

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Mr. ABOU Soufiane

Mr. NOUR Anes Belahouel

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : Pharmaco-Toxicologie

THÈME

Etude phytochimique et activité antioxydante de l'extrait
aqueux de *Cordyceps militaris*

Soutenue publiquement le .../06./2022

DEVANT LE JURY

Présidente	HAMMADI. K	PR	U. Mostaganem
Encadreur	AMARI Nesrine Ouda	MCA	U. Mostaganem
Examinatrice	MISSOUN. F	MCA	U. Mostaganem

Thème réalisé au laboratoire de pharmacognosie & API phytothérapie

Année universitaire : 2021 -2022

Remerciement

En premier lieu, nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir accordé le courage et la force de mener à bien ce modeste travail.

Nous tenant à remercier vivement notre promotrice Mme, AMARI Nesrine Ouda MCA, pour avoir accepté de nous encadrer et aussi pour l'effort fourni, pour ses encouragements constants, ses précieux conseils, son soutien et surtout pour sa qualité humaine, sa modestie, sa disponibilité, tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Que nos vifs remerciements aillent aux membres du jury DR.MISSOUN.F et PR.HAMMADI.K d'avoir accepté de juger ce travail en être l'examineurs de ce mémoire.

Nous remercions aussi les responsables du laboratoire de Pharmacognosie & API phytothérapie pour leur gentillesse et leurs soutiens.

Un grand merci à nos familles, pour leur soutien permanent et indéfectible qui nous a permis de chercher au plus profond de nous-mêmes la force, la volonté et la persévérance à même d'arriver à cet instant des plus importants de notre vie.

Un merci pudique à nos amis, nos collègues en Master 2 et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la concrétisation de cette œuvre.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Un homme exceptionnel, mon exemple éternel, mon soutien et ma source de joie et de bonheur, Celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi mon père. Qu'Allah le garde dans son vaste paradis.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur, maman que j'adore.

Mes dédicaces s'adressent aussi à mes adorables Khawla et Nassima.

Ainsi qu'à mes chers frères Salah Eddine, Abed Elhamide .

A tous ceux qui me sont chers et à tous mes amis.

Anes belahouel

Dédicaces

Je dédie avant tout mon mémoire à ma mère qui m'a donné la force
et la volonté pour réaliser son travail

A mes frères et sœurs.

A tous mes amis

A mon encadreur madame Amari Nesrine qui nous a soutenu et aidé
tout au long de notre travail.

A tous mes professeurs et jurés.

Soufiane

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction..... 1

Partie bibliographique

Chapitre I : Plante médicinales

I.	Plante Médicinale.....	3
I.1.	Historique	3
I.2.	Généralité sur les plantes.....	3
I.3.	Définition de plante médicinale.....	4
I.4.	Intérêt de l'étude des plantes médicinales.....	4
I.5.	Les avantages des plantes médicinales.....	5
I.6.	Les inconvénients des plantes médicinales.....	5
I.6.1.	Intoxication.....	5
I.6.2.	Interaction.....	5
I.6.3.	Allergie.....	5
I.6.4.	Les enfants.....	5
I.6.5.	Grossesse et allaitement.....	6
I.6.6.	Hypertension artérielle.....	6
I.6.7.	Diabète.....	6
I.7.	Importance de l'utilisation des plantes médicinales.....	6
I.7.1.	Parties des plantes utilisées.....	6
I.7.2.	Les formes d'utilisation des plantes médicinales.....	7
I.8.	Composantes des plantes médicinales.....	7
I.8.1.	Définition de principe actif.....	7
I.8.2.	Les huiles essentielles.....	8
I.8.3.	Les flavonoïdes.....	8
I.8.4.	Les alcaloïdes.....	9
I.8.5.	Substances amères.....	9
I.8.6.	Tanins.....	9
I.8.7.	Glucosides.....	10
I.8.8.	Saponosides.....	10
I.8.9.	Les phénols.....	10
I.8.10.	Les glucosinolates.....	10
I.9.	Phytothérapie.....	10
I.9.1.	La phytothérapie traditionnelle.....	10
I.9.2.	La phytothérapie clinique.....	10
I.9.3.	Principe de la phytothérapie.....	11
I.9.4.	Intérêt de la phytothérapie.....	11

Chapitre II : Stress antioxydant

II.	Antioxydants et radicaux libres.....	12
II.1.	Radicaux libres.....	12
II.1.1.	Généralité.....	12
II.1.2.	Définition.....	12
II.2.	Les espèces réactives de l'oxygène radicalaires.....	12
II.2.1.	Les espèces oxygénées réactives radicalaires.....	13
II.2.1.1.	L'anion superoxyde.....	13
II.2.1.2.	Le radical hydroxyle.....	13
II.2.1.3.	Les radicaux alkyles et pyroxyles.....	13
II.2.1.4.	Le peroxyde d'hydrogène.....	14
II.2.2.	Les espèces réactives d'azote.....	14
II.2.2.1.	Espèces radicalaires azotées.....	14
II.2.2.2.	Espèces non radicalaires azotées.....	14
II.3.	Les sources de production des radicaux libres.....	15
II.3.1.	Les sources endogènes.....	15
II.3.1.1.	Les sources non enzymatiques.....	15
II.3.1.1.1.	La chaîne respiratoire mitochondriale.....	15
II.3.1.1.2.	La phagocytose.....	15
II.3.1.1.3.	Les peroxysomes.....	15
II.3.1.2.	Les sources enzymatiques.....	15
II.3.1.2.1.	La xanthine-oxydase.....	15
II.3.1.2.2.	La NADPH oxydase membranaire.....	16
II.3.2.	Sources exogènes.....	16
II.4.	Le Stress Oxydatif.....	16
II.4.1.	Définition.....	16
II.4.2.	Origine du stress.....	17
II.4.3.	Généralités sur les antioxydants.....	17
II.4.4.	Définition.....	17
II.4.5.	Classification des antioxydants.....	18
II.4.5.1.	En fonction de leur activité.....	18
II.4.5.1.1.	Les antioxydants enzymatiques.....	18
II.4.5.1.2.	Les antioxydants non enzymatiques.....	18

II.5.	Antioxydants et système de défense.....	18
II.5.1.	Antioxydants enzymatiques.....	18
II.5.1.1.	Les superoxydesdismutases.....	18
II.5.1.2.	Les catalases (CAT).....	19
II.5.1.3.	La glutathion peroxydase.....	19
II.5.2.	Antioxydants non-enzymatiques.....	19
II.6.	Mécanisme d'action des antioxydants.....	20
II.6.1.	Les antioxydants primaires ou piègeurs des radicaux libres.....	20
II.6.2.	Les antioxydants secondaires ou préventifs.....	20
II.7.	La toxicité des antioxydants.....	20

Chapitre III : *Cordyceps militaris*

III.	<i>Cordyceps Militaris</i>	21
III.1.	Généralité.....	21
III.2.	Description de <i>Cordyceps militaris</i>	21
III.3.	Classification.....	22
III.4.	Origine de <i>Cordyceps militaris</i>	23
III.5.	Composants chimiques.....	23
III.6.	La substances actives dans <i>C. militaris</i>	25
III.7.	Activités biologiques de <i>C. militaris</i>	26
III.8.	Utilisations médicinales/applications cliniques de <i>C. militaris</i>	27

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

I.	Matériels et méthodes	29
I.1.	Matériel.....	29
I.1.1.	Matériel végétal.....	29
I.2.	Méthodes.....	29
I.2.1.	Dosage des polyphénols totaux.....	29
I.2.1.1.	Mode opératoire.....	30
I.2.2.	Dosage des flavonoïdes.....	30
I.2.2.1.	Mode opératoire.....	31
I.2.3.	Evaluation de l'activité antioxydante.....	32
I.2.3.1.	Le test de piégeage du radical DPPH.....	32
I.2.3.1.1.	Mode opératoire.....	32
I.2.3.2.	Test d'ABTS.....	33
I.2.3.2.1.	Mode opératoire.....	33

I.2.3.3.	Test de Ferric Reducing Power (FRAP).....	35
I.2.3.3.1.	Mode opératoire.....	35
I.2.4.	Le calcul de l'IC ₅₀	36
I.2.5.	Analyses statistiques.....	37

Chapitre II : Résultats et discussion

II.	Résultats et discussion.....	38
II.1.	Résultats.....	38
II.1.1.	Dosage des composés phénoliques.....	38
II.1.1.1.	Dosage des polyphénols.....	38
II.1.1.2.	Dosage des flavonoïdes.....	38
II.1.2.	Evaluation de l'activité antioxydante.....	39
II.1.2.1.	Evaluation de pouvoir antiradicalaire par le DPPH.....	39
II.1.2.2.	Activité antioxydante évaluée par le test ABTS.....	40
II.1.2.3.	Activité antioxydante évaluée par le test FRAP.....	42
II.1.2.4.	Concentration d'inhibition d'IC ₅₀	43
II.1.2.5.	Corrélation de DPPH, ABTS et le FRAP.....	43
II.2.	Discussion.....	45

Chapitre III : Conclusion

Conclusion.....	47
------------------------	-----------

Références bibliographiques

Liste des figures

Figure 1 :	Les différentes formes galéniques en phytothérapie	7
Figure 2 :	Exemple d'alcaloïde la morphine	9
Figure 3 :	Aspect morphologique de <i>Cordyceps militaris</i>	22
Figure 4 :	<i>Cordyceps militaris</i> naturel A et cultivé B	22
Figure 5 :	les structures des composés : a:Ergostérol, b:Cordycépine	26
Figure 6 :	Extrait de <i>Cordyceps militaris</i> Sk gold (mushroom)	29
Figure 7 :	Protocole de dosage des polyphénols totaux	30
Figure 8 :	Protocole représentant le dosage des flavonoïdes	31
Figure 9 :	Modification de radical DPPH lors du transfert électronique	32
Figure 10 :	Protocole expérimentale de l'évaluation de l'activité antioxydant par le test DPPH	33
Figure 11 :	Protocole d'évaluation de l'activité antioxydant par le test d'ABTS ⁺	34
Figure 12 :	Protocole d'évaluation de l'activité de FRAP	36
Figure 13 :	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	38
Figure 14 :	Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes	39
Figure 15 :	Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait aqueux de <i>Cordyceps militaris</i>	40
Figure 16 :	Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique	40
Figure 17 :	Pourcentage d'inhibition d'ABTS en fonction des concentrations de l'extrait aqueux de <i>Cordyceps militaris</i>	41
Figure 18 :	Pourcentage d'inhibition d'ABTS en fonction des concentrations de Trolox	41
Figure 19 :	Absorbance de FRAP en fonction des concentrations d'extrait aqueux de <i>Cordyceps militaris</i>	42
Figure 20 :	Absorbance de FRAP en fonction des concentrations d'Acide ascorbique	43

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Représente la structure de base des principaux flavonoïdes	8
Tableau 2 :	Classification botanique de l'espèce étudiée <i>Cordyceps militaris</i>	23
Tableau 3 :	La quantité des vitamines (mg/g)	24
Tableau 4 :	La composition de <i>C. militaris</i> mycélium	25
Tableau 5 :	Les activités biologiques de <i>C. militaris</i>	27
Tableau 6 :	Les teneurs en phénols totaux et les flavonoïdes de l'extrait aqueux de <i>Cordyceps militaris</i>	39
Tableau 7 :	Les IC ₅₀ des échantillons étudiés vis-à-vis du radical DPPH, ABTS et de FRAP	43
Tableau 8 :	Les coefficients de corrélation de DPPH, ABTS et FRAP de l'extrait aqueux de <i>Cordyceps militaris</i>	44
Tableau 9 :	Les coefficients de corrélation entre les phénols totaux, les flavonoïdes et l'activité antioxydante (DPPH, ABTS et FRAP) de l'extrait aqueux de <i>Cordyceps militaris</i>	44

Liste des abréviations

g :	Gramme
IC :	Concentration inhibitrice
µg :	Microgramme
L :	Litre
mg :	Milligramme
ml :	Millilitre
M :	Molaire
mM :	Millimole
% :	Pourcentage
AlCl₃ :	Chlorure d'aluminium
AQ :	Quercétine
DPPH :	2,2 diphényle-1-picrylhydrazyl
mg EQ/g :	milligrammes équivalent quercétine par gramme d'extrait lyophilisat
mg EAG/g :	milligrammes équivalent acide gallique par gramme d'extrait lyophilisat
Fe²⁺ :	Ions ferreux
Fe³⁺ :	Ions ferriques
FeCl₃ :	Chlorure de fer
FRAP :	Ferricreducingantioxidant power
H₂O :	Eau distillée
OH :	Hydroxyle
RO :	Le radical alkoxy
ROO• :	Le radical peroxy
ROOH :	Peroxyde alkyle
ABTS :	2, 2'-azynobis-[3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid]
TPTZ :	2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-s-triazine
A :	Absorbance
EAG :	Equivalent d'acide gallique
IC₅₀ :	concentration d'inhibition de 50%
Trolox :	Acide 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchromane-2-carboxylique
TCP :	Teneur en composés phénoliques
NO' :	monoxyde d'azote

NO₂ :	dioxyde d'azote
ONOO⁻ :	Peroxynitrite
SOD :	la superoxydedismutase
CAT :	la catalase
GPx :	la glutathion peroxydase
UV :	Ultra-violet
Nm :	Nanomètre
H₂O₂ :	Le peroxyde d'hydrogène
HO[•] :	Le radical hydroxyle
O₂ :	Oxygène moléculaire
O₂^{-•} :	Le radical superoxyde

Résumé

Les plantes ont toujours été une importante source de médecine. La plupart des gens dans le monde, n'utilisent que des remèdes traditionnels à base de plantes pour se soigner, Parmi ces plantes, *Cordyceps militaris* est l'un des champignons médicaux importants dans les pays asiatiques, en raison de ses divers effets bénéfiques sur la santé humaine. Le présent travail a pour objectif l'analyse phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* d'un extrait aqueux de plantes *Cordyceps militaris*. La teneur en polyphénols totaux a été déterminée par la méthode de FolinCiocalteu en utilisant l'acide gallique comme standards. Tandis que, les flavonoïdes ont été quantifiés par la méthode de trichlorure d'aluminium dont la quercétine est utilisée comme standard. Les résultats ont révélé la richesse de l'extrait de *Cordyceps militaris* en composés phénoliques et en flavonoïdes avec des teneurs de (747,35±5,91)mg EAG/g et (441,18±1,38)mg EQ/g respectivement. L'évaluation de l'activité antioxydante par le test de l'oxydation du radical le 2,2- diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), l'ABTS (2, 2'- azinobis- [3- éthylbenzothiazoline-6- sulfonic acid]), et le test du fer ferrique (FRAP) en utilisant l'acide ascorbique et le Trolox comme des références synthétiques successives. Les résultats de ces derniers ont montré que l'extrait de *Cordyceps militaris* est accordé d'une bonne activité réductrice avec $IC_{50}^{DPPH}(0,27\pm 14,76)mg/ml$; $IC_{50}^{ABTS}(0,25\pm 15,62)mg/ml$; $IC_{50}^{FRAP}(0,08\pm 0,33)mg/ml$. D'autre part, la corrélation entre les tests de l'activité antioxydante DPPH, ABTS et FRAP a montré une forte corrélation. Par ailleurs, une bonne corrélation a été dévoilée entre les teneurs en phénols totaux et les flavonoïdes et l'activité antioxydante.

Mots clés : *Cordyceps militaris* - Phénols totaux- Flavonoïdes- Activité antioxydante- DPPH- FRAP- ABTS- Extrait aqueux

Abstract

Plants have always been an important source of medicine. Most people in the world, only use traditional herbal remedies to treat themselves, Among these plants, *Cordyceps militaris* is one of the important medical fungi in Asian countries, because of its various beneficial effects on human health. The objective of this work is the phytochemical analysis and evaluation of the in vitro antioxidant activity of an aqueous xtra of *Cordyceps militaris* plants. The total polyphenols content was determined by the FolinCiocalteuen method using gallic acid as a standard. While, flavonoids have been quantified by the method of aluminum trichloride of which quercetin is used as standard. The results revealed the richness of *Cordyceps militaris* extract in phenolic compounds and flavonoids with contents of (747,35±5,91)mg EAG/g and (441,18±1,38)mg EQ/grespectively. The evaluation of antioxidant activity by the oxidation test of the radical 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ABTS (2,2- azinobis- [3- ethylbenzothiazoline-6- sulfonicacid]), and the ferric iron test (FRAP) using ascorbic acid and Trolox as successive synthetic references. The results of these studies showed that *Cordyceps militaris* extract is given a good reducing activity with $IC_{50}^{DPPH}(0,27\pm14,76)mg/ml$; $IC_{50}^{ABTS}(0,25\pm15,62)mg/ml$; $IC_{50}^{FRAP}(0,08\pm0,33)mg/ml$. On the other hand, the correlation between the antioxidant activity tests DPPH, ABTS and FRAP showed a strong correlation. In addition, a good correlation was revealed between total phenol levels and flavonoids and antioxidant activity.

Keywords: *Cordyceps militaris* - Total phenols- Flavonoids- Antioxidant activity- DPPH- FRAP- ABTS- Aqueous extract

الملخص

لطالما كانت النباتات مصدرا مهما للطب. معظم الناس في العالم , استخدم فقط العلاجات العشبية التقليدية للعلاج الذاتي , من بين هذه النباتات, *Cordyceps militaris* هو واحد من الفطر الطبي المهم في البلدان الآسيوية, بسبب آثاره المفيدة المختلفة على صحة الإنسان. يهدف العمل الحالي إلى التحليل الكيميائي النباتي وتقييم نشاط مضادات الأكسدة في المختبر من مستخلص مائي من النباتات *Cordyceps militaris*, تم تحديد محتوى polyphénols totaux بواسطة طريقة Folin Ciocalteu استخدام *acide gallique* كمعيار, في حين , تم تحديد كمية flavonoïdes بالطريقة , *trichlorure d'aluminium* الذي يستخدم *quercétine* كمعيار, كشفت النتائج عن ثراء مستخلص *Cordyceps militaris* في المركبات *Phénols totaux* و flavonoïdes مع بمحتويات (747,35±5,91) mg EAG/g و (441,18±1,38) mg EQ/g على التوالي, تقييم النشاط المضاد للأكسدة عن طريق اختبار *2,2- diphényl-1-picrylhydrazyl* (*DPPH*) , *l'oxydation du radical le 2,2- diphényl-1-picrylhydrazyl* (*FRAP*) باستخدام *l'acide ascorbique* أو *Trolox* كمراجع الاصطناعية المتعاقبة. وأظهرت نتائج هذا الأخير أن مقتطف من *Cordyceps militaris* وهبت مع نشاط الحد جيدة مع IC_{50}^{DPPH} (14,76±0,27) mg/ml و IC_{50}^{ABTS} (15,62±0,25) mg/ml و IC_{50}^{FRAP} (0,33 ± 0,08) mg/ml, من ناحية أخرى , أظهرت العلاقة بين اختبارات النشاط المضاد للأكسدة *DPPH* , *ABTS* و *FRAP* وجود علاقة قوية , علاوة على ذلك , تم الكشف عن علاقة جيدة بين إجمالي محتويات *phénols totaux* و flavonoïdes والنشاط المضاد للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: *Cordyceps militaris* - *Flavonoïdes* - *Phénols totaux* - نشاط مضاد للأكسدة - *FRAP* - *DPPH* - *ABTS* - *extractAqueous* -

A decorative frame with a double-line border, featuring a central scalloped shape and four rounded corners with inward-pointing tabs.

