REPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA DE BOUMERDES

FACULTE DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE
SPECIALITE BIOCHIMIE APPLIQUEE

Science de la nature et de la vie
Filière : biologie
Spécialité : biochimie appliquée

MASTER ACADEMIQUE

Thème :

Contribution a l'évaluation de l'activité antioxydante inter-saisonnière des extraits bruts d'une plante endémique et de l'effet hémolytique de l'extrait optimal

Réalisé par :

Ould Saadi El hachemi

Soutenu le 04/07/2016 devant le jury:

Melle REMANA S.	MAA	UMBB	Presidente
Melle RAHIM MZ.	MAA	UMBB	Promotrice
Mme AIT AMER MEZIANE L.	MAA	UMBB	Examinatrice

Année universitaire : 2015-2016

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

à tous ceux qui me sont chers:

A l'être le plus cher pour moi dans cette vie, ma mère,

pour son sacrifice et encouragement pour finir ce travail. Je vous souhaite une vie pleine de joie, de santé et de bonheur.

A mon chère frère Abde rrahmane

Dieu me les garde pour le reste de ma vie

A ma grande Famille

A mes chers amis Islam et Ibrahim

Amine, Samir et lynol

et a tout mes amis

Remerciements

*Au Tout Puissant **ALLAH** pour m'avoir donné la santé et la force de mener ce travail à bien.*

A l'issue de ce travail, je voudrai adresser mes profondes reconnaissances et mes sincères remerciements à :

*A ma promotrice **M**elle RAHIM de m'avoir permis de travailler dans de bonnes conditions.*

. Merci à vous d'avoir accepté de diriger ce travail, merci pour votre perfectionnisme, soutien, disponibilité, et gentillesse, merci pour votre sympathie et vos encouragements et pour avoir partagé vos compétences avec moi tout au long de ces mois ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps que vous avez bien voulu me consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour, Que vous trouvez ici l'expression de ma plus profond respect et nos sincères gratitudes.

Mes remerciements vont aux membres des jurys pour l'honneur qu'ils m'ont fait de participer à la soutenance et de juger ce projet de fin d'études.

je n'oublie pas l'ensemble du personnel du laboratoire d'écologie et d'immunologie de biomoléculaire et de biochimie appliquée qui ont participé au bon déroulement de mon stage pratique.

Un très grand merci à tout le corps enseignant de la structure de la biologie de l'université M'hamed BOUGARA de Boumerdes qui nous a guidés durant toutes nos années d'étude.

Index des figures

Figure 1	Photo réelle de *Cistanche tinctoria*	3
Figure 2	Aperçu des espèces oxygénées activées (EOA)	11
Figure 3	Schéma de l'extracteur Soxhlet,	17
Figure 4	schéma de l'extraction au soxhlet	18
Figure 5	Structure chimique du radical libre DPPH• et sa rédaction par l'antioxydant.	20
Figure 6	Pourcentage d'inhibition %I en fonction de différentes concentrations de l'extrait hexadique des mois de janvier et avril.	24
Figure 7	Pourcentage d'inhibition %I en fonction de différentes concentrations de l'extrait chloroformique des mois de janvier et avril.	25
Figure 8	Pourcentage d'inhibition %I en fonction de différentes concentra l'extrait d'acétate d'éthyle des mois de janvier et avril	25
Figure 9	Pourcentage d'inhibition %I en fonction de différentes concentrations de l'extrait méthanoïque des mois de janvier et avril.	26
Figure 10	Pourcentage d'inhibition %I en fonction de différentes concentrations de l'extrait aqueux de janvier et avril.	26
Figure 11	représente les %I en fonction des concentrations pour les différents extraits de mois de janvier	29
Figure 12	Histogramme qui représente les IC_{50} des différents extraits et de L'acide ascorbique et de BHT	29
Figure 13	Taux d'hémolyse dans les tubes contenant les suspensions érythrocytaires en présence de l'extrait d'acétate d'éthyle	31

Index des tableaux

Tableau 1	résultats du screening phytochimiques de *Cistanche tinctoria*	23
Tableau 2	Pourcentage d'inhibition %Imax des différents extraits	27

Sommaire

Introduction 1
CHAPITRE I : Généralités sur Cistanche tinctoria (Cistanche phelypaea) 3
1 Présentation de la plante Cistanche tinctoria (Cistanchephelypaea) 3
2 La taxonomie de l'espèce 3
3 Distribution géographique 4
4 Utilisation traditionnelles 4
5 Principes actifs des plantes médicinales 5
6 Métabolites secondaires 5
6.1 Définition 5
6.2 Classification des métabolites secondaires Les polyphenols : 5
6.2.1 Les acides phénoliques 5
6.2.2 Les flavonoïdes 6
6.2.3 Les tanins 6
6.2.4 Les coumarines 6
6.2.5 Les alcaloïdes 7
6.2.6 Les Terpénoïdes 8
CHAPITRE II : stress oxydatif, antioxydation et l'hémolyse cellulaires 9
1 Stress oxydatif 9
1.1 Définition 9
1.2 Explication sur processus de l'oxydation 9
1.3 Les maladies liées au stress oxydant 12
2 Les antioxydants 12
2.1 Classification 13
2.1.1 Les antioxydants endogènes 13
2.1.2 Les antioxydants exogènes 13
3 Définition de l'hémolyse 14
3.1 Les pathologies liée a l'hémolyse 14
Chapitre III Matériel et méthodes 15
1 Matériels 15
1.1 Matériel végétal 15
1.2 Échantillons sanguins 15

1.3 Appareillage 15
1.4 Réactifs 15
2 Méthodes 16
2.1 Technique d'extraction par Soxhlet 16
2.2 Identification des flavonoïdes par screening phytochimique 19
2.3 Evaluation de pouvoir anti oxydant 19
2.3.1 Principe de test DPPH 19
2.3.2 Méthodes d'évaluation 20
2.3.3 Protocole expérimental 21
2.4 Evaluation du pouvoir hémolytique 21
1 Screening phytochimique de cistanche tinctoria 23
2 Pouvoir antioxydant évalué par le test DPPH 23
2.1 Comparaison inter saisonnière des activités antioxydantes 24
2.1.1 activitéantioxydante de l'extrait hexanique 24
2.1.2 activité anti oxydante de l'extrait de chloroforme : 25
2.1.3 Activité anti oxydante de l'extrait d'acétate d'éthyle 26
2.1.4 Activité anti oxydante de l'extrait méthanoïque 26
2.1.5 activité anti oxydante de l'extrait aqueux 26
2.2 Comparaison de l'activité antioxydante des différents extraits 28
3 Pouvoir hémolytique de l'extrait d'acétate d'éthyle 31
Conclusion 32

Liste des abréviations

$Abs_{contrôle}$ Absorbance de contrôle.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

BHA Tert-butyl hydroquinone.

BHT Hydroxytoluène buthylé.

CHS : Chalcone Synthase.

DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

EOA : Espèce oxygénée activée.

GSH: Glutathion.

I% : Pourcentage d'inhibition.

MPO: Myéloperoxydase,

NADPH: Nicotinamide adenosine phosphohydrogenase.

PAL : Phénylalanine Ammonia Liase.

PBS : Phosphate Buffered Saline.

POD : Peroxydases.

PPO : Polyphénols oxydases.

RSA : Radical Scavenger Activity.

Se-GPx: Glutathion peroxydase séléno-dépendante.

SOD : Superoxydes dismutases.

Introduction

Les substances naturelles connaissent un intérêt croissant pour des applications dans de nombreux produits de consommation. En effet, leur utilisation est encouragée car les produits équivalents issus de synthèses chimiques ont, à tort ou à raison, mauvaise presse parmi le grand public. Les plantes représentent une source de principes actifs inépuisable et renouvelable, dont l'usage traditionnel et médical est connu depuis bien longtemps. Il existe donc un besoin de production de substances bioactives isolées, concentrées et purifiées, pour une utilisation dans un large champ d'application (cosmétiques, pharmaceutiques, additifs nutritionnels...)

On retrouve des antioxydants dans toutes les plantes, ils sont qualifiés en métabolites secondaires. Ces composés présentent plusieurs propriétés pharmacologiques, parmi lesquelles nous citerons les propriétés antimicrobienne, anti-inflammatoires, vasodilatatrices, anticancérogène, les antioxydants synthétiques sont utilisés depuis de nombreuses années. Mais, récemment, beaucoup d'études ont porté sur la toxicité élevée des antioxydants synthétiques utilisés dans l'industrie alimentaire, comme, par exemple, le butylhydroxytoluène (BHT), l'hydroxyanisol butyle (BHA), le tert-butylhydroquinone. **(Gomez et *al*., 2006).**

L'Algérie est l'un des pays connu par sa biodiversité résultant de phénomènes géo climatiques divers. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques. Ce potentiel floristique constitué de plantes médicinales, toxiques et condimentaires, est peu exploré du point de vue chimique et pharmacologique. A cet effet, il constitue à notre avis, une source non négligeable de recherche de substances naturelles **(Quezel, 1963).**

Dans le cadre de la valorisation de la flore Algérienne par la recherche de nouveaux composés d'origine végétale a intérêt thérapeutique, nous nous somme intéressé a étudié une plante endémique *Cistanche tinctoria* poussant a l'état spontané dans la wilaya de Béchar et qui en dépit de son utilisation en médecine traditionnelle et comme condiment, de rares études ont été menées sur ses activités biologiques et sa composition phytochimique.

A cet effet, ce présent travail a pour but d'évaluer l'effet antioxydant de différents extraits obtenus par extraction soxhlet des racines de *Cistanche tinctoria* récoltés à deux saisons différentes et ce afin de déterminer le solvant d'extraction optimal ainsi que la meilleure saison de récolte.

Afin d’étudier un aspect toxicologique nous avons évalué l’effet hémolytique de l’extrait présentant la meilleure activité antioxydante.

CHAPITRE I : Généralités sur *Cistanche tinctoria (Cistanche phelypaea)*

1 Présentation de la plante *Cistanche tinctoria (Cistanche phelypaea)*

Cistanchetinctoria est une plante endémique Comme tous les membres de la famille Orobanchaceae la *Cistanche* est une plante parasite dépourvue de chlorophylle qui parasite principalement des Chénopodiacées et des Tamaris. Cette plante assez commune aux Hauts plateaux et au Sahara septentrional, est plus rare Au Sahara occidental, central et Méridional.

Figure 1 Photo réelle de *Cistanche tinctoria*

Cette plante est connue sous le nom vernaculaire arabe: *Danone* الدانون. Elle a un peu la silhouette d'une grosse asperge trapue, courte sur patte, c'est une plante puissante de 3 à 12 dm, aux tiges souvent en touffes. Les fleurs sont jaunes et repartis sur toute la plante dans les tons bruns, du clair au foncé. Elle ne présente pas de feuilles mais seulement des sortes d'écailles le long de la tige. Le tube de la corolle s'évase brusquement au dessus de l'insertion des étamines **(Ozenda, 1991).**

2 La taxonomie de l'espèce

Règne : Plantae

Sous-règne : Eucaryotes

Embranchement : Trachéophyta

Sous-embranchement : Angiosperme

Classe :Dicotylédone

Subclasse :Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Orbonchaceae

Genre :*Cistanche*

Espèce :*Tinctoria (*Beck et *al.,* 1904)

3 Distribution géographique

Local : Espèce saharo-méditerranéenne, connue au Sahara septentrional, plus rares au Sahara occidental, central et méridional.

