de protection car elles détruisent non seulement H_2O_2 , mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par l'oxydation des acides gras ou du cholestérol. Cependant, d'autres enzymes antioxydantes comme les peroxyredoxines, la glutathion transférase, les thioredoxines réductases et les thioredoxines peroxydases sont impliquées dans la défense antioxydante de l'organisme et utilisent le NADPH comme donneur d'équivalent réducteur, celui-ci constitue avec le glutathion les plaques tournantes de la défense antioxydante (Favier, 2003).

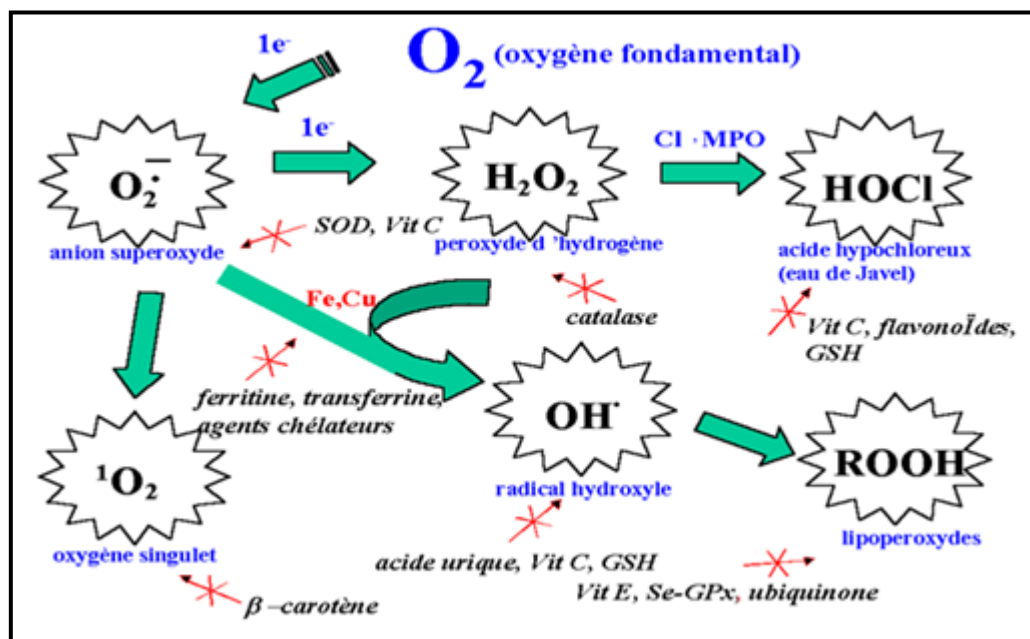
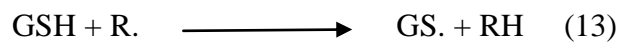
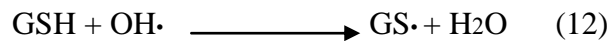


Figure 06 : Espèces réactives oxygénées et systèmes de protection permettant de limiter leur effet toxique. GSH: glutathion, Cl⁻: anion chlorure, MPO: myéloperoxydase, SOD: superoxyde dismutase, Se-GPx: glutathion peroxydase séléno-dépendante (Pincemail *et al.*, 1999).

II.10.2. Antioxydants non enzymatiques

II.10.2.1. Le glutathion

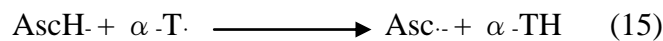
Le glutathion est un tripeptide dont la fonction thiol lui confère un rôle d'antioxydant, voire, de réducteur (donneur d'électron ou d'atome H), qu'il exerce vis-à-vis de nombreuses espèces oxydées, et en particulier vis-à-vis de l'eau oxygénée (voir la réaction 8) et des radicaux hydroxyles tel que montré dans la réaction 12 (**Gardès-Albert *et al.*, 2003**). Toutefois, le rôle protecteur de GSH semble provenir de sa capacité à réagir avec les radicaux (réaction 13). Dans ce cas, un phénomène de "réparation" des radicaux R· en produits réduits RH se produit.



II.10.2.2. L'acide ascorbique

L'ascorbate (vitamine C) est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés aussi bien hautement réactifs tels que les radicaux OH· que très peu réactifs tels que les radicaux O₂·. Sa capacité de donation d'électrons dans une large gamme de réactions enzymatiques et non enzymatiques le qualifie de meilleur agent de détoxification des radicaux oxygénés dans la phase aqueuse (**Blokhina *et al.*, 2003**).

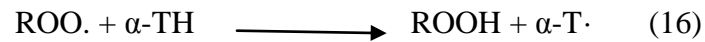
En réagissant avec ces divers radicaux, l'ascorbate (AscH⁻) est oxydé en radical ascorbyle (Asc·) qui est relativement inerte vis-à-vis des molécules biologiques. De plus, l'ascorbate est muni d'une propriété importante: la réparation de deux autres antioxydants, le glutathion (GSH) et l'α-tocophérol (α-TH) à partir de leurs formes radicalaires (réactions 14 et 15). L'ascorbate est recyclé, tout au moins en partie, par dismutation du radical ascorbyle (**Gardès-Albert *et al.*, 2003**).



II.10.2.3. Le α-tocophérol

Parmi les tocophérols naturels, le α-tocophérol (vitamine E) est le plus efficace *in vivo*. Son rôle essentiel est de capter les radicaux lipidiques peroxydes (LOO·), alkoxy (LO·) et alkyl (L·) qui propagent les chaînes de peroxydation lipidique. La réaction entre les radicaux lipidiques et le α-tocophérol (α-TH) se passe au niveau de l'interphase membrane-eau ou ce dernier perd un atome d'hydrogène et se transforme en radical α-tocophéryle (α-T·), tandis que le radical peroxyde est réduit en une molécule d'hydroperoxyde (réaction 16) (**Blokhina *et al.*, 2003**).

Le recyclage de la vitamine E par des systèmes réducteurs dont le plus important est l'ascorbate (voir la réaction 15) lui permet de jouer son rôle d'antioxydant à plusieurs reprises (**Gardès-Albert *et al.*, 2003**).



II.10.2.4. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes tel que le β -carotène constituent une vaste famille de composés qui sont généralement des bons capteurs de radicaux hydroxyles et peroxyles ce qui les rend susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique. En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capter l'oxygène singulet, $^1\text{O}_2$, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire. L'ensemble de ces propriétés antioxydantes permet d'expliquer, en partie, les bénéfices apportés par les régimes alimentaires basés sur une consommation de fruits, de légumes, de thé et d'autres produits végétaux (**Gardès-Albert *et al.*, 2003**).

II.10.2.5. Les oligoéléments

Les oligoéléments ou les éléments-trace (zinc, sélénium, cuivre, manganèse) constituent des cofacteurs nécessaires aux activités des enzymes antioxydantes. D'autres constituants de l'alimentation, comme les vitamines du groupe B, le chrome ou le magnésium agissent comme des antioxydants indirects via la régulation de l'homocystéinémie (vitamines du groupe B), l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (chrome) ou la lutte contre l'inflammation (magnésium). La synthèse du glutathion, un des antioxydants le plus important de l'organisme, dépend fortement de l'apport nutritionnel en acides aminés tels que la méthionine (**Roussel, 2009**).

II.10.2.6. Les protéines plasmatiques

Les transferrines sont des protéines plasmatiques douées d'activité antioxydante car elles possèdent une capacité de fixation importante au fer. Elles se trouvent saturées à 30% en ce métal de transition de sorte qu'il n'est pas possible de trouver du fer libre dans le sang de sujets sains. Dans des cas pathologiques, le fer peut être libéré de ces protéines de transport (ferritine, lactoferrine) et se retrouver dans le sang sous une forme libre capable d'initier des réactions productrices de ERO (**Pincemail *et al.*, 1999**).

II.10.2.7. Les polyphénols

Plusieurs études épidémiologiques ont montré qu'il y a un rapport inverse entre la prise d'aliments riches en polyphénols (les fruits et les légumes) et le risque des maladies liées à l'âge comme les maladies neurodégénératives (**Hu, 2003; Bubonja-Sonje *et al.*, 2011**).

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



Chapitre III

III.1. Activité Anti-inflammatoire

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent agir comme messagers secondaires et activer différents facteurs ou gènes impliqués dans le développement de diverses pathologies (**Parke et Parke, 1995**).

Parmi ces pathologies, les maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, les cancers, les maladies respiratoires, les diabètes, les maladies digestives et les affections cutanées constituent de plus en plus un problème mondial de santé publique. Ces pathologies chroniques peuvent s'accompagner de processus inflammatoire qui est souvent un des signes d'alerte vers les complications (**Ghalem ,2014**).

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées qui sont le siège d'un phénomène appelé explosion oxydative consistant en l'activation du complexe de la 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 est capital dans la lutte anti-infectieuse car il permet la phagocytose des bactéries et des corps étrangers. Une autre espèce radicalaire, le monoxyde d'azote, est elle aussi produite par les systèmes enzymatiques que sont les différentes NO synthases (ou NOS), à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages (**Sahnoun, 1998**).

L'inflammation est un processus de défense de l'organisme dont le but est de neutraliser, de combattre ou d'éliminer l'agent pathogène (endogène ou exogène) et de préparer la réparation des tissus. Les signes de ce processus sont : chaleur, rougeur, douleur et gonflement (**Kumar et al., 2003 ; Majno, 2004**).

L'inflammation se déroule dans le tissu conjonctif vascularisé. Les tissus dépourvus de vaisseaux (cartilage, cornée) sont incapables de développer une réaction inflammatoire complète. Les tissus épithéliaux n'ont pas de rôle actif dans le déroulement de la réaction inflammatoire mais ils peuvent être altérés par l'agression qui déclenche l'inflammation puis être réparés au cours de la phase terminale de l'inflammation (**Ruslan, 2008**).

III.2. Définition de l'inflammation

La réponse inflammatoire est une réponse adaptative engendrée en réponse à des stimuli nocifs telle qu'une infection ou une agression tissulaire. Elle nécessite une régulation fine, généralement bénéfique, elle conduit à l'élimination d'éventuels pathogènes et au retour à l'homéostasie du tissu lésé (**Nathan, 2002**).

La fonction principale de l'inflammation est d'éliminer l'agent agresseur et de permettre la réparation des tissus. L'inflammation de courte durée dite inflammation aiguë est un

phénomène bénéfique pour l'organisme qui lui permet de retrouver son intégrité physiologique. Alors que l'aspect négatif de l'inflammation intervient quand cette dernière se pérennise et devient une inflammation chronique (Weill *et al.*, 2003).

Elle est un processus habituellement bénéfique : son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois elle peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, par anomalie de régulation du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation (Ruslan, 2008).

Les causes de la réaction inflammatoire sont multiples et représentent les agents exogènes. Ces causes déterminent des lésions cellulaires et tissulaires qui vont déclencher l'inflammation (Ruslan, 2008) :

- **Infection** : contamination par des micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons).
- **Agents physiques** : traumatisme, chaleur, froid, radiations.
- **Agents chimiques** : caustiques, toxines, venins.
- **Corps étrangers** : exogènes ou endogènes.

III.3. Manifestations cliniques

La réaction inflammatoire est responsable de phénomènes locaux caractérisés par quatre signes cardinaux qui sont la rougeur, la chaleur, la douleur et l'œdème. Mais elle peut aussi entraîner de multiples effets biologiques et cliniques généraux qui sont d'intensité plus importante en cas de persistance de la réaction inflammatoire. Les effets cliniques généraux sont une altération de l'état général, associant une asthénie, une anorexie, un amaigrissement, une fièvre, des troubles du sommeil et une cachexie avec fonte musculaire (Rousselet *et al.*, 2005).

III.4. Types d'inflammation

L'inflammation est classée en deux catégories selon la durée et la cinétique du processus inflammatoires : Il existe deux types d'inflammations : aiguë et chronique.

III.4.1. L'inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est caractérisée par quatre phénomènes typiques qui sont l'œdème, la douleur, la chaleur et la rougeur. Elle peut également s'accompagner d'atteintes fonctionnelles régionales selon la gravité de l'agression (Botting *et Botting*, 2000).

Elle dure de quelques jours à quelques semaines. L'inflammation aiguë peut être divisée en trois grandes phases ; une phase vasculaire immédiate (de l'ordre de minutes) caractérisée par des modifications de la microcirculation locale, une phase cellulaire consécutive

caractérisée par la mobilisation de nombreuses cellules immunitaires qui permettra l'élimination des microorganismes pathogènes et des tissus lésés, et une phase de résolution et de cicatrisation qui en quelques jours conduira à la restauration des tissus (Figure 07) (Weill *et al.*, 2003).

