



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
جامعة الشهيد حمزة لخضر الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar - El OUED
كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
قسم العلوم الخلوية والجزئية
Département de biologie Cellulaire et Moléculaire

N série:.....

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique
en Sciences biologiques
Spécialité : Biochimie appliquée

THEME

Contribution à étude phyto-chimique et l'activité biologique des extraits
méthanoliques de *Calligonum comosum L'her.* issue de quatre régions
différentes (Oued-Souf)

Présentés Par:

M^{elle} AMMARI Maroua
M^{elle} LAOUAR Safa

Soutenu le: 23 juin 2019

Devant le jury composé de :

Présidente : M^{me}.MAHBOUB N. M.C.B Université d'El Oued
Examineur : Mr.ALIA Z. M.C.B Université d'El Oued
Promoteur : Mr.KHELEF Y. M.A.A Université d'El Oued

Année universitaire -2018/2019-

Remerciements

Nous remercions avant tout ALLAH tout puissant et miséricordieux, qui nous à avoir guidé toutes les années d'étude et qui nous a donné la volonté, la patience et le courage pour réaliser ce travail à terme.

*Nous tiens à remercier vivement notre présidente de jury Mme **MAHBOUB Nesma**.*

*Nos remerciements vont également à **Mr ALIA Z** Maîtres assistantes à l'université d'Echahid Hamma Lakhdar El Oued pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*On tient à exprimer nos remerciements et nos gratitude à monsieur **KHELEF Y**. Maître assistante à la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université Echahid Hamma Lakhdar El Oued, nous est satisfaite de vos qualités exceptionnelles de bonne enseignant dont votre simplicité et votre amour du travail ont fait de vous un enseignant admirable dont l'exemple à suivre. Recevez ici, Monsieur notre sentiments de gratitude pour votre disponibilité, pour nous avoir encadrée, votre aide, votre orientations, votre conseils, votre corrections sérieuses, votre patience au long de la réalisation de ce travail.*

En dernier lieu, nous remercions tous ceux qui ont nous aidés de près ou de loin à élaborer cette étude.

Liste des abréviations

Ac₂O : Anhydride d'Acétate

AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium

DO : Densité optique

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

EC₅₀ : La concentration efficace qui réduit la concentration initiale de DPPH de 50 %

EOR : Espèces Oxygénées Réactives

ERO : Espèces réactives de l'oxygène.

FeCl₃ : Perchlorure de Fer

g : Gramme

GHS : Glutathion réduit

GSH-Px : Glutathion Peroxydase

H : Hydrogène

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

H₂SO₄ : acide sulfurique

H₃PMo₁₂O₄₀ : Acide phosphomolybdic

H₃PW₁₂O₄₀ : Acide phosphotungstic

HCl : Alcool Chlorhydrique

IC₅₀ : Concentration permettant d'inhiber 50% du radical DPPH

m : la masse

m₀ : la masse initiale

MeOH : Méthanol

mg EAG/g Ps : Milligramme d'équivalent acide gallique par gramme du poids sec de la plante.

mg EQ/g Ps : Milligramme d'équivalent quercitine par gramme du poids sec de la plante.

ml : Millilitre

N : Normalité

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium

NaCl : Chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

NH₄OH : Hydroxyde d'ammonium

O₂· : Radical Superoxyde

ROOH : Hydro Peroxyde Lipidique

ROS : Reactive Oxygen Species

SOD:Superoxyde dismutase

UV : Ultras Violet

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

µg : Microgramme

µl : Microlitre

1O₂ :Oxygène singulet

Liste des figures

Figure 2 Schématisation de la balance entre les espèces réactives oxygénées (ERO) et les antioxydants. .5	5
Figure : 3 Régénération de la vitamine E et de la vitaminec8	8
Figure 4 Structure de l'acide benzoïque..... 14	14
Figure 5 Structure de l'acide hydroxycinnamique 15	15
Figure 6 Structure de Trans-resveratrol. 16	16
Figure : 7 Structure de lignane 17	17
Figure 8 Structure de coumarine 17	17
Figure:9 Structure de xanthone 18	18
Figure :10 Structure de base des flavonoïdes..... 19	19
Figure :11 Les structures chimiques des principales familles des flavonoïdes 20	20
Figure :12 Structure des isoflavones. 21	21
Figure :13 Structure des flavanones) 21	21
Figure:14 Structure des flavones. 22	22
Figure : 15 Structure des flavonol. 22	22
Figure : 16 Structure de base des anthocyanes 23	23
Figure :17 Structure de tanins condensés 24	24
Figure : 18 Structure de tanins hydrolysable 25	25
Figure : 19 Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques 27	27
Figure :20 Les caractéristiques structurales des flavonoïdes avec une activité de piégeage des radicaux libres élevée..... 28	28
Figure :21 <i>Calligonum comosum</i> L'her 35	35
Figure : 22 Teneurs en polyphénols totaux dans l'extrait de quatre régions équivalent d'acide gallique. .49	49
Figure : 23 Droite d'étalonnage de la catéchine 50	50
Figure : 24 Teneurs En Tanins Condensés 51	51
Figure : 25 Droite d'étalonnage de la quercétine..... 52	52
Figure : 26 Teneurs En flavinoides 52	52
Figure : 27 Courbe standard de l'acide ascorbique de test dpph 54	54
Figure : 28 Pourcentages d'inhibition du radical dpph• des antioxydants de références et des extraits testés 55	55
Figure : 29 Le pouvoir antioxydant (exprimé par IC ₅₀ (mg /ml)) des antioxydants de références et des extraits testés 56	56
Figure : 30 Droite d'étalonnage de l'acide ascorbique pour mesure la capacité antioxydante 57	57
Figure : 31 Histogramme comparatif de la capacité antioxydant totale des antioxydants de références et des extraits testés..... 58	58
Figure : 32 Courbe standard del'acide ascorbique d'hémolyse 59	59

Figure : 33 Courbe d'hémolyse (%) en fonction des concentration d'extrait de plante de région taghzout.	59
Figure : 34 Courbe d'hémolyse (%) en fonction des concentration d'extrait de plante de région Guemar.	60
Figure : 35 Courbe d'hémolyse (%) en fonction des concentration d'extrait de plante de région Hassani Abdelkrim	60
Figure : 36 Courbe d'hémolyse (%) en fonction des concentration d'extrait de plante de région Eloued ..	61
Figure : 37 Histogramme comparatif de taux d'hémolyse d'acide ascorbique et des quatre extraits testés en concentration 1mg/ml	61
Figure : 38 Spectre d'ir d'extrait étudié dans la région de Taghzout en concentration 1mg/ml	62
Figure : 39 Spectre d'ir d'extrait étudié dans la région de Guemar en concentration 1mg/ml	63
Figure : 40 Spectre d'ir d'extrait étudié dans la région de Hassani Abdelkrim en concentration 1mg/ml ..	63
Figure : 41 Spectre d'ir d'extrait étudié dans la région d'Eloued en concentration 1mg/ml	64

Liste des tableaux

Tableau 1 Mécanisme d'action des antioxydants d'origine enzymatique.....	7
Tableau : 2 Screening phytochimique de la plante <i>Calligonum comosum L'her.</i>	46
Tableau : 3 Interprétation des spectres	64

Résumé

Le présent travail a pour objectif l'étude d'une des plantes d'intérêt médicinal dans le Sahara septentrional algérien, en l'occurrence *Calligonum comosum* L'her provenant de quatre sites différents Taghzout – Boubydha , Guemar-Miha Salah , Hassani - Abdel Karim Al-dokar , El-Oued-Elchatte . Les échantillons choisis sont étudiés à travers leur contenant qualitatif et quantitatif en composés phénoliques, suivi d'une évaluation *in vitro* des activités antioxydante, anti-hémolytique de ces mêmes composés. La teneur en composés phénoliques des plantes estimées par la méthode de Folin- Ciocalteu est comprise entre ($0,076 \pm 0,01$ et $0,05 \pm 8,49$ mg EAG/g d'extrait). Le dosage des flavonoïdes par la méthode d' $AlCl_3$ a révélé que l'extrait de la région de Hassani - Abdel Karim Al-dokar possède la plus haute teneur en flavonoïdes ($0,011$ mg EQ /g d'Ext). L'estimation de la quantité de tanins condensés montre que l'extrait le plus élevée est égale ($1,084 \pm 0,01$ mg EC /g d'extrait) ont été détectées pour la région F2 Guemar-Miha Salah. L'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant des méthodes ; le piégeage du radical libre DPPH où l' IC_{50} obtenu pour l'acide ascorbique ($0,0054 \pm 0,0003$ mg /ml) utilisés comme des molécules de référence , est bien plus inférieur à ceux des extraits et donc, une activité antioxydante très élevé, La capacité antioxydante totale CAT dont les extraits a montré une variabilité entre les quatre régions . On remarque que dans la concentration de $0,5$ mg/ml, la région Hassani - Abdel Kerim Al-dokkar a un pouvoir antioxydant le plus élevé ($0,203 \pm 0,002$ mg EAA/1g EXS) par rapport aux extraits de autre régions, l'activité anti-hémolytique a révélé une réponse antioxydante considérable l'effet protecteur d'hémolyse très proche dans tous les extraits, elle a révélé une réponse antioxydante considérable sauf la solution d'acide ascorbique qui présente un hémolyse le plus bas (16.32%). l'analyse par spectroscopies IR confirme les compositions phénoliques de nos extraits , il est aussi présent dans les très nombreux composés dits « hydroxylés ». De nombreuses études ont établi des relations entre la structure des polyphénols et leur capacité à piéger les radicaux libres.

Mots clé : *Calligonum comosum* L'her, métabolites Secondaires, Polyphénols Totaux, Les Flavonoïdes, L'Activité Antioxydante.

Abstract

The present work aims to study one of the plants of medicinal interest in the Algerian northern Sahara, in this case *Calligonum comosum* L'her from four different sites Taghzout - Boubydha, Guemar-Miha Salah, Hassani - Abdel Kerim Al-dokkar , Eloued-elchatte. The samples chosen are studied through their qualitative and quantitative content of phenolic compounds, followed by an in vitro evaluation of the antioxidant, anti haemolytic activities of these same compounds. The phenolic compounds content of the plants estimated by the Folin-Ciocalteu is between (0.076 ± 0.01 and 0.05 ± 8.49 mg EAG / g extract). The flavonoid assay by the $AlCl_3$ method revealed that the extract of the Hassani-Abdel Karim Al-dokkar region has the highest flavonoid content (0.011 mg EQ / g of Ext). The estimate of the amount of condensed tannins showing that the highest extract is equal (1.084 ± 0.01 EC mg / g extract) was detected for the Guemar-Miha Salah F2 region. Evaluation of antioxidant activity using methods; trapping of the free radical DPPH where the IC_{50} obtained for ascorbic acid (0.0054 ± 0.0003 mg / ml) used as reference molecules, is much lower than those of the extracts and thus a very high antioxidant activity, the capacity total antioxidant CAT whose extracts showed variability among the four regions. It is noted that in the concentration of 0.5 mg / ml, the Hassani-Abdel Karim Al-dokkar region has the highest antioxidant capacity (0.203 ± 0.002 mg EAA / 1g EXS) compared with extracts from other regions, the anti-hemolytic revealed a considerable antioxidant response the protective effect of hemolysis very close in all extracts, it revealed a considerable antioxidant response except the ascorbic acid solution which has the lowest hemolysis (16.32%). analysis by IR spectroscopy confirms the phenolic compositions of our extracts, it is also present in the many so-called "hydroxylated" compounds. Many studies have established relationships between the structure of polyphenols and their ability to trap free radicals.

Key word : *Calligonum comosum* L'her, Secondary metabolites, Total Polyphenols, Flavonoids, Antioxidant activity.

Sommaire

إهداء	
Remerciements	
Liste des abréviations.....	
Liste de figure	
Liste de tableau	
Résumé	
Abstract	
Sommaire	
Introduction	

Partie théorique

Chapitre I : Les antioxydants

I . Généralité sur stress oxydant.....	5
I .1. Définition dustress oxydant:.....	5
I.2. Les Radicaux libres :	5
II. Systèmes de défenses antioxydants.....	6
II.1.Classification et mécanismes de défense contre le stress oxydatif :..	6
II.1.1 . Systèmes de défense par des enzymes antioxydants :	7
II.1.2. Les composés phénoliques et la détoxification des formes activées de l'oxygène	8
II.1.2 .1 . Acide Ascorbique (Vitamine C)	8
II.1. 2. 2. Vitamine E.....	8
II .1.2 .3 . Les caroténoïdes	9
II.1. 2 .4 . Les polyphénols.....	9
II .1. 2 . 5 . Les flavonoïdes	9

Chapitre II : Métabolites secondaires

I. Généralité sur les métabolites secondaires	12
II. Structure des composés polyphénoliques	13
II.1. Composés polyphénoliques non flavonoïdiques.....	13
II.1.1. Les acides phénoliques.....	13
II.1.1.1. Les acides hydroxybenzoïques C ₆ -C ₁	13
II.1.1.2. Les acides hydroxycinnamique C ₆ -C ₃	14
II.1.2. Les stilbénes C ₆ -C ₂ -C ₆	15
II.1.3. Les lignanes (C ₆ -C ₃) _n	16
II.1.4. Les coumarines C ₆ -C ₃	17
II.1.5. Les xanthones C ₆ -C ₁ -C ₆	18
II.2. Composés polyphénoliques flavonoïdiques.....	18
II.2.1. Les isoflavones	20
II.2.2 Les flavanones	21
II.2.3. Les flavones.....	22
II.2.4. Les Flavonols	22
II.2.5. Les anthocyanes	23
II.2.6. Les tanins.....	23
II.2.6.1. Les tanins condensés	24
II.2.6.2. Tanins hydrolysables.....	25
III. Biosynthèse des polyphénols	25
III.1. La voie de Shikimate	25
III.2. La voie de l'acétate malonate	25
IV. Propriétés biologique et intérêt des polyphénols.....	26
IV.1. Chez les végétaux	26
IV.2. Chez l'être humain.....	26
IV.2.1. Activité antioxydante.....	26
IV.2.1.1. Piégeage des radicaux libres.....	26

IV.2.1.2. Chélation des ions métalliques	28
IV.2.1.3. Inhibition enzymatique	29
IV.2.2. Activité anti bactérienne	29
IV.2.3. Activité anti inflammatoire.....	30
IV.2.4. Activité anti tumorale	30
IV.2.5. Activité anti cardiovasculaire	30
IV.2.6. Activité anti diabétique.....	31

Partie pratique

Chapitre I :Materielset méthodes

I. Matériels et méthodes de travail.....	35
I.1. Matériels végétal de la plante à l'étude (<i>Calligonum comosum</i> L`Her).....	خطأ! الإشارة المرجعية غير معروفة.
I.1.1. Description botanique de <i>Calligonum comosum</i> L`Her:.....	35
I.1. 4. Habitat:.....	36
I.1. 5.Cueillette:.....	36
I.1. 6. Partie utilisée :	36
I.1.7. Utilisation:	36
I.2. Préparation des échantillons de plantes.....	37
II. METHODES	38
II.1. Screening phytochimique et caractérisation spectroscopique des métabolitessecondaires	38
II.1. 1. Mise en évidence des flavonoïdes.....	38
II.1. 2 . Mise en évidence des tanins.....	38
II.1. 3 . Mise en évidence des saponosides	38
II.1. 4 . Mise en évidence des alcaloïdes	39
II.1. 5 . Mise en évidence des glycosides	39
II.1. 6 .Mise en évidence des stérols et triterpènes	39
II.1. Méthodes de caractérisation quantitative des polyphénols.....	40
II.1.1. Dosage des polyphénols totaux.....	40

II.1.1.1.Principe.....	40
II.1.1.2.Méthode de dosage.....	40
II.1.2. Dosage des Tanins condensés	40
II.1.2.1. Principe :.....	40
II.1.3.Flavonoïdes	41
II.1.3.1.Principe :.....	41
II.1.3.2. Mode opératoire :	41
II.2. Méthodes de dosage des activités antioxydantes <i>in vitro</i>	41
II.2.1.Le test de piégeage du radical DPPH.....	41
II.2.1.1. Principe.....	41
II.2.1.2. Mode opératoire :	41
II.2.2. Dosage de la capacité antioxydante totale « test de phosphomolybdate »	42
II.2.2.1. Principe.....	42
II.2.2.2. Méthode de dosage.....	42
II.3.Test hémolyse.....	43
II.3.1. Méthode de dosage.....	43
III. Analyse par spectroscopie IR	43
III.1. Principe	43
III.2. Mode opératoire	44
Chapitre II :	45
Résultats et discussions	45
I. Résultats de l'étude phytochimique	46
I.1. Test préliminaires de la composition chimique	46
I.2. Dosage des polyphénols totaux	48
I.3. Dosage des tanins condensés.....	50
I.4. Dosage des flavonoïdes	51
II. Méthode de dosage des activités antioxydantes <i>in vitro</i>	53

II.1. Le test de piégeage du radical DPPH.....	53
II.2. Capacité antioxydant totale (CAT)	57
II.3. Test hémolyse	58
III. Analyse par spectroscopie IR	62
Conclusion.....	66
Références bibliographies.....	69
Références bibliographiques	70

Introduction



Introduction

Depuis des milliers d'années, l'homme utilisé les plantes trouvées dans la nature pour traiter et soigner des maladies (**Sanago, 2006**), l'utilisation des plantes en phytothérapie est très ancienne et connaît actuellement une région d'intérêt au près du public, selon l'organisation mondiale de la santé (**O.M.S.,2003**) environ 65- 80% de la population mondiale a recours au médecine traditionnelle pour satisfaire ses besoins en soins de santé primaire, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne (**MA et al., 1997**). Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constitutions des plantes sont utilisés directement comme agent thérapeutique, mais aussi comme matière première pour la synthèse de médicaments ou comme modèle pour les composés pharmaco logiquement actifs (**Ameenah, 2006**). Ces plantes médicinales renferment de nombreux principes actifs ou certains sont issus du métabolisme secondaire. Les plantes produisent déjà 70%de nos médicaments, déjà environ 170 molécules bioactives ont été identifiées à partie de plante (**Chaabi, 2008**). Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie; Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes (**Bahorun et al., 1996**).

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications, la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes augmente la multiplication mitochondriale de radicaux (**Girodon et al.,1997**). Parmi les activités biologiques des plantes médicinales, ces dernières années l'attention s'est portée sur l'activité antioxydante en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du coeur, le cancer, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'alzheimer en combattant le stress oxydant (**Meddouret et al., 2013**).

L'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées. En effet, les polyphénols sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal qui ont une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé. Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des

maladies inflammatoires et cardiovasculaires; ils sont également utilisés comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (**Bougandoura et al, 2012**).

Le Sahara dispose d'une biodiversité floristique exceptionnelle, constituée d'environ 500 espèces végétales et à laquelle s'ajoute une tradition séculaire de pharmacopée traditionnelle (**Ozanda, 1991**). Les plantes spontanées des zones arides sont considérées comme l'une des ressources phytogénétiques qui présentent un intérêt agronomique, économique, écologique mais aussi stratégique (**UNESCO, 1960**). Parmi à ces plantes médicinales recensées à ce jour, ceux de la famille Polygonaceae, elle comprennent environ 1200 espèces (**David, 2008**) réparties dans environ 50 genres. Les genres les plus importants sont *Eriogonum* (240 espèces), *Rumex* (200 espèces), *Coccoloba* (120 espèces), *Persicaria* (100 espèces) et *Calligonum* (80 espèces) (**Brandbyge, 1993, Craig et al. 2005**).

Dans cette étude, on utilise les feuilles du *Calligonum comosum* L'her, récoltées dans quatre régions différentes, Taghzout, Geumar, Hassani Abdel Karim et El Oued, situées dans la région d'Oued Souf.

Notre travail s'articule autour de l'étude phytochimique de cette plante ainsi que sur l'évaluation des activités antioxydantes des extraits préparés.

Cette étude a été divisée en deux parties ; Dans la première partie, nous présentons une synthèse bibliographique qui regroupe deux chapitres dont le premier consacré aux antioxydants. Le deuxième chapitre est sur les métabolites secondaires ; leurs classification et leurs propriétés pharmacologiques.

La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes utilisées dans ce travail qui porte sur :

- Les tests phytochimiques des différentes parties de la plante.
- Dosage des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins,
- Une étude de l'activité antioxydante des extraits de cette plante, par deux méthodes, le piégeage du radical libre DPPH, la capacité antioxydante total, test hémolyse et analyse par spectroscopie IR.

Dans le dernier chapitre, on a traités les résultats obtenus et la discussion. En fin on termine par une conclusion générale.

Partie théorique

Chapitre I : Les antioxydants

I. Généralité sur stress oxydant

I.1. Définition du stress oxydant:

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives oxygénées (ERO) et leur destruction par des systèmes de défense antioxydants (Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2003).

Dans les conditions quotidiennes normales, les espèces réactives oxygénées (ERO) sont produites en faible quantité comme des médiateurs tissulaires ou des résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cela sous le contrôle de systèmes de défense adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces conditions, on dit que la balance pro-oxydant/anti-oxydants est en équilibre. (Favier, 2003) (Figure 1).

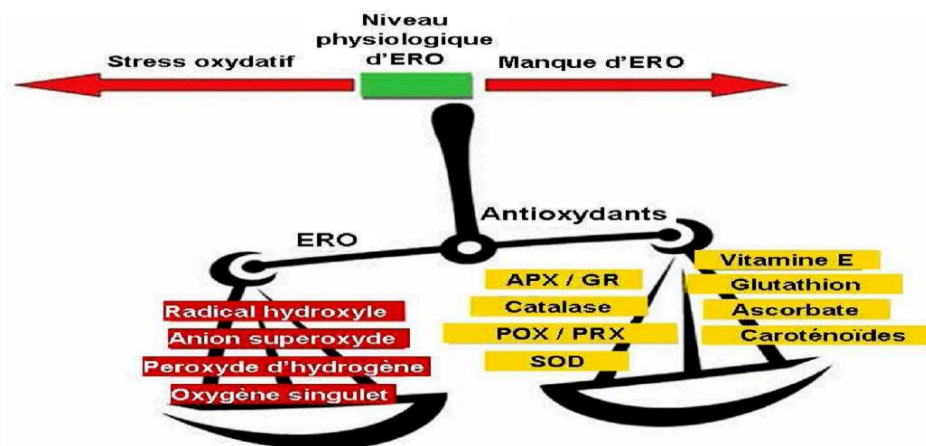


Figure1 Schématisation de la balance entre les espèces réactives oxygénées (ERO) et les antioxydants (Pourrut, 2008).

I.2. Les Radicaux libres :

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leurs couches externes et capables d'existence indépendante (Halliwell *et al.*, 1999). Ils peuvent être dérivés de l'oxygène (ERO) ou d'autres atomes comme l'azote(ERN). La présence d'un électron célibataire confère aux radicaux libres une grande réactivité (demi-vie courte) et ils peuvent être aussi bien des espèces oxydantes que réductrices. Cette instabilité rend difficile leur mise en évidence au niveau des différents milieux biologiques (Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2003).

Parmi les radicaux formés chez les végétaux on distingue (Smirnoff, 2005) :

- _ Anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$)
- _ Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)
- _ Radical hydroxyle ($HO\cdot$)

II. Systèmes De Défenses Antioxydants

Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (**Droge, 2002**).

Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques. Mais aussi à des petites molécules hydro ou liposolubles.

Les systèmes antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (**Delattre et al., 2005**).

II.1. Classification et mécanismes de défense contre le stress oxydatif :

Afin de prévenir l'accumulation excessive des **EOR**, la plante développe un système de défense enzymatique et un autre non enzymatique. Cette protection est basée sur plusieurs mécanismes d'action (**Zhang et al., 2008**):

Il existe 3 types de défenses :

- Les enzymes qui existent à l'état endogène, défendent les cellules contre les radicaux libres. Les principaux systèmes enzymatiques comprennent les superoxydes dismutases (sods), la catalase (**CAT**)...
- Les protéines chélatrices du fer comme la transferrine et l'hémosidérine ou du cuivre comme l'albumine. Ce système bloque les ions métalliques impliqués dans la réaction de Fenton.
- Les molécules antioxydantes ou piègeurs de radicaux libres comme la vitamine E, les caroténoïdes, les anthocyanes... ces molécules interviennent au niveau des membranes lipidiques.

II.1.1 . Systèmes de défense par des enzymes antioxydants :

Les enzymes antioxydantes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire. Les enzymes intervenant dans cette opération sont regroupées dans le **tableau 01**.

Tableau1 : Mécanisme d'action des antioxydants d'origine enzymatique.

