

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico- chimique



Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie appliquée

Thème

Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de deux plantes locales : *Pistacia lentiscus* et *Clematis flammula*

Présenté par : Rahmani Naima & Zouia Samira

Composition du jury

M ^{lle}	D. AIT ALI	MCB	Présidente
M ^{me}	N. BEHLOUL-CHERAFT	MAA	Promotrice
M ^{me}	Y. BERRI	MAA	Examinatrice

Année universitaire: 2015/2016

Remerciements

Avant tous, nous tenons à remercier le dieu, le tout puissant, pour nous avoir donnés la force et la patience.

Nous tenons d'abord à remercier très chaleureusement notre promotrice M^{me} BAHLOUL .N, qui nous a permis de bénéficier de son encadrement, ses conseils qu'elle nous a prodigués, sa patience, sa confiance ; qu'elle nous a témoignés et qui ont été déterminantes dans la réalisation de notre travail.

Nos remerciements s'étendent également à Mlle AYOUNI, Mme ATMANI, Mme RAHMANI ainsi que Naima, Zineb, Malika, Kanza, Farah pour leurs précieux conseils.

Nous exprimons nos remerciements exceptionnels à Mlle REMILA qui nous a vraiment aidées.

Nous voudrions également remercier les membres de jury qui ont bien voulu juger ce travail :

Mme AIT ALI. D, qui nous a faits l'honneur de présider ce jury.

Mme BERRI. Y qui a accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciements vont plus particulièrement à nos familles qui ont su nous soutenir tout au long de nos études.

Merci à tous les personnes du laboratoire génétique, ainsi que toute personne de près ou de loin, qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

À Dieu, le clément et miséricordieux, pour sa Grace. Puisse Allah le tout puissant m'éclairer de sa lumière divine.

À mes chers parents : Ma mère et mon père qui m'ont supportée et m'ont aidée dans les pires moments, je leur dédie avec fierté ce mémoire qui reflète le fruit de l'éducation et de l'attention qu'ils m'ont tant réservé.

À ma très chère sœur IMANE et son fiancé NASSIM.

À mes très chers frères : WALID et AREZKI ainsi que sa femme HASSIBA.

À ma très chère grand- mère TITA.

À celui que je suis très fière de l'avoir mon très cher ami FIKO qui a été toujours à mes côtés pour me soutenir et m'encourager, que dieu le garde pour moi, et à toute sa famille.

*À mes adorables amies qui m'ont beaucoup aidée et m'encouragée : LILA,
SOUSSOU, AICHA, SIHEM, SORAYA, RIMA, SIHAM,
OUARDIA, LALDJA, LINA.*

À toute la famille ZOUIA et LOUNÉS chaque un avec son nom.

À Ma chère amie et sœur NAIMA qui m'accompagne durant ce travail et pendant toute les années d'études à l'université, bien sûr sans oublier sa famille.

À toute la promotion de biochimie appliquée 2016.

En fin à toute personne qui est chère à mon cœur et qui m'a aidée de près ou de loin.

SAMIRA (MIRA).

DEDICACES

À Dieu, le clément et miséricordieux, pour sa Grace. Puisse Allah le tout puissant m'éclairer de sa lumière divine.

À mes chers parents : Ma mère et mon père qui m'ont supportée et m'ont aidée dans les pires moments, je leur dédie avec fierté ce mémoire qui reflète le fruit de l'éducation et de l'attention qu'ils m'ont tant réservé.

À mes chères sœurs : ASSIA et MOUNIA pour leur amour, soins et encouragements.

À mon chère frère : HALIM pour son soutien et son amour.

À mes chers grands parents

À toute ma famille, chacun avec son nom.

À mes très chères amies surtout : MERIEM, SIHEM, HANAE, BAYA, KENZA, AINI, ZAHIA et RIMA qui ont été toujours là pour moi

À Tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

À Ma chère collègue et sœur SAMIRA qui ma accompagnée durant ce travail et tout notre cursus à l'université, et à toute sa famille.

À Toute la promotion Biochimie Appliquée 2015-2016.

NAIMA (Zimo)

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION	1
I.1 LE STRESS OXYDANT	2
I.2 LES RADICAUX LIBRES	2
I.3 LES ANTIOXYDANTS	4
I.3. 1 DÉFINITION	4
I.3. 2 CLASSIFICATION	5
I.3. 2. 1 LES ANTIOXYDANTS ENZYMATIQUES	5
I.3. 2. 2 LES ANTIOXYDANTS NON ENZYMATIQUES	5
I. 4 RELATION STRUCTURE CHIMIQUE ET ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES	9
I. 5 <i>PISTACIA LENTISCUS</i>	11
I.5. 1 DESCRIPTION BOTANIQUE	11
I.5. 2 REPARTITION GEOGRAPHIQUE	13
I.5. 3 UTILISATION TRADITIONNELLE ET ETUDES REALISEES SUR <i>PISTACIA</i> <i>LENTISCUS</i>	13
I.5. 4 PHYTOCHEMIE DE <i>PISTACIA LENTISCUS</i>	15
I.6 <i>CLEMATIS FLAMMULA</i>	17
I.6. 1 DESCRIPTION BOTANIQUE	17
I.6. 2 REPARTITION GEOGRAPHIQUE	19
I.6. 3 UTILISATION TRADITIONNELLE ET ETUDES REALISEES SUR <i>CLEMATISFLAMMULA</i>	19
I.5. 4 PHYTOCHIMIE DE <i>CLEMATISFLAMMULA</i>	20
CAPITRE II: MATÉRIELS ET MÉTHODES	
II. 1 MATERIEL VEGETAL	21
II. 1. 1 PRÉPARATION DES EXTRAITS	21

II. 1. 1. 1 RÉCOLTE DES DEUX PLANTES.....	21
II. 1. 1. 2 SÉCHAGE, BROYAGE ET TAMISAGE.....	22
II. 1. 1. 3 EXTRACTION.....	22
II. 2 REACTIFS ET PRODUITS CHIMIQUES.....	23
II. 3 MATERIELS UTILISÉS	23
II. 4 METHODES DE DOSAGE	24
II.4.1 DOSAGES DES FLAVONOIDES.....	24
II.4.2 DOSAGE DES PHENOLS TOTAUX	24
II.4.3 DOSAGE DES TANNINS	25
II.4.4 DOSAGE DES PROANTHOCYANIDINES.....	25
II.4.5 DOSAGE DES ANTHOCYANINES ET FLAVONOLS GLYCOSIDES	26
II.5 DÉTERMINATION DES ACTIVITÉS ANTIOXYDANTES	26
II.5.1 POUVOIR RÉDUCTEUR DE FER FERRIQUE (TEST FRAP)	26
II.5.2 ACTIVITE ANTI – RADICALAIRE DES EXTRAITS DE <i>PISTACIA LENTISCUS</i> ET <i>CLEMATIS FLAMMULA</i>	28
II.5.2.1 EFFET SCAVENGER DU RADICAL DPPH.....	28
II.5.2.2 EFFET SCAVENGER DU RADICAL H ₂ O ₂	29
II.5.3 EVALUATION DE L’ACTIVITE CHÉLATRICE DU FER.....	30
II.6 CARACTERISATION QUALITATIVE DES COMPOSES PRESENTS DANS LES EXTRAITS DES DEUX PLANTES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE	31
II.6 ANALYSE STATISTIQUYE	32
CHAPITRE III: RÉSULTATS ET DISCUSSION	
III. 1 DOSAGE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES	33
III.1 .1 DOSAGE DES FLAVONOIDES	33
III. 1. 2 DOSAGE DES PHÉNOLS TOTAUX.....	34
III.1. 3 DOSAGE DES TANNINS.....	35
III. 1. 4 DOSAGE DES PROANTHOCYANIDINES.....	37
III. 1. 5 DOSAGE DES ANTHOCYANES	38
III. 1. 6 DOSAGE DES FLAVONOLS GLYCOSYLES	39
III. 2 EVALUATION DE L’ACTIVITÉ ANTIOXYDANTES DES EXTRAITS ÉTHANOLIQUES DE DEUX PLANTES	40
III. 2. 1 MESURE DU POUVOIR ANTIOXYDANT PAR LA REDUCTION DU FER FERRIQUE (TEST FRAP)	40

III. 2. 2 ACTIVITÉ SCAVENGING DU RADICAL DPPH	42
III. 2. 3 EFFET SCAVENGER DE SUPEROXYDE D'HYDROGENE (H ₂ O ₂)	47
III. 2. 4 ACTIVITÉ CHÉLATRICE DU FER DES EXTRAITS ÉTHANOLIQUE DE <i>PISTACIA LENTISCUS</i> ET <i>CLEMATIS FLAMMULA</i>	51
III. 3 RESULTATS DE LA CARACTERISATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM)	55
III. 3. 1 CCM DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE FEUILLE DE <i>C. FLAMMULA</i>	57
III. 3. 2 CCM DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE FEUILLE DE <i>P. LENTISCUS</i>	58
III. 3. 3 CCM DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE FRUIT DE <i>P. LENTISCUS</i>	60
CONCLUSION	62
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES	63

LISTE DES ABREVEATION

Ac Asc	Acide ascorbique
ANOVA	One-Way Analysis of Variance
Ac T	Acide tannique
BSA	Bovine sérum albumine
Cat	Catéchine
C3G	Cyanidine-3- glucoside
CCM	Cromatographie sur couche mince
DPPH	Radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
Fe²⁺	Fer Ferreux
Fe³⁺	Fer Ferrique
FRAP	Ferric Reducing Antioxydant Power
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HOCl	Acide hypochlorique
IC₅₀	Concentration inhibitrice 50
K₂HPO₄	Hydrogénophosphate de potassium
KH₂PO₄	Monopotassium phosphate
Na₂CO₃	Carbonate de sodium
NADPH	Nicotinamide Adenine dinucleotide phosphate
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Nitrique oxydesynthase
¹O₂	Oxygène singulier

O₂⁻	Radical super oxyde
OH	Radical hydroxyl
OONO⁻	Peroxynitrite
Q	Quercitine
r	Coefficient de corrélation
Rf	Rapport frontal
RNS	Espèces réactives de l'azote
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOD	Superoxyde dismutase
TEA	Triethanolamine
TPTZ	2, 4, 3-tripyridyltriazine
UV	Ultraviolets

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
01	Origine des différents radicaux libres.	04
02	Structure de base des flavonoïdes avec la numérotation classique.	07
03	Structure chimique d'un tannin hydrolysable.	08
04	Structure chimique d'un tannin condensé.	08
05	Structure chimique des flavonoles.	11
06	Photographie de l'arbuste et des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> .	13
07	Photographie de <i>Clematis flammula</i> .	17
08	Photographie de fleurs et feuilles de <i>Clematis flammula</i> .	19
09	(A) feuilles et fruits de <i>P. lentiscus</i> (B) photographie originale des feuilles de <i>C. flammula</i> .	21
10	Carte de wilaya de Bejaia	22
11	Principe de la méthode FRAP.	27
12	Protocole de détermination du pouvoir réducteur du fer ferrique (test FRAP).	27
13	Réaction de transformation du radical libre DPPH (2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle) en présence d'un antioxydant	28
14	Protocol d'évaluation de l'effet scavenger du radical DPPH	29
15	Protocol d'évaluation de l'activité de piégeage d'H ₂ O ₂ .	29
16	Procédure expérimentale pour évaluer l'activité chélatrice des ions de fer.	30
17	Chambre chromatographique et une plaque CCM montrant le calcul de rapport frontal.	32
18	Les teneurs en flavonoïdes des extraits éthanoliques de feuilles de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLF), fruits de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLFr) et feuilles de <i>Clematisflammula</i> (ECLF) exprimées en mg équivalent de Quercitine/ g d'extraits.	33
19	Les teneurs en phénols totaux des extraits éthanoliques de feuilles de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLF), fruits de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLFr) et feuilles de <i>Clematisflammula</i> (ECLF) exprimées en mg équivalent Catéchine/ g d'extraits.	34
20	Les teneurs en tannins des extraits éthanoliques de feuilles de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLF), fruits de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLFr) et feuilles de <i>Clematisflammula</i> (ECLF) sont exprimées en mg équivalent d'acide tannique/g d'extrait.	36
21	Les teneurs en protoanthocyanidines des extraits éthanoliques de feuilles de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLF), fruits de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLFr) et feuilles de <i>Clematisflammula</i> (ECLF) exprimées en mg équivalent catéchine/g	37

	d'extrait.	
22	Teneur en anthocyanines des extraits de feuilles de <i>P.lentiscus</i> (EPLF), fruits de <i>P.lentiscus</i> (EPLFr) et feuilles de <i>C.flammula</i> (ECLF)	38
23	Teneurs en flavonols glycosylés des extraits de feuilles de <i>P.lentiscus</i> (EPLF), de fruits de <i>P.lentiscus</i> (EPLFr) et de feuilles de <i>C.flammula</i> (ECLF)	39
24	Evaluation de l'activité antioxydant par la méthode FRAP des extraits éthanoliques de feuilles (EPLF) et fruits (EPLFr) de <i>Pistacialentiscus</i> et l'extrait de feuilles de <i>Clematisflammula</i> (ECLF) en équivalent de l'acide ascorbique/ g d'extrait.	40
25	Effet anti-radicalaire contre le radical DPPH des extraits éthanolique de feuilles de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLF), fruits de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLFr), feuilles de <i>Clematisflammula</i> (ECLF) et Trolox à une concentration de 100 µg / ml.	43
26	Effet scavenger du radical DPPH des extraits éthanoliques de feuilles de <i>P.lentiscus</i> (EPLF), fruits de <i>P.lentiscus</i> (EPLFr) et Trolox ainsi que les feuilles de <i>C.flammula</i> (ECLF) à différentes concentrations.	44
27	Effet scavenger de H ₂ O ₂ de l'extrait éthanolique de feuilles de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLF), fruits de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLFr), feuilles de <i>Clematisflammula</i> (ECLF) et l'acide ascorbique (AcAsc) à une concentration de 100µg/ml	47
28	Effet scavenger de l'H ₂ O ₂ des extraits éthanoliques des feuilles de <i>P.lentiscus</i> (EPLF), fruits de <i>P.lentiscus</i> (EPLFr), feuilles de <i>C.flammula</i> (ECLF) et de standard (Acide ascorbique) à différentes concentrations.	48
29	Effet chélateur du fer ferreux des extraits éthanoliques des feuilles de <i>P.lentiscus</i> (EPLF), fruits de <i>P.lentiscus</i> (EPLFr), feuilles de <i>C.flammula</i> (ECLF) à différentes concentrations (A) ; et de standard EDTA à différentes concentrations.	51
30	Chromatogramme de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>C. flammula</i> (1) et (11), acide ferulique (2), acide coumarique (3), acide tanique (4), acide gallique (5), acide caféique (6), catéchine (7), quercétine (8), rutine (9), pyrocatechol (10) (A) : à la lumière de jour. (B) : observation sous une lampe UV. (C) : révélation par la vanilline sulfurique	57
31	Chromatogramme de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>P. lentiscus</i> (1) et (11), acide ferulique (2), acide coumarique (3), acide tanique (4), acide gallique (5), acide caféique (6), catéchine (7), quercétine (8), rutine (9), pyrocatechol (10) (A) : à la lumière de jour. (B) : observation sous une lampe UV. (C) : révélation par la vanilline sulfurique	58
32	Chromatogramme de l'extrait éthanolique des fruits de <i>P. lentiscus</i> (1) et (11), acide ferulique (2), acide coumarique (3), acide tanique (4), acide gallique (5), acide caféique (6), catéchine (7), quercétine (8), rutine (9), pyrocatechol (10) (A) : à la lumière de jour. (B) : observation sous une lampe UV. (C) : révélation par la vanilline sulfurique	60

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
01	Origine des différents radicaux libres.	04
02	Structure de base des flavonoïdes avec la numérotation classique.	07
03	Structure chimique d'un tannin hydrolysable.	08
04	Structure chimique d'un tannin condensé.	08
05	Structure chimique des flavonoles.	11
06	Photographie de l'arbuste et des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> .	13
07	Photographie de <i>Clematis flammula</i> .	17
08	Photographie de fleurs et feuilles de <i>Clematis flammula</i> .	19
09	(A) feuilles et fruits de <i>P. lentiscus</i> (B) photographie originale des feuilles de <i>C. flammula</i> .	21
10	Carte de wilaya de Bejaia	22
11	Principe de la méthode FRAP.	27
12	Protocole de détermination du pouvoir réducteur du fer ferrique (test FRAP).	27
13	Réaction de transformation du radical libre DPPH (2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle) en présence d'un antioxydant	28
14	Protocol d'évaluation de l'effet scavenger du radical DPPH	29
15	Protocol d'évaluation de l'activité de piégeage d'H ₂ O ₂ .	29
16	Procédure expérimentale pour évaluer l'activité chélatrice des ions de fer.	30
17	Chambre chromatographique et une plaque CCM montrant le calcul de rapport frontal.	32
18	Les teneurs en flavonoïdes des extraits éthanoliques de feuilles de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLF), fruits de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLFr) et feuilles de <i>Clematisflammula</i> (ECLF) exprimées en mg équivalent de Quercitine/ g d'extraits.	33
19	Les teneurs en phénols totaux des extraits éthanoliques de feuilles de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLF), fruits de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLFr) et feuilles de <i>Clematisflammula</i> (ECLF) exprimées en mg équivalent Catéchine/ g d'extraits.	34
20	Les teneurs en tannins des extraits éthanoliques de feuilles de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLF), fruits de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLFr) et feuilles de <i>Clematisflammula</i> (ECLF) sont exprimées en mg équivalent d'acide tannique/g d'extrait.	36
21	Les teneurs en protoanthocyanidines des extraits éthanoliques de feuilles de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLF), fruits de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLFr) et feuilles de <i>Clematisflammula</i> (ECLF) exprimées en mg équivalent catéchine/g	37

	d'extrait.	
22	Teneur en anthocyanines des extraits de feuilles de <i>P.lentiscus</i> (EPLF), fruits de <i>P.lentiscus</i> (EPLFr) et feuilles de <i>C.flammula</i> (ECLF)	38
23	Teneurs en flavonols glycosylés des extraits de feuilles de <i>P.lentiscus</i> (EPLF), de fruits de <i>P.lentiscus</i> (EPLFr) et de feuilles de <i>C.flammula</i> (ECLF)	39
24	Evaluation de l'activité antioxydant par la méthode FRAP des extraits éthanoliques de feuilles (EPLF) et fruits (EPLFr) de <i>Pistacialentiscus</i> et l'extrait de feuilles de <i>Clematisflammula</i> (ECLF) en équivalent de l'acide ascorbique/ g d'extrait.	40
25	Effet anti-radicalaire contre le radical DPPH des extraits éthanolique de feuilles de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLF), fruits de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLFr), feuilles de <i>Clematisflammula</i> (ECLF) et Trolox à une concentration de 100 µg / ml.	43
26	Effet scavenger du radical DPPH des extraits éthanoliques de feuilles de <i>P.lentiscus</i> (EPLF), fruits de <i>P.lentiscus</i> (EPLFr) et Trolox ainsi que les feuilles de <i>C.flammula</i> (ECLF) à différentes concentrations.	44
27	Effet scavenger de H ₂ O ₂ de l'extrait éthanolique de feuilles de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLF), fruits de <i>Pistacialentiscus</i> (EPLFr), feuilles de <i>Clematisflammula</i> (ECLF) et l'acide ascorbique (AcAsc) à une concentration de 100µg/ml	47
28	Effet scavenger de l'H ₂ O ₂ des extraits éthanoliques des feuilles de <i>P.lentiscus</i> (EPLF), fruits de <i>P.lentiscus</i> (EPLFr), feuilles de <i>C.flammula</i> (ECLF) et de standard (Acide ascorbique) à différentes concentrations.	48
29	Effet chélateur du fer ferreux des extraits éthanoliques des feuilles de <i>P.lentiscus</i> (EPLF), fruits de <i>P.lentiscus</i> (EPLFr), feuilles de <i>C.flammula</i> (ECLF) à différentes concentrations (A) ; et de standard EDTA à différentes concentrations.	51
30	Chromatogramme de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>C. flammula</i> (1) et (11), acide ferulique (2), acide coumarique (3), acide tanique (4), acide gallique (5), acide caféique (6), catéchine (7), quercétine (8), rutine (9), pyrocatechol (10) (A) : à la lumière de jour. (B) : observation sous une lampe UV. (C) : révélation par la vanilline sulfurique	57
31	Chromatogramme de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>P. lentiscus</i> (1) et (11), acide ferulique (2), acide coumarique (3), acide tanique (4), acide gallique (5), acide caféique (6), catéchine (7), quercétine (8), rutine (9), pyrocatechol (10) (A) : à la lumière de jour. (B) : observation sous une lampe UV. (C) : révélation par la vanilline sulfurique	58
32	Chromatogramme de l'extrait éthanolique des fruits de <i>P. lentiscus</i> (1) et (11), acide ferulique (2), acide coumarique (3), acide tanique (4), acide gallique (5), acide caféique (6), catéchine (7), quercétine (8), rutine (9), pyrocatechol (10) (A) : à la lumière de jour. (B) : observation sous une lampe UV. (C) : révélation par la vanilline sulfurique	60

LISTE DES TABLEAUX

N°	Titre	Page
I	Les différentes espèces réactives.	02
II	Les antioxydants enzymatiques.	05
III	Les classes des flavonoïdes.	07
IV	Classification de <i>Pistacia lentiscus</i>	13
V	Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes <i>P.lentiscus</i> au stade de pleine floraison	16
VI	Classification de <i>Clematis flammula</i> .	18
VII	Les composés majoritaires de genre <i>Clematis</i>	20
VIII	Corrélation entre la teneur en composés phénolique et le pouvoir réducteur FRAP.	41
IX	Les valeurs des IC ₅₀ de l'effet scavenger du radical DPPH.	45
X	Corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité scavenging du radical DPPH.	46
XI	IC ₅₀ de l'activité de scavenging de l'H ₂ O ₂ .	49
XII	Coefficient de corrélation entre l'activité de piégeage de l'H ₂ O ₂ et le teneur en composés phénoliques	50
XIII	IC ₅₀ de l'activité chélatrice du fer des extraits de plantes et EDTA.	53
XIV	Corrélation entre l'activité chélatrice et la teneur en composés phénoliques des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> et <i>Clematis flammula</i> .	54
XV	Les rapports frontaux des différents extraits et standard utilisés dans la CCM.	56

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le métabolisme cellulaire produit à l'état physiologique une variété des espèces radicalaires dérivées de l'oxygène (RLO) ou d'azote (RLN) tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) et non radicalaire comme peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Dans certaines conditions pathologiques, ces espèces réactives sont produites de façon excessive provoquant le stress oxydant qui, directement ou indirectement, entraîne des dommages oxydatifs des molécules biologiques (les protéines, les lipides, les glucides et l'ADN) induisant, par conséquent l'émergence de différentes pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, le cancer, le diabète, le vieillissement (Favier, 2003 ; Afonso *et al.*, 2007).

Afin de minimiser ces dommages oxydatifs et neutraliser les radicaux libres, plusieurs stratégies antioxydantes ont été mises en évidence, pour renforcer le système antioxydant. C'est pour cela plusieurs chercheurs se sont intéressés à l'étude des molécules bioactives des plantes considérées comme des substances antioxydantes naturelles tels que les composés phénoliques, alcaloïdes, les huiles essentielles. Ces derniers se sont avérés de puissants antioxydants par leur effet de piégeage des radicaux libres, chélation des métaux et inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres.

Ces avantages offerts par ces composés, ne cessent d'attirer l'intérêt de plusieurs projets de recherche pour découvrir encore d'autres principes, très peu étudiés (Goussard, 1999 ; Sylvie *et al.*, 2014).

En Algérie, il existe une diversité d'espèces de plantes aromatiques et médicinales, très utilisées en médecine traditionnelle depuis l'antiquité pour traiter plusieurs pathologies.

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés dans notre travail à étudier l'activité antioxydante des extraits bruts des deux plantes locales hautement utilisées dans le traitement des maladies qui sont *Pistacia lentiscus* (amadagh) et *Clematis flammula* (azenzu). En évaluant leurs teneurs en composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes, anthocyanes et tannins...etc) par des dosages colorimétriques puis la mesure de leur pouvoir réducteur (FRAP), l'effet scavenger contre les radicaux libres (DPPH et H_2O_2) et activité chélatrice du fer, pour terminer par d'une caractérisation qualitative des composés bioactifs présents dans ces extraits à l'aide de la chromatographie sur couche mince (CCM).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 STRESS OXYDANT

Le stress oxydant est un déséquilibre entre le système pro-oxydant et le système antioxydant, en faveur des pro-oxydants (**Gardès-Albert *et al.*, 2003**). Ce déséquilibre est dû soit à une surproduction des espèces réactives, soit à une diminution de la capacité de défense antioxydante (**Favier, 2003**).

Le stress oxydant induit plusieurs dommages tissulaires : des lésions directes de différentes molécules (oxydation d'ADN, de protéines, de lipides et glucides). C'est un facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution de plusieurs maladies : le vieillissement, le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes, les cancers et les maladies cardiovasculaires (**Favier, 2003 ; Favier, 2006**).

I.2 LES RADICAUX LIBRES

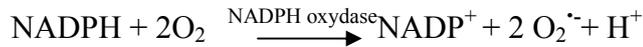
Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atome, molécule) qui présentent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe (**Geiser, 2010**). Ce sont des molécules très réactives, synthétisés dans les conditions physiologiques normales d'une manière continue et en faible quantité (**Favier, 2003**).

Les radicaux libres regroupent : les espèces réactives de l'oxygène (radical super oxyde $O_2^{\cdot-}$), les espèces réactives de l'azote (monoxyde d'azote NO^{\cdot}) qui sont divisés en espèces radicalaires et espèces non radicalaires (Tableau I) (**Halliwal *et al.*, 2004**).

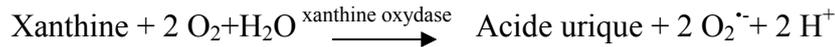
Tableau I : Les différentes espèces réactives (**Halliwal *et al.*, 2004**).

Espèces radicalaires	
Radical superoxyde	$(O_2^{\cdot-})$
Radical hydroxyl	(OH^{\cdot})
Monoxyde d'azote	(NO^{\cdot})
Espèces non radicalaires	
Peroxyde d'hydrogène	(H_2O_2)
Peroxynitrite	$(OONO^{\cdot})$
Oxygène singulier	$(^1O_2)$
Acide hypochlorique	$(HOCl)$

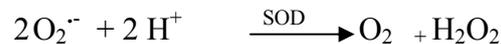
- **Radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$):** Il est moins stable et plus réactif que l'oxygène. Il est produit principalement par la chaîne de transfert d'électron mitochondrial, Lors de la phagocytose grâce à la NADPH oxydase (Figure 01) (**Gutowski et Kowalczyk, 2013**).



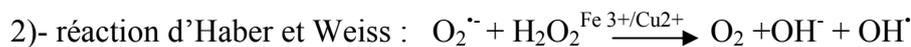
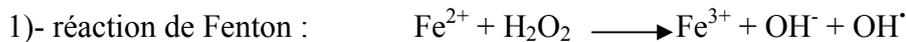
Mais aussi lors de l'oxydation de la xanthine en acide urique :



- **Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) :** Il est de nature non ionique ce qui lui permet de traverser la membrane cellulaire. Il est formé lors de la réaction de dismutation de super-oxyde par le superoxyde dismutase (SOD)(Figure 01) (**Gutowski et Kowalczyk, 2013**).



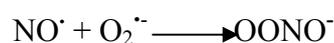
- **Radical hydroxyle (OH^{\cdot}) :** Radical hautement réactive (plus dangereux), formé dans des systèmes biologiques appropriés par différentes réactions (Figure 01) (**Gutowski et Kowalczyk, 2013**).



- **Monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) :** Il est généré dans les systèmes biologiques par l'oxyde nitrique synthase (NOS) qui transforme L-Arginine en citruline (Figure 01) (**Valko et al., 2007**)



- **Peroxynitrite ($OONO^-$) :** Pendant l'inflammation, les cellules de système immunitaire produit le superoxyde et le nitrite oxyde qui peuvent réagir entre eux pour former le peroxynitrite. Il est très toxique, provoque des lésions tissulaires très graves en plus de l'oxydation des lipides (Figure 01) (**Valko et al., 2007**).



- **Oxygène singulier (1O_2)** : Il peut être produit par plusieurs réactions biochimique d'oxydation : peroxydase, lipooxygénase et par la réaction entre divers radicaux libres (Figure 01).

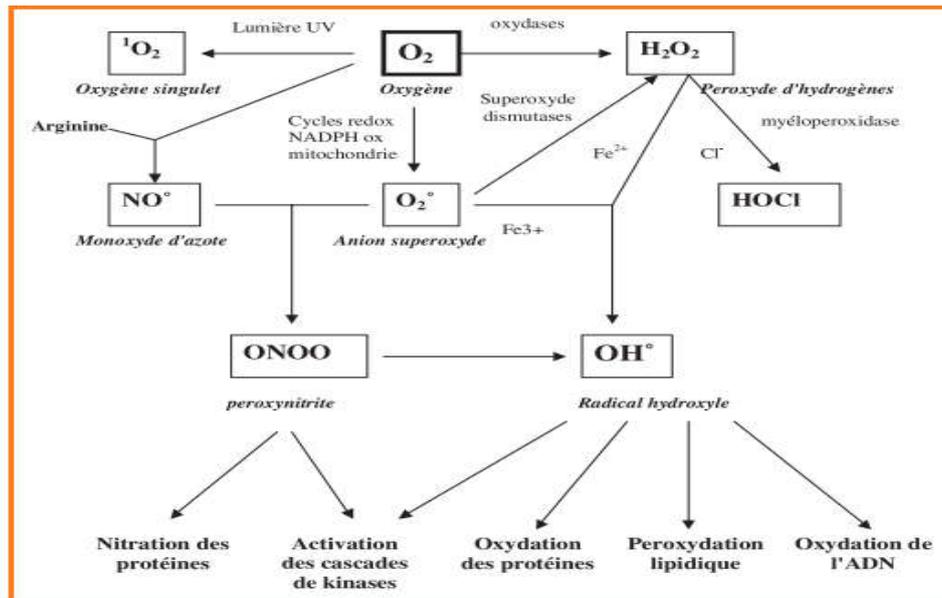
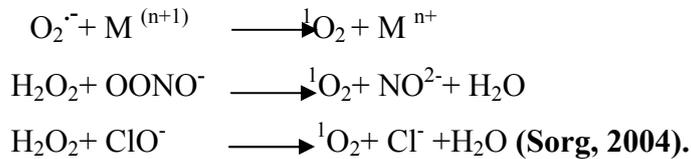


Figure01: Origine des différents radicaux libres (Favier, 2003).

I.3 LES ANTIOXYDANTS

L'oxydation est une réaction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant qui peut produire des radicaux libres (Pincemail *et al.*, 2002). Divers phénomènes contribuent à minimiser l'impact de ces radicaux libres sur la cellule par l'intermédiaire des antioxydants (Goussard, 1999).

I.3.1 DÉFINITION

Les antioxydants sont des substances capables de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme. Ils sont définis « comme toute substance qui en faible concentration par rapport au substance susceptible d'être oxydé prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat » (Pastre et Priymenko, 2007).

I.3.2 CLASSIFICATION

I.3.2.1 LES ANTIOXYDANTS ENZYMATIQUES

L'organisme vivant possède des systèmes antiradicalaires naturels. Les principaux mécanismes de défenses sont constitués par des enzymes (les superoxydes dismutases, les glutathion-peroxydases et les catalases) (Tableau II) qui ont chacune leur lieu et leur mode d'action. Ces enzymes assurent la réparation des éventuels dommages oxydatifs au niveau des protéines ou de l'ADN. S'y ajoutent quelques oligo – éléments (sélénium, cuivre et zinc) qui sont les cofacteurs de divers enzymes à activité antioxydante, elles sont considérées comme étant la première ligne de défense (Favier, 2003 ; Defraigne et Pincemail, 2007).

Tableau II : Les antioxydants enzymatiques.

Enzyme	Réaction	Commentaire	Référence
Superoxyde dismutase (SOD)	$2O_2^- + 2H \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$	Chez l'homme il existe 3 isoformes de la SOD : -SOD cytosolique (Cu, Zn) -SOD mitochondriale (Mg) -SOD extracellulaire (Cu, Zn)	(Haleng <i>et al.</i> , 2007).
Catalase	$2H_2O_2 \xrightarrow{Catalase} 2H_2O + O_2$	Elle est composée de quatre (4) sous-unités dont chacune porte une molécule d'hème et une molécule de NADPH qui augmente l'efficacité de catalase et la protège contre l'inactivation.	(Nicholls, 2012).
Glutathion peroxydase	$H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$ $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2 H_2O + GSSG$	Un tétramère dont chaque unité contient un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénio-cystéine elle se trouve dans le cytoplasme et dans les mitochondries.	Goudable et Favier, 1997).

I.3.2.2 LES ANTIOXYDANTS NON ENZYMATIQUES

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler la concentration d'espèces réactives de l'oxygène comme dans le cas des antioxydants non enzymatiques qui peuvent être synthétisés à partir des extraits des plantes ou d'animaux utilisés tels quelles ou après modification chimique (vitamine E, vitamine C, β carotènes, les oligoéléments, les phénols et les médicaments) ou être synthétisés par l'organisme comme des réducteurs endogènes (glutathion) agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables (Goudable et Favier, 1997 ; Favier, 2003).