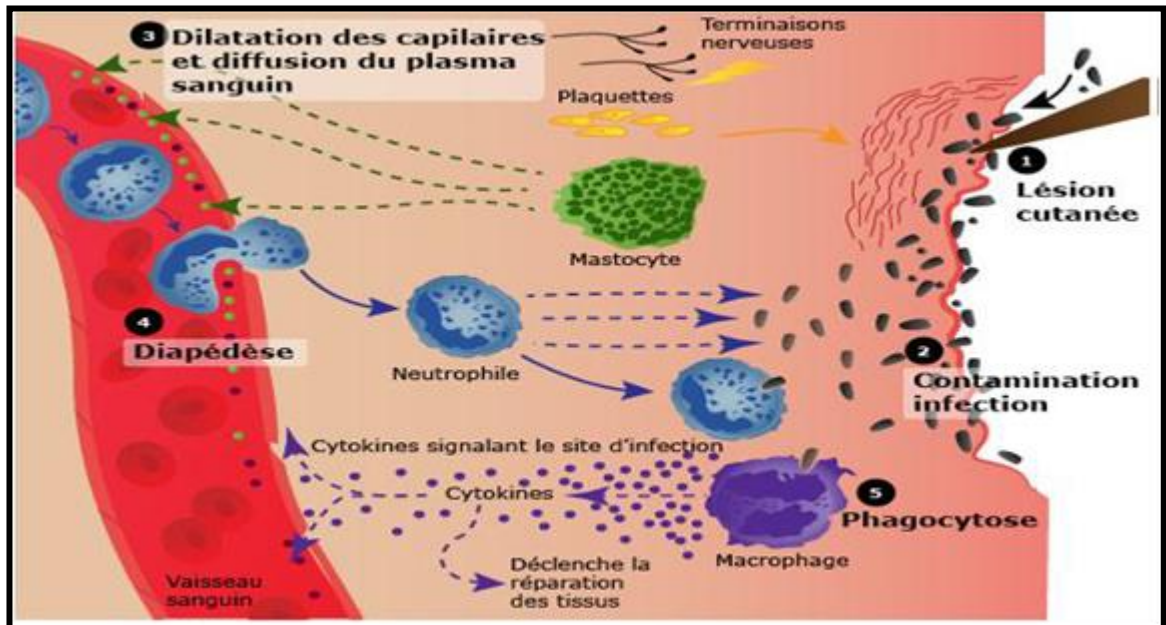


Figure 07 : Les grandes étapes de la réaction inflammatoire aiguë (Patrice, 2014).

Il s'agit de la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours à quelques semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante (Charles *et al.*, 2010).

Les étapes de la réponse inflammatoire aiguë sont toujours les mêmes quelque soient le stimulus inflammatoire et le tissu enflammé. Des modifications vasculaires, telles que l'augmentation de la perméabilité de la paroi vasculaire apparaissent au niveau du tissu enflammé. Cette augmentation de la perméabilité permet au liquide plasmatique de s'échapper vers le milieu extravasculaire, phénomène connu sous le terme d'exsudation plasmatique. Ces modifications vasculaires permettent le recrutement des leucocytes dans le milieu extravasculaire qui se déplacent en suite vers le site inflammatoire. Ces leucocytes détruisent et éliminent les stimuli nocifs qui s'y présentent, laissant place à la réparation du tissu endommagé (Rankin, 2004).

L'inflammation aigue se constitue en trois phases :

- **a) Phase vasculaire (Réaction vasculo-exsudative)**

Elle se traduit cliniquement par les quatre signes cardinaux classiques de l'inflammation aiguë: rougeur, chaleur, tuméfaction, douleur. Elle comporte trois phénomènes: une congestion active, un oedème inflammatoire (l'exsudat), une diapédèse leucocytaire (**Rousselet et al., 2005**).

- **Congestion active**

Il s'agit d'une modification du calibre vasculaire qui apparaît très rapidement, après une brève vasoconstriction, et consiste en une vasodilatation artériolaire puis capillaire dans la zone atteinte. Localement, il en résulte une augmentation de l'apport sanguin et un ralentissement du courant circulatoire. Les petits vaisseaux sont dilatés et gorgés d'hématies, bordés d'un endothélium turgescent. La congestion est déclenchée par un mécanisme nerveux (nefs vasomoteurs) et l'action de médiateurs chimiques (**Rousselet et al., 2005**).

- **OEdème inflammatoire**

Il s'agit du passage dans le tissu conjonctif interstitiel ou les cavités séreuses d'un liquide appelé exsudat fait d'eau et de protéines plasmatiques. Sa traduction clinique est un gonflement des tissus qui, en comprimant des terminaisons nerveuses, est responsable de la douleur (également provoquée par certains médiateurs chimiques). Sa traduction microscopique est un aspect pâle, peu colorable et distendu du tissu conjonctif. L'œdème inflammatoire résulte d'une augmentation de la pression hydrostatique due à la vasodilatation et surtout d'une augmentation de la perméabilité de la paroi des petits vaisseaux sous l'effet de médiateurs chimiques, dont l'histamine (**Rousselet et al., 2005**).

- **Diapédèse leucocytaire**

C'est la migration des leucocytes en dehors de la microcirculation et leur accumulation dans le foyer lésionnel. Elle intéresse d'abord les polynucléaires (pendant les 6 à 24 premières heures), puis un peu plus tard (en 24 à 48 heures) les monocytes et les lymphocytes (**Rousselet et al., 2005**).

- **b) La phase cellulaire (recrutement des leucocytes)**

Les phénomènes vasculo-exsudatifs initiaux permettent l'arrivée dans le foyer inflammatoire des leucocytes. Les premiers sur place (environ 6 heures) sont les polynucléaires. Le plus souvent, les polynucléaires sont progressivement remplacés sur le site inflammatoire par les cellules monocytes. Parmi celles-ci, les macrophages ont pour fonction d'assurer la déterision grâce à leur capacité de phagocytose. Il s'y associe des lymphocytes et des plasmocytes qui participent à la réponse immune spécifique de l'antigène (**Nathan, 2002**).

- **c) La phase de réparation**

Elle est caractérisée par le rétablissement de l'homéostasie après une agression mais nécessite d'abord l'arrêt de la réaction immunitaire et ensuite la réparation des tissus lésés. L'arrêt de l'inflammation fait intervenir plusieurs médiateurs tels que les cytokines anti-inflammatoires et l'apoptose des cellules inflammatoires (**Eming *et al.*, 2007**). La réparation des tissus fait intervenir les macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes (**Eming *et al.*, 2007**).

III.4.2. L'inflammation chronique

Morphologiquement, l'inflammation chronique est définie par la présence de lymphocytes, macrophages, et plasmocytes dans les tissus. Dans de nombreux cas, la réponse inflammatoire chronique peut persister pendant de longues périodes (plusieurs mois ou années). Elle est considérée comme être causé par l'engagement persistant des réponses de l'immunité innée et acquise. L'inflammation chronique est initialement déclenchée par des réponses vasculaires qui impliquent l'apparition de molécules d'adhésion sur la surface des cellules endothéliales qui vont spécifiquement entraîner l'adhésion des lymphocytes et des monocytes, et permettent leur transmigration dans le compartiment extravasculaire (**Charles *et al.*, 2010**).

L'inflammation chronique se développe dans les conditions où persiste une agression ou dans les tissus soumis à des réactions auto-immunes, où l'antigène ne peut être éliminé (**Rankin, 2004**). Elle est caractérisée par une durée étalée sur des mois ou des années. Elle peut même se prolonger tout au long de la vie de l'individu (**Fauve et Hevin, 1998**).

À la différence de ce qui se passe dans l'inflammation aiguë, les phases vasculaires et cellulaires ne se succèdent pas mais coexistent tout au long de l'évolution de l'inflammation. Des phénomènes de destruction tissulaire et de tentatives de réparation sont également présents. Les cellules mononuclées et particulièrement les macrophages constituent l'essentiel de l'infiltrat cellulaire vers le site inflammatoire (**Fauve et Hevin, 1998 ; Weill *et al.*, 2003**).

La présence de lymphocytes dans l'infiltrat est habituelle. Tandis que la présence des polynucléaires éosinophiles est caractéristique des inflammations chroniques allergiques et parasitaires (**Dombrowicz et Capron, 2001**).

III.5. Implications pathologiques de l'inflammation

De nombreuses maladies inflammatoires sont liées à des mécanismes considérés comme dysimmunitaires, à savoir les maladies auto-immunes systémiques et localisées, les maladies auto-inflammatoires, les affections inflammatoires de mécanisme indéterminé notamment, des

affections iatrogènes ou paranéoplasiques dont le mécanisme n'est pas auto-immun (**Charles et al., 2010**).

III.6. Thérapeutiques de l'inflammation

Les traitements utilisés dans le cadre de l'inflammation chronique sont variés et dépendent de la maladie. Ces traitements agissent sur les effets initiateurs ou amplificateurs de l'inflammation (migration des cellules inflammatoires, bronchoconstriction, espèces réactives oxygénées). En plus des traitements spécifiques utilisés dans chaque maladie chronique (asthme, athérosclérose, cancer), des anti-inflammatoires seront utilisés pour soulager la douleur et diminuer l'inflammation. Pour limiter l'inflammation, la thérapie employée en médecine moderne consiste en l'utilisation des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes. Les anti-inflammatoires sont des médicaments qui antagonisent les processus inflammatoires (**Mohr et al., 2001**).

Les anti-inflammatoires sont répartis en deux grands groupes :

III.6.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont été utilisés avec succès pour le soulagement de la douleur, la fièvre et l'inflammation depuis plus de 3000 ans et ils sont toujours utilisés quotidiennement par des millions de patients à travers le monde. Ce sont des médicaments à propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques. Ils présentent une grande hétérogénéité chimique mais ils ont en commun l'inhibition non sélective de l'enzyme cyclooxygénase (**Bidaut-Russel, 2001**).

III.6.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou les glucocorticoïdes constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol. Ils représentent le traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques tel que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin et les maladies auto-immune (**Payne et Adcock., 2001**).

Comme pour les AINS, l'usage des glucocorticoïdes est associé à de nombreux effets indésirables. Le risque d'apparition de ces effets indésirables s'accroît avec le prolongement de la durée du traitement et l'augmentation de la posologie. Divers troubles peuvent être observés. Ces troubles peuvent être aiguës tel que l'hypertension artérielle, la dérégulation de la synthèse naturelle de glucocorticoïdes à la fin du traitement, l'euphorie avec insomnie allant jusqu'à une psychose aiguë et l'apparition d'ulcères gastro-duodénaux. Des troubles chroniques peuvent aussi se manifester tel que l'ostéoporose, les cataractes et la prise de poids (**Henzen, 2003**).



*Etude
expérimentale*



*Matériels
et méthodes*

I. Matériels

Ces travaux ont été réalisés dans les laboratoires pédagogiques de l'université Abbes Laghror Khenchela et aussi au Laboratoire De l'hôpital ALI boushaba –Khenchela-

I.1. Matériel végétal

Les feuilles de *Cytisus villosus* ont été récoltées pendant la période du mois de Mars 2017 au début de la saison de floraison de la région d'El-Milia wilaya de Jijel. Ces parties ont été identifiées, nettoyées, séchées à température ambiante à l'abri de la lumière et stockées à température ambiante, broyées et conservées à l'obscurité.

I.2. Réactifs

Les réactifs chimiques utilisés dans cette étude sont : 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl (DPPH), acide trichloracétique (TCA), acide sulfurique (H₂SO₄), FeCl₃, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman- 2-carboxylic acid (Trolox), réactif de Folin-Ciocalteu, carbonate de sodium, acide ascorbique, acide gallique, acide tannique, quercétine, ferricyanide de potassium [K₃Fe(CN)₆] . Chlorure ferreux (FeCl₂), nitrite de sodium (NaNO₂), trichlorure d'aluminium (AlCl₃), hydroxyde de sodium (NaOH), vanilline, chlorhydrique concentré (HCl), acide sulfurique, phosphate de sodium, molybdate d'ammonium, persulfate de potassium (K₂S₂O₈), ABTS, diclofenac, BSA, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, KCl, eau distillé, méthanol, acétone, éthanol.