Enzyme	Mécanisme d'action	Références
Superoxyde Dismutase (SOD EC 1.15.1.1)	C'est une métalloprotéine contenant du Manganèse, cuivre et de zinc. Elle élimine le radical Superoxyde $2\bullet$ -en le transformant en peroxyde D'hydrogène (H_2O_2).	Pokorny <i>et al.</i>, 2001 ; Gapińska <i>et al.</i>, 2008 ; Iritiet Faoro-Water, 2008
Glutathion Peroxydase (GSH-Px)	Elimination du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) Et le hydro peroxyde lipidique (ROOH), en Association avec le glutathion pour donner Respectivement une molécule d'eau et (ROH).	
Catalase (CAT)	Transformation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) En simple molécule d'eau	
Glutathion Réductase	Régénération du glutathion réduit (GHS).	Aurousseau, 2002

II.1.2. Les composés phénoliques et la détoxification des formes activées de l'oxygène

Ce groupe d'antioxydants est uniquement exogène, il comprend les métabolites secondaires d'origine végétale en particuliers: des polyphénols (flavonoïdes, acides phénoliques, coumarines, des tannins condensés, etc...), caroténoïdes, terpénoïdes, et vitamines (C et A).

II.1.2 .1 . Acide Ascorbique (Vitamine C)

L'acide ascorbique, appelée également vitamine C, est principalement présent dans les légumes et les fruits. Il possède un effet antioxydant car il :

- Protège efficacement les protéines sans protéger les lipides (Kraus *et al.*,1997).
- Intervient pour régénérer la vitamine E (Figure2) (Iriti et Faoro-Water, 2008).
- Piège le superoxyde au niveau du cytoplasme (Aurousseau, 2002)

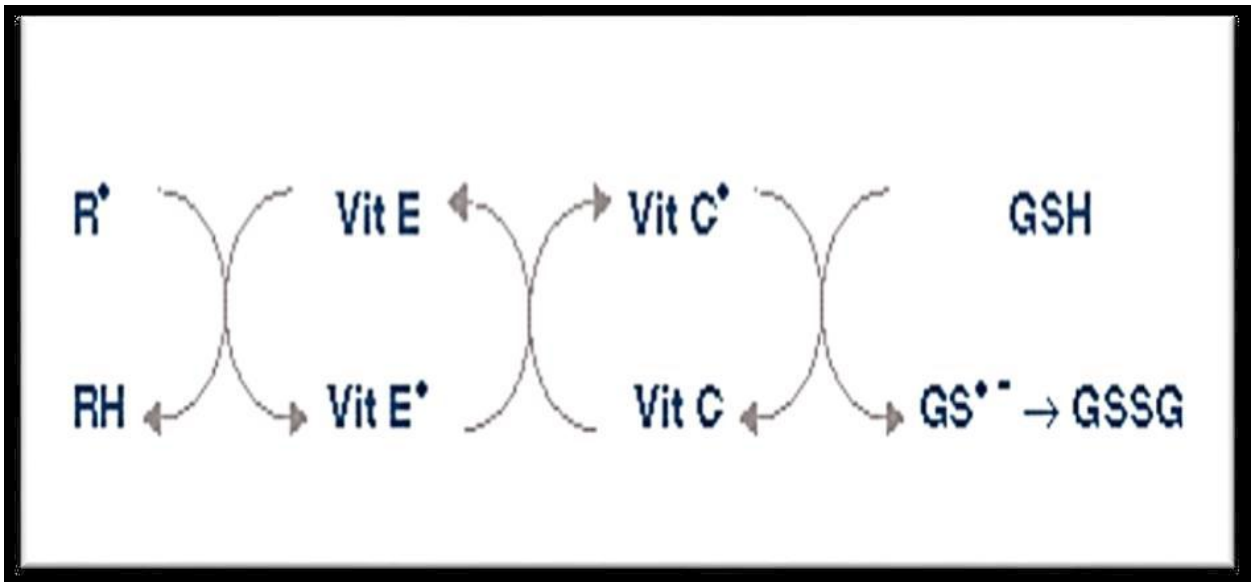


Figure2 : Régénération de la vitamine E et de la vitamine C (Pincemail *et al.*, 1999)

II.1. 2. 2. Vitamine E

La vitamine E ou α tocophérol est une vitamine liposoluble membranaire, abondante dans l'alimentation où elle se trouve en quantité importante dans les huiles végétales, et en particulier dans le germe de blé (Pokorny *et al.*, 2001).

L' α tocophérol est un donneur de H, et permet la formation de peroxydes lipidiques (ROOH), ou de produit stable, pendant que lui-même se transforme en quinone (α TH, α tocophérylquinone (TQ)), selon les réactions suivantes (1 et 2) (Simonoff, 1991):



II .1.2 .3 . Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles jaunes, oranges ou rouges , dont la structure de base est une ossature de carotène $C_{40}H_{56}$ formés de 8 unités isoprènes (tetraterpènes). On distingue plusieurs types de caroténoïdes parmi eux :

Les carotènes et les xanthophylles (**Pokorny et al., 2001**). Les Caroténoïdes sont desantioxydants naturels efficaces contre les dommages oxydatifs. Leurs principaux mécanismes d'action sont (**Smirnoff, 2005 ; Chao-Chin et al., 2008**):

-Piégeage de l'oxygène singulet $1O_2;C_{40}H_{56}$

-Inhibition de la peroxydation lipidique.

II.1. 2 .4 . Les polyphénols

Les polyphénols constituent un groupe important des métabolites secondaires, très largement répandus dans le règne végétal. Ils sont reconnus pour leurs multiples propriétés biologiques: anti-inflammatoires, antimicrobiennes ,antifongiques ,anticancéreuses incluant l'activité antioxydante. Ce Sont des antioxydants naturels puissants impliqués dans la défense contre les dommages oxydatifs au niveaude la cellule car ils possèdent des structures chimiques idéales. L'activité antioxydante des polyphénols est plus puissante que celle des tocophérols et de l'acide ascorbique (**Ozsoy et al., 2008**).

Les actions protectrices des polyphénols peuvent comprendre (**Magalha et al., 2008**):

- Inhibition des **EOR** ($1O_2$) ;
- Piégeage des radicaux libres ;
- Chélation des ions métalliques responsables de la production des **E.O.R** ; Inhibition des enzymes responsables de la production des **E.O.R** (exemple :
- Xanthine oxydase et cyclo-oxygenase).

II .1. 2 . 5 . Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés naturels qui constituent un groupe majeur de polyphénols. Ces composés sont reconnus pour leurs activités antioxydantes.

Ils agissent par (**Halliwell, 1994**):

- Piégeage direct des radicaux libres;

- Inhibition de la peroxydation lipidique;

- Inhibition des enzymes responsables de la production des **EOR**;

-Chélation des ions métalliques responsables de la production des **EOR**.

Chapitre II :

Métabolites secondaires

I. Généralité sur les métabolites secondaires

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leurs capacités à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils s'accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (**Macheix et al., 2005**).

Le terme métabolite secondaire est utilisé pour décrire une large gamme de composés chimiques dans les plantes qui ne sont pas impliqués dans les processus biochimiques de la croissance et de la reproduction des plantes (**Amlan et Jyotisna, 2010**). Ils ont un rôle important dans les interactions de la plante avec son environnement tel que la protection contre les pathogènes, herbivores, la concurrence entre les plantes et le stress abiotique comme la dessiccation et la radiation UV (**Greathead, 2003**). Plus de 200.000 structures de métabolites secondaires ont été identifiées (**Hartmann, 2007**).

Les métabolites secondaires sont classés en trois groupes chimiques très variés :

- **Les polyphénols**: constituent le groupe de métabolites le plus large et le plus répandu du règne végétal plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues (**Marin et Andriantsitohaina, 2002**). L'élément structural fondamental qui caractérise les composés phénoliques est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel il est directement lié au moins à un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction :

Ether, ester, hétéroside (**Bruneton, 2009**). Ce sont des pigments généralement responsables des teintes automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et fruit (jaune, orange, rouge). Ils sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Par ailleurs, les polyphénols font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale. Les principales sources alimentaires sont les fruits, légumes et les céréales...etc (**Edeas, 2007**).

- **Les terpénoïdes**: constituent un groupe de molécules très différentes tant d'un point de vue structural que fonctionnel. Avec près de 15.000 structures moléculaires connues, ils constituent probablement la classe la plus vaste et la plus diversifiée de composés organiques végétaux. Ce sont des substances généralement lipophiles qui dérivent d'une entité simple à cinq atomes de carbones. La famille des terpènes comprend des hormones, des pigments caroténoïdes, des stérols, le latex (qui est à la base du caoutchouc naturel), ainsi qu'une

grande partie des huiles essentielles qui confèrent aux plantes leur parfum ou leur goût (Hopkins, 2003).

- **Les alcaloïdes:** figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine, l'intérêt qu'on leur porte reposait traditionnellement sur leur action physiologique et psychologique particulièrement violente chez l'homme. Ce sont des composés azotés au goût amer qui ont des propriétés chimiques basiques (alcalines) parmi les alcaloïdes on a morphine, coca, caféine (Reven *et al.*, 2000).

II. Structure des composés polyphénoliques

Les polyphénols peuvent se regrouper en deux grands groupes :

- **Les non flavonoïdes** dont les principaux composés sont: les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les coumarines et les xanthones.

- **Les flavonoïdes** dont on caractérise principalement : les flavones, flavanones, flavonols, isoflavonones, anthocyanines, proanthocyanidines et flavanols.

II.1. Composés polyphénoliques non flavonoïdiques

II.1.1. Les acides phénoliques

Sont les principaux polyphénols alimentaires (Watson *et al.*, 2013), ils sont présents dans tous les fruits et les légumes et représentent environ un tiers de la teneur totale de l'alimentation en polyphénols (Sharma *et al.*, 2015).

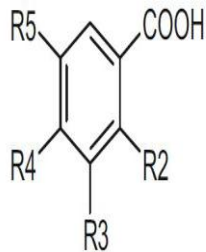
Les acides phénoliques constituent un groupe important de composés organiques naturels avec un large spectre d'activités pharmacologiques, ils possèdent des propriétés non seulement antioxydantes, mais également des propriétés antivirales et antibactériennes. L'activité antioxydante phénolique est généralement combinée avec des groupes hydroxyles trouvés dans leurs molécules (Cazes, 2005).

Les acides phénoliques existent sous deux formes: dérivés de l'acide benzoïque et dérivés de l'acide cinnamique (Watson *et al.*, 2013).

II.1.1.1. Les acides hydroxybenzoïques C₆-C₁

Les acides hydroxybenzoïques sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type (C₆-C₁) (Macheix *et al.*, 2005). Les variations dans les structures de l'acide hydroxybenzoïque individuel se trouvent dans l'hydroxylation et la méthylation du cycle aromatique (Shankar *et al.*, 2012). Sept acides benzoïques sont connus: acide p-hydroxy

benzoïque, acide protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicylique et gentsique (Collin & Crouzet, 2011). (Figure3)



composés	R2	R3	R4
Acide benzoïque (non phénolique)	H	H	H
Acide p-hydroxy benzoïque	H	H	OH
Acide protocatéchique	OH	OH	H
Acide vanillique	OCH ₃	OH	H
Acide gallique	OH	OH	OH
Acide syringique	OCH ₃	OH	OCH ₃
Acide salicylique	H	H	H
Acide gentsique	H	H	OH

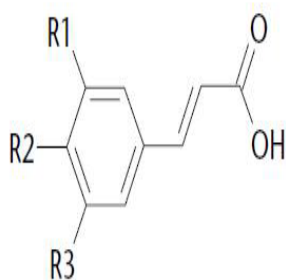
Figure3 : Structure de l'acide benzoïque (Chira *et al.*, 2008).

II.1.1.2. Les acides hydroxycinnamique C₆-C₃

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante des polyphénols, dont la structure de base (C₆-C₃) dérive de celle de l'acide cinnamique. Les molécules de base de la série hydroxycinnamique : l'acide p-coumarique, caféique, férulique, et l'acide sinapique (Macheix *et al.*, 2005).

Le composé le plus courant est l'acide caféique qui représente à lui seul 75 à 100% des acides hydroxy cinnamiques totaux de la plupart des fruits (D'Archivio *et al.*, 2007). Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique, et son éventuelle modification par des réactions secondaires, sont des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules (Macheix *et al.*, 2005).

En fait, les dérivés de l'acide cinnamique existent dans toutes les parties de fruits, bien que la concentration la plus élevée est présente dans les parties extérieures de fruits murs (Teixeira *et al.*, 2013). **Figure4**



Composés	R1	R2	R3
Acide cinnamique (non phénolique)	H	H	H
Acide p-coumarique	H	OH	H
Acide caféique	OH	OH	H
Acide férulique	OCH ₃	OH	H
Acide sinapique	OCH ₃	OH	OCH ₃

Figure4 Structure de l'acide hydroxycinnamique (**Laguerre et al., 2007**).

II.1.2. Les stilbènes C₆-C₂-C₆

Les stilbènes font partie d'un groupe très vaste des polyphénols, celui des dérivés de l'acide cinnamique (phénylpropanoïdes). Ils sont présents dans toutes les sources végétales (**Leray, 2010**). La structure chimique de base des stilbènes est composée de deux cycles aromatiques joint par un pont méthylène (C₆-C₂-C₆). Les deux formes isomères des stilbènes (cis et trans) ont des propriétés chimiques et biologiques différentes (**Collin et Crouzet, 2011**).

Ils jouent un rôle important dans les mécanismes de défense constitutifs et inductibles, y compris des activités antibactériennes et antifongiques. Les stilbènes possèdent un large spectre d'effets pharmacologiques et thérapeutiques tels que l'effet anti-épileptique, anti-oxydant, anticancéreux, les activités anti-athérosclérose. En plus ils possèdent un effet cardioprotecteur, hépato-protecteurs et des effets neuroprotecteurs (**Ahuja et Ramawat, 2014**).

Le resvératrol est le stilbène le plus étudié, en raison de sa présence dans les produits issus du raisin (jus frais, vin) et de ses nombreuses propriétés pharmacologiques (anticancéreuses, cardioprotecteurs, antioxydantes...) (**Leray, 2010**). Il exerce son effet antioxydant par l'inhibition de la peroxydation lipidique et protège contre la cytotoxicité des LDL oxydés (**Cohen et Souied, 2014**). (**Figure5**)

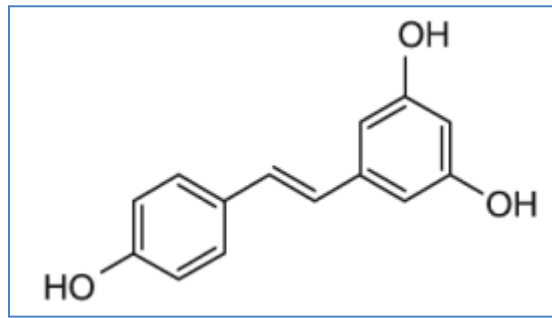


Figure 5 Structure de Trans-resveratrol (Stuart et Robb, 2013).

II.1.3. Les lignanes (C_6-C_3)_n

Sont un groupe de phytonutriments largement distribués dans le règne végétal (Imran *et al.*, 2015). Ce sont des composés dimères formés par le couplage de deux fragments (C_6-C_3) monomères dérivées de la voie des phénylpropanoïdes (Figure 6) (Gilani et Anderson, 2002).

Les lignanes phénoliques se trouvent dans la plupart des plantes riches en fibres, y compris les graines de citrouille, graines de sésame, les céréales, les fruits et les légumes (Imran *et al.*, 2015). En fonction de la structure, les lignanes peuvent être classés en cinq familles de composés: proper lignanes, néolignanes, sesquilignanes, dineolignanes, norlignans et des lignanes hybrides (Calvo-Flores *et al.*, 2015).

Les lignanes possèdent un certain nombre de propriétés utiles pour les humains, certains protègent contre l'apparition de divers cancers, tandis que d'autres sont antimutogènes, antivirales, antibactériennes, et antifongiques (Costa *et al.*, 1999). **Figure 6**

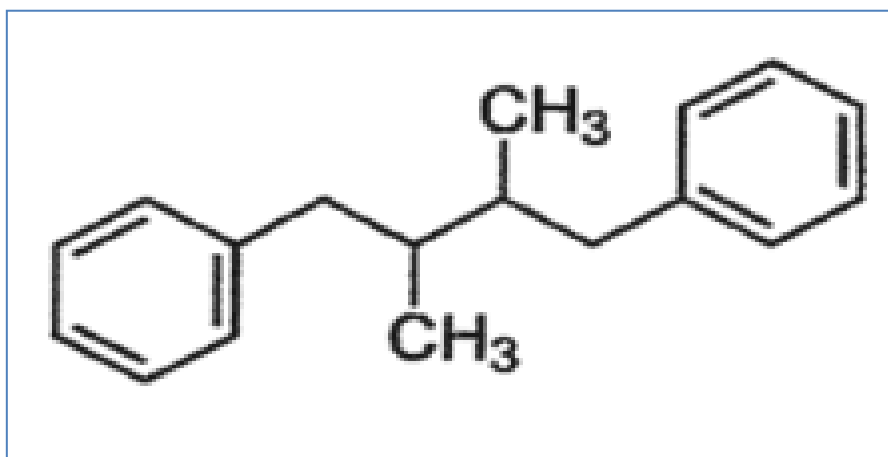


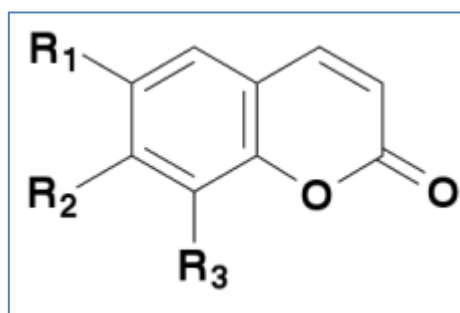
Figure 6 : Structure de lignane (Jost et Jost - Tse, 2016).

II.1.4. Les coumarines C₆-C₃

Les coumarines sont des composés aromatiques naturels, largement distribués dans le règne végétal, ils inhibent la croissance et la sporulation des champignons et autres microorganismes qui sont pathogènes pour les plantes (Edardes, 2008).

Les coumarines ont une structure de base (C₆-C₃) dérivant des acides orthohydrocinnamiques

(Collin et Crouzet, 2011). Différents dérivés coumariniques ont été isolés, habituellement, les substituants sont dans les positions C₅, C₆, C₇ et C₈ (par ex : l'ombelliférone, l'hierniarine, l'aesculétine, la scopolétine, l'osthenol, l'osthol...) (Cazes, 2001). (Figure7)



Composés	R1	R2	R3
Ombelliférone	H	OH	H
Herniarine	H	OCH ₃	H
Esculétol	OH	OH	H
Scopolétol	OCH ₃	OH	H
Fraxétol	OCH ₃	OH	OH

Figure7 : Structure de coumarine (Bruneton, 2009).

II.1.5. Les xanthones C₆-C₁-C₆

Le xanthone terme dérivé du grec (xanthos), ce qui signifie jaune (Khan & Ather, 2006). Les xanthones sont des métabolites secondaires trouvés dans quelques plantes supérieures, les champignons et les lichens. Dans la nature, le xanthone se trouve dans des familles très restreintes de plantes, la majorité étant dans Gentianaceae et Guttiferae (Tiwari *et al.*, 2013).

La structure chimique d'un xanthone est constituée d'un système cyclique conjugué composé de carbone 1-4 (cycle aromatique A) et de carbone 5-8 (cycle aromatique B) (Kuete, 2013), et d'un système à trois anneaux qui contient plusieurs groupes fonctionnels comprenant l'isoprène, le groupe méthoxy et les groupes phényles, ainsi que des protons aromatiques, des

Groupes hydroxyle phénoliques, des protons hydroxyle, et les anneaux dihydrofuranne (Gongbo *et al.*, 2013). Les xanthones peuvent être brièvement classés en cinq groupes dont xanthone simplesoxygéné, prénylé, glycosides xanthone, xanthonolignoids et divers xanthones (Tiwari *et al.*, 2013), la diversité structurale et les propriétés chimiques des xanthones peuvent jouer un rôle majeur dans la prévention, y compris les activités anti-inflammatoires, antioxydantes, et anticancéreuses (Gongbo *et al.*, 2013). **Figure 8**

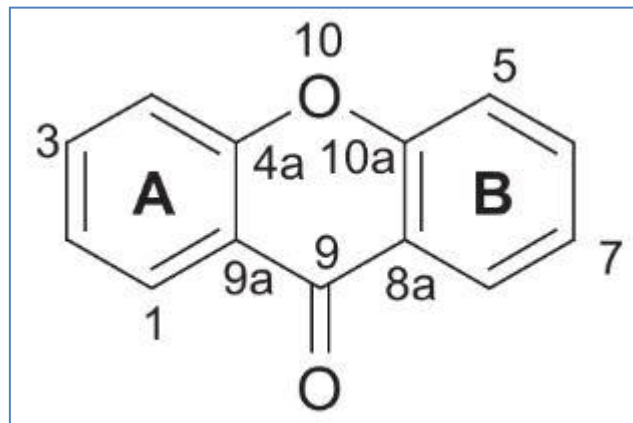


Figure 8: Structure de xanthone (Kuete, 2013).

II.2. Composés polyphénoliques flavonoïdiques

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus

Dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes (Guignard, 1996).

Les flavonoïdes sont formés d'un squelette à 15 atomes de carbone ($C_6-C_3-C_6$) correspondant à la structure du diphenylpropane (Collin & Crouzet, 2011). Ils sont constitués

D'un cycle benzoïque présentant plusieurs groupements hydroxyles et pour cette raison ils sont nommés polyphénols. Ces groupements hydroxyles sont responsables de la fonction antioxydante des polyphénols (Descheemaeker & provoost, 1999). **Figure9**

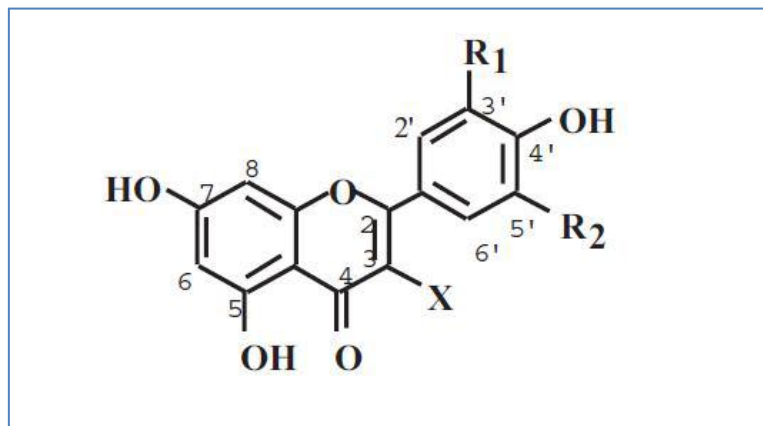


Figure9: Structure de base des flavonoïdes (Lugasi *et al.*, 2003).

Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés chez les plantes. La liste de ces derniers est en croissance continue. Ceci est dû à la survenance de nombreux modèles dans les quelle les substitutions primaires (comme le groupe hydroxyle) peuvent être substitués (glycosylés ou acylés) et parfois créés des structures très complexe (D'Archivio *et al.*, 2007). Les Principales classes des flavonoïdes sont : les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les isoflavones et les anthocyanes, ils varient dans leurs caractéristiques structurales par la diversité fonctionnelle autour de l'oxygénation de l'hétérocycle. **Figure 10**

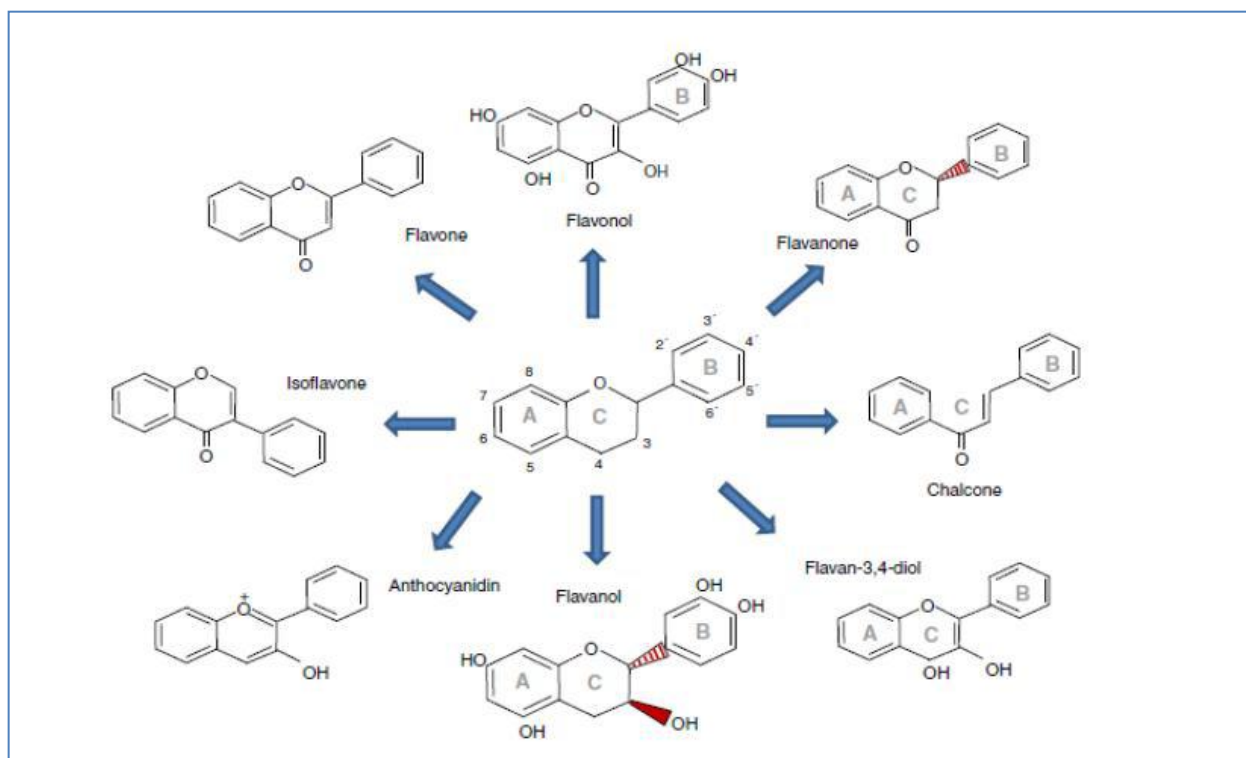


Figure 10: Les structures chimiques des principales familles des flavonoïdes (Fraga & Oteiza, 2011).