1. LES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

❖ DÉFINITION

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois), caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Cette structure leur permet d'être des donneurs d'hydrogènes ainsi se sont des antioxydants puissants. D'autre part, ce sont des chélateurs de métaux qui empêchent la formation de radical OH par la réaction de fenton. Ces composés suscitent beaucoup l'intérêt des chercheurs car étant des antioxydants, ils protègent les constituants cellulaires contre les dommages oxydatifs et limiter le risque de diverses maladies liées au stress oxydant (**Scalbert et al., 2002**).

❖ CLASSIFICATION

1.1 LES ACIDES PHENOLIQUES

Un acide phénolique ou acide-phénol est un composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (**Bruneton, 1999**).

La pratique courante en phytochimie consiste à réserver ce terme aux dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique. Ils dérivent par hydroxylation de l'acide benzoïque, ces hydroxyles phénoliques OH peuvent ensuite être méthylés (ex : acide gallique, acide salicylique). Les dérivés de l'acide cinnamique appartiennent à la famille des phénylpropanoïdes. Les hydroxyles (OH) de ces dérivés peuvent aussi être méthylés tels que (coumarine, acide caféique, acide chlorogénique, acide férulique) (**Budic-Leto et Lovric, 2002**).

1.2 LES FLAVONOÏDES

Les flavonoïdes sont définis comme étant des pigments végétaux quasiment présents dans la plupart des végétaux, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles (**Ghedira, 2005**).

Leur structure de base est le noyau flavane qui est composé de 15 atomes de carbone arrangés dans trois noyaux, à savoir A, B, et C (**Pietta, 2000**) (Figure 02). Les flavonoïdes se divisent en six sous-catégories (Tableau III)

Tableau III : Les classes des flavonoïdes (Charles et Benbrook, 2005).

Classe	Exemples
• les flavonols	Quercétine, kaempférol, myricétine.
• les flavones	Lutéoline, apigénine.
• les isoflavones	Irigénine, rétusine.
• les flavanols	Catéchine, gallocatéchine, épicatechine, épigallocatéchine, épicatechine 3-gallate, épigallocatéchine 3-gallate, théaflavine.
• les flavanones	hespérétine, naringénine.
• les anthocyanidines	cyanidine, delphinidine, malvidine.

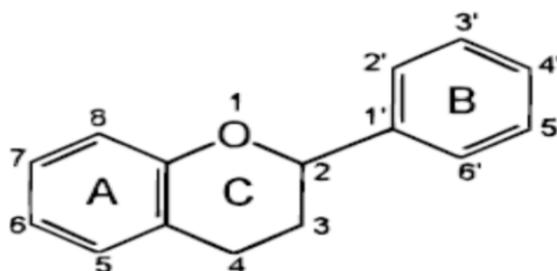


Figure 02 : Structure de base des flavonoïdes avec la numérotation classique (Pietta, 2000).

1.3 LES TANNINS

Les tannins sont des composés phénoliques ayant des poids moléculaires compris entre 500 et 3000 Da (Hassanpour *et al.*, 2011). Deux groupes de tannins se différencient aussi bien par leur structure que par leur origine biosynthétique : tannins hydrolysables et tannins condensés (Ribéreau-Gayon, 1968).

La structure chimique des tannins présente de nombreux groupements hydroxyles et phénoliques qui leur confèrent la propriété de former des complexes avec de nombreuses macromolécules telles que des protéines et des hydrates de carbone, ou encore avec des ions métalliques (Laura Bravo, 1998).

1. 3.1 LES TANNINS HYDROLYSABLES : Les tannins hydrolysables ou appelés tannins pyrogalliques (Figure 03), sont des polyesters de glucides et d'acide-phénols. Ils sont facilement scindés par les acides ou les enzymes en ose et en un acide-phénol. Selon la nature de ces tannins, on distingue : les tannins galliques dans le cas de l'acide gallique et les tannins ellagiques dans le cas de l'acide ellagique) (Hassanpour *et al.*, 2011).

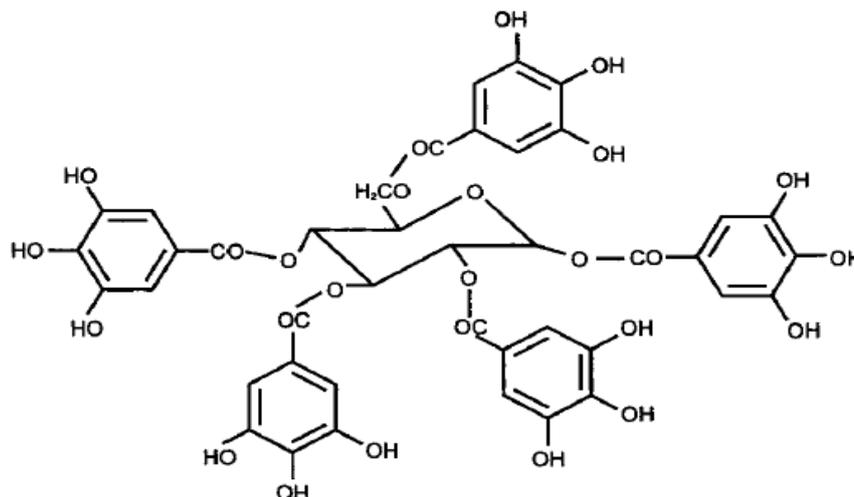


Figure 03 : Structure chimique d'un tannin hydrolysable (Laura Bravo, 1998).

1.3.2 LES TANNINS CODENSÉS : Les tannins condensés (ou proanthocyanidines) (Figure 04) sont le type le plus commun de tannins présents dans les légumineuses fourragères, les arbres et les tiges. Ils ont une variété de structures chimiques affectant leurs propriétés physiques et biologiques. Ils sont constitués d'unités de flavanoïdes (3-flavanes-ol) reliés entre eux par des liaisons carbone-carbone. Il existe de nombreuses hydroxylations possibles en différents endroits de chaque monomère (Hassanpour *et al.*, 2011).

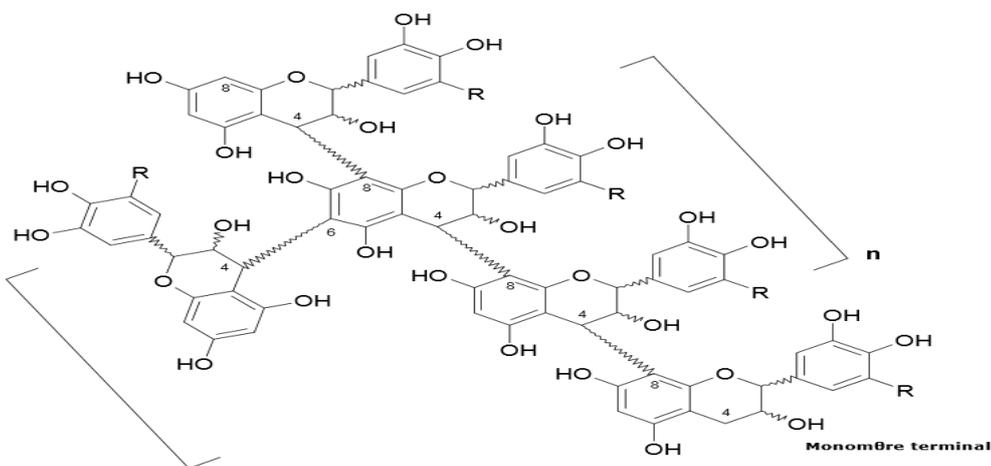


Figure04: Structure chimique d'un tannin condensé (Li, 2004).

I. 4 RELATION STRUCTURE CHIMIQUE ET ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

L'activité antioxydante des composés phénoliques et leurs métabolites dépend de la disposition des groupes fonctionnelles sur la structure nucléaire, plusieurs recherches ont générés le rôle de la structure spécifique de ces composants comme requis pour piéger les radicaux, chélate les ions et augmente l'activité antioxydante (**Heim et al., 2002**).

1. LES GROUPES HYDROXYLES (OH)

La configuration et le nombre total de groupes hydroxyles influencent sensiblement sur plusieurs mécanismes d'activité antioxydante. La capacité de piégeage des radicaux libres est principalement attribuée aux réactivités élevées des substituants hydroxyles qui participent à la réaction suivante (**Heim et al., 2002**) :



La configuration des groupes hydroxyles de noyau B est le déterminant le plus significative de l'activité scavenging des ROS et RNS, ces groupes donnent l'hydrogène et un électron à des radicaux hydroxyles, peroxydes et les radicaux péroxynitrites, les stabiliser et donnant lieu à un radical flavonoïde relativement stable. L'activité scavenging de peroxyde et l'hydroxyle augmente linéairement et de manière curvilinéaire, respectivement, selon le nombre totale de groupement OH (**Van Acker et al., 1996; Heim et al., 2002**).

Le blocage du groupe 3-hydroxyle dans le noyau C de la quercétine autant que glucoside (tout en conservant l'extrémité 3', 4' structure dihydroxy dans le noyau B) comme de la rutine ou quercitine-rutinoside, ou l'élimination du groupe 3-OH dans le noyau C comme la lutéoline diminue l'activité antioxydant (**Van Acker et al., 1996**).

La structure des flavonoïdes leurs permettent de piéger les radicaux libres par la fixation de deux atomes d'hydrogène fournit par deux fonction thiols (**Lahouel et al., 2004**).

La structure 3'-4' catéchol dans le noyau B augmente fortement l'inhibition de la peroxydation lipidique (**Heim et al., 2002**).

Il est à noter que l'absence de groupement hydroxyle en position C5 n'a pas d'influence sur l'activité antioxydante, aussi l'insaturation dans le noyau C et le groupe hydroxyle libre en C-7 augmente significativement cette activité (**Montoro et al., 2005**).

2. L'O-MÉTHYLATION

Les différences dans l'activité antioxydante entre les poly-hydroxyles et les flavonoïdes poly-méthoxylés sont les plus susceptibles en raison des différences dans les deux hydrophobies et la planéité moléculaire. La quercétine est un piègeur de radical peroxy puissant, suivie par des dérivés O-méthylé et O-glycosylés. La suppression de l'activité antioxydante par O-méthylation peut refléter des effets stériques qui perturbent la planéité. Bien que le rapport des groupes méthoxy aux substituants hydroxy ne fait pas nécessairement de prédire la capacité de balayage d'un flavonoïde, le noyau B est particulièrement sensible à la position d'un groupe méthoxyl (**Heim et al., 2002**).

3. LA DOUBLE LIAISON ENTRE C2 ET C3 ET LA FONCTION 4-OXO

L'une des différences de structure entre les flavonoïdes est la présence ou l'absence de la double liaison entre C2 et C3 et la fonction 4-oxo (**Heim et al., 2002**).

Plusieurs études ont cherchées à déterminer l'importance de 2-3 doubles liaisons et le groupe 4- carbonyle. Parmi ces études, des expériences de catéchines et anthocyanidines suggèrent que ceux-ci peuvent être dispensables pour autant que d'autres critères structurels (**Heim et al., 2002**).

Dans une étude systématique de 33 flavonoïdes, les chercheurs ont identifié que les flavonoïdes avec une double liaison 2-3 en conjugaison avec un groupe 4-carbonyle présentent des valeurs inférieures d'IC₅₀ (**Heim et al., 2002**).

La majorité des recherches soutient que les flavonoïdes manquant un ou les deux caractéristiques sont des antioxydants moins puissants que ceux avec les deux éléments. Il est rapporté qu'une partie du catéchol dont il existe une combinaison entre la double liaison C2-C3 et la fonction 4-oxo semble une structure essentielle pour une grande activité antioxydante (**Heim et al., 2002**).

4. LA GLYCOSYLATION

Les flavonoïdes aglycones ont un grand potentiel antioxydant comparé à leurs correspondants glycosylés (**Van Acker et al., 1996**), en effet, la comparaison entre la quercétine et les composés de quercétine glycosylés comme dans le cas de quercétine 3-méthoxy-7-O-β-D-glucoside montre que la glycosylation au niveau du groupe hydroxyle en position C7 réduit l'activité antioxydante (**Montoro et al., 2005**).

5. LE DEGRÉ DE POLYMÉRISATION

Le degré de polymérisation augmente l'efficacité de procyanidines contre une variété d'espèces radicalaires. Les tétramères présentent la plus grande activité contre les peroxy-nitrites et les superoxydes, tandis que les pentamères et les hexamères présentent de plus grandes propriétés de piégeage superoxyde que les trimères et les tétramères (**Heim et al., 2002**).

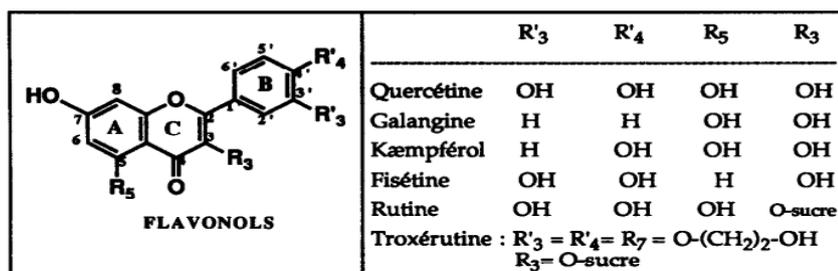


Figure 05 : Structure chimique des flavonoles (**Turnaire et al., 1994**).

L'utilisation des plantes médicinales pour promouvoir la guérison est une pratique ancienne revient à l'antiquité et jusqu'à ce jour, elle constitue un moyen important pour le maintien de la santé malgré l'énorme évolution en médecine et en pharmacologie (**Conway, 2010 ; Saeed et al., 2012**).

Les chercheurs ont un intérêt accru aux plantes médicinales et aux choses plus naturelles de fait de la limite thérapeutique, les effets indésirables des médicaments conventionnels, ainsi la phytothérapie offre l'avantage de sécurité relative, l'absence d'effet indésirable et le coût qui est généralement plus faible que les médicaments conventionnels.

Le fait que les plantes sont utiles contre plusieurs maladies est le résultat de leur richesse en composés actifs, les recherches ont pour but de mieux identifier ces composés et une meilleure utilisation de ces plantes (**Capasso et al., 2012**). Comme exemple de plante médicinale on a : *Pistacia lentiscus* et *Clematis flammula*.

I.5 PISTACIA LENTISCUS

I.5.1 DESCRIPTION BOTANIQUE

Pistacia lentiscus (Pistachier lentisque) appartient à la famille des Anacardiaceas qui sont des plantes grimpantes à canaux résinifères et à feuilles alternés dont les fleurs sont actinomorphes, heterochlamydées, hétérosexuée et /ou unisexuée, généralement hypogynes, displostémone ou haplostémone. Cette famille se caractérise aussi par un fruit qu'est

généralement une drupe souvent à mésocarpe résineux et des graines exalbuminée ou presque, à embryon courbe (Min Tialu *et al.*, 1980).

Le genre *Pistacia* regroupe neuf espèces appartenant à l'ordre des Sapindales d'origine asiatique ou méditerranéenne, ce sont des arbustes dioïques (fleur mâle et femelle poussant sur des arbustes différentes), à feuilles caduques, alternés ou persistantes. Trois espèces qui sont très connues : *Pistacia terebinthus*, *Pistacia vera* et *Pistacia lentiscus* (Al-Saghir, 2012).

Dans notre étude, nous nous sommes intéressées à l'étude du *Pistacia lentiscus* qui présente les caractéristiques suivantes :

- ✓ **Ecorce** : rougeâtre sur les jeunes branches et vire ou gris avec le temps
- ✓ **Branches** : tortueuses, composées, forment une masse serrée
- ✓ **Feuilles** : possédant un nombre pair de folioles (4 à 10) d'un vert sombre, elliptique, obtuses, luisantes en dessus, glabres, coriaces et dont le pétiole est bordé d'une aile verte (More et White, 2005)
- ✓ **Fleurs** : unisexuées d'environ 3 mm de large se présentent sous forme de grappe et très aromatiques, les fleurs femelles ont un ovaire trilatéral et uniloculaire et les fleurs mâles ont 8-10 étamines (Verdu et Garcia-Fayos, 1998)
- ✓ **Fruits** : est une baie globuleuse de 2 à 3 mm, monosperme, remplie par nucléole de la même forme, leur couleur est fortement liée à la viabilité des graines : le fruit de couleur noir contient couramment des graines viables, alors que le blanc ou le rouge contient des graines non viables (Verdu et Garcia-Fayos, 1998)
- ✓ **Mastic** : l'incision du son tronc fait écouler un suc résineux nommé « mastic » qui est globulaire, piriforme ou larmes allongées, de couleur jaune pâle, clair et vitreux à l'état frais, il a une odeur aromatique et goût agréable (Ansari *et al.*, 2012).

P.lentiscus ou Pistachier lentisque est appelé D'ru « ضرور » en arabe (Abdeldjelil *et al.*, 2014) et « amadagh » en kabyle (1). Comme cité précédemment, elle appartient à la famille d'Anacardiaceae et à l'ordre des sapandales, sa systématique détaillée est citée dans ce tableau selon Ansari *et al.*, (2012).

Tableau IV : classification de *Pistacia lentiscus*

Règne	Plante
Ordre	SAPINDALES
Famille	ANACARDIACEAE
Genre	<i>Pistacia</i>
Espèce	<i>Pistacia lentiscus</i>
Nom binomial	<i>Pistacia lentiscus</i> L.

Figure 06 : Photographie de l'arbuste et des feuilles de *Pistacia lentiscus* (1)

I.5.2 REPARTITION GEOGRAPHIQUE

Pistacia lentiscus se trouve couramment en sites arides Asie et région méditerranéenne de l'Europe et d'Afrique, le Maroc et la péninsule ibérique à l'ouest par le sud de la France, la Turquie, l'Irak, l'Iran et l'Inde aussi dans les îles Canaries. Il pousse à l'état sauvage dans la garrigue et sur les sols en friche (Ansari *et al.*, 2012).

En Algérie il est généralement dispersés sur toute la zone littorale, sur tout type de sol des zones subhumide et semi-aride, plus précisément dans le bassin du Soummam (Boukeloua *et al.*, 2012).

I.5.3 UTILISATION TRADITIONNELLE ET ETUDES REALISEES SUR *PISTACIALENTISCUS*

Les utilisations médicinales de *P. Lentiscus* sont diverses où la décoctions de ses parties aériennes et / ou de résine sont utilisés dans le traitement de la toux, l'eczéma, la jaunisse, les infections de gorge, l'asthme, douleurs d'estomac et les calculs rénales (Ljubuncic *et al.*, 2005). Cette plante a montré plusieurs activités biologiques à savoir : anti-athérogénique, antimicrobienne, antioxydant, anti-inflammatoire et anticancéreuse (Ansari *et al.*, 2012).

- L'extrait obtenu à partir de son mastic est utilisé principalement comme anti-inflammatoire, antiseptique (**Barra et al., 2007**). L'huile essentielle extraite à partir de ce mastic a un effet antimicrobien et antifongique. Il a été également démontré que l'extrait éthanolique du mastic a exhibé une inhibition significative de la prolifération des cellules du cancer de colon humain (HCTM16), de plus de nombreux produits cosmétiques dont le mastic est le principal constituant sont également commercialisés (crèmes hydratantes, shampooing, savon) (**Ansari et al., 2012 ; Abdeldjelil et al., 2014**).
- La partie aérienne de *P. lentiscus* est utilisée dans le traitement de l'hypertension grâce à ses propriétés diurétiques, des maux de gorge, eczéma, calculs rénaux et la jaunisse (**Benhammou et al., 2008**).
- Plusieurs travaux de recherches ont démontré que les extraits brutes obtenus à partir des feuilles de *P. lentiscus* sont doués d'une activité antimicrobienne, antifongique, des propriétés emménagogues, astringentes, diurétiques, analgésiques et antipyrétiques (**Lahsissene et al., 2009 ; Ansari et al., 2012**). Quelques herboristes qui commercialisent les feuilles de *P. lentiscus* recommandent leur utilisation comme une infusion de secours, de maux de la gorge, douleurs à l'estomac, les feuilles sont également considérés comme ayant des propriétés hypoglycémiques et hypotenseurs (**Abdeldjelil et al., 2014**).
- Les pharmaciens reconnaît deux utilisations thérapeutiques majeurs de l'huile fixe de *P. lentiscus* : le premier est son utilisation comme une application topique pour traiter les affections cutanées telles que des brûlures, des blessures et de l'eczéma; l'autre est principalement utilisée comme un médicament administré par voie orale pour soigner les problèmes respiratoires tels que: maux de la gorge, la bronchite, l'asthme et des allergies respiratoires. D'autres indications moins étendues de cette huile comprennent son utilisation dans le traitement de l'arthralgie, les hémorroïdes, la jaunisse et les troubles gastro-intestinaux (**Abdeldjelil et al., 2014**).
- Récemment, sa propriété antioxydante a été démontrée dans plusieurs études (**Ljubuncic et al., 2005 ; Barra et al., 2007 ; Ansari et al., 2012 ; Abdeldjelil et al., 2014**).
- Les feuilles et l'écorce, sont employées, en décoction ou en poudre, dans le traitement des maux des intestins, de la diarrhée (**Lahsissene et al., 2009**).

- L'extrait aqueux de ces feuilles a exhibé un grand potentiel antioxydant en piégeant le radical H_2O_2 et en inhibant la peroxydation lipidique (Atmani *et al.*, 2009; Remila *et al.*, 2015), il a également présenté un effet hépatoprotecteur remarquable (Ansari *et al.*, 2012) et une activité antimicrobienne contre *candida albicans*, *staphylococcus aureus*, *salmonella typhi* (Benhammou *et al.*, 2008).
- L'extrait de fruits a montré de puissants effets, cytoprotecteur à fortes concentrations, inhibiteur de la prolifération des cellules du cancer de la peau B16F10, anti-inflammatoire en diminuant le taux des interleukines (IL) pro-inflammatoires telles que IL-1 β (Remila *et al.*, 2015).
- L'huile essentielle de *P. lentiscus* est indiquée dans le traitement d'un certain nombre de maladies telles que les infections bactériennes et fongiques, les douleurs dorsales et les brûlures. De plus, elle a présenté de puissants effets anti-radicalaires grâce à sa richesse en monoterpène hydrocarboné (Barra *et al.*, 2007 ; Gardeli *et al.*, 2008 ; Djenane *et al.*, 2010 ; Ansari *et al.*, 2012 ; Bammou *et al.*, 2015).
- L'acide gallique obtenu à partir des fruits de *P. lentiscus* a manifesté une activité inhibitrice contre la xanthine oxydase, un effet anti-radicalaire (99%) et une protection contre la peroxydation lipidique (68%) (Ansari *et al.*, 2012).

I.5.4 PHYTOCHEMIE DE *PISTACIA LENTISCUS*

a) LES HUILES ESSENTIELLES

Le fruit de *P. lentiscus* contient 0,2% d'huile essentielle de son poids sec et 38.8% d'huile fixe alors que les protéines représentent 0,5% (Hasan *et al.*, 2011). Les études menées sur le mastic ont montré la présence huiles essentielles, triterpenoïde. Les études sur ces feuilles et ces petits rameaux ont révélés la présence des stérols et triterpènes, des saponosides et des composés réducteurs (oses, holosides et mucilage) (Bammou *et al.*, 2015)

L'huile essentielle de *P. lentiscus* contient : 15,18% de β -myrcène, 15,02% de 1,8-cinéol, 6,41% de terpinen-4-ol, 5,54% de α -pinène, 5,10% de β -pinène (Djenane *et al.*, 2010) et caractérisé par un grand pourcentage de monoterpène hydrocarboné, des monoterpènes oxygenés et des sesquiterpène hydrocarboné (tableau V) (Gardeli *et al.*, 2008).

b) COMPOSES PHENOLIQUES

1. TANNINS

Le screening phytochimique des feuilles a mis en évidence la présence des tannins catéchiques et galliques (**Bammou et al., 2015 ; Remila et al., 2015**).

2. PHENOLS TOTAUX

Cette plante renferme des acides phénoliques (acide gallique, acide digallique), 5,4 mg/ml d'anthocyanine, des flavonoïdes dans le mastic (**Longo et al., 2007**), des flavonoïdes (anthocyanes, flavones et leucoanthocyanes) dans les feuilles (**Bammou et al., 2015**)

L'extrait éthanolique de feuilles et de fruits renferme des teneurs notables en phénols totaux et en flavonoïdes (**Atmani et al., 2009 ; Remila et al., 2015**). Le tableau résumé la composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes *P. lentiscus* au stade de pleine floraison.

Tableau V : Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes *P.lentiscus* au stade de pleine floraison (**Barra et al., 2007**).

cmpd	KI ^a	LRI ^b	identification methods ^c	harvesting area				
				TDS ^d	ORR ^d	VLP ^d	ORS ^d	ALG ^d
tricyclene ^e	921	920	MS, RI	0.90	0.48	0.20	0.41	0.36
α-tujene	924	924	MS, RI, std	0.15	0.45	0.21	0.64	0.45
α-pinene	931	932	MS, RI, std	20.40	19.15	14.81	21.55	22.59
camphene	947	946	MS, RI, std	3.60	2.31	1.05	1.85	1.59
sabinene	970	968	MS, RI, std	2.51	1.17	3.67	3.88	8.13
β-pinene	976	979	MS, RI, std	3.46	5.50	2.62	4.32	3.62
β-myrcene	988	991	MS, RI, std	18.29	19.36	10.44	1.40	0.99
α-phellandrene	1002	1003	MS, RI, std	0.20	0.62	4.91	10.84	0.06
α-terpinene	1015	1017	MS, RI, std	t ^f	0.30	5.12	5.59	t
p-cymene	1024	1025	MS, RI, std	14.79	9.92	1.59	2.17	16.22
limonene	1027	1029	MS, RI, std	3.03	3.76	0.93	1.83	2.23
β-phellandrene ^e	1029	1030	MS, RI	2.88	3.80	3.09	5.39	2.35
γ-terpinene	1056	1060	MS, RI, std	0.57	1.32	6.56	5.15	0.29
α-terpinolene	1083	1080	MS, RI, std	0.13	0.40	2.04	2.40	t
2-nonanone ^e	1091	1090	MS, RI	0.66	1.24	0.44	0.51	0.37
linalool	1100	1097	MS, RI, std	0.19	t	t	0.19	0.17
α-fencocanphone ^e	1103	1106	MS, RI	0.20	0.31	t	0.12	t
isoamyl isovalerate ^e	1107	1103	MS, RI	t	0.23	t	t	t
menth-2-en-1-ol-cis-para ^e	1123	1122	MS, RI	t	t	0.19	0.18	0.45

menth-2-en-1-ol- <i>trans</i> -para ^e	1141	1141	MS, RI	t	t	0.11	t	0.29
borneol	1170	1169	MS, RI, std	0.06	0.14	0.07	t	t
terpinen-4-ol	1179	1177	MS, RI, std	14.17	15.07	19.74	19.84	28.29
α -terpineol	1193	1189	MS, RI, std	1.93	3.24	2.64	1.80	2.67
ascaridole ^e	1242	1237	MS, RI	0.21	t	t	t	t
carvone oxide <i>cis</i> ^e	1252	1263	MS, RI	1.05	0.38	t	0.08	1.72
ascaridole glicol <i>trans</i> ^e	1273	1269	MS, RI	0.11	t	t	t	0.21
bornyl acetate	1285	1289	MS, RI, std	2.24	0.74	0.67	0.51	0.72
2-undecanone ^e	1292	1292	MS, RI	0.98	1.58	0.78	1.01	0.43
4-hydroxy-crypton ^e	1319	1316	MS, RI	0.28	t	t	t	0.13
δ -elemene ^e	1348	1338	MS, RI	0.64	0.19	0.41	0.36	t
α -copaene ^e	1374	1377	MS, RI	t	0.19	0.41	t	t
β -elemene ^e	1387	1391	MS, RI	t	t	0.24	0.15	t
methyl eugenol	1398	1404	MS, RI, std	t	t	t	t	0.18
β -caryophyllene	1415	1419	MS, RI, std	1.30	2.29	1.74	1.23	0.89
2-methylbutyl benzoate ^e	1437	1441	MS, RI	0.21	t	0.21	0.12	0.23
α -humulene	1453	1450	MS, RI, std	0.46	0.57	0.90	0.45	0.46
aromdendrene- <i>allo</i>	1462	1461	MS, RI, std	t	t	0.29	t	t
muurolo-4-(14),5-diene <i>cis</i> ^e	1470	1467	MS, RI	t	t	0.27	0.17	t
cadina-1(6),4-diene <i>trans</i> ^e	1473	1477	MS, RI	0.51	0.39	0.63	0.29	0.60
germacrene D ^e	1478	1480	MS, RI	t	1.71	5.06	2.11	t
γ -amorfene ^e	1495	1496	MS, RI	0.51	0.41	t	t	0.50
δ -cadinene ^e	1524	1523	MS, RI	1.13	1.06	2.71	1.54	0.81
calamenene <i>trans</i> ^e	1532	1529	MS, RI	0.23	t	t	t	t
cubanol	1647	1647	MS, RI, std	t	t	1.01	t	0.36
valerianol ^e	1658	1658	MS, RI	t	t	1.74	t	t
total identified				97.98	98.28	97.5	98.08	98.36

I.6 CLEMATIS FLAMMULA

I.6.1 DESCRIPTION BOTANIQUE

Clematis flammula (clématite flammette) fait partie de la famille des Ranunculaceae qui comporte 59 genres incluant 1900 espèces qui sont des herbes vivaces ou annuelles (Wang *et al.*, 2001).



Figure 07 : Photographie originale de *Clematis flammula*.

Cette plante entre dans le genre *Clematis* qui comporte plus de 250 espèces, tous sont ligneuses grimpantes dont la grande majorité d'entre eux sont très robustes et la forme de leur fleurs varie d'un signe de tête, en forme de cruche, en forme de cloche, ou en forme d'étoile qui ont généralement une couleur blanche, certaines espèces peuvent avoir des fleurs rouges ou violettes. Leurs fruits sont des akènes, ces dernières ont des pointes sous forme de longue queue couvrée avec des poils blancs (**Rindels, 2013**).

Clematis flammula est caractérisé par :

- Une tige sarmenteuse, grimpante qui peut atteindre trois à cinq mètres de longueur grêle, pleine, presque glabre (**Isnard, 2003**)
- Feuilles bipennées, à 3-7 folioles assez petites, ovales ou lancéolées, entières ou rarement trilobées, à saveur brûlante
- Fleurs blanches, en panicule lâche à sépales pubescents en dehors, glabres en dedans et pas de pétales
 - Anthères grandes, égalant le filet
 - Réceptacle glabre
 - Carpelles très comprimés
 - À arête brumeuse assez courte (**More et White, 2005**).

C.flammula ou clématite flammette est appelé en arabe « Sebenqسبنق ; Narbeurdبرد نار » (**Chorfi et al., 2005**). Et son nom berbère est « Azenzu » (2) Sa systématique est résumée dans le (tableau VI) (3)

Tableau VI : Classification de *Clematis flammula*.

Règne	Plante
Division	MAGNOLIOPHYTA
Sous-division	ANGIOSPERMAE
Classe	MAGNOLIOPSIDA
Sous-classe	MAGNOLIIDAE
Ordre	RANUNCULALE
Famille	RANUNCULACEAE
Genre	<i>Clematis</i>
Espèce	<i>Clematis flammula</i>



Figure 08 : Photographie de fleurs et feuilles de *Clematis flammula*(3)

I. 6. 2 REPARTITION GEOGRAPHIQUE

Le genre *Clematis* est distribué partout dans les régions froides et tempérées, mais plus spécialement au-delà des régions tropicales dans l'hémisphère nord (Sheidai, 2009) allant de la région tropicale vers les zones glaciales et de niveau de la mer à la haute altitude (Ae-Ra et al., 2013)

C. flammula est présente dans le sud de l'Europe et l'Afrique du nord (Kumar et al., 2008) et elle est largement distribuée dans l'air méditerranéen (Isnard et al., 2003).

I. 6. 3 UTILISATION TRADITIONNELLE ET ETUDES REALISEES SUR *CLEMATIS FLAMMULA*

Plusieurs propriétés médicinales ont été décrites, traditionnellement, les différentes espèces de *Clematis* sont utilisées anciennement comme remède dans le traitement des maladies vénériennes (syphilis) et les maladies chroniques de la peau, également employées pour soigner la goutte, soulager les douleurs rhumatismales, diminuer l'œdème et la pression artérielle (Zeng et al., 2006). Propriétés antalgiques, antibactériennes, anticancéreuses, antipaludique, anti-inflammatoire, diurétique, antidote dans le cas d'une morsure de serpent, anti-dysentérique (Zeng et al., 2006 ; Chawla et al., 2012).

Les études réalisées par (Chawla et al., 2012) ont indiqué que :

- ❖ Les feuilles de différentes espèces de genre *Clematis* sont utilisées pour traiter les maux de tête, toux, trouble intestinale.
- ❖ La décoction des feuilles, tige, racines sont utilisés séparément pour soulager le paludisme, les infections de sinus froid et l'asthme.
- ❖ L'infusion des feuilles et l'écorce de la tige est utilisée dans le traitement de la schistosomiase.

- ❖ Les racines de *Clematis terniflora* et *Clematis chinensis* sont utilisées comme analgésique, anti-tumorale et dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde et d'autre inflammation comme laryngite (Xu *et al.*, 1996).
- ❖ L'activité anti-microbienne de genre *Clematis* est très importante dont : *Clematis recta* a manifesté un effet fongicide, les feuilles de *Clematis hirsuta* et l'extrait brute de *Clematis vitalba* ont montré une bonne activité antibactérienne. L'extrait total de *Clematis heracleifolia* a présenté un effet significatif contre la protéase recombinée de HIV-1 à une concentration de 100µl /ml (Khan *et al.*, 2001 ; Buzzini et Pieroni, 2003).
- ❖ En Algérie, les infusions de feuilles de *Clematis flammula* sont largement employées dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, des brûlures et des plaies superficielles, de plus cette espèce agit sur le cancer en inhibant la prolifération cellulaire (Kumar *et al.*, 2008 ; Atmani *et al.*, 2011).
- ❖ Une activité antioxydante très prononcée a été rapportée pour les différents extraits de feuilles de *C. flammula* (Atmani *et al.*, 2009).

