

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Filière : Science Biologique
Option : Pharmacologie moléculaire



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Caractérisation de l'activité antioxydante de *Hyoscyamus albus*

Présenté par :

M^{elle} AGSOUS Nabila & M^{elle} BOUAOUINA Sarah

Soutenu le : **16 juin 2015**

Devant le jury composé de :

M^{me}. DEBBACHE N.

MCB

Présidente

M^{elle}. ADRAR S.

MAB

Encadreur

M. TACHERFIOUT M.

MAA

Examineur

M^{me}. BENSALÉM S.

Docteur

Co-promotrice

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

On remercie, **Dieu**, le tout puissant pour nous avoir donné la santé, la patience, la puissance et la volonté pour la réalisation et l'aboutissement de ce mémoire.

On voudrait remercier M^{elle} ADRAR S., on ne saura jamais la remercier assez pour son aide, sa disponibilité, son soutien, sa sympathie et pour le suivi qu'elle nous a accordé au déroulement de ce mémoire, on vous suit très reconnaissantes de nous avoir encadrer, d'avoir diriger ce travail et veiller à son élaboration en ne ménageant aucunement votre temps et vos conseils.

À cette même occasion, on tient à remercier notre co-promotrice M^{me} BENSALÉM S., pour sa disponibilité, ces conseils et les efforts qu'elle a consentit durant la réalisation de ce mémoire.

À vous, on vous prie de retrouver ici l'expression de notre respectueuse et profonde reconnaissance.

Madame BEDJOU F.,

Vous nous avez fait l'honneur de présider ce jury et de juger ce travail. On vous prie de trouver ici l'expression de notre profond respect et de notre entière reconnaissance.

Monsieur TACHERFOUIT M.,

On vous remercie de l'honneur que vous nous faites en acceptant d'examiner et d'évaluer ce travail. Soyez remerciés de votre présence dans ce jury et soyez assurés de tout notre respect et de notre profonde gratitude.

On aimerait également exprimer notre gratitude à tout nos professeurs de l'université A/Mira de Bejaia, ainsi qu'aux membres du laboratoire d'expérimentation animale.

On adresse, enfin et surtout, notre profonde gratitude et tout notre amour à nos parents, à nos frères et sœurs et à tout ceux qui sont chers à nos cœurs, qui ont su nous faire confiance et nous soutenir en toutes circonstances.

Merci

Dédicaces

En guise de reconnaissance, on dédie ce travail :

A nos merveilleux parents

A nos très chers frères et sœurs.

Respectifs,

On leur adresse un grand MERCI pour leur soutien inconditionnel, leur aide,

leurs encouragements et pour tous les sacrifices consentis ces derniers mois !

En témoignage de notre Amour.

On vous embrasse affectueusement.

A toute nos familles et nos chères amies.

Et surtout on dédie ce travail :

A la promotion 2014/2015 de **Pharmacologie Moléculaire**.

Nabila et Sarah

Liste des abréviations

ADN : Acide Desoxyribose-nucléique

CAT : La Catalase

Cu : Cuivre

CYP₄₅₀ : Cytochrome P450

ERN : Espèces réactives de l'azote

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

GPX : La glutathion peroxydase

GR : La glutathion réductase

GSH : Glutathion avec la forme réduite

GST : La glutathion S-transférase

IC₅₀ : La concentration de l'extrait inhibitrice de 50% des radicaux libre

LDL : Lipoprotéines de Densité Légère

N₂O₄ : Le peroxyde d'azote

Nm: Nanomètre

NO[•] : Le monoxydes d'azote

NO₂[•] : Le dioxyde d'azote

RL : Radicaux libres

ROO[•] : Radicaux peroxydes

SH : Groupement sulfohydroxyle

SNC : Système nerveux central

SOD : La superoxyde dismutase

TCR: Acide trichloro Acétique

TO[•] : Radicaux tocophéryles

UV : Ultra violet

XO : Xanthine oxydase

Zn : Zinc

Liste des figures

Figure N	Titre	Page
01	La plante de <i>Hyoscyamus albus</i>	3
02	Les différentes parties de la jusquiame blanche	4
03	Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie	9
04	Principaux sites cellulaires de productions des ERO	11
05	Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés	13
06	Oxydation des protéines par les ERO	13
07	Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules	14
08	Sites d'action des nutriments antioxydants (en rouge) et des enzymes antioxydants	19
09	Squelette de base des flavonoides	21
10	Structure chimique des tanins hydrolysable	21
11	Structure chimique des tanins condensés	22
12	Les acides phénoliques et le trans-resvératro	22
13	Réaction des flavonoïdes avec les ERO	23
14	Les flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques	24
15	Les élément essentielle pour l'activité antioxydant des flavonoïdes	24
16	La structure chimique de l'atropine	25
17	La structure chimique de l'hyoscyamine	26
18	La structure chimique de la scopolamine	26
19	La partie aérienne de <i>Hyoscyamus albus</i>	28
20	Séchage et broyage de la partie aérienne de la jusquiame blanche	28
21	Extraction à l'éthanol de la poudre de la partie aérienne de la jusquiame	29
22	(A) décantation a l'aide d'une éprouvette (B) l'extrait éthanolique humide (C) l'extrait brut sec	29
23	A : représente un schéma de l'appareil de soxlhet (1 : condenseur, 2 : vapeur, 3 : cartouche, 4 : ballon chauffée).B : extraction des alcaloïdes totaux par l'appareil de soxlhet	30
24	Décantation de l'extrait de la jusquiame. (A) Délipidation de l'extrait avec (phase aqueuse à 2% HCL /éther de pétrole) ; (B) Extraction des alcaloïdes avec du CHCL ₃ (phase aqueuse à pH 9/ CHCL ₃)	31
25	Le protocole de dosage des phénols totaux	32
26	Le protocole de dosage des flavonoïdes	33
27	Mécanisme de la réaction de la vanilline avec les tanins condensés	34
28	Le protocole de dosage des tanins condensés	34
29	La réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	35
30	Le protocole de l'activité scavenging du radical DPPH	35
31	Formation et piégeage du radical ABTS ⁺ par un antioxydant donneur deH	36
32	Protocole de l'activité scavenging du radical ABTS	36
33	Le principe de la chromatographie sur couche mince	38
34	Révélation des alcaloïdes totaux de la jusquiame.	42

35	Inhibition de l'activité scavenging du radical DPPH° par les extraits de la jusquiame blanche et par les standards (BHA et l'acide ascorbique).	43
36	Représentation graphique de l'évolution du pourcentage du radical DPPH° en fonction de la concentration de l'acide ascorbique et la BHA	44
37	Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition du radical ABTS ^{•+} en fonction de la concentration en extrait éthanolique	44
38	Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition du radical DPPH° en fonction de la concentration en extrait alcaloïdique	45
39	Pourcentage de l'activité inhibitrice du radical ABTS ^{•+} par les extraits de la jusquiame blanche et des standards (Trolox)	46
40	Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition du radical ABTS ^{•+} en fonction de la concentration en extrait éthanolique	47
41	Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition du radical ABTS ^{•+} en fonction de la concentration en extrait alcaloïdique	47
42	Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition du radical DPPH° en fonction de la concentration en Trolox	48
43	Profil chromatographique de l'extrait éthanolique de la partie aérienne de <i>Hyoscyamus albus</i> révélé à la lumière du jour. (1, 2, 3) : extrait éthanolique ; (4) : quercétine (5): acide gallique; (6) : rutine	49
44	Profil chromatographique de l'extrait éthanolique de la partie aérienne de <i>Hyoscyamus albus</i> révélé par la vanilline sulfurique. (1, 2, 3) : extrait éthanolique ; (4) : quercétine ; (5): acide gallique; (6) : rutine	50
45	Profil chromatographique de l'extrait éthanolique de la partie aérienne de <i>Hyoscyamus albus</i> sous UV. (1, 2, 3) : extrait éthanolique ; (4) : quercétine ; (5): acide gallique; (6) : rutine	50
46	Profil chromatographique de l'extrait alcaloïdique de la partie aérienne de <i>Hyoscyamus albus</i> révélé à la lumière du jour. (1, 2, 3) : extrait alcaloïdique	51
47	Profil chromatographique de l'extrait alcaloïdique de la partie aérienne de <i>Hyoscyamus albus</i> sous UV. (1, 2, 3) : extrait alcaloïdique	52
48	Profil chromatographique de l'extrait alcaloïdique de la partie aérienne de <i>Hyoscyamus albus</i> après pulvérisation par le réactif Dragendorff. (1, 2, 3) : extrait alcaloïdique	52
49	Le profil chromatographique des extraits de <i>Hyoscyamus albus</i> après pulvérisation par une solution de DPPH°. Extrait éthanolique: (1,2,3) extrait, (4) quercétine, (5) acide gallique, (6) rutine. Extrait alcaloïdique : (1,2,3) extrait.	53
50	Le profil chromatographique des extraits de <i>Hyoscyamus albus</i> après pulvérisation par une solution de ABTS ^{•+} . Extrait éthanolique: (1,2,3) extrait, (4) quercétine, (5) acide gallique, (6) rutine. Extrait alcaloïdique : (1,2,3) extrait	54

Liste des tableaux

Tableau N	Titre	Page
I	la classification de <i>Hyoscyamus albus</i>	5
II	les principaux dérivés primaires de l'oxygène	8
III	Les différentes espèces réactives de l'oxygène	10
IV	Les maladies causées par le stress oxydatif	15
V	Les deux types de protection antioxydants de l'organisme : les systèmes enzymatiques et les nutriments antioxydant	16
VI	Les différents antis oxydants non enzymatiques et leurs mécanismes d'action	17
VII	Principales classes des composés phénolique	20
VIII	Les différents types des alcaloïdes classés selon la forme et l'origine	25
IX	les différents solvants et réactifs utilisés pour l'extraction des métabolites secondaires	27
X	Les pourcentages d'extraction des extraits de <i>Hyoscyamus albus</i>	40
XI	Les teneurs en composés phénoliques	41
XII	Les IC ₅₀ des extraits éthanoliques et alcaloïdiques de <i>Hyoscyamus albus</i> .	48
XIII	Les couleurs des bandes des extraits sous UV et les composés correspondants	51

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I.1. Généralités sur <i>Hyoscyamus albus</i> (la jusquiame blanche)	3
I.1.1. Généralités sur les jusquiames	3
I.1.2. Historique et légende	3
I.1.3. Description botanique	4
I.1.4. Localisation	4
I.1.5. Taxonomie	5
I.1.6. Composition chimique	5
I.1.7. Usages thérapeutiques	5
I.1.8. Effet toxique	6
I.2. Radicaux libres	7
I.2.1. Définition d'un radical libre	7
I.2.2. Rôles physiologiques des espèces réactives	7
I.2.3. Les différents dérivés réactifs de l'oxygène	7
I.2.3.1. Les dérivés primaires de l'oxygène	8
I.2.3.2. Radicaux secondaires de l'oxygène	9
I.2.3.3. Les espèces réactives azotées (ERN)	10
I.2.4. Les sources endogènes de l'oxygène	10
I.2.5. Sources exogènes des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote	11
I.2.6. Le stress oxydatif	12
I.2.6.1. Définition	12
I.2.6.2. Conséquences biochimiques du stress oxydatif	12
I.2.6.2.1. Oxydation des lipides	12
I.2.6.2.2. Oxydation des protéines	13
I.2.6.2.3. Oxydation de l'ADN	14
I.2.6.3. Pathologies dues au stress oxydant	14

I.3. Les systèmes antioxydants	15
I.3.1. Définition	15
I.3.2. Les systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques	16
I.3.2.1. Les antioxydants non enzymatiques	16
I.3.2.2. Les antioxydants enzymatiques.....	18
I.3.2.2.1. La superoxyde dismutase (SOD)	18
I.3.2.2.2. La catalase	18
I.3.2.2.3. Le glutathion	18
I.3.3. Les polyphénols	19
I.3.3.1. Structure	20
I.3.3.2. Classification	20
I.3.3.3. Principales activités biologiques des polyphénols	23
I.3.3.3.1. Piégeage direct des radicaux libres	23
I.3.3.3.2. Chélation des ions métalliques	23
I.3.3.3.3. Inhibition enzymatique	24
I.3.4. Les alcaloïdes	24
I.3.4.1. Définition	24
I.3.4.2. Classification	25
I.3.4.3. Les alcaloïdes tropaniques	25
I.3.4.5. Activités biologiques des alcaloïdes	26

Chapitre II: Matériels et méthodes

II.1. Produits et réactifs chimique utilisés	27
II.2. Appareillage	27
II.3. Matériel végétal	27
II.4. Séchage et broyage	28
II.5. Extraction des polyphénols	28
II.6. Extraction des alcaloïdes totaux	29
II.7. Mise en évidence chimique des alcaloïdes	31
II.8. Dosage des composés phénoliques	32
II.8.1. Dosage des phénols totaux	32
II.8.2. Dosage des flavonoïdes.....	33
II.8.3. Dosage des tanins condensés (pro-anthocyanidines)	33

II.9. Evaluation des activités antioxydantes des extraits de la jusquiame blanche	34
I.9.1. Activité anti-radicalaire du DPPH [•]	35
II.9.2. Activité scavenging du radical ABTS ^{•+}	36
II.10. Chromatographie sur couche mince (C.C.M)	37
II.10.1. Principe	37
II.10.2. Méthode	37
II.10.3. Mise en évidence de l'activité antioxydante de radical DPPH [•] et ABTS ^{•+}	39
II.11. Etude statistique	39

Chapitre III: Résultats et discussions

III.1. Le taux d'extraction	40
III.2. Dosage des composés phénoliques.....	41
III.3. Mise en évidence chimique des alcaloïdes	42
III.4. Evaluation de l'activité antioxydante	42
III.4.1. L'activité scavenging du radical DPPH [•]	42
III.4.2. L'activité scavenging du radical ABTS ^{•+}	45
III.5. Fractionnement et caractérisation de l'activité antioxydante des extraits de <i>Hyoscyamus albus</i> par CCM	48
III.5.1. Fractionnement des extraits	48
III.5.1.1. Extrait éthanolique	48
III.5.1.2. Extrait alcaloïdique	51
III.5.2. Caractérisation de l'activité anti oxydante par CCM	53
III.5.2.1. Activité anti radicalaire du DPPH [•]	53
III.5.2.2. Activité inhibitrice du radical ABTS ^{•+}	54
Conclusion et perspectives	55
Références bibliographiques	57

Annexes

> INTRODUCTION

Introduction

L'oxygène est un gaz indispensable à la vie, apparu sur la terre il y a plus de 2 500 millions d'années, simultanément au développement de la photosynthèse par les algues bleues. A l'exception de certains organismes anaérobies et aérotolérants, l'oxygène est nécessaire à tous les animaux, plantes et bactéries pour produire de l'énergie, mais il représente paradoxalement une menace pour eux sans restriction de sa réactivité vis à vis des matières organiques par une configuration particulière, qualifiée de stress oxydant (**Gardès-Albert 2003**).

En effet les espèces réactives libérées par l'oxygène sont impliquées dans de nombreuses pathologies car elles sont considérées comme une source principale dans l'oxydation des unités fondamentales de la cellule telles que l'ADN, les protéines ou encore les lipides.

Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre de la balance oxydants/antioxydants et pour assurer les performances physiologiques et biologiques au sein de l'organisme (**Laguerre et al., 2007**).

Actuellement, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale constitue une source importante d'agents thérapeutiques, environ 25-30% de tous les médicaments sont dérivés des produits naturels (des animaux, des bactéries et des champignons), notamment les plantes, car ces dernières sont capables de produire de nombreux métabolites secondaires parmi lesquels on distingue les alcaloïdes et les composés phénoliques. Avec leurs diversités structurales remarquables, ces derniers, également appelés polyphénols, constituent une richesse largement exploitée par les industries agro-alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Les polyphénols sont présents dans toutes les parties de la plante. Ils entrent dans la composition des produits de consommation les plus courants, en particulier les fruits et légumes (**Muanda, 2010**).

Hyoscyamus albus est une plante médicinale qui appartient à la famille des Solanacées. Elle est utilisée pour ses nombreuses propriétés pharmacologiques (antioxydante, anti-inflammatoire, et hépatoprotectrice).

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce présent travail dont l'objectif essentiel consiste à déterminer dans les extraits de la partie aérienne de *Hyoscyamus albus* les fractions ou composés susceptibles de bloquer l'action des ERO et de protéger l'organisme contre les dommages oxydatifs qu'elles peuvent induire en utilisant des systèmes chimiques et biologiques *in vitro*.

La partie théorique traite des généralités sur la plante *Hyoscyamus albus* ainsi que sur les différents radicaux libres de l'oxygène et leurs impact consécutif au niveau cellulaire mais aussi les différents systèmes dont l'organisme dispose à fin de neutraliser et contrer l'action des radicaux libres.

La partie pratique sera focalisée sur une analyse quantitative et qualitative du contenu en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés ainsi qu'en alcaloïdes des extraits éthanoliques et alcaloïdiques de la plante. Et puis une caractérisation de l'activité antioxydante vis-à-vis du radical libre relativement stable (DPPH[•]) et du radical cationique (ABTS^{•+}).

> Chapitre

I

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Généralités sur *Hyoscyamus albus* (la jusquiame blanche)

I.1.1. Généralités sur les jusquiames

Les jusquiames sont des plantes appartenant au genre *Hyoscyamus* et à la famille des Solanacées. Ce genre comprend 15 espèces annuelles, bisannuelles ou vivaces, dont plusieurs sont employées en médecine (**Guignard, 1998**). Parmi elles on trouve : la jusquiame noire (*Hyoscyamus niger*), la jusquiame blanche (*Hyoscyamus albus*) représentée dans la figure 01, la jusquiame dorée (*Hyoscyamus aureus*) et la jusquiame d'Egypte (*Hyoscyamus muticus*) (**Alphonse, 1864**).



Figure 01: La plante de *Hyoscyamus albus* [1].

I.1.2. Historique et légende

Les jusquiames ont une histoire riche de légendes et de superstitions, utilisées pour leurs propriétés médicinales depuis des millénaires.

En 1550 av. J.C., la jusquiame est mentionnée sur le papyrus Ebers de l'Egypte pharaonique, où elle voisine avec l'opium et le chanvre. Elle est connue et utilisée comme un poison violent (**Mazars, 2002**).

Hyoscyamus albus est l'une des plantes hallucinogènes les plus importantes d'Europe, elle était utilisée à des fins divinatoires ou pour des fumigations rituelles dans la Grèce antique (**Schultes et Hofmann, 1993**).

La scopolamine est un alcaloïde toxique de la plante, elle fait perdre la volonté et elle est responsable d'une amnésie antérograde. Elle a été utilisée comme «sérum de vérité» pendant la seconde guerre mondiale (**Goullé et al., 2004**).

I.1.3. Description botanique

La jusquiame blanche est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle, qui mesure de 30 à 90 cm de hauteur, rameuse, visqueuse et velue, qui dégage une odeur forte. Les feuilles entières irrégulièrement dentées sont ovales et longues 5 à 10 cm sur la partie supérieure, pétiolées et allongées. Les fleurs sont de longueur de 1 à 3 cm, bilabiées et disposées en cymes scorpoïdes. Le calice est très velu, campanulé, et divisé en 5 dents. La corolle est blanchâtre ou d'un jaune très pale (Figure 02). Le fruit est une capsule contenant plusieurs graines blanches, enfermées dans le calice (**Schultes et Hofmann, 1993 ; Alphonse, 1864 ; Goullé et al., 2004**).

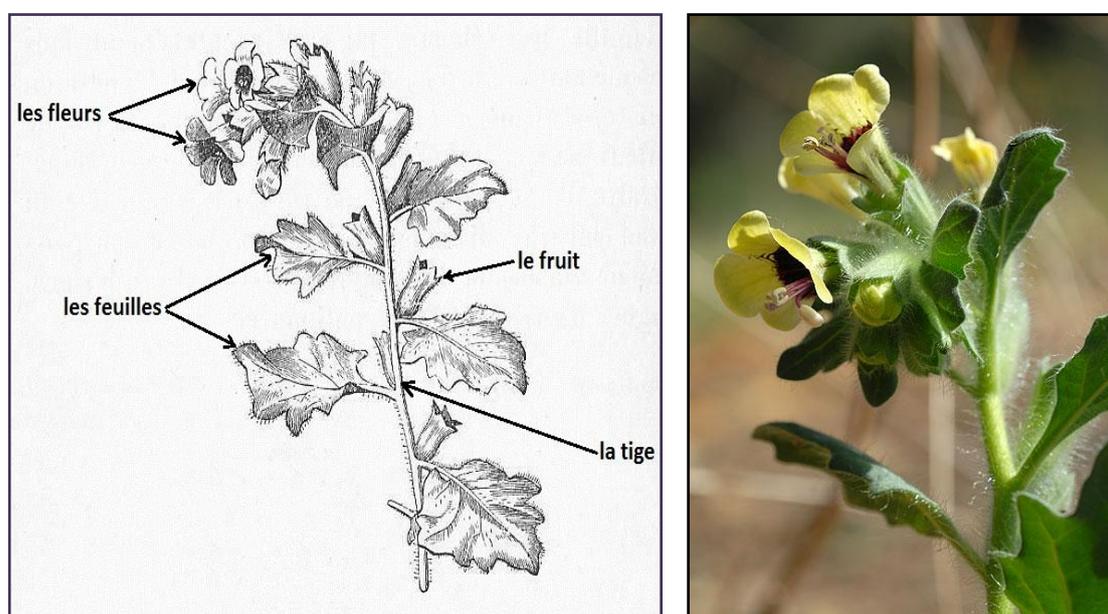


Figure 02: Les différentes parties de la jusquiame blanche [2, 3].

I.1.4. Localisation

La jusquiame blanche pousse dans le midi de la France, on la trouve fréquemment dans la Lorraine, le Languedoc et la Provence mais aussi au subcontinent indien (**Alphonse, 1864 ; Benhouda et Yahia, 2014**). Elle pousse sur les talus, les falaises, les friches et les plages de galets en Europe, en Afrique du nord et en Asie (**Guignard, 1998**), comme on peut la rencontrer en Libye (**Alghazeer et al., 2012**). Elle se retrouve aussi en Algérie (Bejaia, Annaba).

I.1.5. Taxonomie

Tableau I : La classification de *Hyoscyamus albus* (Palazón, 2008 ; Michel, 2001).

Règne	Végétale
Embranchement	Magnoliophyta (angiospermes)
Classe	Dicotylédones
Ordre	Solanales
Famille	Solanaceae
Genre	Hyoscyamus
Espèce	<i>Hyoscyamus albus</i>

Noms vernaculaires: white henbane (anglais) / sikran ou gengit (arabe) / bounarjouf ou taylout (kabyle).

I.1.6. Composition chimique

L'analyse phytochimique révèle la présence d'alcaloïdes tropaniques, stéroïdes, terpenoïdes, le 2,3-diméthylnonacosane et une grande quantité de composés phénoliques (dans les extraits méthanoliques) tels que les flavonoïdes, tanins condensés et saponines (Benhouada et Yahia, 2014 ; Mahmood et al., 2001).

La jusquiame contient de 0,2 à 0,5 % d'alcaloïdes, majoritairement sous forme de L-hyoscyamine mais également sous forme d'atropine et de scopolamine. La L-hyoscyamine et l'atropine représentent 67 % des alcaloïdes totaux de la plante sèche, et la scopolamine 33 % (Goullé et al., 2004 ; Guignard, 1998).

I.1.7. Usages thérapeutiques

La composition phytochimique très variée de la jusquiame lui confère plusieurs effets thérapeutiques.

- La jusquiame est utilisée en médecine traditionnelle comme parasympholytique et sédatif du système nerveux (Benhouada et Yahia, 2014).
- Les flavonoïdes exercent des activités antioxydantes, anti-inflammatoires et hépatoprotectrices (Tapas et al., 2008), aussi ils ont un rôle comme analgésique en ciblant les prostaglandines (Ferdous et al., 2008).

- Les tanins de la jusquiame jouent un rôle dans l'activité anti-nociceptive (**Vanu et al., 2006**).
- L'hyoscyamine et la scopolamine sont utilisées en médecine, à savoir en ophtalmologie, dans le traitement des spasmes gastro-intestinaux, dans le traitement d'empoisonnement par les organophosphorés et comme anesthésique (**Romeike, 1956**), elles sont aussi utilisées grâce à leurs propriétés mydriatiques et anticholinergiques (**Strauss, 1989**).