I.3. Appareillage

L'appareillage utilisé est le suivant :

- Spectrophotomètre UV-visible (UV/Vis 6305 JENWAY)
- Rota vapeur (Hahapeur : KIT / LAB) HS- 2005-N).
- Balance de précision de 0.001g (SOLOCEXMS 7 -H 550-Pro) .
- Agitateur (SCIOLOGEX MS7-H550-Pro).
- Bain-marie (Memmert C).
- pH mètre (pH 211 microprocassor).
- Centrifugeuse.
- Vortex

II. Méthodes

II.1. Préparation des extraits bruts

Les extraits ont été préparés selon la technique décrite par (Isbilir *et al.*, 2012) avec quelques modifications ; une prise d'essai de 20g de poudre de *Cytisus villosus* a été mise à macérer dans 150 ml du solvant (acétone et eau distillée) absolu sous agitation à température ambiante pendant une nuit (24h). L'extrait a été récupéré après filtration à l'aide de papier filtre, puis centrifugé à 3500 tours pendant 5 min et filtré pour une deuxième fois, puis évaporé à sec sous pression réduite à 25°C pour l'extrait acétonique et à 35°C pour celui de l'eau au Rota-vapeur.

Les produits obtenus seront récupérés dans l'eau distillée et l'acétone pour être finalement prêts pour les différents tests antioxydants. Le résidu sec pesé est conservé à +4°C.

II.2. Calcul de rendement

Le pourcentage en extrait bruts sec méthanolique a été calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = (M/M_0) \times 100$$

Où :

R (%) : Rendement exprimé en %.

M : Masse en grammes (g) de l'extrait sec résultant.

M₀ : Masse en gramme (g) du matériel végétal à traiter.

II.3. Dosage des composés phénoliques

II.3.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits des fruits de *C. villosus* a été déterminée par la méthode de (Singleton et Ross, 1965) en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

Un volume de 200 µl pour chaque extrait de *C. villosus* à concentration de 1mg/ml est introduit dans des tubes à essais, le mélange (1 ml de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois et 0.8 ml de carbonate de sodium à 7.5 %) est additionné. Le mélange est agité et laissé à l'obscurité à une température ambiante pendant 30 min. Un témoin est préparé dans les mêmes conditions.

L'absorbance est mesurée à 765 nm. Une courbe d'étalonnage à différentes concentrations d'acide gallique a été préparée.

Les teneurs en phénols totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/ g MS).

II.3.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode colorimétrique adaptée par (Zhishen *et al.*, 1999). Une quantité de 500 µl des extraits est ajoutée à 1500 µl de l'eau

distillée. Au temps zéro, 150 µl de nitrite de sodium (NaNO₂) à 5 % est ajouté au mélange. Après 5 min, 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à 10 % (m/v) est rajouté.

Après une incubation de 6min à la température ambiante, 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1 M) est additionné. Immédiatement, le mélange est complètement agité. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est mesurée à 510 nm contre le blanc. La teneur en Flavonoïdes totaux dans les extraits est exprimée en milligramme (mg) équivalent de quercétine par gramme (g) du poids de la matière sèche (EC/g).

La concentration en flavonoïdes contenus dans les extraits a été calculée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard.

II.3.3. Dosage des tannins condensés

Les quantités des tannins condensés sont estimées en utilisant la méthode à vanilline en milieu acide (**Julkunen-Titto, 1985**). Un volume de 50µl d'extrait est ajouté à 1500 µl de la solution vanilline/acétone (4%, m/v), puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 µl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) sont additionnés et laissés réagir à la température ambiante pendant 20mn. L'absorbance à 550nm est mesurée contre un blanc.

La concentration des tannins est estimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche (EC/g) à partir de la courbe d'étalonnage.

II.4. Evaluation du pouvoir antioxydant

II.4.1. Activité antioxydante totale (TAC)

- **Principe**

La capacité antioxydant totale (TAC) des extraits des plantes est évaluée par la méthode de Phosphomolybdène. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent

Sous la forme d'ions molybdate MoO₄²⁻ à molybdène Mo (V) MoO²⁺ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide (**Prieto et al., 1999**).

- **dosage**

Un volume de 0.3 ml de chaque extrait d'eau distillé et d'acétone de différentes concentrations (0.2 ; 0.4 ; 0.6 ; 0.8 mg/ml) est mélangé avec 3 ml de la solution du réactif (0.6 M acide sulfurique (1ml), 28 mM phosphate de sodium (1ml) et 4 mM molybdate d'ammonium (1ml). Les tubes sont vissés et incubés à 95°C pendant 90 min.

Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 ml de la solution du réactif et 0.3 ml de l'acétone ou de l'eau distillée et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon.

La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS) à partir de la courbe d'étalonnage (Prieto *et al.*, 1999).

II.4.2. Réduction de fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

- **Principe**

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par (Oyaizu 1986 ; Bougandoura, 2013).

La méthode de la réduction du fer est basée sur la réduction de fer ferrique en sel de fer par les antioxydants qui donnent la couleur bleu

(Hampsch-Woodill *et al.*, 2001)

- **Dosage**

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée par (Oyaizu, 1986). 1 ml de chaque concentrations (0.2 ; 0.4 ; 0.6 ; 0.8 mg/ml) de chaque extrait est mélangé avec 2,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6) et 2,5 ml de solution de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) à 1%. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 30 min. Après, 2,5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. 2,5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de FeCl_3 (0,1%).

L'absorbance est mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions opératoires.

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonctions des différentes concentrations. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

Le pourcentage de pouvoir réducteur de fer est calculé par la réaction suivante :

$$\text{Pouvoir réducteur de fer (\%)} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100.$$

A_0 : est l'absorbance de FeCl_3 .

A_1 : est l'absorbance de FeCl_3 solution en présence de l'extrait (Ghaisas *et al.*, 2008).

II.4.3. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α , α -diphényl β picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont, d'azote (Figure 08) (Blois, 1958) .

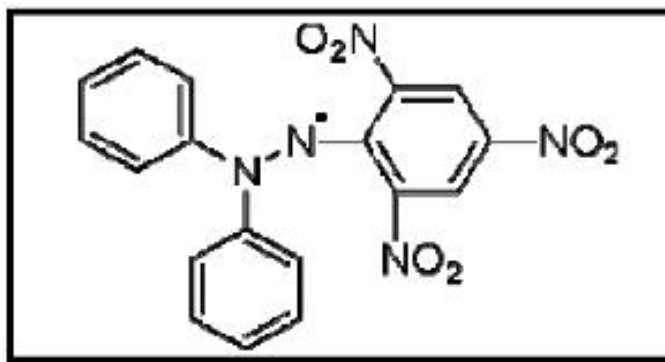


Figure 08 : Structure chimique du radical libre DPPH (2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle) (Popovici *et al.*, 2009).

- **Dosage**

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par (Benhammou *et al.*, 2007). La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,5 mg de DPPH dans 100ml du méthanol.

Un volume de 50 µl de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g/l) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1,950 ml d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration. Pour le calcul des pourcentages d'inhibitions, nous avons utilisé la formule suivante :

$$I \% = (Ac - At) / Ac \times 100$$

Où :

I %: Pourcentage de l'activité anti-radicalaire (AAR%) ;

Ac : absorbance du contrôle.

At : absorbance du test effectué.

Calcul des IC50 : L'IC50 ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC50 pour Efficient Concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes traces ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

II.4.4. Activité antioxydante mesurée par le radical cation ABTS

Le radical cation ABTS est généré en mélangeant un volume égal d'une solution de 2,45 mM de persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) et une solution stock d'ABTS à 7mM, le tout est conservé à l'abri de la lumière et à la température ambiante durant 16h avant utilisation (Awika et al., 2004). La solution obtenue est diluée avec l'éthanol pour obtenir une absorbance comprise entre 0.7 et 0.8 à 734nm. 3ml de cette solution fraîchement préparée est ajoutée à 30 μ l d'extrait à différentes concentrations (0.2 ; 0.4 ; 0.6 ; 0.8 mg/ml).

La lecture est faite à 734 nm après 6min pour chaque série d'analyses. Le Trolox est utilisé pour le contrôle positif.

Le pourcentage d'inhibition du radical ABTS est calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = (A_c - A_t) / A_c \times 100$$

Où :

A_c : absorbance du contrôle.

A_t : absorbance du test effectué.

II.5. Tests anti-inflammatoires

L'étude de l'activité anti-inflammatoire par le test de la stabilité de l'albumine à différentes concentrations a été réalisée en triple, dont les absorbances sont mesurées à 255nm.

L'activité anti-inflammatoire in vitro des extraits aqueux et acétonique de *Cytisus villosus* a été effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines.

L'activité a été effectuée avec 3 types de concentrations pour chaque extrait (0.05mg/ml, 0.1mg/ml et 0.25 mg/ml). (Chinna et al., 2015) La méthode consiste à préparer quatre solutions ;

- **La solution d'essai** (0,5 ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de sérum bovine albumine (BSA) 0.5 % et 0,05 ml d'extrait aqueux/acétonique.

- **La solution contrôle test** (0,5 ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 0.5 % et 0,05 ml d'eau distillé.

- **La solution contrôle produit** (0,5 ml) composé de 0,45 ml d'eau distillé et 0,05 ml d'extrait aqueux/acétonique.

- **La solution standard test** (0,5 ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 0.5 % et 0,05 ml de la solution de standard diclofenac de sodium à concentration de 250 μ g/ml. (Su et al., 2006.)

Les échantillons ont été incubés à 37 ° C pendant 20 min, ensuite la température était augmentée pour garder les échantillons à 57°C pendant 3 min, après refroidissement des tubes, 2,5 ml de la solution phosphate tampon saline (pH 6,3) a été ajouté aux solutions ci-dessus,

l'absorbance a été lue par le spectrophotomètre UV –visible à 255 nm, et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculée comme suit :


Pourcentage d'inhibition = 100- (ABS de la solution Test-ABS de la solution contrôle produit) / ABS de la solution control test×100

Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées ; et les résultats sont comparés avec le Diclofenac de sodium (25 mg/ml).

II.6.Analyse statistique

Les expériences *in vitro* ont été faites en triple, Les résultats ont été présentés par la moyenne et plus ou moins l'écart type pour chaque cas. Les valeurs IC50 (concentration inhibitrice a 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentration)].

Les analyses statistiques ont été réalisées par le logiciel statistique XLSTAT. Elles sont traitées statistiquement par le test d'ANOVA suivi par le test de comparaison multiple(HSD). Une P < 0,05 a été utilisé comme critère pour la significativité statistique.



*Résultats
et discussion*

II Résultats et discussion

Le présent travail porte sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydants et anti-inflammatoires in vitro d'extrait aqueux et acétonique de la partie aérienne de la plante médicinale «*Cytisus villosus*».

II.1. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des deux extraits préparés a été faite après avoir séché la plante à l'ombre et l'avoir rendu en poudre. En fait, l'utilisation d'un matériel sec est recommandée du moment que les flavonoïdes (particulièrement les glycosides) peuvent être soumis à une dégradation enzymatique quand le matériel végétal est frais ou non séché. Le séchage de la plante à l'obscurité prévient les transformations chimiques telles que l'isomérisation et la dégradation causées par les radiations ultraviolettes de la lumière solaire (Deghdak *et al.*, 2014)

L'utilisation de la poudre à la place de la plante entière a pour but d'améliorer l'extraction du fait de rendre l'échantillon plus homogène, augmenter la surface du contact avec le solvant et faciliter sa pénétration à l'intérieur des cellules qui ne sont pas détruites après le broyage. (Jones et Kinghorn, 2005).

II. 1.1. Détermination de rendement d'extraction

La méthode extraction par macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact de l'eau et de l'acétone avec l'extrait tout en préservant la bio-activité de ses constituants. De même le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement d'extrait à pression réduite permet d'obtenir le maximum des composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction (Deghdak *et al.*, 2014)

Il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie de manière générale. En effet, le rendement n'est pas relatif, il dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. D'autre part, la méthode d'extraction affecte également le contenu total en phénol et flavonoïdes (Lee *et al.*, 2003).

Les extractions des composés phénoliques de notre plante nous a permis de calculer le rendement de chaque extrait. Il a été déterminé par rapport à 100g de matériel végétal sec et broyé est exprimé en pourcentage. Les résultats obtenus sont illustrés dans le (Tableau 01).

Tableau 01 : Le rendement de l'extrait eau et acétone de *Cytisus villosus*.

Extrait	Acétone	Eau
Rendement (%)	18.42±13	20.10±9

L'analyse des résultats du **Tableau 01** a montré que le rendement de l'extrait aqueux des feuilles de *Cytisus villosus* (20.10 ± 9 %) est légèrement supérieur à celui de l'extrait d'acétone (18.42 ± 13 %). L'analyse statistique, par le test ANOVA suivi par le test de comparaison multiple (HSD), a montré une différence très hautement significative entre les deux extraits avec ($p > 0,001$).

D'une manière générale, les teneurs en extraits secs varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille mais également en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide des polyphénols : la température, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion de solvant. (Majhenic *et al.*, 2007).

Il a été démontré que l'extraction par les solvants à température élevée permettait d'obtenir des rendements plus élevés en extraits secs que lorsqu'ils sont obtenus à température ambiante.

