

République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Abdelhamid Ibn Badis
Mostaganem
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



Département Des Sciences Alimentaires

Mémoire De Fin D'étude

Présenté par :

HAMDI CHERIF Sid Ahmed

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Nutrition et Pathologie

Thème

**Exploration des activités biologiques de *Retama*
*retam***

Devant le Jury :

- Président :	CHAALEL Abdelmalek	MCA	U. Mostaganem
- Encadrante:	YAHLA Imène	MCA	U. Mostaganem
-Examinatrice:	BOUKEZZOULA Nawel	MCB	U. Mostaganem

Année universitaire : 2021/2022

Résumé

La présente étude vise à évaluer l'activité antioxydant et anti-inflammatoire de l'extrait de *Retama retam*. L'activité antioxydant est évaluée par test du piégeage du radical DPPH. Selon les résultats, l'extrait éthanolique de *Retama retam* présente un bon effet antioxydant vis-à-vis de ce radical. L'activité anti-inflammatoire de cette plante a été explorée par deux méthodes : la méthode de stabilisation des membranes des globules rouges HRBC et le test d'inhibition de la dénaturation des protéines. Les résultats obtenus montrent que l'extrait éthanolique de *Retama retam* affiche un effet de la stabilité des membranes des globules rouges de 79%. En outre, cet extrait exerce un pouvoir inhibiteur de la dénaturation des protéines de 34%. A partir de ces résultats, on déduit que *Retama retam* a un bon potentiel anti-inflammatoire.

Mots clés : *Retama retam*, Effet antioxydant, effet anti-inflammatoire, dénaturation des protéines, DPPH.

ABSTRACT

The present study aims to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activity of *Retama retam* extract. The antioxidant activity is evaluated by DPPH radical scavenging test. According to the results, the ethanolic extract of *Retama retam* exhibits a good antioxidant effect against this radical. The anti-inflammatory activity of this plant has been explored by two methods: the HRBC red blood cell membrane stabilization method and the protein denaturation inhibition test. The results obtained show that the ethanolic extract of *Retama retam* displayed an effect of the stability of the membranes of red blood cells of 79%. In addition, this extract exerts an inhibitory power of protein denaturation of 34%. From these results, it is deduced that *Retama retam* has good anti-inflammatory potential.

Keywords: *Retama retam*, Antioxidant effect, anti-inflammatory effect, protein denaturation, DPPH.

ملخص

إن الهدف من دراستنا هو تقييم نشاط مضاد الأكسدة و مضاد الالتهابات لمستخلص *Retama retam*, و قد تم تقييم نشاط مضاد الأكسدة عن طريق اختبار DPPH, و وفقا للنتائج فإن المستخلص الإثنولي من نبات *Retama retam* له تأثير ممتاز كمضاد للأكسدة و يمكن أن يعمل كفخ للجذور, و قد تم دراسة التأثيرات العلاجية لهذا النبات بطريقتين مختلفتين : عن طريق تثبيت غشاء خلايا الدم الحمراء و اختبار تثبيط البروتين , و قد أظهرت النتائج المحصل عليها أن المستخلص *Retama retam* أظهر تأثيرا في ثبات الأغشية الحمراء بلغت نسبته **79 %** , و زيادة على هذا فإن لهذا الأخير قدرة لتثبيط البروتين بلغت نسبة **34 %** , و من كل هذا نستنتج أن نبات *Retama retam* يعمل جيدا كمضاد الالتهابات .

الكلمات المفتاحية: *Retama retam* , تأثير مضاد الأكسدة , تأثير مضاد الالتهابات

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail : A mes **chers parents**, aucun hommage ne pourrait être à la hauteur, de le leur amour inestimable, leur confiance leur soutien, leurs sacrifices et toute les valeurs qu'ils ont su m'inculquer. C'est grâce à eux que je suis arrivé là aujourd'hui. Que dieu les protège et leur procure bonne santé et une longue vie.