Régional : L'Afrique du nord.

Global : L'Afrique du nord. **(Sitouh, 1989)**

4 Utilisation traditionnelles

Cistanche tinctoria est employée pour la diarrhée, diabète, ennuis intestinaux, infection (abces) et en tant que diurétique. Les nomades au Maroc et en Algérie méridionaux mangent la partie inferieure de la plante bouillie dans l'eau ou cuit en cendres et mélangé à des céréales pour faire une sorte de gruau ou d'un pain plat qui est connue également pour ses propriétés aphrodisiaques **(Ozenda, 1991).**

La tige de *Cistanche tinctoria* est utilisée comme tonique pour le traitement de l'insuffisance rénale, aidant a soutenir et augmenter la fonction des reins. Il est utile quand la fonction de rein est trop faible (comme dans les cas de la conservation de l'eau) ou dans les cas ou la fonction des reins n'est pas équilibrée par la fonction d'autres organes (comme dans l'incontinence urinaire). *Cistanche tincoria* est également utile pour l'impuissance chez les hommes, et le résultat dans des capacités sexuelles accrues plutôt qu'a augmenté la commande de sexe (l'infertilité femelle), de la leucorrhée morbide, de la métrorrhagie prodigue et de la constipation sénile (**Yong et peng, 2009).**

La plante est utilisée notamment pour bronzer et teindre des peaux. Dans la région de Tissint (Maroc), la poudre est appliquée pour les blessures comme homéostat. Une préparation faite à partir de la partie plus inferieure sèche de *Cistanche*, le miel et les feuille d'olivier est utilisé comme crème pour l'hémorroïde. En Egypte, la plante en poudre sèche s'est mélangée au lait du chameau et employée aux contusions (**Bellakhdar, 1997)**

5 Principes actifs des plantes médicinales

Le métabolisme de la plante produit avant tous des glucides (sucres) et des protides. Une fraction des glucides est ensuite transformée en composés divers dont les lipides sont les plus importants pour la plante, mais le métabolisme fournit aussi plusieurs corps secondaires que l'homme utilise dans son arsenal thérapeutique, il s'agit des alcaloïdes, des hétérosides, des huiles essentielles et des tanins, les végétaux nous fournissent également des vitamines, des oligoéléments, et des antibiotiques (champignons microscopique). **(Domart et Bourneuf, 1988)**

6 Métabolites secondaires

6.1 Définition

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles: Les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes **(Lutige et *al*., 2002 ; Abderrazak et Joël, 2007)**

6.2 Classification des métabolites secondaires des polyphenols :

6.2.1 Les acides phénoliques

Les composés phénoliques sont dérivés de deux sous groupes distingués : Les acides hydroxycinnamiques, dont les plus abondants sont l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide chlorogenique, et les acides hydroxybenzoïque, mais les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique. Sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales, et présents chez toutes les céréales **(Barboni, 2006).**

Ils sont considérés comme substances phytochimiques avec des effets prebiotique, antioxydant, de chélation et anti-inflammatoire. Leur toxicité est très faible car ils sont considérés non toxiques **(Bruneton, 1999 ; Cowan, 1999 ; Barboni, 2006).**

Les mieux caractérisés pharmacologiquement, sont l'acide caféique et l'acide ferulique qui montrent l'effet anticancéreux au niveau des poumons chez les souris, alors que l'acide gallique agit par le même effet en prévenant le déclanchement du cancer œsophagien chez les rats **(Ribereau, 1968).**

6.2.2 Les flavonoïdes

L'ensemble des flavonoïdes, qui possèdent une origine biosynthétique commune, ont un élément structural de base en C15 (C6-C3-C6). Selon le degré d'oxydation du noyau central, qui peut être ouvert ou fermé, les flavonoïdes peuvent-être regroupés en neuf classes distinctes : chalcones, aurones, flavones, isoflavones, flavonols, flavanones, flavane-3-ols flavane-3,4-diols et anthocyanes. Dans la plante, ils sont très souvent liés avec des sucres, on parle alors d'hétérosides constitués d'une partie phénolique aglycone ou génine associée à un sucre. La liaison glycosidique pouvant être de type C-O-C ou de type C-C. D'autres types de liaisons se retrouvent fréquemment chez les flavonoïdes comme des sulfatations ou des prénylations**(Bruneton, 2008 ; Macheix et *al.*, 2005)**. L'argousier contient de nombreux dérivés flavonoïques qui sont principalement représentés par des dérivés de flavonols et de flavane3-ols.

6.2.3 Les tanins

Les tanins sont des substances polyphénolique de structure variée, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau, cette aptitude est lié à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da **(Paris et Hurabielle, 1981).**

Caractérisées par leur astringence, ils ont la propriété de précipiter les protéines (fongiques ou virales) et les métaux lourds. Ils favorisent la régénération des tissus et la régulation de la circulation veineuse, tonifient la peau dans le cas des rides **(Kansole, 2009).**

6.2.4 Les coumarines

Les familles les plus riches en coumarines sont : Légumineuse, Rutacées, Apiécées et Thymeleacées. Elles se trouvent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines **(Deina et al., 2003 ; Booth et al., 2004).**

Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration et aussi selon l'espèce. Dans la cellule végétale elles sont principalement présentes sous forme glycosylée **(Hofmann, 2003),** Cette glycosylation est une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques de ces molécules.

Elles sont considérées comme des phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries.

Les coumarines peuvent également se trouver dans la règne animale (les glandes à sécrétion odoriférante du castor) et chez certains microorganismes **(Ford et al., 2001 ; Hofmann, 2003)**

6.2.5 Les alcaloïdes

6.2.5.1 Définition

Un alcaloïde est une substance organique azotée d'origine végétale a caractère alcalin et présentant une structure moléculaire hétérocyclique complexe **(Badiaga, 2011).**

Généralement, les alcaloïdes sont produits dans les tissus en croissance : jeunes feuilles, jeunes racines. Ce sont des composés relativement stables qui sont stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques .

(Omulokoli et al., 1997)

6.2.5.2 Structure des alcaloïdes

La plupart des alcaloïdes sont dérivés des acides aminés tels que le tryptophane, L'ornithine, la lysine, l'asparate, l'anthranilate, la phénylalanine et la tyrosine. Ces acides aminés sont décarboxylés en amines et couplées à d'autres squelettes carbonés **(Cyril, 2001)**

6.2.5.3 Effet biologique

Les alcaloïdes sont utilisés dans plusieurs médicaments, ils affectent chez l'être humain le système nerveux particulièrement les transmetteurs chimiques tels l'acétyl choline, norepinephrine , acide aminobutyrique , dopamine et la serotonine d'autres effets pharmacologiques sont attribués également aux alcaloïdes telles que l'effet analgésique (cocaïne), anti-cholinergique (atropine), anti-malaria (quinine), anti-hypertensive (réserpine), antitussive (codéine), stimulant centrale (caféine), dépressant cardiaque et diurétique narcotique (morphine), anti-tumeur et sympathomimétique (éphédrine) **(Bediga,2011).**

6.2.6 Les Terpénoïdes

6.2.6.1 Définition

Le terme de terpénoïde est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène, ces composés sont majoritairement d'origine végétale **(Malecky, 2005).** Synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux **(Benaissa, 2011).**

CHAPITRE II : stress oxydatif, antioxydation et l'hémolyse cellulaires

1 Stress oxydatif

1.1 Définition

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles.

La réduction univalente de l'oxygène résulte dans la formation d'espèces oxygénées activées (EOA) dont font partie les radicaux libres (anion superoxyde, radical hydroxyle), le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène. Toutes ces espèces sont potentiellement toxiques pour l'organisme car elles peuvent inactiver des protéines, induire des cassures au sein de l'acide désoxyribonucléique (ADN) avec, comme conséquence, une altération du message génétique, dégrader les sucres, oxyder les lipoprotéines et initier des processus de peroxydation lipidique au sein de la membrane cellulaire en s'attaquant aux acides gras polyinsaturés.

(Pincemail et *al*., 1998)

1.2 Explication sur processus de l'oxydation

La molécule de dioxygène est en réalité bi-radicalaire. Elle possède, en effet, deux électrons célibataires sur des orbitales différentes. Le dioxygène est susceptible de récupérer quatre électrons, mais ses capacités oxydantes sont limitées par une barrière cinétique importante.

En présence de rayonnements, de métaux ou d'enzymes, il est capable de capter un électron pour donner le radical superoxyde O_2 qui est un radical modérément réactif (Fig. 1). Ce radical est le substrat d'enzymes essentielles, les superoxydesdismutases (SOD), qui le transforment en eau oxygénée H_2O_2.

L'eau oxygénée peut avoir plusieurs destinées. En présence de métaux, en particulier de fer Fe++, elle est transformée en radical hydroxyle .$OH^{\cdot}$ par la réaction de Fenton. Ce dernier est extrêmement réactif et va oxyder très rapidement les molécules voisines, formant parfois d'autres radicaux libres **(Morel et Barouki, 1999)**

La majeure partie de la toxicité de l'oxygène provient de la formation de radicaux libres, c'est-à-dire, selon la définition proposée par Halliwell et Gutteridge, d'espèces capables d'existence indépendante, contenant un ou plusieurs électrons non appariées dits électrons célibataires, ces radicaux peuvent se former par transferts mono-électroniques ou par scission homolytique de liaison covalente selon le schéma suivant:

$A^{\cdot} + B^{\cdot}$ Rupture homolytique radicaux libres

A **:** B

$A^{+} + B^{-}$ Rupture homolytique radicaux libres

Après une rupture homolytique, chacun des deux électrons intervenant dans la liaison entre les atomes A et B gagne l'orbitale externe de ces atomes, qui deviennent alors des radicaux libres **(Bonnefont-rousselot et *al.*, 2003)**.

Du fait de leur instabilité énergétique, les radicaux libres ont tendance à revenir immédiatement à un état stable en donnant un électron ou en prenant un à une autre molécule: ils peuvent donc être réducteurs ou oxydants. En jouant le rôle d'accepteur ou donneur d'électrons, les radicaux libres ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs vis-à-vis desautres molécules, possédant un temps de demi-vie extrêmement court (de la nano- à la milliseconde) **(Koechlin-Ramonatxo, 2006)**.

En situation normale, les EOA sont produites en permanence par notre organisme (rôle physiologique) mais un système efficace de défenses antioxydantes (vitamines, enzymes, oligoéléments) permet de réguler cette production afin de prévenir tout dégât cellulaire excessif **(Fig 2)**.