II.2. Dosage des composés phénoliques

Les composés phénoliques (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (Beta *et al.*, 2005).

Et comme la majorité des effets pharmacologiques des plantes sont dûs à ces substances, un dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins des extraits (eau et acétone) a été effectué pour en estimer les teneurs.

II.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Les composés phénoliques comme les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins sont considérés comme les contributeurs majeurs à la capacité anti-oxydante des plantes (Li *et al.*, 2007).

Ces composés possèdent aussi diverses activités biologiques telles que les activités anti-inflammatoires, antibactériennes, antivirales, antiallergiques, anti-thrombotique et vasodilatatrices qui peuvent être reliées à leur activité anti-oxydante (Gulcin *et al.*, 2010).

La teneur en polyphénols totaux, de l'extrait d'acétone et d'eau de *Cytisus villosus* a été déterminée en utilisant la méthode de Folin Ciocalteu. Les résultats exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche sont présentés dans le (**Tableau 02**).

Tableau 02 : Teneur des extraits de l'acétone et de l'eau de *Cytisus villosus* en polyphénols totaux.

Extrait	Acétone	Eau
Teneur en polyphénols (mg EAG/g)	124.47 ± 13.80	135.66 ± 9.13

Les composés phénoliques ont été quantifiés en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme de la matière sèche en se basant sur la fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax + b$) d'acide gallique à différentes concentrations (0.2 ; 0.4 ; 0.6 ; 0.8 mg/ml).

Les résultats montrent que l'extrait d'eau est plus riche en polyphénols que l'extrait acétone, avec des valeurs de 135.66 ± 9.13 et 124.47 ± 13.80 mg EAG/g, respectivement. En outre, l'analyse statistique des résultats n'a montré aucune différence significative avec ($p > 0.307$).

La variabilité des teneurs en polyphénols chez les espèces végétales est influencée par la composition phénolique des extraits, les facteurs génotypiques, les conditions biotiques (espèce, organe et l'étape physiologique) et abiotiques (facteurs édaphiques), la nature du sol et le type du microclimat et aussi les étages bioclimatiques où poussent ces plantes (**Ksouri et al., 2007 ; Atmani et al., 2009**).

Le dosage des polyphénols totaux est fait par la méthode de Folin-Ciocalteu. Cette méthode est considérée comme la meilleure méthode de détermination du taux des polyphénols totaux des extraits de plantes car elle est standardisée, simple, reproductible et les interférences avec la matrice de l'échantillon qui est souvent coloré sont minimisées à la grande longueur d'onde d'absorption (765 nm) utilisée (**Huang et al., 2005 ; Djeridane et al., 2010**).

Malgré la sensibilité et la simplicité de la méthode Folin, elle n'est pas spécifique des polyphénols. En effet, le réactif peut réagir avec des protéines, des sucres réducteurs, de l'acide ascorbique et des composés soufrés (**Singleton et al., 1999**).

Le pouvoir réducteur de l'espèce *C. villosus* est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (**Siddhuraju et Beker, 2007**).

Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Siddhuraju et Beker, 2007**).

II.2.2. Dosage des flavonoïdes

L'étude quantitative des extraits aqueux et acétonique au moyen des dosages spectrométriques et selon la méthode de trichlorure d'aluminium avaient pour objectif la détermination de la teneur totale des flavonoïdes. Une courbe d'étalonnage de la quercétine à différentes concentrations a été tracée pour cet objectif.

Les quantités des flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en milligramme équivalent de quercétine par gramme du poids de matière sèche (mgEQ/g) et déterminés par l'équation de type $y = ax + b$. Les résultats sont représentés dans le (**Tableau 03**)

Tableau 03 : Teneur en flavonoïdes des extraits d'acétone et de l'eau des feuilles de *Cytisus villosus*.

Extrait	Acétone	Eau
Teneur en Flavonoïdes (mg EQ/g)	14.78±0.99	62.66±12.36

D'après les résultats du tableau 03, il est clair que la teneur en flavonoïdes de l'extrait aqueux est supérieure par rapport à celui de l'acétone avec des valeurs de (62.66±12.36 mgEQ/g) et (14.78±0.99 mgEQ/g) respectivement.

L'analyse statistique des résultats montre qu'il y a une différence hautement significative entre l'extrait acétone et celui d'eau concernant la teneur en flavonoïdes avec ($p > 0,003$).

D'après nos résultats, nous pouvons dire que les feuilles de *Cytisus villosus* constituent une source non négligeable de flavonoïdes. **Maisuthisakul et al. (2007)** ont constaté que la teneur en flavonoïdes des extraits d'acétone de 28 plantes, est liée à la teneur des composés phénoliques totaux.

II.2.3. Dosage des tannins condensés

Le dosage spectrométrique des extraits aqueux et acétonique selon la méthode de vanilline en milieu acide (**Julkunen, 1985**) avait pour objectif la détermination de la teneur en tannins condensés. Une courbe d'étalonnage d'acide tannique à différentes concentration a été tracée pour cet objectif. Les quantités des tannins condensés correspondantes ont été rapportées en milligramme équivalent de l'acide tannique par gramme du poids de matière sèche (mg EAT/g) et déterminées par l'équation de type $y = ax + b$.

Tableau 04: Teneur en tannins condensés des extraits d'acétone et de l'eau des feuilles de *Cytisus villosus*.

Extrait	Acétone	Eau
Teneur en Tannins condensés (mg EAT/g)	6.75±2.70	13.66±1.41

L'analyse des résultats obtenus montre l'extrait acétone est moins riches en tannins condensés (6.75±2.70 mg EAT/g) que celui d'eau (13.66±1.41 mg EAT/g).

Les résultats de test ANOVA montre qu'il y a une différence très hautement significative entre l'extrait acétone et celui d'eau concernant la teneur en tannins avec ($p > 0,001$).

D'après **Falleh et al. (2008)**, la solubilité des polyphénols est gouvernée par le type de solvant utilisé, leur degré de polymérisation ainsi que de leur interaction avec d'autres

constituants et la formation de complexes insolubles. Pour une plus haute récupération de polyphénols, le méthanol est le solvant approprié. En effet, l'extrait acétone de *Cytisus villosus* était plus riche en polyphénols que l'extrait d'eau. Cela est expliqué par la présence d'un grand nombre de molécules solubles dans l'eau est non solubles dans l'alcool.

II.3. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de *Cytisus villosus*

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits a été réalisée par quatre techniques à savoir la capacité antioxydante totale (TAC), la réduction de fer (FRAP), le test anti radicalaire (DPPH) et l'activité antioxydante mesurée par le radical cation (ABTS).

II.3. 1. Activité antioxydante totale (TAC)

L'activité antioxydante totale a été déterminée pour les deux extraits et exprimée en mg équivalent d'acide ascorbique/g (mgEAA/g). Les résultats sont illustrés dans la (Figure 09).

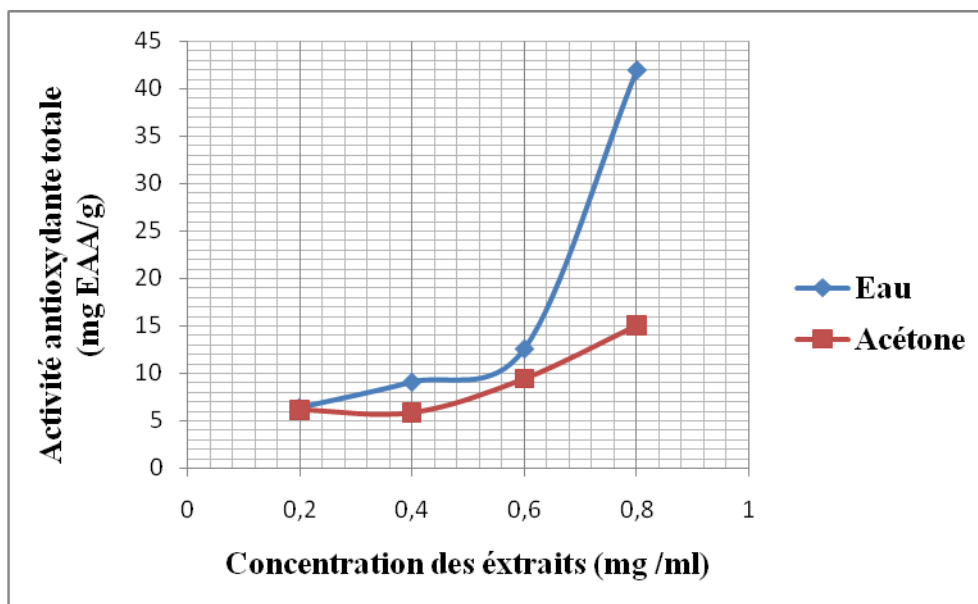


Figure 09 : L'activité antioxydante totale (TAC) des extraits de *Cytisus villosus*.

L'analyse de la figure 09 montre que l'activité antioxydante totale des deux extraits augmente avec l'augmentation de la concentration de ces derniers. En outre, l'extrait aqueux exerce une activité antioxydante plus forte que celle de l'extrait acétone, cette activité atteint 42 ± 16.53 mg EAA/g et 15 ± 4.25 mg EAA/g pour 0.8 mg/ml d'extrait eau et acétone respectivement. L'analyse statistique par le test ANOVA a montré une différence non significative entre l'activité antioxydante totale des deux extraits ($p > 0.061$)

Miliauskas *et al.* (2004) ont montré qu'un antioxydant efficace dans un test n'est pas forcément efficace dans un autre. D'autre part, Moure *et al.* (2001) a rapporté qu'il est très accepté que ce n'est pas nécessairement la forte teneur en polyphénols exhibe une activité antioxydante puissante.

II.3.2. Réduction de fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Les différents extraits sont traités de la même façon que ceux des solutions standards de l'acide ascorbique. Nous avons tracé les courbes représentant la variation du pouvoir réducteur exprimée en absorbance en fonction de la concentration des extraits. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Hubert, 2006).

Les résultats trouvés pour le test du pouvoir réductrice sont représentés dans la (Figure 10).

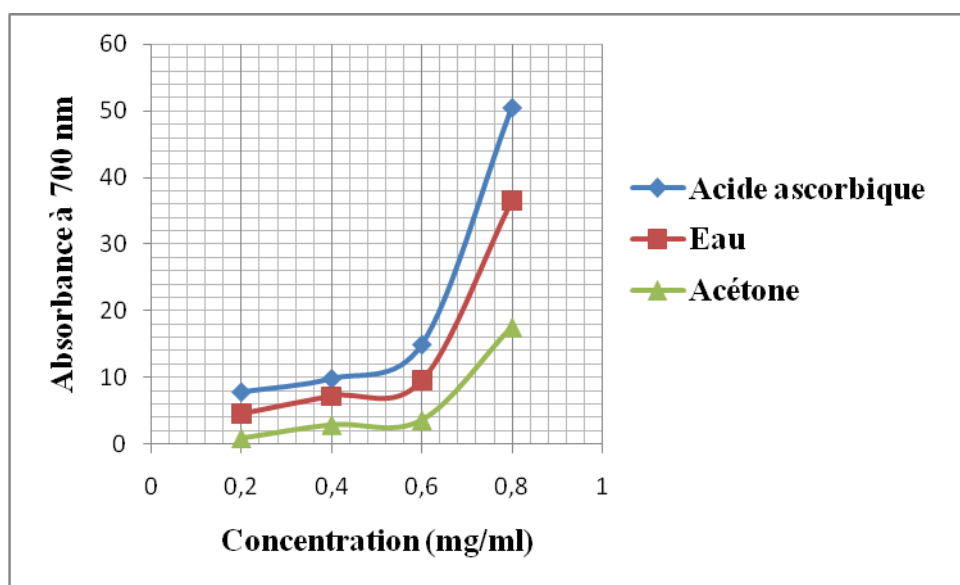


Figure 10 : Activité réductrice des extraits (acétone / eau) de *Cytisus villosus* et de l'acide ascorbique vis-à-vis du fer ferreux.

En analysant la figure ci-dessus, il apparaît clairement que le pouvoir réducteur des deux extraits augmente avec la concentration. D'autre part, nous avons constaté que l'extrait d'eau présente le meilleur pouvoir réducteur par rapport à l'extrait acétone. Il est clair aussi que le pouvoir réducteur de nos extraits est plus faible que celui de l'acide ascorbique utilisé comme standard.

Les résultats de l'analyse statistique par le test ANOVA n'ont montré aucune différence significative entre l'extrait acétone et d'eau concernant la teneur en FRAP avec ($p > 0,572$).

La capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Yang *et al.*, 2008). De plus, plusieurs études ont indiqué qu'il y a une corrélation directe entre les activités antioxydantes et la puissance de réduction des composants de quelques plantes (Yildirim *et al.*, 2001).