I.1.8. Effet toxique

Chez l'homme, ces alcaloïdes conduisent en cas d'intoxication à un syndrome anti cholinergique. Les principaux signes cliniques sont : mydriase, sécheresse cutanée et muqueuse, vasodilatation, tachycardie, agitation, hallucinations, convulsions, coma et dépression respiratoire (**Goullé et al., 2004**).

Les doses toxiques d'atropine produisent une stimulation centrale avec agitation, irritabilité, désorientation, hallucinations ou délire. Il dilate les vaisseaux cutanés, en particulier ceux du visage donnant un aspect rouge caractéristique.

La scopolamine est fortement hallucinogène (**Schultes et Hofmann, 1993**), c'est un dépresseur du SNC (**Brown and Taylor, 2006**).

Le traitement d'une intoxication à la jusquiame est symptomatique : hydratation, sédation, prévention ou traitement des convulsions, mesures de réanimation dans les cas les plus graves (**Brown et Taylor, 1990**).

I.2. Espèces réactives de l'oxygène

I.2.1. Définition

C'est une espèce chimique, molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante en contenant un ou plusieurs électrons célibataires. Cela lui confère une forme instable et une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, cette espèce aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable, il va donc se réduire en oxydant un autre composé (**Halliwell, 1996**).

I.2.2. Rôles physiologiques des espèces réactives

En situation physiologique, les espèces réactives oxygénées (ERO) sont formées en continu dans l'organisme. Ainsi, les radicaux libres (RL) générés de façon permanente par le métabolisme normal de l'oxygène, ils ne sont pas seulement des produits agressifs mais aussi des modulateurs des voies de signalisation et de l'expression de gènes qui participent à l'homéostasie vasculaire. Ils jouent le rôle de messenger pour la cellule, dans l'apoptose et dans la défense contre les infections (**Human, 2002**).

I.2.3. Les différents dérivés réactifs de l'oxygène

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie qui sont les radicaux primaires qui dérivent de l'oxygène ou de l'azote par des réductions avec un électron (**Yoshikawa, 2000**). Alors que les radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les biomolécules de la cellule.

D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, ne sont pas des RL, mais elles sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux (**Favier, 2003**).

I.2.3.1. Les dérivés primaires de l'oxygène

Tableau II: Les principaux dérivés primaires de l'oxygène.

Les dérivés primaires non radicalaires	
Le peroxyde d'hydrogène H₂O₂	Ce n'est pas un radical libre à proprement parler mais une molécule car tous ses électrons périphériques sont appariés. Cependant, il peut générer des radicaux hydroxyles HO [•] en présence de cations métalliques tels que Fe ²⁺ (réaction de Fenton), ou de Cu ⁺ (Belkheiri, 2010).
$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} (\text{Cu}^+) \rightarrow \text{HO}^\bullet + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+} (\text{Cu}^{2+}) \quad (1)$	
L'oxygène singulet ¹O₂	Il peut être produit par plusieurs réactions biochimiques d'oxydation incluant la peroxydase et la lipooxygénase, par la réaction entre divers ERO ou en présence de la lumière. Bien qu'il ne soit pas un radical, il joue un rôle dans le vieillissement cutané et certaines maladies liées à l'âge (Choe et Min, 2005 ; Hennebelle, 2006).
$\text{O}_2 \xrightarrow{h\nu} \text{}^1\text{O}_2 \quad (2)$	
L'acide hypochlorique HOCl	Cette espèce est produite par La myéloperoxydase, enzyme qui convertit le peroxyde d'hydrogène en acide hypochlorique (HOCl) dans le phagosome des neutrophiles polymorphonucléaires à des concentrations physiologiques. Ce dernier peut réagir avec les fonctions aminées des protéines pour former des chloramines (Martinez, 2004).
$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{Cl}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{HOCl} \quad (3)$	
Espèces radicalaire de l'oxygène	
Le radical superoxyde O₂^{•-}	Le radical superoxyde est produit à partir de l'oxygène moléculaire, principalement par les cellules phagocytaires (neutrophiles, monocytes, macrophages, éosinophiles), et il participe à l'inactivation des virus et bactéries (Nohl, 1994).
Le radical hydroxyle OH[•]	Agent très oxydant, il peut être produit à partir de l'eau par les radiations ionisantes dans tous les organismes vivants mais il est surtout formé par la réaction de Fenton (Mc Cord, 1993) à partir d'H ₂ O ₂ .
$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{Fe}^+ \quad (4)$	
Le radical hydroperoxyde HO₂[•]	C'est la forme protonée de l'anion superoxyde. L'anion superoxyde est en équilibre constant avec le radical hydroperoxyde (HO ₂ [•]) qui est beaucoup plus oxydant que lui (Hool et clin, 2006).

I.2.3.2. Radicaux secondaires de l'oxygène

➤ Le radical peroxyde RO_2^\bullet

C'est un radical secondaire issu de l'addition de l'oxygène sur les radicaux centrés sur le radical R^\bullet . Sa réactivité se situe entre le radical anion superoxyde et le radical hydroxyle (Rezaire, 2012).

➤ Le radical secondaire alkoxyde RO^\bullet

Le radical alkoxyde est produit suite à la décomposition de l'hydroperoxyde RO_2H , issu de l'oxydation du substrat RH , par des cations métalliques (Rezaire, 2012).

Les origines des différents RL et ERO ainsi que leurs cibles moléculaires sont représentés dans la figure 03.

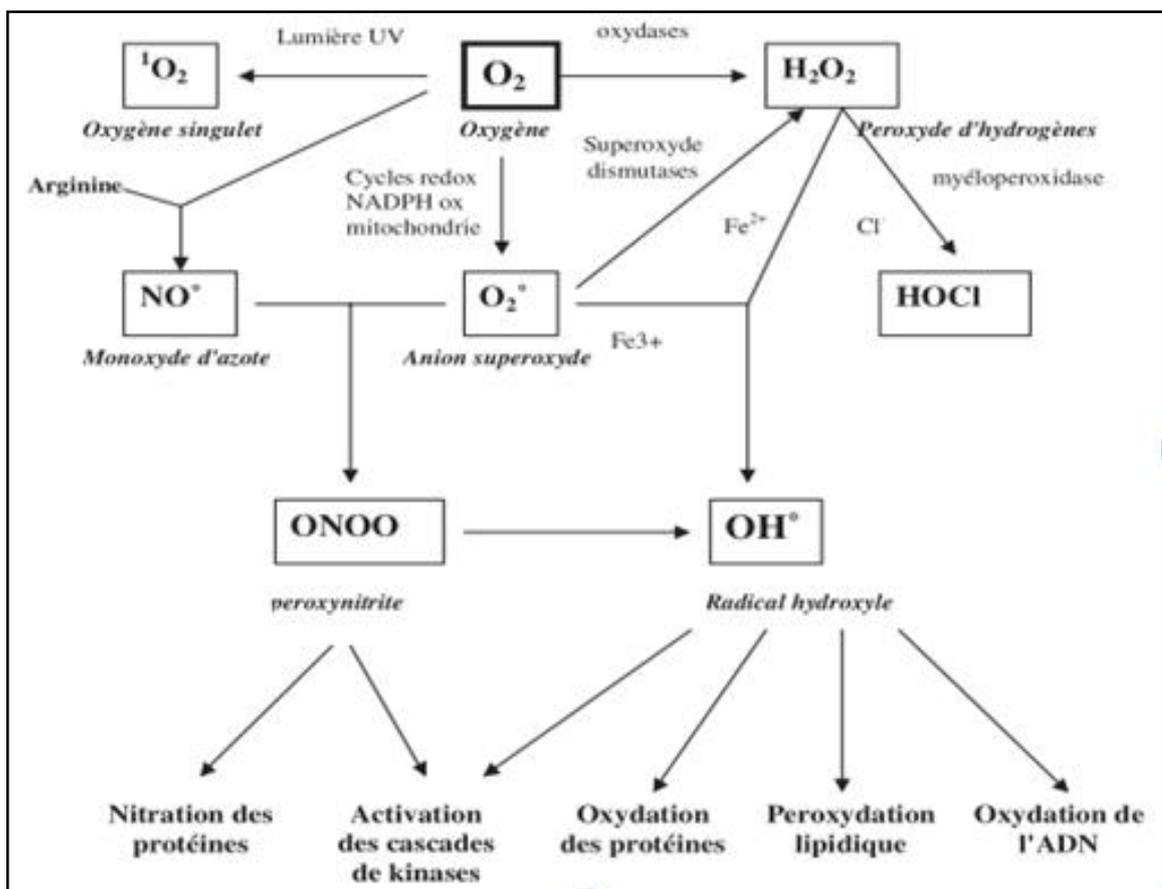


Figure 03 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003).

I.2.3.3. Les espèces réactives azotées (ERN)

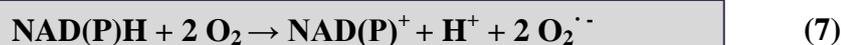
Tableau III : Les différentes espèces réactives de l'oxygène.

Espèces radicalaires azotées	
Le monoxyde d'azote (NO[•])	C'est un second messager de courte vie qui diffuse rapidement à partir de son site de production et qui remplit un rôle vasodilatateur (Hobbs et al., 1999 ; Alderton et al., 2001). Il réagit très rapidement avec O ₂ ^{•-} pour former ONOO ⁻ et avec O ₂ pour former N ₂ O ₄ (Deby, 2009a). C'est un oxydant faible incapable de nitration (Sertejn et al., 2002).
Espèces non radicalaires de l'azote	
Le peroxydinitrite (ONOO⁻)	Il est non radicalaire, instable et très oxydant, comme HOCl (Sertejn et al., 2002). Sa formation est endogène et aurait lieu dans les macrophages, les neutrophiles, les cellules endothéliales et les mitochondries (Sertejn et al., 2002 ; Deby, 2009a).
$\text{NO}^{\bullet} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{ONOO}^- \quad (5)$	
Le dioxyde d'azote NO₂[•]	Abondant dans les polluants de l'atmosphère des villes, se formerait aussi <i>in vivo</i> par réaction entre NO [•] , O ₂ et NO ₂ . Le NO ₂ [•] attaque les doubles liaisons des acides gras non-saturés et les transforme soit de cis- en trans, soit par nitration. Le NO ₂ [•] s'ajouterait aux doubles liaisons d'autres molécules (Deby, 2009a).
$2 \text{NO}^{\bullet} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{NO}_2 \quad (6)$	

I.2.4. Les sources endogènes des ERO

I.2.4.1. La NAD(P)H oxydase

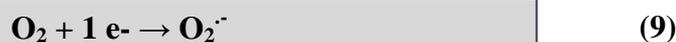
La NAD(P)H oxydase est une enzyme membranaire qui catalyse la réduction de l'oxygène selon :



Les cytochromes P450, accepteurs terminaux d'électrons du complexe (IV) de la chaîne de transport des électrons, situés dans la membrane mitochondriale, catalysent la réaction :



Cette chaîne de transport laisse fuir une certaine proportion d'électrons, environ 2 %, qui vont réduire partiellement l'oxygène pour aboutir à la formation du radical superoxyde (**Delattre et al., 2005b**). Selon l'équation :



I.2.4.2. La mitochondrie

L'oxydation des acides carboxyliques dans le cycle de Krebs libère de l'énergie qui est transportée par des électrons de haut niveau d'énergie sur les FAD et NAD^+ sous forme des réducteurs FADH_2 et NADH . Ces électrons perdent progressivement leur énergie en traversant la chaîne de transport d'électrons située dans la membrane interne de la mitochondrie. Leur ultime rôle est de réduire l'oxygène moléculaire d'un coup, en produisant de l'eau, sans former des composées intermédiaire (Deby, 2009b).

I.2.4.3. La xanthine-oxydase

La xanthine-oxydase joue un rôle important dans la production des ROS (particulièrement $\text{O}_2^{\cdot -}$ et H_2O_2), lors de l'ischémie/reperfusion (Mabile, 1997 ; Bartosz, 2003).

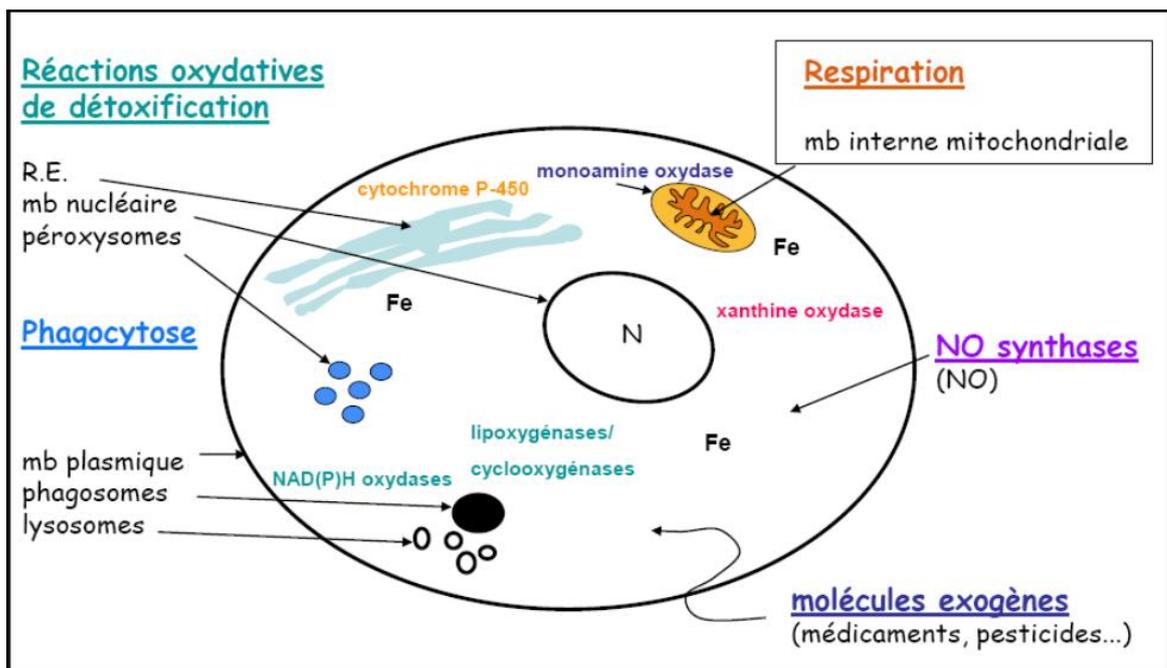
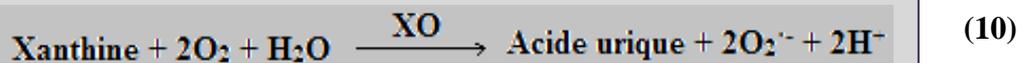


Figure 04 : Principaux sites cellulaires de productions des ERO (Sekli-belaidi, 2011).

I.2.5. Sources exogènes des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Elles sont surtout d'origine physique et chimique (ex. radiations X ou gamma, UV:315 à 400 nm), radiolyse de l'eau, réactions photochimiques (Belkheiri, 2010).

Les facteurs environnementaux incluant des agents cancérigènes non-génotoxiques peuvent directement, ou indirectement, être impliqués dans la génération de radicaux libres (xénobiotiques, activation des leucocytes) (Martinez, 2004).

L'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂) présents dans notre mode de vie (tabagisme, radiations ionisantes, champs électriques, polluants industriels.), ainsi qu'une alimentation « chimiquée » (raffinée, riche en graisses saturées et en sucre, consommation d'alcool...), sont autant d'éléments favorisant la genèse de radicaux libres (**Mena et al., 2009**).

I.2.6. Le stress oxydatif

I.2.6.1. Définition

Le stress oxydatif apparaît dans une cellule quand l'équilibre entre les espèces pro-oxydantes et antioxydantes est rompu en faveur de l'état pro-oxydant. La rupture de cet équilibre est due à la promotion d'espèces actives de l'oxygène, ou radicaux libres oxygénés (**Gutteridge, 1995 ; Halliwell, 1996**). On distingue deux types de stress : le stress biotique et abiotique (**Béguel, 2012**).

Dans les systèmes vivants, la production des radicaux libres oxygénés se fait de manière continue. Toutes les molécules biologiques possédant des doubles liaisons sont particulièrement affectées par les radicaux libres, entraînant de très grande réactivité de ces espèces chimiques vis-à-vis des lipides, des protéines et de l'ADN. C'est pourquoi les effets des radicaux libres sont retrouvés dans tout l'organisme et dans des pathologies très variées (**Goudable et Favier, 1997 ; Favier, 2003**).

I.2.6.2. Conséquences biochimiques du stress oxydatif

I.2.6.2.1. Oxydation des lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde (Figure 05). Cette réaction appelée la peroxydation lipidique (**Esterbauer et al., 1992**).

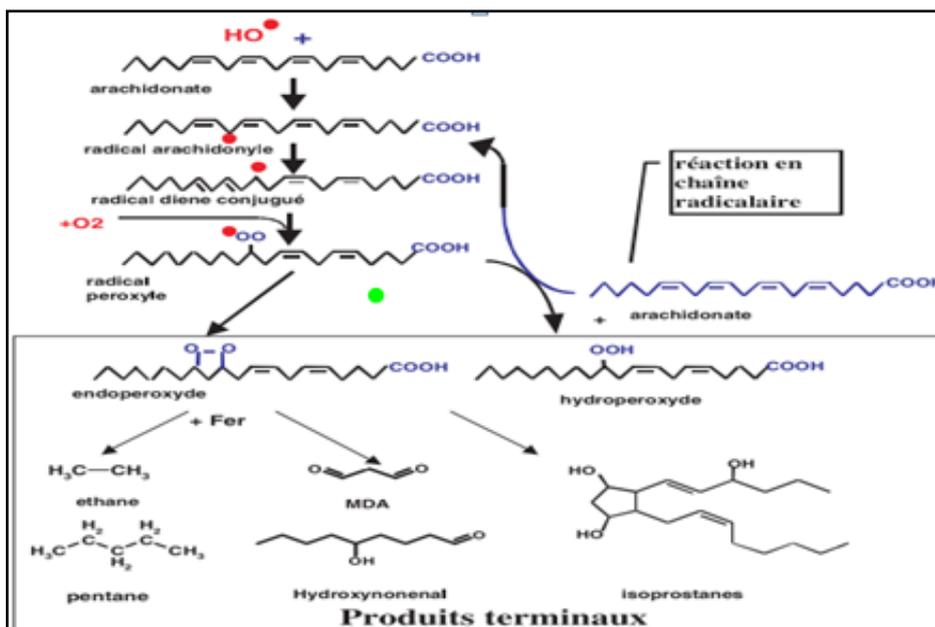


Figure 05 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003).

I.2.6.2.2. Oxydation des protéines

Les protéines à groupement sulfhydroxyle (SH) sont les plus sensibles aux attaques radicalaires. C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. D'autres lésions irréversibles conduisent à la formation d'un intermédiaire radicalaire, aboutissant à la perte des fonctions biologiques des protéines (Figure 06) (Favier, 2003).

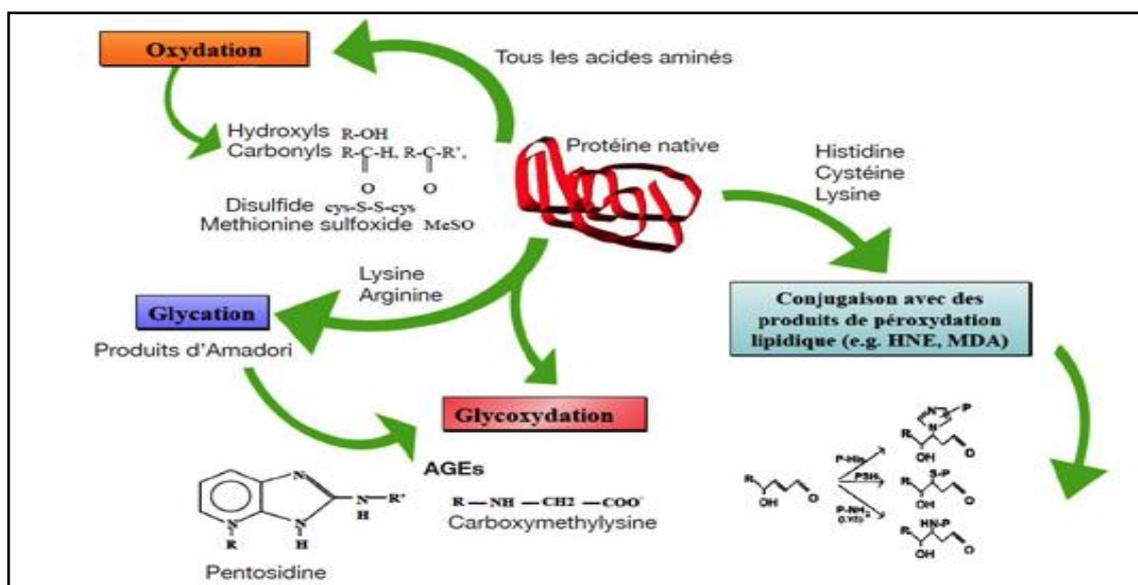


Figure 06: Oxydation des protéines par les ERO (Mputu KANYINDA et al., 2014).

I.2.6.2.3. Oxydation de l'ADN

Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation du désoxyribose et des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées (Figure 07) (Favier, 2003).

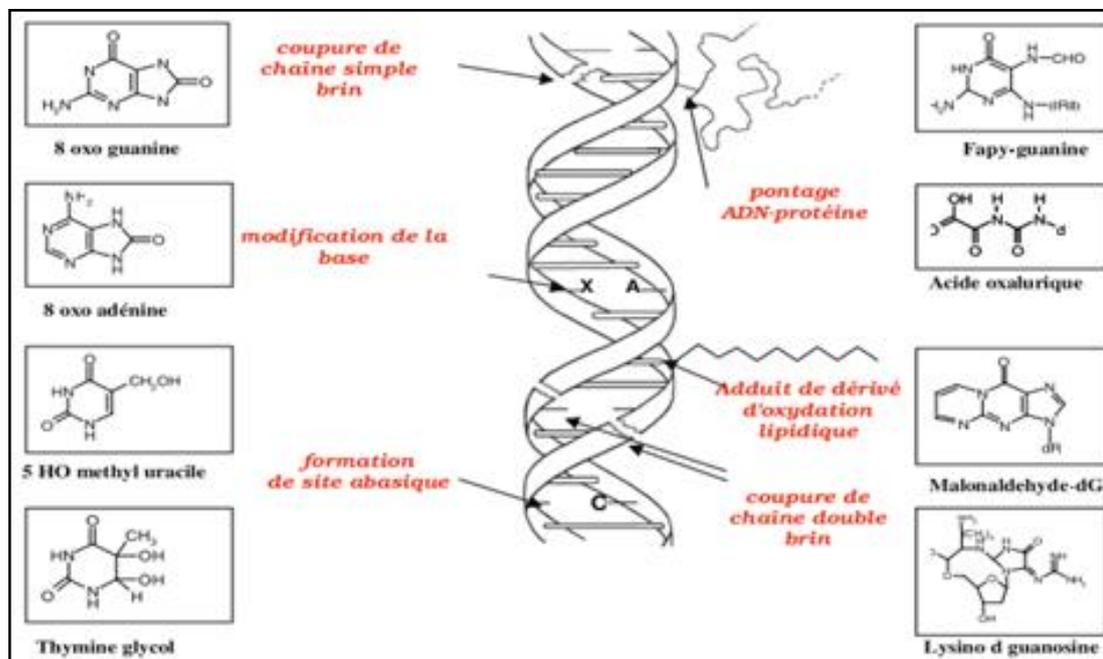


Figure 07 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003).

I.2.6.3. Pathologies dûes au stress oxydant

Le stress oxydant est l'un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles telles que le diabète, les rhumatismes, les maladies cardiovasculaires, le syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire et le vieillissement accéléré (Montagnier et al., 1998). Les plus fréquentes sont citées dans le tableau IV :

Tableau IV: Les maladies causées par le stress oxydatif.

