

République Algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université de Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biotechnologie et Agro-Ecologie

Mémoire de fin d'étude

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

Option : Biotechnologie végétale

Thème

**Evaluation de quelques activités biologiques, in vitro de
l'extrait de flavonoïdes de (*Zygophyllum album*)**

Présenté par:

BOURGHADEN SARAH

ABED CHAIMA

Soutenu le :26-09-2021

Devant le Jury

Dr Moumene S.	MCA	UB-1	Présidente
Dr Bendali A.	MAA	UB-1	examineur
Dr Ayadi R.	MCA	UB-1	Promotrice
Dr Ainouz L.	MCA	ESNV	Co promotrice

Promotion : 2020/2021

Remerciement:

*Nous remercions et louons Dieu qui nous a donné la force, la
Patience et la volonté tout au long des années de nos études et
On doit également remercies nous
à honore de sa science pour la réalisation de ce travail de recherche*

*Au début, on souhaite adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes
qui nous a apporté leur aide et qui ont contribué à élaboration de ce mémoire*

*On tien à remercier tout particulièrement notre promotrice
Dr Ayadi .R pour nous avoir suivis et conseillés tout au long de la réalisation de
mémoire.*

*A monsieur Djazouli .Z
A mes dames : Mme Ainouz et Mme Djazouli.
de nous avoir encadrées durant notre pratique pour leurs conseils et pour leur
soutien.*

*on tient à remercies les membres du jury :
Mme la présidente Moumen S, Mr l'examineur Bendali
Mme la co- promotrice Ainouz .L*

*Mr Degaichia H , et Mme Guesmi F , Doctorante Belazougui K
pour leur aide dans laboratoire au long
De réalisation de se travail.*

*Nos remerciements s'adressent aussi à tous ceux qui ont participés de près et de
loin à la réalisation de ce mémoire.*

Dédicace :

Je dédie ce modeste travail :
À la mémoire de ma grand-mère « Aldjia » qui m'a donné de la force pour
poursuivre mon parcours.
A mon grand père qui ma toujours encourager
A mes parents
A mes sœurs : (Ghina –Sabrina), et mes frères (Mouhand et Nacime)
À mon cher petit Rayan
À ma petite cousine Malek
À la famille paternelle et maternelle.
À ma copine de parcours et mon binôme de ce travail Chaima et sa famille
« Abed »
À mes copines Amani et Rachida
À tous mes amis
À tous mes enseignants
À tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire.

Sarah

Dédicace :

Je dédie ce modeste travail à ceux qui possèdent au bon cœur plein d'amour et de douceur. à mes parents pour leur compréhension, leur sacrifice et soutien qu'ils m'ont donné pendant tous les moments de ma vie à mon frère Rabah pour leur soutien

À ma famille maternelle (fekari). Pour leur soutien moral et encouragements qu'ils m'ont toujours apportés durant mes études supérieures.

À mes amis et mes collègues surtout machérie « Amani Bouziane » et à tous ceux qui m'aiment

À ma chère binôme « Sarah » et sa famille « Bourghaden »

À celui que j'aime beaucoup et qui m'a aidé et soutenu tout au long de ce projet. Mr « Boudehri Yazid »

Chaima

Listes des figures

Figure1 : plante médicinale [7]

Figure 2 : plante *Zygophyllum album*[16].

Figure3 : description botanique de la plante *Zygophyllum album* [16].

Figure4 : Structure chimique de quelques alcaloïdes isolés de *peganumharmala*[30].

Figure5 : Quelques exemples sur les lignanes[34].

Figure6 : Structure de base des flavonoïdes [41].

Figure7 : Principales étapes de biosynthèses de différentes classes des flavonoïdes [27].

Figure8 : Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonoïdique[54,55].

Figure9 : Structure de l'acide ascorbique [85].

Figure10 : Structure de la vitamine E [86].

Figure11 : Structure de la β - carotène [87].

Figure12 : Plante *Zygophyllum album* [Original 2021].

Figure13: Préparation de la poudre végétale (broyat) de la plante *Zygophyllum album* [Original 2021]

Figure14 : Les différentes étapes de la macération par méthanol[Original 2021].

Figure15 : Le poids de ballon avant évaporation et après évaporation[Original 2021].

Figure16 : Extraction liquide-liquide en utilisant ampoule à décante[Original 2021].

Figure17 : l'évaporateur rotatif [Original 2021].

Figure18 : La manipulation de l'activité antioxydante[Original 2021].

Figure19 : Courbe d'étalonnage de la quercétine[Original 2021].

Glossaire

Concentration : opération qui consiste à augmenter la proportion d'une substance dans le milieu où elle est contenue en solution ou en suspension.

Hypertension artérielle : est une maladie caractérisée par une pression artérielle trop élevée.

Antispasmodique : est un médicament qui aide à traiter les spasmes musculaires, principalement digestifs et génito- urinaires.

Ulcérogène : provocation de la formation d'ulcères.

Adénovirus : sont une famille de virus qui regroupe une centaine de variétés, dont une quarantaine environ peut infecter l'humain.

Liste des abréviations

OMS : Organisation mondiale de la santé

IDF : Fédération internationale de diabète

UV : ultra violet

ADN : Acide désoxyribonucléique

RMN: Résonance magnétique nucléaire

RF : Radio fréquence

t-PA : Activateur tissulaire du plasminogène

VRS : Virus respiratoire syncytial

LDL : Taux de cholestérol

RL : Radicaux libres

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

DPPH : 2,2 – diphenyl-1 - picrylhydrazine

ZA : *Zygodium album*

R : coefficient de corrélation

Abs : Absorbance

IC50 : la concentration de l'échantillon

EZA : Extrait aqueux de *Zygodium album*

Résumé

Zygophyllum album est une plante tolérante au sel et domine de nombreuses communautés végétales dans lesquelles elle pousse. La poudre de la plante séchée est utilisée pour préparer une macération dans le méthanol ensuite une série d'extraction des solvants non miscibles à l'extrait aqueux. Cet extrait flavonoïdique est utilisé afin de tester la quantité des flavonoïdes dans et à évaluer l'activité antioxydante sur le DPPH. L'absorbance de la solution est mesurée par spectrophotométrie. Les résultats obtenus au cours de notre étude montrent que l'extrait d'acétate d'éthyle contient une teneur élevée en flavonoïdes et l'extrait éther diéthylique suggère une forte activité antioxydante IC₅₀ (Ether di éthylique) est à 0,51 mg /ml.

Mots clés : Extrait flavonoïdique de *Zygophyllum album*, DPPH, antioxydant, IC₅₀

Abstract:

The objective of this work is to evaluate some biological activities of *Zygophyllum album* flavonoid extract *in vitro*. *Zygophyllum album* is a salt tolerant plant and dominates many plant communities in which it grows. The dried plant powder is used to prepare a maceration in the methanol then a series of extraction of solvents not miscible to the extract aqueous. This flavonoid extract is used to test the amount of flavonoids and to evaluate antioxidant activity on DPPH. The absorbance of the solution is measured by spectrometry. The result obtained during our study show that ethyl acetate extract contains high content of flavonoids and diethyl ether extract suggests strong antioxidant activity IC₅₀(diethyl ether) 0.51 mg/ml.

Key words: flavonoids extract of *Zygophyllum album*, DPPH ,antioxidant,IC₅₀.

المخلص

الهدف من هذا العمل هو تقييم بعض الانشطة البيولوجية لمستخلص (*Zygophyllum album*) بعد (ZA) من النباتات المتسامحة مع الملح و يهيمن على العديد من المجتمعات النباتية التي ينمو فيها يستخدم مسحوق النباتات المجفف لتحضير مستخلص (flavonoidique) ثم هذا المستخلص لاختبار اثنين من الآثار البيولوجية للنبات. الاول لاختبار كمية الفلافونويدات الموجودة في المستخلص و الثاني هو تقييم نشاط مضادات الاكسدة على (DPPH) اظهرت النتائج التي تم الحصول عليها خلال دراستنا ان مستخلص اسيتات الاثيل (acétate d'éthyle) يحتوي على كمية عالية من الفلافونويدات flavonoïdes و ان مستخلص اثير ثنائي الاثيل (éther d'éthyle) له نشاط مضاد اكسدة مرتفع IC₅₀=0,51mg/ml

Table de matière

Recherche bibliographique

Chapitre1

Généralité sur la plante.....	3
1-Plantes médicinales.....	3
2- Famille des Zygophyllacées.....	4
3- Intérêts biologique de la famille des zygophyllaceas.	4
4- Espèces Zygophyllum album.....	5
4-1-Classification botanique.....	5
4-2- Description de Zygophyllum album.....	6
4-3-Ecologie et repartions géographique	6
4-4-Propriétés thérapeutiques et pharmaceutiques.....	7

Chapitre2

Métabolites secondaires.....	8
1- Composition biochimique d'espèce <i>Zygophyllum album</i>	8
2-Métabolites secondaires isolés de la famille des Zygophyllacées.....	8
2-1-Alcaloïdes	8
2-2- Lignanes	10
2-3- Les triterpénoides.....	11
2-4-Composés flavonoïdiques.....	11
3-Les flavonoïde.....	12
3-1-Généralité.....	12
3-2-Biosynthèse des flavonoïdes.....	13
3-3-Classification des flavonoïdes	14
3-4-Localisation et distribution	15

3-5-Propriétés physiologiques des flavonoïdes	17
3-6-Caractéristiques physico- chimique des flavonoïdes.....	18
3-6-a- Caractéristiques spectrophotométriques chromatographique.....	18
3-6-b-Solubilité et extraction.....	21
3-7-Propriétés biologique et pharmacologique.....	22

Chapitre3

1- Activité anti- oxydante.....	25
1-1- Définition du stress oxydatif.....	25
1-2- origine du stress oxydatif.....	26
1-3- Antioxydants d'origine alimentaire.....	26
1-3-1- Acide ascorbique. Vitamine C.....	26
1-3-2- Vitamine E.....	27
1-3-2-1-β carotène.....	27
1-4- Apports de la phytothérapie dans le traitement du stress oxydatif.....	28
1-5 – Sources des radicaux libres.....	28

1-5-1 Source exogènes d'exposition au radicaux libres.....28

1-5-2 Sources endogènes de radicaux libres29

Partie expérimental

1-Matériel.....30

1-1 Matériel biologique..... 30

1-2 Matériels non biologiques.....31

2 Méthodes.....32

2-1 préparation de l'extrait des flavonoïdes.....32

2-1-1- Préparation de la poudre.....32

2-1-2- Extraction par macération dans le méthanol.....33

2-1-3 Evaporation35

2-1-4 Détermination de rendement.....35

2-1-5 Extraction de liquide – liquide.....36

2-2 Dosage quantitatif par spectrophotométrie.....37

2-3- Test de l'effet antioxydant de Z. Album par la méthode de piégeage du radical

libre DPPH.....	38
2-3-1- Principe.....	38
2-3-2- Mode opératoire.....	39
a) Préparation de la solution DPPH dans du méthanol	39
b) Préparation de la solution mère de notre échantillon.....	39
c) Préparation des dilutions a partir de la solution mère.....	39
d) Préparation du mélange DPPH+échantillon.....	40
3) Résultats et discussion.....	41
3-1- Rendement de l'extrait des flavonoïdes après macération.....	41
3-2-Rendement des extraits des flavonoïdes après extraction liquide- liquide.....	42
3-3- Résultat du dosage quantitatif par spectrophotométrie.....	42
3-4- Résultat de l'activité antioxydant	44
a) Calcule de la concentration inhibitrice.....	44
b) Calcule del'IC50 d'acétate d'éthyle.....	46

c) Calcule de l'IC 50 d'éther di éthylique.....46

4 -Conclusion 49



Introduction



1 Introduction

Le diabète est l'un des principaux tueurs au monde avec l'hypertension artérielle et le tabagisme, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), cette maladie constitue un problème de santé publique majeur et malgré les efforts de prévention, la pandémie se poursuit en 2014 le diabète affectait 422 millions de personnes au niveau mondiale, alors qu'il ne concernait que 108 millions de patients en 1980 et que les premières prévisions de l'organisation mondiale de la santé (OMS) et de l'international diabète fédération (IDF) s'inquiétait en 1990 du risque de voir le diabète affecte 240 millions de personnes en 2025 [1].

En effet, le stress provoque la libération de certaines hormones, dont le cortisol, qui occasionnent la hausse de la glycémie. Ce phénomène est généralement bien contrôlé, par contre chez les personnes qui ont une prédisposition génétique du diabète et qui subissent un stress chronique, on observe une élévation plus importante et persistante de la glycémie. À long terme, cette réponse au stress contribuerait à accroître la résistance à l'insuline et favoriserait le développement du diabète de type 2 [2].

Depuis le temps les plus anciens, les grandes civilisations (chinoise, égyptienne, babylonienne, grecque, romaine, etc) on recourt aux plantes médicinales pour leur propriétés thérapeutiques, cosmétiques, chimiques, diabétiques, pharmaceutiques, après alimentaires et industrielles.

Actuellement, cette médication, par les plantes, connaît un regain d'intérêt notable et c'est grâce aux études scientifiques basées sur les méthodes analytiques et les expérimentations nouvelles, que le monde médical découvre de plus en plus, le bien fondé des prescriptions empiriques des plantes médicinales [3].

L'objectif de notre travail vise à évaluer, *in vitro*, deux activités biologiques (antidiabétiques et antioxydant) des extraits flavonoidiques de *Zygophyllum album*, et qui sera présenté comme suit :

Il contient deux parties : parties bibliographique et partie expérimental. La partie bibliographique contient quatre chapitres.

- Un premier chapitre qui comprend des généralités sur le diabète et la phytothérapie du diabète

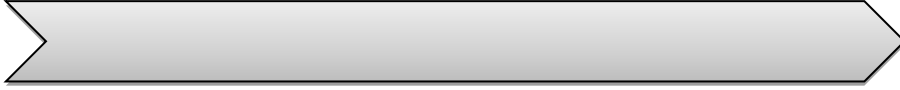
- Un deuxième chapitre qui contient des généralités sur la plante étudiée et les plantes médicinales et leurs propriétés thérapeutiques et pharmaceutiques
- Un troisième chapitre sur les métabolites secondaires de la plante étudiée
- Un quatrième chapitre sur les deux activités antioxydant et antidiabétique

La deuxième partie expérimentale, portant sur l'étude *in vitro* des deux activités biologiques de l'extrait flavonoïdique de *Zygodium album*, et la troisième partie qui comporte les résultats obtenus et des discussions sur ces derniers. Enfin, une conclusion et des perspectives sur notre thématique.



*Synthèse
bibliographique*





Chapitre 1







I. Généralité sur la plante

1 Plante médicinale

Les plantes médicinales représentent une des sources de médicaments pour environ 80% de population **africaine**, « le savoir- faire des guérisseurs traditionnelles, d'une valeur inestimable », est un point de départ pour l'investigation pharmacologique et phytochimique de ces médicament naturels [5]

La médecine moderne occidentale e a rejeté la plupart de ces recours pour développer des médicaments chimiques et une technique de soins sophistiquée, elle continue cependant d'utiliser certains remèdes à base de plante médicinale.