Introduction

Introduction

À travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales dans l'objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé (Iserin, 2001).

De nos jours, avec les progrès de la recherche scientifique, la science reconnaît et confirme différentes vertus des plantes et leurs constituants actifs. Elles ont un domaine d'application très varié et sont très utilisées dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique, parfumerie, agroalimentaire (Segnou et al., 1992). Les vertus thérapeutiques des plantes connaissent un regain d'intérêt (Bourgau et al., 2001), grâce à l'amélioration des techniques extractives et aux progrès des méthodes d'analyses structurales, pour la découverte de nouveaux principes actifs qui sont liés aux produits des métabolites secondaires. On estime que deux tiers des médicaments actuels ont une origine naturelle ou par modification d'un produit naturel qui sont largement utilisés en thérapie, essentiellement les antioxydants qui défendent contre le stress oxydatif (Kar, 2007). Ou autres comme des agents préventifs anti-inflammatoires, antimicrobiens, antiseptiques, diurétiques (Newman et al., 2007).

Le Champignon médicinaux est une source abondante de produits naturels utiles ayant diverses activités biologiques. De nombreuses espèces de champignons ont été utilisées il y a longtemps dans les médecines traditionnelles. Le Genre *Cordyceps*, nom donné aux champignons sur les insectes et son existence est connue depuis 2000 avant J.-C (Gu et al., 2007). L'un des plus importants médicaments traditionnels chinois, qui appartient à la classe des Ascomycètes. Il a été largement utilisé comme médicament brut et comme aliment tonique populaire en Asie orientale (Ying et al., 1987). Il contient de nombreux types de composants actifs (comme La cordycépine, les polysaccharides, l'ergostérol, le mannitol, etc.). En raison de ses diverses activités physiologiques, il est maintenant utilisé à de multiples fins médicinales (Mizuno et al., 1999; Nag et al., 2005). C'est pourquoi nous sommes intéressés à effectuer une étude phytochimique et à évaluer l'activité antioxydante de l'extrait aqueux de *Cordyceps militaris*.

Le *Cordyceps militaris* étant reconnu comme un champignon médicinaux et comestible, à révéler de nouvelles molécules bioactives intéressantes, qui pourraient être isolées de cette espèce. Les composés hydrophiles et lipophiles ont été analysés par des techniques chromatographiques couplées à différents détecteurs. (Yakhlef et al., 2011).

La présente étude a pour objectif la valorisation des champignons médicinaux et comestibles, afin de développer de nouveaux composés ou principes actifs à intérêts thérapeutiques. Pour cela, nous avons envisagé de réaliser une étude phytochimique par un dosage spectrophotométrique des polyphénols totaux et des flavonoïdes. Ainsi, l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante de l'extrait aqueux de *Cordyceps militaris* en utilisant trois méthodes, à savoir la technique de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2, 2'-azynobis-3 éthylbenzothiazoline-6- sulfonate) et la technique de FRAP (ferric reducing antioxidant power ; pouvoir antioxydant réducteur du fer).

De ce fait, Ce manuscrit est subdivisé en trois parties. La première partie est consacrée à rassembler des données bibliographiques sur les plantes médicinales et les principes actifs. Ainsi, un aperçu simplifié sur l'activité antioxydante. La seconde concerne l'approche expérimentale qui a pour but d'évaluer le profil phytochimique (polyphénols et flavonoïdes) et l'activité antioxydante de l'extrait aqueux de *Cordyceps militaris*. Les résultats et discussion sont rassemblés dans cette partie. Enfin une conclusion générale est donnée avec des perspectives.



Partie Bibliographique

A decorative frame with a double-line border, featuring a central pointed top and bottom, and rounded, slightly flared sides.

Chapitre 1

Plante Medicinales

I. Plante Médicinale

I.1. Historique

D'après la Xème édition de la Pharmacopée française, les plantes médicinales "sont des drogues végétales au sens de la Pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses". Ces plantes médicinales peuvent également avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques. En d'autres termes, nous pouvons dire qu'une plante médicinale est une plante dont un des organes. Par exemple la feuille ou l'écorce, possède des vertus curatives lorsqu'il est utilisé à un certain dosage et d'une manière précise (**Debuigne, 1974**).

Dans le Code de la Santé Publique, il n'existe pas de définition légale d'une plante médicinale au sens juridique (**Moreau, 2003**).

Pourtant en France, une définition officielle en est donnée par la jurisprudence : "une plante est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et que son usage est exclusivement médicinal. C'est-à-dire que les plantes sont présentées pour leurs propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales. Dans le seul cas où ces deux conditions sont réunies. Alors, la plante appartient à l'usage pharmaceutique. Elles sont considérées comme des médicaments et leur vente est exclusivement réservée aux pharmaciens". Il existe pourtant une exception pour 148 d'entre elles qui sont, par dérogation, en vente libre. On peut distinguer deux types de plantes médicinales : En premier lieu, se trouve l'allopathie dans laquelle les plantes ont une action importante et immédiate. Beaucoup des plantes utilisées dans ce mode de traitement peuvent s'avérer toxiques. En effet, deux tiers des médicaments sur le marché sont d'origine naturelle, principalement végétale (**Moreau, 2003**).

Puis on différencie les plantes dépourvues d'effet iatrogène mais ayant une activité faible. Elles sont utilisées en l'état ou dans des fractions réalisant le totum de la plante, soit la totalité des constituants (**Moreau, 2003**).

La plante, organisme vivant, marque son identité par des spécificités morphologiques, à l'origine de la classification botanique, mais aussi biochimiques, liées à des voies de biosynthèses inédites, représentant l'intérêt de l'usage des plantes médicinales (**Bruneton, 1987**).

I.2. Généralité sur les plantes

Les plantes ont toujours été une importante source de médecine. Même aujourd'hui, la plupart des gens dans le monde, en particulier dans les pays en développement, n'utilisent que

des remèdes traditionnels à base de plantes pour se soigner (**Hostettman, Poteratte et al., 1998**).

Les remèdes naturels, en particulier les plantes médicinales, ont longtemps été la principale source de médicaments pour nos grands-parents. Bien que, les progrès remarquables de l'industrie pharmaceutique aient permis à la médecine moderne de traiter un large éventail de maladies souvent mortelles. Environ 80% de la population mondiale bénéficie des apports de la médecine Identification de la phytothérapie traditionnelle et connaissance empirique de nos ancêtres (**El-rhaffari et Zaid, 2004**).

La plupart des espèces végétales cultivées dans le monde ont des vertus thérapeutiques. Car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. Ils sont utilisés en médecine traditionnelle et en phytothérapie : ils présentent des avantages qui manquent généralement aux médicaments. Les progrès de la physiologie et de la pharmacologie ont permis de comprendre les mécanismes d'action de ces substances naturelles. Depuis des décennies, la compréhension de la relation qui existe entre la structure moléculaire et son activité biologique, a permis la conception et la fabrication de médicaments de synthèse aux propriétés améliorées, ou à un meilleur contrôle des effets indésirables (**Iserin, 1996**).

I.3. Définition de plante médicinale

On peut distinguer dans le code de la santé publique, il n'existe pas de définition légale d'une plante médicinale au sens juridique, mais en France "une plante" est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et que son usage est exclusivement médicinal. C'est-à-dire qu'elles sont présentées pour leurs propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales (**Ghabrier, 2010**).

Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (**Elqaj et al., 2007**).

Il n'existe pas de définition légale d'une plante médicinale au sens juridique dans le code de la santé publique, mais en France une "plante" est dite plante médicinale lorsqu'elle est inscrite à la Pharmacopée et utilisée uniquement à des fins médicinales. C'est-à-dire qu'ils surviennent pour leurs propriétés préventives ou thérapeutiques contre les maladies humaines ou animales (**Moreau, 2003 et Ghabrier, 2010**).

I.4. Intérêt de l'étude des plantes médicinales

Les plantes médicinales sont la principale source de médicaments et des substances actives utilisées pour les fabriquer. Leur importance a augmenté avec les progrès de la civilisation et, au cours des dernières décennies, la recherche pharmaceutique a décrypté la

composition chimique de nombreuses plantes médicinales. L'industrie pharmaceutique a réussi à répliquer chimiquement de nombreux composants, et à découvrir de nouvelles combinaisons au bénéfice des patients et de la préservation des ressources naturelles (**Kunkele et Lobmeyer, 2007**).

I.5. Les avantages des plantes médicinales

En général, peu ou même de plantes médicinales sont couramment utilisées. Aucun effet secondaire: C'est l'un de leurs principaux avantages. De plus, la synergie. Divers ingrédients commencent à être mieux compris et acceptés scientifiquement (**Decaux, 2002**). Contrairement à certaines croyances populaires, il existe plusieurs plantes qui ont réellement un effet. Métaboliser immédiatement (**Pinto et al., 2003; Salgueiro et al., 2003**).

Les drogues synthétiques, en revanche, ont tendance à avoir un effet plus direct et spectaculaire car leur formule est instantanément absorbée par l'organisme. Il est également, plus facile de déterminer leur composition exacte, leur état. Protéger (**Simony, 2001**).

I.6. Les inconvénients des plantes médicinales

I.6.1. Intoxication

Les plantes peuvent contenir des composés chimiques puissants, responsables d'effets indésirables et de toxicité. Leur utilisation nécessite une vigilance continue. Des études antérieures du Centre Anti Poison d'Alger montrent que l'intoxication par les plantes présente 2,34% en 2007 parmi tous les cas d'intoxications mais avec un nombre de décès élevé « 21 cas décès » (**Durrity, 1994**).

I.6.2. Interaction

La prise simultanée de plantes médicinales et de médicaments peut entraîner l'interaction des deux remèdes et l'apparition d'effets secondaires. Parfois graves par exemple le millepertuis peut inhiber l'effet de médicaments comme la digoxine, la théophylline. L'anti coagulant à base d'anti-vitamine K, des contraceptifs oraux et certains antidépresseurs (**Durrity, 1994**).

I.6.3. Allergie

Les herbes des foies contiennent des substances qui causent des allergies. C'est le cas par exemple de « Aloe Vera ». Certaines plantes peuvent provoquer une allergie grave de l'organisme ' choc anaphylactique ' nécessiter une intervention médicale immédiate (**Durrity, 1994**).

I.6.4. Les enfants

Les doses d'herbes ont été conçues dans la plupart des cas pour s'adapter à des adultes; et quelques types seulement sont adaptés aux enfants. Vous ne devriez pas donner

aux enfants de certains types de plantes sans avoir consulté votre médecin et faites attention lorsque vous l'utilisez (Durrity, 1994).

I.6.5. Grossesse et allaitement

Certaines plantes peuvent causer des dommages, peuvent même aller jusqu'à l'avortement. Parce qu'il fonctionne sur la contraction des muscles de l'utérus. Il n'est pas recommandé d'utiliser des herbes pendant une longue période avant et après la grossesse le cas de « Gingembre » (Durrity, 1994).

I.6.6. Hypertension artérielle

Certaines plantes peuvent provoquer une diminution de la pression artérielle, comme c'est le cas dans les herbes diurétiques (Durrity, 1994).

I.6.7. Diabète

Il faut éviter de manger certaines herbes qui peuvent influencer sur le diabète, ou des médicaments pour traiter le diabète 'insuline ou hypoglycémifiants' ou affecter sur la sécrétion pancréatique d'insuline, ou de réduire l'absorption du sucre par les cellules (Durrity, 1994).

I.7. Importance de l'utilisation des plantes médicinales

Il est acquis que les plantes médicinales sont en mesure de soigner des maladies simples comme le rhume, ou d'en prévenir de plus importantes comme l'ulcère, la migraine, l'infarctus en plus de certaines allergies ou affections. Si l'on y ajoute leurs vertus réparatrices, tonifiantes, sédatives, revitalisantes ou immunologiques, on mesure mieux l'aide précieuse qu'elles sont susceptibles de nous apporter au quotidien (Anonyme, 2005).

I.7.1. Parties des plantes utilisées

En phytothérapie, on utilise la plante entière ou seulement une partie de la plante (la feuille, la fleur, la sommité fleurie). Chaque organe peut contenir des principes actifs spécifiques et donc avoir un effet particulier.

Les parties des plantes utilisées par ordre de croissance sont :

- Les feuilles
- La tige
- L'écorce
- Le bois
- Les bourgeons
- Les racines, les rhizomes, les bulbes
- Les fleurs
- Les sommités fleuries
- Les fruits (ex: jus), la queue des fruits

- Les graines (**Larousse des plantes médicinales, 2002**).

I.7.2. Les formes d'utilisation des plantes médicinales

La pharmacie galénique est l'art de transformer une substance présentant une activité thérapeutique en un médicament aisément utilisable pour un homme : les plantes peuvent adopter de nombreuses formes (**Fig.1**) galéniques (**Salle, 1991**).

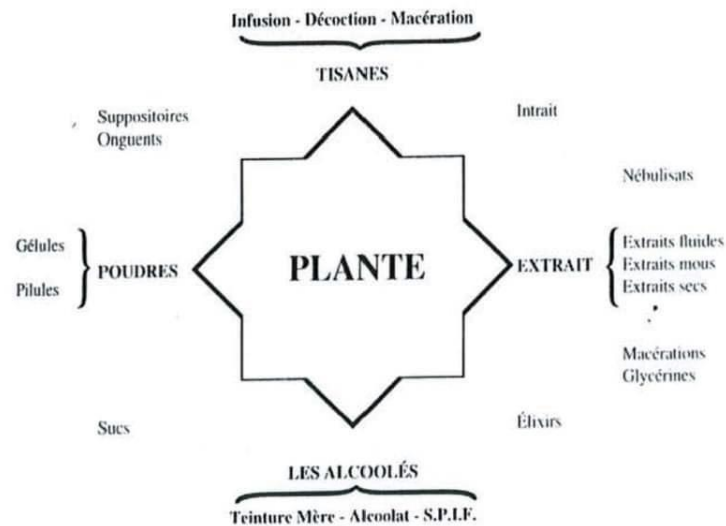


Figure1: Les différentes formes galéniques en phytothérapie (**Salle, 1991**).

I.8. Composantes des plantes médicinales

I.8.1. Définition de principe actif

Le principe actif est une molécule contenue dans une drogue végétale ou dans une préparation à base de drogue végétale. Il est utilisé pour la fabrication des médicaments (**Pelt, 1980**). Cette molécule présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'homme ou l'animale, elle est issue de plantes fraîches ou des séchées. Les parties utilisées sont comme suit: les racines, écorces, sommités fleuries, feuilles, fleurs, fruits, ou encore les graines (**Benghanou, 2012**).

Les plantes contiennent des métabolites secondaires peuvent être considérées comme des substances indirectement essentiels à la vie des plantes. Par contre, les métabolites primaires sont les principales dans le développement et la croissance de la plante. Les métabolites secondaires participent à l'adaptation de la plante avec l'environnement. Ainsi à la tolérance contre les chocs (lumière UV, les insectes nocifs, variation de la température ...) (**Sarnimanchado et Cheynier, 2006**).

I.8.2. Les huiles essentielles

Ce sont des molécules à noyau aromatique et caractère volatil offrant à la plante une odeur caractéristique. On trouve ces molécules dans les organes sécréteurs (**Iserin et al., 2001**).

Ces huiles jouent un rôle de protection des plantes contre un excès de lumière et attirent les insectes pollinisateurs (**Dunstan et al., 2013**).

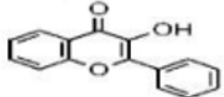
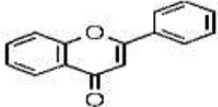
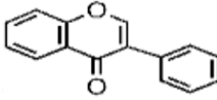
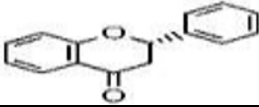
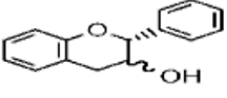
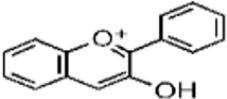
Ils sont utilisés pour soigner des maladies inflammatoires, telles que les allergies, l'eczéma, et soulagent les problèmes intestinaux (**Iserin et al., 2001**). Leur utilisation est également présente dans l'industrie cosmétique et alimentaire (**Kunkele et Lobmeyer, 2007**).

I.8.3. Les flavonoïdes

Terme en latin; flavus= jaune. Les flavonoïdes ont une structure de C₆-C₃-C₆ à poids moléculaire faible. Ils peuvent être considérés parmi les agents responsables des couleurs de plante à côté des chlorophylles et caroténoïdes (**Wichtl et Anton, 2009**).

Les flavonoïdes ont des sous-groupes caractérisés à contenant deux ou plusieurs cycles aromatiques (**Tab.1**) existent sous forme libre, dite aglycone ou sous forme d'hétérosides. Chacun portant une ou plusieurs groupes hydroxyles phénoliques et reliés par un pont carboné (**Heller et Forkmann, 1993**).

Tableau 1: Représente la structure de base des principaux flavonoïdes (**Harborne et Williams, 2000**).

Sous classe	Structure
Flavonoles	
Flavones	
Isoflavones	
Flavanones	
Flavan-3-ol	
Anthocyanes	

I.8.4. Les alcaloïdes

Sont des substances naturelles azotées à réaction basique fréquente issus d'acides aminés. En général, ils portent le nom du végétal qui les contient (**Fig.2**) (**Kunkele et Lobmeyer, 2007**).

Tous les alcaloïdes ont une action physiologique intense, médicamenteuse ou toxique. Très actifs, les alcaloïdes ont donné naissance à de nombreux médicaments (**Ali-Delille, 2013**).

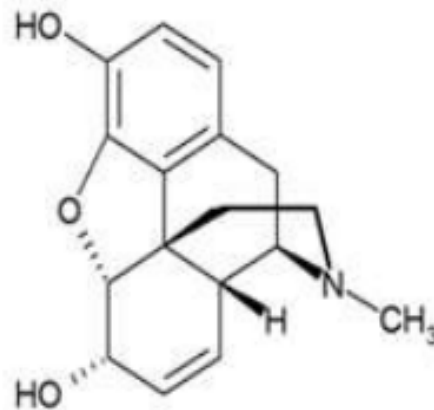


Figure 2: Exemple d'alcaloïde la morphine (**Osbourn et Lanzotti, 2009**).