Maladies	Explication	Références
Maladies neurodégénératives	Le rôle du stress oxydant dans les mécanismes de mort cellulaire au cours des maladies neurodégénératives est évoqué depuis plusieurs années. Parmi ces affections, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique et la maladie de Parkinson sont les plus fréquentes.	(Christen, 2000)
Cancer	Il a été démontré que ni $O_2^{\cdot-}$, ni H_2O_2 ne pouvaient réagir avec le désoxyribose ou les bases de l'ADN, ce qui suggère que le radical OH^{\cdot} serait le principal responsable des dégradations observées.	(Sekli-belaidi, 2011)
Cataracte	Le stress oxydant a aussi été évoqué dans la survenue de la cataracte qui est la première cause de cécité.	(Sekli-belaidi, 2011)
Allergie	Dans le cas de l'asthme et de rhinite allergique, les éosinophiles relèguent des médiateurs de l'inflammation notamment le radical $O_2^{\cdot-}$. Ainsi, dans toutes les pathologies, les ERO interviennent sur le site de l'inflammation.	(Lupu et al., 2010) (Cooper et hall, 1993)
Athérosclérose	Il est actuellement admis que l'athérosclérose est liée à la peroxydation des LDL qui conduit à la genèse de la plaque athéromateuse.	(Nezamzadeh et al., 2007)

I.3. Les systèmes antioxydants

Certaines molécules présentes dans l'organisme ont des propriétés anti-radicalaires. Ces antioxydants sont pour la plupart apportés par l'alimentation, d'où l'attention portée aux aliments dans le renforcement du système de défense contre le stress oxydant.

I.3.1. Définition

Les antioxydants agissent par échange ou appariement d'électron célibataire. Ils sont capables d'inactiver les espèces réactives de l'oxygène par des processus d'oxydo-réductions. Il s'agit en quelque sorte de substance à effet tampon : lorsqu'elles sont présentes dans des zones de risque, comme les membranes cellulaires, certaines protéines et l'ADN (Human, 2002).

I.3.2. Les systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques

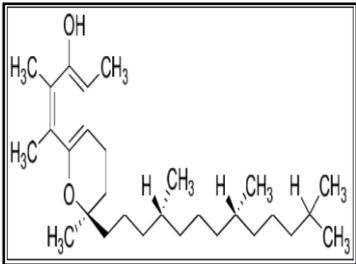
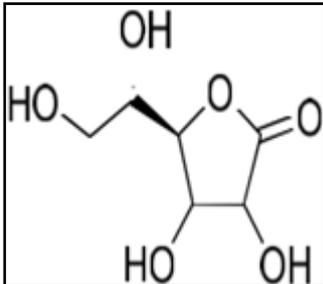
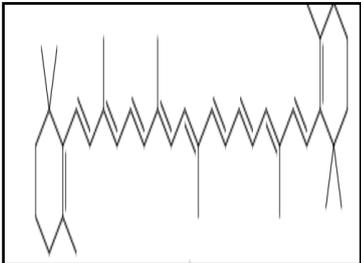
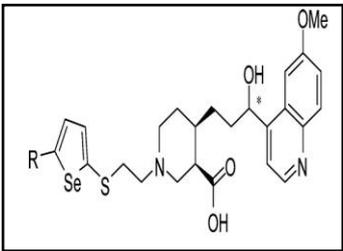
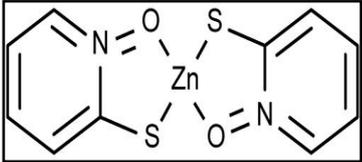
Tableau V : Les deux types de protection antioxydants de l'organisme : les systèmes enzymatiques et les nutriments antioxydants (**Pastre, 2005**).

Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes	Systèmes antioxydants d'origine alimentaire
Superoxyde dismutase	Vitamine E
Glutathion peroxydase	Vitamine C
Catalase(s)	Caroténoïdes (lycopene, luteine,...), taurine
Lipases, protéases, endonucléases	Polyphénols
Albumine, ferritine	Minéraux et oligo-éléments

I.3.2.1. Les antioxydants non enzymatiques

D'autres substances exogènes apportées par l'alimentation, telles que la vitamine E (tocophérol), la vitamine C (acide ascorbique), ou les caroténoïdes agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules stables (**Pincemail et al., 2002 ; koechlin–ramonatxo, 2006**). La vitamine piégeuse devient à son tour un radical qui sera détruit ou régénéré par un autre système (Tableau V) (**Pincemail et al., 2002**).

Tableau VI: Les différents antioxydants non enzymatiques et leurs mécanismes d'actions.

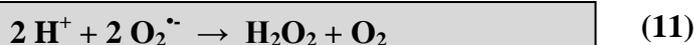
Molécules	Structure	Mécanismes d'action
Vitamine E		<p>-Lutte contre la peroxydation lipidique.</p> <p>-Les tocophérols (TOH) cèdent aux (ROO•) un atome d'hydrogène phénolique et sont transformés en radicaux tocophéryles (TO•) capables de réagir avec d'autres formes radicalaires pour former des produits stables (Rietjens et al., 2002).</p>
Vitamine C		<p>- Capte les anions superoxydes, hypochlorites, hydroxyles et l'oxygène singulet.</p> <p>- <i>in vitro</i>, il inhibe la peroxydation lipidique avant l'intervention de la vitamine E.</p> <p>- Il protège les membranes vis à vis de l'attaque peroxydative, en piégeant efficacement les radicaux peroxydes ROO• dans la phase aqueuse, avant qu'ils puissent initialiser les peroxydations (Pastre, 2005).</p>
Caroténoïde		<p>Ils agissent en tant qu'antioxydants selon plusieurs mécanismes par exemple, bloquer les chaînes de réactions radicalaires, selon les équations suivantes :</p> $BC + ROO\cdot \longrightarrow BC\cdot$ $BC\cdot + O_2 \rightleftharpoons BC-O\cdot$ $BC + ROO\cdot \longrightarrow \text{Produits inactifs} \text{ (Pastre, 2005)}$
Les oligoéléments		
Sélénium		<p>Il entre dans la constitution de la glutathion peroxydase (GPx). Cette enzyme sélénodépendante participe au recyclage du glutathion et réduit la peroxydation lipidique en catalysant la réduction du peroxyde d'hydrogène (Di silvasrto, 2000).</p>
Zinc		<p>- Limitation de la production endogène de RL.</p> <p>-Participation à la structure et à la fonction du SOD (Di silvasrto, 2000).</p>

I.3.2.2. Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (le superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ERO (**Blandine, 2006**).

I.3.2.2.1. La superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est une des plus importantes enzymes cellulaires possédant une fonction antioxydante la plus importante dans toutes les cellules vasculaires car elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygénée. L'absence de cette enzyme peut être létale (**Soulère et al., 2002 ; Salvayre, 2003**).



I.3.2.2.2. La catalase

La catalase est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes. Elle catalyse la réaction de détoxification du H_2O_2 (généralement produit par la SOD). Elle est surtout présente au niveau des globules rouges et du foie (**Soulère et al., 2002 ; Salvayre, 2003**).



I.3.2.2.3. Le glutathion

➤ La glutathion peroxydase

Ou GPX est une enzyme tétramérique permettant également la décomposition du H_2O_2 produit de manière continue dans l'organisme. Elle agit plus lentement que la catalase mais elle a une meilleure affinité pour le H_2O_2 que cette dernière (**Deby, 2009a**).



➤ La glutathion réductase (GR)

Elle n'est pas une enzyme antioxydante proprement dite dans le sens où elle n'a pas d'action directe sur les ERO. En revanche, elle a un rôle très important dans la réduction du glutathion, puissant antioxydant et co-substrat de la GPX. La GR permet la régénération du glutathion sous sa forme réduite via la consommation de NADPH, évitant ainsi la synthèse de novo du glutathion (**Deby, 2009a**).



(15)

➤ **La glutathion S-transférase (GST)**

Elle a également une action indirecte sur la détoxification des ERO puisqu'elle permet le transport du GSH vers les compartiments cellulaires subissant des dommages oxydatifs. Elle permet la liaison du GSH à certains xénobiotiques ainsi qu'aux aldéhydes issus de la peroxydation lipidique. Elle joue un rôle central dans la détoxification des ERO par le GSH (Beguél, 2012).

Les sites d'actions des systèmes antioxydants sont résumés dans la figure 08.

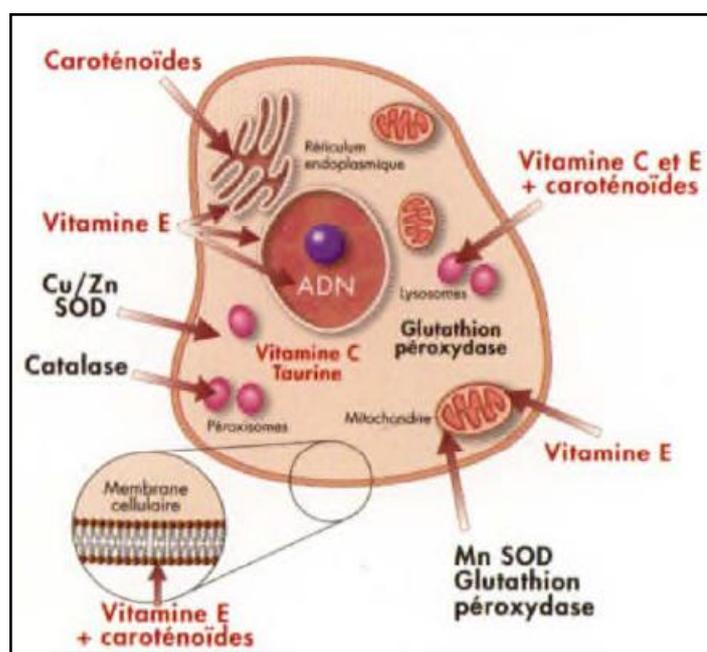


Figure 08 : Sites d'action des nutriments antioxydants (en rouge) et des enzymes antioxydantes (en noir) (Opara, 2002).

I.3.3. Les polyphénols

Les composés phénoliques, ou polyphénols, constituent une famille de molécules organiques largement présentes dans le règne végétal. On les retrouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits, et ils font donc partie intégrante de notre alimentation. Ce sont des métabolites secondaires produits par les plantes pour interagir avec les autres végétaux et les animaux (Rezaire, 2012).

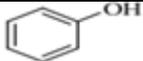
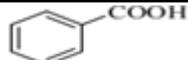
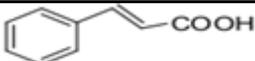
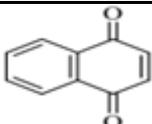
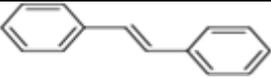
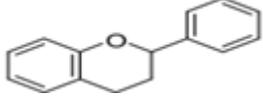
I.3.3.1. Structure

Les phénols sont des molécules qui contiennent un ou plusieurs noyaux aromatiques avec un ou plusieurs groupes hydroxyles (OH). Ils peuvent être extraits à partir de plantes ou synthétiques (Bouguerne, 2012).

I.3.3.2. classification

Les polyphénols naturels peuvent donc être des molécules simples comme les acides phénoliques, mais aussi des composés hautement polymérisés comme les tanins (Bravo, 1998). Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à ce jour dans le règne végétal (Tableau VII).

Tableau VII: Les principales classes des composés phénoliques.

Squelette carboné	Classe	Structure de base
C ₆	Phénols simples	
C ₆ -C ₁	Acides hydroxy benzoïques	
C ₆ -C ₃	Acides hydroxy cinnamiques Coumarines	
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbénes	
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines	
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés	

I.3.3.2.1. Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde rassemble de nombreux composés naturels répartis en plusieurs classes dont les plus importantes sont les flavones, les flavanols, les flavanones, les isoflavones et les anthocyanes. Les propriétés chimiques de ces composés varient suivant leur classe, leur degré d'hydroxylation, le degré de méthylation et le niveau de glycosylation (Anderson *et al.*, 1995 ; Nkhili, 2009).

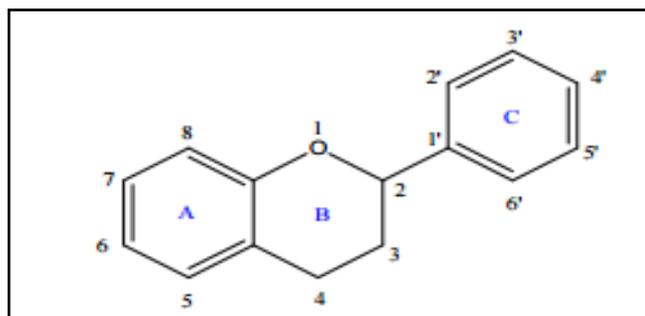


Figure 09 : Squelette de base des flavonoïdes (Nkhili, 2009).

I.3.3.2.2. Les tanins

Les tanins sont un groupe de polyphénols à haut poids moléculaire. Ce sont des molécules fortement hydroxylées et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux (Alkurd *et al.*, 2008 ; Anderson *et al.*, 1995).

➤ Les tanins hydrolysables

Ces tanins sont des dimères d'acide gallique (l'acide hexahydroxydiphénique) condensés sur un dérivé glycosyle. Ils subissent facilement une hydrolyse acide et basique ou encore sous une action enzymatique et par l'eau chaude (Figure 10) (Conrad *et al.*, 1998).

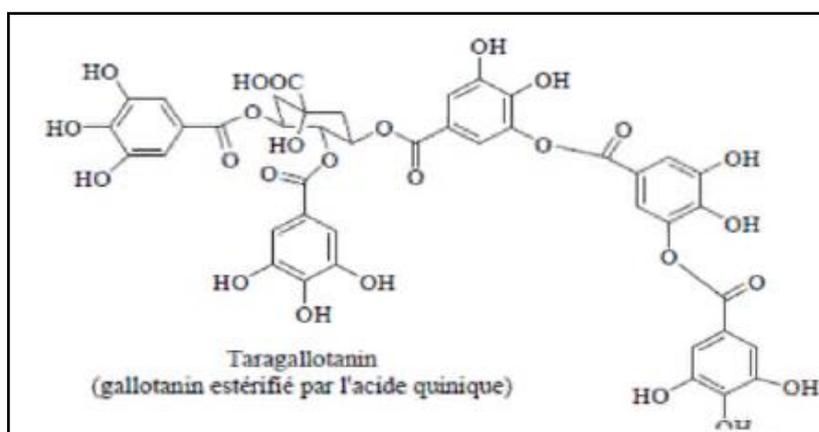


Figure 10: Structure chimique des tanins hydrolysables (Bruneton, 2009).

➤ Les tanins condensés

Appelés aussi proanthocyanidines ou procyanidines, de masse molaire élevée. Ils résultent de la polymérisation auto oxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diols liées majoritairement par les liaisons C4-C8 des unités adjacentes, et se nomment ainsi proanthocyanidines de type B (Figure 11) (Dykes *et Rooney*, 2006).

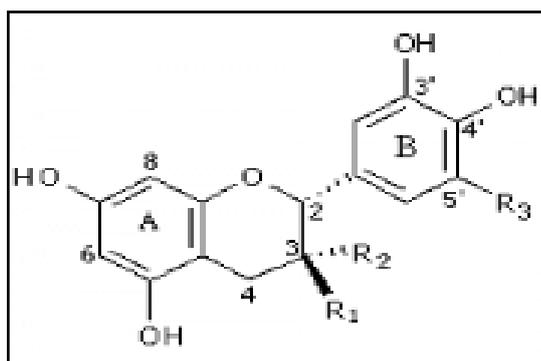


Figure 11 : Structure chimique des tanins condensés (Guignard, 1998).

I.3.3.2.3. Les acides phénoliques

On distingue deux sous groupes: les dérivés d'acide benzoïque et les dérivés d'acide cinnamique. Les acides hydroxybenzoïques sont à la base de structures complexes comme les tanins hydrolysables présents dans les fruits rouges (Manach *et al.*, 2004). Les acides hydroxycinnamiques sont plus abondants que les acides hydroxybenzoïques. Ils sont principalement composés d'acide coumarique, caféïque, férulique et sinapique (Figure 12) (El Gharras, 2000).

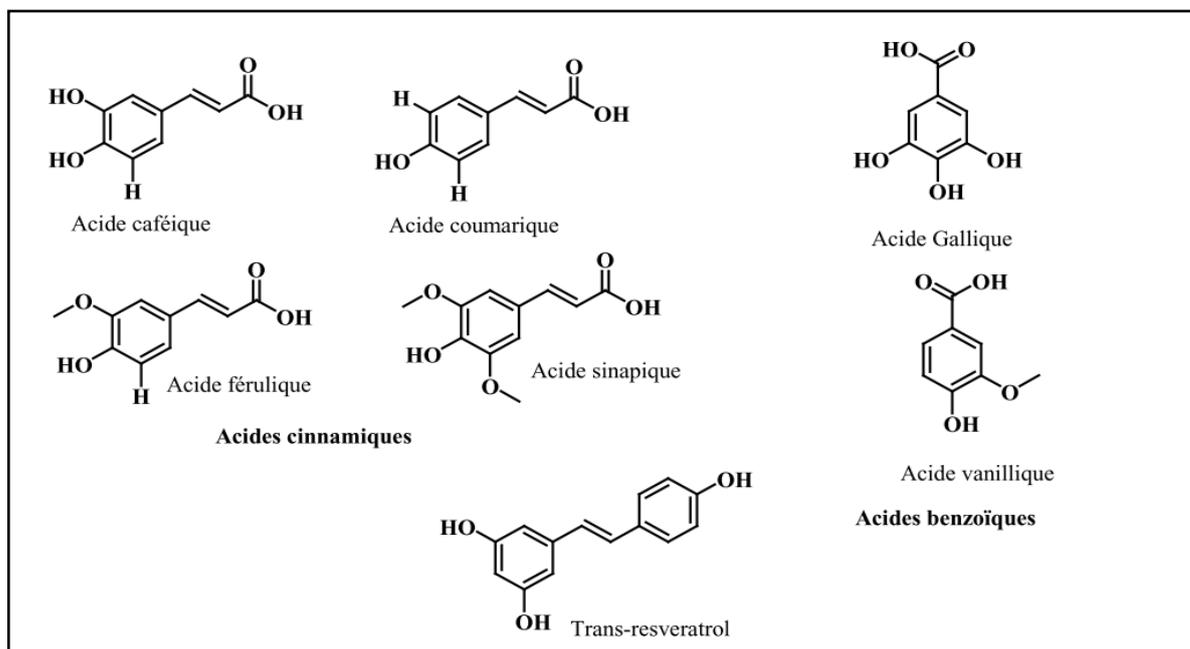


Figure12: Les acides phénoliques et le trans-resvératro (Kochetova *et al.*, 2007).

I.3.3.3. Principales activités biologiques des polyphénols

Les polyphénols sont connus pour leur activités biologiques, à savoir : les activités antibactériennes, antifongiques, antivirales (Xia *et al.*, 2011) et l'activité anti-inflammatoire (Udenigwe *et al.*, 2008).

Cependant, ces dernières années, une importance particulière a été accordée aux propriétés antioxydantes des flavonoïdes, Plusieurs mécanismes ont été décrits :

I.3.3.3.1. Piégeage direct des radicaux libres

Les flavonoïdes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires (Figure 13). À cause de leur faible potentiel redox, les flavonoïdes (Flav-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R^\bullet) comme le superoxyde, le radical peroxy, le radical alkoxy et le OH^\bullet par transfert d'hydrogène (Javanovic *et al.*, 1994).

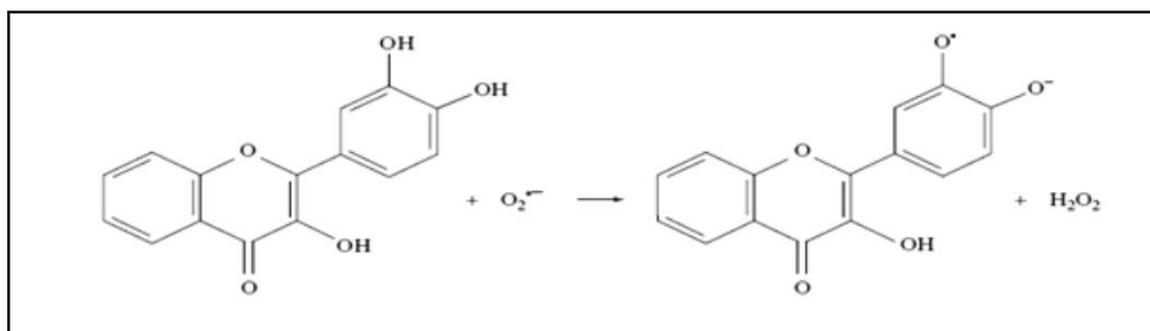


Figure 13 : Réaction des flavonoïdes avec les ERO (Densiov et Afanas'ev, 2005).

I.3.3.3.2. Chélation des ions métalliques

Les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^{2+}) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils peuvent être, soit des constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs des différentes enzymes du système de défense antioxydant (par exemple, Fe pour la catalase, Cu pour la ceruloplasmine, Cu et Zn pour la superoxyde dismutase). Mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle (Pietta, 2000).

Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques (Morris, 1995). Les études menées par Van Acker et ses collaborateurs (1996) sur la chélation du fer par certains flavonoïdes, ont pu ressortir les sites potentiels pour la chélation des ions métalliques (Figure 14) (Heim *et al.*, 2002).

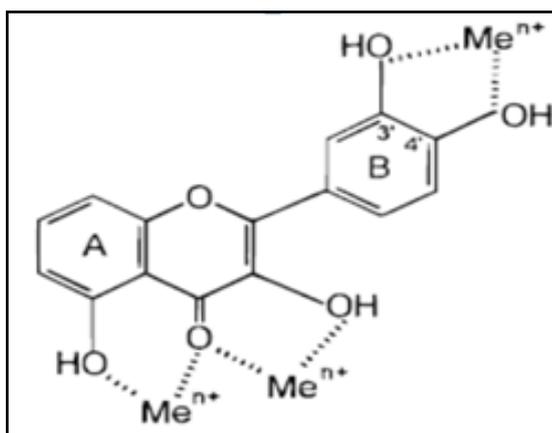


Figure 14: Les flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Pietta, 2000).

I.3.3.3. Inhibition enzymatique

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices de $O_2^{\cdot-}$ et d'autres ERO, comme la xanthine oxydase, la protéine kinase C, la cyclooxygénase, lipoxygénase, monooxygénase microsomal, et la glutathion S-Transferase. Les flavonoïdes ayant une moitié catéchol sur le cycle B inhibent la succinoxidase mitochondriale et la NADH oxydase (Figure 15) (Pietta, 2000 ; Densiov et Afanas'ev, 2005).

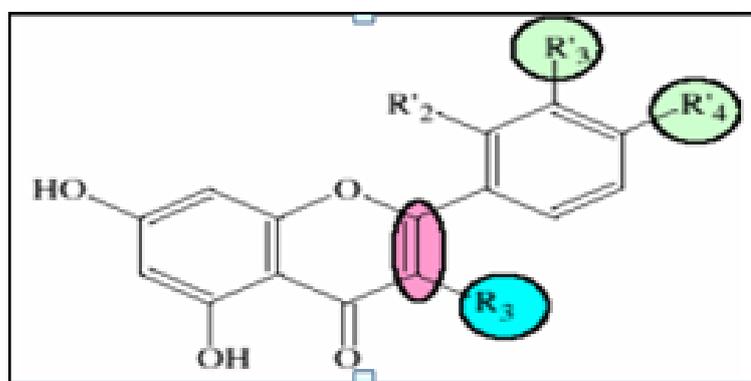


Figure 15 : Les éléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes (Chebil, 2006).

I.3.4. Les alcaloïdes

I.3.4.1. Définition

Les alcaloïdes sont des substances organiques produites par les plantes comme métabolites secondaires le plus souvent d'origine végétale mais aussi animale. Ce sont des bases, qui contiennent au moins un atome d'azote dans un système hétérocyclique et possédant des propriétés physiologiques à faible dose (Hesse, 1981 ; Fournier, 2001).

I.3.4.2. Classification

Les alcaloïdes sont classés selon leur forme et leur origine (tableau VIII) (Ghedjati, 2014 ; Aniszewski, 2007).

Tableau VIII : Les différents types des alcaloïdes classés selon la forme et l'origine.

Type	Définition	Exemples
Les alcaloïdes vrais	Ils dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique.	Atropine Hyoscyamine Scopolamine
Les proto-alcaloïdes	Ce sont des amines simples et ils ne possèdent pas un azote intra-cyclique.	Stachydrine Hordenine
Les pseudo-alcaloïdes	Ils présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas dérivés des acides aminés.	Caféine Gentianine Tomatidine

I.3.4.3. Les alcaloïdes tropaniques

I.3.4.3.1. L'atropine

L'atropine est l'ester du tropanol et de l'acide tropique, c'est un mélange racémique de D et L- hyoscyamine (Figure 16) (Vakili *et al.*, 2012). Elle est produite par l'époxidation de l'hyoscyamine catalysée sous l'action de l'enzyme hyoscyamine 6 B-hydroxylase (H6H) (Palazón *et al.*, 2008).

