



Figure 2 : Schéma de l'extraction par Soxhlet.	P.9
Figure 3 : phase d'initiation.	P.14
Figure 4 : Phase de propagation.	P.14
Figure 5 : Phase de terminaison.	P.14
Figure 6 : Structure de la vitamine C.	P.16
Figure 7 : Structure de la vitamine E.	P.16
Figure 8 : Structure du β -carotène.	P.17
Figure 9 : Structure générale du noyau des flavonoïdes.	P.17
Figure 10 : Structure de la gallate d'épigalocathéchine.	P.18
Figure 11 : Noyau de base des coumarines.	P.18
Figure 12 : Structure du resvératrol.	P.19
Figure 13 : Structure de la manguiférine.	P.19
Figure 14 : Antioxydants de synthèse les plus utilisés.	P.20
Figure 15 : Daphne gnidium de Beni Ammart.	P.23
Figure 16 : O. elongatum de Beni Ammart.	P.25
Figure 17 : Cistus salviifolius.	P.26
Figure 18 : Schéma de l'extracteur Soxhlet.	P.28
Figure 19 : Evaporateur (BÜCHI).	P.29
Figure 20 : Photo sonde immergée dans l'échantillon.	P.30
Figure 21 : l'appareil de sonication.	P.30
Figure 22 : Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive.	P.32
Figure 23 : structure de l'acide gallique.	P.34
Figure 24 : structure quercétine	P.34
Figure 25 : Photo du rat Wistar anesthésié et placé en décubitus.	P.35
Figure 26 : Ouverture de la cavité abdominale et perfusion du LVM.	P.35
Figure 27 : Lit mésentérique mis en évidence par une perfusion colorée par du bleu de méthylène.	P.36
Figure 28 : Ensemble du montage utilisé lors de la perfusion du lit mésentérique.	P.37
Figure 29 : Rendement de l'extraction par soxhle.	P.38
Figure 30 : Rendement de l'extraction par Sonication.	P.39



Figure 31 : Rendements de l'extraction de la <i>D. gnidium</i> par les deux méthodes d'extraction.	P.39
Figure 32 : Rendements de l'extraction par Sonication pour les trois plantes.	P.40
Figure 33 : Courbe d'étalonnage d'AG.	P.41
Figure 34 : Courbe d'étalonnage du Quercitine.	P.41
Figure 35 : Teneurs en polyphénols des extraits de <i>D. gnidium</i> par sonication et par soxlhet.	P.42
Figure 36: Teneurs en flavonoïdes des extraits de <i>D. gnidium</i> par sonication et par soxlhet.	P.42
Figure 37 : Teneurs en polyphénols des extraits des extraits d' <i>O.elongatum</i> et <i>C. salviifolius</i> .	P.43
Figure 38 : Teneurs en flavonoïdes des extraits d' <i>O.elongatum</i> et <i>C. salviifolius</i> .	P.43
Figure 39 1: Pouvoir antioxydant des extraits de <i>D. gnidium</i> et du BHT en fonction de la concentration, selon le test au DPPH.	P.45
Figure 40 : CI ₅₀ des extraits de <i>D. gnidium</i> par sonication et par soxlhet.	P 45
Figure 41 2: Pouvoir antioxydant des extraits des plantes 2 et 3et du BHT.	P 47
Figure 42 : CI ₅₀ des plantes 2 et 3	P.47
Figure 43 : Effet vasodilatateur de l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>D gniduim</i>	P.48
Figure 44 : Effet vasodilatateur de l'extrait méthanolique d' <i>O elongatum</i> .	P.49
Figure 45 : Effet vasodilatateur de l'extrait d'acétate d'éthyle d' <i>O elongatum</i> .	P.49
Figure 46 : Effet vasodilatateur de l'extrait de dichlorométhane de <i>C.salviifolius</i> .	P.50



Liste Des Tableaux

Tableau 1 : Liste des principaux oxydants.	P.12
Tableau 2 : Principales sources de production des radicaux libres.	P.13
Tableau 3 : Matériel végétal étudié.	P.27
Tableau 4 : Rendements des différents extraits.	P.38
Tableau 5 : Rendements des extraits.	P.38
Tableau 6 : tableau récapitulatif regroupant les rendements des différents extraits.	P.40
Tableau 7 : Quantité des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits de Daphne gnidium pour les deux méthodes d'extraction.	P.42
Tableau 8 : Quantités des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits de la plante 2 et la plante 3.	P.43
Tableau 9 : Pouvoir d'inhibition du DPPH par les extraits de D. gnidium et par le BHT.	P.44
Tableau 10 : Pouvoir d'inhibition du DPPH par chaque extrait et par le BHT	P.46



Liste des abréviations

Ach	: Acétylcholine.
AG	: acide gallique.
AlCl₃	: chlorure d'aluminium.
BHA	: 3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole.
BHT	: 3,5-ditertiobutyl-4-hydroxytoluène.
CaCl₂	: Chlorure de calcium.
CLHP	: Chromatographie liquide à haute performance
CG/SM	: Chromatographie en phase gazeuse-Spectrométrie de masse
DPPH	: 2,2diphényl-1-picrylhydrazyl.
ERO	: Espèces réactives oxygénées.
CI50	: Concentration inhibitrice à 50%
KCl	: Chlorure de potassium.
KH₂PO₄	: Dihydrogénophosphate de potassium.
LVM	: Lit vasculaire mésentérique.
MgSO₄	: Sulfate de magnésium.
NaCl	: Chlorure de sodium.
Na₂CO₃	: Carbonate de sodium.
NaNO₂	: nitrite de sodium.
NaOH	: Hydroxyde de sodium.
PAM	: Plante médicinale et aromatique.
PHE	: Phényléphrine.
PG	: Gallate de propyle.



I. Plantes aromatiques et médicinales(PAM)	4
1. Généralités.....	4
2. Définitions des plantes médicinales et aromatiques.....	4
3. Domaines d'application des plantes médicinales.....	5
4. Plantes aromatiques et médicinales au Maroc.....	5
II. Différents procédés d'extraction des principes actifs des plantes	6
1. Définitions.....	6
1.1 Extraction	6
1.2 Principes actifs	6
2. Techniques d'extraction des principes actifs des plantes.....	7
2.1 Techniques traditionnelles	7
2.2 Techniques conventionnelles.....	8
2.3 Techniques nouvelles.....	10
III. Oxydants	12
antioxydant	12
1. Oxydants	12
1.1 Origine des radicaux libres.....	12
1.2 Stress oxydant.....	13
1.3 Mécanisme d'oxydation.....	14
2. Antioxydants.....	15
2.1 Définition.....	15
2.2 Caractéristiques des antioxydants.....	15
2.3 Mode d'action des antioxydants.....	15
2.4 Sources d'antioxydants.....	16
2.4.1 Source alimentaire.....	16
2.4.2 Molécules naturelles antioxydantes.....	17
2.4.3 Antioxydants synthétiques.....	19
2.5 Rôle des antioxydants dans la prévention des accidents vasculaires cérébrales et l'hypertension artérielle.....	20
Partie expérimentaux.....	21
Chapitre I: Matériel	22
méthodes	22
I. Matériel végétal	22
1. Identification botanique des espèces végétales étudiées.....	22
1.1 <i>Daphne gnidium</i>	22
1.2 <i>Origanum elongatum</i>	24
1.3 <i>Cistus salviifolius</i>	26
2. Collecte et conservation.....	27
II.méthodes d'extraction	28
1. Extraction par Soxhlet.....	28
2. Extraction par sonication.....	30
3. Calcul du rendement.....	31



III. Tests biologiques.....	32
1. Test d'activité antioxydante.....	32
1.1 Mesure du pouvoir anti-radicalaire par le test DPPH *.....	32
1.2 Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux.....	33
2. Activité vasodilatatrice.....	35
2.1 Préparation du lit vasculaire mésentérique.....	35

Chapitre	II:	Résultats	et
discussion.....		38	
I. Rendements des extractions.....		38	
1. Soxhlet.....		38	
2. Sonication.....		38	
3. Comparaison entre le rendement des deux méthodes d'extraction pour <i>Daphne gnidium</i>		39	
4. Rendement d'extraction des trois plantes par sonication.....		40	
II. Analyse quantitative des polyphénols et flavonoïdes.....		41	
III. Activité antioxydante.....		44	
IV. Activité vasodilatatrice.....		48	
Conclusion et perspectives.....		51	



Références Bibliographiques



Références Bibliographiques

- [1]: **MEZITI ASMA (2009)**, Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa L* Étude *in vitro* et *in vivo*, UNIVERSITE EL-HAJ LAKHDAR BATNA
- [2]: **BENBRINIS Soumia (2012)**, Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de *Santolina chamaecyparissus*, UNIVERSITE FERHAT Abbas-SETIF.
- [3]: **Petko Ivanov PENCHEV.(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)
- [4]: **Plantes Aromatiques et Médicinales (2014):**



<http://www.apia.com.tn/pdf/aromaticplante.pdf>

[5]: **Jean-Christophe tardivonet Chadouli si-MohaMed (2014)**:«Les plantes aromatiques et médicinales», http://www.latITUDE21.fr/sites/default/files/livret_pam_web_0.pdf

[6]: **LAMNAOUER D,(2010)**., Plantes médicinales du Maroc : Usages et toxicité.Art. BP 6202, inst. Rabat. Maroc

[7]: **Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D. et Guo Z. (1986)**, Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé*, 159-164.

[8]: **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.

[9]: **Litim Afaf (2012)**, Biodiversité et Étude Ethnobotanique dans le Parc National de Belezma (Batna). p21.

[10]: **BAHORUN T. (1997)**, Substances naturelles actives : La flore Mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Article. Univ. Maurice.

[11]: **association ansys (04/2014)**, « plante médicinale »:

http://associationansys.org/index.php?option=com_content&task=view&id=33&Itemid=63

[12]: Extraction des espèces chimiques (03/2014):

<http://www.physagreg.fr/Cours2nd/Chimie/Theme1/Cours/Chimie-Chapitre2-extraction.pdf>

[13]: **N. BOULENOUAR, A. MAROUF, A. CHERITI (2011)**, phytopathologie fongique et métabolites secondaire, Laboratoire de Phytochimie et Synthèse Organique Université de Bechar, Bechar 08000, Algérie

http://www.academia.edu/1998712/Phytopathologie_Fongique_et_Metabolites

[14]: **Méthodes d'extraction des principes actifs (3/2014) :**

<http://cletpe.e-monsite.com/pages/i-b-methodes-d-extraction-des-principes-actifs.html>

[15]: **Mode d'extraction de principe actif (3/2014):**

<http://phyto-tpe.e-monsite.com/pages/mode-d-extraction-du-principe-actif.html>

[16]: **Les différents procédés d'extraction des principes actifs des plantes (3/2014):**

<http://nathaliepirioudeslandes.wordpress.com/2012/10/18/les-differents-procedes-dextraction/>

[17]: **Petigny Antoine (2011):**

<http://web04.univ-lorraine.fr/ENSAIA/marie/web/ntic/pages/2011/petign.html>



- [18]: **Maître des Conférences des Universités, I.Hininger-Favier, (2014)** « Le Stress oxydant », Laboratoire de Biologie du stress Oxydant. Faculté de Pharmacie. Grenob :
http://www.iep-eu.com/img-user/Stress_oxydant.pdf
- [19] :**Gutteridge, J.M. (1993)**. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence, *Free Radic Res Commun*, 19:141-158.
- [20]: **BOUGANDOURA Nabila (2011)**, « Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Saturejacalaminthassnepta* (nabta)et *Ajugaiva L.* (chendgoura) de l'ouest d'Algérie.) »
- [21]: **Justine, Odile, Carole PASTRE (2005)**: INTERÊT DE LA SUPPLEMENTATION EN ANTIOXYDANTS DANS L'ALIMENTATION DES CARNIVORES DOMESTIQUES, *l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*, page 14
- [22]: **Durackova Z., Djrolo F., Hougbe H., Avode G., Attoulou V., Addra B., Kodjoh N., Avimadj M., (2008)**. Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. *Mitochondrial medicine*. Gvozdkakova A (ed). P :19-43.
- [23]: **Barouki R. (2006)**. Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/sciences* n°3, vol.22, 266-72.
- Baskin S.I and Salem H.(1994)**. Oxidant, Antioxidant and Free Radicals. *Academic pressInc.* 363 (25-62).
- Jenkins A.J., Hill M.A. and Rowley K.G. (2007)**. Diabetes and Oxidant Stress. *Atherosclerosis and Oxidant Stress. A New Perspective*. Holtzman J.L (ed).p123-160
- [24]: **Durackova Z., Djrolo F., Hougbe H., Avode G., Attoulou V., Addra B., Kodjoh N., Avimadj M., (2008)**. Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. *Mitochondrial medicine*. Gvozdkakova A (ed). P :19-43.
- [25]: **Abuja P.M and Albertini R. (2001)**. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta* 306 (1-17).
- Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO. (1999)**. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons.*; 4(5)
- [26]: **HUANG D., OU B, and PRIOR R.L. (2005)**. "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53** (6): 1841-1856.
- [27]: **Ursini F., Tubaro F., Rong J and Sevanian A. (1999)**. Optimization of nutrition: Polyphenols andvascular protection. *Nutrition reviews*. Vol 57, n°8: 241-249.



