

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 physicochimique
Filière : Biochimie
Option : M2 Pharmacologie Moléculaire



Réf :.....

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

MASTER

Thème

*Evaluation de l'activité
antioxydante et
cytoprotectrice des extraits
alcaloïdiques d'une plante
médicinale locale*

Présenté par :

Belmouri Loubna & Bendahmane Tinhinane

Soutenu le : **21Juin 2017**

Devant le jury composé de :

M^{me} Slimani-Meziani S

MAA

Présidente

M^{me} Bensalem-Bournine S

MCB

Encadreur

M^{me} Mehdid A

MAA

Examinatrice

Année universitaire : 2016 / 2017

Dédicaces

*Je dédie ce travail tout d'abord à ma chère mère **Nadia** et mon cher père **Alyazid** qui ont toujours souhaité ma réussite et qui m'ont permis d'atteindre mes objectifs dans mes études et dans ma vie. Merci de m'avoir soutenu tant moralement que matériellement pour que je puisse attendre mon but, et de vos prières pour moi.*

*A mon cher frère **Aymen**.*

*A mes chères sœurs : **Siham** et **Ikram**.*

*A mon cher oncle **Noureddine** et sa femme, ma chère **Nora**.*

A mes cousins et cousines.

*A mes petits chouchous **Hocine** et **Chems eddine**.*

*A toute la famille **Belmouri**.*

*A mes chères amies : **Sabrina**, **Kahina**, **Khalissa** et **Chahra**.*

*A la personne qui m'a beaucoup encouragé **Azzedine**. Merci d'être près de moi tout au long de mes études.*

*A ma chère amie et collègue **Tinhinane**.*

*A mes amis de promotion de master **Pharmacologie Moléculaire**.*

A tous ceux qui ont pris place dans mon cœur Et à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

Loubna

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

Aux être les plus cher : mes parents

A mon père DJAMEL

A L'homme qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, qui ne cesse constamment de m'enrichir de son expérience et de me prodiguer ses conseils. que dieu te garde pour nous papa.

A ma très chère maman CHAFIA

A celle qui ma donné la vie, qui n'a jamais cessée de m'encourager, tes prières m'ont été un grand secours pour mener à bien mes études. Merci maman

Que Dieu, vous préserve, vous accorde santé, bonheur et longue vie.

A mon cher frère Tahar

A mes adorables sœurs Thélili et Tiziri pour leur soutien moral

A mes très chères tantes Karima, Naima qui ont tant sacrifié et qui ont toujours été présente pour nous .dans la joie et le malheur .vos conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite.

A ma très chère grande mère Nouara

A mes cousines et cousin : Doriane, Kenza, Sofia, Liza, Douda, Madani

A ami (e) s: Kenza, Nora, Khalissa, Siham, Nadjett, sidali.hanan

A tous ceux qui m'ont soutenu de pré ou de loin

Je termine avec mon binôme et ma meilleure amie LOUBNA

Tinhinane

Remerciements

Avant tout nous remercions Allah, le bon Dieu, le miséricordieux de nous avoir donné le courage, l'ambition, le défi et la santé pour finaliser ce mémoire.

Nous adressons un Sincère remerciement et profonde gratitude à notre promotrice M^{me} **BENSALÉM Sihem** qui a accepté de nous encadrer et qui nous a fait bénéficier de son savoir et de ses conseils éclairés tout au long de ce parcours, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas vu le jour sans son aide, on tient aussi à exprimer notre profonde gratitude et nos remerciements à Mr **BOURNINE L** pour son aide.

Nos plus vifs remerciement s'adressent à :

M^{me} **SLIMANI-MEZIANI S** maitre assistant de classe A à la faculté des sciences de la nature et de la vie, pour avoir accepté de présider le jury.

M^{me} **MAHDID A** maitre de conférences de classe B à la faculté des sciences de la nature et de la vie, pour avoir accepté de juger ce modeste travail

Un remerciement particulier va à M^{me} **SEBAIHI-HARZOUN S** pour son aide et pour sa bienveillance et ses conseils.

A toute l'équipe du laboratoire « **Biotechnologie Végétale et ethnobotanique** ».

A nos chers collègues de la promotion « **Pharmacologie moléculaire** ».

Enfin ces remerciements seraient incomplets si notre famille n'y était pas associée. Sans eux nous n'aurions jamais pu envisager d'effectuer cet humble travail

Sommaire

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste d'abréviations	
Introduction.....	1

Chapitre I : Revue bibliographique

I.1. Plantes médicinales.....	2
I.1.1. Généralités sur les plantes médicinales.....	2
I.1.2. Substances naturelles issues de plantes à potentiel antioxydant.....	2
I.1.2.1. Classification.....	3
I.2. Description botanique de la plante <i>V.difformis</i>	4
I.2.1. Classification.....	4
I.2.2. Description.....	4
I.2.3. Propriétés et usages.....	5
I.2.4. Composition chimique.....	5
I.3. Stress oxydant.....	6
I.3.1. Mécanismes de production des espèces réactives oxygénées.....	6
I.3.1.1. Généralités.....	6
I.3.1.2. Mécanismes physiologiques de la production des ERO.....	6
I.3.2. Cibles moléculaires des espèces réactives oxygénées.....	8
I.3.2.1. Lipides membranaires.....	8
I.3.2.2. Protéines.....	8
I.3.2.3. Lipoprotéines.....	8

I.3.2.4. Acide désoxyribonucléique (ADN).....	8
I.3.3. Statut oxydatifs et marqueurs biochimiques.....	9
I.3.3.1. Marqueurs de la peroxydation lipidique.....	9
I.3.3.2. Marqueurs de l'oxydation des protéines et des acides aminés.....	9
I.3.3.3. Marqueurs de l'oxydation des acides nucléique.....	9
I.3.4. Elimination des radicaux libres.....	10
I.3.4.1. Les antioxydants.....	10
I.4. Modèles d'études du stress oxydant.....	12
I.4.1. Modèles animaux.....	12
I.4.2. Organes isolés.....	12
I.4.3. Etude <i>in vitro</i>	13
I.4.4. Modèles cellulaires.....	13

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal.....	15
II.2. Réactifs chimiques et instruments.....	15
II.3. Méthodes.....	15
II.3.1. Préparation de l'extrait végétal.....	15
II.3.1.1. Extraction des alcaloïdes totaux.....	15
II.3.2. Activité scavenger du radical DPPH.....	16
II.3.3. Chélation du fer ferreux.....	18
II.3.4. Effet cytoprotecteur des extraits de <i>V.difformis</i>	18
II.3.4.1. Préparation de la solution érythrocytaire.....	18
II.3.4.2. Mesure de l'effet anti-hémolytique de l'extrait alcaloïdiques de <i>V.difformis</i>	19

II.3.5. Analyse statistique.....	20
----------------------------------	----

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Taux d'extraction des alcaloïdes de <i>V.difformis</i>	21
---	----

III.2. Effet scavenger du radical DPPH.....	21
---	----

III.3.Chélation du fer.....	25
-----------------------------	----

III.4. Activité cytoprotectrice des extraits alcaloïdiques de <i>V. difformis</i>	29
---	----

Conclusion et perspectives.....	39
---------------------------------	----

Références bibliographiques.....	40
----------------------------------	----

Annexes

Liste des figures

Figure (01) : Classification des substances phytochimiques.....	3
Figure (02) : Structure chimique des alcaloïdes indoliques.....	4
Figure (03) : Photographies de <i>Vinca difformis</i> , a) vue générale, b) fleur et feuilles, c) fleur.....	5
Figure (04) : Origines des différents radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.....	7
Figure (05) : Extraction des deux parties (feuilles et racines) du <i>V.difformis</i> par soxhlet.....	15
Figure (06) : Protocole effet scavenger du radical libre DPPH.....	17
Figure (07) : Pourcentage scavenger du radical libre DPPH de l'extrait ATFVDA.....	23
Figure (08) : Pourcentage scavenger du radical libre DPPH de l'extrait ATFVDb.....	24
Figure (09) : Pourcentage scavenger du radical libre DPPH de l'extrait ATRVDA.....	24
Figure (10) : Pourcentage scavenger du radical libre DPPH de l'extrait ATRVDb.....	25
Figure (11): Activité chélatrice (%) de l'extrait ATFVDA.....	26
Figure (12): Activité chélatrice (%) de l'extrait ATFVDb.....	27
Figure (13): Activité chélatrice (%) de l'extrait ATRVDA.....	28
Figure (14): Activité chélatrice (%) de l'extrait ATRVDb.....	28
Figure (15) : L'activité hémolytique de l'extrait ATFVDA.....	30
Figure (16) : Mesure de la concentration cellulaire de l'extrait ATFVDA.....	30
Figure (17) : Mesure du taux d'hémoglobine libérée de l'extrait ATFVDA.....	31
Figure (18) : Mesure du taux d'hémoglobine intracellulaire de l'extrait ATFVDb.....	31
Figure (19) : L'activité hémolytique de l'extrait ATFVDb.....	32
Figure (20) : Mesure de la concentration cellulaire de l'extrait ATFVDb.....	33

Figure (21) : Mesure du taux d'hémoglobine libéré de l'extrait ATFVDb.....	34
Figure (22) : Mesure du taux d'hémoglobine intracellulaire de l'extrait ATFVDb.....	34
Figure (23): L'activité hémolytique de l'extrait ATRVDA et de l'extrait ATRVDb.....	35
Figure (24): Mesure de la concentration cellulaire de l'extrait ATRVDA et de l'extrait ATRVDb.....	36
Figure (25): Mesure du taux de l'hémoglobine libérée de l'extrait ATRVDA et de l'extrait ATRVDb.....	36
Figure (26): Mesure du taux de l'hémoglobine intracellulaire de l'extrait ATRVDA et de l'extrait ATRVDb.....	37
Figure (27): La morphologie des érythrocytes humaines observés au microscope optique (Gx100) : Témoin négatif (a), Témoin positif (b), Extrait acide des feuilles (c), Extrait basique des feuilles (d), Extrait acide des racines (e) et Extrait basique des racines (f).....	38

Liste des tableaux

Tableau I : rendements des extraits obtenus pour les deux parties (feuilles et racines) de la plante <i>V.difformis</i>	21
Tableau II: L'IC ₅₀ de la quercétine et les différents extraits testés sur la décoloration du DPPH.....	23
Tableau III : Les IC ₅₀ de l'EDTA et de différents extraits de <i>V.difformis</i> testés lors de test de chélation de fer.....	26

LISTE DES ABBREVIATIONS

AAPH : 2,2%-azobis-(2-amidinopropanehydrochloride).

ATa : Alcaloïdes totaux acides.

ATb : Alcaloïdes totaux basiques.

ATFVD : Alcaloïdes totaux feuilles Vinca difformis.

ATRVD : Alcaloïdes totaux racines Vinca difformis

ADN: l'acide désoxyribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

CAT : catalase

CS : cellule souche

GPx : glutathion peroxydase

GR: globule rouge

DPPH: 2, 2-diphenyl picryl-1picrylhydrazyl

ERO: espèces réactive de l'oxygène

ERN: espèces réactives nitrogènes

GSH : glutathion réduit

GSSH : glutathion oxydé.

GST : glutathion -S-transférase.

GPx : glutathion peroxydase.

Hb : Hémoglobine.

HNO : 4-hydroxylnonenal.

LDL: low density lipoprotein.

LH: lipase hépatique.

SOD: superoxydes dismutase.

TBARS: thiobarbituric reactive substances.

OH[•]: radical Hydroxyle.

8-OH-dG: hydroxy-désoxyguanosine.

O₂: dioxygene.

CLHP: chromatographie liquids a haute performance.

Introduction

Pendant longtemps, les plantes médicinales ont été une source inépuisable de substances pour guérir certaines pathologies souvent mortelles. En raison de la richesse de ces plantes en biomolécules actives, elles sont très utilisées en médecine traditionnelle (**Hambaba et al, 2012**). Parmi ces substances actives, les alcaloïdes qui possèdent un large spectre de réduire le stress oxydant en particulier, ceux de la classe indoliques.

Ces composés possèdent des activités biologiques diverses, notamment l'activité antioxydante envers les radicaux libres, l'activité anti-inflammatoire, antidiabétique et anticancéreuse... (**Bidie et al, 2011**).

Le stress oxydant est considéré comme un réel problème de santé qui est très fréquent dans notre vie moderne. De nombreuses maladies, les plus répandues de l'ère contemporaine, tels que l'hypertension, le diabète, les maladies cardiovasculaires, les pathologies neuro-dégénératives, les cancers, ont été expliqués en partie comme l'une des conséquences du stress oxydatif (**Pisoschi et al, 2015**).

Les radicaux libres sont produits d'une façon discontinue à partir d'une dérégulation du métabolisme de l'oxygène au niveau de l'organisme, ils sont responsables des dommages au niveau cellulaire qui affectent des cibles moléculaires en particulier (**Gardés-Albert, 2003**).

L'organisme se protège en permanence contre la formation et les agressions des radicaux libres grâce à un système de défense cellulaire, complété par les apports alimentaire en substances antioxydantes tels que les vitamines, les caroténoïdes, les composés phénolique et les alcaloïdes (**Sharma et al, 2013**).

Dans le cadre du présent travail nous avons étudié les propriétés antioxydantes des alcaloïdes totaux de *Vinca difformis* et des molécules de référence sur le globule rouge humain. Notre démarche consistera à adopter deux approches complémentaires. D'une part, l'extraction des alcaloïdes totaux de la plante avec étude de leur pouvoir antioxydant à travers différents tests comme l'activité antiradicalaire au DPPH et l'activité chélatrice du fer ferreux. Et d'autre part, l'étude de l'effet de ces alcaloïdes et des molécules standards sur la résistance des érythrocytes au stress oxydatif induit par le radical AAPH.

Chapitre I
Revue bibliographique

I.1. Plantes médicinales

I.1.1. Généralités sur les plantes médicinales

En Afrique, plus de 90 % de son peuple ont recours à la médecine traditionnelle afin de les employer pour se soigner. Le continent dispose de multiples ressources naturelles peu ou pas exploitées. L'objectif recherché est la connaissance des rôles essentielles de ces ressources en vue de les valoriser, en conséquence donner une amélioration à la santé humaine et animale (**Moudachirou, 2015**).

Une plante médicinale est un végétal doué d'un effet thérapeutique sur l'organisme avec l'absence d'effet toxique à dose normale. Il importe avant tout, que l'utilisation thérapeutique des vertus des plantes afin d'entretenir notre santé, prévenir nos maux voir même les guérir.. Depuis l'antiquité, l'usage empirique du règne végétal ait permis la découverte de nouvelles propriétés pharmacologiques de toutes les plantes connues. Néanmoins, l'exploration de la flore du globe étant loin d'être complète, chaque jour de nouvelles découverte étant faite sur les propriétés de certaine plantes, l'étude des vertus médicinales des plantes connues ou inconnues nous réserve assurément de nouvelles surprises (**Debuigne et al, 2009**). Donc ça reste fragmentaire concernant notre connaissance des véritables vertus des plantes.

Fréquemment la limite entre plante médicinale et toxique s'avère flou. Se soigner, le végétal doit avoir un effet bienfaisant sur l'organisme, à une dose modérée. Cependant en cas d'abus, il devient très dangereux (**Debuigne et al, 2009**).

I.1.2. Substances naturelles issues de plantes à potentiel antioxydant

Les plantes médicinales sont considérées comme d'excellents producteurs d'une grande variété de substances naturelles très diversifiées, qui ont des intérêts multiples mise à profit dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire. Parmi ces composés, on trouve des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides et acides nucléiques), à coté des ces derniers, ils accumulent fréquemment des métabolites secondaires (**Jean et al, 2005**).

Les métabolites secondaires se trouvent dans toute les plantes supérieures, dont plus de 20.000 structures ont été identifiées (**Hatman, 2005**).

Les substances naturelles et les plantes en particulier représentent une immense source de chimiodiversité, avec souvent des structures très originales dont une synthèse totale et rentable (complexité structurale) est souvent difficile à réaliser.

