

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie physico-chimique
Spécialité Biochimie Appliquée



Réf :

Mémoire de Fin d'étude
En vue de l'obtention du diplôme
MASTER

Thème

Evaluation des potentiels antioxydants et anti-hémolytique des extraits méthanoliques encapsulés de plantes médicinales

Présenté par :

SAIDI Zahia & ROUABAH Karima

Soutenu le : 26 Juin 2023

Devant le jury composé de :

Mme. DJOUDAD-KADJI H.	Pr.	Président
Mme. KHETTAL B.	Pr.	Encadreur
Mr. OTMANI A.	MAB.	Examineur

Année universitaire : 2022 / 2023

Remerciements

Au terme de ce travail nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage et la patience de mener à fin ce mémoire.

On tient à exprimer nos plus chaleureux remerciements à notre promotrice Professeure KHETTAL Bachra de nous avoir fait l'honneur de nous encadrer et accompagner dans la réalisation de ce travail. Veuillez trouver ici Madame notre profonde gratitude.

On est très honorées par la présence du Mm. DJOUDAD-KADJI H. et Mr. OTMANI A. Dans notre jury de soutenance. Merci pour l'évaluation de ce travail.

On tient à remercier Mme Hassaine S. ingénieure du laboratoire recherche biotechnologie végétale et ethnobotanique ou nous avons effectué notre travail de mémoire de master ainsi que Lydia et Meriem, ingénieurs du laboratoire pédagogique du département de Biologie Physico-chimiques, ou nous avons aussi réalisé une partie de ce travail.

Nos remerciements vont aussi au staff du Centre de Transfusion Sanguine de Sidi Ali Lebhar de Bejaia d'avoir fourni le sang sur lequel on a travaillé.

Nous témoignant enfin notre reconnaissance à tous ceux et celles ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de notre mémoire de fin de cycle.

Dédicaces

Je dédie ce travail

À mon père, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir.

À ma mère, la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur, à qui je souhaite une longue vie pleine de bonheur et de santé

À mes très chers frères et sœur qui ont été toujours à mes côtés : Ali, Nadjib et Ines

À mon fiancé Daoud et sa famille.

À mes chers oncles, tantes, cousin cousine paternelle et maternelle

À amies : Karima, Celina, Roummaïssa, Zahra, Salima et Thiziri

Ainsi qu'à tous ceux qui m'ont aidée de loin au de près.

Zahia

Dédicaces

À celle qui m'a soutenue nuits et jours, durant tout mon parcours Très chère mère je te dis : merci.

À mon cher père, pour son soutien, son aide et sa compréhension, que Dieu vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie.

À mon frères Larbi et ma sœur Asma. Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, Votre joie me comble de bonheur. Puisse Dieu vous garde, éclaire votre route et vous aide à réaliser vos vœux les plus chers.

À mes chers oncles, tantes Amina et Rabia,

À mes chères cousines et à tous les membres de la famille Ahaddad et Rouabah.

À ma chère binôme zahia et sa famille. Et à toutes personnes qui m'ont aidé de proche ou de loin.

Karima

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
AGPI :	Acides gras poly-insaturés
AlCl ₃ :	Trichlorure d'aluminium
DPPH :	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
ERO :	Espèces réactives d'oxygène
ERN :	Espèces réactives de nitrogène
Eq.AG :	Equivalent Acide Gallique
Eq.AT :	Equivalent Acide Tannique
Eq.C :	Equivalent Catéchine
Eq.Q :	Equivalent Quercétine
FeCl ₃ :	Chlorure de fer
FRAP :	Ferric reduction ability of plasma
GSH :	Glutathion réduit
GSSH :	Glutathion oxydé
HCl :	Chlorure d'hydrogène
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
IC ₅₀ :	Concentration d'inhibition à 50%
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Na ₂ CO ₃ :	Carbonate de sodium
¹ O ₂ :	Oxygène singulet
RL :	Radicale libre
ROOH :	Hydroperoxyde lipidique
SOD :	Superoxyde dismutase

Liste des figures

Figure 1: Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire.	3
Figure 2: Structure de base du noyau flavan des flavonoides	7
Figure 3: Classes des flavonoïdes et Structures de quelques flavonoides.....	8
Figure 4: le matériel végétal de l'étude expérimentale : A. Fleur, feuille, bouton floral et racine des quatre plantes utilisées. B. Les poudres correspondantes poudres des quatre plantes végétales avant et après broyage	14
Figure 5: Réaction de réduction du radical DPPH	17
Figure 6: Réaction de réduction du complexe ferricyanide ferrique Fe (III) par antioxydant (AH)	18
Figure 7: Billes d'alginate de sodium contenant l'extrait de plante avant (A) et après séchage (B).....	21
Figure 8: Rendements d'extraction au méthanol.....	24
Figure 9: Taux des polyphénols totaux extraits des 4 plantes	24
Figure 10: Taux des flavonoïdes des extraits des plantes	24
Figure 11: Teneur en tannins condensés.....	24
Figure 12: Teneur en tanins hydrosolubles.....	24
Figure 13: efficacité anti-radical DPPH des extraits méthanoliques exprimés en IC 50	24
Figure 14: Pouvoir réducteur des différents extraits à différentes concentrations	24
Figure 15: variation des taux d'inhibition du radical H ₂ O ₂ en fonction des concentrations des extraits méthanoliques.....	24
Figure 16: Concentrations inhibitrice à 50% de H ₂ O ₂ des extraits méthanoliques.....	24
Figure 17: Effet des extraits sur l'activité anti-hémolyse induit par H ₂ O ₂	24
Figure 18: Activité anti-radical DPPH de l'extrait encapsulé en fonction de temps.....	33

Liste des tableaux

Tableau N°I : Les espèces réactives de l'oxygène et de nitrogènes	2
Tableau N°II : Les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.....	4
Tableau N°III : Exemples de plantes à activité antioxydants	6
Tableau N°IV : Liste de quelques techniques d'encapsulations	11
Tableau N°V : Exemples de quelque domaine d'application de l'encapsulation.....	12

Table de matiere

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....	1
--------------------------	----------

Partie 1 : Revue Bibliographique

I. Stress oxydatif et les antioxydants.....	2
I.1. Le stress oxydant.....	2
I.2. Les radicaux libres	2
I.3. Cibles moléculaires des radicaux libres	3
I.4. Les antioxydants	4
I.5. Plantes à activités antioxydantes	5
II. Les flavonoïdes : structure et propriétés thérapeutique	7
II.1. Généralité.....	7
II.2. Structure des flavonoïdes.....	7
II.3. Propriétés thérapeutiques des flavonoïdes.....	9
II.3.1. Activité antioxydants	9
II.3.2. Activité anti-inflammatoire	9
III. Encapsulation des substances bioactives	9
III.1. Généralités sur l'encapsulation	10
III.2. Technique d'encapsulation.....	10
III.3. Domaines d'applications de l'encapsulation.....	12

Partie 2 : Etude expérimentale

I. Matériels et méthodes.....	13
I.1 Préparation des échantillons d'étude.....	13
I.1.1. Espèces végétales.....	13
I.1.2. Le sang.....	13
I.2. Extraction des métabolites bioactifs.....	13
I.2.1. Préparation de la poudre de plante.....	13
I.2.2. Extraction au méthanol.....	14

I.2.3. Calcul du rendement.....	14
1.3. Dosage des composés phénoliques.....	15
1.3.1. Dosage des polyphénols totaux.....	15
1.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	15
1.3.3. Dosage des tanins condensés.....	16
1.3.4. Dosage des tanins hydrolysables.....	16
I.4. Evaluation du pouvoir antioxydant.....	17
I.4.1. Inhibition du radical DPPH.....	17
I.4.2. Test du pouvoir réducteur « FRAP »	18
I.4.3. Piégeage du peroxyde d'hydrogène	18
I.4.4. Inhibition de l'hémolyse induite par H ₂ O ₂	19
I.4.1.1. Préparation de la suspension des érythrocytes.....	19
I.4.1.2. Mesure du taux d'hémolyse.....	19
I.5. Encapsulation de l'extrait de verveine	20
I.5.1. Extraction de l'alginate de sodium.....	20
I.5.2. Encapsulation de l'extrait de verveine dans les billes d'alginate.....	20
I.5.3. Détermination du rendement d'encapsulation de l'extrait de verveine.....	21
I.5.4. Mesure de l'activité antiradicalaire de l'extrait de verveine encapsulé.....	21
I.6. Analyse statistique.....	22
II. Résultats et discussion.....	23
II.1. Rendement d'extraction.....	23
II.2. Quantité des composés phénoliques.....	24
II.3. Potentiel antioxydants.....	27
II.4. Rendement et activité antioxydants de l'extrait de verveine encapsulation.....	32
II 4.1. Rendement.....	32
II.5. Efficacité antiradicalaire de l'extrait de verveine encapsulé.....	32
Conclusion.....	33

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Introduction

Depuis des millénaires, les plantes médicinales représentent une source précieuse d'agents thérapeutiques utilisées dans les médecines traditionnelles et alternatives, pour traiter et prévenir les maladies. Elles contiennent des composés naturels qui ont des pouvoirs préventifs, en raison de leur richesse en substances actives issues principalement de leur métabolisme secondaire[1]. De plus ces quatre dernières années il y avait une montée considérable dans l'utilisation des plants médicinales, en raison de la pandémie covid-19, pour leurs propriétés antivirales, anti-inflammatoires et antioxydantes[2].

Les effets correctifs bénéfiques des matières végétales sont principalement dus au mélange de substances, appelées métabolites secondaires, Parmi ces métabolites secondaires, les composés phénoliques qui ont ainsi, et de manière croissante, attiré l'attention des thérapeutes en raison de leurs puissantes propriétés antioxydantes et de leurs effets marqués dans la prévention de diverses maladies associées au stress oxydatif [3].

Dans ce contexte s'insère l'objectif de notre travail qui est de quantifier quelques métabolites secondaires et d'évaluer quelques activités biologiques de quatre plantes médicinales de la flore algériennes. Il s'agit du bouton floral de *Syzygium aromaticum*, la racine de *Zingiber officinale*, les fleurs de *Chamaemelum nobile* et feuilles de *Aloysia citriodora* d'une part. et de réaliser un essai d'encapsulation des extraits méthanolique des feuilles de *Aloysia citriodora* et d'évaluer l'activité antiradicalaire de cet extrait encapsulé.

Notre travail sera présenté comme suit :

- ✓ Une première partie est une synthèse bibliographique consacré à un rappel sur le stress oxydant et différents antioxydants enzymatiques et non enzymatiques structure et propriétés thérapeutiques des flavonoïdes et une description succincte des méthodes d'encapsulations des substances bioactives.
- ✓ La seconde partie décrit le matériel et les méthodes utilisés lors du travail expérimental ainsi que l'ensemble des résultats obtenus et leurs discussions.

I. Stress oxydatif et les antioxydants

I.1 Le stress oxydant

Le stress oxydant est une circonstance anormale dans laquelle des cellules ou tissus de notre organisme doivent faire face à un flux de radicaux libres qui peut provoquer un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les capacités cellulaires antioxydantes. Dans les circonstances quotidiennes normales, les radicaux libres sont produits en permanence en faibles quantités comme des médiateurs tissulaires ou des résidus de réaction énergétiques ou de défenses [4].

I.2 Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des composés chimiques, molécules ou atomes caractérisés par la présence d'un ou plusieurs électrons célibataires qui leur confère une grande réactivité sur les constituants organiques et les structures cellulaires (Tableau N° I). En effet, ces radicaux libres auront toujours tendance à remplir leurs orbitales en captant des électrons pour qu'ils deviennent plus stable, ils vont donc se réduire en oxydant un autre composé [5]. Il existe deux types de radicaux libres ; ceux générés à partir de l'oxygène sont appelés espèces réactives de l'oxygène, et ceux formés par la réaction de l'oxygène avec le nitrogène appelé espèces réactives de nitrogène. Ils sont résumés dans le tableau N° I.

Tableau N° I : Les espèces réactives de l'oxygène et de nitrogènes [5-7]

	Espèces réactives radicalaires	Espèces réactives non radicalaires
ERO	Anion super oxyde (O₂^{° -}) : produit à partir de l'oxygène moléculaire, principalement par les cellules phagocytaires ; l'oxygène subit une réduction mono-électronique selon la réaction : $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\circ -}$	Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) : produit à partir du radical superoxyde en présence de superoxyde dismutase qui catalyse la réaction : $O_2^{\circ -} + O_2^{\circ -} \rightarrow H_2O_2 + O_2$
	Radical hydroxyle (OH[°]) : produit au sein des cellules suite à la réaction de Haber- Weiss (1) et la réaction de Fenton (2) : (1) $H_2O_2 + O_2^{\circ -} \rightarrow OH^{\circ} + OH^- + O_2$ (2) $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\circ} + OH^- + Fe^{3+}$	Oxygène singulet (O[°]) : forme active de l'oxygène qui est généré dans les organismes photosynthétiques et dans les macrophages et les neutrophiles chez les mammifères selon la réaction : $O^{\circ} + O^{\circ} \rightarrow O_2^1$
ERN	Monoxyde d'azote (NO[°]) : synthétisé par les cellules endothéliales via l'action de NO synthétases sur la L arginine par la réaction $NO^{\circ} + O_2^{\circ -} \rightarrow ONOO^-$	Peroxynitrite (ONOO⁻) : oxydant puissant et diffusible, capable d'endommager de nombreuses molécules biologiques

I.3 Cibles moléculaires des radicaux libres

Les radicaux libres hautement réactifs interagissent avec diverses biomolécules afin de se stabiliser. Ce qui provoque l'altération de ces molécules causant ainsi des dommages cellulaires et tissulaires. Les cibles des radicaux libres dans l'organisme sont variées et peuvent inclure :

i. Les protéines, en particulier ceux qui possèdent les acides aminés comme la cystéine, la méthionine, l'histidine, la proline, le tryptophane, et la tyrosine sont les plus réactifs et toute attaque radicalaire provoquera soit la réticulation par formation de ponts bi-tyrosine, l'apparition de groupements carbonylés, clivages de chaînes peptidiques ou modification de certains acides aminés (Figure 01). La plupart des dommages sont irréversibles et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles des protéines et la perte de leurs propriétés biologiques [7].