Par ailleurs, la plupart des activités antioxydantes non enzymatiques telles que le piégeage du radical libre et l'inhibition de la peroxydation est mise en place par la réaction redox (Zhu *et al.*, 2002).

II.3.3. Piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Pour détecter l'activité anti-radicalaire des différents extraits de *Cytisus villosus*, nous avons utilisé le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), un radical stable, violet en solution et présentant un maximum d'absorption caractéristique à 517 nm. Le protocole appliqué en routine en repose sur la disparition de ce maximum lorsque le DPPH est réduit par un composé à propriété anti radicalaire, entraînant ainsi une décoloration.

Les résultats peuvent être exprimés en tant que : pourcentage de l'activité anti radicalaire ou en pourcentage de DPPH restant ou peuvent également être exprimés en utilisant le paramètre IC50, qui est défini comme la concentration du substrat qui cause une perte de 50% de l'activité de DPPH (Markowicz Bastos *et al.*, 2007).

Les résultats de piégeage de ce radical par les différentes concentrations des extraits aqueux et acétoniques et par l'acide ascorbique utilisé comme standard sont récapitulés dans la figure 11

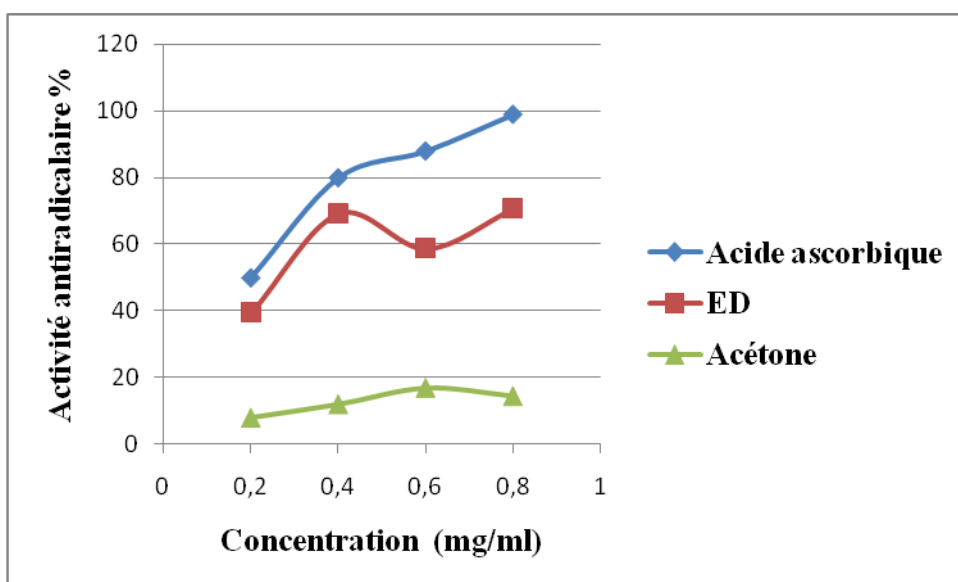


Figure 11 : Activité anti radicalaire des extraits acétone et eau de *Cytisus villosus* et de l'acide ascorbique vis-à-vis du radical DPPH.

Il est clair d'après les résultats obtenus que les deux extraits testés sont capables de neutraliser le radical DPPH•, en outre, cette capacité accroît généralement avec la concentration des extraits.

Par comparaison avec le pouvoir inhibiteur de l'acide ascorbique, nous pouvons déduire que nos extraits et surtout celui d'acétone présentent une modeste capacité à piéger le radical DPPH• qui se traduit par $72,5 \pm 3,8$ % enregistré avec l'extrait aqueux à 0.8mg/ml et par $18,5 \pm 14,44$ % enregistré avec l'extrait d'acétone par rapport à $95,77\% \pm 20,99$ % pour le standard à la même concentration.

L'analyse statistique des résultats trouvés avec nos extraits a montrée une différence très hautement significative avec ($P < 0.001$).

A partir de ces courbes nous pouvons déterminer la valeur IC50 (mg/ml) de chaque extrait ainsi que de l'acide ascorbique. Les résultats sont présentés dans la (**Figure 12**).

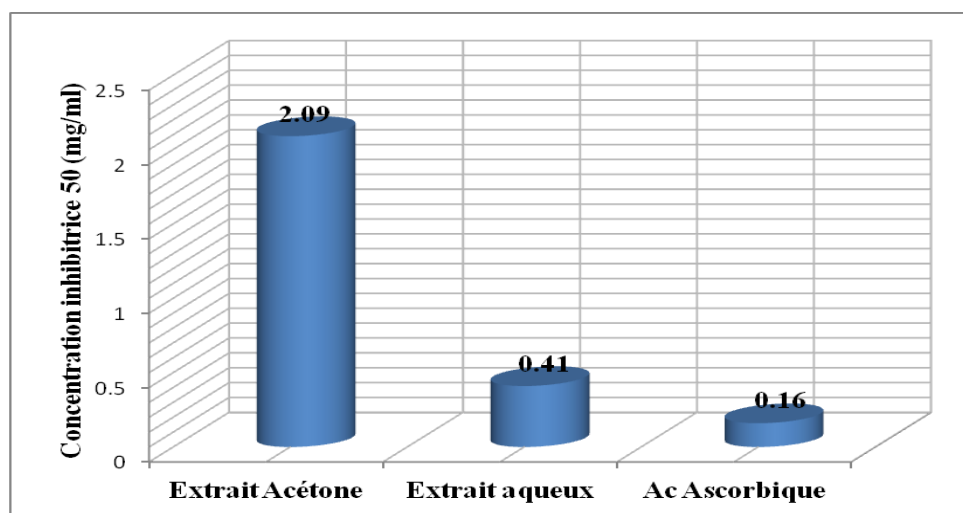


Figure 12: Valeurs des concentrations efficaces 50% de l'activité anti radicalaire.

Ainsi, l'examen de la figure 12, nous laisse constater que l'extrait aqueux présente l'effet antioxydant le plus marqué car sa concentration qui permet d'inhiber l'effet de 50% des radicaux libre est la plus faible (0.41 mg/ml) par rapport à l'extrait acétone (2.09 mg/ml). L'analyse par le test ANOVA a montrée une différence hautement significative ($P < 0.01$).

Selon **Turkmen et al. (2007)**, les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale.

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

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

II.3.4. Activité antioxydante mesurée par le radical cation ABTS

La méthode du radical ABTS est l'un des tests les plus utilisés pour la détermination de la concentration des radicaux libres. Le radical $ABTS^{•+}$, en contact avec un donneur de H^{\bullet} conduit à l' $ABTS^+$ et à la décoloration à 734 nm de la solution (**Lien et al., 1999**).

Les valeurs des pourcentages d'inhibition du radical libre ABTS par tous les extraits testés sont représentées par la figure 13 .

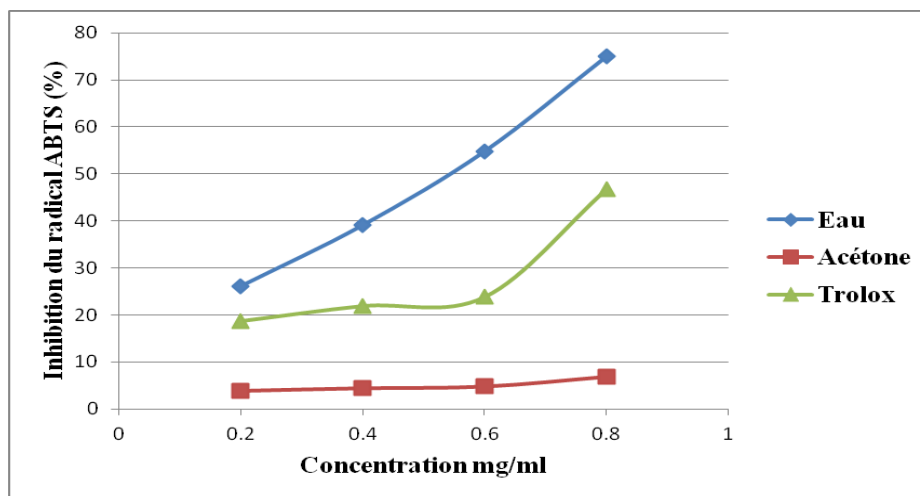


Figure 13 : Pourcentages d'inhibition du radical libre ABTS des extraits et de Trolox à différentes concentrations.

L'analyse des résultats illustrés ci-dessus montre que l'augmentation du pourcentage d'inhibition des radicaux libres ABTS est proportionnelle avec les concentrations des extraits et de Trolox. D'autre part, les meilleurs résultats d'inhibition ont été trouvés avec l'extrait d'eau qui peut inhiber plus de 75.04 ± 14.57 % de l'activité du radical libre ABTS à concentration de 0.8mg/ml. Par ailleurs, l'activité d'inhibition de Trolox (46.79%) reste inférieure à celle de l'eau à la même concentration, ce qui nous a permis de déduire que ce dernier a subi des modifications au cours du stockage qui ont mené à la diminution de son activité.

L'analyse statistique des résultats par le test ANOVA montre qu'il y'a une différence très hautement significative entre l'extrait d'acétone et celui d'eau concernant l'inhibition du radical ABTS avec ($p < 0,0001$).

Un antioxydant est toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi, retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. C'est une substance qui en faible concentration comparativement à la quantité des substances oxydables telles que les espèces oxygénées réactives (ROS), retarde significativement ou prévient l'oxydation des substrats comme les lipides, les protéines, les ADN et les carbohydrates (**Berger, 2006**).

La plupart des plantes médicinales testées présentées une activité antioxydante qui s'est traduite par leur pouvoir réducteur des radicaux libres DPPH[•] et ABTS^{•+}. Ce pouvoir réducteur des radicaux libres qui sont à l'origine de l'oxydation, confirme l'utilisation

traditionnelle de ces plantes pour traiter entre autres, des maladies oxydatives (Soares *et al.*, 2003).

Pour la plupart des plantes testées, l'effet obtenu avec la méthode DPPH n'est pas corrélé par celui obtenu par la méthode ABTS ; les résultats diffèrent par ces deux méthodes. Ces variations peuvent s'expliquer par les mécanismes impliqués dans les réactions antioxydantes des radicaux. En effet, l'activité antioxydante des composés testés dépend de l'agent utilisé et insistant sur le mécanisme d'action de l'anti-oxydant (Soares *et al.*, 2003).

D'autres facteurs, tels que la stéréo-sélectivité des radicaux ou la solubilité des composés dans les systèmes de tests différents peuvent aussi influencer sur la capacité de chaque extrait (Yu *et al.*, 2002).

Dans ce sens et selon Del Castillo *et al.* (2002) qui ont analysé un café de plusieurs processus de torréfaction et ont trouvé des réponses plus élevées par le test ABTS d'une solution aqueuse de café par rapport à une autre éthanolique, cette différence résulte du fait que certains composants, apportant une contribution importante à l'activité antioxydante des solutions aqueuses, ne sont pas solubles dans l'éthanol. La différence de fonctions chimiques des composés contenus dans les différentes plantes analysées pourrait aussi expliquer les variations de l'activité antioxydante.

D'une manière générale, on peut conclure que l'extrait aqueux des feuilles de *Cytisus villosus* ayant le meilleur pouvoir antioxydant, et que cette plante peut être une source non négligeable des substances à activité antioxydante.

II.4. Tests anti-inflammatoires

En analysant la figure 14 qui représente le pourcentage de la stabilité de BSA par les deux extraits des feuilles de *Cytisus villosus* et par le Diclofinac, il apparaît que la stabilité de la protéine augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits et de Diclofinac, ce qui signifie que l'activité anti-inflammatoire de ces derniers est proportionnelle avec les concentrations.

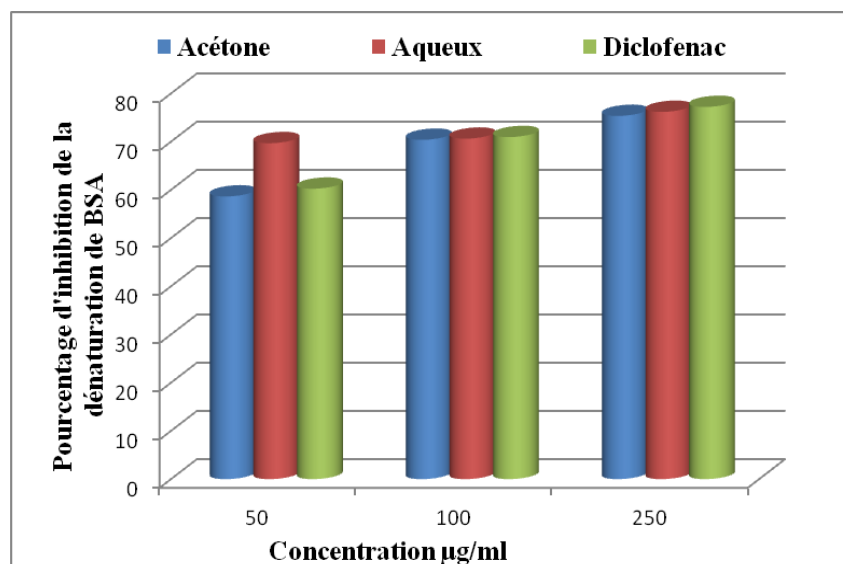


Figure 14 : Pourcentage de la stabilité de BSA par les deux extraits des feuilles de *Cytisus villosus* et le Diclofenac.