- [28]: GARDES-ALBERT, M., BONNEFONT-ROUSSELOT, D., ABEDINZADEH, Z., JORE, D. (2003). "Espèces réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?" L'actualité chimique, novembre-décembre 2003
- [29]: Colette E. (2003). Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse Pharmacie Bamako. 147 P.
- [30]: Ahamet S. (2003). Etude phytochimique et des activités biologiques de *Balanites aegyptiaca* L. (*Balanitaceae*). Thèse Pharmacie, Bamako; 117 P.
- [31]: Igor Passi L B. (2002). Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxyloides* Lam. (*Rutaceae*). Thèse Pharmacie, Bamako ; 133 P
- [32]: Cavin A. (1999). Investigation phytochimique de trois plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydante et antiradicalaire : *Tinospora crispa* (Ménispermacées), *Merremia emarginata* (Convolvulacées) et *Oropea enneandra* (annonacées). Thèse de Doctorat, Lausanne, 241 P
- [33]: Sidibé F. (2003). Etude phytochimique et pharmacologique de *Stereospermum kunthianum* Cham. (*Bignoniaceae*). Thèse de Pharmacie, Bamako ; 79 P.
- [34]: KANOUN KHADIDJA (2010-2011), Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine).
- [35]: Barlow, S.M. (1990). Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. Ed. Hudson, B.J.F, Food Antioxidants: 253-307.
- [36]: [Burns J](#), [Gardner PT](#), [O'Neil J](#), [Crawford S](#), [Morecroft I](#), [McPhail DB](#), [Lister C](#), [Matthews D](#), [MacLean MR](#), [Lean ME](#), [Duthie GG](#), [Crozier A](#) (2000), Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines., [J Agric Food Chem](#). 2000 Feb;48(2):220-30.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10691619>
- [37]: [Schwarzacher SP](#)¹, [Hutchison S](#), [Chou TM](#), [Sun YP](#), [Zhu BQ](#), [Chatterjee K](#), [Glantz SA](#), [Deedwania PC](#), [Parmley WW](#), [Sudhir](#) (1998), Antioxidant diet preserves endothelium-dependent vasodilatation in resistance arteries of hypercholesterolemic rabbits exposed to environmental tobacco smoke. [J Cardiovasc Pharmacol](#). 1998 May;31(5):649-53
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593062>



[38]: T L Yue, H Y Cheng, P G Lysko, P J McKenna, R Feuerstein, J L Gu, K A Lysko, L L Davis and G Feuerstein (1992), Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger the journal of pharmacology.

<http://jpet.aspetjournals.org/content/263/1/92.short>

[39]: G. Z. Feuerstein and R. R. Ruffolo JR (1995), Carvedilol, a novel multiple action antihypertensive agent with antioxidant activity and the potential for myocardial and vascular protection European Heart Journal

http://eurheartj.oxfordjournals.org/content/16/suppl_F/38.short

[40]: **Julien Ferrari** (2002), Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : *Gnidia involucrata* Steud. Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne.p13.

[41]: **Nisrin BENAYAD** (2008), LES HUILES ESSENTIELLES EXTRAITES DES PLANTES MEDICINALES MAROCAINES, Faculté des Sciences de Rabat,p18.

[42]: **Mohammedi Zohra**(2012-2013), Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie, Faculté des Sciences Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire Laboratoire des Produits Naturels,p35-3

[43]: **ATLAN M.** (1987), Les labiées : études botaniques, économiques, chimiques et pharmacologiques. Doctorat en Pharmacie. Université de Bordeaux II.:

[44]: **Mohamed GHANMI**, Plantes Aromatiques et Médicinales du Maroc,p46 ,47

<http://fr.scribd.com/doc/167501625/plantes-aromatiques-et-medicinales-au-maroc-les-milles-et-une-vertus2-pdf>

[45]: **Gilles FIGUEREDO** (2007), Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne, UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL.p151

[46]: **BOUZERGOUNE FOUZIA**, FACULTE DES SCIENCES, étude photochimique de la plante *Helianthemum Kahiricum* UNIVERSITE HADJ LAHKDAR-BATNA

[47]: *Classification de la Flore* (25/05/14) :

http://www.omnibota.com/View/Flora_class.php?pageNum_Classification1=296&totalRowsClassification1=1567



- [48]: **Amina DAMERDJI (2012)**, , La faune malacologique sur différentes plantes médicinales dans la région de Tlemcen (Algérie nord-occidentale) Département d'Écologie et Environnement, Faculté S.N.V/S.T.U, Université de Tlemcen, Algérie
- [49]: **H. Bouamama, T. Noel , J. Villard , A. Benharref , M. Jana(2006)** Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. *Journal of Ethnopharmacology* ,104–107
- [50]: **J.De Pascual Teresa, P. Basabe., I. S. Marcos, F. Bermejo. et J. G. Urones.** (1981) *An. Quim.* 77C, 184.
- [51]: **Jesus.M.L.Rodilla, Dina I. M.DeMendonça, J.G.Urones, R.F.Moro et D.J.Williams** (1998) Tricyclic diterpenes from *halimium viscosium*. *Phytochemistry*, vol. 47. 8. 1545-1549
- [52]: **Matkowski A., Tasarz P. and Szypuła E. (2008).** Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily *Lamioideae*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2 (11): 321-330.
- [53]: **Hedi Mighri , Hafedh Hajlaoui , Ahmed Akrouit , Hanen Najjaa , Mohamed Neffati ,(2010) (Mighri et al, 2010):**,Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone.
- [54]: **Singleton V. L. and Rossi J. A.(1965)**, Colorimetry of total phenols with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.
- [55]: **Arnous, A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2002)**, Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 655–665.
- [56]: **Arvouet-Grand A., Vennat B., Pourrat A., Legret P (1994)**, Standardization d'une extrait de propolis et identification des principaux constituents, *Journal de Pharmacie de Belgique*, 49, p. 462- 468.
- [57]: **Chokri A, El Abida K, Zegzouti YF, Ben Cheikh R (2012)**, Endothelium-dependent vascular relaxation induced by *Globularia alypum* extract is mediated by EDHF in perfused rat mesenteric arterial bed. *Can J Physiol Pharmacol.* May;90(5):607-16..
- [58]: **Namirianian K, et al. Eur J Pharmacol. (2001) (5):607-16.**
- [Mesenteric vascular bed responsiveness in bile duct-ligated rats: roles of opioid and nitric oxide systems](#)



[59]: Rachid Ben Cheikh, Jean-Claude Feray, Abdelillah Alaoui, and Bertrand Crozatier, **Thromboxane A2 (2002)**, in Vasomotor Effects of Phenylephrine, Acetylcholine, and Bradykinin in Rat Mesenteric Bed. *J Cardiovasc Pharmacol*TM, , Vol. 40, No. 2:255–264.



Introduction

L'oxygène est un élément crucial pour la vie des organismes aérobiques, toutefois il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou encore les espèces réactives oxygénées (ERO). [1]

Les espèces réactives oxygénées (ERO) sont impliquées dans des processus physiologiques à de faibles quantités. Cependant, l'excès de la production des ERO peut devenir toxique pour les composants majeurs de la cellule, les lipides, les protéines et les acides nucléiques, et donne lieu au stress oxydatif qui sera impliqué dans diverses pathologies à savoir les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), le diabète, les cancers, les maladies inflammatoires et le vieillissement. [2]

L'oxydation des lipides représente, par ailleurs, un problème important pour certaines industries, puisqu'elle est responsable de la baisse de qualité et de la diminution de la durée de conservation des produits cosmétiques et alimentaires. Ce phénomène conduit à l'odeur rance des nourritures en putréfaction. [3]

Face à ce danger les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes pour éliminer ou minimiser le dommage oxydatif. Selon leur type, les antioxydants peuvent agir en réduisant ou en dismutant les ERO, en les piégeant pour former un composé stable. Sous certaines conditions, ces systèmes antioxydants endogènes ne peuvent pas fonctionner efficacement. Cette dysfonction antioxydante peut être corrigée par des antioxydants exogènes alimentaires, soit naturels ou de synthèse. [2]

Toute fois, il y a une préoccupation concernant les effets indésirables des antioxydants destinés actuellement à la lutte contre le stress oxydant.

De ce fait, l'exploitation de nouvelles molécules bioactives ayant des effets secondaires limités ou inexistantes et leur adoption comme une alternative aux molécules existantes est devenue un objectif prioritaire pour les recherches scientifiques et dans les domaines alimentaires et pharmaceutiques. [2]

Dans cet ordre d'idée, les plantes médicinales constituent une source inépuisable de substances ayant des activités biologiques et pharmacologiques très variées. Elles représentent, donc, une voie prometteuse pour le développement de nouveaux médicaments. Récemment, beaucoup de chercheurs s'intéressent aux plantes médicinales pour leur richesse en antioxydants



naturels à savoir les polyphénols, les flavonoïdes et les tannins, qui possèdent des activités antioxydantes et antimicrobiennes. [2]

Ce travail vise à étudier l'activité antioxydante et vasodilatatrice de trois plantes:

- *Daphne gnidium* ;
- *Origanum elongatum*;
- *Cistus salviifolius*.

Notre travail sera réparti en deux parties :

- une première partie relative à l'étude bibliographique des trois plantes et des activités recherchées.
- et une deuxième partie réservée aux travaux expérimentaux subdivisée en deux chapitres : le premier présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail et le deuxième consacré à la présentation et à la discussion des résultats obtenus.



Partie 1: Etude bibliographique



I. Plantes aromatiques et médicinales(PAM)

1. Généralités

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales «P.A.M.» est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires. [4]



De nos jours, entre 20.000 et 25.000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine, 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une molécule active d'origine végétale [5].

Les grands types de plantes aromatiques et médicinales utiles à l'homme peuvent être définis par leur principal usage [5]. On peut citer :

- plantes pour tisanes, boissons hygiéniques et d'agrément,
- plantes à usages cosmétiques,
- plantes à usages aromatiques et condimentaires,
- plantes à usages alimentaires,
- plantes à usages industriels,
- plantes médicinales.

2. Définitions des plantes médicinales et aromatiques

➤ Plantes médicinales

Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses [7]. Elles sont utilisées en phytothérapie et en médecine populaire pour guérir certaines pathologies chez l'Homme et chez les animaux [6].

Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne [8].



➤ Plantes aromatiques

Les plantes aromatiques sont des plantes à parfum pénétrant et agréable dû à des huiles essentielles appelées communément essences, qui sont des mélanges de constituants plus ou moins nombreux. [9]

3. Domaines d'application des plantes médicinales

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie (alimentaire, cosmétique et en dermatopharmacie). Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La Pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et les recherches scientifiques mettent en évidence chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi-synthèse. [10]

4. Plantes aromatiques et médicinales au Maroc

Par ses contrastes géographiques, le Maroc offre une gamme variée de bioclimats permettant l'installation d'une flore riche (plus de 4200 espèces) et une diversité de ressources phylogénétiques en PAM (600 espèces) [5].

Le Maroc est un producteur traditionnel de PAM, et un fournisseur exclusif de plusieurs huiles essentielles comme l'armoise, la camomille sauvage et la tanaïsie annuelle, il est l'un des principaux fournisseurs à l'échelle mondiale (de romarin, de verveine, de rose, de coriandre, de menthe pouliot, etc.) [5]. Cette activité met en exploitation aussi bien des plantes spontanées que des plantes séchées pour les besoins d'herboristerie et les aromates alimentaires. Plus d'une vingtaine d'espèces sont utilisées pour la production d'huiles essentielles ou d'autres extraits aromatiques destinés essentiellement à l'industrie de parfumerie et cosmétique ainsi que pour la préparation des produits d'hygiène et de la formation des arômes. [11]

La production des PAM au Maroc se révèle ainsi riche et diversifiée, ce qui constitue un important atout pour l'établissement et le développement du secteur. Plusieurs produits sont connus sur le marché international comme étant des produits typiquement marocains. Cela signifie que la profession d'exploitation des PAM au Maroc, malgré ses faiblesses, a réussi à introduire sur le marché international plusieurs produits nouveaux. [11]



II. Différents procédés d'extraction des principes actifs des plantes

3. Définitions

1.1 Extraction

Une extraction consiste à **retirer** (extraire) une ou des **espèces chimiques** d'un milieu **solide** ou **liquide**. [12]

1.2 Principes actifs

En plus des métabolites primaires, tels que les glucides, les acides aminés, les acides gras, les cytochromes, les chlorophylles, et les intermédiaires métaboliques des voies anaboliques et cataboliques, qui se produisent dans toute espèce végétale, les plantes contiennent également une grande variété de substances, appelées les métabolites secondaires ou **les principes actifs**. Certains métabolites secondaires sont limités à quelques espèces de plantes, où ils accomplissent des fonctions écologiques spécifiques, telles que l'attraction des insectes pour transférer le pollen, ou aux animaux pour consommer des fruits et de cette façon pour propager la graine, et pour agir en tant que pesticides naturels [13].

L'intérêt des métabolites secondaires a considérablement augmenté ces dernières années en raison de la diversité de leurs effets thérapeutiques et/ou prophylactique [13].

Les principes actifs des plantes peuvent être groupés en familles chimiques parmi lesquelles on trouve [14].

- **Alcaloïdes**: morphine, nicotine, pavot...
- **Glucosides**: verveine, tilleul, hamamélis...
- **Saponines**: réglisse, bouillon blanc...
- **Tanins**: écorce de chêne...



4. Techniques d'extraction des principes actifs des plantes

Le procédé d'extraction est basé sur la différence de solubilités des composés d'un mélange dans un solvant. Le mélange peut être solide ou liquide. Dans notre travail, nous nous intéressons aux procédés d'extraction à partir d'un système solide, la plante.

Il existe plusieurs techniques d'extractions. Ces techniques peuvent être traditionnelles, conventionnelles (utilisées depuis longtemps) et nouvelles (développées plus récemment).

2.1 **Techniques traditionnelles** [15]

Avec les techniques traditionnelles, les plantes peuvent être utilisées en **infusion**, **décoction** ou **macération**.

➤ **Infusion**

Cette technique est nécessaire si l'on utilise les parties fragiles et nobles de la plante (telles que les fleurs, sommités fleuries). Le procédé consiste ici, en premier, à faire bouillir une certaine quantité d'eau. Dès le début de l'ébullition, on retire le récipient de la source de chaleur. On y ajoute la quantité nécessaire de plante et on laisse infuser (en général de 10 à 20 minutes). On filtre, ensuite, pour consommer le filtrat après avoir laissé un peu refroidir éventuellement.

➤ **Décoction**

Elle est utile lorsque l'on utilise les parties dures, ligneuses de la plante (racines, rhizomes, écorces). On met en présence les quantités requises de plante et d'eau sur une source de chaleur, puis on chauffe jusqu'à ébullition. La décoction permet une extraction plus complète des principes actifs que l'infusion, mais ne s'applique pas à toute les plantes, la température modifiant ou dégradant certains principes.

Exemple: On a eu recours à la décoction pour extraire les principes actifs de l'écorce de saule, le « salicoside », qui est le précurseur de l'aspirine.

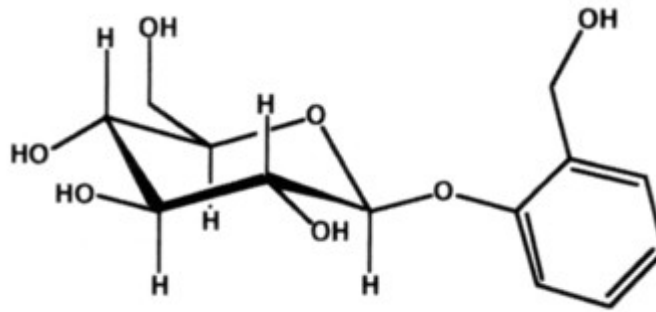


Figure 1: Structure du salicoside

➤ Macération

On peut soit faire au préalable une décoction et ensuite laisser macérer toute la nuit, après avoir arrêté de chauffer, soit laisser macérer à froid dès le départ.