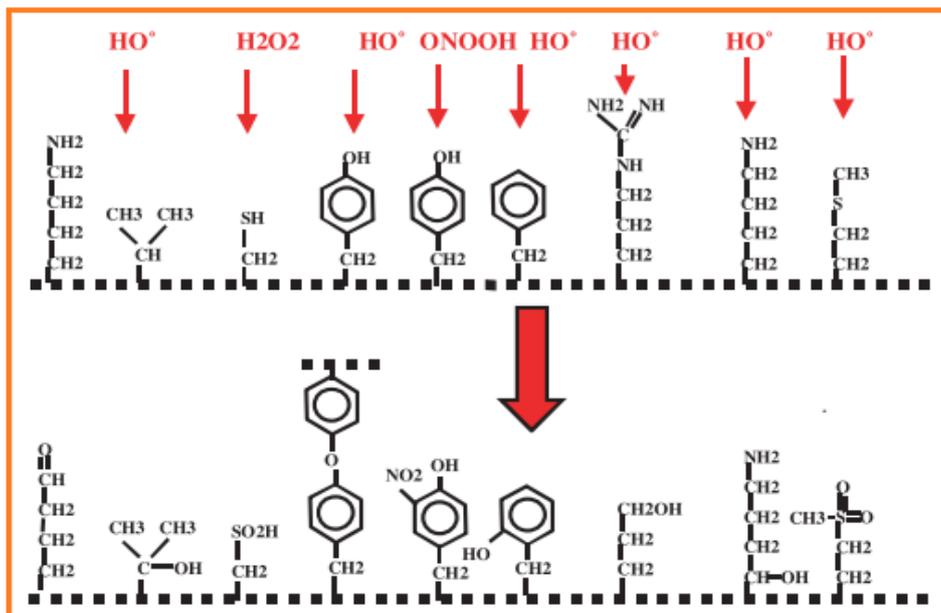


Figure 1: Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire [8].

- ii. Les bases puriques, pyrimidiques et le désoxyribose de L'ADN** sont la cible privilégiée des EOR ; elles sont alors transformées en produits de fragmentations et en bases oxydées. La modification de l'ADN induit des mutations par transversion GC (guanine/cytosine) vers TA (thymine/adénine) qui sont souvent observées spontanément dans les cellules cancéreuses. [8]
- iii. Les polysaccharides** sont aussi une cible des espèces réactives de l'oxygène, les ERO attaquent les mucopolysaccharides et notamment les protéoglycanes du cartilage. Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques en cas de présence de

traces métalliques ; la libération des cétoaldéhydes ; la libération d' H₂O₂ et OH•, qui entraîneront la coupure des protéines ou leur glycation [8].

- iv. **Les lipides membranaires** ; principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de radical hydroxyle, qui est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras poly-insaturés (AGPI). Le radical lipidique réagit avec la molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde (ROO•), suffisamment réactif pour arracher un proton à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction, il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire [9].

I.4 Les antioxydants

Un antioxydant est défini comme toute substance ou molécule ayant la capacité de retarder, prévenir ou inhiber la génération d'un oxydant toxique, de piéger ceux qui sont déjà produits et de les inactiver, bloquant de ce fait la réaction en chaîne de propagation produite par ces oxydants. Les antioxydants sont d'origine endogène métaboliques comme les enzymes ou d'origine exogènes nutritionnelles comme les vitamines C et E.[10] les principaux antioxydants naturels sont présentés dans le tableau N° II.

Tableau N° II : Les antioxydants enzymatiques et non enzymatique

Antioxydants enzymatiques		Réf.
Catalase	Agit avec les SOD, son rôle est de transformer le peroxyde d'hydrogène en simples molécules d'eau et oxygène moléculaire	[6]
Glutathion peroxydase	Elle réduit l'H ₂ O ₂ et les hydro-péroxydes lipidiques, en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur sur lequel ils transfèrent l'oxygène, le transformant en glutathion oxydé (GSSG)	[5]
Superoxyde dismutase	Catalyse la dismutation d'ion superoxyde, première espèce toxique formée à partir de l'oxygène, elle assure ainsi la première ligne de défense contre le stress oxydant	[4]
Antioxydants non enzymatiques		
Le glutathion	Le glutathion est un tripeptide constitué d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. On le retrouve dans de nombreux compartiments intracellulaires (cytosol, noyau, mitochondries) soit sous forme réduite (GSH) soit sous forme oxydée.	[11]
Vitamine C	C'est un excellent piégeur de RL oxygéné qui peut protéger les protéines, acides gras et ADN de l'oxydation ainsi que les LDL produites par divers systèmes générateur des radicaux libres (neutrophiles activées, myéloperoxydase.)	[4]
Vitamine E	A pour rôle de canaliser l'électron célibataire afin d'éviter l'attaque des lipides membranaire.	[12]

Oligoéléments	Fer, cuivre, zinc, manganèse sont les oligo-éléments qui interviennent comme cofacteurs d'enzymes indispensables dans la lutte contre les radicaux libres	[13]
Polyphénols	Les polyphénols ont un très grand nombre de résidus hydroxyles, pour lutter contre les radicaux libres et stopper la réaction en chaîne.	[14]

I.5 Plantes à activités antioxydantes

L'intérêt scientifique porté à la recherche d'antioxydants et anti-hémolytiques naturels à partir *des* plantes médicinales a considérablement augmenté ces dernières années. Les effets correctifs bénéfiques des matières végétales sont principalement dus aux polyphénols (flavonoïdes, coumarines, tanins...) largement répartis dans le règne végétal. Ces derniers ont un très grand nombre de résidus hydroxyles qui contribue à la réduction des radicaux libres ou d'empêcher la lyse des érythrocytes par la répartition de ces composées phénoliques dans leurs membranes[15]. Dans le tableau N° III sont énumérées quelques espèces de plantes dont le potentiel antioxydant a été déterminé par le teste *in vitro* du DPPH et le test *ex-vivo* de l'activité anti hémolyse induit par H₂O₂.

Tableau N° III : Exemples de plantes à activité antioxydants

Plante	Partie de la plante utilisée	Méthode et solvant d'extraction	Efficacité antioxydants Test DPPH	Réf.
<i>Fredolia aretioides</i>	Racine	Macération par le méthanol	IC50 = 1,06 ± 0,84 mg/ml	[16]
<i>Mallotus oppositifolius</i>	Feuille et racine	Macération par l'éthanol	IC50 = 200,7 ± 0,2 µg/ml	[17]
<i>Piliostigma thonningii</i>	Feuille	Décoction par l'éthanol	IC50 = 46,8 ± 5,77 µg/ ml	[18]
<i>Piliostigma thonningii</i>	Écorces	Décoction par l'éthanol	IC50 = 138,9 ± 2,03 µg/ ml	[18]
<i>Mitragyna ciliata</i>	Écorce	Macération par le méthanol	IC50 = 10,5 ± 0,29 µg/ ml	[19]
<i>Chrysophyllum perpulchrum</i>	Écorce	Macération par le méthanol	IC50 = 4,00 ± 0,29 µg/ ml	[19]
<i>Disthemonanthus benthamianus</i>	Écorce	Macération par le méthanol	IC50 = 4,50 ± 0,29 µg/ ml	[19]
<i>Zingiber officinale</i>	Racine	Décoction dans l'eau distillée	IC50 = 2,1 µg/ml	[20]
<i>Aloysia triphylla</i>	Feuille	Infusion dans l'eau	IC50 = 27,40 ± 0,1 mg/ml	[21]
<i>Syzygium aromaticum</i>	Bouton de fleur	Hydrodistillation	IC50 = 4,82 ± 0,0006 µg/ml	[22]
<i>Chamaemelum nobile</i>	Partie aérienne	Distillation à l'eau	IC50= 602,73 ± 4,8 mg/ml	[23]
Plante	Partie de la plante utilisée	Méthode et solvant d'extraction	Efficacité antioxydants Test anti-hémolyse induite par H2O2	Réf.
<i>Gymnema sylvestre</i>	Feuille	Macération de l'eau	IC50 = 29,83 mg/ml	[24]
<i>Mentha piperita</i>	Partie aérienne	Percolation par l'éthanol	IC50 = 836.4± 29.2 µg/ml	[25]
<i>Acacia hydasypica</i>	Partie aérienne	Macération par le méthanol	IC50 = 29,9 ± 0,91 µg/ml	[26]

II. Les flavonoïdes : structure et propriétés thérapeutique

II.1 Généralités

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques synthétisés par les plantes. On les trouve dans des vacuoles. Ils assurent la pigmentation et la protection contre les bactéries, les virus et les moisissures. En plus de leur rôle dans les plantes les flavonoïdes peuvent offrir une protection contre plusieurs maladies associées au stress oxydatif. C'est une des classes les plus diversifiées des polyphénols. Ces derniers englobent une gamme très large et très répandue de dérivés phénoliques comme les tanins, coumarine, lignane, lignine, quinone...[27].

II.2 Structure des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont la même structure chimique de base : deux anneaux aromatiques liés par un pont tricarbones qui forment un hétérocycle oxygéné. Le flavan (**Figure 02**) est la structure de l'anneau parent sur lequel sont basées les structures chimiques de la plupart des flavonoïdes [28].

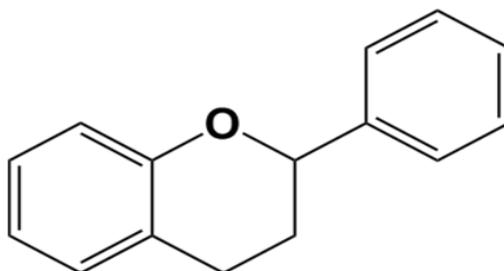
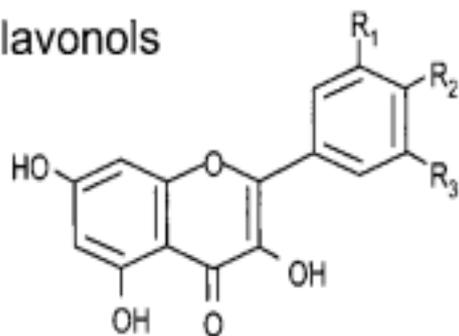


Figure 2:Structure de base du noyau flavan des flavonoïdes [28]

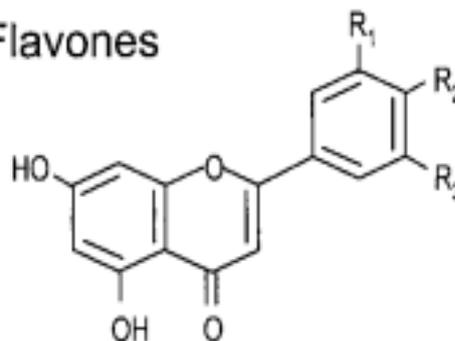
Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes selon la structure de l'hétérocycle oxygéné (cycle C) impliqué, les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavones, les isoflavanones et les anthocyanes (Figure 03) [29].

Flavonols



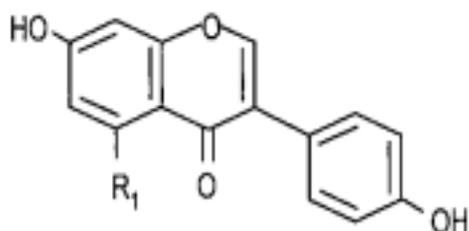
$R_2 = OH; R_1 = R_3 = H$: Kaempferol
 $R_1 = R_2 = OH; R_3 = H$: Quercetin
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Myricetin

Flavones



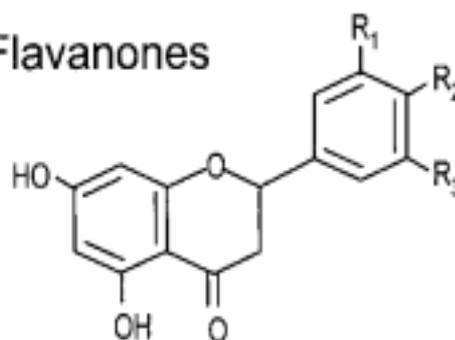
$R_1 = H; R_2 = OH$: Apigenin
 $R_1 = R_2 = OH$: Luteolin

Isoflavones



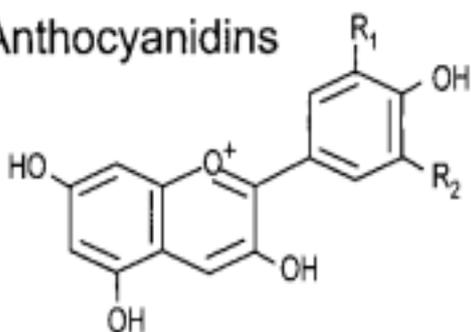
$R_1 = H$: Daidzein
 $R_1 = OH$: Genistein

Flavanones



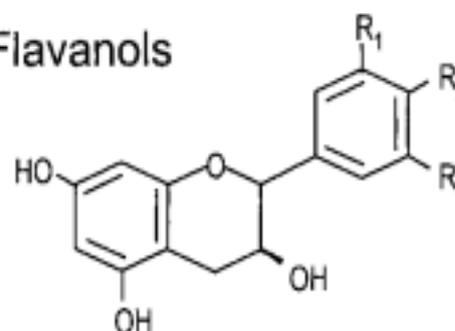
$R_1 = H; R_2 = OH$: Naringenin
 $R_1 = R_2 = OH$: Eriodictyol
 $R_1 = OH; R_2 = OCH_3$: Hesperetin

Anthocyanidins



$R_1 = R_2 = H$: Pelargonidin
 $R_1 = OH; R_2 = H$: Cyanidin
 $R_1 = R_2 = OH$: Delphinidin
 $R_1 = OCH_3; R_2 = OH$: Petunidin
 $R_1 = R_2 = OCH_3$: Malvidin

Flavanols



$R_1 = R_2 = OH; R_3 = H$: Catechins
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Gallocatechin

Figure 3: Classes des flavonoïdes et Structures de quelques flavonoïdes[29]

II.3 Propriétés thérapeutiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont suscité un intérêt considérable en raison de leur potentiel thérapeutique et effets bénéfiques sur la santé humaine. Plusieurs études ont montré que les flavonoïdes peuvent avoir des effets anti-inflammatoires, antioxydants, antiviraux, anticancéreux, anti-hépatotoxiques, cardioprotecteurs, anti-ulcérogène et protecteurs vasculaires [30].

II.3.1 Activité antioxydants

Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant soit par captation directe des espèces réactives de l'oxygène, ou par inhibition de certaines enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la xanthine oxydase, la lipoxygénase, la protéine kinase C, la monooxygénase microsomale, la succinoxydase mitochondriale, la NADPH oxydase et la cyclooxygénase [31]. On cite comme exemple l'effets des flavonoïdes comme la quercétine sur l'endothélium vasculaire, ce composé phénolique antioxydant est capable de piéger le radical NO. Ce dernier étant élaboré par plusieurs types de cellules, notamment les cellules endothéliales et les macrophages dus à l'activité NO synthase, est important dans le maintien de la dilatation des vaisseaux sanguins. En effet la quercétine a la propriété de bloquer la vasodilatation due à la relaxation exercée par NO sur les cellules musculaires lisses de l'endothélium vasculaire [30].

II.3.2 Activité anti-inflammatoire

Les actions pharmacologiques des flavonoïdes suggèrent leur activité potentielle dans le traitement des maladies allergiques et inflammatoires par la diminution de la régulation de l'ADN. En effet les mastocytes sont des cellules impliquées dans les réactions allergiques en sécrétant des médiateurs tels que l'histamine et Cytokines. L'étude de l'activité antiinflammatoire de plusieurs flavonoïdes : l'astragaline, la fisétine, le kaempférol, la myricétine, quercétine et rutine, sur les réactions inflammatoires allergiques induites par les mastocytes a permis de montrer que les cinq flavonoïdes inhibent l'augmentation de taux de calcium intracellulaire et toutes ces molécules, à l'exception de l'astragaline, inhibaient la sécrétion de l'histamine. L'analyse de l'expression des gènes et de la sécrétion de certaines cytokines dans les mastocytes humains (cellules HMC-1) révèlent que la fisétine, la quercétine et la rutine diminuent l'expression et la production de TNF- α , IL-1- β , IL-6 et IL-8. La myricétine, quant à elle, a diminué le TNF- α et l'IL-6 mais pas l'IL-8. Enfin la fisétine, la myricétine et la rutine ont bloqué l'activation de NF-kappaB [32].