Une tendance récente conduit même à rechercher dans les plantes de nouveau produits de substitution pour certaines maladies :(cancer, paludisme ...ect) plus de 2000 000 plante médicinale sont recensées de nos jours sur l'ensemble de notre planète vivent dans les pays tropicaux d'Afrique et d'ailleurs, L'histoire de la médecine montre l'importance de ces espèces dans les thérapies. Toutes les sociétés traditionnelles ayant puisé, pour leurs soins de santé, dans cette pharmacopée végétale d'une très grande richesse(**Figure1**)[6].



Figure 1: plante médicinales [7].

2 Famille des *Zygophyllaceae*

Cette famille comprend 26 genres et de 285 espèces déparés la classification phylogénétique [4].

Zygophyllacées, renferment 10 étamines, le plus souvent, à stipules unies, un ovaire de 4 à 5 carpelles, et possède un ou plusieurs ovules par loge. Les fruits sont en général, capsulés, loculicides, ou septicides, se dissociant en coque, parfois bacciformes, au drupacés.

3 Intérêts biologique de la famille des *Zygophyllaceae*

Beaucoup d'espèces de cette famille ont des propriétés thérapeutiques remarquables, et sont utilisés en médecine traditionnelle. Dans ce qui suit, nous allons citer quelques exemples d'espèces de très grande importance thérapeutique :

- ***Balanites aegyptiaca*** : c'est une plante riche en saponines, elle a plusieurs activités : anti- inflammatoires, antioxydantes, anti- nociceptives , anti-fongique, anti-septiques ,, anti malaria, anti – styphiniques et anti – virales ,traditionnellement, ses extraits aqueux sont utilisés dans le traitement de la jaunisse et diabète.
- ***Larreadivaricatta*** : c'est une plante populaire en médecine, est utilisée dans le traitement des tumeurs des maladies inflammatoires, du rhumatisme et de la fièvre.
- ***Larreatridentata*** : C'est une plante désertique , elle est largement utilisée dans cette thérapeutiqueses extrait peuvent soigner l'acné et les psoriasis et en même temps sont des effets cicatrisants, anti fongiques et antiviral, elle a aussi des activités analgésiques anti- inflammatoires et antis oxydantes. [8]
- ***Zygophyllum eichwaldii*** : Cette espèce a des propriétés nombreuse, anti septiques, anti eczéma, anti diabétique ; anti bactériennes et anti- fongiques .
- ***Zygophyllum coccineum*** : c'est une plante commune en médecine traditionnelle dans les pays méditerranéens, elle est utilisée contre le rhumatisme, la goutte et l'hypertensionet le diabète [9].
- ***Peganumharmala*** : ses extraits sont utilisés dans le traitement, de diabète, l'hypertension artérielle le rhumatisme et l'asthme et aussi comme anti bactériennes et anti-fongique[10].

- ***Zygophyllum gaetulum*** : très connue avec ses propriétés anti –diabétique, elle est également antispasmodique, anti-eczéma et un bon remède pour l'estomac [11].
- ***Zygophyllum geslini*** : cette espèce est utilisée contre le diabète, elle a également des activités cytoxique[12]

4 Espèces zygophyllum album

Le *Zygophyllum album* L. est une plantes spontané appelé en arabe (Bougriba) selon (halis 2007) et selon(Chehma et Djjebar (2008) spontanée et selon Maizaet al ;(1993) (aggafia) et (bougrbaya)Selon Makkiet al.,(2013).(Figure3).



Figure2: plante zygophyllum album. L [16]

1.1 classifications botaniques de zygophyllum album

Classification systématique : [13,14,15]

- ❖ **Règne** : végétale.
- ❖ **Embranchement** : spermaphytes.
- ❖ **Sous – embranchement** : Angiospermes.
- ❖ **Classe** : Dicotylédones.
- ❖ **Sous classe** : Rosidae
- ❖ **Ordre** : Zygophyllale.
- ❖ **Famille** : Zygophyllaceae
- ❖ **Sous-famille** : Zygophylloideae
- ❖ **Genre** : Zygophyllum
- ❖ **Espèce** : Zygophyllum album L

1.2 Description de *zygophyllum album*

Selon (halis 2007) le *Zygophyllum* est parmi les plantes connues dans la région de Oued souf, elle se compose des plantules denses et très ramifiées avec des feuilles charnues de couleur vert pâle recouvertes par des écailles blanches ressemble à la poussière pendant la maturation les feuilles prennent une couleur jaunâtre à orange sans être tombées. Il se compose de deux feuilles charnues, leur stigmate comporte un filet épais et large sur base ou on peut différencier plusieurs espèces à travers leur fruits, leur fleurs sont branchées et petites à peu près comme la taille des feuilles ces fleurs donnent naissance à des fruits qui contiennent 5 à cinq lobes. [16] -le pédoncule fructifère bien plus court que le fruit, la partie libre des carpelles sensiblement aussi longue que la partie soudée [17].

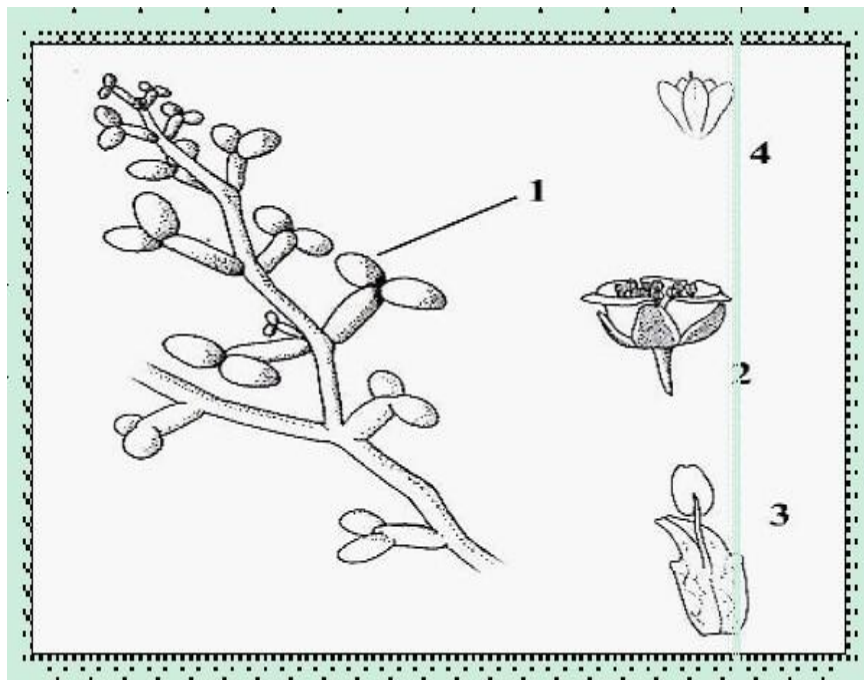


Figure 3: Description botanique de la plante *zygophyllum album* [16]

- 1) Les feuilles. 2) les fleurs. 3) l'étamine est caractérisée par un fil gras et large dans sa partie inférieure. 4) les fruits (les différentes espèces de *zygophyllum* sont caractérisées par les fruits)

1.3 Ecologie et répartition géographique

Le (*zygophyllum album. L.*) représente un groupe de plantes succulentes qui sont résistantes à la sécheresse et tolérantes au sel, vivant sous de sévères conditions

climatiques sèches. Elle peut se développer dans les marécages ainsi dans les sols ou la remonte de sel, donc c'est une espèce qui améliore la masse végétale dans ces régions même vue sa capacité de rétention de l'eau par ses feuilles charnues il est considéré comme une ressource pour animaux (les bétails) surtout dans la période estivale [16].

Elle est distribuée à travers le Sahara d'Afrique du nord à la péninsule arabique et l'Afrique orientale tropicale, il a une large répartition géographique en Égypte et est commun dans les marais salants et au sec dans les bandes côtières de la méditerranée et les mers rouges.

Il est également abondant dans certains oueds désertiques intérieurs dans les zones salines autour des sources d'eau saumâtre, et dans tout le Sahara septentrional [18,19].

1.4 Propriétés thérapeutique et pharmaceutique

Les feuilles, les tiges et les fruits de cette plante sont utilisées dans la médecine populaire comme un médicament actif contre les rhumatismes, la goutte, l'asthme et l'hypertension, il est également utilisé comme diurétique, anesthésique local, antihistaminique, agent anti diabétique, carminative, antiseptique et stimulante. En outre, il possède d'une activité anti -diarrhéique [20,21].

Elle est très utilisée contre le diabète sucre, les inflammations et les douleurs du tube digestif.

Les activités biologiques attribuées à cette plante : Antidiabétiques, anti oxydantes, antifongique, antimicrobiennes, antivirales [13,14]. Dans le domaine de pharmacopée elle est utilisée, en décoration, en poudre ou en pommade pour le traitement des diabètes, des indigestions et des dermatoses [18].



Chapitre 2



II. Métabolites secondaires

1 La composition biochimique d'espèce *Zygophyllum album*

Les principaux constituants décrits à partir d'espèces *Zygophyllum album* sont : Zygophyllin, l'acide quinorique, les glycosides, β – sitosterol- β -D-glycopyranoside, des glucides, des tanins, des alcaloïdes, des stéroïdes, des cardenolides, des lactones, des acides aminés, saponines, stérols insaturés et tri terpéniques.

En outre, six flavonoïdes ainsi que deux acides phénoliques ont été isolés et identifiés comme : 7-di-O- β -glycopyranoside, isorhamnétine-3-O- β -glycopyranoside et isorhamnétine-3-O- α -rhamnopyranosyl.(1/6) – O- β – glycopyranoside (isorhamnétine -3-O-rutinoside), isorhamnétine -3-O- α rhamnopyranosyl-(06-01)-O- β -galactopyranoside.(Isorhamnétin 3-O- robinoside); isorhamnétine-3-O- β -glucopyranoside 7-O- α -rhamnopyranoside, l'acide gentisique et 5-O- α -rhamnopyranoside. [21,22,23]

2 Métabolites secondaires isolés de la famille des Zygophyllacées

2.1 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances d'origines biologique et plus souvent végétales (ils sont rares dans le règne animal).

Eventuellement reproductibles par synthèse azotées, de réactions alcalines plus ou moins prononcées et douées à faible dose de propriétés pharmacodynamiques marquées.

Leurs noms se terminent souvent par « ine ». Les alcaloïdes renferment toujours du carbone, d'hydrogène et de l'azote, et le plus souvent, en plus de l'oxygène. (Exceptionnellement quelques alcaloïdes contiennent du soufre).

Les alcaloïdes donc sont des produits aminés naturels qui ont des effets physiologiques sur l'organisme humain. [24,25,26]. La plus part des alcaloïdes contient plus d'un hétérocycle.

L'atome d'azote de cet hétérocycle est une amine secondaire ou tertiaire. La présence des atomes d'azote dans la chaîne linéaire est très rare. Notons que plusieurs alcaloïdes contiennent deux atomes et plus d'azotes dans des hétérocycles différents à l'image de la nicotine et la réserpine. La caféine à son tour contient quatre atomes d'azotes repartis dans les différents hétérocycles [24].

Le rôle des alcaloïdes dans la plante reste encore moins clair. Probablement ils sont considérés comme une réserve d'azote en cas de son manque dans le sol [27].

La masse moléculaire des alcaloïdes varie entre 100 et 900 g/mol. Les alcaloïdes et leurs sels purs sont en général des produits solides cristallisés par un point d'ébullition propre, certains alcaloïdes sont amorphes trouvant sous formes de cires. D'autres alcaloïdes de faibles points d'ébullition sont à l'état liquide sous forme d'huiles dont la viscosité varie.

Les alcaloïdes dans le cas général sont des produits incolores, sans odeurs spécifiques, particulièrement ceux qui ont de faibles points d'ébullition. Un nombre limité des alcaloïdes possédant des cycles aromatiques vire vers le jaune tel que la berbérine et la colchicine, d'autres virent vers l'orange.

Les alcaloïdes liquides peuvent être volatils caractérisés par une odeur spécifique ou non volatils, signalons enfin que les alcaloïdes ont un goût amer. [27, 28,29].

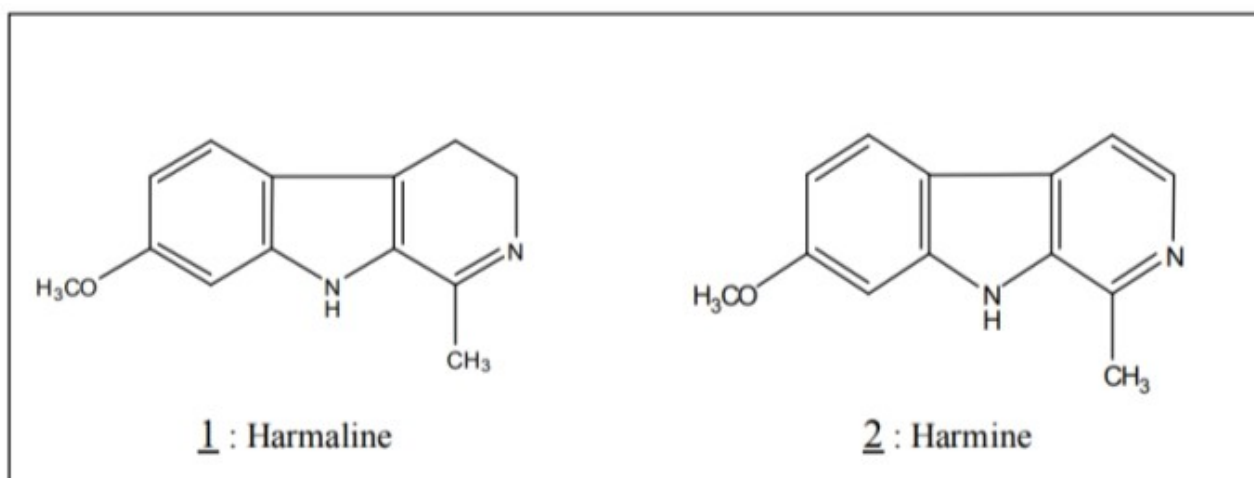


Figure 4 : Structure chimique de quelques alcaloïdes isolés de *Peganum harmala* [30].