II.2.1. Les isoflavones

Les isoflavones ont des similitudes structurales avec les oestrogènes, à savoir des groupes hydroxyles dans les positions C₇ et C₄, comme molécule d'oestradiol. Ils peuvent se lier à l'oestrogène récepteur et sont classés ainsi que les phytoestrogènes. Les isoflavones sont contenues presque exclusivement dans les légumineuses (D'Archivio *et al.*, 2007; Tapas *et al.*, 2008). **Figure 11**

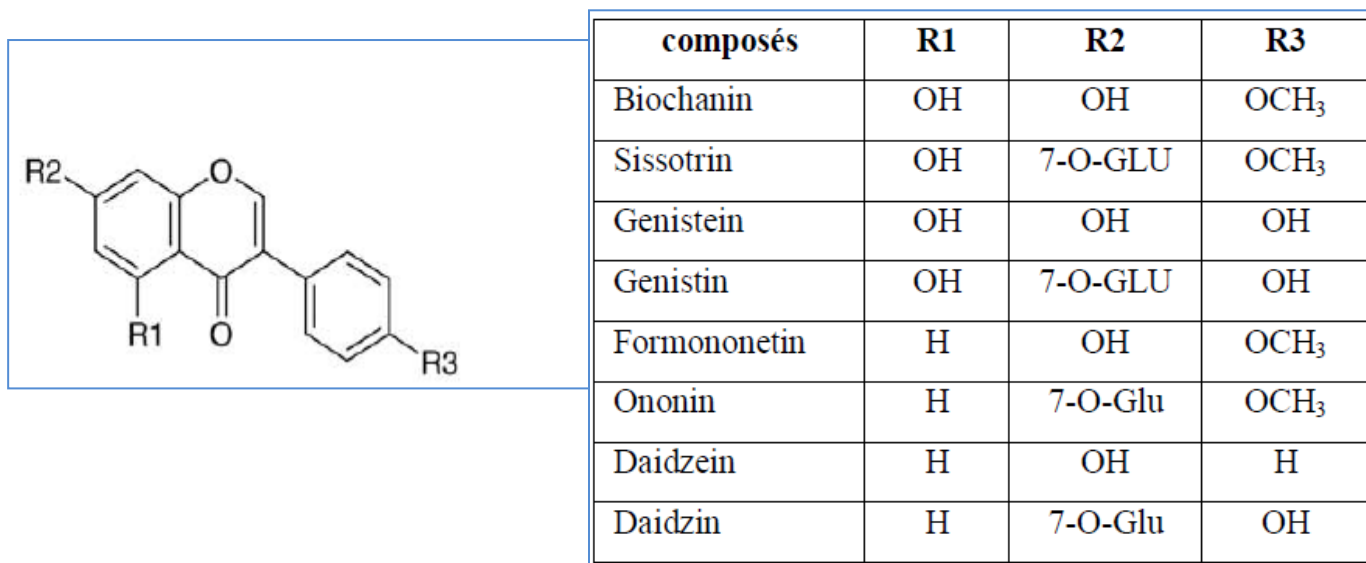


Figure 11: Structure des isoflavones (Rijik *et al.*, 2006).

II.2.2 Les flavanones

Les flavanones sont caractérisés par la présence d'un hétérocycle saturé à trois carbonesen chaîne et un atome d'oxygène dans la C₄. Ils sont généralement glycosylé par un disaccharideen C₇. Les flavanones sont présents en haute dans les agrumes, mais ils sont également trouvé dans les tomates et certaines plantes aromatiques tels que la menthe (Tapas *et al.*, 2008). Figure12

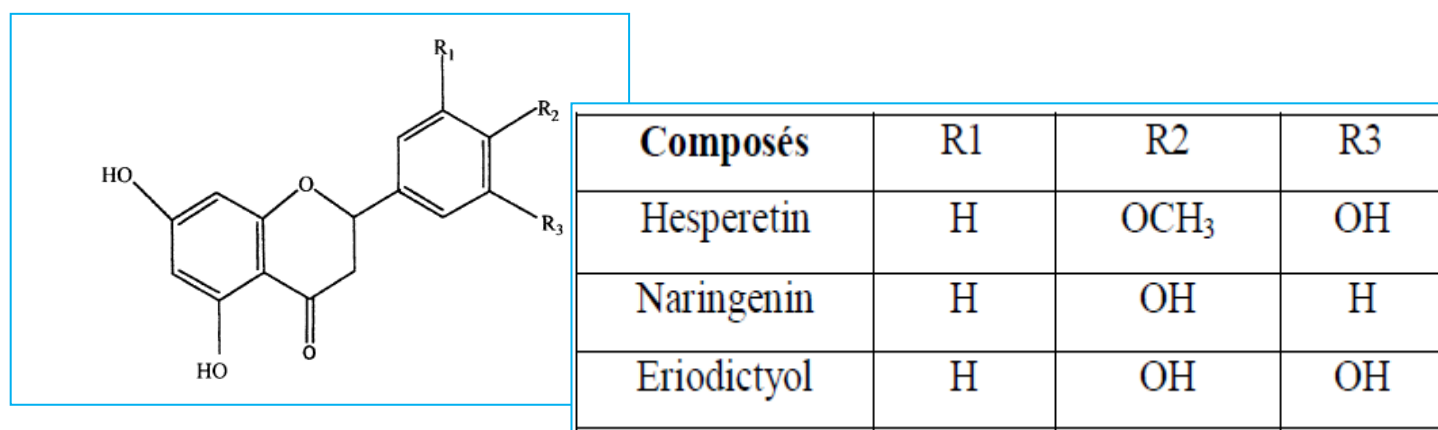
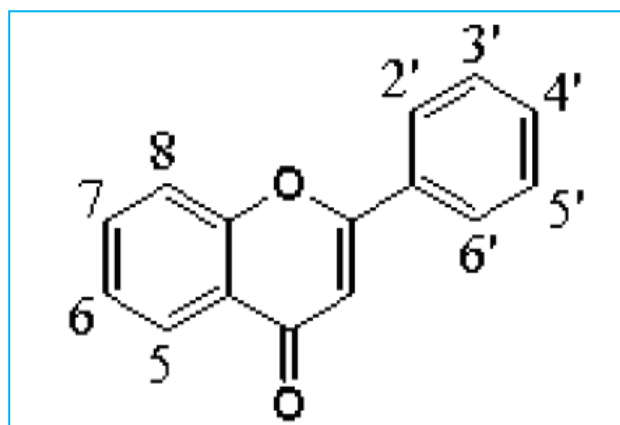


Figure12: Structure des flavanones (o'connell & Fox, 2001).

II.2.3. Les flavones

Les flavones sont structurellement très proches des flavonols, la différence provenant de l'absence de l'hydroxyle en C₃. Il existe aussi de très nombreuses substitutions des flavones, telles que l'hydroxylation, la méthylation, les O- et C- alkylation et glycosylation. Les flavones étant principalement trouvés sous forme de glucosides (Chira *et al.*, 2008).

Figure13



Composés	5	7	4'	3'
Apigenin	OH	OH	OH	--
Luteolin	OH	OH	OH	OH

Figure13: Structure des flavones (yordi *et al.*, 2012).

II.2.4. Les Flavonols

Appartiennent à la sous famille des flavonoïdes, dans lesquels le cycle c'est un hétérocycle saturé avec un groupe hydroxyle en position 4. Ils peuvent avoir un groupe OH ou OCH₃ en haut à trois positions dans le noyau B (Fraga et Oteiza, 2011). **Figure14**

The diagram shows the chemical structure of a flavonol skeleton. It is similar to the flavone skeleton but has a hydroxyl group (-OH) at the 4-position of the pyrone ring. The B-ring has substituents R₁, R₂, and R₃ at positions 3', 4', and 5' respectively. There are also hydroxyl groups (-OH) at positions 5 and 7 of the A-ring.

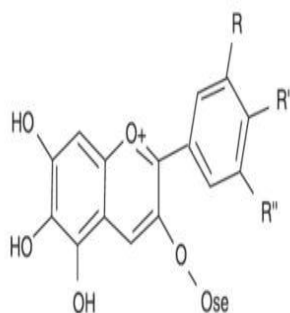
Composés	R1	R2	R3
Quercetin	H	OH	OH
Kaempferol	H	OH	H
Myricetin	OH	OH	OH

Figure14 : Structure des flavonols (o'connell & Fox, 2001).

II.2.5. Les anthocyanes

Les anthocyanes (en grec anthos fleur et cyan bleu) (Valls *et al.*, 2009) sont des métabolites secondaires de la famille des flavonoïdes, produits par les angiospermes. Ce sont des pigments colorés responsables de la pigmentation des fleurs, des fruits et des grains (Samouelian *et al.*, 2003), mais aussi jouent un rôle important dans la physiologie végétale comme attracteurs des insectes dans la dispersion des grains (Shipp *et al.*, 2010).

Les anthocyanes possèdent une structure de base, le 2-phényl-1-benzopyrylium (cation flavylium) constituée de trois cycles aromatiques, responsable du pouvoir absorbant (chromophore). Cette structure porte plusieurs fonctions hydroxyles dont l'une est glycosylée par des différents oses (glucose, galactose, rhamnose, arabinose), omégosides ou hétérosides (Samouelian *et al.*, 2009). **Figure 15**



Pigment	R	R'	R''	Couleur
Pélagonidine	H	OH	H	Rouge
Cyanidine	H	OH	OH	Bleu
Delphinidine	OH	OH	OH	Pourpre
Péonidine	OCH ₃	OH	H	Rose
Pétunidine	OCH ₃	OH	OH	Pourpre
Malvidine	OCH ₃	OH	OCH ₃	Mauve

Figure 15: Structure de base des anthocyanes (Samouelian *et al.*, 2009).

II.2.6. Les tanins

Le terme tanin provient d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour «tanner» les peaux d'animaux, autrement dit pour transformer une peau en cuir. Ces extraits contiennent des dérivés phénoliques qui se lient aux protéines et donc les dénaturent (Hopkins, 2003).

Les tanins sont des composés polyphénoliques, hydrosolubles, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 (Gazengel & Orecchioni, 2013). Ce sont des molécules fortement hydroxylées et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides,

aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux (Alkurd *et al.*, 2008).

Chez les végétaux supérieurs, il existe deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique :

II.2.6.1. Les tanins condensés

Les tanins condensés (Tannins vrais ou tannoïdes) résultent de la condensation de molécules élémentaires de type flavane 3-ol (catéchines) ou flavane 3-4 diols (leucoanthocyanidines).

Les liaisons formées sont de type carbone-carbone ce qui rend ces molécules difficilement hydrolysables. Les tannins condensés sont également appelés proanthocyanidines ; en effet leur oxydation en milieu alcool-acide à chaud entraîne la formation de pigments anthocyaniques tels que cyanidine et de l'epinidine. Ce type de molécules dotées de propriétés remarquables chez les plantes qui en sont pourvues (Merghem, 2009).

Les tanins condensés sont présents dans les vacuoles d'un réseau de cellules spécialisées, situées sous l'épiderme des feuilles et des tiges de certaines légumineuses tempérées (sainfoin, loier corniculé ou pédonculé) et tropicales herbacées (*Lespedeza sericea*, *des-modium intortum*) et arbustives, ainsi que dans les feuilles d'arbustes fourragers ...etc (Jarrige *et al.*, 1995). **Figure 16**

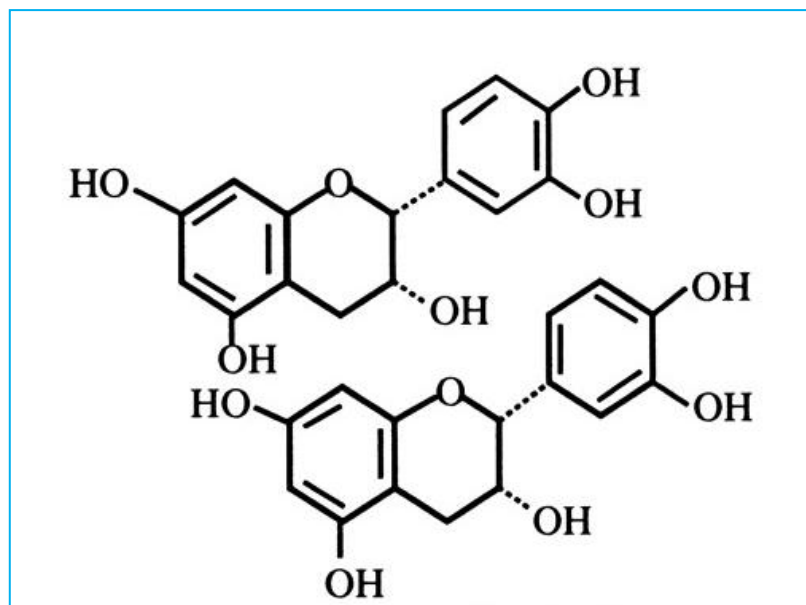


Figure 16: Structure de tanins condensés (Cowan, 1999).

II.2.6.2. Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables, ou acide tanique, sont des polymères de l'acide gallique ou de son produit de condensation, l'acide ellagique. Ils ont un poids moléculaire plus faible (de 500 à 3000) et précipitent beaucoup moins les protéines que les tanins condensés (Jarrige *et al.*, 1995). Figure17

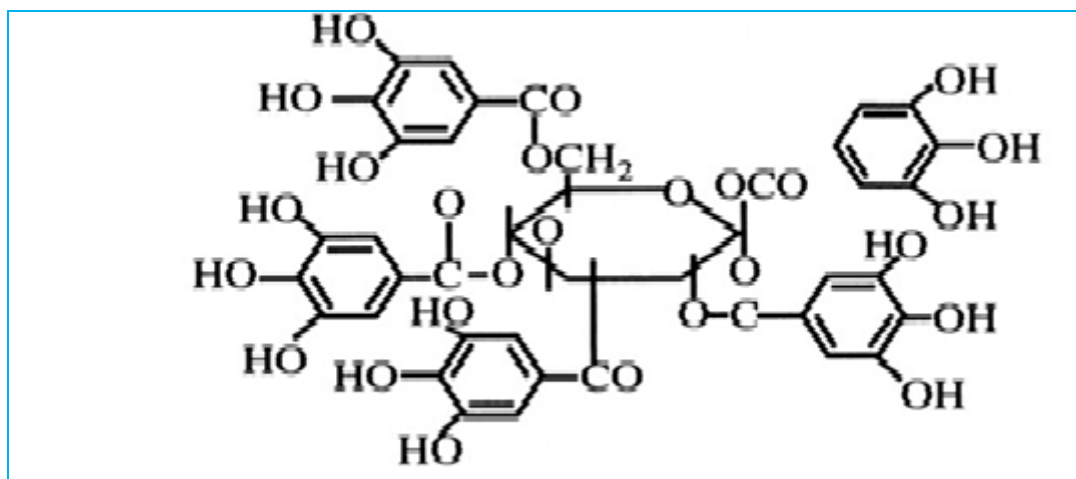


Figure17 : Structure de tanins hydrolysable (Cowan, 1999).

III. Biosynthèse des polyphénols

Les composés phénoliques sont principalement synthétisés à partir des hydrates decarbone via la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate malonate (Chira *et al.*, 2008).

III.1. La voie de Shikimate

C'est la voie de biosynthèse principale des composés aromatique (Kening *et al.*, 1995) dans les plantes et les micro-organisme, y compris les acide aminés aromatique : laphénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Ce sont des métabolites primaires qui servent de précurseurs pour de nombreux de produits naturels (secondaire) tel que les flavonoïdes, les acidephénoliques, les coumarines, les alcaloïdes... (Ghasemzadeh & Ghasemzadeh, 2001).

III.2. La voie de l'acétate malonate

Ce mode de formation plus secondaire consiste à la cyclisation des chaînes polycétonique, elles-mêmes obtenus par condensation de groupement acétates. La condensation des groupements acétates ne se fait qu'après carboxylation de l'acétyl coa en malonyl coa.

Chez les flavonoïdes, les anthocyanes, le cycle benzénique latéral (A) provient de l'enchaînement de 3 acétyl-COA (Merghem, 2009).

IV. Propriétés biologique et intérêt des polyphénols

Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment grâce à leurs propriétés et ces effets bénéfiques sur la santé des êtres humains ou chez les végétaux.

IV.1. Chez les végétaux

Les composés phénoliques sont des pigments responsables des teintes automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et fruits (jaune, orange, rouge) (**Edeas, 2007**).

Ils jouent un rôle important dans l'interaction de la plante avec son environnement, en particulier contre les radiations UV, le stress oxydatif, les attaques microbiennes (**Moheb et al., 2011**). Ils sont impliqués aussi dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits (**Biozot & Charpentier, 2006**).

IV.2. Chez l'être humain

La consommation d'aliments riches en polyphénols réduit le développement de nombreuses pathologies, telles que le cancer, l'ischémie cardiaque, l'athérosclérose et l'hypertension. Cela peut-être expliqué par le fait que ces composés ont la capacité de modifier de nombreux facteurs impliqués dans la genèse de ces maladies (**Martin & Andriantsitohaina, 2002**).

Ces composés montrent des activités anticancéreuses, antivirales, antibactériennes, (**Babar et al., 2007**), Antiallergique, antiathérogène, antioxydant, anti-inflammatoire, antithrombotiques, cardioprotecteur et les effets vasodilatateurs (**Falleh et al., 2008**).

Leurs propriétés sont liées au fait qu'ils peuvent moduler l'activité de nombreuses protéines intracellulaires (les protéines kinases, les phospholipases, l'adénylate cyclase, les ATPases, les cyclo-oxygénases (CO_x), les NOS ou le cytochrome P₄₅₀) et agir sur différents types cellulaires (**Martin & Andriantsitohaina, 2002**).

IV.2.1. Activité antioxydante

Les antioxydants sont classés selon leur mode d'action : éliminateurs de radicaux libres, chélateurs d'ions métalliques, piègeurs d'oxygène dans des systèmes fermés. Les polyphénols, naturellement présents dans les aliments ou formés au cours des procédés de transformation sont

Considérés comme éliminateurs des radicaux libres (**Chew et al., 2009**).

IV.2.1.1. Piégeage des radicaux libres

Les composés phénoliques ont des propriétés antioxydantes en raison de leur capacité à piéger les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène, le processus est radicalaire (Sökmen *et al.*, 2012). Ils interfèrent avec l'oxydation des lipides et d'autres molécules par la donation rapide d'un atome d'hydrogène aux radicaux libres selon un mécanisme proposé dès 1976 par Sherwin : l'antioxydant cède formellement un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un radical intermédiaire. Il est stabilisé par ses structures mésomères conjuguées (Sökmen *et al.*, 2012).

Figure 18

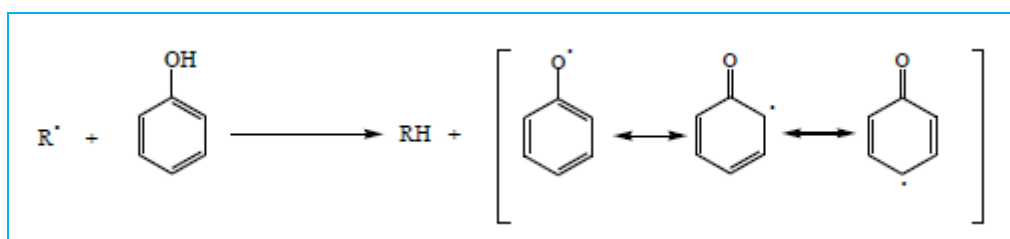


Figure 18 : Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques.

Les radicaux intermédiaires phénoxy (PO^\bullet) sont relativement stables en raison de la résonance et donc une nouvelle réaction en chaîne n'est pas facile à initié (Dai & Mumper, 2010). Par ailleurs, ils peuvent agir avec d'autres radicaux libres selon la réaction:



Les composés phénoliques possèdent une structure chimique idéale pour le piégeage des radicaux libres, parce qu'ils possèdent:

- Des groupes phénoliques hydroxyyles qui sont susceptibles de donner un atome

D'hydrogène ou un électron au radical libre.

- Un système aromatique stabilisé par la résonance (Dai & Mumper, 2010).

Les flavonoïdes en général et les flavan-3-ols en particulier sont de bons piègeurs de radicaux libres (Fraga, 2007). A cause la présence de 3',4'-dihydroxy et la présence du groupe *o*-dihydroxy (structure des catéchol) sur le noyau aromatique B; ils possèdent la propriété de donneur d'électrons. En outre, la présence du 3-OH du cycle C est également bénéfique pour

l'activité antioxydante des flavonoïdes. La présence de la double liaison C₂-C₃ conjuguée avec le groupe 4-céto est responsable de la délocalisation des électrons du noyau B, ce qui améliore encore l'activité antiradicalaire (Amic *et al.*, 2003). **Figure 19**

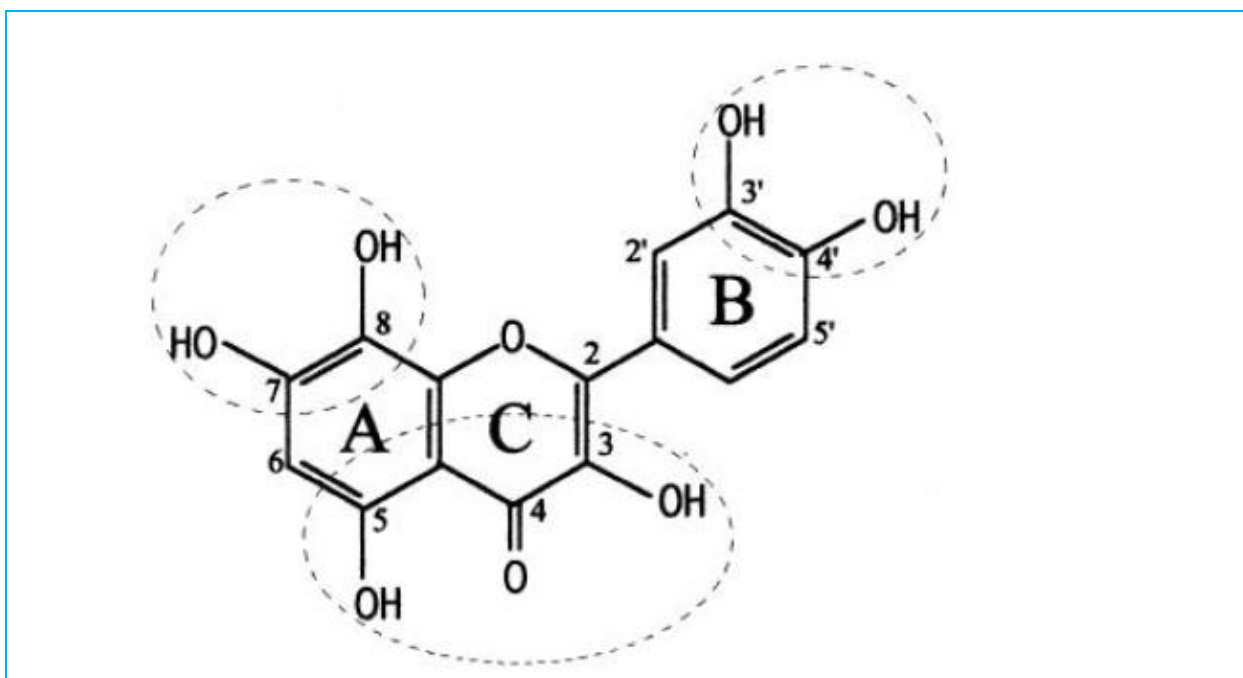
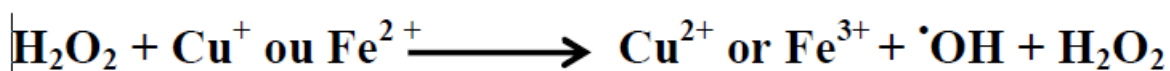


Figure 19: Les caractéristiques structurales des flavonoïdes avec une activité de piégeage des radicaux libres élevée (Amic *et al.*, 2003)

IV.2.1.2. Chélation des ions métalliques

Les ions métalliques sont nécessaires pour le fonctionnement des processus biochimiques et physiologiques cellulaires, mais dans certains cas et lorsque leur mécanisme d'action n'est pas bien contrôlé ces mêmes ions peuvent être à l'origine d'une peroxydation lipidique, un stress oxydatif, ou une blessure des tissus, à titre d'exemple Cu²⁺ est un stimulateur de la peroxydation des LDL. (Tiwari, 2001).