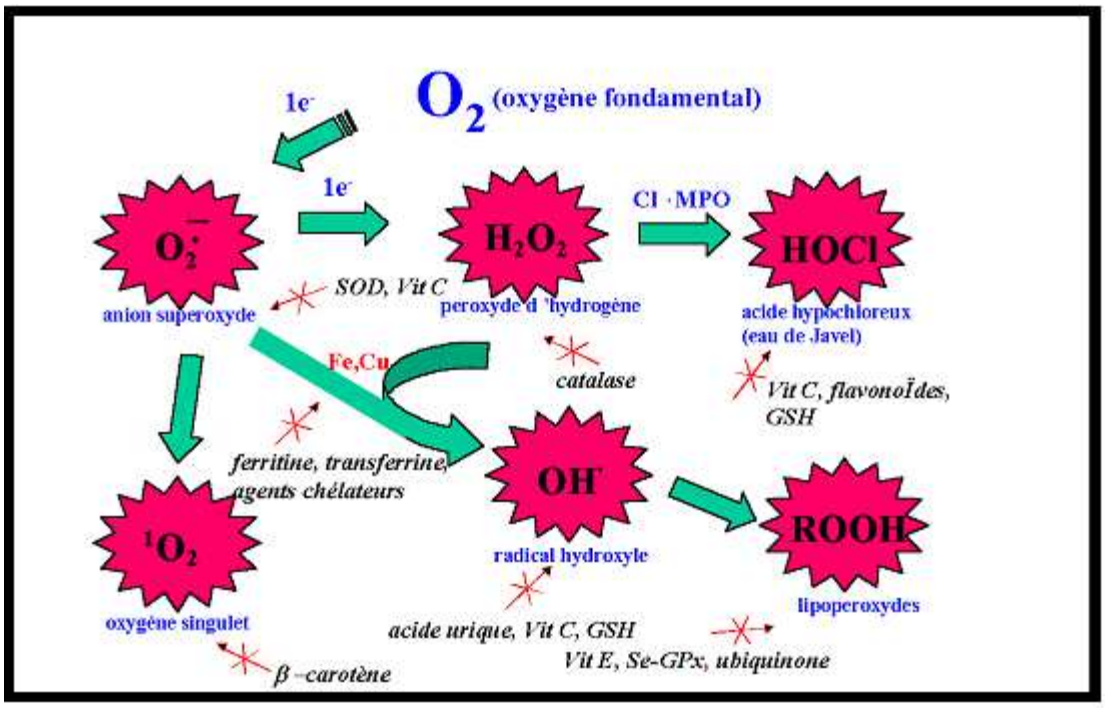

Figure 2: Aperçu des espèces oxygénées activées (EOA) dérivant de l'oxygène et systèmes de protectionpermettant de limiter l'effet toxique de ces espèces.

Dans certaines conditions, une surproduction d'EOA due à l'activation de divers mécanismes biochimiques peut submerger rapidement les défenses antioxydantes: c'est le stress oxydatif. Celui-ci est de plus en plus impliqué pour expliquer les dégâts cellulaires observés dans les états inflammatoires aigus, le vieillissement, le cancer, les troubles consécutifs à l'ischémie - reperfusion (transplantation d'organes), le diabète ou les maladies cardiovasculaires **(Pincemail, 1995)**

Les EOA peuvent être produites par des agents physiques comme les rayonnements, des réactions chimiques et surtout enzymatiques. En effet, toute réaction impliquant de l'O2 et un système réducteur de transfert d'électrons est susceptible de libérer des EOA.

C'est ainsi que la chaîne respiratoire provoque une libération importante d EOA, mais dont l'intensité demeure controversée (voir plus loin).

D'autres activités enzymatiques fournissent aussi des EOA, notamment les NADPH oxydases au cours de l'inflammation et les cytochromes P450 au cours de la détoxication des xénobiotiques. Ainsi, la mitochondrie, la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique sont les sièges principaux de libération d'EOA **(Takamatsu, 1995)**

Il existe, dans la cellule, d'autres oxydants très puissants, qu'ils soient des radicaux libres ou non **(Chamiec, 1996)**. Par exemple, des oxydants chlorés (HOCl) sont libérés par les macrophages et ont une activité bactéricide importante.

Par ailleurs, le monoxyde d'azote (NO) est un radical libre qui est surtout réputé pour ses proprié-tés physiologiques. Or, le NO interagit avec l'anion superoxyde pour donner le peroxynitrite, composé extrêmement réactif et toxique. NO et peroxynitrite interagissent avec des protéines et peuvent altérer leurs propriétés. **(Barouki, 2006)**

D'autres molécules comme les hydroquinones se retrouvent sous forme de radicaux libres après leur réaction avec le radical °OH, et, de par leur structure, stabilisent leur électron célibataire (radical semi-quinonique). Elles sont ainsi susceptibles de diffuser dans la cellule et d'oxyder d'autres molécules à distance, propageant ainsi une chaîne de réactions radicalaires. **(Barouki, 2006)**

1.3 Les maladies liées au stress oxydant

Le déséquilibre entre l'oxydation et l'anti oxydation conduit à un phénomène appelé stress oxydatif. L'initiation des phénomènes de réactions d'oxydations en chaîne dans l'organisme humain peut conduire à des pathologies comme l'athérosclérose, le cancer, l'infarctus, les allergies, les rhumatismes et d'autres…..Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tel que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires **(Favier, 2003)**

2 Les antioxydants

Par définition un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques.

Les antioxydants s'utilisent pour réduire l'oxydation du produit auquel ils sont mélangés. L'effet des antioxydants provient de deux mécanismes :

1) Ils neutralisent les radicaux libres et empêchent les réactions en chaine initialisées par ces derniers.

2) Les antioxydants détruisent les hydroperoxydes (composés intermédiaires formant des radicaux libres en interrompant la liaison O-O), diminuant ainsi la vitesse de formation de radicaux libres**. (Ribeiro et *al*,. 2001)**

Alors qu'ils incluent dans le captage de l'oxygène singulet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition permettant le piégeage direct des (EOA),l'inhibition des enzymes impliquée dans le stress oxydant et la chélation des traces métalliques responsables de la production des (EOA) ainsi la protection des systèmes de défense antioxydants. **(Diallo, 2005)**.

2.1 Classification

2.1.1 Les antioxydants endogènes

La production physiologique d' EOA est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes (SOD, hème oxygénase, peroxyrédoxine...), de molécules antioxydantes de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine, ubiquinone, ...) et de protéines (transferrine, ferritine, …). Enfin, un système secondaire de défense composé de phospholipases, d'ADN endonucléases, de ligases et de macroxyprotéinases empêche l'accumulation dans la cellule de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques **(Pincemail et *al.*, 2002)**.

2.1.2 Les antioxydants exogènes

Toutes ces défenses peuvent être renforcées par des apports exogènes en :

➢**Médicaments**

Ils constituent une source importante d'antioxydants. Actuellement, les classes thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les antihyperlipoprotéinémiques, les béta-bloquants et autres antihypertenseurs ont été évalués pour leurs propriétés antioxydantes.

➢**Antioxydants naturels**

La vitamine C ou acide ascorbique

C'est un puissant réducteur. Il joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E.

La vitamine E ou tocophérol :

Prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux peroxyles.

Le sélénium :

Les effets bénéfiques de cet oligo-élément sur l'organisme ne sont connus que depuis un quart de siècle. Il neutralise les métaux toxiques (plomb, mercure). Il aurait aussi une action préventive sur certains cancers.

Le ß-carotène :

Outre l'activité pro vitaminique A, possède la capacité de capter l'oxygène singulet.

Les flavonoïdes :

Les relations structure-activités anti-oxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité anti-oxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation.

Les tanins :

Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation.

Les coumarines :

Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxyles.

Les phénols :

Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales **(Diallo, 2005)**.

3 Définition de l'hémolyse

L'hémolyse désigne le processus visant la destruction des globules rouges, ou hématies, par les macrophages. Ces derniers sont des globules blancs spécifiques, localisés au niveau du foie et de la moelle osseuse. Avec une durée de vie moyenne de 100 jours, l'hématie est ensuite recyclée pour produire de nouveaux globules rouges. Si elle est généralement normale, l'hémolyse peut devenir pathologique et entraîner la destruction prématurée des globules rouges.**(Horde, 2014)**

3.1 Les pathologies liée a l'hémolyse

Certaines pathologies peuvent engendrer ce type de phénomène :

Un déficit en glucose6 phosphate déshydrogénase,

Drépanocytose,

Thalassémie,

Coagulopathies,

Paludisme,

Maladies auto-immunes**. (Horde, 2014)**

Matériel et méthodes

1 Matériels

1.1 Matériel végétal

L'échantillon végétal utilisé au cours de notre étude est *Cistanche tinctoria*. Récoltée à deux saisons différentes (mois de Janvier et Avril pour l'année 2015) dans la région Béni Abbes (wilaya de Bechar).

La partie souterraine: La racine a été séchée l'abri de la lumière et de l'humidité afin d'abaisser la teneur en eau pour que les réactions d'altération ne puissent plus se produire et ce afin de limiter la prolifération des microbes.

Une fois séchée, cette partie a été broyée en poudre et conservée soigneusement à l'abri de l'humidité et de la lumière.

1.2 Échantillons sanguins

L'effet hémolytique a été testé sur des échantillons de sang de donneurs sains (n=3), prélevé au niveau du laboratoire d'immunologie dans des tubes héparines et ont été conservés a +4C.

1.3 Appareillage

Les principaux appareils utilisés au cours de notre travail sont

Dispositif Soxhlet, Evaporateur rotatif, Etuve 37℃ à105°C, Micro pipette fixe de 1ml, Spectrophotomètre.

1.4 Réactifs

Chloroforme 95%, Hexane 98%, Méthanol 99%, Acétate d'éthyle 97%, Ethanol 98%, Acétone 96%, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) acide ascorbique , hydroxytoluènebuthylé BHT ,NaCl ,Na_2HPO_4, NaH_2PO_4.

2 Méthodes

2.1 Technique d'extraction par Soxhlet

L'extraction a été réalisé par la technique appelée **Soxhlet.** L'extracteur de Soxhlet est une pièce de verrerie permettant d'effectuer une extraction solide-liquide avec une grande efficacité. L'appareil porte le nom de son inventeur : Franz vonSoxhlet.

Le schéma d'un appareil Soxhlet est représenté sur la figure 3.1. Il est composé d'un corps en verre, dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais (une matière pénétrable pour le solvant), d'un tube siphon et d'un tube de distillation. Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction. Le ballon est chauffé afin de pouvoir faire bouillir son contenu. La cartouche contenant le solide à extraire est insérée dans l'extracteur, au dessus duquel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant. Ensuite, le condensat retombe dans le corps de l'extracteur sur la cartouche, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant. **(Penchev, 2010)**

Le ballon étant chauffé, le liquide est amené à l'ébullition, les vapeurs du solvant passent par le tube de distillation et rentrent dans le réfrigérant pour être liquéfiées. Ensuite, le condensat retombe dans le corps de l'extracteur sur la cartouche, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant.

Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'au niveau du sommet du tube-siphon, suivi par le retour dans le ballon du liquide de l'extracteur accompagné de substances extraites. Ainsi le solvant dans le ballon s'enrichit progressivement en composants solubles. L'extraction continue jusqu'à l'épuisement de la matière solide chargée dans la cartouche. **(Penchev, 2010)**

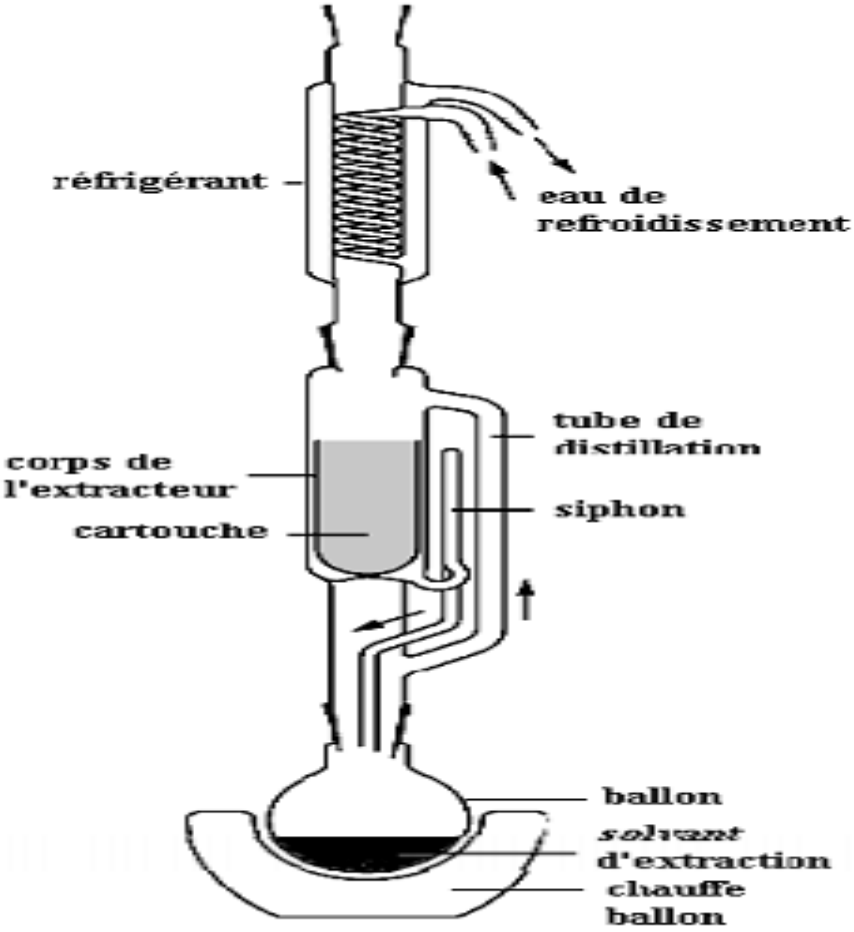

Figure 2: Schéma de l'extracteur Soxhlet (Penchev, 2010)

Le dispositif Soxhlet utilisé au cours de notre travail comporte 6 corps en verre. 30g de poudre de la racine *Cistanche tinctoria* des mois de janvier et d'avril ont été partagés entre les 6 corps en verre en raison de 3 corps pour chaque échantillon.

L'extraction a été réalisée successivement à l'aide de différents solvants de polarité croissante, l'hexane puis le chloroforme ont été d'abord utilisé pour extraire les composés apolaires. Les composés de polarité intermédiaire ont été extrais par l'acétate d'éthyle suivi de méthanol. Enfin l'eau a permis l'extraction des composée les plus polaire **(Fig 3).**Les extraits obtenus ont été évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif et les résidus secs ont été conservésà 4 °C.

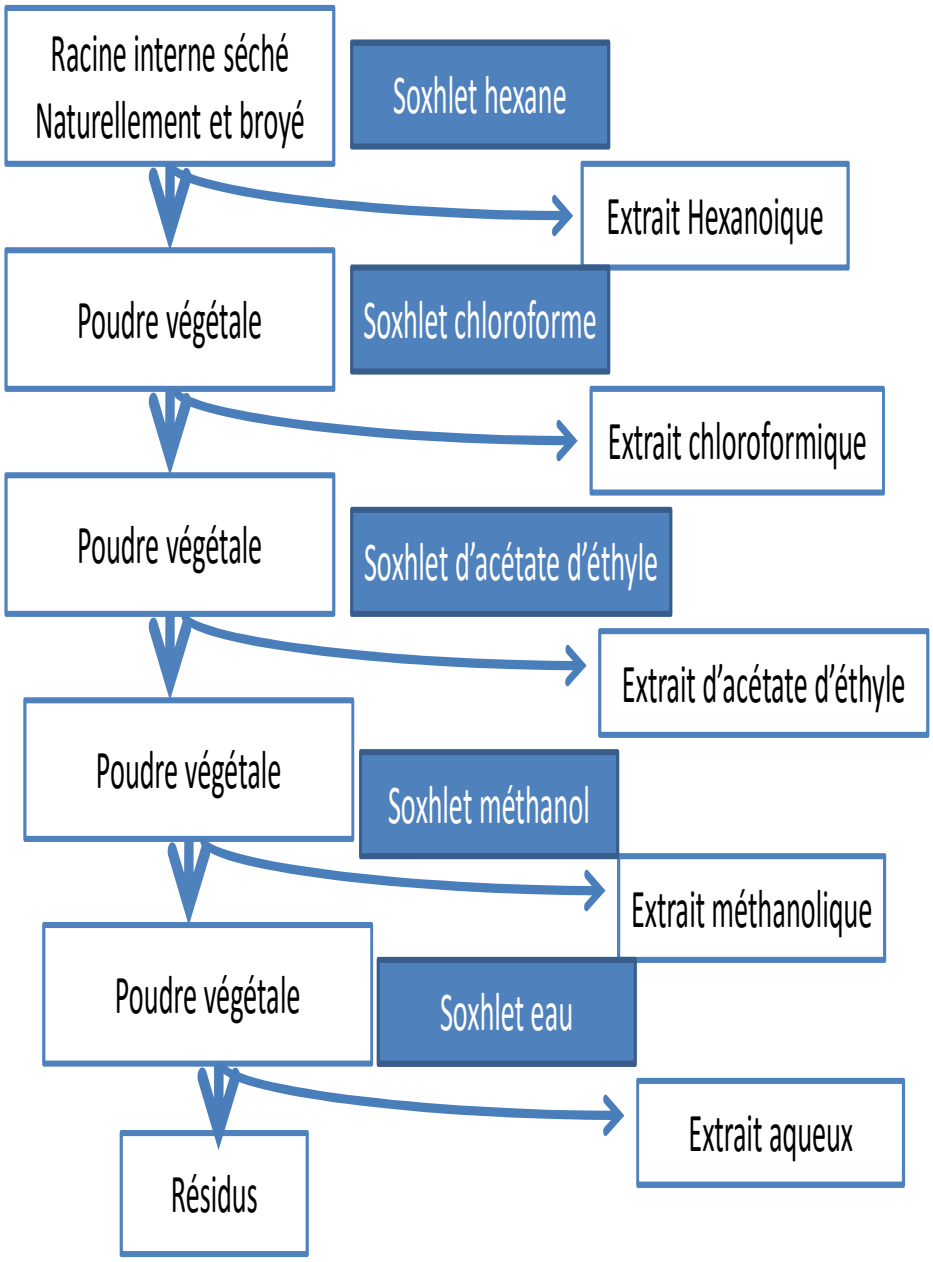

Figure 4: schéma de l'extraction au soxhlet

2.2 Identification des flavonoïdes par screening phytochimique

Les flavonoïdes sont révélés a la cyanidine, cette réaction de détection des flavonoïdes consiste a mélanger 5ml de l'extrait brute avec 5ml d'acide chlorhydrique puis des copeaux de zinc a quelle 1 ml d'alcool d'isoamylique sont ajoutés.

La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se develope après 3 minutes.

L'apparition d'une coloration rose orangée (flavones) ou rose violacée (flavanones) ou rouge (flavonols, flavanonols) rassemblée dans la couche surnageante d'alcool isoamylique indique la présence d'un flavonoide libre (génines). Les colorations sont moins intenses avec les hétérosides flavoniques.

La réaction négative avec les chalcones, les dihydrochalcones, les aurones, les catéchines et les isoflavones.

2.3 Evaluation de pouvoir anti oxydant

2.3.1 Principe de test DPPH

Le principe de ce test se résume en la capacité de l'extrait à réduire le radical libre DPPH**.** C'est le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α-diphényl-β-picrylhydrazyle). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote **(Fig 5)**, alors qu'il ne forme pas de polymères il est toujours en sa forme monomère cette délocalisation provoque la couleur bleu. La réduction de cette liaison par liaison covalente avec l'électron libre des antioxydants diminue l'intensité de cette coloration qui vas nous permettre a mesurer par spectrophotomètre dans le visible a 517nm.

(Brand-Williams et *al*. 1995).

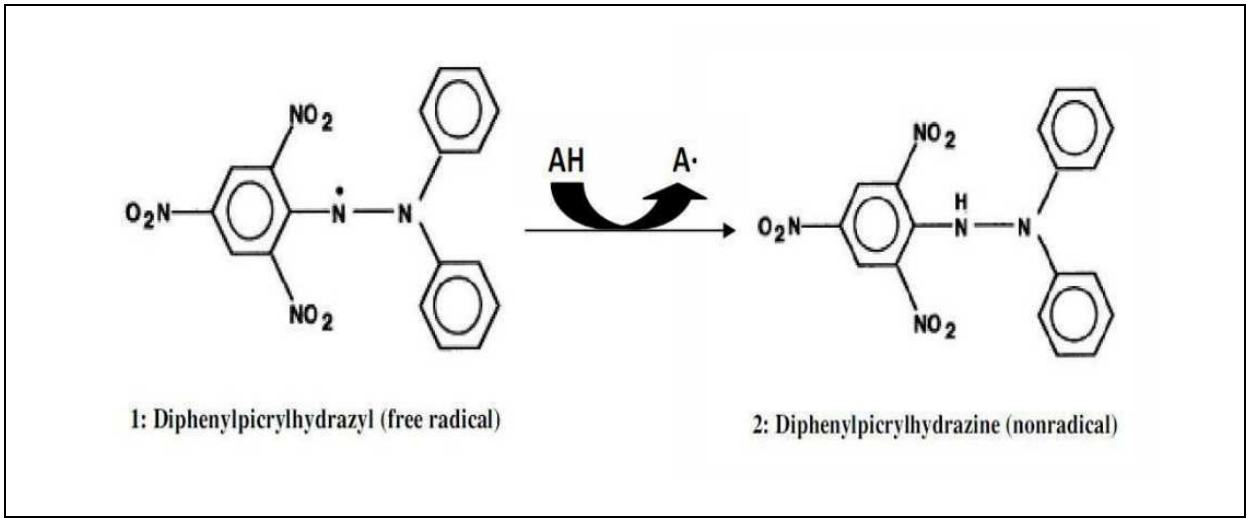

Figure 5 : **Structure chimique du radical libre DPPH• et sa rédaction par l'antioxydant.**

Dans la réaction ci-dessous (1), le radical DPPH est représenté par Z• et la molécule du donneur par AH, la réaction primaire est:

Z• + AH = > ZH + A• (1)

ZH est la forme réduite du radical DPPH . Notons que compte tenu de la solubilité en milieu organique du DPPH, cette méthode est plus adaptée pour les dosages qui se déroulent en milieu alcoolique (méthanol et éthanol) **(Mansouri et *al.*, 2011).**

2.3.2 Méthodes d'évaluation

Pour l'évaluation de l'activité antioxydantes, deux approches sont appliquées: d'une part, la détermination de la réduction relative du radical DPPH• à un temps de référence ou la détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH• et d'autre part, le suivi de la cinétique de la réduction.(Molyneux, 2004)

- **Le % RSA (Radical ScavengerActivity)**

on mesure l'activité de l'antioxydant de notre échantillon a une concentration et un temps donnée par l'équation ci dessous et la rapporter a l'activité d'antioxydant connu comme l'acide ascorbique (vitamine C) :

$\%RSA=(Abs_{contrôle}- Abs_t)/ Abs_{contrôle} \times 100\%$**(Molyneux, 2004)**

- **Le IC_{50}**

correspond à la réduction de 50% de l'activité de DPPH• dans le milieu réactionnelle les concentrations de l'antioxydant qui sont nécessaires pour faire décroître la concentration initiale du DPPH• avec 50% (exprimée en mol Antioxydant/mol DPPH• ou mg Antioxydant/g DPPH•).**(Sanchez-Moreno et *al.*, 1998)**

Dans notre travail nous avons utilisé l'approche % RSA pour la comparaison inter saisonnière des mêmes extraits et celle de l'IC_{50} pour la comparaison du pouvoir antioxydant des différent extraits.