I.6.4 PHYTOCHIMIE DE CLEMATIS FLAMMULA

Les espèces du *Clematis* sont caractérisées par une large gamme de constituants tel que : triterpènes, flavonoïdes, lignanes, coumarines, alcaloïdes, huiles volatiles, stéroïdes, triterpénoïdes (Chawla *et al.*, 2012)

Les feuilles de cette plante sont riches en composés phénoliques, flavonoïdes et tannins (Atmani *et al.*, 2009 ; Atmani *et al.*, 2011) (Annexe17).

Tableau VII : Les composés majoritaires de genre *Clematis* (Chawla *et al.*, 2012)

Composés phénoliques	-Ibotanolide B -D-ribono-γ-lactone	-Calceolarioside B -Tricosamol	-Clemomandshuricoside A, B et C -Acide heptacosanoïque
Coumarines	-4,7-Dimethoxy-5-methyl coumarine -7-Hydroxy-4,6-dimethoxy-5-methyl	-coumarine	-4,6,7-Trimethoxy-5-methyl coumarine -siderine -scopoletine
Flavonoïdes	-Linarine Vitaboside Naringenine Hyperine	-Apigénine -Kaempférol-3-o-glucoside -Luteoline -Quercétine-3-o-β-D-glucopyranosyl	-Kaempférol -Isokaempferide -Resokaempférol -Isoquercétine -Quercétine-3,7-o-diglucoside
Alcaloïdes	-Corytuberine -β-Magnoflorine	-α-Magnoflorine	-Clemaine -Choline

MATERIEL ET METHODES

II. MATERIELS ET METHODES

II.1 MATERIEL VEGETAL

Notre étude a été réalisée sur des extraits ethanologiques de deux plantes connues pour leurs effets thérapeutiques dans la médecine traditionnelle, il s'agit de feuilles et de fruits de *Pistacia lentiscus* et les feuilles de *Clematis flammula*.

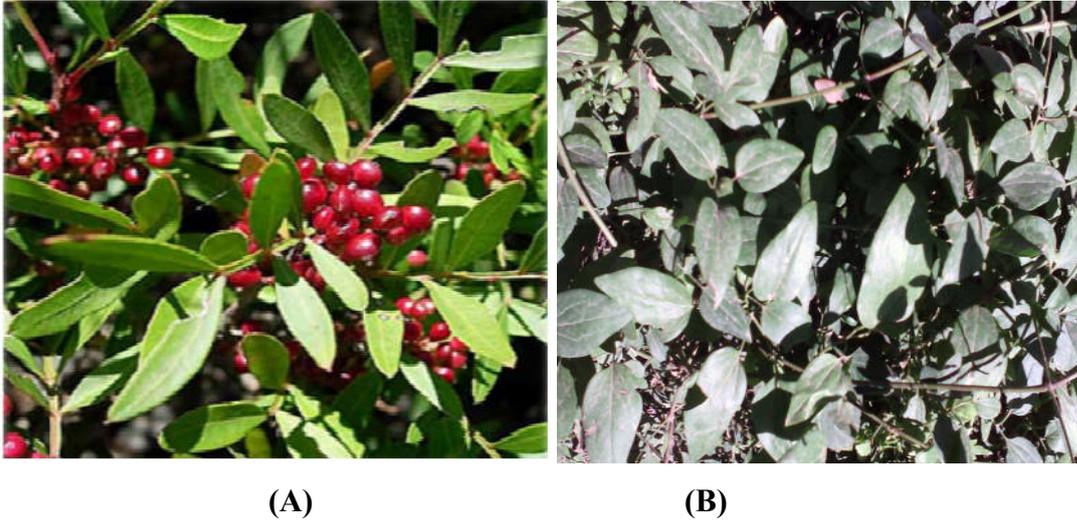


Figure 09 : (A) feuilles et fruits de *P. lentiscus* (Bammou *et al.*, 2015)

(B) photographie originale des feuilles de *C. flammula*.

II. 1. 1 PRÉPARATION DES EXTRAITS

II. 1. 1. 1 RÉCOLTE DES DEUX PLANTES

La récolte des deux plantes *Clematis flammula* et *Pistacia lentiscus* a été effectuée dans la région de Sidi Ayad, de la commune de Sidi Aich, wilaya de Bejaïa (Figure 10), durant la fin mai et début Juillet respectivement, pour les feuilles. Fin novembre, début décembre pour les fruits de *P. lentiscus* qui est la période de maturation de fruits et elle s'effectue à lobe.



Figure 10 : Carte de wilaya de Bejaia

II. 1. 1. 2 SÉCHAGE, BROYAGE ET TAMISAGE

Les différentes parties des plantes *Clematis flammula* et *Pistacia lentiscus*, ont été séchées à l'aire libre et à l'abri de la lumière, elles ont été ensuite broyées à l'aide d'un broyeur électrique et tamisées jusqu'à l'obtention d'une poudre fine de diamètre < 63µm pour les feuilles et une pâte pour les fruits de *Pistacia lentiscus* et les deux ont été conservé à -4°C.

II. 1. 1. 3 EXTRACTION

Les broyats obtenus des feuilles des deux plantes étudiées (*Clématite, lentisque*), ainsi que celui des fruits de *P. lentiscus* ont été macérées dans l'éthanol (96%) sous agitation. Après décantation, les surnageant ont été versés dans des cristallisoirs sous la hotte afin de subir un séchage. Après l'évaporation totale, la pesée de l'extrait a été prise après stabilisation du poids sec. Le pourcentage d'extraction de chaque étape est calculé selon la formule suivante

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = [(P1)-(P0)/E]*100$$

P1 : Poids d'extrait après évaporation (g).

P0 : Poids vide du cristallisoir ou boîte de pétri (g).

E : Poids de la poudre ou de l'extrait sec de la phase précédente (g).

II. 2 REACTIFS ET PRODUITS CHIMIQUES

Les différents produits utilisés sont

Solvants organiques : méthanol, acide acétique (CH_3COOH), acétate d'éthyle ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$),

Acide/base : acide chlorhydrique (HCl), hydroxyde de sodium (NaOH), acide formique (CH_2O_2), acide sulfurique (H_2SO_4), EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$), Hydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4), Monopotassium phosphate (KH_2PO_4), acide ascorbique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), acide férulique ($\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$), acide coumarique ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$), acide caféique ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$), Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique)

Composés phénoliques : acide tannique, rutine, quercétine, catéchine, acide gallique

Réactifs : réactif de Folin-Ciocalcu, vanilline, ferrozine, TPTZ (2, 4, 6- Tripyridyl-s-Triazine)($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6$), H_2O_2 .

Sels : carbonate de sodium (Na_2CO_3), chlorure de fer (FeCl_3) et (FeCl_2), trichlorure d'aluminium (AlCl_3), acétate de sodium ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$), chlorure de sodium (NaCl).

Autre produits :

Eau distillée, BSA (Bovine SerumAlbumin), SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), TEA(triéthanolamine), pyrocatechol ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$), silice, DPPH (2, 2- diphenyl 1-picrylhyorazyl) ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$).

II. 3 MATERIELS UTILISÉS

Nom d'appareil	Marque
Spectrophotomètre à UV	Shimadzu
Vortex	VELP Scientifica
Balance	Sartorius, RADWAG
Etuve	Ecocell (MMM group)
pH mètre	HANNA instruments
Agitateur	VELP Scientifica
Ultra soniccleaner (sonicateur)	Raypa
Bain marré	Memmert
Centrifugeuse	Sigma
Lampe UV	VILBER LOURMAT

II. 4 METHODES DE DOSAGE

II. 4. 1 DOSAGES DES FLAVONOIDES

L'évaluation des teneurs en flavonoïdes présent dans les différents extraits a réalisé selon la méthode de chlorure d'aluminium($AlCl_3$) en suivant le protocole de **Mimica-Dukic. (1992)**.

Ces composés forment des complexes chromogènes avec le chlorure d'aluminium, qui donnent à la solution une coloration jaunâtre dont l'absorbance est fixée à une longueur d'onde de 430nm.

✓ MODE OPÉRATOIRE

Pour le mode opératoire, 2ml de la solution d'extrait ont été additionné à un 1ml de solution de chlorure d'aluminium et après agitation, le mélange a été incubé pendant 10min à température ambiante puis l'absorbance a été mesurée à 430nm.

Pour déterminer la teneur des différents extraits en flavonoïdes, une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant la quercetine comme référence (Annexe 01), les concentrations ont été exprimées en milligramme équivalent quercetine par gramme d'extrait sec.

II. 4. 2 DOSAGE DES PHENOLS TOTAUX

Le protocole appliqué pour déterminer la quantité des phénols totaux contenus dans les extraits des deux plantes est celui de **(Djerridane et al., 2006)**

La réaction est basée sur la réduction de l'acide phosphomolybdène-phosphotungstène du réactif de *Folin-Ciocalteu* de couleur jaune par les phénols vers un complexe de couleur bleue dont l'intensité reflète la teneur en phénols totaux dans chaque extrait **(Djerridane et al., 2006)**.

✓ MODE OPÉRATOIRE

Un volume de 1ml de réactif de *Folin-Ciocalteu* a été mélangé avec 200 μ l de solution d'extrait. Après une incubation pendant 1 min à température ambiante, 0.8 ml de carbonate de sodium (20%) ont été ajoutés et le mélange réactionnel a été incubé à nouveau à une température ambiante et à l'obscurité pendant 2 heures. L'absorbance a été mesurée à 760nm.

La concentration en phénols totaux est exprimée en mg équivalent catéchine par g d'extrait sec, calculée en utilisant l'équation de la droite d'étalonnage (Annexe 02).

II. 4. 3 DOSAGE DES TANNINS

Le dosage des tannins a été réalisé selon le protocole de **Hagerman et Bulter (1978)** avec quelques modifications, en se basant sur leur précipitation par une protéine standard la BSA, par la suite le complexe tanins-BSA formé est mesuré à une longueur d'onde de 510nm après hydrolyse alcaline et réaction avec le FeCl₃.

✓ MODE OPÉRATOIRE

Afin d'effectuer le dosage, un volume de 2ml de la BSA a été additionné à 1ml de la solution d'extrait et le mélange a été incubé à 4°C pour une durée de 24H. Une centrifugation à 3000g pendant 15 min a été réalisée, le culot a été récupéré puis un volume de 4ml de mélange SDS/TEA et 1ml de FeCl₃ ont été rajoutés. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 15 min à température ambiante ensuite l'absorbance a été mesurée à 510nm. .

Pour déterminer la teneur des différents en tannins, une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant l'acide tannique comme standard (Annexe 03), la concentration a été exprimée en milligramme équivalent acide tannique par gramme d'extrait sec.

II. 4. 4 DOSAGE DES PROANTHOCYANIDINES

La quantité en pro-anthocyanidines présente dans les extraits des deux plantes a été déterminée selon la méthode de la vanilline-HCL décrite par **Melo et al. (2006)** avec quelques modifications.

Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités de pro-anthocyanidines en présence d'acide pour produire un complexe coloré qui est mesuré à 500 nm (**Ba et al., 2010**).

✓ MODE OPÉRATOIRE

Un volume de 0.5ml de la solution d'extrait a été mélangé avec 3ml de solution vanilline/méthanol (4%), Après l'ajout de 1,5ml d'HCL, le mélange réactionnel a été incubé pendant 20min à température ambiante et l'absorbance a été mesurée à 500nm.

Pour déterminer la teneur de ces extraits en pro-anthocyanidines, une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant la catéchine comme référence (Annexe 04), la concentration a été exprimée en milligramme équivalent catéchine par gramme d'extrait sec.

II. 3. 5 DOSAGE DES ANTHOCYANINES ET FLAVONOLS GLYCOSIDES

Les teneurs en anthocyanines et en flavonols glycosides sont déterminées selon le protocole décrit par **Ganjewala *et al.*, (2008)**.

✓ MODE OPÉRATOIRE

Pour réaliser ce dosage, 10 mg d'extrait ont été ajoutés à un 1ml de solution méthanol-HCL (0,1N) après 20 µl de la solution d'extrait sont mélangé avec 980 µl de solution méthanol-HCL (0,1N) puis on a fait la lecture à 530 nm pour déterminer le taux des anthocyanines et une lecture à 360 nm pour déterminer le taux des flavonols (**Ganjewala *et al.*, 2008**).

Les résultats sont déterminés en équivalent mg de quercitine 3-glucoside/100g Matière Sèche en utilisant le coefficient d'extinction de 38000L/mol/cm pour les anthocyanines et 20000L/mol/cm pour les flavonols glycosides selon la formule suivante

$$C \text{ (mg/l)} = (\text{Abs} \times \text{FD} \times \text{MM} \times 1000) / \epsilon \times L$$

Avec : Abs : absorbance de test ; MM : poids moléculaire=449,2g/mole de cyanidine-3-glucoside ; FD : facteur de dilution ; $\epsilon=20000 \text{ L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ pour flavonol glycoside et $38000\text{L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ pour anthocyane

II. 5 DÉTERMINATION DES ACTIVITÉS ANTIOXYDANTES

L'activité antioxydante des extraits de *Pistacia lentiscus* et *Clematis flammulaa* été déterminée en utilisant plusieurs tests :

II. 5. 1 POUVOIR RÉDUCTEUR DE FER FERRIQUE (TEST FRAP)

❖ PRINCIPE DU TEST FRAP

La présence des réducteurs dans les extraits de plantes provoque la réduction en milieu acide du complexe incolore 2, 4, 3-tripyridyltriazine-ferrique (Fe(III)-TPTZ) à la forme ferreux (tripyridyltriazine- ferreux (Fe(II)-TPTZ)) de couleur bleue intense, qui absorbe à 593 nm (**Prior *et al.*, 2005 ; Govindan et Muthukrishnan, 2013 ; Senthilkumar, 2013 ; Sowndhararajan et Kang, 2013**)

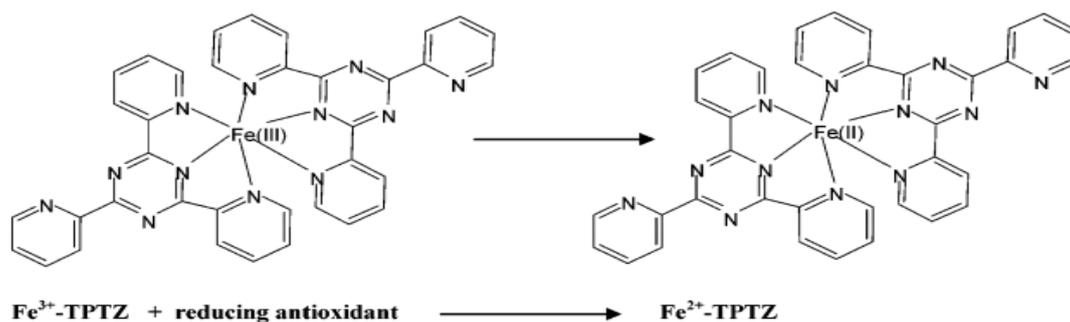


Figure 11 : Principe de la méthode FRAP (Prior *et al.*, 2005).

✓ MODE OPÉRATOIRE

Le pouvoir réducteur des extraits de *P. lentiscus* et *C. flammula* a été évalué selon la méthode développée par Maksimovič *et al.* (2005). Une solution de tampon acétate (300mM) de pH 3.6 a été préparé avec TPTZ (10mM) et FeCl₃-6H₂O (20mM) avec un rapport de 10 : 1 (Figure 12).

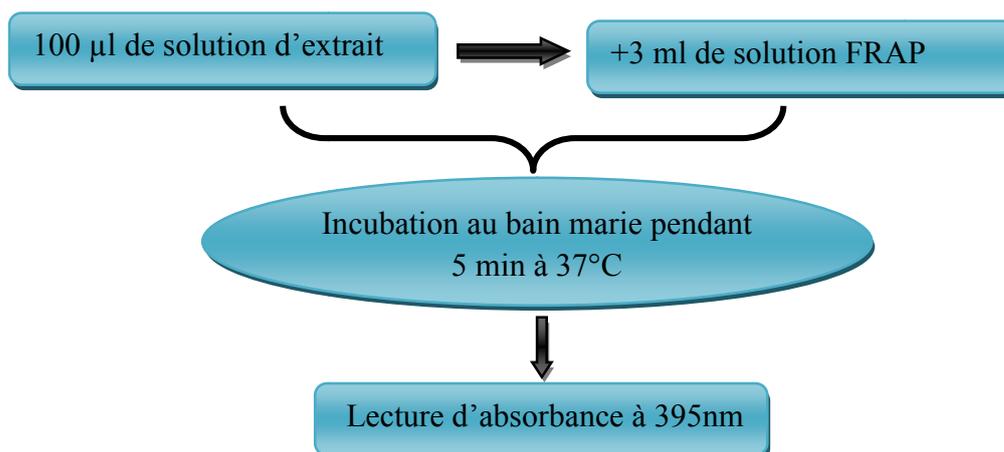


Figure 12: Protocole de détermination du pouvoir réducteur du fer ferrique (test FRAP) (Maksimovič *et al.*, 2005).

Le même test a été effectué avec une molécule de référence, l'acide ascorbique, afin de réaliser une courbe d'étalonnage qui permettra de calculer l'équivalence en milligramme de l'acide ascorbique par gramme d'extrait (mg Eq Ac. asc /g d'extrait).

II. 5. 2 ACTIVITÉ ANTI- RADICALEIRE DES EXTRAITS DE *PISTACIA LENTISCUS* ET *CLEMATIS FLAMMULA*.

II. 5. 2. 1 EFFET SCAVENGER DU RADICAL DPPH

❖ PRINCIPE

L'essai de piégeage des radicaux libres DPPH a été réalisé pour l'évaluation de l'activité anti-radicalaire. Le DPPH (2, 2- diphenyl 1-picrylhyorazyl) est un radical libre stable, de couleur violet intense. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (**Popovici *et al.*, 2009 ; Balakrishnan *et al.*, 2011**).

Lorsque le DPPH entre en contact avec les antioxydants, il se réduit en di-phenyl hydrazine, de couleur jaune et ce changement de coloration (de violet au jaune) est mesuré à $\lambda = 517$ nm. Cette réduction est due soit à un don d'hydrogène ou d'électron par l'antioxydant (**Popovici *et al.*, 2009 ; Tirzitis et Bartosz, 2010 ; Balakrishnan *et al.*, 2011 ; Padmanabhan et Jangle, 2012 ; Djacbou *et al.*, 2014**).

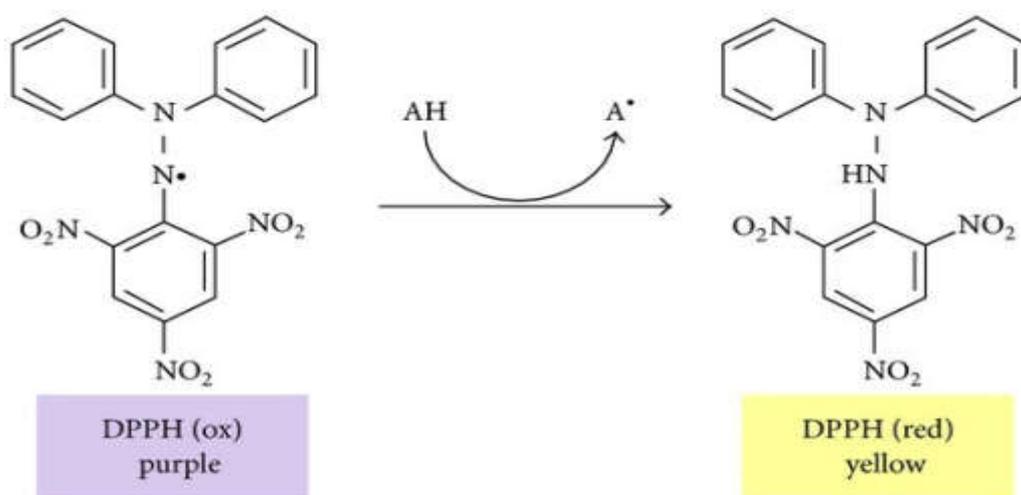


Figure 13 : Réaction de transformation du radical libre DPPH (2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle) en présence d'un antioxydant (**Molyneux, 2004**).

✓ MODE OPÉRATOIRE

L'effet scavenger du radical DPPH des extraits de *P. lentiscus* et *C. flammula* et la molécule standard Trolox ((acide 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tétraméthyl chroman-2-carboxylique) a été déterminé selon le protocole de **Maisuthisakul *et al.* (2007)** (Figure 14).



Figure 14 : Protocole d'évaluation de l'effet scavenger du radical DPPH (Maisuthisakul *et al.*, 2007).

Chaque test est réalisé en trois répliques. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est calculé comme suite :

$$\% \text{ scavenging de DPPH} = ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100$$

A_0 : absorbance de control

A_1 : absorbance de l'extrait

II. 5. 2. 2 EFFET SCAVENGER DU RADICAL H_2O_2

❖ PRINCIPE

Le principe de ce test est basé sur la neutralisation du H_2O_2 par un antioxydant qui va faciliter sa décomposition en molécule d'eau (Özyürek *et al.*, 2010).

✓ MODE OPÉRATOIRE

La capacité des extraits de *P.lentiscus* et *C.flammula* à piéger le radical H_2O_2 a été déterminée en suivant la méthode développée par (Ruch *et al.*, 1989)(Figure 15).

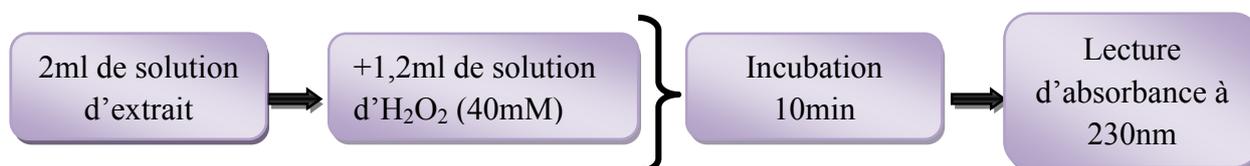


Figure 15: Protocole d'évaluation de l'activité de piégeage d' H_2O_2 (Rajeshwar *et al.*, 2005).

Une molécule de référence (acide ascorbique) a été testée dans les mêmes conditions avec les différents extraits. Chaque test est répété trois fois et le pourcentage de piégeage de l' H_2O_2 a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de piégeage de } H_2O_2 = ((A_{\text{cont}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{cont}}) \times 100$$

A_{cont} : absorbance de control

A_{test} : absorbance de l'extrait

II. 5. 3 EVALUATION DE L'ACTIVITE CHÉLATRICE DU FER

❖ PRINCIPE

L'activité chélatrice du fer des extraits de *P.lentiscus* et *C.flammula* a été établie en suivant la méthode de **Sharma *et al.* (2012)**. La ferrozine forme avec les ions ferreux des complexe rouges violacés, très soluble dans l'eau et qui absorbent à 562 nm. Cependant, en présence d'agents chélateurs, la formation de complexe est perturbé ce qui entraine une diminution de la couleur. La mesure de la diminution de la couleur permet donc d'estimer l'activité de la chélation du fer (**Sharma *et al.*, 2012 ; Adjimani et Asare, 2015 ; Moulaoui *et al.*, 2015**). L'EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique) a été étudiée comme molécule de référence chélatrice du fer.

✓ MODE OPÉRATOIRE

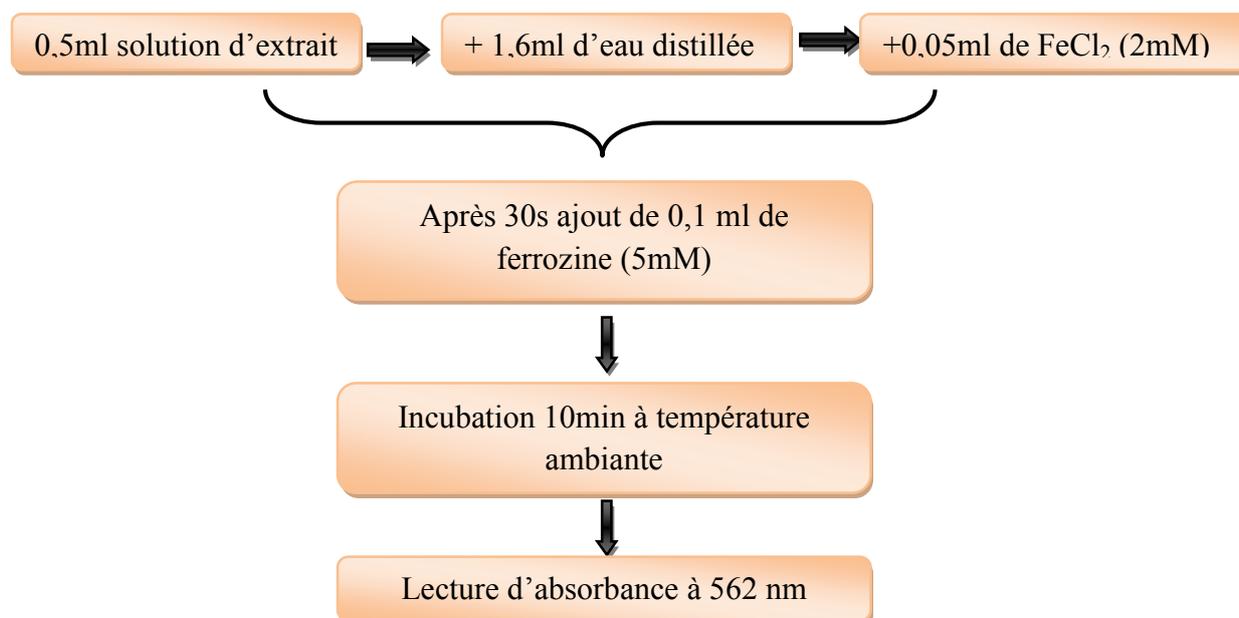


Figure 16 : Procédure expérimentale pour évaluer l'activité chélatrice des ions de fer (**Sharma *et al.*, 2012**).

Chaque test est répété trois fois et le pourcentage de chélation de fer a été calculé selon la formule suivante

$$\% \text{ de chélation} = ((A_0 - A_1)/A_0) \times 100$$

A_0 : absorbance de control

A_1 : absorbance de l'extrait

II. 6 CARACTERISATION QUALITATIVE DES COMPOSES PRESENTS DANS LES EXTRAITS DES DEUX PLANTES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

La chromatographie sur couche mince CCM, ou sur plaque, est effectuée surtout en vue d'une analyse de composition d'un mélange. Elle est composée de deux phases :

- La phase stationnaire (solide) est fixée sur une plaque, généralement c'est la silice
- la phase mobile liquide, nommée éluant, est un solvant ou un mélange de solvants (**Mendham *et al.*, 2006**).

La CCM a été réalisée en trois phases principales : préparation des plaques, développement des plaques et enfin la révélation.

a) PRÉPARATION DES PLAQUES

C'est une étape où la plaque chromatographique (en verre) sera recouverte par une couche mince (0,5 mm d'épaisseur) d'un mélange de la silice/ eau (60g/100ml d'eau distillée) à l'aide d'un étaleur manuel.

Pour faciliter le processus de migration et éliminer les particules d'eau de la silice, la plaque est réactivée à 100°C pendant 30 min après séchage.

L'extrait éthanolique des différentes parties des plantes étudiées et des molécules de référence (acide ferulique, acide coumarique, acide tannique, acide gallique, acide caféique, catéchine, quercétine, rutine, pyrocatechol) ont été déposés sous forme de spots (V=20µl) à 2 cm du bord inférieur de la plaque.

b) DÉVELOPEMENT DES PLAQUES

Le système éluant appliqué pour la migration est constitué d'un mélange de : L'acétate d'éthyle, l'acide formique, l'acide acétique et l'eau distillée. Avec des rapports de 100 : 11 : 11 : 26. (**Shikov *et al.*, 2010**)

Ce mélange a été mis dans une chambre de chromatographie pour la saturation, par la suite la plaque a été déposée soigneusement et immergée d'environ 0,5 cm dans la phase mobile. Les différentes molécules seront entraînées par une progression capillaire de la phase mobile vers le haut de la plaque. Leurs rapports frontaux (Rf) dépendront de leurs interactions entre la phase mobile et la phase stationnaire (adsorption et solubilité) ainsi que leurs poids moléculaires.

c) LA RÉVÉLATION

Dès que la phase mobile atteint la limite de migration, les plaques sont immédiatement retirées et séchées puis des observations à la lumière de jour et sous lampe UV à 365 nm ont été réalisées. Ensuite, une pulvérisation avec la vanilline sulfurique a été effectuée afin de visualiser et caractériser les sous fractions non visibles sous UV et à la lumière du jour.

La dernière étape consiste aux calculs des rapports frontaux ainsi à la comparaison à ceux des molécules de références, permettant ainsi la caractérisation des constituants des différents extraits (Figure 17).

$R_f = \text{distance parcourue par le composé} / \text{distance parcourue par le front du solvant}$

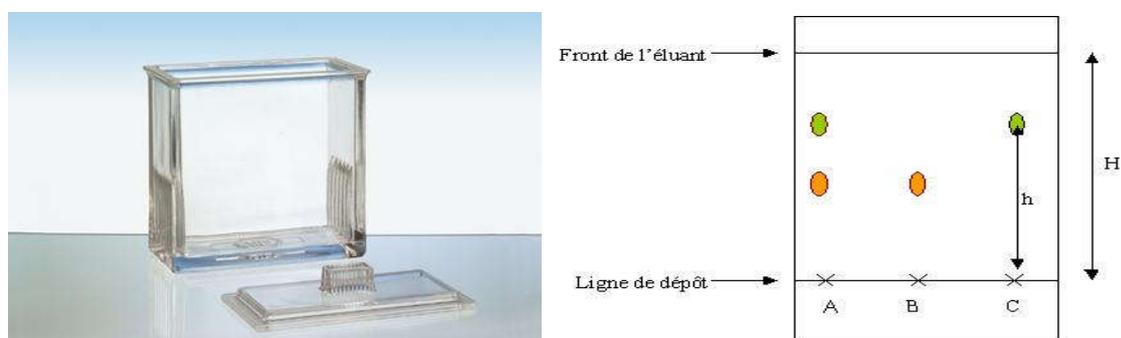


Figure 17 : Chambre chromatographique et une plaque CCM montrant le calcul de rapport frontal.

II.6 ANALYSE STATISTIQUE

L'analyse statistique des différents résultats a été effectuée en utilisant le logiciel Graph Pad Prism et les différences sont considérées significatives pour $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***) .

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type (n=3).

RESULTATS ET DISCUSSION

III. 1 DOSAGE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

III. 1 .1 DOSAGE DES FLAVONOÏDES

Les teneurs en flavonoïdes des extraits éthanoliques des deux parties (feuilles ou fruits) de *Pistacia lentiscus* et de feuilles de *Clematis flammula* sont exprimées en mg équivalent Quercétine/ g d'extrait, illustrées dans la figure 18

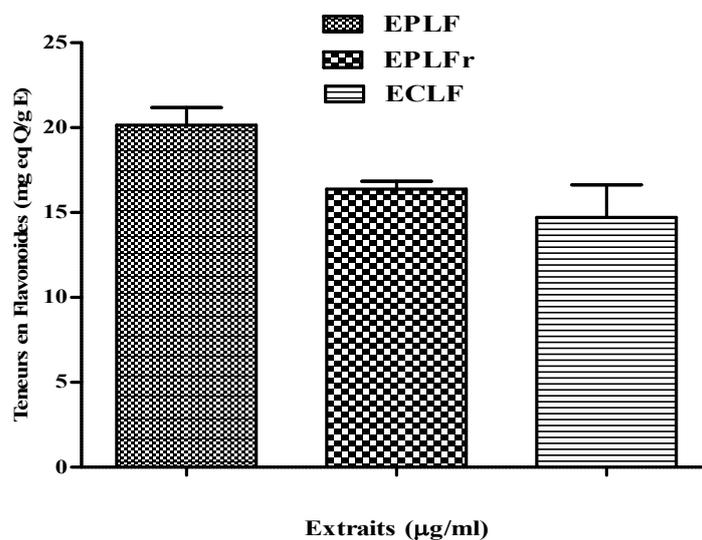


Figure 18 : Les teneurs en flavonoïdes des extraits éthanoliques de feuille de *Pistacia lentiscus* (EPLF), fruit de *Pistacia lentiscus* (EPLFr) et feuille de *Clematis flammula*(ECLF) exprimées en mg équivalent de Quercétine/ g d'extraits. -Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

L'étude statistique révèle l'existence d'une différence hautement significative ($p < 0,01$) entre les teneurs en flavonoïdes des extraits de feuilles de *P. lentiscus* et celles des extraits de feuilles de *C. flammula*. La différence est significative ($p < 0,05$) entre les extraits de feuilles de *P. lentiscus* et ceux des fruits de la même plante. Cependant aucune différence significative n'a été enregistrée entre les extraits de fruits de *P. lentiscus* et les feuilles de *C. flammula*.

Les résultats de l'analyse quantitative des extraits de feuille et fruit de *P. lentiscus* et les extraits de feuille de *C. flammula* par spectrophotométrie montrent que la teneur la plus élevée en flavonoïdes est enregistrée par l'extrait de feuilles de *P. lentiscus* (20,14±1,04mg Eq Q/g d'extrait), suivie par les extraits de fruits de la même plante et ceux des feuilles de *C. flammula* (16,38±0,46 et 14,71±1,91 mg Eq Q/g d'extrait) respectivement (Figure 18).