La préparation de la macération est la même que celle de l'infusion, à la différence qu'il suffit de laisser en contact plusieurs heures, voire plusieurs jours les plantes et le liquide extracteur. Exemple: c'est du quinquina que la chimie a extrait la quinine, seul médicament autrefois disponible pour lutter contre les fièvres du paludisme.

2.2 **Techniques conventionnelles** [16]

Parmi les techniques conventionnelles, on trouve :

➤ L'entraînement à la vapeur (hydrodistillation):

C'est une technique largement utilisée pour l'extraction des huiles essentielles. L'avantage de cette technique réside en la diminution de la température de distillation. Les composés volatils sont donc entraînés à des températures beaucoup plus basses que leur température d'ébullition, ce qui évite leur décomposition.

➤ L'extraction par Soxhlet:

C'est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide. Les avantages du Soxhlet sont les suivants : l'échantillon entre rapidement en contact avec une portion de solvant pur, ce qui aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant. De plus, Cette méthode ne nécessite pas de filtration



après extraction et peut être utilisée quelque soit la matrice végétale. Ses inconvénients les plus significatifs sont la durée importante d'extraction et la grande quantité de solvant consommée (devant être ultérieurement évaporé), ce qui limite sa rentabilité économique et la rend peu écologique. Il n'y pas de possibilité de travailler à froid, ce qui peut être gênant avec des substances sensibles à la chaleur. Cette technique est limitée d'un point de vue de la sélectivité du solvant et n'est pas facilement automatisable.

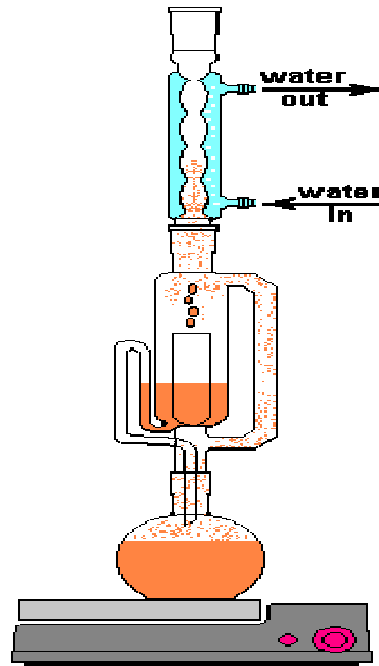


Figure 2: Schéma de l'extraction par Soxhlet.

➤ **L'extraction en mode batch par agitation:**

L'avantage majeur de l'extraction en mode batch par agitation devant le Soxhlet est la possibilité de travailler facilement avec des mélanges de solvants et de contrôler la température d'extraction pour éviter le risque de destruction des composés thermolabiles. C'est une méthode simple et efficace mais qui exige des procédures postérieures de filtration et de concentration relativement longues.

➤ **L'extraction assistée par sonication:**

C'est une méthode simple, efficace et peu coûteuse. Ses avantages les plus significatifs sont liés à l'augmentation du rendement d'extraction et une accélération de la cinétique par rapport à une



extraction classique. Elle permet de travailler à des températures relativement basses et d'éviter la thermodestruction des composés.

Cette technique est facile à mettre en œuvre. Comme le Soxhlet, l'extraction par sonication permet d'utiliser une large gamme de solvant afin d'obtenir différents composés naturels. Cependant, l'effet de l'extraction par ultrasons sur le rendement et la cinétique d'extraction est lié à la nature de la matrice végétale. Cette méthode ne permet pas de renouveler le solvant pendant le processus. L'étape limitante est la filtration et le rinçage après l'extraction.

2.3 Techniques nouvelles

Afin de pallier aux problèmes environnementaux et économiques dus à la grande quantité de solvant demandée par les méthodes classiques, plusieurs méthodes utilisant des paramètres physiques sont apparues. [17]

Parmi les « techniques nouvelles » on peut citer : [16]

- **L'extraction assistée par micro-ondes**(HydroDistillation par Micro-ondes sous Vide pulsé (VMHD)):

Elle utilise de plus petites quantités de solvant, n'est pas coûteuse et est considérablement rapide. Cependant, la température opératoire de cette technique est relativement haute (100 – 150 °C), ce qui pose des problèmes quand il s'agit de l'extraction d'antioxydants. Les autres inconvénients de cette technique sont d'une part le rendement faible lorsque les solutés ou les solvants sont apolaires et d'autre part le besoin de l'étape postérieure de filtration ou de centrifugation pour éliminer le résidu solide de l'extraire.

- **L'extraction accélérée par solvants (Accelerated Solvent Extraction ASE®)** :

Technique brevetée de la société DIONEX qui utilise les solvants conventionnels à des températures (50 – 200 °C) et des pressions (100 – 150 bar) élevées. La pression exercée est assez élevée pour maintenir le solvant à l'état liquide à température élevée. Pendant l'ASE®, le solvant reste toujours en dessous de ses conditions critiques. Les avantages de cette technique devant les techniques conventionnelles sont les suivants : on évite les échauffements locaux et on consomme de plus petites quantités de solvant en comparaison à l'extraction par Soxhlet et par batch avec agitation. Ses inconvénients sont liés à son coût élevé et surtout à sa non sélectivité, ce



qui impose des procédures supplémentaires de nettoyage des extraits. Les températures opératoires élevées peuvent aussi mener à une dégradation des solutés thermolabiles.



➤ **L'extraction avec des fluides supercritiques:**

Cette technologie considérée "verte" est très attractive et performante. Les avantages de cette méthode devant les méthodes conventionnelles sont basées sur une durée d'extraction plus courte, une sélectivité élevée et la facilité d'éliminer le solvant après l'extraction par simple décompression. Son grand inconvénient est le coût élevé de l'appareillage.

Exemples d'applications : Extraction de molécules actives : décaféination du café, délipidation d'aliments, extraction/traitement d'arômes, épices, colorants, agents de texture, extraction de principes actifs à partir de plantes médicinales, purification de principes actifs, élimination de solvants résiduels.



III. Oxydants et antioxydants

3. Oxydants

Ce sont des molécules toxiques, appelées aussi **radicaux libres**. Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne [18]. Ces espèces radicalaires très instables et très réactives sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques. Par exemple, lors de la respiration cellulaire, l'oxygène moléculaire se transforme en diverses substances oxygénées, communément appelées radicaux libres de l'oxygène ou espèces réactives oxygénées (ERO) [19].

Les principales ERO sont listés dans le tableau 1.

Tableau 1: Liste des principaux oxydants [20]

Radical	Formule
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Hydroxyle	OH^{\cdot}
Peroxyde	ROO^{\cdot}
Hydroperoxydes	$ROOH$
Alcoxydes	RO^{\cdot}
Oxygène singulet	$1/2O_2$
Oxyde nitrique	NO^{\cdot}

1.3 Origine des radicaux libres (RL) [21]

La production de ces espèces oxydantes est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. En effet, l'organisme a besoin d' O_2 pour produire de l'énergie au cours des réactions dites de respirations oxydatives. Cependant, une faible partie de l'oxygène échappe à sa réduction



en eau, au niveau de la mitochondrie. Elle peut alors être à l'origine de la production de radicaux libres oxygénés.

Les autres sources de production de radicaux libres sont représentées dans le tableau 2. Elles sont classées en deux catégories :

- sources endogènes : les radicaux libres sont des produits des réactions de l'organisme,
- sources exogènes : les êtres vivants sont exposés quotidiennement à des polluants susceptibles d'être à l'origine de la production de radicaux libres.

Tableau 2. Principales sources de production des radicaux libres. [21]

Sources endogènes	-Production de radicaux libres lors des respirations oxydatives (mitochondries). -Cellules phagocytaires. -Métabolisme de l'acide arachidonique. -Système xanthine/xanthine oxydase.
Sources exogènes	-Rayonnement électromagnétique. -Métaux de transition. -Pesticides. -Médicaments...

Dans certaines situations, cette production augmente fortement, entraînant un stress oxydatif.

1.4 Stress oxydant

Lorsque l'un des systèmes protecteurs de l'organisme contre la toxicité des radicaux libres (RL) montre une défaillance, l'action des radicaux libres devient incontrôlable. Ceci entraîne des dommages au niveau des molécules, des cellules, des organes et potentiellement la mort de l'organisme [22].

La conséquence des effets nocifs des RL et des métabolites réactifs est dite « stress oxydant ». Ce terme est défini initialement comme étant « Un déséquilibre profond de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants en faveur des premiers » [23].

Selon les points de vue actuels, le stress oxydant peut être défini comme étant « *un déséquilibre entre la production et l'élimination des métabolites réactifs de l'oxygène et du nitrogène en faveur de leur production conduisant à des dommages potentiels et à des dégâts cellulaires irréversibles* » [24, 25].



1.4 Mécanisme d'oxydation

Les mécanismes d'oxydation des composés insaturés biologiques (acides gras, caroténoïdes, polyphénols...) sont souvent des réactions radicalaires avec l'oxygène moléculaire et présentent trois phases principales [26].

- Une phase d'initiation qui peut être due à l'intervention d'un radical hydroxyle HO qui arrache un atome d'hydrogène (*Figure 3*).

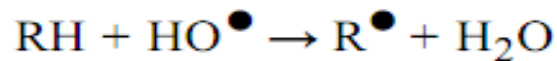


Figure 3 : phase d'initiation

L'arrachement du proton est facilité tant par la chaleur (agitation moléculaire) que par les rayonnements ou les catalyseurs (métaux tels que Cu, Fe, Co, Mn, Ni...).

- Une phase de propagation : en présence d'oxygène, il se forme un radical peroxyde (ROO•) qui déstabilise une deuxième molécule d'acides gras polyinsaturés (AGPI) et conduit à un hydroperoxyde lipidique (ROOH) et à un nouveau radical, assurant ainsi la propagation du processus (*Figure 4*)

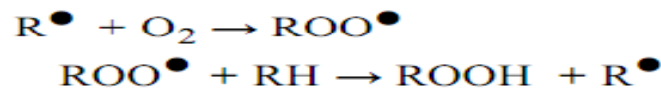


Figure 4 : Phase de propagation

- Une phase de terminaison, où se recombinent différents radicaux formés pour aboutir à des composés stables (*Figure 5*)

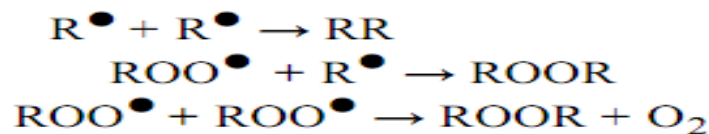


Figure 5 : Phase de terminaison



4. Antioxydants

L'organisme a développé des systèmes de défense très efficaces contre la production des RL. Les molécules contrôlant cette production sont désignées par le terme «antioxydant».

2.1 Définition

Du point de vue biologique, les antioxydants sont toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat [27], et dont les produits de réaction avec l'oxydant ne sont pas toxiques [28].

2.2 Caractéristiques des antioxydants

Un composé est considéré antioxydant *in vivo*, lorsqu'il requière les propriétés suivantes [24 et 27] :

- 1- il doit réagir avec les métabolites réactifs de l'oxygène qui sont biologiquement toxiques.
- 2- le produit de la réaction de l'antioxydant avec l'oxydant ne doit pas être plus toxique pour l'organisme que le métabolite éliminé.
- 3- l'antioxydant potentiel doit être présent dans l'organisme en concentration suffisante.
- 4- la demi-vie de l'antioxydant doit être suffisamment longue pour réagir avec l'oxydant.

2.3 Mode d'action des antioxydants

Indépendamment de leur localisation, les antioxydants peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés ou en épurant les radicaux libres oxygénés. En complément de cette double ligne de défense, l'organisme est, en outre, capable de réparer ou d'éliminer les molécules endommagées par l'attaque radicalaire [28] Les antioxydants préventifs ont une action stabilisatrice en décomposant par exemple les peroxydes en des produits stables de terminaison ce qui empêche directement la formation des radicaux libres. Ils peuvent aussi chélater les catalyseurs des réactions d'oxydation tels que les ions métalliques ou bien réagir avec l'oxygène.

Les piègeurs des ERO rentrent en compétition avec des radicaux déjà existants et contribuent à bloquer la phase de propagation. On différencie deux types de piégeage [26] :

- le premier par libération d'un atome d'hydrogène, souvent par une structure aromatique (cas des dérivés du phénol : tocophérols, polyphénols, flavonoïdes...) :



- et le deuxième par libération d'un électron.

La combinaison de ces antioxydants préventifs et piègeurs peut générer des effets synergiques.

2.4 Sources d'antioxydants

En plus des substances propres à l'organisme, l'alimentation, la synthèse et les plantes peuvent être également des sources d'antioxydants

2.4.1 Source alimentaire:

Certaines substances sont utilisées par l'organisme comme antioxydants. Ce sont principalement : la vitamine C, la vitamine E, le sélénium et le β carotène.

➤ La vitamine C ou acide ascorbique :

C'est un puissant réducteur. Il joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E. Il est présent dans les légumes, le chou, le poivron, les agrumes. [29].

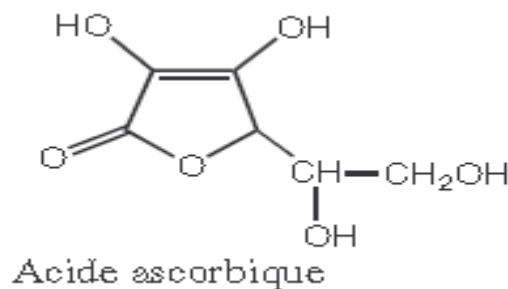


Figure 6: Structure de la vitamine C

➤ La vitamine E ou tocophérol :

Prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux peroxydes. Elle est présente dans les huiles végétales, les noix, les amandes, les graines, le lait, les œufs et les légumes à feuilles vertes [30].