Ces substances bioactives jouent un rôle très important dans la survie des plantes. Les métabolites secondaires sont impliqués dans des interactions écologiques entre la plante et son environnement. (Hatman, 2005)

I.1.2.1. Classification

On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes, parmi eux : les composés phénoliques, les caroténoïdes, les composés oragnosulfurés et les composés azotés dont les alcaloïdes font l'objet de notre étude (Liu, 2004).

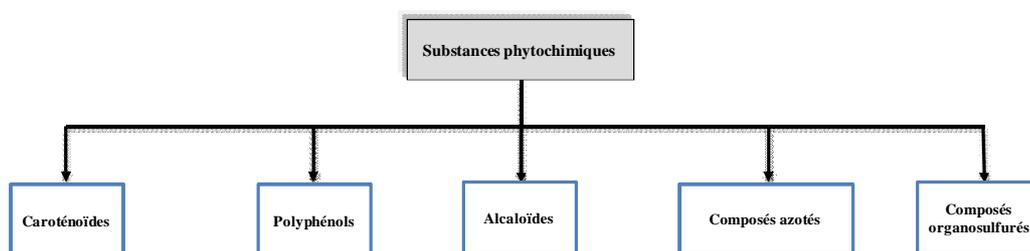


Figure (1) : Classification des substances phytochimiques (Liu, 2004).

➤ Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques et naturelles, fréquemment d'origine végétale basique, à structure chimique complexe. Ils contiennent un atome d'azote inclus dans un système hétérocyclique, ils sont doués d'une activité pharmacologique. Ils existent à l'état de sel et ils sont biosynthétiquement formés à partir d'un acide aminé.

Ces éléments caractérisent ce que l'on peut appeler les alcaloïdes vrais. Un nombre d'auteurs distinguent par ailleurs les proto-alcaloïdes et pseudo-alcaloïdes (Bruneton, 2009).

- Alcaloïdes indoliques

Les alcaloïdes indoliques possèdent une structure bicyclique, un cycle benzénique à six chaînes fusionnées avec un cycle pyrrole contenant de l'azote (figure 03), ils se caractérisent par la présence d'un noyau indole dans leur structure, dont le précurseur est un acide aminé: la tryptamine (Hamid et al, 2017).

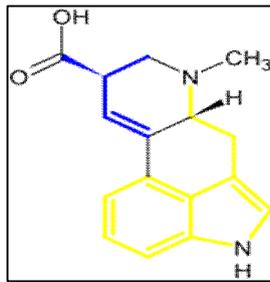


Figure 02 : Structure chimique des alcaloïdes indoliques (Anonyme 1).

I.2. Description botanique de la plante *V.difformis*

I.2.1. Classification

Classe	Equisetopsida
Ordre	Gentianales
Famille	Apocynacées
Genre	<i>Vinca</i>
Espèce	<i>Vinca difformis</i> Pourr.

I.2.2. Description

Vinca difformis est connue sous le nom «*Qadhab*», «*Ainaqiya*» (Baba-Aissa, 2000). Elle est appelée communément la pervenche, c'est une plante vivace à tiges prostrées sarmenteuse, longues de 30 à 50 cm. Les feuilles sont persistantes disposées de façon opposées de formes ovales courtement pétiolées, elles mesurent de 3 à 4 cm. Fleurs bleu claire, exceptionnellement blanches isolées à l'aisselle des feuilles (figure 04). La pervenche pousse dans les forêts et les broussailles humides. Elle est répandue dans la Méditerranée, son appellation commune est la pervenche (Quezèl et Santa, 1962).



Figure 03 : Photographies de *Vinca difformis*, a) vue générale, b) fleur et feuilles, c) fleur (anonyme2).

I.2.3. Propriétés et usages

Vinca difformis était utilisée autrefois dans le tannage des cuirs. Elle était utilisée dans le temps par la médecine traditionnelle sous forme d'un cataplasme, qui permette d'appliquer une pate épaisse sur la peau en l'associant à la farine de lin (graines broyées).

En médecine populaire, la pervenche a la réputation d'arrêter les hémorragies et utilisée comme hémostatique, hypoglycémiant, vaso-dilatateur, vulnéraire. Utile contre les ulcères de la bouche, les gingivites et les maux de gorge (en bains de bouche et en gargarismes) (Baba-Aissa, 2000).

Les cas d'intoxication par *V.difformis* ne sont pas encore signalés. Des études de la toxicité orale ont prouvé la non -toxicité de cette plante, l'extraction de la plante n'a pas montré aucun signe ou symptômes de la toxicité et de la mortalité (Mathew et al, 2015). Elle a plusieurs activités biologiques telles que l'activité anticancéreuse, antioxydante (Mathew et al, 2015), et antibactérienne (El-shouny et al, 2016).

I.2.4. Compositions chimiques

La pervenche possède comme principes actifs les tanins, les saponines, les flavonoïdes et une assez forte proportion d'alcaloïdes dont vincadiformine, vincamajine, vincine, vincamédine, akuammidine, vellosimine, vincadiffine (Baba-Aissa,2000).

I.3. Stress oxydant

La définition du stress oxydant se réfère à un déséquilibre de la balance entre la production des espèces réactives oxygénées (ERO) et les systèmes de défense antioxydants, en faveur des premières (**Pencemail et al, 2009**). Il est potentiellement impliqué dans le vieillissement et il accompagne également de nombreuses pathologies. Il est le résultat de l'accumulation des composés d'oxydation des biomolécules (lipides, protéines, acides nucléiques) au niveau plasmatique et cellulaire, ce qui permet d'évaluer ce stress oxydant par la vérification de ces composés (**Michel et al, 2008**).

I.3.1. Mécanismes de production des espèces réactives oxygénées

I.3.1.1. Généralités

L'oxygène (ou dioxygène O₂) est l'un des éléments essentiels pour l'assurance de la survie de la plupart des espèces et leur bien être. Il est nécessaire pour produire de l'énergie. Cependant, il peut s'avérer toxique en raison de sa conformation chimique (**DE Moffarts et al, 2005**). Il est susceptible de provoquer des dommages dans l'organisme via la production des ERO et des radicaux libres (RL) (**Haleng et al, 2005**).

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire (non apparié) (**Gardés et al, 2003**). Les RL sont des composés caractérisés par une structure électronique déséquilibrée qui leur confère une grande réactivité sur les constituants organiques et sur les structures cellulaires. Ils se forment de façon inévitable en parallèle au métabolisme énergétique et par une multitude d'autres voies. Ils favorisent habituellement le bon fonctionnement de l'organisme et la santé des mammifères, mais leur excès peut être néfaste (**Aurousseau, 2002**).

I.3.1.2. Mécanismes physiologiques de la production des ERO

En raison de leurs divers mécanismes physiologiques, les ERO sont utiles à des doses précises ; mais leur production peut être excessive et résulte des effets toxiques où l'organisme doit se protéger de ces excès par l'intermédiaire des différents systèmes antioxydants (**Favier, 2003**).

Trois voies de génération endogènes des ERO sont généralement décrites (**DE Moffarts et al, 2005**), à savoir :

- La chaîne de transfert des électrons située au niveau des mitochondries (cytochrome P450) (**Descamps et al, 2006**).

- La flambée respiratoire des cellules phagocytaires, ces dernières étant indispensables à la défense immunitaire (DE Moffarts et al, 2005), et les cellules non phagocytaires (Descamps et al, 2006).

- L'activité des enzymes de type oxydase telles que la NADPH-oxydase (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase) et la myéloperoxydase (MPO) (DE Moffarts et al, 2005) ainsi que la présence de métaux, en particulier le Fer (Fe^{2+}) (Barouki, 2006).

D'autres sources ou modes de génération exogènes des ERO existent de part des interactions avec leur milieu environnant. Par exemple, l'ingestion ou l'inhalation de toxiques, de produits oxydés ou oxydants, ou encore les radiations (figure 01)

(DE Moffarts et al, 2005).

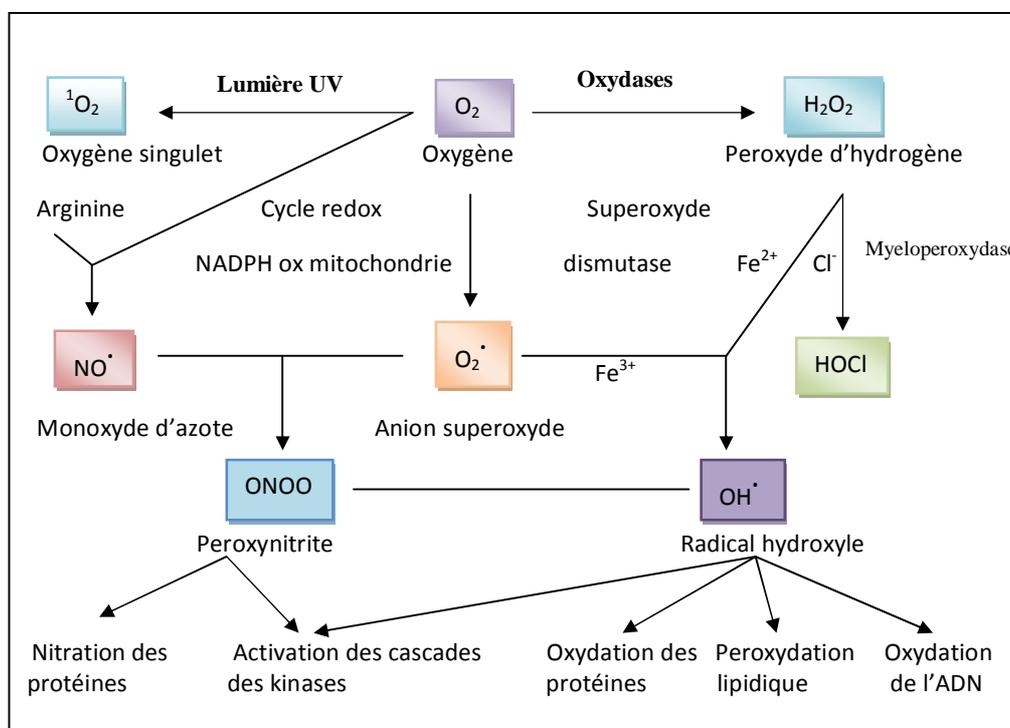


Figure 04 : Origines des différents radicaux libres et des ERO impliqués en biologie (Favier, 2003).

I.3.2. Cibles moléculaires des espèces réactives oxygénées

Les ERO réagissent exclusivement avec les composants cellulaires, ce qui permet leur oxydation, notamment les lipides en préférentiel, suivi par les protéines et l'ADN (**DE Moffarts et al, 2005**).

I.3.2.1. Lipides membranaires

L'oxydation des lipides polyinsaturés (LH), en présence d'oxygène, est un processus radicalaire de réactions en chaîne, connu sous le nom de peroxydation lipidique (**Michel et al, 2008**). L'hydrogène des carbones situés au niveau des doubles liaisons est arraché par le radical hydroxyle provoquant une formation d'un radical diène conjugué, oxydé après en radical péroxyle (**Favier, 2003**).

I.3.2.2. Protéines

Par l'intermédiaire des RL ou des métaux de transition, qui peuvent provoquer des modifications au niveau des protéines essentiellement des fragmentations, oxydation des chaînes latérales des acides aminés et la formation de liaisons croisées entre deux protéines (**Bonnefont-Rousselot et al, 2001**).

I.3.2.3. Lipoprotéines

L'oxydation de ces composés permet la formation de LDL (Low density lipoprotein) oxydées, qui seront après reconnues par des cellules immunitaires en particulier les macrophages possédant des récepteurs spécifiques. Leurs mécanismes d'action peuvent activer le système immunitaire et générer la sécrétion des cytokines (**Haleng et al, 2007**).

I.3.2.4. Acide désoxyribonucléique (ADN)

Il est reconnu comme une cible privilégiée pour les ERO (**Haleng et al, 2007**). L'attaque radicalaire de l'ADN provoque des dommages au niveau des bases azotés exclusivement la guanine qui est sensible aux ERO qui résulte des cassures et des mutations qui peuvent se réparées ou non (**Pencemail et al, 2009**). Ces lésions non réparées peuvent perturber la répllication de l'ADN ou bien résulte des erreurs de lecture et de synthèse par les ADN polymérasés et/ou l'incapacité du copier l'ADN qui provoque une apoptose et la mort de la cellule (**Favier, 2003**).

I.3.3. Statut oxydatifs et marqueurs biochimiques

I.3.3.1. Marqueurs de la peroxydation lipidique

Les acides gras polyinsaturés sont la cible favorisés 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. Cette réaction appelée peroxydation lipidique, elle forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué. Les hydroperoxydes peuvent subir plusieurs modes d'évolution : ils peuvent être réduits et neutralisés par la GPx ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes, acides et en alcanes (**Favier, 2003**).

Les produits terminaux libérés de la peroxydation lipidique sont stables, ils peuvent se mesurer dans le plasma ou les urines, tels que les malonyldialdéhyde (MDA), 4-hydroxynonanal (HNE) qui sont des aldéhydes toxiques pour les cellules (**Michel, 2008**).

I.3.3.2. Marqueurs de l'oxydation des protéines et des acides aminés

Les protéines sont susceptibles d'être oxydées par les ERO provoquant leur dénaturation en altérant leur structure primaire et secondaire.

Toute attaque radicalaire des protéines provoque des conséquences oxydatifs qui se manifestent par l'oxydation du squelette carboné de la chaîne polypeptidique conduisant à l'éclatement des protéines et/ou à la constitution de liaisons croisées intra- ou inter-chaînes ainsi que la formation de groupement hydroperoxydes, même on peut observer des modifications de quelques acides aminés notamment la cystéine et la méthionine, avec la formation des ponts disulfures (**Stadtman, 1993 et Grune et al, 1998**).

I.3.3.3. Marqueurs de l'oxydation des acides nucléiques

Les dommages oxydatifs continus de l'ADN peuvent conduire à des altérations dans les cascades de signalisation ou l'expression des gènes, induire ou stopper la transcription, et causer des erreurs de réplication et l'instabilité génomique (**Sachin et al, 2013**).

Parmi les nombreux métabolites identifiés à partir de l'oxydation de l'ADN, la 8-hydroxy-désoxyguanosine(8-OH-dG) que l'on peut doser par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) avec détection électrochimique à partir de biopsies, de lymphocytes isolés du sang ou encore de l'urine (**Baudin,2006**).

I.3.4. Elimination des radicaux libres

I.3.4.1. Les antioxydants

L'exposition aux radicaux libres provenant de diverses sources conduit l'organisme à développer une série de mécanismes de défenses très efficaces contre la surproduction des ERO et des espèces réactives nitrogènes (ERN) (Cadenas, 1997).

Le terme d'antioxydant désigne toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxygène, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (Pisoschi et al, 2015).

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défense très efficaces contre la surproduction des ERO. Ces systèmes peuvent être exogènes ou endogènes.

a) Les antioxydants endogènes

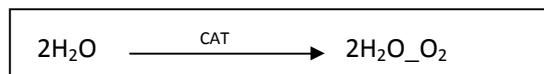
La production physiologique des ERO est contrôlée au sein des cellules par deux types de mécanismes de protection ; les systèmes de défenses enzymatiques et non enzymatiques (Salim, 2016).

➤ Antioxydants enzymatiques

Les principaux enzymes antioxydants impliqués dans la neutralisation des ERO dans les cellules sont : les superoxydes dismutase (SOD), les catalases (CAT) et les glutathions peroxydase (GPx) (Matés et al, 1999).

Ces enzymes permettent l'élimination de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène en catalysant les réactions suivantes :

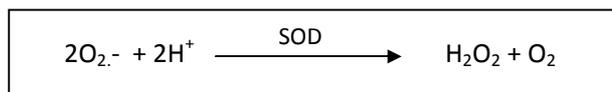
La catalase catalyse la décomposition de H_2O_2 en H_2O et O_2 selon la réaction suivante :



La glutathion peroxydase catalyse la réduction d'une variété d'hydroperoxydases (ROOH et H_2O_2) en utilisant GSH (Matés, 2000).