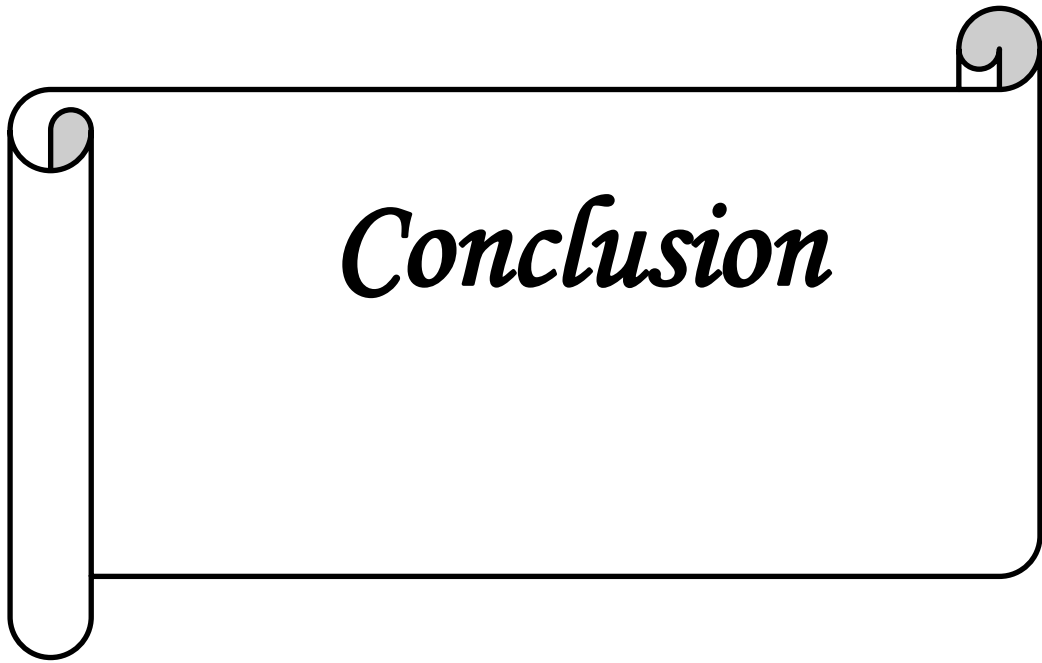
On constate aussi que l'extrait aqueux de la plante *Cytisus villosus* était légèrement plus efficace par rapport à l'extrait acétone où nous avons enregistré des valeurs de $76.19 \pm 4.2\%$ et de $75.35 \pm 9.3\%$ à la concentration de $250 \mu\text{g/ml}$ respectivement. Ces résultats sont aussi comparables à ceux obtenus pour le Diclofenac sodium, un médicament anti-inflammatoire utilisé comme standard qui exerce une inhibition de $77.21 \pm 14.3\%$ à la même concentration.

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation. La production d'auto-antigènes dans les maladies inflammatoire peut être due à la dénaturation des protéines *in vivo*, le mécanisme possible de cette dénaturation consiste à l'altération des liaisons électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintien la structure tridimensionnelle des protéines (Mizushima et Kobayashi ,1968 ; Sangeet et Kousalyer , 2004).

Il est prouvé que les anti-inflammatoires non stéroïdiens comme le phénylbutazone et l'indométhazine n'inhibent pas seulement la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires, mais aussi la dénaturation des protéines (Sangeet et Kousalyer, 2004).

L'activité inhibitrice de la dénaturation de BSA est peut être attribuée à la présence de différents composés bioactifs tels que les flavonoïdes et les tannins dans les extraits trouvés lors du criblage phytochimiques (Deghdak *et al.* ,2014).

On peut conclure que l'extrait aqueux possède un meilleur effet anti-inflammatoire marqué *in vitro* contre la dénaturation des protéines par rapport à l'acétone et que d'autres études définitives sont nécessaires pour déterminer les mécanismes et les électeurs derrière ses actions anti-inflammatoires.



Conclusion

Conclusion

Les plantes médicinales ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pendant plusieurs années. Elles sont toujours des sources essentielles de médicaments et ce sont la source de la majorité des antioxydants naturels et elles restent encore sous exploitées dans le domaine médicale et l'industrie pharmaceutique, sachant que les antioxydants sembleraient de manière significative à la prévention des maladies, le développement de nouveaux médicaments à base d'antioxydants d'origine naturelle doit être à l'ordre de jour. Cette efficacité est due à des métabolites secondaires ou ses principes actifs comme: les composés phénoliques, les alcaloïdes, et les huiles essentielles. Notre pays est riche de ce type des plantes qui sont utilisées souvent en médecine traditionnelle.

Ce travail porte sur la détermination des activités antioxydants et anti-inflammatoires de la plante médicinale *Cytisus Villosus*. Dans un premier temps, la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins des deux extraits (eau et acétone) a été effectuée.

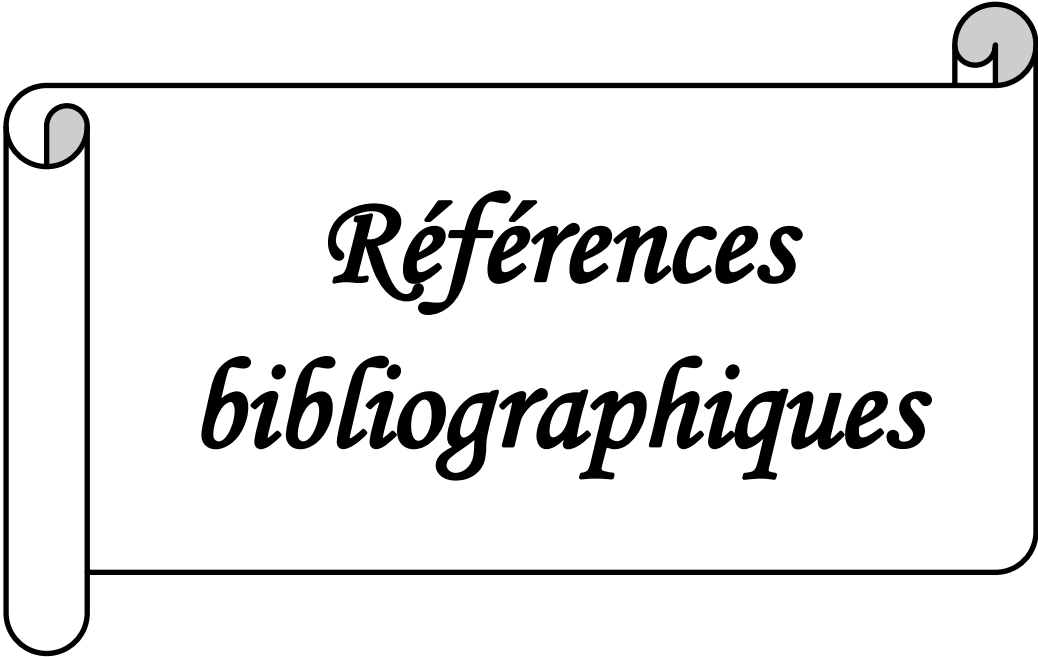
L'extraction des composés phénoliques des feuilles de la plante a permis d'obtenir des rendements qui diffèrent en fonction des solvants utilisés, alors que la teneur en composés phénoliques, flavonoïdes était conséquente.

L'extrait d'eau et l'extrait acétonique ont montré une richesse en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins.

Et selon les résultats obtenus, nous pouvons dire que : l'extrait d'eau donne une bonne activité antioxydante soit pour la capacité de piégeage de radicaux libres (DPPH) ,ou bien pour la capacité antioxydante totale (TAC) et la réduction de fer , soit pour effet mesuré par le radical cation (ABTS).

Concernant l'activité anti-inflammatoire des deux extraits: l'extrait aqueux présente un meilleur pouvoir dénaturation de la protéine BSA par rapport à l'extrait acétonique.

Enfin, La plante médicinale *Cytisus Villosus* est une source prometteuse d'agents antioxydants et anti inflammatoire ce qui est expliqué par la nature des composés présents dans cette plante.



*Références
bibliographiques*

Référence

- **Adarshv M. , Ajay K P., Kavitha D., Anura g k B (2011).**Anti denaturation and antioxidant activities of annonacherimola in-vitro. International Journal of Ppharma and Bio Sciences ,2(2): 629-675.
- **Ahsan H, Ali A and Ali R (2003).** Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. Clinical and Experimental Immunology, 131: 398-404.
- **Aïra REZAIRE (2012).** Thèse pour le doctorat en Phytochimie : Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa) ; Sous la direction de Bernard Fils-Lycaon ; Soutenue le 19 décembre 2012 à Cayenn.
- **Ansari K N (1997).** The free radicals-the hidden culprits-an update. Indian Journal of Medical Sciences, 51: 319-336.
- **Aruoma O I (1999).** Free radicals, antioxidants and international nutrition. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 8 (1) : 53-63.
- **Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache,N., Atmani, D. (2009).** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. Food Chem, 112: 303–309.
- **Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Bagad Y M., Umarmkar K R., Tatia A U .,Surana S J (2011).**Investigation of anti-inflammatory and analgesic activity of *brideliaairyhawii* (Euphorbiaceae) .J pharm Res 4(5) :1326-1332.
- **Bandhopadhyay U., Das D. and Banerjee R.K. (1999).** Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. Current Science, 77 : 658-666.
- **Beckman K B and Ames B N (1998).** The Free radical theory of aging matures. Physiological Reviews, 78 (2):547-581.
- **BENBRINIS S (2011).**Mémoire Présenté Pour l’obtention du Diplôme de MAGISTER en BIOCHIMIE, THEME :Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de *Santolina chamaecyparissus* , UNIVERSITE FERHAT Abbas-SETIF.

- **Benhammou N., Bekkara A., Kadifkova P.(2007).** Antiradical capacity of the phenolic compounds of Pistacia lentiscus L. and Pistacia atlantica Desf, *Advances in Food Sciences*,29(3) : 155-161.
- **Bergendi L, Benes L, Durackova Z and Ferencik M (1999).** Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences*, 65:1865-1874.
- **Berger M.M. (2006).** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20 : 48-53.
- **Beta T ., Nam S ., Dexter J E et Sapirstein H D (2005).** Phenolic content and antioxidant activity of pearkd wheat and Roller Milled fractions .*Cereal chem* , 82 : 390-393.
- **Bidaut-Russell M (2001).** Adverse gastrointestinal effects of nsaid: consequences and costs. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*.15 : 739-753.
- **Blokhina O, Virolainen E and Fagerstedt K V (2003).** Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review. *Annals of Botany*, 91 :179-194.
- **Boizot N., et Charpentier .J.P (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra*. pp 79-82. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).
- **Bonnefont-Rousselot D, Peynet J, Beaudeau J L, Thérond P, Legrand A and Delattre J (2002).** Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16 :260-267.
- **Botting R.M. et Botting J.H. (2000).** Pathogenesis and mechanism of inflammation and pain: An overview. *Clinical Drug Investigation*, 19: 1-7.
- **Bougandoura N., Bendimerad N(2013).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de Satureja calamintha ssp. *Nepeta (L.) Briq. Nature & Technologie*. (9).
- **Briquet, J. (1894).** Etudes sur les Cytises des Alpes Maritimes. Georg & Co., Genève et Bale.
- **Bubonja-Sonje M, Giacometti J and Abram M (2011).** Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, 127:1821-1827.