2.3.3 Protocole expérimental

Pour chaque extrait une série de concentration de 1000, 500, 250, 125, 63.5, 30.25, 15.63µg /ml ont été préparé dans l'éthanol et 1 ml de chaque concentration a été incubé avec 1ml d'une solution éthanolique de DPPH (0.0024 %). Le mélange est incubé à l'abri de la lumière pendant 30 min et l'absorbance a été mesuré à 517 nm

L'inhibition du radical libre de DPPH exprime en pourcentage (I %) a été calculée de la manière suivante:

I % = [(A blanc – A échantillon) / A blanc] x 100

Les pourcentages d'inhibition %I en fonction des concentrations de chaque extrait sont présentés sous forme de courbes à partir desquelles l'index IC50 est calculé. Ce paramètre est défini comme la concentration en composées requis pour diminuer la concentration du DPPH initiale de 50%

Une série de concentrations équivalente a été réalisé pour le BHT (hydroxytoluèn ébuthylé) et l'acide ascorbique dans les mêmes conditions d'incubation et les mêmes concentrations. Ces deux derniers sont utilisés comme des contrôles positifs.

2.4 Evaluation du pouvoir hémolytique

Ce dosage est réalisé pour l'extrait qui a présenter la meilleure activité antioxydante (IC50 le plus élevé) et ce, afin de vérifier un aspect de l'innocuité de cet extrait.

Afin de séparer les globules rouges, le sang récolté dans des tubes héparines a été centrifugé à +4°C ,2000 rpm pendant 10 min.

Les érythrocytes sont ensuite lavés trois fois avec du tampon phosphate salin (PBS) pH 7,4 .Le culot obtenu est suspendu dans du PBS pour obtenir une hématocrite de 10 %.

Les globules rouges ont été incubés avec des concentrations de 100, 500 et 1000 µg/ml de l'extrait d'acétate d'éthyle pendant 15 min a 37 °C dans un incubateur agitateur.

Parallèlement, un contrôle positif représentant 100 % d'hémolyse est préparé par l'addition de l'eau distillé aux globules rouge. Le contrôle négatif comporte des globules rouges incubés avec le PBS.

Des aliquotes de ces globules rouge ont été centrifugés pendant 10 min à 2000 rpm et dilué avec du PBS et le pourcentage d'hémolyse a été évalué selon la formule citée précédemment.

Résultat et discussion

1 Screening phytochimique de *Cistanche tinctoria*

Tableau 1 : resultats du screening phytochimiques de *cistanchetinctoria.*

les tests phytochimiques		Extrait d'Actetate d'ethyle	Extrait methanolique	Extrait aqueux	Extrait de chloroforme	Extrait hexane
Metabolites secondaires	Réactifs					
Flavonoïdes	Mg^{++}	+++	+++	+++	++	++

+++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; Faiblement positif ; **-**Négatif

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de quelques métabolites secondaires au niveau de la racine de *Cistanche tinctoria*. La détection de ces composés biochimiques est basée sur des tests de solubilité, de changement de couleur par des réactifs spécifiques à la famille du composé recherché.

Une des caractéristiques des métabolites secondaires, est de montrer une répartition très inégale chez les différentes espèces végétales et pour une même espèce, selon la partie de la plante utilisée et la saison de récolte, par ailleurs leur distribution peut varier pendant le développement de la plante, ceci peut être à cause des conditions climatiques extrêmes, qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les flavonoides.

2 Pouvoir antioxydant évalué par le test DPPH

L'activité anti-oxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres tant décriée dans diverses pathologies. Dans le but de pallier le système de défense endogène, les recherches s'orientent dans la découverte de molécules antioxydantes. Ainsi pour évaluer l'activité antioxydante de nos extraits, nous avons employé la méthode au DPPH. Ce radical libre présente une coloration très sombre. Lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes, la forme réduite confère à la solution une coloration jaune pale.

Le virage vers cette coloration et l'intensité de la coloration de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance anti-radicalaire **(Ebrahimzadeh et *al*., 2010).**

L'activité antioxydante des différents extraits de la racine de *Cistanchetinctoria* des deux mois (janvier et avril) a été évaluée par le test DPPH$^{\cdot}$et ce par le suivi de la réduction de ce radical libre par différentes doses des extraits accompagnée d'un passage de couleur violette vers le jaune mesurable par spectrophotométrie UV /visible à 517 nm.

2.1 Comparaison inter saisonnière des activités antioxydantes

Afin de comparer le pouvoir anti radicalaire des extraits entre les deux saisons hiver et printemps, l'activité antioxydante a été évaluée pour deux échantillons des mois de janvier et avril représentatifs de ces deux saisons.

2.1.1 Activité antioxydante de l'extrait hexanique

Les résultats obtenus pour l'extrait hexanique sont présentés dans la figure suivante:

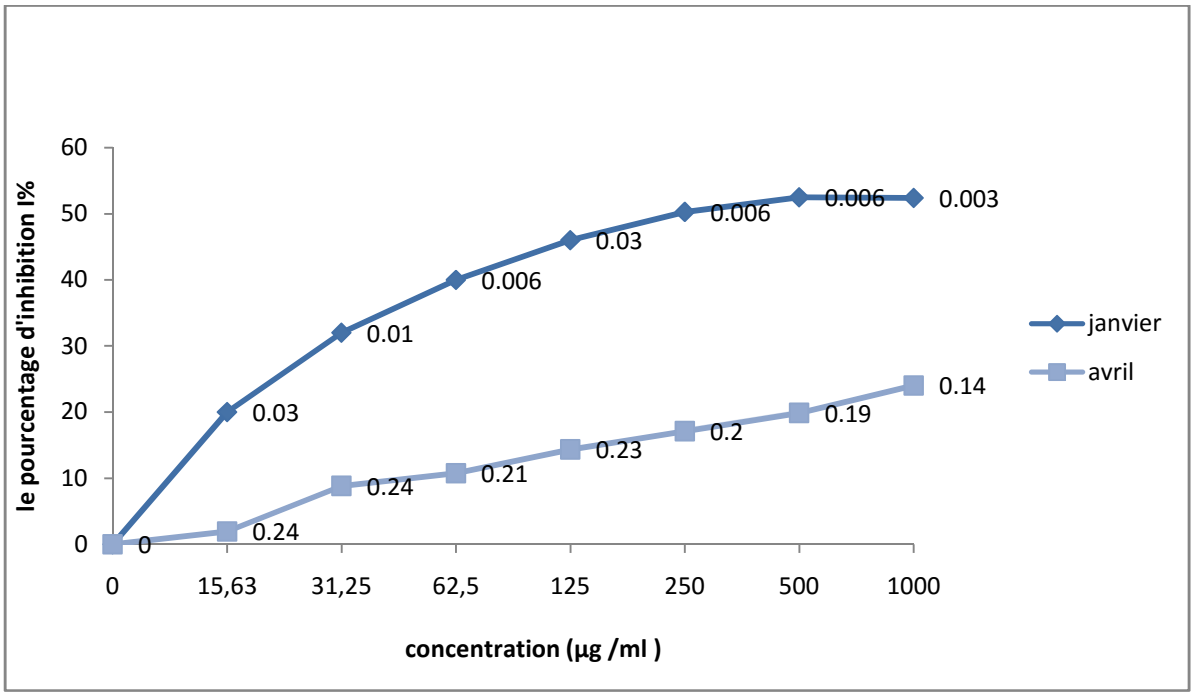

Figure 6: **Pourcentage d'inhibition %I en fonction de différentes concentrations de l'extrait hexadique des mois de janvieret avril.**

2.1.2 Activité anti oxydante de l'extrait de chloroforme :

Les résultats pour l'extrais chloroforme sont présentés dans la figure suivante :

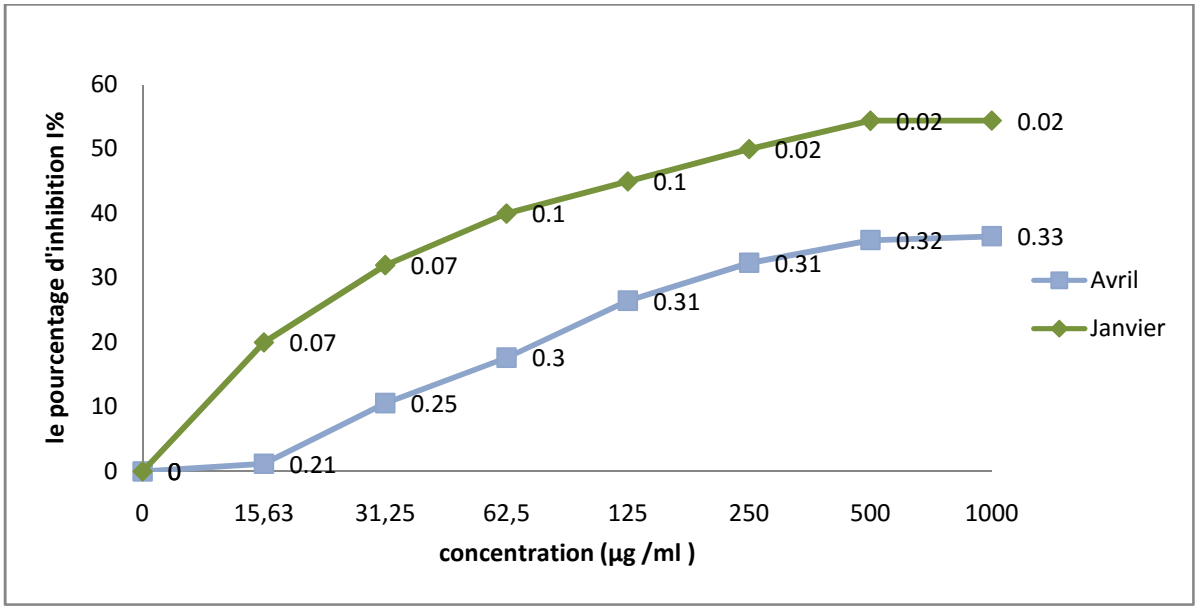

Figure7: Pourcentage d'inhibition %I en fonction de différentes concentrations de l'extrait chloroformique des mois de janvier et avril.