La SOD transforme l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène qui est éliminé par la GPx ou la CAT (Valéry et al, 2007) selon la réaction suivante :



➤ Antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants endogènes sont produits par le métabolisme dans le corps, comme l'acide lipoïdique, glutathion, L-arginine, coenzyme Q10, mélatonine, l'acide urique, la bilirubine, les protéines chélatrices des métaux, la transferrine, ...etc. (Pham-huy et al, 2008)

b) Les antioxydants exogènes

En plus de substances propres à l'organisme, l'alimentation et les plantes sont également des sources importantes des antioxydants, les plus courants sont :

➤ Les vitamines

La vitamine E ou α -tocophérol est un antioxydant liposoluble, se localise essentiellement entre les chaînes d'acides gras des phospholipides. Elle a un rôle essentiel de capter les radicaux peroxydes lipidiques RO_2 qui propagent les chaînes de peroxydation. La partie active de la molécule étant la fonction phénol réductrice. Celle-ci perd facilement un atome d'hydrogène et se transforme en radical α -tocophéryle, tandis que le radical RO_2 est réduit en une molécule d'hydroperoxyde. De plus, l' α -tocophérol capte les radicaux superoxydes (sous leur forme protonée HO_2), les radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$, tout comme $\text{O}_2\cdot$ (Gardès et al, 2003).

La vitamine C ou l'acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble avant tout, elle constitue un excellent piègeur des ERO ($\text{HO}\cdot$ ou $\text{O}_2\cdot$), aussi elle désactive l'oxygène singulet et elle protège les phospholipides membranaires contre peroxydant, elle est aussi un donneur d'hydrogène aux radicaux lipidiques et tocophéroxydes pour régénérer la vitamine E (Pisoschi et al, 2015).

➤ Caroténoïde

La beta-carotène est un élément liposoluble, antioxydant puissant (Pham-huy et al, 2008), plusieurs auteurs ont démontré que les caroténoïdes inhibent la formation d'oxygène singulet (Andreea et al, 2011).

➤ Polyphénols

Les polyphénols sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal qui ont une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires Ils sont également utilisés comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Petricevich et al, 2014).

I.4. Modèles d'études du stress oxydant

La théorie des RL est soutenue par des arguments expérimentaux dont la plupart sont corrélatifs même si des expériences récentes présentent des preuves plus directes (Barouki, 2006). Il n'existe pas de modèle unique parfait mais chacun a son utilité (Galas et al, 2012).

I.4.1. Modèle animal

Dans l'étude du vieillissement, la souris présente un modèle qui apporte un plus comme tout les rongeurs qui constituent également un modèle de choix afin d'évaluer le comportement des cellules souches du cerveau (Galas et al, 2012). De même que la production des RL a été prouvée dans le plasma de rats exposés au tétrachlorure de carbone (CCl₄). De plus, cette étude a été démontrée dans le phénomène d'ischémie-reperfusion chez les lapins et les chiens (Defraigne et al, 2008).

I.4.2. Organes isolés

Les organes, en raison de leur rôle important dans le métabolisme et l'élimination des toxiques approvisionnés avec le sang, sont appelés organes cibles tels que le foie et les reins (Rezzagui, 2012).

En général, les chercheurs ont considéré les organes de la plupart des mammifères sont actifs métaboliquement, cependant cette biotransformation est mal équipée ce qui implique à un déficit de l'ATP mitochondrial et donc l'induction du stress oxydant (Storey, 1996) ; des études ont été mené par Defraigne et ces collaborateurs (2008) ont démontré la production des RL au niveau de rein de lapin et du cœur de chien (Defraigne et al, 2008).

I.4.3. Stress oxydant *in vitro*

Lors de la découverte de la SOD, des scientifiques ont montré *in vitro* la toxicité des RL présentant des dommages au sein des cellules via le déclenchement des cassures et des mutations au niveau de l'ADN (Defraigne et al, 2008), l'inactivation de diverses enzymes telles que GPx et SOD (Pencemail et al, 2009), la modification des structures protéiques, l'oxydation des sucres et l'induction de peroxydation lipidique. Dans le but d'évaluer les dommages cellulaires des ERO, au milieu des années 70, le test TBARS (thiobarbituric reactive substances) a été développé, il sert essentiellement à étudier l'interaction des ERO avec les lipides (peroxydation lipidique) (Defraigne et al, 2008). De plus, des scavengers de RL ou des antioxydants synthétiques sont utilisés afin de déterminer les ERO (Sharma et al, 2013), tels que le radical libre stable DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle) qui possède une activité scavenger *in vitro* (Brighente, 2007). Parmi les antioxydants commerciaux les plus populaires sont : BHT (l'hydrogryptoluène butylé), BHA (l'hydroxyanisole butylé), TBHQ (l'hydroquinone tert-butylique), les gallates, les tocophérols et le secondaire des antioxydants tels que l'acide ascorbique, l'acide citrique et l'EDTA (ethylenediamine tetra acetic acid). En raison de la bivalente de la transition métallique des ions, le Fer en particulier, peut catalyser l'effet oxydatif en formant un radical libre hydroxyle (OH[•]) (Brewer, 2011).

I.4.4. Modèle cellulaire

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau des ERO (Favier, 2003).

Les ERO sont produites par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les monocytes-macrophages et les neutrophiles conduisant à l'oxydation lipidique notamment les LDL résulte de plusieurs pathologies notant les maladies

neurodégénératives (Alzheimer et Parkinson), les maladies cardiovasculaires, le diabète et les cancers (**Gardés et al, 2003**).

La formation des ERO par l'auto-oxydation de l'hémoglobine (Hb) résulte un stress oxydant continu ce qui fait les érythrocytes un bon modèle cellulaire.

A des conditions du stress élevé, le taux du méthémoglobine (MetHb) augmente ce qui implique une oxydation continue de l'Hb provoquant une dénaturation de cette protéine (formation des corps de Heinz), cela est excité par les cellules réticulo-endothélial des macrophages, mais une oxydation plus importante peut entraîner l'hémolyse des cellules si elle n'est pas contrôlée.

Outre l'Hb, les ERO peuvent affecter d'autres protéines d'une manière critique dans les globules rouges (GR), car elles sont des cibles faciles pour les ERO, tels que les protéines composantes de la membrane des GR (**Pandey et al, 2011**).

Chapitre II
Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal

La pervenche a été récoltée en mois de Mars dans la région de Souk El Ténine dans la wilaya de Bejaïa (Nord Est de l'Algérie). Les feuilles et les racines ont été séchées à 40°C à durant quatre jours (4 jours), puis finement broyées à l'aide d'un moulin à café pour obtenir une poudre fine pour qu'elle soit prête à l'utilisation.

II.2. Réactifs chimiques et instruments

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits : le méthanol, l'éthanol, la quercétine (3,3',4',5,7-pentahydroxy flavone), le chloroforme (CHCl₃), l'acide chlorhydrique (HCl), l'ammoniaque (NH₄O₄), chlorure du sodium (NaCl), le chlorure ferreux (FeCl₂), la ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid), AAPH (2,2%-azobis-(2-amidinopropanehydrochloride)), DPPH et EDTA.

Parmi l'appareillage utilisé : soxhlet, bain marie, étuve universel de 5 à 220 °C spectrophotomètres UV-visible, agitateur magnétique, vortex (VELP), centrifugeuse réfrigérée, balance analytique, pH-mètre, microscope optique et évaporateur rotatif ou bien rotavapor.

II.3. Méthodes

II.3.1. Préparation de l'extrait végétal

II.3.1.1. Extraction des alcaloïdes totaux

Pour extraire les alcaloïdes totaux de différentes parties de *V.difformis*, on a opté pour le protocole décrit par Andrade et ses collaborateurs (2005), en y apportant quelques modifications :

- Les parties feuilles et racines de *V. difformis* ont été extraites avec un appareil de soxhlet en utilisant comme solvant l'éthanol (figure 05);
- L'extrait éthanolique séché à l'aide d'un rotavapor (figure 06) pour éliminer le solvant, il a été mis en suspension dans l'HCl à 5% puis la phase aqueuse est extraite trois fois avec du chloroforme (alcaloïdes totaux de la phase acide), ensuite le pH de

la phase aqueuse acide a été ajusté à 9 avec l'ajout de l'ammoniaque puis extraite trois fois avec du chloroforme (alcaloïdes totaux de la phase basique). Le protocole d'extraction est résumé dans la figure 07.



Figure (05) : Extraction des deux parties (feuilles et racines) de *V.difformis* par soxhlet.

Le rendement de l'extraction est calculé par la formule (1):

$$R (\%) = 100 \times M_{\text{ext}} / M_{\text{ech}} \quad (1)$$

R (%) : le rendement en pourcentage (%) ;

M_{ext} : la masse de l'extrait après évaporation du solvant en (g) ;

M_{ech} : la masse de l'échantillon de la poudre du végétale en (g).

II.3.2. Activité scavenger du radical DPPH

C'est une méthode colorimétrique basée sur la capacité des substances antioxydantes à donner un électron au radical synthétique DPPH. Cette réduction se traduit par le changement de la couleur violette de la solution méthanolique du DPPH vers une couleur jaunâtre (Shirwaiker et al, 2006).

Ce passage, de la première forme à la seconde, est accompagné d'une diminution de l'absorbance qui peut être exprimée en pourcentage de réduction du DPPH.

$$\% \text{ Scavenger du DPPH} = (A_C - A_E) / A_C \times 100 \quad (2)$$

A_C : absorbance du contrôle négatif

A_E : absorbance de l'échantillon

➤ Mode opératoire

L'effet scavenger du radical DPPH par les alcaloïdes totaux de l'extrait des feuilles et des racines de *V.difformis* a été déterminé selon la méthode de Niki, 2010. Brièvement,

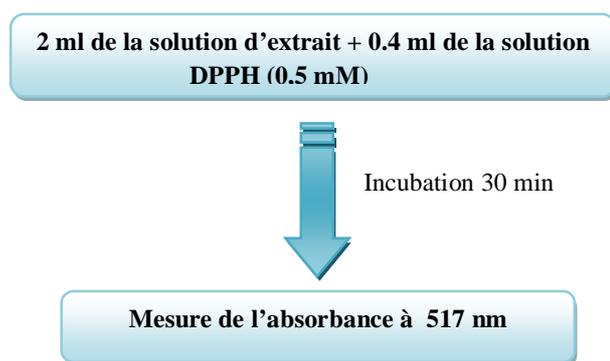


Figure (06) : Protocole d'effet scavenger du radical DPPH.

La mesure des absorbances a été effectuée à 517 nm en utilisant l'appareil spectrophotomètre UV-visible (figure 08). Le pourcentage scavenger du radical DPPH est déterminé selon l'équation (2). Les valeurs d'IC₅₀ sont calculées à partir des courbes à régression linéaire.

L'IC₅₀ est la concentration d'extrait de la plante ou de la quercétine responsable de 50 % d'inhibition des radicaux DPPH. Elle est déterminée sur le graphique représentant le pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des différents extraits et de la quercétine (Bidie et al, 2011).

Une gamme de concentration (0, 100, 125, 150, 175 et 200 µg/ml) est utilisée pour déterminer l'effet de l'extrait acide des feuilles de la plante et une autre gamme (0, 20, 40, 60, 80 et 100 µg/ml) est utilisée pour déterminer l'effet de l'extrait basique des feuilles ainsi que les extraits acides et basiques des racines de *V.difformis*.

Nous avons utilisé la quercétine comme un antioxydant de référence à une concentration de 100 µg/ml.

II.3.3. Chélation du fer ferreux

La chélation du fer est basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe (II)-ferrozine.

L'évaluation de la chélation du fer se fait par l'utilisation de la ferrozine qui forme un complexe avec le fer résiduel dans le milieu réactionnel à une absorbance à 562 nm.

Nous avons utilisé l'EDTA comme un composé de références dans notre étude à une concentration de 20 µg/ml.

➤ Mode opératoire

Un volume de 0.04 ml de FeCl₂ (2 mM) est ajouté à un volume de 0.9 ml de la solution d'extrait et de 0.5 ml d'eau distillée bien agiter le mélange, puis un volume de 0.06 ml de ferrozine (5 mM) est ajouté au mélange. Le tout est incubé pendant 10 minutes à température ambiante. La lecture des absorbances est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible à 562 nm. Le pourcentage de chélation du fer est déterminé selon la formule (3).

$$\% \text{ de Chélation du fer} = (A_T - A_E) / A_T \times 100 \quad (3)$$

A_T : absorbance du témoin ;

A_E : absorbance de l'échantillon.

II.3.4. Effet cytoprotecteur des extraits de *V.difformis*

II.3.4.1. Préparation de la solution érythrocytaire

Dans ce test, on a utilisé les globules rouges (GR) de l'être humain comme modèle cellulaire. Le sang est collecté chez des sujets sains dans des tubes EDTA. Il est centrifugé à 4000 rpm pendant 10 min à 4 °C puis lavé trois fois avec une solution isotonique.

Les plaquettes, les leucocytes et le plasma sont soigneusement éliminés par pipetage. La suspension érythrocytaire est préparée avec un hématocrite égal à 20 %.

II.3.4.2. Mesure de l'effet anti-hémolytique de l'extrait alcaloïdique de *V.difformis*

Dans cette partie du travail, on a opté pour l'utilisation des GR humaines comme modèle cellulaire et le radical AAPH pour étudier l'effet protecteur des extraits alcaloïdiques de *V.difformis* (extrait alcaloïdique acide et basique) et des antioxydants de référence sur la stabilisation de la membrane cytoplasmique. L'intégrité membranaire a été mesurée par dosage de l'Hb libérée (concentration de l'Hb extracellulaire), mesure de la concentration cellulaire à travers de la détermination de la turbidité et la protection intracytoplasmique par le dosage de l'Hb intracellulaire (concentration de l'Hb intracellulaire).

➤ Détermination de l'hémolyse érythrocytaire

L'activité cytoprotectrice des extraits alcaloïdiques de *V.difformis* a été déterminée par la mesure de l'inhibition de l'hémolyse des érythrocytes en utilisant le protocole décrit par Zheng et ces collaborateurs (2016) avec quelques modifications.

Une gamme de concentration (100 et 200 µg/ml) est utilisée pour déterminer l'effet de l'extrait alcaloïdique acide des feuilles, (25, 50, 100 et 150 µg/ml) de l'extrait basique, (25, 50, 100, 150 et 200 µg/ml) de l'extrait alcaloïdique basique des racines et à une seule concentration (200 µg/ml) pour déterminer l'effet de l'extrait acide des racines de *V.difformis*.

Brièvement, un volume de la suspension érythrocytaire est mélangé avec 200 µl de l'échantillon ou bien de la solution isotonique. Le mélange est incubé à 37 °C pendant 30 min, puis un volume de la solution AAPH est ajouté. Le mélange est incubé pendant 2 heures (h). Après incubation, un volume du mélange est prélevé puis dilué avec de la solution isotonique ou de l'eau distillée pour le témoin positif.

La quercétine est utilisé comme un composé de référence à 100 µg/ml.

L'absorbance est mesurée à 620 nm, puis les absorbances des surnageant ont été mesurée à 412 et 540 nm. Le pourcentage d'hémolyse est déterminé selon l'équation (4).

$$\% \text{ d'hémolyse} = (A_E/A_{TP}) \times 100 \quad (4)$$

A_E : absorbance de l'échantillon ;

A_{TP} : absorbance du témoin positif.

➤ Observation au microscope optique

Dans ce travail, on a réalisé des observations microscopiques d'une lame de frottis du sang traité ou non traité, par les différents extraits alcaloïdiques des deux parties de *V.difformis*. L'observation a été effectuée avec différents grossissement puis la prise des photos est effectuée avec le grossissement ($\times 100$).