Les Composés phénoliques avec catécholate et groupes gallate peut inhiber le métal induit la formation du radical oxygène soit par coordination avec le Fe²⁺ et le renforcement de l'auto-oxydation de Fe²⁺ soit par la formation de complexe inactif avec le Cu²⁺, Fe²⁺ ou le Cu⁺ relativement avec faible interaction (Yoshino *et al.*, 1998 ; Perron & Brumaghin, 2009).



La chélation des ions métalliques par les flavonoïdes nécessite trois sites principaux :

- Noyau catéchol sur le cycle B
- Les groupe 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C
- Le groupe 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycle A et C (Heim *et al.*, 2002 ; Pietta,2000).

A titre d'exemple ; la quercétine et la myricétine répondent à tous ces critères nécessaires pour avoir une activité antiradicalaire efficace et importante (Middleton *et al.*,2000).

IV.2.1.3. Inhibition enzymatique

En raison de la présence de multiples fonctionnalités phénol, ils interagissent avec les protéines si fortement, que la précipitation des complexes protéines-polyphénols se produit fréquemment, ce qui est la base de leur utilisation dans le processus de tannage du cuir(Handique & Baruah, 2002). Les phénomènes d'interaction polyphénols-protéines ont été largement étudiés *in vitro*, particulièrement dans le cas des flavonoïdes (Rolo-Naranjo *et al.*,2009). Afin de préciser le mécanisme d'action de l'activité inhibitrice des flavonoïdes, des études ont été réalisées sur l'effet de la quercétine sur l'oxydation de l'acide linoléique par une lipoxygénase. Ces auteurs ont constaté que le mécanisme d'inhibition des lipoxygénases par la quercétine ne serait pas dû à une complexation ou à une oxydation du Fe²⁺, mais plutôt à une inhibition irréversible résultant de liaisons covalentes entre l'enzyme et les dérivés oxydés de la quercétine (quinone ou radical phénoxy) (Chebil, 2006).

IV.2.2. Activité anti bactérienne

Les polyphénols sont doués d'activité antibactériennes importantes et diverses, probablement dû à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité (Cowan, 1999). Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés plus ils sont inhibiteurs des microorganismes (Scalbert, 1991). Les flavane-3-ols, les flavonols et les tanins ont reçu plus d'attention du à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols. (Daglia, 2011).

Ces composés jouent un rôle inhibiteur, ils n'agissent pas sur la paroi bactérienne mais plutôt sur un mécanisme interne. Ces composés sont supposés agir sur l'ADN, l'ARN et la synthèse protéique (Ulanowska *et al.*, 2008). Ils possèdent une capacité de supprimer un nombre de

facteurs de virulence microbienne telle que l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes ainsi qu'à leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques (**Daglia, 2011**).

IV.2.3. Activité anti inflammatoire

De nombreuses études indiquent que les polyphénols notamment les flavonoïdes possèdent des propriétés anti inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (**González-Gallego et al., 2007**). D'autres flavonoïdes sont capables d'inhiber l'histamine (**Kim et al., 2004**). Les flavones et les flavonols sous forme glycosylée ou libre comme la quercétine, kaempférol, myricétine ont une activité inhibitrice de la cyclooxygénase COX (**Tapas et al., 2008**).

IV.2.4. Activité anti tumorale

Le développement d'un cancer est un processus lent, constitué de plusieurs phases (initiation, promotion, progression et invasion) dans lesquelles les radicaux libres oxygénés et des composés carcinogènes jouent un rôle primordial : ils modifient la structure et l'expression de certains gènes dont le rôle est de contrôler le fonctionnement normal de la cellule (**Suschetet et al., 1996; Alberts et al., 1999**). Par leur action antioxydante puissante, les polyphénols pourraient donc produire leur effet anti-cancer.

Les stilbènes notamment le resvératrol possède agit sur la carcinogénèse en présentant des actions au niveau des trois stades de ce processus : la phase d'initiation, la phase de promotion et la phase de progression. De plus, il supprime les phases finales de la carcinogénèse telles que l'angiogénèse et les métastases (**Delmas et al., 2006**). Le resvératrol joue un double rôle car il peut prévenir de la formation de cancers mais permet aussi de lutter contre un cancer déjà déclaré (**Kundu & Surh, 2008**). A faible dose, le resvératrol a la propriété de potentialiser l'effet des chimiothérapies traditionnelles (**Delmas et al., 2006**).

IV.2.5. Activité anti cardiovasculaire

Diverses études épidémiologiques ont montré qu'il existe une corrélation inverse entre la consommation d'aliments riches en polyphénols et le risque de développement des maladies cardiovasculaires (**Visioli et al., 2000 ; Arts & Hollman, 2005**). Au niveau des artères, ces molécules préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (**LDL**) (**Yamanaka, 1996**)

Evitant ainsi l'athérosclérose (épaississement des artères qui contribue à réduire le flux sanguins et peut conduire à l'asphyxie des tissus irrigués). Les polyphénols inhibent aussi l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose, qui induit l'occlusion des artères. Ainsi en prévenant l'athérosclérose et les risques de thrombose, ces composés limitent les risques d'infarctus du myocarde (**Rein et al., 2000**).

D'après de récentes données probantes, certains polyphénols sous forme purifiée, y compris le resvératrol, et la naringénine, ont des effets bénéfiques sur la dyslipidémie chez les modèles humains ou animaux. Un traitement à la naringénine atténuait l'athérosclérose en corrigeant la dyslipidémie (**Mulvihill & Huff, 2000**).

IV.2.6. Activité anti diabétique

Des travaux multiples ont démontré les bienfaits des polyphénols sur les troubles et les complications métaboliques induites par le diabète. Les produits riches en polyphénols peuvent moduler le métabolisme des glucides et des lipides, atténuer l'hyperglycémie, la dyslipidémie et la résistance à l'insuline, améliorer le métabolisme du tissu adipeux, et atténuer le stress oxydatif

Et les voies de signalisation sensibles au stress et les processus inflammatoires (**Bahadoran et al., 2013**). Les effets antidiabétogènes et cytoprotecteurs des extraits de flavonoïdes notamment la quercétine se traduit par un effet significativement positif sur l'insulinosécrétion des cellules β et la glycémie. Cet effet est dû au pouvoir antioxydant et cytoprotecteur des composés phénoliques et à la réduction de la production du MDA en empêchant donc la lipoperoxydation et la normalisation du niveau cytosolique des systèmes antioxydants (SOD, CAT et GSH) (**Kebièche et al., 2011**). Les composés polyphénoliques peuvent également prévenir la santé avec d'autres activités : activité sur les maladies neurodégénératives, activité insecticide, activité anti virale, anti parasitaires...etc.

Partie pratique

Chapitre I :

Materiels et méthodes

I. Matériels et méthodes de travail

I.1. Description botanique de *Calligonum comosum* L'Her:

Arbuste de 1 à 2 m, tiges à branches très rameuses intriquées et flexibles, de couleur blanches. Feuilles étroites et allongées de couleur vert vif. Fleur petits blanches. Fruits couvert de longs poils. Pendant les fortes sécheresses, il y a une chute totale des feuilles, et la plante garde sa forme générale, grâce à ses rameaux **figure (20)**. (Chehema, 2006)

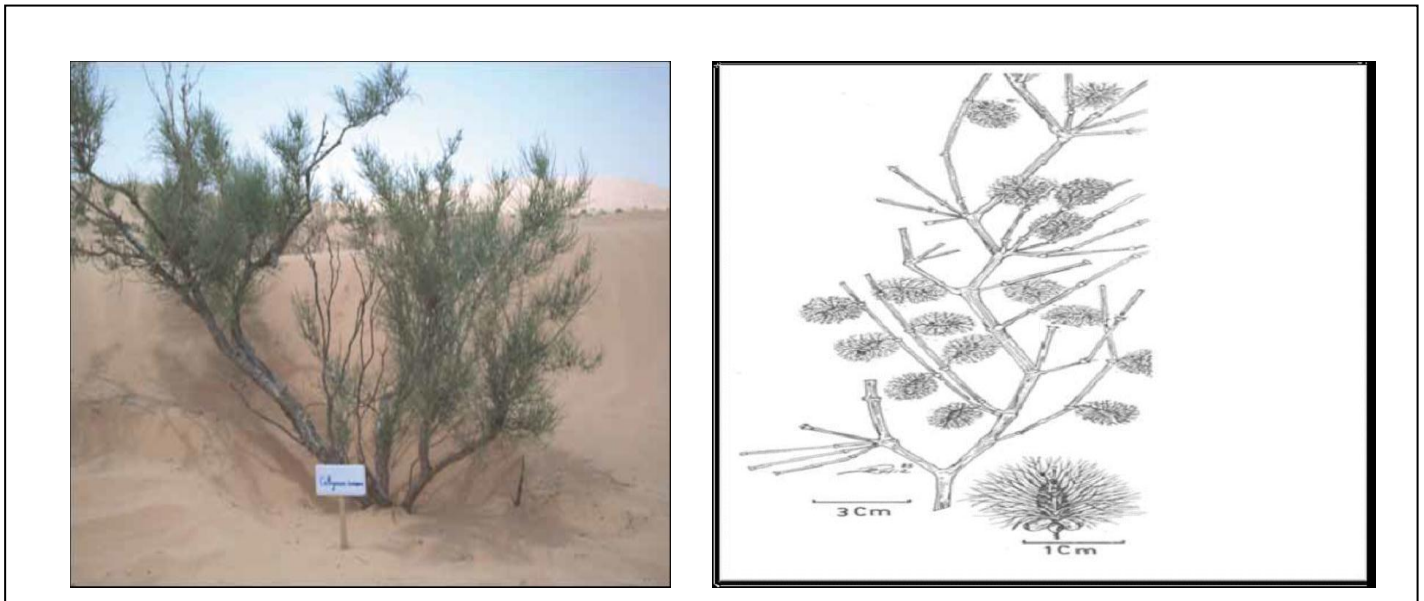


Figure20: *Calligonum comosum* L'Her. (Quezel et Santa, 1963)

I.1.2. Classification de la plante :

Règne	Plantea
Classe	Angiospermes
Ordre	Caryophyllales
Famille	Polygonaceae
Genre	Calligonum
Espèce	<i>Calligonum Comosum l'her</i>
Nom vernaculaire	Arta

I.1. 3 . Caractéristiques générales de *Calligonum comosum* L`Her

Cette espèce se caractérise par sa taille, son feuillage persistant arbuste atteignant jusqu'à 3 mètres de long, mais se trouve généralement dans les buissons de 1 à 2 mètres haute. La tige est ligneuse, dur et blanc à blanc grisâtre avec noeuds enflés et longs entre-noeuds. La plante est considéré comme apophile car il semble sans feuilles manque d'un tronc principal mais a rigide branches blanches basales lignifiées, mais les jeunes branches supérieures sont vertes et minces avec très petites feuilles caduques. Les branches vertes et raides produisent une abondance de fleurs dans les premiers mois de printemps (mars et avril). Les pédicelles des fleurs sont aussi longs ou plus longs que le périanthe. Les petites fleurs au parfum blanc-argenté sont suivies par le poilu fruits qui sont vert jaunâtre, jaune ou même des nuances de rouge . Les fruits couverts par poils longs issus de quatre crêtes étroites en forme d'ailes verticales. La plante a une longue racine pivotante qui permet à la plante de collecter le sable et qui est utilisée comme stabilisant des dunes de sable. (**Taia1 et al.2011**)

I.1. 4. Habitat:

On trouve le dans les maquis du désert et n'importe quelle zone climatique. Il habite une grande partie du désert d'Afrique du Nord, les sables du désert Moyen-Orient, le Pakistan ainsi que les dunes de sable en Arabie centrale et orientale .(**Taia1 et al ,2011**)

- Dans toutes les régions sahariennes (**Hellis, 2007**)
- Dans lits d'Oued, Reg et les alluvions (**Chehma, 2006**)
- Se rencontre, en pieds isolés ou en petits groupes (**Chehma, 2006**)

I.1. 5.Cueillette:

La fin de printemps (**Hellis, 2007**)

I.1. 6. Partie utilisée :

Toute la plante surtout partie aérienne (**Hellis, 2007**)

I.1.7. Utilisation:

- Utilisée pour stimulée les enzymes d'estomac (**Saad, 1946**)
- Elle est employée les feuilles sont utilisées contre les piqures de scorpions. Sésracines sont utilisées comme vermifuge (**Chehma, 2006**)
- A EL oued, elle très appréciée par les dromadaires et les chèvres.....etc

Dans cette étude, on utilise les feuilles du *Calligonum comosum l'her*, récoltées dans quatre régions différentes, Taghzout, Guemar, Hassani Abdel Kerim et El oued , situées dans la région d' Oued Souf,

- **Région de Taghzout - boubydha:** située entre la longitude 95,50 '77 ° 6 à l'est de la ligne Greenwich et la latitude 31,53'46 ° 33 au nord de l'équateur, dans la région de la municipalité de Taghzout, dans la région de Boubyada, une zone agricole.
- **Région de Guemar-Miha Salah:** située dans la longitude E 70,3383 ° 6 à l'est de la ligne de Greenwich et la latitude N 35,15'51 ° 33 au nord de l'équateur et située dans la région de la municipalité de Miha Salahde Guemar, une zone agricole.
- **Région de Hassani - Abdel Kerim Dokar:** située à l'intérieur de la ligne E06.92 '89 ° 6 à l'est de la ligne Greenwich et à 33,35 '49 ° 33 de latitude nord au nord de l'équateur, dans la région de la municipalité d'Al-dokar, Hassani Abdul Karim, zone d'agriculture pastorale.
- **El oued - Al chatte :** Il est situé entre la ligne de longitude 21,93 '85 ° 6 à l'est de la ligne Greenwich et la latitude 49,41 '39 ° 33 de latitude nord de l'équateur, dans la région d'Al-Shat, municipalité d'El oued.

Les parties de la plante ont été récoltées pendant la phase de floraison le 29/04/2017.

Les tiges saines ont été sélectionnées pour leur maturité, elles ont été lavées à l'eau froide jusqu'à ce que la poussière soit éliminée, ainsi que du plancton et des parties grossières, puis divisées en petites parties pour faciliter le processus de séchage. Et ensuite, réparties sur un tissu blanc sous la forme d'une fine couche pour faciliter le retournement deux fois par jour et il faut veiller à ne pas exposer la plante au soleil pour terminer le processus de séchage en s'assurant que la plante est sans eau.

Après séchage, la matière sèche est broyée par la rectifieuse électrique pour obtenir la poudre de plante. La poudre est conservée dans des flacons en verre scellés.

I.2. Préparation des échantillons de plantes

L'absence d'odeur aromatique indique l'absence de la plante à partir d'huiles volatiles et sa richesse et sa diversité en composés phénoliques, nous avons utilisé dans cette étude en utilisant du méthanol pour l'extraction en utilisant deux méthodes:

• Extraction de macération:

Faites tremper 50 g de matière sèche dans 500 ml de solvant (Méthanol). Laissez le mélange à 24 ° C. Le mélange est filtré et transféré sur rota-vapeur rotatif à 55 ° C pour éliminer le solvant et obtenir l'extrait sec.

II. METHODES**II.1. Screening phytochimique et caractérisation spectroscopique des métabolites secondaires****II.1. 1. Mise en évidence des flavonoïdes**

On met 10 g de la poudre avec 60 ml d'éthanol dans une fiole. Le mélange est porté à ébullition pendant 1 heure. On filtre et on laisse refroidir (Mbodj,2003).

• Réaction de cyanidine

En solution alcoolique, en présence d'hydrogène naissant, produit *In situ* paraction de chlorhydrique sur du magnésium, les flavonoïdes donnent des coloration variées allons du rouge-oranger au violet. On introduit dans un tube 2 ml de l'extrait. On ajoute 2 ml d'alcool chlorhydrique (alcool à 96°= 2 volume ; eau = 2 volume ; HCL concentré =1 volume).Coloration orange, puis violette, donc la réaction est positive (Mbodj, 2003).

II.1. 2 . Mise en évidence des tanins

On met 10 g de la poudre avec 60 ml d'éthanol dans une fiole. Le mélange est porté à ébullition pendant 1 heure . On filtre et on laisse refroidir (Mbodj,2003).

On filtre et on complète le filtrat à 100 ml avec de l'eau distillée .On introduit 5 ml d'infusé à 5 % dans un tube à essais, puis on ajoute 1 ml d'une solution aqueuse de Fe Cl₃ à 1 %. En présence de tanin, il se développe une coloration verdâtre (Tanins Cathéchique) ou bleu noir (Tanins Gallique) (Edeoga1 *et al.*, 2005).

II.1. 3 . Mise en évidence des saponosides

On porte à ébullition 100 ml d'eau distillée dans un erlenmeyer de 250 ml puis on ajoute 1 g de la poudre ensuite on maintient une ébullition pendant 15 mn. Après filtration, on ajuste le filtrat à 100 ml. On remplit 1ml du décocté à 1 % préparé dans un tube à essais et on ajuste le volume à 10 ml avec de l'eau distillée. Ensuite, on agite le tube. Pour confirmer la présence des saponosides, il faut qu'une mousse

Apparaît après avoir laissé au repos pendant 15 minute le tube à essai et la teneur en saponosides est évaluée par positif lorsque la hauteur de la mousse persistante, supérieure à 1 cm (Karumi *et al.*,2004).

II.1. 4 . Mise en évidence des alcaloïdes

- **Macération**

On met 10 g de la poudre végétale dans un erlenmeyer de 250 ml+ 50 ml de H_2SO_4 dilué au 1/10 (50 ml). On laisse macérer pendant 24 heures à la température du laboratoire. On filtre sur papier lavé à l'eau distillée de manière à obtenir environ 50 ml de filtrat (Dohou *et al.*, 2003).

- **Réactions de caractérisation**

1 ml de filtrat + 5 gouttes du réactif de Mayer s'il apparaît un précipité c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes (Précipité blanc-jaunâtre). 1 ml de filtrat + 5 gouttes de réactif de Wagner (2 g de KI et 1,27g d' I_2 solubilisés dans 100 ml d'eau distillée) s'il apparaît un précipité brun c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes filtrat (Dohou *et al.*, 2003).

II.1. 5 . Mise en évidence des glycosides

5 g de plante, mise en poudre, on y ajoute 50 ml d'une solution de l'acide tartrique 2% dans l'éthanol, on chauffe à reflux durant 2 h, après filtration et lavage par l'éthanol, on met le filtrat dans l'eau chaude. Dans un tube à essai, on ajoute à 2ml du filtrat 2 gouttes de la liqueur de Fehling, on chauffe, la réaction de la liqueur de Fehling montre la présence des glycosides (Chaouch, 2001).

II.1. 6 .Mise en évidence des stérols et triterpènes

5 g de plante, mise en poudre, a été mis dans 20 ml de chloroforme. Après filtration la solution obtenue est répartie entre deux tubes à essais (l'un servira de référence). On ajoute d'abord l'anhydride d'acétate ; ensuite nous avons ajouté 1 ml d' H_2SO_4 au fond du tube sans agiter. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et d'une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence des stérols et des triterpènes. C'est la réaction de Liebermann-Buchard (Benzahi, 2001 ; Chaouch, 2001).

II.2. Méthodes de caractérisation quantitative des polyphénols

La caractérisation quantitative des différentes phases de la plantes a été réalisée de la manière suivante :

II.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit par **Singleton et Rossi ;1965**. Son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines plus diverses.

II.2.1.1.Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PmO_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleu de tungstène et demolybdène (**Ribéreau, 1968**). La coloration produite, dont l'absorption maximum à environ 760-765 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Boizot et Charpentier, 2006**).

II.2.1.2.Méthode de dosage

Les polyphénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie, suivant le protocole appliqué en 2006 par Wong et ses collaborateurs. 125 μ l d'extrait végétal dilué dans le méthanol est mélangé avec 500 μ l d'eau distillé et 125 μ l de réactif de Folin-Ciocalteu (**FCR**). Après 5 minutes, 1250 μ l de 2% decarbonate desodium (Na_2CO_3) et 1000 μ l d'eau distillée sont ajoutés. Après une incubation du mélange réactionnel pendant 90 minutes à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 760 nm. La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations (0-500 μ g/ml), dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage. Les résultats sont ainsi exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par 1g poids sec de l'extrait (mg EAG/1g EXS). Toutes les mesures sont répétées 3 fois.

II.2.2. Dosage des Tanins condensés :

II.2.2.1. Principe :

Le dosage des tanins condensés dans les extraits de *Calligonum comosum L'Her* est effectué selon la méthode de **Schofield et al., (2001)**. Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de vanilline sur le carbone 6 du cycle A de la catéchine pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe la lumière à 500 nm. A 400 μ l de chaque échantillon ou standard, on ajoute 3 ml d'une solution de vanilline (4% dans le méthanol), et

1,5 ml d'acide hydrochlorique concentré. Le mélange est incubé durant 15 min et l'absorbance est lue à 500 nm. Les concentrations des tanins condensés sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec la catéchine (0-0,5 mg/ml), et sont exprimées en milligramme d'équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg ECT/g Ext).

II.2.3.Flavonoïdes

II.2.3.1.principe :

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe en présence de chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ces complexes peuvent être utilisés pour la réalisation de spectres d'absorption de nombreux composés phénoliques des végétaux, dont la structure est Odihydroxyphénols, hydroxy-3 et hydroxy-5 chromones (**Djeridane et al ., 2006**).

II.1.3.2. Mode opératoire :

La teneur en flavonoïdes déterminée selon la méthode décrite par **Ordonez et al. (2006)** ; 0.5 ml d'extrait est mélangé avec 0.5 ml de chlorure d'aluminium (AlCl₃ 2%). Après dix minutes d'incubation, l'absorbance est mesurée à 420 nm. La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard : Quercétine. La teneur en flavonoïde est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS).

II.3. Méthodes de dosage des activités antioxydantes *in vitro*

II.3.1.Le test de piégeage du radical DPPH

II.3.1.1. Principe

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH). Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène (**Brand-William et al., 1995**). On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation :



II.3.1.2. Mode opératoire :

L'activité antioxydante des différents extraits est mesurée par la méthode décrite par **Brand-William et al (1995)**. Pour chaque extrait, Un volume de 1 ml de la solution de DPPH (0.1mm) est mélangé avec 0.5 ml d'extrait ou des antioxydants standards (acide ascorbique).

Après 15 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue à 515 nm. Le pourcentage de l'activité anti-radicalaire est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Ac : Absorbance du contrôle.

At : Absorbance d'extrait ou standard.

La réalisation de la cinétique de cette activité permet de déterminer les concentrations qui correspondent à 50 % d'inhibition (IC₅₀) ; la valeur d'IC₅₀ la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée. La valeur de l'ic₅₀ est exprimée en µg/ml (3 répétitions pour chaque concentration).

II.3.2. Dosage de la capacité antioxydante totale « test de phosphomolybdate »

Le test du PPM (phosphomolybdate) est une variante du test au DPPH. Au cours de ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé réducteur (extrait-antioxydant) vers le complexe oxydant (PPM). Ce transfert dépend du potentiel redox, du pH du milieu et de la structure du composé antioxydant.

II.3.2.1. Principe

Le test est basé sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo (V) MoO_2^{+} en présence de l'extrait ou d'un agent antioxydant. Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/ Mo (V) à un pH acide (**Prieto et al., 1999**). On mesure l'augmentation de la coloration du complexe molybdène (VI) en présence d'antioxydant. A la différence des autres tests, ce test permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des polyphénols mais aussi d'autres composés antioxydants tel que les vitamines (C, E...).

II.3.2.2. Méthode de dosage

La méthode consiste à introduire dans un tube 200 µl de chaque extrait à différentes concentrations mélangés à 2000µl d'un réactif composé de H₂SO₄ (0,6 M), de Na₂PO₄ (28 mm) et du molybdate d'ammonium (4 mm). Le tube est ensuite bien fermé puis incubé à 95°C pendant 90 minutes. Après les avoir refroidis, l'absorbance est mesurée à 695 nm. Le témoin est constitué de 200 µl de méthanol mélangé avec 2000 µl du réactif mentionné ci-dessus.

Les échantillons et les témoins sont incubés dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent acide ascorbique par gramme de matière sèche de l'extrait (mg EAA/g Ext).