Spécialement à madame **YAHLA IMENE**

A **mes amis** Mohamed, Abdelhadi, Othman et mes collègues

A **412**

A mes camarades de la lutte estudiantine en **ONEA**

Enfin, à toute la famille **HAMDI CHERIF**

A tous ceux qui ont contribué de près ou loin à la réalisation de ce mémoire.

Je vous dis merci

Remerciements

Nous remercions tout d'abord Dieu Le Tout Puissant qui nous a donné la force et le courage pour terminer ce travail. Au terme de ce travail, il nous est à la fois un plaisir et un devoir de remercier sincèrement toutes les personnes qui ont participé à sa réalisation.

En premier lieu, Nous voudrions remercier chaleureusement madame **YAHLA IMENE** Maître de conférences A à l'Université de Mostaganem, de nous avoir offert l'opportunité de réaliser ce travail et de bien vouloir accepter de le diriger avec beaucoup de compréhension. Nous leur en sommes infiniment reconnaissants.

Nous remercions aussi les membres du jury d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail :

- Président : **M. CHAALEL** Maître de conférences A à l'Université de Mostaganem
- Examineur : **Mme BOUKEZZOULA** Maître de conférences B à l'Université Mostaganem

Nous remercierons également tous nos enseignants, nos collègues et le personnel de la faculté des sciences de la nature et de la vie

Enfin, juste un petit mot pour vous dire *Merci*

LISTE DES ABBREVIATIONS

ABS : Absorbance.

AINS : Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

AIS : Les anti-inflammatoires stéroïdiens

C°: Degré Celsius.

Ca : Calcium.

DMSO : diméthyl-sulfoxyde

DPPH : le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl.

EERR: Extrait éthanolique de *Retama retam*

GRH: Globule rouge humain

h : heure

HCl : Acide chlorhydrique

HRBS : Stabilisation des membranes des globules rouges humains.

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

ml : Millilitre.

Na : Sodium.

NaCl : Chlorure de sodium

P : Poids.

PBS : Tampon phosphate salin

µg : Microgramme.

µl : Microlitre

% : Pourcentage

Listes des tableaux et des figures

1. Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification scientifique de <i>Retama raetam</i>	8
Tableau 2: Caractéristiques de l'extrait éthanolique de <i>Retam retama</i>	23
Tableau3 : résultats du test de DPPH	24
Tableau 4 : Les valeurs de L'IC50 de L'extrait testé.....	26
Tableau 5 : Les valeurs de l'inhibition de L'extrait et du Diclofénac.....	27

2. Liste des figures

Figure 1: Classification du genre <i>Retama</i> selon Maire (1952-1987).....	6
Figure 2 : Photo de <i>Retama raetam</i> (photo originale).....	7
Figure 3 : Physiopathologie du stress oxydant (MERIANE, 2018).....	12
Figure 4 : Les principales espèces réactives de l'oxygène.....	13
Figure 5 : Localisation géographique de la wilaya de Mostaganem-Algérie (région kharouba)	17
Figure 6: Macération de la plantes <i>Retam retama</i>	18
Figure 7: Appareillage d'extraction sous vide	18
Figure 8 : Structure moléculaire du radical 1,1-Diphényle-2-picryl-hydrazyl (DPPH). (MERIANE, 2018).	19
Figure9 : Courbe de test DPPH d'extrait de <i>Retam retama</i>	24
Figure 10 : Courbe étalonnage de l'acide ascorbique.....	25
Figure 11 : Activité anti-inflammatoire de l'extrait et du diclofénac par hémolyse.....	27
Figure 12 : pourcentages d'inhibition de la dénaturation des protéines.....	29