Les travaux de **Benhammou et ses collaborateurs, (2008)** sur la famille des Anacardiaceae ont mis en évidence l'abondance des flavonoïdes glycosidiques dans les parties aériennes des espèces de *Pistacia*.

D'autre part l'étude menée par (Remila *et al.*, 2015), et en appliquant les mêmes procédures de dosage et sur les mêmes parties de la plante étudiée a montré que les teneurs en flavonoïdes des extraits éthanoliques de *P. lentiscus* (feuilles ou fruits) étaient 139.38 ± 3.11 et 6.28 ± 1.04 mg Eq rutine/g d'extrait respectivement.

Des teneurs faibles en flavonoïdes des extraits éthanoliques des feuilles de *P. lentiscus* et des feuilles de *C. flammula* (12.93 ± 1.69 et 05.15 ± 0.10 mg Eq Quercetine/g d'extrait) ont été rapportées par l'équipe de recherche de Atmani *et al.*, (2009).

III. 1. 2 DOSAGE DES PHÉNOLS TOTAUX

Les teneurs en phénols totaux des extraits de feuilles de *Clematis flammula* et les extraits de fruits et de feuilles de *Pistacia lentiscus* sont présentées dans la figure 19.

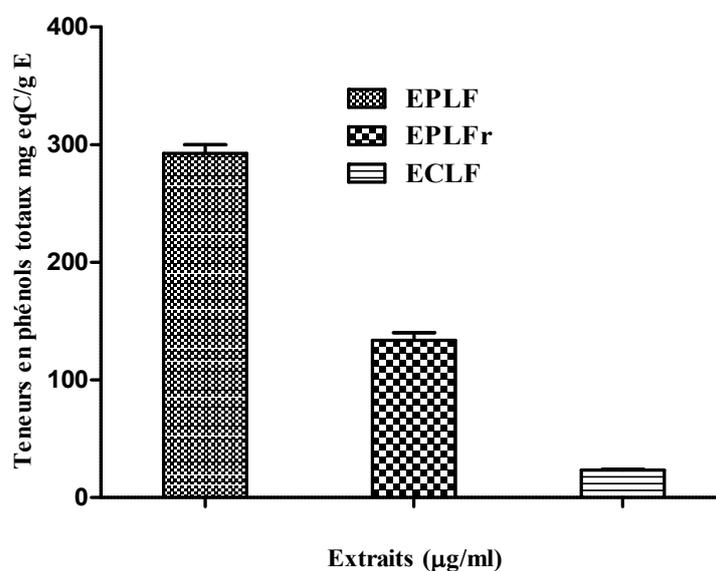


Figure 19: Les teneurs en phénols totaux des extraits éthanoliques de feuilles de *Pistacia lentiscus* (EPLF), fruits de *Pistacia lentiscus* (EPLFr) et feuilles de *Clematis flammula* (ECLF) exprimées en mg équivalent Catéchine/ g d'extraits. -Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

D'après la (figure19), on remarque l'existence d'une différence très hautement significative ($p < 0,001$) entre les teneurs en phénols totaux des extraits de feuilles de *P. lentiscus* et les extraits de fruits de la même plante et les feuilles de *C. flammula*. D'après les résultats de l'analyse quantitative de ces extraits par spectrophotométrie, on constate que la teneur la plus élevée est marquée par l'extrait de feuilles de *P. lentiscus* ($292,67 \pm 7,29$ mg Eq Cat/ g d'extrait), suivie par l'extrait de fruits de la même plante ($133,63 \pm 6,55$ mg Eq Cat/ g d'extrait), et la teneur la plus faible a été enregistrée par l'extrait de feuilles de *C. flammula* avec $23,45 \pm 0,62$ mg Eq Cat/ g d'extrait.

L'équipe de **Barboucha et collaborateurs, (2010)** ont réalisé une étude sur l'extrait éthanolique des feuilles de *P. lentiscus* où une faible teneur en phénols totaux ($136,25 \pm 18,97$ mg Eq Cat/g d'extrait) a été enregistrée. D'autre part, **(Remila et al., 2015)** et **(Mehenni et al., 2016)** ont rapporté des taux élevés en phénols totaux des extraits éthanolique des deux parties de *Pistacia lentiscus*.

Comparativement aux résultats obtenus dans cette présente étude, cette différence entre les résultats peut être attribuée probablement à la différence de l'année de la récolte.

Une autre étude réalisée dans le même laboratoire par **(Atmani et al., 2009)** a montré la richesse de l'extrait éthanolique de feuilles de *P. lentiscus* et *C. flammula* en phénols totaux avec des valeurs de (136.25 ± 18.9 et 19.65 ± 3.61 mg Eq Cat/g d'extrait) respectivement. De cette présente analyse, on constate que nos résultats sont plus importants par rapport à ceux obtenus auparavant par **(Atmani et al., 2009)**, ce qui réaffirme la richesse de ces deux plantes en phénols totaux.

De même, **(Benhammou et al., 2008)** ont rapporté que les teneurs en composés phénoliques totaux des extraits éthanoliques de *P. lentiscus* et *P. atlantica* variaient entre 0,90 à 1,96 mg équivalent pyrocatechol par gramme d'extrait.

III.1 .3 DOSAGE DES TANNINS

Les teneurs en tannins des extraits des feuilles de *C. flammula*, les extraits de feuilles et fruits de *P. lentiscus* sont représentées dans la figure 20.

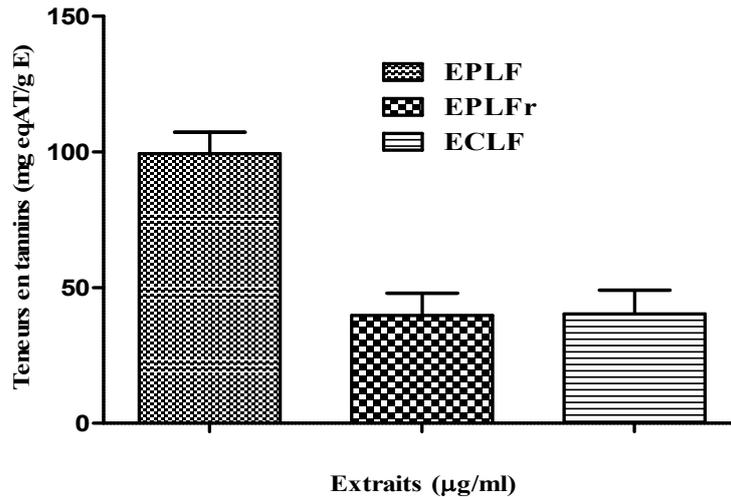


Figure 20 : Les teneurs en tannins des extraits éthanoliques de feuille de *Pistacia lentiscus* (EPLF), fruit de *Pistacia lentiscus* (EPLFr) et feuille de *Clematis flammula* (ECLF) sont exprimées en mg équivalent acide tannique/g d'extrait. -Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

D'après l'analyse statistique, on remarque qu'il existe une différence très hautement significatives ($p < 0,001$) entre des teneurs en tannins des extraits de feuilles et de fruits de *P. lentiscus* et celles des extraits de feuilles de *C. flammula*, cependant aucune différence significative n'a été notée entre les extraits de fruits de *P. lentiscus* et les feuilles de *C. flammula*.

Les résultats de dosage quantitative des tannins contenus dans les extraits éthanoliques de *P. lentiscus* (feuilles ou fruits) et les feuilles de *C. flammula* par spectrophotométrie ont signalé des valeurs de l'ordre de l'ordre de $99,33 \pm 7,89$; $39,73 \pm 8,16$ et $40,26 \pm 8,73$ mg Eq Ac T/g d'extrait respectivement.

Ces résultats rejoignent ceux trouvés par **Atmani et al., (2009)** qui ont enregistré des teneurs de ($909,4 \pm 42,61$; $86,33 \pm 10,82$ mg Eq Ac T/g d'extrait) pour les extraits éthanoliques de feuille de *P. lentiscus* et les feuilles de *C. flammula* respectivement.

D'autre part, une autre étude menée par **Remila et al., (2015)** a montré que les extraits éthanoliques des feuilles et des fruits de *P. lentiscus* ont manifesté des taux de ($142,56 \pm 2,60$ et $216,74 \pm 5,31$ mg Eq Ac T/g d'extrait) respectivement.

On peut conclure que les extraits de feuille de *P. lentiscus* sont riches en tannins par rapport à ceux des fruits de la même plante et ceux de *C. flammula*. Cependant ces taux restent toujours inférieurs aux résultats des travaux réalisés par **Atmani et al., (2009)** et **Remila et al., (2015)**.

III. 1. 4 DOSAGE DES PROANTHOCYANIDINES

Les teneurs en protoanthocyanidines des extraits éthanoliques de *Pistacia lentiscus* (feuilles ou fruits) et les feuilles de *Clematis flammula* ont été déterminées par la méthode Vanilline-HCL, les résultats ont été exprimés en mg équivalent cat/g d'extrait sont représentées dans la figure 21.

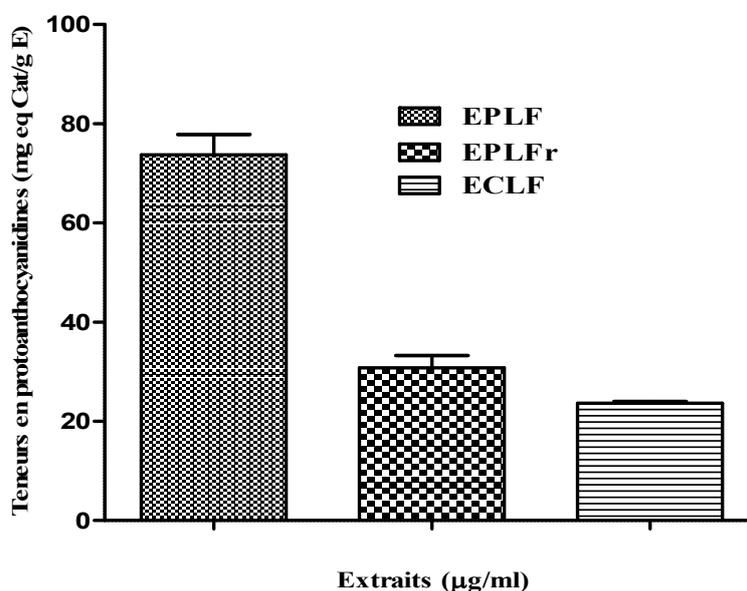


Figure 21 : Les teneurs en protoanthocyanidines des extraits éthanoliques de feuilles de *Pistacia lentiscus* (EPLF), fruits de *Pistacia lentiscus* (EPLFr) et feuilles de *Clematis flammula* (ECLF) exprimées en mg équivalent catéchine/g d'extrait. -Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

Selon l'étude statistique, il existe une différence très hautement significative ($p < 0,001$) entre les teneurs en protoanthocyanidines des extraits de feuille et de fruit de *P. lentiscus* et ceux des feuilles de *C. flammula*, cependant la différence est significative ($p < 0,05$) entre les teneurs des extraits de fruit de *P. lentiscus* et les extraits de feuille de *C. flammula* avec l'enregistrement de la teneur la plus élevée par l'extrait de feuilles de *P. lentiscus* 73,70±4,10 mg Eq Cat/g d'extrait, suivie par les extraits de fruit de *P. lentiscus* et feuilles de *C. flammula* avec les teneurs : 30,75±2,5 mg Eq Cat/g d'extrait et 23,66±0,32 mg Eq Cat/g d'extrait respectivement.

Une étude réalisée par (Lebreton *et al.*, 1997) sur 37 plantes médicinales révèle l'existence des proanthocyanidines dans les extraits de *P. lentiscus* et *P. terebinthus* avec une teneur de 10,2mg/g et 11,9 mg/g respectivement.

Ces différences de teneurs entre les extraits peuvent être dues à la vanilline qui est un aldéhyde aromatique, qui interagit spécifiquement avec les flavan3-ol et avec les unités terminales des proanthocyanidines (Hagermen, 2002).

III. 1. 5 DOSAGE DES ANTHOCYANES

La figure suivante illustre les résultats de dosage des anthocyanes des extraits éthanoliques de feuilles et de fruits de *P. lentiscus* ainsi que les feuilles de *C. flammula* exprimés en mg C3G/100g d'extrait.

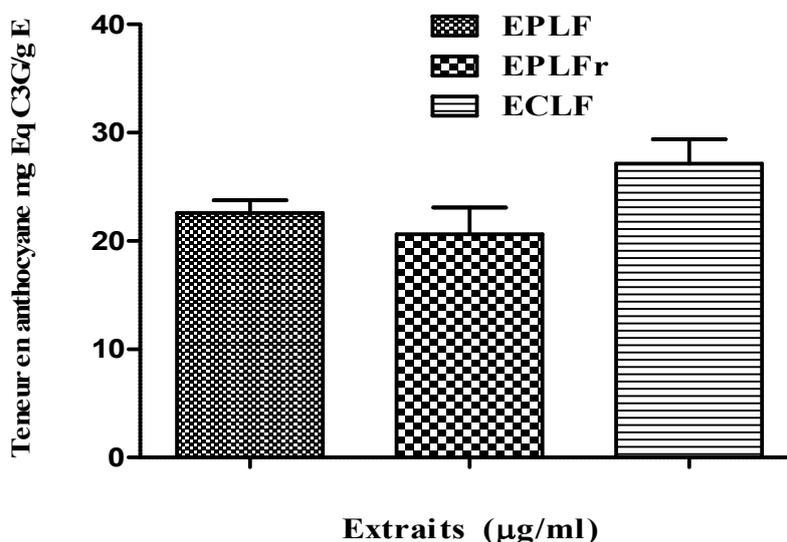


Figure 22: Teneur en anthocyanines des extraits de feuilles de *P. lentiscus* (EPLF), fruit de *P. lentiscus* (EPLFr) et feuille de *C. flammula* (ECLF) - Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

Aucune différence significative n'est enregistrée entre les teneurs en anthocyanines obtenues pour les extraits de feuille et de fruit de *P. lentiscus*, avec des taux de 22,56±1,18 et 20,61±2,46 mg Eq C3G/100g d'extrait respectivement.

Par contre, on constate une différence significative ($P < 0.05$) entre les deux extraits de *P. lentiscus* et l'extrait de feuille de *C. flammula*, du fait que cette dernière a présenté la grande teneur (27,13±2,24 mg Eq C3G/100g d'extrait).

Plusieurs travaux de recherches ont montré que les deux espèces de Lentisque, *Pistacia lentiscus* et *Pistacia vera* sont riches en cyanidine-3-O-glucoside (Bellom et Fallico, 2007 ; Longo et al., 2007 , Benhammou et al., 2008). Par ailleurs, l'étude menée par l'équipe de Bammou et al., (2015) a révélé la présence des anthocyanes dans l'extrait des feuilles de *P. lentiscus*, ce qui confirme les résultats des études précédentes.

III. 1. 6 DOSAGE DES FLAVONOLS GLYCOSYLES

Les résultats de dosage des flavonols glycosylés des différents extraits sont illustrés dans la figure 23.

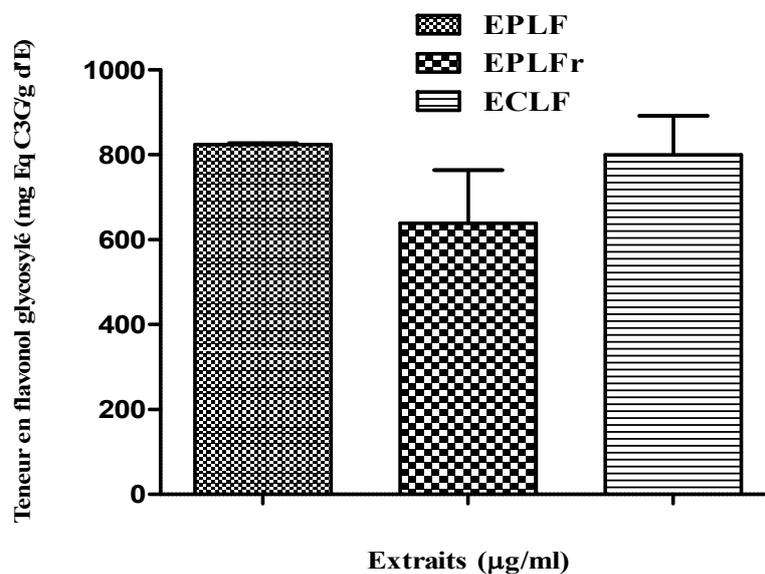


Figure 23 : Teneurs en flavonols glycosylés des extraits de feuilles de *P.lentiscus* (EPLF), de fruits de *P. lentiscus* (EPLFr) et de feuille de *C. flammula* (ECLF). -Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

D'après la (Figure 23), la teneur la plus élevée en flavonols glycosylés a été représentée par l'extrait éthanolique de feuilles de *P. lentiscus* avec 823,563± 3,28 mg Eq cyanidine-3-glucoside/ 100g d'extrait, suivie par l'extrait de feuilles de *C. flammula* et les fruits de *P. lentiscus* avec des valeurs de 734,62 ±79,63 et 731,43± 113,29 mg équivalent la cyanidine-3-glucoside/ 100g d'extrait respectivement où aucune différence significative n'a été notée.

L'abondance des flavonoïdes glycosides dans les parties aériennes de *P. lentiscus*, *P. atlantica*, *P. vera*, *P. chinensi* et *P. khinjuk* a été étudiée par l'équipe de recherche de **kawashty et al., (2000)**. La présence de flavonol glycosides (myricétine et quercétine glycosidés) dans l'extrait éthanolique des feuilles de *P. lentiscus* a été également confirmée par les résultats obtenus par **Benhammou et al., (2008)**.

III. 2 EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTES DES EXTRAITS ÉTHANOLIQUES DE DEUX PLANTES

III. 2. 1 MESURE DU POUVOIR ANTIOXYDANT PAR LA REDUCTION DU FER FERRIQUE (TEST FRAP)

Le pouvoir antioxydant par la réduction du fer ferrique des extraits des deux plantes a été évalué et les résultats sont exprimés en équivalent acide ascorbique/g d'extrait.

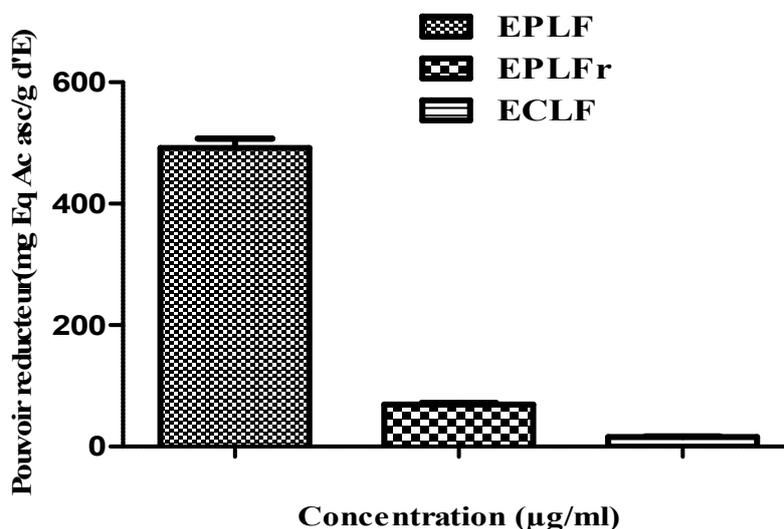


Figure 24 : Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode FRAP des extraits éthanoliques de feuille (EPLF) et fruit (EPLFr) de *Pistacialentiscus* et l'extrait de feuille de *Clematisflammula* (ECLF) en équivalent de l'acide ascorbique/ g d'extrait.

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

-Les valeurs indiquent que (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

D'après les résultats illustrés dans la (figure 24), on remarque qu'il existe une différence très hautement significative ($P < 0,001$) entre les valeurs du pouvoir réducteur exhibé par les différentes parties des deux plantes, (491,72 ± 15,48 mg Eq Ac asc/g d'extrait) pour l'extrait de feuilles de *P. lentiscus*. Suivi par les extraits de fruits de la même plante et les feuilles de *C. flammula* avec des valeurs qui sont respectivement de (69,49 ± 2,06 mg Eq Ac asc/g d'extrait) et (15,97 ± 0,66 mg Eq Ac asc/g d'extrait).

Une étude réalisée par **Gardeli *et al.*, (2008)** sur l'extrait méthanolique de *P. lentiscus* à différentes périodes de récolte (Février, May, Aout) a donnée des valeurs de l'ordre de :84,6+3,5 ; 131,4+10,1 ; 105+12,2 (mmol Fe₂⁺/l) respectivement, les résultats obtenus ont également indiqué que la capacité réductrice augmente quand deux groupements hydroxyles sont orientés en positions *ortho* ou *Para*.

Le pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique de *Thalictrum minus* L., une plante appartenant à la même famille de *Pistacia lentiscus* (Ranunculaceae) est de 14.3 ± 0.01 (mmole FeSO₄/l) (**Molan *et al.*, 2012**)

Une autre étude menée par **Venkatachalam et Muthukrishnan, (2012)** a montré que l'extrait éthanolique de feuilles de *Desmodium gongeticum* (Fabaceae) a manifesté une activité réductrice de l'ordre de 0,073 (mg Eq Ac Asc/g d'extrait) à une concentration de 200 µg/ml.

Les résultats de la capacité réductrice de l'extrait éthanolique de *Boerhavia erecta* (Nyctaginaceae) étaient dans une gamme de 0,06 - 0,16%, en les comparants avec l'acide ascorbique (0,08-0,19%) (**Govindan et Muthukrishnan, 2013**).

Tableau VIII : Corrélation entre la teneur en composés phénoliques et le pouvoir réducteur FRAP.

Composés phénoliques	Coefficient de corrélation (r)		
	<i>P. lentiscus</i> feuilles	<i>P. lentiscus</i> fruits	<i>C. flammula</i> feuilles
Flavonoïdes	r= 0,34	0,52	0,94
Phénols totaux	r= 0,45	-0 ,64	-0,15
Tannins	r= 0,96	-0,83	0,06
Proanthocyanidines	r= -0,95	0,51	0,92
Anthocyanes	r= -0,99	-0,96	0,36
Flavonols glycosylés	r= -0,98	-0,06	-0,74

On constate qu'il ya une très bonne corrélation entre la teneur en tannins des extraits de feuilles de *P. lentiscus* et le pouvoir réducteur FRAP, avec un coefficient de corrélation de ($r=0,96$), cependant la corrélation est positive entre la teneur en flavonoïdes ($r=0,34$), phénols totaux ($r=0,45$) de la même partie et l'activité réductrice.

Par contre aucune corrélation n'a été enregistrée concernant les proanthocyanidines, anthocyanes et flavonols glycosylés. D'autre part concernant les fruits de *P. lentiscus* la corrélation est positive entre la teneur en flavonoïdes ($r=0,52$), proanthocyanidines ($r=0,51$) et le pouvoir réducteur FRAP.

Une très bonne corrélation a été noté entre la teneur en flavonoïdes ($r=0,94$), proanthocyanidines ($r=0,92$) de l'extrait de feuille de *C. flammula* et l'activité réductrice FRAP, cependant, aucune corrélation n'a été enregistrée avec les autres composés de cette plante.

Les études menées par **Dudonné *et al.*, (2009)** et **Sowndhararajan et kang, (2013)** ont confirmé nos résultats concernant l'extrait de feuilles de *C. flammula*, qui ont démontré qu'il y a une bonne corrélation entre les flavonoïdes et le test FRAP avec ($r=0,82$), suggérant que cette classe de composés est responsable de l'activité réductrice de cette plante.

De même, un coefficient de corrélation ($r=0,95$) a été rapporté par l'équipe de recherche de **Venkatachalam et Muthukrishnan, (2012)**.

En étudiant la relation entre le pouvoir réducteur et la structure de différents composés, **Olabinri et ces collaborateurs, (2010)** ont démontré que la position et le degré d'hydroxylation des composés phénoliques, en particulier dans le noyau B jouent un rôle crucial dans l'activité chélatrice.

III. 2. 2 ACTIVITÉ SCAVENGING DU RADICAL DPPH

L'activité de piégeage des extraits éthanoliques des deux plantes (*Pistacia lentiscus* et *Clematis flammula*) et la molécule de référence Trolox du radical stable DPPH a été évaluée à une concentration de 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ et les résultats sont illustrés dans la figure 25.

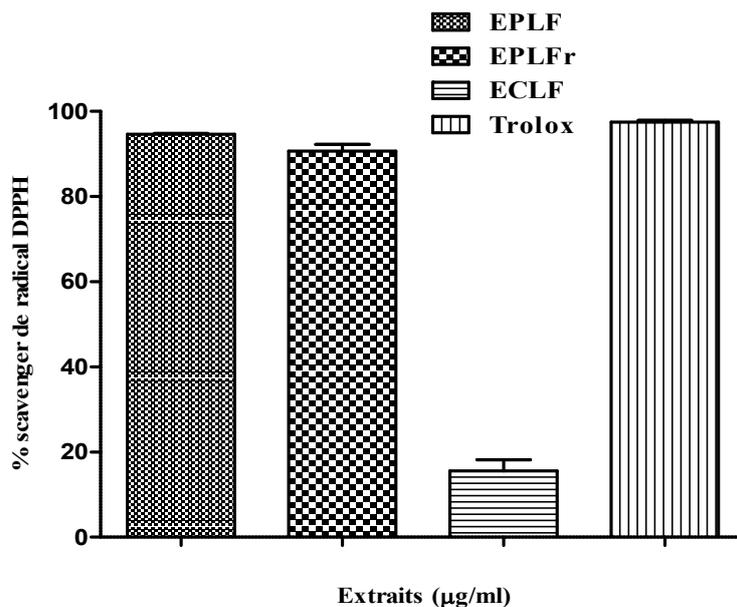


Figure 25 : Effet anti-radicalaire contre le radical DPPH des extraits éthanolique de feuilles de *Pistacia lentiscus* (EPLF), fruits de *Pistacia lentiscus* (EPLFr), feuilles de *Clematis flammula* (ECLF) et Trolox à une concentration de 100 µg / ml.

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

-Les valeurs indiquent que *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

A la lumière des résultats présentés dans la figure 25, on constate que l'extrait de feuilles de *P. lentiscus* a exhibé l'effet anti-radicalaire le plus élevé (94,64±0,18%), similaire à celui de la molécule de référence utilisée: le Trolox avec 97,48 ±0,37% ou aucune différence significative n'a été notée, suivi par l'extrait de fruits (90,69±1,52%).

L'extrait de feuilles de *C. flammula* a noté la plus faible activité (15,59±2,61%) avec une différence hautement significative par rapport au standard et les extraits de *P. lentiscus* (P<0,001). Cette différence peut être attribuée à la richesse de *P. lentiscus* en composés phénoliques, et l'implication des groupements hydroxyles OH dans la neutralisation du radical DPPH par transfert d'hydrogènes ou d'électrons (Yi *et al.*, 2008 ; Aksoy *et al.*, 2013 ; Djidel *et al.*, 2013 ; Rajesh Kumar Rawri *et al.*, 2013).

Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec les travaux décrits par Abdelwahed *et al.*, (2007) et Atmani *et al.*, (2009), où tous les extraits *P. lentiscus* ont manifesté des activités scavenging supérieures à (90%).

De même, l'extrait de feuilles de *C. flammula* a montré un effet anti-radicalaire similaire à celui rapporté par Atmani *et al.*, (2009), mais supérieur en comparaison aux résultats obtenus par Molan *et al.* (2012).

D'autre part, l'extrait éthanolique de *Thalictrum minus* L, une plante appartenant à la même famille de *Clematis flammula* a exhibé une faible activité de piégeage de DPPH ($0.15 \pm 0.6 \%$) comparativement à nos résultats.

A une gamme de concentrations de 200 à 1000 mg / ml, l'extrait éthanolique de *Boerhavia erecta* (Nyctaginaceae) a présenté un effet scavenger contre ce radical avec des pourcentages de 22,42 à 59,88% (Govindan et Muthukrishnan, 2013).

D'après les résultats obtenus à 100 $\mu\text{g/ml}$, des dilutions ont été faites comme suit : de 1,25 à 100 $\mu\text{g/ml}$ pour les extraits de feuille et de fruit de *P. lentiscus* ainsi que le Trolox. Alors que pour l'extrait de *C. flammula* les concentrations testées varient entre de 10 à 500 $\mu\text{g/ml}$.

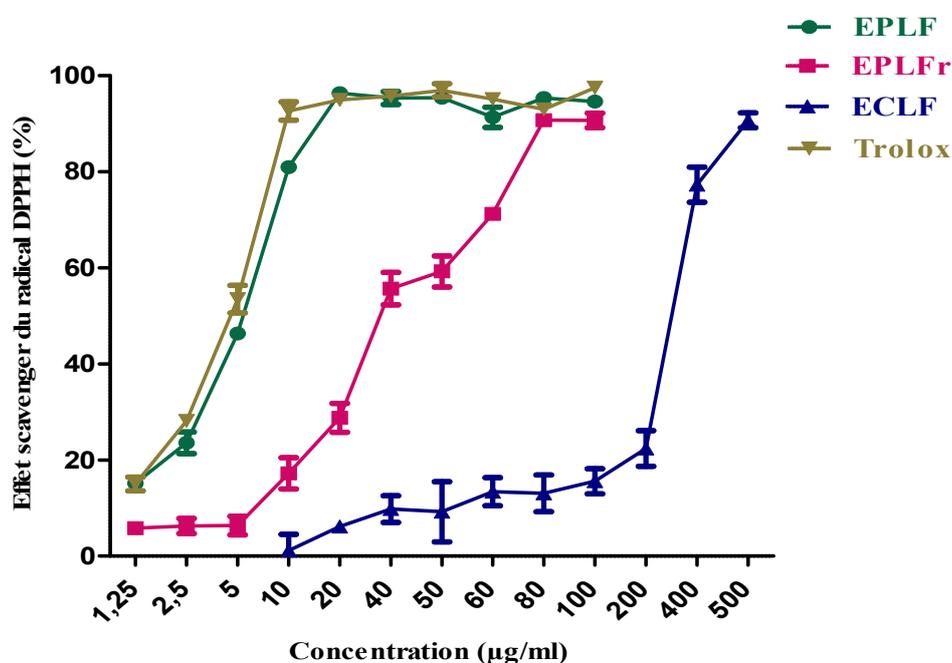


Figure 26 : Effet scavenger du radical DPPH des extraits éthanoliques de feuilles de *P. lentiscus* (EPLF), fruits de *P. lentiscus* (EPLFr) et Trolox ainsi que les feuilles de *C. flammula* (ECLF) à différentes concentrations.

D'après les résultats représentés dans le (Tableau VIII), l' IC_{50} la plus faible qui exprime l'activité scavenging du radical DPPH la plus élevée est celle de l'extrait des feuilles de *P. lentiscus* avec une valeur de $IC_{50}=5,26\mu\text{g/ml}$ proche de celle de Trolox ($IC_{50}=4,61\mu\text{g/ml}$), suivie par l'extrait de fruit de la même plante ($IC_{50}= 38,65$), tandis que *C. flammula* exprime la faible activité anti-radicalaire avec l' IC_{50} la plus élevée (289,40 $\mu\text{g/ml}$).

Les valeurs des IC₅₀ de l'extrait éthanolique des plantes sont illustrées dans le tableau IX.

Tableau IX: Les valeurs des IC₅₀ de l'effet scavenger du radical DPPH.

Extrait	IC ₅₀ (µg/ml)
Extrait éthanolique Feuilles de <i>P.lentiscus</i>	5,26
Extrait éthanolique Fruits de <i>P.lentiscus</i>	38,65
Extrait éthanolique Feuilles <i>C.flammula</i>	298,40
Trolox	4,61

L'étude de **Gardeli et al., (2008)** sur l'extrait méthanolique de *P. lentiscus* à différente mois de récolte a rapporté une bonne activité anti-radicalaire dont IC₅₀ varie entre 5,09 et 11(mg/l).

Cependant l'étude de **Atmani et al., (2009)** sur l'extrait éthanolique de *P. lentiscus* montre que l'activité anti-radicalaire est de (90%), cependant l'extrait éthanolique de *C. flammula* montre une activité inférieure à (50%).

Une autre étude réalisée par **Govindan et Muthukrishnan, (2013)** montre que l'activité scavenging du radical DPPH dépendante de la dose de *B. erecta* (Nyctaginaceae) avec une valeur IC₅₀ de 800 (µg/ml).

D'après ces résultats, on remarque que les extraits (feuilles ou fruits) de *P. lentiscus* ont une bonne activité anti-radicalaire par rapport à l'extrait de *C. flammula*, et nos résultats sont similaires à ceux de **Gardeli et al., (2008)**.

Cette activité anti-radicalaire est due, selon **Sroka et Cisowski, (2003)**, à la présence de trois groupes hydroxyles liés au noyau aromatique en position *ortho* qui semble être le facteur le plus important associé à une forte activité anti-radicalaire et anti-oxydante des composés phénoliques capables de donner un hydrogène (**Bidchol et al., 2011 ; Karpagasundari et Kulothungan, 2014**), ou probablement à la présence d'acide gallique, un composé majoritaire des extraits de *Pistacia lentiscus* (**Abdelwaheb et al., 2007 ; Meheni et al., 2016**) qui montre selon les études de **Abdelwaheb et al., (2007)** et **Popovici et al., (2009)**, une bonne activité anti-radicalaire.