III. Encapsulation des substances bioactives

III.1 Généralités sur l'encapsulation

L'encapsulation peut être définie comme un processus permettant de piéger ou enrober une substance dans une autre substance [33]. Elle permet de créer une barrière (Une matrice ou un revêtement) sur un composant actif qui inhibe les interactions chimiques, et qui protège contre les effets des facteurs environnementaux (par exemple: température, pH, enzyme, et oxygène); et permet la libération contrôlée du composant actif sous certaines conditions[34].

Les substances à encapsuler peuvent être liquides, solides ou gazeuses. Ce sont souvent des principes actifs sensibles ou instables à certains facteurs environnementaux ayant une action ciblée (vectorisation), ou bien des substances dont on souhaite modifier l'état (transformation d'un liquide en solide par exemple) [35].

De nombreux principes actifs ont été encapsulés pour les protéger de la dégradation en réduisant leur réactivité au milieu extérieur (chaleur, humidité, l'air et la lumière) et en ralentissant leur diffusion vers le milieu extérieur. De plus, l'encapsulation modifie les propriétés physiques du produit d'origine pour faciliter la manipulation, séparer les autres composants du mélange et finalement aider à contrôler la concentration de libération de l'agent actif [36].

III.2 Techniques d'encapsulation

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour favoriser l'encapsulation des composés bioactifs. Le choix de la méthode d'encapsulation la plus appropriée dépend essentiellement du type de matériau de base et des caractéristiques du produit final où l'encapsulation sera appliquée. De plus le choix de matériau de la paroi de la capsule a une grande influence sur les propriétés de la substance encapsulée, particulièrement sur l'efficacité d'encapsulation, et devrait être considéré soigneusement [37]. Les techniques d'encapsulation sont diverses, elles peuvent être physico-chimiques, chimiques et mécaniques. Dans le tableau N° IV sont résumés les différents procédés utiliser ainsi que leurs avantages et inconvénients.

Tableau N° IV: liste de quelques techniques d'encapsulations [35, 38]

	Techniques	Avantages	Inconvénients	Polymères utilisés
Procédés physico-chimiques	Coacervation simple	Distribution de taille étroite Absence de contact entre la phase continue et l'actif.	Agglomération. Utilisation de solvant dans certains cas	Gélatine ; Méthylcellulose ; Acétophtalate de sodium ; Pectine
	Coacervation Complexe	Distribution de taille étroite. Haut rendement Conditions douces	Agents réticulant toxiques. Gamme de pH limitée	Gélatine ; Gomme arabique ; Acide Polyacrylique ; Alginate de sodium.
Procédés chimiques	Polymérisation Interfaciale	Contrôle de la porosité et de l'épaisseur de la paroi en fonction des polymères.	Interaction de certains actifs dans la réaction de polymérisation. Nombreux lavages nécessaires Sous-produits interagissant avec les actifs.	Polyamides ; Polyesters ; Polyurée ; Polyuréthanes
	Polymérisation in situ	Rapide et facile Grande efficacité d'encapsulation.	Réaction de polymérisation difficile à contrôler. Nécessite une quantité de solvant. Rend les monomères non biodégradable et/ou non biocompatible.	Dérives acryliques ; Poly méthacrylate de méthyle ; Dérives de polystyrènes
Procédés mécaniques	Gélification de gouttes	Particules non poreuses et denses. Absence de solvant. Temps de procédés courts.	Températures de procédés pouvant affecter les actifs. Agglomération.	Alginate de sodium ; Chitosane ; Agarose.
	Séchage par atomisation	Simple. Rapide. Économique.	Perte importante d'actifs par adhérence aux parois de la chambre de séchage. Non applicable à des systèmes de viscosité trop élevée. Consommation d'énergie importante en raison de l'évaporation de l'eau.	Gomme arabique ; Gélatine ; Dérives cellulosiques.
	Lit d'air fluidisés	Séchage rapide et homogène. Pas de points chauds sur les produits finis. Assure l'efficacité du séchage du matériau.	Possibilité de perte de produit Accumulation de potentiel électrostatique peut être élevé. Séchage du matériau collant est assez difficile.	Dérives cellulosiques ; sucre ; paraffine ; Alginate.

Domaines d'applications de l'encapsulation

Les premiers produits encapsulés ont été développés dans les années 50. Aujourd'hui, les applications de l'encapsulation sont nombreuses et touchent des domaines variés : industries chimiques, agro-alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques, nutraceutiques, l'agriculture, les textiles ou encore la peinture[39]. Le tableau N° V regroupe les divers domaines d'applications de l'encapsulation avec quelques exemples de substances encapsulées.

Tableau N° V : Exemples de quelque domaine d'application de l'encapsulation [39]

Domaine d'application	Exemples de composes encapsules
Cosmétique	Parfums. Démaquillants
Pharmaceutique	Aspirine Peptides et de protéines.
Alimentaire	Additifs alimentaires : huiles d'agrumes, épices et huile de café Extraits d'huile de poisson Huile d'ail.
Agriculture	Herbicides et pesticide : parathion méthylique [298-00-0], le diazinon [333-41-5], les thiocarbonates et les pyréthrinés.
Biotechnologie	Enzymes. Microorganismes.

Dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique l'encapsulation de principes actifs a pour objectif de protéger les propriétés de ces derniers, surtout ceux sensibles telles que les huiles essentielles. Ce procédé pourrait, par exemple, faire office de barrière physico-chimique contre les éléments pro-oxydants comme les radicaux libres, l'oxygène ou encore les rayons UV durant la période de stockage du produit fini. L'intérêt peut être aussi d'optimiser la libération et donc l'activité du principe actif par une action ciblée et/ou retardée.

Diverses substances à intérêt pharmacologique et thérapeutique ont été encapsulées c'est le cas des huiles essentiels, enzymes, aspirine, vitamine, catéchol, propolis et protéines [35]. Dernièrement la propolis riche en flavonoïdes a fait l'objet d'étude d'encapsulation pour améliorer sa biodisponibilité et la protéger contre les conditions hostiles tel que la haute température, oxygène et lumières [40]

I. Matériels et méthodes

I.1 Préparation des échantillons d'étude

I.1.1 Espèces végétales

L'espèce végétal utilisé est constituée de racine de gingembre (*Zingiber officinale*), feuille de verveine (*aloesia citriodora*), fleur séchée de la camomille (*chamaemelum nobile*) et le bouton floral de giroflier (*Syzygium aromaticum*).

Les parties des plantes utilisées dans cette étude ont été achetées chez un herboriste de la ville de Bejaia sous forme sec et ont subi un séchage supplémentaire pendant 24 à 48 heures dans une étuve aérée à 37°C pour éliminer toute trace d'humidité

I.1.2 Le sang

Le sang utilisé dans cette étude est un sang contrôlé issu d'un donneur sein de groupement sanguin A+ qui été donné par le centre de transfusion sanguine Sidi Ali Lebhar, Bejaia. Il a été transporté dans des conditions stériles à basse température (glacière) et stocké au cours de l'utilisation à 4°C.

I.2. Extraction des métabolites bioactifs

L'objectif est d'extraire les molécules bioactives présentes dans les 4 plantes choisies, notamment les composés phénoliques. Une extraction solide/liquide au méthanol a été réalisée par la technique épuisante de Soxhlet [41].

I.2.1. Préparation de la poudre de plante

Les fleurs, feuilles, racine ou bouton floral séchés des 4 espèces de plantes (**Figure 4A**) ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique afin de récupérer une poudre plus au moins fine (**Figure 4B**). La poudre obtenue a été ensuite conservée hermétiquement dans des bocaux en verre et stocké à labri de la lumière jusqu'à utilisation.

A1 : Fleurs de camomille	A2 : Feuille verveine	A3 : Clou de girofle	A4 : Racine de gingembre
			
B1 : Poudre de fleurs de camomille	B2 : Poudre de feuille verveine	B3 : Poudre de clou de girofle	B4 : Poudre de racine de gingembre
			

Figure 4: le matériel végétal de l'étude expérimentale : A. Fleur, feuille, bouton floral et racine des quatre plantes utilisées. B. Les poudres correspondantes poudres des quatre plantes végétales avant et après broyage

I.2.2. Extraction au méthanol

Une quantité de 20 g de poudre végétale placée dans une cartouche en cellulose ont été extrait par 250 ml de méthanol 70% en utilisant le Soxhlet. L'extrait ainsi obtenu a ensuite subi une dilipidation par l'hexane puis concentrées à 20ml par évaporation à l'air libre pendant plusieurs jours.

I.2.3. Calcul du rendement

Pour calculer le rendement, 1 ml d'extrait concentré a été mis à évaporer dans une étuve aérée à température 40°C. Une fois le solvant totalement évaporé, la masse de l'extrait sec obtenu à partir de 1 ml d'extrait concentré a été mesurée et la masse de l'extrait sec totale est calculé en extrapolant par rapport au volume totale de l'extrait concentré. Le rendement de l'extraction est exprimé selon l'équation suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Masse de l'extrait sec (g)}}{\text{Masse de la poudre végétale utilisée (g)}} \times 100$$

II.3. Dosage des composés phénoliques

II.3.1 Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux est basé sur la capacité de ces derniers à être oxydés par un mélange d'acides phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀) appelé couramment réactif de Folin-Ciocalteu. Ces derniers sont réduits en oxydes métalliques (W₈O₂₃/Mo₈O₂₃) de couleur bleu, L'intensité de la coloration produite, qui a une absorbance maximale à 760nm, est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents [42].

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé selon le protocole décrit dans la référence [43] légèrement modifié. 1,5 ml du réactif Folin-Ciocalteu (0.1N) ont été ajoutés à 50µl d'extrait à concentration déterminée, puis on a ajouté 200 µl de méthanol 50%, le mélange a été ensuite incubé pendant 5min, puis 4 ml de la solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 7,5% sont additionnées au mélange réactionnel. Après agitation et incubation pendant 1heure à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 760nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions mais ne contenant pas d'extrait végétal.

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait est calculée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique dans les mêmes conditions opératoire.

La teneur en polyphénol totale est exprimée en milligrammes équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg Eq. AG/g MS).

II.3.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes contenus dans les extraits a été réalisé par la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃). Les flavonoïdes contiennent des groupements hydroxyles (OH) libres en position C3 ou C5, ils provoquent la formation de complexes flavonoïdes-aluminium, qui donne par chélation de l'ion Al⁺³ une coloration jaunâtre mesurable à 462nm. La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes présentent dans les extraits [44].

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon le protocole décrit dans la référence [45] légèrement modifié. Différentes concentrations d'extraits végétales ont été mélangé avec 1ml de solution de chlorure d'aluminium (AlCl₃ 2%). Après incubation pendant 10 min à température ambiante, la mesure de l'absorbance a été effectuée à 462 nm.

Les taux de flavonoïdes contenus dans les différents extraits est calculé par référence à une courbe d'étalonnage, en utilisant la quercétrine comme standard et il est exprimé en mg équivalent de quercétine /g matière sèche végétal (mg Eq. Q/g MS).

II.3.3. Dosage des tanins condensés

Pour doser les tanins condensés, nous avons appliqué la méthode à la vanilline-HCl. Cette méthode est basée sur la réaction de la vanilline avec les groupes flavonoïdes terminaux des tanins condensés et la formation d'un complexe rouge. Les tanins à réagissent avec la vanilline pour former des anthocyanidols rouges [44]

Le dosage des tanins condensés a été réalisé selon le protocole décrit dans la référence [42] légèrement modifié. 50 µl chaque extrait a différentes concentrations a été ajouté au 450 µl de méthanol 50%, Ensuite, un volume de 2,5 ml de la solution vanilline 5,8%, HCl 24% a été additionné, et le mélange obtenu a été vigoureusement agité puis laissé incubé à 30°C pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 500 nm contre un blanc qui ne contient pas de vanilline.

Les taux de tanins condensés contenus dans les différents extraits sont calculés en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec la catéchine comme standard (annexe 3) et ils sont exprimés en mg équivalent catéchine /g de matière sèche végétal (mg Eq. C/g MS).

II.3.4. Dosage des tanins hydrosolubles

Les tanins hydrolysables réagissent avec le chlorure ferrique et donnent une coloration bleue dont l'intensité d'absorbance mesurée par spectrophotométrie est proportionnelle à leurs concentrations [44].

Le dosage des tanins hydrosolubles a été réalisé selon le protocole décrit dans la référence [44] légèrement modifié. 10 µl de chaque extrait à différentes concentrations ont été mélangé avec 990 µl de méthanol 50% et 3,5 ml de FeCl₃ (0,01%). La solution réalisée a été homogénéisée vigoureusement par vortex. L'absorbance est ensuite mesurée immédiatement à 660 nm contre un blanc ne contenant pas d'extrait.

Les taux de tanins hydrolysables contenus dans les différents extraits sont calculés en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide tannique comme standard (annexe 4) et ils sont exprimés en µg équivalent d'acide tannique/g matière sèche végétal (µg Eq. AT/g MS).

I.4. Evaluation du pouvoir antioxydant des quatre plantes

I.4.1. Inhibition du radical DPPH

Le pouvoir antioxydant des extraits méthanoliques a été testé par l'antiradicalaire du DPPH (1,1-diphénylpicrylhydrazyl), radical libre relativement stable. Dans ce test, le DPPH radicalaire de couleur violette se réduit en un composé jaune (**Figure 05**), dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité réductrice des antioxydants présents dans le milieu [3].

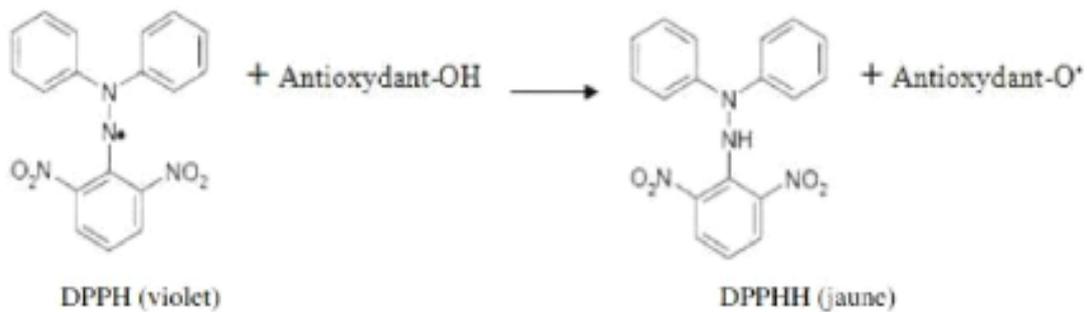


Figure 5:Réaction de réduction du radical DPPH [46]

Le test anti-radical DPPH a été réalisé selon le protocole décrit dans la référence [3] légèrement modifié. La réaction a été réalisée dans un volume total de 1,5 ml contenant différents volumes des extraits méthanoliques à différentes concentrations complétées à 0,5ml avec de l'éthanol pur et 1 ml d'une solution de DPPH solubilisé dans l'éthanol. Les mélanges obtenus ont été incubés à l'obscurité pendant 30 minutes puis l'absorbance a été mesurée à 520 nm. Le control a été réalisé en absence d'extrait dans les mêmes conditions.