II.4. Test hémolyse

II.4.1. Méthode de dosage

Selon **Abirami et al 2014**; Le sang est récupéré sur anticoagulant EDTA ensuite le tube est centrifugé à 3000 tr/mn pendant 10 min. 1ml du culot ajoute à 1ml de H₂O puis il est centrifugé à 3000 tr/mn pendant 10 min 2 fois. 40µl de surnageant ajoute à 2ml d'extrait, et laisser le mélange 05 min en 37° C après ajouter 40µl de solution peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (30 mmol), 40µl de solution FeCl₃ (80 mmol), 20µl solution acide ascorbique (50mmol), le mélange place dans l'étuve à température 37°C, après incubation 60 min le mélange est centrifugé à 700 tr/mn pendant 10 min. La longueur d'onde du spectrophotomètre est fixée à 540 nm cette opération se répète avec différentes concentrations d'extrait

Les résultats du test d'hémolyse sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la lyse des globules rouges. Le pouvoir d'inhibition a été calculé à partir de la relation suivante :

$$\% \text{ Hémolyse} = \left[\frac{\text{Abs}_{\text{contrôle}}}{\text{Abs}_{\text{échantillon}}} \right] * 100$$

Abs_{contrôle} : Absorbance de milieu réactionnelle en absence de l'extrait.

Abs_{échantillon}: Absorbance de milieu réactionnelle en présence de l'extrait .

$$\% \text{ Hémolyse} = \left[\frac{\text{Abs}_{\text{contrôle}}}{\text{Abs}_{\text{échantillon}}} \right] * 100$$

III. Analyse par spectroscopie IR

La Spectroscopie Infra Rouge est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau (**Wojtkowiak et al 1977**).

III.1. Principe

Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistre une diminution de l'intensité réfléchie ou transmise. Le domaine infrarouge entre

4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} (2.5 - 25 μm) correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules.

III.2. Mode opératoire

On analyse nos extraits en concentration 1mg/ml, l'intervalle de nombre d'onde utilisé est (650-4000 cm^{-1})

Chapitre II :

Résultats et discussions

I. Résultats

I. Résultats de l'étude phytochimique

I.1. Test phytochimique

Les tests préliminaires de la composition phytochimique consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la poudre du *Calligonum comosum L'Her* par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés. Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau suivant: **Tableau2**

Tableau2 : Screening phytochimique de la plante *Calligonum comosum L'Her*.

Métabolite secondaire	Résultats
Les Flavonoïdes	+++
Les Tanins Gallique	-
Les Tanins Cathéchique	+++
Les Anthocynes	+
Les alcaloïdes	-
Triterpènes Et Les Stérols	++
Les Saponosides	+++

(+) : présence ; (-) : absence

Le screening phytochimique montre que l'espèce *Calligonum comosum L'Her*. Est très riche par plusieurs classes de métabolites secondaires notamment les flavonoïdes, les tanins, Saponosides et Les Anthocynes, glycosides, stérols et triterpènes est signalée chez la plante. Une absence marquée des alcaloïdes

La présence des flavonoïdes, des tanins et des saponosides confère à cette plante des propriétés biologiques très importantes et pourrait expliquer leur utilisation traditionnelle pour soigner de nombreuses maladies :

- **Des flavonoïdes** : peuvent assurer la protection des plantes contre le rayonnement UV (**Dahou et al., 2004; Radu et al., 2006; Rijke et al., 2006**), certaines flavonoïdes jouent le rôle de phytoalexines (**Hopkins, 2003; Stobiecki et al., 2006**). C'est par la couleur de fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes pollinisateurs (**Croteau et al., 2000**). De nos jours plusieurs activités sont attribuées aux flavonoïdes dans le domaine thérapeutiques, dont on peut trouver des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, antiallergiques, et anticancéreuses (**Alemàn, 2000; Calabrò et al., 2004**).

- **Des 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. Ces tanins permettent aussi de stopper les hémorragies (**Iserin, 2001**). Les applications des drogues à tanins sont assez restreintes et découlent de leur affinité pour les molécules protéiques. Par voie externe, elles imperméabilisent les couches les plus externes de la peau et des muqueuses, protégeant ainsi les couches sous-jacentes ; elles ont aussi un effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels. Par voie interne, ils exercent un effet antidiarrhéique certain. Quelle que soit la voie d'administration, l'effet est antiseptique - antibactérien et antifongique (**Bruneton, 2009**).

- **Des saponosides** : La présence des saponosides confère aux plantes des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et anti-oedémateuse (**Roux et al., 2007**). *In vivo*, les saponosides assurent la défense du végétal contre l'attaque microbienne ou fongique. Quasiment dépourvus d'activité antibactérienne, les saponosides sont parfois actifs, *In vitro*, sur des virus (**Bruneton, 2009**).

Le travail de **Chouikh, Mekki et Adjaj, (2015)** sur la même espèce étudiée en Sahara algérien confirme les familles chimiques détectées dans notre étude. Par ailleurs, Une analyse faite par **Beddou, (2015)** sur les extraits méthanoliques de l'espèce *Rumex vesicarius L* de la famille des polygonacées affirme la présence des mêmes groupes chimiques détectés dans la présente étude, à l'exception des alcaloïdes et glucides .

I.2. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en phénols totaux estimée par la méthode de Folin- Ciocalteu pour chaque extrait à partir d'une gamme étalon établie avec différentes concentrations d'acide gallique (l'équation standard de courbe $y = 14.794x + 0.0123$; $R^2 = 0.9841$) **Figure 20**. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par g de l'extrait sec (mg EAG/1g EXS). En plus de sa sensibilité, cette méthode de dosage représente une productibilité puisque l'absorbance et étroitement corrélée à la concentration de l'acide gallique utilisé dans la gamme étalon $R^2=0.9841$. **Figure21**

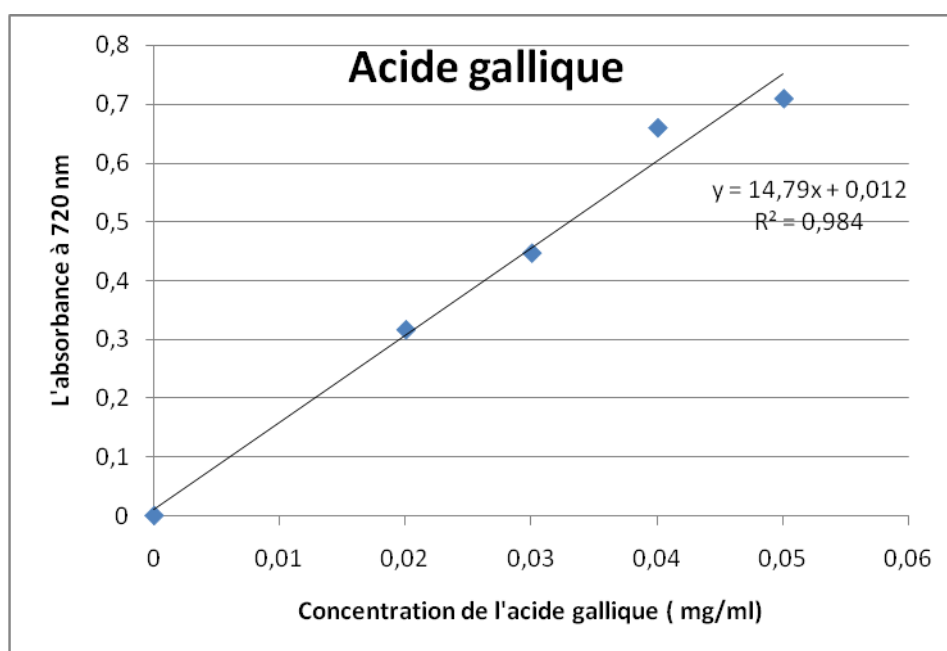


Figure 20: Droite d'étalonnage de l'Acide Gallique ((Moyenne \pm SD de trois essais)

La (**figure 21**) montre que l'extrait de région F4 (Eloued-Al chatte) possède la plus haute teneur en polyphénols (0.07654 ± 0.01 mg EAG/g EXS), suivi par l'extrait de région F1 (Taghzout - Boubydha) (0.0668 ± 0.001 mg EAG/g EXS) suivi par l'extrait de région F2 Guemar-miha Salah (0.05394 ± 0.003 mg EAG/g EXS) et enfin l'extrait de région F3 Hassani - Abdel Karim dokar ($0.05 \pm 8.4984E-18$ mg EAG/g EXS).

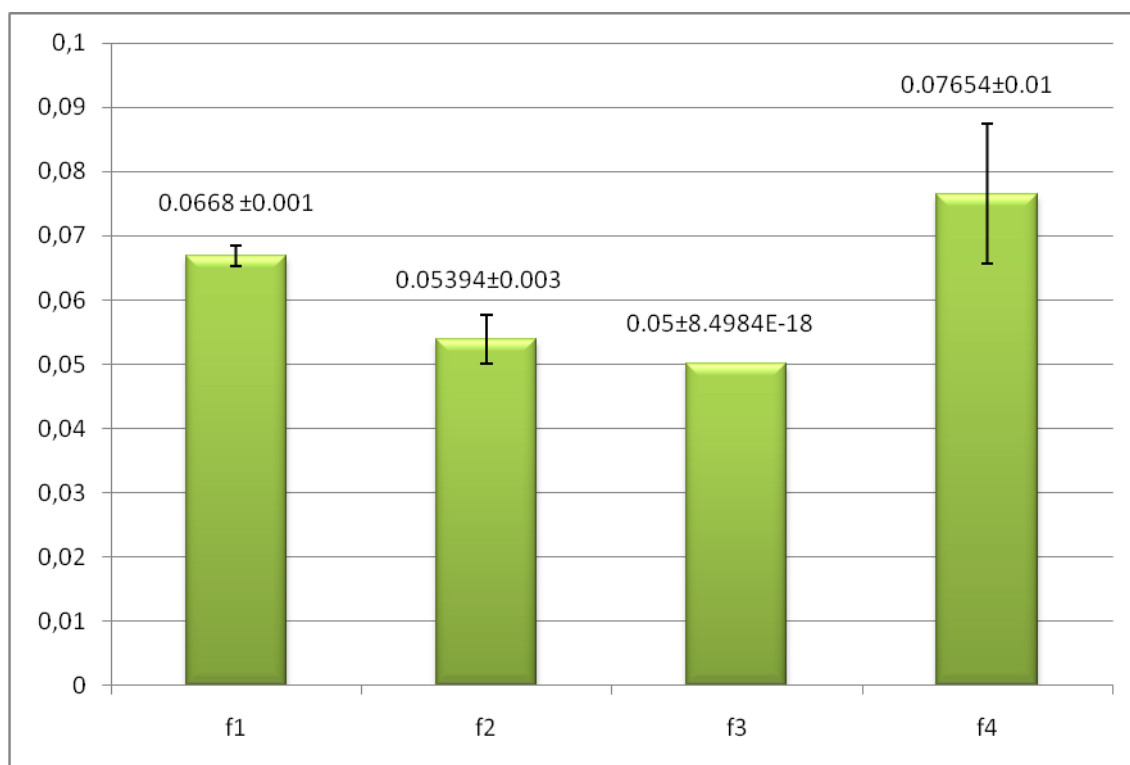


Figure 21 : Teneurs en polyphénols totaux dans l'extrait de quatre régions équivalent d'acide gallique.

F1 : (Taghzout - Boubydha) ; **F2 :** Guemar-miha Salah ; **F3 :** Hassani - Abdel Karim dokar
F4 : (Eloued-Al chatte) .

D'après les résultats, on peut constater que tous les extraits de la plante étudiés, sont riches en polyphénols mais avec des quantités différentes.

Les teneurs des polyphénols totaux déterminées ne sont pas des mesures absolues des quantités des phénols du matériel de départ, elles sont en fait, basées sur la capacité réductrice Relative à une capacité réductrice équivalente à l'acide gallique (EAG). Les valeurs obtenus par la méthode colorimétrique fournissent des informations directes sur la quantité des groupes phénoliques antioxydants de l'extrait qui dépend essentiellement du nombre des groupes hydroxyles de ces derniers (**Balasunderam et al., 2006**).

Le profil polyphénolique des extraits de plantes peut varier sous l'influence de divers facteurs parmi lesquels la variété, le climat, la localisation géographique (**Ryan et al., 1999 ; Benlarbi, 2004**), les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante (**Park et Cha, 2003**) la température et le solvant d'extraction (**Sousa et al., 2006 ; Conde et al., 2009**)

I.3. Dosage des tanins condensés

La quantification des tanins a été effectuée par une méthode adaptée par **Schofield et al. (2001)**. Le dosage des tanins condensés dans les extraits de *Calligonum comosum L'Her* est effectué selon la méthode de **Schofield et al., (2001)**. Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de vanilline sur le carbone 6 du cycle A de la catéchine pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe la lumière à 500 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant la catéchine. Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent de la catéchine par gramme d'extrait (mg EC/g Ext).

Les taux de tanin des quatre extraits ont été obtenus à partir de la courbe d'étalonnage qui suit l'équation de type $y = 1,9033x - 0,0018$ (**Figure 22**).

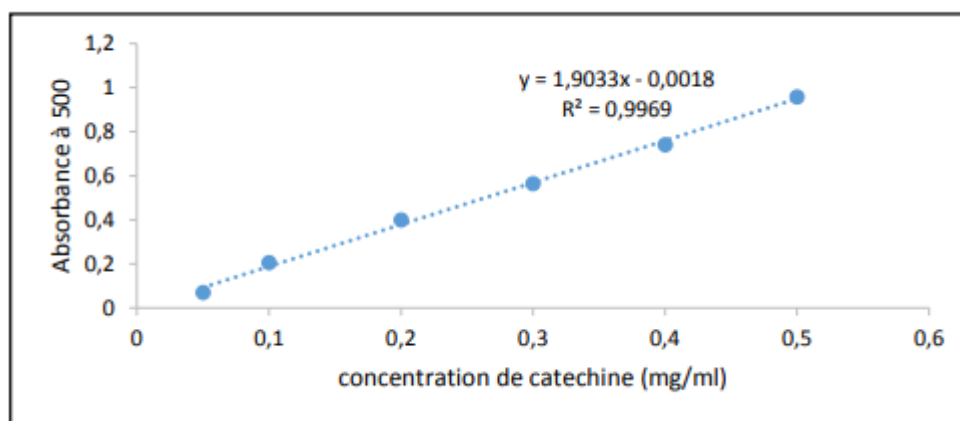


Figure 22: Droite d'étalonnage de la catéchine ((Moyenne \pm SD de trois essais)

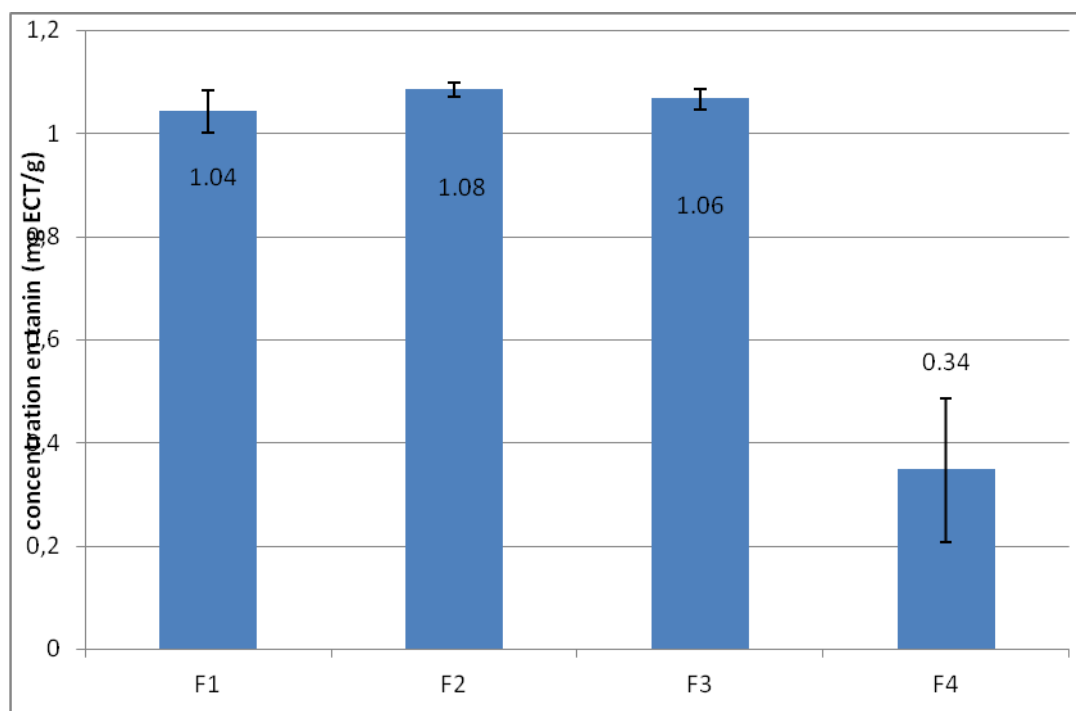


Figure23: Teneurs En Tanins Condensés

D'après la **figure (23)**, les résultats obtenus lors de la quantité des tanins on peut constater que les teneurs de ces composés dans des quatre Régions sont quasiment équivalents : la plus élevée est égale 1.08 mg EC/g) ont été détectées pour la région F2 Guemar-miha Salah puis de (1.06 mg EC/g) pour la région F3 Hassani - Abdel Karim dokar, et en la région F1 (Taghzout - Boubydha) avec (1.04 mg EC/g). Tandis que la teneur la plus basse est remarquée à la région F4 (Eloued-Al chatte) avec (0.34 mg EC/g).

Le taux des tanins dans une plante dépend de deux facteurs principaux : le stade de développement végétatif et les conditions environnementales. Leur concentration varie considérablement entre les différentes espèces végétales et au sein de la même espèce où elle dépend du degré de maturité, de l'âge des feuilles, des fleurs et de la saison (**Skadhauge et al., 1997**).

I.4. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes déterminée par la méthode de trichlorure d'aluminium (**Bahorun et al., 1996**) au moyen des dosages spectrophotométriques, une courbe d'étalonnage (**Fig.24**) et déterminés par l'équation standard $y = 14.794x + 0.0123$; $R^2 = 0.9841$ a été tracée, établie avec la quercétine utilisant comme standard à différentes concentrations. Des mesures de densité pour chaque fraction réalisées à 430 nm. Les quantités des flavonoïdes

correspondantes ont été rapportées en équivalent milligramme de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ /g d'Ext).

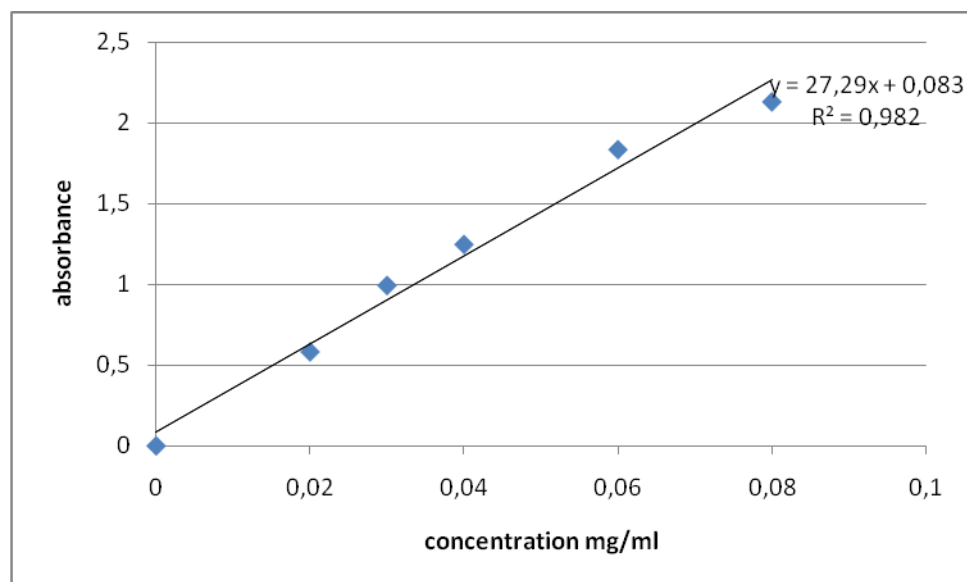


Figure24: Droite d'étalonnage de la quercétine ((Moyenne \pm SD de trois essais)

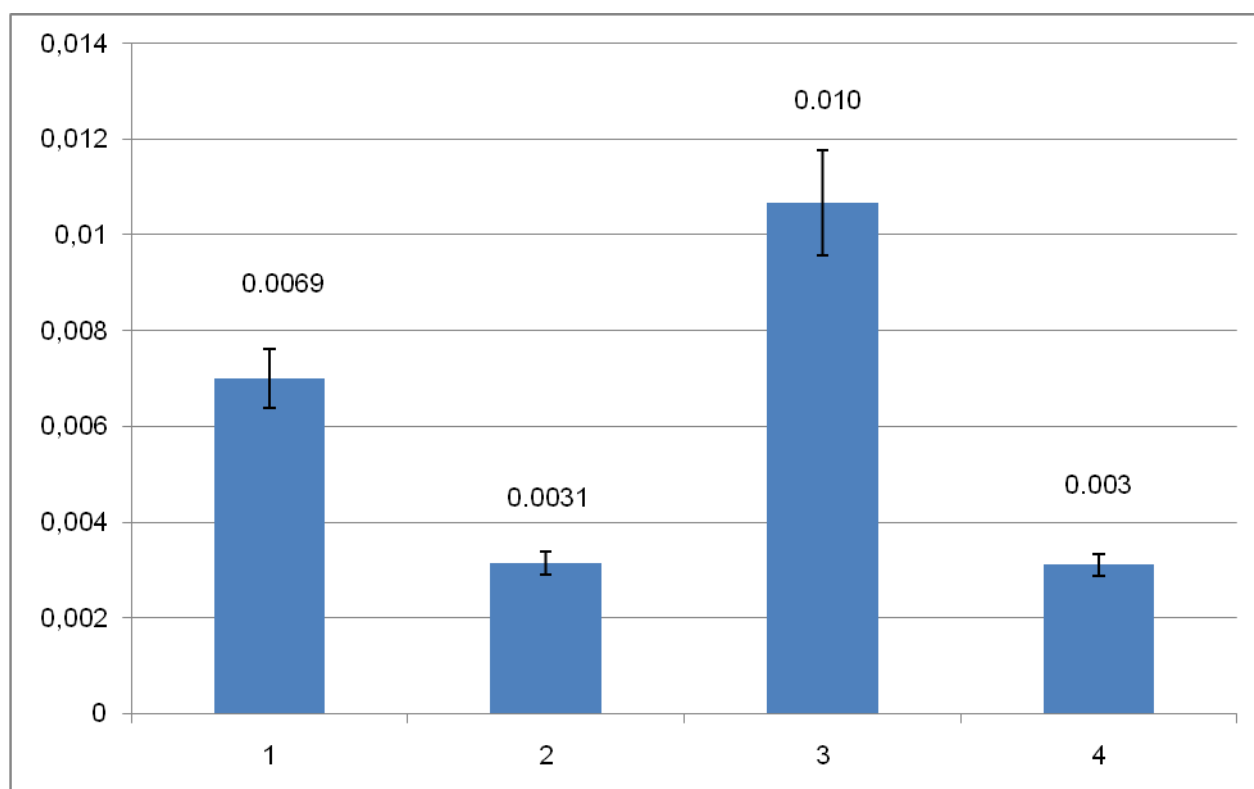


Figure25: Teneurs En Flavonoïdes

L'histogramme illustré par la **figure 25** montre que les teneurs en flavonoïdes varient considérablement entre les extraits des différents sites étudiés. Ces résultats montrent que l'extrait de région Hassani - Abdel Karim dokar possède la plus haute teneur en flavonoïdes (0.011mg EQ /g d'Ext), suivi par l'extrait de région (Taghzout - Boubydha) (0.006mg EQ /g d'Ext) suivi par l'extrait de région Guemar-miha Salah (0.0031 mg EQ /g d'Ext) et le même valeur pour l'extrait de région (Eloued-Al chatte).

Il faut cependant noter que la quantité des flavonoides obtenu dans la présente étude sont nettement inférieur à ceux trouvés par qui reportent un taux en polyphénols totaux (0.341 ± 0.002 mg EQ /g), et flavonoïdes égale à (0.068 ± 0.002 mg EQ /g). Bien qu'ils aient utilisé un procédé extractif similaire de celui que nous avons utilisé. sur la même espèce. Mais le taux de tanins condensés est supérieur où présente les tanin condensé (0.436 ± 0.003 mg EQ /g).

Gasmi et al (2019)

Par comparaison des résultats obtenus, nous constatons une différence dans le pourcentage des composés dans la même espèce ou dans les espèces du même genre qui peut être dû aux facteurs abiotiques tel que le climat spécifiques aux régions de provenance des échantillons, les facteurs géographiques comme l'altitude et la nature du sol (**Brada, 2007**).

Ces observations laissent penser que les quatre sites présenteraient des compositions polyphénoliques différentes en quantité et, peut-être aussi, en nature. Néanmoins, le dosage des polyphénols totaux par le test Folin-Ciocalteu, implique que toutes les molécules réductrices, comme les sucres réducteurs ou la vitamine C, sont dosées, ce qui par conséquent rend ce dosage non sélectif vis-à-vis des polyphénols (**Fukushima et al., 2009**).