2.2 Lignanes

Ces composés sont les dimères des unités de phenylpropane (C₆ C₄)[31]. Ils sont isolés à partir de nombreuses plantes médicinales, les travaux phytochimiques effectués sur la famille zygothylaceae, ont permis l'isolement de ces métabolites essentiellement de l'espèce *Larrea tridentata*. [32,33]. (Tableau 4)

Tableau 1: Quelques structures de lignanes isolés de *Larrea tridentata*[30]

Nom d'espèce	Nom de composés isolés
<i>Larrea tridentata</i>	<ul style="list-style-type: none"> • (7s, 8s, 7's, 8's)- 3, 3' trihydroxy-4-methoxy 7,7'-oxy-lignanes. • Méso – (rel 7s, 8s, 7'R, 7, 8'R)-3, 4, 3'4'-tetrahydroxy-7, 7'-epoxy-lignane. • (E) -4,4'-dihydroxy -7,7'-dioxolign-8(8')-ene 3,4'-dimethoxy-6,7'-cyclolignane • 3'-demethoxyisoguaiacine 4,4'- dihydroxy-3,3'-dimethoxy-6,7'-cyclolignane • 4, 4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-lignane • 3',4-dihydroxy -3,4'-dimethoxy-lignane • 3, 3'-dihydroxy-4,4'-dimethoxy-lignane

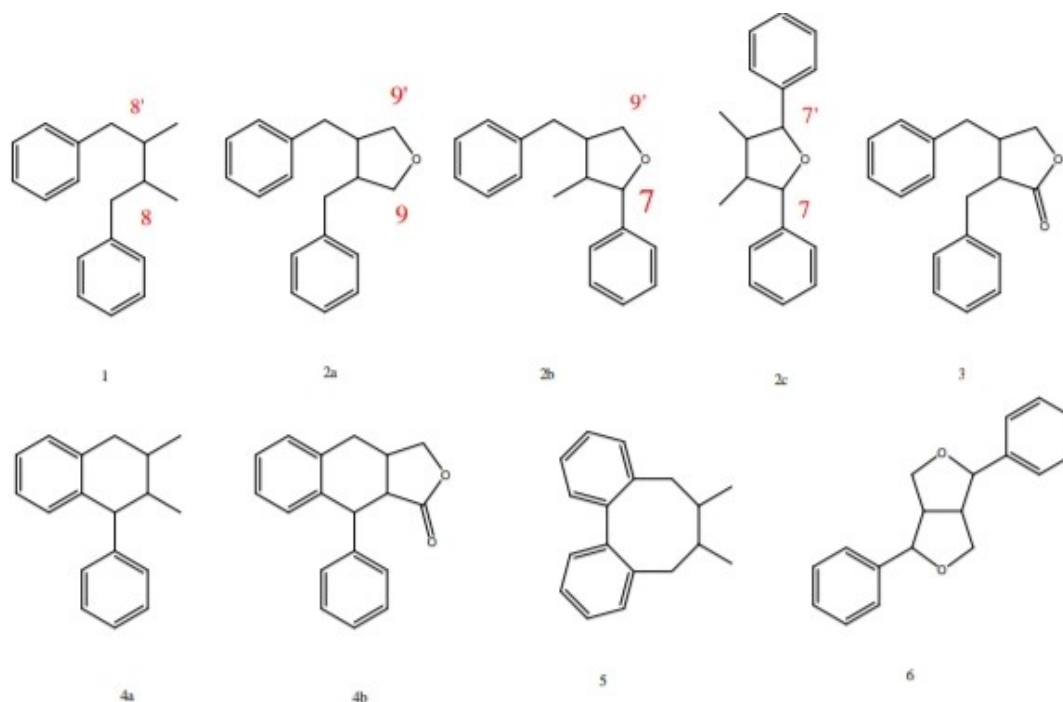


Figure5 :Quelque exemple sur les lignanes [34]

2.3 Triterpénoides :

Les triterpènes(**Tableau5**), sont des composés dérivés de leur précurseur en C30, le squalène , qui a été isolé initialement du foie de requin [30] . Ils sont largement distribués dans deux règnes végétal et animal[35] .Ces métabolites sont isolés de nombreuses plantes appartenant a la famille *zygophyllaceae*. [34,30].

Tableau 2: Classification des terpenoides [39]

Nombre de carbone	Nom
10	Monoterpène
15	Sesquiterpène
20	Diterpène
30	Triterpène
40	Tetraterpène

2.4 Composés flavonoidiques

Terme en latin ; (Flavus =jaune). Ont une structure de C6-C3-C6 a poids moléculaire faible, ils peuvent être considérés parmi les agents responsables des couleurs de plante a cote des chlorophylles et caroténoïdes [47].

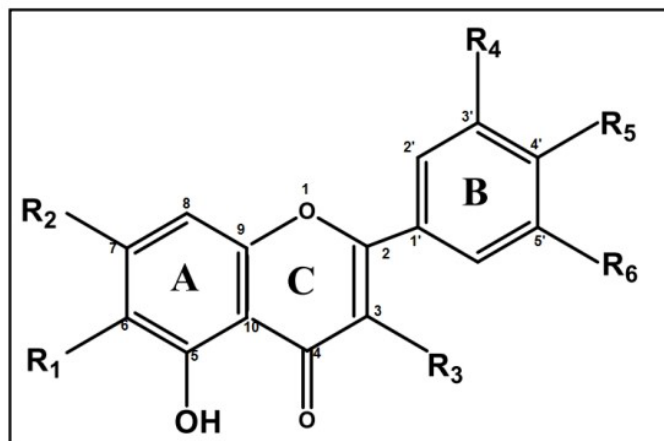


Figure 6 :Structure de base des flavonoïdes[41].

3 Les flavonoïdes

3.1 Généralité

Ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux. Ce groupe comprend comme son nom l'indique des composés jaunes mais aussi d'autres couleurs ou incolores [40].

Les flavonoïdes constituent le principal groupe de polyphénols, avec plus de 9000 composés différents [41] et distribués de manière générale, dans toutes les plantes vasculaires. Leur squelette chimique commun possède 15 atomes de carbones, constitué de deux noyaux benzéniques A et B reliés par un cycle pyranique central C

Les flavonoïdes qui représentent plus la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines

Les différentes classes de composés phénoliques sont représentées dans le (Tableau3)

Tableau3: Classification des polyphénols [42].

Structure	Classe
C ₆	Phénols simples
C ₆ - C ₁	Acides phénoliques et composés dérivés
C ₆ - C ₂	Acétophénonnes et acides phénylacétiques
C ₆ - C ₃	Acides cinnamiques, coumarines, isocoumarines, chromones
C ₁₅	Flavanols, flavanones, flavonols, flavonones, anthocyanines et anthocyanidines
C ₃₀	Biflavonyles
C ₆ - C ₁ - C ₆ , C ₆ - C ₂ - C ₆	Benzophénonnes, xanthones et stilbéne
C ₆ , C ₁₀ , C ₁₄	Quinones
C ₁₈	Bétacyanines
Lignanes, neolignanes	Dimères ou oligomères
lignine	Polymères
tanins	Condensé et hydrolysable

2.2. Biosynthèses des flavonoïdes

La structure du flavonoïde C₆-C₃-C₆ est le produit de deux voies de biosynthèse séparées. Le pont et le cycle B aromatique constituent une unité phénylpropanoïde synthétisée à partir de p-coumaroyl-CoA. Les six carbones du noyau-A proviennent de la condensation de trois unités d'acétate par voie d'acide malonique [43]. La biosynthèse de l'important squelette flavonoidiques est illustrée dans la (figure8).

La condensation de trois molécules de malonyl-CoA avec le 4-coumaroyl-coenzyme A, catalysée par la chalcone- synthase, donne comme produit de reaction une chalcone . La chalconne tend à sisomeriserspontanement en flavanoneracémique dans les conditions physiologiques normales. L'étape suivante c'est la cyclisation de la chalcone par l'enzyme chalcone – isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle C résultant d'une (2S) –flavanone. La production de la flavanol (2R, 3R) - dihydrokaempférol est catalysée par l'enzyme flavanone 3-hydroxylase qui est spécifique à l' hydroxylation en position C3 de la (2S) –flavanone.

L'introduction de la double liaison entre C2 et C3 est garantie par le flavonol-synthase en présence de l'oxoglutarate. [34].

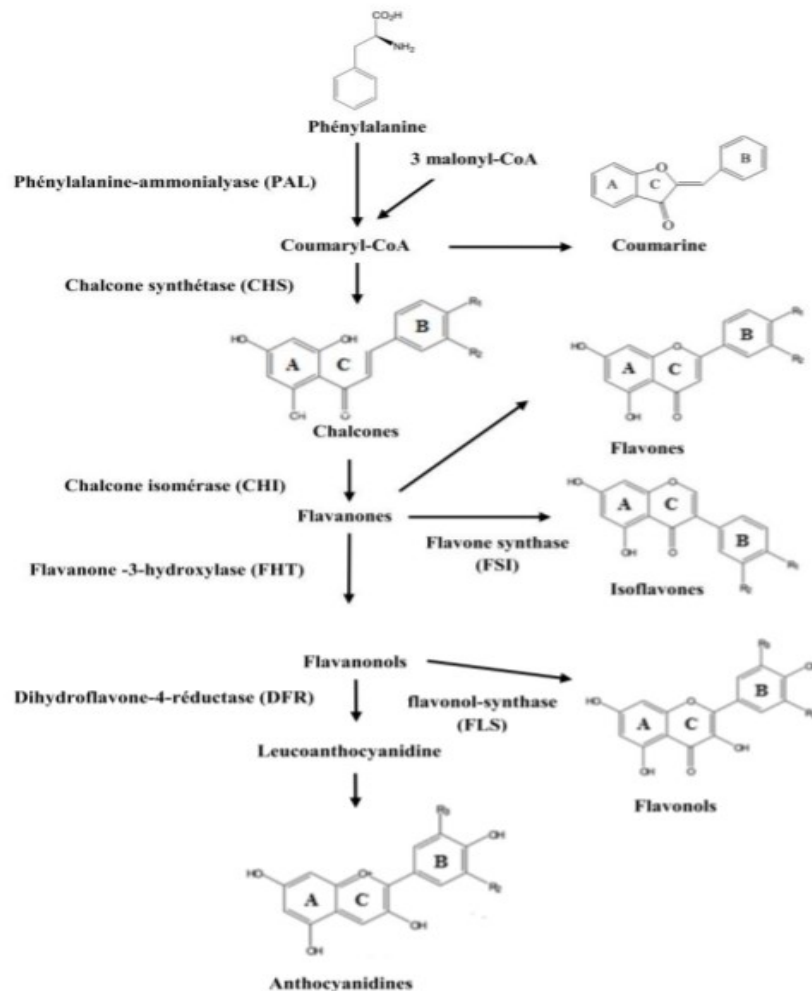


Figure 7: principales étapes de biosynthèse des différentes classes des flavonoïdes [27].

2.3. Classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont des sous- groupes caractérisés contenant deux ou plusieurs cycles aromatique existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, chacun pourtant une ou plusieurs groupes hydroxyles phénoliques et reliées par un pont carboné [27].

Les flavonoïdes sont généralement des antibactériennes [45]. Ils peuvent être exploités de plusieurs manières dans l'industrie cosmétique et alimentaire (jus de citron) et de l'industrie pharmaceutique (les fleurs de trèfle rouge traitent les rhumes et grippe en réduisant les sécrétions nasales), comme certains flavonoïdes ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antivirales. [46].

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et donc possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement 2-phenylchromane [40].

Les principales classes de flavonoïdes sont les flavones, les flavonols, flavan-3-ols, les isoflavones, flavanones et anthocyanidines. D'autres groupes de flavonoïdes, qui sont quantitativement mineurs, sont dihydroflavonols, flavane-3,4-diols, chalcones, dihydrochalcone et auronés [47]. Dans chaque cas, deux anneaux de benzène sont liés ensemble par un groupe de trois carbones. C'est l'arrangement du groupe C3 qui détermine comment les composés sont classés [42].

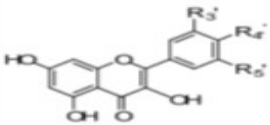
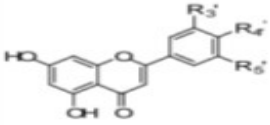
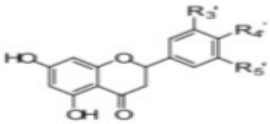
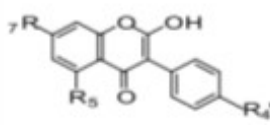
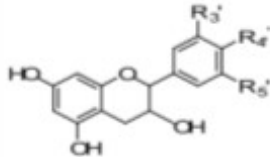
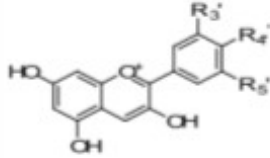
2.4. Localisation et distribution

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieures : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines noies certains flavonoïdes sont plus spécifiques de certains tissus. Le monde animal est lui aussi concerné par les flavonoïdes, on trouve par exemple de la chrysin, de la quercétine, de la galangine dans la propolis des abeilles. Ils peuvent également se trouver dans les glandes à sécrétion odoriférante du castor [48].

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes, hydrosolubles s'accumulent dans les vacuoles et, selon les espèces, se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle (mais ces deux tissus peuvent accumuler spécifiquement des structures différentes, comme chez certaines céréales). Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques.

Lorsque les flavonoïdes sont présents au niveau de la cuticule foliaire, il s'agit presque toujours de gènes libres dont le lipophile est accrue par la méthylation partielle ou totale des groupes hydroxyle, cela concerne surtout des plantes des régions arides ou semi arides [34].

Tableau4: Distribution alimentaires des principales classe des flavonoides [34].

Flavonoides	exemples	aliment	Caractéristiques
<p>Falvonols</p> 	<p>Quercétine</p> <p>Kaempférol</p>	<p>Oignon, poireau, brocolis, pommes, chou frisé, vin rouge, thé.</p>	<p>Le groupe le plus abondant des composés phénoliques</p>
<p>Flavones</p> 	<p>Lutéoline</p> <p>Apigénine</p>	<p>Persil, céleri.</p>	<p>Le groupe le plus abondant des composés phénoliques, les flavones se diffèrent des flavonols seulement par le manque d'un OH libre en C3, ce qui affecte ainsi leur absorption aux UV, mobilité chromatographique et les réactions de coloration</p>
<p>Flavanone</p> 	<p>Naringénine</p> <p>Eriodictyol</p>	<p>Fruits du genre Citrus.</p>	<p>Sont caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3, le flavanone le plus abondant est la naringénine, isolée pour la première fois à partir des écorces de citrus.</p>
<p>Isoflavones</p> 	<p>Genisteine</p> <p>Daidzeine</p>	<p>Graines de soja et produits qui en dérivent.</p>	<p>Caractérisés par leur variabilité structurale dont l'attachement du cycle B se fait en C3. Ils sont présents dans les plantes sous forme libre ou glycosylée.</p>
<p>Flavan 3-ols</p> 	<p>Catéchine</p> <p>Epicatéchine</p> <p>Epigallocatec-hine</p>	<p>Vin rouge, thé noire, thé vert, cacao, chocolat.</p>	<p>Flavan 3ols ainsi que Flavan 3,4diols sont tout les deux impliqués dans Biosynthèse de proanthocyanidines (tanins condensés) par des condensations enzymatiques et chimiques</p>
<p>Anthocyanidines</p> 	<p>Cyanidine</p> <p>Delphénidine</p>	<p>Raisins, vin rouge, certaines variétés de céréales.</p>	<p>Représentent le groupe le plus important des substances colorées, ces pigments hydrosolubles contribuent à la coloration des angiospermes.</p>

2.5. Propriétés physiologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes comptent parmi les plus représentatifs des substances élaborées par les plantes à travers leurs métabolismes secondaires, ces substances possèdent des propriétés colorantes, aromatique, médicinales et cosmétologiques et cohérent à la plante des avantages adaptatifs, de nombreux principes actifs sont bénéfiques à l'homme et à l'animal.