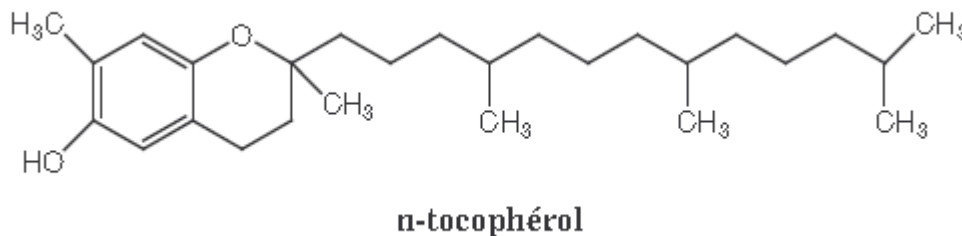


Figure 7: Structure de la vitamine E

➤ *Le sélénium*

C'est l'oligo-élément le plus «à la mode» pour ses propriétés antioxydantes certaines. Il neutralise les métaux toxiques (plomb, mercure) et il aurait aussi une action préventive sur certains cancers [30]

➤ *Le β -carotène*

Outre l'activité pro vitaminique A, il possède la capacité de capter l'oxygène singulet. Il est retrouvé dans les légumes verts, les épinards, la salade, les carottes, l'abricot, le melon, la papaye et d'autres fruits jaunes. [30]

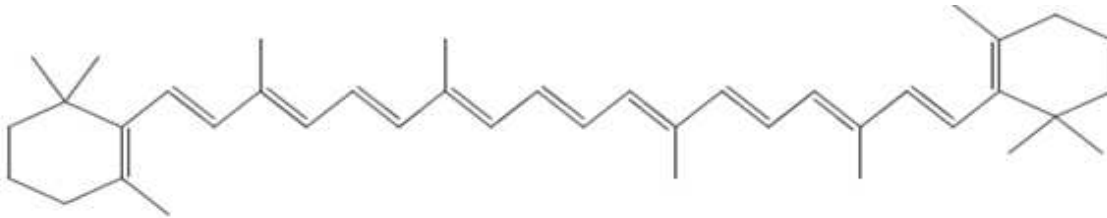


Figure 8 : Structure du β -carotène

2.4.2 Molécules naturelles antioxydantes

Les antioxydants d'origines naturelles sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures et sont en générale des composés phénoliques. Elles peuvent être groupées selon leur structure chimique. On en cite:

➤ **Les flavonoïdes**

Présentes dans la plupart des plantes, les flavonoïdes (figure 6) sont des pigments polyphénoliques responsables de la coloration des fleurs et des fruits. Ils possèdent de nombreuses vertus. Ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation. Certains ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et anti virales, d'autres ont des effets hépto-protecteurs. [31]

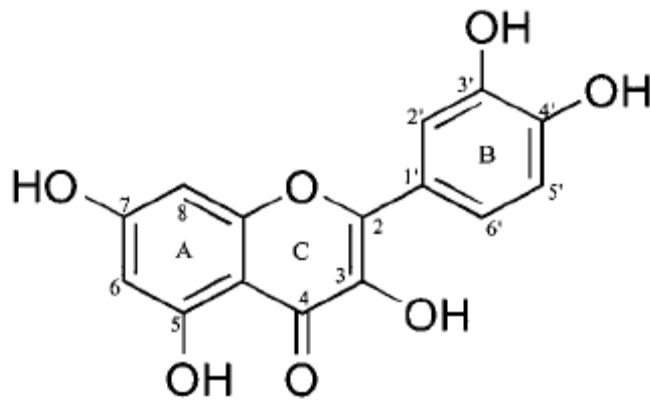


Figure 9: Structure générale du noyau des flavonoïdes

➤ Les tanins

Toutes les plantes en contiennent à des degrés différents. Ce sont des composés polyphénoliques qui permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections.

Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus souples, comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure [32].

Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides [32].

Un exemple de tanins est la gallate d'épigalocathéchine (Figure 10)

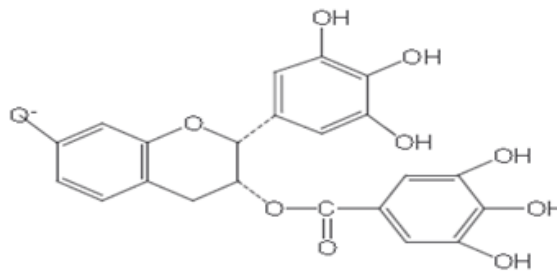


Figure 10: Structure de la gallate d'épigalocathéchine.

➤ Les coumarines

Les coumarines (figure 11) se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses.

Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Les conditions structurales requises pour l'activité antiperoxydante des coumarines sont similaires à celles des flavonoïdes [30].

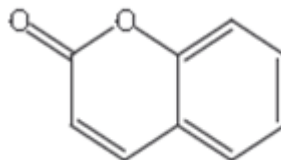


Figure 11: Noyau de base des coumarines

➤ Les phénols

Il existe une très grande variété de phénols, de composés simples comme l'acide salicylique, précurseur de l'aspirine, à des substances plus complexes comme les composés phénoliques auxquels sont rattachés les glucosides. Les phénols sont anti-inflammatoires et antiseptiques. On suppose que les plantes, en les produisant, cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes phytophages. Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales. [30].

Parmi les dérivés phénoliques, le resvératrol (*Figure 12*) est le composé le plus étudié. En effet, cette molécule, isolée du raisin possède de fortes propriétés antioxydantes [30].

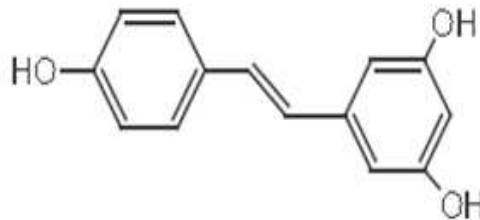


Figure 12: Structure du resvératrol.

➤ Les xanthones

Les propriétés pharmacologiques reconnues des xanthones sont essentiellement : leur activité antimicrobienne, leur cytotoxicité et surtout l'inhibition de la monoamine-oxydase [33]. La mangiférine (*Figure 13*) est une xanthone qui possède la propriété d'inhibition de la peroxydation des lipides, ainsi que des propriétés de capteurs de radicaux libres contre les anions super oxydes [33].

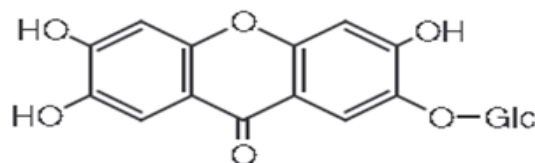


Figure 13 : Structure de la mangiférine.

4.4.3 Antioxydants synthétiques

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tels que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT), gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels (Figure 14). Cependant, leur sécurité est très discutée. Il a été montré qu'ils pourraient être toxiques [34]. En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomales [35].

Ainsi, le besoin de réduire l'utilisation des antioxydants synthétiques (maintenant limitée dans plusieurs pays en raison de leurs possibles effets indésirables sur la santé humaine) impose d'orienter le marché vers des antioxydants d'origine naturelle et stimule la recherche dans ce domaine [3].

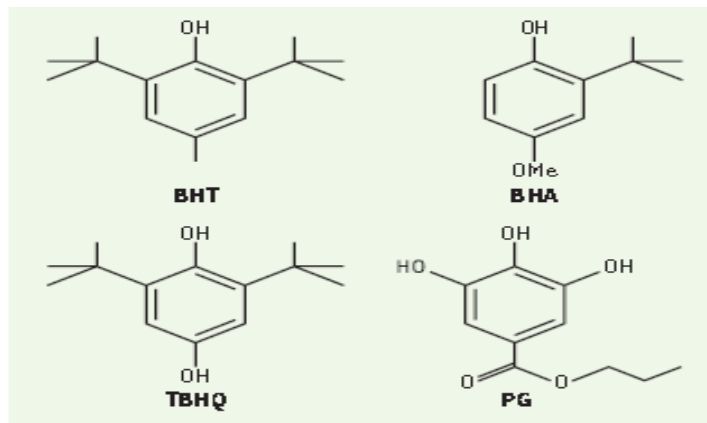


Figure 14: Antioxydants de synthèse les plus utilisés.

2.5 Rôle des antioxydants dans la prévention des accidents vasculaires cérébraux et l'hypertension artérielle

Si les antioxydants ont le pouvoir d'excéder la capacité des radicaux libres à endommager les tissus de l'organisme et prévenir, particulièrement, les maladies cardiovasculaires, il paraît évident de corréler ce pouvoir à une activité vasodilatatrice.

En effet, Burn et al, ont démontré une étroite relation entre l'activité antioxydante et la capacité vasodilatatrice d'un groupe de composés phénoliques [36]. De même d'autres études ont abouti à conclure que les antioxydants agissent comme vasodilatateurs et par la suite aident à baisser la pression artérielle et prévenir les attaques vasculo-cérébrales (AVC). ([37], [38], [39].).

A cet effet, nous avons étudié l'effet de nos plantes sur le lit vasculaire mésentérique (LVM).



Partie 2: Travaux expérimentaux



Chapitre I: Matériel et méthodes

I. Matériel végétal

3. Identification botanique des espèces végétales étudiées:

1.1. *Daphne gnidium*

Daphne gnidium appartient aux Thymelaeaceae. C'est une petite famille de dicotylédones composée de quelque 1200 espèces réparties en 67 genres. [40]

➤ **Place dans la systématique** [41]



Systematique de la plante

Embranchement : Phanérogames

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Eudicots

Ordre : Myrtales

Famille : Thymelaeaceae

Genre : Daphne

Espèce : Gnidium

➤ Description botanique

Le daphné garou ou garou (*Daphne gnidium*) est un arbrisseau, de 60 cm à 2 m de haut ou plus, à rameaux minces très feuillés. Des feuilles persistantes ou caduques, lancéolées-linéaires, larges de 5-7mm au plus, cupsidées, très denses. Inflorescences terminales en panicule rameuse longue de 5-10cm, entièrement blanche – tomenteuse, fleurs blanches caduques. Le fruit est une drupe ovoïde, rouge orangé. La floraison va d'octobre à mars. [42]



Figure 15: *Daphne*

Ammart

gnidium de Beni

➤ Composition chimique [42]

Le *Daphne gnidium* contient:

- des coumarines (Daphnétine, daphnine, acétylimbelliférone, daphnorétine)
- des flavonoïdes (lutéolin-3',7-di-*O*-glucosidelutéoline, orientine, isoorientine, quercétine, apigénine-7-*O*-glucoside, genkwanine, 5-*O*- β -D-primeverosyl genkwanine, 2,5,7,4'-tétrahydroxyisoflavanol).
- Les graines et les écorces des différentes espèces de *Daphne* renferment des diterpènes toxiques, la daphnétoxine (écorce) et la mézéréine (graines).

➤ Utilisation [42]

Anciennement, l'écorce des plantes du genre *Daphne* et plus particulièrement du *Daphne gnidium* était utilisée sous forme de pommade aux propriétés épispastiques.

- En phytothérapie, la plante est indiquée dans le traitement des leucémies, des tumeurs solides et la sclérose en plaque.
- Dans la pharmacopée traditionnelle, il était utilisé pour ses propriétés antiseptique, insecticide, dépurative, cicatrisante, sudorifique et abortive. Le Garou possède des effets cytotoxique, antioxydant et antimicrobien.



1.2 *Origanum elongatum*

Origanum elongatum est une plante de la famille des *Lamiaceae*. Cette famille comprend 187 genres et 3 000 espèces [43]

➤ Place dans la systématique

Classification d'après Deysson 1967 [43]

Systématique de la plante

Embranchement : Spermaphytes	Ordre : Lamiales
Sous-embranchement : Angiospermes	Famille : Lamiaceae
Classe : Dicotylédones	Sous-famille : Népétoïdées
Sous-classe : Gamopétales	Genre : <i>Origanum</i>
Série : Superovariées tétracycliques	Espèce : <i>Elongatum</i>

➤ Description botanique

Plante endémique du Rif et du nord du Moyen Atlas, elle croît dans les sols schisteux entre 400 et 1500 mètres d'altitude. Elle fleurit de juin à octobre. [45]

Ce sont des plantes herbacées ou des sous arbrisseaux vivaces et aromatiques de la famille des lamiacées. Ces espèces sont appelées localement « Zaâtre ». Ce sont des plantes vivaces chaméphytes, ligneuses à tiges dressées et plus ou moins ramifiées, les feuilles sont toujours simples, opposées, pétiolées ou sessiles à subsessiles. Les fleurs sont plus ou moins pourprées à inflorescence composées d'épis réunis de fleurs sessiles ou subsessiles. Les fleurs blanches ou rosées, androcées sont à quatre étamines et les fruits sont constitués de quatre nucules ovoïdes et lisses. [44]



Figure16: O. elongatum de Beni Ammart

➤ Utilisation

L'origan peut avoir plusieurs utilisations, ses feuilles vertes ou séchées sont très utilisées dans les préparations culinaires.

Leurs propriétés biologiques ne cessent de se confirmer (activité bactéricide par exemple), ainsi contre des pathogènes foliaires, les origans se sont avérés très efficaces. De même, l'origan permettrait d'accroître la durée de stockage des pommes de terre en réduisant le risque d'attaques microbiennes. Dans la pharmacopée traditionnelle, les origans sont employés sous formes d'infusions comme calmant, somnifère et stimulant [44]

1.4 *Cistus salviifolius*

Cistus salviifolius appartient à la famille des Cistacées. C'est une famille de plantes dicotylédones qui comprend moins de 200 espèces et maximum dix (10) genres. [46]

➤ Place dans la systématique [47]

Systematique de la plante

Embranchement : Spermatophyta
Classe : Tricolpées évoluées
Sous-classe : Rosidae
Super ordre : Eurosidées II

Ordre : Malvales
Famille : Cistaceae
Genre : *Cistus*
Espèce : *salviifolius*

➤ Description botanique

C'est un arbrisseau très ramifié, compact, érigé, parfois prostré. Cette plante peut atteindre 20 à 60 cm de haut, parfois 100 cm. La racine n'a pas de poils absorbants en général. Les feuilles sont simples, persistantes, opposées et pourvues d'un court pétiole pouvant atteindre plusieurs centimètres. [48]



Figure17: *Cistus salviifolius*



➤ Composition chimique

La majorité des études phytochimiques effectuées sur un nombre important d'espèces de la famille des Cistacées montre la richesse ainsi que la diversité structurale de ces dernières en métabolites secondaires incluant en particulier les terpènes, les composés phénoliques constituant principalement les flavonoïdes (comme aglycones et glycosides), les pro-anthocyanidines, les terpenoïdes et les tannins. [46]

➤ Utilisation

Toutes les espèces de la famille Cistaceae sont fréquemment employées dans la médecine traditionnelle pour leurs propriétés antimicrobienne, antitumorale, antivirale anti-inflammatoire, antifongique, anti oxydante, et activités spasmolytique ethypotensive [49].