L'activité antiradicalaire est exprimée en taux d'inhibition du radical DPPH calculé selon l'équation suivante :

$$I\% = \frac{[\text{Abs contrôle} - \text{Abs extrait}]}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

I.4.2. Test du pouvoir réducteur « FRAP »

La méthode FRAP évalue le pouvoir réducteur des composés réducteurs (AH) dans les extraits des plantes ; elle est basée sur la capacité à réduire l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) du complexe ferricyanure-Fe (Figure 06). Le Fe^{2+} peut être évalué en mesurant l'augmentation de la densité de la couleur bleu cyanée dans le milieu réactionnel à 700 nm [47].

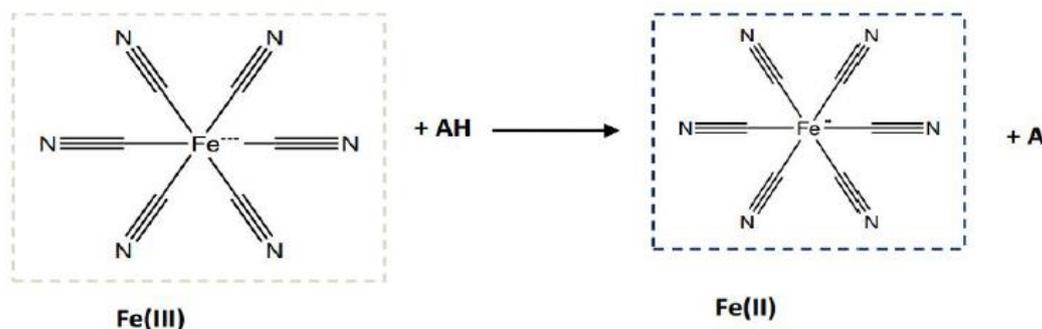


Figure 6: Réaction de réduction du complexe ferricyanide ferrique Fe (III) par antioxydant (AH) [47].

Le protocole utilisé pour évaluer le pouvoir réducteur a est basé sur celui décrit par dans la référence [48] légèrement modifié. 1 ml de tampon phosphate buffer 0,2M, pH= 6,6 et 1 ml de ferricyanure de potassium 1% ont été ajoutés à différentes concentrations des extraits. Après 20 minutes d'incubation à 50°C, 1ml d'une solution aqueuse de TCA (10%) a été ajouté au milieu réactionnel. Après agitation et centrifugation à 3000 tours pendant 10 min, 1,5 ml de méthanol 50% et 150 µl de FeCl_3 0,1% sont ajoutés à 1,5 ml du surnageant. Un blanc ne contenant d'extrait a été utilisé comme contrôle positif. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

I.4.3. Piégeage du peroxyde d'hydrogène

Il s'agit de neutraliser le peroxyde d'hydrogène avec un antioxydant pour favoriser et inhiber son action hémolytique. [49]. La capacité des extraits à piéger le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a été déterminée par la méthode de décrite dans la référence [49] avec quelques modifications. Une quantité de 1 ml de la solution H_2O_2 (10 V) diluée au 1/10 avec le tampon PBS (pH=7,4) a été mélangé avec différentes concentrations des extraites solubilisés dans du tampon PBS et 3 ml de tampon PBS. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, l'absorbance été mesurée à 240 nm, Le blanc a été préparé de la même façon mais sans le H_2O_2 . Le control a été réalisé en absence d'extrait dans les mêmes conditions.

L'activité de piégeage de H₂O₂ est calculée selon la formule suivant :

$$\text{Taux de piégeage du H}_2\text{O}_2 (\%) = \frac{[\text{Abs Control} - \text{Abs Essai}]}{\text{Abs Control}} \times 100$$

I.4.1. Inhibition de l'hémolyse induite par H₂O₂

La capacité de l'extraits à stabiliser la membrane des globules rouges vis-à-vis de l'attaque par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a été déterminé par le test anti-hémolytique *in vitro*. le principe de la méthode reposent sur la mesure par spectrophotométrie de l'hémoglobine libérée (couleur rouge) suite à la rupture de la membrane des globules rouges [50].

I.4.1.1. Préparation de la suspension des érythrocytes

La suspension érythrocytaire a été préparée comme décrit dans la référence [50]. Du sang fraîchement prélevé à l'aide d'une seringue a été centrifugé à 3000rpm pendant 10 minutes pour séparer les globules rouges des autres éléments constitutifs du sang. Le culot obtenu a été récupéré et lavé 3 fois avec une solution d'eau physiologique à 0,9% puis re suspendu dans du tampon phosphate 0,2M, pH=7,4 contenant 0,9% NaCl (tampon PBS) pour obtenir un hématocrite à 10%.

I.4.1.2. Mesure du taux d'hémolyse

La mesure de l'activité anti hémolytique induite été réalisée selon le protocole décrit dans la référence [24]. L'extrait à concentrations déterminées a été incubé avec une solution d'H₂O₂ 10V diluée avec du tampon PBS pendant 30 min à 37°C. 500 µl de la suspension érythrocytaire ont été ensuite ajoutés, le volume total du milieu réactionnel a été compléter à 4ml par le tampon PBS et le mélange a été incubé pendant 3h sous douce agitation. L'hémoglobine libérée dans le surnageant a été mesurée à 540 nm, après centrifugation à 3000 tours pendant 5 min. Le control a été réalisé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait avec du tampon. L'activité anti-hémolytique est estimée selon l'équation suivante :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = \frac{[\text{Abs Control} - \text{Abs Essai}]}{\text{Abs Control}} \times 100$$

I.5. Encapsulation de l'extrait de verveine

I.5.1. Extraction d'alginate de sodium

1. Décoloration et déminéralisation des algues

L'alginate de sodium a été extraite à partir des algues brunes suivant le protocole de [51] avec quelques modifications. La première étape consistait à réhydrater les algues et les mixer grossièrement à l'aide d'un mixeur. Puis le calcium et le magnésium ont été éliminés avec de l'acide sulfurique H₂SO₄ dilué pendant 1 heure à température ambiante. Les résidus obtenus ont été ensuite lavés et séchés à l'air libre. Les résidus obtenus ont été ensuite décolorés par l'hypochlorite de sodium 0,315%.

2. Extraction de l'alginate

Les algues déminéralisés et décolorés ont été mis à macérer dans du carbonate de sodium Na₂CO₃ 2% pendant 5 heures. Le macérat obtenu a été ensuite mélangé avec l'acide sulfurique concentré (1N) pour précipiter l'acide alginique. Le précipité a été ensuite abondamment rincé à l'eau distillée pour éliminer l'excès d'acide sulfurique puis mélangé au carbonate de sodium Na₂CO₃ 2% et laisser réagir pendant 1 heure à température ambiante. La solution finalement obtenue est laissée sécher à l'air libre pendant 24 heures. L'extrait sec obtenu a été ensuite broyé pour obtenir la poudre d'alginate de sodium.

I.5.2. Encapsulation de l'extrait de verveine dans les billes d'alginate

Les billes d'alginate ont été réalisées selon le Protocole décrit dans la référence [52] légèrement modifié. 400 µg d'alginate de sodium ont été dissous dans 20 ml de solution d'extrait de verveine. Le mélange a été homogénéisé sous agitation magnétique pendant 1 heure. La solution d'alginate contenant l'extrait de plante a été ensuite versée goutte à goutte à l'aide d'une seringue dans 40 ml de CaCl₂ à 4%. Les billes formées ont été récupérées par filtration, rincées avec l'eau distillée puis séchées à l'étuve à 37°C pendant une nuit. **(Figure 07)** les billes d'alginate de sodium sans extrait ont été préparées en suivant le même protocole pour servir de solution témoin.

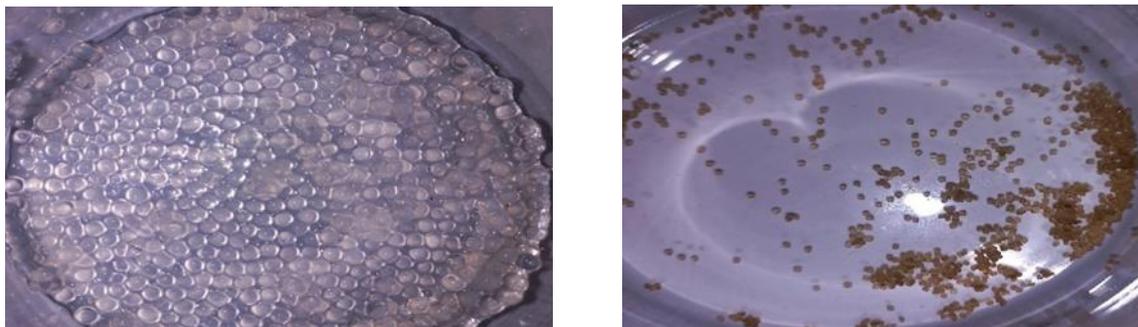


Figure 7: Billes d'alginate de sodium contenant l'extrait de plante avent (A) et après séchage (B)

I.5.3. Détermination du rendement d'encapsulation de l'extrait de verveine

Le rendement d'encapsulation de l'extrait de verveine dans les billes d'alginate a été déterminé en termes de taux de flavonoïdes encapsulés. Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode colorimétrique précédemment décrite en utilisant l' AlCl_3 à 2%. La quantité de flavonoïdes a été exprimée en mg Equivalent quercétine en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine (annexe)

Les flavonoïdes ont été dosé aussi bien dans la solution d'alginate (flavonoïdes totaux), que dans le surnageant de filtration après formation des billes contenant l'extrait (flavonoïdes libres)

Le rendement est calculé selon la formule suivante :

$$Rt \text{ d'encapsulation } (\%) = \frac{M_t - M_L}{M_t} \times 100$$

Avec :

M_t : Masse des flavonoïdes totaux en mgEq.Q

M_L : Masse des flavonoïdes non incorporés dans les billes mgEq.Q

I.5.4. Mesure de l'activité antiradicalaire de l'extrait de verveine encapsulé

Le test anti-radical DPPH a été réalisé selon la même méthode précédemment décrite. 1 g des billes sèches contenant l'extrait de verveine ont été suspendus dans 8 ml de tampon phosphate,

PH= 7 et laisser incuber à température ambiante. 500 µl du surnageant récupérés à différents temps d'incubation (0min, 30min, 60min et 90min) ont été mélangés avec 1 ml de DPPH et incubés pendant 30 min à l'obscurité. L'absorbance a été ensuite mesurée à 525 nm.

Le control est réalisé avec le surnageant d'une suspension formée de bille vierge dans du tampon phosphate.

Le taux d'inhibition du DPPH est calculé selon la formule suivante :

$$I\% = \frac{[\text{Abs contrôle} - \text{Abs extrait}]}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

II.6. Analyse statistique

Les essais été réalisé en double sauf le dosage des tanins et le test de pouvoir réducteur. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes ± écart-type par le programme Microsoft office Excel 2007 et GraphPad Prism 6 par l'application de l'ANOVA one way et le teste de KHI-DEUX. Les résultats sont classés par ordre décroissant a>b>c>d. Les valeurs obtenues portant la même lettre ne présentent aucune différence significative, les différences ont été considérées comme étant significatives à $\alpha = 0,05$ et les barres verticales représente l'écart-types.

II. Résultats et discussion

II.1. Rendement d'extraction

Dans le but d'avoir une meilleure extraction des principes actifs, nous avons opté pour une extraction solide / liquide par la technique épuisante de soxhlet. Les taux d'extraction ont été calculés par rapport à la poudre végétale initiale utilisée pour l'extraction. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 8.

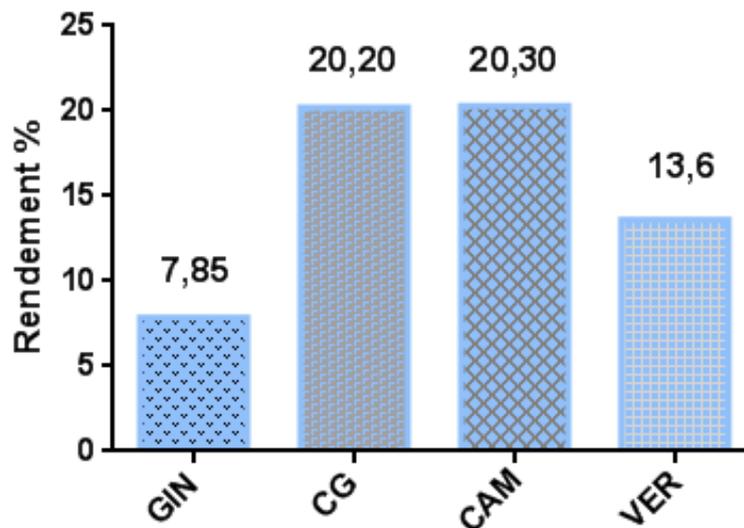


Figure 8: Rendements d'extraction au méthanol

Le calcul des rendements par rapport au poids de la poudre végétale a montré que les extraits de la *Chamaemelum nobile* et *Syzygium aromaticum* représentent les rendements les plus élevés 20.3 % et 20.2% respectivement suivi par l'extrait d'*Aloysia citriodora* (13.6 %) et celui de *Zingiber officinale* qui est le plus faible de 07.85%. La différence en rendement d'extraction par le même solvant est probablement due au fait que les plantes utilisées soient des espèces différentes et que même les parties des plante utilisées sont différentes ; racine *Zingiber officinal*), feuille d'*aloyisia citriodora*, fleur séchée de *chamaemelum nobile* et bouton floral de *Syzygium aromaticum*.