2.1.3 Activité anti oxydante de l'extrait d'acétate d'éthyle

Les résultats pour l'extrais d'acétate d'éthyle sontprésentés dans le graph suivant :

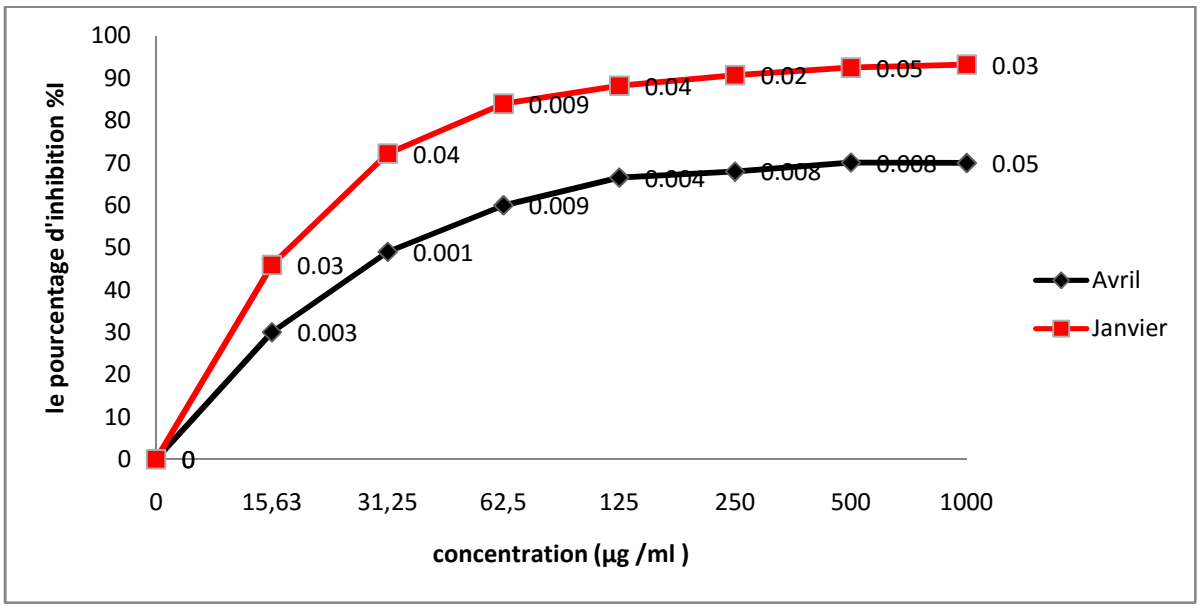

Figure 8: Pourcentage d'inhibition %I en fonction de différentes concentrations de l'extrait d'acétate d'éthyle des mois de janvier et avril.

2.1.4 Activité anti oxydante de l'extrait méthanoïque

Les résultats pour l'extrais méthanoïque présentés dans le graph suivant :

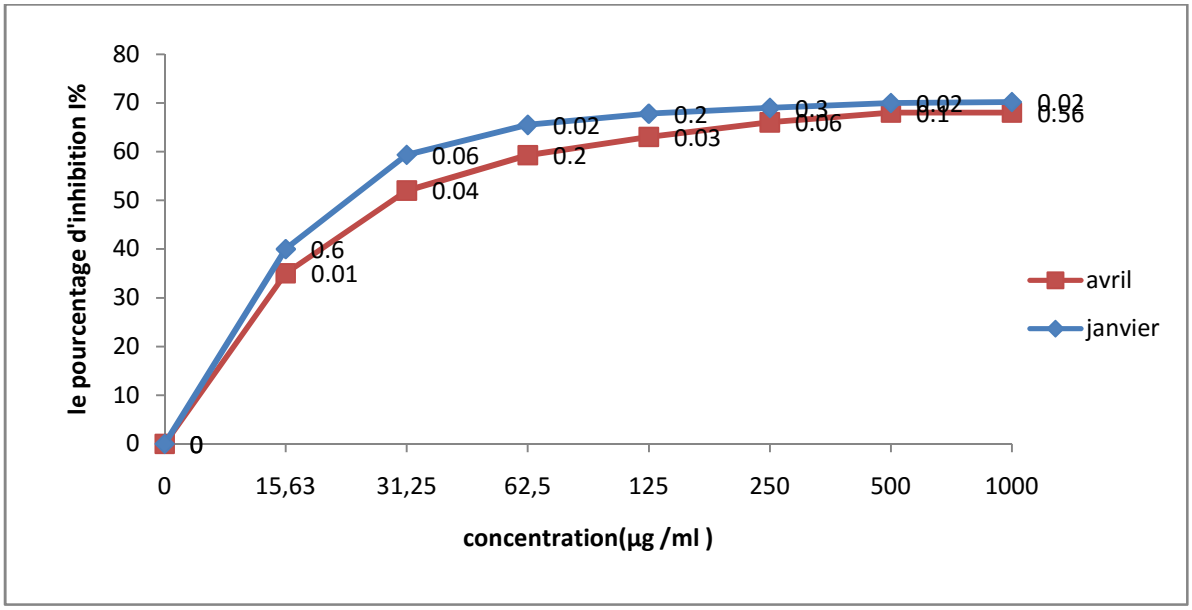

Figure 9: Pourcentage d'inhibition %Ien fonction de différentes concentrations de l'extrait méthanoïque des mois de janvier et avril.

2.1.5 activité anti oxydante de l'extrait aqueux

Les résultats pour l'extrais aqueux présentés dans le graph suivant :

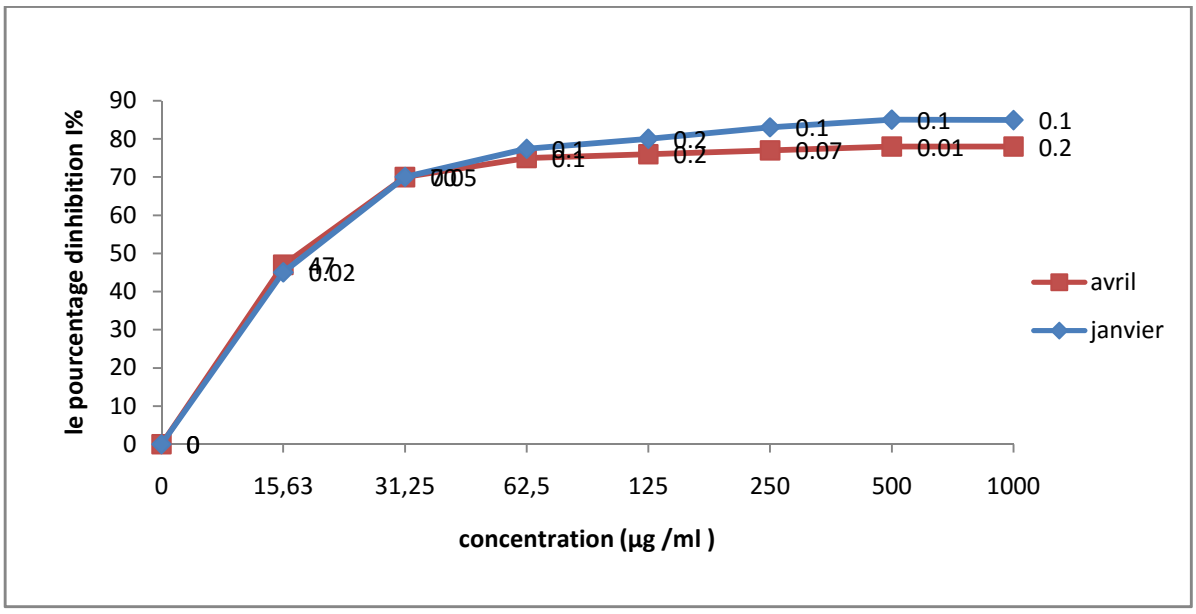

Figure 10: Pourcentage d'inhibition %I en fonction de différentes concentrations de l'extrait aqueux de janvier et avril.

Les figures représentant l'activité antioxydante des différents extraits présentent le même aspect global et montrent bien que l'ensemble de ces extraits est doué d'un pouvoir antioxydant qui reste cependant très variable.

En effet, les pourcentages d'inhibition du DPPH par les extraits des mois de janvier et avril augmentent de manière proportionnelle avec la concentration de ces derniers jusqu'aatteindre un plateau ou le %I présente une valeur maximale variable entre les saisons des mêmes extraits et ainsi que sur les différents extraits.

Tableau 2: Pourcentage d'inhibition %Imax des différents extraits

Extrait	**He/ J**	He/ A	**Ch/ J**	Ch/ A	**Ac/J**	Ac/ A	**Me/ J**	Me/A	**Aq/J**	Aq/A
%I max	**52,4**	24.03	**54.42**	36.47	**93.23**	70,1	**70.2**	68	**84.9**	78
Ϭ (%)	28,37		17,95		23,13		2,2		6,9	

%I max : pourcentage d'inhibition maximal, He : extrait hexanique, Ch : extrait chloroformique, Ac : extrait acétate d'éthyle, Me : extrait méthanolique, Aq : extrait aqueux, J :Janvier, A :avril, Ϭ (%) : différence de pourcentage entre les deux saison pour un même extrait

Les valeurs de %I maximaux **(Tab.2)** du mois de janvier de tous les extraits sont supérieures à ceux du mois d'avril. Ainsi ces résultats montrent que pour tous les extraits le pouvoir antioxydant est plus accentué chez les jeunes poussés de racine récoltées durant la saison hivernale par rapport aux racines du stade mature du mois d'avril. Cependant, cette variation saisonnière du pouvoir antioxydant semble être plus prononcée pour les extraits hexanique, chloroformique et acétate d'éthylepar rapport à ceux méthanolique et aqueux. En effet la différence dans le %Imax (Ϭ (%)) est de 28,37 ; 17,95 et 23,13 respectivement pour les trois premiers. Ces différences sont plus importantes que celles retrouvées pour les extraits méthanolique et aqueux (2,2 et 6,9%).

Nos résultats montre un pouvoir antioxydant plus important pour l'échantillon récolté durant la saison hivernale ce qui serait liée directement à la variation de la composition en métabolites secondaires qui serait plus importante durant cette saison pour certains métabolites ou encore à l'apparition de métabolites spécifiques a cette saison dotes de pouvoir antioxydant. Dans ce contexte les travaux de Slimestad et Verheuil (2005) ont montré que la composition des plantes en métabolites secondaires et notamment en antioxydants varie au cours des différentes saisons et les teneurs en acide chlorogénique, en rutine ou en naringéninechalcone, pouraient être multipliées par trois en fonction de la date de récolte . Ces variations saisonnières sont attribuables entres autres aux conditions de lumière et de température **(Riga et *al*., 2008).**

Par ailleurs, la température peut modifier les teneurs en polyphénols chez les plantes, un stress thermique semblerait apparaître, causant l'accumulation de composés phénoliques tels que les flavonoïdes et les acides hydroxycinnamiques. En effet, un stress thermique provoqué par des températures froides (4°C) ou élevées entraîne une augmentation des activités PAL (Phénylalanine AmmoniaLiase) et CHS (ChalconeSynthase) qui a pour conséquence d'augmenter les teneurs en composés phénoliques **(Leyva et *al*., 1995).**

En outre, l'oxydation des composés phénoliques par les polyphénols oxydases (PPO) et peroxydases (POD) est inhibée, ce qui maximise l'accumulation des polyphénols. **(Rivero et *al*., 2001).**

2.2 Comparaison de l'activité antioxydante des différents extraits

Afin d'étudier l'effet du solvant d'extraction sur la capacité antioxydante et de déterminer le solvant présentant une capacité optimale nous avons comparé les IC50 des différents extraits du mois de janvier de la saison hivernale extrapolés à partir des courbes représentatives des %I en fonction des différents concentrations des extraits.