I.8.5. Substances amères

Forment un groupe très diversifié de composants dont le point commun est l'amertume de leur goût. Cette amertume stimule les sécrétions des glandes salivaires et des organes digestifs, ces sécrétions augmentent l'appétit et améliorent la digestion. Avec une meilleure digestion, et l'absorption des éléments nutritifs adaptés, le corps est mieux nourri (**Iserin et al., 2001**).

I.8.6. Tanins

C'est un terme provient d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour tanner les peaux d'animaux (**Hopkins, 2003**).

C'est une substance amorphe contenue dans de nombreux végétaux. Elle est employée dans la fabrication des cuirs car elle rend les peaux imputrescibles. Elle possède en outre des propriétés antiseptiques mais également antibiotiques, astringentes, anti-inflammatoires, anti-diarrhéiques, hémostatiques et Vasoconstrictrices (**Ali-Delille, 2013**). Les plantes contenant du tanin sont par exemple le chêne (**Kunkele et Lobmeyer, 2007**).

I.8.7. Glucosides

Les glucosides sont des composés organiques très répandus, contenus dans un grand nombre de préparations pharmaceutiques (**Kunkele et Lobmeyer, 2007**).

I.8.8. Saponosides

Le terme saponoside est dérivé de mot savon, sont des terpènes glycolyses comme ils peuvent aussi se trouve sous forme aglycones. Ils ont un goût amer et acre (**Hopkins, 2003**).

Ils existent sous deux formes, les stéroïdes et les terpénoïdes(**Iserin et al., 2001**).

I.8.9. Les phénols

Sont des petites molécules constituées d'un noyau benzénique et au moins d'un groupe hydroxyle. Ces phénols sont solubles dans les solvants polaires. Leur biosynthèse dérive de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (**Wichtl et Anton, 2009**).

Les phénols possèdent des activités anti-inflammatoires, antiseptiques et analgésiques (**Iserin et al., 2001**).

I.8.10. Les glucosinolates

Provoquent un effet irritant sur la peau, causant inflammation et ampoules. Appliqués comme cataplasme sur les articulations douloureuses. Ils augmentent le flux sanguin dans la zone irritée, favorisant ainsi l'évacuation des toxines (**Iserin et al., 2001**).

I.9. Phytothérapie

La phytothérapie est le traitement par les plantes (**Bruneton, 1999**). C'est une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de végétaux, de parties de végétaux ou de préparations à base de végétaux, qu'elles soient consommées ou utilisées en voie externe (**Wichtl et Anton, 2003**).

I.9.1. La phytothérapie traditionnelle

C'est une thérapie de substitution qui a pour but de traiter les symptômes d'une affection. Ses origines peuvent parfois être très anciennes et elle se base sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Elles concernent notamment les pathologies saisonnières depuis les troubles psychosomatiques légers jusqu'aux symptômes hépatobiliaires, en passant par les atteintes digestives ou dermatologiques (**Prescrire, 2007**).

I.9.2. La phytothérapie clinique

C'est une approche globale du patient et de son environnement est nécessaire pour déterminer le traitement, ainsi qu'un examen clinique complet. Son mode d'action est basé sur un traitement à long terme agissant sur le système neuro-végétatif. Dans ce type les indications sont liées à une thérapeutique de complémentarité. Elles viennent compléter ou

renforcer l'efficacité d'un traitement allopathique classique pour certaines pathologies (Moreau, 2003).

I.9.3. Principe de la phytothérapie

En phytothérapie, les plantes sont également utilisées comme des médicaments pour réguler les fonctions du corps. Selon les phytothérapeutes, une maladie ne survient pas par hasard. Elle est la conséquence d'un déséquilibre interne à l'organisme qui doit en permanence s'adapter à son environnement. La phytothérapie s'attache à analyser les systèmes constitutifs de l'organisme : systèmes neuroendocrinien, hormonal, immunitaire, système de drainage (Devoyer, 2012).

I.9.4. Intérêt de la phytothérapie

La phytothérapie se pratique sous différentes formes et uniquement dans le cas de maladies « bénignes ». Bien sûr, bon nombre de symptômes nécessitent des antibiotiques ou autres traitements lourds. Dans d'autres cas, se soigner par les plantes représente une alternative reconnue par la médecine et dénuée de tout effet toxique pour l'organisme (Berlencourt, 2008-2017).

A decorative frame with a double-line border, featuring a central pointed top and bottom, and rounded, slightly flared sides.

Chapitre 2

Stress Antioxydant

II. Antioxydants et radicaux libres

II.1. Radicaux libres

II.1.1. Généralité

Un radical libre est un atome ou une molécule très instable, qui porte sur sa couche électronique périphérique un ou plusieurs électrons, non couplés à un électron de spin opposé. Cela entraîne une très haute réactivité chimique avec les éléments voisins. (**Rochette, 2008; Guillouty, 2016**).

Les radicaux primaires les plus importants sont dérivés d'oxygène tels, l'anion super oxyde O_2^- et le radicale hydro peroxyde ou l'azote tel le monoxyde d'azote NO (**Christelle, 2006**). Les radicaux primaires ont un rôle physiologique particulier. Par contre, les radicaux secondaires, issus de la réaction des radicaux primaires avec des entités biochimiques cellulaires (lipides, protéines, glucides...) (**Favier, 2003; Belkheiri, 2010**).

Le radical NO (NO^\bullet) est produit dans les organismes supérieurs par l'oxydation de l'un des atomes terminaux de guanidoazote de L'arginine.

Ce processus est catalysé par l'enzyme NOS. Selon le microenvironnement, le NO peut être converti en diverses autres espèces réactives d'azote (RNS), telles que le cation nitrosonium (NO^+), anion nitroxyle (NO^-) ou peroxydinitrite ($ONOO^-$) (**Baet al., 1996**).

II.1.2. Définition

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (ERO) (**Favier, 2003**).

Les radicaux libres sont électriquement neutres ou chargés (ioniques) (**Eboh, 2014**). Actuellement, on emploie le terme « espèces réactives de l'oxygène » pour désigner un ensemble plus large de molécules:

- les ERO caractérisés par un électron non apparié : l'anion superoxyde (O_2^-), les radicaux hydroxyles (HO^\bullet), radicaux peroxy les (ROO^\bullet), alkoxyde (RO^\bullet).
- les ERO non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singlet (1O_2) et le peroxydinitrite ($ONOO^-$) (**Favier, 2003**).

II.2. Les espèces réactives de l'oxygène radicalaires

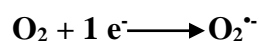
On distingue alors deux grands groupes de molécules réactives impliquées dans le stress oxydant: les espèces radicalaires et les espèces non-radicalaires.

La réactivité d'un radical libre varie d'un radical à un autre et dépend de l'environnement où ils se trouvent. Leurs constantes de vitesse réactionnelle sont très élevées (Delattre et al., 2005).

II.2.1. Les espèces oxygénées réactives radicalaires

II.2.1.1. L'anion superoxyde

C'est la forme réduite de l'oxygène moléculaire (O_2) par la réception d'un électron (Halliwell, 1989) :



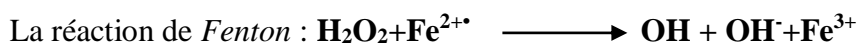
L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) est considéré comme le type le moins réactifs des espèces réactif de l'oxygène (Halliwell, 1989; Huet & Duranteau, 2008 ; Miller et al., 2005).

Il est formé lors du transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire et la principale source, c'est l'explosion oxydative des cellules phagocytaires qui entré en contact avec des antigènes (microbe pathogène, bactérie...). Les cellules phagocytaires connues pour produire l'anion superoxyde sont : les Nitrophile, les éosinophiles, les monocytes et les macrophages (Favier, 2003 ; Scheibmeir et al., 2005).

L'anion superoxyde joue un rôle important dans la génération de d'autres radicaux libres, tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radicale hydroxyle (OH^{\cdot}) et peut réagir avec l'oxyde nitrique (NO^{\cdot}) pour former le peroxy nitrite ($ONOO^{\cdot}$) (Lone et al., 2013; Huet et Duranteau, 2008; Eboh, 2014).

II.2.1.2. Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) provient de la réduction du peroxyde d'hydrogène ; c'est une forme très réactive. Il se forme, par la réaction de Haber-Weiss ou par la réaction de Fenton, en présence de métaux de transition tel que le Fe^{2+} ou le Cu^{2+} (Halliwell, 2001 ; Rees et al., 2004 ; Eboh, 2014) :

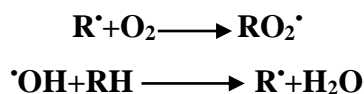


Le radical hydroxyle OH^{\cdot} a une courte demi-vie. Il représente une source potentielle des lésions moléculaires, tissulaires et cellulaires. Ce radical intervient directement et très rapidement dans la dégradation de l'ADN, la peroxydation lipidique et l'oxydation des protéines (Deby-Dupont et al., 2002; Scheibmeir et al., 2005; Eboh, 2014).

II.2.1.3. Les radicaux alkyles et pyroxyles

Les radicaux alkyles (R^{\cdot}) sont les derniers maillons dans la chaîne de production des espèces réactives de l'oxygène. Ils sont les résultats de l'action oxydante du OH^{\cdot} sur les

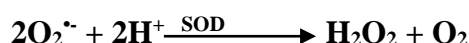
chaînes d'acides gras polyinsaturés. Les radicaux alkyles (R[•]) et pyroxyles (ROO[•]) sont à l'origine des processus radicalaires en chaîne et en particulier de la peroxydation lipidique (Rees et al., 2004 ; Eboh, 2014) :



II.2.1.4. Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est une molécule stable et facilement diffusable à travers les membranes cellulaires avec une longue demi-vie (Rees et al., 2004; Huet et Duranteau, 2008).

L'anion superoxyde qui reçoit un électron d'hydrogène peut former le peroxyde d'hydrogène par un processus appelé dis mutation. Cette réaction est catalysée par une enzyme appelée ainsi la superoxyde dis mutase (SOD) (Schneider et Reischak de Oliveira, 2004; Scheibmeir et al., 2005; Eboh, 2014) :



Le peroxyde d'hydrogène est capable de générer les radicaux libres hautement réactifs, en présence des métaux de transition (fer et cuivre), pour donner via la réaction de Fenton le radical hydroxyle (Halliwell, 2001 ; Deby-Dupont et al., 2002 ; Eboh, 2014).

II.2.2. Les espèces réactives d'azote

II.2.2.1. Espèces radicalaires azotées

Apparu au cours de la dernière décennie, le **monoxyde d'azote (NO[•])** a pris une place considérable en biologie. Malgré son rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydant en limitant la lipoper oxydation et ses effets anti-inflammatoires. Il est paradoxalement impliqué dans de nombreuses pathologies telles que le diabète, l'athérosclérose, le cancer et les lésions neuronales dégénératives.

II.2.2.2. Espèces non radicalaires azotées

Caractérisé par sa grande faculté de diffusion dans les membranes cellulaires et sa réactivité moyenne (de l'ordre de quelques secondes *in vivo*). Le monoxyde d'azote radicalaire peut aisément réagir avec la plupart des espèces oxygénées et se transformer en dioxyde d'azote (NO₂) (NO^{2•}+O₂→ 2NO₂). Lequel peut donner du trioxyde d'azote (N₂O₃) (NO[•]+NO₂→N₂O₃), pour enfin aboutir à un ion nitrate stable (NO₂⁻)(N₂O₃ + H₂O → 2NO₂⁻ + 2H⁺). De plus, le monoxyde d'azote forme avec l'ion superoxyde le peroxy nitrite (ONOO⁻) (NO[•]+O₂⁻→ ONOO⁻), moins réactif que son précurseur azoté, mais responsable de

l'oxydation de nombreuses biomolécules (protéines, lipides et acides nucléiques) (Sumaya, 2004).

II.3. Les sources de production des radicaux libres

II.3.1. Les sources endogènes

On distingue deux sources endogènes ; l'une enzymatique et l'autre non enzymatique :

II.3.1.1. Les sources non enzymatiques

II.3.1.1.1. La chaîne respiratoire mitochondriale

La principale source des espèces radicalaires de l'oxygène réside dans la respiration mitochondriale. En effet, l'oxygène est indispensable à la production d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) dans la cellule. Cette production d'énergie, appelée phosphorylation oxydative se fait via les chaînes de transports des électrons au sein de la membrane interne mitochondriale. La réduction tétravalente de l'oxygène en eau se déroule en plusieurs étapes successives donnant naissance à des intermédiaires potentiellement réduits appelés les ERO. On estime que 2 à 5% de l'oxygène consommé au niveau mitochondrial est transformé en $O_2^{\cdot -}$ de manière continue et physiologique (Halliwell, 1989; Aravind et al., 2003; Appel et Hirt, 2004; Rees et al., 2004).

II.3.1.1.2. La phagocytose

Les radicaux libres dérivés du métabolisme sont produits dans toutes les cellules. De même, si certaines en fabriquent des quantités plus importantes particulièrement au niveau des polynucléaires, des neutrophiles et des macrophages pendant la phagocytose. Les neutrophiles sont les leucocytes les plus importantes au début de la reperfusion et ils contiennent dans leur membrane plasmique la NADPH-oxydase qui réduit l'oxygène moléculaire en anion superoxyde. Ce dernier se produit par dis mutation de l'eau oxygénée (Favier, 2003; Vamecq et al., 2004).

II.3.1.1.3. Les peroxysomes

Ils sont le siège d'une forte activité métabolique très centrée sur le métabolisme oxydatif et ils possèdent de nombreux systèmes antioxydants et pro-oxydants. En fait, les peroxysomes se sont des vésicules cytoplasmiques minuscules entourées d'une membrane simple, contenant des oxydases et des enzymes spécifiques des métabolismes du peroxyde d'hydrogène (Ji et Leichtweis, 1997; Lone et al., 2013).

II.3.1.2. Les sources enzymatiques

II.3.1.2.1. La xanthine-oxydase

D'une part, elle catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande d'ATP et déficit en oxygène. D'autre part, la xanthine-oxydase peut

également catalyser l'oxydation de la xanthine en acide urique notamment lors d'ischémie-reperfusion ou d'hypoxie. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électrons produisant $O_2^{\cdot-}$ (Ji et Leichtweis, 1997).

II.3.1.2.2. La NADPH oxydase membranaire

En plus de la production des ROS par la respiration mitochondriale, la NADPH oxydase membranaire (NOx) est capable de produire des radicaux superoxydes. La NOx est une enzyme qui catalyse la réduction de l' O_2 en utilisant comme donneur d'électron le nicotinamide adénine di-nucléotide phosphate (NADPH dans sa forme réduite ou NADP dans sa forme oxydée (Al-Dalaen et Al-Qtaitat, 2014) :



Cette enzyme est importante dans les cellules phagocytaires pour assurer la défense de l'organisme contre les pathogènes. Elle existe également dans les autres cellules non phagocytaires et participe à la signalisation cellulaire. Elle est localisée à la membrane cytoplasmique et dans certains granules des polynucléaires neutrophiles (Deby-Dupont et al., 2002).

II.3.2. Sources exogènes

Il existe également différents phénomènes induisant la formation des radicaux libres ou des molécules favorisant leur formation. Parmi ces facteurs on trouve :

- l'alimentation : l'alcool, les additifs, le café, les nourritures d'origine animale.
- les polluants : fumé de la cigarette, air atmosphérique, produits de nettoyage, solvant industriel...
- des métaux toxique : le cadmium, le nickel, l'arsenic, l'amiante, ainsi que les métaux de transition telle que le mercure et le fer.
- les médicaments : adriamycine, bleomycine,...
- les radiations : ionisantes, les rayons X et gamma ou ultra-violette sont capables de produire des anions superoxyde et l'oxygène singulet.
- les pesticides. (Favier, 2003 ; Rees et al., 2004).

II.2. Le Stress Oxydatif

II.2.1. Définition

Le stress oxydant se définit par un déséquilibre profond entre les antioxydants et les prooxydants en faveur de ces derniers. Cette situation peut résulter d'une déficience ou défaillance en systèmes antioxydants, des troubles de production, de distribution ou d'une abondance accrue des prooxydants (Pincemail et al., 2002).

Des études ont mis en évidence l'implication des facteurs alimentaires, notamment les micronutriments dans la modulation de ce phénomène (**Berger, 2006**).

Le mot prooxydant désigne toute espèce réactive de l'oxygène et de l'azote, radicalaire ou non radicalaire (**Achach, 2006**).

Un radical libre est une espèce chimique, molécule ou atome, capable d'avoir une existence indépendante en contenant un ou plusieurs électrons célibataires. Le radical libre à la propriété d'être instable, très réactif avec une durée de vie très courte. Pour devenir stable, il aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron, par l'oxydation d'un autre composé (**Goudable, Favier, 1997**).

II.2.2. Origine du stress

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques, car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales. On dit que la balance antioxydants /prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé «stress oxydant » (**Favier, 2003**).

II.2.3. Généralités sur les antioxydants

L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies. Mais l'oxygène peut être également une source d'agression pour ces organismes.

En effet des dérivés hautement Réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet Des rayons U.V, des radiations ionisantes et de métaux de transition (**Ekoumou, 2003**).

Les formes de L'oxygène provoquant ces troubles sont: l'oxygène singulet O_2 , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , les peroxydes alkyles $ROOH$, le radical superoxyde O_2 , les radicaux hydroxyles HO , Peroxydes ROO et alkoxydes RO (**Cavin, 1999**).

Les conséquences au niveau de l'organisme se font ressentir sur l'ADN, les lipides et les protéines (**Ahamet, 2003**).

II.2.4. Définition

Un antioxydant est une molécule naturelle ou synthétique qui inhibent ou retardent l'oxydation d'autres molécules en intervenant à différents stades du processus d'oxydation (**Maurent, 2017**).

C'est une molécule suffisamment stable pour donner un électron à un radical libre déchaîné et le neutraliser, réduisant ainsi sa capacité d'endommager (**Nimse et Pal, 2015**).

Il peut agir de différentes façons : piéger les composés qui initient la réaction radicalaire, piéger les ions métalliques tel que Fe^{2+} , neutraliser l'anion Superoxyde pour éviter la formation de peroxydes, terminer la réaction de propagation dans la réaction radicalaire mise en place ou réduire la concentration en O_2 (Maurent, 2017).