En général, les facteurs influençant les rendement d'extraction des métabolites bioactifs des plantes sont divers : méthode et conditions d'extraction, espèce et origine géographique, partie et stade de maturité de la plante, période de la récolte et conditions et durée du stockage.[53]

II.2. Taux des composés phénoliques

II.2.1. Taux des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux des extraits des différentes plantes a été effectué par la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. La courbe d'étalonnage utilisant l'acide gallique comme standard représenté dans (l'annexe 1) a permis de calculer les concentrations des polyphénols totaux, exprimées en mg Eq.AG/g MS est représentée dans la figure 9

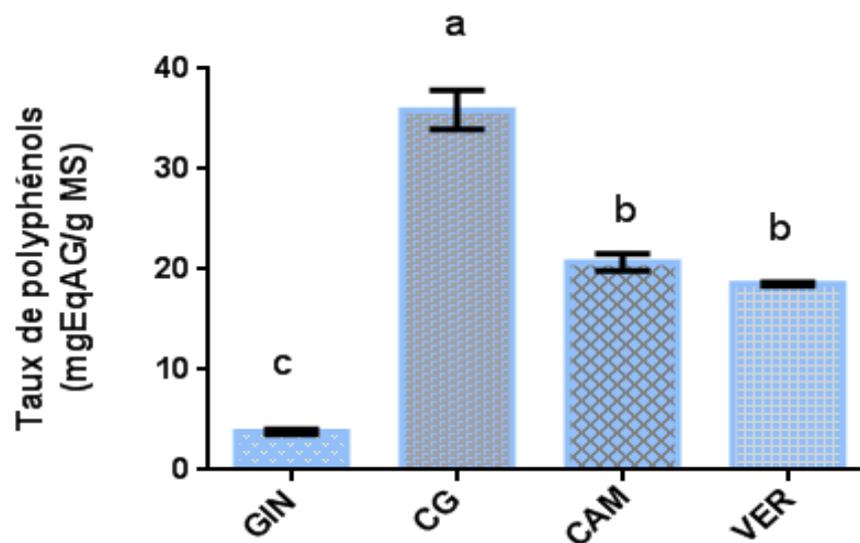


Figure 9: Taux des polyphénols totaux extraits des 4 plantes

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits diffèrent significativement entre les 4 plantes. L'extrait de racine de *Syzygium aromaticum* a donné la teneur la plus élevée qui est de $35.89 \pm 1,34$ mg Eq.AG/g MS. les teneurs en polyphénols des extraits des fleurs de *Chamaemelum nobile* et des feuilles de *Aloysia citriodora* sont respectivement de 20.115 ± 1.205 mg Eq.AG/g MS. et $18.535 \pm 0,115$ mg Eq.AG/g MS. L'extrait Du bouton floral de *Zingiber officinale* contient la plus faible teneur de $3.812 \pm 0,185$ mg Eq.AG/g MS.

Les teneurs en polyphénols totaux obtenus peuvent être surestimé du fait que le dosage par le réactif Folin-Ciocalteu n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec ce réactif comme les protéines, les sucres, donnant des taux phénolique apparent élevé [54].

Des études réalisées sur la composition phytochimique de l'espèce d'*Aloysia triphylla* ont révélé que les feuilles de *Aloysia triphylla* présente des teneur en polyphénols de $61,13 \pm 0,0$ (mg Eq AG/g) [21] largement plus élevée que les teneurs obtenus dans notre étude. Cette différence est probablement due à la méthode et le solvant d'extraction utilisés. En effet, les auteurs de l'étude ont utilisé une extraction par macération hydro alcoolique) [21]. Sans oublier que les teneur phénolique d'une plante dépendent de nombreux facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) [48].

II.2.2. Taux de flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes des extraits des différentes plantes a été effectué par la méthode colorimétrique en utilisant le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$). La courbe d'étalonnage utilisant la quercétine (annexe 2) comme standard a permis de calculer les concentrations des flavonoïdes totaux en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage. Les résultats obtenus exprimés en mg Eq. Q/g MS sont représentés dans la figure 10,

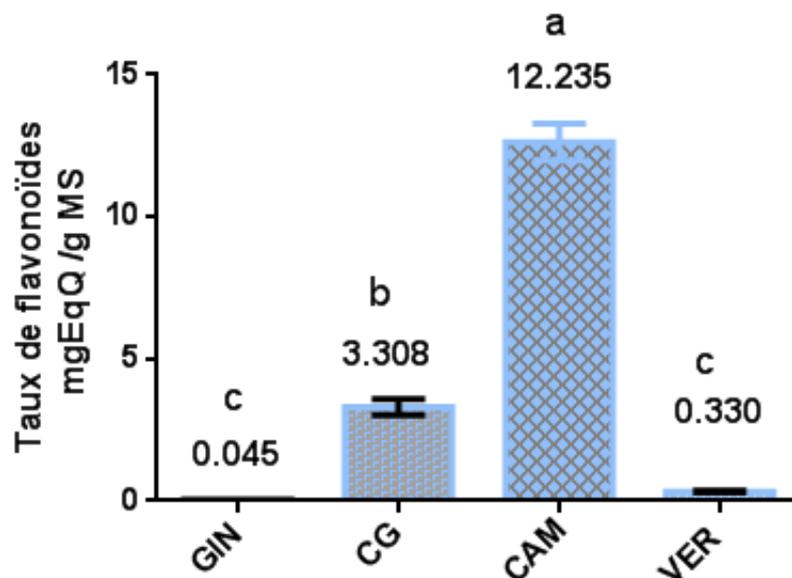


Figure 10: Taux des flavonoïdes des extraits des plantes

Les teneurs en flavonoïdes totaux (Figure 10) montrent une des différences significatives entre les extraits ($p < 0,05$). Les fleurs *Chamaemelum nobile* ont donné la teneur la plus élevée de 12.235 ± 0.865 mg Eq.Q/g MS, suivi de celle *Syzygium aromaticum* de 3.308 ± 0.2 mg Eq.Q/g MS. Les teneurs les plus faibles sont obtenus pour les extraits des feuilles d'*Aloysia citriodora*

($0.330 \pm 0,2$ mg Eq.Q/g MS) et de racine de *Zingiber officinale* ($0.045 \pm 0,0035$ mg Eq.Q/g MS). A noter qu'il n'y'a pas de différences significatives entre ces deux espèces. La différence entre les résultats obtenus s'explique par la partie comestible utilisé où les flavonoïdes bioactifs sont principalement présents.

II.2.3. Taux de tanins

Les teneurs en tanins condensés et hydrosolubles dans les quatre extraits sont déterminées par les tests phytochimique. Les teneur en tannins condensés sont exprimés en (mg Eq.Cat/g MS) présenté dans la figure 11.

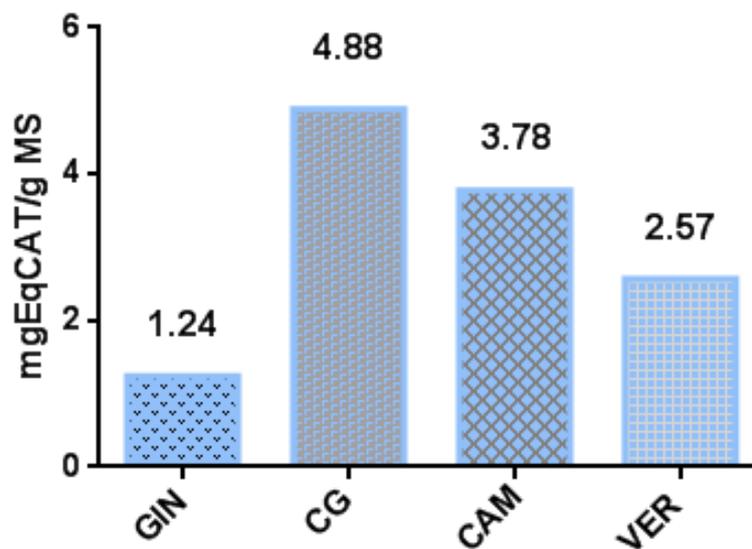


Figure 11: Teneur en tannins condensés

Les teneurs en tanins condensés montrent que l'extrait de *Syzygium aromaticum* a donné la teneur la plus élevée qui est de 4.88 mg Eq.Cat/g MS suivi de celle de *Chamaemelum nobile* qui est de 3.78 mg Eq.Cat/g MS, de l'extrait d'*Aloysia citriodora* avec un taux de 2.57 mg Eq.Cat/g MS. La teneur la plus faible est obtenue avec l'extrait de *Zingiber officinale* qui est de 1.24 mg Eq.Cat/g MS. Les teneurs en tannins hydrosolubles sont exprimés en (ug Eq.AT/g MS) dans la figure 12

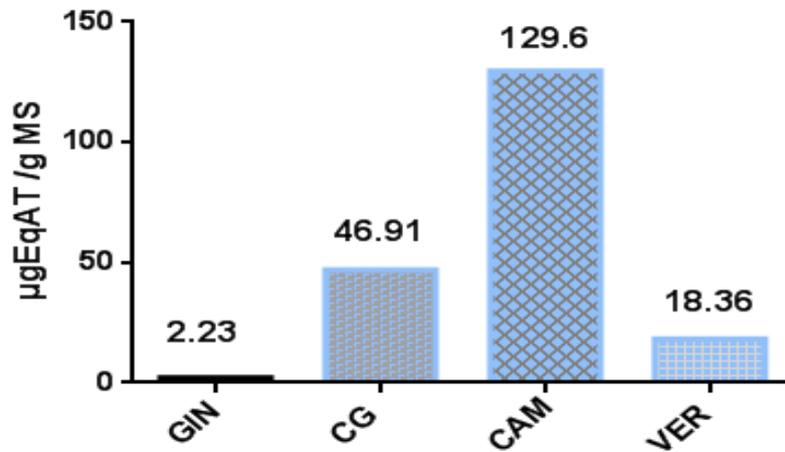


Figure 12: Teneur en tanins hydrosolubles

Les teneurs en tanins hydrosolubles montrent que l'extrait de *Chamaemelum nobile* a donné la teneur la plus élevée qui est de 129.6 µg Eq.AT/g MS suivi de celle de *Syzygium aromaticum* qui est 46.91 µg Eq.AT/g MS. L'extrait d'*Aloysia citriodora* a donné un taux de tanin hydrosoluble qui est de 18.36 µg EQ.AT/g MS. La teneur la plus faible est obtenue avec l'extrait de *Zingiber officinale* qui est de 2.23 µg EAT/g MS.

Les différences observées entre les extraits sont probablement dues à la composition chimique des plantes. En effet, le taux de tanins des extraits, dont dépend la dégradabilité, est susceptible d'être influencé par le mode de culture, le stade phénologique, la nature du sol (les sols arides sont sablonneux, infertiles et pauvres en éléments nutritifs), le climat au moment du prélèvement (température et pluviométrie) [55].

II.3. Potentiel antioxydants

II.3.1. Activité antiradicalaire

Nous avons étudié l'activité antiradicalaire par inhibition du radical DPPH pour les 4 extraits obtenus à différentes concentrations (annexe 5,6,7,8). Les résultats obtenus exprimés en IC50 (concentration de l'extrait qui cause une perte de 50% de l'activité de DPPH) sont représentés dans la figure 13.

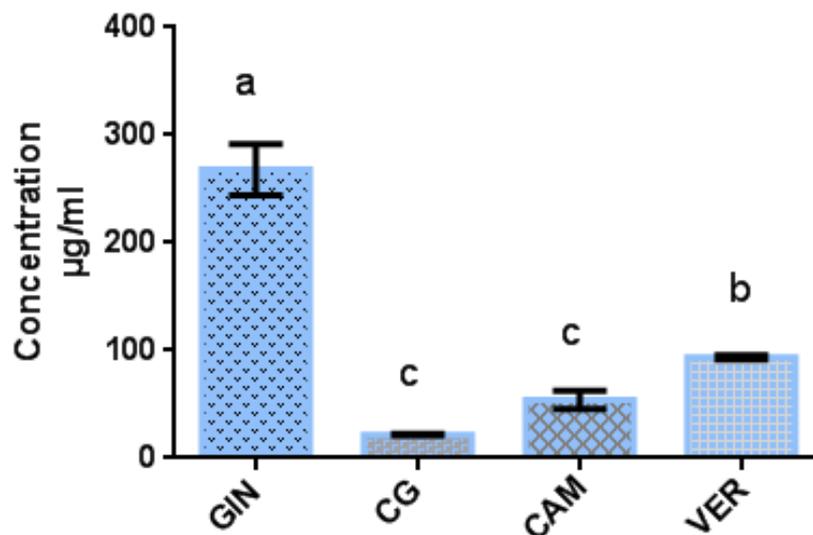


Figure 13: efficacité anti-radical DPPH des extraits méthanoliques exprimés en IC 50

Les résultats montrent une différence significative ($p < 0.05$) entre les IC50 d'au moins 3 extraits et que l'extrait de *Syzygium aromaticum* présente la meilleure efficacité antiradicalaire (IC50= 21,93ug/ml \pm 0,72) suivi de l'extrait de *Chamaemelum nobile* (IC50= 54,25 ug/ml \pm 8,45) puis de l'extrait d'*Aloysia citriodora* (IC50= 93,57 ug/ml \pm 1.77). L'extrait le moins efficace est celui de *Zingiber officinale* (IC50= 268,04 ug/ml \pm 23,87). Cette variabilité d'efficacité antiradicalaire est potentiellement corrélée avec les teneurs en composés phénoliques (flavonoïdes et tanins) des extraits. En effet, il a été noté que les extraits qui présentent les taux en flavonoïdes les plus élevées qui possèdent une activité antiradicalaire élevée.

II.3.2. Pouvoir réducteur

Les propriétés réductrices des extraits méthanoliques ont été évaluées en utilisant la méthode basée sur la capacité des extraits à réduire le fer ferrique Fe³⁺ en fer ferreux Fe²⁺. Par conséquent, Fe²⁺ peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm [48]. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 14.

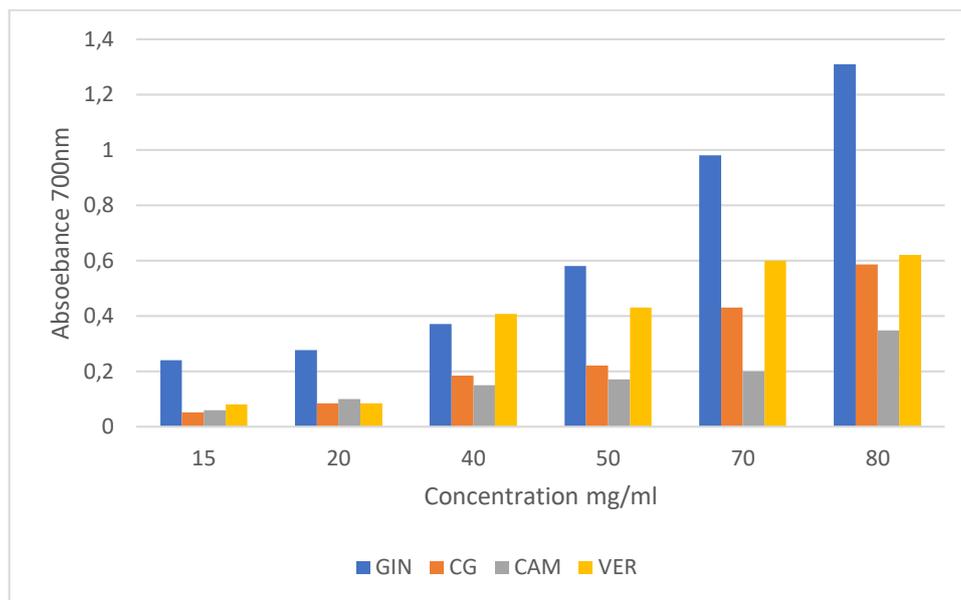


Figure 14: Pouvoir réducteur des différents extraits à différentes concentrations

D'après les résultats obtenus, le pouvoir réducteur des différents extraits à concentration 80mg/ml, présent une DO égale à 0,62 pour l'extrait d'*Aloysia citriodora*, 0,59 pour le *Syzygium aromaticum* et 0,35 pour la *Chamaemelum nobile*, ces DO sont inférieurs à celle enregistrée par le *Zingiber officinale* (DO=1,31). Cela peut être due à la présence de groupement hydroxyle des composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron.