Les flavonoïdes sont à l'origine des propriétés chromatique des différents pigments, qui sont accumulés dans la plupart des organes des végétaux. Les pigments responsables des couleurs vives et variées des fleurs, ont non seulement un effet esthétique, mais sont aussi responsables de l'attraction des pollinisateurs (oiseaux et insectes). Un tel constat a été mis en évidence par (Harbone et al. (1978), confirmant le rôle des anthocyanes dans le processus de pollinisation. D'autres auteurs soulignent l'importance des flavonoïdes dans la fertilité des plantes, ils sont indispensables dans le développement des gamétophytes mâles. Des mutations affectant l'enzyme clé chalcone synthétase qui catalyse la biosynthèse des composés phénoliques entraîne l'absence de pigments dans les anthères et une stérilité mâle.

Les flavonoïdes jouent un rôle important dans la défense des plantes contre les agressions parasitaires ou abiotiques. Les plantes étant immobiles, elles ont dû mettre en place un système de résistance pour combattre les effets de l'environnement comme le gel et la sécheresse. Les flavonoïdes pourraient également permettre aux plantes de suivre sur les sols riches en métaux toxiques comme l'aluminium [49]. Les flavonoïdes de défense peuvent être divisés en deux groupes : ceux préformés, et ceux dont la synthèse va être induite par un phénomène physique, une infection ou un stress. Ils peuvent être présents de manière constitutive, mais leur synthèse va être augmentée par un facteur déclenchant, dans ce cas on parle de phytoalexines[50].

Vanetten et al. (1994) définissent les phytoalexines comme les composés synthétisés en réponse à une attaque. Les flavonoïdes préformés sont des composés synthétisés durant le développement normal de la plante. Ils sont souvent accumulés à des endroits stratégiques de la plante pour sa défense. Ce qui explique que certains de ces composés possèdent un potentiel thérapeutique contre les microorganismes (bactéries, virus, champignons), et les insectes. Les flavonoïdes pourraient entraîner des changements dans la différenciation tissulaires et promouvoir la formation de thylle et d'al, empêchant ainsi l'agression par des agents invasifs.

En raison de leur structure, les flavonoïdes présentent une zone d'absorption dans l'ultraviolet et leur synthèse est fortement stimulée chez certaines espèces par la lumière ultraviolette [51,52].

Ces composés s'accumulent en grande quantité dans leurs tissus périphériques, ils font écran aux UV qui endommagent l'ADN [53] et protègent ainsi les tissus internes des tiges et des feuilles.

2.6. Caractéristique physico-chimique des flavonoïdes

L'étude physico-chimique des flavonoïdes a émergé comme celle de la plupart des produits naturels, leur importance relative dépend d'une meilleure connaissance des différentes modifications structurales de ces composés, sous l'effet de l'acidité du milieu, de température, de la lumière, de leur solubilité, de leur complexation métallique, et complexation avec les protéines. Généralement cette connaissance est déterminée par les méthodes spectrales, RMN...ect. Mais avant d'élaborer cette étude l'extraction et la séparation phytochimiques sont indispensables.

2.6.1. Caractéristiques spectrophotométriques, chromatographique

Les végétaux flavonoïdes pigments chromophores capables d'absorber sélectivement une partie de la lumière. Les fonctions chimiques responsables de cette absorption sont constituées de liaisons riches en électrons délocalisés ou de la conjugaison de celles-ci.

L'étude de ces propriétés chromatiques se fait par le biais de la spectrophotométrie UV-visible. Cette méthode physique simple et rapide très utilisée dans la détermination du squelette flavonoïdique, ainsi que la position des substituants. L'identification des flavonoïdes grâce aux spectres UV dans le méthanol et en présence de réactifs s'appuie sur les données de la littérature décrites par (Mabry *et al.* (1970), Markham (1982) et Voirin (1983).

En effet, le spectre d'absorption d'une structure flavonoïdique présente deux bandes d'absorptions essentielles (**figure 12**) :

La bande 1 située entre 300 et 400nm caractérise la forme cinnamoylée de la molécule.

La bande 2 située à 240- 285 nm est attribuée à sa forme benzoylée.

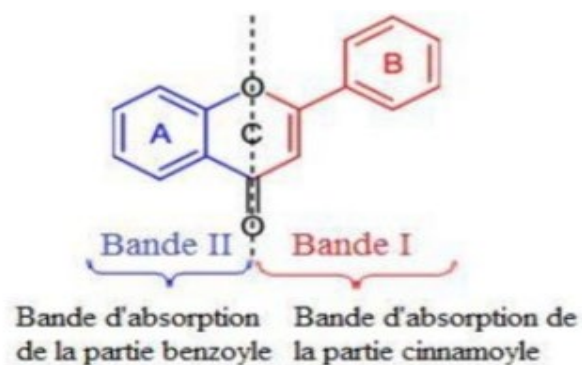


Figure 8 : les bandes caractéristiques d'un squelette flavonoidique [54,55].

L'augmentation du nombre d'hydroxyle sur le noyau B se traduit par effet bathochrome de la bande 1 ; il en est de même pour la bande 1 en relation avec le noyau A. De plus, la bande 2 apparait sous forme d'un pic unique ou un pic accompagne d'un épaulement, selon que le noyau B est hydroxyle en position 3' ou di hydroxyle en position 3' et 4'.

L'emploi de réactifs tels que la soude, l'acétate de sodium, l'acide borique, le chlorure d'aluminium et l'acide chlorhydrique ; permet de localiser les regroupements hydroxyles libres ou substitués sur une molécule flavonoidique (**Tableau 8**).

Tableau 5: Maximum d'absorption UV des flavonoïdes Action des réactifs sur l'allure du spectre UV-visible [44].

Spectre UV	Bande I	Bande II	Types de flavonoïdes
MeOH neutre	320-350	250-270	Flavones
	352-385	250-280	Flavonols
	300-330	245-275	Flavanones
	300-330	245-275	Isoflavones
	348-390	230-270	Chalcones
380-430	230-270	Aurones	
Spectres UV en présence de réactifs	Bande II	Bande I	Substitutions
NaOH/MeOH		+40 à 60 nm +50 à 60 nm	OH en 4' OH en 3 et 4OR
		Bande III entre les bandes I et II	OH en 7
NaOAc/MeOH	+ 5 à 20 nm		OH en 7
NaOAc + H ₃ BO ₃ /MeOH		+12 à 36 nm +5 à 10 nm	Ortho di-OH 3',4' 6,7 ou 7,8 di OH
AlCl ₃ /MeOH		+60 nm +35 à 55 nm	OH en 3 OH en 5
AlCl ₃ +HCl/MeOH		-30 à -40 -20 à -25	Ortho di OH sur le noyau B Ortho di OH sur le noyau A (en plus ortho di OH sur le noyau B)
		+35 à 55 +17 à 20 +50 à 60	5-OH 5-OH 3-OH ou 3-OH et 5-OH

L'emploi de réactifs tels que la soude, l'acétate de sodium, l'acide borique, le chlorure d'aluminium et l'acide chlorhydrique ; permet de localiser les groupements hydroxyles libres ou substitués sur une molécule flavonoïdique.

Des indications significatives sur la structure chimique des flavonoïdes peuvent être fournies par les valeurs des R_f dans un système de solvant donné. La couleur de la fluorescence sous lumière ultra – violet peut également orienter quant à la structure de la famille flavonique.

Tableau 6:

Tableau 6 :Fluorescence des structures flavonoidiques sous lumière UV [55].

Couleur des spots	Structures flavoniques
Noir- violette	Flavones -5, 6,7 Flavonol substitué en 3
Bleu	Flavone ou flavonol sans OH en 5 Flavanone avec OH en 3 ou flavanol Flavonol avec 3-OH substitué ou sans 5- OH
Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH
Orange	Isoflavones
Jaune verte	Aurones
Verte	Chalcones
Bleu verte	Flavanone sans 5-OH

2.6.2. Solubilité et extraction

L'extraction des flavonoïdes est basé sur le degré de solubilité dans les solvants organique, les aglycones moins polaires comme les isoflavones, les flavanones et les flavones hautement méthoxylés, sont plus solubles dans les solvants tels que l'éther et le chloroforme [56] et les autres qui possèdent un nombre in substitue de groupements hydroxyles ou de sucres sont des composes polaires, généralement solubles dans les solvants polaires [57].

Les hétérosides peuvent être extraits le plus souvent à chaud par de l'acétone ou par des alcools (éthanol, méthanol) additionnes d'eau. Il est possible de procéder à une évaporation sous vide et, et lorsque le milieu ne contient plus que de l'eau, on mettre en œuvre une série d'extraction liquide-liquide par des solvants non miscibles :

- par l'éther de pétrole qui élimine la chlorophylle et les lipides.
- par de l'éther di éthylique qui extrait les génines libres.

- par de l'acétate d'éthyle qui entraîne la majorité des hétérosides les plus polaires. Alors que les flavonoïdes lipophiles des tissus superficiels des feuilles sont directement extraits
- par les solvants moyennement polaires (dichlorométhane) ; il faut ensuite les séparer des cires et des graisses qui sont extraites simultanément [34].

2.7. Propriétés biologique et pharmacologique

Les flavonoïdes sont couramment consommés quotidiennement sous de fruit, légumes et boissons telles que le vin et le thé. ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires [58], suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités, biochimiques ou pharmacologiques notamment des propriétés, anti- cancérogènes, hépatoprotecteur[34] anti- inflammatoires, [59, 60,61] anti – allergiques vasculoprotectrices[42], anti- virales et anti- bactériennes [62].

La catéchine montre une activité anti- tumorale [63]. Cette activité est attribuée à la capacité de ce flavonoïde d'inactiver le t-PA (tissue – type plasminogén activateur) en greffant à celui – ci laminine, une molécule de la matrice extracellulaire qui joue un rôle important durant la mort cellulaire. la quercétine aussi est capable d'inhiber la croissance cellulaire, donc cytotoxique, en empêchant certaines phases du cycle cellulaire et en bloquant les sites récepteurs des hormones [64] . D'autres mécanismes également peuvent inhiber la croissance cellulaire, à savoir : la stabilisation du collagène et la réduction des radicaux libres [65].

Les flavonoïdes sont également connus pour leurs effets anti- allergiques, ils agissent par inhibition des enzymes qui favorisent la libération d'histamine à partir des mastocytes et des basophiles : AMPc phosphodiesterase et la Ca^{++} ATPase [66,67].

Par exemple, l'ATPase Ca^{2+} dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption de calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme , la quercétine a montré un pontentiieldactionsuperieur a celui du cromoglycane de sodium utilisé comme

médicament en empêchant la libération de l'histamine substance endogène qui cause l'asthme [65].

Sous l'action de cyclooxygénase et la lipooxygénase, l'acide arachidonique se métabolise respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Landolfi et ses collaborateurs montrent que certains flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes [68]. C'est ainsi que la myricétine et la quercétine bloquent l'action des cyclooxygénase et lipooxygénase à des concentrations relativement élevées. À faible concentration, c'est la lipooxygénase qui est inhibée préférentiellement. Certains travaux suggèrent qu'ils possèdent une bonne activité anti-inflammatoire sans les effets indésirables de types ulcérogènes [69, 70, 71, 72].

De nombreuses preuves suggèrent que l'inflammation joue un rôle dans l'apparition de la maladie de Parkinson, qui se caractérise par une dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la substance noire. Des chercheurs ont évalué l'effet de la lutéoline, possédant diverses activités et notamment des effets anti-inflammatoires, sur la diminution du captage de la dopamine par les neurones et la perte de neurones. La lutéoline inhibe cette diminution de manière dose-dépendante [72].

Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase [73]. Ong et Khoo ont rapporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant [74].

L'effet des flavonoïdes sur le système immunitaire est complexe et demeure encore mal élucidé. Certains d'entre eux réduisent l'activation du complément, diminuant de façon générale la réponse inflammatoire [75].

Les flavonoïdes atténuent le pouvoir infectieux ou affectent la réplication intercellulaire d'autres virus tels que le virus respiratoire syncytial (VRS), la herpès simplex virus (HSV) et les adénovirus [76].

Les maladies coronariennes sont généralement associées à des taux sanguins élevés de cholestérol, LDL... Un des agents pharmacologiques efficaces pour traiter ces désordres est la niacine. Des chercheurs ont montré que la quercétine et la lutéoline pouvaient diminuer ces bouffées de chaleur en inhibant la production de prostaglandine induite par la niacine [77].

Malgré l'effet inhibiteur des flavonoïdes sur les enzymes, ces composés rarement stimulent une activité enzymatique : c'est le cas de la proline – hydroxylées. Cette stimulation favorise l'établissement de pontages entre les fibres de collagène, renforçant ainsi leur solidité et leur stabilité, s'opposant à leur dénaturation [37].

Tableau7: les plantes médicinales riche en flavonoïdes. [77].

Plant	Family	Flavonoid
<i>Aloe vera</i>	Asphodelaceae	Luteolin
<i>Acalypha indica</i>	Euphorbiaceae	Kaempferol glycosides
<i>Azadirachta indica</i>	Meliaceae	Quercetin
<i>Andrographis paniculata</i>	Acanthaceae	5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavone
<i>Bacopa moneirra</i>	Scrophulariaceae	Luteolin
<i>Betula pendula</i>	Betulaceae	Quercetrin
<i>Butea monospermea</i>	Fabaceae	Genistein
<i>Bauhinia monandra</i>	Fabaceae	Quercetin-3-O-rutinoside
<i>Brysonima crassa</i>	Malphigaceae	(+)-catechin
<i>Calendula officinalis</i>	Compositae	isorhamnetin
<i>Cannabis sativa</i>	Compositae	Quercetin
<i>Citrus medica</i>	Rutaceae	hesperidin
<i>Clerodendrum phlomidis</i>	Verbenaceae	Pectolinarigenin,
<i>Clitoria ternatea</i>	Fabaceae	kaempferol-3-neohesperidoside
<i>Glyccheriza glabra</i>	Leguminosae	Liquiritin,
<i>Mimosa pudica</i>	Mimosoideae	Isoquercetin
<i>Limnophila indica</i>	Scrophulariaceae	3,4-methlenedioxyflavone
<i>Mentha longifolia</i>	Lamiaceae	Luteolin-7-O-glycoside
<i>Momordica charantia</i>	Curcubitaceae	Luteolin
<i>Oroxylum indicum</i>	Bignoniaceaea	Chrysin
<i>Passiflora incarnate</i>	Passifloraceae	Vitexin
<i>Pongamia pinnata</i>	Fabaceae	Pongaflavonol
<i>Tephrosia purpurea</i>	Fabaceae	Purpurin
<i>Tilia cordata</i>	Tiliaceae	hyperoside



Chapitre 3



1. Activité anti- oxydante

L'activité antioxydante des flavonoïdes est essentiellement liée à leur capacité à piéger les espèces réactives de l'oxygène comme les radicaux superoxyde, hydroxyle, peroxyde, et alkoxyde. La plupart des résultats proviennent d'études expérimentales de radiolyse pulsée, [78,79]

Cette technique permet de générer et de suivre le devenir des formes radicalaires de composés antioxydants comme les flavonoïdes. Elle est souvent combinée à diverses techniques analytiques comme la spectroscopie d'absorption UV/visible afin de déterminer les constantes de vitesse associées aux processus conduisant à l'apparition et à la capture des espèces radicalaires [80,81].