Tableau X : Corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité scavenging du radical DPPH :

Composés phénolique	Coefficient de corrélation (r)		
	<i>P. lentiscus</i> feuilles	<i>P. lentiscus</i> fruits	<i>C. flammula</i> feuilles
Flavonoïdes	0,99	-0,97	0,35
Phénols totaux	- 0,58	0,99	-0,98
Tannins	0,67	0,97	0,99
Proanthocyanidines	-0,15	-0,96	0,40
Anthocyanes	-0,32	0,86	0,93
Flavonolsglycosylés	-0,61	0,75	0,65

D'après les résultats de tableau et les annexes (05, 09, 13), on constate la présence d'une bonne corrélation entre la teneur en flavonoïdes d'extrait de feuille de *P. lentiscus* et l'effet scavenger du radical DPPH ($r= 0,99$), ainsi une corrélation positive moyenne entre la teneur en tannins et l'activité anti-radicalaire avec un coefficient de $r=0,67$.

Cependant, aucune corrélation n'a été observée avec les autres composés. Ces résultats sont expliqués par la présence des groupements OH libre en position C3 du noyau aromatique B des flavonoïdes, ou à la présence des trois groupes hydroxyles liés au noyau aromatique en position *ortho* (Heim *et al.*, 2002 ; Sroka et Cisowski, 2003).

D'autre part l'extrait de fruits de *P. lentiscus* présente une bonne corrélation entre la teneur en phénols totaux, tannins, anthocyanes, flavonols glycosylés et l'effet scavenger du DPPH avec des valeurs qui sont respectivement $r=0,99$; $0,97$; $0,86$ et $0,75$. Une corrélation négative a été enregistrée entre la teneur en flavonoïdes ($r= -0,97$), et proanthocyanidines ($r= -0,96$) de l'extrait ethanologique des fruits de *Pistacia lentiscus* et la même activité.

Pour l'extrait de feuille de *C. flammula*, une très bonne corrélation a été enregistrée entre les teneurs en tannins ainsi que les anthocyanes et l'activité de piégeage de DPPH avec des coefficients de corrélation de $r=0,99$ et $r=0,96$ respectivement. Aussi, qu'il existe une corrélation positive moyenne entre les teneurs en flavonoïdes, proanthocyanidines, flavonols glycosylés et la même activité avec des valeurs de $r=0,35$; $0,40$ et $0,65$ respectivement.

Par contre la teneur en phénol totaux n'a marqué aucune corrélation qui peut être expliquée par la qualité des composés et non par la quantité.

III. 2. 3 EFFET SCAVENGER DE SUPEROXYDE D'HYDROGENE (H₂O₂)

L'activité de piégeage des extraits brut de *P. lentiscus* et *C. flammula*, et l'acide ascorbique à une concentration de 100µg/ml, contre le H₂O₂ est illustrée dans la figure 27

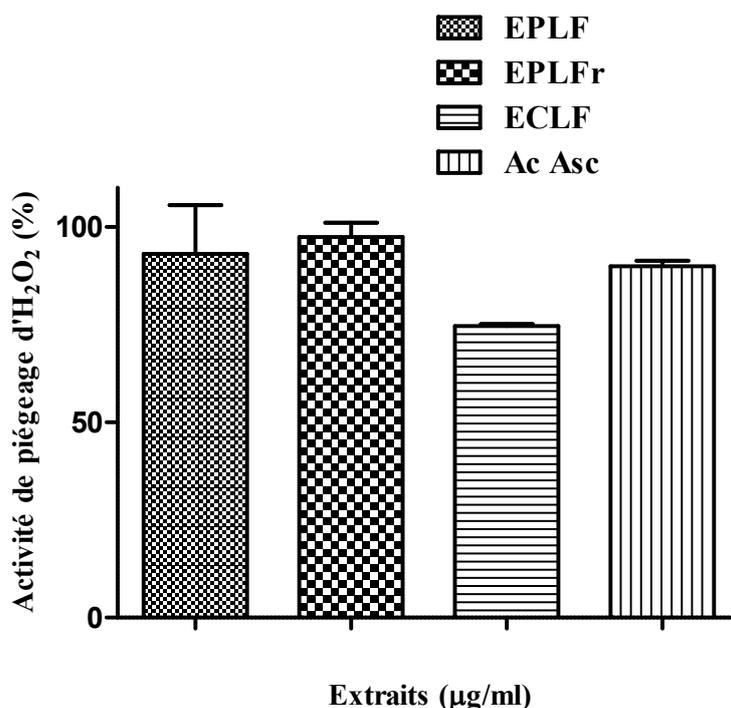


Figure 27 : Effet scavenger de H₂O₂ de l'extrait éthanolique de feuilles de *Pistacia lentiscus* (EPLF), fruits de *Pistacia lentiscus* (EPLFr), feuilles de *Clematis flammula* (ECLF) et l'acide ascorbique (Ac Asc) à une concentration de 100µg/ml.

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec ± l'écartype.

-Les valeurs indiquent que *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

D'après l'analyse statiqtique, aucune déférence significative n'est enregistrée entre les extraites des deux parties de *Pistacia lentiscus* avec l'acide ascorbique (89,89±1,44%). Où l'extrait des fruits de *P. lentiscus* présente l'activité de piégeage de l'H₂O₂ avec une valeur de 97,39±3,62%, et celui des feuilles est de 93,04±12,51. Cette bonne activité est probablement due à la richesse de ces extraits en composés phénolique capables de donner des électrons à l'H₂O₂ se qui le neutralise en H₂O (Bhatti *et al.*, 2015).

Une études réalisée par **Keser et al., (2012)** sur l'activité scavenging d' H_2O_2 des extraits éthanoliques des différentes parties de *Crataegus monogyna*, à une concentration de $100\mu g$, a révélé une différence entre les effets exhibés par les feuilles, fruits et les fleurs avec un pourcentage de scavenging de H_2O_2 de 30,13%, 15,57% et 27,13% respectivement.

D'autre part, une faible activité est exhibée par l'extrait des feuilles de *C. flammula* avec $74,65\pm 0,34\%$, marquant ainsi une différence significative avec les extrait de *P. lentiscus* et le standard ($P < 0,05$)

Les résultats obtenus par **Atmani et ces collabrateurs, (2009)** pour les extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* et *Clematis flammula* qui sont respectivement de 51% et 19%, sont faible par rapport à nos résultats.

Les extraits ainsi que le standard ont été testés sur une gamme de concentrations précise allant de $0,3125$, jusqu'au $200\mu g/ml$, dans le but d'exprimer les résultats en termes d' IC_{50}

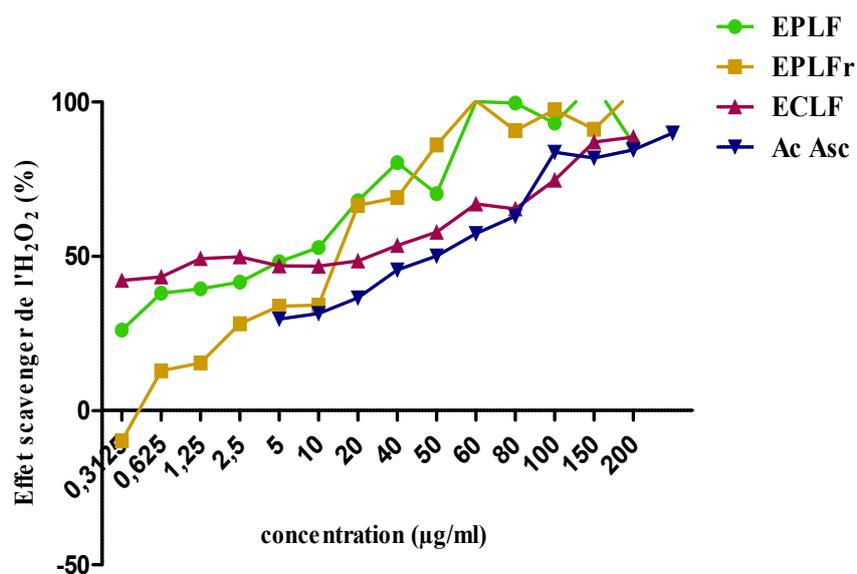


Figure 28 : Effet scavenger de l' H_2O_2 des extraits éthanoliques des feuilles de *P. lentiscus*(EPLF), fruits de *P. lentiscus* (EPLFr), feuilles de *C. flammula* (ECLF) et de standard (Acide ascorbique) à différentes concentrations.

On remarque selon la figure ci-dessus, une activité dose dépendante des extraits. En effet, une augmentation de l'activité anti-radicalaire a été notée en augmentation des concentrations des extraits testés et la molécule de référence pour atteindre des pourcentages proches de 100% à la plus grande concentration appliquée ($200\mu g/ml$), cette activité est probablement due à l'effet synergique entre les composés responsables de cet effet.

Tableau XI : IC₅₀ de l'activité de scavenging de l'H₂O₂

Extrait	IC ₅₀ (µg/ml)
Extrait éthanolique Feuilles de <i>P.lentiscus</i>	8,3
Extrait éthanolique Fruits de <i>P.lentiscus</i>	14,30
Extrait éthanolique Feuilles <i>C.flammula</i>	23,51
Acide ascorbique	38,85

D'après la (Figure 28) et le (Tableau XI), l'extrait qui a donné l'IC₅₀ la plus faible c'est-à-dire l'activité scavenging de H₂O₂ la plus importante est celui de feuilles de *P. lentiscus* avec une valeur de 8.3µg/ml, suivie par l'extrait de fruits de *P. lentiscus* (14,30µg/ml). La faible activité est obtenue par l'extrait des feuilles de *C. flammula* avec une IC₅₀=23,51 µg/ml. L'ensemble des valeurs d'IC₅₀ obtenues sont inférieures à celle de l'acide ascorbique (38,85 µg/ml) signalant de ce fait une bonne activité anti-H₂O₂ des extraits de nos plantes.

Nos résultats marquent un effet très prononcé de l'activité anti-H₂O₂ par rapport aux IC₅₀ calculées par **Lui et al., (2013)** pour l'extrait éthanolique de *Agaricus bisporus* (0,65mg/ml) et la vitamine C (0,16 mg/ml). **Bhatti et al., (2015)** ont rapporté que les extraits méthanolique de *Ranunculus arvensis* et *Gymnema sylvestre* de famille (Ranunculaceae) expriment des IC₅₀ de 65,73µg/ml et 72,55µg/ml respectivement.

D'autre part, nos résultats sont en concordances avec ceux de **Yi et al., (2008)** où ils ont rapporté une IC₅₀ de 11,8µg/ml de l'extrait *Pericarpium Citri* (Reticulatae) qui est supérieur à l'activité de acide ascorbique (IC₅₀ =16,4 µg/ml).

Tableau XII : Coefficient de corrélation entre l'activité de piégeage de l' H_2O_2 et le teneur en composés phénoliques.

Composés phénoliques	Coefficient de corrélation (r)		
	<i>P. lentiscus</i> feuille	<i>P. lentiscus</i> fruit	<i>C. flammula</i> feuille
Flavonoïdes	-0,02	0,92	0,90
Phénols totaux	0,75	-0,97	-0,81
Tannins	0,79	-0,99	0,75
Proanthocyanidines	-0,99	0,91	0,92
Anthocyanes	-0,97	-0,93	0,91
Flavonolsglycosylés	-0,84	-0,63	-0,05

D'après notre étude, une corrélation positive moyenne a été notée entre la teneur en phénols totaux ($r=0,75$), tannins ($r=0,79$) de l'extrait de feuille de *P. lentiscus* et l'activité scavenging du radical H_2O_2 , mais aucune corrélation n'existe avec les autres composés, cela est probablement dû à la structure chimique de ces composés qui n'est pas adéquate pour piéger le radical H_2O_2 .

Concernant les extraits de fruits de *P. lentiscus* une très bonne corrélation a été observée entre la teneur en flavonoïdes ($r=0,92$), proanthocyanidines ($r=0,91$) et l'effet scavenger contre le radical H_2O_2 , alors que d'autres composés n'ont marqué aucune corrélation.

Par ailleurs l'extrait de feuille de *C. flammula* a enregistré une très bonne corrélation entre la teneur en flavonoïdes, proanthocyanidines, anthocyanes et l'activité de piégeage de H_2O_2 avec des coefficients de corrélation qui sont respectivement 0,90 ; 0,92 et 0,91, et une corrélation de ($r=0,75$) entre la teneur en tannins et la même activité. Par contre aucune corrélation n'a été obtenue avec le reste des composés dosés dans cet extrait.

Les résultats de la corrélation entre les différentes classes des composés phénoliques des extraits de plantes testées avec l'activité de piégeage de H_2O_2 suggèrent que ces composés phénoliques avec leur propriété de donner des électrons est la clé de l'effet scavenger des extraits testés (Zhang *et al.*, 2011)

III. 2. 4 ACTIVITÉ CHÉLATRICE DU FER DES EXTRAITS ÉTHANOLIQUE DE *PISTACIA LENTISCUS* ET *CLEMATIS FLAMMULA*

La capacité chélatrice du fer des extraits des plantes est déterminée selon la méthode de Sharma *et al.*, (2012).

La méthode est basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferozine après le traitement des échantillons avec les ions Fe^{2+} (Adjimani et Asare, 2015). De ce fait, les antioxydants entre en compétition avec la ferozine pour capter le fer diminuant de ce fait de la coloration de milieu réactionnel qui permet de suivre l'effet chélateur des antioxydants testés (Saravanam *et al.*, 2014).

L'activité chélatrice du fer des extraits de *P.lentiscus* et *C.flammula* a été évaluée à une concentration de 100 μ g/ml mais aucun effet chélateur n'a été enregistré sauf pour la molécule de référence EDTA. C'est pour cela des concentrations supérieures ont été testées pour tous les extraits allant de [100 -6000] μ g/ml et des concentrations inférieures à 100 μ g/ml ont été appliquées pour EDTA (Figure 29).

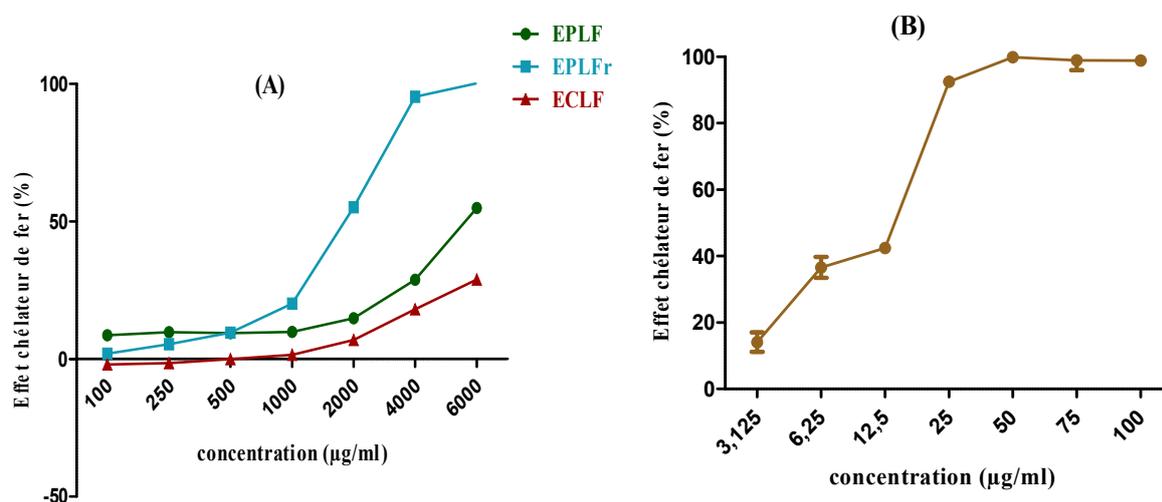


Figure 29: Effet chélateur du fer ferreux des extraits éthanoliques des feuilles de *P.lentiscus*(EPLF), fruits de *P.lentiscus* (EPLFr), feuilles de *C.flammula* (ECLF) à différentes concentrations (A); et de standard EDTA à différentes concentrations (B).

Les résultats obtenus de l'activité chélatrice du fer des extraits testés en fonction de concentrations montrent une activité dose dépendante, en effet, une activité chélatrice du fer proche de 100% a été enregistrée à partir de 25µ/ml de EDTA avec une IC₅₀ de 12,71 µg/ml (Tableau XIII), ce standard est rapporté par différentes études comme étant un puissant chélateur du fer grâce à sa structure de fait qu'il est un ligand hexadenté (il peut former quatre ou six liaisons avec un ion métallique) se qui lui permet de former un complexe de coordination (**Flora et al., 2010**)

Une forte activité chélatrice du fer de 100% à été exhibée par l'extrait de fruit de *Pistacia lentiscus* à 6000µg/ml, alors qu'il est de 54,81% et 28,89% pour les extraits de feuille de *Pistacia lentiscus* et *Clematis flammula* respectivement, et qui tend à augmenter avec l'augmentation des concentrations des extraits.

Exprimant de ce fait un classement d' IC₅₀, la plus faible IC₅₀ est enregistrée par l'extrait de fruits de *P. lentiscus* avec une valeur de 1861,86 µg/ml traduisant l'effet chélateur du fer le plus prononcé par rapport aux autres extraits, à savoir l'extrait feuilles de *P. lentiscus* (IC₅₀= 5687,68 µg/ml) et l'extrait brut des feuilles de *C. flammula* (IC₅₀ =7720 µg/ml) (tableau XIII).

Une étude menée par **Pervin et ses collaborateurs, (2013)** sur l'extrait éthanolique des feuilles de *Vaccinium corymbosum* a rapporté un effet chélateur de 41,46% à une concentration de 2 mg/ml. Cet effet est inférieur à celui noté par les fruits de *Pistacia lentiscus* (55,10 % à 2mg/ml) mais supérieur aux autres effets des extraits de feuilles des deux plantes testées.

Toutefois, nos résultats sont en concordance avec une étude faite par **Rubo et al., (2012)** sur l'extrait éthanolique des fleurs de *Lavandula angustifolia*. Où une activité chélatrice du fer de 36,81 et 97,95 % à des concentrations de 2,5 et 20 mg/ml respectivement a été notée avec une valeur d'IC₅₀ de 54 ,46 mg/ml, faible à celle de la molécule de référence testée, l'acide gallique (3,36 mg/ml) (**Rubo et al., 2012**).

Tableau XIII: IC₅₀ de l'activité chélatrice du fer des extraits de plantes et EDTA.

Extrait	IC ₅₀ (µg/ml)
Extrait éthanolique Feuilles de <i>P.lentiscus</i>	5687,68
Extrait éthanolique Fruits de <i>P.lentiscus</i>	1861,86
Extrait éthanolique Feuilles <i>C.flammula</i>	7720
EDTA	12,71

Le résultat obtenu dans notre étude pourrait être expliqué par l'effet synergique qui existe entre les différents composés bioactives des extraits qui sont responsables de cet effet chélateur des ions grâce à leurs structures chimiques.

Pistacia lentiscus et *Clematis flammula* sont connues pour leurs richesses en composées phénoliques (flavonoïdes, phénols totaux, tannins...), ces derniers sont dotés de très bonnes activité antioxydante (Atmani *et al.*, 2009 ; Remila *et al.*, 2015).

Plusieurs recherches réalisées sur la relation activité structure ont rapporté que l'activité de chélation des ions métalliques est aussi attribuée à quelques acides phénoliques (Capecka *et al.*, 2005) et flavonoïdes (Le *et al.*, 2007). En effet, une étude faite par Verdan et ses collaborateurs, (2011) a révélé que les effets antioxydants des flavonoles à savoir, quercétine, myricétine et morine sont dus en partie à leurs capacités de fixer différents métaux (Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ et Zn²⁺) à plusieurs sites. Il a été rapporté par ces auteurs que la quercétine et myricétine forment des complexes avec le Fe²⁺ via les groupements hydroxyle des trois cycles: les groupes hydroxyles du cycle B ainsi que les groupes 3-hydroxy-4-céto et 5-hydroxy-4-céto des cycles A et C. Les deux groupes 3- hydroxy et 5-hydroxy rentrent en compétition pour la fixation du métal (Verdan *et al.*, 2011).

D'autres part, Schinella *et al.*, (2010), ont rapporté que l'activité chélatrice des ions du fer est dépendante du nombre de groupes hydroxyles en position *ortho* sur le cycle benzénique. Ray *et al.*, (2013) ont confirmé par leur étude que les composés ayant une structure contenant des groupements OH, CO, S et O favorisent la transition des métaux, augmentant ainsi l'activité chélatrice.

Tableau XIV: Corrélation entre l'activité chélatrice et la teneur en composés phénoliques des extraits de *Pistacia lentiscus* et *Clematis flammula*.

Composés phénoliques	Coefficient de corrélation (r)		
	<i>P. lentiscus</i> feuilles	<i>P. lentiscus</i> fruits	<i>C. flammula</i> feuilles
Flavonoïdes	0,19	-0,95	0,69
Phénols totaux	-0,85	0,99	0,29
Tannins	-0,67	0,98	-0,37
Proanthocyanidines	0,97	-0,95	0,65
Anthocyanes	0,91	0,89	-0,08
Flavonols glycosylés	0,73	0,71	-0,96

Cette étude montre une très bonne corrélation entre l'activité chélatrice et les teneurs en phénols totaux, tannins, anthocyanines et flavonols glycosylés de l'extrait des fruits de *P. lentiscus* avec des coefficients de corrélations $r=0,99$, $0,98$, $0,89$; $0,71$, respectivement, tandis que l'extrait des feuilles de la même plante à présenter une bonne corrélation avec les teneurs en proanthocyanidines ($r=0,97$), anthocyanes ($r=0,91$) et flavonols glycosylés ($r=0,73$).

Par ailleurs, une faible corrélation est obtenu entre la teneur des flavonoides et l'extrait des feuille de *P. lentiscus* ($r=0,19$) et la teneur en phénols totaux et l'extrait de feuille de *C. flammula* ($r=0,29$). Une corrélation négatif est enregistré entre les teneurs en phénols totaux, tannins et les extraits de feuille de *P. lentiscus* et la teneur en proanthocyanidines et flavnoides de l'extrait de ces fruits, de même pour l'extrait de *C. flammula* avec ces teneur en tannins, anthocyanes et flavonols glycosylés (Tableau XIV).

Cependant l'extrait brut des feuilles de *C. flammula* a montré une corrélation positive moyenne avec ces teneurs en flavonoïdes et proahthocyanidines ($r= 0,69$) ($r= 0,65$) respectivement.

Cela peut être expliqué soit par la qualité de ces différents composés présents dans les extraits qui n'ont pas une structure chimique appropriée pour la chélation du fer où par la présence d'autres composés dans la plante qui empêchent leur interaction avec le fer (la glucosylation des groupements OH).

Une corrélation positive ($r= 0,99$) similaire à celle notée dans cette étude, est exhibée entre la teneur en composés phénoliques totaux et l'activité anti-oxydante incluant la chélation du fer de l'extrait éthanolique de *Boerhavia erecta* (Govindan et Muthukrishnan, 2013)

Sowndhararajan et Kang, (2013) ont trouvé une bonne corrélation entre le pouvoir chélateur des extraits de feuilles de *Bauhinia vahlii* et leur teneur en phénols totaux et en flavonoïdes avec des coefficients de corrélation de 0,75 et 0,87 respectivement.

III. 3 RESULTATS DE LA CARACTERISATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM)

La chromatographie sur couches minces (CCM) est réalisée dans le but de caractériser les composés présents dans les extraits éthanoliques de *P. lentiscus* et *C. flammula* qui sont peut être responsables des différentes activités réalisées précédemment.

Dans cette optique, un système d'élution est utilisé pour la séparation des composés phénoliques des extraits éthanolique des deux plantes. Il est constitué d'acétate d'éthyle, acide acétique, acide formique et l'eau avec des rapports de 100 : 11 :11 :26

Les différentes taches obtenu sur les chromatogrammes on été comparées selon la couleur et/ou du rapport frontal (R_f) avec les molécules de référence utilisées (tableau XV).

Tableau XV: Les rapports frontaux des différents extraits et standard utilisés dans la CCM

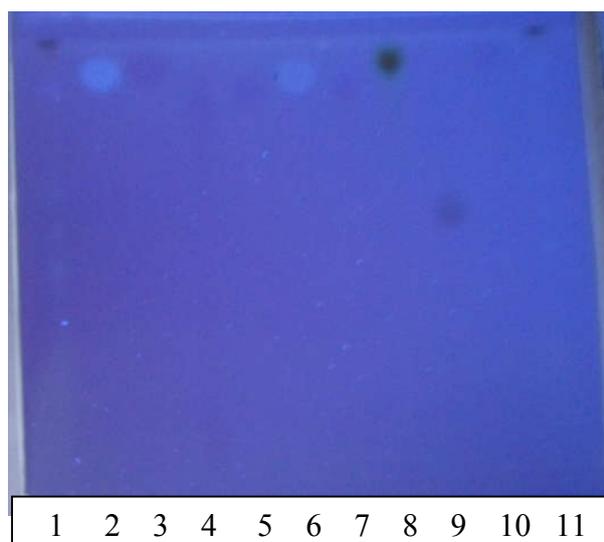
	Extrait de feuilles de <i>P. lentiscus</i>	Extrait de fruits de <i>P.</i> <i>lentiscus</i>	Extrait de feuilles de <i>C. flammula</i>
Fractions	Rf	Rf	Rf
F1	0,57	0,10	0,35
F2	0,67	0,31	0,67
F3	0,85	0,50	1
F4		0,59	
F5		0,63	
F6		0,83	
F7		1	
Standards			
Ac. Ferulique		0,92	
Ac. Coumarique		0,95	
Ac. Tannique		0,88	
Ac. Gallique		0,85	
Ac. Caféique		0,90	
Catéchine		0,89	
Quercétine		0,93	
Rutine		0,54	
Pyrocatechol		0,94	

III. 3. 1 CCM DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE FEUILLE DE *C. FLAMMULA*

(A)



(B)



(C)

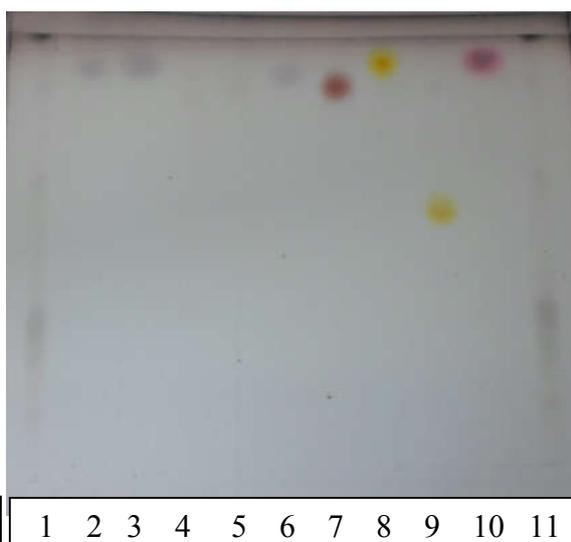


Figure 30 : chromatogramme de l'extrait éthanolique des feuilles de *C. flammula* (1) et (11), acide ferulique (2), acide coumarique (3), acide tanique (4), acide gallique (5), acide caféique (6), catéchine (7), quercétine (8), rutine (9), pyrocatechol (10) (A) : à la lumière de jour. (B) : observation sous une lampe UV. (C) : révélation par la vanilline sulfurique

D'après la (Figure 30), on remarque que l'observation à l'UV et la vanilline sulfurique ont mis en évidence de nombreuses taches qui sont invisibles à l'œil nu.

Sous l'UV à 365nm, deux spots fluorescents de couleur bleue et un spot de couleur vert sont observés qui peuvent correspondre au acides phénoliques et coumarine respectivement (Benhammou *et al.*, 2008 ; N'gaman Kohué *et al.*, 2009).

D'après la figure 28, la tache verte (F3) s'intensifie en faveur de la présence des coumarines ($R_f=1$) et les deux taches (F1 : $R_f = 0,35$ et F2 : $R_f = 0,67$) sont devenues vert-grises dont la F2 a un R_f proche à celui de la rutine ($R_f= 0,63$).

III. 3. 2 CCM DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE FEUILLE DE *P. LENTISCUS*

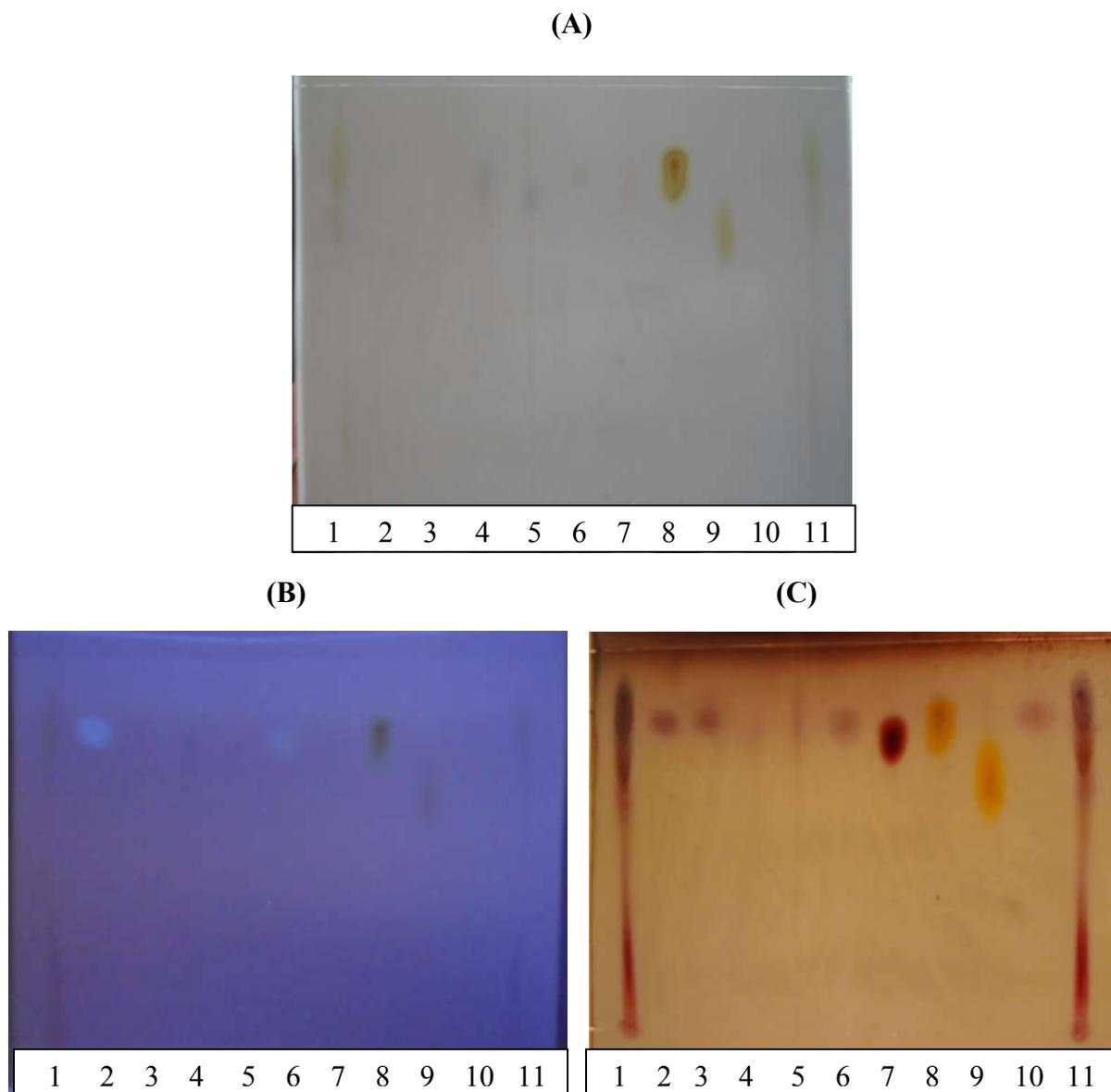


Figure 31: chromatogramme de l'extrait éthanolique des feuilles de *P. lentiscus* (1) et (11), acide ferulique (2), acide coumarique (3), acide tanique (4), acide gallique (5), acide caféique (6), catéchine (7), quercétine (8), rutine (9), pyrocatechol (10) (A) : à la lumière de jour. (B) : observation sous une lampe UV. (C) : révélation par la vanilline sulfurique

A l'œil nu, un sillon de coloration jaune a été obtenu tout au long du trajet de migration des deux dépôts des extraits qui est due probablement à la présence de flavonoïdes. Sous lampe UV le sillon est devenue de couleur jaune-vert suggérant la présence de flavonols selon N'gaman Kohué *et al.*, (2009).

Cependant, la révélation par la vanilline sulfurique a permis d'obtenir trois taches (F1, F2, F3) et une quatrième tache qui n'a pas migré, de couleur rouge semblable à celle de catéchine, cela pourrait être expliqué par la condensation et la concentration des composés de haut poids moléculaires non séparés par ce système. Selon **Glavnik et ses collaborateurs, (2009)** une coloration rouge est obtenue suite à la réaction de la vanilline avec (+)-catéchine et (-)-epicatéchine), encore une fois cela témoignerait de la richesse de cet extrait en tannins condensés.

La fraction F1 avec un Rf de 0,57 apparaît sous une couleur marron qui est probablement un gallotannin selon **Meller-Harvey, (2001)**. La fraction F2 (Rf=0,67) est de couleur grise similaire à celle exhibée par l'acide caféique suggérant la présence de ce dernier dans l'extrait. Une dernière fraction F3 (Rf=0,85) a une couleur vert-gris dont le Rf est proche à celui de l'acide gallique (Rf=0,83). Ce composé a déjà été détecté par **Topçu et al., (2007)** et par **Remila et al., (2015)** et **Mehenni et al., (2016)** au niveau des feuilles de *P. lentiscus*.