La figure 11 illustre la différence entre le pouvoir anti radicalaire (anti-DPPH$^{\cdot}$) des différents extraits issus du mois de janvier.

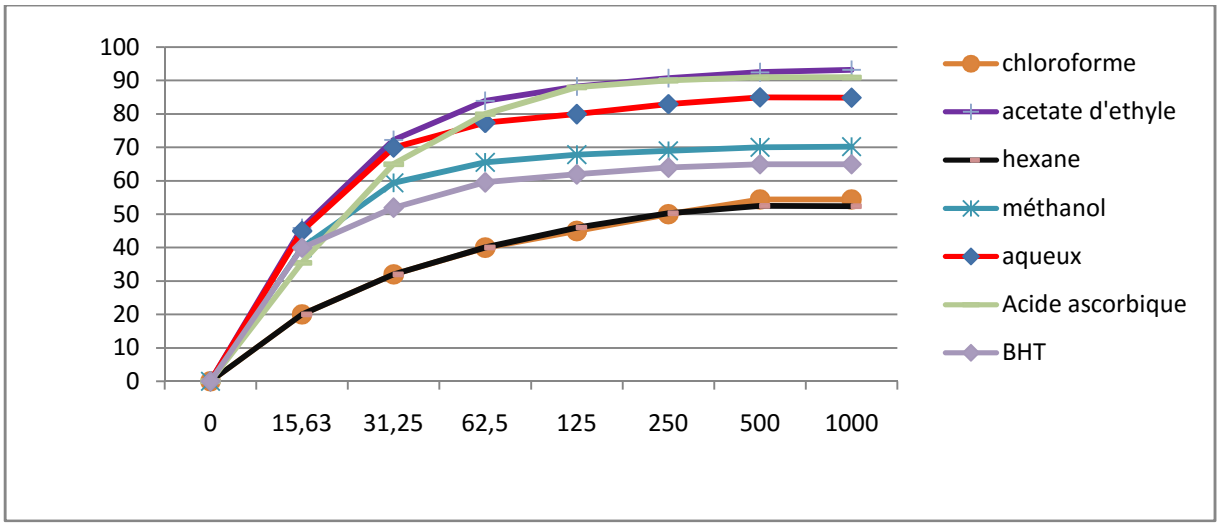

Figure 11: représente les %I en fonction des concentrations pour les différents extraits de mois de janvier

Les pouvoirs antioxydants de ces différents extraits par rapport les antioxydants de référence (acide ascorbique et BHT) ont été également évalués.

La figure suivante montre les IC_{50}des différents extraits :

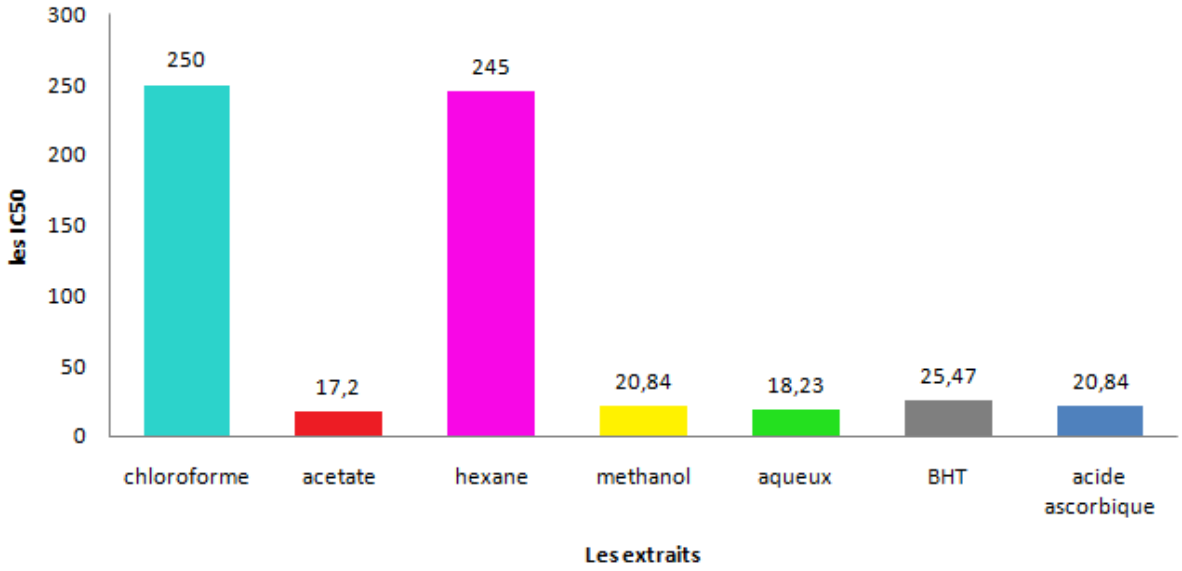

Figure12 :Histogramme qui représente les IC_{50} des différents extraits et de L'acide ascorbique et de BHT.

L'évaluation de l'activité antioxydante par le paramètre IC_{50} est inversement proportionnelle à l'action anti radicalaire (anti DPPH$^{\cdot}$), un IC_{50} faible correspond à une activité antioxydante élevée et vice-versa.

Nos résultats montrent que l'IC_{50} de l'extrait acétate d'éthyle, l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique est bien inferieur et/ou égale à celui du BHT et l'acide ascorbique ce qui suggère que ces trois extraits exerce un effet antioxydant aussi puissant que celui des standards de référence. Par contre, les extraits hexanique et chloroformique présentent des IC50 plus élevés ce qui montre que leurs activité anti radicalaire est plus faible.

L'analyse des IC50 montrent que le pouvoir antioxydant le plus important est attribué à l'extrait acétate d'éthyle suivi de l'extrait aqueux et méthanolique. Enfin les extraits hexanique et qui présente un faible pouvoir antioxydant et comparable.

Ces différences de potentiel antioxydant entre les extraits peuvent être dues à la variation de la composition des extraits en molécules anti-oxydantes.
(Ribereau-Gayon, 1968 ; Gulcin, 2006).

Le screening phytochimique realisé par de Nisrine El Allagui et *al* (2007) permet de mettre en évidence les métabolites secondaires de cinq espèces appartenant à la famille des Orobanchacée. L'extraction et la révélation de ces composés font appel à un ensemble de solvants et de révélateurs. Le chloroforme est un solvant qui peut extraire majoritairement les composés cyanogènes et les coumarines, l'hexane permet l'extraction des terpènes, le méthanol est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes,des alcaloïdes et des tanins.L'eau peut extraire certains composes en commun avec le méthanol en plus des molécules les plus polaires et les saponines**.** Tous ces métabolites exercent des effets antioxydants variables. **(El Allagui et *al*.,2007)**

Les flavonoïdes, molécules ubiquitaires du règne végétal, sont les antioxydants majeurs des végétaux, contribuant ainsi à l'effet bénéfique sur la santé humaine de la consommation régulière d'aliments d'origine végétale **(Pietta, 2000 ; Rice-Evanset *al.*, 1996)** Cet effet est notamment dû à leur capacité à inhiber des enzymes responsables de la production des ERO mais aussi à leur capacité à piéger ou à stabiliser les radicaux libres **(Pietta, 2000)**. ce qui prouve l'activité anti radicalaire élevé dans l'extrait d'acétate d'éthyle par rapport aux autre extraits qui sont pauvre en flavonoïdes.

D'après les travaux Dakhlaoui et *al* en (2014) acétate d'éthyle a pus extraire, 6 composés qui ont été identifiés. Les constituants majoritairement représentés sont des acides phénoliques de la sous-classe des acides hydroxy-cinnamiques suivi par les flavonoïdes. Les

composés majoritairement représentés sont l'apigénine et l'acide syringique, connus pour leurs propriétés antimutagéniques, antimicrobiennes et **antioxydantes**. **(Jdey et *al*., 2014).**

3 Pouvoir hémolytique de l'extrait d'acétate d'éthyle

La figure ci-dessous présente le pourcentage d'hémolyse des érythrocytes qui ont été incubés 15 minutes à 37 °C , en présence des différentes concentrations croissante de l'extraits d'acétate d'éthyle, et traité avec 0,5 mM de HOCL dilué dans le PBS , comparé à deux tubes contrôle, un contrôle positif contenant le suspension érythrocytaire et le HOCl, et un contrôle négatif contenant la suspension érythrocytaire et le PBS.

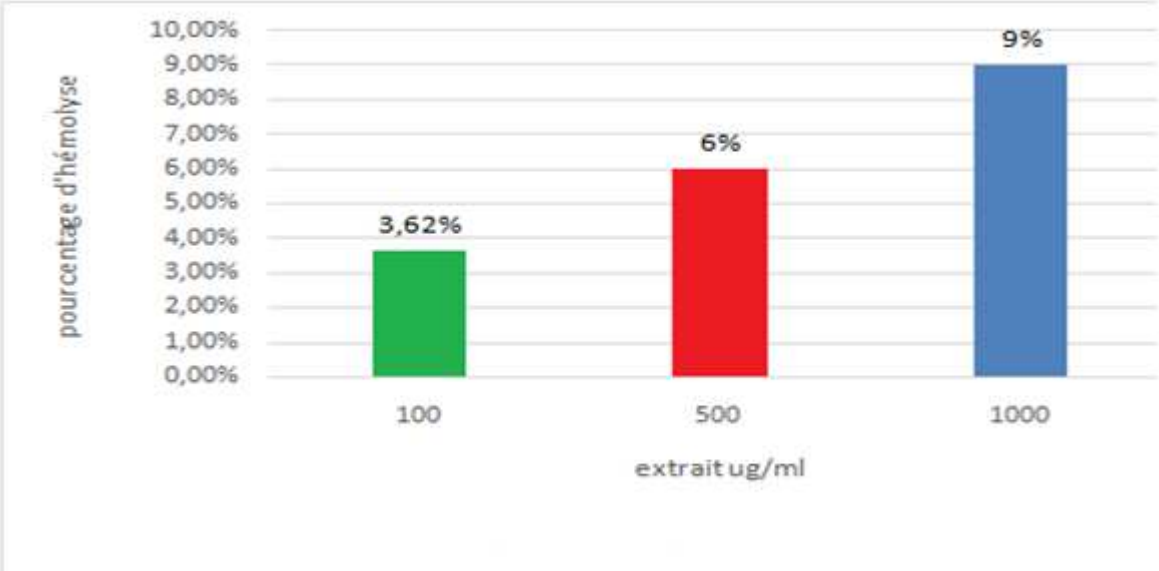

Figure 13 Taux d'hémolyse dans les tubes contenant les suspensions érythrocytaires en présence de l'extrait d'acétate d'éthyle de la *Cistanchetinctoria* préparé en concentrations croissantes.

D'après les résultats obtenus, nous avons enregistré des augmentations des taux d'hémolyse après incubation des érythrocytes isolés dans le PBS en présence de l'extrait en fonction des concentrations. Ces augmentations enregistrées sont significatives par rapport au taux d'hémolyse dans le tube de contrôle négatif où l'hémolyse est quasiment nulle, mais ce taux d'hémolyse est relativement faible et négligeable.