II.2.5. Classification des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés de plusieurs façons :

II.2.5.1. En fonction de leur activité

Ils peuvent être classés comme enzymatiques et non enzymatiques :

II.2.5.1.1. Les antioxydants enzymatiques

Cela fonctionne en brisant les radicaux libres et en les éliminant. Les enzymes antioxydants transforment les produits d'oxydation dangereux en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Puis en eau, selon un procédé en plusieurs étapes en présence de catalyseurs tels que le cuivre, le zinc, le manganèse et le fer (Nimse et Pal, 2015).

II.2.5.1.2. Les antioxydants non enzymatiques

Agissent en interrompant les réactions en chaîne des radicaux libres. Parmi ces antioxydants, la vitamine C, la vitamine E, le polyphénol végétal, caroténoïdes et glutathion (Nimse et Pal, 2015).

II.3. Antioxydants et système de défense

II.3.1. Antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques s'agissent principalement de trois enzymes ; la superoxyde dis mutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du $O_2^{\bullet-}$ et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (Lehucher-Michel et al., 2001).

II.3.1.1. Les superoxydesdismutases

La famille des superoxyde-dis mutases comporte trois iso formes (SOD1, SOD2, SOD3) dont le rôle est la dis mutation de deux anions superoxyde en espèces oxygénées moins réactives que sont H_2O_2 et O_2 (Antwerpen, 2006).

Cette enzyme existe sous deux formes : une cytoplasmique nécessite comme cofacteur les ions de cuivre et de zinc (Cu, Zn, SOD) et l'autre mitochondriale utilise le manganèse commeco facteur (MnSOD) (Jacques et André, 2004).



II.3.1.2. Les catalases (CAT)

Les catalases permettent de transformer le peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire et en eau (Souchard *et al.*, 2002).



La catalase présente dans tous les organes est particulièrement concentrée dans le foie, et à l'état libre se trouve dans le plasma. Dans les hématies, la CAT protège la membrane plasmique et les tissus traversés du peroxyde d'hydrogène produit par la dis mutation du radical superoxyde, lui-même issu des auto-oxydations de l'hémoglobine (Halliwell *et Gutteridge*, 2008).

II.3.1.3. La glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dis mutation du H_2O_2 en H_2O et O_2 . Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG) (Nomura *et al.*, 2000).

Au fur et à mesure de sa consommation par la glutathion peroxydase, le glutathion doit être régénéré. Cela est rendu possible par une glutathion réductase qui consomme une molécule de NADPH fourni par la voie des pentoses phosphates (Jacques *et André*, 2004).

II.3.2. Antioxydants non-enzymatiques

Ce groupe de systèmes antioxydants contient de nombreuses substances endogènes. Parmi eux on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (le principal thiol des cellules). D'autre part, la bilirubine est Capable de piéger les radicaux libres peroxy et l'oxygène singulier, protégeant. Ainsi, l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques des radicaux libres. C'est une protéine chélatrice des métaux de transition telles que l'haptoglobine, la ferritine. L'albumine et la céruloplasmine agissent en réduisant la disponibilité des pro-oxydants, comme les ions $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ou $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$. Empêchant ainsi, la Radicaux libres de la réaction de Fenton (Trivalle, 2002).

Autres substances exogènes apportées par les aliments, telles que la vitamine E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone) ou caroténoïdes par piégeage. Les radicaux libres et neutralisent les électrons non appariés, les convertissant ainsi en molécules stables.

Les vitamines piégées deviennent à leur tour des radicaux libres, qui peuvent être détruits ou régénérés par un autre système. Avoir Par exemple, la vitamine E est régénérée à

partir de la vitamine C, elle-même régénérée à partir de la vitamine C ascorbate réductase (Bruneton, 1999).

II.4. Mécanisme d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers. Incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes et la chélation des métaux de transition (Dahmani, 2018).

Il y a deux types d'antioxydants par rapport à leur mécanisme d'action :

II.4.1. Les antioxydants primaires ou piègeurs des radicaux libres

Ce genre d'antioxydants peut inhiber la réaction d'initiation et la propagation de l'oxydation en participant au processus d'oxydation, et en convertissant les radicaux libres vers leurs formes inactives. Les antioxydants primaires sont généralement des composés phénoliques (AH) capables de donner un atome d'hydrogène au radical libre et le convertir en un composé stable non radicalaire (Huang *et al.*, 2005).

II.4.2. Les antioxydants secondaires ou préventifs

Ils englobent une large gamme de différentes substances chimiques, qui inhibent l'oxydation des lipides par différents mécanismes, et ne transfèrent pas le radical libre sous sa forme non-radicalaire. Avec quelques exceptions, les antioxydants secondaires sont généralement reliés à l'inhibition de facteurs initiant l'oxydation. Ce type d'antioxydants inclut des chélateurs de métaux pro-oxydatifs, des désactivateurs de l'oxygène singulet, des piègeurs de la molécule d'oxygène, inhibiteurs des enzymes pro-oxydative, enzymes antioxydantes et destructrices des hydroperoxydes (Miller *et al.*, 1996).

II.5. La toxicité des antioxydants

Les antioxydants sont des molécules en général faiblement toxiques. Leur utilisation à forte dose n'est pas dénuée de danger. Par exemple, le radical α -tocophérol stabilisé par mésomérie, peut initier des réactions d'oxydation avec les acides gras mono et poly insaturés des phospholipides membranaires (LH, LOOH) à l'origine de radicaux libres, et peut ainsi contribuer à la phase de propagation, des réactions radicalaires survenant dans la peroxydation lipidique.

Ce rôle prooxydant de l' α -tocophérol en tant qu'initiateur des réactions radicalaires n'est néanmoins possible que si le radical α -tocophéryl est présent en forte concentration dans les membranes et que la vitamine C n'assure pas sa régénération (Pastre et Priymenko, 2007).

A decorative frame with a double-line border, featuring a central pointed top and bottom, and rounded, slightly flared sides.

Chapitre 3

Cordyceps Militaris

III. *Cordyceps Militaris*

III.1. Généralité

Le champignon médicinal est une abondante source de produits naturels utiles avec divers biologiques activités (**Gu et Want, 2007**).

Simultanément, le développement de la chimie moderne permis l'isolement de produits chimiques à partir d'herbes médicinales qui ont servi de médicaments ou de matières premières pour la synthèse de nombreux médicaments importants utilisés aujourd'hui. Beaucoup plus médicaments modernes ont été synthétisés à la suite de la connaissance acquise à partir d'études de mécanismes d'actions de produits chimiques d'abord isolé des herbes médicinales, y compris médicinales champignons (**Mathews et al., 1999**).

Dans les vastes implications de champignons animaux parasitaires aux insectes, plus de 350 types ont été découverts jusqu'à maintenant (**Gogtay et al., 2002**). Il y a plus de 1 200 champignons entomopathogènes dans le monde (**Humber, 2000**). La plupart d'entre eux sont classés dans l'*Ascomycota*, y compris les Deutéromycètes; le reste se trouve dans les *Zygomycota*, *Chytridiomycota*, *Oomycota* et peu dans les *Basidiomycota*. Le *Cordyceps* (*Clavicipitaceae*, *Hypocreales*, *Ascomycota*) est l'un des grands genres entomopathogènes, comprenant environ 300 à 500 espèces et variétés (**Kobayasi, 1982; Hodge et al., 1998; Hywel-Jones, 2002; Liu et al., 2002**). Ses membres sont pour la plupart pathogènes pour les insectes, y compris les araignées, et quelques-uns poussent sur les espèces de champignons hypogées *Elaphomyces*. *Cordyceps militaris* est l'espèce type de *Cordyceps* (**Seaver, 1911**).

III.2. Description de *Cordyceps Militaris*

Le nom de *Cordyceps* est dérivé du cordon de mots latin, signifiant «club», et cèpes, ce qui signifie «tête». Plusieurs espèces de *Cordyceps* sont considérées comme des agents thérapeutiques dans la médecine chinoise (**Halpern et Georges, 2007**).

Cordyceps militaris est un champignon rarement fourchu comprimé ou non, fréquemment sillonné 1–7cm de long, 2–6mm de large, orange à rouge avec périthèces au sommet immergés pointent à l'extérieur (**Fig.3**), ovoïdes 500–720 × 300–480µm avec une paroi de 20µm d'épaisseur. La couche pseudo parenchymateuse asques étroits, cylindriques 300–510 × 3,5–5µm se rétrécit au sec. La longueur des stromates des spécimens frais de *Cordyceps militaris* variait entre 35 et 60mm. Les ascospores de ce champignon sont filiformes, multi septées, se brisant en fragments cellulaires à maturité 2–4,5x 1–1,5µm (**Mains, 1958**).

Selon Kobayasi (1941) le *Cordyceps militaris* a une forme albinique. La partie apicale fertile des stromates avait une longueur de 8 à 30mm et une largeur de 4 à 12mm, Le nombre de stromates par hôte variait de simple à plusieurs(Fig.4) (Bhushan et al., 2005).

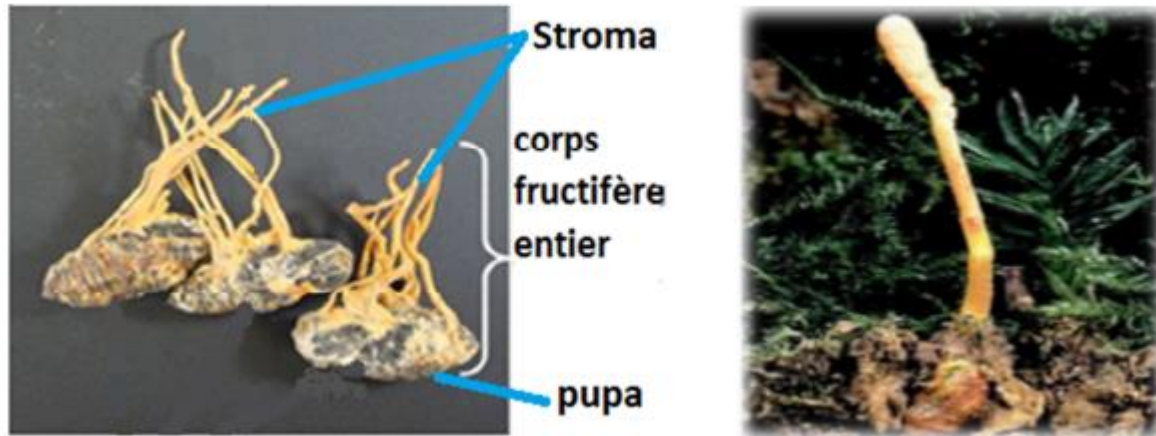


Figure 3: Aspect morphologique de *Cordyceps militaris* (Lee Yue et al., 2008).

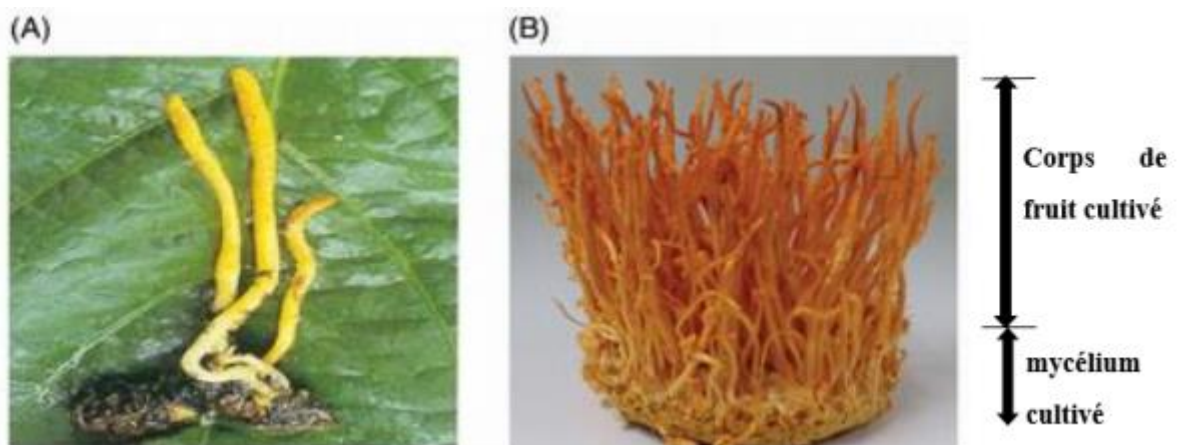


Figure 4: *Cordyceps militaris* naturel A et cultivé B (Eunhyun et al., 2020).

III.3. Classification

Les espèces de *Cordyceps* sont des parasites des insectes ou des mycètes, montrant souvent un niveau important de spécificité. Selon les analyses phylogénétiques, *Cordyceps* ne représente pas une lignée évolutive simple (Artjariyasripong et al., 2001).

De même, les espèces de *Cordyceps* ne représentent pas un groupe monophylétique (Tab.2) (Nikoh et al., 2000).

Tableau 2: Classification botanique de l'espèce étudiée *Cordyceps militaris* (Das et al., 2010).

Royaume	Champignons
Phylum	Champignon
Sub-phylum	Ascomycotina
Classe	Ascomycètes
Order	Hypocreales
Famille	Clavicipataceae
Genre	Cordyceps
Espèce	<i>Cordyceps militaris</i>

III.4. Origine de *Cordyceps militaris*

Cordyceps militaris, est un champignon médicinal chinois, ento-méropathogène appartenant à la classe des ascomycètes.

Cette espèce particulière de *Cordyceps* a été utilisée à des fins médicinales en Chine, au Japon, en Corée et dans d'autres pays asiatiques. Est l'un des plus champignons médicinaux importants, a été utilisé populairement comme drogue brute et un aliment tonique folklorique en Asie de l'Est (Ying et al., 1987).

III.5. Composants chimiques

Une variété de composés a été purifiée et leurs structures ont été élucidées (Song et al., 1998).

La Cordycépine 3'-déoxyadénosine (C₁₀H₁₃N₅O₃), 3'-amino-3'-déoxyadénosine (C₁₀H₁₄N₆O₃), homocitrullylaminoadénosine (C₁₇H₂₇N₉O₅), adénine(C₅H₅N₅), l'acide cordycepique (C₆H₁₄O₆) et le D-mannitol (C₆H₁₄O₆) ont été rapportés par les espèces de *Cordyceps* (Cunningham et al., 1950; Liu et al., 1989).

Les nucléosides et leurs bases sont déterminés dans les *Cordyceps* (Li et al., 2004; Li et al., 2001).

La détermination de l'adénosine (C₁₀H₁₃N₅O₄) et de la 3'-désoxyadénosine (cordycépine) en utilisant la méthode HPLC également rapportée par certains chercheurs (**Guo et al., 1998**). En outre, l'ergostérol (C₂₈H₄₄O) dans le *Cordyceps* peut être déterminé par la méthode HPLC (**Li et al., 2004 ; Huang et al., 2003**).

L'ophiocorde (C₂₈H₂₆N₂O₁₀), un antibiotique antifongique, est présent dans ce *Cordyceps* (**Boros et al., 1994 ; Kneifel et al., 1979**). Les Bioanthracènes (C₃₄H₃₆O₁₀) ont été également isolés du *Cordyceps* (**Isaka et al., 2001; Paisan et al., 2001**).

En outre, le cordyheptapeptide (C₄₉H₆₅N₇O₈), un nouveau cycloheptapeptide, a été isolé d'une souche de *Cordyceps* avec quatre bioanthracènes connus. Il n'y avait que deux rapports antérieurs sur l'isolement de peptides cycliques de ce genre et il s'agissait de

C. militaris et *Cordyceps sinensis* (**Rukachaisirikul et al., 2006**).

Chez les espèces de *Cordyceps* l'adénine, l'adénosine, la guanosine (C₁₀H₁₃N₅O₅), l'uracil (C₄H₄N₂O₂), uridine (C₉H₁₂N₂O₆) et inosine (C₁₀H₁₂N₄O₅) peuvent être déterminées par une électrophorèse capillaire (**Gong et al., 2004**). D'après **Pooja et anand (2014)** les corps fructifères de *Cordyceps militaris* riches en différents composants biochimiques (**Tab.3 et 4**).

Tableau 3: La quantité des vitamines (mg/g)

Les Vitamines	Quantité (mg/g)
A	32,7
B1	12,4
B6	58,7
B12	69,3
B3	40,6
Cu	27,7
Se	0,35
Zn	127,1

Tableau 4 : La composition de *Cordyceps militaris mycélium* (Wen-hung et al., 2007).

Composition	Unit/100g
Cordycépine	1,892mg
Acide cordycepique	2,162mg
Polysaccharide	4,200 mg
Superoxydedismutase	31,2U
Ca	251mg
Mg	162 mg
Zn	23mg
Se	0,23mg
Les acides aminés essentielles	0,1-0,9g
Les acides aminés non essentielles	0,1-0,9g
Acide gadoléique	1,8mg
Acide gadoléique	3,7mg
Vitamine B1	0,08mg
Vitamine B1	0,12mg
Vitamine B2	0,49mg
Vitamine B12	0,21mg
Vitamine C	16,2mg
β-carotène	0,43mg

III.6. La substances actives dans *Cordyceps militaris*

Il possède de nombreux types de actifs (tels comme la cordycépine, les polysaccharides, l'ergostérol et mannitol), et en raison de ses multiples composants, il est utilisé actuellement en plusieurs buts médicaux (Song et al., 1998; Mizuno, 1999; Nag et Wang, 2005).

Les principaux composants actifs de la fructification de *Cordyceps militaris* sont Cordycépine, un dérivé du nucléoside adénosine. La molécule a été isolée pour Le premier provenait de *Cordyceps militaris* (Cunningham et al., 1950). Autres composés des activités pharmacologiques ont été isolées du *Cordyceps militaris*, telles que l'ergostérol (un stérol présent dans les champignons) et des polysaccharides, apportant des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, Agents antinéoplasiques, agents antimétastatiques, immunomodulateurs, agents hypoglycémiantes, hormones stéroïdes et activité hypolipidémiant (Fig.5) (Nag et Wang, 2005).

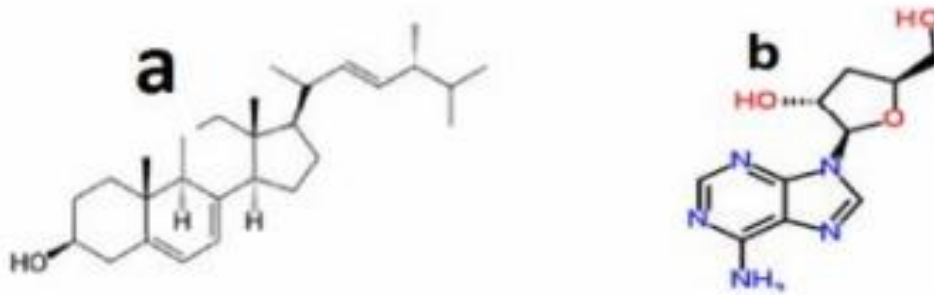


Figure 5: les structures des composés : a:Ergostérol, b:Cordycépine (Legouill, 2012).