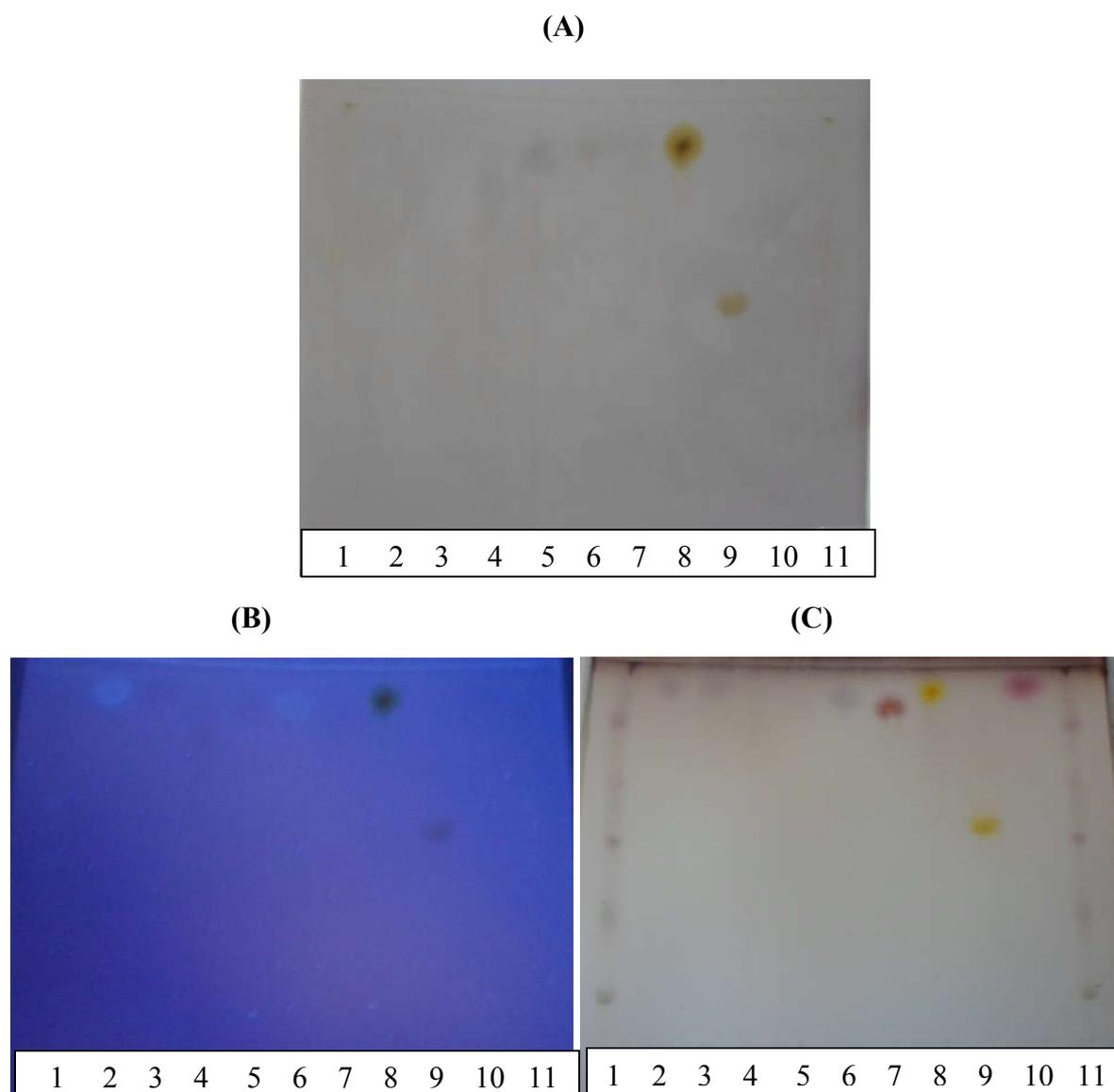
III. 3. 3 CCM DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE FRUIT DE *P. LENTISCUS*

Figure 32: Chromatogramme de l'extrait éthanolique des fruits de *P. lentiscus* (1) et (11), acide ferulique (2), acide coumarique (3), acide tanique (4), acide gallique (5), acide caféique (6), catéchine (7), quercétine (8), rutine (9), pyrocatechol (10) (A) : à la lumière de jour. (B) : observation sous une lampe UV. (C) : révélation par la vanilline sulfurique

A la lumière de jour, une tache jaunâtre est visualisée et sous lampe UV deux fluorescences bleues sont observées qui correspondent selon **Dohou *et al.*, (2003)** aux flavonoïdes.

La révélation par la vanilline sulfurique a permis de caractériser sept fractions avec une tache de couleur vert-gris qui n'a pas migré. Les fractions F1 ($R_f = 0,10$) et F2 ($R_f = 0,31$) ont notées la même coloration que celle du dépôt (vert-gris). Les deux autres fractions (F4, F5) apparaissent sous une couleur grise-clair avec des rapports frontaux de 0,59 et 0,63 respectivement

Par ailleurs, la fraction F3 ($R_f = 0,50$) a une coloration mauve qui correspondrait selon **Dohou, (2003)** au anthocyane. La fraction F6 ($R_f = 0,83$) est de couleur rose-violette suggérant la présence de flavan-3-ol ou la nature tri-terpénique de saponoside (**Dohou et al., 2003; Mueller-Harvey, 2001**). Une tache violette foncée (F7) a été visualisée ($R_f = 1$), ce spot est probablement un acide ellagique d'après **Mueller-Harvey, (2001)**.

Au terme de cette partie de la caractérisation par CCM des extraits éthanoliques des deux plantes *Pistacia lentiscus* et *Clematis flammula*, on peut conclure que le système d'éluion a mis en évidence un nombre de spots qui correspondraient selon la littérature, à des terpènes, à des flavonoïdes, acide gallique, à la catéchine...etc. Cela renforce les résultats de dosages quantitatifs obtenus, en témoignant la richesse et de la diversité des composés des extraits qui sont peut-être à l'origine du potentiel antioxydant noté au cours de cette étude.

CONCLUSION

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les plantes médicinales et aromatiques sont la source de la majorité des antioxydants naturels, elles restent encore peu exploitées dans le domaine médical.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressées à l'étude des extraits éthanoliques de deux plantes locales, il s'agit de feuilles et fruits de *Pistacia lentiscus* et les feuilles de *Clematis flammula* qui ont fait l'objet d'une étude préliminaire à savoir le dosage des composés phénoliques, l'évaluation de leur activité anti-radicalaire, activité chélatrice du fer, leur pouvoir réducteur, ainsi que la caractérisation qualitative par chromatographie sur couche mince.

L'analyse quantitative des différents composés a prouvé la richesse de l'extrait de feuilles de *Pistacia lentiscus* en composés phénoliques, en comparaison avec l'extrait de fruit de la même plante et de feuilles de *Clematis flammula*, avec des taux élevés en flavonols glycosylés (823,563± 3,28 mg équivalent la cyanidine-3- glucoside/ 100g d'extrait), phénols totaux (292,67±7,29 mg équivalent Cat/ g d'extrait), tannins (99,33±7,89 mg équivalent AT/g d'extrait), proanthocyanidines (73,70±4,10 mg équivalent Cat/g d'extrait), les anthocyanes (22,56±1,18 mg équivalent C3G/100g d'extrait) et les flavonoïdes avec 20,14±1,04mg équivalent Q/g d'extrait. Par ailleurs, l'extrait de feuilles de *Clematis flammula* a noté les teneurs les plus élevées en anthocyanes avec 27,13±2,24 mg équivalent C3G/100g d'extrait.

À partir des résultats obtenus concernant l'évaluation des activités antioxydantes, on a constaté que :

- L'étude de l'activité anti-radicalaire des deux plantes, a montré que les extraits de *P. lentiscus* (feuilles et fruits) ont présenté les pourcentages les plus élevés (90,69±1,52 - 94,64±0,18) % pour l'effet scavenger contre le DPPH et (93,04±12,51 - 97,39±3,6%) contre le H₂O₂.
- L'étude de l'activité antioxydante par le test FRAP a indiqué que les feuilles de *P. lentiscus* ont exhibé les meilleures activités réductrices en comparaison aux fruits de la même plante et les feuilles de *C. flammula* avec une valeur de 491,72±15,48 mmol équivalent Ac. Ascorbique/g d'extrait.
- L'activité chélatrice du fer révèle que l'IC₅₀ la plus faible a été enregistrée par les fruits de *P. lentiscus* qui ont exprimé l'effet chélateur le plus important (IC₅₀= 1861,86 µg/ml).
- Des corrélations positives ont été enregistrées entre la teneur en différents composés et les activités antioxydantes étudiées.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

- Ces résultats quantitatifs ont été confirmés par les résultats de l'analyse qualitative par chromatographie sur couche mince où différents composés ont été révélés présents dans les extraits bruts des deux plantes.

L'ensemble des résultats obtenus, au fil de cette étude, n'est qu'une étape préliminaire, Alors il est souhaitable d'accomplir et d'enrichir ce travail par :

- ❖ L'évaluation des activités antioxydantes des fractions chromatographiques issues des extraits étudiés,
- ❖ L'évaluation des activités biologiques des différents extraits *in vivo*,
- ❖ L'étude d'autres parties des plantes étudiées à savoir les racines par exemple.
- ❖ Dosage d'autres composés bioactifs comme les caroténoïdes, et caractérisation des composés responsables de l'activité antioxydante par les différentes méthodes telles que la HPLC, RMN, SM...etc.
- ❖ L'étude de la toxicité de ces deux plantes afin de déterminer le seuil toxique et l'intervalle thérapeutique.

REFERENCES

REFERENCES



- Abdeldjelil, M. C., Bensegueni, A., Messaï, A., Agabou, A. et Benazzouz, H. (2014).** Medicinal use of *Pistacialentiscus* fixed oil in Constantine province, north-east Algeria. *Journal National Product. Plant Resources*, 4 (1):48-51.
- Abdelwahed, A., Bouhleb, I., Skandrani, I., Valenti, K., Kadri, M., Guiraud, P., Steiman, R., Mariotte, A-M., Ghedira, K., et al., (2007).** Study of antimutagenic and antioxidant activities of Gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacialentiscus* Confirmation by microarray expression profiling. *Chemico-Biological Interactions*, 165: 1-13.
- Adjimani, J. P. et Asare, P. (2015).** Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. *Toxicology Reports*, 2: 721–728.
- Ae-Ra, M., Jeong-Eun, H., Byoung-Yoon, L., Jeong-Mi, P. et Chang-gee, J. (2013).** An unrecorded species of genus *Clematis* (Ranunculaceae) from Korea, *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*, 6(4): 415-418.
- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., Lomri, A. (2007).** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydesdismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. Reactiveoxygenspecies and superoxidedismutases:role in joint diseases, *Revue du Rhumatisme*, 74: 636–643.
- Aksoy, L., Kolay, I., Ağlönü, Y., Aslan, Z. et Kargioğlu, M. (2013).** Free radical scavenging activity, total phenolic content, total antioxidant status, and total oxidant status of endemic *Thermopsis turcica*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20: 235-239.
- Al-Mamary, M., Al-Habori, M. et Al-Zubairi, A. S. (2014).** The in vitro antioxidant activity of different types of palm dates (*Phoenix dactylifera*) syrups. *Arabian Journal of Chemistry*, 7 : 964–971.
- AL-Saghir, M. G. et Porter, D. M. (2012).** Taxonomic revision of the genus *Pistacia* L. (Anacardiaceae). *American Journal of Plant Sciences*, 3:12-32.
- Ansari, N.S.H et Siddiqui, A.N. (2012).** *Pistacia Lentiscus*: a review on phytochemistry and pharmacological properties. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4 (4):16-20.
- Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S. et Khebri, S. (2010).** Activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Science Journal*, 11(1) : 69-81.
- Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N. et Atmani, D. (2009).** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food chemistry*, 112: 303-309.
- Atmani, D., Ruiz-Larrea, M., Ruiz-Sanz, J., Lizcano, J., Bakkali, F. et Atmani, D. (2011).** Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(4): 589-598.

B

Ba, K., Tine, E., Destain, J., Cissé, N. et Thonart, P. (2010). Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 14(1) : 131-139

Balakrishnan, K., Ramaswamy, P., Sambandam, S., Thangavel, G., Ghosh, S., Johnson, P., Mukhopadhyay, K., Venugopal, V. et Thanasekaraan, V. (2011). Air pollution from household solid fuel combustion in India: an overview of exposure and health related information to inform health research priorities. *Global Health Action*, 4(5638): 4-9.

Bammou, M., Daoudi, A., Slimani, I., Najem, M., Bouiamrine, E.H., Ibijbijen, J. et Nassiri, L. (2015). Valorisation du lentisque «*Pistacia lentiscus L.*»: Étude ethnobotanique, screening phytochimique et pouvoir antibactérien. *Journal of Applied Biosciences*, 86 : 7966-7975.

Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabbas, P. et Angion A. (2007). Characterization of the volatile constituents in the essential oil of *Pistacia lentiscus L.* from different origins and its antifungal and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 7093–7098.

Bartosz, G. et Tirzitis, G. (2010). Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Biochimica Polonica*, 57 (1): 139–142.

Bellomo, M.G. et Fallico, B. (2007). Anthocyanins, chlorophylls and xanthophylls in pistachio nuts (*Pistacia vera*) of different geographic origin. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 352–359.

Benhammou, N., Atik Bekkara, F. et Kadifkova Panovska, T., (2007). Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus L.* and *Pistacia atlantica Desf.* *Advances in Food Sciences*, 29(3) : 115-161.

Benhammou, N., Atik Bekkara, F. et Kadifkova Panovska, T. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(2) : 22-28.

Benites, RSR., Formagio, ASN., Argandoña, EJS., Volobuff, CRF., Trevizan, LNF., Vieira, MC. et Silva, MS. (2015). Contents of constituents and antioxidant activity of seed and pulp extracts of *Annonacoriacea* and *Annona sylvatica*. *Brazil Journal Biology*, 75(3) : 685-691.

Berboucha, M., Ayouni, K., Atmani, D., Atmani, D. et Benboubetra, M. (2010). Kinetic Study on the Inhibition of Xanthine Oxidase by Extracts from Two Selected Algerian Plants Traditionally Used for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Journal of medicinal food*, 13(4):1-9.

Bhatti, M. Z., Ali, A., Ahmad, A., Saeed, A. et Malik, S. A. (2015). Antioxidant and phytochemical analysis of *Ranunculus arvensis L.* extracts. *BMC Research Notes*, 8(279):6-8.

Bidchol, A.M., Wilfred, A., Abhijna, P. et Harish, R. (2011). Free Radical Scavenging Activity of Aqueous and Ethanolic Extract of *Brassica oleracea* L. var. *italic*. *Food Bioprocess Technol*, 4 : 1137-1143.

Boizot, N., et Charpentier, J-P.(2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier.*Le Cahier des Techniques de l'Inra*, 79-82.

Boukeloua, A., Belkhiri, A., Djerrou, Z., Bahri, L., Boulebda, N. et Hamdi, Pacha Y. (2012). Acute Toxicity of *Opuntia ficus indica* and *Pistacia lentiscus* seed oils in mice. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*, 9(4):607-611.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. *Technique et documentation*, 1120.

Budic-Leto, T. et Lovric, J. (2002). Food technol and biotechnol. 40(3) : 221-225.

Buzzini, P. et Pieroni, A. (2003). Antimicrobial activity of extracts of *Clematis vitalba* toward pathogenic yeast and yeast-like microorganisms. *Fitoterapia*, 74 : 397–400.

C

Capasso, F., Gaginella, S. T., Grandolini, G., Izzo, A. A. (2012). *Phytotherapy : a quick reference to herbal medicine*. Berlin Heidelberg: Springer. p 7-8

Capecka, E. et Mareczek. A. (2005). Dry herbs of some Lamiaceae species. *Food chemistry*, 93 : 223-226.

Charles M., Benbrook Ph.D.(2005). Accroître la teneur en antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. *The Organic Center*. p8

Chawla, R., Kumar, S. et Sharma, A. (2012). The genus *Clematis* (Ranunculaceae): Chemical and pharmacological perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*, 143 : 116–150

Chorfi, A., Ziriati, A., Aberkan, K., Dahel, R., Bagot, A. et Bray, L.(2005). *Guide illustré de la flore algérienne*. wilaya d'Alger et mairie de Paris. p37.

Conway, P. (2010). *The consultation in phytotherapy: the herbal practitioner's approach to the patient*. British library: Churchill livingstone Elsevier. p 5-6.

D

Defraigne, J.O. et Pincemail, J. (2007). Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Revue Médicale de Liege*, 62 : 1-9.

Djacbou, D. S., Anatole, P.C., Cabral, B.P. et Penlap Beng V. (2014). Comparison of in vitro antioxidant properties of extracts from three plants used for medical purpose in Cameroon: *Acalypha racemosa*, *Garcinia lucida* and *Hymenocardia lyrata*. *Asian Pac Journal Trop Biomedecin*, 4(2): 745-752.

Djenane, D., Yangüela, J., Montañés, L., Djerbal, M. et Roncalés, P. (2010). Antimicrobial activity of *Pistacialentiscus* and *Saturejamontana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control*, (22):1046 -1053.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P. et Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97: 654–660.

Djidel, S., Khennouf, S., Ameni, D., Baghiani, A., Arrar, L. et Charef, N. (2013). Antioxidant properties of *Pistacialentiscus* L. leaves extracts. *Pharmacognosy Communications*, 3(2) : 28-34.

Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi, H. L.M., Badoc, A. et Gmira, N. (2003). Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelaealythroïdes*. *Société de Pharmacie de Bordeaux*, 142 : 61-78.

Dudonné, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M. et Merillon, J.M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:1768–1774.

F

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

Favier, A. (2006). Stress oxydant et pathologie humaines. *Annales pharmaceutiques françaises*, 64 :390-396.

Flora, S. J. S. et Pachauri, V. (2010). Chelation in Metal Intoxication. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7: 2745-2788.

G

Ganjewala, D., Boba, S. et Raghavendra, A.S. (2008). Sodium nitroprusside affects the level of anthocyanin and flavonols glycosides in pea (*Pisum Sativum* L. cv. Arkel) leaves. *Acta Biologica Szeged.hu/ABS*, 52(2): 301-305.

Gardeli, C., Papageorgiou, V., Mallouchos, A., Theodosis, K. et Komaitis, M. (2008). Essential oil composition of *Pistacialentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*. 107: 1120–1130.

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.

Geiser, R. (2010). Radicaux, stress oxydatif et valeurs ORAC. *D-inside*, 1-4.

Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 3: 162-169.

Goudable, J., et Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique Métabol*, 11 :115-120.

Goussard, J-P. (1999). Les radicaux libres et les antioxydants. *Guide nutritionnel des sports d'endurance*. 2-11.

Govindan, P. et Muthukrishnan, S. (2013). Evaluation of total phenolic content and free radical scavenging activity of *Boerhavia erecta*. *Journal of acute medicine*, 3: 103-109.

Gutowski, M. et Kowalczyk, S. (2013). A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *ACTA Biochimica Polonica*, 60(1):1-16.

H

Hagerman, A.E et Bulter, I.G. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Agriculture and Food Chemistry*, 26: 809-812.

Hagerman, A.E. (2002). Tannins chemistry in tannins handbook. Hagerman laboratory, Miami University, Oxford, USA.

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C. et Chapelle, J.P. (2007). Le stress oxydant. *Revue Medicale de Liege*, 62(10):628-638.

Halliwell, B. et Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142: 231–255.

Hasan, H.H., Habib, I. H., Gonaid, M. H., et Islam, M. (2011). Comparative phytochemical and antimicrobial investigation of some plants growing in Al Jabal Al-Akhdar. *Journal National Product. Plant Resour.*, 1 (1):15-23.

Hassanpour, S., Maheri-Sis, N., Eshratkhah, B. et Mehmandar, F B. (2011). Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review, *International Journal of Forest, Soil and Erosion*, 1(1): 47-53.

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

I

Isnard, S., Rowe, N., Speck, T. (2003). Growth habit and mechanical architecture of sand dune-adapted climber *Clematis flammularia naritima* L. *annals of botany*, 91:407-417.

K

Karpagasundari, C. et Kulothungan, S. (2014). Free radical scavenging activity of *Physalis minima* Linn. leaf extract (PML). *Journal of Medicinal Plants Studies*, 2(4): 59-64.

Kataki, M. S., Kakoti, B. B., Bhuyan, B., Rajkumari, A. et Rajak, P. (2014). Garden rue inhibits the arachidonic acid pathway, scavenges free radicals, and elevates FRAP: role in inflammation. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(3): 0172–0179.

Kawashty, S.A., Mosharrafa, S.A.M., El-Gibali, M. et Saleh, N.A.M. (2000). The flavonoids of four *Pistacia* species in Egypt. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28: 915-917.

Keser, S., Celik, S., Turkoglu, S., Yilmaz, Ö. et Turkoglu, I. (2012). Hydrogen peroxide radical scavenging and total antioxidant activity of Hawthorn. *Chemistry Journal*, 02 (01) : 9-12.

Khan, M.R., Kihara, M. et Omoloso, A.D. (2001). Antimicrobial activity of *Clematis papuasica* and *Nauclea obovata*. *Fitoterapia*, 72: 575 – 578.

Kumar, P., Kumar, S. et Kaur, J. (2008). Cytomixis induced meiotic abnormalities in Pollen Mother Cells of *Clematis flammula* L. (Ranunculaceae). *Cytologia*, 73(4): 381–385.

L

Lahouel, M., Boulkour, S., Segueni, N. et Fillastre, J.P. (2004). Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Pathologie Biologie*, 52: 314-322.

Lahsissene, H., Kahouadji, A., Tijane, M. et Hseini, S. (2009). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental). *Lejeunia*, (186) :1-26.

Laura Bravo, Ph.D. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56(11): 317-333.

Lebreton, P., Nader, S., Barbero, M., Gallet, C. et Hubert, B. (1997). Sur la structuration biochimique des formations végétales secondaires méditerranéennes. *Review. Ecology. (Terre Vie)*, 52 : 121-238.

Lee, Y.S., Mulugu, S., York, J.D. et O'Shea, E.K. (2007). Regulation of a cyclin-CDK-CDK inhibitor complex by inositol pyrophosphates. *Science*, 316(5821): 109-112.

Li, K.; Geng, Simonsen, J. et Karchesy. (2004). Novel wood adhesives from condensed tannins and polyethylenimine. *International Journal of Adhesion and Adhesives*. 24: 327-333.

Liu, J., Jia, L., Kan, J. et Jin, C.H. (2013). In vitro and in vivo antioxidant activity of ethanolic extract of white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food and Chemical Toxicology*, 51:310–316.

Ljubuncic, P., Song, H., Cogan, U., Azaizeh, H. et Bomzon, A. (2005). The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. *Journal of Ethnopharmacology*, 100:198–204.

Longo, L., Scardino, A. et Vasapollo, G. (2007). Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrealatifolia* L. and *Rubia peregrina* L. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8:360–364.

M

Maisuthisakul, P., Suttajit, M., Pongsawatmanit, R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*, 100:1409-1418.

Maksimovicé, Malencic, Z. D. et Kovacevic, N. (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technology*, 96: 873–877.

Mehenni, C., Kilani-Atmani, D., Dumarçay, S., Perinn, D., Gérardin, P. et Atmani, D. (2016). Hepatoprotective and antidiabetic effects of *Pistacialentiscus* leaf and fruit extracts. *Journal of food and drug analysis*, 3: 1-17.

Mélo, E.A., Lima, V.A. G. et Maciel M. I. S. (2006). Polyphenol, ascorbic acid and total carotenoid contents in common fruits and vegetables. *Brazilian Journal of food technology*, 9(2) : 89-94.

Mendham, Denny, Barnes, Thomas (2006). Analyse chimique quantitative de Vogel. *De Boeck*, p:272-313.

Mimica- Dukic, N. (1992). Investigation on secondary biomolecules in some Mentha-species. Ph D. Thesis. University of Novi Sad.

Min Tialu. et Anders, B. (1980). Anacardiaceae. *Popularis Sin*, 45(1): 66–135.

Molan, A-L., Faraj, A.M. et Mahdy, A.S. (2012). Antioxidant activity and phenolic content of some medicinal plants traditionally used in Northern Iraq. *Phytopharmacology*, 2(2) : 224-233.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol.*, 26(2) : 211-219.

Montoro, P., Braca, A., Pizza, C. et De Tommasi, N. (2005). Structure antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food chemistry*, (92):349-355.

More, D. et White, J. (2005). Encyclopédie des Arbres plus de 1800 Espèces et Variétés du Monde. *Flammarion*, P 832.

Moulaoui, K., Caddeo, C., Manca, M. L., Castangia, I., Valenti, D., Escribano E., Atmani, D., Fadda, A. M. et Manconi, M. (2015). Identification and nanoentrapment of polyphenolic phytocomplex from *Fraxinus angustifolia*: In vitro and in vivo wound healing potential. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 89 : 179-188.

Mueller-Harvey, I. (2001). Analysis of hydrolysable tannins. *Animal feed science and technology*, 91:3-20.

N

N'gaman Kohué, C. C., Békro, Y.A., Mamyrbékova-Békro, J. A., Bénié, A. et Gooré, B. S. (2009). Sur la composition en métabolites secondaires et l'activité anti-oxydante d'extraits bruts de *Gmelina Arborea Roxb.* (Verbanaceae) de Côte d'Ivoire, Afrique del'Ouest: Analyse par Chromatographie en Couche Mince. *European Journal of Scientific Research*, 36 (2) :161-171.

Nicholls, P., (2012). Classical catalase: Ancient and modern. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525: 95-101.

O

Okawa, M., Kinjo, J., Nohara, T. et Ono, M. (2001). DPPH (1,1- Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. *BiologyPharmaceutic., Bulletin*, 24(10) : 1202-1205.

Olabinri, BM., Eniyansoro, OO., Okoronkwo, CO., Olabinri, PF. Et Olaleye MT. (2010). Evaluation of chelation ability of aqueous extract of *Tetracarpidiumconophorum* (African walnut) *in vitro*. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 3(3): 13-18.

Olson, M.(2013).Ranunculaceae .*The Buttercup Family*, 1.

Özyürek, M., Bektasoglu, B., Güçlü, K., Güngör, N. etApak, R. (2010). A novel hydrogen peroxide scavenging assay of phenolics and flavonoids using cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23: 689–698.

P

Padmanabhan, P. et Jangle, S. N. (2012).Evaluation of DPPH radical scavenging activity and reducing power of four selected medicinal plants and their combinations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 4(2): 143-146.

Pastre, J. et Priymenko, N.(2007).Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques.*Revue de Médecine Vétérinaire*, 158(4) :180-189.

Pervin, M., Hasnat, M. A. et Lim, B. O. (2013). Antibacterial and antioxidant activities of *Vacciniumcorymbosum* L. leaf extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3(6): 444-453.

Pietta, P.G., (2000).Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63 :1035-1042.

Pincemail, J.;Bonjean, K .; Cayeux, K. etDefraigne, J. O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolisme*.16(4) : 233-239.

Popovici, C., Saykova, I. et Tylkowski, B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4 : 25-39.

Prior, R., Wu, X. et Schaich, K. (2005).Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 : 4290–4302.

R

Rajesh Kumar Rawri, Bharathi, K., Jayaveera, K.N. etAsdaq, SMB.(2013).*In vitro* antioxidant properties of *Garciniaindicalinn* alcoholic fruits extracts. *Journal of pharmaceutical and scientific innovation*, 2(3): 9-12.

Rajeshwar, Y., Kumar, G.P.S., Gupta, M. etMazumder, U.K. (2005).Studies on *in vitro* antioxidant activities of methanol extract of *MucunaPruriens* (Fabaceae) seeds. *European bulletin of drug research*, 13 (1): 200-531.

Ray, A., Dutta-Gupta, S. et Ghosh, S.(2013).Evaluation of anti-oxidative activity and UV absorption potential of the extracts of *Aloe vera* L. gel from different growth periods of plants. *Industrial Crops and Products*, 49:712–719.

Remila, S., Atmani-Kilani, D., Delemasure, S., Connat, J-L., Azib, L., Richard, T. et Atmani, D. (2015).Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacialentiscus*(Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. *European Journal of Integrative Medicine*, 7 : 274-286.

Rindels, S.(2013).*Clematis.in Iowa State University: extension and outreach*, 1.

Robu, S., Aprotosoie, A. C., Miron, A.,Cioanca, O., Stanescu, U. et Hancianu ,M.(2012).In vitro antioxidant activity of ethanolic extracts from some *Lavandula* species cultivated in Romania. *Farmacia*, 60(3): 394-401.

S

Saeed, N., Khan, M.R. etShabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 221(12): 1-12.

Saravanan, C., He, Z. et Ni, Y.(2014).Application of polyaniline/clay combination to cellulosic paper as an approach to conductivity development. *Bioresource*, 9(2):1886-1887.

Scalbert, A.,Morand, C., Manach C. et Rémésy C., (2002).Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*.56 :276-282.

Schinella, G., Mosca, S., Cienfuegos-Jovellanos, E., ÁngelesPasamar, M., Muguerza, B., Ramón, D. et Ríos,J. L. (2010).Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. *Food Research International*, 43: 1614–1623.

Senthilkumar, R., Parimelazhagan, T., Chaurasia, O. P. et Srivastava, R.B. (2013).Free radical scavenging property and antiproliferative activity of *Rhodiola imbricata* Edgew extracts in HT-29 human colon cancer cells. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 11-19.

Seyoum, A., Asres, K. et El-Fiky, F.K. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67: 2058-2070.

Sharma, S. K. et Singh, A. P. (2012).In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of *Nardostachys jatamansi* DC. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies* ,5(3):112-118.

Sheidai, M., Habibi, M., Azizian, D. et Khatamsaz, M. (2009). Cytology and palynology of the *Clematis* L. species (Ranunculaceae) in Iran. *Acta Botanica Croatica*, 68 (1): 67–77.

Shikov, A. N., Kunderacikova, M., Palama, T., Pozharitskaya, O. N., Kosman, V. M., Makaoo, V. G., Galambosi, B., Kim, H. J., Jang, P. Y., Choi, H. Y. et Verporte, R. (2010). Phenolic constituents of *Gnaphalium uliginosum* L. *Phytochemistry letters*, 3: 45-47.

Sorg, O.(2004).Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *.ComptesrendusBiologies*, 327: 649-662.

Sowndhararajan, K. et Kang, S. C. (2013).Free radical scavenging activity from different extracts of leaves of *Bauhinia vahlii* Wight & Arn. *Saudi Journal of Biological Sciences*,20 : 319–325.

Sroka, Z. etCisowski, W.,(2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids.*Food and Chemical Toxicology*, 41: 753-758.

Sylvie, D.D., Anatole, P C., Cabral, B P. et Veronique, PB., (2014). Comparison of in vitro antioxidant properties of extracts from three plants used for medical purpose in Cameroon: *Acalypharacemosa*, *Garcinialucida*and *Hymenocardialyrata*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*,4(2): 625-632.

T

Topçu, G., Ertas, A., Kolak, U., Öztürk, M. etUlubelen, A. (2007). Antioxidant activity tests onnouveltriterpenoids from *Salvia macrochlamys*. *Arkivoc*, 7 : 195-208.

Tournaire, C., Hocquaux, M., Beck, I., Oliveros, O. et Maurette, M.T. (1994). Activité anti-oxydante de flavonoïdes réactivité avec le superoxyde de potassium en phase hétérogène.*Pergamon*, 50(31):9303-9317.

V

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J.(2007). Free radicals and antioxydants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*.39: 49.

Van Acker, S.A.B.E., Van Den Berg, D-J., Tromp,M.N.J.L.,Griffioen, D.H.,Van Bennekom, W.P.,Van Den Vijgh. W.J.F. etBast. A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20(3): 331-342.

Venkatachalam, U. etMuthukrishnan, S. (2012). Free radical scavenging activity of ethanolic extract of *Desmodiumgangeticum*. *Journal of acute medicine*, 2: 36-42.

Verdan, A.M., Wang, H.C., Garcia, C.R, Henry, W.P. etBrumaghim, J.L. (2011). Iron binding of 3- hydroxychromone, and sulfonatedmorin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites.*Journal of Inorganic Biochemistry*, 105: 1314-1322.

Verdú, M. etGarcía-Fayos, P. (1998). Ecological causes, function, and evolution of abortion and parthenocarpy in *Pistacialentiscus* (Anacardiaceae).*Canadian Journal of Botany*,76: 134–141.

W

Wang,W. , Fu, D. , Li, L., Bruce, B., Anthony, R., Bryan, E., Michael, G. G., Yuichi,K., Orbélia, R., Michio, T., Michael, J., Zhu, G. et Svetlana, N. (2001).Ranunculaceae. *Flora of China*, 6: 133–438.

Wyllie, S. G., Brophy, J. J., Sarafis, V. et Hobbs, M. (1990). Volatile components of the Fruit of *Pistacia Lentiscus*. *Journal of food science*, 55 (5): 1325-1326.

X

Xu, R., Zhao, W., Xu, J., Shao, B. et Qin, G. (1996). Studies on bioactive saponins from Chinese medicinal plants. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 404:371-82.

Y

Yi, Z., Yu, Y., Liang, Y. et Zeng, B. (2008). In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT*, 41: 597-603.

Z

Zeng, Y. X., Zhao, C. X., Liang, Y. Z., Yang, H., Fang, H. Z., Yi, L. Z. et Zeng, Z. D. (2006). Comparative analysis of volatile components from *Clematis* species growing in China. *Analytica Chimica Acta*. 595: 328–339.

Zhang, A., Fang, Y., Wang, H., Li, H. et Zhang, Z. (2011). Free-radical scavenging properties and reducing power of grape cane extracts from 11 Selected grape cultivars widely grown in China. *Molecules*, 16:10104-10122.