II.3.5. Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectués avec le logiciel GraphPad Prism 5, les résultats sont présentés comme moyenne \pm déviation standard (SD) et sont évalués avec ANOVA à une seule variable, avec le test Bonferroni post-hoc. Le seuil de signification est fixé à $p < 0,05$.

Chapitre III
Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Taux d'extraction des alcaloïdes de *V.difformis*

Le rendement d'extraction des alcaloïdes totaux de *V.difformis* a été déterminé par rapport au poids de la plante. Les résultats montrent que le taux des alcaloïdes est très significatif ; le rendement le plus élevé a été obtenu avec l'extrait acide des feuilles et des racines de la plante avec un taux de 15,15 % et 11,45 %, respectivement. En ce qui concerne l'extrait basique des deux parties, les taux des alcaloïdes totaux obtenus sont faibles : 3,2 % et 2,15 %, respectivement (tableau I).

Ces résultats ne concordent pas avec ceux obtenus par Mathew et al, 2015 sur les parties aériennes de la plante qui a été récoltée dans la région de Cagliari en Italie dont le pourcentage des alcaloïdes totaux est révélé de 8%. En comparant nos résultats avec ceux obtenus par Mathew, nous pouvons déduire que notre plante est très riche en alcaloïdes indoliques. Cette différence de rendement d'extraction peut être expliquée par la méthode d'extraction ou bien le lieu et la période de récolte de la plante.

Tableau I : Les rendements des extraits obtenus pour les deux parties (feuilles et racines) de la plante *V.difformis*.

Extraits	Extraits acides		Extraits basiques	
	Feuilles	Racines	Feuilles	Racines
Poids (g)	3,03	2.29	0,43	0,64
Rendements (%)	15,15	11,45	2,15	3,2
Aspect physique et couleur	Cristallisés vert		Cristallisés marron	

III.2. Effet scavenger du radical DPPH

L'activité antioxydante d'une substance est définie par sa capacité de piéger un radical libre en le réduisant ou en le dismutant pour former un complexe stable (**Favier, 2003**).

Notre étude a permis de montrer que les extraits alcaloïdiques des feuilles et des racines de *V.difformis* possèdent un effet scavenger contre le radical DPPH, cette étude a été réalisée en comparant avec d'autres antioxydants standards tels que la quercétine.

L'effet scavenger du radical DPPH s'accompagne par son passage de sa couleur violette caractéristique de la solution du DPPH en une couleur jaune mesurable par spectrophotométrie à 517nm. La diminution de son absorbance, induite par un antioxydant (AH) après 30 min, comme suit (**Brighente et al, 2007**).



Avec : AH est l'antioxydant

A partir des valeurs obtenues, nous avons calculé le pourcentage d'inhibition en utilisant la formule donnée dans la partie matériel et méthodes. Ces valeurs ont permis d'obtenir les graphes représentés dans les figures (10, 11, 12 et 13) et d'exprimer l'activité anti-radicalaire en IC_{50} . La valeur basse de l' IC_{50} correspond à une forte activité antioxydante.

Les résultats ont montré, à part l'extrait acide des alcaloïdes totaux des feuilles de *V.difformis* qui représente une valeur élevée d' IC_{50} (116,98 $\mu\text{g/ml}$), que les extraits acide et basique des racines et l'extrait basique des feuilles exercent une activité antioxydante modérée en comparant leurs valeurs d' IC_{50} ($\text{IC}_{50} \leq 28 \mu\text{g/ml}$). On déduit que la partie racine possède un effet scavenger plus fort que la partie aérienne contre le radical DPPH. Cependant, les deux parties possèdent un pourcentage scavenger du radical DPPH inférieur à celui de la quercétine qui est l'antioxydant de référence ($\text{IC}_{50} = 2,27 \mu\text{g/ml}$) (Tableau II).

Des études antérieures ont été effectuées sur une autre plante appartenant à la famille des apocynacées, *Vinca rosea*, ont démontré qu'à des concentrations élevées d'extrait de feuilles et racines ($> 400 \mu\text{g/ml}$), les deux parties de cette plante exerce un potentiel effet scavenger contre le radical DPPH avec un pourcentage de 80% (**Jayakumar et al, 2010**). D'après les résultats obtenus par Jayakumar et ces collaborateurs on peut suggérer que notre plante qui est douée d'un potentiel effet antioxydant à des concentrations minimales est peut être dû à sa composition en alcaloïdes type indoliques en comparant avec d'autre plante de la même famille (*V. rosea*).

D'autres études ont été rapportées par Thiong et ses collaborateurs (2003), ils ont démontré la capacité des fractions alcaloïdiques (les alcaloïdes indoliques) des feuilles de *V.rosea* de piéger le radical DPPH à des concentrations dans l'ordre de micromolaire. Ces résultats sur d'autres plantes du genre *Vinca* nous laisse suggérer que le potentiel effet scavenger du radical DPPH des extraits alcaloïdiques de *V. difformis* est dû à la richesse de cette plante en composés phytochimiques notamment les alcaloïdes de type indoliques. Les résultats ont été statistiquement significatifs (P value $<0,001$).

Tableau II: Les IC₅₀ (µg/ml) de la quercétine et les différents extraits de *V. difformis* testés sur la décoloration du DPPH

Composés	Standard	Extraits des feuilles		Extraits des racines	
	Quercétine	ATa	ATb	ATa	ATb
IC ₅₀ (µg/ml)	2,27	116,98	18,72	28,45	24,86

Les résultats de l'effet scavenger du radical DPPH par l'extrait alcaloïdique acide de feuilles de *V. difformis* montrent qu'à différentes concentrations l'extrait de la plante exerce un très bon effet contre le radical DPPH avec une valeur maximale à 200 µg/ml (87,19%) (figure 07).

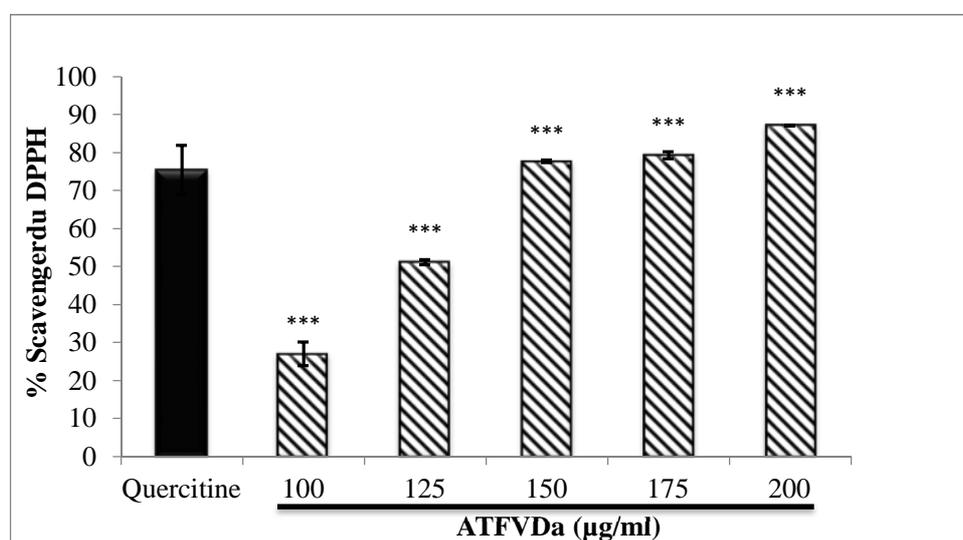


Figure (07) : Pourcentage scavenger du radical libre DPPH de l'extrait alcaloïdique acide des feuilles *V.difformis*. ATFVDa : extrait acide d'alcoïdes totaux de feuilles de *V.difformis*. Les résultats sont exprimés en moyenne ± S.E.M de trois différentes expérimentations (n = 3). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparé avec le contrôle positif (quercétine).

L'extrait alcaloïdique basique de feuilles (ATFVDb) montre une bonne activité scavenger (73,58 %) à une concentration maximale de 100 µg/ml (figure 08).

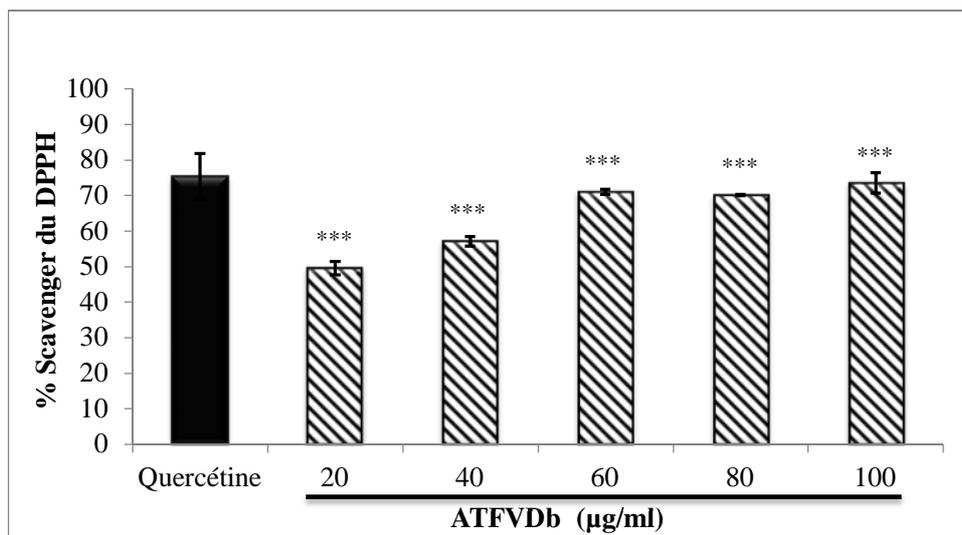


Figure (08) : L'activité scavenger du radical libre DPPH (%) de l'extrait ATFVDb. ATFVDb : extrait basique d'alcaloïdes de feuilles de *V. difformis*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M de trois différentes expérimentations (n = 3). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparé avec le contrôle positif (quercétine).

L'effet scavenger des extraits alcaloïdiques de la racine de la plante a été aussi déterminé. Les résultats montrent que l'extrait alcaloïdique acide de racines exerce une très bonne activité scavenger du radical DPPH à 100 µg/ml (83,07 %) (figure09).

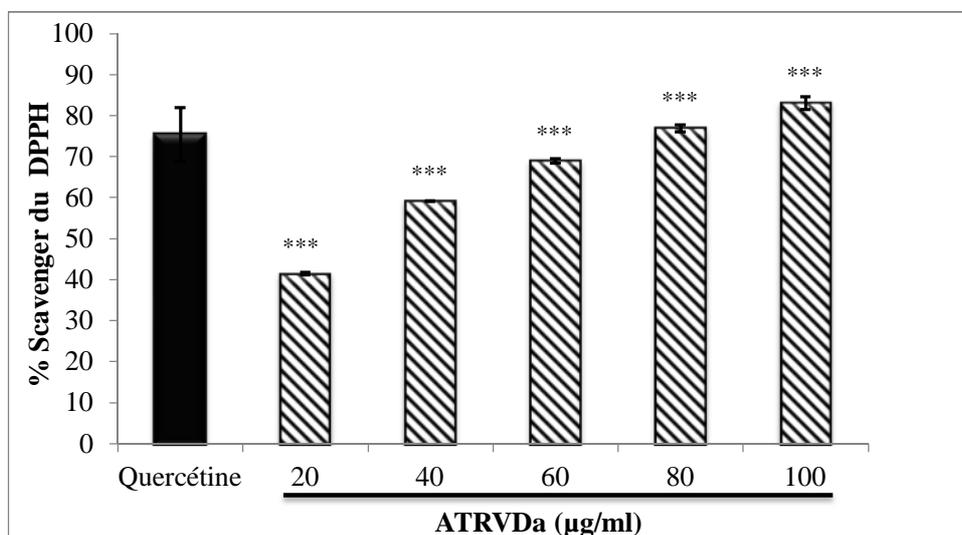


Figure (09) : Pourcentage scavenger du radical libre DPPH de l'extrait ATRVDa. ATRVDa : extrait acide d'alcaloïdes totaux de racines de *V.difformis*.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M de trois différentes expérimentations (n = 3). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparé avec le contrôle positif (quercétine).

Les résultats de l'effet scavenger par l'extrait basique de racines de *V. difformis* montrent qu'à différentes concentrations, il exerce un très bon effet scavenger (92,54 %) à une concentration maximale de 100 $\mu\text{g/ml}$ (figure 10).

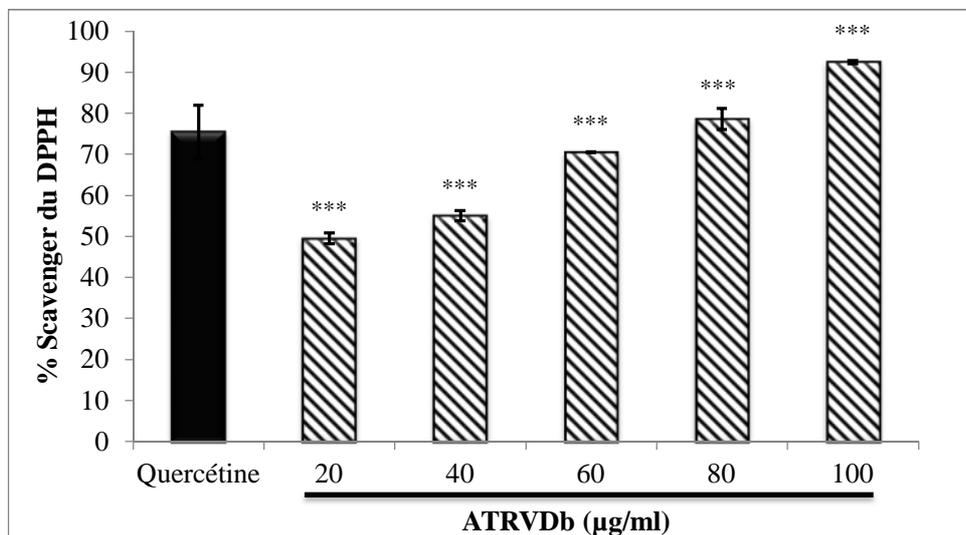


Figure (10) : L'activité scavenger du radical libre DPPH (%) de l'extrait ATRVDb. ATRVDb : extrait basique d'alcaloïdes totaux de racines de *V.difformis*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M de trois différentes expérimentations (n = 3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparé avec le contrôle positif (quercétine).

III.3.Chélation du fer

Dans nos expériences, tous les extraits alcaloïdiques testés expriment un effet chélateur variable.

Les résultats montrent que les alcaloïdes totaux acide des feuilles et des racines exercent un effet chélateur très faible et stable sur une gamme de concentration (figure 13,14,15 et 16) avec un IC_{50} de 149,56 pour l'extrait acide des feuilles ,par conséquent l'extrait acide des racines n'exerce pas d'effet chélateur sur le fer. Quant aux extraits basique des feuilles et des racines de *V.difformis* ont donné une activité chélatrice vis-à-vis du fer ferreux (Fe^{+2}) avec une manière dose dépendante, les IC_{50} de l'extrait basique des feuilles et des racines sont respectivement de 195,62 $\mu\text{g/ml}$ et 116,63 $\mu\text{g/ml}$ en comparaison avec la molécule de référence chélatrice de métaux, EDTA.

Une étude sur les racines *Vinca herbacea* et *Kit* a été faite par Gulçin et ses collaborateurs (2012), ils ont été démontré que cette plante exerce un potentiel effet chélateur du fer avec des IC_{50} allant de 10 à 14 $\mu\text{g/ml}$ cela veut dire que *V.difformis* exhibe une activité chélatrice bien inférieur à celle de cette plante.

Tableau III : Les IC_{50} de l'EDTA et de différents extraits de *V. difformis* testés lors de test de chélation de fer.

Composé	Standard	Extrait feuille		Extrait Racine
	EDTA	ATa	ATb	ATb
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	64,12	149,56	195,62	116,63

Les résultats de l'effet chélateur par l'extrait alcaloïdique acide des feuilles (ATFVDA) montrent qu'à différentes concentrations, cet extrait exerce un effet inférieur à celui enregistré par l'EDTA avec une valeur maximale de 54,57 % à 150 $\mu\text{g/ml}$ (figure 11).