La quantité des composés phénoliques des extraits méthanoliques des plantes étudiées dépend essentiellement : de leur origine (**Ebrahimzadeh et al., 2008**), la variété, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique, les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante (**Park et Cha, 2003**) et la durée de sa conservation (**Özgülven et Tansi, 1998**).

II. Méthode de dosage des activités antioxydantes *in vitro*

II.1. Le test de piégeage du radical DPPH

La méthode du DPPH est indépendante de la polarité de substrat. Cette méthode est

Basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui

Donne un hydrogène ou un électron. La forme non radicalaire DPPH-H est formée. Les graphes ci-dessous représentent la variation du pourcentage du pouvoir inhibiteur en fonction de la concentration de chaque extrait.

D'après les résultats représentés dans la (**figure 26 et 27**), il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour les standards (l'acide ascorbique) ou pour les différents extraits de la plante.

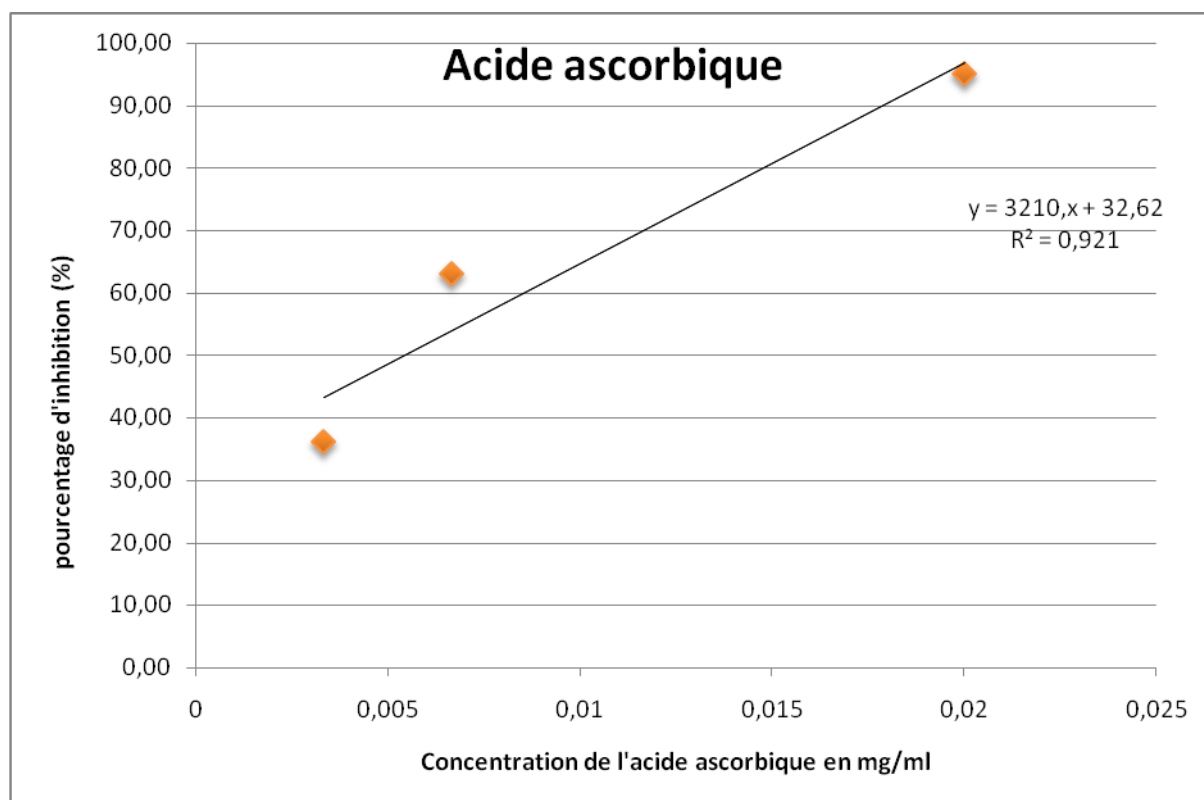


Figure26 : Courbe standard de l'acide ascorbique de test DPPH

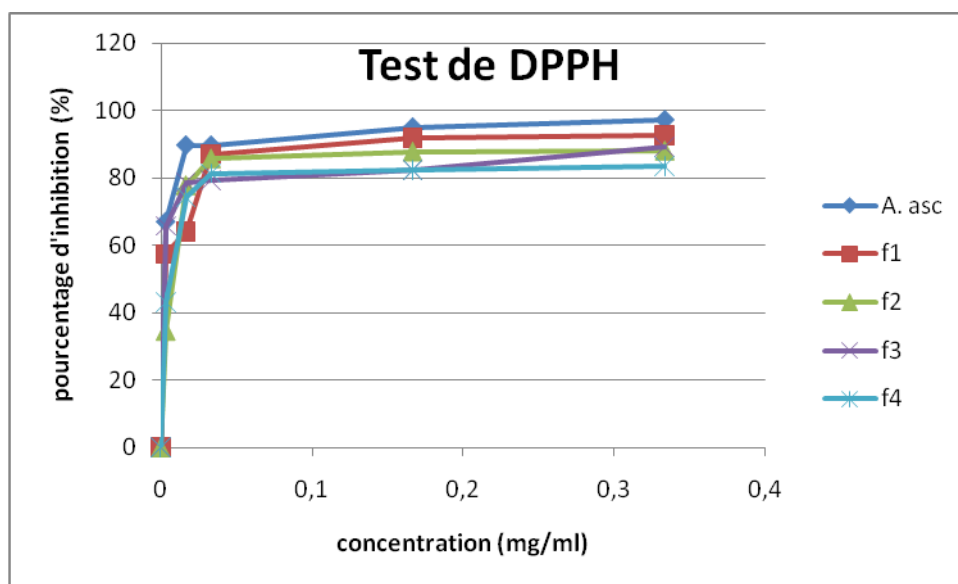


Figure27: Pourcentages d'inhibition du radicale DPPH• des antioxydants de références et des extraits testés

On a remarqué que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour les extraits était inférieur à celui du standard pour toutes les concentrations utilisées.

Pour une concentration de 0.33g/ml le standard pour d'acide ascorbique est révélé un pourcentage d'inhibition de DPPH de 97.19 % \pm 0,002. Concernant les quatre extraits, pour une concentration de 0.33g/ml , le pourcentage d'inhibition de DPPH est de 92.59 % \pm 0,015 pour le F1 , 88.06% \pm 0,004 pour le F2 , 89.19 % \pm 0,003 pour le F3 et 83.58 % \pm 0,006 pour le F4 . Ces pourcentages correspondent à une inhibition totale du DPPH reflétée par la décoloration complète du DPPH du violet en jaune pâle.

La capacité antioxydant des différents extraits a été déterminée à partir de l'IC₅₀, c'est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radicale DPPH. Plus la valeur d'ic₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (Hebi et Eddouks, 2016).

Nous avons déterminés pour chaque extrait, la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical libre DPPH ou IC₅₀. À partir des équations des régressions linéaires des graphes. Les valeurs sont représentées dans le tableau suivant **Figure28** :

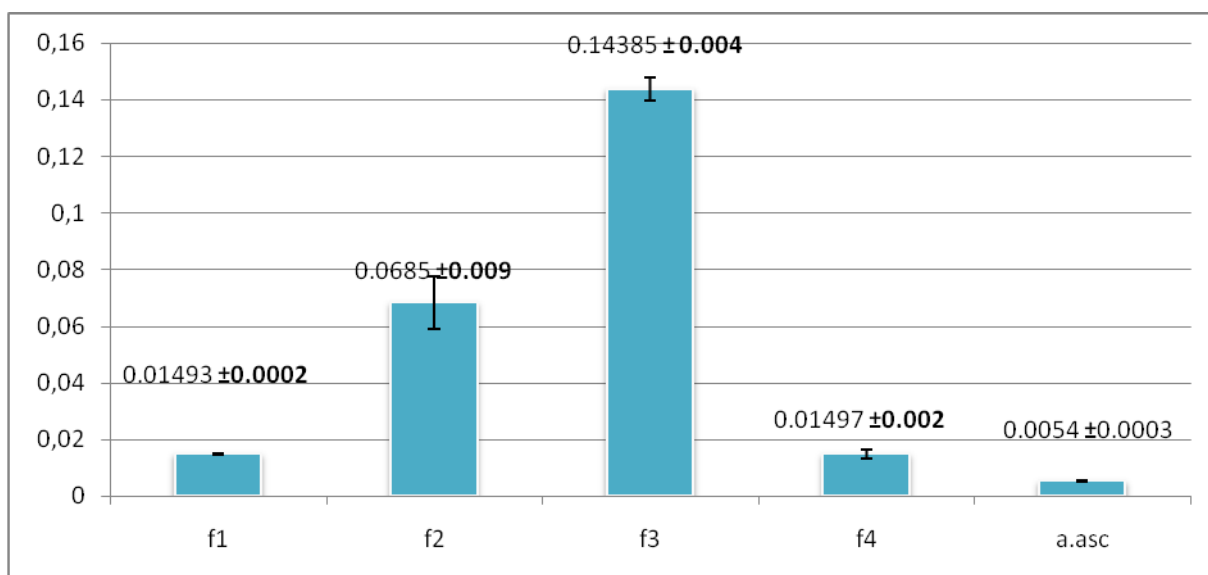


Figure28: le pouvoir antioxydant (exprimé par IC₅₀ (en mg /ml)) des antioxydants de références et des extraits testés

D'après les résultats présentés dans le Figure, l'ic₅₀ obtenu pour l'acide ascorbique

(0.0054 ± 0.0003 mg /ml) utilisés comme des molécules de référence , est bien plus inférieur à ceux des extraits et donc, une activité antioxydante très élevé. L'extrait de région de Taghzout - Boubydha présente un IC₅₀ (de l'ordre de 0.01497 ± 0.002 mg /ml) et l'extrait de région d' Eloued-Al chatte (0.01497 ± 0.002 mg /ml) largement inférieur à ceux des extraits de région de Guemar-miha Salah (0.0685 ± 0.009mg /ml) et de région de Hassani - Abdel Karim dokar (0.14385 ± 0.004mg/ml).

Il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, tocophérol, flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (**Bougandoura et Bendimerad, 2012**). Les polyphénols contenus dans nos extraits sont probablement responsables de l'activité antioxydante.

A travers la recherche bibliographique, de très grandes différences de points de vue sont notées à propos de cette corrélation. Certains travaux ont montré une bonne corrélation entre les IC₅₀ et la teneur en polyphénols et en flavonoïdes, à l'opposé d'autre études n'ont pas établie cette corrélation (**Athamena et al., 2010 ; Mariod et al., 2010**). Par ailleurs, il est bien établi que l'activité antioxydante est corrélée positivement avec la structure des polyphénols.

Généralement, les polyphénols avec un nombre élevé du groupements hydroxyles présentent l'activité antioxydante la plus élevée (**Heim et al., 2002**) due à leur pouvoir de donner plus

d'atomes pour stabiliser les radicaux libres (Torres de Pinedo *et al.*, 2007), ce qui peut expliquer en partie que l'activité anti-radicalaire est dépendante du nombre, de la position et de la nature des substituant sur les cycles B et C (groupements hydroxyles, metaxylés, glycosylés) et le degré de polymérisation (Popovici *et al.*, 2010). Ainsi, l'effet antioxydant n'est pas seulement dose-dépendant mais également structure-dépendant (Rodriguez-Bernaldo *et al.*, 2010).

II.2. Capacité antioxydant totale (CAT)

La capacité antioxydante totale des extraits étudié est exprimée en nombre d'équivalents

D'acide ascorbique à partir d'une courbe d'étalonnage ($y = 2.927x - 0,0411$; $R^2 = 0,993$)

(figure 29). Les résultats obtenus sont exprimés en (mg EAA/g EXS).

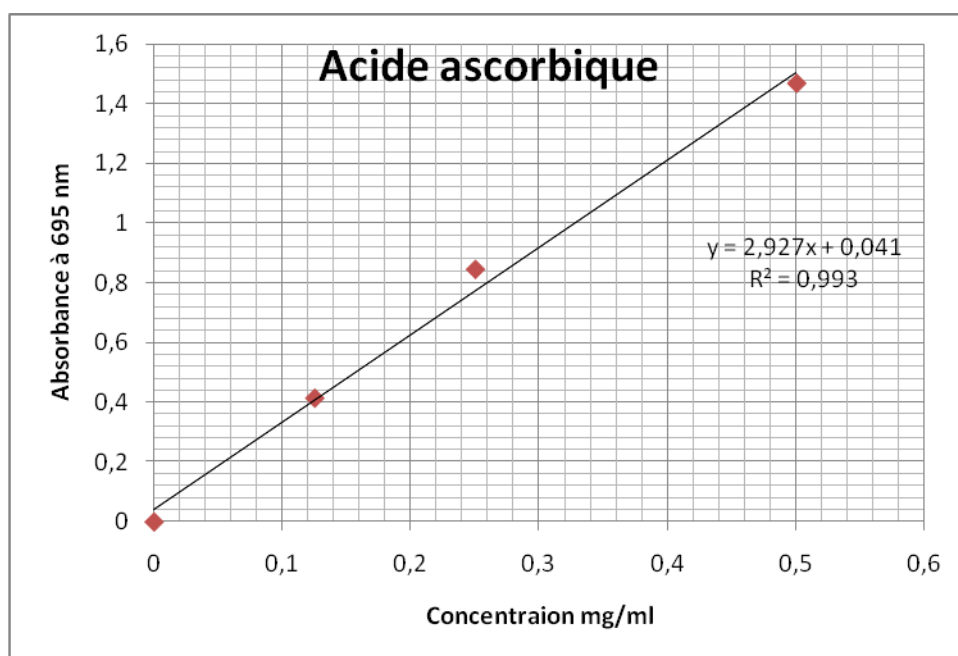


Figure29: Droite d'étalonnage de l'acide ascorbique pour mesure la capacité antioxydante

D'après les résultats obtenu dans la (figure30), l'estimation de la capacité antioxydante totale des extraits a montré une variabilité entre les quatre régions. On remarque que dans la concentration de 0.5 mg/ml, la région Hassani - Abdel Karim dokar à un pouvoir antioxydant le plus élevé ($0.203 \pm 0,002$ mg EAA/g EXS) par rapport aux extraits de région Taghzout - Boubydha, Guemar-miha Salah et Eloued-Al chatte (respectivement $0.163 \pm 0,003$ mg EAA/1g EXS, $0.156 \pm 0,002$ mg EAA/1g EXS et $0.155 \pm 0,004$ mg EAA/g EXS). Ce pouvoir antioxydant observer dans les quatre extraits peut être dû essentiellement à la richesse des

extraits en polyphénols particulièrement les flavonoïdes, et aussi en fonction des structures chimiques des molécules bioactives.

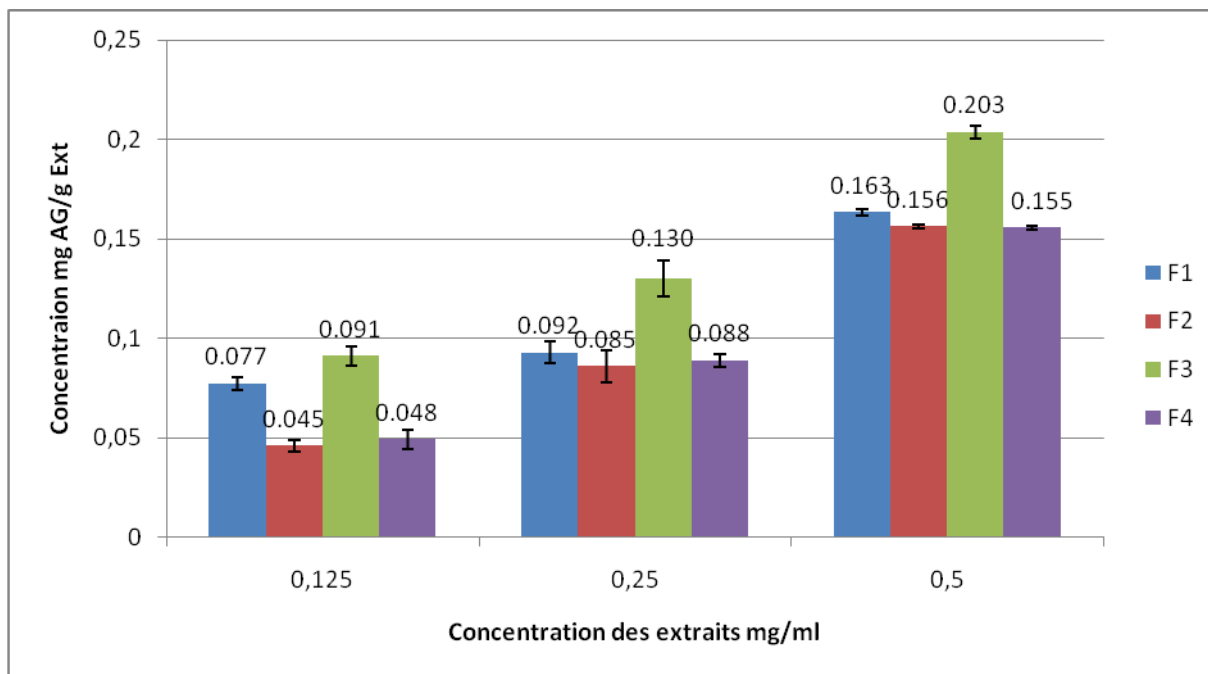


Figure30: Histogramme comparatif de la capacité antioxydante totale des antioxydants de références et des extraits testés

Pour les extraits de nos plantes, leurs comportements à céder le proton ou l'électron pour exprimer les propriétés antioxydantes sont différents. Ce résultat a été corroboré par **Miliauskas et al (2004)** qui ont montré qu'un antioxydant efficace dans un test n'est pas forcément efficace dans un autre d'une part. D'autre part, les activités antioxydantes sont plus variables dans les espèces de la plante (inter-espèce) que dans la même espèce (intra-espèce) (**Ksouri et al., 2008**).

II.3. Test hémolyse

Afin d'estimer l'activité antioxydante des extraits de plantes étudiés, on utilise le test hémolyse en tant que ce test le plus simple et plus rapide pour ce but ; Où les pourcentages d'hémolyse ont été déterminées par la formule **d'Abirami et al (2014)**

A partir des **figures (31- 32-33-34-35)** qui montrées les pourcentages d'hémolyse , on remarque une relation inverse entre la concentration des extraits et l'hémolyse; où la concentration augmentel'hémolyse diminue .

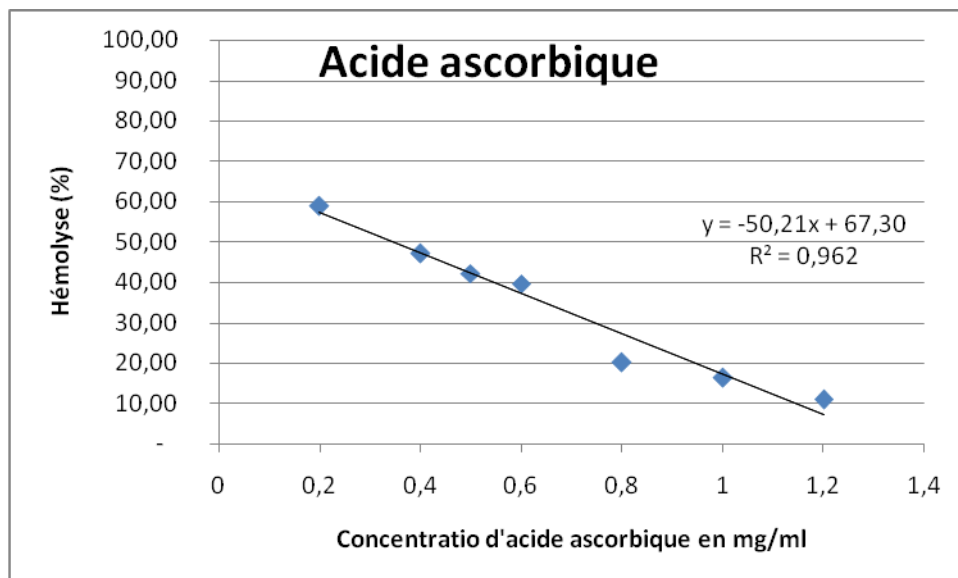


Figure31: Courbe standard de l'acide ascorbique d'hémolyse

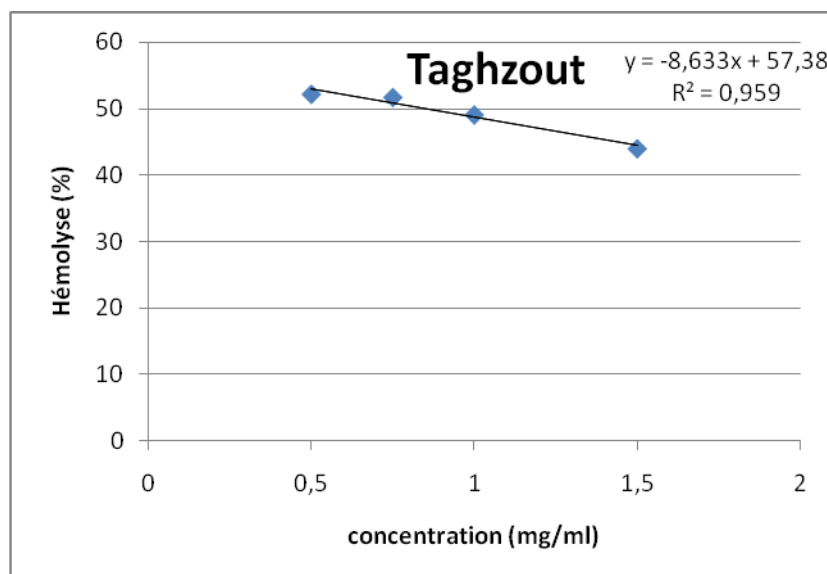


Figure32: courbe d'hémolyse (%) en fonction des concentration d'extrait de plante de région Taghzout (mg/ml)

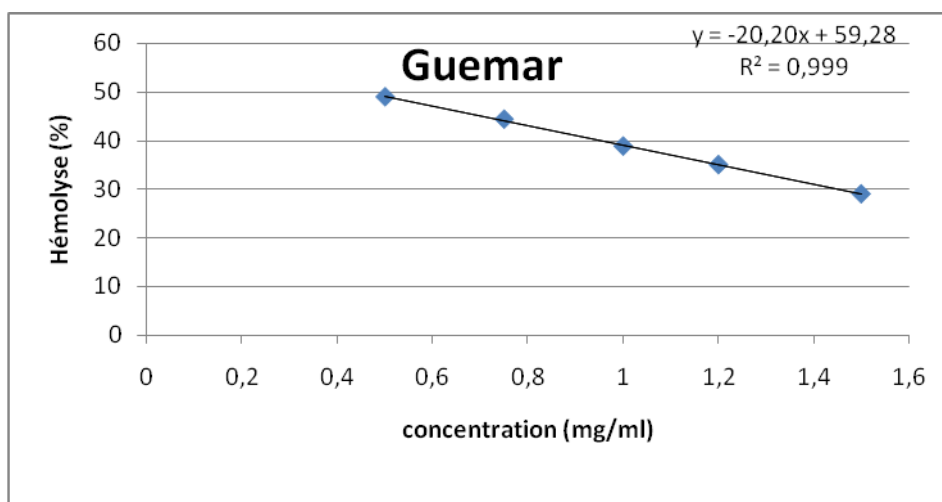


Figure33: courbe d'hémolyse (%) en fonction des concentration d'extrait de plante de région Guemar (mg/ml)

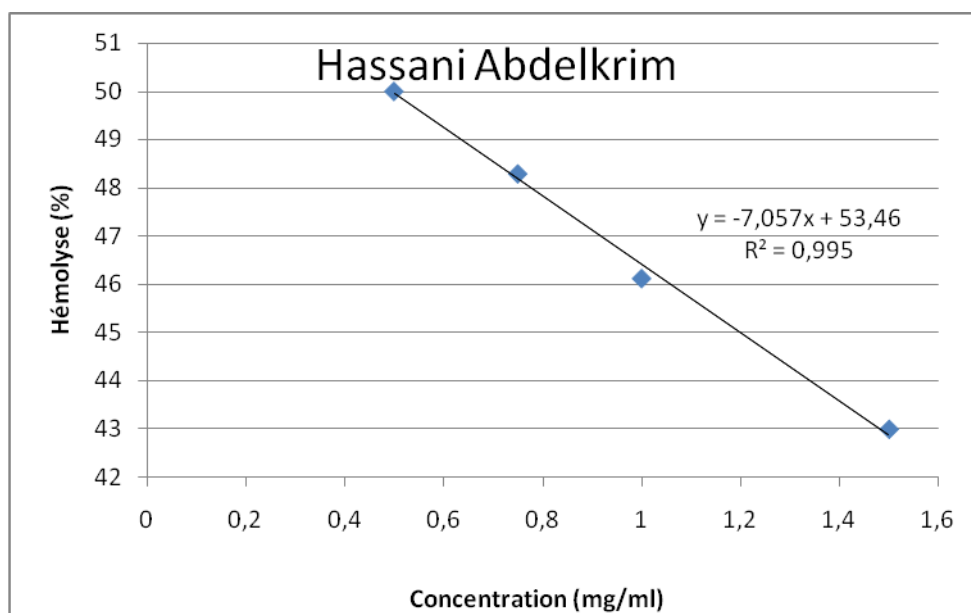


Figure34: courbe d'hémolyse (%) en fonction des concentration d'extrait de plante de région Hassani Abdelkrim (mg/ml)