Le polysaccharide est l'un des composants actifs les plus importants du *Cordyceps militaris*. Depuis des études récentes ont montré que de nombreux polysaccharides naturels et Polysaccharides - les protéines isolées des champignons peuvent être utilisées comme source de réactifs Traitement sans effets secondaires significatifs (Novak et Vetvicka, 2008).

III.7. Activités biologiques de *Cordyceps militaris*

Un certain nombre d'activités biologiques de grande valeur a été rapporté chez *Cordyceps militaris* par plusieurs auteurs (Tab.5). Il a été révélé que la plupart des activités biologiques plus ou moins similaires à celles de *Cordyceps sinensis*. Il a été rapporté que *Cordyceps militaris* possédait de nombreuses activités biologiques et pharmacologiques, notamment antiinflammatoires, anti-oxydantes, anti-tumorales, antiprolifératives et antidiabétiques (Shih et al., 2007; Dong et al., 2013).

Tableau 5 : Les activités biologiques de *Cordyceps militaris*.

Activité biologique	Références
Anti-inflammatoire	(Yu et al., 2004; Won et Park., 2005)
Anti-oxydant/anti-âge	(Yu et al., 2004; Chen et al., 2004)
Antitumoral / anticancéreux / anti-leucémique anti-proliférative	(Liu et al., 1997; John et Adamason, 1976)
Pro-sexuel	(Liu et al., 1997)
Anti-métastatique	(Yu et al., 2007)
Immunomodulateur	(Liu et al., 1997)
Antimicrobienne	(Lin et Chiang, 2008; Sone et al., 1985)
Antibactérienne	(Park, 1996)
Antivirale	(Ahn et al., 2000)
Anti-fongique	(Lin et Chiang, 2008)
Antidiabétique	(Mao et Zhong, 2006)
Neuroprotectrice	(Choi et al., 2004)
Hypoglycémie	(Ribeizo, 1995)
Réno-protecteur	(Choi et al., 2004)
Pneumo-protecteur	(Zhao-Long et al., 2000; Yu et al., 2007)

III.8. Utilisations médicinales/applications cliniques de *Cordyceps militaris*

Bien qu'il soit connu pour être pro-philique, anti-inflammatoire et Anti-cancéreux. Il est actuellement utilisé comme fonction dans de nombreux cas cliniques Insuffisance pulmonaire, toux, expectoration, étourdissements, perte de mémoire, Déficience visuelle, virus du rhume, perte d'appétit, sueurs nocturnes, pâleur, Lèvres pâles, acouphènes, maux de dents, dents mobiles, insomnie, soif, Extrémités froides ou chaudes, douleurs lombaires ou

aux genoux, collapsus nerveux, Rétablissement lent du diabète, de l'énurésie nocturne, de l'impuissance, de l'anémie et de la maladie (**Das et al., 2010**).

Traditionnellement, le mycélium ou fructification de *Cordyceps militaris* utilisé comme phytothérapie et complément alimentaire (**Wu, 2016**).

A decorative frame with a double-line border, featuring a central scalloped shape and four rounded corners with inward-pointing tabs.

Partie Expérimentale

A decorative frame with a double-line border, featuring a central pointed top and bottom, and rounded, slightly flared sides.

Chapitre 1

Matériels et Méthodes

I. Matériels et méthodes

Objectif

L'étude expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire Pharmacognosie Api phytothérapie, Département de biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Abd El Hamid Ibnbadis «Mostaganem». L'objectif du travail est d'évaluer l'activité antioxydante *in vitro* de l'extrait de *Cordyceps militaris* par trois tests : le test de piégeage du radical DPPH (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl), le test de FRAP (Ferric reducing antioxidant power) et ABTS (2, 2'-azynobis-3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid). Ainsi une étude phytochimique par un dosage spectrophotométrique des polyphénols totaux et des flavonoïdes.

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel végétal

Un extrait aqueux de champignon médicinal a été obtenu de l'institut des produits naturels d'Académie de science et technologie de Hanoi Vietnam. Il s'agit de Sk gold du mushroom *Cordyceps militaris* (Fig.6).



Figure 6: Extrait de *Cordyceps militaris* Sk gold (mushroom).

I.2. Méthodes

I.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). Ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés (Boizot et charpentier, 2006).

I.2.1.1. Mode opératoire

Dans un flacon, 1 ml d'extrait et 5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois ont été introduit. Une minute après, 4 ml de solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3 : 7,5 %) a été ajouté et incubé à l'ombre à une température ambiante pendant 1 heures (**Fig.7**).

L'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc. Une courbe d'étalonnage est préparée en utilisant l'acide gallique comme standard et les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de lyophilisat (mg EAG/g).

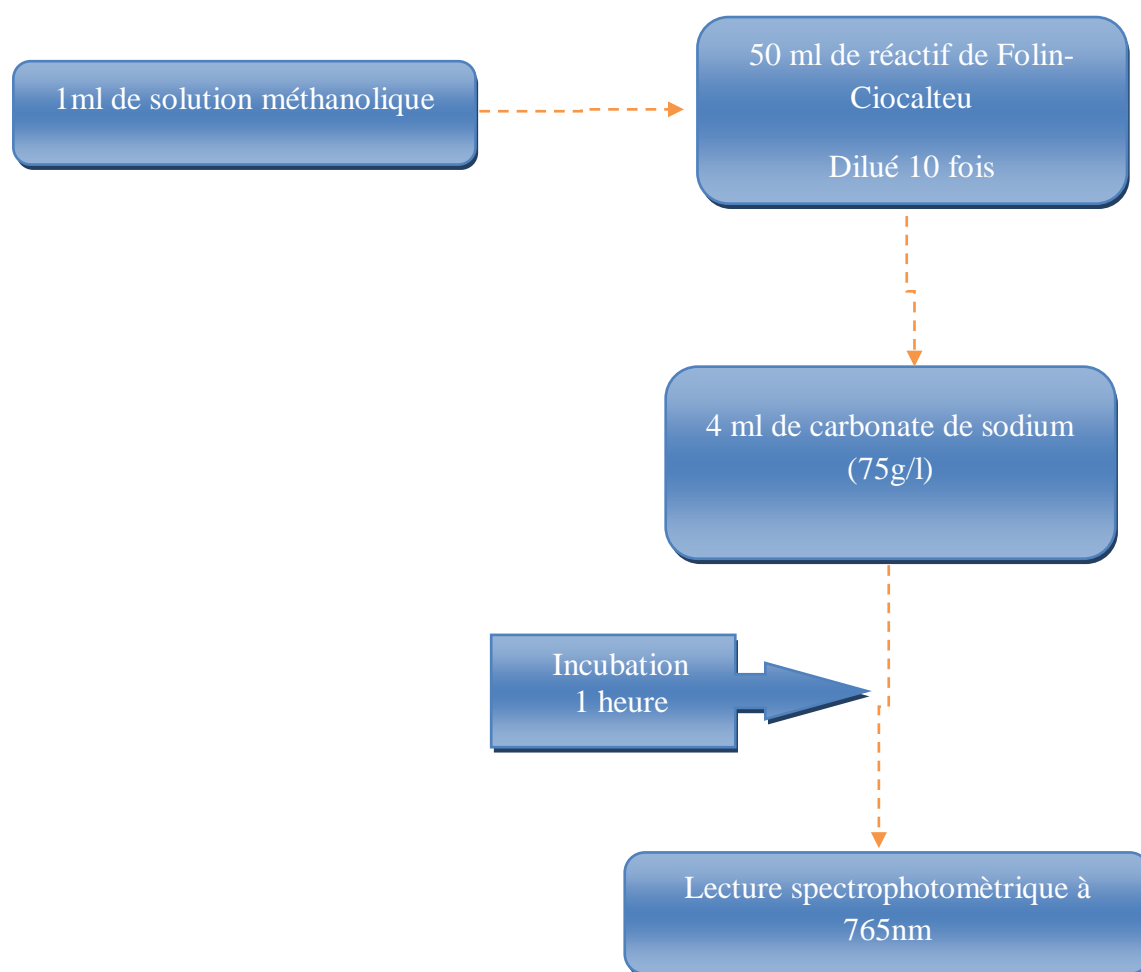


Figure 7: Protocole de dosage des polyphenols totaux.

I.2.2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent un groupement OH libre en position 5 susceptible de donner, en présence de chlorure d'aluminium, un complexe jaunâtre par chélation de l'ion AL^{3+} . La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait (**Ribereau-Gayon, 1968**).

I.2.2.1. Mode opératoire

Un volume de 2ml d'échantillon a été mélangé avec le même volume de chlorure d'aluminium d' AlCl_3 (2%). Ensuite, le mélange a été vigoureusement agité, puis l'ensemble est incubé à l'ombre à la température ambiante pendant 10 minutes. L'absorbance est lue à 430 nm (**Fig.8**).

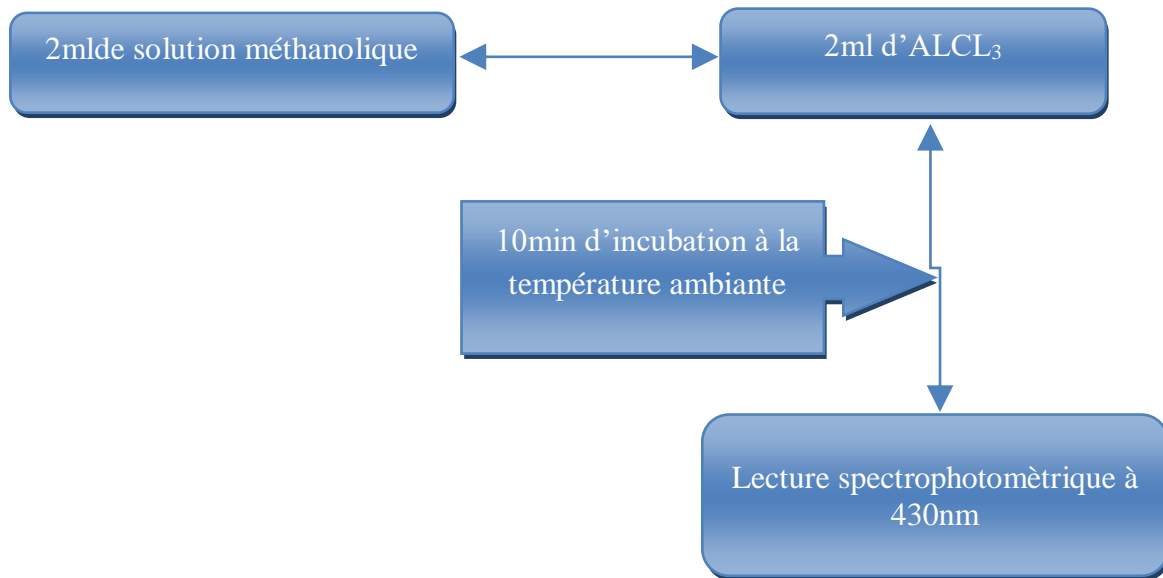


Figure 8: Protocole représentant le dosage des flavonoïdes

I.2.3. Evaluation de l'activité antioxydante

Trois tests différents ont été utilisés pour évaluer l'activité antioxydante des extraits des *C. militaris*: le test de piégeage du radical DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), le test de FRAP (Ferric reducing antioxidant power) et ABTS(2, 2'-azynobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).

I.2.3.1. Le test de piégeage du radical DPPH

Le DPPH est un radical stable à température ambiante et de couleur bleue caractéristique. Il est un des premiers radicaux à avoir été utilisé pour étudier la relation structure/activité antioxydante des composés phénoliques. Il possède dans sa structure un électron non apparié sur un atome du pont azote-azote. L'efficacité d'un antioxydant peut être mesurée par sa capacité à réduire le radical (**Fig.9**). Ceci s'observait par le changement de couleur allant de la bleu- violet forme oxydée au jaune forme réduite (**Desmier, 2016**).

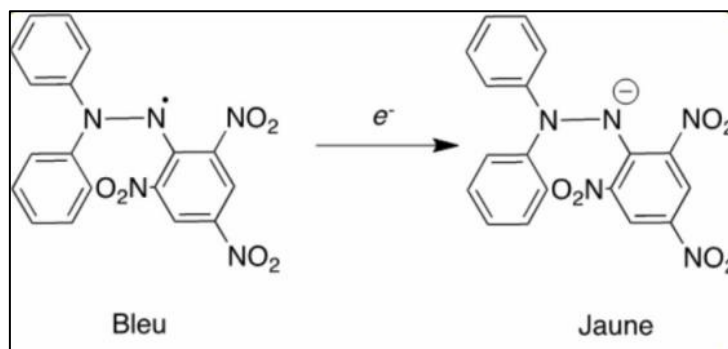


Figure 9: Modification de radical DPPH lors du transfert électronique (**Desmier, 2016**).

I.2.3.1.1. Mode opératoire

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par (**Seung-cheol et al.,2004**).

Un volume de 50µl de différentes concentrations d'extrait est ajouté à 2,5ml de la solution méthanolique du DPPH (0,004g/l) fraîchement préparée. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min à la température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 517nm à l'aide d'un spectrophotomètre (**Fig.10**). Le pourcentage de neutralisation du radical de DPPH est calculé selon la formule suivante: Pourcentage d'inhibition du radical

$$\text{DPPH} = (|\text{témoin}| - |\text{échantillon}| / |\text{témoin}|) \times 100$$

-**Témoin** : Correspond à l'absorbance du control (sans extrait).

-**Échantillon** : Absorbance de la solution en présence de molécules testée.

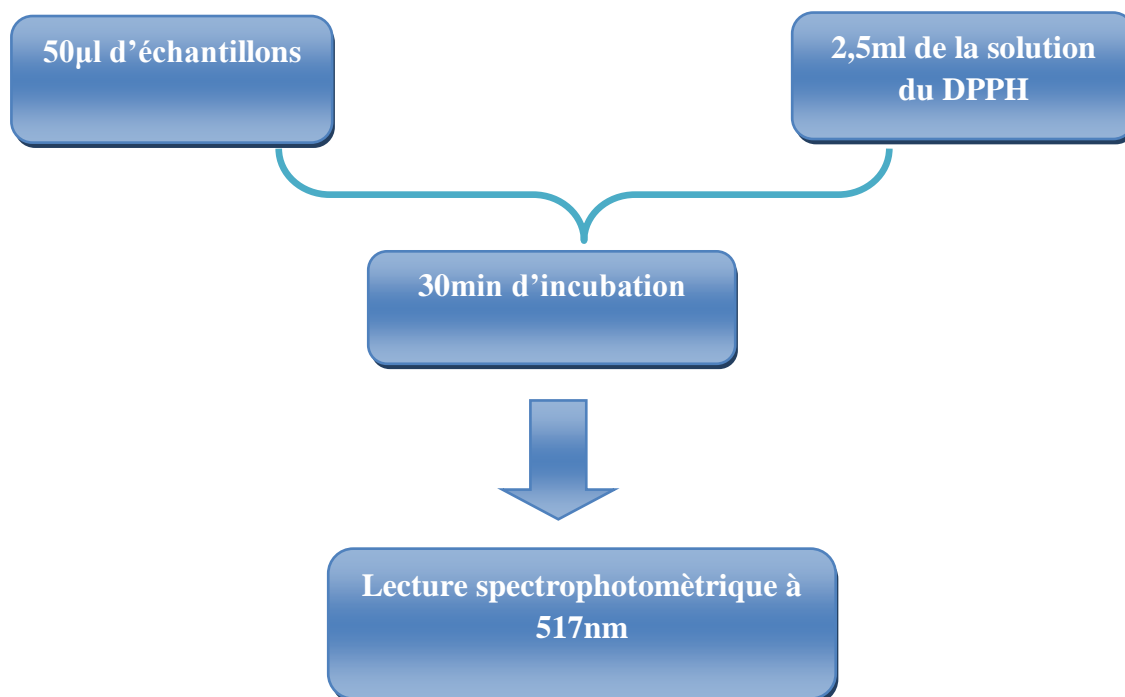


Figure 10: Protocole d'évaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH

I.2.3.2. Test d'ABTS

L'activité antiradicalaire des extraits a été déterminée par une méthode basée sur la réduction du radical ABTS^{•+} « 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) » qui est utilisé comme un radical libre pour évaluer l'activité antioxydant des échantillons. Ce radical cationique est facilement formé par oxydation en présence de persulfate de potassium pour donner une solution colorée en vert-bleue (Prouillac, 2006).

Le pourcentage d'inhibition du radical ABTS^{•+} a été évalué par la méthode de (Ramful et al., 2010).

I.2.3.2.1 Mode opératoire

La solution d'ABTS^{•+} préparé par mélange de 7mm d'ABTS et de 2,45mm de persulfate de potassium incubé pendant 12-16h à l'abri de la lumière et à température ambiante avant l'utilisation. La solution d'ABTS est diluée jusqu'à l'obtention d'une absorbance de (0,7±0,02) à 734nm.

Un volume de 2,5ml de la solution d'ABTS a été additionné à 50µl de l'extrait à différentes concentrations. Après, l'incubation pendant 10 min à l'obscurité et à température ambiante, la réaction de réduction de la solution d'ABTS à 734nm a été mesurée (Fig.11).

La capacité antioxydant des extraits de *Cordyceps militaris* a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical ABTS suivant l'équation :

$$\text{Pourcentage Inhibition} = \frac{AC - (AS - AB)}{AC} * 100$$

- **AC** : Correspond à l'absorbance du control (sans extrait).
- **AS** : Absorbance de la solution en présence de molécules testées.
- **AB** : Correspond à l'absorbance du blanc (**Huang et al., 2011**).