Au Maroc, les feuilles de *Cistus* sont utilisées en décoction contre les douleurs gastriques et comme hypoglycémiant, et en infusion dans le thé comme digestif [51].

4. Collecte et conservation

Les plantes ont été récoltées au mois de février 2014 dans la région de Beni Ammart, un village dans la province d'Al-Hoceima dans les montagnes du rif.

Les plantes ont été identifiées par monsieur A. ENNABILI, professeur de botanique à l'institut national des plantes médicinales et aromatiques.

Les plantes récoltées et triées sont séchées à l'étuve à une température de 40 °C pendant 24 heures, les feuilles ont été ensuite isolées du reste de l'échantillon puis broyées avec un broyeur pour obtenir une poudre végétale fine. Ces poudres sont ensuite conservées dans des flacons en verre.

Les données du matériel végétal étudié sont citées dans le tableau 3

Tableau 3: Matériel végétal étudié

Nom botanique	Famille botanique	Zone de collecte	Date de récolte	Organe utilisé
<i>Daphne gnidium</i>	Thymelaceae	Irboura	8 février 2014	feuilles
<i>Origanum elongatum</i>	Lamiaceae	Izouknaoune	9 février 2014	feuilles
<i>Cistus salviifolius</i>	Cistaceae	Irboura	8 février 2014	feuilles

II. Méthodes d'extraction

Dans ce travail on a utilisé deux méthodes d'extraction soxhlet et sonication. L'extraction faite par quatre solvants à polarité croissante: Hexane, acétate d'éthyle, dichlorométhane, méthanol.

L'extraction des principes actifs de *Daphné gnidium* a été faite par soxhlet et sonication afin de faire une étude comparative entre les deux méthodes. Les deux autres plantes (*Origanum elongatum*, *Cistus salviifolius*) ont été extraites par sonication uniquement.

1. Extraction par Soxhlet

L'extraction est effectuée par épuisement successif du matériel végétal, en utilisant trois solvants à polarité croissante : l'hexane, l'acétate d'éthyle (AE), et le méthanol (MeOH). La quantité de solvant doit être appropriée à la quantité de matière végétale dont nous disposons (dans notre cas nous avons utilisé 160 g de poudre pour 2 L de solvant organique).

Le Soxhlet (figure 18) est composé d'un corps en verre, dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais (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 solvant est chauffé à ébullition. Les vapeurs ainsi produite passent par la cartouche contenant le matériel végétal à extraire. Le réfrigérant placé au dessus du dispositif servira à condenser les vapeurs du solvant.

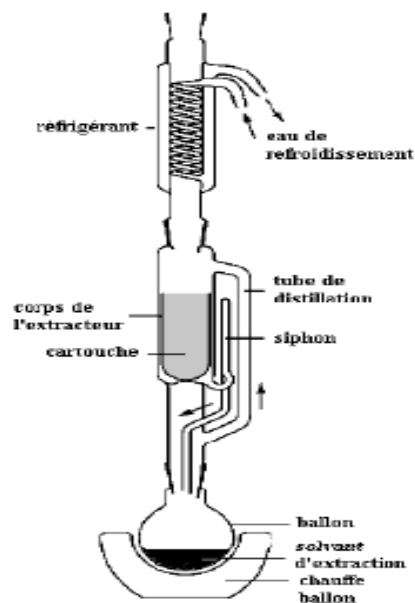




Figure 18: Schéma de l'extracteur Soxhlet

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. L'extraction est complète lorsque le solvant d'extraction devient limpide (presque une semaine d'extraction pour chaque solvant). Le contenu du ballon est ensuite concentré par évaporation sous pression réduite à 40°C dans un évaporateur (BÜCHI) (Figure 19), jusqu'à élimination du solvant, dans un ballon pré-pesé. Une pesée à ce stade permet le calcul du rendement en extraits.

Le résidu, ainsi obtenu, a été repris dans 2 l d'acétate d'éthyle jusqu'à ce que le solvant d'extraction devienne clair. Enfin, l'extraction par 2 l de méthanol est faite dans les mêmes conditions que précédemment.

Après chaque extraction, le solvant est éliminé et le ballon est pesé pour calculer le rendement.



Figure 19: Evaporateur (BÜCHI)

La série d'extraction permet d'obtenir trois extraits organiques : un extrait hexanique, un extrait d'acétate d'éthyle, et un extrait méthanolique (MeOH). Les extraits secs sont conservés à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

2. Extraction par sonication

Cette technique est basée sur l'utilisation des ultrasons pour l'extraction des principes actifs.

➤ *Extraction par sonication pour Daphne gnidium*

Afin de faire une étude comparative entre les deux méthodes d'extraction nous avons, aussi, utilisé l'extraction par sonication pour *Daphne gnidium* en utilisant trois solvants (l'hexane, l'acétate d'éthyle, et le méthanol).

25g de matériel végétal sont mis en contact avec 250 ml du solvant dans un ballon de sonicateur, la sonde est immergée d'environ 4cm dans l'échantillon pour générer les ultrasons pendant 45 min en alternance de 3 seconde en mode actif et 1 seconde en mode inactif (60 min de temps total). Le commutateur est allumé et les paramètres de contrôle de sonicateur sont réglés comme suit:

TEMPS 00H45min00s	AMPL 40 %
IMPULSION on 3s off 1s	



Figure:20 Photo sonde immergée dans l'échantillon



Figure 21:l'appareil de sonication

Après filtration sur papier filtre, le résidu de l'extraction précédente a été repris dans 250 ml d'acétate d'éthyle, la sonde est introduite dans la suspension afin de pulvériser la matière végétale. Enfin, le résidu est à nouveau extrait par 250 ml de méthanol dans les mêmes conditions. Les



extraits ont par la suite été évaporés dans un ballon pré-pesé à l'évaporateur sous pression réduite, l'extrait sec pesé et conservé à 4°C.

➤ *Extraction par sonication pour les trois plantes*

L'extraction par sonication des trois plantes a été effectuée dans quatre solvants (l'hexane, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et le méthanol). Le matériel végétal est renouvelé à chaque extraction.

25g de matériel végétal sont mis en contact avec 250 ml du solvant dans un ballon de sonicateur, la sonde est immergée d'environ 4cm dans l'échantillon pour générer les ultrasons pendant 45 min en alternance de 3 secondes en mode actif et 1 seconde en mode inactif (60 min de temps total).

Après filtration sur papier filtre, l'extrait obtenu est évaporée à sec à l'aide d'un évaporateur sous pression réduite (Buchi).

On procède à nouveau, à une nouvelle extraction par ultrason de chacune des plantes, avec changement de la matière végétale.

Les extraits ont été conservés à une température de 4°C jusqu'à utilisation.

3. Calcul du rendement

Le rendement de l'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$R(\%) = M / M_0 \times 10$$

R (%) : Rendement exprimé en %.

M: Masse en gramme de l'extrait sec obtenu

M₀ : Masse en gramme du matériel végétal à traiter

III. Tests biologiques

3. Test d'activité antioxydante

3.1 Mesure du pouvoir anti-radicalaire par le test DPPH

Principe :

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical stable présentant en solution une absorption caractéristique à 517 nm qui lui confère une coloration violette. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit par un capteur de radicaux libres en 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune (Figure 22) [52].

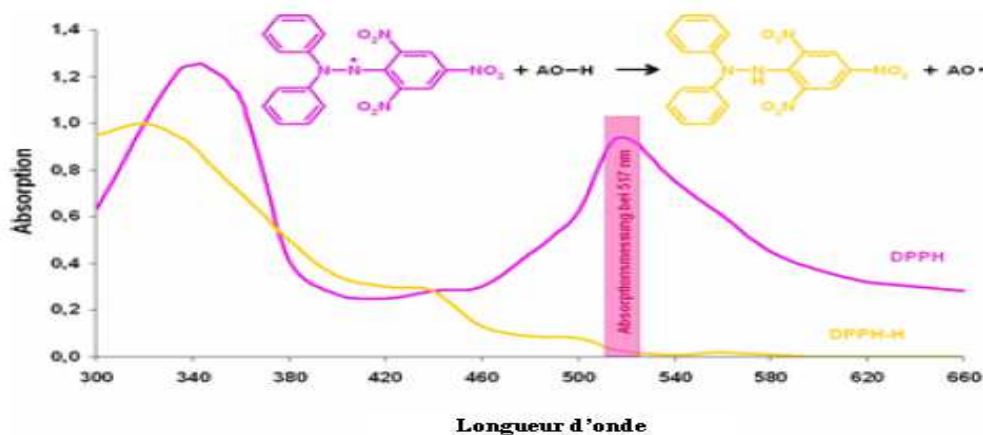


Figure 22: Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive [53].

Mode opératoire

Le protocole est celui décrit par Mighri et al [53]. On introduit 2.5 ml de chaque extrait (0,2 mg/ml) dans des tubes et 2.5ml de la solution méthanolique du DPPH (0,04 mg/ml). Après agitation au vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm par un spectrophotomètre 6800 UV /JENWAY.

Différentes concentrations ont été testées allant de 0,2 mg/ml à 0,00625 mg/ml) afin de déterminer la concentration qui réduit 50% du DPPH (CI₅₀). Les essais ont été effectués trois fois pour chacune des concentrations.



Les résultats obtenus pour chaque extrait testé sont comparés à ceux obtenus pour le BHT pris comme antioxydant standard.

L'activité antiradicalaire de nos échantillons est évaluée selon l'équation suivante :

$$\% \text{d'activité antiradicalaire} = \left[\frac{\text{Abs}_{517} \text{ contrôle} - \text{Abs}_{517} \text{ échantillon}}{\text{Abs}_{517} \text{ contrôle}} \right] \times 100$$

$\text{Abs}_{517} \text{ contrôle}$: absorbance contrôle (DPPH)

$\text{Abs}_{517} \text{ échantillon}$: absorbance de l'échantillon

Calcul des CI50:

CI50 est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les CI50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés et du standard.

1.2 Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux

➤ Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols pour les différents extraits de plantes a été réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu [54].

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est à 750 nm, étant proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

0,2 ml de l'extrait est introduit dans un tube qui contient initialement 1,8 ml d'eau distillée, 0,2 ml de réactif Folin-Ciocalteu est ajouté. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un vortex. Après 5 min, 2 ml d'une solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (7%) sont ajoutés.

Le mélange réactionnel est finalement laissé à incuber durant 90 min à l'obscurité. L'absorbance est lue à 750 nm contre le témoin [55].



Une droite d'étalonnage est préalablement réalisée avec de l'acide gallique dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. La quantité des composés phénoliques totaux est exprimée en $\mu\text{g EAG} / 100\text{mg}$ d'extrait.

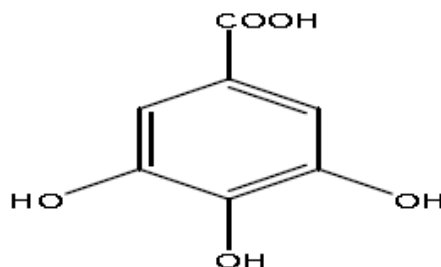


Figure 23 : structure de l'acide gallique

➤ Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes totaux dans les extraits de la plante a été réalisé par la méthode colorimétrique de chlorure d'aluminium AlCl_3 . Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par Arvouet-Grand [56].

Pour cela, 0,5 ml de l'extrait est introduit dans un tube contenant 2 ml d'eau distillée. A $t=0$, 0,15 ml de nitrite de sodium NaNO_2 à 5% est ajouté. On agite pendant 6 minutes puis on rajoute 0,15 ml d' AlCl_3 à 10%. Après 5 minutes on rajoute 1 ml de NaOH (1M) puis on ajuste le volume à 5 ml avec de l'eau distillée.

Une droite d'étalonnage est réalisée avec la quercétine (flavonoïde de référence) dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. La quantité des flavonoïdes totaux est exprimée en $\mu\text{g quercétine} / \text{mg}$ d'extrait.

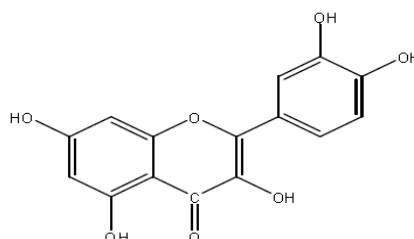


Figure 24: structure quercétine.



La quantité de flavonoïdes totaux de l'extrait testé est calculée à l'aide de l'équation de la droite d'étalonnage.

2. Activité vasodilatatrice

2.1 Préparation du lit vasculaire méésentérique:

Les rats ont été anesthésiés à l'uréthane (50 mg/Kg), la cavité abdominale est ensuite ouverte, l'artère méésentérique supérieure est repérée, une hémisection est effectuée à son origine avec l'aorte abdominale par laquelle on introduit une aiguille hypodermique.



Figure 25: Photo du rat Wistar anesthésié et placé en décubitus [57]



Figure 26: Ouverture de la cavité abdominale et perfusion du LVM [57]

La perfusion est tout de suite démarrée afin d'éviter l'anoxie du lit méésentérique grâce à une pompe péristaltique (Pharmacia Bio Tech) à débit constant (2ml/min) [58], [59]. La solution de perfusion, le Krebs Heinsleit, est composée (en g/l) du: NaCl 6,9; KCl 0,35; CaCl₂ 2; MgSO₄ 0,29; NaHCO₃ 2,1; KH₂PO₄ 0,14; Glucose 0,27 et est ajustée à un pH de 7.4. Afin de maintenir ce pH et oxygéner la solution de perfusion, cette dernière est barbotée par du carbogène (95% d'O₂ et 5% de CO₂.) La température est maintenue à 37 °C.

Une fois la perfusion démarrée, le LVM est isolé minutieusement avec des ciseaux fins aux bords des intestins et déposé sur une boîte de pétri. Une fois le LVM isolé, les rats sont sacrifiés par dislocation cervicale.



Figure 27: Lit mésentérique mis en évidence par une perfusion colorée par du bleu de méthylène.

L'artère mésentérique supérieur se ramifie en un grand nombre de branches, qui se divisent également en plusieurs vaisseaux sanguins afin d'assurer l'irrigation des mésentères [57].