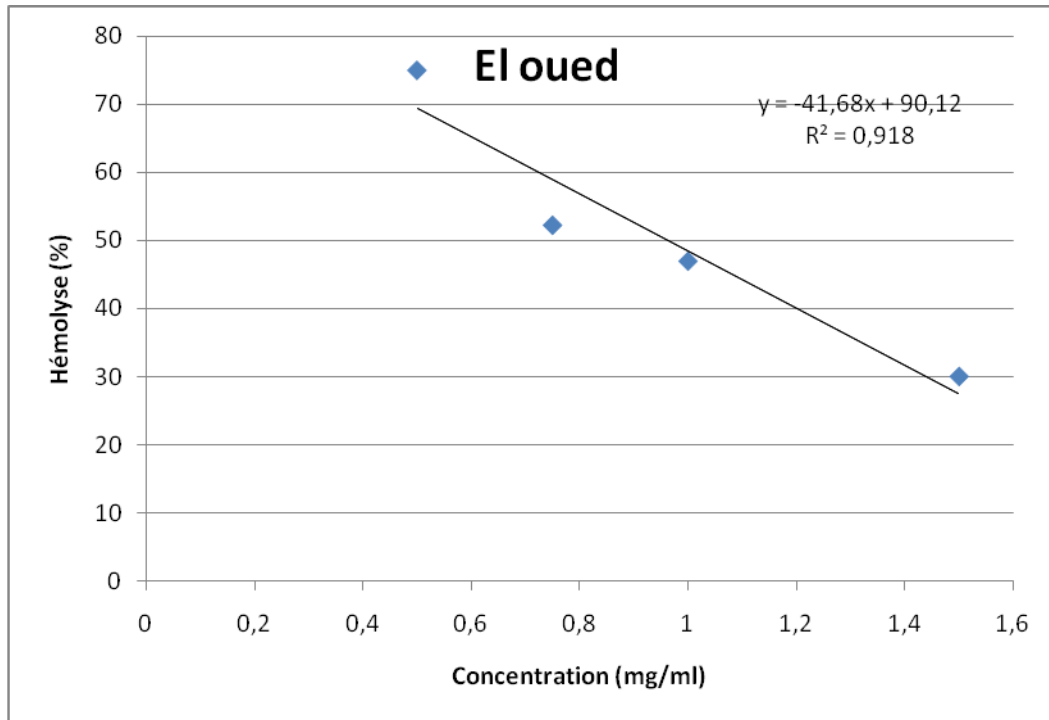


Figure35: courbe d'hémolyse (%) en fonction des concentration d'extrait de plante de région Eloued(mg/ml)

A partir les résultats de **figure (36)** on observe l'effet protecteur d'hémolyse très proche dans tous les extraits sauf la solution d'acide ascorbique qui présente un hémolyse le plus bas (16.32%) puis l'extrait de la région Guemar-miha Salah (38.87%) , puis les extraits des région Hassani Abdelkrim, El oued respectivement (46.12%) et (46.95%) et enfin l'hémolyse le plus élevé est remarqué dans l'extrait de région Taghzout (49.13%)

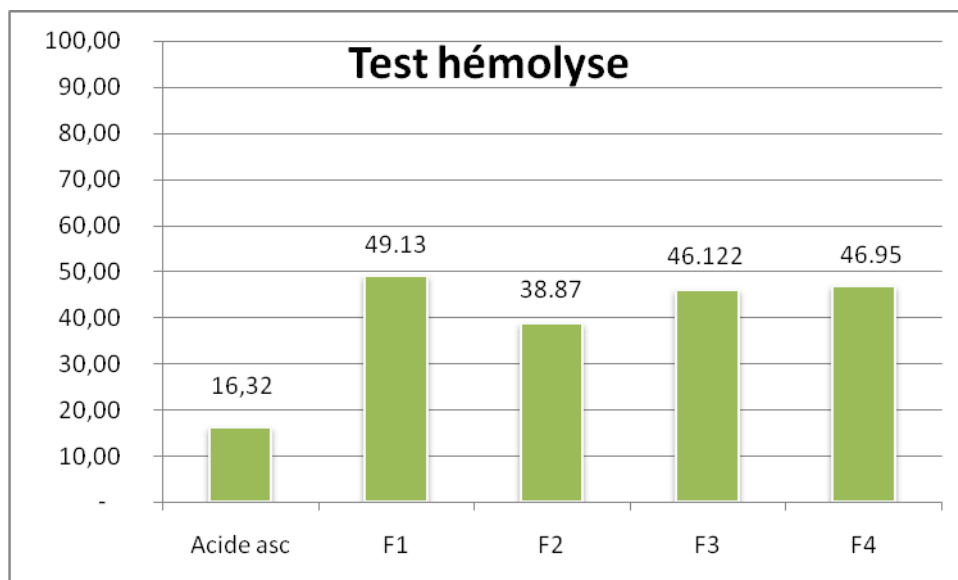


Figure36: Histogramme comparatif de taux d'hémolyse d'acide ascorbique et des quatre extraits testés en concentration 1mg/ml

Les globules rouges sont parmi les cellules les plus utilisées dans l'évaluation de la toxicité à cause de leur disponibilité, et la facilité de leur surveillance au cours de la lyse cellulaire grâce à la libération de l'hémoglobine, (Situ *et al* , 2000).

En outre, la présence d'une concentration très élevée d'acides gras polyinsaturés, sur la membrane et le rôle de transport d'oxygène joué par les molécules d'hémoglobine, rend les érythrocytes une cible privilégiée des radicaux libres, (Situ *et al*, 2000).

L'interaction d'un composé cytotoxique avec la membrane des globules rouges provoque la perte de leur intégrité ce qui conduit à leur lyse. (Tiwari *et al.*, 2011).

Le peroxyde d'hydrogène est une espèce oxygénée réactive très utilisée dans les tests d'évaluation de l'activité anti-hémolytique. Il provoque la dégradation de la membrane cellulaire des hématies en libérant le contenu cytoplasmique et particulièrement l'hémoglobine. Le H₂O₂ stimule la production du radical hydroxyle en mobilisant le Fe₂₊ grâce à la réaction de Fenton. (Kupier *et al* , 1989) . Notre résultats d'hémolyse ne dépasse pas 50% en concentration 1 mg/ml , donc ils est indiquer l'effet protecteur des globules rouges à partir leur capacité antioxydantes , Ceci est illustré par les résultats de test DPPH et CAT .

III. Analyse par spectroscopie IR

L'analyse par spectroscopies IR servent à identifié des liaisons chimiques dans les molécules organiques. Ils permettent de déterminer ces fonctions chimiques. Les spectres d'ir suivant présentent les liaisons on peut trouver dans nos extraits.

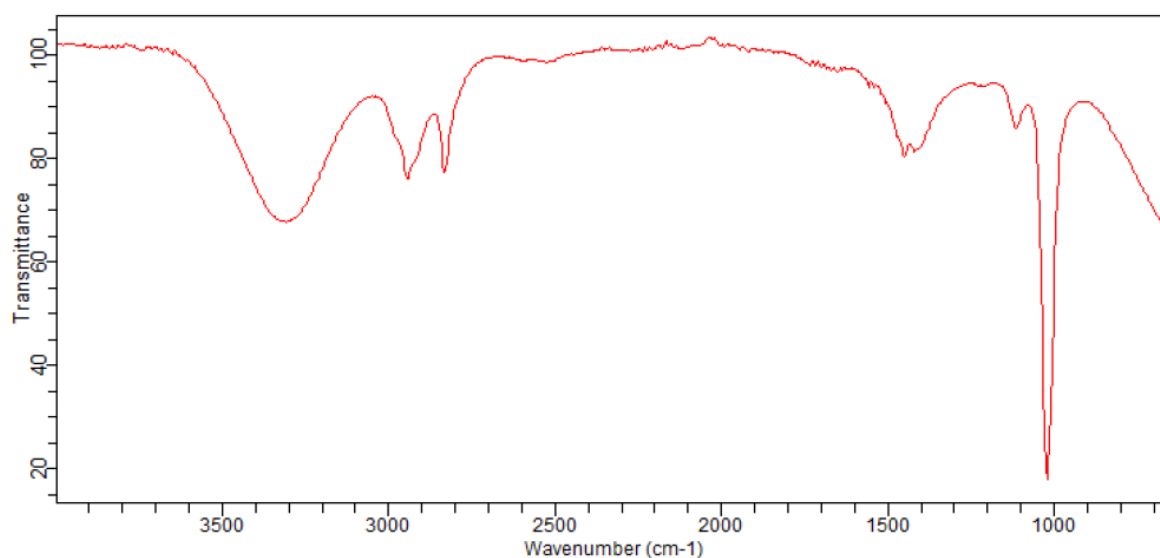


Figure37: spectre d'IR d'extrait étudié dans la région de Taghzout en concentration 1mg/ml

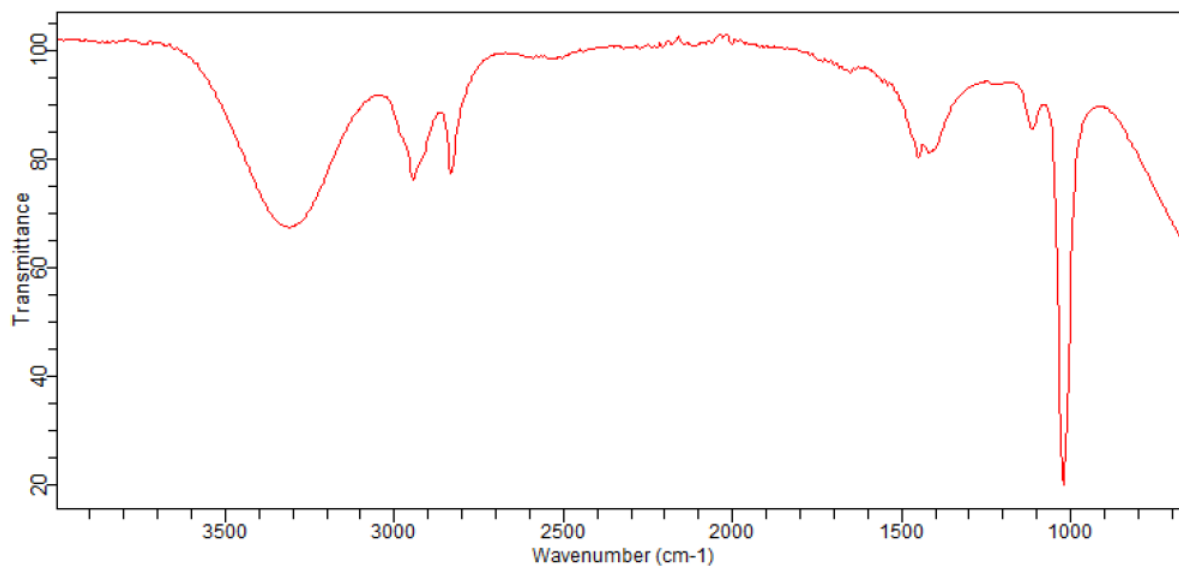


Figure38: spectre d'IR d'extrait étudié dans la région de Guemar en concentration 1mg/ml

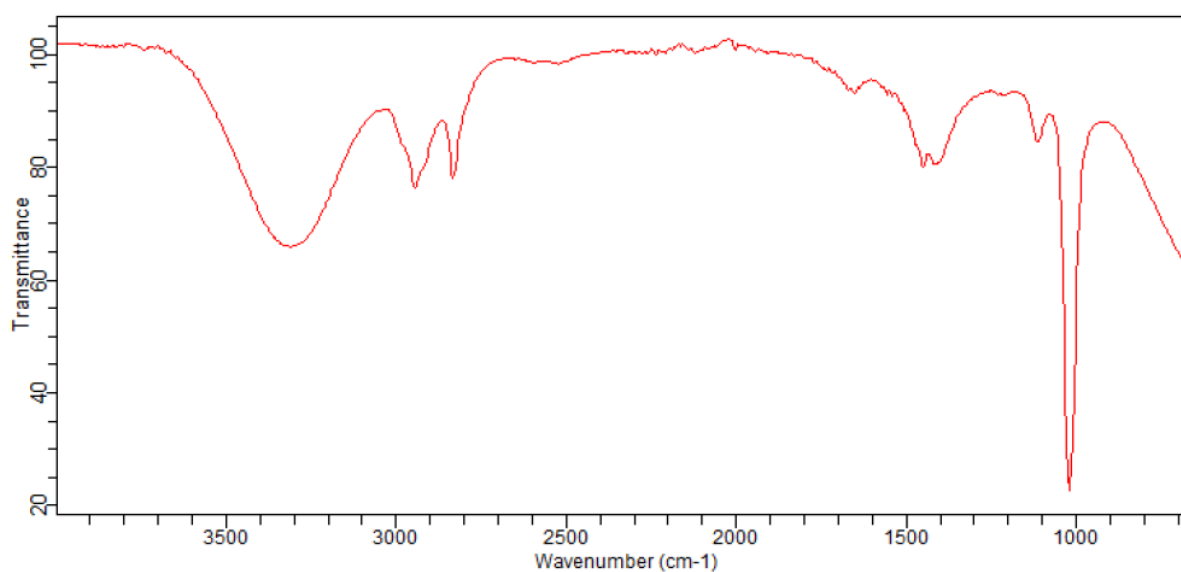


Figure39: spectre d'IR d'extrait étudié dans la région de Hassani Abdelkrim en concentration 1mg/ml

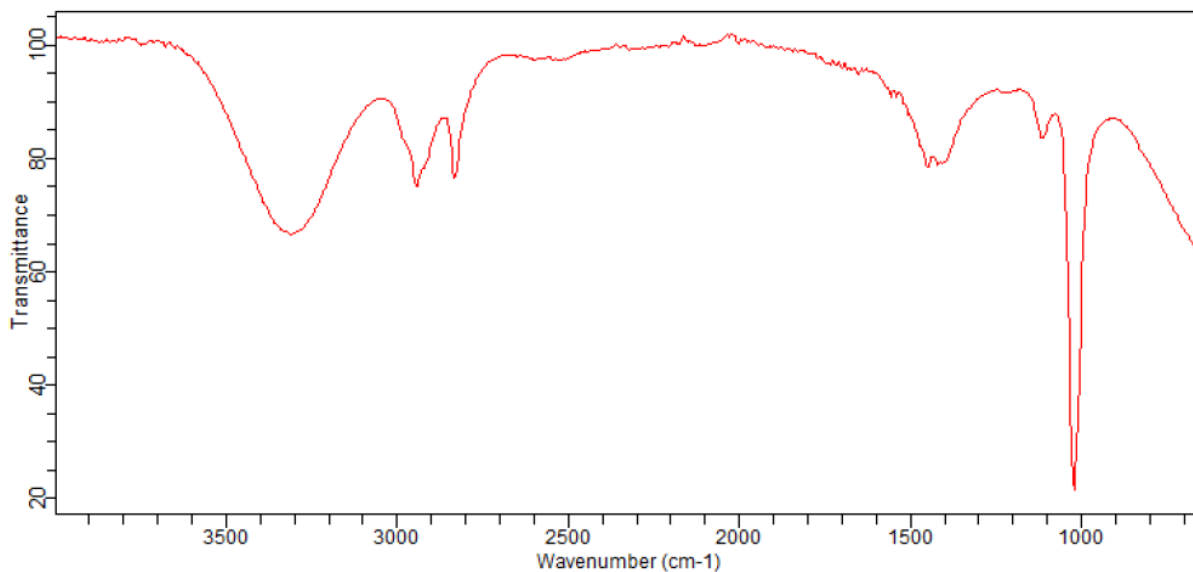


Figure40 : spectre d'IR d'extrait étudié dans la région d'Eloued en concentration 1mg/ml

On observe dans tous les spectres IR **figure 37-38-39-40**. les résultats sont similaires entre les extrait de quatre région. On résume les résultats dans le tableau suivant **Tableau3** :

Tableau3 : interprétation des spectres

Liaison	Fonction ou famille	Nombre d'ondecm	L'intencité
O-H	Hydroxyl	3200-3400	Forte
C-H	Aldéhyde/cétone	3000	Forte
C-C	Alcan	1000	Forte

Sur la base des données précédentes, il est possible que l'activité antioxydante, puissante d'extraits polaires, soit due à la présence de substances ayant des groupes hydroxyles libres. Dans ce contexte, les flavonoïdes possèdent une structure idéale pour le balayage des radicaux libres, car ils présentent un certain nombre de groupes hydroxyles agissant comme hydrogène-donneurs (**Usmani et al., 2013**). A travers la recherche bibliographique il est bien établi que l'activité antioxydante est corrélée positivement avec la structure des polyphénols. Généralement, les polyphénols avec un nombre élevé de groupements hydroxyles présentent l'activité antioxydante la plus élevée (**Heim et al., 2002**) due à leur pouvoir de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres (**Torres De Pinedo et al., 2007**). De nombreuses études ont établi des relations entre la structure des polyphénols et leur capacité à piéger les

radicaux libres (**Pietta. 2000 ;Goupy et al 2003**) .Les polyphénols possèdent une affinité pour une grande variété de protéines (**Havsteen. 2002 ;Dangles et al . 2008,**), via des interactions de van der Waals (cycles aromatiques) et des liaisons hydrogènes (groupements OH phénoliques) (**Zuo et al 2002**).

Conclusion

Notre travail vise à faire une étude phytochimique et l'étude de l'activité antioxydante de *Colligonum comosum* L'Her. Qui pousse dans la région d'El-oued (Est Sud d'Alger) ; à partir de screening chimique et la comparaison entre l'extraits dans quatre région différents Taghzout - Boubydha , Guemar-miha Salah, Hassani - Abdel Karim dokar, Eloued-Al chatte.

Les plantes de *Colligonum comosum* L'Her. Ont été soumises à une méthode d'extraction des composés phénoliques, par macération.

Le screening chimique a mis en évidence la présence: Les Flavonoïdes, Les Anthocyanes, Les Tanins Catechique, Les Composés Réductrices, Les Saponosides, Les Sterols, Les Triterpènes, et l'absence des Tanins Galliques et Les Alcaloïdes. La teneur en composés phénoliques des plantes estimées par la méthode de Folin-Ciocalteu est comprise entre 0.07654 ± 0.01 et 0.05 ± 8.498 mg EAG/g d'extrait. Le dosage des flavonoïdes par la méthode d'alcl₃ a révélé que l'extrait de région F3 Hassani - Abdel Karim dokar possède la plus haute teneur en flavonoïdes (0.011 mg EQ /g d'Ext) .

L'estimation de la quantité de tanins condensés montre que l'extrait le plus élevée est égale (1.08 mg EC/g) ont été détectées pour la région F2 Guemar-miha Salah A l'issue de les résultats de la caractérisation quantitative, la *colligonum comosum* L'Her à travers ces constituants en polyphénols, flavonoïdes et en tannins, constitue une source prometteuse en composés bioactives bénéfiques à la santé humaine.

Les tests utilisés pour l'estimation de l'activité antioxydante sont: CAT et DPPH et test hémolyse ; Il ressort que tous les extraits bruts et les fractions montrent des activités antioxydante et radicalaire intéressantes qui dépendent de leur contenu élevé en polyphénols et flavonoïdes totaux; le test CAT donne des bonnes valeurs est comprise entre $0.203 \pm 0,002$ mg EAA/1g EXS et $0.155 \pm 0,004$ mg EAA/1g EXS. Les valeurs d' IC₅₀ calculées à l'aide de l'équation linéaire de taux d'inhibitions de radical DPPH montrent une activité antioxydante très élevée. L'extrait de région de Taghzout - Boubydha présente un IC₅₀ (de l'ordre de 0.01497 ± 0.002 mg /ml), l'effet protecteur d'hémolyse très proche dans tous les extraits , il ne dépasse pas 50% en concentration 1 mg/ml sauf la solution d'acide ascorbique qui présente un hémolyse le plus bas (16.32%) l'analyse par spectroscopies IR permette de déterminer les fonction chimique on peut trouver dans nos extraits .

En concluant que les plantes médicinales étudiées représentent une source importante de substances et de composés naturels bioactifs Bien qu'il y ait des différences entre les quatre sites d'étude .Ces résultats justifient, en partie, l'utilisation des ces plantes en médecine traditionnelle au Sahara. Il est donc impératif que des études analytiques structurales soient

entreprises et approfondies afin de mettre en évidence les principaux principes actifs qui permettraient de résoudre de nombreux problèmes de santé humaine. Il est également envisageable d'élargir le domaine des tests biologiques pour rechercher par exemple des anti-inflammatoires, des antifongiques, des insecticides des inhibiteurs d'enzyme, des anticoagulants ou autres.

Enfin, notre travail reste préliminaire et l' extrait de la plante constitue un réservoir très intéressant pour des recherches ultérieures qui vont nous ouvrir des horizons de recherche ciblés vers cette plante en raison du manque des études concernant cette plante par rapport à leur richesse par plusieurs composés chimiques importants dans le domaine de la médecine traditionnelle, notamment en termes de mise en évidence des principes actifs et évaluation de leurs activités biologiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- **Abirami A., Gunasekaran N., & Perumal S., 2014-** *In vitro* antioxidant, anti-diabetic, cholinesterase and tyrosine inhibitory potential of fresh juice from *Citrus hystrix* and *C. maxima* fruits. *Food Science and Human Wellness*, (03): 18-22.
- **Ahuja, M. R., & Ramawat, K. G. (2014).** *Biotechnology and biodiversity*. Edition Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London, p 216.
- **Alberts, D. S., Colvin, O. M., Conney, A. H., Ernster, V. L., Garber, J. E & Greenwald P.(1999).** Prevention of cancer in the next millennium, Report of the Chemoprevention Working Group to the American Association for Cancer Research. *Cancer Res*, **59**, 4743 – 4758.
- **Alkurd, A., Hamed, T. R., & Al-Sayyed, H. (2008).**Tannin contents of selected plants used in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, **4**, 265 – 274.
- **Ameenah G. F., 2006.** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow *Molecular Aspects of Medicine*, 27:1-93.
- **Amel Gasmi ; Mohamed Ali Benabderrahima ; Ferdaous Guasmia ; Walid Elfallehc ;Tebra Trikia ; Tarek Zammouria ; Ali Ferchichia . (2019) -** Phenolic profiling, sugar composition and antioxidant capacity of arta (*Calligonum comosum L.*), a wild Tunisian desert plant – journal elsevier *Industrial Crops & Products* 130 (2019) 436–442 .
- **Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., & Trinajstić, N. (2003).** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, **76** (1), 55 – 61.
- **Amlan, K., & Jyotisna, P. S. (2010).** A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71, 1198 – 1222.
- **Amlan, K., & Jyotisna, P. S. (2010).** A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71, 1198 – 1222.
- **Arts, I. C., & Hollman, P. C. (2005).** Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr*, **81**, 317S – 325S.
- **Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., & Khebri, S. (2010).** Activite anti-oxydante et antimicrobienne d’extraits de *Cuminum cyminum L.* *Lebanese science journal*,**11** (1), 69 – 81.

- **Aurousseau, 2002.** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage conséquence sur la reproduction la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod. Anim.*, 15, 67–82

B

- **B. Wojtkowiak, M. Chabanel, (1977)** « spectrochimie moléculaire », Technique & Documentation, Imprimerie Bayeusaine, France,.
- **Babar, M. A., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2007).** Methyl jasmonate and salicylic acide induced oxidative stress and accumulation of phenolics in panax ginseng bioreactor root suspension cultures. *Molecules*, 12, 607 – 621.
- **Bahadran, Z., Mirmira, P., & Fereidoun, A. (2013).** Dietary polyphenols as potential untraceuticals in management of diabetes: a review. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 12 (43), 1 – 9.
- **Bahorun T ; Gressier B ; Trotin F ; Brunet C ; Dine T ; Luyckx M ;Vasseur J ; Cazin M ; Cazin J. C. Et Pinkas M . 1996-**Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Journal of Arzneimittel-Forschung*. 46 : 1086-1089.
- **Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-product : antioxidant activity, occurrence; and potential uses. *Food Chemistry*, 9, 191 – 120.
- **Beddou F. (2015),** Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss. & Dur. Thèse de doctorat en Biologie Cellulaire et Biochimie, Université de Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, 144 p.
- **Benzahi K, (2001)** .Contribution à l'étude des flavonoides dans la Plante cynodon *Dactylon-L* <<chindent>>, mémoires de Magister. Université d'Ouargla, , P15-17.
- **Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des orgnes d'un forestier. *Le cahier des techniques de l'Inra*, 79 – 82.
- **Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des orgnes d'un forestier. *Le cahier des techniques de l'Inra*, 79 – 82.
- **Bonnefont-Rousselot D., Therond P. et. Delattre J., 2003.** Radicaux libres et antioxydants. Ed :Flammarion Médecine-Sciences pp ,59-81.