1.1. Définition de stress oxydatif

La recherche de ces deux dernières décennies a montré que de nombreuses pathologies humaines sont causées ou favorisées par le stress oxydant [82].

Lorsque l'un des systèmes protectifs de l'organisme contre la toxicité des radicaux libres (RL) montre un échec, l'action des radicaux libres devient incontrôlable, ce qui conduit à des dommages au niveau des molécules, des cellules, des organes et potentiellement à la mort de l'organisme [82].

La conséquence des effets nocifs des RL et des métabolites réactifs est dite stress oxydatif. Ce terme est défini initialement comme étant « un déséquilibre profond de la balance entre les pro oxydants et les antioxydants en faveur des premiers ». Cette définition ne signale aucun effet délétère d'un tel changement sur la fonction des tissus et n'indique pas l'origine de ce déséquilibre s'il est dû à une augmentation de la production des oxydants ou à une diminution de la capacité réductrice des tissus [83]. D'autres chercheurs ont dit que le stress oxydant désigne un état caractérisé par une augmentation de la génération ROS (Reactive Oxygen Species) en ajoutant que ce terme est synonyme du dommage [84].

Selon les points de vue actuels, le stress oxydant peut être défini comme étant un déséquilibre entre la production et l'élimination des métabolites réactifs de l'oxygène et

du nitrogène en faveur de leur production conduisant a des dommages potentiels et a des dégâts cellulaires irréversibles [84].

1.2. Origine du stress oxydatif

Les RL sont produits par divers mécanismes physiologique car ils sont utiles pour l'organisme à doses raisonnables. Cette production physiologique est parfaitement maitrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants / pro oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une sur production énorme de RL, un état de « stress oxydant » est signalé [85].

1.3. Antioxydants d'origine alimentaire

1.3.1. Acide ascorbique : vitamine c

La vitamine C est antioxydant puissant (**figure10**). Elle participe dans les réactions avec la vitamine E et l'enzyme glutathion peroxydase pour neutraliser les radicaux libres. La vitamine C agit principalement en piégeant directement les ROS (majoritairement IO_2^- et le $ONOO^-$) Elle est présente dans les légumes, les agrumes et elle assure un rôle important dans la régénération de la vitamine E [85]

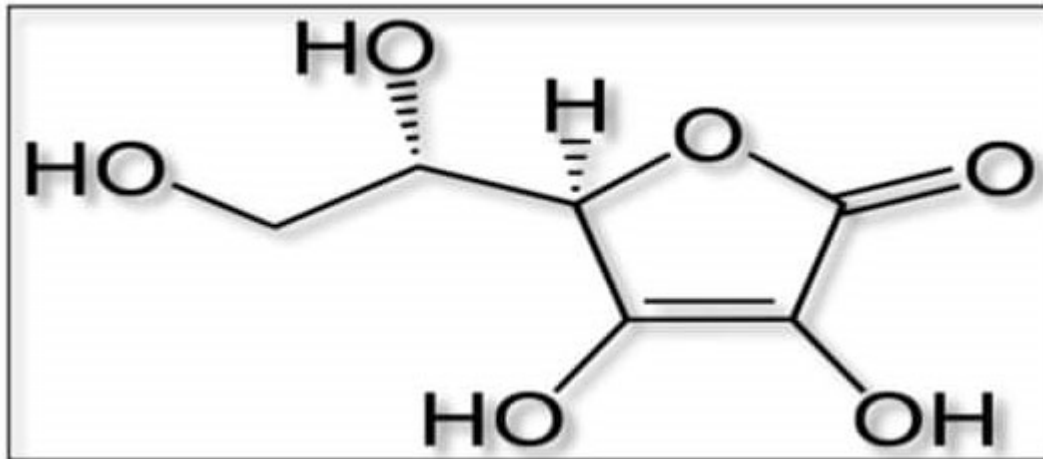


Figure 9 : Structure de l'acide ascorbique [85].

1.3.2. Vitamine E

La vitamine E (**figure11**) prévient la peroxydation des lipides membranaire *in vivo*, en captant les radicaux peroxydes. Elle est présente dans les huiles végétales ainsi

que dans les légumes à feuilles vertes. Elle joue un rôle préventif dans le développement des cancers et retards le vieillissement [86].

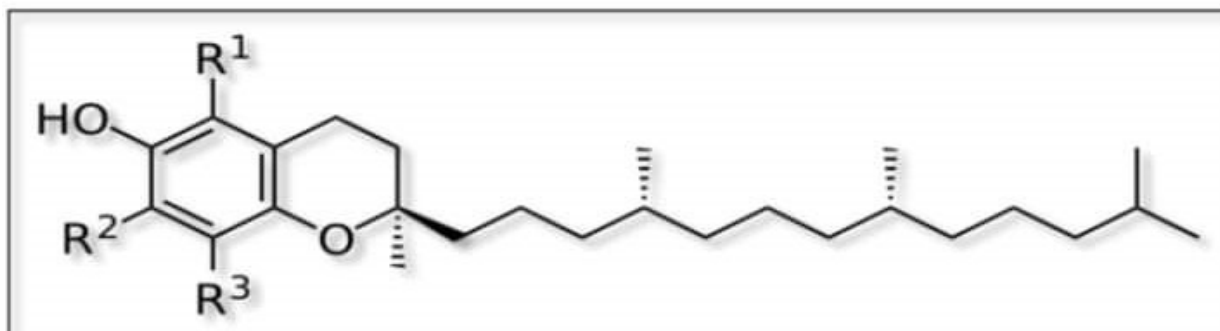


Figure 10 : Structure de la vitamine E [86].

1.3.3 β Carotène

La β – carotène (**figure12**) qui, outre l'activité pro- vitaminique A, possède la capacité de capter l'oxygène singlet. La recommandation officielle parle d'un apport quotidien de 60 mg de vitamine C et 10 mg de vitamine E, mais il n'en existe pas pour le β - carotène. Toutefois ces quantités suffisent juste pour prévenir les phénomènes de cancer. C'est la raison pour laquelle les spécialistes recommandent en général un apport quotidien- nettement plus élevé :

150 à 300 mg de vitamine C 50 à 150 mg de vitamine E et 2 à 6 mg de β – carotène. Il est présent dans les légumes verts, salades, carottes, abricot, melon, épinards et papaye [87].

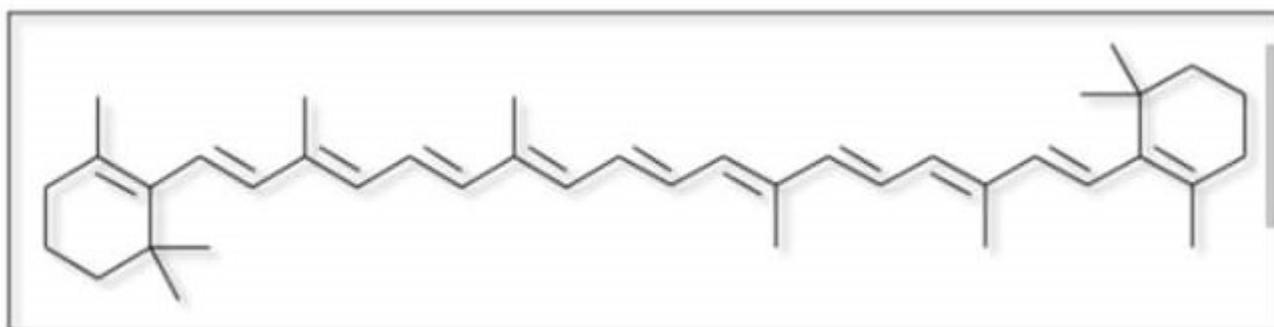


Figure11 : Structure de la β - carotène [87].

1.4. Apports de la photothérapie dans le traitement du stress oxydatifs :

Il existe une grande quantité de substances vitaminiques (A ,B,C,E) , minérales (Zinc, Cuivre, Sélénium) et biochimique (glutathion , 9 , acide phénols) qui ont

également un pouvoir antioxydant bien connu .Ces substances se retrouvent dans les plantes ; le fait de les connaître, nous permet d'affirmer que phytothérapie est bien sa place dans la lutte contre le vieillissement provoqué par le stress oxydatif.En association, les substances antioxydantes présentent des effets synergiques efficaces pour lutter contre le stress oxydant et ses effets délétères.

Afin de contres l'action oxydante des radicaux libres, notre organisme possède une armée d'antioxydants de nature protéique, enzymatiques et d'agents oxydables.Ceux - ci agissent, non pas comme de petits soldats, mais comme des éboueurs qui nettoientnotre corps des radicaux indésirables [88].

1.5. Sources des radicaux libres

1.5.1. Sources exogène d'exposition aux radicaux libres

Parmi ces sources nous citons le rayonnement électromagnétique (radioactive , radiations ionisantes , lumière ultraviolette : UVA et UVB) , les métaux toxiques , les fumées de combustion (de cigarette , de bois , de matériaux de construction oxyde de Carbone).Auxquels s'ajoutent certains produits chimiques comme les antiseptiques, les médicaments (par exemplephena cétine et paracétamol),les pesticides, les solvants, l'alcool [89].

1.5.2. Sources endogène de radicaux libres

Les radicaux libres peuvent se former dans notre corps, dans le cadre de certains phénomènes biologique .Les cellules immunitaires (globules blancs, macrophages) ont besoins de radicaux libres pourdétruire certains organismes tels que les microbes et virus. Ils sont donc bien bactérie virucides et luttent aussi contre les parasites .Malheureusement, ces moyens de défense se retournent parfois contre notre corps, en attaquantdirectement les tissus et provoquent des inflammations chroniques .

Chacune de nos cellules utilise quotidiennement mille milliards de molécules d'oxygènes pour se procurer de l'énergie mais une petite partie (5%) échappe à la combustion pour formes des radicaux libres.Donc, les phénomènes oxydatifs, utiles et nécessairespour l'homéostasie et la survie de notre organisme, provoquent invariablement des radicaux libres qui occasionnent la sclérose et le vieillissement de cet organisme. Il semblerait donc que la plus grande source de production de radicaux libres et donc de vieillissement soit la source endogène, donc le processus vital lui-même [89].





Partie expérimentale





Matériel et méthode



La première partie d'extraction des métabolites secondaires a été réalisée au niveau de laboratoire biotechnologie végétale de la faculté des Sciences de la nature et de vie de l'Université Saad Dahleb de Blida 1, elles ont été réalisées, pour l'étude des activités biologiques (anti- oxydante- anti diabétique) c'est au niveau de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire (ENSV) , pendant une durée de 5 mois (mai 2021- septembre 2021) .

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer, *in vitro*, l'effet anti- oxydant de l'extrait des flavonoïdes de la plante *Zygophyllum album*.

Pour atteindre ce but nous avons effectué un premier test qui consiste à mesurer le pouvoir réducteur de l'extrait flavonoïdique de *Zygophyllum album* sur le DPPH .Le second test consiste à évaluer l'effet de ce même extrait sur l'absorption du glucose par la levure *Saccaromyces cerevisiae* .L'ensemble des tests sont réalisés *in vitro* en respectant la réglementation Européenne des techniques alternatives à l'expérimentation animale.

1. Matériel

1.1 Matériel biologique : *Zygophyllum album*

L'expérimentation a été réalisée sur le broyat (poudre) de la plante entière (partie aérienne + racines) de *Zygophyllum album* (Figure 14)

La récolte de la plante a été faite dans le sud algérien précisément dans la région wilaya de Tamanrasset le mois de Mars 2021

L'identification de l'espèce a été réalisée par **Mr METTAI** Enseignant au niveau de la faculté des Sciences de la Nature et de Vie de Blida 1.

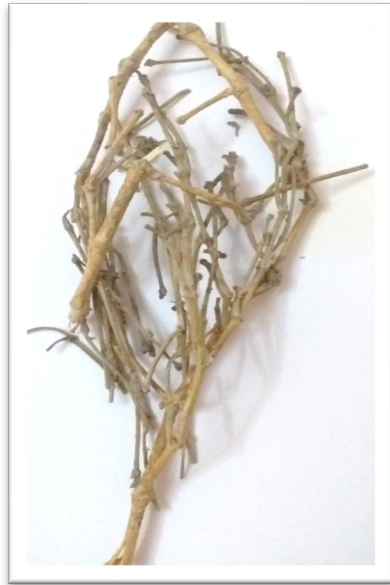


Figure12 : plante *Zygophyllum album* (Originale 2021).

1 Matériels non biologiques

Le Matériel utilisé au cours de l'expérimentation est résumé dans les tableaux 10, 11 et 12

Tableau8: Appareillage utilisé au cours de l'expérimentation

Appareillage
-Balance
-Agitateur magnétique
-Retavap (Evaporateur rotatif)
-Spectrophotomètres UV-visible (wpa)
-Pompe à vide
-Broyeur

Tableau 9 : Verrerie utilise au cour de l'expérimentation

Verrerie
<ul style="list-style-type: none">• -Becher-Pince-Portoir• Cuve pour spectrophotomètre, Tube a essai• Spatule, erlenmeyer, Entonnoirs• Fiole, Eprouvette, Ampoule a décanté

Tableau 10: Réactifs chimiques utilise au cour de l'expérimentation :

Réactifs chimiques
<ul style="list-style-type: none">• Méthanol• DPPH-H (2,2 - diphenyle - 1 pierylhyrazine)• Butanol• Acétate d'éthyle• Ether de pétrole• Ether di éthylique• Quercetine déshydrate

2 Méthodes

2.1 Préparation de l'extrait (Extraction des flavonoïdes)

2.1.1 Préparation de la poudre

La préparation de l poudre de *Z. album* se fait en trois étapes :

Le séchage, le broyage et le tamisage. Le séchage est réalisé dans un endroit aéré à l'abri du soleil, pendant quatre semaines. Le broyage, qui vise à obtenir une poudre fine, elle est réalisée à l'aide d'un broyeur électrique.