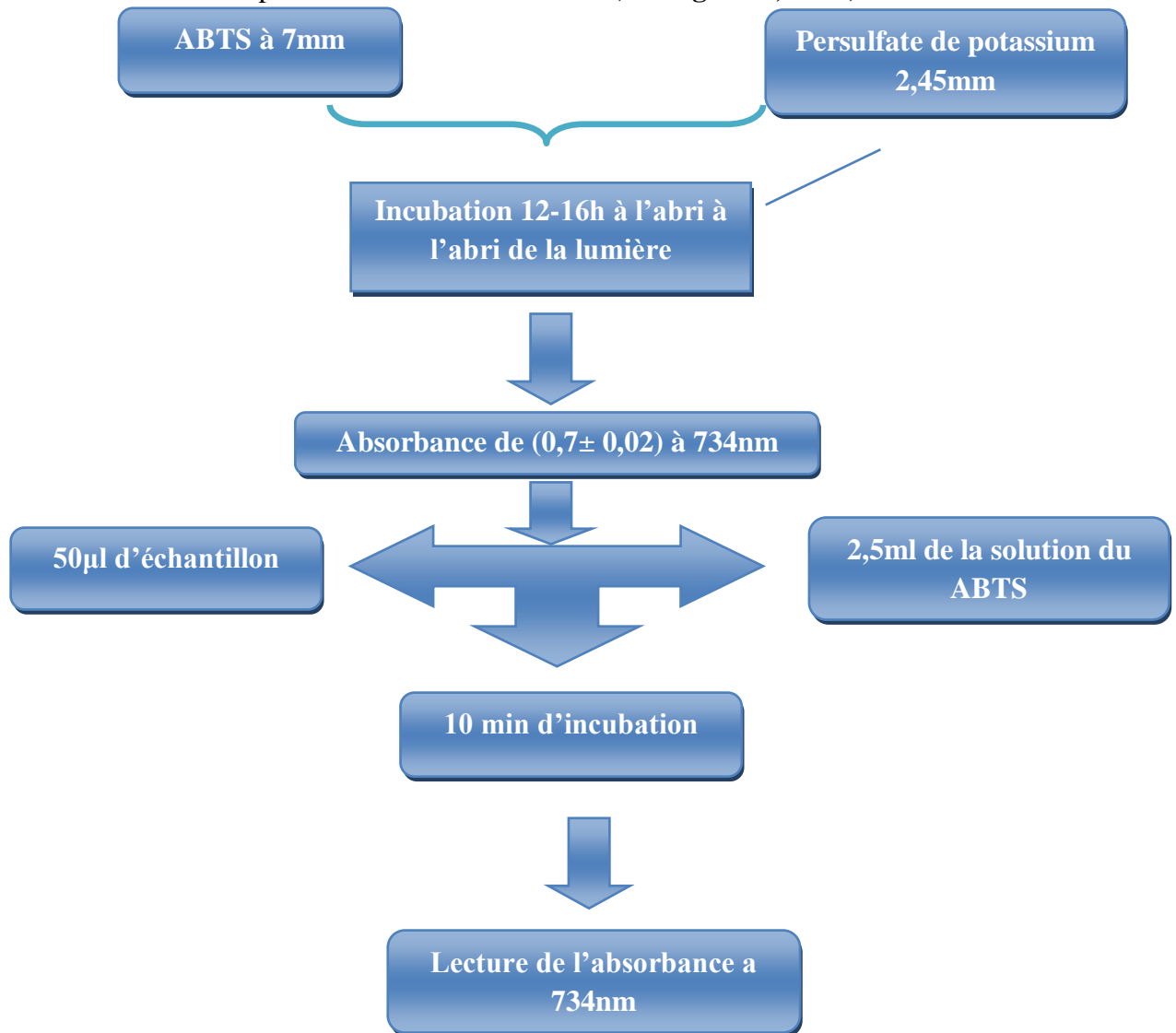


Figure 11: Protocole d'évaluation de l'activité antioxydante par le test ABTS⁺

I.2.3.3. Test de Ferric Reducing Power (FRAP)

I.2.3.3.1. Mode opératoire

Utilisé pour la première fois par Benzie et Strain (1996). Le test FRAP implique la réduction du complexe tripyridyltriazine ferrique ((Fe(III)-TPTZ)₂) en un complexe tripyridyltriazine ferreux ((Fe(II)-TPTZ)₂) par un antioxydant. Le pouvoir réducteur est relié au degré d'hydroxylation et à la présence des liaisons conjuguées des antioxydants. La réaction nécessite un pH de 3,6 pour maintenir la solubilité du fer et se base totalement sur le transfert d'électron (**Prior et al., 2005**).

L'apparition d'une couleur bleu intense (spécifique pour la tripyridyltriazine ferreux ((Fe(II)- TPTZ)₂) lors du contact avec les extraits indique la présence des composés antioxydants. Le changement de couleur est mesuré à 593nm et il est directement relié au pouvoir réducteur des antioxydants (**Karadag et al., 2009**).

Le test FRAP a été conduit conformément à la méthode proposée par Benzie et Strain (1996) avec certaines modifications. Le réactif FRAP a été préparé chaque jour à partir de tampon acétate 300mM (pH 3,6), de chlorure ferrique hexahydraté (FeCl₃.6H₂O) 20mM et de TPTZ 10mM dans HCl 40mm. Ces solutions ont été mélangées en proportion respectives : 10/1/1 (v/v/v) et le mélange a été chauffé à une température de 37°C. 0,3ml d'extrait de différentes concentrations (0,2, 0,4, 0,6 et 0,8mg/ml), ont été mélangés avec 0,9ml d'eau ultra pure et ensuite avec 9ml de réactif FRAP. Après 30 minutes d'incubation, l'absorbance a été immédiatement lue à 593nm au spectrophotomètre. Le contrôle positif a été représenté par une solution d'un antioxydant standard ; Trolox (0 à 0,16mg/ml) dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances qui ont été obtenues en fonctions des différentes concentrations utilisées pour les différents extraits. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Singleton et Rossi, 1965**) (**Fig.12**).

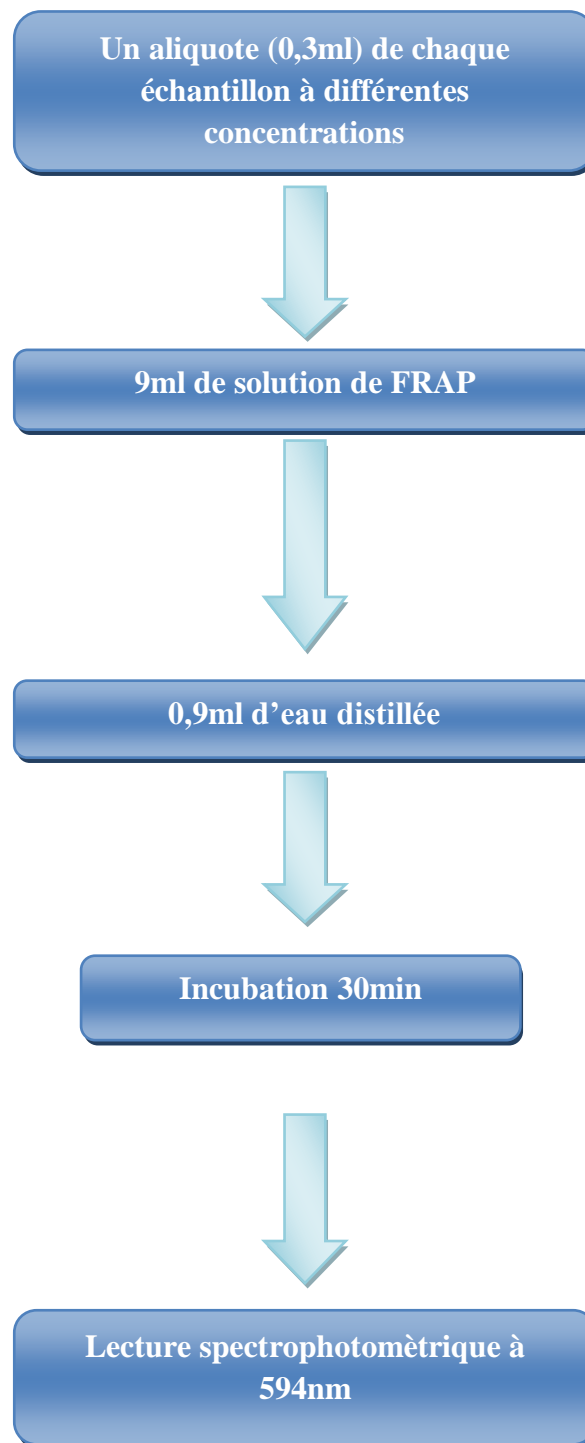


Figure 12 : Protocole d'évaluation de l'activité antioxydante par le test FRAP

I.2.4. Le calcul de l'IC₅₀

La concentration inhibitrice à 50% (IC₅₀) est définie comme la quantité d'antioxydants nécessaires pour diminuer la concentration du radical initial de 50%. Les valeurs de l'IC₅₀ sont déterminées à partir du tracé graphique de l'activité par rapport à une gamme de

concentrations d'extraits de plante. La plus forte activité antiradicalaire correspond à la fraction qui possède l'IC₅₀ la plus faible (**Zemmouri, 2015**).

I.2.5. Analyses statistiques

Toutes les mesures ont été données en triplicata. Les données des traitements ont été examinées par l'analyse de la variance (ANOVA mono-factorielle). Les résultats sont présentés en moyennes \pm écarts types. Les corrélations ont été établies en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson (r) dans les corrélations linéaires bivariées ($P < 0,01$). Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel XL STAT pour Windows.

A decorative frame with a double-line border, featuring a scalloped top and bottom edge and a central pointed shape. The text is centered within this frame.

Chapitre 2

Résultats et Discussion

II. Résultats et discussion

II.1. Résultats

II.1.1. Dosage des composés phénoliques

II.1.1.1. Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux montre une estimation globale de la teneur en différentes classes des composés phénoliques contenus dans les échantillons analysés.

Les teneurs en phénols totaux ont été estimées par la méthode de Folin-Ciocalteu. Une coloration bleue est obtenue, cette coloration varie en fonction de la concentration de chaque échantillon en composés phénoliques. La courbe d'étalonnage établie à l'aide de différentes concentrations de l'acide gallique, a permis d'estimer la teneur en composés phénoliques. Cette teneur a été rapportée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de lyophilisat (mg EAG/g), pour l'échantillon du *Cordyceps militaris*. Les quantités de polyphénols correspondantes à chaque échantillon ont été calculées à partir de la courbe d'étalonnage en utilisant l'équation de régression linéaire de type :

$$Y = 0,15x; R^2 = 0,99$$

Ces résultats montrent que l'extrait aqueux de *Cordyceps militaris* est riche en phénols totaux avec une teneur de l'ordre de (747,35±5,91mg EAG/g) (Fig.13).

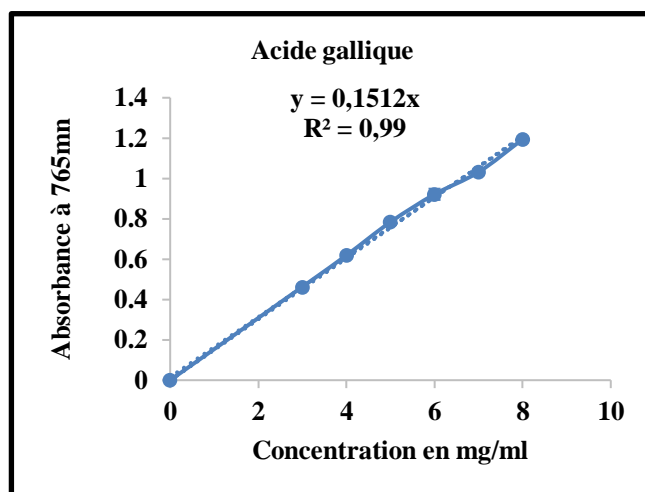


Figure 13: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

II.1.1.2. Dosage des flavonoïdes

L'estimation de la teneur en flavonoïdes de l'extrait aqueux de *Cordyceps militaris* a été réalisée selon la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Une coloration rose est obtenue, cette coloration dépend proportionnellement de la concentration de chaque échantillon en flavonoïdes.

La teneur en flavonoïdes est exprimée dans l'extrait aqueux en milligramme équivalent de quercétine par gramme de lyophilisat (mg EQ/g) en utilisant comme standard la quercétine. En effet, une courbe d'étalonnages (**Fig.14**) a été tracée à l'aide de différentes concentrations de la quercétine. Les quantités des flavonoïdes correspondantes à chaque échantillon ont été calculées à partir de la courbe d'étalonnage, en utilisant l'équation de type : $Y = 0,49x$; $R^2 = 0,98$.

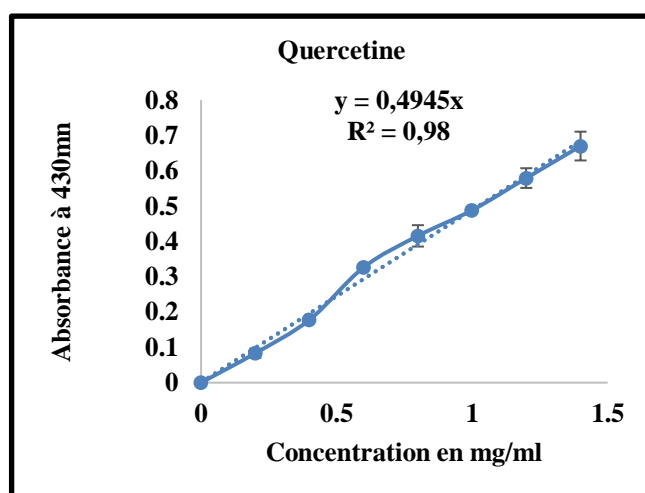


Figure 14: Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes

Les résultats obtenus révèlent que l'extrait aqueux de *Cordyceps militaris* riche en flavonoïdes avec une teneur de $(441,18 \pm 1,38 \text{ mg EQ/g})$ (**Tab.6**).

Tableau 6: Les teneurs en phénols totaux et les flavonoïdes de l'extrait aqueux de *Cordyceps militaris*.

Extrait	Phénols totaux	Flavonoïdes
Extrait de <i>Cordyceps militaris</i>	$747,35 \pm 5,91 \text{ mgEAG/g}$	$441,18 \pm 1,38 \text{ mgEQ/g}$

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm Ecart type

II.1.2. Evaluation de l'activité antioxydante

II.1.2.1. Evaluation de pouvoir antiradicalaire par le DPPH

Test de piégeage du radical libre DPPH : L'activité antioxydante de l'extrait aqueux de *Cordyceps militaris* et du standard (acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires.

La détermination de l'activité antioxydante révèle que l'extrait aqueux de *Cordyceps militaris* possède une activité de piégeage du radical DPPH importante. L'activité antioxydante est directement proportionnelle à la concentration, où culmine-t-il (40,43±0,10)% à la concentration 0,2mg/ml et minimum (81,39±0,30)% à la concentration 0,8mg/ml (Fig.15 et 16).

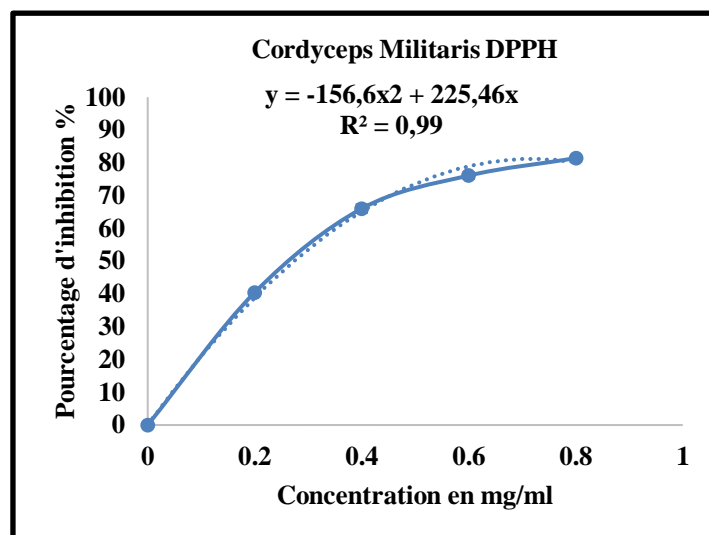


Figure 15: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait aqueux de *Cordyceps militaris*

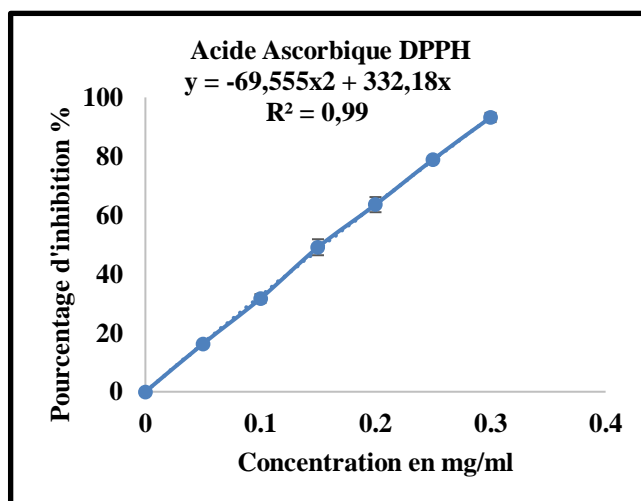


Figure 16: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique

II.1.2.2. Activité antioxydante évaluée par le test ABTS

Le radical $ABTS^+$ est largement utilisé pour déterminer l'activité antioxydante des extraits de plantes, en contact avec un donneur de H^+ conduit à la formation de l' $ABTS^+$ et à la décoloration de la solution à 734nm. Une comparaison est faite avec la capacité du Trolox à

capturer $ABTS^+$. La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète la capacité de capture du radical libre.

Les résultats de l'activité anti-radicalaire, vis-à-vis du radical $ABTS^+$, du standard et d'extrait sont exprimés en pourcentage d'inhibition et représentés dans les Figures (17 et 18).

D'après les résultats illustrés, l'extrait de *Cordyceps militaris* a montré que le radical $ABTS$ à différentes concentrations. Le pourcentage d'inhibition le plus élevé est de $(87,42 \pm 1,06)\%$ à la concentration 1mg/ml, et le faible est de $(44,50 \pm 0,86)\%$ à la concentration 0,2mg/ml. Par contre, le Trolox a montré un pourcentage d'inhibition maximale de $(62,59 \pm 1,28)\%$ à une concentration de 1,6mg/ml.