Les réponses vasculaires ont été détectées par les changements de la pression de perfusion, qui a été mesurée en continu avec un capteur de pression (Capto 844) et enregistrée sur un oscillographe (Harvard apparatus limited). Les variations de perfusion en mmHg sont mesurées à l'aide d'un transducteur de pression (model TCB 100, Millar, Houston,TX).

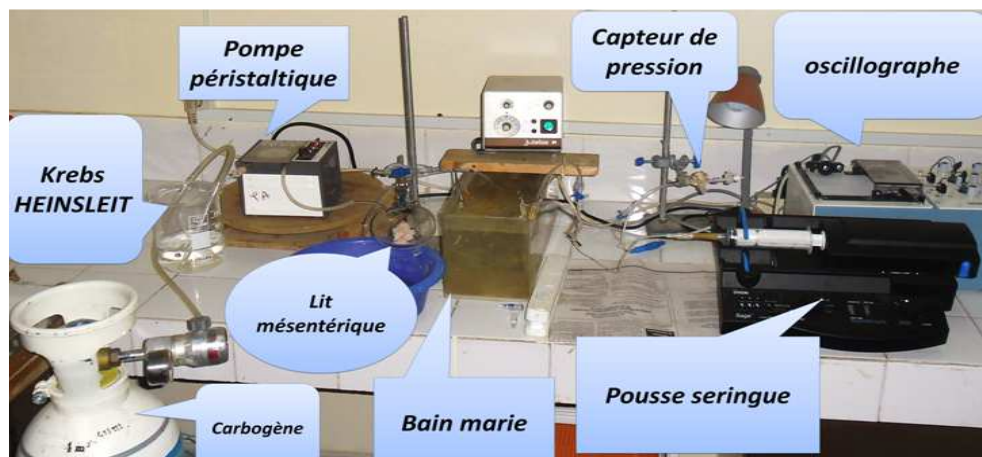


Figure28: Ensemble du montage utilisé lors de la perfusion du lit mésentérique.

Après 30 min de stabilisation, le LVM reçoit des injections toutes les 5 minutes de la phényléphrine (50 nmole), un agoniste des récepteurs α_1 , jusqu'à ce que les réponses soient reproductibles, puis on précontracte en continue par le pousse seringue en mettant de la phényléphrine (la pression atteint 80mmHg à 100 mmHg), nous faisons une pré contraction maximale en continue pour déterminer la réponse vasodilatatrice, ce qui nous permet de voir la chute de pression, puis on injecte l'acétylcholine qui est le vasodilatateur de référence. Après l'injection de l'acétylcholine on a une réponse vasodilatatrice traduite par une chute de pression.



Des concentrations croissantes des extraits des trois plantes ont été ajoutées cumulativement au milieu de survie.



Chapitre II: Résultats et discussion

V. Rendements des extractions

1. Soxhlet:

L'extraction par soxhlet a été faite seulement pour *Daphne gnidium* dans trois solvants (l'hexane, l'acétate d'éthyle et le méthanol) afin de faire une comparaison entre les deux méthodes d'extraction soxhlet et sonication.

Tableau 4: Rendements des différents extraits

Matériel végétale	Extrait	Rendement %
<i>Daphne gnidium</i>	-Hexane	5 ,0375
	-Acétate d'éthyle	6,9375
	-Methanol	29,7562

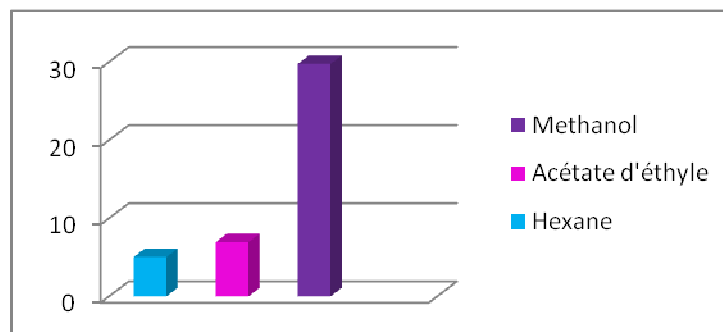


Figure29 : Rendement de l'extraction par soxhlet

Les résultats obtenus montrent que parmi tous les extraits obtenus c'est l'extrait méthanolique qui a le rendement le plus élevé (29,7562 %), suivi de l'extrait dans l'acétate d'éthyle (6,9375 %) puis de l'extrait hexanique (5 ,0375%).

Donc, le rendement augmente avec la polarité du solvant d'extraction par soxhlet.

2. Sonication

L'extraction par sonication de *Daphne gnidium* a été effectuée dans trois solvants (l'hexane, l'acétate d'éthyle et le méthanol) en gardant le même matériel végétal.

Tableau 5: Rendements des extraits

Matériel végétale	Extrait	Rendement %
<i>Daphne gniduum</i>	-Hexane	4 ,32
	-Acetate d'éthyle	15,2
	-Methanol	10,52

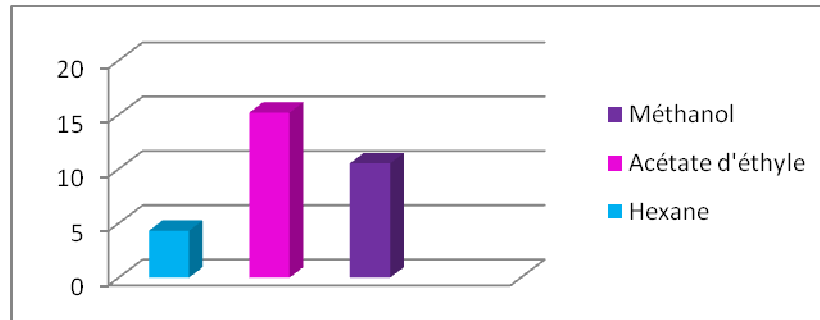


Figure30 : Rendement de l'extraction par Sonication

D'après nos résultats, le rendement le plus élevé a été obtenu avec l'acétate d'éthyle, soit 15,2 % tandis que le plus faible est celui de l'hexane, soit 4 ,32 %.

3. Comparaison entre le rendement des deux méthodes d'extraction pour *Daphne gnidium*

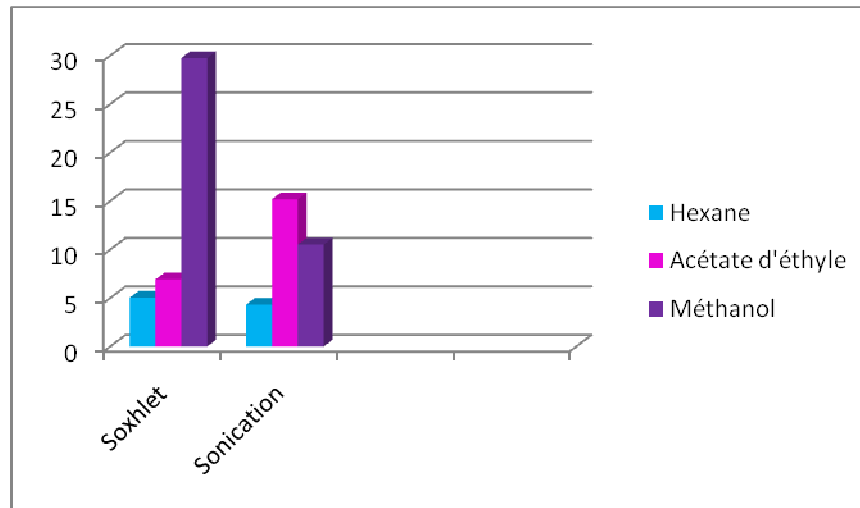


Figure31 : Rendements de l'extraction de la D. gnidium par les deux méthodes d'extraction



Le meilleur rendement pour l'extraction par le soxhlet était avec le méthanol (29.75%), et pour l'extraction par sonication était avec l'acétate d'éthyle (15,2%).

Comme cité précédemment, le rendement augmente avec la polarité du solvant dans le cas de l'extraction par soxhlet.

Quant à l'extraction par sonication, c'est l'extrait par acétate d'éthyle qui a donné le meilleur rendement. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les ultrasons font éclater la cellule végétale et les principes actifs sont, ainsi, libérés. Lorsque le matériel végétal subit des extractions successives dans plusieurs solvants, le rendement diminue avec le nombre d'extractions.

4. Rendement d'extraction des trois plantes par sonication

L'extraction par sonication des trois plantes *Daphne gnidium*, *Origanum elongatum* et *Cistus salviifolius* a été effectuée dans quatre solvants (l'hexane, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et le méthanol) en renouvelant à chaque extraction le matériel végétal.

Tableau 6: tableau récapitulatif regroupant les rendements des différents extraits

Matériel végétale	Extrait	Rendement %
<i>Daphne gnidium</i>	-Hexane	4,08
	-Acetate d'éthyle	21,32
	-Dichlorométhane	1,8
	-Methanol	21,64
<i>Origanum elongatum</i>	-Hexane	3,2
	-Acetate d'éthyle	10
	-Dichlorométhane	6,4
	-Methanol	10,8
<i>Cistus salviifolius</i>	-Hexane	1,6
	-Acetate d'éthyle	5,2
	-Dichlorométhane	2

	-Methanol	18
--	-----------	----

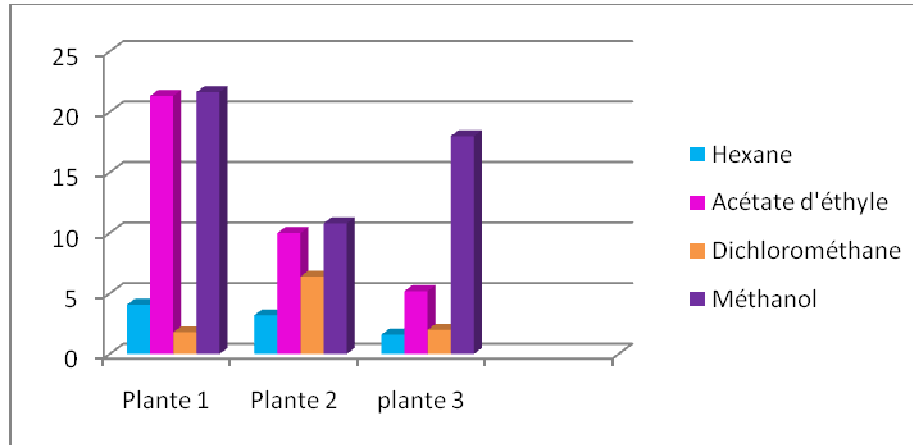


Figure 32 : Rendements de l'extraction par Sonication pour les trois plantes

Résultats:

Plante 1: Le rendement le plus élevé a été obtenu avec l'acétate d'éthyle (21,32 %) et le méthanol (21,64 %), tandis que le plus faible est celui du dichlorométhane (1,8 %).

Plante 2: Le rendement le plus élevé a été obtenu avec le méthanol (10,8 %) et l'acétate d'éthyle (10 %) tandis que le plus faible est celui de l'hexane (3,2 %).

Plante 3: le rendement le plus élevé est obtenu avec l'extrait du méthanol (18 %), suivi par le l'acétate d'éthyle (5,2 %), dichlorométhane(2%) puis l'hexane (1,6%),

VI. Analyse quantitative des polyphénols et flavonoïdes

La détermination de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. La courbe montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations (Fig. 33). Les quantités des polyphénols correspondantes à chaque extrait ont été exprimées en équivalent microgramme d'acide gallique(AG) et déterminées par l'équation : $y = 0,0148 x - 0,0198$ avec $R^2 = 0,9901$. Où x:Teneur en polyphénols, y: Absorbance et R^2 : coefficient de corrélation.



Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon le protocole colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl₃) et l'étalon était la quercétine (Fig. 34). La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme de l'extrait (µg EQ/mg d'extrait). Les taux des flavonoïdes des extraits ont été obtenus à partir de la courbe d'étalonnage qui suit l'équation : $y = 0,0345 x + 0,0108$ avec $R^2 = 0,9983$. Où x:Teneur en flavonoïdes, y:Absorbance et R^2 : coefficient de corrélation.

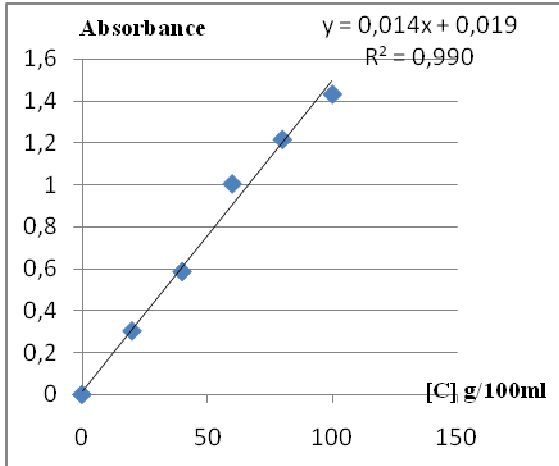


Figure 33 : Courbe d'étalonnage d'AG

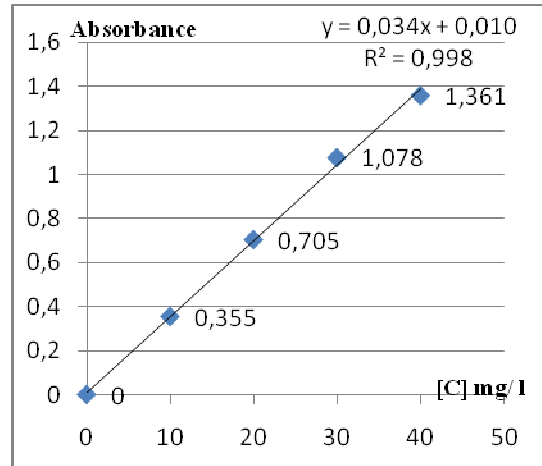


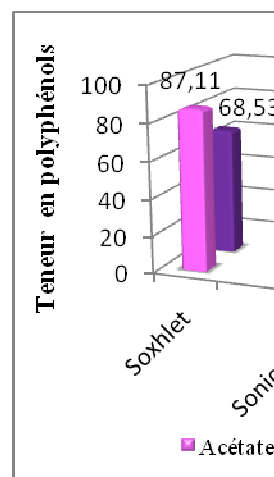
Figure 34 : Courbe d'étalonnage du Quercitine

Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux (7 et 8):

➤ **Plante1: Daphne gnidium**

Tableau7: Quantité des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits de Daphne gnidium pour les deux méthodes d'extraction.