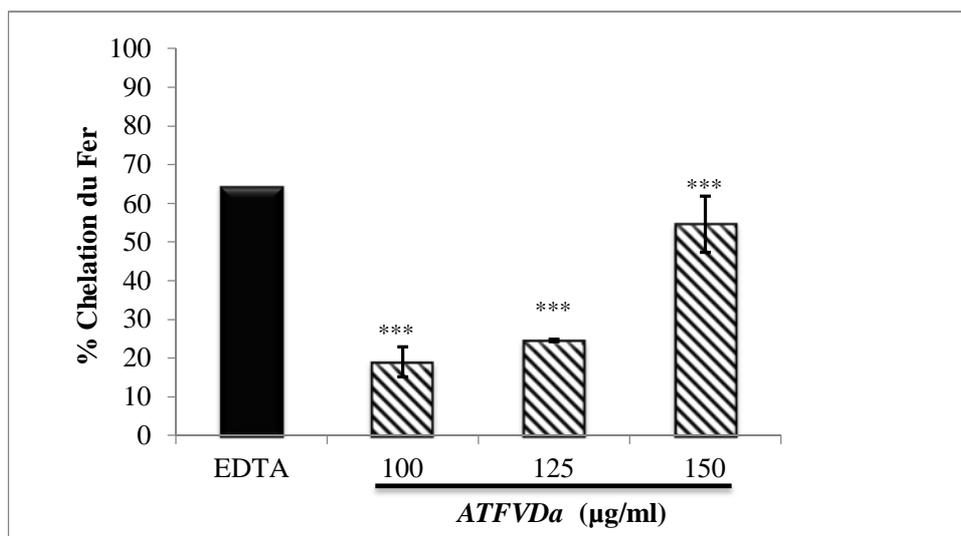


Figure (11): Activité chélatrice (%) de l'extrait ATFVDA. ATFVDA : extrait acide d'alcaloïdes totaux de feuilles de *V.difformis*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M de trois différentes expérimentations ($n = 3$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparé avec le contrôle positif (EDTA).

D'autre part, les résultats de l'effet chélateur par l'extrait alcaloïdique basique des feuilles (ATFVDb) montrent qu'à différentes concentrations, cet extrait exerce un potentiel effet chélateur du fer avec une manière dose dépendante et qui atteint un maximal effet à 250 µg/ml en comparaison avec l'EDTA (figure 12).

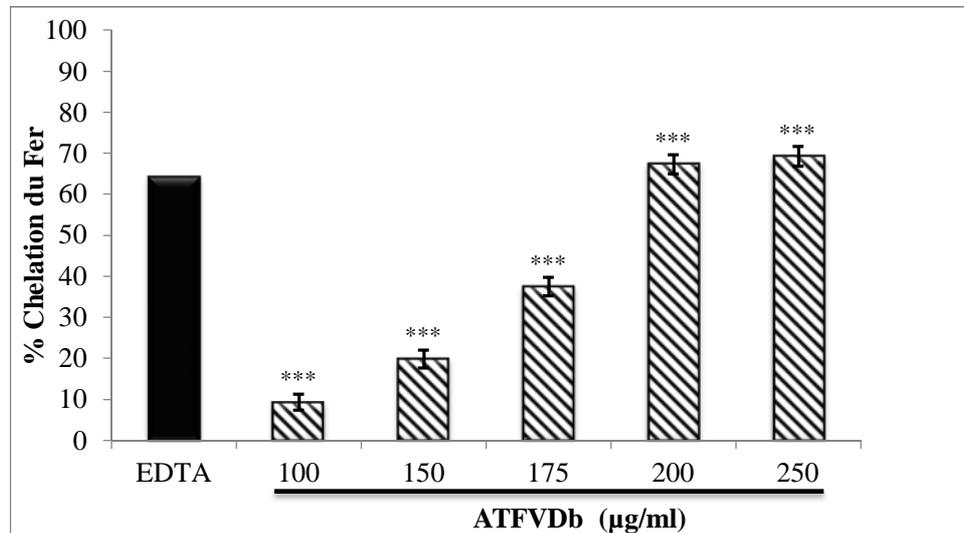


Figure (12): L'activité chélatrice (%) de l'extrait ATFVDb. ATFVDb : extrait basique d'alcaloïdes totaux de feuilles de *V.difformis*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M de trois différentes expérimentations (n = 3). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparé avec le contrôle positif (EDTA).

Les résultats de l'effet chélateur obtenus avec l'extrait alcaloïdique acide des racines (ATRVDa) montrent qu'à différentes concentrations, cet extrait exerce un faible effet sur l'inhibition de la formation du complexe « Ferrozine-fer » qui est largement inférieur à celui exercé par l'EDTA (figure 13).

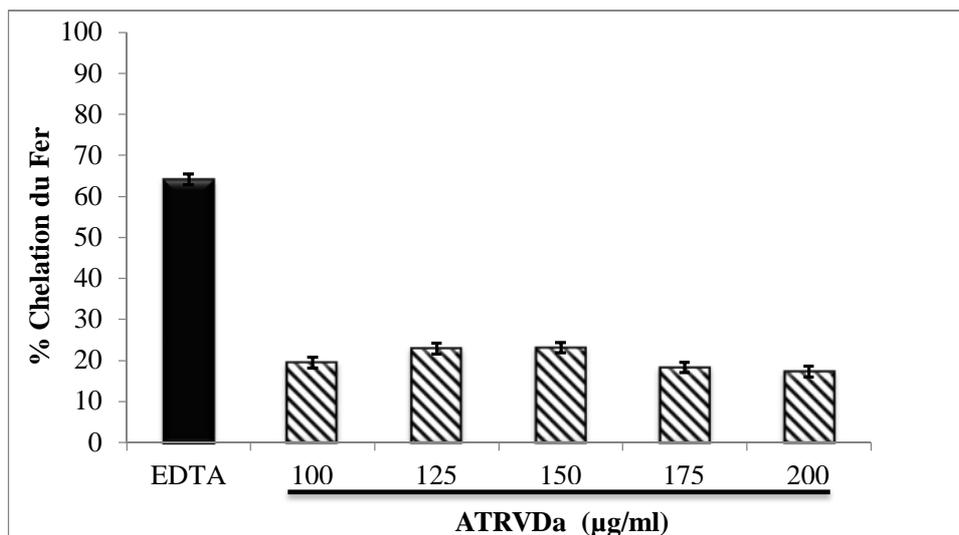


Figure (13): Activité chélatrice de l'extrait ATRVDa. ATRVDa : extrait acide d'alcaloïdes totaux de racines de *V.difformis*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M de trois différentes expérimentations (n = 3). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparé avec le contrôle positif (EDTA).

Les résultats de l'effet chélateur exercé par l'extrait alcaloïdique basique des racines (ATRVDb) montrent qu'à différentes concentrations, cet extrait exerce un très bon effet chélateur du fer avec une valeur maximale de 89,85 % à une concentration d'extrait de 175 $\mu\text{g/ml}$ (figure 14).

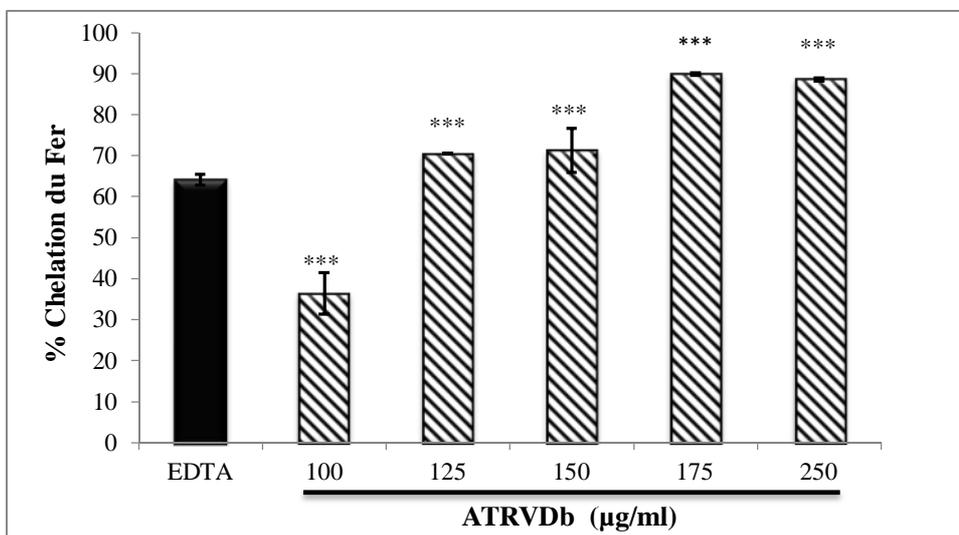


Figure (14): Activité chélatrice de l'extrait ATRVDb. ATRVDb : extrait basique d'alcaloïdes totaux de racines de *V.difformis*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M de trois

différentes expérimentations (n = 3). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparé avec le contrôle positif (EDTA).

III.4. Activité cytoprotectrice des extraits alcaloïdiques de *V. difformis*

Dans cette partie du travail, nous avons opté pour l'utilisation de globule rouge comme modèle cellulaire et le radical AAPH pour étudier l'effet protecteur des extraits alcaloïdiques de *V. difformis* et des antioxydants de référence sur la stabilisation de la membrane cytoplasmique. L'intégrité membranaire a été mesurée par dosage de l'hémoglobine libérée (concentration de l'hémoglobine extracellulaire), mesure de la concentration cellulaire à travers la mesure de la turbidité et la protection intracytoplasmique par le dosage de l'hémoglobine intracellulaire (concentration de l'hémoglobine intracellulaire).

Les résultats montrent que les différents extraits de *V. difformis* ont un effet protecteur de globules rouges très significatif en comparant avec les résultats obtenus avec la molécule de référence la quercétine. L'extrait alcaloïdique acide de feuilles de *V. difformis* (200 $\mu\text{g/ml}$) exerce un faible effet sur l'inhibition de l'hémolyse provoquée par le radical AAPH, cet effet est inférieure à celui enregistré par la molécule de référence (figure 15). Les valeurs de concentration cellulaire, de l'hémoglobine libérée et intracellulaire vont dans le même sens pour les globules rouges traités avec l'extrait de la plante, la quercétine et non traités (témoin négatif) en comparant aux résultats obtenus avec le témoin positif (figure 16, 17 et 18).

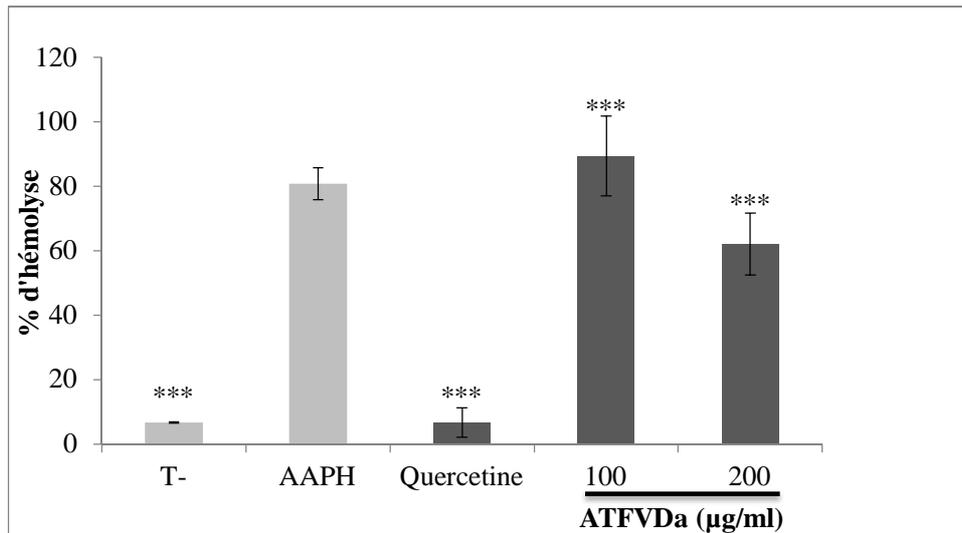


Figure (15) : L'activité anti-hémolytique de l'ATFVDa. ATFVDa : extrait acide d'alcaloïdes totaux de feuilles *V.difformis*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M de trois différentes expérimentations (n = 3). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparé avec le contrôle positif (AAPH).

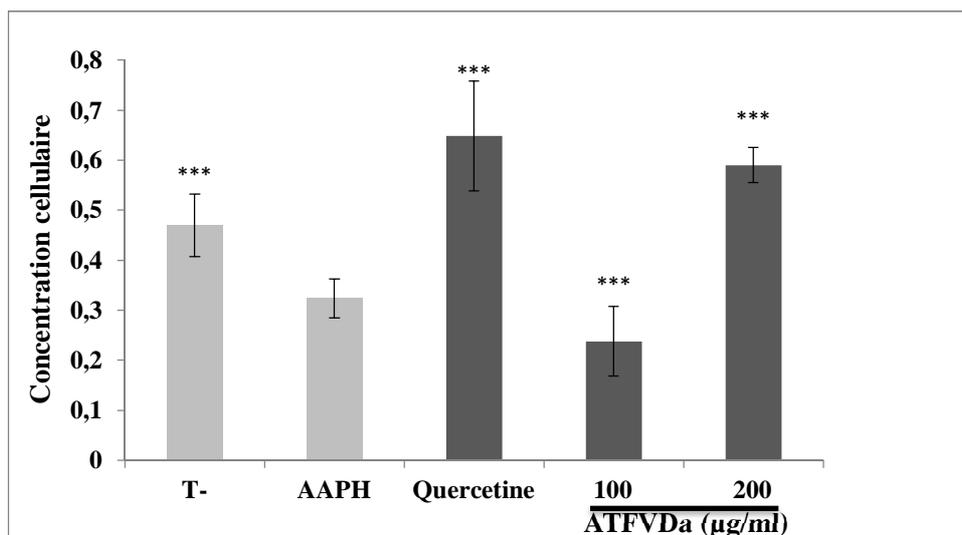


Figure (16) : Mesure de la concentration cellulaire de l'ATFVDa. ATFVDa : extrait acide d'alcaloïdes totaux de feuilles de *V.difformis*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M de trois différentes expérimentations (n = 3). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparé avec le contrôle positif (AAPH).

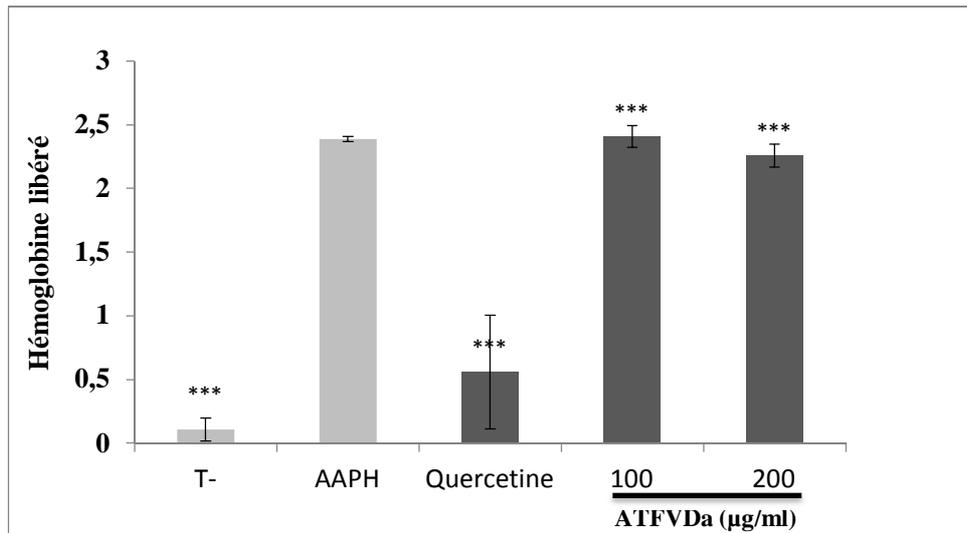


Figure (17) : Mesure du taux d'hémoglobine libéré de l'extrait ATFVDa. ATFVDa : extrait acide d'alcaloïdes totaux de feuilles de *V.difformis*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M de trois différentes expérimentations (n = 3). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparé avec le contrôle positif (AAPH).