- **Cadenas E and Davies J A (2000).** Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29 :222-230.
- **Cannon. S., 2008.** Chapitre 3 : Legume comparative genetics
- **Carillon E. (2000).** La phytothérapie face à l'évolution médicale.
- **Chan K L (2003).** Role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury. *Current Medicinal Chemistry*, 1, 1-13.
- **Charles N S, Peter A W et Derek W G (2010).** *Fundamentals of Inflammation.* Cambridge University Press, 2-3. *Chem.* 51, 1077–1080. doi:10.1021/jf020864z
- **Chinna A M, Eswaraiya H A. Dutta lanurag Pharmacy College, Kodad, Telengana State(2015).** India 2 Assam Down Town University, Guwahti, India. *Am-Euras. J. Agric. & Environ*, 15 (1): 115-121.
- **Choe, E. et D. B. Min (2005).** "Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods." *Journal of Food Science* ,70(9): R142-R159.
- **Chu W L, Lim Y W, Radhakrishnan A K and Lim P E (2010).** Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10 (53): 2-8.
- **Cohen J H, Kristal A R and Stanford J L (2000).** Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 61-68.
- **Debbache, N., Atmani, D. (2009).** Antioxidant capacity and phenol content of selected constituents and antioxidant activity of some *Stachys* taxa. *Food Chem.* (in press).
- **Del Castillo, M.D., Ames, J.M., Gordon, M.H (2002).** Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3698–3703.
- **Delattre, J., J.-L. Beaudoux et D. Bonnefont- Rousselot (2005a).** "Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques." 1- 23.
- **Delattre, J., J.-L. Beaudoux et D. Bonnefont- Rousselot (2005c).** "Radicaux libres et stress antioxydant, aspects biologiques et pathologiques." 60-80.
- **Djeridane A, Yousfi M, Brunel J M and Stocker P (2010).** Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in

screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2599-2606.

- **Dombrowicz D. et Capron M. (2001).** Eosinophils, allergy and parasites. *Current Opinion in Immunology*, 13: 716-720.

- **Doyle J.J., 1994.** Phylogeny of the legume family: an approach to understanding the origins of nodulation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 25: pp325–349.

DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *J. Agric. Food edibles plant species. Asia of pacific journal of clinical nutrition.* 17 (S1): 275-279.

- **Eming S A, Krieg T, Davidson J M (2007).** Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 514–525.

- **Evans W J (2000).** Vitamin E, vitamin C and exercise. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 647-652.

- **Evans, P. et B. Halliwell (1999).** "Free radicals and hearing: Cause, consequence, and criteria." *Annals of the New York Academy of Sciences* ,884: 19-40.

- **Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M and Abdelly C (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 372-379.

- **Fauve R.M. et Hevin M. (1998).** Réaction inflammatoire et réactions immunitaires. In: inflammation. Russo-Marie F., Peltier A., Polla B S. Eds, John Libbey Eurotext (France). 10-19.

- **Fouché J., Marquet A. et Hambuckers A. (2000).** Les plantes médicinales de la plante au médicament, *Observation du monde des plantes.*

- **Gaëlle Auvray (2011).** Les relations phylogénétiques au sein d'un système réticulé : cas particulier de *Cytisus scoparius* L. (Genisteae, Fabaceae) et des espèces, hybrides et cultivars apparentes.. *Biologie végétale. Université d'Angers Français.* p :57-58

- **Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z et Jore D (2003).** Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*, 91-96.

- **GHALEM M (2014).** En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat En Physiologie et Biochimie de la Nutrition : Effets antioxydants et anti-inflammatoires des extraits de *Zizyphus lotus* et *Anthyllis vulneraria* ; UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID – TLEMCEM Soutenu en 2014 ; Année Universitaire : 2013-2014.
- **Goeptar A R, Scheerens H and Vermeulen N P (1995).** Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Critical Reviews in Toxicology*, 25:25-65.
- **Govindarajan R., Vijayakumar M. and Pushpangadan P. (2005).** Antioxidant approach to disease management and the role of 'Rasayana' herbs of Ayurveda. *Journal of Ethnopharmacology*, 99 : 165-178.
- **Graham H.D. (1992).** Stabilisation of the Prussian blue colour in the determination of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104 :1258–1268.
- **Gulcin I, Huyut Z, Elmastas M and Aboul-Enein H Y (2010).** Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3, 43-53.
- **Guzik T J, Korbust R and Adamek-Guzik T (2003).** Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54 (4):469-487.
- **Hagerman A E et Butler L G (1989).** Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *Journal of Chemical Ecology*, 15 (6), 1795-1810.
- **Halliwell B and Gutteridge J M C (2007).** *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press, Oxford (fourth edition).
- **Hampsch-Woodill M., OU B., Prior R L.,(2001).** Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- **Hayouni, E.A., Abedrabba. M., Bouix, M., Hamdi, M. (2007).** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105, 1126- 1134.
- **Hennebelle T (2006).** "Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants." *Chimie Organique et Macromoléculaire Docotrat*: 303.

- **Henzen C (2003).** Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires. Forum médical suisse, 19, 442-446.
- **Hu F B (2003).** Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. American Journal of Clinical Nutrition, 78, 544-551.
- **Huang D, Ou B and Prior R L (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 53:1841-1856.
- **Huang D., Ou B. Et Prior R.L (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. J of Agr Food chem.53:1841-1856. merican Journal of Clinical Nutrition, 78 :544-551.
- **Hubert J. (2006).** Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat à l'Institut Nationale Polytechnique de Toulouse, Ecole Doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries.
- **ITIS : *Cytisus* Desf**
- **Jeong S M ., Kim S Y., Nam K C ., Ahn D U ., Lee S C(2004).** Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from Citrus Peels. Journal of Agriculture and Food Chemistry ,52 :3389-3393.
- **Jones W P and Kinghorn A D (2005).** Extraction of plant secondary metabolites. In: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. Humana Press (Totowa), pp: 323-411.
- **Ketsawatsakul U, Whiteman M and Halliwell B (2000).** A reevaluation of the peroxynitrite scavenging activity of some dietary phenolics. Biochemical and Biophysical Research Communications, 279, 692-699.
- **Koyama K., Kaya M., Ishigaki T., Tsujita J., Hori S., Seino T. and Kasugai A. (1999).** Role of xanthine oxidase in delayed lipid peroxidation in rat liver induced by acute exhausting exercise. Eur. J. Appl. Physiol, 80, 28.
- **Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly. C. (2007).** Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. Plant. Physiol Bioch, 45: 244-249.

- **Kumar V., Cotran R.S et Robbins S.L. (2003).** Robbins Basic Pathology. Saunders. 134.
- **Kumari A and Kakkar P (2008).** Screening of antioxidant potential of selected barks of Indian medicinal plants by multiple in vitro assays. Biomedical and environmental sciences, 21:24-29.
- **Laamouri A, M. Elaloui^{1*}, A. Ennajah, N. Bouabdely(2015).** Study of mineral and nutritional components of some leguminous herbaceous and shrubs species in Tunisia, International Journal of Agronomy and Agricultural Research (IJAAR) ,Vol. 6, No. 4, p : 5.
- **Ladjudie P, Dupuy N, Ndiaye A, Neyra M , Boivin C, Gillis M (1998).** Acacia : nodulation et rhizobium associés, 359-375.
- **Lee J, Koo N and Min D B (2004).** Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 3 (1), 21-33.
- **Lee K. W., Kim Y. J., Lee H. J. and Lee C. Y (2003).** Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. J. Agric. Food Chem ,51: 7292-7295.
- **Lewis G.P., Schrire B.D., Mackinder B.A., Lock J.M (2003).** Legumes of the World.Royal Botanic Gardens, Kew, UK
- **Li H B, Cheng K W, Wong C C, Fan K W, Chen F and Jiang Y (2007).** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. Food Chemistry, 102: 771-776.
- **Lien E.J., Ren S., Bui H.H., Wang R (1999).** Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants, Free Radic Biol Med, 26:285-94.
- **Luigia L, Scardino A, Vasapollo G (2007).** Identification and quantification of anthocyanins in the berries of Pistacialentiscus L., Phillyrealatifolia L. and Rubiaperegrina L. Innovative Food Science And EmergingTechnologies,8 (3) :360- 364.
- **Maisuthisakul P.,Suttajit M et Pongsawatmanit R (2007).** Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some thai indigenous plants .Food Chemistry,100 :1409-1418.
- **Majhenic L., kerget M.S., Knez Z. (2007).** Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. Food Chemistry, 104 :1258–1268.

- **Majno G. et Joris I. (2004).** Cellules, tissus et maladies. Oxford Univ. Press.
- **Markowicz Bastos, D. H., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A.C.H. F., Cunha I B. S., Carvalho, P. O. Eberlin, M. N. (2007).** Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules.*,12: 423-432.
- **McManus J P, Davis K G, Lilley T H et Haslam E (1981).** The association of proteins with polyphenols. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 309-311.
- **Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., van Beek, T. A. (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem*, 85: 231–237.
- **Mizushima Y., Kobayashi M (1968).** Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins ,especially with sama biologically active proteins , *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 20 (1) :169-173.
- **Mohr K, Iüllmann H, Ziegler A, (2001).** Atlas de poche de pharmacologie. Flammarion, Médecine-Science. 384.
- **Moure A, Cruz J M, Franco D, Dominguez J M, Sineiro J, Dominguez H, Nunez M J and Parajo J C (2001).** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145-171.
- **Nathan C (2002).** Points of control in inflammation. *Nature*, 19-26,420, 846-852.
- **Núñez, M.J., Parajo, J. C. (2001).** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*,72: 145–171.
- **OMS. (2002).** Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. WHO /EDM /TRM /2002.1.
- **Organisation mondiale de la santé. (2000).** Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle.
- **Oyaizu, M., (1986).** Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine, *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- **Packer L and Weber S U (2001).** The role of vitamin E in the emerging field of nutraceuticals. In: Kramer K, Hoppe P P and Packer L. *Nutraceuticals in health and disease prevention*. New York (Marcel Dekker), pp: 27-43.

- **Parke, A., Parke, D.V. (1995).** The pathogenesis of inflammatory disease: Surgical shock and multiple system organ failure. *Inflammopharmacology* 3, 149-168.
- **Patrice M (2014).** La réaction inflammatoire aiguë. Copyright 2000-2014 Maxicours RCS PARIS B432623429.
- **Payne D N R, Adcock I M (2001).** Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Paediatric Respiratory Reviews*, 2, 145–150.
- **Pincemail J, Meurisse M, Limet R et Defraigne J O (1999).** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, 4 (5).
- **Popovici C., Saykova I., Tylkowski B.(2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*.
- **Prieto P., Pineda M., Aguilar M.,(1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.*
- **Rankin J.A (2004).** Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clinical Issues*, 15: 3-17.
- **Rodrigo R, Miranda A and Vergara L (2011).** Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, 412: 410-424.
- **Roede J R and Jones D P (2010).** Reactive species and mitochondrial dysfunction: mechanistic significance of 4-hydroxynonenal. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51, 380-390.
- **Roussel A M (2009).** Qui manque d'antioxydants, et comment le savoir ? *Cahiers de nutrition et de diététique*, pp: 7.
- **Rousselet M C, Vignaud, J M, Hofman P, Chatelet F P (2005).** Inflammation et pathologie inflammatoire AFECAP, 1-57.
- **Ruslan M. (2008).** Origin and physiological roles of inflammation *Nature*, 454: 428-435.
- **Sahnoun Z. , Jamoussi K. et Zeghal K.M. (1998).** Radicaux libres et anti-oxydants : physiologie, pathologie humaine et aspects thérapeutiques (IIème partie) = *Cellular*

systems implicated in production of free radicals and physiological functions of these radicals and free radicals in human pathology Rencontre Nationales de Pharmacologie 1998, 53(4) : 355-389.

- **Sangeetha M., Kouslya K., Lavanya R ., Cherukuru S ., Chammundeeswari D ., Uma Maheswara R (2011).** In vitro anti-inflammatory and anti-arthritic , Activity of leaves of Cleodendrom Inerme RJPBCS , (1) :822-827.

- **Sango R.(2006).** Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako(Mali): 53 scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chem, 85: 231–237.

- **Shahidi F. et Miraliakbari H. (2004).** département omega -3 (n-3) fatty acid in health and disease. Part 1- cardiovasculair disease and cancer. J. med. Food., 7: 387-401

- **Siddhuraju P ., 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.

- **Simon H U, Haj-Yehia A and Levi-Schaffer F (2000).** Role of reactive oxygen species (ROS) in the apoptosis induction. Apoptosis, 5, 415-418.

- **Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, 299, 152-178.

- **Smirnoff, N. (2005).** "Antioxidants and reactivess oxygen species in plants."

- **Soares, D.G., Andreazza, A.C., Salvador, M (2003).** Sequestering ability of butylate hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS,

- **Su X, Duan J, Jian Y, Shi J and Kakuda Y (2006).** Effect of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. Journal of Food Composition and Analysis, 19, 348-353.