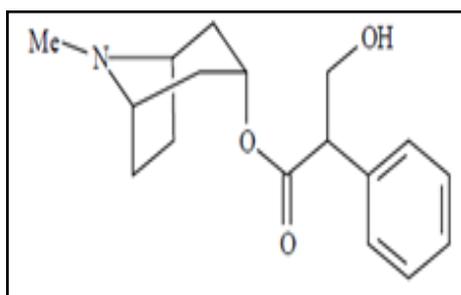


Figure16 : La structure chimique de l'atropine (Muniz, 2006).

I.3.4.3.2. L'hyoscyamine

C'est l'alcaloïde tropanique le plus répandu, isolé en 1833 dans la plante *Hyoscyamus niger* (jusquiame noire). C'est l'ester de tropanol et de l'acide L-tropique (Figure 17) (Gryniewicz et

Gadzikowska, 2008). Elle est l'isomère lévogyre de l'atropine racémique. Mais deux fois plus active que l'atropine (**Grevoz et Laubriet, 2007**).

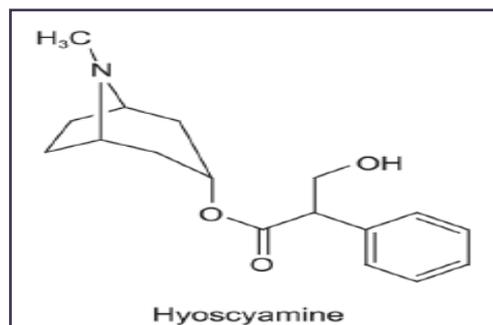


Figure17 : La structure chimique de l'hyoscyamine (**Gaire et Subedi, 2013**).

I.3.4.3.3. La scopolamine

Elle a été isolée pour la première fois de *Scopola carniolica* en 1881 et identifiée par la suite dans *Hyoscyamus niger* (**Alexander et al., 2008**). C'est des esters de l'acide tropique avec des bases de tropines et scopolines (Figure 18) (**Robinson, 1981**).

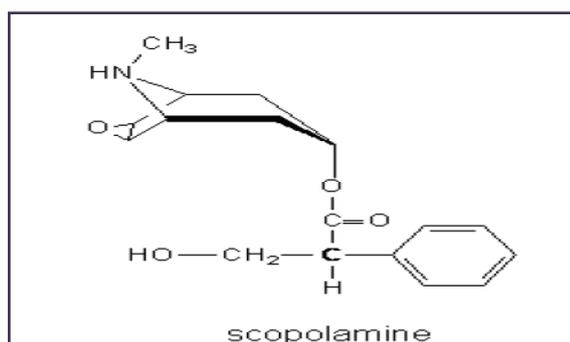


Figure 18: La structure chimiques de la scopolamine (**Alexander et al., 2008**).

I.3.4.5. Activités biologiques des alcaloïdes

L'atropine, hyoscyamine et la scopolamine sont utilisés pour différentes indications médicales, leur mécanisme d'action est basé sur leurs activités en tant que antagoniste muscarinique des récepteurs de l'acétylcholine (**Brown et Taylor, 2006**).

L'hyoscyamine est utilisé pour le traitement de spasme viscéral (**Koleva et al., 2012**) et la scopolamine pour le traitement de la maladie de Parkinson et dans certaines douleurs digestives. Elle possède des propriétés sédatives et antispasmodiques (**Hordé, 2014**).

> Chapitre

II

**MATERIELS ET
METHODES**

II.1. Produits et réactifs chimiques utilisés :

Tableau IX : Les différents solvants et réactifs utilisés pour l'extraction des métabolites secondaires.

Solvant	Formule chimique	Réactifs	Formule chimique
Ethanol	C ₂ H ₆ O	Folin-Ciocalteu.	
Méthanol	CH ₄ O	Réactif de Mayer	Tétra-iodomercurate de potassium
Chloroforme	CHCl ₃	Le carbonate de sodium	Na ₂ CO ₃
Ether de pétrole	CH ₃ -(CH ₂) _n -CH ₃	d'acétate de sodium	C ₂ H ₃ NaO ₂
Toluène	C ₇ H ₈	Chlorure d'aluminium	AlCl ₃
Acétone	C ₃ H ₆ O	vanilline	C ₈ H ₈ O ₃
Ammoniaque	NH ₄ OH	persulfate de potassium	K ₂ S ₂ O ₈
Acide chlorhydrique	HCl	DPPH	(2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl)
Hexane	C ₆ H ₁₄	ABTS	2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt
Acide gallique	C ₇ H ₆ O ₅	Réactif de Dragendorff	Iodobismuthate de potassium
Acide formique	HCOOH		
Acide acétique	C ₂ H ₄ O ₂		
Acide sulfurique	H ₂ SO ₄		

II.2. Appareillage

Balance (RADWAG), étuve (MEMMERT), agitateur magnétique (VELP scientifica), vortex, pH- mètre (ph211 HANNA microprocessor PHmeter), appareil de soxhlet (behr, labo-Technic), lampe UV, Spectrophotomètre (UNICO1200 spectrophotometre).

II.3. Matériel végétal

La partie aérienne (feuilles, fleurs et tiges) de *Hyoscyamus albus* a été récoltée au mois de Mars 2015 à la commune d'Adekar de la willaya de Bejaïa (Figure 19). L'étude effectuée sur la plante a été réalisée au niveau du laboratoire de biotechnologie végétale et ethnobotanique de l'université A/Mira, Bejaïa.



Figure 19 : La partie aérienne de *Hyoscyamus albus*.

II.4. Séchage et broyage

La partie aérienne de *Hyoscyamus albus* a été séchée à l'étuve à 40°C pendant 48h. Le broyage est effectué à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à obtention d'une poudre très fine (Figure 20).



Figure 20 : Séchage et broyage de la partie aérienne de la jusquiame blanche.

II.5. Extraction des polyphénols

Le principe de cette méthode se base sur l'extraction sélective liquide-solide des composés phénoliques en utilisant l'éthanol 96%. Les étapes d'extraction ont été réalisées à température ambiante.

Soixante gramme (60 g) de poudre ont été mélangés avec 360 ml d'éthanol à 96 %, pour un rapport de 1/6 (v/v), et de les laisser macérer sous agitation magnétique pendant 24 heures (Figure 21).



Figure 21 : Extraction à l'éthanol de la poudre de la partie aérienne de la jusquiame blanche.

Après décantation de la suspension pendant 24 heures, l'extrait humide a été prélevé à l'aide d'une pipette et versé dans une boîte de pétri puis laissé sécher à l'étuve à 40°C jusqu'à atteindre un poids constant. L'extrait éthanolique sec est par la suite réservé pour les tests (Figure 22).

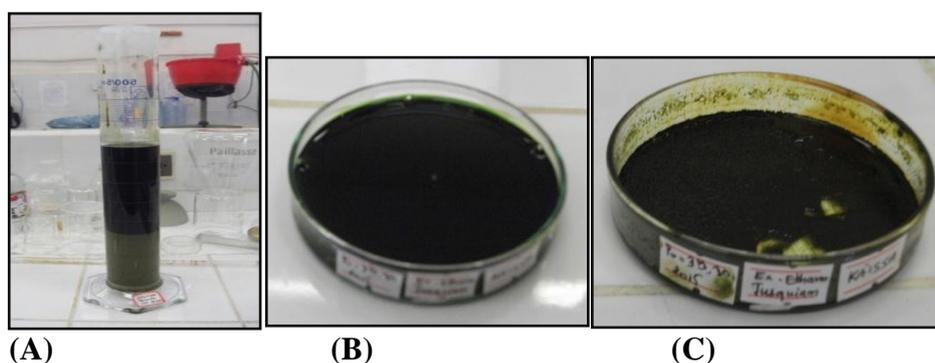


Figure 22 : (A) Décantation à l'aide d'une éprouvette (B) L'extrait éthanolique humide (C) L'extrait brut sec.

Il est à noter, qu'après l'extraction, un extrait éthanolique a été obtenu. Le taux d'extraction a été calculé suivant la formule ci-dessous :

$$\text{Taux d'extraction} = \frac{(P - P_0)}{\text{poids de la poudre}} \times 100$$

P_0 : Poids vide de la boîte de pétri.

P : Poids après évaporation du solvant.

II.6. Extraction des alcaloïdes totaux

L'extraction des alcaloïdes de la jusquiame blanche a été réalisée en utilisant la méthode décrite par Kartal et *al.* (2003) avec quelques modifications.

L'extraction des alcaloïdes totaux à partir de la partie aérienne sont obtenues par une extraction liquide-liquide, basée sur la différence de solubilité des alcaloïdes en milieu acide et alcalin (Bruneton, 1999).

II.6.1. Extraction par Soxhlet

Quarante gramme (40g) de poudre de *Hyoscyamus albus* est extraite avec 400 ml d'éthanol à 80% (v/v) en utilisant l'appareil Soxhlet pendant 30h. Le contenu du ballon (solvant plus matières solubilisées) est ensuite mis dans des boîtes de pétris et mis dans l'étuve à 40°C pour éliminer le solvant. A la fin un extrait éthanolique sec est obtenu (Figure 23).

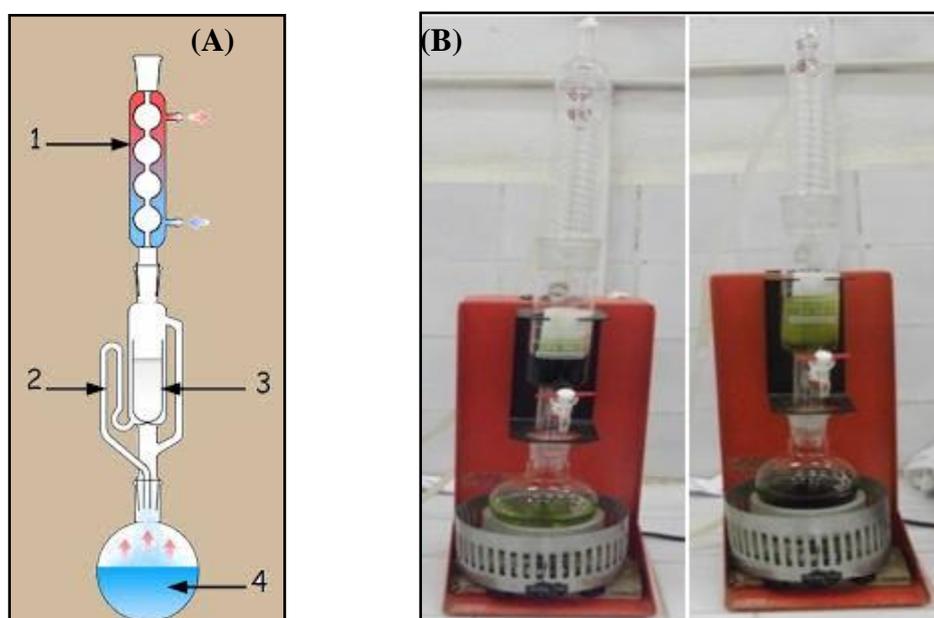


Figure 23 : (A) Un schéma de l'appareil de Soxhlet (1: condenseur, 2: vapeur, 3: cartouche, 4: ballon chauffé). (B) Extraction des alcaloïdes totaux de *Hyoscyamus albus* par l'appareil de Soxhlet.

II.6.2. Extraction par macération

Il s'agit de mettre 60g de poudre dans 280 ml d'éthanol à 96 %, avec un rapport de 1/4 (v/v), et de le laisser macérer sous agitation magnétique pendant 24heurs.

Après décantation de la suspension pendant 24 heures, l'extrait humide a été prélevé à l'aide d'une pipette et versé dans une boîte de pétri puis laissé sécher à l'étuve à 40°C jusqu'à atteindre un poids constant. L'extrait éthanolique sec est par la suite réservé pour les tests.

Le taux d'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction} = \frac{(P - P_0)}{\text{poids de la poudre}} \times 100$$

P_0 : Poids vide de la boîte de pétri.

P : Poids après évaporation du solvant.

II.6.3. Extrait alcaloïdique brut

Les extraits éthanoliques secs obtenus par Soxhlet sont acidifiés avec 200 ml de l'acide chlorhydrique (HCl) à 2 % (v/v) puis une étape de délipidation a été faite par ajout de l'éther de pétrole (200 ml). La phase aqueuse est ajustée à pH= 9 avec l'ajout de l'ammoniaque à 25% puis extraite avec le chloroforme (3×40 ml), le solvant est évaporé pour obtenir un extrait alcaloïdique brut.

Les mêmes étapes ont été suivies afin d'obtenir l'extrait alcaloïdique brut par l'extrait éthanolique sec obtenu par macération (1/4). L'acidification est réalisée avec 300 ml de HCl 2% (v/v) puis une délipidation a été réalisée par l'ajout de 300 ml d'éther de pétrole et l'extrait brut a été obtenu par l'ajout du chloroforme (3x60ml) (figure 24).



Figure 24 : Décantation de l'extrait de la jusquiame blanche. (A) Délipidation de l'extrait avec (phase aqueuse à 2% HCl/éther de pétrole) ; (B) Extraction des alcaloïdes avec du CHCl_3 (phase aqueuse à pH 9/ CHCl_3).

II.7. Mise en évidence chimique des alcaloïdes

Deux millilitres (2ml) de l'extrait aqueux (HCl à 2%) sont prélevés et placés dans un tube à essai avec quelques gouttes de réactif de Mayer. La présence des alcaloïdes est confirmée par la formation d'un précipité ou d'un trouble blanc.

Deux autres millilitres sont prélevés de l'extrait à lequel nous avons rajoutés quelques gouttes du réactif de Dragendorff, la présence des alcaloïdes est confirmée par la formation d'un précipité brun orangé (Abbah *et al.*, 2010).

II.8. Dosage des composés phénoliques

Dans le but de déterminer la teneur en composés phénoliques de l'extrait de la partie aérienne de *Hyoscyamus albus*, trois protocoles ont été suivis afin de doser les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en pro-anthocyanidines (tanins condensés).

II.8.1. Dosage des phénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode citée par Yap *et al.* (2009) avec légères modifications (figure 25). La teneur en phénols totaux est déterminée par une méthode colorimétrique avec le spectrophotomètre UV-Visible en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu.

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Boizot et Charpentier, 2006). La coloration bleue produite possède une absorption maximum aux environs de 765 nm. Elle est proportionnelle au taux de composés phénoliques. Le carbonate de sodium a été ajouté comme catalyseur.

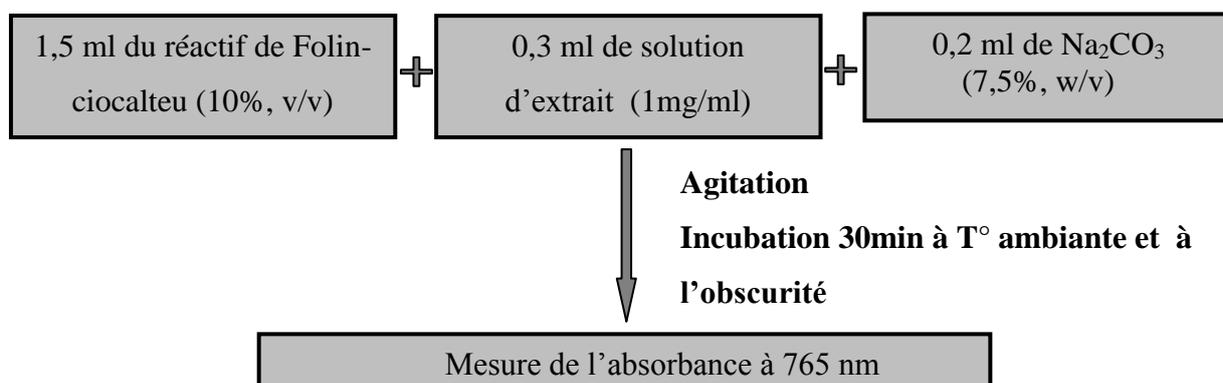


Figure 25 : Le protocole de dosage des phénols totaux.

- Un contrôle a été préparé en mélangeant 0,3 ml de méthanol avec 1,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu et 0,2 ml de solution de carbonate de sodium.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant l'acide gallique comme standard afin de déterminer les concentrations en phénols totaux des extraits exprimées en mg équivalent acide gallique /g d'extrait.

II.8.2. Dosage des flavonoïdes

La détermination de la teneur en flavonoïdes des extraits, a été réalisée en utilisant la méthode décrite par Mimica-Dukic, (1992) in Abdou Bouba et *al.*(2010) (figure 26).

Ce protocole se base sur la formation d'un complexe jaunâtre aluminium-flavonoïde par chélation des métaux (fer et aluminium), qui est dûe à la présence des groupements hydroxyles libres (Ribéreau-Gayon, 1968).

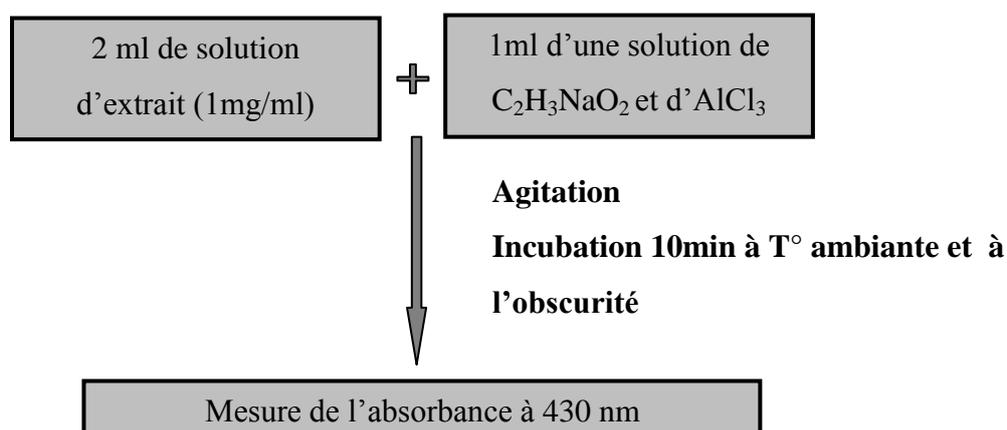


Figure 26: Le protocole de dosage des flavonoïdes.

- Un blanc d'extrait a été préparé en mélangeant 2 ml de solution d'extrait avec 1 ml d'eau distillée.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant la quercétine comme standard et la concentration a été exprimée en mg équivalent quercétine /g d'extrait.

II.8.3. Dosage des tanins condensés (pro-anthocyanidines)

Les tanins condensés sont déterminés en utilisant la méthode décrite par Sun et *al.* (1998) in Oyedmi et Afolayan, (2011) avec quelques modifications (figure 28).

Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesurable à 500 nm. La réactivité de la vanilline avec les tanins n'implique que la première unité du polymère (Ba et *al.*, 2010) (Figure 27).

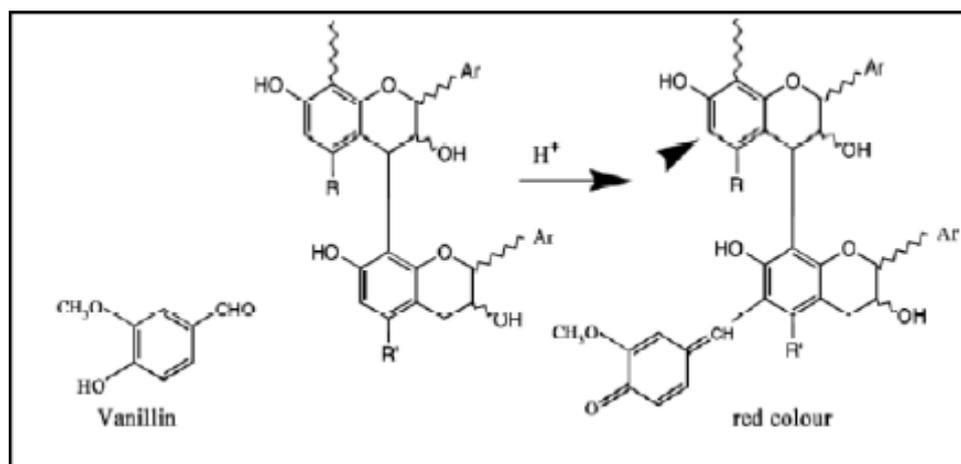


Figure 27: Mécanisme de la réaction de la vanilline avec les tanins condensés (Schofield *et al.*, 2001).

- Un blanc d'extrait a été préparé en mélangeant 0,5 ml de solution d'extrait avec 3 ml de méthanol et 1,5 ml d'HCl.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant la catéchine comme standard et la concentration a été exprimée en mg équivalent catéchine /g d'extrait.

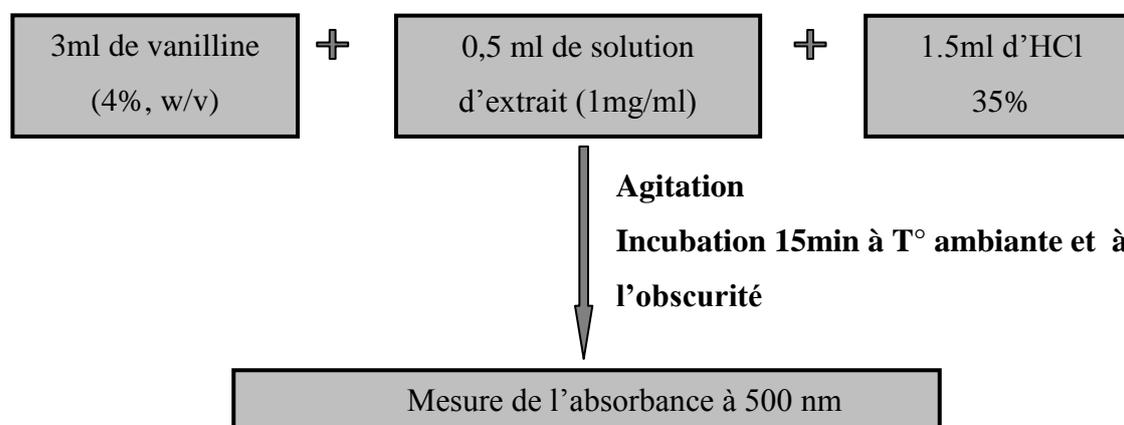


Figure 28: Le protocole de dosage des tanins condensés.

II.9. Evaluation des activités antioxydantes des extraits de la jusquiame blanche

L'activité anti-oxydante a été évaluée en testant l'activité scavenging des radicaux DPPH[•] et ABTS^{•+}.

II.9.1. Activité anti-radicalaire du DPPH[•]

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits de *Hyoscyamus albus* a été réalisée en mesurant l'activité scavenging du radical DPPH[•]. En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH[•] de couleur violette se réduit en DPPHH (2,2-Diphényl-1-picryl hydrazine) de couleur jaune (figure 29) (Athamena et al., 2010).

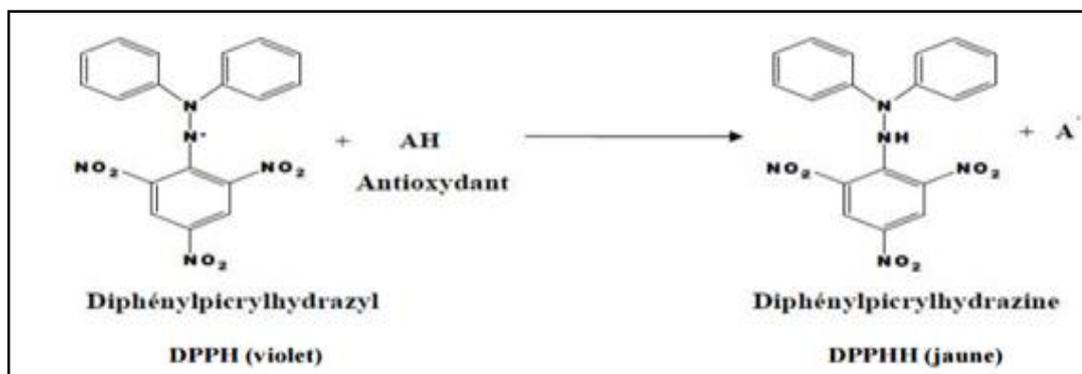


Figure 29 : La réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH[•].

La mesure de l'activité scavenging du radical DPPH[•] a été effectuée en suivant le protocole de Hemalatha et al., (2010) (figure 30).