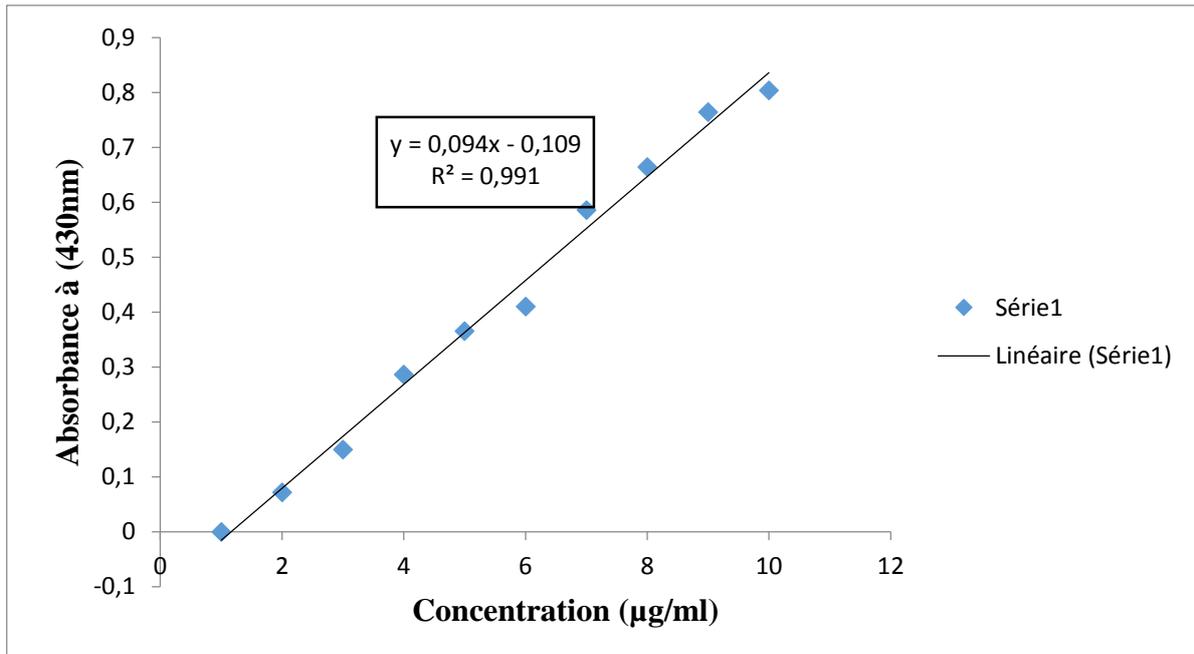
Zhang, H., Wu, J. et Guo, X. (2016). Effects of antimicrobial and antioxidant activities of spice extracts on raw chicken meat quality. *Food Science and Human Wellness*, 5:39–48.

Sites

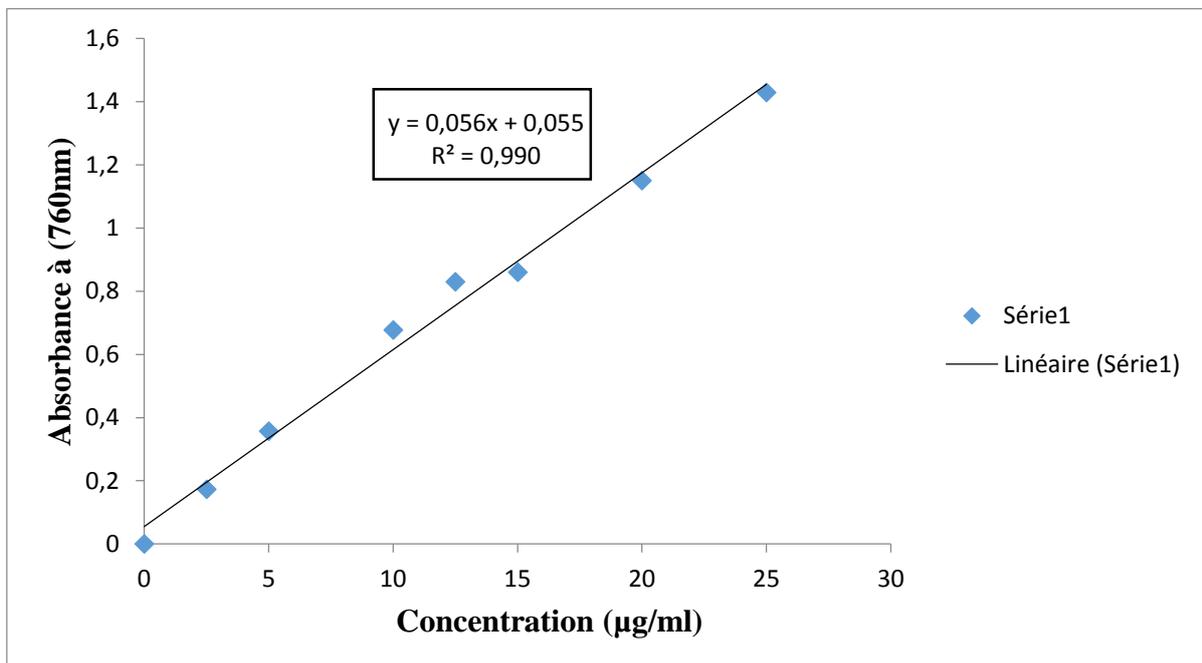
- (1) : Raval- Dana. Eklablog [en ligne]. <http://ravel.ek.la/6-les-lentisques-edharouu-en-arabe-a92927201> (consulté le 25 /04/2016).
- (2) : Société française d'ethnopharmacologie. Plantes médicinales et pharmacopées traditionnelles [en ligne]. http://www.ethnopharmacologia.org/recherche-dans-prelude/?plant_id=3245 (consulté le 15/04/2016).
- (3) : United States Department of Agriculture Plants database [en ligne]. <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=CLFL8> (consulté le 18/04/2016).

ANNEXES

ANNEXES

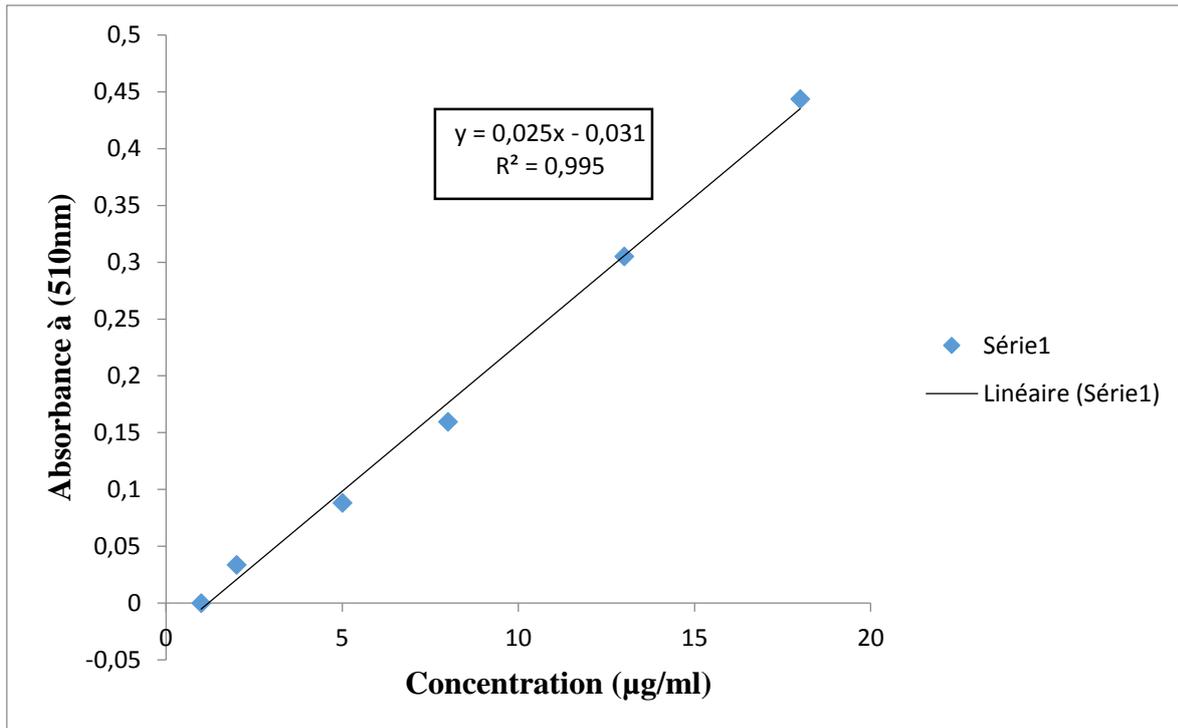


Annexe 01 : Droite d'étalonnage des flavonoïdes.

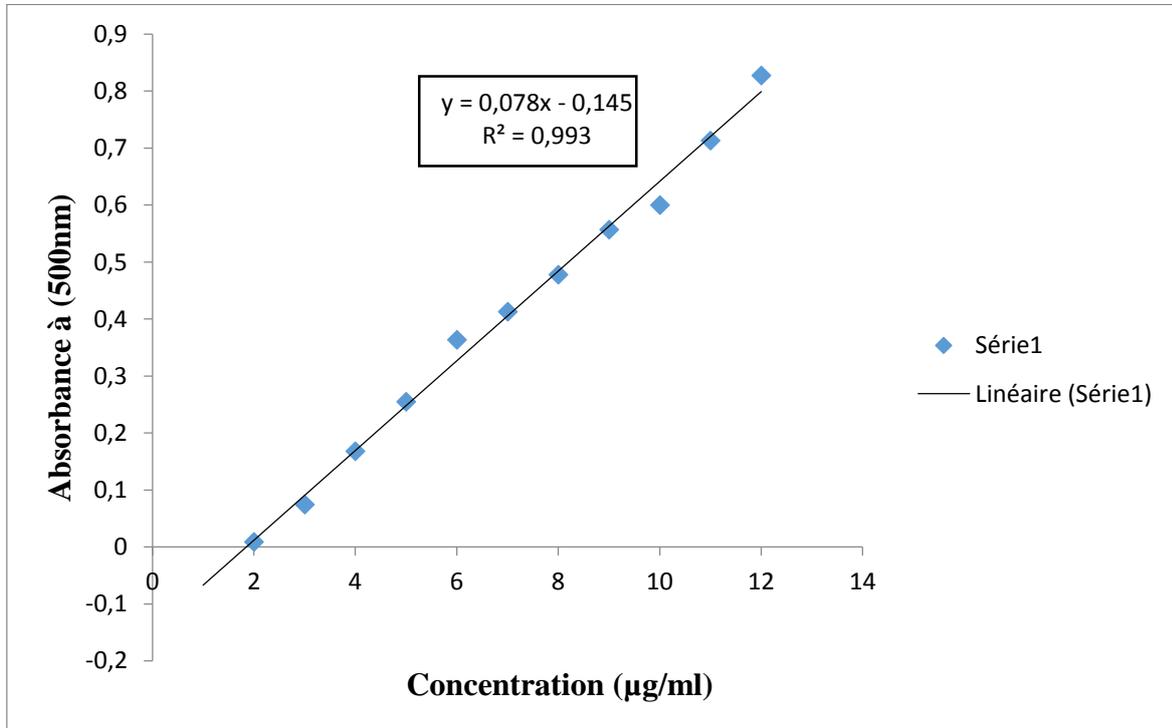


Annexe 02 : Droite d'étalonnage des phénols totaux.

ANNEXES

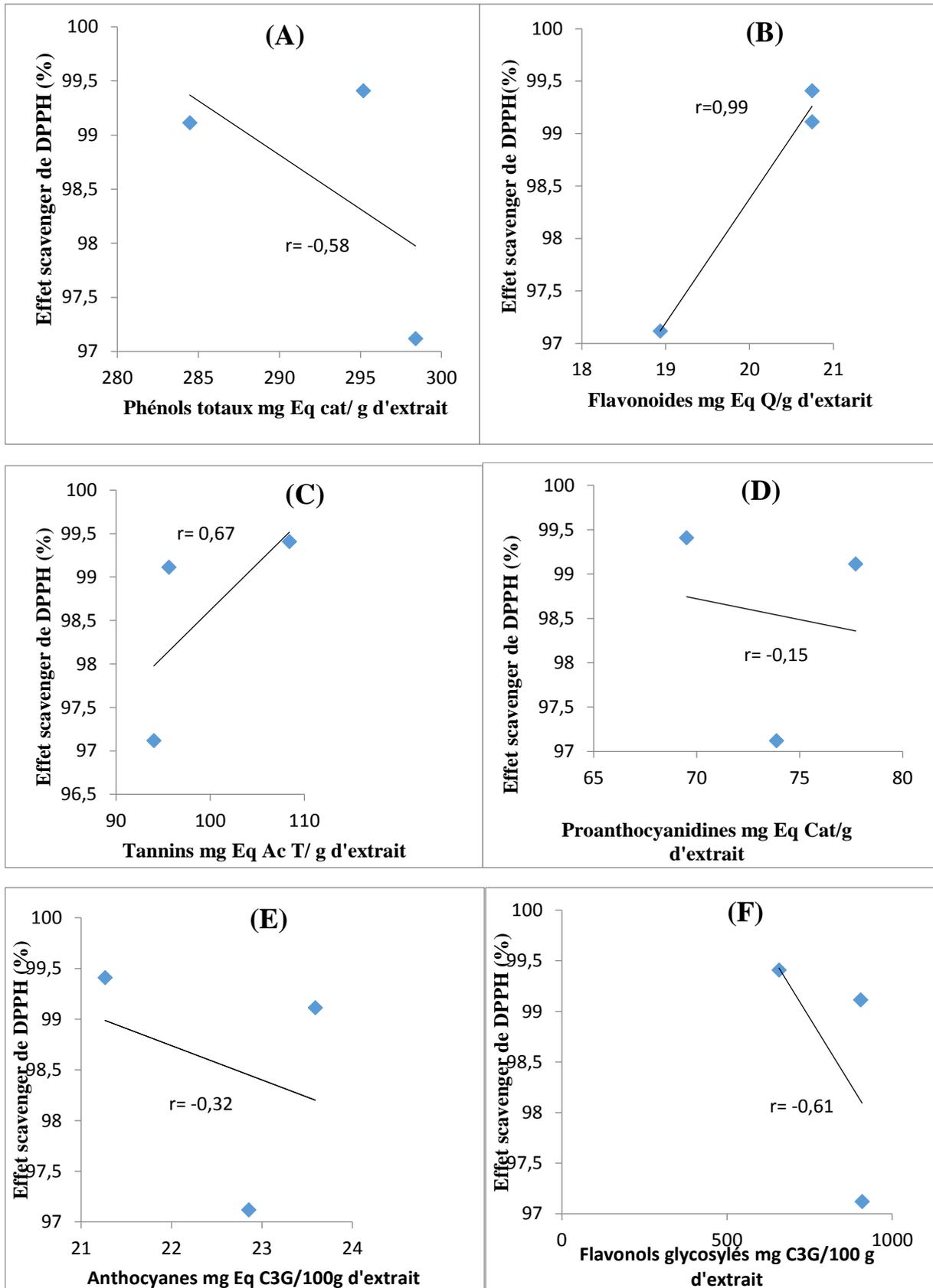


Annexe 03 : Droite d'étalonnage des tannins.



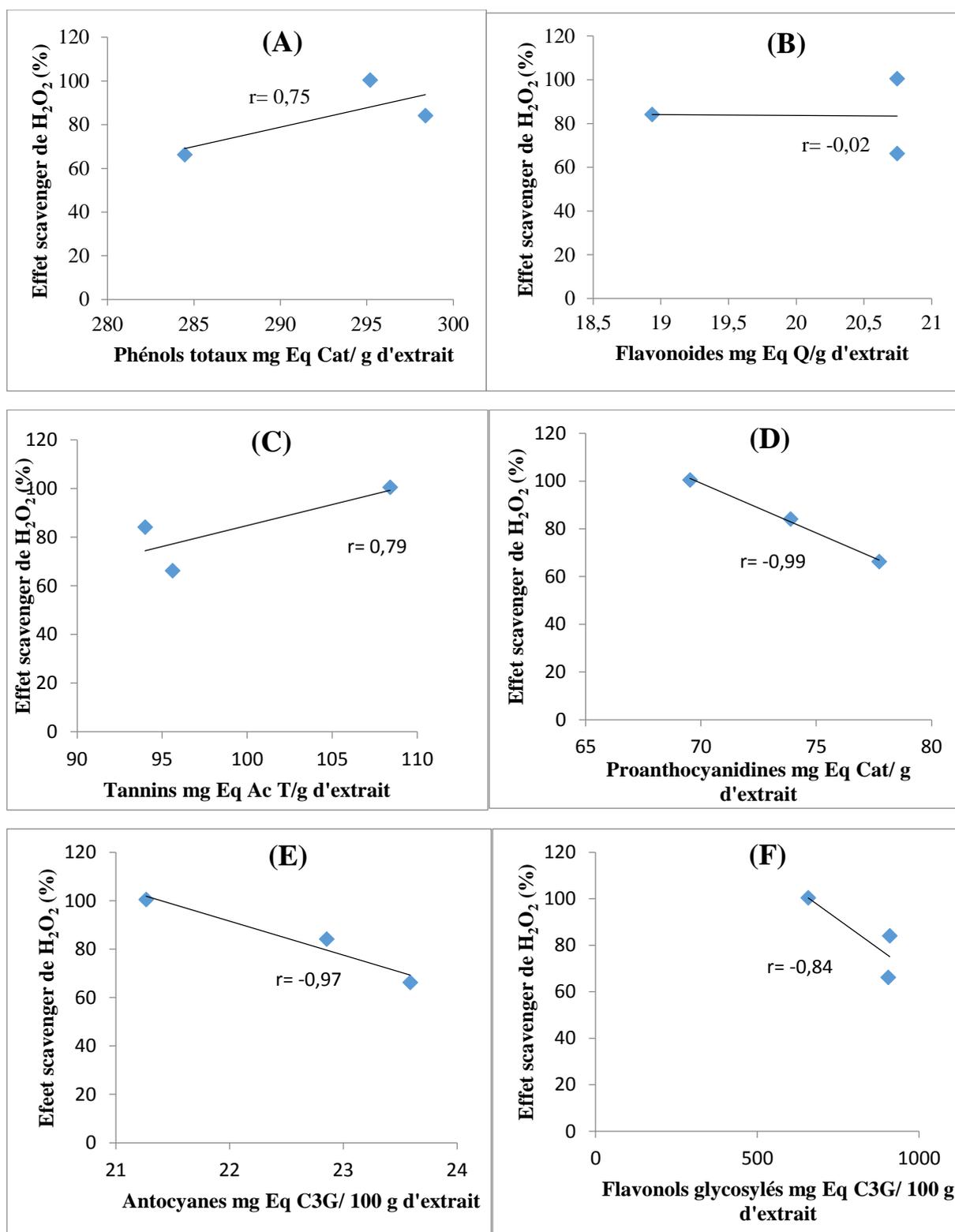
Annexe 04: Droite d'étalonnage des proanthocyanidines.

ANNEXES



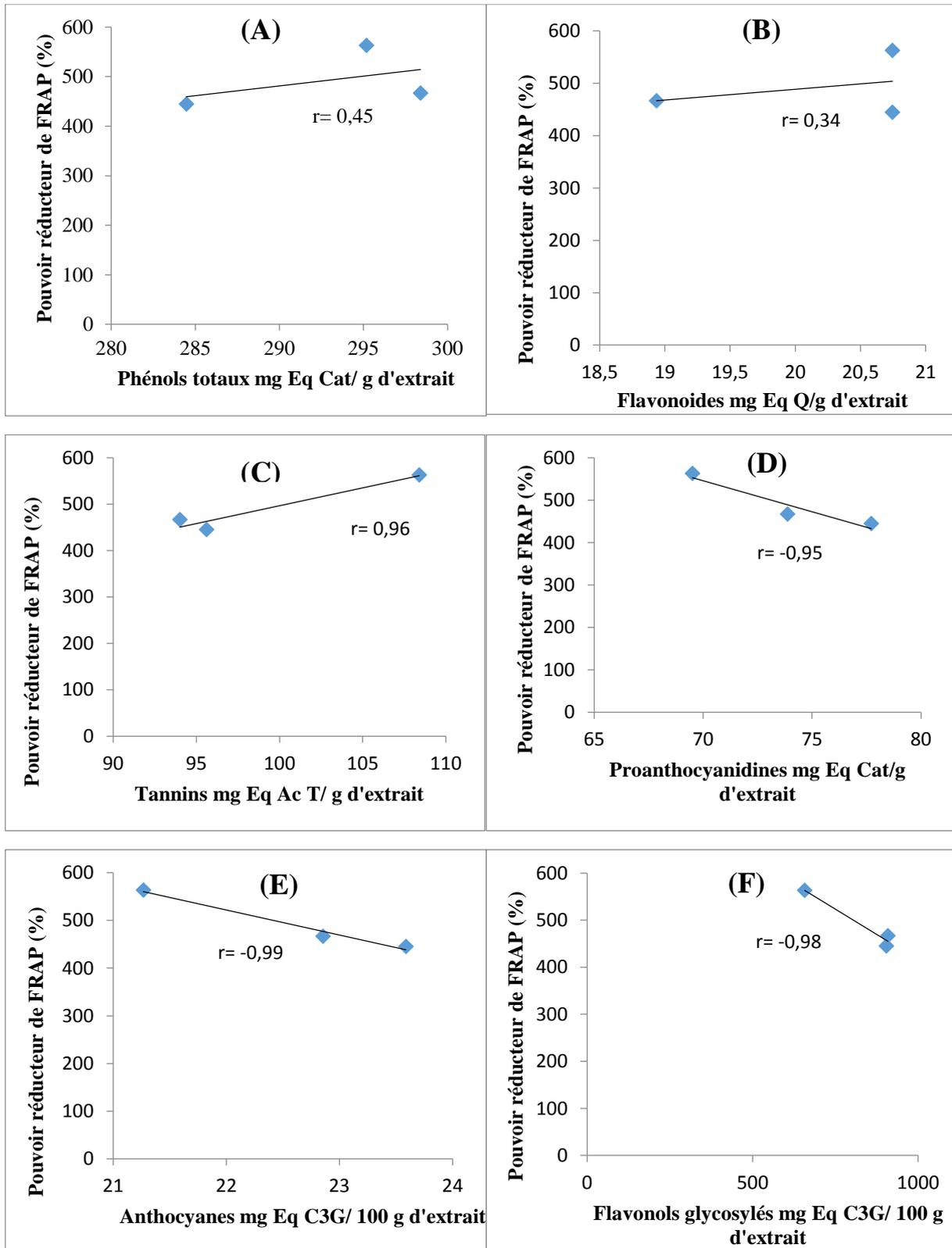
Annexe 05 : Corrélation entre l'effet scavenger DPPH et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoides (B), Tannins (C), proanthocyanidines (D), anthocyanes (E), et flavonols glycosylés (F) de feuilles de *Pistacia lentiscus*.

ANNEXES



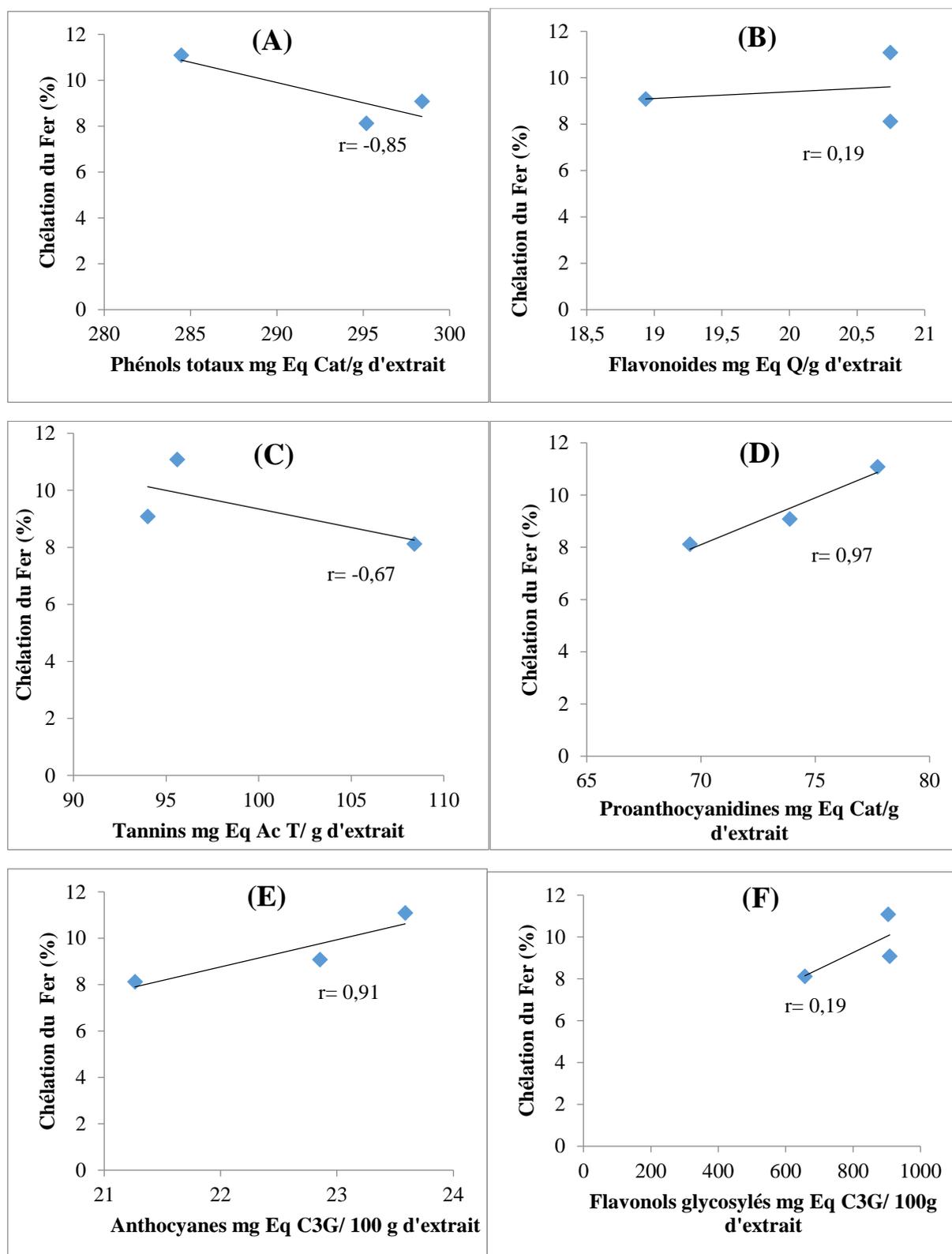
Annexe 06 : Corrélation entre l'effet scavenger H₂O₂ et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes (B), Tannins (C), proanthocyanidines (D), anthocyanes (E), et flavonols glycosylés (F) de feuilles de *Pistacia lentiscus*.

ANNEXES



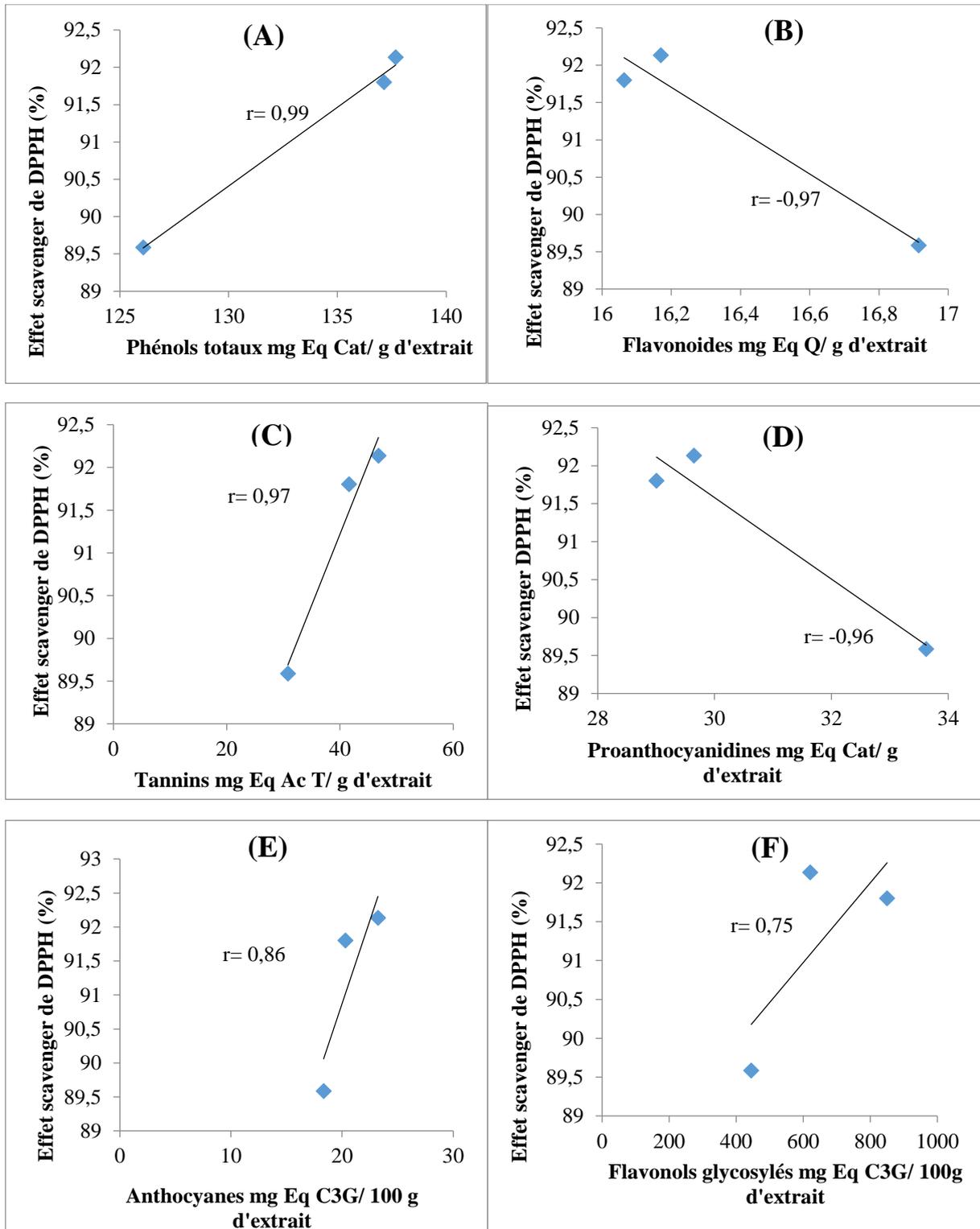
Annexe 07 : Corrélation entre le pouvoir réducteur FRAP et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes (B), Tannins (C), proanthocyanidines (D), anthocyanes (E), et flavonols glycosylés (F) de feuilles de *Pistacia lentiscus*.

ANNEXES



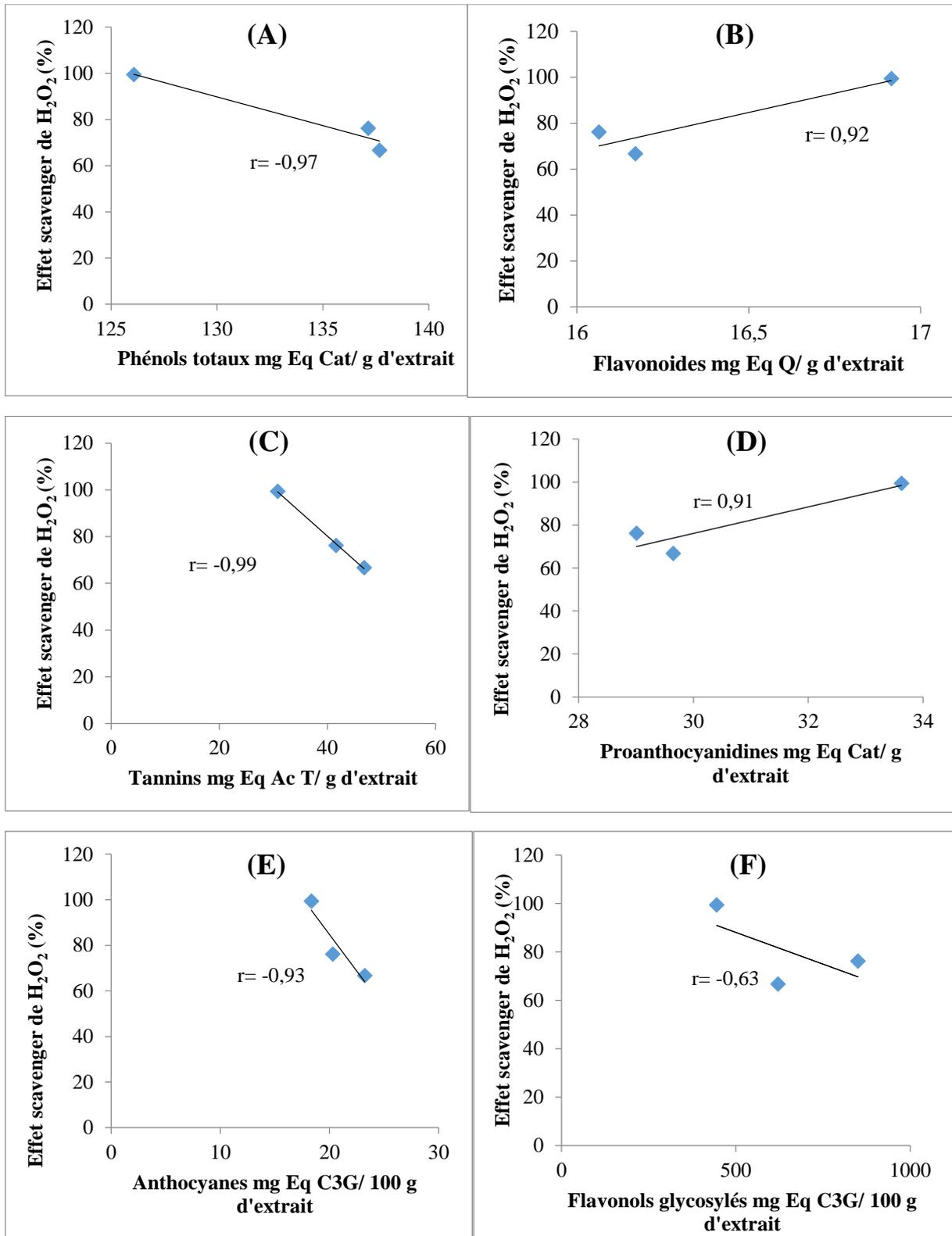
Annexe 08 : Corrélation entre la chélation du fer et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes (B), Tannins (C), proanthocyanidines (D), anthocyanes (E), et flavonols glycosylés (F) de feuilles de *Pistacia lentiscus*.