II.3.3. Activité anti-peroxyde d'hydrogène

Les résultats de l'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène par les extraits méthanoliques des 4 plantes sont représentées dans la figure 15 et 16. Les taux de piégeage de H₂O₂ augmentent avec l'augmentation de la concentration de nos extraits (figure 15).

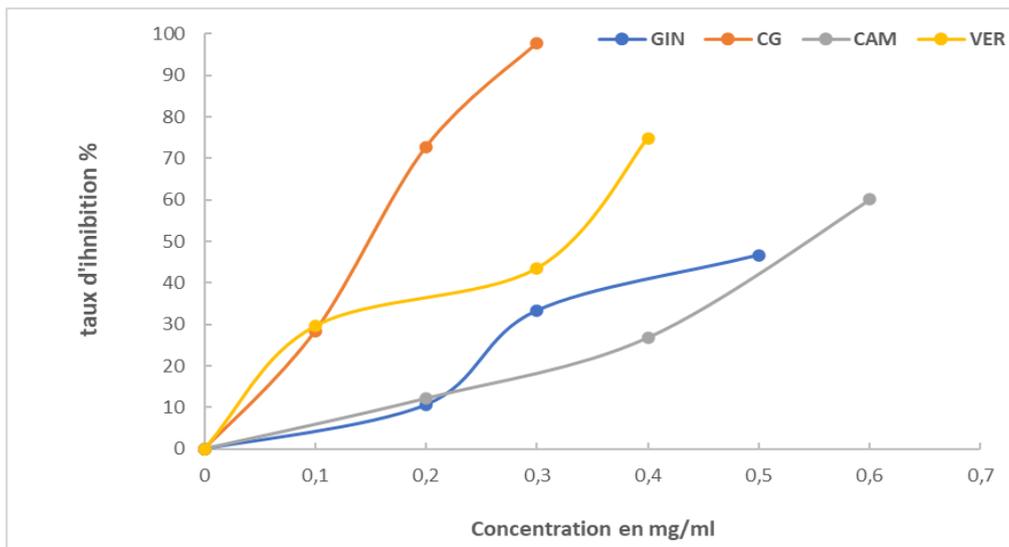


Figure 15: variation des taux d'inhibition du radical H2O2 en fonction des concentrations des extraits méthanoliques

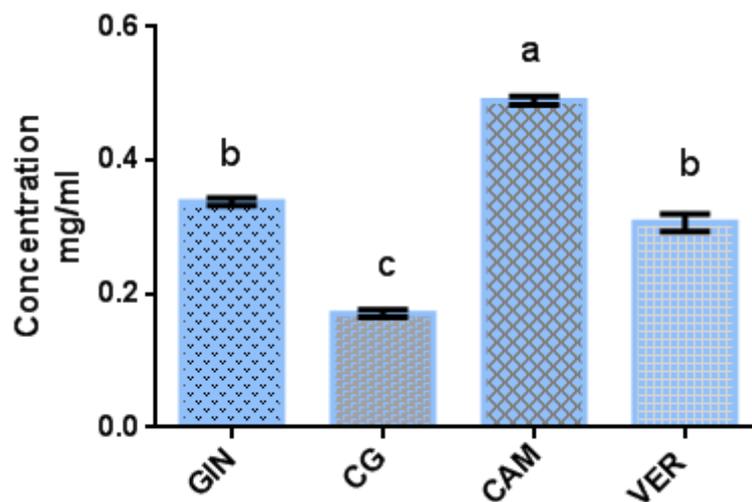


Figure 16: Concentrations inhibitrices à 50% de H2O2 des extraits méthanoliques

D'après l'analyse statistique on constate une différence significative pour l'efficacité à piéger le radical H2O2 par les différents extraits méthanoliques. L'extrait de clou de girofle présente la meilleure activité de piégeage de l'H2O2 avec une valeur d'IC50 = 0,15 mg/ml ± 0,0045, L'efficacité de piégeage de H2O2 peut être expliquée par des phénomènes intrinsèques d'auto-inhibition et par les teneurs en composés phénoliques qui ont le pouvoir de piéger ce type de

radicaux et qui ont la capacité de donner des électrons pour favoriser la conversion du H₂O₂ en H₂O [56].

II.3.4. Activité anti-hémolytique induite par H₂O₂

L'étude de pouvoir anti-hémolytique du peroxyde d'hydrogène a été réalisée à une concentration 4 mg/ml d'extrait. L'analyse statistique des résultats (figure 17) montre les différences observées entre les extraits sont significatives

Les résultats obtenus montrent que le pouvoir anti-hémolytique des extraits méthanoliques varies de 0% à 99,46%. L'extrait de fleur de camomille est celui le plus actif avec un taux anti-hémolytique de 99,46% ± 0,76 alors que l'extrait du clou de girofle ne présente aucune activité anti-hémolytique (0%) à la concentration utilisée

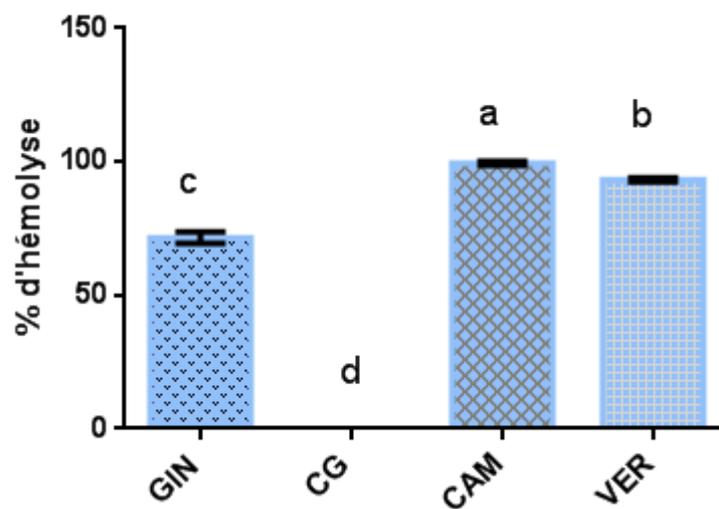


Figure 17: Effet des extraits sur l'activité anti-hémolyse induit par H₂O₂

L'hémolyse induite par le peroxyde d'hydrogène à faibles concentrations résulte des dommages oxydatifs destructeurs de la membrane cytoplasmique suite à la peroxydation lipidique des AGPI [57]. Lorsque le H₂O₂ traverse cette membrane, il peut causer la dégradation de l'hème de l'hémoglobine ainsi les ions Fe²⁺, ce qui génère le radical hydroxyle qui est très réactif par la réaction de Fenton. Ces deux radicaux induisent une chaîne de peroxydation lipidique aboutissant à la lyse des érythrocytes [58]. Par contre, aux concentrations élevées, les taux d'hémolyse diminuent, ce qui peut être lié à l'insolubilité de l'hémoglobine suite à sa polymérisation et à l'agrégation des érythrocytes [59].

II.4. Rendement et activité antioxydants de l'extrait de verveine encapsulation

II.4.1. Rendement

La méthode utilisée pour encapsuler l'extrait de verveine dans les billes d'alginate de sodium a permis d'obtenir un grand rendement. Exprimé en termes de teneurs de flavonoïdes encapsulés, le rendement de l'encapsulation obtenu est de $78.21 \pm 0.21\%$.

II.4.2. Activité anti-radical DPPH

La capacité antioxydante de l'extrait encapsulé évaluée par le test de piégeage du radical DPPH a été évalué en fonction du temps pour une quantité de 0,228 mg Eq.Q de flavonoïdes initialement encapsulés. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 18.

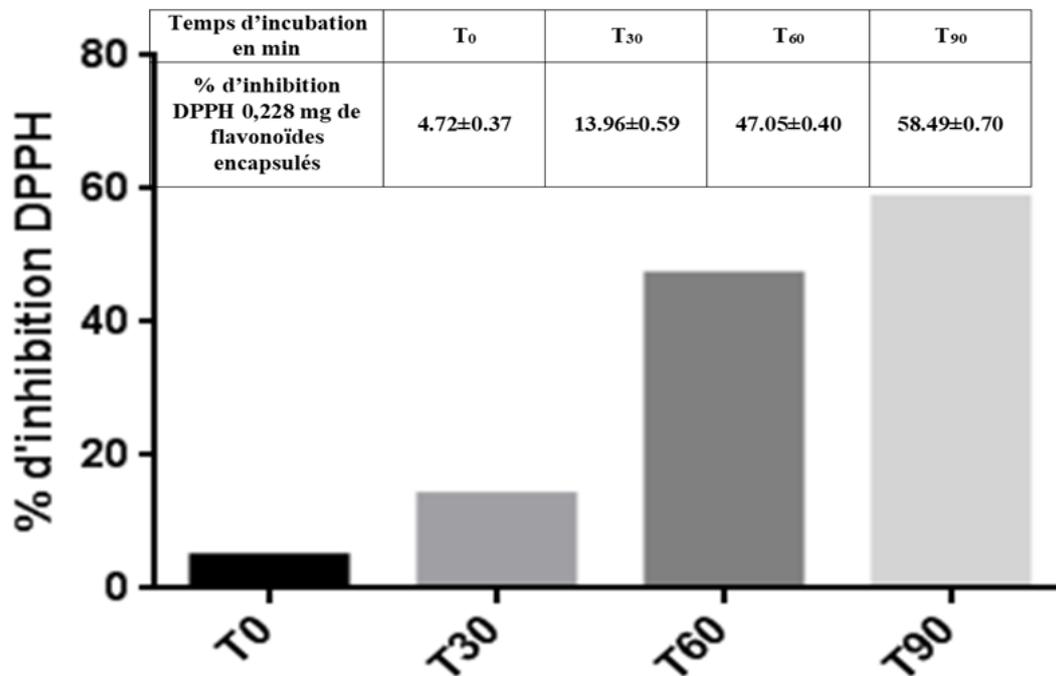


Figure 18: Activité anti-radical DPPH de l'extrait encapsulé en fonction de temps

Les résultats obtenus montrent une augmentation de pourcentage d'inhibition en fonction de temps, ça signifie que les billes d'alginate de sodium libèrent les composants (flavonoïdes ou autres) de l'extrait encapsulé.

Conclusion

De nos jours, un grand nombre de plantes médicinales possèdent des propriétés biologiques très importantes liées certainement aux vertus attribuées à une gamme de métabolites secondaires synthétisées par la plante non seulement surtout comme substances bioactives thérapeutiques dues essentiellement à leurs propriétés d'antioxydants.

Au cours de cette étude, nous avons effectué une analyse de quantification des composés phénoliques : polyphénols totaux et flavonoïdes et tanins dans l'extrait méthanolique des plantes *Syzygium aromaticum*, *Zingiber officinale*, *Chamaemelum nobile* et *Aloysia citriodora* et l'évaluation de leurs activités antioxydants et anti-hémolytiques.

L'activité antioxydante par la méthode de piégeage de DPPH est démontrée pour les extraits des 4 espèces de plante. La meilleure activité est obtenue par les extraits de *Syzygium aromaticum* et *Chamaemelum nobile*, probablement due à leur grande teneur en polyphénols totaux. En revanche, pour le pouvoir réducteur par la méthode de FRAP, les extraits de *Zingiber officinale* et *Aloysia citriodora* qui ont montré une meilleure activité.

Le teste d'encapsulation de l'extrait d'*Aloysia citriodora* a donné un bon rendement d'encapsulation. Et l'extrait encapsulé présentait toujours une activité anti-radical DPPH.

Ces résultats restent préliminaires et nécessitent des études complémentaires approfondies à différents niveaux de l'approche à travers une caractérisation fine et poussée sur d'autres composés des quatre plants par d'autres techniques, afin d'établir une relation structure activité. Les activités antioxydantes et anti- hémolytiques doivent être évaluées dans d'autres systèmes in vitro (cellulaires et enzymatiques) comme in vivo (modèle animal) pour mieux cerner les interactions moléculaires de ces composés vis-à-vis de leurs cibles.

Finalement, on a pu voir que l'encapsulation avec les alginates de sodium ouvrent d'importantes perspectives notamment dans le domaine de la micro- encapsulation, mais avant une utilisation de ceux-ci en thérapeutique, il s'avère nécessaire de connaître les phénomènes de diffusion sur lesquels s'appuie le relargage contrôlé des substances actives.

- 1 Sofowora, A.: 'Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique' Karthala Editions, 2010.
- 2 Khadidja, H., and Sarah, M.: 'La phytothérapie et les produits naturels au secours de la médecine conventionnelle dans le traitement et la prévention de la COVID-19', Algerian Journal of Health Sciences, 2021, 79
- 3 Moussa, M., Cherif, R.A., Lekhal, S., Bounab, A., and H, Y.: 'Dosage des composés phénoliques et détermination de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Brocchia cinerea* VIS de l'Algérie (Sud-Est)', 2022
- 4 Hamed, H.: 'La relation entre la numération cellulaire et la qualité du lait, Presses académiques francophones, 2016
- 5 Goudable, J., and Favier, A.: 'Radicaux libres oxygénés et antioxydants', Nutrition clinique et métabolisme, 1997, 11, (2), pp. 115-120
- 6 Sorg, O.: 'Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?', Comptes rendus biologies, 2004, 327, (7), pp. 649-662
- 7 Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Charlier, C., and Chapelle, J.-P.: 'Le stress oxydant', Revue médicale de Liège, 2007, 62, (10)
- 8 Favier, A.: 'Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique Review. l'actualitechimique, novembre 2003, pp: 108-115
- 9 Cillard, J., and Cillard, P.: 'Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations', Oléagineux, Corps gras, Lipides, 2006, 13, (1), pp. 24-29
- 10 Tang, S.Y., and Halliwell, B.: 'Medicinal plants and antioxidants: what do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies?', Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 394, (1), pp. 1-5
- 11 Parihar, A., Parihar, M.S., Milner, S., and Bhat, S.: 'Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury', Burns, 2008, 34, (1), pp. 6-17
- 12 Leverage, X.: 'Oxidative, stress and antioxidants?', Cahiers de Nutrition et de Dietetique, 2009, 44, (5), pp. 219-224
- 13 Baudin, B.: 'Oligoéléments cofacteurs enzymatiques', Revue Francophone des Laboratoires, 2021, 2021, (533), pp. 18-24
- 14 Rolland, Y.: 'Antioxydants naturels végétaux', Oléagineux, Corps gras, Lipides, 2004, 11, (6), pp. 419-424