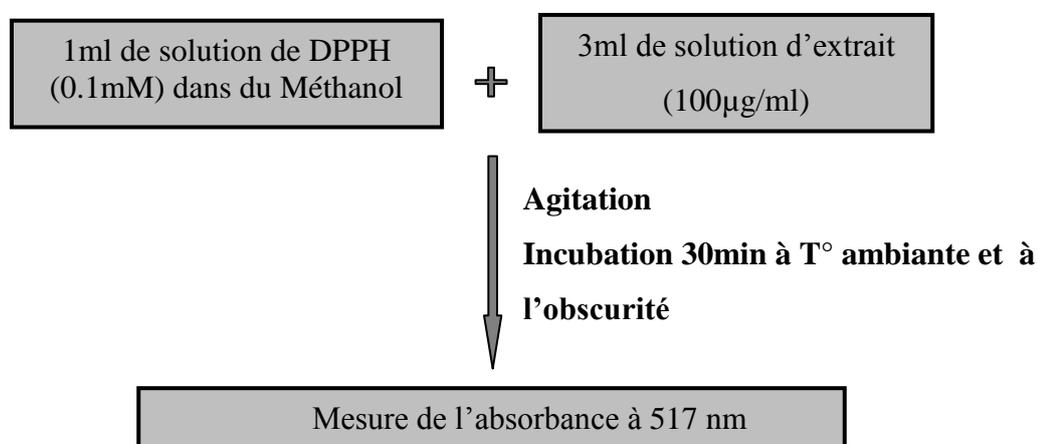


Figure 30: Le protocole de l'activité scavenging du radical DPPH[•].

- Un contrôle a été préparé avec 3ml de méthanol + 1ml de solution du DPPH.
- Un blanc pour chaque extrait a été préparé en mélangeant 1 ml de méthanol avec 3 ml de solution d'extrait.

L'acide ascorbique et la BHA ont été utilisés comme standards à différentes concentrations.

Le pourcentage de l'activité scavenging du radical DPPH' de chaque extrait a été calculé comme suit :

$$\% \text{ de l'activité scavenging du radical DPPH}' = [(Ac - (At - Ae)) / Ac] \times 100$$

Où :

Ac : Absorbance du contrôle, c'est l'absorbance du blanc contenant seulement le DPPH.

At : Absorbance du test, c'est l'absorbance de la solution de DPPH contenant l'extrait.

Ae : Absorbance de l'extrait, c'est l'absorbance de la solution de l'extrait sans le DPPH.

II.9.2. Activité scavenging du radical ABTS^{•+}

Le test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+} de coloration bleu-verte en le transformant en ABTS^H incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant (figure 31) (Re *et al.*, 1999).

Le protocole suivi est celui décrit par Nenadis *et al.* (2004) in Le *et al.* (2007) avec quelques modifications (Figure 32).

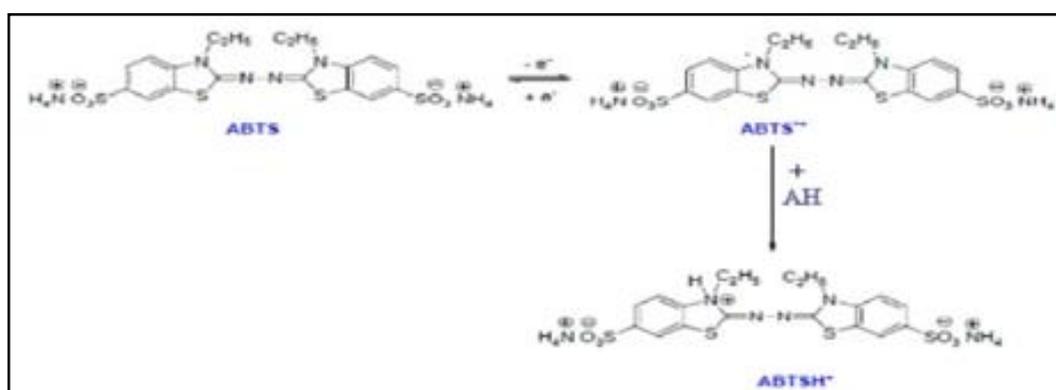


Figure 31 : Formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant donneur de H (Marc *et al.*, 2004).

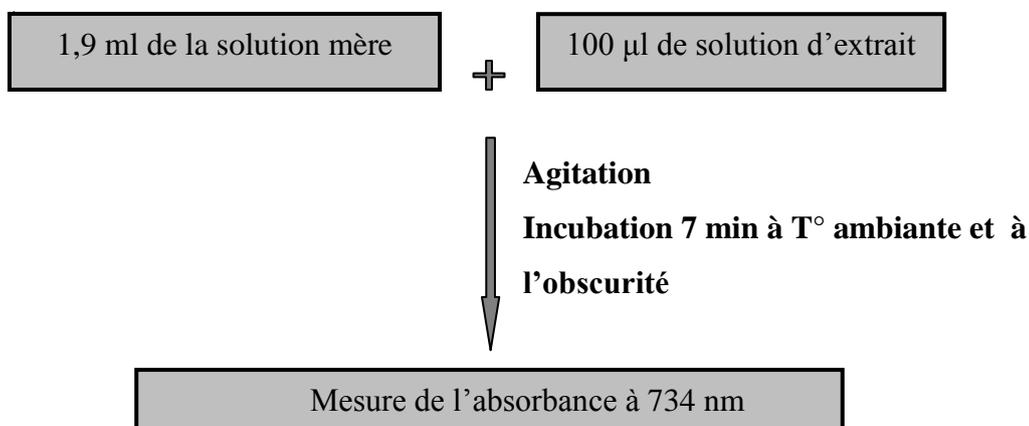


Figure 32 : Protocole de l'activité scavenging du radical ABTS^{•+}.

- Le blanc a été préparé en remplaçant la solution d'extrait par du méthanol.

Le Trolox (acide 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylique), analogue de la vitamine E a été utilisé comme standard à différentes concentration (**Miller et Rice-Evans, 1997**).

Le pourcentage de l'activité scavenging de l'ABTS^{•+} de chaque extrait a été calculé comme suit :

$$\% \text{ de l'activité scavenging du radical ABTS}^{\bullet+} = [(Ac-At)/Ac] \times 100$$

Où :

Ac : absorbance du blanc.

At : absorbance du test.

II.10. Chromatographie sur couche mince (C.C.M)

II.10.1. Principe

La chromatographie est une méthode physique de séparation des constituants d'un mélange, elle est basée sur les différences d'affinités des substances à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile.

La chromatographie sur couche mince (CCM), est effectuée surtout en vue d'une analyse d'un mélange. La phase stationnaire solide est fixée sur une plaque, et la phase mobile liquide, nommée éluant, est un solvant sur laquelle est déposé le mélange à analyser. La phase mobile migre de bas en haut, par capillarité, le long de la phase fixe en entraînant les constituants du mélange. C'est le phénomène d'élution, qui permet la séparation des constituants du mélange à analyser.

Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale : $Rf = \frac{\text{hauteur de la tache}}{\text{hauteur du front du solvant}}$

II.10.2. Méthode

Des plaques de CCM (FLUKA- Analytical, silica gel on TLC plates) prêtes à l'emploi, de gel de silice sur un support en verre avec des dimensions 20 x 20cm ont été utilisées.

➤ Analyse qualitative des polyphénols

La phase mobile utilisée est constituée de toluène/acétone/acide formique (60/60/10, v/v/v). Les témoins utilisés sont (la quercétine, la rutine et l'acide gallique) préparés par une dissolution de 10 mg de chaque extrait dans 1ml de méthanol, de même pour les extraits.

Après dissolution des extraits et des témoins, 10µl sont prélevés à l'aide d'une micropipette et déposés à 2.5cm du bord inférieure sur la ligne de base, chaque dépôt est séché puis la plaque est introduite dans la chambre de migration contenant la phase mobile (Figure 33).

Quand le front du solvant arrive à 3.5cm du bord supérieur de la plaque (la migration d'une quinzaine de cm prend plus ou moins 60 mn), les chromatogrammes sont retirés puis séchés.

La visualisation est effectuée d'abord à la lumière du jour puis par deux autres méthodes :

- Méthode physique : grâce à une lampe UV (250-300 nm).

- Méthode chimique : en utilisant un mélange de vanilline-acide sulfurique (H_2SO_4) préparé de la manière suivante : 200 mg de vanilline à laquelle sont rajoutés 28 ml de méthanol et 2 ml d'acide sulfurique, le mélange est pulvérisé sur l'ensemble du chromatogramme puis chauffé à l'étuve à 110C° pendant 10 à 15 min afin de noter le changement de couleur.

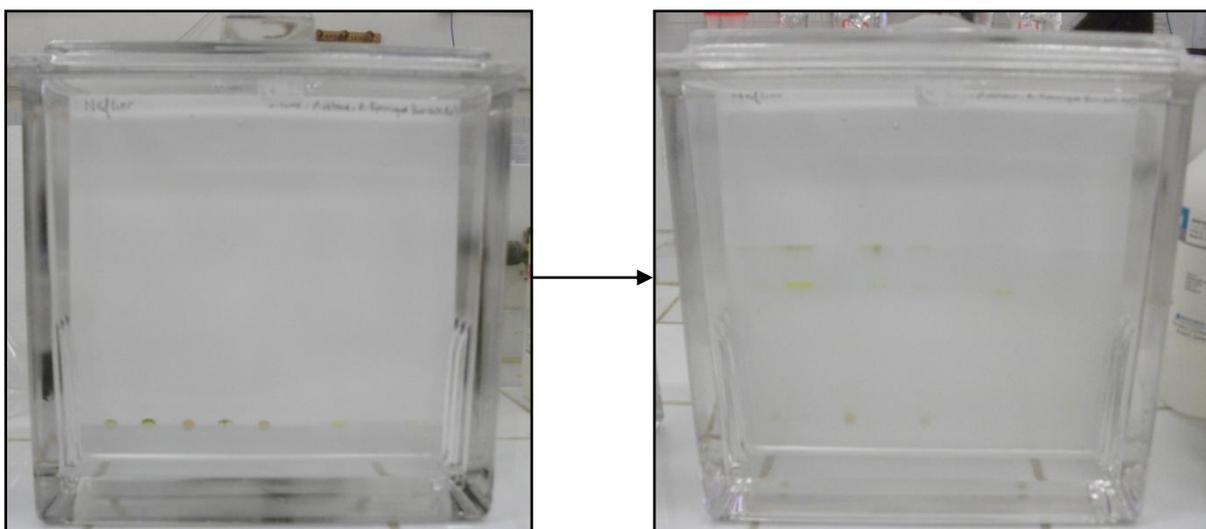


Figure 33 : Le principe de la chromatographie sur couche mince.

➤ Analyse qualitative des alcaloïdes

Tandis que pour l'analyse des alcaloïdes, les mêmes étapes ont été réalisées sauf que le système de solvants utilisé est constitué de chloroforme/éthanol/ammoniaque (85 /14 /1, v/v/v), et sans utilisation de témoins. La visualisation a été réalisée par l'observation à la lumière du jour puis sous UV et enfin par pulvérisation du réactif Dragendorff (Wesolowska et Skrzypczak, 1985).

II.10.3. Mise en évidence de l'activité antioxydante de radical DPPH[•] et ABTS^{•+}

En utilisant le même protocole de l'analyse qualitative, les extraits éthanoliques et alcaloïdiques sont déposés sur les chromatogrammes puis insérés dans les cuves contenant les mêmes systèmes de solvants préalablement utilisés, ces derniers sont séchés puis pulvérisés par une solution de DPPH[•] et ABTS^{•+} pour la mise en évidence de l'activité antioxydante des extraits.

Les résultats finaux ont été photographiés.

II.11. Etude statistique

Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon analysé et les résultats ont été exprimés sous la forme : moyenne \pm écartype. Des comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel Anova. Les différences ont été considérées d'être significatives à $\alpha = 0,05$. Les valeurs des IC₅₀ ont été calculées en utilisant le logiciel Origine 8.

> **Chapitre**

III

**RESULTATS ET
DISCUSSIONS**

III.1. Le taux d'extraction

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

Dans notre travail, afin d'obtenir des combinaisons phénoliques distinctes, une extraction liquide-solide sélective a été réalisée en utilisant deux solvants : l'eau et l'éthanol. En ce qui concerne les alcaloïdes, une extraction solide-liquide a été effectuée en utilisant les mêmes solvants cités précédemment suivis d'une extraction liquide-liquide par l'usage de plusieurs solvants de polarités différentes, à savoir, l'acide chlorhydrique, le chloroforme et l'ammoniaque.

Commencer l'extraction par l'éthanol est intéressant car ce dernier représente un solvant permettant la dissolution de la majorité des composés phénoliques (Cowan, 1999).

Une fois les extraits secs sont obtenus, le calcul des taux d'extraction dans chaque étape a été réalisé. Les résultats sont représentés dans le tableau X.

Tableau X : Les pourcentages d'extraction des extraits de *Hyoscyamus albus*.

Extrait	Taux d'extraction
Extrait éthanolique	5.26 %
Extrait alcaloïdique (60g)	0.11%
Extrait alcaloïdique (40g)	0.1%

Une étude a été réalisée sur *Vitex doniana Sweet* qui est une plante appartenant à la famille des Lamiacées dont le taux d'extraction en extrait phénolique est de 3,1% qui est inférieure à notre taux d'extraction (Muanda, 2010).

Le taux d'extraction concernant l'extrait alcaloïdique de notre plante est inférieure à celui obtenu à partir d'une étude réalisée par Alghazeer et al. (2012) sur les feuilles de *Hyoscyamus albus* qui est de 1% cela est probablement dû à la différence de la période de récolte et des conditions d'extraction.

On constate que les deux extraits alcaloïdiques possèdent des taux d'extractions relativement proche malgré la différence de la quantité de la poudre utilisée et la méthode d'extraction. D'après ces constatations, il est possible de déduire que l'extraction par Soxhlet est une méthode efficace et reproductible.

III.2. Dosage des composés phénoliques

La détermination des teneurs en phénols totaux, en tanins condensés et en flavonoïdes dans les extraits de *Hyoscyamus albus* a été réalisée en utilisant séparément les méthodes colorimétriques (Folin-Ciocalteu, la vanilline sulfurique et le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), respectivement) sont représentées dans le tableau XI.

Tableau XI : Les teneurs des composés phénoliques.

Dosage	Teneur
Phénols totaux	56.36 mg EAG/g d'extrait
Flavonoïdes	1.29 mg EQ/g d'extrait
Tanins condensés	35.33 mg EC/ g d'extrait

➤ Dosage des phénols totaux

Une étude réalisée par Alghazeer et *al.* (2012), a démontré que la teneur en phénols totaux est de $48,54 \pm 7,82$ mg EAG/g d'extrait, cette valeur est proche à celle obtenus par notre étude qui est de $56,36 \pm 2,68$ mg EAG/g d'extrait, cela pourrait s'expliquer par le fait que ces auteurs ont étudié uniquement les feuilles et que leur extrait est dissout dans le méthanol.

Le taux en phénols totaux de l'extrait brut par rapport à un gramme de poudre est de 2,96 mg EAG/g de poudre, ce taux nous permet de classer la jusquiame blanche selon une étude faite par **Kähkönen et al., (1999)**, qui ont montré que la quantité en composés phénoliques variait selon les plantes de 0,2 à 155,3 mg EAG/g de poudre. D'après cette étude, on déduit que *Hyoscyamus albus* est faible en polyphénols.

➤ Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes dans l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *Hyoscyamus albus* est de 1.29 ± 0.66 mg EQ/g d'extrait représentant 2.23% de l'extrait brut en phénols totaux. Par conséquent la jusquiame est pauvre en flavonoïdes.

➤ Dosage des tanins condensés

La teneur de *Hyoscyamus albus* en tanins condensés est de 35.33 ± 5.10 mg EC/g d'extrait, cette valeur représente un taux de 62.68% de l'extrait brut. A partir de cette estimation, on classe notre plante comme étant riche en tanins condensés.

III.3. Mise en évidence chimique des alcaloïdes

Les résultats obtenus après la réaction des deux solutions d'alcaloïdes totaux avec le réactif de Mayer et Dragendorff sont présentés dans la figure 37 :

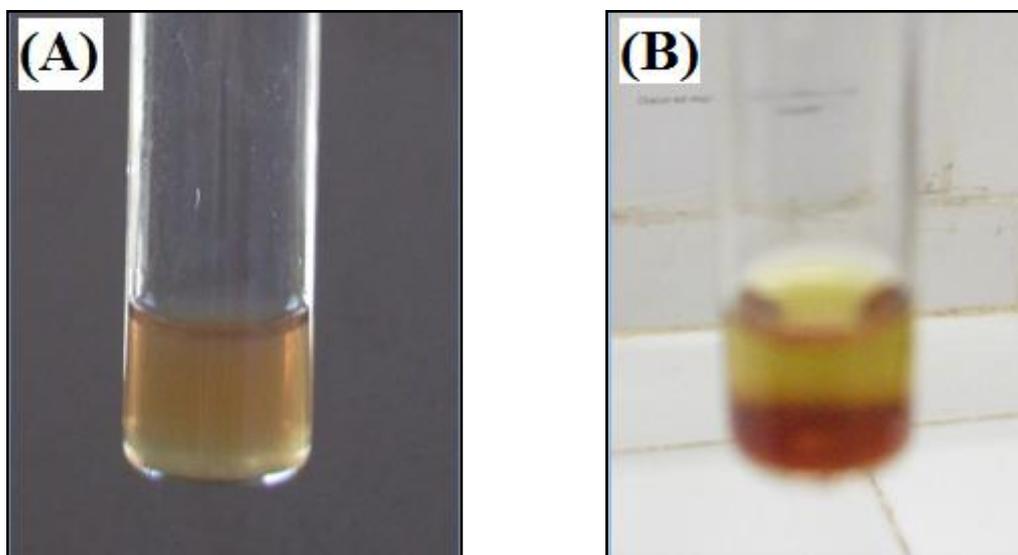


Figure 34: Révélation des alcaloïdes totaux de la jusquiame. (A) Réaction des alcaloïdes avec le réactif de Mayer, (B) Réaction avec le réactif de Dragendorff.

La présence d'alcaloïdes est établie par la précipitation des sels et la révélation à l'aide du réactif de Mayer (solution de tétra-iodomercure de potassium) et Dragendorff (solution iodo-iodurée ou vapeur d'iode) (Abbah *et al.*, 2010). Ces réactions sont fondées sur la capacité qu'ont les alcaloïdes à se combiner avec des métaux et des métalloïdes contenus dans les réactifs tels que le bismuth, le mercure, le tungstène et l'iode.

La figure (A) montre clairement l'apparition d'un précipité blanc jaune ou jaune claire après l'ajout du réactif de Mayer et la figure (B) montre la formation d'un précipité brun orangé observé clairement suite à l'ajout du réactif de Dragendorff. Cette coloration est dûe à la présence d'alcaloïdes dans l'extrait.

III.4. Evaluation de l'activité antioxydante

III.4.1. Activité scavenging du radical DPPH[•]

L'activité antioxydante des extraits éthanoliques et alcaloïdiques de *Hyoscyamus albus* et des standards (BHA et acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH[•] a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH[•]) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517nm.

Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti-radicalaires (Majhenic et al., 2007).

Les résultats de l'activité scavenging du radical DPPH^{*} par les extraits de la plante sont représentés dans la figure 38 :

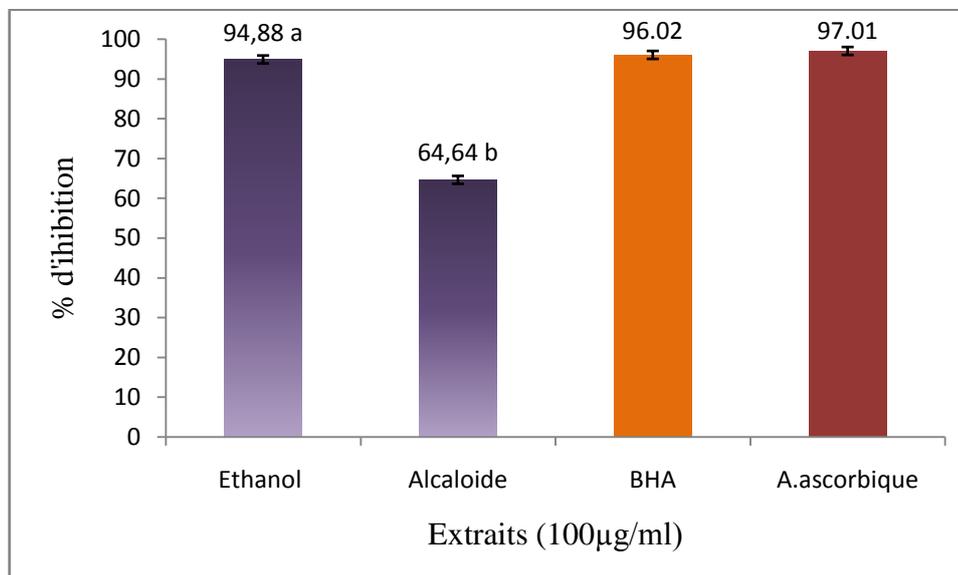


Figure 35: Inhibition de l'activité scavenging du radical DPPH[°] par les extraits de la jusquiame blanche et par les standards (BHA et l'acide ascorbique).

A partir de ces résultats, nous constatons que les deux extraits de *Hyoscyamus albus* ont dévoilé une très forte activité scavenging du radical DPPH^{*} à 100µg/ml qui est similaire à celle enregistrée par les standards utilisés: (acide ascorbique (97,01± 0,95%) et BHA (96,02± 1,33%).

L'inhibition du radical DPPH^{*} par les extraits de la plante montre que l'extrait éthanolique a exhibé un pourcentage d'inhibition plus important qui est de 94,88 ± 0,01% en comparaison avec l'extrait alcaloïdique dont le pourcentage d'inhibition est de 64,64 ± 0,03%, étant donné que l'extrait éthanolique est riche en polyphénols qui sont des composés riches en groupement OH donneur d'électrons et d'hydrogènes (Erol et al., 2010).

Concernant les alcaloïdes, l'activité antioxydante est peut être dûe soit aux groupements hydroxyles des alcaloïdes tropaniques ou bien aux groupements azotés contenus dans les systèmes hétérocycliques (Aniszewski, 2007). La différence entre les pourcentages d'inhibition des deux extraits pourrait s'expliquer du fait que l'activité antioxydante ne dépend pas uniquement des concentrations des antioxydants mais aussi de leurs structures et de l'interaction entre les antioxydants dans un même extrait (Brighente et al., 2007).

➤ Détermination des IC_{50}

L' IC_{50} est la concentration d'extrait de plante ou du standard pour laquelle 50% des radicaux DPPH^{*} sont inhibés. Les IC_{50} sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés selon le pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations des fractions testées et les standards.

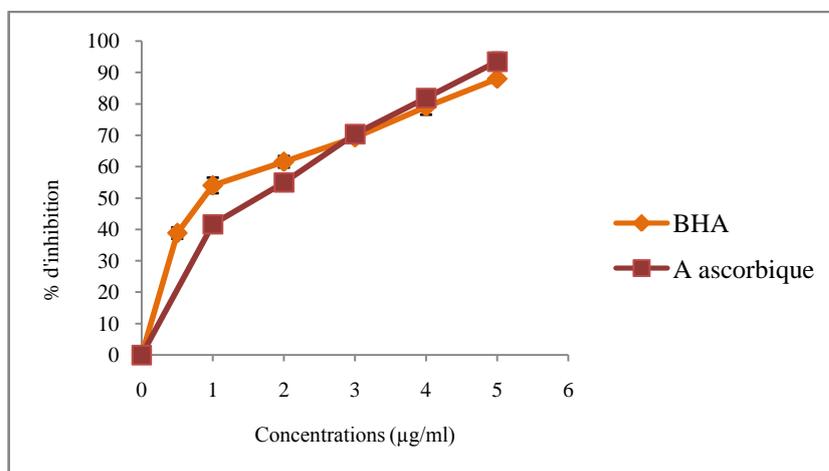


Figure 36: La représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition du radical DPPH^{*} a en fonction de la concentration de l'acide ascorbique et la BHA.