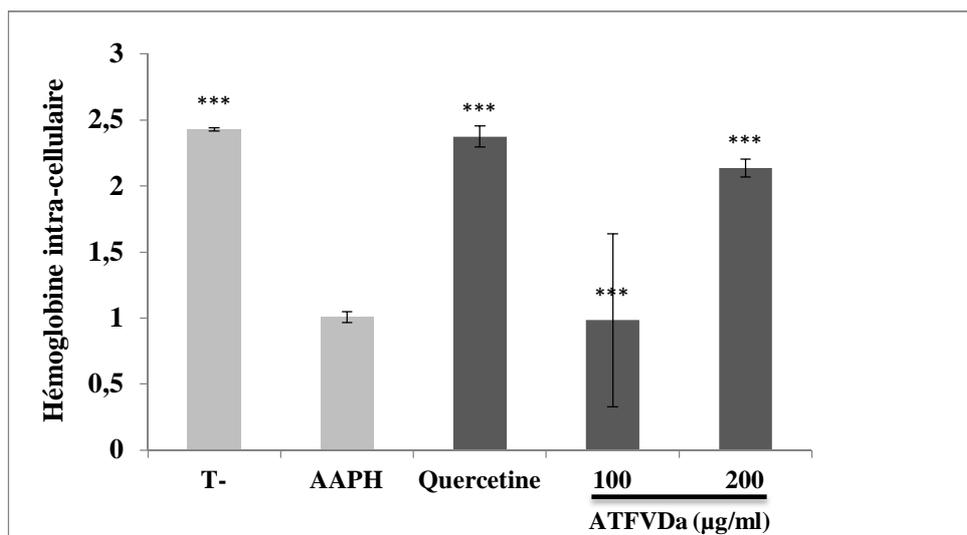


Figure (18) : Mesure du taux d'hémoglobine intracellulaire de l'extrait ATFVDa. ATFVDa : extrait acide d'alcaloïdes totaux de feuilles de *V.difformis*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M de trois différentes expérimentations (n = 3). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparé avec le contrôle positif (AAPH).

Les résultats montrent que le pourcentage d'hémolyse diminue en fonction des concentrations de l'extrait alcaloïdique basique de feuilles de *V. difformis* à partir de la concentration 25 µg/ml. L'extrait de la plante montre un effet protecteur contre l'oxydation de la membrane des globules rouges par le radical AAPH avec une IC₅₀ de 38,38 µg/ml (figure 19)

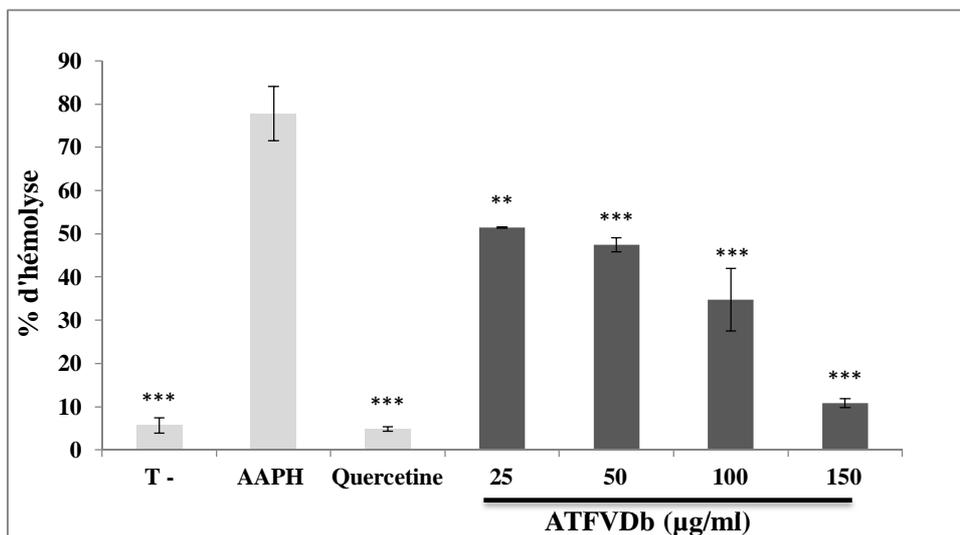


Figure (19) : L'activité hémolytique de l'extrait ATFVDb. ATFVDb : extrait basique d'alcaloïdes totaux de feuilles de *V.difformis*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M de trois différentes expérimentations (n = 3). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparé avec le contrôle positif (AAPH).

Nous avons confirmé cet effet à travers la mesure de la turbidité cellulaire (concentration cellulaire) qui montre des valeurs de concentration cellulaire très significatives après traitement avec l'extrait de la plante en comparant à ceux obtenus après traitement seulement avec le radical AAPH (témoin positif) (figure 20)

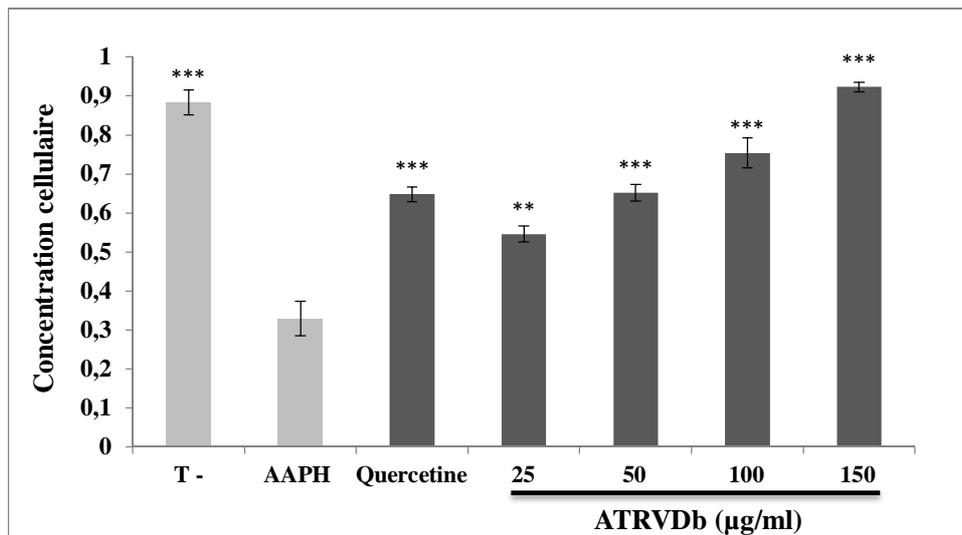


Figure (20) : Mesure de la concentration cellulaire de l'extrait ATFVDb. ATFVDb : extrait basique d'alcaloïdes totaux de feuilles de *V.difformis*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M de trois différentes expérimentations ($n = 3$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparé avec le contrôle positif (AAPH).

Les valeurs d'hémoglobine libérée vont dans le sens contraire de la concentration cellulaire c'est-à-dire qu'elles diminuent en fonction de concentrations de l'extrait alcaloïdique basique de feuilles de *V. difformis* jusqu'à atteindre une valeur maximale après traitement avec l'extrait (150µg/ml) qui est presque similaire à la valeur du témoin négatif (traité avec la solution isotonique). Cet effet est très significatif en comparaison avec la valeur du témoin positif. Les valeurs élevées de l'hémoglobine libérée signifie une forte hémolyse (figure 21).

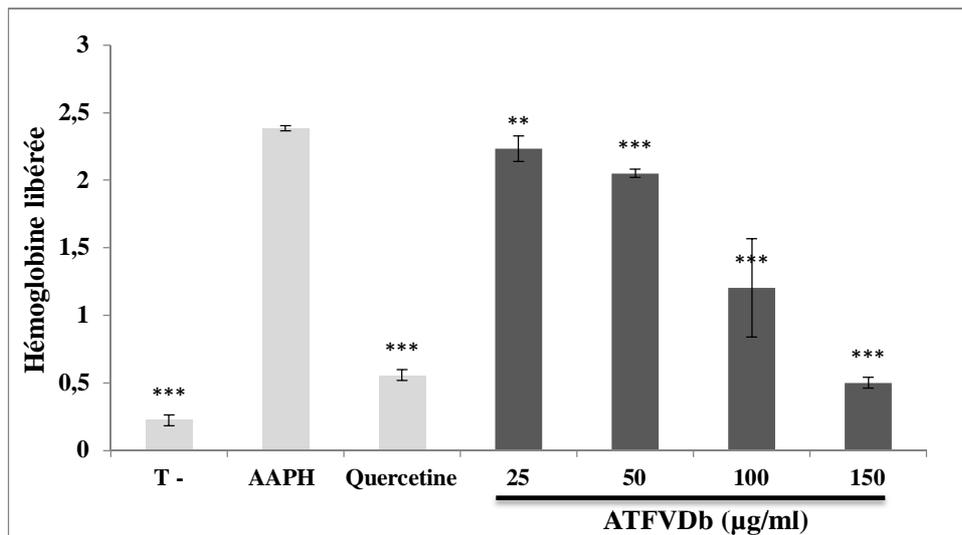


Figure (21): Mesure du taux de l'hémoglobine libérée de l'extrait ATFVDb et de la quercétine. ATFVDb : extrait d'alcaloïdes totaux de feuilles de *V.difformis*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M de trois différentes expérimentations ($n = 3$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparé avec le contrôle positif (AAPH).

Contrairement à la quantité d'hémoglobine libérée, les valeurs d'hémoglobine intracellulaire semblent être plus élevées lorsque les cellules sont intactes, la quantité d'hémoglobine intracellulaire élevée indique que le taux d'hémolyse est plus faible (figure 22).

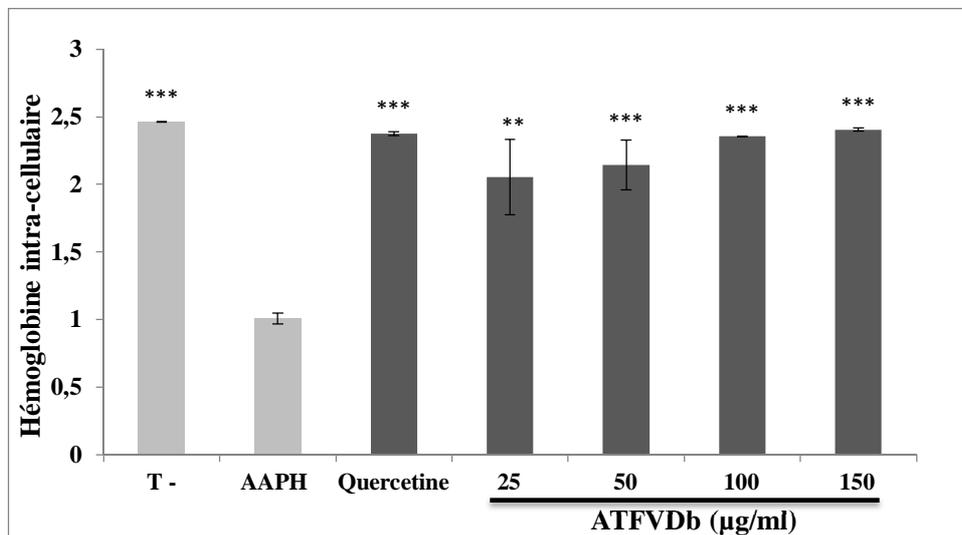


Figure (22): Mesure du taux de l'hémoglobine intracellulaire de l'extrait ATFVDb. ATFVDb : extrait basique d'alcaloïdes totaux de feuilles de *V.difformis*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M de trois différentes expérimentations ($n = 3$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparé avec le contrôle positif (AAPH).

D'autre part, les résultats montrent que l'extrait alcaloïdique basique de racines de *V.difformis* (200 $\mu\text{g/ml}$) exerce un potentiel effet sur l'inhibition de l'hémolyse provoquée par le radical AAPH, cette effet est comparable avec celui enregistré par la molécule de référence (figure 23). Par conséquent, l'extrait acide (200 $\mu\text{g/ml}$) n'exerce pas un effet protecteur sur l'inhibition de l'hémolyse (figure 23). Les valeurs de concentration cellulaire, de l'hémoglobine libérée et intracellulaire vont dans le même sens pour les globules rouges traités avec les deux extraits de la plante, la quercétine et non traités (témoin négatif) en comparaison aux résultats obtenues avec le témoin positif (figure 24, 25 et 26).

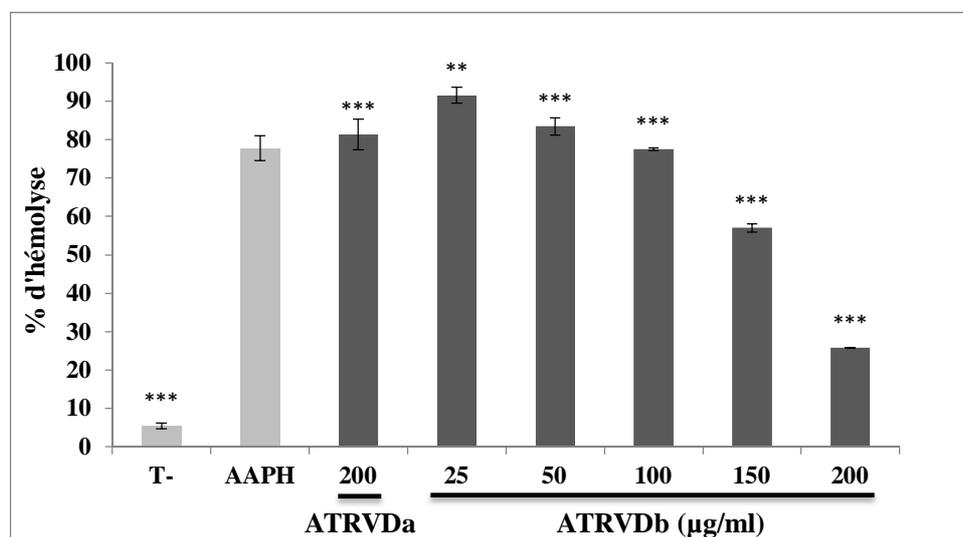


Figure (23) : L'activité hémolytique de l'ATRVDa et l'ATRVDb. ATRVDb : extrait acide d'alcaloïdes totaux de racines de *V.difformis* et l'ATRVDa : extrait basique alcaloïdes totaux de racines *V.difformis*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M de trois différentes expérimentations ($n = 3$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparé avec le contrôle positif (AAPH).

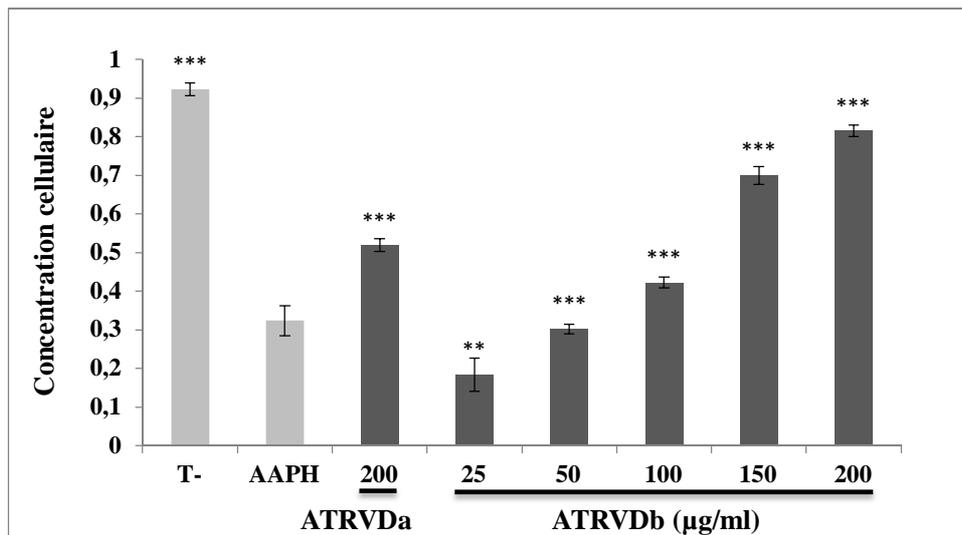


Figure (24) : Mesure de la concentration cellulaire de l'ATRVDa et de l'ATRVDb. ATRVDa : extrait acide d'alcaloïdes totaux de racines de *V.difformis* et l'ATRVDb : extrait basique d'alcaloïdes totaux de racines de *V.difformis*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M de trois différentes expérimentations (n = 3). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparé avec le contrôle positif (AAPH).