ANNEXES



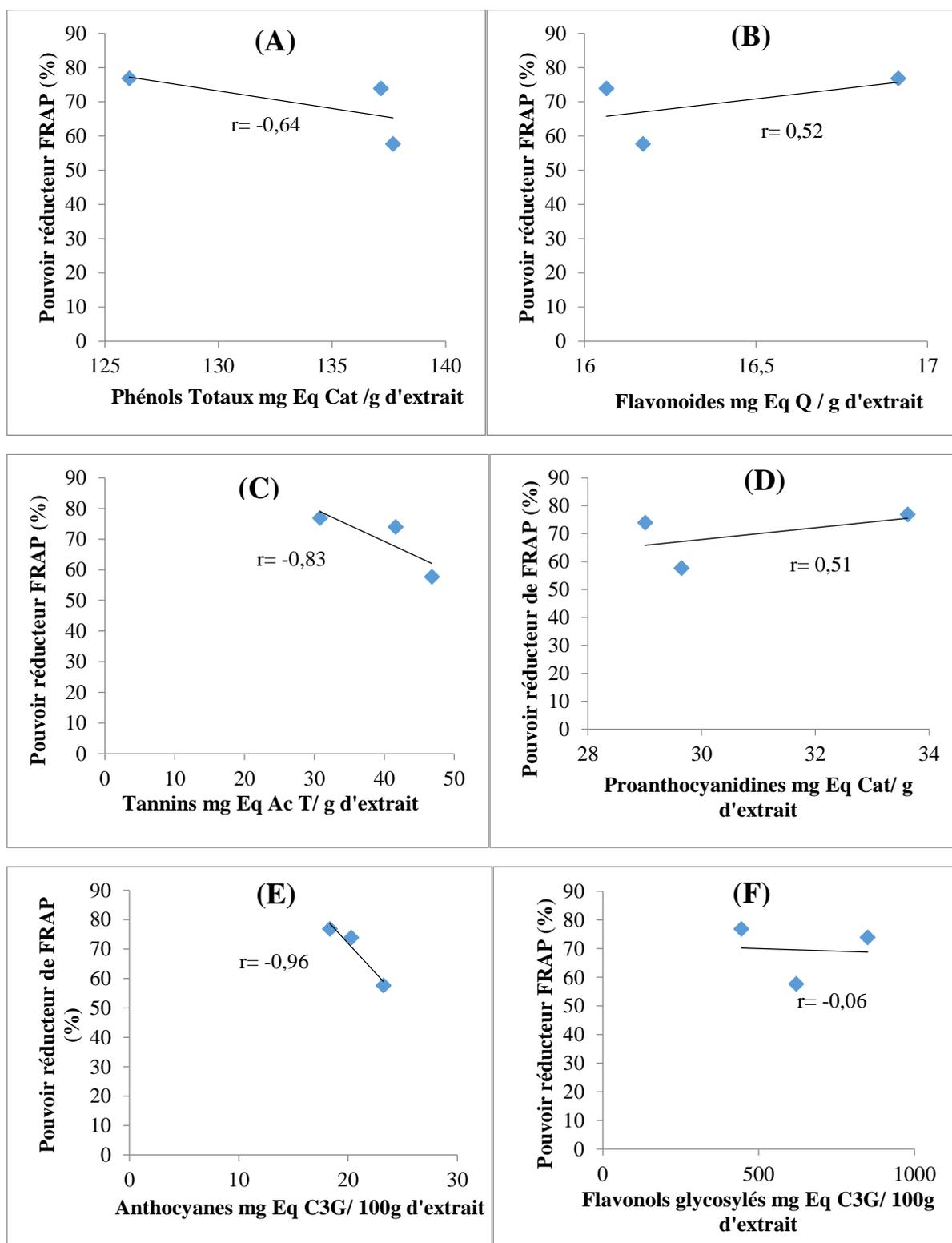
Annexe 09 : Corrélation entre l'effet scavenger DPPH et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoides (B), Tannins (C), proanthocyanidines (D), anthocyanes (E), et flavonols glycosylés (F) de fruits de *Pistacia lentiscus*.

ANNEXES



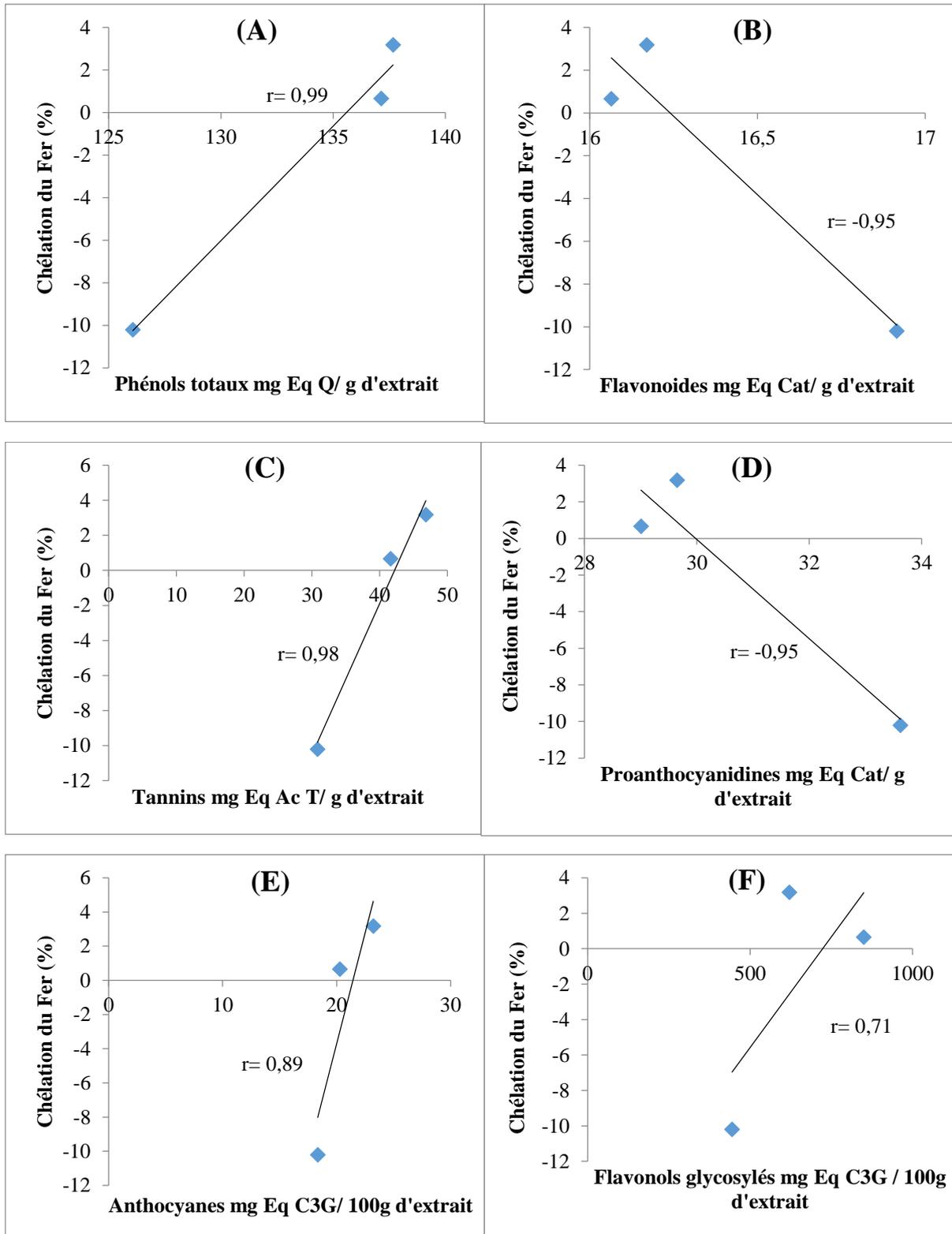
Annexe 10 : Corrélation entre l'effet scavenger H₂O₂ et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes (B), Tannins (C), proanthocyanidines (D), anthocyanes (E), et flavonols glycosylés (F) de fruits de *Pistacia lentiscus*.

ANNEXES



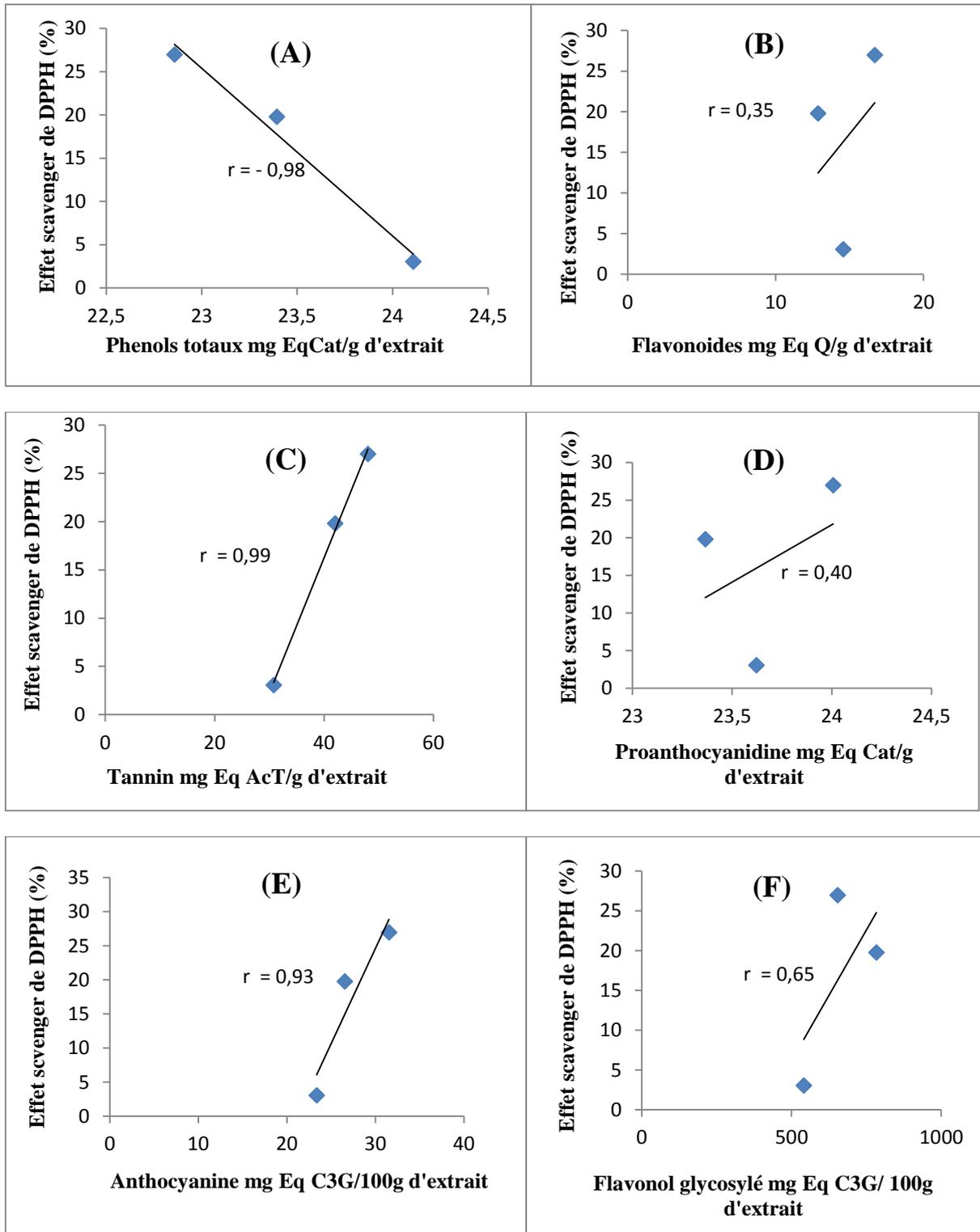
Annexe 11 : Corrélation entre le pouvoir réducteur FRAP et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes (B), Tannins (C), proanthocyanidines (D), anthocyanes (E), et flavonoïdes glycosylés (F) de fruits de *Pistacia lentiscus*.

ANNEXES



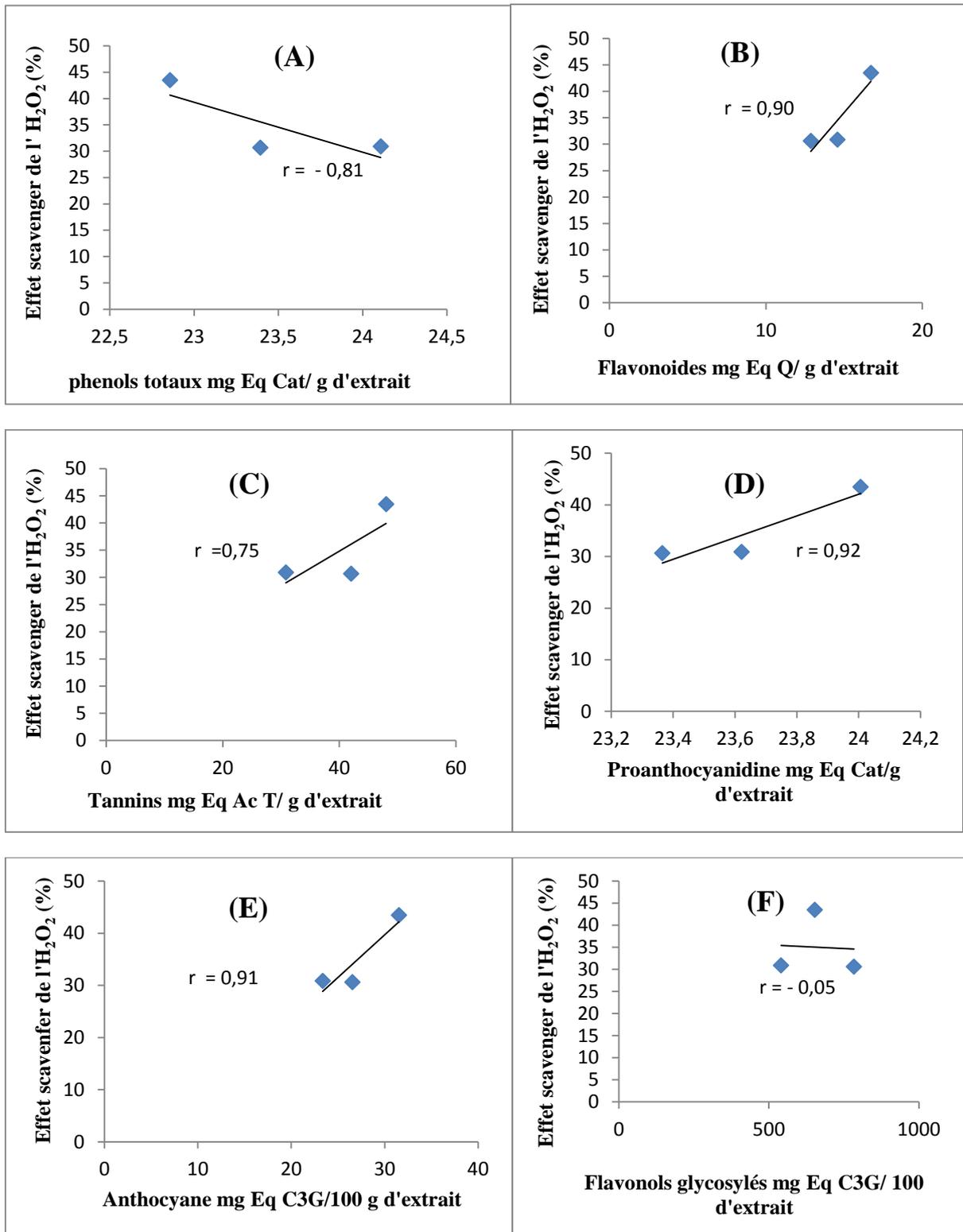
Annexe 12: Corrélation entre la chélation du fer et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes (B), Tannins (C), proanthocyanidines (D), anthocyanes (E), et flavonols glycosylés (F) de fruits de *Pistacia lentiscus*.

Annexes



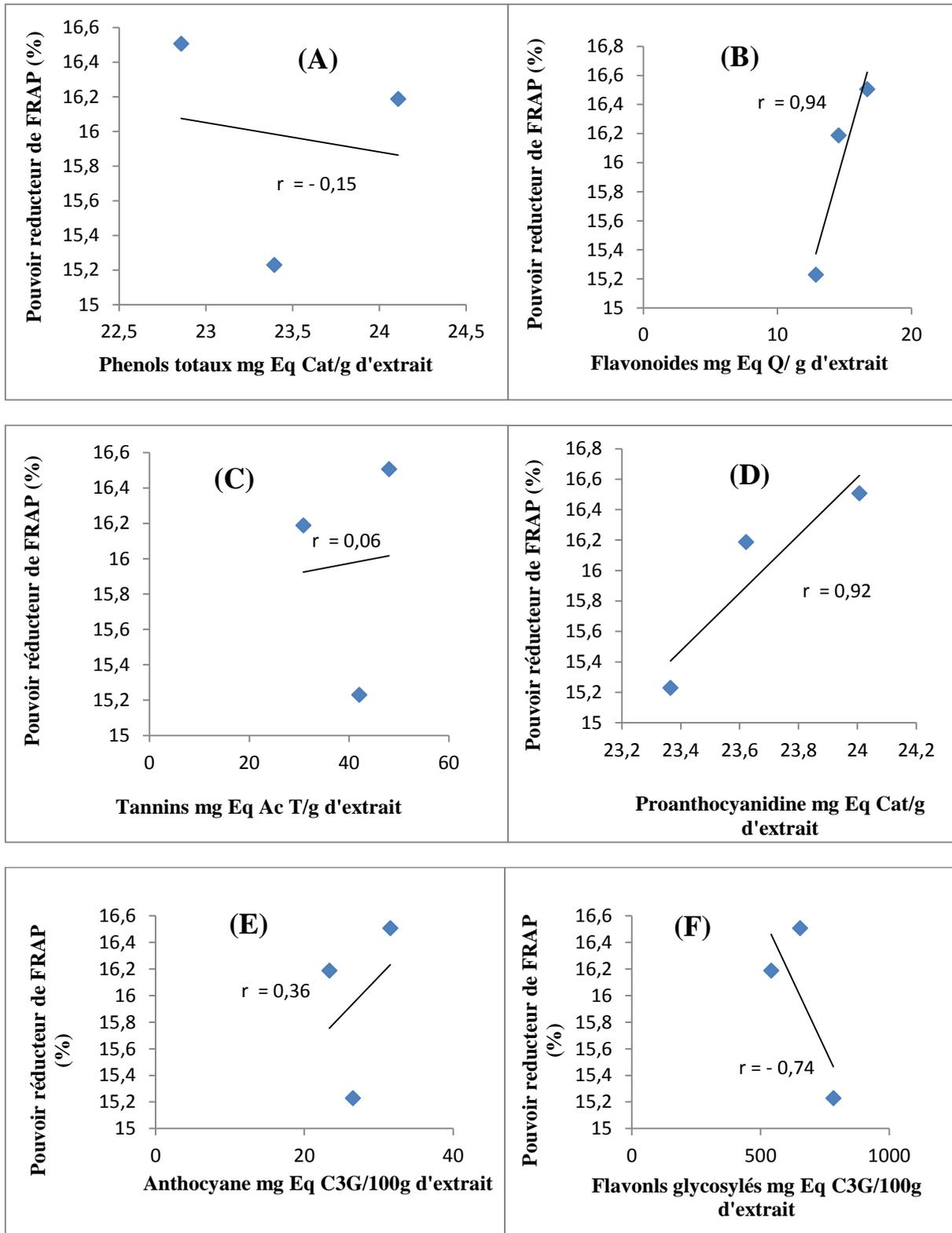
Annexe 13 : Corrélation entre l'effet scavenger de DPPH et les teneurs en phenols totaux (A), flavonoides (B), tannins (C), proanthocyanidines (D), anthocyanane (E) et falvonols glycosylés (F) des extraits de feuilles de *C. flammula*.

Annexes



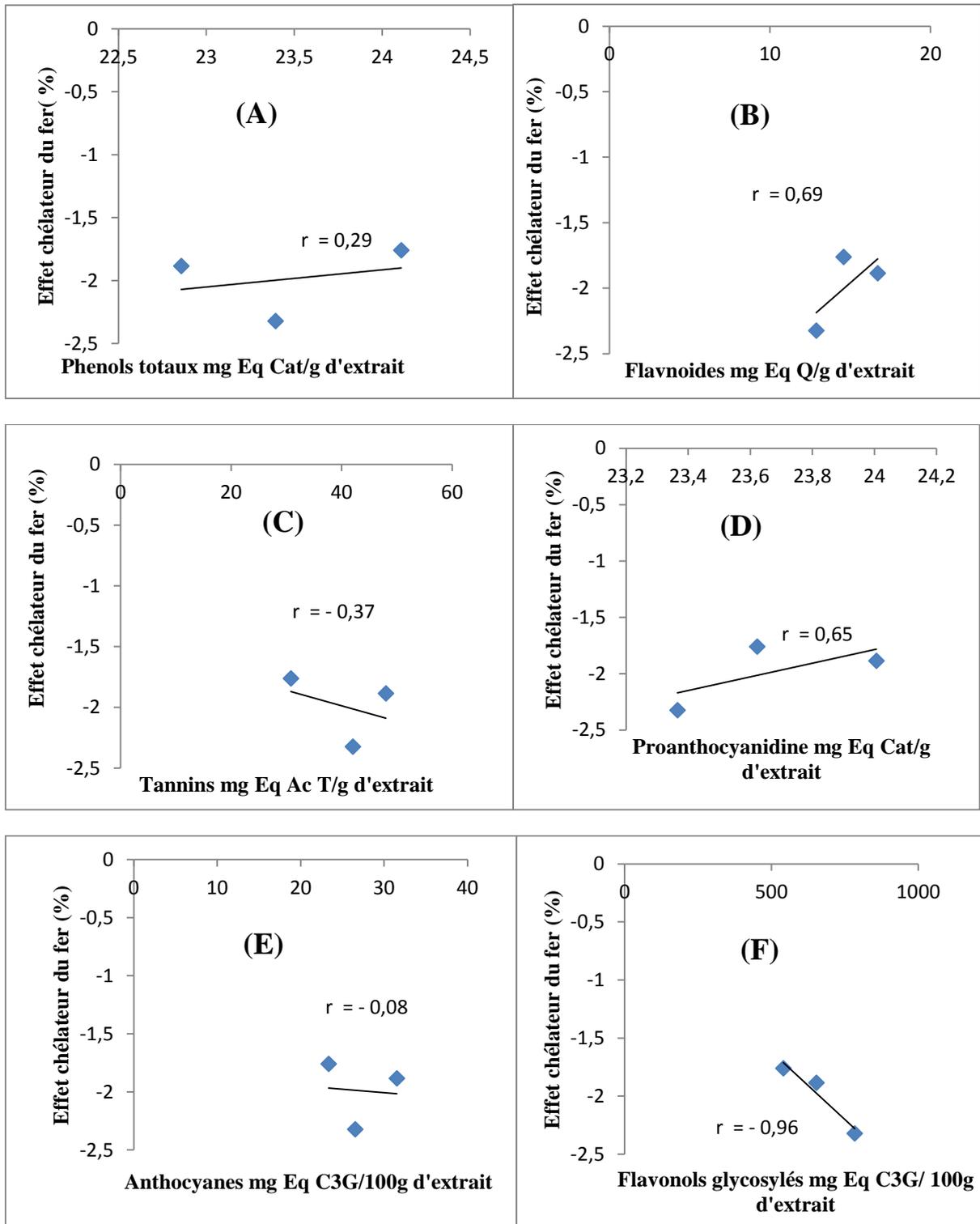
Annexe 14 : Corrélation entre l'effet scavenger de l'H₂O₂ et les teneurs en phenols totaux (A), flavonoides (B), tannins (C), proanthocyanidines (D), anthocyane (E) et falvonols glycosylés (F) des extraits de feuilles de *C. flammula*.

Annexes



Annexe 15 : Corrélacion entre le pouvoir réducteur (FRAP) et les teneurs en phenols totaux (A), flavonoides (B), tannins (C), proanthocyanidines (D), anthocyane (E) et falvonols glycosylés (F) des extraits de feuilles de *C. flammula*.

Annexes



Annexe 16 : Corrélation entre le pouvoir chélateur du fer et les teneurs en phenols totaux (A), flavonoides (B), tannins (C), proanthocyanidines (D), anthocyane (E) et falvonols glycosylés (F) des extraits de feuilles de *C. flammula*.

Annexes

Annexe 17 : Les différents composés de genre Clematis (Chawla et al., 2012).

Composés phénoliques	-Ibotanolide B -Calceolarioside B -D-ribono- γ -lactone -Tricosamol	-Clemomandshuricoside A, B et C -Acide heptacosanoïque
Anémoines	-Anémoinine -Protoanémoinine	-Ranunculine
Huiles volatiles	-Acide hexadecanoïque -Acide palmitique -Acide myristique -5-hydroxymethyl-2-furaldehyde -Acide 3-methoxy-4-hydroxy benzoïque -Acide para-coumarique -Coniferaldehyde -Acide caféique -Acide ferulique -Acide isoferulique -Acide 5-hydroxy-4-oxo-pentanoïque -3-Hydroxy-4-methoxy benzaldehyde -5-Hydroxymethyl-5H-furan-2-one -Inositol -Acidebehynique	-Phytol -Acide linoléique -Acide vanillique
Coumarines	-4,7-Dimethoxy-5-methyl coumarine -7-Hydroxy-4,6-dimethoxy-5-methyl -coumarine	-4,6,7-Trimethoxy-5-methyl coumarine -siderine -scopoletine
Steroids	-Stigmasterol -5- α -Stigmastane-3- β -6- α -diol -Stigmasterol-3-o- β -D-glucopyranoside -3- β -Hydroxy-stigmast-5,22-dien-7-one	-Daucosterol - β -Sitosterol - β -Sitosterol- β -D-glucoside - β -Amyrine - α -Amyrine
Lignanes	-Armandisine -Clemastanine B -Liriodendrine -Isolariciresinol	-Salvadoraside -Clemaphenol A
Flavonoïdes	-Linarine -Apigénine -Apegénine-7-o- β -D-glucoside -Apegénine-6,8-di-C- β -D-glucoside -4,7-Dimethoxy -kaempférol -Vitaboside -Kaempférol-3,7-o-dirhamnoside -3-o-Methyluteoline -Quercétine -3,3',7-Trihydroxy-4,5-dimethoxy flavone -5,7,3',5'-Tetrahydroxy dihydroflavone -3,3',7-Trihydroxy-4,5-dimethoxy flavone -3',4',5,7-Tetrahydroxy-6-C-glucopyranosyl flavone	-Isovitexine -Terniflorine -Isokaempferide-Kaempférol -Kaempférol-3-o-glucoside -Clematine -Ternoflosidde A -Resokaempférol -Genistein -Hespérétine -Liquiritigénine -Naringénine -Tectoridine-Pueranine -Luteoline -Quercétine-3,7-o-diglucoside -3,5,7,3'-Tetrahydroxy flavone -3,5,7,3'-Tetrahydroxy flavone
Alcaloïdes	-Corytuberine - β -Magnoflorine -Choline -Me-7-Methoxy-3-indolecarbonate -Me-7-o- α -L-rhamnopyranosyl(4 \rightarrow 6) β -D-glucopyranosyl-3-indolecarbonate	- α -Magnoflorine -Clematine
Saponines	-Acide hederagénique -Clematichénoside A et B	-Prosaponine

Annexes

	-Kizutasaponine - α -Hederine -Clematiganoside A -Hederacholichiside F
	-Prosagenine CP ₁₁ -Clematoside S -Clemontanoside C -Vitalboside F
	-Orientaloside F et H -Songaroside -Huzhangoside D -Clemastanoside
	-Vitalboside B et D -Tanguticoside A et B -Saponine PK -Dipsacoside B
	-Clematibetoside A et C -Clematernoside C -Acide oleanolique
	-Saponine 1, 2, 3 et 5 -Prosaponine -Clematichinensioide C
	-Clematoside C, A ET B -Clematomandshurica saponine A, B, C, D, E
	-Hederasaponine B -Acide ursalique -Acide arjunolique -Acide quinatique

Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales de la flore Algérienne, on s'est intéressé à l'étude des extraits éthanoliques de deux espèces locales *Pistacia lentiscus* (feuilles, fruits) et *Clematis flammula* (feuilles) via un screening phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante par différents tests (piégeage des radicaux DPPH et H₂O₂, méthode FRAP et chélation du fer). L'analyse quantitative a révélé la richesse de l'extrait des feuilles de *Pistacia lentiscus* en composés phénoliques par rapport aux autres extraits. Par ailleurs, les résultats des tests de l'activité antioxydante ont montré que le lentisque (feuilles et fruits) a exhibé le meilleur effet anti-radicalaire (DPPH, H₂O₂) avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 90%. En outre, le pouvoir réducteur le plus fort est marqué par l'extrait des feuilles de *P. lentiscus* (491,72 ± 15,48 mg équivalent Ac. Ascorbique/g d'extrait). Par contre, l'extrait de fruits de cette dernière a présenté l'activité chélatrice la plus importante avec une IC₅₀ de 1,86 mg/ml. L'analyse qualitative par CCM a mis en évidence la présence de quelques composés phénoliques dans les extraits bruts des deux plantes étudiées. L'ensemble des résultats obtenus confirment le pouvoir antioxydant de ces deux plantes, et encourage la suite des recherches entamées sur les activités biologiques qui sont liées à cette activité antioxydant en premier lieu, et cela afin de prouver scientifiquement l'utilisation de ces deux plantes.

Mots clés : *Pistacia lentiscus*, *Clematis flammula*, chélation du fer, activité anti-radicalaire, CMM.

Abstract

As part of the valorisation of medicinal plants of the Algerian flora, we were interested in the study of ethanol extracts of two local species *Pistacia lentiscus* (leaves, fruits) and *Clematis flammula* (leaves) via a phytochemical screening and evaluation of antioxidant activity by different tests (DPPH radical scavenging and H₂O₂, FRAP method and iron chelating activity). The quantitative analysis revealed the richness of leaves extracts of *Pistacia lentiscus* in phenolic compounds compared to other extracts. Furthermore, the results of antioxidant activity tests showed that the mastic tree (leaves and fruits) exhibits the best anti-radical effect (DPPH, H₂O₂) with a percentage of inhibition greater than 90%. Furthermore, the leaves extract of *P. lentiscus* marked the strongest reducing power (491,72 ± 15,48 mg equivalent Ascorbic Acide / g of extract). On the other hand, the fruits extract of the latter presented the highest chelating activity with an IC₅₀ of 1,86 mg/ml. Qualitative analysis by TLC showed the presence of some phenolic compounds in crude extracts of both plants tested. Results obtained confirm the antioxidant power of the two plants, and push towards completing the preliminary research related to this activity and this in order to validate scientifically the use of these two plants.

Key words: *Pistacia lentiscus*, *Clematis flammula*, iron chelating activity, radical scavenging activity, TLC.

ملخص

في إطار الترويج للنباتات الطبية الجزائرية، اهتمنا بدراسة المستخلصات النباتية لنبتين محليتين "الضرور" (الأوراق والثمار) و" نار باردة" (الأوراق) وذلك عن طريق الفحص الكيميائي النباتي وتقييم النشاط المضاد للأكسدة بواسطة اختبارات مختلفة (تعديل الجذور الحرة DPPH و H₂O₂، اختبار FRAP، ازالة معدن الحديد). حيث كشف التحليل الكيميائي ان مستخلص أوراق "الضرور" غنية بالمركبات الفينولية مقارنة بالمستخلصات الأخرى. علاوة على ذلك، أظهرت نتائج اختبارات النشاط المضاد للأكسدة أن نبات "الضرور" (أوراق وثمار) تتميز بأفضل تأثير مضاد للجذور الحرة (DPPH، H₂O₂) مع نسبة تثبيط أكبر من 90%. وأما بخصوص قوة الإرجاع (FRAP) فأوراق "الضرور" هي التي أظهرت النتائج الأحسن (491,72±15,48 ملغ تعادل حمض الأسكوربيك / غرام من المستخلص). أما فيما يتعلق بوظيفة ازالة معدن الحديد فالنتائج الأفضل قدمت من طرف مستخلص ثمرة "الضرور" مع IC₅₀ من 1,86 ملغ / مل. أما التحليل النوعي بواسطة تقنية الكروماتوغرافية، فقد أكدت عن وجود بعض المركبات الفينولية في المستخلص الخام لكلتا النبتتين. ومن خلال النتائج المتحصل عليها، تمكنا من تأكيد احتواء مستخلصات النبتتين على قدرة مضادة للأكسدة، مما يشجع على مواصلة البحوث المتعلقة بالنشاطات البيولوجية المرتبطة بالقدرة المضادة للأكسدة بالدرجة الأولى من أجل التأكيد العلمي لمختلف استعمالتهما.

كلمات المفتاح: الضرور، نار باردة، ازالة معدن الحديد، تعديل الجذور الحرة، تقنية الكروماتوغرافية.