- 15 Portier, K., Kirschvink, N., Fellmann, N., Coudert, J., and Lekeux, P.: 'Paramètres influençant la structure et la fonction du globule rouge chez le cheval', Université de Liège, Liège, Belgium, 2007
- 16 Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., and Boucherit, K.: 'Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie', *Phytothérapie*, 2014, 12, (6), pp. 364-371
- 17 Tanoh, S.K., N'Gaman-Kouassi, C., Boa, D., Mamyrbekova-Békro, J.A., and Békro, Y.-A.: 'Activité antioxydante des extraits bruts hydroéthanoliques et hydroacétoniques des organes de quatre plantes de Côte d'Ivoire médicinales', *Nature & Technology*, 2019, (21), pp. 28-34
- 18 Dieng, S.I.M., Fall, A.D., Diatta-Badji, K., Sarr, A., Sene, M., Sene, M., Mbaye, A., Diatta, W., and Bassene, E.: 'Evaluation de l'activité antioxydante des extraits hydroéthanoliques des feuilles et écorces de *Piliostigma thonningii* Schumach', *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 2017, 11, (2), pp. 768-776
- 19 Bidie, A.P., N'guessan, B.B., Yapo, A.F., N'Guessan, J.D., and Djaman, A.J.: 'Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne', *Sciences & Nature*, 2011, 8, (1-2), pp. 1-12
- 20 Oueslati, S., Gharsalli, W., Abdelkarim, M., Benaissa, F., and Ksouri, R.: 'Biochemical evaluation and exploration of the antioxidant, antibacterial and anticancer potential of *Zingiber officinale*', 2018, pp.3561-3568
- 21 Cheurfa, M., and Allem, R.: 'Évaluation de l'activité anti-oxydante de différents extraits des feuilles d'*Aloysia triphylla* (L'Hérit.) d'Algérie in vitro', *Phytothérapie*, 2016, 14, (3), pp. 181-187
- 22 Selles, S.M.A., Kouidri, M., Belhamiti, B.T., and Ait Amrane, A.: 'Chemical composition, in-vitro antibacterial and antioxidant activities of *Syzygium aromaticum* essential oil', *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2020, 14, (4), pp. 2352-2358
- 23 Sharifzadeh, A., Javan, A.J., Shokri, H., Abbaszadeh, S., and Keykhosravi, K.: 'Evaluation of antioxidant and antifungal properties of the traditional plants against foodborne fungal pathogens', *Journal de Mycologie Médicale*, 2016, 26, (1), pp. e11-e17
- 24 James, O., and Alewo, I.M.: 'In vitro antihemolytic activity of *gymnema sylvestre* extracts against hydrogen peroxide (H₂O₂) induced haemolysis in human erythrocytes', *Am. J. Phytomed. Clin. Ther.*, 2014, 2, pp. 861-869
- 25 Ebrahimzadeh, M., Nabavi, S., Nabavi, S., and Eslami, B.: 'Antioxidant and antihemolytic activities of *Mentha piperita*', *Pharmacologyonline*, 2010, 1, pp. 744-752
- 26 Afsar, T., Razak, S., Khan, M.R., Mawash, S., Almajwal, A., Shabir, M., and Haq, I.U.: 'Evaluation of antioxidant, anti-hemolytic and anticancer activity of various solvent extracts of *Acacia hydasypica* R. Parker aerial parts', *BMC complementary and alternative medicine*, 2016, 16, (1), pp. 1-16
- 27 Benbrook, M.: 'Accroître la teneur antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques', *The organic center*, 2005, pp. 6-8

- 28 Bruneton, J.: 'Acides phénols', Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Ed: Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 2008, pp. 198-260
- 29 Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., and Jiménez, L.: 'Polyphenols: food sources and bioavailability', The American journal of clinical nutrition, 2004, 79, (5), pp. 727-747
- 30 Ghedira, K.: 'Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique', Phytothérapie, 2005, 3, (4), pp. 162-169
- 31 Banjarnahor, S.D., and Artanti, N.: 'Antioxidant properties of flavonoids', Medical Journal of Indonesia, 2014, 23, (4), pp. 239-244
- 32 Park, H.-H., Lee, S., Son, H.-Y., Park, S.-B., Kim, M.-S., Choi, E.-J., Singh, T.S., Ha, J.-H., Lee, M.-G., and Kim, J.-E.: 'Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells', Archives of pharmacal research, 2008, 31, pp. 1303-1311
- 33 Zuidam, N.J., and Nedovic, V.: 'Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing', Springer, 2010.
- 34 Sagis, L.M.: 'Microencapsulation and microspheres for food applications', Academic Press, 2015.
- 35 Kerdudo, A.: 'Optimisation de la conservation des cosmétiques: impact de la formulation, recherche de nouveaux conservateurs naturels, encapsulation', Nice, 2014
- 36 Desai, K.G.H., and Jin Park, H.: 'Recent developments in microencapsulation of food ingredients', Drying technology, 2005, 23, (7), pp. 1361-1394
- 37 Dias, D.R., Botrel, D.A., Fernandes, R.V.D.B., and Borges, S.V.: 'Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods', Current Opinion in Food Science, 2017, 13, pp. 31-37
- 38 Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., and Bugarski, B.: 'An overview of encapsulation technologies for food applications', Procedia food science, 2011, 1, pp. 1806-1815
- 39 Lamprecht, A., and Bodmeier, R.: 'Microencapsulation', Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, 2000
- 40 Tavares, L., Smaoui, S., Lima, P.S., de Oliveira, M.M., and Santos, L.: 'Propolis: Encapsulation and application in the food and pharmaceutical industries', Trends in Food Science & Technology, 2022
- 41 Handa, S.: '1 An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants', Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants, pp. 21
- 42 Ghedadba, N., Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkane, M., Bousselsela, H., and Oueld-Mokhtar, S.: 'Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de Marrubium deserti de Noé', Phytothérapie, 2015, 13, (2), pp. 118-129

- 43 Oomah, B.D., Caspar, F., Malcolmson, L.J., and Bellido, A.-S.: 'Phenolics and antioxidant activity of lentil and pea hulls', *Food Research International*, 2011, 44, (1), pp. 436-441
- 44 Dif, M., Benchiha, H., Mehdadi, Z., Benali-Toumi, F., Benyahia, M., and Bouterfas, K.: 'Étude quantitative des polyphénols dans les différents organes', 2015
- 45 Hebi, M., and Eddouks, M.: 'Évaluation de l'activité antioxydante de Stevia rebaudiana', *Phytothérapie*, 2016, 14, (1), pp. 17-22
- 46 Congo, M.Y.M.: 'Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliférative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica L (Salvadoraceae)*', 2014
- 47 Que, F., Mao, L., and Pan, X.: 'Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds', *Food Research International*, 2006, 39, (5), pp. 581-587
- 48 Habibou, H.H., Idrissa, M., Ikhiri Khalid, P., and Benjamin, O.: 'Activité Antioxydante des Extraits Méthanoliques de Différents Organes de *Detarium microcarpum Guill. & Perr*', *European Scientific Journal*, 2019, 15, (12), pp. 159-171
- 49 El-haci, I.A.: 'Estimation du pouvoir antioxydants des différents extraits organiques d'*Ecballium elaterium (L.)*'
- 50 Berroukeche, F., Attoui, N., Toul, F., Ziane, M., Soulimane, N.M., and Merzouk, H.: 'AJAB', *Asian J Agric & Biol*, 2022, (1)
- 51 Vijian, R.S., Yusefi, M., and Shameli, K.: 'Plant Extract Loaded Sodium Alginate Nanocomposites for Biomedical Applications: A Review', *Journal of Research in Nanoscience and Nanotechnology*, 2022, 6, (1), pp. 14-30
- 52 Aichour, A., and Zaghouane-Boudiaf, H.: 'L'alginate de sodium :encapsulation et caractérisation'
- 53 Haddouchi, F., Chaouche, T., and Halla, N.: 'Phytochemical screening, antioxidant activities and hemolytic power of four Saharan plants from Algeria', *Phytothérapie*, 2016, pp. 1-9
- 54 Bakchiche, B., and Gherib, A.: 'Activités antioxydantes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle d'Algérie [Antioxidant activities of polyphenol extracts from medicinal plants in Algerian traditional pharmacopoeia]', *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 2014, 9, (1), pp. 167
- 55 Laurent, S.: 'Etude comparative de différentes méthodes d'extraction et de dosage des tannins chez quelques ptéridophytes', *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, 1975, 83, (4), pp. 735-752
- 56 El-Haci, I., Atik-Bekkara, F., Didi, A., Gherib, M., and Didi, M.: 'Teneurs en polyphénols et pouvoir antioxydant d'une plante médicinale endémique du Sahara algérien', *Phytothérapie*, 2012, 5, (10), pp. 280-285

- 57 Singh, N., and Rajini, P.: 'Antioxidant-mediated protective effect of potato peel extract in erythrocytes against oxidative damage', *Chemico-biological interactions*, 2008, 173, (2), pp. 97-104
- 58 Okoko, T., and Ere, D.: 'Reduction of hydrogen peroxide-induced erythrocyte damage by *Carica papaya* leaf extract', *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2012, 2, (6), pp. 449-453
- 59 Masuoka, N., Sugiyama, H., Ishibashi, N., Wang, D.-H., Masuoka, T., Kodama, H., and Nakano, T.: 'Characterization of acatalasemic erythrocytes treated with low and high dose hydrogen peroxide: hemolysis and aggregation', *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281, (31), pp. 21728-21734
- 60 Ahmed, K., Shaheen, G., and Asif, H.: 'Zingiber officinale Roscoe (pharmacological activity)', *J. Med. Plants Res*, 2011, 5, (3), pp. 344-348
- 61 Barbelet, S.: 'Le giroflier: historique, description et utilisations de la plante et de son huile essentielle', Université de Lorraine, 2015
- 62 Pillonel, N., Fischer, S., and Baroffio, C.: 'Origine du dépérissement de la camomille romaine', *Revue suisse de viticulture, arboriculture et horticulture*, 2012, 44, (4), pp. 234-243
- 63 Ghédira, K., and Goetz, P.: 'Verveine odorante *Aloysia citriodora* Paláu (*Lippia citriodora*)', *Phytothérapie*, 2017, 15, (1), pp. 33

Annexe

Présentation des plantes

-Le *zingiber officinale* (Gingembre) est une espèce de genre *Zingiber* et de classe monocotylédone. Originaire d'Asie, il est constitué de deux parties : la partie souterraine, appelée le rhizome, est noueuse et branchue et la partie aérienne est formée de feuilles et d'une tige d'environ un mètre de hauteur [60].



Figure N°5 : Plante de *zingiber officinale* partie aérienne et souterraine[60]

-*Syzygium aromaticum* (Clou de girofle) Originaire de l'archipel des Moluques il appartient à la famille des Myrtaceae de classe Magnoliopsida, cet arbre de 15 à 20 mètres de haut apprécie les sols tropicaux maritimes drainés. Ses feuilles sont opposées, coriaces et persistantes. Ses fleurs blanc rosé sont groupées en petites cymes compactes et ramifiées [28].



Figure N°6 : plante de *Syzygium aromaticum*[61]

-*Chamaemelum nobile* (camomille) est une plante de la famille des astéracées, classe des Dicotylédones elle est cependant plus connue par son synonyme *Anthemis nobilis*

ou la camomille romaine. C'est une plante herbacée et vivace de 10 à 30 cm de haut, à souche rampante, parfumée [62]

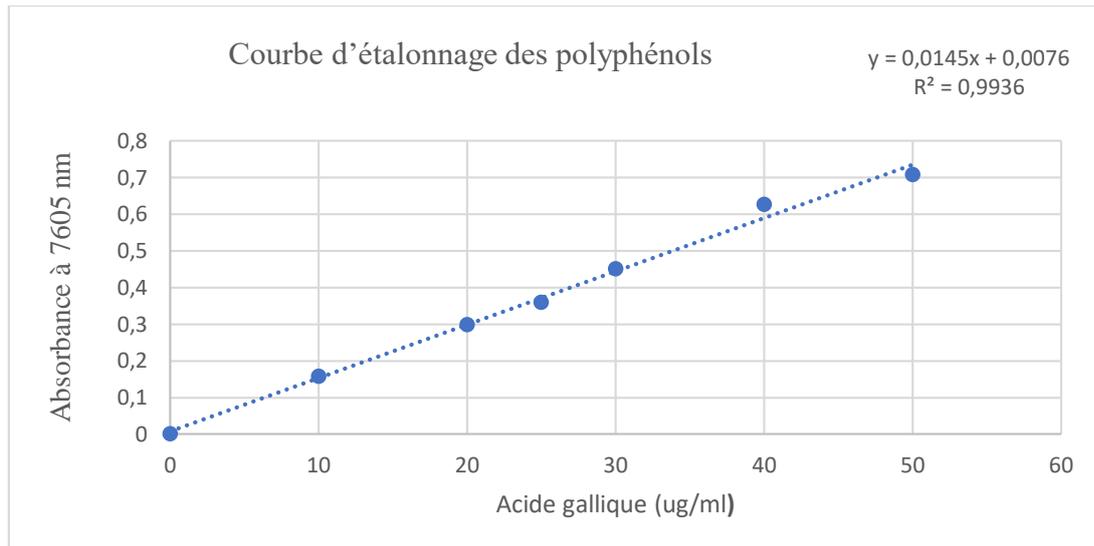
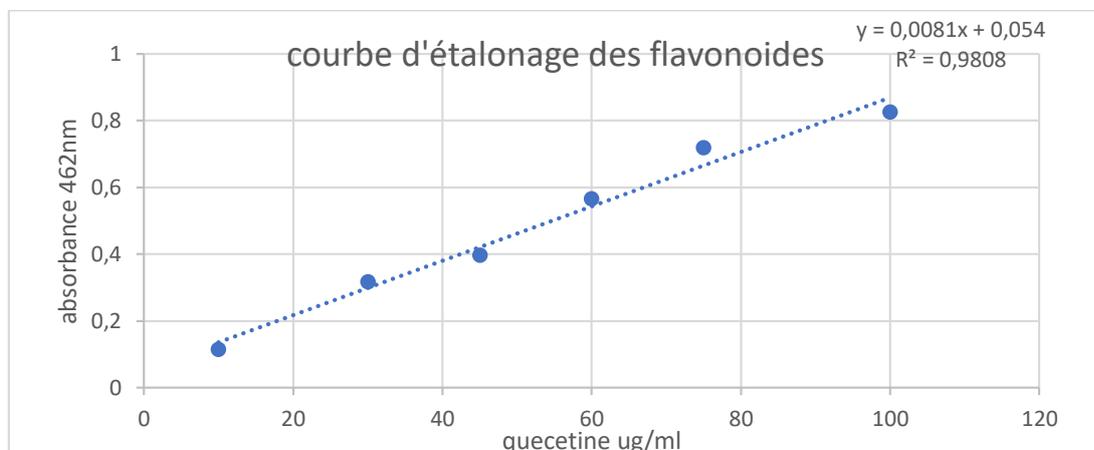
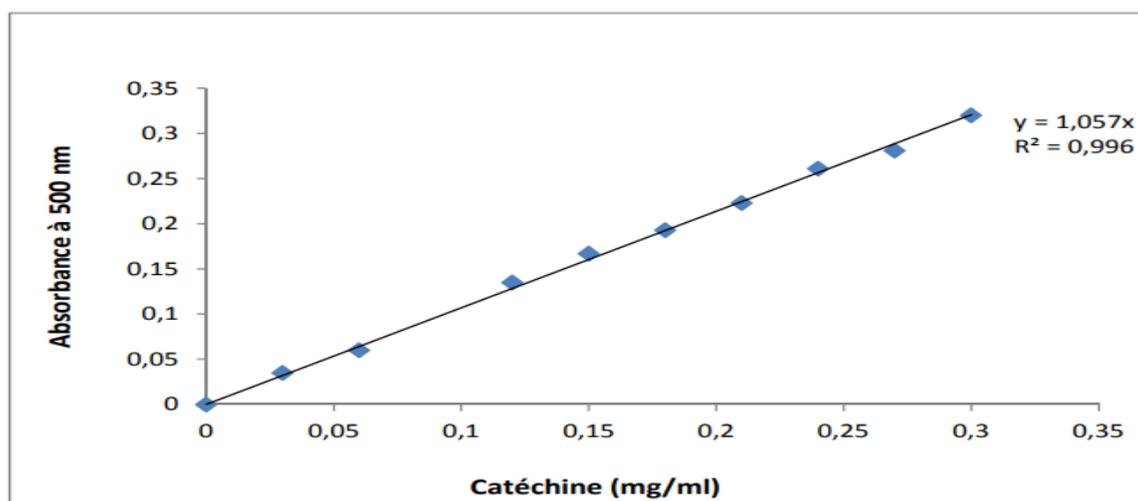