Conclusion

Notre étude a été réalisée dans le but de contribuer à l'évaluation du pouvoir antioxydant des racines *Cistanche tinctoria* des deux saisons.

Tous les extrait obtenues par la méthode d'extraction soxhlet montrent un pouvoir antioxydant, les jeunes racines de saison hivernale correspondants au mois de janvier montrent un pourcentage d'inhibition du radical DPPH nettement plus important que celui des racines récoltées au mois d'avril et cela pour tous les extraits.

Ainsi, la récolte des racines de *Cistanche tinctoria* a des fins thérapeutiques nutritionnelles ou autre idéal durant la saison hivernal ou la synthèse des métabolites secondaires est maximale.

Par ailleurs, après évaluation des IC50, les extraits qui ont donnée un effet antiradicalaire le plus important sont les extraits semi polaire et polaire, l'acétate d'éthyle puis l'eau puis le méthanol suivie par les extrait apolaire hexane puis et le chloroforme qui ont fait un effet plus faible , cela nous mène a conclure que les composés bioactifs de cette plante sont pour la majeure partie semi polaires et polaires.

En perspective a notre étude il sera intéressant de :

-Evaluer l'activité antioxydante par d'autres tests FRAP, ABTS.

-Etudier l'aspect quantitatif des métabolites secondaire par le dosage de polyphénols etc.

-Etudier la composition chimique des extraits.

A

Abderrazak M et Joël R., (2007). La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris.177p**.**

B

Barboni T., (2006). Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Corse, p26.

Barouki. R. (2006). Stress oxydantet vieillissement. Medecine/sciences, 22 : 266-72

Beck, Gunther von Mannageta and Lerchenau., (1904). Cistanche tnctorria (forssk). Catalogue of the vascular plants of Madagascar, Bulletin de l'Herbier Boissier II, 4:685.

Bediga M., (2011). etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de Nauclea Latifolia smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali . thése de doctora. Universit de bamako . p 10.

Bellakhdar, J., (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaire. IBIS Press. 764p.

Benaissa O. (2011). Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres Chrysanthemum et Rhantherium. Activité Biologique, Thèse Doctorat, université Mentouri Constantine. 63p.

Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Delattre, J. (2003) Radicaux libres et anti-oxydants.In: Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires. Médecine-sciences.Flammarion (Ed). Paris, pp 59-81

Booth, N.L., Dejan, N., Richard, B., Stoci, E. (2004). New lanthanide complexes of 4 methyl 7 hydroxy coumarin and their pharmacological activity. Clinical Pharmacology and Therapeutics. p50, 120-123.

Brand-william W, Cuvelier ME, Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmmittel Wissenschaft und Technologie, 28: 25-30.

Bruneton, J. (2008) Pharmacognosie, Phytochimie, Plante médicinales. Lavoisier Technique & Documentation, 3ème éd., Paris, pp. 1120.

C

Chamiec T. (1996). Effects of antioxidant vitamins C and E on signal-averaged electrocardiogram in acute myocardial infarction. Am JCardiol; 77: 237-41.

Cyril, T. (2001).étude des métabolismes primaires et secondaires de racines transformées de Catharanthus Roseusen, vue du développement d'un modèle cinétique, université de Montréal. 28p.

D

Deina, M., Rosa, A., Casu, V., Cottiglia, F., Bonsignore, L. (2003). Natural product: their chemistry and biological significance. Journal of the American Oil Chemistry Society. 80:65-70

Diallo A. (2005). Etude de la phytochimie et des activites biologiques de *Syzygium guineense*willd. (*MYRTACEAE*). Thèse de Doctorat. Mali.

Domart A ; Bourneuf J., (1988). Nouveau Larousse des plantes médicinales. Librairie Larousse. Paris.

E

Ebrahimzadeh M. A., Nabavi S. F., Nabavi S.M., Mahmoudi M., Eslami B. and Dehpour A. A. (2010). Biological and pharmacological effect of Delphinium elbursense. Afr. J. of biotechnol.,9 (34):5542-5549.

El Allagui N., Tahrouch S., Bourijate M., Hatimi A. (2007). "Action de différents extraits végétaux sur la mortalité des nématodesà galles du genre Meloidogyne ssp. "Acta Botanica Gallica 154:4, 503-509.

F

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

Ford R.A; Hawkins D.R; Mayo B.C; Api A.M., (2001). The in vitro dermal absorption and metabolism of coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. Food and Chemical Toxicology. 39 p 153-162.

G

Gulcin I (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). Toxicology., 217:213-220.

H

Hoffman, L. (2003). Etude du métabolisme des phénylpropanoides. Thèse de doctorat. Strasbourg. 245p.

Horde. P. (2014). Hémolyse – Définition. sante-medecine.commentcamarche.net.

J

Jdey A., Falleh H., Dakhlaoui S. (2014)." Characterization of antioxidant and antityrosinase activities of six plant species originating from middle-east of Tunisia (Sidi Bouzid)." Plantes Extrêmophiles 220.

K

Kansole M., (2009). Etude ethnobotanique, phytocuimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de Leucas martinicansis (Jacquin) R. Brown, Hoslundia oppossta vahl et Orthosiphon pallidus royle ex benth. Mémoire pour obtenir un diplôme Diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.

Koechlin-Ramonatxo, C. (2006) Oxygène, stress oxydant et supplémentations anti-oxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*. 20: 165-177.

L

Leyva A., Jarillo J. A., Salinas J.Martinez-Zapater J. M. (1995). "Low temperature induces the accumulation of Phenylalanine Ammonia-Lyase and Chalcone Synthase mRNAs of Arabidopsis thaliana in a light-dependent manner." Plant Physiology 108: 39-46.

Lutige U., Kluge M., Bauer G.,(2002). Botanique 3ème Ed : Technique et documentation. Lavoisier .Paris. 211p.

M

Macheix, J.-J., Fleuriet, A. and Jay-Allemand, **C., (2005)** Les composés phénoliques végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausane, pp. 192.

Malecky, M. (2005). Métabolisme des terpenoïdes chez les caprins, thèse Pour obtenir le grade de docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro Paris Tech. p 9, 13-19, 20, 27.

Mansouri N., Satrani B., Ghanmi M., Elghadraoui L., Guedira A. et Aafi A.(2011). Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydane de l'huile essentielle de juniperus communis du maroc. Bulletin de la Société des science de liège, Vol. 80 : 791-805.

M.A. Ribeiro, M.G. Bernardo-Gil and M.M. Esquı vel., Melissa officinalis, L. (2001). study of antioxidant activity in supercritical residues, Journal of Supercritical Fluids, 21 51 – 60.

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

Morel Y, Barouki R. (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. Biochem J; 342 : 481-96.

O

Omulokoli E; Khan B; Chhabra S.C., (1997). .Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 56 p 133-137.

Ozenda,p., (1991). Flore et végétation du Sahara. Ed. CNRS, Paris. 662 p.

P

P**aris M et Hurabielle., (1981).** Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie. Tome 1. Ed Masson. Paris.pp: 102-103-104-107.

Penchev P. (2010). Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions, Thèse Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.129p.

Pietta, P.-G. (2000) Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products, 63(7), 1035-1042.

Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O. (2002) Mécanismes physiologiques de la défense anti-oxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*. **16**: 233-239.

Pincemail J. (1998) Espèces oxygénées en médecine humaine: une approche didactique. Vaisseaux, Cœur, Poumon; 3: 133–8.

Pincemail, J. (1995). Free radical, antioxidants and human diseases. In: Favier A et al, editors. Analysis of Free Radicals in Biological Systems. Basel, London, Boston: Berlin Birkhäuser;. p. 83-98

Q

Quezel, P., Santa S., (1963). Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In: CNRS (Ed.), Vol. 1-2. Paris**.**

R

Ribereau ,G.P., (1968). Les composés phénoliques des végétaux, Dunod, Paris, p254.

Ribereau-Gayon P, (1968). Les composes phénoliques des végétaux. Edition Dunod, Paris, pp 254

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine, 20(7), 933-956

Riga P., Anza M.Garbisu C. (2008). "Tomato quality is more dependent on temperature than on photosunthetically active radiation." Journal of the Science of Food and Agriculture 88: 156-166.

Rivero R. M., Ruiz J. M., Garcia P. C., Lopez-Lefebre L. R., Sanchez E.Romero L. (2001). "Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants." Plant Science 160: 315-321.

S

Sanchez-Moreno C., Larrauri Jose A ., Saura-Calixto F. (1998). A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 76(2)*, 270-276.

Sitouh, M., (1989). Les plantes utiles du Sahara. Ann. Inst. Nat. Agro. El Harrach, Alger, vol. 13, n°2.

Slimestad R.Verheul M. J. (2005). "Seasonal variation in the level of plant constituents in greenhouse production of cherry tomatoes." Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 3114-3119.

T

Takamatsu S. (1995). Effects on health of dietary supplementation with 100 mg of alpha-tocopheryl acetate daily 6 years. J Intern Med Res; 23: 342-57.

Y

Yong J, Peng-F., (2009). Analysis of chimical constituents in cistanche species. School of pharmaceutical Sciences, Peking University Health Science center, Beijing 100191, China.

Résumé

Cistanche tinctoria est une plante qui possède plusieurs propriétés pharmacologique qu'on peut exploiter et ce bénéficier de leurs avantages sur le corps humain. L'oxydation qui est un phénomène naturelle résultant de plusieurs réactions chimiques naturelles déroulant au niveau notre corps est la cause principale de plusieurs maladies que l'humanité soufre dans le temps moderne. La nécessité de trouvé des substances qu'on appel substance antioxydante qui peuvent réduire ou éliminé les conséquences dévastatrice de stress oxydatif augmente jours après jours. *Cistanche tinctoria* est une plante qui possède un effet antioxydant considérablement fort mais qu'il ce varis en fonction de la saison de la récolte et l'extrait utilisé avec un effet hémolytique qui reste négligeable.

Summary:

Cistanche tinctoria is a plant was had several a lot of pharmacological Proprieties that we may exploited for there avantages for the human body. The oxidation is natural phenomena it result for lot of chemical reaction making in our body level is the principal cause for a lot of new human diseases in modern time. The necessity to find a natural antioxidant substance they has the power to destroy the consequence of oxidative stress increases day after day. *Cistanche tinctoria* is the plant that she has a great antioxidant effect but its different between seasons harvest and extract solvent she have a negligible hemolytic effect bat this effect .

ملخص :

الدانون هو نبات يحتوي على العديد من الخصائص الدوائية التي يمكن استغلالها لما فيها فوائد على جسم الإنسان. الأكسدة وهي ظاهرة طبيعية ناجمة عن عدة تفاعلات كيميائية طبيعية التي تحدث في جسمنا وهي السبب الرئيسي للكثير من الأمراض التي تعاني منها البشرية في الوقت الحالي لدا أصبح العثور على عناصر و التي تدعى مضادات للأكسدة والتي قد تخفض أو تقضي على الآثار المدمرة للأكسدة□اجة تزيد يوما بعد يوم.

الدانون هو النبات الذي له تأثير مضاد للأكسدة قوي بشكل معتبر ولكن هذا□سب موسم القطف والمستخرج المستعمل مع تأثير الانحلالي لا يكاد يذكر.