Methode d'extraction	Extrait	Phénols totaux µg (EAG)/100mg	Flavonoïdes totaux µg (EQ)/mg
<i>Soxhlet</i>	-Acétate d'éthyle	87,11 ± 0,001	4,72 ± 0,002
	-Méthanol	68,53 ± 0,04	4,14 ± 0,006
<i>Sonication</i>	-Acétate d'éthyle	70,12 ± 0,02	4,69 ± 0,008
	-Méthanol	67,57 ± 0,01	3,63 ± 0,0009



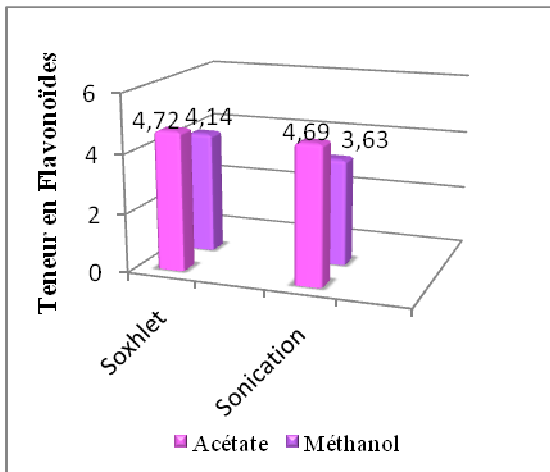


Figure 35: Teneurs en polyphénols des extraits par sonication et par soxhlet

Figure36: Teneurs en flavonoïdes des extraits de *D. gnidium* de *D. gnidium* par sonication et par soxhlet.

Les teneurs en polyphénols totaux (Fig 35) des extraits méthanoliques de *D.gnidium* pour l'extraction par soxhlet (68,53 μg EAC/100mg) et par sonication (67,57 μg EAC/100mg) sont relativement faibles en comparaison avec les extraits d'acétate d'éthyle par soxhlet (87,11 μg EAC/100mg) et par sonication (70,12 μg EAC/100mg). Il paraît clairement que l'extrait dans l'acétate d'éthyle contient plus de polyphénols totaux que l'extrait méthanolique pour les deux méthodes d'extraction.

On remarque, aussi, d'après les résultats ci-dessus (figure 36) que la quantité de flavonoïdes dans les extraits méthanoliques de *D.gnidium* par soxhlet (4,14 μg EQ/mg) et par sonication (3,63 μg EQ/mg) sont relativement faibles comparés aux extraits d'acétate d'éthyle par soxhlet (4,72 μg EQ/mg) et par sonication (4,69 μg EQ/mg). Le taux de flavonoïdes le plus élevé a été obtenu dans l'extrait d'acétate d'éthyle pour les deux méthodes d'extraction.

➤ **Pour la Plante 2: *Origanum elongatum* et Plante 3 : *Cistus salviifolius*.**

Tableau8: Quantités des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits de la plante 2 et la plante 3.



Matériel végétale	Extrait	Phénols totaux $\mu\text{g (EAG)}/100\text{mg}$	Flavonoïdes totaux $\mu\text{g (EQ)}/\text{mg}$
- Plante 2 : <i>Origanum elongatum</i>	-Acétate d'éthyle	$130 \pm 0,02$ $153,22 \pm 0,04$	$5 \pm 0,0008$ $8,16 \pm 0,0001$
	-Méthanol		
- Plante 3 : <i>Cistus salviifolius</i>	-Acétate d'éthyle	$80 \pm 0,01$	$4,83 \pm 0,001$ $5,39 \pm 0,002$
	-Méthanol	$98,84 \pm 0,02$	

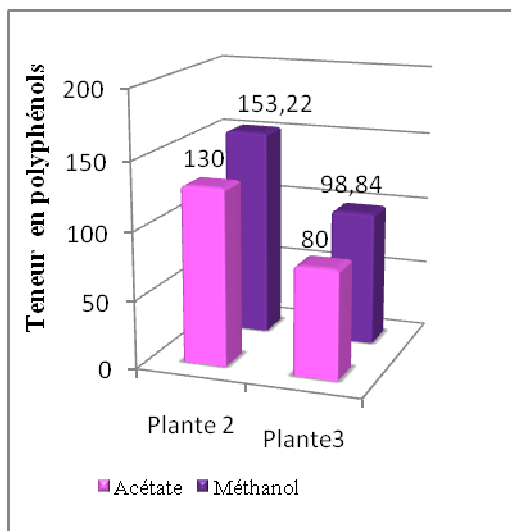


Figure 37 : Teneurs en polyphénols des extraits d'*O.elongatum* et *C. salviifolius*

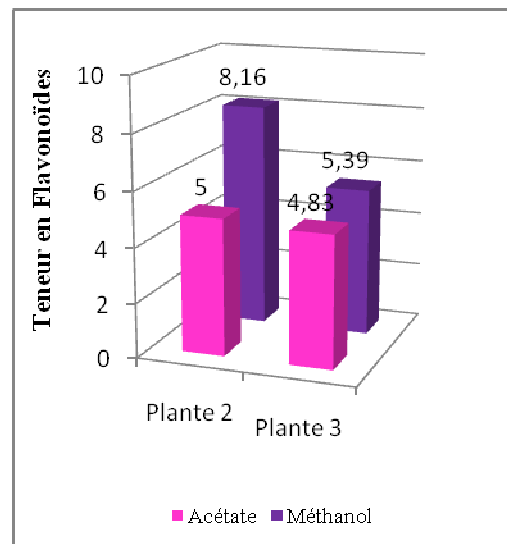


Figure 38 : Teneurs en flavonoïdes des extraits des extraits d'*O.elongatum* et *C. salviifolius*



Pour la plante 2:

A la lumière des résultats des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes pour les extraits d'*O. elongatum* (figures 37 et 38), on constate que la quantité des polyphénols (153,22 µg EAC/100mg) et des flavonoïdes (8,16 µg EQ/mg) dans les extraits méthanoliques est plus importante que la quantité des polyphénols (130 µg EAC/100mg) et des flavonoïdes (5 µg EQ/mg) dans les extraits d'acétate d'éthyle.

Pour la plante 3:

De même, (figures 37 et 38) les extraits méthanoliques de (polyphénols: 98,84 µg EAC/100mg et flavonoïdes 5,39 µg EQ/mg) sont plus riches en polyphénols et en flavonoïdes que les extraits de *C. salviifolius* dans l'acétate d'éthyle (polyphénols: 80 µg EAC/100mg et flavonoïdes: 4,83 µg EQ/mg)

Parmi les quatre solvants utilisés, le méthanol s'est avéré, donc, le meilleur solvant pour l'extraction des flavonoïdes et des polyphénols d'un matériel végétal.

VII. Activité antioxydante

Les résultats du pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les extraits des trois plantes ainsi que le BHT à différentes concentrations sont représentés dans les tableaux 9 et 10.

Le BHT est utilisé comme antioxydant de référence dans notre étude.

➤ Activité antioxydante des extraits de la Plante 1: *Daphne gnidium*

Nous avons évalué le pouvoir antioxydant des extraits de *D. gnidium* ainsi que celui du BHT à des concentrations allant de 6,25 µg/ml à 200 µg/ml.

Tableau 9: Pouvoir d'inhibition du DPPH par les extraits de *D. gnidium* et par le BHT.

Concentration µg/ml	Extraction par soxhlet		Extraction par sonication		BHT
	AE	MeOH	AE	MeOH	
200	98%	95%	95%	96%	61%
100	94%	83%	87%	85%	53,18%



50	80%	70%	72%	75%	49,87%
25	69%	59%	68%	67%	29,77%
12,5	56,50%	56%	63%	62%	24,17%
6,25	54,30%	53%	60%	61%	15,01%

Les résultats montrent que les quatre extraits réduisent la concentration de ce radical libre, et que le pourcentage d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration. On remarque aussi que le pouvoir réducteur de tous les extraits de *D. gnidium*, aussi bien par sonication que par soxhlet, est bien supérieur à celui de la référence (figure 39).

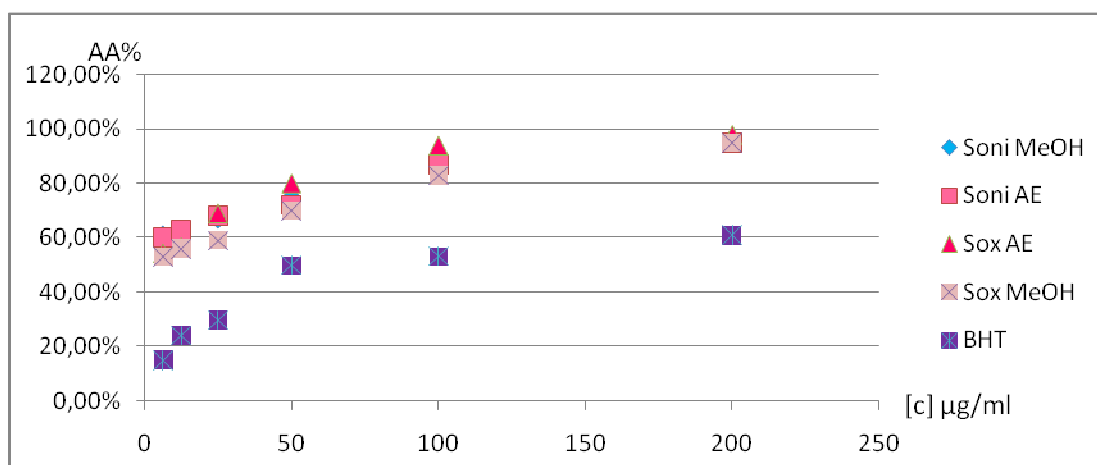


Figure 39: Pouvoir antioxydant des extraits de *D. gnidium* et du BHT en fonction de la concentration, selon le test au DPPH.

Les résultats des tests précédents nous ont permis de déterminer la concentration de chaque échantillon qui réduit de moitié la concentration du DPPH: CI_{50} . Cette concentration est calculée graphiquement par les régressions linéaires des tracés: pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des échantillons testées.

La CI_{50} étant inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé, plus la valeur de la CI_{50} est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

Sur le graphe de la figure 40 on représente les CI_{50} des différents extraits testés ainsi que celle du BHT.

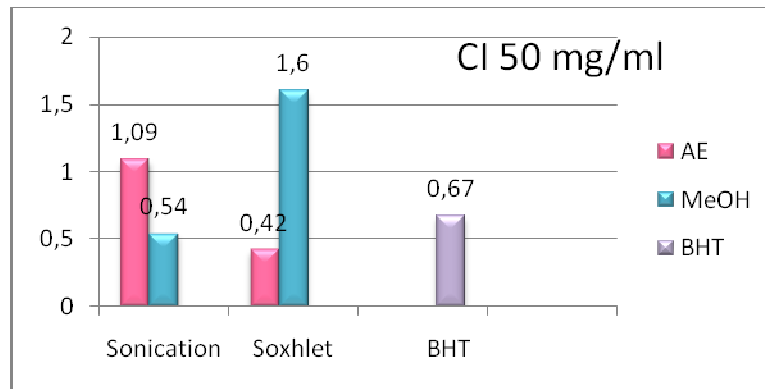


Figure 40: CI_{50} des extraits de *D. gnidium* par sonication et par soxhlet.



Les résultats obtenus (figure 40) ont permis de classer les extraits par rapport au standard (BHT) selon leur pouvoir antioxydant par ordre décroissant:

Ex AE (soxhlet) > Ex MeOH(sonication) > BHT > Ex AE(sonication) > Ex MeOH(soxhlet)

Deux extraits ont montré une meilleure activité que la référence. On remarque aussi que les résultats changent en changeant la technique d'extraction:

- par sonication, l'extrait méthanolique ($CI_{50} = 0,54 \pm 0,004$ mg/ml) est plus actif que celui dans l'acétate d'éthyle ($CI_{50} = 1,09 \pm 0,002$ mg/ml).
- Par soxhlet, c'est l'extrait dans l'acétate d'éthyle ($CI_{50} = 0,42 \pm 0,001$ mg/ml) qui a montré la meilleure activité en comparaison avec le méthanolique ($CI_{50} = 1,6 \pm 0,007$ mg/ml).

On peut conclure donc que:

La composition chimique des extraits changerait avec la technique d'extraction.

➤ **Activité antioxydante des extraits de la plante 2 (*Origanum elongatum*) et de la plante 3 (*Cistus salviifolius*).**

L'activité antioxydante des extraits des deux plantes 2 et 3 a été évaluée en mesurant leur pouvoir réducteur du radical DPPH. Les extraits ont été testés à des concentrations allant de 6,25 µg/ml à 200 µg/ml. Nous avons utilisé le BHT comme référence.

Les pourcentages d'inhibition sont donnés dans le tableau 11.

Tableau 10: Pouvoir d'inhibition du DPPH par chaque extrait et par le BHT.

Concentration µg/ml	Plante 2 : <i>Origanum elongatum</i>		Plante 3 : <i>Cistus salviifolius</i>		BHT
	AE	MeOH	AE	MeOH	
200	99%	98%	96%	98%	61%
100	96%	96%	90%	94%	53,18%
50	88%	81,60%	84%	86%	49,87%
25	74%	61%	79%	80%	29,77%



12,5	57%	60%	68%	69% 24,17%
6,25	49,20%	52,30%	60%	59% 15,01%

Les résultats montrent que les quatre extraits des deux plantes réduisent la concentration du DPPH, et que le pourcentage d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration. On remarque aussi que tous les extraits ont une activité supérieure à celle du BHT (figure 41).