Enfin la poudre obtenue est conservée dans des flacons bien couverts pour éviter l'effet dégradant de la lumière, dans un endroit sec jusqu'au moment d'utilisation.



Figure 13: préparation de la poudre végétale (broyat) de la plante *Zygophyllum album*.

3.1.2. Extraction par macération dans le méthanol

La macération (extraction solide – liquide) est une opération qui consiste à laisser séjourner la matière végétale (broyat) dans du méthanol pour extraire les principes actifs (composés phénoliques et flavonoïdes). L'opération se fait selon le Protocole établi **Feknous et all(2013)** comme suit :

- On pèse 120 g de poudre végétale et la mélanger avec un volume de 400 ml de méthanol MeOH (99.8 %), pendant 72h (3 jours).
- Puis on filtre le macérât sur un papier (Wathman) , et une deuxième filtration avec une pompe à vide
- Enfin on récupère le filtrat dans un flacon, qu'on conserve, à l'abri de la lumière de l'humidité au réfrigérateur.

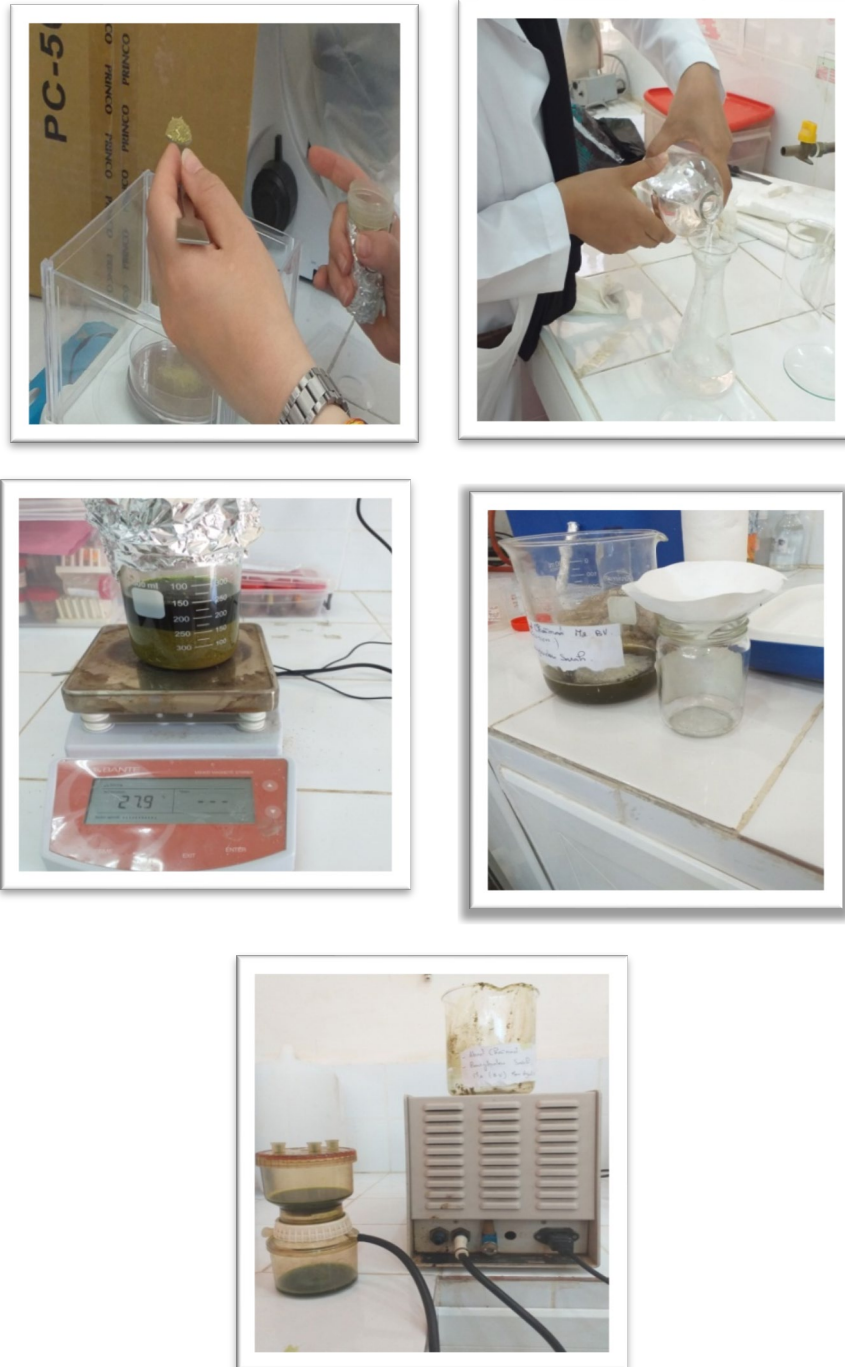


Figure14 : les différentes étapes de la macération par méthanol (Original 2021)

3.1.3. Evaporation

A l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavap), nous avons éliminé le solvant sous vide



Figure 15: l'évaporateur rotatif (Original, 2021)

Utilisant le protocole établie par **Benlabrech,(2013)** , résumé comme suit :

- -Peser le ballon d'évaporateur vide
- -Placer le filtrat dans un ballon d'évaporation
- -Procéder à l'évaporation jusqu'à disparition complète du solvant
- -Retirer le ballon de rotavap et attendre qu'il refroidisse
- -Peser le ballon a fin de calculer le rendement d'extraction
- -Recueillir l'extrait dans un volume d'eau distillé tiède
- L'intérêt de l'utilisation de l'eau distille bouillante est pour assurer la récupération des composés
- Restés accrochés a la paroi du ballon d'évaporation et avoir un extrait aqueux.
- -Filtrer l'extrait aqueux (résidu +eau) sur le papier de Wathman.
- **2-1-4 Détermination du rendement**
- Le Poids de l'extrait sec est déterminer par la différences entre le poids de ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant évaporation).(**Figure 16**)



Figure16 : le poids de ballon avant évaporation et après évaporation. (Originale 2021).

$$R(\%) = (M/M_0) \times 100$$

(R%) = rendement exprimer en %

M : Masse en gramme de l'extrait sec résultant

M₀ : Masse en gramme du matériel végétal sèche

3.1.4. Extraction liquide- liquide

Une série d'extraction des solvants non miscibles à l'extrait aqueux, selon la Protocol décrit (Rihan et Benlahrech, 2013) avec quelques modifications

3.1.5. Lavage a l'éther de pétrole(Lavage1)

Cette étape consiste à additionné de 1/3 de volume d'éther de pétrole avec un volume de la phase aqueuse, pour éliminer tous les composées non phénoliques(Les caroténoïdes et les pigments chlorophylliens, les graisses). Bien agiter et laisser reposer le mélange.Jusqu'à obtention de deux phases, une phase organique de (éther de pétrole) et une phase aqueuse, Récupérer la phase aqueuse dans un ballon en verre.



Figure 17: Extraction liquide-liquide en utilisant l'ampoule à décante (**Original2021**)

A la fin de cette manipulation, la solution aqueuse ainsi obtenue est placée dans une ampoule à décanté. Ensuite elle est soumise à un processus de séparation liquide – liquide avec des solvants de polarités croissantes Ether di éthylique ((C₂H₅)₂O), Acétate d'éthyle (EtOAc) et n- butanol (NBuOH) successivement .

Ether di éthylique ((C₂H₅)₂O) : permet à extraire les aglycones (composés simples tels que les acides phénols et les flavonoïdes).

Acétate d'éthyle(EtOAc) : permet d'extraire le man glycoside et partiellement les di glycoside.

N- butanol (nBuOH) : permet d'extraire le reste de di glycoside et le tri- glycoside.

Le mode opératoire de chacune des trois phases est le même.

- Il faut bien agiter le mélange et le laisser à reposer, jusqu'à l'obtention de deux phases, une phase organique (éther di éthylique) et une phase aqueuse.
- On va évaporer la phase organique obtenue, par l'utilisation d'un évaporateur rotatif, Enfin on recueille l'extrait dans 2 ml de méthanol pour la conservation.
- Cette manipulation a été effectuée selon le même protocole précédant pour l'acétate d'éthyle(EtOAc) et le n-butanol (nBuOH).

3.2. Dosage quantitatif par spectrophotométrie

Dosage des flavonoïdes par la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl₃) :

L'évaluation quantitative des flavonoïdes dans les différentes fractions (extrait total, extrait d'acétate d'éthyle, extrait d'éther di éthylique et extrait de n- butanol) est réalisée selon la méthode au trichlorure d'aluminium en suivant le Protocole de **Lamaison et Carnat (1990)**.

- Un volume de 1 ml de solution méthanolique de 2% $AlCl_3$ a été ajouté à 1 ml d'échantillons à température ambiante pendant 15 minutes.
- L'absorbance du mélange et du blanc a été mesurée à 430 nm avec un spectrophotomètre UV-visible.
- Une courbe d'étalonnage de la quercétine a été préparée dans les mêmes conditions.
- La concentration est exprimée en mg/ g d'équivalents de quercétine.
- Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes.

3.3. Test de l'effet antioxydant de *Z.album* par la méthode de piégeage du radical libre DPPH

Le Test DPPH° permet de mesurer le pouvoir anti radicalaire de molécules pures d'extraits végétaux dans un système model (solvant organique, température ambiante). Il mesure la capacité d'un antioxydant (AH, composés phénoliques généralement) à réduire le radical chimique DPPH° (2,2 – diphenyle -1- picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène.

Le DPPH°, initialement violet, se transforme en DPPH-H, de couleur jaune pâle.

- La réduction du DPPH ° est facilement mesurée par spectrophotométrie à 515 nm (λ max DPPH°).
- La réaction sera plus au moins rapide selon la nature de l'antioxydant, et la quantité DPPH-H formée dépendra de la concentration en antioxydant.



Figure18: La Manipulation de l'activité anti-oxydante (**Originale 2021**)

3.3.2. Mode opératoire

3.3.2.1. Préparation de la solution DPPH dans du méthanol

Dissoudre 0.01 mg de DPPH → 250 ml de méthanol

3.3.2.2. Préparation de la solution mère de notre échantillon

25 mg de notre échantillon → 25 ml de méthanol pour obtenir une concentration de 1 mg/ ml

3.3.2.3. Préparation des dilutions à partir de solution mère

A partir de la solution mère (1mg/ml), on prépare des dilutions en utilisant le facteur de dilution et les équations suivantes :

$$F = C_m / C_f \dots\dots 1$$

$$F = V_f / V_m \dots\dots 2$$

F= Facteur de dilution

C_m : Concentration mère

C_f : Concentration fille

V_m= Volume de la concentration mère

V_f= Volume la concentration fille

En connaissant la concentration mère qui est de 1 mg/ml, on détermine les facteurs de dilution (équation 1).

En connaissant le facteur de dilution et en utilisant (l'équation 2), avec $V_f = 4$ ml, on trouvera donc V_m

3.3.2.4. Préparation du mélange DPPH+ échantillon

On mélange dans une cuve 750 μ l de la solution de DPPH avec 250 μ l de notre échantillon (acétate d'éthyle, éther di éthylique, N-butanol) avec les différentes concentrations 750 μ l de DPPH avec 250 μ l de concentration 1 mg/ ml dans une cuve ainsi de suite jusqu'à la dernière concentration de la dilution.

- Les cuves sont mises à l'obscurité et soumises à une température ambiante.
- La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm par spectrophotomètre.
- Pour chaque dilution, on prépare un blanc.



Résultat et discussion



Résultats de l'extraction de flavonoïdes *Zygophyllum album L*

Les rendements d'extraction des flavonoïdes totaux ainsi que les flavonoïdes caractéristiques de chaque phase sont reportés dans le (Tableau14) :

Tableau11 : Rendement d'extraction des flavonoïdes suivant le solvant et le type des flavonoïdes extraits.

Procédure d'extraction	Rendement de l'extraction	Type de flavonoïde
Macération au méthanol	12,66 %	Flavonoïdes totaux
Ether di éthylique	3 ,5 %	Les flavoneslipophyles ; les acides phénols.
Acétate d'éthyle	0 ,747 %	Les aglyennes , mono glycosides
N- butanol	0 ,04 %	di- glycoside, le tri- glycoside ; C- glycosides.

1. Rendement de l'extrait des flavonoïdes après macération

- $R\% = (M/M0) \times 100$
- Le poids de l'extrait sec : $192,7 - 177,5 = 15,2$
- Le poids de ballon vide : 177,5 g
- Le poids de ballon remplie : 192,7g
- $R(\%) = (15,2 / 120) = 0,12 \times 100$
- $R(\%) = 12,66\%$

L'extraction de la poudre végétale de ZA avec la méthode de macération par méthanol montre que le rendement en flavonoïdes dans notre plante est de 12,66 %.

Ce taux est nettement inférieur à celui trouvé par **Zeghoudi (2018)** qui est de 19,08 % et celui de **Benhamou (2012)** qui est de 14,30%.

Cette différence peut être due à l'origine de la plante ou le protocole d'extraction utilisé.

Notre plante est originaire de la wilaya de Tamanrasset, celle utilisée par **Zeghoudi (2018)** est originaire de Ouargla alors que celle utilisée par **Ben hamou (2012)** est originaire de Adrar.

L'extrait des flavonoïdes ainsi obtenu après macération a été soumis à une extraction liquide-liquide pour extraire chaque type de flavonoïdes séparément.

2. Rendement des extraits des flavonoïdes après extraction liquide-liquide.

L'extraction des flavonoïdes par la méthode de l'affrontement par des solvants organiques : Ether di éthylique, Acétate d'éthyle, et le n-butanol montre que l'extrait d'Ether d'éthylique présente un rendement égale à 3,5 %, suivi de l'extrait d'acétate d'éthyle à 0,747 %. Le rendement le plus faible est celui de l'extrait n-butanol qui est 0,04%.

Belguidoum (2012) affiche que les extraits d'acétate d'éthyle et de n-butanol de *Zygophyllum album* et de *Zygophyllum cornutum* présentent des rendements faibles comme nos résultats, soit de 0.1539 % pour l'acétate d'éthyle et de 5,4452 % pour n-butanol (*Z. cornutum*).

Nos résultats s'avèrent faibles par rapport à ceux obtenus par **Youcef El rahmani (2019)** sur *Zygophyllum album*. Soit de 6,41 %, 14,818 % et 16,2 % respectivement pour l'Ether di éthylique, acétate d'éthyle et n-butanol.

Les rendements obtenus sont exprimés par rapport à la masse végétale utilisée au départ. Notre poudre végétale m : 120g, poudre végétale de **Youcef El rahmani (2019)** m : 400g

De même, le rendement dépend de plusieurs paramètres, Le solvant, le PH, temps d'extraction et la composition d'échantillon **Lehout et Laib (2015)**.