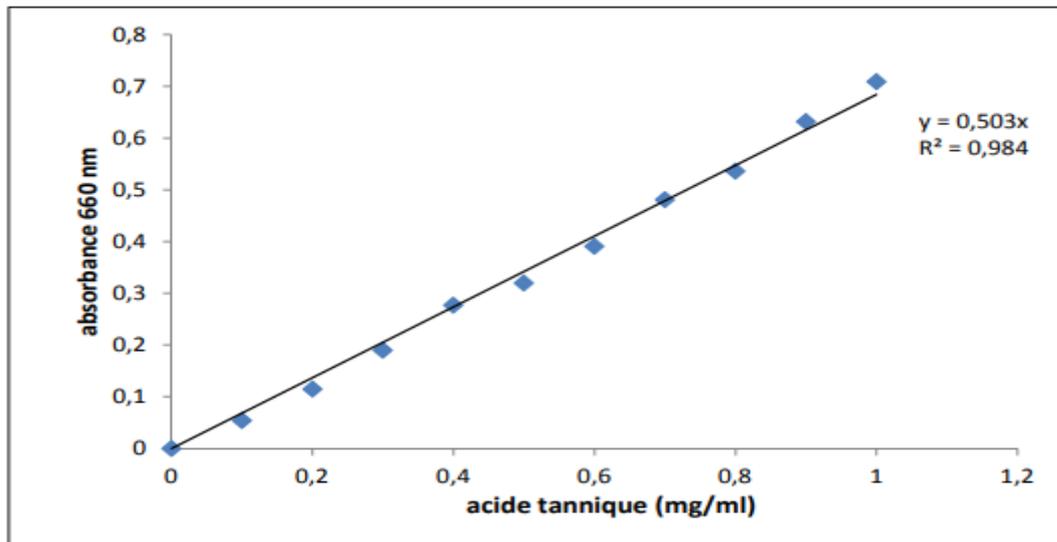
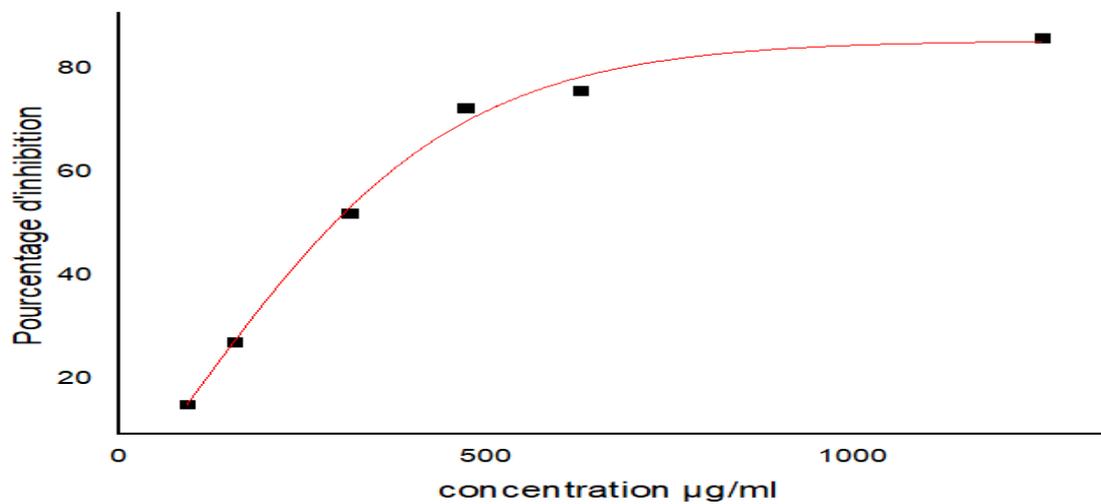
Figure N°7 : Plante de *Chamaemelum nobile* [62]

-*Aloysia citriodora* verveine citrinière c'est un arbrisseau odorant de famille Verbenaceae de classe Magnoliopsida à tige anguleuse qui peut mesurer 1 à 3 m de haut, Ses feuilles lancéolées vert pâle courtement pétiolées.[28]

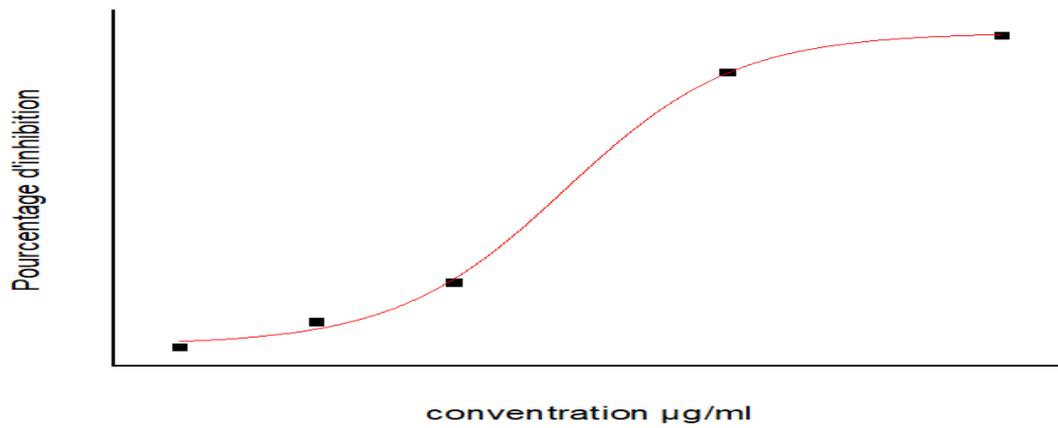


Figure N°8 : plante de *Aloysia citriodora* [63]

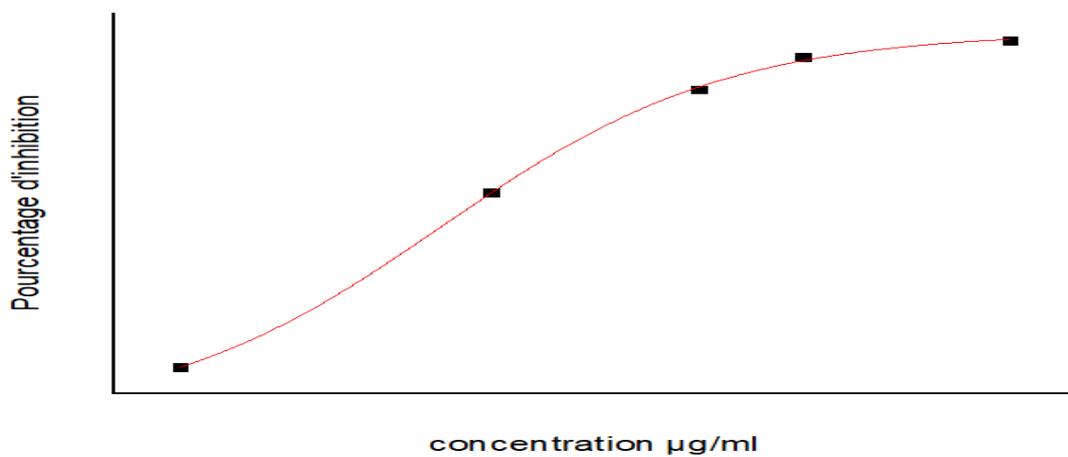
Annexe 1 : courbe d'étalonnage avec l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux**Annexe 2 : courbe d'étalonnage avec la quercétine pour le dosage des flavonoïdes****Annexe 3 : Courbe d'étalonnage de dosage des tanins condensés.**

Annexe 4 : Courbe d'étalonnage de dosage des tanins hydrolysables.**Annexe 5** : activité du piégeage radical DPPH des différentes concentrations de l'extrait méthanolique des racines de *Zingiber officinale*

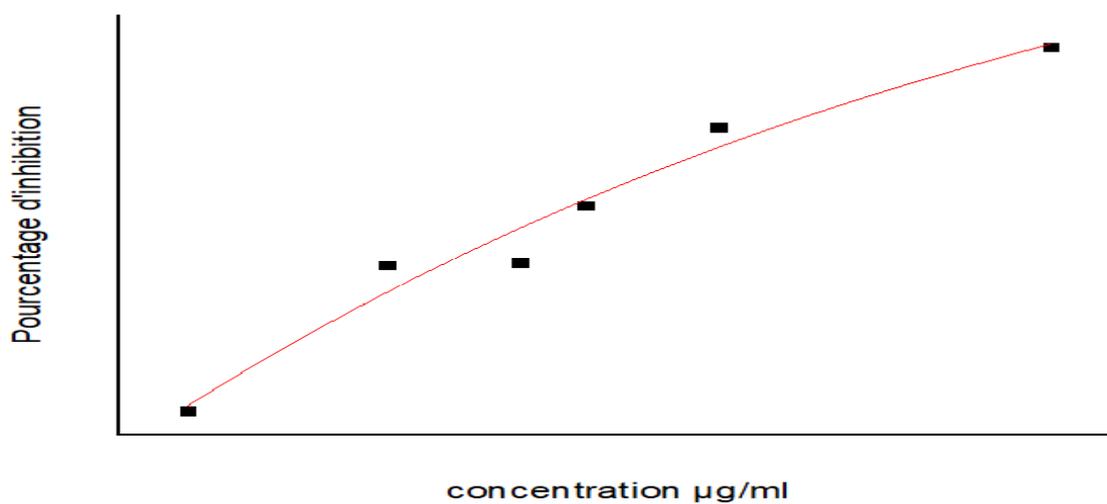
Annexe 6 : activité du piégeage radical DPPH des différentes concentrations de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *Syzygium aromaticum*



Annexe 7 : activité du piégeage radical DPPH des différentes concentrations de l'extrait méthanolique des fleurs de *Chamaemelum nobile*



Annexe 8 : activité du piégeage radical DPPH des différentes concentrations de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Aloysia citriodora*



Résumé

L'objectif de ce travail est de doser les composés phénoliques et d'évaluer l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de différentes plantes *Syzygium aromaticum*, *Zingiber officinale*, *Chamaemelum nobile* et *Aloysia citriodora* par différents tests (DPPH, FRAP, piégeage d'H₂O₂ et anti hémolyse induite par H₂O₂) et d'évaluer l'activité de l'extrait de verveine encapsulé dans des billes d'alginate. Les résultats obtenus montrent que les teneurs en polyphénols totaux obtenus sont plus élevées dans l'extrait de *Syzygium aromaticum* 35.89 ± 1.34 mg Eq.AG/g MS par rapport aux autres extraits. L'activité antioxydante par la méthode de DPPH est plus importante pour *Syzygium aromaticum* avec une valeur de IC₅₀ de $21.93 \mu\text{g/ml} \pm 0.72$ suivit respectivement celles de *Chamaemelum nobile* $54.25 \mu\text{g/ml} \pm 8.45$ et d'*Aloysia citriodora* $93.57 \mu\text{g/ml} \pm 1.77$. Le test anti-hémolyse réalisé a montré que les trois espèces (*Zingiber officinale*, *Chamaemelum nobile* et *Aloysia citriodora*) présentent un potentiel anti-hémolytique et pas d'effet pour le *Syzygium aromaticum*. D'autre part, un bon rendement d'encapsulation de l'extrait de verveine a été obtenus et l'extrait encapsulé présente une bonne activité anti-radical DPPH.

Mots clés : antioxydant, encapsulation, verveine, clou de girofle, camomille, gingembre

Abstract

The objective of this study is to quantify phenolic compounds and evaluate the antioxidant activity of methanolic extracts from different plants, namely *Syzygium aromaticum*, *Zingiber officinale*, *Chamaemelum nobile*, and *Aloysia citriodora*, through various tests (DPPH, FRAP, H₂O₂ scavenging, and H₂O₂ induced anti-hemolysis), as well as assessing the activity of encapsulated verbena extract in alginate beads. The obtained results reveal that the total polyphenol contents are higher in *Syzygium aromaticum* extract, with a value of 35.89 ± 1.34 mg Eq.AG/g MS, compared to the other extracts. The antioxidant activity, determined by the DPPH method, is more significant for *Syzygium aromaticum* with an IC₅₀ value of $21.93 \mu\text{g/ml} \pm 0.72$, followed by *Chamaemelum nobile* with $54.25 \mu\text{g/ml} \pm 8.45$, and *Aloysia citriodora* with $93.57 \mu\text{g/ml} \pm 1.77$. The anti-hemolysis test showed that *Zingiber officinale*, *Chamaemelum nobile*, and *Aloysia citriodora* exhibit anti-hemolytic potential, while no effect was observed for *Syzygium aromaticum*. Additionally, a high encapsulation yield of the verbena extract was achieved, and the encapsulated extract demonstrated good anti-radical DPPH activity.

المخلص

الهدف من هذا العمل هو فحص المركبات الفينولية وتقييم النشاط المضاد للأوكسدة لمستخلصات الميثانول لنباتات المختلفة القرنفل والزنجبيل والبابونج واللوزة الليمونية من خلال اختبارات مختلفة (DPPH و FRAP و H₂O₂ scavenging ومضادات انحلال الدم الناجم عن H₂O₂) وتقييم نشاط مستخلص لوزة مغلف في حبات الجينات. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن إجمالي محتويات البوليفينول التي تم الحصول عليها أعلى في مستخلص القرنفل 35.89 ± 1.34 ملغ مع مكافئ حمض الغاليك/غ من المادة الجافة، مقارنة بالمستخلصات الأخرى. النشاط المضاد للأوكسدة بطريقة DPPH أكبر بالنسبة ل القرنفل بقيمة IC₅₀ تبلغ 21.93 ± 0.72 ميكروغرام / مل تليها على التوالي البابونج 54.25 ± 8.45 ميكروغرام / مل واللوزة الليمونية 93.57 ± 1.77 ميكروغرام / مل.

أظهر اختبار مضاد انحلال الدم الذي تم إجراؤه أن الأنواع الثلاثة الزنجبيل والبابونج واللوزة الليمونية لها إمكانات مضادة لانحلال الدم والقرنفل ليس لها أي تأثير. من ناحية أخرى، تم الحصول على محصول تغليف جيد لمستخلص اللوزة الليمونية وللمستخلص المغلف نشاط جيد مضاد للجذور DPPH