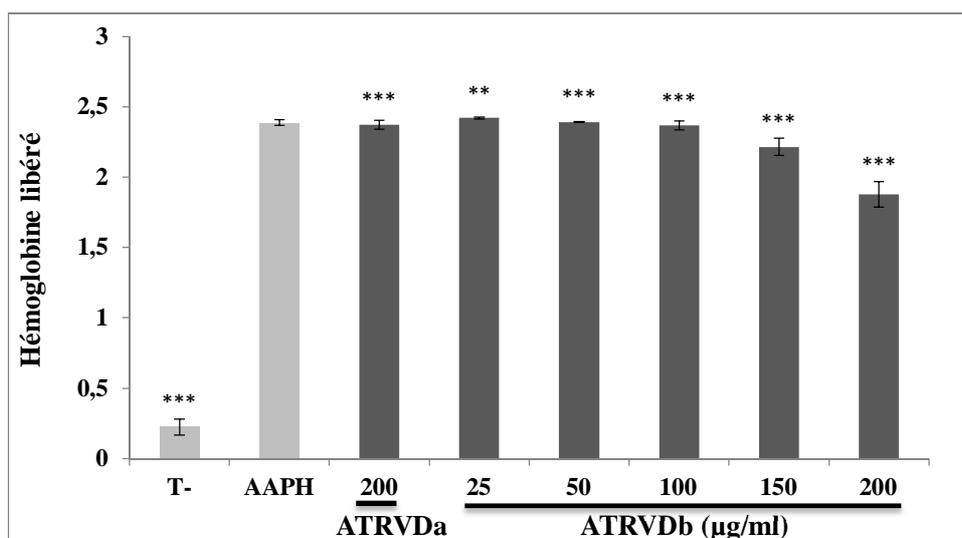


Figure (25): Mesure du taux de l'hémoglobine libéré de l'ATRVDa et de l'ATRVDb. ATRVDa : extrait acide d'alcaloïdes totaux de racines de *V.difformis* et l'ATRVDb : extrait basique d'alcaloïdes totaux de racines de *V.difformis*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M de trois différentes expérimentations (n = 3). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparé avec le contrôle positif (AAPH).

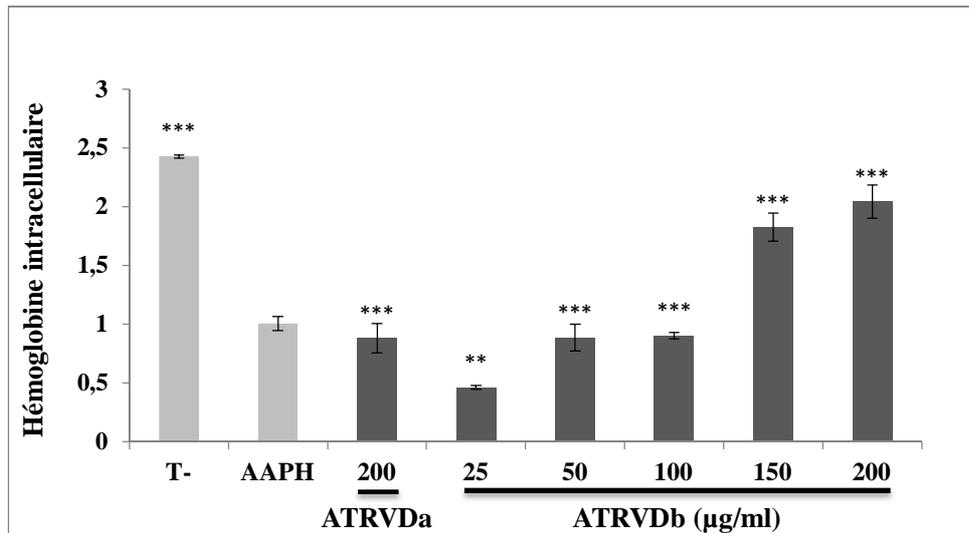


Figure (26): Mesure du taux de l'hémoglobine intracellulaire de l'ATRVDa et de l'ATRVDb. ATRVDa : extrait acide d'alcaloïdes totaux de racines de *V.difformis* et l'ATRVDb : extrait basique d'alcaloïdes totaux de racines de *V.difformis*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M de trois différentes expérimentations (n = 3). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparé avec le contrôle positif (AAPH).

Parallèlement aux résultats du dosage d'hémoglobine et de turbidité cellulaire nous avons suivi cette étude par une observation microscopique de la morphologie des globules rouge traités avec les échantillons, le AAPH et non traités. Les résultats montrent une morphologie cellulaire normale des globules rouges traités avec les extraits de la plante en comparaison avec les globules rouges non traités (contrôle négatif) et ceux traités avec le radical AAPH (figure 27).

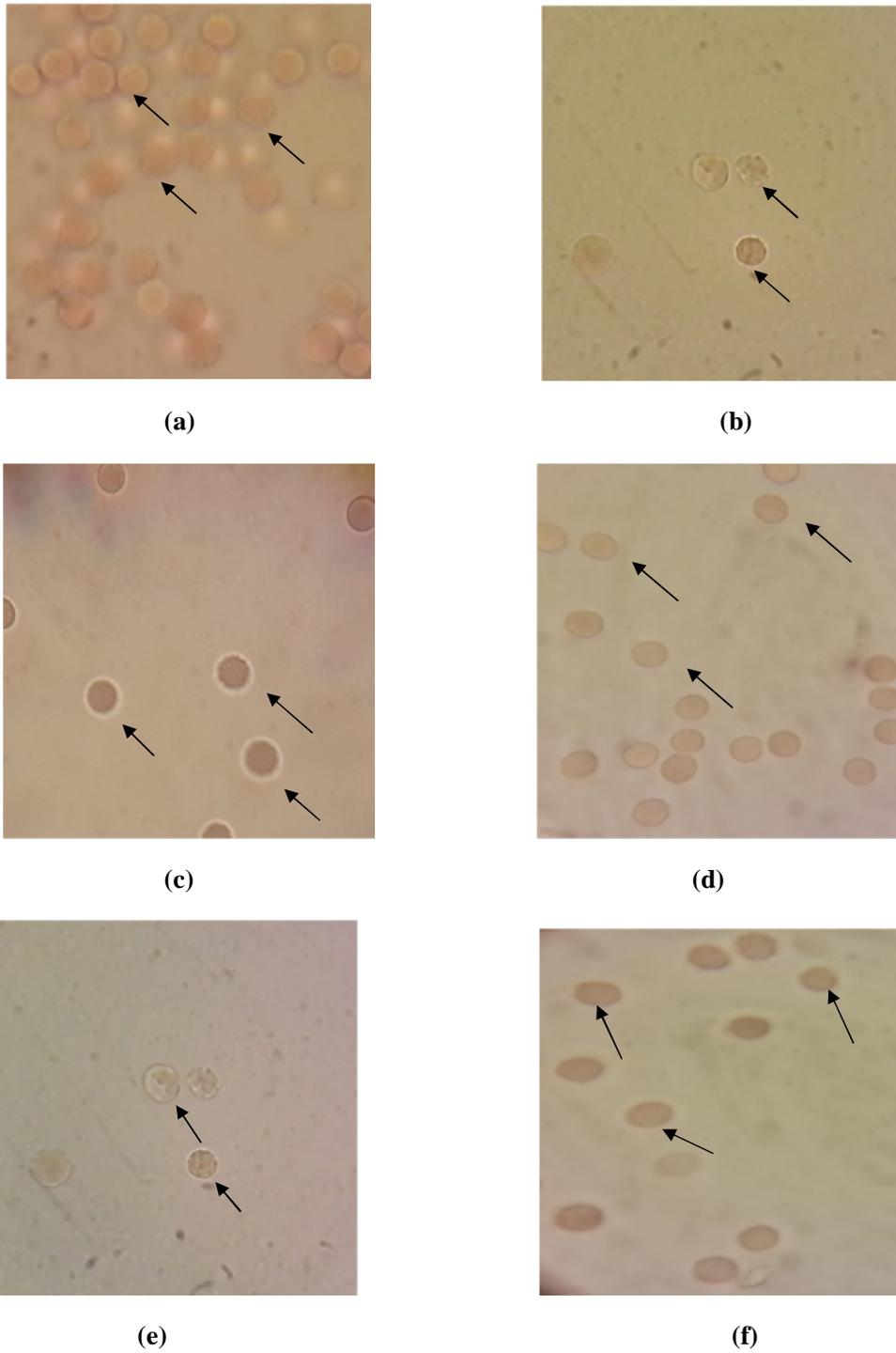


Figure (27): La morphologie des érythrocytes humaines observés au microscope optique (x100) : Témoin négatif (a), Témoin positif (b), Extrait acide des feuilles (c), Extrait basique des feuilles (d), Extrait acide des racines (e) et Extrait basique des racines (f).

*Conclusion
et
perspectives*



Conclusion et perspectives

La présente étude a permis de mettre en évidence par des tests *in vitro* l'activité antioxydante et cytoprotectrice des extraits alcaloïdiques basiques et acides des feuilles et des racines de *V.difformis*, plante appartenant à la famille des apocynacées. Les extraits alcaloïdiques de *V.difformis* semblent présenter un intérêt réel et un effet potentiel par leurs activités antioxydantes qui ont été réalisés par différents tests *in vitro* (DPPH, chélation du fer).

L'extraction par le soxhlet a été effectuée avec l'éthanol dont le rendement le plus élevé est obtenu avec les extraits alcaloïdiques acides des deux parties (feuilles et racines) par rapport aux extraits basiques qui se caractérisent par un rendement plus faible.

Les résultats *in vitro* ont révélé une activité antioxydante pour l'ensemble des extraits, un fort pouvoir de piégeage du DPPH qui est similaire à celui de la molécule de référence, la quercétine.

L'évaluation de l'activité chélatrice du fer des extraits alcaloïdiques de la plante a été mise en évidence, l'extrait alcaloïdique basique des feuilles et des racines ont révélé un potentiel effet de chélater le fer, contrairement aux extraits alcaloïdiques acides qui ont montré une faible activité chélatrice du fer.

L'activité cytoprotectrice des extraits alcaloïdiques basiques de la partie aérienne et des racines a montré un effet protecteur plus marqué que celui obtenu avec les extraits alcaloïdiques acides de *V.difformis*.

Au terme de ce travail, nous pouvons déduire que les plantes médicinales sont considérées comme une source de substances premières essentielles pour la révélation de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments. Ainsi, les résultats de notre étude suggèrent que des molécules naturelles telles que les alcaloïdes indoliques pourraient être envisagées comme traitements de certaines pathologies. Une étude *in vivo* est souhaitable afin d'obtenir une vue plus approfondie sur l'activité antioxydante et cytoprotectrice de la plante ainsi qu'une étude phytochimique reste nécessaire afin de purifier et d'identifier les alcaloïdes responsables de l'activité antioxydante et cytoprotectrice de la plante. De plus une caractérisation des substances naturelles présentes notamment les alcaloïdes indoliques est toujours importante

Références bibliographiques

References bibliographiques

A

Abd El-Fattah El-Shouny W., Gamal Allam N., Abd El-Fattah Khalil M et Mohamed Hegazy A. (2016). Antibacterial response of combination between antibiotics and some plant extracts against multidrug resistant bacteria. *Advances in biological research*, 10(1): 51-57.

Andrade M.T., Lima J.A., Pinto A.C., Rezende C.M., Carvalho M.P et Epifanio R.A. (2005). Indole alkaloids from *Tabernaemontana australis* (Müell. Arg): miers that inhibit acetylcholinesterase enzyme. *Bioorganic and medicinal chemistry*, 13: 4092-4095.

Andreea, S., Stanila, S. (2011). Antioxidant activity of carotenoids extracts from hippophae rhamnoides. *Agricultura – Știință și practică*, 3- 4(79-80), 43-49.

Arulmozhi S., Papiya M.M., Sathiya N.L et Prasad A.T. (2010). In vitro antioxydant and free radical scavenging activity of fractions from *Alstonia scholaris* Linn.R.Br. *International journal of pharmaceutic technologie research*, 2 (1): 18-25.

Aurousseau B. (2002).les radicaux libres dans l'organisme dans animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits=oxygen radicals in farm animals.

B

Barouki R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. Ageing free radicals and cellular stress. *Médecine and sciences - Inserm / SRMS*, 22(3): 266-272.

Baba aissa F. (2000).Encyclopédie des plantes utiles. *Flore d'Algérie et du Maghreb substances végétales d'Afrique d'orient et d'Occident*. Ed .Librairie Moderne ,ROUIBA,Algerie.

Baudin B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *mt cardio*, 2(1) :43-52.

Beloued, A. (1998).Plante Médicinales d'Algérie.OPU, Algérie, 270 02.Edition 2.

Bidie A. dit Philippe., N'Guessan B.B., Yapo A.F., N'Guessan J.D et Djaman J.A. (2011). Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Science and nature*, 8(1) : 1-11.

Bonnefont-Rousselot D., Théron P., Beaudeau J-L., Peynet J., Legrand A., Delattre J. (2001). Vieillesse et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels ? *Anale de Biologie Clinique*, 59(4) : 453-9.

Brewer M.S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 10: 221-247.

Brighente I.M.C., Dias M., Verdi L.G et Pizzolatti. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of some brazilian species. *Pharmaceutical biology*, 45(2): 156-161.

Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales .Ed 4, TEC &DOC__Edition médicales internationales : P938

C

Cadenas, E. (1997).basic mechanisms of antioxidant activity.biofactors, 6,391-397.

D

Debuigne, G., Couplan, F. (2009).Petit Larousse des Plantes Médicinales. Editions 21 rue du Montparnasse, paris : P5.

Defraigne J.O et Pincemail J. (2008).stress oxydant et antioxydants.Review Médical Liege 63 :10-19.

DE Moffarts B, Kirschvink N, Pincemail J et Lekeux P. (2005). Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Département des Sciences fonctionnelles, Service de Physiologie, FORMATION CONTINUE-ARTICLE DE SYNTHÈSE*, 149 : 1-9.

Descamps E., Gelé P., Bordet R et Vamecq J. (2006). Modulation pharmacologique du stress oxydatif. Pharmacological control of oxidative stress. *La lettre de pharmacologue, Stratégies thérapeutiques*, 20(4) : 107-118.

E

Elqaj M., Ahami A. et Belghyti D. (2007). La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. *Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques"*. Maroc.

F

Favier A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques, l'actualité chimique*, 108-115.

G

Galas S., Château M-T., Pomiès P., Wang J., Menardo J., Puel J-L., Hugnot J-P., Verdier J-M et Devau D. (2012). Aperçu de la diversité des modèles animaux dédiés à l'étude du vieillissement. The diversity of aging models. © 2012 *médecine/sciences – Inserm / SRMS*, 28(3): 297–304.

Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z et Jore D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *Mécanismes biochimiques, l'actualité chimique*, 91-95.

Gonc-alves E., Almeida LM et C.P Dinis T. (1998). Antioxidant activity Of 5-aminosalicylic acid against lipid peroxidation in the presence of vitamins C and E. *International journal of pharmaceuticals*, 172: 219-228.