Les différentes phases obtenues après extractions présentent différentes couleurs (vert : éther di éthylique, jaune claire : acétate d'éthyle et jaune foncé : n-butanol) Caractéristique de chaque type de flavonoïdes .

2. Résultats du dosage quantitatif par spectrophotométrie

La détermination des concentrations des flavonoïdes se fait à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la quercitine .

Cette évaluation quantitative montre une corrélation positive entre la variation des flavonoïdes et l'absorbance avec un coefficient de corrélation R : 0.9997

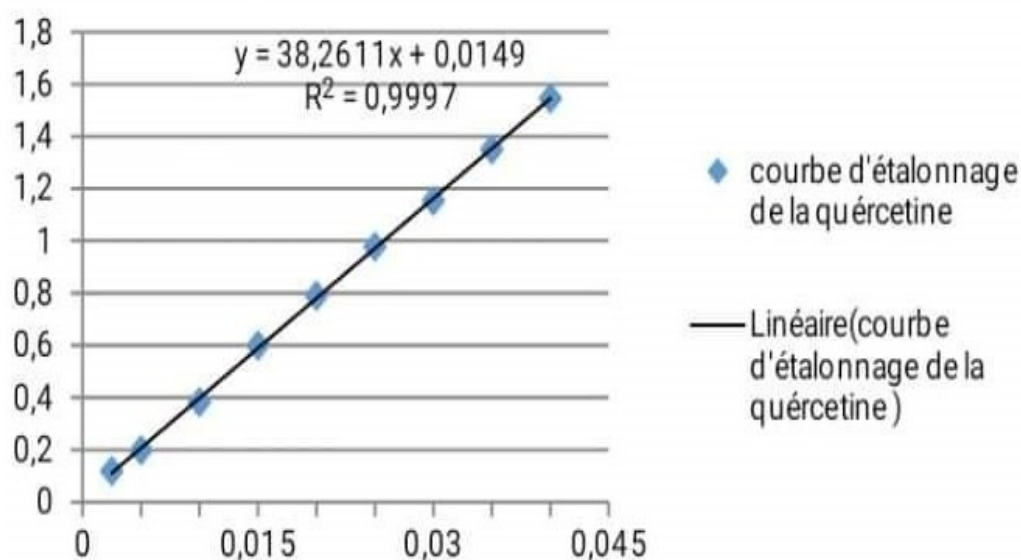


Figure19 : Courbe d'étalonnage par la quercétine.

Les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en mg EQ de quercétine / g d'extrait de matière végétale. Cette teneur est variable selon la phase extraire (**Tableau15**)

Tableau12 : Teneurs des flavonoïdes dans chaque extrait en mg eq de quercétine par g d'extrait

L'extrait	Absorbance moyenne	Dosage en mg/ml	Dosage en μ g/ml
Butanol	0.07	0.001	1.44
Acétate d'éthyle	0.929	0.024	23.89
Ether di éthylique	0.177	0.004	4.24

L'extrait d'acétate d'éthyle contient une teneur élevée en flavonoïdes, En deuxième lieu se place la teneur de l'extrait d'éther di éthylique, et la teneur la plus faible parmi les trois solvants est celle de n-butanol.(1.44 μ g/ml, 4.24 μ g/ml)

Nos résultats sont en contradiction avec ceux annoncés par **Belguidoum (2012)**. Dans le sens où le dernier a affirmé que la teneur en flavonoïdes (extrait d'acétate d'éthyle et n-butanolique)

chez *Zygophyllum album* est respectivement de 1.945 mg EQ/g, 0.805 mg EQ/g. Alors qu'elle est de 5,85 mg EQ/g et de 0,74 mgEQ/g chez *Z cornutum*.

L'extrait d'acétate d'éthyle de notre plante contient une teneur importante en flavonoïde par rapport aux deux derniers extraits (Ether diéthylique et n-butanolique). Globalement notre extrait de *Z album* est très riche en flavonoïdes en comparaison avec l'extrait de *Z album* **Youcef El rahmani (2019)** car la quantité de la matière végétale utilisée dans notre étude est de 120g et celle de **Youcef El rahmani(2019)** est de 400g, si on compare le rendement après macération des deux extraits par rapport à la masse utilisée (matière végétale) en confirme que le notre est plus élevée voir l'explication suivante :

4. Rendement après macération

Youcef El rahmani (2019) 400g de matière végétale (*Z album*) → 26%

(Notre plante) 120 g de matière végétale (*Z album*) → 12,6 %

Si on utilise 400g de matière végétale (*Z album*) → 40 %

5. Résultats de l'activité antioxydante

Pour calculer le taux d'inhibition des radicaux libres en pourcentage (I%) utilisant la formule suivante :

- $I\% = 100 - [(Abs\ test - Abs\ blanc) / Abs\ control] \times 100$
- Soit : % I = Taux d'inhibition
- Abs control = Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm de la solution DPPH.
- Abs blanc = Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm de la solution méthanol.
- Abs test = Absorbance à 517 nm de l'échantillon / standard.

5.1. Calcul de la concentration inhibitrice de 50 % (IC50)

L'IC 50 est la concentration de l'échantillon test ou standard qui inhibe 50% des radicaux libres.

$$Y= 50 \quad Y= aX+b \quad X= (50-b) \text{ Donc} \quad X= IC 5$$

La présente étude est consacrée a la recherche d'un éventuel effet antioxydant de l'extrait de flavonoïdes (*Z album*).

Pour l'extrait n-butanolique il n'ya eu aucun changement de couleur même après plusieurs essais de concentration différentes, qui exprime l'absence d'activité antioxydante notable.

5.2. Extrait acétate d'éthyle

Les résultats relatifs aux pourcentages d'inhibition et l'IC50 de l'extrait Acétate d'éthyle sont présentes dans le (Tableau16) :

Tableau13 : Tableau exprime les résultats de l'activité antioxydante de l'acétate d'éthyle.

Dilutions des concentrations en mg/ml	Moyennes des absorbances	% inhibition	IC50 en mg/ml
1	0,076	74,73	0,66
0,8	0,197	60,29	
0,6	0,337	43,59	
0,4	0,453	29,74	
0,2	0,533	20,20	
0,1	0,562	16,74	

5.3. Calcule de l'IC 50 de acétate d'éthyle

A partir de la droite de régression nous avons calculé l'IC 50 de l'acétate (Tableau13). Nous avons obtenu : IC50 de l'acétate d'éthyle= 0,66 mg / ml

5.4. Calcule de l'IC 50 d'éther di éthylique

A partir de la droite de régression nous avons calculé l'IC50 d'éther di éthylique
 Nous avons obtenu :

L'IC 50 d'éther di éthylique = 0,51mg/ml d'éther di éthylique

Tableau14 : Tableau exprime les résultats de l'activité antioxydante d'éther di éthylique.

Dilutions des Concentration en mg/ml	Moyennes des Des absorbances	% inhibition	IC 50 en mg/ml
1	0,061	76,52	0,51
0,8	0,099	71,99	
0,6	0,199	60,05	
0,4	0,323	45,26	
0,2	0, 443	30, 94	
0,1	0,54	19,36	

Le tableau démontre que les IC50 des différents extraits des flavonoïdes(**Tableau15**)

Tableau15 :Tableau exprime les trois IC50 (Acétate d'éthyle, Ether di éthylique, Extrait aqueux **Belaribi (2019)**).

Extrait	IC 50 exprimée (mg/ml)
Acétate d'éthyle	0,66
Ether di éthylique	0,51
Extrait aqueux Belaribi (2019)	5,511

Pour l'extrait d'acétate d'éthyle en observent une valeur d'IC50 de (0,66 mg/ml) avec une forte activité anti-oxydante de ce dernier qui arrive a (74,73% d'inhibition). Pour l'extrait d'éther di éthylique en observent une valeur d'IC50 (0,51 mg/ml) avec une activité antioxydante très élevée de ce dernier qui arrive a (76,52% d'inhibition).

IC50 (éther di éthylique)	IC50 (Acétate d'éthyle)
0,51	< 0,66

Donc l'extrait éther di éthylique suggère une forte activité antioxydante en comparaison avec le résultat d'antioxydante de l'extrait acétate d'éthyle.

Dans l'étude de **Belaribi (2019)**, il a été rapporté que malgré la valeur élevée de l'IC50 de l'extrait aqueux de *Z.Album* (5,511 mg/ml), l'activité antioxydante reste faible, ce qui suggère une probable mauvaise miscibilité.

Dans l'étude de **Marouane et al en 2014**, il a été rapporté que malgré le pouvoir antioxydant de l'extrait aqueux de *Z.album* est le plus faible à celui des antioxydants synthétiques, il reste très avantageuse par sa capacité de continuer à piéger les radicaux libres. Ce potentiel antioxydant confère à l'extrait aqueux *Z.album* un grand intérêt dans la prévention contre le vieillissement et le diabète et pour les maladies cardiovasculaires (113).

De plus, dans une autre étude de **Bozin et al en 2008**, il a été rapporté qu'une activité anti radicalaire exprime la capacité de réduction des radicaux libres. Le radical DPPH est l'un des substrats les plus utilisés pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydant en raison de sa stabilité en forme radicalaire libre et la simplicité de l'analyse (144).



Conclusion



Conclusion

Zygodhryllum album demeure une plante très importante, a cause des composées biochimiques variées d'intérêt et sa capacité de réduire le stress avec sont pouvoir antioxydant.

D'après l'étude des différents extraits de la plante *Zygodhryllum album* (aqueux, flavonoïdes) on confirme que l'utilisation de cette riche plante est multiple.

Les différentes méthodes de l'extraction sert à extraire juste les composées veulent étudier, ces méthodes nous facilite à analysées des composées spécifiques.

Les flavonoïdes ont un pouvoir important à éliminer les radicaux libres, donc c'est un antistress très efficace pour le corps humain.

La thérapie à base de plante ou la phyto thérapie c'est une discipline précieuse, naturelle sert a trouvées des solutions pour des maladies de siècles comme le diabète, le stress, le cancer et beaucoup d'autres problèmes de santé, loin de médicaments à base chimique pleine d'effet secondaire.

La prévention et la guérison des maladies a l'aide de composees phytochimique, en particulier les flavonoïdes, sont bien connues, Les fruits et légumes sont des sources naturelles de flavonoïdes

La variété de flavonoïdes que l'on trouve dans la nature possède ses propres propriétés physiques, chimique et physiologiques. La relation structure –fonction des flavonoïdes est la quintessence des principales activités biologique.

L'efficacité médicinale de nombreux flavonoïdes comme agents antibactériennes, hépatoprotecteus, anti-inflammatoires, anticancéreux et antiviraux est bien établie.

Ces substances sont plus couramment utilisées dans les pays en développement. L'utilisation thérapeutique de nouveaux composees doit être validée a l'aide de tests biochimiques spécifiques. Grâce à l'utilisation de modifications génétiques, il est désormais possible de produire des flavonoïdes a grande échelle .D'autres réalisations fourniront de nouvelles informations et mèneront certainement à une nouvelle ère d'agents pharmaceutiques à base de flavonoïdes pour le traitement de nombreuses maladies infectieuses et dégénératives.



***Références
bibliographiques***



Liste des références

1. **ATLAS 2019 de L'INTERNATIONAL.**

2. **AMERICAN PSYCHOLOGICAL Association** , How stress affects your health(2013)
Centre d'étude sur le stress humain (2013)

LOYD, C SMITH , J.J et WIGNER K.(2005).Stress and diabetes :A Review of Links .
Diabets Spectrum, 18(2), 121-127. Institut universitaire de sante mantale Douglas,
(2014).Stress : cause et consequence Mayo clinic .(2017). Stress Management .

FaLCO G , PIRRO PS , CASTELLANO E , ANFOSSI M , BORRETTA G ,. The
relation Ship between Stress and Diabets Mellitus . JNeurolpsychol .2015 ; 3(1) :7.

3. **HAFLA LAHISSENE , AZZEDDINE , KAHOUADJI , S HSEINI**La Jeunia ,
Revue de Botaique ,200 plante medicinales de louest et de Sud

4. **BELGUIDOU M ,DENDOUGUI H., KENDOUR Z.,2015 :** In vitro antioxydant
properties and phenolic contents of Zygophyllum album L.from Algeria .JChem Pharm
Res , vol.7,p.510-514.

5. **MNAFGUI K., HAMDEN K., HICHEM BS., KCHAOU M., MBAREK
N.,SADOK S.,DERBALI F ., ALLOCHE N., ELFEKI A., 2012 :** Inhibitory activities
of Zygophyllum album : a naturalweight-lowering plant on key enzymes in high-fat diet –
fed rats . Hindawi publishing Corporation.620384 :9p.

6.**AMAL MY ., MOUSTAFA.,KHODAIR A.,FAIZA
M.,HAMMOUDA.,HOUSSEINY A.,HOUSSEINY.,2007 :** Phytochemical and
toxicological stadies of Zygophyllum album .Journal of pharmacology and toxicology.
2(3) : 220-237.

7. **KHALDI A., MEDDAH B., MOUSSAOUI A., BENMEHDI H., GOURI S.,2012 :**
Screening phytochimique et Effet Antifongique de Certains Extraits de plantes Sur le
Développement in vitro des Moisissures. European Journal of Scientific
Research,80 :316.

8. KIRRMANN A., CANTACUZENE J., et DUHAMEL P ., 1975 : Chimie Organique , Fonctios Simples,p.149,pp.165-168.

9. VALLET A., 1996 : Contribution a letude de la biosynthese des acaloïdestropaniques chez le *Datura innoxia* Mill. ; Transformation par *Agrobacterium* in Rice *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes* et culture de chevelus racinaires. These D.E.A. Universite de Picardie Jules Verne . Amiens .

10. NULTSCH W., 1969 : Botanique Generale , éd. Louis pasteur, 319-320.

11. HELLER , W. et FORKMANN,G., 1993 : Biosynthesis of flavonoids .In The Flavonoids : Advences in Research Since 1986 (Harborne , J.B.,ed). London : Chapman & New York . Phanol Biochem (PMBD , 185303293) 1964.

12. PARIS et HURABIELLE M ., 1981 : Abeger de Matiere (Pharmacognosie). Tome 1 , Masson ed ., Paris 356p.

13. CORDELL, GEOFFREY A ., 1981 : Introduction to alkaloids : A biogenetic approach. Ed. John Wiley & Sons.

14. PENGELLY, A 2004. The constituents of Medicinal plants : An introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine. CABI publishing.

15. HUSSEIN SR., MARZOUK M ., IBRAHM L, KAWASHTY S , SALEH N ., 2011. Flavonoids of *Zygophyllum simplex* L. (Zygophyllaceae), Biochemical Systematics and Ecology 39 ;778-780.

16. ABOU-GAZAR, H., BEDIR , E., TAKAMATSU , S FERREIRA , D., KHAN, I.A., 2004. Antioxydant lignanes from *Larrea tridentata* . Phytochemistry 65,2499-2505.