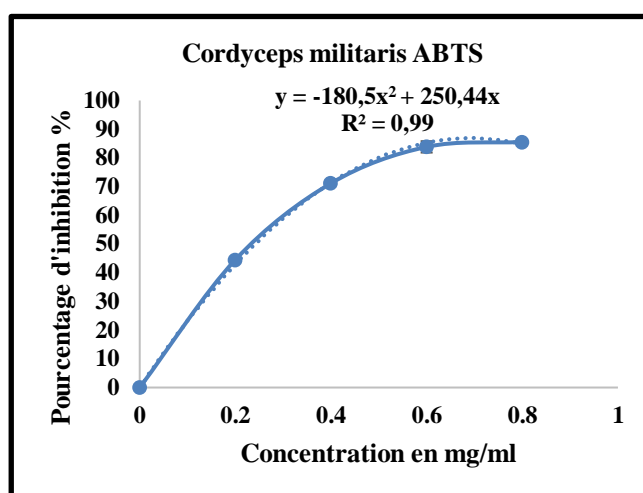


Figure 17: Pourcentage d'inhibition d'ABTS en fonction des concentrations de l'extrait aqueux de *Cordyceps militaris*

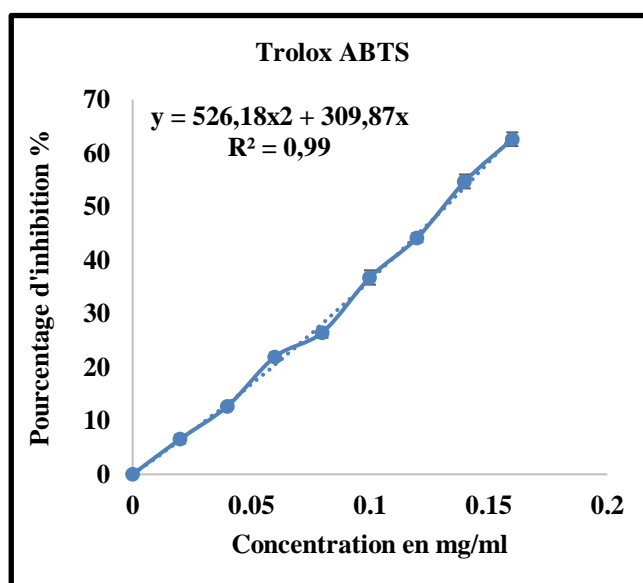


Figure 18: Pourcentage d'inhibition d'ABTS en fonction des concentrations de Trolox

II.1.2.3. Activité antioxydante évaluée par le test FRAP

Le pouvoir réducteur est la capacité d'un extrait à donner un électron et à réduire le fer ferrique en fer ferreux. La couleur jaune de la solution de ferricyanure de potassium vire vers une couleur bleu verte dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de l'extrait. Les valeurs des densités optiques en fonction des différentes concentrations en font possibles de tracer des courbes de l'extrait étudié.

Les résultats du pouvoir antioxydant des extraits testés montrent que le pourcentage d'inhibition des extraits aqueux de *Cordyceps militaris* est supérieur à 90% à des concentrations de l'ordre de $(1,58 \pm 0,03)\%$ respectivement pour l'extrait *Cordyceps militaris*. Par contre, l'Acide Ascorbique (FRAP) a montré un pourcentage d'inhibition maximale de $(0,543 \pm 0,02)\%$ à une concentration de 0,024mg/ml. (Fig.19 et 20).

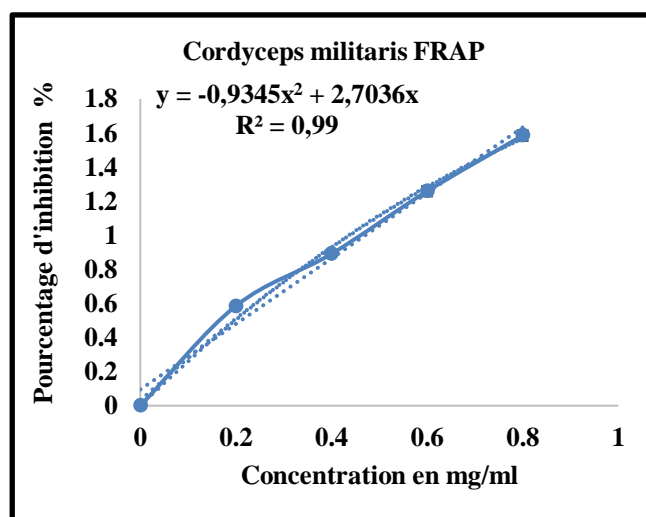


Figure 19: Absorbance de FRAP en fonction des concentrations d'extrait aqueux de *Cordyceps militaris*

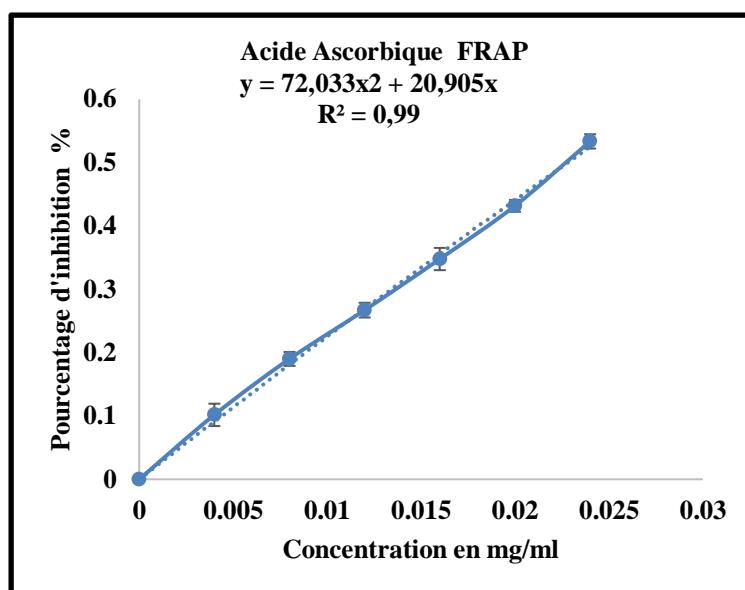


Figure 20 : Absorbance de FRAP en fonction des concentrations d'Acide ascorbique

II.1.2.4. Concentration d'inhibition d'IC₅₀

Tableau 7 : Les IC₅₀ des échantillons étudiés vis-à-vis du radical DPPH, ABTS et de FRAP

Test	Concentration inhibitrice 50 (mg/ml)		
	<i>Cordyceps militaris</i>	Acide Ascorbique	Trolox
DPPH	0,27	0,15	
ABTS	0,25		0,13
FRAP	0,08	0,02	

Les résultats de l'IC₅₀ des test DPPH, ABTS et FRAP (0,27±14,76), (0,25±15,62) et (0,08±0,33)mg/ml respectivement montrent que l'extrait de *Cordyceps militaris* possède une capacité de piéger des radicaux DPPH, ABTS et FRAP élevé.

II.1.2.5. Corrélation de DPPH, ABTS et le FRAP

Le coefficient de Pearson est un indice reflétant une relation linéaire entre deux variables continues. Le coefficient de corrélation varie entre -1 et +1, 0 reflétant une relation nulle entre les deux variables, une valeur négative (corrélation négative) signifiant que lorsqu'une des variables augmente, l'autre diminue ; tandis qu'une valeur positive (corrélation positive) indique que les deux variables varient ensemble dans le même sens.

Selon les résultats de (Tab.9), une forte corrélation a été montrée entre les activités antioxydantes basées sur le dosage d'ABTS et FRAP et le piégeage des radicaux DPPH de l'extrait de *Cordyceps militaris*. Beaucoup plus, entre le test de DPPH et d'ABTS ($r = 0,98$).

Tableau 8 : Les coefficients de corrélation de DPPH, ABTS et FRAP de l'extrait aqueux de *Cordyceps militaris*.

	DPPH	ABTS	FRAP	Phenols	Flavonoïdes
DPPH	1	0,98	0,89	0,90	0,99
ABTS	0,98	1	0,84	0,88	0,99
FRAP	0,89	0,84	1	0,67	0,89
Phenols	0,90	0,88	0,67	1	0,92
Flavonoïdes	0,99	0,99	0,89	0,92	1

Les corrélations entre l'activité antioxydante et les contenus en polyphénols totaux et en flavonoïdes ont été établies (Tab.8). Le coefficient de corrélation obtenu entre les teneurs en flavonoïdes et l'activité antioxydante est fortement positif ($R=0,99$). Alors, que celui obtenu entre les polyphénols totaux et l'activité antioxydante est moins fort ($R=0,90$). Ces résultats montrent l'implication linéaire des composés phénoliques (essentiellement des flavonoïdes) dans l'activité antioxydante

Tableau 9: Les coefficients de corrélation entre les phénols totaux, les flavonoïdes et l'activité antioxydante (DPPH, ABTS et FRAP) de l'extrait aqueux de *Cordyceps militaris*.

	DPPH	ABTS	FRAP
DPPH	1	0,98	0,89
ABTS	0,98	1	0,84
FRAP	0,89	0,84	1

II.2. Discussion

Cordyceps militaris utilisés dans la médecine traditionnelle chinoise pendant plus d'un siècle comme suppléments bénéfiques pour la santé (Ng et Wang, 2005). Il a été démontré que *cordyceps militaris* possède diverses fonctions biologiques, notamment des propriétés, immunomodulatrices, hypolipidémiques et antitumorales (Ng et Wang, 2005; Marsup et al., 2020).

L'étude quantitative de l'extrait aqueux de *Cordyceps militaris* montre la richesse de l'extrait en phénols totaux et en flavonoïdes. Ces teneurs sont supérieures à ceux de (Mohd Azrie Awang et al., 2021) qui sont de l'ordre de $(160 \pm 0,74\text{mg EAG/g})$ et $(6,6 \pm 1,13\text{mg EQ/g})$ respectivement. Alors, les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes trouvé par (Punyawatt Pintathong et al., 2021) sur l'extrait aqueux de *Cordyceps militaris* étaient inférieur à nos résultats est de l'ordre de $(18,20 \pm 0,59\text{mgGAE/g})$ et $(1,84 \pm 0,21\text{mg QE/g})$ respectivement. De même pour les résultats trouvé par (Yu Xiao et al., 2014) en phénols sur un extrait éthanolique $(7,36 \pm 0,37\text{mg GAE/g})$. Les teneurs en polyphénols varient en fonction des paramètres d'extraction, de température et de solvant d'extraction. Il a été démontré que l'extraction à température élevée permettait d'obtenir des quantités plus élevées en polyphénols que lorsqu'ils sont obtenus à température ambiante (Majhenic et al., 2007). En raison de l'implication des radicaux libres dans diverses pathologies, les recherches de nouvelles molécules pouvant pallier le déficit du système de défense endogène se sont largement intensifiées.

L'activité anti-radicalaire de l'extrait aqueux de *C.militaris* augmente avec la concentration de l'extrait. Il paraît plus actif sur la réduction du DPPH à partir de la concentration plus basse $(40,43 \pm 0,10)\%$ et la concentration plus élevée $(81,39 \pm 0,30)\%$. Les résultats de l' IC_{50} de DPPH ont montré une activité antiradicalaire plus importante que ceux de (Adchara Prommaban et al., 2022) et moins important que ceux de (Tran Ngoc Quy et Tran Dang Xuan, 2019) sur l'extrait aqueux $(1,35 \pm 0,07 \text{ mg/ml})$ et (Yu Xiao et al., 2014) sur l'extrait éthanolique $(4,67 \pm 0,02 \text{ mg/ml})$. Des études sur la relation entre la structure chimique des composés phénoliques et leur capacité à piéger les radicaux libres ont montré que l'activité de piégeage dépend du nombre, de la position et de la nature des substitués des cycles B et C et du degré de polymérisation (AndziBarhé et FeuyaTchouya, 2016).

D'après les résultats illustrés, l'extrait de *Cordyceps militaris* a montré que le radical ABTS à différentes concentrations. Le pourcentage d'inhibition le plus élevé est de $(87,42 \pm 1,06)\%$ à la concentration 1mg/ml, et le faible est de $(44,50 \pm 0,86)\%$ à la concentration 0,2mg/ml.

Par ailleurs, aux mêmes concentrations testées, les PI obtenus par le test du DPPH sont inférieurs à ceux de la méthode à l'ABTS. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de substances qui présentent des bandes d'absorption à la même longueur d'onde que le radical DPPH entraînant ainsi une augmentation de l'absorbance (Sarr et al., 2015). Cependant, les résultats de l'IC₅₀ du test ABTS concorde avec ceux obtenu sur d'autre travaux (Adchara Prommaban et al., 2022).

Les résultats obtenus par la méthode de FRAP confirment le potentiel antioxydant important de l'extraits aqueux de *C.militaris* . Ces résultats plus actifs à ceux trouvés par (Yu Xiao et al., 2014) sur l'extrait éthanolique. Le pouvoir réducteur de l'extrait est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron (Bougandora et al., 2013).

Par ailleurs, une forte corrélation a été montrée entre les activités antioxydantes basées sur le dosage d'ABTS et FRAP et le piégeage des radicaux DPPH de l'extrait de *Cordyceps militaris*. De même, pour la corrélation entre les trois tests et les flavonoïdes et les composés phénolique. Ces constatation concorde avec les travaux de (Yu Xiao et al., 2014). L'action réductrice de l'extrait de *C.militaris* peut être expliquée par la présence des polyphénols totaux. Cela est en accord avec les résultats obtenus par (Yu Xiao et al., 2014) qui ont montré une forte corrélation entre l'activité antioxydante et le contenu des polyphénols totaux et flavonoïdes de l'extraits de *Cordyceps militaris*. L'activité antioxydante attribuée aux polyphénols s'explique en partie par leur capacité à capturer des radicaux libres et de complexer des métaux (Bahorun et al., 1996).

A decorative frame with a double-line border, featuring a central pointed top and bottom, and rounded, slightly flared sides. The frame is empty and serves as a container for the chapter title.

Chapitre 3

Conclusion et Perspectives

Conclusion

La présente étude a permis de mettre en évidence les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes et évaluer l'activité antioxydante *in vitro* de l'extrait aqueux de *Cordyceps militaris* par trois tests.

La quantification par les méthodes spectrophotométrique a permis de déterminer les teneurs en polyphénols totaux par le réactif du Folin-Ciocalteu et en flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium. Les résultats obtenus ont révélé la richesse de l'extrait de *Cordyceps militaris* en polyphénols totaux ($747,35 \pm 5,91$) mg EAG/g et en flavonoïdes ($441,18 \pm 1,38$) mg EQ/g.

L'activité antioxydant de l'extrait *Cordyceps militaris* a été évaluée, *in vitro*, par trois tests : le test au radical libre DPPH (2,2-Diphényl-1-Picrylhydrazyl), le test radical libre ABTS⁺ qui est obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'Acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6- Sulfonique) et le test FRAP (Ferric ion Reducing Antioxydant Paramètre). La capacité de piégeage du radical libre DPPH a montré un pourcentage d'inhibition important de l'ordre de ($81,39 \pm 0,30$)% et une IC₅₀ de ($0,27 \pm 14,76$)mg/ml. Pour le test de piégeage du radical-cation libre d'ABTS, un pourcentage d'inhibition très élevé ($87,42 \pm 1,06$)% a été remarqué et une activité antioxydante très supérieure dont la valeur d'IC₅₀ est de ($0,25 \pm 15,62$) mg/ml. La méthode du radical libre FRAP a présenté un pourcentage d'inhibition de ($1,58 \pm 0,03$)% et une valeur d'IC₅₀ de ($0,08 \pm 0,33$) mg/ml. De plus, une bonne corrélation a été montrée entre les teneurs en phénols totaux et les flavonoïdes et l'activité antioxydant de l'extrait aqueux de *Cordyceps militaris*. La corrélation la plus élevée est de $r = 0,99$. Cependant, l'extrait aqueux de *Cordyceps militaris* a présenté une très grande activité de piégeage des radicaux libres du DPPH, ABTS et une forte capacité de réduction du fer. Ces résultats pourraient constituer une base scientifique solide pour la recherche de nouveaux composés ayant une importante application dans les industries pharmaceutiques.

En perspectives, il serait intéressant de procéder à la séparation et la caractérisation des différentes substances présentes dans cet extrait, et de déterminer lesquelles d'entre elles sont responsables de cette activité par des techniques telles que CCM, HPLC. Par la suite, essayer de réaliser ces tests *in vivo* afin de s'assurer de l'efficacité et de l'innocuité de l'extrait ou des constituants biochimiques isolés.

A decorative frame with a double-line border, featuring a central pointed top and bottom, and rounded, slightly flared sides. The word "Références" is centered within this frame.

Références

Références bibliographiques

- Achach N. (2006).** Stress oxydatif et angor instable: *Mémoire de fin d'études pharmaceutiques*: Faculté de pharmacie de Monastir Tunisie.
- Ahamet S.(2003).** Etudes phytochimiques et des activités biologiques de *Balanites aegyptica* (Balanitaceae). Thèse de pharmacie, Bamako, 117 p.
- Ahmad FA. (1995).** plantes médicinales et aromatiques dans le monde arabe, l'agriculture et la fabrication de plantes médicinales dans le monde arabe. Institution arabe pour les études et publication, p : 2-22.
- Ahn Y.J, Park S.J, Lee S.G, Shin S.C, Choi D.H. (2000).** Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp. *J Agric Food Chem.* 48:2744–8.
- Al-Dalaen S.M,& Al-Qtaitat A.I. (2014).** Review article: Oxidative stress versusantioxydants. *American Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2(5) : 60-71.
- Ali-Dellile L.(2013).** Les plantes médicinales d'Algerie. Berti EditionAlger 6_11.
- Anonyme, (2005).** Ministère de l'agriculture et du Développement Rural, Unité de Conservation et de Développement- Batna
- Antwerpen PV. (2006).** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myclopéroxydase / Peroxyole d'hydrogène / Clilorure. Thèse de Doctorat en Science Pharmaceutiques Bruxelles.
- Artjariyasripong S, Mitchell J, Hywel-Jones I, Jones E. (2001).** Relationship of thegenus*Cordyceps* and related genera. Based on parsimony and spectral analysis ofpartial 18S and 28S ribosomal Gene sequences. *Mycoscience.*42: 503-517.
- Bae Y.S, Kang S.W, Seo M.S, Baines I.C, Tekle E, Chock P.B, Rhee S.G (1997).** Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. *J.Biol. chem,* 272, 217- 221.
- Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunet C, Dine T, Luyckx M, Vasseur J, Cazin M, Cazin J.C, Pinkas M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei. Forschung,* 46, 1086- 1089.
- Belkheiri N. (2010).** Dérivés phénoliques à activités Antiathérogènes. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier de Toulouse.
- Berger M.M. (2006).** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances : *Nutrition clinique et métabolisme* : 20 : 48-53

- Berlencourt Aude. (2008-2013).** Huiles essentielles – Aromathérapie Historical review of medicinal plants' 10.4103/0973-7847.95849).
- Bhushan S, Sang-Kuk H, Won-Ho L, Seong-Keun C, Je-O L, Sung J. (2005).** Distribution et fructification *in vitro* de *Cordyceps militaris* en Corée, *Mycobiologie*. 33 (4): 178-181. Anglais.
- Boizot N. & Charpentier JP. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre fougère. Le cahier des techniques de l'Inra, 79-82.
- Boros C, Hamilton S.M, Katz B, Kulanthaivel P. (1994).** Comparison of balanol from *Verticillium balanoides* and phiocordin from *Cordyceps ophioglossoides*. *J Antibiot (Tokyo)*. 47 :1010–6.
- Bougandora N. (2013).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanoliques de *Satureja calamintha* ssp. *Nepta*(L.) Briq. Nature & Technologie. B- Sciences Agronomiques et Biologiques, n°9
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier, E. (2001).** Production of plant secondary
- Bruneton J. (1987).** *Éléments de phytochimie et de pharmacognosie*, Ed. Tec & Doc Lavoisier.
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3ème Ed Tec&Doc. Paris.Thèse de doctorat d'état ;Université Toulouse III - Paul Sabatier , TOULOUSE, p 7.
- Cavin A. (1999).** Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: *Tinospora crispa* (Menispermaceae)*Merremia emarginata*(Convolvulaceae) et *Orophea enneandra* (Annonaceae). Thèse Université de l'Indonésie.
- Chen C, Luo S.S, Li Y, Sun Y.J, Zhang C.K. (2004).** Study on antioxidant activity of three *Cordyceps* sp. by chemiluminescence. *Shanghai J Trad Chinese Med*. 38(7):53–5.
- Christelle K-R. (2006).** Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolisme*. 20:165–177.
- Cunningham K.G, Manson W, Spring F.S, Hutchinson S.A. (1950).** Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. *Nature*. 166 :949–54.
- Dahmani S, Dahmani F. (2018).** Evaluation de l'activité biologique des différents extraits, et des huiles essentielles de la plante : *Salvia officinalis* L. Mémoire de Master, Université Mohamed Boudiaf - M'sila.
- Das S.K, Masuda M, Sakurai A, Sakakibara M. (2010).** Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects. *Fitoterapia*. 81, 961- 968.