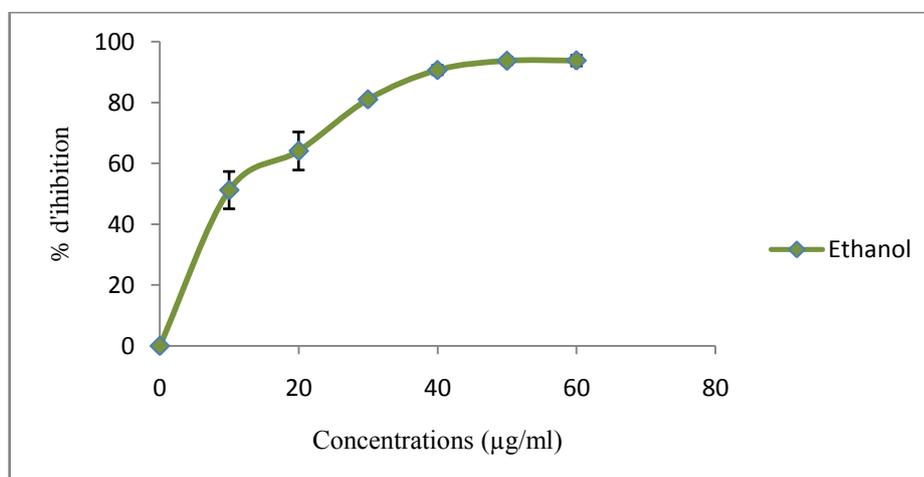


Figure 37: La représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition du radical DPPH^{*} en fonction de la concentration en extrait éthanolique de la jusquiame blanche.

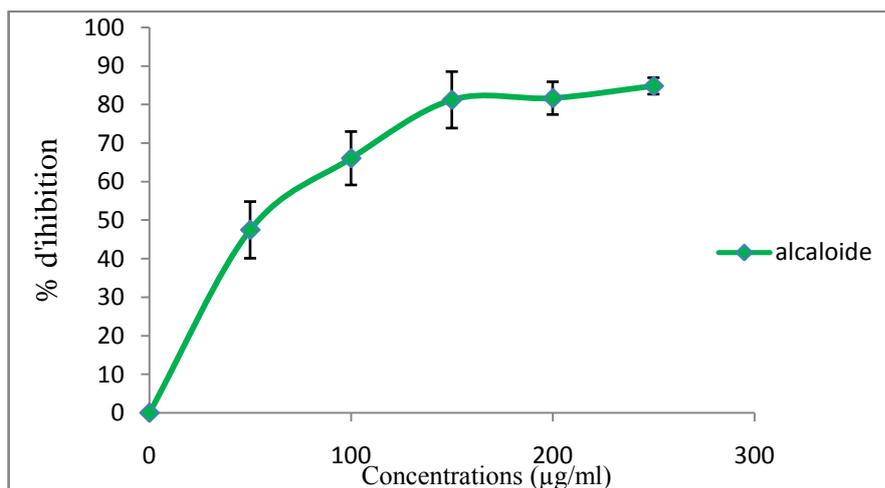


Figure 38 : La représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition du radical DPPH^{*} en fonction de la concentration en extrait alcaloïdique de la jusquiame blanche.

Les figures ci-dessus montrent que la variation de l'activité scavenging du radical DPPH^{*} des extraits de *Hyoscyamus albus* et des standards (acide ascorbique et BHA) est dépendante de la concentration, avec l'IC₅₀ de l'extrait éthanolique de 11,37 µg/ml qui se rapproche de celle des standards utilisés qui sont de 0,98µg/ml et 1,61µg/ml pour la BHA et l'acide ascorbique. Tandis que l'extrait alcaloïdique quant à lui représente une valeur d'IC₅₀ élevée par rapport à celle obtenu avec l'extrait éthanolique et les standards (55,52 µg/ml).

III.4.2. L'activité scavenging du radical ABTS^{•+}

Le radical ABTS^{•+} est largement utilisé pour déterminer l'activité antioxydante des extraits des plantes. L'ABTS^{•+} en contact avec un donneur d'hydrogène conduit à sa forme réduite et à la décoloration de la solution à 734nm. L'activité scavenging du radical ABTS^{•+} des différents extraits est représentée dans la figure suivante:

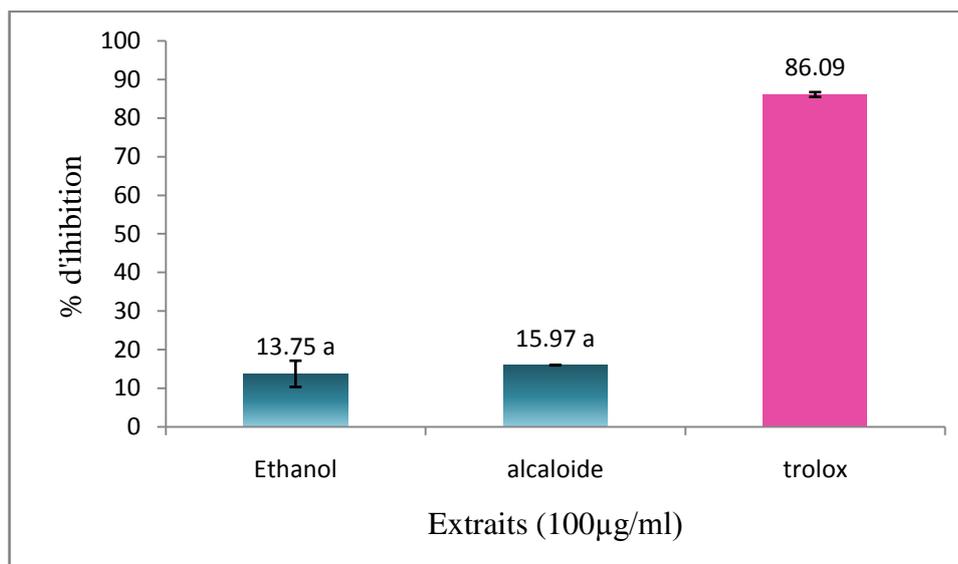


Figure 39 : Le pourcentage de l'activité inhibitrice du radical $ABTS^{++}$ par les extraits de la jusquiame blanche et du standard (Trolox).

A partir de cette figure, nous constatons que tous les extraits de *Hyoscyamus albus* n'ont pas exhibé une forte activité anti-radicalaire à 100 $\mu\text{g/ml}$, en comparaison à l'activité montrée par le standard utilisé, en effet les pourcentages retrouvés sont respectivement : 13,75% et 15,97% pour l'extrait éthanolique et alcaloïdique qui sont assez négligeable devant le pourcentage d'inhibition du Trolox qui est de 86,09%.

Cependant, l'extrait éthanolique de *Hyoscyamus albus* ($13,75 \pm 0,02\%$) est légèrement inférieur à l'extrait alcaloïdique ($15,97 \pm 0,04\%$).

Cette faible activité pourrait être expliquée par le fait que plusieurs facteurs peuvent influencer sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant/ $ABTS^{++}$, type de solvants, pH et le profil phénolique en particulier) (Molyneux, 2004), mais aussi le milieu réactionnel, en effet un milieu réactionnel aqueux est défavorable aux extraits éthanolique et alcaloïdique de la plante.

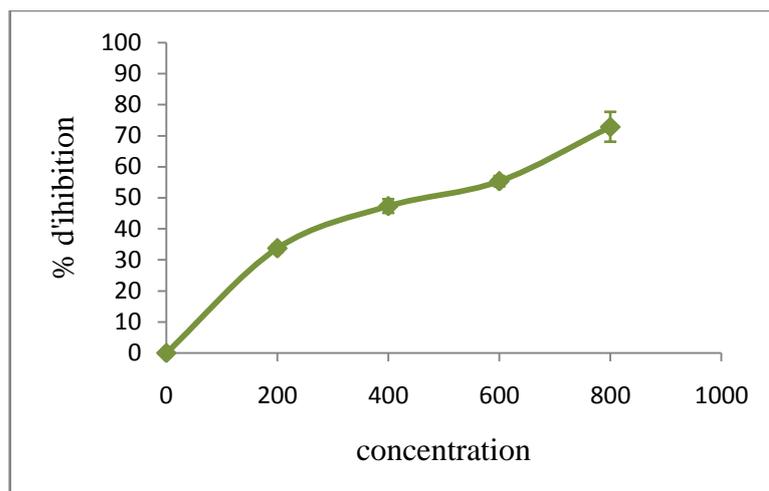
➤ Détermination des IC₅₀

Figure 40 : La représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition du radical ABTS^{•+} en fonction de la concentration en extrait éthanolique de la jusquiame blanche.

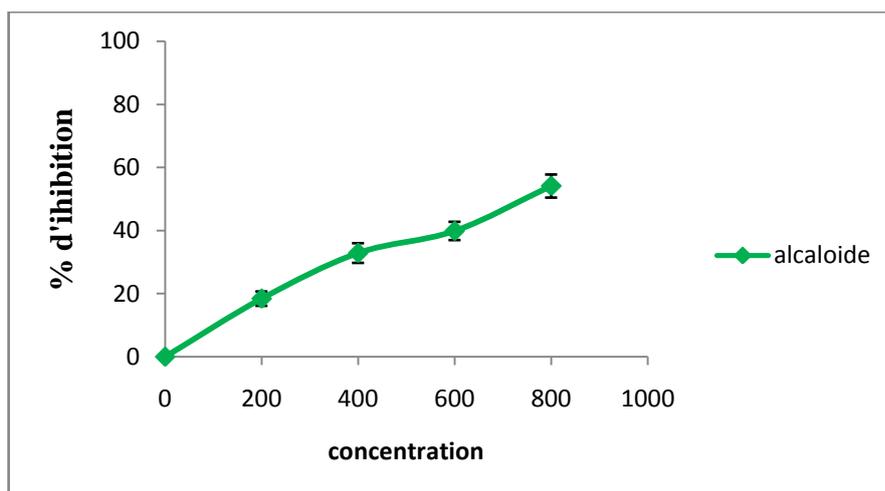


Figure 41: La représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition du radical ABTS^{•+} en fonction de la concentration en extrait alcaloïdique de la jusquiame blanche.

D'après ces figures, l'activité scavenging du radical ABTS^{•+} est proportionnelle aux concentrations des extraits, avec des IC₅₀ ($\geq 423 \mu\text{g/ml}$) indiqués dans le tableau XI, ces valeurs sont largement supérieures à celle obtenue avec le Trolox qui est de $50,18 \mu\text{g/ml}$. Cela implique que les deux extraits de la plante ont une faible activité anti radicalaire vis à vis du radical ABTS^{•+}.

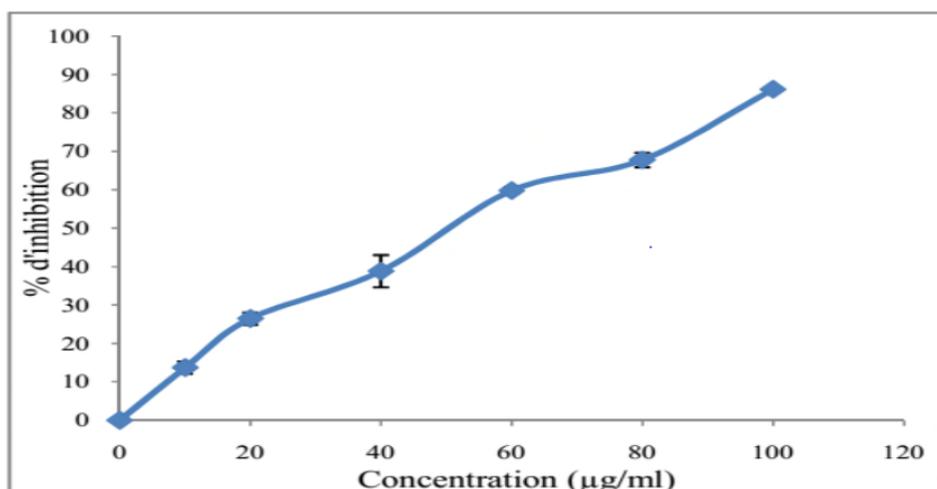


Figure 42 : La représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition du radical $ABTS^{*+}$ en fonction de la concentration en Trolox.

Tableau XII : Les IC_{50} des extraits éthanoliques et alcaloïdiques de *Hyoscyamus albus*.

Extraits	IC_{50}
Extrait éthanolique	423 ,16 µg/ml
Extrait alcaloïdique	742 ,05 µg/ml

III.5. Fractionnement et caractérisation de l'activité antioxydante des extraits de *Hyoscyamus albus* par CCM

III.5.1. Fractionnement des extraits

III.5.1.1. Extrait éthanolique

Les différents extraits de *Hyoscyamus albus* ont été soumis à des chromatographies sur couche mince préliminaires pour pouvoir apporter un aperçu sur la nature des constituants que l'on peut retrouver chez cette espèce.

➤ Visualisation à la lumière du jour

Le chromatogramme résultant de l'analyse de l'extrait éthanolique de *Hyoscyamus albus*, en utilisant la phase mobile : Toluène/acétone/acide formique (60 :60 :10 ; v/v/v) révélé à la lumière du jour est représenté dans la figure :

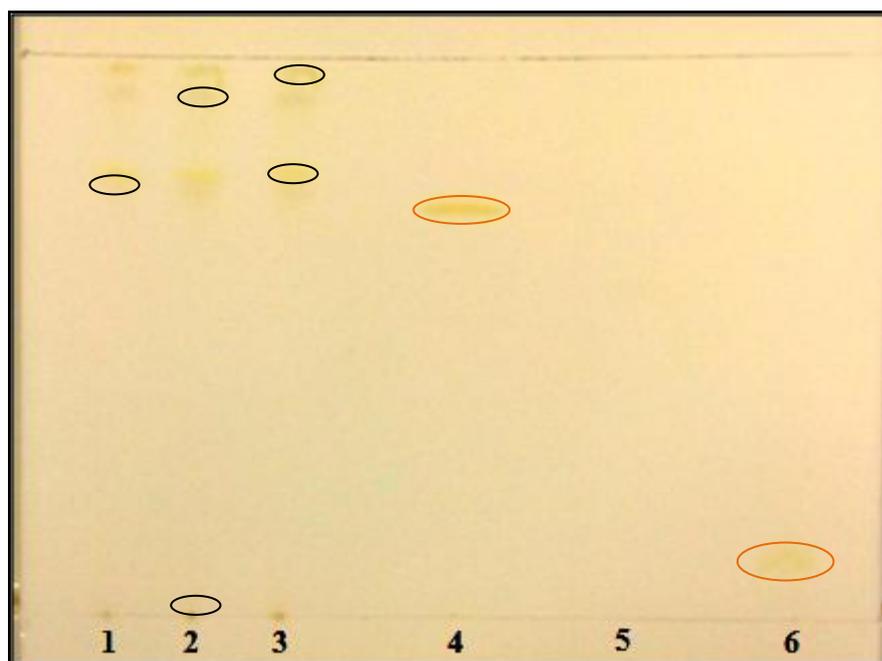


Figure 43 : Profil chromatographique de l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *Hyoscyamus albus* révélé à la lumière du jour. (1, 2, 3) : extrait éthanolique ; (4) : quercétine ; (5) : acide gallique ; (6) : rutine.

L'analyse du profil chromatographique des extraits à la lumière du jour (Figure 46) nous permet de constater que le système de solvants utilisé a permis une bonne séparation et une bonne migration des différents composés contenus dans l'extrait éthanolique. De cela, on déduit que ce système est adéquat pour le fractionnement de notre plante.

D'après le chromatogramme, on observe l'apparition de 5 bandes bien distinctes. A noter également l'apparition des spots correspondant à deux standards utilisés (quercétine et rutine).

➤ Visualisation après pulvérisation par la vanilline sulfurique

Le profil chromatographique révélé par la vanilline sulfurique de l'extrait éthanolique de *Hyoscyamus albus* (Figure 47) montre la présence de plusieurs spots, cela confirme la bonne séparation et le bon fractionnement (liquide-liquide) de nos extraits par le système de solvants choisi. Par ailleurs, nous constatons que le plus grand nombre de bandes sont de couleur violette et bleu, ce qui pourrait supposer que notre plante contient des monoterpènes et des stéroïdes (Akhanovna et al., 2012). Cela est en accord avec ce qui a été mentionné par Benhouda et Yahia. (2014) dans leur article.

On voit bien l'apparition des trois standards utilisés de couleur allant du jaune clair (acide gallique) au foncée (quercétine et rutine).

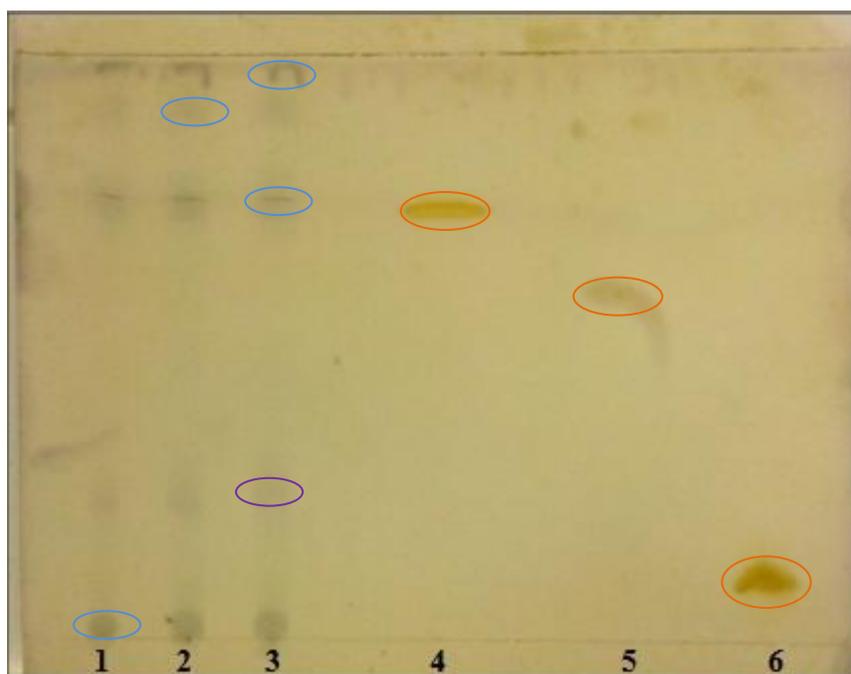


Figure 44: Profil chromatographique de l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *Hyoscyamus albus* révélé par la vanilline sulfurique. (1, 2, 3) : Extrait éthanolique ; (4) : quercétine ; (5): acide gallique; (6) : rutine.

➤ Visualisation sous UV

Le profil chromatographique observé sous UV est présenté dans la figure 48. Nous constatons que, l'extrait éthanolique est riche en composés phytochimiques cela est déduit par l'apparition de plusieurs bandes de couleur différentes. D'après Akhanovna *et al.* (2012) et Jork *et al.* (1994), ces couleurs correspondent à des composés bien définis (Tableau XII).

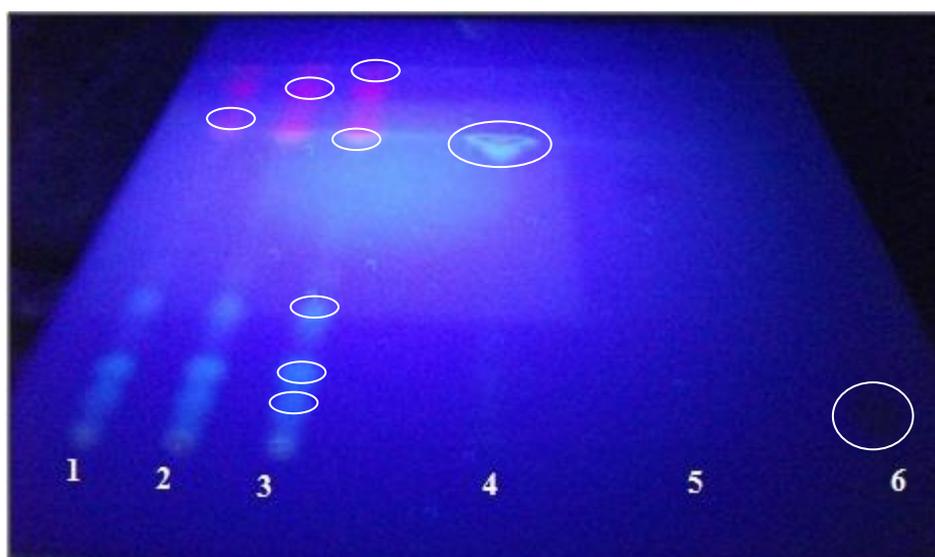


Figure 45 : Profil chromatographique de l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *Hyoscyamus albus* sous UV. (1, 2, 3) : Extrait éthanolique ; (4) : quercétine ; (5): acide gallique; (6) : rutine.

Tableau XIII : Les couleurs des bandes des extraits sous UV et les composés correspondants.

Couleur du spot	Composé
Rose	Anthocyanidine 3glucoside
Blanc	Flavonoïdes
Bleu pale fluorescent	Acides phénoliques

Nous remarquons également que les bandes de l'extrait éthanolique sont partagées en deux parties. Une partie qui se retrouve en haut de la plaque chromatographique cela pourrait nous renseigner sur la nature de ces composés qui surement ce sont des composés apolaires de ce fait entraînés par l'éluant. Et une partie en bas de la plaque retenue par le gel de silice du fait de sa polarité, on pourrait déduire que c'est des composés polaires.

III.5.1.2. Extrait alcaloïdique

➤ Visualisation à la lumière du jour

Le chromatogramme résultant de l'analyse de l'extrait alcaloïdique de *Hyoscyamus albus* en utilisant le système de solvants suivant chloroforme/éthanol/ammoniaque (85 :14 :1 ; v/v/v) révélé à la lumière du jour est représenté dans la figure :



Figure 46 : Profil chromatographique de l'extrait alcaloïdique de la partie aérienne de *Hyoscyamus albus* révélé à la lumière du jour. (1, 2, 3) : Extrait alcaloïdique.

D'après le chromatogramme, aucun spot n'a été révélé, cela est peut être dû au fait que la couleur de l'extrait été assez claire.

➤ **Visualisation sous UV**

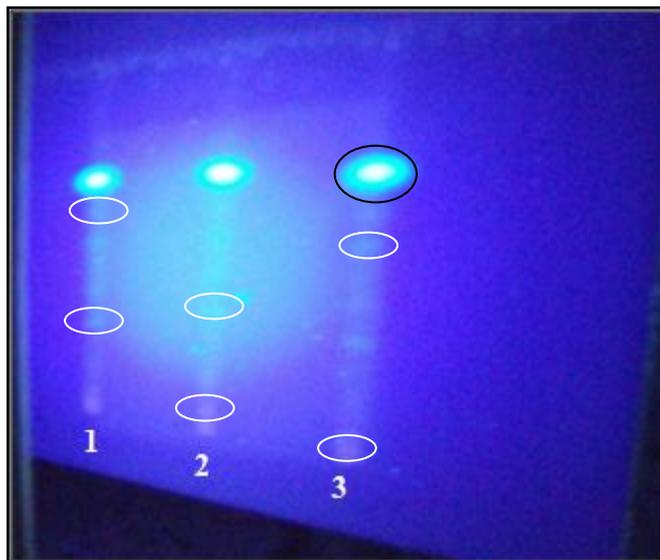


Figure 47 : Profil chromatographique de l'extrait alcaloïdique de la partie aérienne de *Hyoscyamus albus* sous UV. (1, 2, 3) : Extrait alcaloïdique.

Le profil chromatographique représenté dans la figure 50, révèle l'apparition de plusieurs spots de couleur rose claire et bleu pale mais aussi trois spots de couleur bleu-blanc très fluorescent.

➤ **Visualisation après pulvérisation par le réactif Dragendorff**

La figure 51 représente le profil chromatographique après pulvérisation de la plaque avec le réactif Dragendorff.



Figure 48: Profil chromatographique de l'extrait alcaloïdique de la partie aérienne de *Hyoscyamus albus* après pulvérisation par le réactif Dragendorff. (1, 2, 3) : Extrait alcaloïdique.

La caractérisation de l'extrait alcaloïdique de la partie aérienne de *Hyoscyamus albus* par CCM nous a permis de mettre en évidence la présence des alcaloïdes qui sont apparus sous forme de spots bruns après révélation avec le réactif de Dragendorff.

Le rapport frontal calculé pour ce composé est de 36%, cette valeur est proche à celui trouvé dans la littérature avec une étude réalisée par Wesolowska et Skrzypczak, (1985) dans les mêmes conditions (R_f apoatropine = 38%) donc, cela nous laisse supposer que le composé contenant dans notre plante pourrait être de l'apoatropine.

III.5.2. Caractérisation de l'activité anti oxydante par CCM

III.5.2.1. Activité anti radicalaire du DPPH

La figure ci-dessus montre les chromatogrammes des extraits de la plante après pulvérisation avec une solution de DPPH \cdot .