- **Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2012).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.)* Briq. *Nature & Technologie*, (9), 14 – 19.
- **Brada M., Mohamed B., Michel M., Annabelle C 2007.** Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de L'Algérie. *Biothnol. Argon. Soc. Environ.*, 11(1) ; pp 3-7.
- **Brada, M ; Bezzina, M ; Marlier, M ; Carlier A ; Lognay, G; 2007.** Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 11 (1): 3-7.
- **Brandbyge, J. (1993):** "Polygonaceae". p 531-544. In: Klaus Kubitzki (editor); Jens G. Rohwer, and Volker Bittrich (volume editors). *The Families and Genera of Vascular Plants volume II*. Springer-Verlag: Berlin; Heidelberg, Germany.
- **Bruneton, J. (2009).** *Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales*. 4^{ème} édition. Edition Lavoisier Tec & Doc. Médicales Internationales, Paris, p 261, 308, 571.

C

- **Calvo-Flores, F. G., Dobado, J. A., Isac-Garcia, J., & Martin-Martinez, F. J. (2015).** *Lignin and Lignans as Renewable Raw Materials*. Edition Wiley, Chemistry, Technologie and Application. Edition John Wiley & Sons, Ltd, p 315.
- **Cazes, J. (2001).** *Encyclopedia of Chromatography (Print)*. Edition Marcel Dekker, p 206.
- **Cazes, J. (2005).** *Encyclopedia of chromatograph*. Second Edition. Edition Taylor & Francis, p 1250.
- **Chaabi M., 2008.** Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : *Euphorbia stenocla* Baill. (*Euphorbiaceae*), *Anogeissuslio carpus* Guill. Etperr. (*Combrétaceae*), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (*Plumbaginaceae*). Thèse de doctorat en pharmaco chimie, Université, Louis Pasteur et Université MENTOURI de Constantine (Alger): 179, 180.
- **Chao-Chin H., Jau-Tien L., Fung -Jou L., Fen -Pi C. et Deng -Jye Y., 2008.** Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chemistry*, 109, 439–446.

- **Chaouch N, 2001.** Etude des alcaloïdes dans la coloquinte *Colocynthis vulgaris* (L) Schrad (cucurbitacées) Région de Oued N'sa (Wilaya de Ouargla). Mémoire de magister. Université d'Ouargla, 44.
- **Chebil, L. (2006).** Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia*: études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse de Doctorat ; Institut national polytechnique de LORRAINE.
- **Chehma A. et Hadjaiji F., 2005.** Les plantes spontanées (médicinales) du Sahara septentrional algérien, caractéristiques floristiques, répartition spatio-temporelle et abondance. Séminaire International sur la valorisation des Plantes Médicinales dans les zones arides. Ouargla (Algérie), 1, 2 et 3 février 2005
- **Chew, M. H., Xu, G. G., Ho, P. W., & Lee, C. W. (2009).** A propos d'un cas de syndrome compartimental glutéale après traitement chirurgical d'un anévrisme de l'aorte abdominale. *Annales de chirurgie vasculaire*, **23** (4), 17 – 21.
- **Chira, K., Suh, J. H., Saucier, C., & Teissédre, P. L. (2008).** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, **6**, 75 – 82.
- **Chira, K., Suh, J. H., Saucier, C., & Teissédre, P. L. (2008).** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, **6**, 75 – 82.
- **Cohen, S. Y., Souied, E & Quentel, G. (2014).** Dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) / Myopie et étiologies de la néovascularisation choroïdienne. Edition Lavoisier Médecine sciences publications, p 77.
- **Cohen, S. Y., Souied, E & Quentel, G. (2014).** Dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) / Myopie et étiologies de la néovascularisation choroïdienne. Edition Lavoisier Médecine sciences publications, p 77.
- **Collin, S., & Crouzet, J. (2011).** Polyphénols et procédés. Edition Lavoisier TEC & DOC, p 5, 13, 16, 235..
- **Conde, E., Cara, C., Moure, A., Ruiz, E., Castro, E. & Dominguez, H. (2009).** Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chemistry*, **114** (3), 806 – 812.
contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*. **64** (4): 555- 559.
- **Costa, M. A., Xia, Z. Q., Davin, L. B., & Lewis, N. G. (1999).** Toward Engineering the Metabolic Pathways of Cancer-Preventing Lignans in Cereal Grains and Other Crops. Edition Springer. Recent Advances in Phytochemistry, **33**, 67 – 87.

- **Cowan, M. M. (1999).** Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12** (4), 564 – 582.
- **Craig C. F. and Reveal, J.L. (2005):** "Polygonaceae" pages 216-601. In: Flora of North America Editorial Committee (editors). Flora of North America vol. 5. Oxford University Press: New York, NY, USA.

D

- **D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super Sanità*, **43** (4), 348 – 361.
- **Daglia, M. (2011).** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, **23**,1 – 8.
- **Dai, J. & Mumper, R. J. (2010).** Plant Phenolics : Extraction, Analysis and Their Antioxydant and Anticancer Properties. *Molecules*, **15** (10), 7313 – 7352.
- **Dangles O., Dufour C. (2008).** Flavonoid-protein binding processes and their potential impact on human health. In *Recent Advances in Polyphenol Research*. Blackwell Publishing: Oxford. 01: 67-87.
- **David, J. M. (2008):** Mabberley's Plant-Book third edition (2008). Cambridge University Press: UK.
- **Davide, G. W. (2015).** Encyclopedia of Mind Enhancing, Foods, Drugs and Nutritional Substances. Second edition. *Edition Mcfarland & Company, Inc, Publishers Jefferson, North Carolina*, p 166..
- **Delmas, D., Lançon, A., Colin, D., Jannin, B & Latruffe, N. (2006).** Resveratrol as a chemopreventive agent: A promising molecule for fighting cancer. *Current Drug Targets*, **7** (4), 423 – 442.
- **Descheemaeker, K., & Provoost , C .(1999).** L'impacte de la nutrition sur la santé, dveloppements rcebts-1. Edition. Louvin-Garant, p 95.
- **Djeridane A.,Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. (2006).** Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *J. Food Chem.* **97**: 654–660.
- **Dohou N et al., 2003.** Screening Phytochimique d'une Endémique IBEROMAROCAINE: *Thymelaea lythroides* ; *Bull. Soc. Pharm.Bordeaux*.**142** :61-78

E

- **Ebrahimzadeh, M. A., Pourmmorad, F. Hafezi, S. (2008).** Antioxidant activities of Iranian cornsilk. *Turkish journal of biology*, 32: 43-49.
- **Edardes, J. P. (2008).** Coumarin Anticoagulant Research Progress. Edition Nova Biomedical Books, p 100.
- **Edeas, M. (2007).** Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*, 5, 264 – 270.

F

- **Edeoga H.O., Okwu D. E. et Mbaebie B.O., 2005.** Phytochemical constituent of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of biotechnology*. 4(7) : 685-68.
- **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Bouraoui, N. K., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus L.* organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*, 331, 372 – 379.
- **Favier A., 2003.** Le stress oxydant. *Actualité chimique* , 108-115.
- **Fraga, C. J., & Oteiza, P. I. (2011).** Dietary flavonoides : Role of (-) – epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, 51, 813 – 823.
- **Fukushima Y., Ohie T., Yonekawa Y., Yonemoto K., Aizawa H., Mori Y., Watanabe M., Takeuchi M., Hasegawa M., Taguchi C. Et Kondo K., 2009-** Coffee and green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(4) : 1253-1259.

G

- **Gapińska M., Skłodowska M. et Barbara G., 2008.** Effect of short-and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots *Acta Physiol Plant*, 30, 11–18
- **Gazengel, J. M., & Orecchioni, A. M. (2013).** Le préparateur en pharmacie, Guide théorique et pratique. 2^{ème} édition. Edition *Lavoisier TEC & DOC, Paris*, p 1174.
- **Ghasemzadeh, A., & Ghasemzadeh, N. (2001).** Flavonoids and phenolic acids: role and biochemical activity in plants and human . *Journal of Medicine Plants Research*, 5 (31), 6697–6703.
- **Gilani, G. S., & Anderson, J. J. B. (2002).** Phytoestrogens and health. Edition Aocs Press, p 405.
- **Girodon F., Blache D., Monget A, D., Lombart M., Brunet-Lecompte P., Arnaud J., Richard M, J., Galan P., (1997).** Effect of a two-year supplementation with low

doses of antioxidant vitamins and/or minerals in elderly subjects on levels of nutrients and antioxidant defense parameters. *J Am Coll Nutr* 16: 357-365.

- **Girodon F., Blache D., Monget A, D., Lombart M., Brunet-Lecompte P., Arnaud J., Richard M, J., Galan P., (1997).** Effect of a two-year supplementation with low doses of antioxidant vitamins and/or minerals in elderly subjects on levels of nutrients and antioxidant defense parameters. *J Am Coll Nutr* 16: 357-365.
- **Gongbo, L., Stacey, T., & Jeremy, J, J. (2013).** Polyphenols from the mangosteen (*Garcinia mangostana*) fruit for breast and prostate cancer. *Frontiers in pharmacologie*, 4 (80), 1 – 4.
- **Gonzalez-Gallego, J., Sanchez-Campos, S., & Tunon, M. J. (2007).** Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutricion Hospitalaria*, 22 (3), 287 – 293.
- **Goupy P., Dufour C., Loonis M., Dangles O. (2003).** A quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51(3): 615-622.
- **Greathead, H. (2003).** Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proceedings of The Nutrition Society*, 62, 279 – 290.
- **Guignard, J. L. (1996).** *Abrégé de biochimie végétale*. Edition Masson, Paris, p 160.

H

- **Halliwell B. et Gutteridge J., 1999.** *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, Clarendon. Press: 188-275.
- **Halliwell B., Gutteridge J. M. et Cross C. E., 1994.** Free radicals, antioxidants, and human disease : where are we now. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 119,598-620 .
- **Handique, J. G., & Baruah, J. B. (2002).** Polyphenolic compounds: an overview. *Reactive & Functional Polymers*, 52, 163 – 188.
- **Hartmann, T. (2007).** From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68, 2831 – 2846.
- **Havsteen B-H. (2002).** The biochemistry and medical significance of flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*. 96: 67-202.
- **Hebi, M., & Eddouks, M. (2016).** Evaluation de l'activité antioxydante de *Stevia rebaudiana*. *Phytothérapie*, 14, 17 – 22.

- **Heim K.E., Tagliaferro A.R. Et Bobilya D.J., 2002**-Flavonoid antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutrition and Biochemistry*. 13 : 572–584..
- **Hopkins, W. G. (2003)**. Physiologie végétale. 2 ème édition. Edition de Boeck Université, p 268, 280.

I

- **Imran, M., Ahmad, N., Anjum, F. M., Kamran-Khan, M., Mushtaq, Z., Nadeem, M., & Hussain, S. (2015)**. Potentiel protective properties of flax lignin secoisolariciresinol diglucoside. *Nutrition journal*, 14, 1 – 7.
- **Iriti M. et Faoro-Water F., 2008**. Oxidative Stress, the Paradigm of Ozone Toxicity in Plants and Animals. *Air Soil Pollut.*, 187, 285–301.

G

- **Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M. H., & Journet, M. (1995)**. Nutrition des ruminants domestique: ingestion et digestion. Edition *Inra*, p 57.
- **Jost, J. P., & Jost-Tse, Y. C. (2016)**. L'automédication chez les animaux dans la nature. Editions connaissances & savoirs, p 23.

K

- **Kamal Uddin, A. H. M. Mahbubur Rahman*, A.K.M. Rafiul Islam** -Taxonomy and Traditional Medicine Practices of Polygonaceae (Smartweed) Family at Rajshahi, Bangladesh -
- **Karumi Y., Onyeili P.A., Ogugbuaja V.O., 2004**. Identification of active principal of *M.balsamina* (Balsam Apple) leaf exact. *J Med Sci*. 4(3) :179-182.
- **Kebièche, M., Lakroun, Z., Mraïhi, Z., Soulimani, R. (2011)**. Effet antidiabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de *Ranunculus repens* L. et de la quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique. *Phytothérapie*, **9**, 274 – 282.
- **Kening, Y., Vincenzo, D. L., & Normand, B. (1995)**. Création of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. *The Plant Cell*, **7**, 1787 – 1799.
- **Khan, M. T. H., & Ather, A. (2006)**. Lead molecular for natural products. First edition. Edition Elsevier, p 273.

- **Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., & Kang, S. S. (2004).** Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, **96** (3), 229 – 245.
- **Kraus A., Roth H.P.etKirchgessner M., 1997.**Supplementation with vitamin C, vitamin E or b-carotène influences osmotic fragility and oxidative damage of erythrocytes of zinc-deficient rats.*J. Nutr.*, 127, 1290-1296
- **Ksouri R, Megdiche W, Falleh H, Trabelsi N, Boulaaba M, Smaoui A, Abdely C (2008).** Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C. R. Biol.*, 331: 865-873
- **Kuete, V. (2013).** Medicinal plant research in Africa: Pharmacology and chemistry. 1 ère édition .Edition Elsevier Insights, p 393 , 394.
- **Kuiper-Goodman, T., & Scott, P. (1989).** Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and environmental sciences: BES*, 2(3), 179-248.
- **Kundu, J. K., & Surh, Y. (2008).** Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. *Cancer Letters*, **269** (2), 243 – 261.

L

- **Leray, C. (2010).** Les lipides dans le monde vivant. Edition Lavoisier TEC & DOC, p5.
- **Lugasi, A., Hovari, J., Sagi, K. V., & Biro, L. (2003).** The rol of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, 47, 119 – 125.

M

- **MA B., Hieter P. et Boeke JD. (1997) .** Petits cadres de lecture ouverts: de belles aiguilles dans la palette de foin. *Genome Res* 7 (8): 768-71
- **Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de metabolites secondaire d'importance économique. Edition Presses Polytechniques & Universitaires Romandes, p Vii, 2, 3.
- **Magalhaes L., Segundo M.,Reis S.et Lima Jose L.F.C, 2008.** Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica chimica acta*. 613,1–19.
- **Mariod, A. A., Ramlah, M. I., Maznah, I., & Norsharina, I. (2010).** Antioxydant activities of phenolic rich fraction (PRFs) obtained from black mahlab *Monechma*

- ciliatum* and white mahlab *Prunus mahaleb* seedcakes. *Food Chemistry*, **118**, 120 – 127.
- **Martin, S., & Andriantsitohaina, R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie*, 51, 304 – 315.
 - **Maurice N., 1997-** L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXI^e siècle. Ed. Tec et Doc, Paris. France. Pp 12-14.
 - **Mbojd N., 2003.** Etude de l'activité antidiabétique des extraits acetonique, méthanolique et hesniques de *vernonia colorata* (willd/darke) composées chez des rats wistar, Thèse de docteur en pharmacie, Université de Cheikh Anta Diop de Dakar : pp53.
 - **Meddour A., Yahia M., Benkiki N., Ayachi A., 2013-** Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *Capparis Spinosa* L. *Lebanese Science Journal*. Vol. (14): 49-60.
 - **Merghem, R. (2009).** Eléments de biochimie végétale. Editions *Bahaeddine Algérie*, p 111, 123.
 - **Miliauskas G., Venskutonis P. R., et Van Beek T. A. (2004).** Screening of radical scavenging. 440-447
 - **Moneb, A., Ibrahim, R. K., Roy, R., & Sarhan, F. (2011).** Changes in wheat leaf phenolome in response to cold acclimation. *Phytochemistry*, **72**, 2294 – 2307.
 - **Mulvihill, E. E. & Huff, M. W. (2010).** Antiatherogenic properties of flavonoids : Implications for cardiovascular health. *Canadian Journal of Cardiology*, **26**, 17A - 21A.
- o**
- **O'connell, J. E., & Fox, P. F. (2001).** Significance and application of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review *.international Dairy journal*, **11**,103 – 120.
 - **Ordonez A.A.L., Gomez J.D., Vattuone M.A., Isla M.I., 2006-**Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq). *Food Chem.* 97:452-458.
 - **Ozanda P., 1991.-** Flore et végétation du Sahara. (3^{ème} édition, augmentée). Ed. CNRS, Paris: 662 p.

- **Özgülven M. Et Tansi S., 1998**-Drug yield and essential oil of *Thymus vulgaris L.* as in influenced by ecological and ontogenetical variation. *The Turkish journal of agriculture and forestry.* 22 : 537-542.
- **Ozsoy N., Can A., Yanardag R. et Akev N., 2008.** Antioxidant activity of *Smilax excelsa L.* leaf extracts. *Food Chemistry,* 110, 571–583.

P

- **Park H.J. Et Cha H.C., 2003**-Flavonoids from leaves and exocarps of the grape *Kyoho.* *Korean journal of biological society.* 7 : 327-330.
- **Perron, N. R., & Brumaghim, J. L. (2009).** A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem. Biophys,* 53, 75 – 100.
- **Pietta P.G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Production.* 63: 1035- 1042.
- **Pokorny J, Yanishlieva N et Gordon M. H., 2001.** Antioxidants in food: practical applications. Cambridge : Woodhead Publishing Limited. New York, USA p. 108-109.
- **Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowskib. (2010).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel,*(4), 1– 8.
- **Pourrut B. (2008).** Implication du stress oxydative dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia Faba.* Thèse de Doctorat de l'université Toulouse. Université Toulouse ,p.43.
- **Prieto P., Pineda M & Aguilar M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry,* (269): 337-341.

Q

- **Quezel P. Et Senta S., 1963-** Nouvelle flore de l'algerie et des régions désertique méridionales. Tome 2, CNRS, Paris, France, 1168 p.

R

- **Raven, P. H., Evert, R. F., Eichhorn, S. E., Bouharmont. J., & Evrard, C. M. (2000).** *Biologie végétale .1ère édition.* Edition de Boeck Université, Paris, p 32.

- **Rein, D., Paglieroni, T. G., Wun, T., Pearson, D. A., Schmitz, H. H., Gosselin, R., & Keen, C. L. (2000).** Cocoa inhibits platelets activation and function. *Am. J. Clin. Nutr*, **72** (1), 30 – 35.
 - **Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Sudraud, P., & Ribéreau-Gayon, P. (1968).** Sciences et techniques du vin. Tome 1. Edition. *Dunod, Paris*, p 671.
 - **Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C., & Brinkman, U. A. T. (2006).** Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, **1112**, 31 – 63.
 - **Rodriguez-Bernaldo, A. Q. F. S., Frecha, P. A., Vidal., & Lopez, H. J. (2010).** Antioxydant compounds in edible brown seaweeds. *European Food Research & Technology*, **231** (3), 495 –498
 - **Rolo-Naranjo, A., Rebolledo-Rios, R., Melchor-Rodriguez, K., & Codorniu-Hernández, E.(2009).** Pseudo-phase portrait applied to pattern recognition in flavonoid–protein interactions. *Applied Mathematics and Computation*, **215**, 156–167.
 - **Ryan, M. T., Muller, H., & Pfanner, N. (1999).** Functional staging of ADP/ATP carrier
- §**
- **Samouelian, F., Gaudin, V., & Boccara, M. (2009).** Génétique moléculaire des plantes. Edition *Quae*, p 21, 22.
 - **Sanago R., 2006.** Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako(Mali): 53.
 - **Scalbert, A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, **30**, 3875 – 3883.
 - **Schofield P; Mbugua D.M. Et Pell A.N; 2001-**Analyses of condensed tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.* **91** : 21-40.
 - **Shankar, S., & Srivastava, R. K. (2012).** Nutrition, diet and cancer. Edition springer Dordrecht Heidelberg London New York London, p 213.
 - **Sharma, S., Sheehy, T., Kolahdooz, F., & Barasi, M. (2015).** Nutrition at a Glance. Second Edition Wiley Backwell, p 162.
 - **Shipp, J., & Abdel-Aal, E. S. M. (2010).** Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients. *The Open Food Science Journal*, **44**, 7 – 22.

- **Singleton VL, Rossi JA (1965)** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144-158
- **Situ, H., & Bobek, L. A. (2000).** In vitro assessment of antifungal therapeutic potential of salivary histatin-5, two variants of histatin-5, and salivary mucin (MUC7) domain 1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(6), 1485-1493.
- **Skadhauge B, Gruber MY, Thomsen KK, von Wettstein D. 1997.** Leucocyanidin reductase activity and accumulation of proanthocyanidins in developing legume tissues. *American Journal of Botany* 84: 494–503.
- **Smirnoff N. (2005)** Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology* 9(2), 214-219.
- **Sökmen, B. B., Aydın, S., & Kınalıoğlu, K. (2012).** Antioxidant and antibacterial properties of a lichen species *Diploschistes scruposus* (Schreb.) Norman. *IUFS Journal of Biology*, 71 (1), 43 –51.
- **Sousa, R., Dias, S., & Antunes C. (2006).** Spatial subtidal macrobenthic distribution in relation to abiotic conditions in the Lima estuary, NW of Portugal. *Hydrobiologia*, 559, 135-148.
- **Stuart, J. A., & Robb, E. L. (2013).** Bioactive polyphenols from wine grapes. Edition Springer New York Heidelberg Dordrecht London, p 3.
- **Suschetet, M., Siess, M. H., Le Bon, A. M. & Canivenc-Lavier, M. C. (1996).** Anticarcinogenic properties of some flavonoids. In *Polyphenols 96 – Les Colloques* 87. Edition Inra, p 165, 204.*
- **Swain T., Hillis W.E. (1956).** The phenolics constituents of *Prunus domestica* -1-

T

- **Tapas, A. R., Sakarkar, D. M., & Kakde, R. B. (2008).** Flavonoids as nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1089 – 1099.
- **Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., & Borges, F. (2013).** Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. *BioMed Research International*, 1 – 11.
- the quantitative analysis of phenolics constituents. *J of the Sei. of Food and Agric.*, 10,13.

- **Tiwari, A. K. (2001).** Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. *Current science*, **81** (9), 1179 – 1181.
- **Tiwari, B. K., Brunton, N. P & Brennan, C. S. (2013).** Handbook of plant food phytochemicals. 1ère édition. Edition John Wiley & Sons, p 2000.
- **Torres De Pinedo A., Pen Alver P. Et Morales J.C., 2007-**Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidant: structure-activity relation ship. *Food Chemistry*.103 : 55-61.

U

- **Ulanowska, K., Traczyk, A., Konopa, G & Wegrzyn, G. (2008).** Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol*, **184** (5), 271 –278.
- **UNESCO 1960.** Les plantes médicinales des régions arides. Recherche sur les zones arides. Vol. 13, Paris, 99 p.
- **Usmani S., Arshad H. Et Farooqui A.H.A., 2013-**Determination of infochemicals, phytochemical screening and evaluation of antioxidant potential of *Digera muricata*. *DerPharmacia Lettre*. 5(2) : 3-4.

V

- **Valls, J., Millan, S., Marti, M. P., Borrás, E., & Arola, L. (2009).** Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols . *Journal of Chromatography A*, **1216** (43), 7143 – 7172.
- **Visioli, F., Borsani, L., & Galli, C. (2000).** Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of Phytochemicals. *Cardiovascular Research*, 419 – 425.

W

- **W. K. Taia^{1*} 1, and S. A. I. Moussa (2011)** Phenotypic Variations in *Calligonum comosum* L`Her (Polygonaceae) Grown in Al-Nefud Desert in Saudi Arabia 421-435
- **Waston, R. R., Preedy, V. R., & Zibadi, S. (2013).** Polyphenol in Human Health and Disease. Edition Academic Press is an Imprint of Elsevier, p 643.

Y

- **Yamanaka, N., Samu, O., & Nagao, S. (1996).** Green tea catechins such as (-) epicatechin and (-) epigallocatechin accelerate Cu⁺² induced low density lipoprotein oxidation in propagation phase. *Febs Lett*, **401**, 230 – 234.

- **Yordi , E. G., Pérez, E. M ., Matos, M. J ., & villares, E. U. (2012).** Antioxidant and pro oxidant effects of polyphenolic compounds and structure- avtivity relationship evidece, 23 –48.
- **Yoshino, M., & Murakami, K. (1998).** Interaction of iron with polyphenolic compounds:application to antioxidant characterization. *Anal. Biochem*, **257**, 40 – 44.

Z

- **Zhang H., Xia Y., Wang G. et Shen Z., 2008.** Excess copper induces accumulation of hydrogen peroxide and increases lipid peroxidation and total activity of copper–zinc superoxide dismutase in roots of *Elsholtzia haichowensis*. *Planta*, **227**, 465
- **Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W., 1999-** The determination of flavonoid
- **Zuo Y., Chen H., Deng Y. (2002).** Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*. **57**(2): 307-316.

ح

- **حليس يوسف، 2007 - الموسوعة النباتية لمنطقة سوف ، إنتاج الوليد للطباعة الوادي**