- Deby-Dupont G, Deby C & Lamy M. (2002).** Données actuelles sur la toxicité de l’oxygène, Réanimation. *Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS*. 11 : 28-39.
- Decaux I. (2002).** Phytothérapie: Mode d’emploi. Ed: le bien public. P: 6.
- Delattre J.J, Beaudeau L et Bonnefont- Rousselot D. (2005).** "Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques." 1- 23.
- Devoyer J. (2012).** Stéphane Korsia-Meffre, rédacteur et coordinateur du Guide des plantes qui soignent (éd. Vidal). Publié le 28.09.2012).
- Dong J, Ding Z.J, Yu P.Z, Lei C, Zheng X.J, Wang Y. (2013).** Composition and distribution of the main active components in selenium-enriched fruit bodies of *Cordyceps militaris* link. *Food Chem*. 137 164–167.
- Dro B, Soro D, Koné M.W, Bakayoko A, Kamanzi K. (2013).** Evaluation de l’abondance de plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle dans le nord de la côte. *Journal of animal & plant sciences*.16 pp.
- Durrity B. (1994).** Intoxication rapportée à la phytothérapie chinoise dans les pays occidentaux: analyse des causes.
- Eboh A.S. (2014).** Review Article. Biochemistry of free radicals and oxidants scholars. *Academic journal of biosciences (SAJB)*. 2(2) : 110-118.
- Ekoumou C. (2003).** Etudes phytochimiques et pharmacologiques de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse pharmacie, Bamako, 145 p.
- EL-Rhaffari L, Zaid A. (2004).** *Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafialet)*. Un savoir empirique pour une pharmacopée rnovée. Origine des pharmacopées traditionnelles et élaboration des pharmcopes savates.
- Favier A. (2003).** Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique* : 108-115.
- Ghabrier J.Y. (2010).** Plantes médicinales et formes d’utilisation en phytothérapie. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy1, France.
- Gogtay N.J, Bhatt H.A, Dalvi S.S, Kshirsagar N.A. (2002).** the use and safety of nonallopathic Indian medicines. *Drug Saf*. 25(14):1005–19.
- Gong Y.X, Li S.P, Li P, Liu J.J, Wang Y.T. (2004).** Simultaneous determination of six main nucleosides and bases in natural and cultured *Cordyceps* bcapillary electrophoresis. *J Chromatogr*. 1055 :215–21.
- Goudable J, Favier A.(1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants : *Nutr Clin Métabol* :11 : 115-20.

- Gu Y.X, Want Z.S, Li S.X, Yuan Q.S. (2007).** Effects of multiple factors on accumulation of nucleosides and bases in *Cordyceps militaris*. *Food Chem.* 102:13049.
- Guillouty A. (2016).** Plantes médicinales et antioxydants. Thèse de doctorat d'état, Université toulouse iii paul sabatier, toulouse, 14p.
- Guo, C, Zhu J, Zhang C, Zhang L. (1998).** Determination of adenosine and 3'-deoxyadenosine in *Cordyceps militaris* (L.) Link. By HPLC. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 23 :236-7.
- Halliwell B, Gutteridge J.M.C. (2007).** Free Radicals in Biology and Medicine, 4th ed. Oxford University Press. Pp 20-31.
- Halliwell B. (1989).** Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol.* 70 : 737-757.
- Halliwell B. (2001).** Free radicals and other reactive species in disease encyclopedia of life
- Halpern G.M. (2007).** Champignons de guérison. Square One Publishers. Square One Publishers. pp. 65-86. ISBN 978-0-7570-0196-3.
- Heller W, Forkmann G, (1993).** The flavonoids. Advances in research since 1986. In Harborne JB. Secondary Plant Products. Encyclopedia of plant physiology. Ed. Chapman et Hall, London. UK. Pp 399-425.
- Hodge K.T, Humber R.A, Wozniak C.A. (1998).** *Cordyceps variabilis* et le genre *Syngliocladium*. *Mycologia.* 90: 743-753.
- Hopkins W.G. (2003).** Physiologie végétale. 2^{ème} édition américaine, de Boeck et Lancier S A, Paris: 514.
- Hostettman K.O, Poteratte et al, (1998).** *The potential of higher plants as a Source of New Drugs.* *Chimia International Journal for Chemistry.*
- Huang D, Chen H.J, Lin C.D, & Lin Y.H. (2005).** Antioxidant and antiproliferative activities of water spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk) constituents. *Bot. Bull. Acad. Sin* 46, 99-106.
- Huang L.F, Liang Y.Z, Guo F.Q, Zhou Z.F, Cheng B.M. (2003).** Simultaneous separation and determination of active components in *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* by LC/ESI-MS. *J Pharm Biomed Anal.* 33 :1155-62.
- Huet O, Duranteau J. (2008).** Dysfonction endothéliale : rôle des radicaux libres. Endothelial dysfunction : Involvement of reactive oxygen species. *J : Réanimation.* 17: 387-392.
- Humber R.A. (2000).** Pathogènes fongiques et parasites d'insectes. Dans: Priest FG, Good fellow M, éditeurs. Systématique microbienne appliquée. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp. 203-230.

- Hywel-Jones N.L. (2002).** Multiples de huit ascospores de *Cordyceps*. *MycolRes*.106: 2-3.sciences. J : *Nature publishing group*. 1(3) : 185-192.
- Isaka M, Kongsaree P, Thebtaranonth Y. (2001).** Bioanthracenes from the insect pathogenic fungus *Cordyceps pseudomilitaris* BCC 1620. II. Structure elucidation. *J Antibiot (Tokyo)*. 54 :36-43.
- Iserin P. (2001).** Encyclopedies des plantes médicinales. Ed: Larousse Bourdesse. Paris p: 335
- Iserin P, Masson M, Restellini J, Yberte E, DE Meux A, Moulard F, Zha E, DE LA Roque R, DE LA Roque O, Vican P, Deesalle-Feat T, Biaujeaud M, Ringuet J, Bloth J, Botrel A. (2001).** Larousse des plantes médicinales: *identification, préparation,soins. 2ème édition de VUEF, Hong Kong: 335.*
- Pastre J, Priymenko N,(2007).** Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue de médecine vétérinaire*, vol : 1(4), 180-189.
- Jacques B et André R. (2004).** Biochimie métabolique. Ed. Ellipses . Paris. Pp217-225.
- Ji. L & Leichtweis S. (1997).** Exercise and oxidative stress: sources of free radicals and their impact on antioxidant systems. Interdepartmental Program of Nutritional Sciences, and Institute on Aging University of Wisconsin-Madison. 20 : 91-106.
- Johns D.G. (1976).** Adamson RH. Enhancement of the biological activity of cordycepin (3'-deoxyadenosine) by the adenosine deaminase inhibitor 2'-deoxycoformycin. *Biochem Pharmacol*. 25 :1441-4.
- Maurent K. (2017).** Synthèse de composés phénoliques de type diarylheptanoïde, évaluation de leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Thèse de Doctorat Chimie organique, Université Paul Sabatier de Toulouse.
- Kar A. (2007).** Pharmacognosy and Pharma biotechnologie ; 2ème Ed : *New Age*
- Kneifel H, Konig W.A, Loefffler W, Muller R. (1977).** Ophiocordin, an antifungal antibiotic of *Cordyceps ophioglossoides*. *Arch Microbiol*. 113 : 121-30.
- Kobayasi Y. (1982).** Clés des taxons des genres *Cordyceps* et *Torrubiella*. *Trans Mycol Soc Japon*. 23: 329-364.
- Künkele U, Lobmeyer T.R. (2007).** Plantes médicinales : identification, récolte, propriétés et emplois. Edition Parragon, Royaume-Uni.
- Larousse des plantes médicinales ; (2002).** Edition Hong Kong.
- Lehucher M.MP , Lesgards J.F, Delubac O, Stocker P, Durand P, Prost M.(2001).** Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. 30: Pp1076-1081

- Li S.P, Li P, Dong T.T, Tsim K.W, Wang Y.T. (2001).** Determination of nucleosides in natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps* mycelia by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 22 :144–50.
- Li S.P, Li P, Lai C.M, Gong Y.X, Kan K.K, Dong T.T. (2004).** Simultaneous determination of ergosterol, nucleosides and their bases from natural and cultured *Cordyceps* by pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1036: 239–43.
- Lin Y.W, Chiang B.H. (2008).** Anti-tumor activity of the fermentation broth of *Cordyceps militaris* cultured in the medium of *Radix astragali*. *Proc Biochim*. 43: 244–50.
- Liu Z.Y, Liang Z.Q, Liu Y.Y, Yao Y.J, Hyde K.D, Yu Z.N. (2002).** Preuve moléculaire de connexions teleomorph -anamorphes chez *Cordyceps* à partir des séquences d'ADNr de l'ITS-58S. *MycolRes*. 106: 1100-1108.
- Liu J.M, Zhong Y.R, Yang Z, Cui S.L, Wang F.H. (1989).** Chemical constituents of *Cordyceps militaris* (L.) Link. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 14 : 608–9.
- Liu J, Yang S, Yang X, Chen Z, Li J. (1997).** Anticarcinogenic effect and hormonal effect of *Cordyceps militaris*. *Zhongguo Yao Za Zhi*. 22 (2) :111–3.
- Lone A.A, Shaiq A, Ganai S.A, Ahanger R.A, Bhat H.A, Bhat T.A, Wani I.A.(2013).** Free radicals and antioxidants : Myths, facts and mysteries. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*. 7 (3) : 91-113.
- Mains E.B. (1958).** North American Entomogenous species of *Cordyceps*. *Mycologia*. 169-222.
- Majhenic L, Kerget M, Knez Z. (2007).** Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chem* 104:1258–68
- Mao X.B, Zhong J.J. (2006).** Significant effect of NH₄⁺ on cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme Microb Technol*. 38: 343–50.
- Marsup P, Yeerong K, Neimkhum W, Sirithunyalug J, Anuchapreeda S, To Anun C, Chaiyana W. (2020).** Enhancement of chemical stability and dermal delivery of *Cordyceps militaris* extracts by nanoemulsion. *Nanomaterials*. 10(8):1565.
- Mathews H.B, Lucier G.W, Fisher K.D. (1999).** Medicinal herbs in the United States: research needs. *Environ Health Perspect*. 107(10):773-8.
- Miller N.J, Sampson J, Candeias L.P, Bramley P.M, Rice-Evans C.A. (1996).** Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS letters*, 384(3), 240-242
- Miller. E.R, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma R.A, Appel L.J, Guallar E. (2005).** Meta-analysis : High-dosage Vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *J : Ann. Intern. Med*. 142 : 37-46.

- Mizuno T. (1999).** Medicinal effects and utilization of Cordyceps (Fr.) Link (Ascomycetes) and Isaria Fr. (Mitosporic Fungi) Chinese caterpillar fungi, “Tochukaso” (Review). *Intl J Med Mushroom*. 1: 251–61.
- Moreau B. (2003).** Maître de conférences de pharmacognosie à la faculté de Pharmacie de Nancy. Travaux dirigés et travaux pratiques de pharmacognosie de 3ème année de doctorat de pharmacie.
- Newman D.J, Cragg G.M. (2007).** Natural products as sources of New Drugs over the Last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70:461-477.
- Ng T.B, Wang H.X. (2005).** Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine. *J Pharm Pharmacol*. 57(12):1509–1519.
- Nikoh N, Fukatsu T. (2000).** Interkingdom host jumping underground: phylogenetic analysis of entomoparasitic fungi of the genus *Cordyceps*. *Molecular Biology and Evolution*. 17: 629-638.
- Nomura K, Imai H, Koumura T, Kobayashi T, Nakagawa Y.(2000).** Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycemia-induced apoptosis. *Biochem J*. 351; Pp183-193.4302.
- Paisan, S, Kirtikara, K. (2001).** Bioxanthracenes from the insect pathogenic fungus *Cordyceps pseudomilitaris* BCC 1620. I. Taxonomy, fermentation, isolation and antimalarial activity. *J Antibiot* 54. 29–35.
- Park S.J. (1996).** Growth responses of intestinal microorganisms to tochukaso, mushroom and tropical plant, and cordycepin from *Cordyceps militaris*. M. S. Thesis. Seoul National University, Suwon, Republic of Korea.
- Pelt J-M. (1980).** *Les drogues. Leur histoire, leurs effets*, Ed. Doin.
- Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne J.O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante : *Nutrition clinique et métabolisme* : 16 : 233-239.
- Pinto et al., (2003) ; Salgueiro et al., (2003).**
- Pooja P, Anand S. (2014).** Studies on the biology of *Cordyceps militaris*: A medicinal mushroom from North West Himalaya. *KAVAKA*. 43: 35-40.
- Prescrire. (2007).** *Bien utiliser les plantes en situations de soins*, numéro spécial été, T. 27, n° 286.
- Prior R.L, Wu X, Schaich K. (2005).** Standardized methods for the determination of
- Prouillac C. (2009).** Synthèse et évaluation de nouveaux composés organiques et phosphorés contre les effets des rayonnements ionisants. Etude de leur mécanisme d'action *in vitro*. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier Toulouse III.

- Ramful D, Bahorun T, Bourdon E, Tarnus E, Aruoma O.I. (2010).** Bioactivephenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potentialprophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, **278**: 75-87.
- Rees F.J, Zal F, Thome J.P. (2004).** Enfer et paradis : la toxicité de l'oxygène chez lesorganismes abyssaux. *J : Océanis*. 30 (3) : 277-291.
- Ribeizo J.A. (1995).** Purinergic inhibition of neurotransmitter release in the central nervous system. *Pharm Toxicol*. 77(5): 299–305.
- Ribereau G. (1968).** Notions générales sur les composés phénoliques. In « Les composésphénoliques des végétaux ». Ed Dunod, 1-27.
- Rochette L. (2008).** Stress oxydant et sepsis. *Réanimation* .17(6) : 1-4.
- Rukachaisirikul V, Chantaruk S, Tansakul C, Saithong S, Chaicharernwimonkoon L, Pakawatchai C. (2006).** A cyclopeptide from the insect pathogenic fungus *Cordyceps* sp. BCC 1788. *J Nat Prod*. 69: 305–7.
- Nimse S.B, Pal D. (2015).** Free radicals, naturel antioxydants, and their reactions mechanisms.RSC advances journal, 5, 27986-28006.
- Salle J.L. (1991).** Le totum en phytothérapie : approche de phyto-biothérapie.Paris: Frison-Roche, 239p.
- Scheibmeir H. D, Christensen K, Whitaker S.H, Jegaethesan J, Clancy R, Pierce J.D. (2005).** A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *J : Intensive andCritical Care Nursing*. 21 : 24-28.
- Schneider C.D & Reischak A.O. (2004).** Review article. Oxygen free radicals and exercise : mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. *Rev BrasMed Esporte*. 10(4).P : 314-318.
- Seaver F.J. (1911).** Les hypocreales de l'Amérique du Nord-IV. *Mycologia*. 3: 207-230.
- Seung-cheol L, Seok-Moo J, So-Young K, Dong-Ryul K, Seong-Chun J, Nam K.C, ET Ahn D.U. (2004).** Effet of Heat Treatment on the Antioxydant Activity ofExtracts from Citrus Peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 3389-339.
- Simon y, Mills. (2001).** Evidence for the clinician – a pragmatie frame work for phytotherapy.
- Singleton V.L, Orthofer R, Lamuela-Raventós R.M. (1999).** [14] Analysis of total phenolsand other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, in:Methods in Enzymology. Elsevier, pp: 152–178.
- Singleton V, ET Rossi J.A. (1965).** Colorimetry of total phénolics withphosphomotungstungstics acid reagent. *Am J Enol Viticulture*, **16**: 144-158

- Sone Y, Okuda R, Wada N. (1985).** Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agric Biol Chem.* 49 : 2641–53.
- Song C.H, Jeon Y.J, Yang B.K, Ra K.S, Sung J.M. (1998).** Anti-complementary activity of exo-polymers produced from submerged mycelial cultures of higher fungi with particular reference to *Cordyceps militaris*. *J Microbiol Biotechnol.* 8:536-539.
- Sumaya, Martinez M.T. (2004).** "Valorisation d'hydrolysats de co-produits de crevettes : étude de l'activité antiradicalaire et antioxydante, fractionnement des substances actives et effet de la glycation." *Microbiologie Doctorat*: 188.
- Ting Feng, Wu. (2016).** PhD in Microbiology, Department of Biotechnology, Southern Taiwan University of Science and Technology (Taiwan).
- Trivalle C. (2002).** Gérontologie préventive : élément de prévention du vieillissement pathologique. Ed : *Masson* (Paris), p104-106.
- Vamecq J, Vallée L, Storme L, Gelé P, Bordet R. (2004).** Les acteurs immédiats du stress oxydatif. *J : La Lettre du Pharmacologue.* 18(1) : 16-22.
- Wichtl M, Anton R, (2009).** Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Édition LAVOISIR, Paris: 38, 41.
- Won S.Y, Park E.H. (2005).** Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *J Ethnopharm.* 96: 555–61.
- Ying J, Mao X, Ma Q, Wen H. (1987).** Icons of medicinal mushroom from China. Beijing: Science Press Beijing (in Chinese). 151-155.
- Yu R.M, Yang W, Song L.Y, Yan C.Y, Zhang Z, Zhao Y. (2007).** Structural characterization and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris*. *Carbohydrate Polym.* 70 :430–6.
- Yu R, Wang L, Zhang H, Zhou C, Zhao Y. (2004).** Wound healing activity of henna, pomegranate and myrrh herbal ointment blend. Isolation, purification and identification of polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris*. *Fitoterapia.* 75 : 662–6.