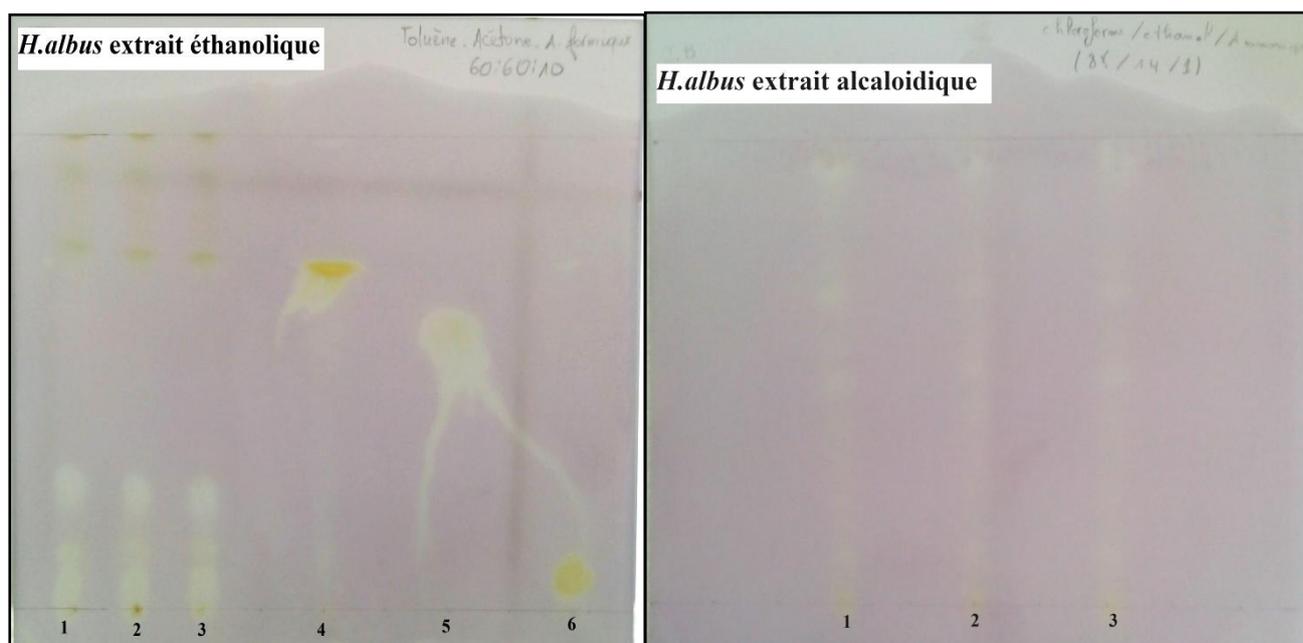


Figure 49: Le profil chromatographique des extraits de *Hyoscyamus albus* après pulvérisation par une solution de DPPH \cdot . Extrait éthanologique: (1,2,3) extrait, (4) quercétine, (5) acide gallique, (6) rutine. Extrait alcaloïdique : (1,2,3) extrait.

Le DPPH \cdot est un radical libre stable de couleur violacée, en présence de composés anti-radicalaires, le DPPH \cdot apparaît sous forme de bande jaune (forme réduite).

En vue générale, on observe au niveau des chromatogrammes l'apparition de spots de couleur jaune plus intense dans l'extrait éthanologique que l'extrait alcaloïdique. Ce qui nous

permet de confirmer que nos extraits possèdent une bonne activité antioxydante contre le DPPH^{*}, avec une prédominance au niveau de l'extrait éthanolique.

La caractérisation de l'activité antiradicalaire des extraits de la plante par CCM nous montre clairement que plusieurs spots de couleur jaune sont apparus ce qui est dû à la présence de composés à effet antiradicalaire. Cette technique nous a permis à la fois de caractériser l'activité antioxydante des extraits de la plante ainsi que les composés responsables de cette activité. En conséquent, elle nous permettra d'identifier ces composés en utilisant des molécules de référence.

III.5.2.2. Activité inhibitrice du radical ABTS^{•+}

La figure ci-dessus montre les profils chromatographiques des extraits de la plante après pulvérisation avec une solution de ABTS^{•+}. Le principe est basé sur la décoloration du radical ABTS^{•+} de couleur bleu-vert. On observe d'après la figure une décoloration au niveau de l'extrait éthanolique surtout au niveau des composés qui ont un rapport frontal faible, c-à-dire les composés hydrophiles tandis qu'au niveau de l'extrait alcaloïdique presque aucune décoloration n'est observé. Cela nous permet de déduire que l'extrait éthanolique possède une activité inhibitrice du radical ABTS^{•+} qui est peut être dû aux composés hydrophiles.

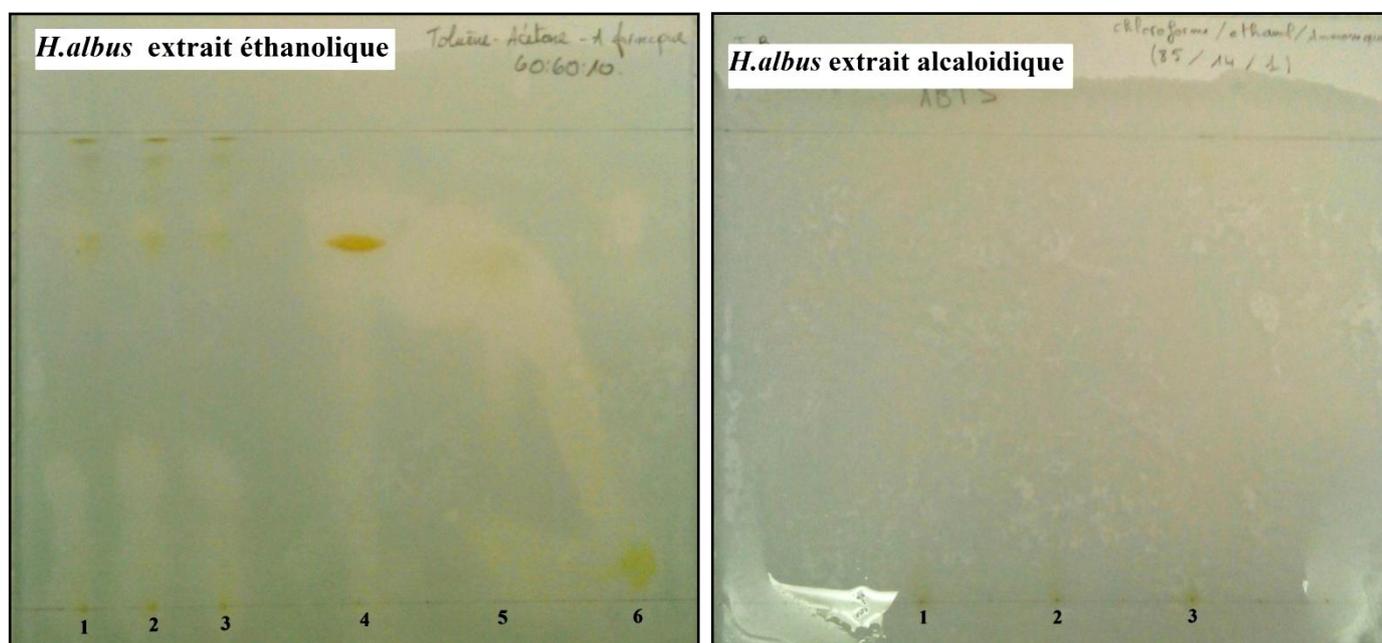


Figure 50: Le profil chromatographique des extraits de *Hyoscyamus albus* après pulvérisation par une solution de ABTS^{•+}. Extrait éthanolique: (1,2,3) extrait, (4) quercétine, (5) acide gallique, (6) rutine. Extrait alcaloïdique : (1,2,3) extrait.

> CONCLUSION ET PERSPETIVES

Conclusion et perspectives

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

La présente étude est portée sur la partie aérienne de la plante *Hyoscyamus albus* qui appartient à la famille des solanacées, l'une des familles les plus importantes, utilisées pour ses nombreuses propriétés pharmacologiques.

Notre étude est axée vers l'extraction des composés phénoliques et alcaloïdiques ainsi qu'au dosage des différents composés phénoliques et l'évaluation de l'activité antioxydante (test du DPPH[•] et ABTS^{•+}). La caractérisation des différents composés de la plante a été réalisée par une chromatographie sur couche mince ainsi qu'une mise en évidence des composés phénoliques et des alcaloïdes de la plante en utilisant des révélateurs chimiques appropriés.

Ainsi, notre travail nous a permis d'obtenir les résultats suivants :

- Les rendements d'extraction obtenus montrent que l'extrait éthanolique est riche en composés phytochimiques tandis que, l'extrait alcaloïdique représente un taux moyen en alcaloïdes.
- L'évaluation de la teneur en phénols totaux en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu indique que la plante est riche en composés phénoliques et en tanins condensés.
- Concernant l'activité antioxydante, tous les extraits de *Hyoscyamus albus* ont dévoilé une très forte activité scavenging du radical DPPH[•] à 100µg/ml par rapport aux standards utilisés, les IC₅₀ des extraites éthanoliques et alcaloïdiques de la plante ont été estimées à 11,37µg/ml et 55,52 µg/ml, respectivement.
- Cependant, les extraits de *Hyoscyamus albus* ont exercé une activité moyenne vis-à-vis du radical cationique ABTS^{•+} à 100µg/ml en comparaison avec l'activité enregistrée par le standard (le trolox).
- L'analyse chromatographique des deux extraits, observée à la lumière du jour, sous UV et après la pulvérisation avec la vanilline sulfurique et le réactif de dragendorff a confirmé que la partie aérienne de la plante est riche en composés phytochimiques. Parmi ces composés détectés, on cite : les anthocyanidines, les

flavonoïdes, les terpènes, les stéroïdes et les alcaloïdes tropaniques tels que l'apoatropine.

Si *Hyoscyamus albus* est une plante médicinale très utilisée en médecine traditionnelle, elle demeure encore relativement peu étudiée et ne connaît pas d'application en médecine conventionnelle.

- Il serait alors intéressant d'approfondir des recherches sur ses propriétés pharmacologiques, d'utiliser de nouvelles méthodes d'extractions, de purifications et d'identifications telles que : HPLC, RMN ou encore la spectrométrie de masse.
- Réaliser des études *in vivo* afin de démontrer et d'évaluer d'autres activités biologiques, des composés phénoliques et alcaloïdiques.
- Identifier les différents alcaloïdes contenus dans la plante et s'en servir dans le traitement et la guérison de nombreuses pathologies.

> REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- **Abbah, J.**, Amos, S., Chindo, B., Ngazel, I., et *al.* (2010). pharmacological evidence favouring the use of *Nauclea latifolia* in malaria, ethnopharmacy: Effect against nociception , inflammation , and pyrexia in rats and mice. *Journal of ethnopharmacology*, 127:85-90.
- Abdou Bouba A., Njintang Y.N., Scher J. et Mbofung C.M.F. (2010). Phenolic compounds and radical scavenging potential of twenty Cameroonian spices. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(3): 213-224.
- Akhanovna, M.B.J., Benson, B. B., Christian, K. K., et Yves-Alain, B. (2012). Sur l'analyse qualitative et pharmacologique de 2 plantes antihypertensives utilisées à gramanssabo en Côte d'Ivoire. *Nature &Technologie*, 2-12.
- Alderton, W. K., Cooper C. E. et Knowles R .G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, 357: 593-615.
- Alexander J., Benford D., Cockburn A., Cravedi J-P., Dogliotti E., Di Domenico A., Fernández-Cruz M L., Fürst P., Fink-Gremmels J. et *al.*, (2008). Tropane alkaloids (from *Datura* sp.) as undesirable substances in animal feed. *The EFSA Journal*, 691: 1-55.
- Alghazeer, R., El-Saltani, H., Nabeel, S., Al-Najjar, A. et Hebail, F. (2012). Antioxidant and antimicrobial properties of five medicinal Libyan plants extracts. *Natural Science*, 4 :324-335 325.
- Alkurd, A., Hamed, T. R. et Al-Sayyed, H.(2008). Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 4: 265 - 274.
- Alphonse, M.E. (1864). De la famille des solanacées. *Paris : impr. de E. Martinet. Cote: P5292.*
- Anderson, J.W., Johnstone, B.M. et Cook-Newell, M.E. (1995). Meta-Analysis of the Effects of Soy Protein Intake on Serum Lipids. *N. Engl. J. Med*, 333:276-282.
- Aniszewski, T. (2007). *Alkaloids - Secrets of Life, Alkaloid Chemistry, Biological significance, Applications and Ecological Role*, Elsevier.
- 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.

- **Ba, K.**, Tine, E., Destin, J., Cissé, N. et Thonart, P. (2010). Etude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 14 (1): 131-139.
- Bartosz, G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Com on Toxicology*, 9: 5-2.
- Béguel, J-P. (2012). Etude de la capacité antioxydante en lien avec la reproduction chez l'huitre creuse. 11:115-20.
- Belkheiri, N. (2010). *Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes*. Mémoire en vue de l'obtention du grade de doctorat. Spécialité chimie –biologie-santé. Université de Toulouse.
- Benhouda, A et Yahia, M. (2014). Toxicity, analgesic and anti-pyretic activities of methanolic extract from *hyoscyamus albus*' leaves in albinos rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(3): 121-127.
- Blandine, G. (2006). *Stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la glisodin*. Thèse pour obtenir le grade de docteur. Département biologie cellulaire. Université de Joseph Fourier.
- Boizot, N. et Charpentier, J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *INRA – Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques*.
- Bougurane, B. (2012). *Conception et synthèse des composés phénoliques hautement fonctionnalisés et études de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose)* .travail présenté en vue de l'obtention du diplôme de doctorat. Spécialité chimie-biologie-santé. Université de Toulouse.
- Bravo, L. (1998). "Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance." *Nutrition Reviews*, 56(11): 317-333.
- Brighente, I.M.C., Dias, M., Verdi, L.G. et Pizzolatti, M.G. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharmaceutical Biology*, 45: 156-161.
- Brown, J.H. and Taylor, P. (1990). Muscarinic receptor agonists and antagonists. The pharmacological basis of therapeutics. *Hardman J.G., Limbird L.E.*, 141-60.

- Brown, J.H. and Taylor, P. (2006). Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th Ed., L.L. Brunton, J.S. Lazo and K.L. Parker (Eds.), McGraw-Hill Med. Publ. Div., New York, p. 183-200.
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} édition Lavoisier. Paris. 1120p.
- Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie phytochimie, plantes médicinales. 4^{ème} édition. Lavoisier. Paris. 1268p.

- **Chebil, L.** (2006). Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle. Institut national polytechnique de Lorraine. Lavoisier. Paris. 1268p.
- Chiang, H.C., Lo, Y.J. et Lu, F.J. (1994). Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Also philaspinulosa* (Hook) Tryon. *Enzyme Inhibition*, 8 (1): 61-71.
- Choe, E. et Min, D.B. (2005). "Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods." *Journal of Food Science*, 70(9):142-159.
- Christen, Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71: 621 -629.
- Conrad, J., Vogler, B., Klaiber, I., Roos, G., Walter, U. et Kraus, W. (1998). Two triterpene esters from *Terminalia macroptera* bark. *Phytochemistry*, 48: 647 - 650.
- Cooper, J.C. et Hall, E.A.H. (1993). Catalytic reduction of benzoquinone at polyaniline and polyaniline/enzyme films. *Electroanalysis*, 5: 385-397.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12 (4): 564-570.

- **Deby, C.** (2009a). Initiation au métabolisme de l'oxygène : [www.2/ulg.ac.be/cord/initiation au met oxygene/sommaire.html/](http://www.2/ulg.ac.be/cord/initiation%20au%20met%20oxygene/sommaire.html/)
- Deby, C. (2009b). L'oxygène en pathologie des mammifères. Partim : [www.2/ulg.ac.be/cord/oxygene pathologie mammifères/oxypath.html/](http://www.2/ulg.ac.be/cord/oxygene%20pathologie%20mammiferes/oxypath.html/)
- Delattre, J., Beaudoux, L. et Bonnefont- Rousselot, D. (2005b). "Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques." 45-60.
- Densiov, E.T. et Afanas'ev, I.B. (2005). In: Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Eds: Taylor & Francis Group (U.S.A), 703-861.

- Di silvestro, RA. (2000). Zinc in relation to diabetes and oxidative disease. *J Nutr*, 130:1509-1511.
- Dykes, L. et Rooney, LW. (2006). Sorghum and millet phenols and antioxidants. *Journal of cereal Sciences*, 44: 236-241.

- **El Gharras, H.** (2009). "Polyphenols: Food sources, properties and applications – A review." *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12): 2512-2518.
- Erol, N.T., Sari, F. et Velioglu, Y.S. (2010). Polyphenols, alkaloids and antioxidant activity of different grades turkish black tea. *GIDA*, 35 (3):161-168.
- Esterbauer, H., Gebicki, P. et Jurgens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.*, 13, p. 341.

- **Favier, A.** (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, stress oxydant. L'actualité chimique, 108-114.
- Ferdous, M., Rouf, R., Shilpi, J.A. et Uddin, S.J. (2008). Antinociceptive activity of the ethanolic extract of *Ficus racemosa* Linn. (Moraceae). *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 8: 93-96.
- Fournier, J. (2001). Découverte des alcaloïdes : des marqueurs pour l'histoire de la chimie, *Revue d'histoire de la pharmacie*. XLIX, 331:315-332.

- **Gaire, B.P.** et Subedi, L. (2013). A review on the pharmacological and toxicological aspects of *Datura stramonium* L. *J Integr Med.*, 11(2): 73-79.
- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadehet, Z. et Jore, D. (2003). Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'actualité chimique - novembre-décembre Mécanismes biochimiques. 91-95.
- Ghedjati, N. (2014). *Toxicité aigüe et subaigüe des alcaloïdes naturels et synthétiques des graines du Datura stramonium*. Mémoire. Université Ferhat Abbas Sétif 1. 51p.
- Goudable, J. et Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Mdtabol*, 11:115-20.

- Goullé, J-P., Pépin, G., Dumestre Toulet, V. et Lacroix, C. (2004). Botanique, chimie et toxicologie des solanacées hallucinogènes : belladone, datura, jusquiame, mandragore, *Annales de Toxicologie Analytique*. XVI:(1).
- Grevoz, G. D. et Laubriet, A. (2007). Reconnaissance et préparation de médicaments à l'officine. *Edition Maloine*, Paris, p 18.
- Grynkiewicz, G. et Gadzikowska, M. (2008). Review Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. *Pharmacological reports*, 60: 439-463.
- Guignard, J.L. (1998). Abrégé de botanique. Masson Ed. Paris.
- Gutteridge, J.M.C. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, 41:19-28.

- **Halliwell, B.** (1996). Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathologie Biologie*. 44: 6-13.
- Heim, E.K., Tagliaferro, A.R. et Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants : chemistry , metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584.
- Hemalatha, S., Lalitha, P. et Arulpriya, P. (2010). Antioxidant activities of the extracts of the aerial roots of *Pothosaurea* (Linden ex Andre). *Der Pharma Chemica*, 2 (6): 84-89.
- Hennebelle, T. (2006). "Investigation chimique, chimio-taxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants." Chimie Organique et Macromoléculaire. Docotrat, p 303.
- Hesse, M. (1981). *Alkaloid Chemistry*. New York: John Wiley & Sons.
- Hobbs, A. J., Higgs, A. et Moncada, S. (1999). Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 39:191-220.
- Hool, L.C., Clin. (2006). *Exp. Pharmacol. Physiol*. 33:146-151.
- Hordé, P. (2014). Scopolamine – Définition, Sante-Medecine.
- Human, D. (2002). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Sci. Aging Knowl. Environ.*, 37 14.

- **Javanovic, S.V.**, Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B. et Simic, M.J. (1994). Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*. 116: 4846-4851.
- Jork H., Funk W., Fischer W. et Wimmer H. (1994). Thin-Layer Chromatography: reagents and detection methods. 1: 448.
- **Kartal, M.**, M. L. Altun and S. Kurucu (2003). "HPLC method for the analysis of harmol, harmalol, harmine and harmaline in the seeds of *Peganum harmala* L." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 31(2): 263-269.
- Kochetova, M.V., Semenistaya, E.N., Larionov, O.G. et Revina, A.A. (2007). Determination of biologically active phenols and polyphenols in various objects by chromatographic techniques. *Russian Chemical Reviews*, 76(1):79-90.
- Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique*, 20:165-177.
- Koleva, I.I., van Beek, T.A., Soffers, A.E.M.F., Dusemund, B. and Rietjens, I.M.C.M. (2012). Alkaloids in the human food chain– Natural occurrence and possible adverse effects. *Mol. Nutr. Food Res.*, 56:30–52.
- **Laguerre, M.**, Lopez-Giraldo, L.J., Lecomte, J., Pina, M. et Villeneuve, P. (2007). outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante. *OCL VOL*, 14(5) :278-292.
- Le, K., Chiu, F. et Ng, K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105: 353–363.
- Lupu, S., del Campo, F.J. et Munoz, F.X. (2010). Development of microelectrode arrays modified with inorganic-organic composite materials for dopamine electroanalysis. *J. Electroanal. Chem*, 639:147-153.
- **Mabile, L.**, Meilhac, O., Escargueil-Blanc, I., Trolly, M., Pieraggi, M.T., Salvayre, R. et Nègre-Salvayre, A. (1997). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17:1575-1582.

- Mahmood, U., Yogendra, S., Raghunath, S. et Thakur, R. (2001). 2, 3-dimethyl nonacosane and tropane alkaloids from *Hyoscyamus albus*. *Phytochemistry*, 24 (7): 1618- 1619.
- Majhenic L., Kerget M.S. et Knez Z. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104:1258–1268.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy et Jimenez, L. (2004). "Polyphenols: Food sources and bioavailability." *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5): 727-747.
- Marc, F., Davin, A., Deglène-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M. et Fritsch, P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Médecine Sciences*, 20(4): 458-463.
- Martinez, S. M.T. (2004). "Valorisation d'hydrolysats de co-produits de crevettes : étude de l'activité antiradicalaire et antioxydante, fractionnement des substances actives et effet de la glycation." Microbiologie. Doctorat: 188.
- Mazars, G. (2002). « Pharmacopées du Proche-Orient antique », dans « Des sources du savoir aux médicaments du futur », J. Fleurentin, vol. IRD Éditions.
- Mc Cord, J. (1993). Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem*, 26:351-357.
- Mena, S., Ortega, A. et Estrela, J.M. (2009). "Oxidative stress in environmental induced carcinogenesis." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1-2): 36-44.
- Michel, B. (2001). *Intoxications des animaux domestiques par plantes de la famille des solanacées*. Thèse de doctorat vétérinaire. Université Claude Bernard, Lyon I. 72p.
- Miller, N.J. et Rice-Evans, C. (1997). Factor influencing the antioxidant activity determined by the ABTS^{•+} radical cation assay. *Free Radical Biol. Med*, 26: 195-199.
- Molyneux, P. (2004). The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol*, 26 (2): 211-219.
- Montagnier, L., Olivier, R. et Pasquier, C. (1998). Oxidative stress in cancer, AIDS and neurodegenerative diseases, Marcel Dekker, New York.

- Morris, C.J., Earl, J.R., Trenam, C.W. et Blake, D.R. (1995). Reactive oxygen species and iron-a dangerous partnership in inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 27: 109-122.
- Mputu KANYINDA , J-N., PIERART, C., DESTAIN, J., NOKI, P. et THONART, P. (2014). Impact du séchage sur la viabilité de *Pseudomonas fluorescens* (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 18(1).
- Muanda, F.N.(2010). *Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques*. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université Paul Verlaine-Metz spécialité : chimie organique.
- Muniz, M.N. (2006). *Synthèse d'alkaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)- camptothecine*. Other. Université Joseph-Fourier - Grenoble I.
- **Nacz**, M. et Shahid, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in foods. *Journal of chromatography A*, 1054: 95-111.
- Nezamzadeh, A.M.K., Amini, H. et Faghihian. (2007). voltammetric determination of ascorbic acid based on its electrocatalytic oxidation at zeolite-modified carbon-paste electrodes. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2: 583-594.
- Nkhili, Z. (2009). *Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant*. Thèse en co-tutelle. Diplôme de Doctorat. Université d'Avignon et des pays de vaucluse.
- Nohl, H. (1994). Generation of superoxide radicals as by pro-duct of cellular respiration. *Ann Biol Clin*, 199-204.
- **Opera**, E.C. (2002). Oxydatives stress, micronutrients, diabetes mellitus and its complications. *the journal of the royal society for the promotion of health*, 122(1): 28-34.
- Oyedemi, S. et Afolayan, A.j. (2011). *In vitro and in vivo Antioxidant Activity of Aqueouss Leaves Extract of Leonotis (L.)R.Br. International Journal of Pharmacology*, 7(2): 248-256.