Grandjean D., Renard N., Dhote F., Ouabdesselam M., Aubert L., Bigard X., Robach P., Hery J-P., Bomassi E et Bertiat G. (2015). Modèle d'étude du stress oxydatif cellulaire: le chien de travail en environnement extrême. *Le nouveau praticien vétérinaire*, 121: p37.

H

Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C et Chapelle JP. (2007). Le stress oxydant. *Review Medical Liege*, 62(10): 628-638.

Hambaba L., Boudjellal., Abdeddaim M., Aberkane M.C et Boudiaf K. (2012). Etude in vitro des activités antimicrobienne et antioxydante des extraits du fruit d'*Elaeagnus angustifolia* L. *Pharmacognosie*, 10 : 350-356.

Hamid HA., Ramli AN., Yusoff MM. (2017). indole alkaloids from plants as potential leads for antidepressant drugs: A mini Review. *Front pharmacol.*v.8

J

Jayakumar D., Jhancy Mary S et Jaya Santhi R. (2010). Evaluation of antioxidant potential and antibacterial activity of *Calotropis gigantea* and *Vinca rosea* using invitro model. *Indian journal of science and technology*, 3(7): 720-723.

Jean, J.M., annie, F et chrystian, J.L. (2005). les composés phénoliques des végétaux .un exemple de métabolites secondaires d'importances économiques : P7-8.

L

Lee Y.K., Mok Kim S et Han S. (2003). Ozone-induced inactivation of antioxidant enzymes. *Biochimie*, **85**: 947-952.

Liu R.H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *International research conference on food, nutrition, and cancer*, 3479-3485.

M

Mahmoudian M., Jalilpour H et Salehian P. (2002). Toxicity of *Peganum harmala*: Review and a case report. *Iranian journal of pharmacology and therapeutic*, 1(1): 1-4.

Mandal, P. (2017). Potential biomarkers associated with oxidative stress for risk assessment of colorectal cancer. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*390 (6):557-565.

Mathew G., Lincy J., Naina S.S et Balawant S. (2015). Phytochemical investigation and anti-cancer activity of aerial parts of *Vinca difformis*. *An international journal of research in ayush and allied systems ayushdhara*, 2(6): 404-408.

Mates .JM (1999) .antioxydant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*, 38:595-603.

Matés.JM. (2000).Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology.*Toxicologie* 153:83-104.

Moudachirou, M. (2015).plante médicinales et Aromatiques: mieux connaitre pour valoriser.*de supervision, comites d'organisation et .livre du colloque.*

Michel F, Bonnefont-Rousselot D, Mas E, Draï J et Thérond P. (2008).biomarqueurs de la peroxydation lipidique : *Aspects analytique. Annales de biologie clinique*, 66(6) :605-620.

Mongens M. (2013). *Origine et conséquences du stress oxydant.* THÈSE Pour le DOCTORAT VÉTÉRINAIRE Présentée et soutenue publiquement devant LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL de L'ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT.

N

Niki, E. (2010). "Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo." *Free Radical Biology and Medicine*, 49(4): 503-515.

P

Pandey K.B et S.I Rizvi. (2011).biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomedical papers medicine faculty university Palacky Olomouc Czech Republic*, 155(20):1-6.

Patel R.M. (2013). Ferrous ion chelating activity (FICA) - A comparative antioxidant activity evaluation of extracts of eleven naturally growing plants of Gujarat, India. *International journal of scientific research*, 2(8): 426-428.

Pham-huy., LA, He, H., Pharm-huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxydants in disease and Health. *International journal of Biomédical science*.4 (2): 89-96).

Pincemail J., Le Goff C., Charlier C., Gillion P., Cheramy-Bien J.P., Van Honacker E., Chapelle J.P et Defraigne J.O. (2009). Evaluation biologique du stress oxydant : Application en routine clinique. *Nutrition et endocrinologie.Spécial antioxydant*, 16-31.

Pisoschi, AM, Pop, A. (2015).the role of antioxydants in the chemistry of oxidative stress. *European Journal of Medicinal Chemistry* 97:55-74.

Q

Quezel P et Santa S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed, Paris, vol (2): 1170p

R

RAZZAGUI,Abir. (2012).*Evaluation de l'effet toxique de l'extrait brute et de l'activité antioxydante des différent extraits des grains de Peganum harmala L*,Mémoire de magister Biochimie et Physiologie experimental,Université Ferhat Abbas Sétif [en ligne],www.univ-setif.dz/MMAGISTER/images/facultes/SNV/2012/Rezzagui%20A.pdf.(consultée le 15.03.17)

S

Salim, S. (20016).oxydative stress and the central Nervous System. *The Journal of Pharmacologie and Experimental Therapeutique* 360:201–205.

Sharma, S., Shrivastav², BR., Shrivastav³, A. (2013). Free Radicals, Antioxidants and Oxidative Stress. *International Journal of Advanced Research*, 1(9), 252-258.

Shirwaiker A., Prabhu K.S et Punitha I.S.R. (2006). In vitro antioxydant studies of *Sphaeranthus indicus* (Linn). *Indian journal of experimental biology*, 44: 993-996.

Stadtman, ER. (1993). Oxidation of free amino acids and amino acids résidus in proteins by metal-catalysed reactions. *Annu Rev Biochem* 62: 797-821.

Storey K.B. (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian journal of medical and biological research*, 29 (12): 1715-1733.

T

Thiong S.H., Looi C.Y., Hazni H., Arya A., Paydar M., Wong W.F., Cheah S-C., Mustafa M.R et Awang K. (2013). Antidiabetic and Antioxidant Properties of Alkaloids from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Molecules*, 18(8): 9770-9784.

V

Valko M., Leibfriz D., Moncol, Cronin MT., Mazur M and Telser J (2007). free radicals and antioxidants in normal physiological function and human disease. *int J Biochemistry cell biology*, 39(1), 44-84.

Y

YIIN, SJ. Ph, LIN, TE-H. (1998). Effects of Metallic Antioxidants on Cadmium-catalyzed Peroxidation of Arachidonic Acid*. *Annals Of Clinical and Laboratory Science*, Vol. 28(1).

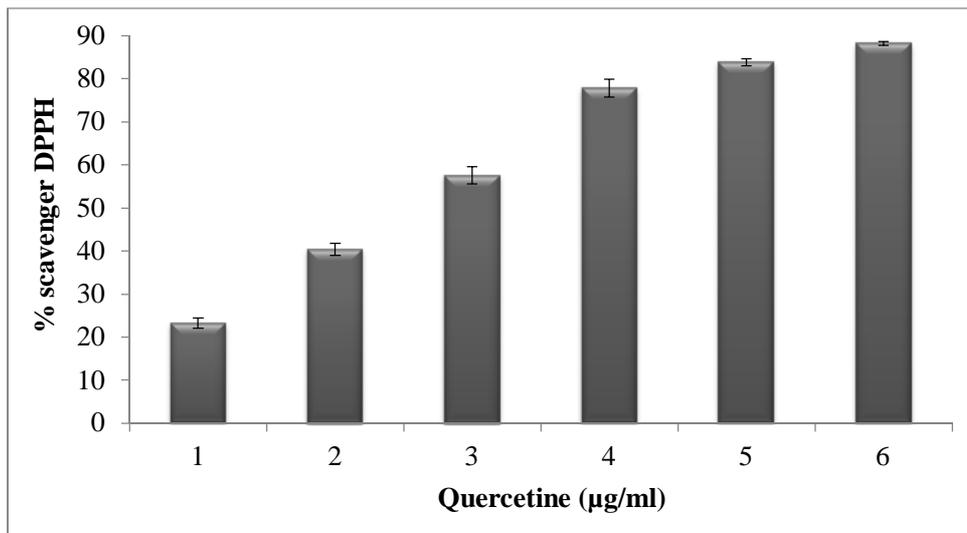
Z

Zheng, L., Dong, H., Su, G., Zhao, Q. and Zhao, M. (2016). "Radical scavenging activities of Tyr-, Trp-, Cys- and Met-Gly and their protective effects against AAPH-induced oxidative damage in human erythrocytes." *Food Chem* 197(Pt A): 807-813.

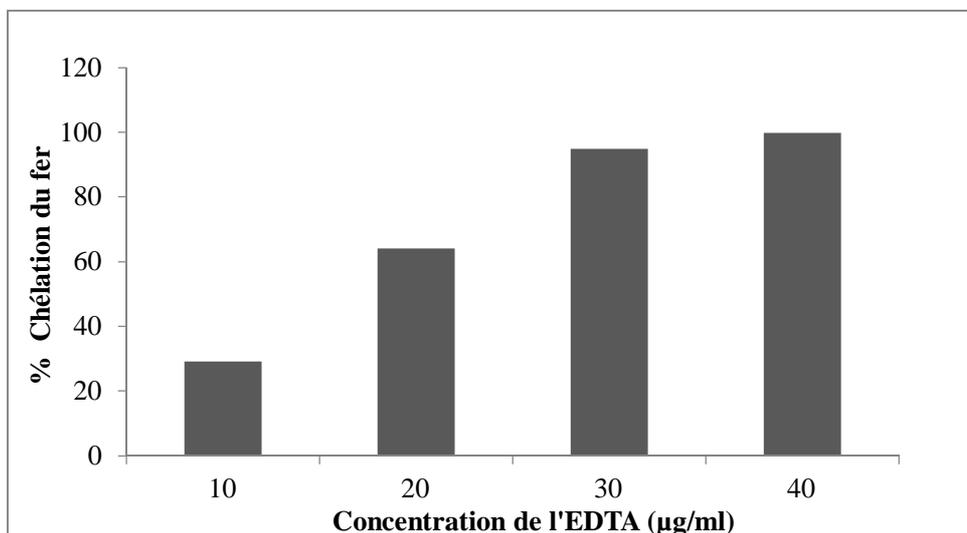
Anonyme (1). Method for synthesizing ergoline alkaloids from indolic bicyclic compound by double cyclization, resulting materials, and intermediate materials. [En ligne],

<http://www.Patents/WO2012001308A9.consulté en Mai 2017>.

Anonyme (2). Cryptopolyploidy revisited: the case of *Vinca* (Apocynaceae). *Pl. Syst. Evol.* 256: 201–208 [En ligne], <http://www.tropicos.org/Name/1802510.consulté en Février>.



Annexe 01 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par la quercétine.



Annexe 02 : L'activité chélatrice du Fer de l'EDTA.

Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'évaluation de l'activité antioxydante et cytoprotectrice de différents extraits alcaloïdiques acide et basique préparés à partir des feuilles et racines de *V. difformis*. L'extraction a révélé un rendement variable dont le plus important est enregistré avec l'extrait de feuilles. L'effet antioxydant a été déterminé en utilisant deux tests : test anti-radicalaire à l'égard du radical DPPH et le test de chélation du fer. Les valeurs d'IC₅₀ obtenues pour les différents extraits testés contre le radical DPPH sont de 117,28µg/ml et 40,67µg/ml pour l'extrait alcaloïdique acide et basique de feuilles (ATFVDA et ATFVDB), respectivement. En revanche, les alcaloïdiques totaux de racine acide et basique (ATRVDA et ATRVDB) ont exhibé un potentiel effet scavenger du radical DPPH avec des IC₅₀ de 28.23µg/ml et de 37.97µg/ml, respectivement. D'autre part, les extraits alcaloïdiques ont montré un effet modéré sur la chélation du fer avec des valeurs d'IC₅₀ de 195.62µg/ml pour l'extrait ATFVDB et de 116.63µg/ml pour l'extrait ATRVDB. Concernant l'extrait ATFVDA, a enregistré un effet chélateur modéré avec une IC₅₀ de 146.56 µg/ml, quant à l'extrait de racine n'a pas exercé un effet sur la chélation du fer. La deuxième partie du travail a été consacrée à l'évaluation de l'activité cytoprotectrice des extraits alcaloïdiques de la plante en utilisant les globules rouges comme modèle cellulaire et le radical AAPH. Les résultats montrent que les extraits alcaloïdiques ont un effet cytoprotecteur des érythrocytes très significatif avec des valeurs d'IC₅₀ de 38,38 µg/ml et de 169,5 µg/ml pour l'extrait ATFVDA et ATFVDB, respectivement. Quant à l'extrait alcaloïdique de racine, seulement l'extrait basique a montré un effet cytoprotecteur avec une valeur d'IC₅₀ de 153.06µg/ml).

Mots clés : antioxydant, activité cytoprotectrice , alcaloïdes, *V. difformis*, globules rouges, hémoglobine.

Abstract

This work aimed to evaluate the antioxidant and cytoprotective activity of various alkaloid extracts prepared from the leaves and roots of *V. difformis*. The Extraction revealed a variable yield of extraction, the most important was recorded with leaf extract. The antioxidant effect was determined by two tests: DPPH scavenging effect and iron chelating. IC₅₀ values were obtained for the various extracts tested against DPPH radical (ATFVDA= 117.28 µg/ml and ATFVDB= 40.67 µg/ml). On the other hand, the total alkaloid extracts of roots showed a potential scavenging effect with an IC₅₀ of 28.23µg/ml for ATRVDA and 37.97µg/ml for ATRVDB). In addition, the alkaloid extracts showed a moderate effect on the iron chelating activity with IC₅₀ values of 195.62 µg/ml for ATFVDB and 116.63 µg/ml for ATRVDB. Concerning ATFVDA, the results showed a moderate effect with an IC₅₀ of 146.56 µg/ml and no effect have been mentioned for ATRVDA. The second part of this work was devoted to evaluate the cytoprotective activity of alkaloid extracts using as red blood cells (RBC) as cell model and the AAPH radical. The results showed that the alkaloid extracts have a very significant protective effect of RBC with IC₅₀ values of 38.38 µg/ml for ATFVDB and 169.5 µg/ml for ATFVDA. The results of alkaloid extract of roots showed that only a basic extract have a cytoprotective effect with an IC₅₀ = 153.06 µg/ml.

Key words: antioxidant, cytoprotective activity, alkaloids, *V. difformis*, cell red blood, hemoglobin.

المخلص

في هذا العمل تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة وحماية الخلية لمختلف المستخلصات الحمضية والأساسية التي أعدت من أوراق وجذور *V. difformis*. كشف استخراج محصول متغير. أكبر كمية تم تسجيلها في الأوراق. تم تحديد تأثير مضاد الأكسدة من قبل تقنيتين: اختبار DPPH وخب الحديد. وقد تم الحصول على قيم IC₅₀ مختلفة لمختلف المستخلصات المختبرة ضد الجذر DPPH، فهي 117.28 مكغ / مل و 40.67 مكغ / مل للمستخلص الحمضي والقاعدي، على التوالي. في المقابل، المستخلصات الحمضية والأساسية القلويدية من الجذور أظهرت تأثير محتمل ضد DPPH مع IC₅₀ من 28.23 مكغ / مل و 37.97 مكغ / مل على التوالي. من ناحية أخرى، أظهرت المستخلصات القلويدية تأثير معتدل على إزالة معدن الحديد مع قيم ال IC₅₀ من 195.62 مكغ / مل للمستخلص الأساسي للأوراق و 116.63 مكغ / مل للجذور. وفيما يتعلق بالمستخلص الحمضي للأوراق سجلت تأثير معتدل مع IC₅₀ 146.56 مكغ / مل، أما عن مستخلصات الجذر لم تمارس تأثيراً لإزالة الحديد. ويخصص الجزء الثاني من العمل لتقييم النشاط الوقائي الخلوي للقلويدات مستعملين خلايا الدم الحمراء و جذر ال AAPH. وأظهرت النتائج أن المستخلصات القلويدية من النبتة لها تأثير وقائي كبير جداً على الخلايا الحمراء مع القيم IC₅₀ من 38.38 مكغ / مل و 169.5 مكغ / مل للمستخلصين الأساسي والحمضي للأوراق، على التوالي. أما بالنسبة للمستخلصات القلويدية للجذور فقط المستخلص الأساسي للجذور له تأثير وقائي مع قيمة IC₅₀ من 153.06 مكغ / مل.

كلمات مفاتيح: مضاد للأكسدة، حماية الخلية، القلويدات، *V. difformis*، كريات الدم الحمراء.