17. RAFFAEILLI, B.A., HOIKKALA, A., WAHALA, K. 2002. , 2002. chromatography B777,29-43.

18. J. Bruneton , Pharmacognosie , phytochimie , plantes médicinales .4.2009 Tec & Doc.1269.

19. LAMBERT, J.D., SANG, S ., DOUGHERTY, A., CALDWELL , C.G., MEYERS , R.O., DORR , R.T ., TIMMERMAN, B.N., 2005. Cytotoxic lignans from *larrea tritentata* . Phytochemistry 66,811-815.

20. BRUNETON J ., 1995. Pharmacognosy phytochemistry Medicinal Plants, Lavoisier Pubs, Paris.

21. SMATI , D., LOGEON,A., GUYOT , M., 2004 . 3β -(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-erythrodiol, a cytotoxic constituent of *Zygophyllum geslini* collected in the Algerien Sahara. *Journal of Ethnopharmacology* 95, 405-407.

22. J . B . HARBORNE , Phytochemical methods a guide to modern techniques if plant analysis 1984 Chapman and Hall.

23. BEROUGGI, H., MARTIN-CORDERO, C., KHALIL A., HaMMOUCHI , M ., ETTAIB,A., MARHUENDA,E., DOLORES,H, M., 2006 . Vasorelaxant effects of harmine and harmine extrated from *Peganum Harmala L.* seed's isolated rat aorta. *Pharmacological Research* 54, 150-157.

24. HERNANDEZ , I., ALEGRE, L., Van BREUSEGEM, F., & MUNNE-BOSH, S.(2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants ?. *Trends in plant science* , 14(3), 125-132.

25. W. VERMERRIS ,R. NISHOLSON, Phenolic compound biochemistry. 2006 Springer.

26. ALAN CROZIER, MICKEL N . CLIFFORD, H. MARBY , The flavonoids . 1975 Springer Science +Busness Media Dordrecht.

27. SAFFIDINE K.(2018). Etude analytique et biologique des flavonoides extraits de *carthamuscaeruleus L.* et de *plantago major L* (Doctoral dissertation).

28. WICHTL M., ANTON R., 2009 : Plantes therapeutiques tradition , pratique officinale , science et therapeutique .Edition LA VOISIR ,Paris :38,41.

29. ISIRIN P., MASSON M., RESTELLINIJ .p ., YBERT E., DE LAAGE DE MIEUX A., MOULARD F., ZHA E., DE LA ROQUE O., VICAN P ., DEELESALLE-FEAT T ., BIAUJEAUD M ., RINGUET J ., Bloth J .et Botrel A., 2001 : La rousse des plantes medicinales : identification, preparation , soins .Ed Larousse .p10812.

- 30. ALAN CROZIER , MiCHAEL N . CLIFFORD , H . ASHIIHARA,** Plant secondary metabolites : occurrence , structure and role in human diet , 2006 , Blackwell p. 384.
- 31. DOMART A., (1990).**Nouveau la rousse medical, 1^{er}edition . Paris ; pp : 322-537.
- 32.MOREL , S. (2011).** Etude phytochimique et evaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth.(Fabaceae) (Doctoral dissertation, Universite d'Angers).
- 33. MERT-TURK, F. (2002).** Phytoalexins : defence or just a response to stress . Journal of cell and molecular biology , 1(1), 1-6.
- 34.SCHMELZER , E., JAHNEN, W., & HAHLBROCK , K.(1988).**In situ localization of light –induced chalcone synthase mRNA , chalcone synthase , and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves .Proceedings of the national academy of sciences , 85(9),2989-2993.
- 35. SHIRLEY , B.W .(1996).** Flavonoid biosynthesis : new functions for an old pathway .Trends in plant science , 1(11),377-382.
- 36. STAPLETON , A. E. (1992).** Ultraviolet radiation and plants : burning questions . The plant Cell , 4(11)1353.
- 37. MABRY , T J., MARKAM , K. R., & THOMAS , M. B.(1970).** The systematic identification of flavonoids (pp.35-40) . Springer, Berlin , Heidelberg.
- 38.MARKHAM, K.R.(1982).**Techniques of flavonoid identification (vol.36).London : Academic press.
- 39.VERYKOKIDO-VISSTAROPOULOU E., VAJIAS C., (1986).** Methylated flavones from *Teucrium polium* . planta Med; 5: 343-432.
- 40.BENKERIEF R., BRUN – BOUSQUY M ., TILLEQUIN F., KOCH M ., (1990)** . Alcaloides et flavonoides des parties aeriennes de *Hammada articulata* , ssp . Ann pharmaceutique francaise; 48(4): 219-224.
- 41.GHEDIRA K., (2005).** Les flavonoides , structures , proprietes biologique role prophylactique et emplois en therapeutiques , pharmagognosie, springer; 4:162-166.

42.DA SILVA E.J.A., OLIVEIRA A.B.,LAPA A.J.,(1994).Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of citrus bioflavonoide, hesperidin , and the isoflavonoids,duartin andclaussequinone , inrats and mice .J.pharm.Pharmacol;46(2):118-22.

43.GALATI E.M.,MONFORTE M.T.,KIRJAVAINENS.,FORESTIERI A.M ., TROVATO A .,TRIPODO M.M.,(1994).Biological effects of hesperidin , a citrus flavonoid.(Note 1): anti-inflammatory and analgesicactivity.Farmaco;40(11):709-2.

44. READ M.A.,(1995).Flavonoids : Naturally occurring anti-inflammatory agents Vascular.Am .J Pathol. 147(2):235-7.

45.MUCSI L , PRAGAI B.M.,(1985).Inhibition of virus multiplication and alteration of cyclic AMP level incell cultures by flavonoids .Experientia;41(7):930-1.

46.BRACKE M., VYNCKE B ., OPDENAKKER G., FOIDART J.M ., DePESTELG.,M.,(1991).Effect of catechins and citus flavonoids on invasion in vitro.Clin Exp Metasis;9:13-25.

47.LAROCAA L.M.,GIUSTACCHINI M.,MAGGIANO N ., RANALETTI F.O.,PIANTELLI M., ALCINI E., CAPRLLI A.,(1994).Growth –inhibitors effect of quercitin and presence of type 2 estrogen binding sites in primary human transitionl cell carcinomas .J Urol; 152:1029-1033.

48.DI CARLO G., MASCOLO N.,IZZO A.A.,CPPASSO F.,(1999). Flavonoids : old and new aspects of class of natural therapeutic drugs .Review .life Sci;65:337-53.

49.AMELLA M., BRONNER C.,BRIANCOF F., (1985).Inhibition of mast cell histamine relase by flavonoids and biflavonoids .Planta Med ; 51(1):16-20.

50.BERG P.A., DANIEL P.T., (1988).Plant flavonoids in Biology and Medicine 2 .Progress in Clinical and Biological Reasearch , Cody V? Middleton E? Harborne JB(Eds) 280:157-171.Liss AR Inc , New York.

51.LANDOLFI R, MOWER R.L ., STEINER M., (1984).Modification of platelet function and arachidonoc acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations .Biochem pharmacol; 33: 1525-1530.

52.ASONGALEM E.A.,FOYET H.S., NGOGANG J., (2004).Analgesic and – inflammatory activities of Erigeron floribundus.J Ethnopharmaco;91(2-3):301-8.

- 53. CRUZ T., GALVEZ J., OCETE M.A., (1998)** Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats .Life Sci;62(7):687-95.
- 54. FRIESENCKER B., TSAI A.G., INTAAGLIETTA M., (1995).** Cellular basis of inflammation ,edema and the activity of Daflon 500mg.Int J Microcirc ClinExp 15(Suppl):17-21.
- 55. MIDDLETON E.J., (1998).** Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function .Adv Exp Med Biol ; 493:175-82.
- 56. CHEN H.Q., JIN Z.Y., Wang X.J., Xu X.M, Deng L., Zhao J.W., (2008).** Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. Neurosci Lett .(Epub ahead of print)
- 57. CHAUDHY P.S ., CABERA J ., JULIANI H.R ., VARMA S.D ., (1983).** Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin .Biochem Pharmacol;32:1995.
- 58. MARFAK A., (2003).** Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de dépsides. Thèse de doctorat .Université de Limoges ; pp : 24-40.
- 59. BERRENS L., De la CUADRA B., GALLEGO M.T, (1997).** Complement inactivation by allergenic plant pollen extracts .Life Sci ; 60(17) :1497-503.
- 60. GONÇALVES J.I.S., JEITAO S.G ., DELLE MONACHE F., (2001).** *In vitro* antiviral effect of flavonoid-rich extracts of vitex polygama (Verbenaceae) against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. Phytomedicine ;8(6) :477-158.
- 61. SERKEDJEVE J., IVANCHEVA S., (1998).** Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant Geranium sanguinum L. J Ethnopharmacol;64(1):59-68.
- 62. KALGOGEROMETROS D., MAKRIS M ., CHLIVA C., AGGELIDES X., KEMPURAJ D., THEOHARIDES T.C.A., (2008).** Quercetin containing supplement reduces niacin-induced flush in humans .Int Immunopathol Pharmacol ; 21(3):509-14.

63. KUMAR , S ., CHASCHO, G ., SAXENA, A., K., & PANDEY , A.K.(2013). Parthenium hysterophorus : a probable source of anticancer , antioxidant and –HIV agents. BioMed hysterophorus

64.ARTICL PORTAIL DE PHARMACIE

65.RAJENDRAN M, MANISANSKAS P., GANDHIDANSAN R., MURUGENR.(2004).Free Radicals Scavenging Efficiency of a Few Natwally Occurring Flavonoids : A Comparative Study .J.Agic.Food Cen ,52,7389-7394.

66.NAGAI., OHARA K., MUKAI K.(2005).Kinetic Study of the Quenching Reaction of singlet oxygen by Flavonoids in Ethanol Solution .J.Phys .Chem.,B. , 109,4234-4240.

67. HALLIWELL B ,GUTTESDGE JMC .Free radicol in biology and medicine3ed .Oxford :oxford university Press ,1999.

68.BIRALSKI HK, BOHLES H,ESTESBAUES H ,FURST P,GEY7,HUNSDOREFERG , etal.Antioxidant vitamins in prevention sensensus statement Chn Nutur1997,16 :15 1-5.

69. ALONSON DE VEGAJM, DIAJ J,SERAVVO C,CARBONELL LF.plasma redax relates to the severity in critically patients. Crit Care Med 2000,28 :1812-4

70. CERIELLO A,QUAGLIARO L ,PICONI L ,ASSALONI R,DAROSR,MAIESA ,ESPARITO K,GIUGLIANO D ,Effet of post prandial hgpestriglycendemia and hypesglyceminan circulating adhesion molecules and oxidative stress generation and the possible role of simvastation traitment.Diabet.2004,53.701-710.

71. ESPACITO K,NAPPO F,MERFELLA R,GIUGLIANO G,GIUGLIANO F,GIOTOLA M,OUGLOARO L,GERIELLO A,GIUGLIANO. D. Inflammatorycytokinine concentratiens are actuelyincreased by hyperglycemia in humans.role of oxidative stresscirculation.2002,106:2067-2077.

72.LEVERVE X.Hyperglycemia and oxidative stress= Complex relationships with attractive prospects.Intensive Care Med 2003 ., 29 : 511-4..Berger MM Oligoelements= quoi de neuf ? Swiss Med Forum 2003 :31 :720-6.

73.BERGER. MMoligoelements : quoi de neuf ? swissmed forum 2003 ; 31 :720-6.

74. DIALLO A., 2005. Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd (MYRTACEAE). Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako : 13-14.

75. JENKINS A.J., HILL M.A and ROWLEY K.G (2007). Diabetes and oxidative stress. Atherosclerosis and oxidative stress. A New Perspective. Haltzman J.L (ed). p 23-160.

76. DURACKOVA Z, DJROLO F., HOUNG BE M., AVODE G., ATTOULOU V., ADDRA B., KADJOH N. AVIMADJ M., (2008). Oxidative and Oxidative stress. Mitochondrial medicine. Guzdjakouva A (ed). P = 19-43.

77. BIESALSKI HK, BOHLES H, ESTERBAUER H, FUST P, GEY F, HUNSDORF, Antioxidant vitamins prevention. consensus statement. Clin Nutr 1997 ;16 :151-5.

78. ALONSON DE VEGA JM, DIAZ J, SERRANO E, Carbonell LF. Plasma redox status relates to the severity in critically ill patients. Crit Care Med 2000 ;28 :1812-4.

79. BEAUDAUX J.L and DOMINIQUE B.R (2005). Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Edition médicales internationale p 550.

80. JANG, M., CAI, L., UDEANI, G.O., SLOWING, K.V., THOMAS, C.F., BEECHER, C.W. "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grape", Science, vol. 275, 1997, p. 218-220.

81. ZAFRA-STONE S, YASMIN T, BAGCHI M, GHATTERJEE A, VINSON G A, BAGCHI D., 2007 Gun Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. Mol Nutr Food Res ; 51(6):675-83.127

82. KRIVOKKAN R, SHIDLES MD, NASHAA, KALT W, VINIVIST - TYMCHUKMR, SHUKHIT -HALE B, JOSEPH JA. Blueberry supplementation improves memory in old mice. J Agric Food Chem. 2010 Apr 14;58.

83. CHEN Q, VAZQUEZ E.J., MOGHADDAS S., MOPPEL C.L., LESSEFSKY E.J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex 3. J. Biol. Chem 278,36027-31.

84. JENKINS A.J., HILL M.A. and ROWLEY K.G. (2007)

Diabetes and Oxydant Stress .Atherosle rosis and Oxidant stress .A New Perspective
.Moltz mam J.L (ed).p 123-160.

85.KRISHNAMACHANI V .,LEUVINE L.H .,Pare P.W. (2002).Flavonoids
Oxidation by Radical Generators AIBN. Aunified Mechanism for quercetine Radical
Scavenging .g.Agic Food chen .50,4357-4363.

**86.MC PHAIL D.B.,HARTHEY R.C., GARDNER P.T ., DUTHIE
G.G.(2003).**kinetic and stoichiometric assessment of the otioxydant activity of flavonoids
by electron spin resonance spectroscopy.j .agric .food chem..

**87.SARAN M ., VETTER G., ERBEN-RUSS M., WINTER R ., KRUSE
A.,MICHEL C ., BORS W .(1987).**pulse radiolysis equipement : a setup for simultaneous
multiwave length kinetic spectroscopy .rev .sci .instrum.,58,363-368.

88.ERBAN – RUSS M ., BORS W ., SARAN M (1987).reaction of lionolic acid
peroxyl radicals with phenolic antioxidants : a pulse radiolysis study .int .g radiat .biol .,
52,393-412.

89.BORS W., MICHEL C ., SARAN M(1994).flavonoid antioxydants : rate constant
for reactions with oxygen radicals .methods enzymol.234,420-429.