- **Palazón, J.,** Ocaña, A., Vazquez, L. et Mirjalili, M. (2008). Application of Metabolic Engineering to the Production of Scopolamine. *Molecules*, 13 : 1722-1742.
- Pastre, J. (2005). *interet de la supplementation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques*. Thèse pour obtenir la garde de docteur veterinaire .Université de Toulouse.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxydants. *Journal of natural products*, 63: 1035-1042.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K. et Defraigne, J.O. (2002). Physiological action of antioxydant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16: 233-239.

- **Re, R.,** Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. et Evans, C. (1999). Antioxydant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9/10): 1231-1237.
- Rezaire, A. (2012). *Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien Oenocarpus bataua (patawa)*. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat. Spécialité : phytochimie. Université des Antilles et de la Guyane. Cayenne.
- Rietjens, I.M.C.M., Boersma, M.G., de Haan, L., Spenkelink, B., Awad, H.M., Cnubben, N.H.P et al. (2002). The pro-oxidant chemistry of natural antioxydants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11: 321-33.
- Robinson, T. Ph.D. (1981). Tropane Alkaloids. *The Biochemistry of Alkaloids. Molecular Biology Biochemistry and Biophysics*, 3: 58-66.
- Romeike, A. (1956). *Flora* 143:67.

- **Salvayre, R.,** Auge, N. and Nègre-Salvayre, A. (2003). Rôle de l'oxydation dans la genèse et la progression de l'athérosclérose. In *L'athérosclérose : Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques.*, J.-F. Toussaint, M.-P. Jacob, L. Lagrost and J. Chapman, Eds. Masson: Paris, 14 : 269-290.
- Schofield, P., Mbugua, D.M. et Pell, A.N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 21-40.

- Schultes, R.E. et Hofmann, A. (1993). Les plantes des dieux. Les plantes hallucinogènes, botanique et ethnologie. Ed. du Lézard. Paris.
- Sekli-belaidi, F. (2011). *Fonctionnalisation de surfaces d'électrodes par un film de poly (3,4-éthylènedioxythiophène) pedot pour l'élaboration de microcapteur spécifique des acides ascorbique et urique : application à l'étude des propriétés antioxydantes du sérum sanguin.*Thèse En vue de l'obtention du diplôme de doctorat. Spécialité : Génie des Procédés et de l'Environnement. Université de Toulouse.
- Serteyn, D., Mouithys-Mickalad, A., Franck, T., Grulke, S., Lamy, M., Deby, C. et Deby-Dupont, G. (2002). La nature chimique et la réactivité de l'oxygène. *Ann. Méd. Vét, 146* : 137-53.
- Soullère, L., Viodé, C., Périé, J. et Hoffmann, P. (2002). Selective Inhibition of Fe-versus Cu/Zn- Superoxide Dismutases by 2,3-Dihydroxybenzoic Acid Derivatives. *Chem. Pharm. Bull., 50*:578-582.
- Strauss, A. (1989). in: Y.P.S. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer, Berlin. 7*: 286-314.
- **Tapas, A.,** Sakarkar, D. et Kakde, R. (2008). Flavonoids as nutraceuticals: a review," *Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 7(3)*:1089–1099.
- **Udenigwe, C.C.,** Ramprasath, V.R. Aluko R.E. et Jones P.J.H. (2008). "Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy." *Nutrition Reviews, 66(8)*:445-454.
- **Vakili, B.,** Karimi, F., Sharifi, M. et Behmanesh M. (2012). Chromium-induced tropane alkaloid production and H6H gene expression in *Atropa belladonna L.* (Solanaceae) in vitropropagated plantlets. *Plant Physiology and Biochemistry. 52*: 98-103.
- Vanu, M.R., Palanivelu, S. and Panchanatham, S. (2006). Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of *Semecarpus anacardium* Linn. Nut milk extract in experimental inflammatory conditions. *Biological and Pharmaceutical Bulletin, 29*: 693-700.

- **Wesolowska, M.** et Skrzypczak, L. (1985). *In vitro* androgenic cultures of *hyoscyamus niger L.*, *H.albus L.* and alkaloids content assay. *Acta societatis, BOTANICORUM POLONIAE*, 54(1): 107-113.
- **Xia, E.Q.**, Deng, G.F., Guo, Y. J. et Li, H.B. (2011). "Biological activities of polyphénols from grapes." *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2): 622-646.
- **Yap, C. F.**, Ho, C. W., Wan Aida, W. M., Chan, S. W., Lee, C. Y. et Leong, Y. S. (2009). Optimazation of extraction condition of total phenolic compounds from star fruit (*Averrhoacarambola L.*) residues. *Sains Malaysiana*, 38 (4): 511- 520.
- Yoshikawa, T., Yamamoto, Y. et Naito, Y.(2000). Free radicals in chemistry. *Biology and Medicine*, Ed. Oica International, Londres.

[1]http://www.florealpes.com/fiche_hyoscyamusalbus.php?zoomphotod=4&PHPSESSID=007e613d5439c0b2945d31d8492e8918

[2][http://fr.wiktionary.org/wiki/jusquiame#/media/File:Jusquiame_blanche_\(dessin\).jpg](http://fr.wiktionary.org/wiki/jusquiame#/media/File:Jusquiame_blanche_(dessin).jpg)

[3]http://www.florealpes.com/fiche_hyoscyamusalbus.php?zoomphotod=5&PHPSESSID=007e613d5439c0b2945d31d8492e8918#visiga

> ANNEXES

ANNEXES

Annexe N°1 : Préparation de la solution au chlorure d'aluminium :

- la solution d'acétate de sodium et de chlorure d'aluminium est préparée comme suit :
133mg $AlCl_3$ + 400mg d'acétate de sodium dans 100ml eau distillée.

Annexe N°2 : Préparation de la solution mère ABTS^{•+} :

- La solution mere d'ABTS^{•+} (7 mM) : 72 mg de l'ABTS + 13,24 mg de persulfate de potassium (2,45 mM) dans 20 ml d'eau distillée, et laissée incuber pendant 16h a l'obscurité. La solution d'ABTS^{•+} est diluée avec d'eau distillée jusqu'à atteindre une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm.

Annexe N°3 : Courbes d'étalonnages utilisées pour le calcul des teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et tannins condensés :

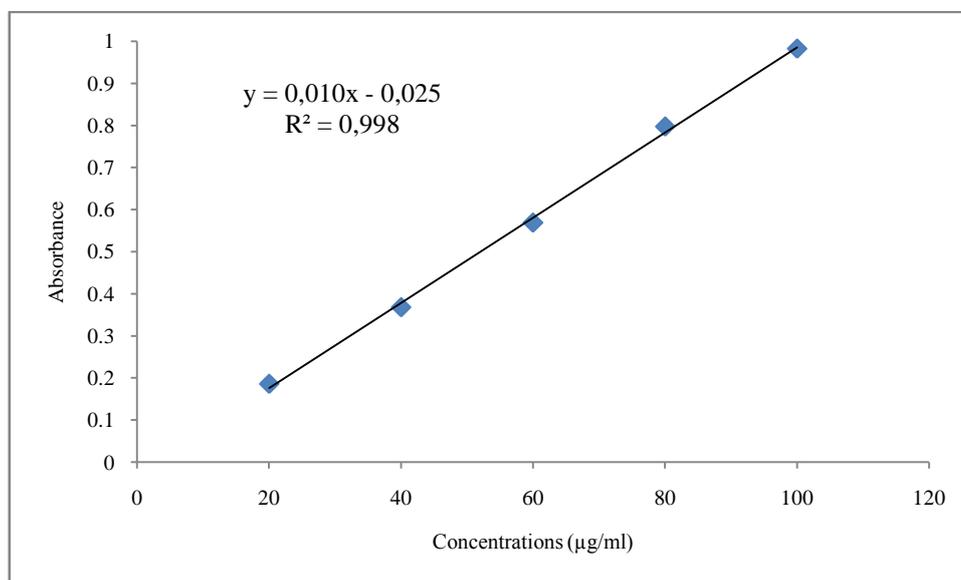


Figure 01 : Courbe d'étalonnage avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux
 $\lambda=765$ nm.

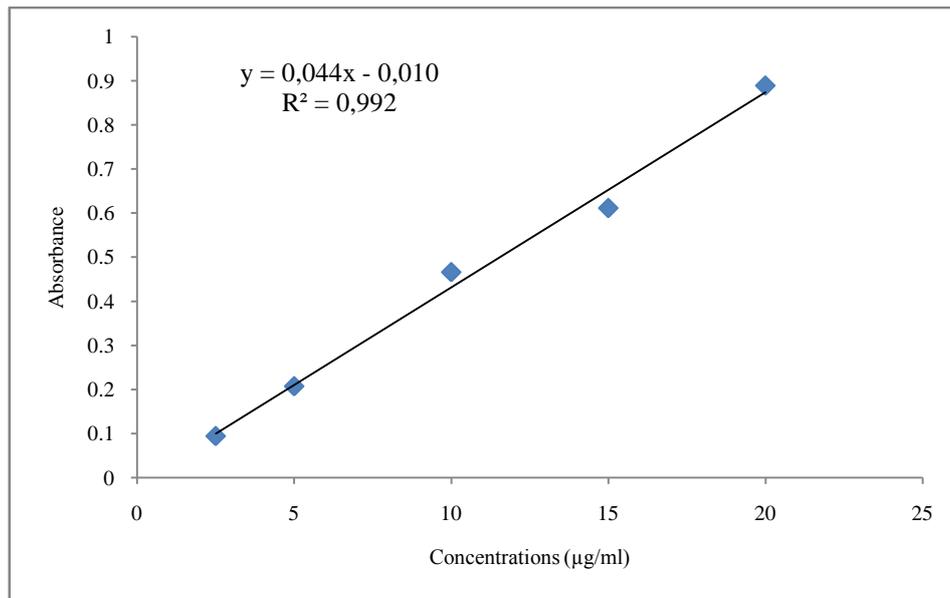


Figure 02 : Courbe d'étalonnage avec la quercétine pour le dosage des flavonoïdes $\lambda=430$ nm.

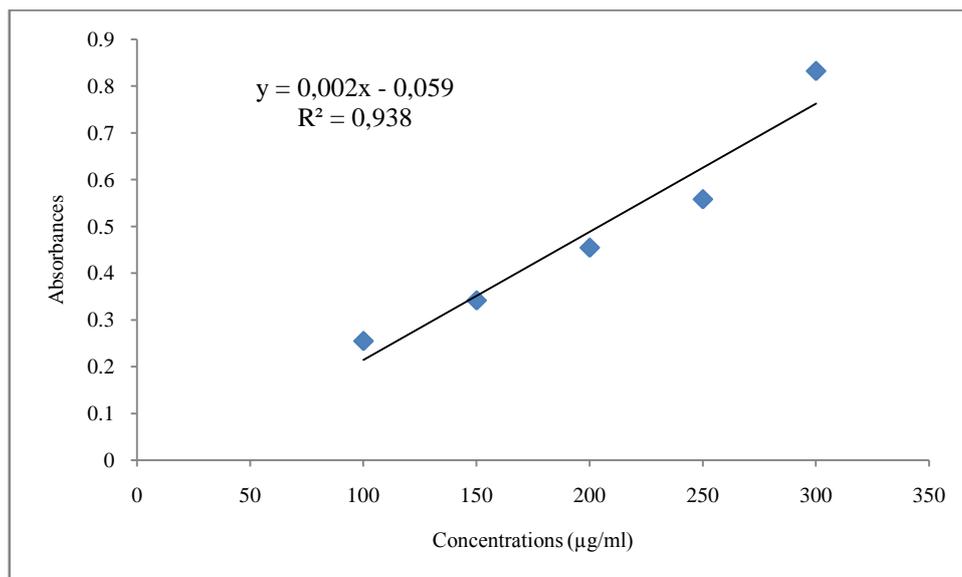


Figure 03 : Courbe d'étalonnage avec catéchine pour le dosage des pro-anthocyanidines
 $\lambda=500$ nm.

Annexe N°4 : Courbes obtenus par origin 8 utilisées pour le calcul des IC₅₀ :

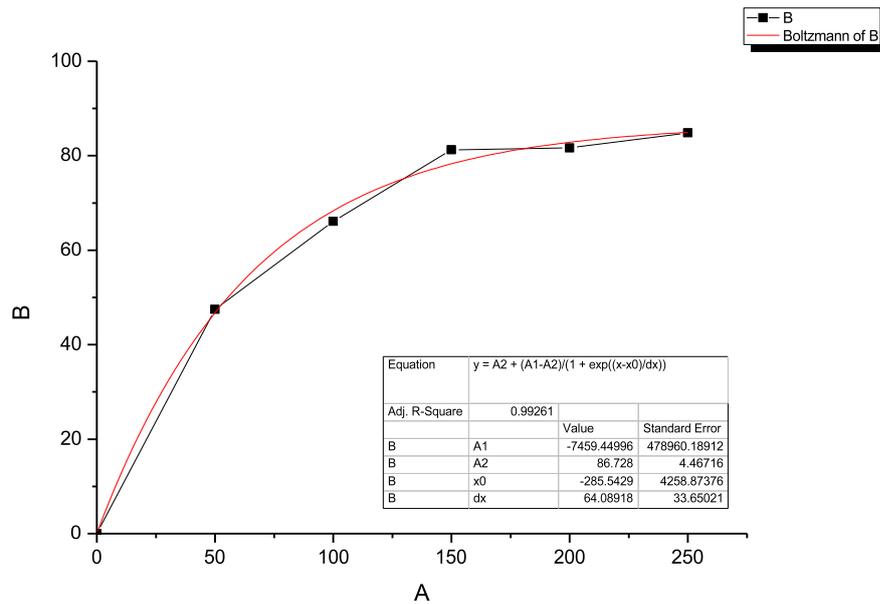


Figure 04 : Courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'extrait alcaloïdique de la jusquiame blanche dans l'activité scavenging du DPPH*.

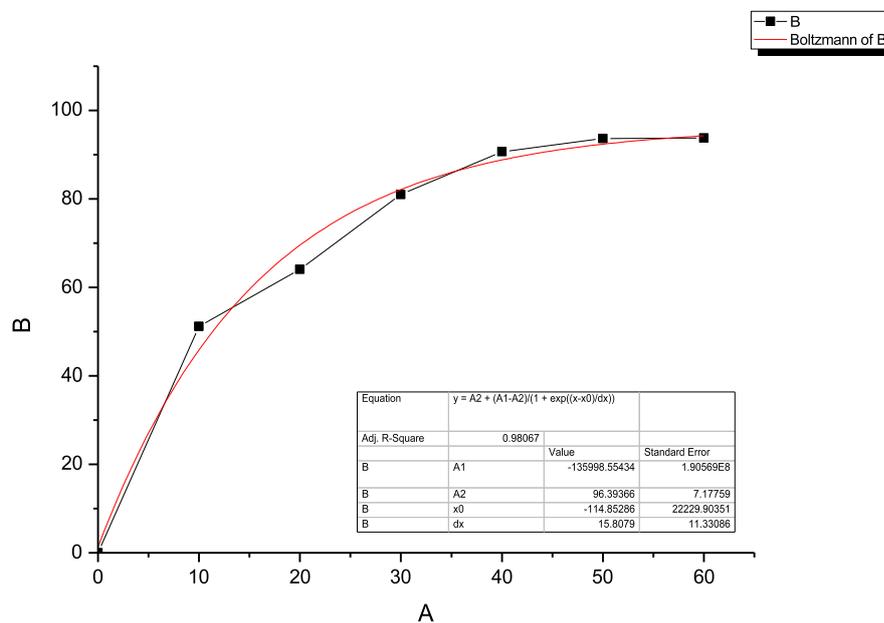


Figure 05: Courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'extrait éthanolique de la jusquiame blanche dans l'activité scavenging du DPPH*.

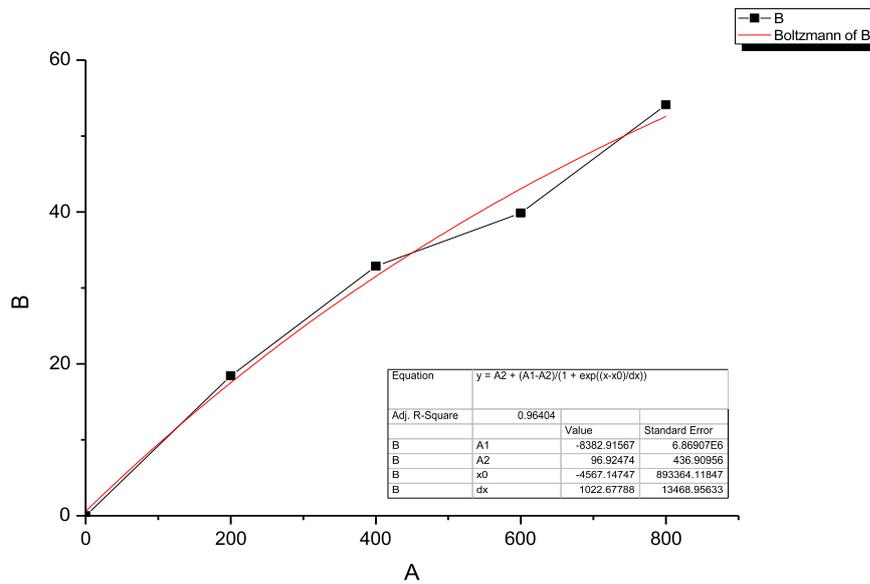


Figure 06 : Courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'extrait alcaloïdique de la jusquiame blanche dans l'activité scavenging du ABTS*+.

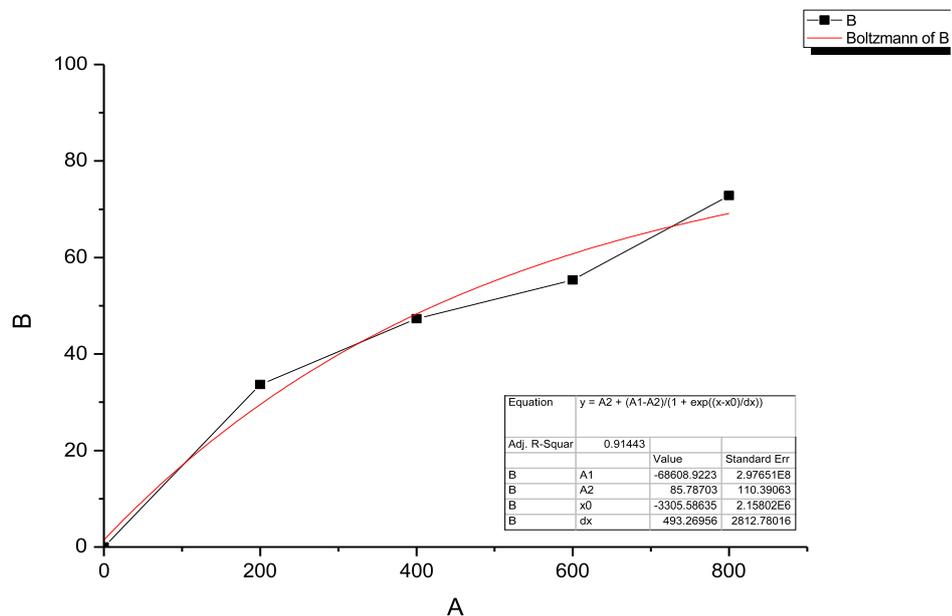


Figure 07: Courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'extrait éthanolique de la jusquiame blanche dans l'activité scavenging du ABTS*+.

Résumé

Hyoscyamus albus est une plante médicinale de la famille des Solanaceae, connus comme antioxydant. Dans le présent travail deux extraits ont été préparés, à partir de la partie aérienne de cette plante : l'un éthanolique et l'autre alcaloïdique. Les rendements en extraits brutes secs sont de l'ordre de 5.26% et 0.21 % respectivement. L'estimation quantitative des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés par la méthode colorimétrique a montré que les extraits ont des teneurs appréciables en phénols totaux et en tanins condensés et une faible concentration en flavonoïdes (1.29 ± 0.66 mg EQ/g d'extrait). L'évaluation du pouvoir antioxydant qui a été réalisée en utilisant la méthode du piégeage du radical libre DPPH[•] et ABTS^{•+} a indiqué que l'extrait éthanolique a montré une très bonne activité antioxydante contre le DPPH[•] qui est supérieure à 90% à 100µg/ml. En revanche, l'activité inhibitrice du radical ABTS^{•+} a été faible pour les deux extraits. Finalement, une caractérisation de l'activité antioxydante par chromatographie sur couche mince a été réalisée. L'analyse des profils chromatographiques des extraits a montré une bonne séparation des différents composés. Par ailleurs, la caractérisation de l'activité scavenging des radicaux ABTS^{•+} et DPPH[•] des extraits de la plante a montré une décoloration au niveau des extraits ce qui a confirmé les résultats obtenus précédemment. Cependant, des recherches plus approfondies seront nécessaires afin d'évaluer d'autres activités biologiques et éventuellement une identification des composés d'intérêts.

Mots clés : *Hyoscyamus albus*, radicaux libres, activité antioxydante, composés phénoliques, alcaloïdes, CCM.

Abstract

Hyoscyamus albus is a medicinal herb of the family of Solanaceae, known like antioxidant. In the present work two extracts were prepared from the aerial part of the plant: one ethanol and the other alkaloid. The yields of dry raw extracts are in the order of 5.26% and 0.21%, respectively. The quantitative estimation of total phenols, flavonoids and condensed tannins by the colorimetric method showed that the extracts have significant levels of total phenols and condensed tannins and a low concentration of flavonoids (1.29 ± 0.66 mg EQ /g of extract). Evaluation of antioxidant activity that has been performed using the method of trapping free radical DPPH[•] and ABTS^{•+} indicated that the ethanol extract showed a very good antioxidant activity against DPPH[•] greater than 90% at 100µg/ml. However, the inhibitory activity of the radical ABTS^{•+} was low for both extracts. Finally, characterization of the antioxidant activity by thin-layer chromatography was performed. The analysis of chromatographic profiles of the extracts showed good separation of the different compounds. Furthermore, the characterization of the activity of scavenging ABTS^{•+} radical and DPPH[•] of the extracts of the plant showed discoloration in extracts which confirmed the previous results. However, further research is needed to assess other biological activities and identification of interest compounds.

Keywords: *Hyoscyamus albus*, free radicals, antioxidant activity, phenolic compounds, alkaloids, TLC.

ملخص

Hyoscyamus albus هي إحدى النباتات الطبية من عائلة Solanaceae المعروفة بالمضادة للأكسدة. في هذا العمل، قمنا بتحضير مستخلصان من الجزء الهوائي للنباتة: مستخلص إيثانولي و آخر الكالويدية. فالمرود من المستخلص الصافي الجاف هو: 5.26% و 0.21% على الترتيب. إن التقدير الكمي من الفينول الكلي، الفلافونويد و التنيك المكثفة بطريقة التحويل اللوني أظهرت إن المستخلصات تحتوي على كمية معتبرة من الفينول الاجمالي و التنيك المكثفة و تركيز ضعيف من الفلافونويد 0.66 ± 1.29 mgEQ/g. إن تقييم المضادة للأكسدة تم تحقيقها بأسلوب احتجاز الجذر الحر و بين نشاط جيد ضد الجذر DPPH[•] بقيمة تفوق 90% في 100µg/ml. من ناحية أخرى، إن النشاط المثبط ل'ABTS^{•+} كان ضعيفا للمستخلصين. و أخيراً، بيان خصائص النشاط للمضاد للأكسدة بطريقة الكروماتوغرافي على طبقة رقيقة. إن تحليل خصائص الكروماتوغرافي أظهرت فصل جيد لمختلف المركبات. من جهة أخرى، بيان خصائص المضاد للأكسدة DPPH[•] و ABTS^{•+} من المستخلصات بين نقص اللون على مستوى المستخلصات هذا ما أكد النتائج المتحصلة عليها. غير إن دراسات المعقدة أكثر ضرورية لتقييم النشاطات البيولوجية الأخرى و تشخيص المركبات المفيدة.

الكلمات المفتاحية: الجذور الحرة، النشاط المضاد للأكسدة، المركبات الفينوليكية، الالكالويدات، الكروماتوغرافي على طبقة رقيقة.