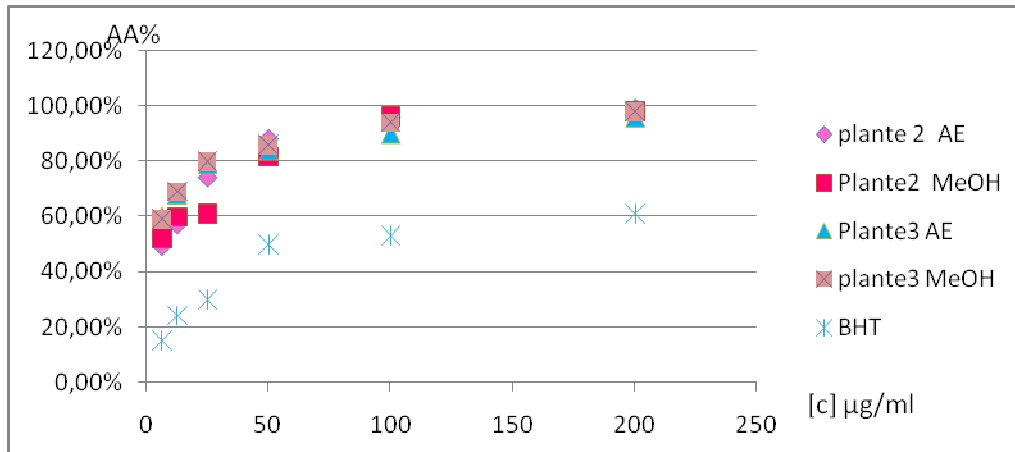


Figure 41: Pouvoir antioxydant des extraits des plantes 2 et 3 et du BHT.

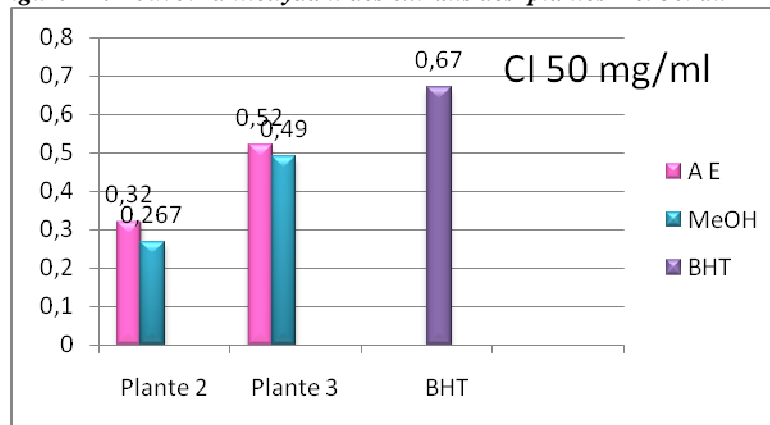


Figure 42: CI₅₀ des plantes 2 et 3

Comme le montre la figure 42:

- Les CI₅₀ des extraits des plantes (de 0,267 ± 0,06 mg/ml à 0,52 ± 0,001 mg/ml) sont inférieures à celle de la référence (0,67 ± 0,109 mg/ml).
- Comme pour *D. gnidium*, les extraits, par sonication, méthanoliques de *O. elongatum* et de *C. salviifolius* se sont montrés plus actifs que ceux dans l'acétate.

Les résultats obtenus ont permis de classer les extraits et le standard (BHT) selon leur pouvoir antioxydant par ordre décroissant :

Ex MeOH (*O. elongatum*) > Ex AE (*O. elongatum*) > Ex MeOH(*C. salviifolius*) > Ex AE(*C. salviifolius*) > BHT

CI₅₀ mg/ml= (0,267 ± 0,06 < 0,32 ± 0,095 < 0,49 ± 0,04 < 0,52 ± 0,001 < 0,67 ± 0,109)

Et enfin, en comparant l'activité antioxydante des extraits, des trois plantes par sonication, on peut conclure que, quelque soit le solvant d'extraction (méthanol ou acétate d'éthyl):

O. elongatum est plus active que *C. salviifolius* qui est plus active que *D. gnidium*.

Ce résultat est en parfaite cohérence avec celui de l'étude phytochimique. En effet, *O. elongatum* est plus riche en polyphénols et en flavonoïdes que *C. salviifolius*. *D. gnidium* ayant la plus faible teneur en polyphénols et en flavonoïdes.

VIII. **Activité vasodilatatrice**

L'activité vasodilatatrice de chaque échantillon a été déterminée en mesurant la pression de perfusion (PP) du lit mésentérique du rat. Elle est déterminée en calculant la différence entre la pression artérielle avant injection et la pression artérielle après injection du produit à tester. Cette différence est proportionnelle à l'activité vasodilatatrice (plus PP est grande plus le produit est actif). Les résultats des trois plantes étudiées sont présentés dans les courbes suivantes:

➤ *Daphne gnidium*

L'injection des extraits de *D. gnidium* aux différentes doses étudiées (de 30 à 300 µg/ml) n'entraîne aucun effet vasodilatateur comme le montre la figure 43.

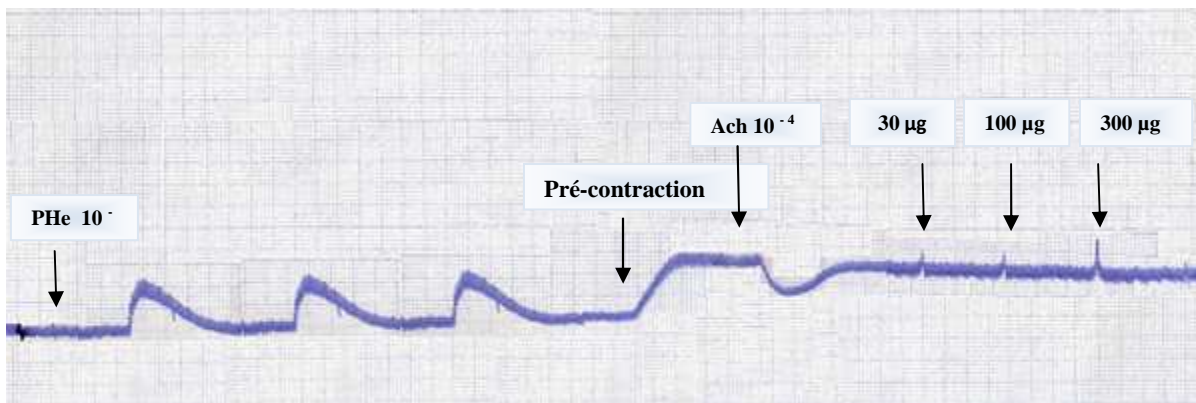


Figure 43: Effet vasodilatateur de l'extrait d'acétate d'éthyle de *D gnidium*.

Donc *D. gnidium* ne possède pas de pouvoir hypotenseur.

➤ *Origanum elongatum*

On remarque que l'extrait méthanolique d'*O. elongatum* a une activité vasodilatatrice (PP = 50 mmHg) voisine de celle de l'acétylcholine (PP = 40 mmHg) et qu'il induit aussi un prolongement de la réponse vasodilatatrice (figure 44).

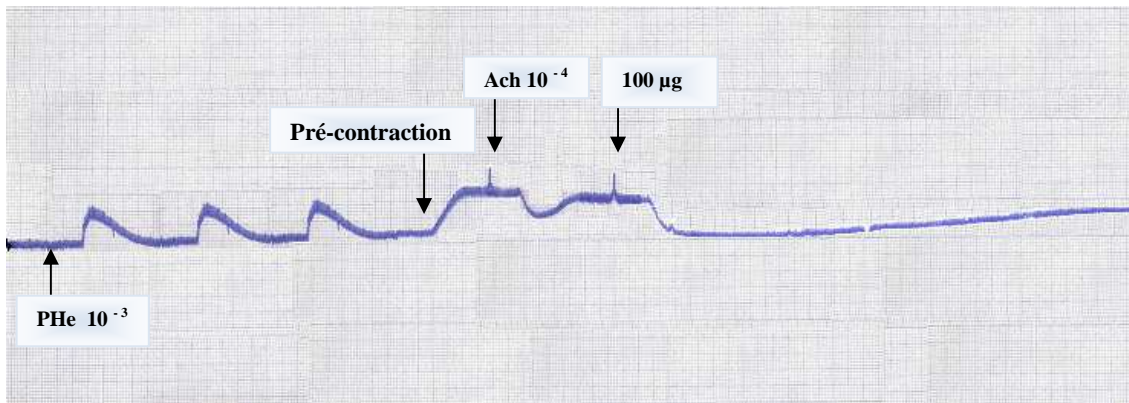


Figure 44 : Effet vasodilatateur de l'extrait méthanolique d'*O. elongatum*.

L'extrait dans l'acétate d'éthyle d'*O. elongatum* (PP=20 mmHg) s'est révélé moins actif que la référence (PP=40 mmHg). On remarque également un prolongement de la réponse vasodilatatrice après injection de cet extrait (figure 45).

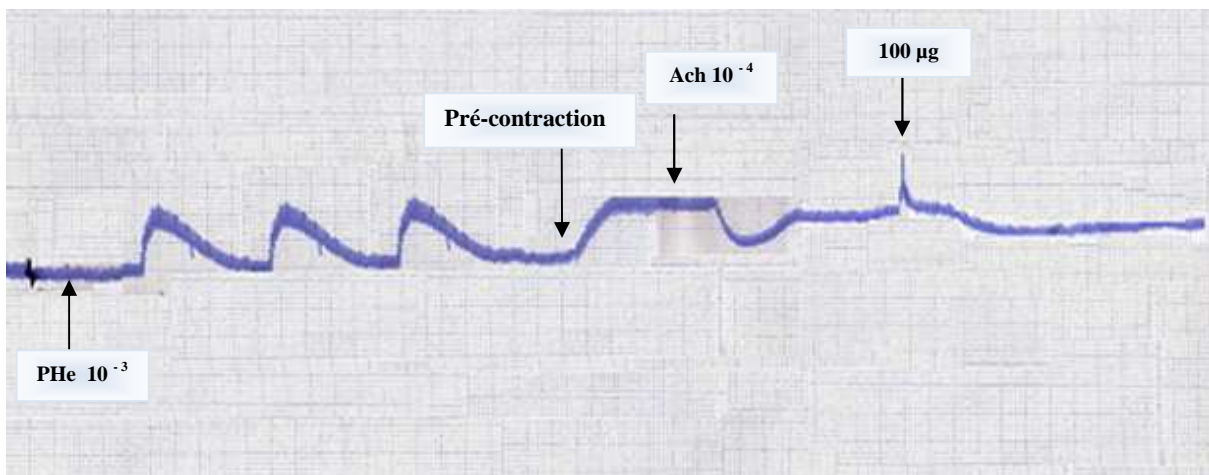


Figure 45 : Effet vasodilatateur de l'extrait d'acétate d'éthyle d'*O. elongatum*.

-pour *O. elongatum*, les extraits méthanoliques (PP = 50 mmHg) se sont révélés plus actifs que ceux dans l'acétate d'éthyle (PP=20 mmHg).

➤ *Cistus salviifolius*

L'injection de l'extrait dans le dichlorométhane de *C.salviifolius* aux doses étudiées (30 à 300 µg/ml) a induit une activité vasodilatatrice (figure 46) proportionnelle à la dose injectée.

L'effet hypotenseur a été observé à partir de 100 µg/ml qui baisse la pression de 25 mmHg. A 300 µg/ml une réponse égale à l'activité de l'acétylcholine (PP=40 mmHg) a été obtenue.

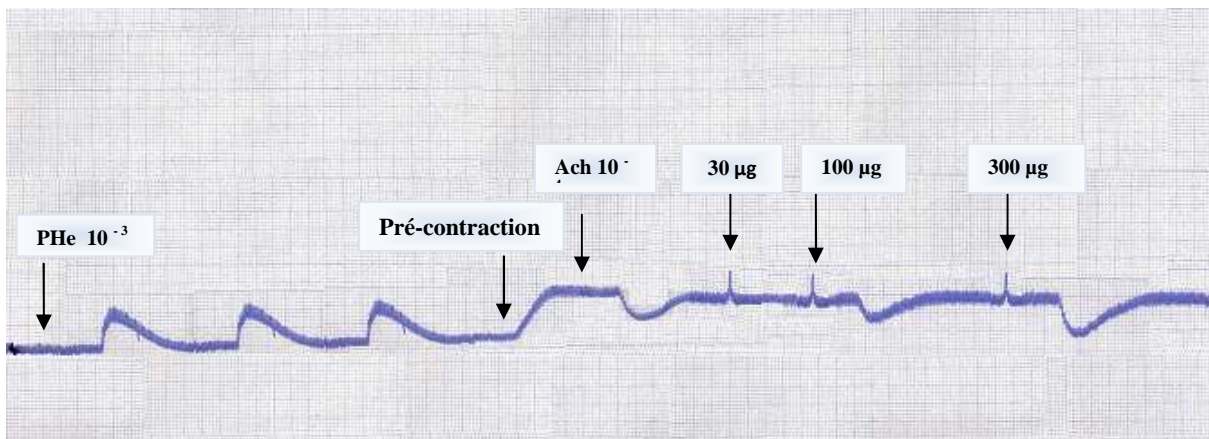


Figure 46: Effet vasodilatateur de l'extrait de dichlorométhane de *C.salviifolius*.

En comparant l'activité vasodilatatrice des trois plantes, on retrouve le même résultat de l'activité antioxydante :

O.elongatum est plus active que *C. salviifolius* qui est plus active que *D. gnidium* (n'entraîne aucun effet vasodilatateur).

On peut, donc, conclure que l'activité vasodilatatrice retrouvée chez les trois plantes étudiées serait due à leur pouvoir antioxydant.



Conclusion et perspectives

L'objectif de notre travail était l'étude phytochimique, l'évaluation du pouvoir antioxydant et l'effet vasodilatateur de différents extraits de trois plantes de la région de beni-Ammart : *Daphne gnidum*, *Origanum elongatum*, *Cistus salviifolius*.

La comparaison de deux techniques d'extraction, soxhlet et sonication, dans un même solvant, nous a permis de conclure que la composition chimique des extraits végétaux dépend de la technique utilisée.

Presque tous les extraits des plantes étudiées ont montré de bonnes activités antioxydante et vasodilatatrice.

Nous avons mis en évidence une corrélation entre la teneur en polyphénols et en flavonoïdes dans nos extraits et leurs activités antioxydante et vasodilatatrice. Ainsi, nous avons pu classer les trois plantes selon leurs activités biologiques dans l'ordre suivant :

O. elongatum plus active que *C. salviifolius* plus active que *D. gnidium*.

Les résultats prometteurs obtenus avec les trois plantes, incitent à faire des études plus approfondies. Ainsi, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- Caractériser la quantité des composés polyphénoliques par différentes méthodes de séparation (CLHP, CG/SM...).
- Etudier chaque extrait séparément puis isoler et identifier les différents composés qui existent.
- Isoler les polyphénols et déterminer leurs activités antioxydante, et vasodilatatrice séparément et combinés pour faire ressortir l'éventuel effet synergique entre ces molécules.
- Etudier la toxicité des extraits pour voir la possibilité de leur utilisation