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

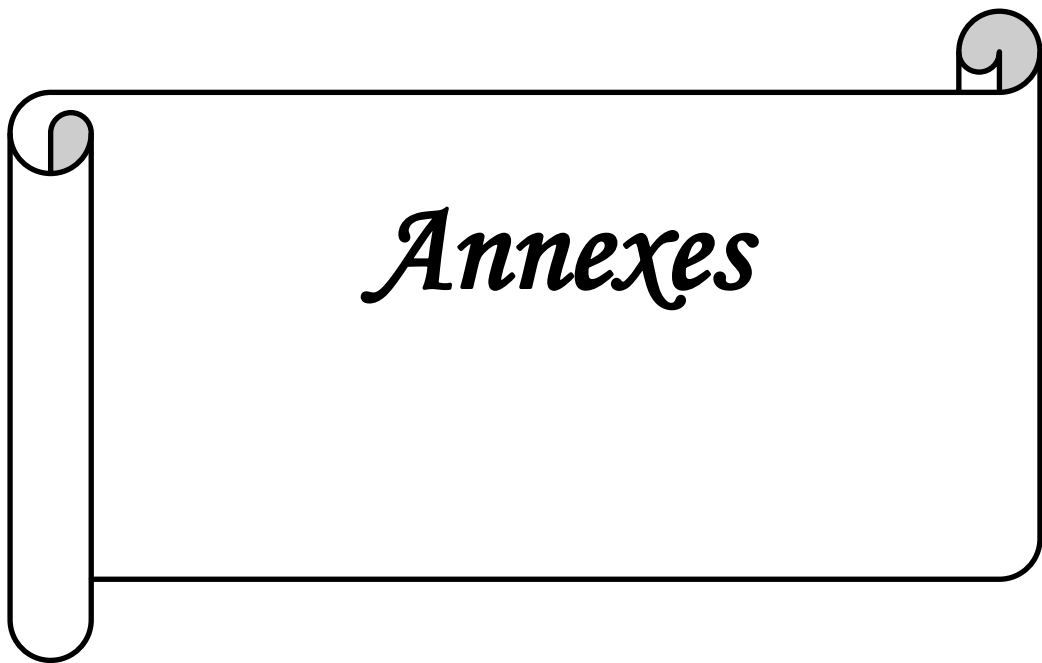
- **Turkmen, N., Velioglu, Y. S, Sari, F., Polat, G. (2007).** Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules.*,12:484-496.
- **Valko, M., M. Izakovic, M. Mazur, C. J. Rhodes et J. Telser (2004).** "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence." *Molecular and Cellular Biochemistry* ,266(1-2): 37-56.
- **Vorbach C, Harrison R and Capecchi M R (2003).** Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends in Immunology*, 24, 512-517.
- **Wardman, P. et L. P. Candeias (1996).** "Fenton chemistry: An introduction." *Radiation Research*, 145(5): 523-531.
- **Weill B, Batteux F, Dhainaut J (2003).** Immunopathologie et réactions inflammatoires. Eds, De Boeck Université (Paris), p: 12-23.
- **Wiseman H and Halliwell B (1996).** Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*, 313:17-29.
- **Wojciechowski M.F., Lavin M. et Sanderson M.J (2004).** A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *MATK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*; 11: 18-46.
- **Yang R. Y., Lin S. et Kuo G. 2008.** Content and distribution of flavonoids among 91
- **Yildirim, A; Mavi ,A; Kara, A.A. (2001).** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:4083- 4089.
- **Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., Qian, M (2002).** Free Radical Scavenging Properties of Wheat Extracts. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1619–1624.doi:10.1021/jf010964p
- **Zadak Z, Hyspler R, Ticha A, Hronek M, Fikrova P, Rathouska J, Hrnčiarikova D and Stetina R (2009).** Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiological Research*, 58, 13-17.

- **Zhishen J., Mengcheng T. et Jianming W. (1999).** Research on antioxidant activity of flavonoids from natural materials, *Food Chemistry*, 64: 555-559.

- **Zhu Q.T., Hackman R.M., Ensunsa J.L., Holt R.R., Keen C.L. (2002).** Antioxidative activities of oolong tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6929–6934.

Site électronique

- **SITE 1:** www.florealpes.com/fiche_cytisusvill.php
- **SITE2:** http://www.florealpes.com/photos/cytisusvill_9.jpg?PHPSESSID=0a72039f5036d91c7df80dd406b795b0



Annexe 01 : Courbes d'étalonnage.

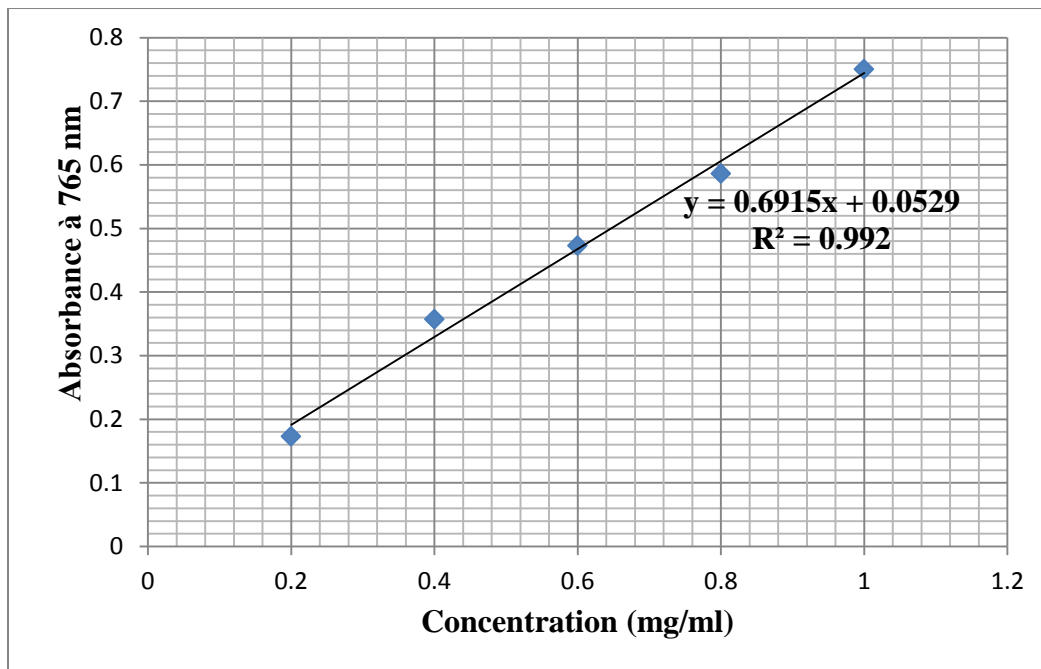


Figure 01 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

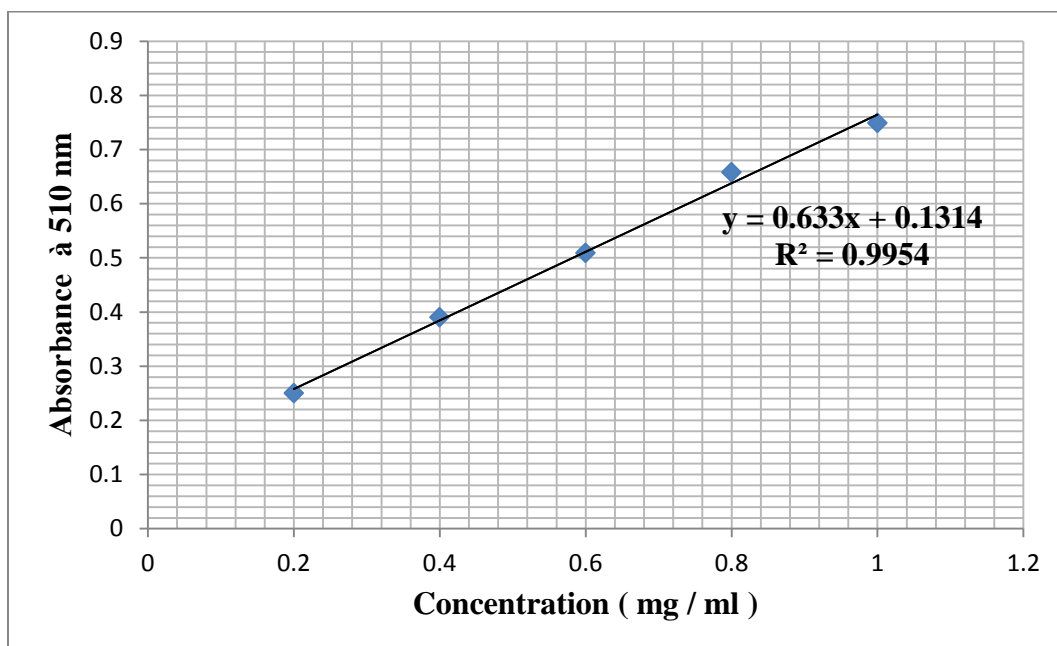


Figure 02 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

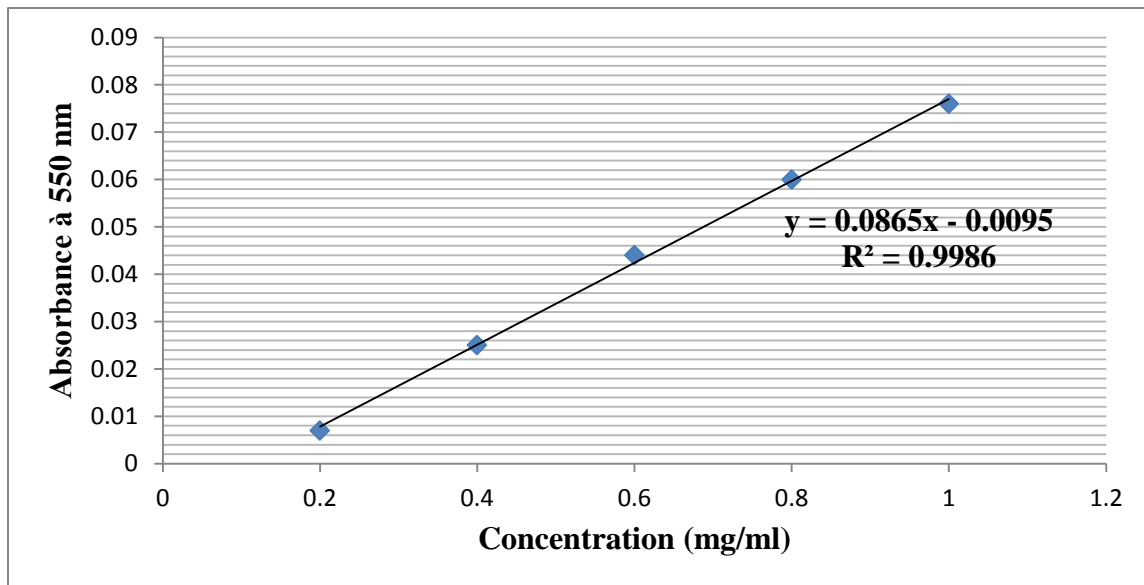


Figure 03 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique.

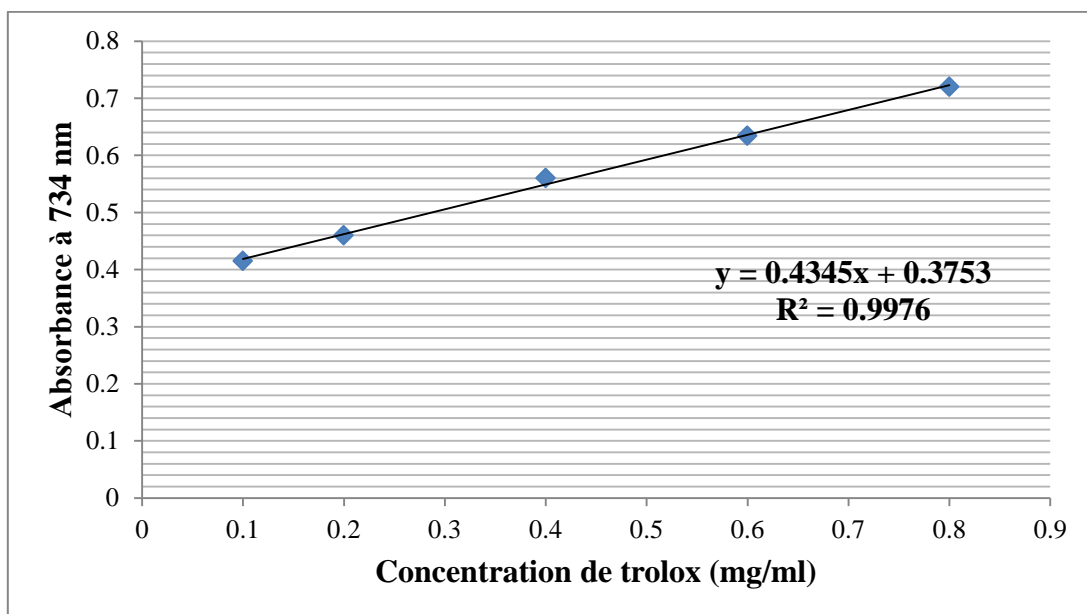


Figure 04 : Courbe d'étalonnage de Trolox.