Sommaire

Résumé

Abstract

ملخص

Dédicace

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des tableaux et des figures

Introduction 1

CHAPITRE I : Généralités sur *Retama Retam*

I.1. Définition des plantes médicinales..... 3

I.2. Définition de la phytothérapie..... 3

I.3. Utilisation traditionnelle des plantes médicinales..... 3

I.4. Les Rétaïe..... 4

I.4.1. Description générale du genre *Retama*..... 5

I.5. *Retama retam*..... 7

I.5.1. Définition 7

I.5.2. Morphologie et phénologie..... 7

I.5.3. Position systématique..... 8

I.5.4. Composition chimique..... 8

I.5.5. Intérêt écologique et économique..... 8

I.5.6. Utilisation en médecine traditionnelle..... 9

CHAPITRE II : Les activités biologiques

II.1. Activité Antioxydant..... 10

II.1.2. Les antioxydants..... 10

II.1.2.1. Classification..... 10

II.1.2.1.1. Les antioxydants endogènes..... 10

II.1.2.1.2. Les antioxydants exogènes..... 10

II.1.2.2. Propriétés antioxydants..... 12

II.2. Activité anti-inflammatoire..... 13

II.2.1. Définition de l'inflammation..... 13

II.2.2. Réaction inflammatoire	13
II.2.3. Médiateurs chimiques de l'inflammation	13
II.2.4. Les facteurs étiologiques.....	14
II.2.5. Anti-inflammatoires.....	14
II.2.5.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).....	15
II.2.5.2. Anti-inflammatoire stéroïdiens (AIS).....	15
II.2.5.3. Anti-inflammatoires traditionnels.....	15

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

III.1. L'objectif	16
III.2. Matériel du laboratoire utilisé.....	16
III.3. Protocole expérimental.....	17
III.3.1. Préparation de l'extrait.....	17
III.3.2. Rendement de l'extraction.....	18
III.3.3. Détermination de l'activité anti-oxydante	19
III.3.3.1. L'activité antioxydant par mesure de la activité anti radicalaire sur le DPPH....	19
III.3.3.2. Protocole.....	19
III.3.3.3. Détermination de la concentration inhibitrice IC50%.....	20
III.3.4. Exploration de l'activité anti-inflammatoire.....	21
III.3.4.1. Méthode de stabilisation des membranes HRBC	21
III.3.4.2. Test de l'inhibition des protéines	22

Chapitre IV : RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1 Extraction.....	23
IV.2. Etude de l'activité antioxydant	23
IV.3. L'activité anti-inflammatoire.....	26
IV.3.1. Stabilisation des membranes des globules rouges humaines.....	26
IV.3.2. Inhibition de la dénaturation du l'albumine des œufs.....	28
CONCLUSION.....	30
Références bibliographiques.....	31
Annexes.....	36

Introduction

Introduction

Depuis des lustres, voire des millénaires, l'homme a recours aux plantes pour soigner ses maux, apaiser ses angoisses et panser ses blessures. Malgré le développement de la pharmacologie, l'utilisation thérapeutique des plantes médicinales est encore largement pratiquée, notamment dans les pays sous-développés. En effet, 80.000 des quelque 500.000 espèces végétales ont des vertus thérapeutiques.

Le nombre d'espèces végétales en Algérie est estimé à environ 3000, dont 15% sont endémiques et appartiennent à différentes familles botaniques. Le potentiel floristique, qui présente un intérêt biologique, a incité les chercheurs à étudier ces ressources tant sur le plan phytochimique que pharmaceutique. La plante possède des qualités pharmacologiques exceptionnelles en raison de la quantité de principes actifs, ce qui pourrait expliquer ses nombreux usages médicaux et son utilisation en médecine traditionnelle.

Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre l'activité de l'oxygène réactif et la capacité du système biologique à détoxifier rapidement les intermédiaires réactifs ou à réparer les dommages qui résultent de cette action. La génération de radicaux libres augmente, les défenses antioxydantes deviennent moins actives, ou les deux, sont les causes du stress oxydatif (CHENINI., 2022).

L'inflammation est un processus normal dans l'organisme humain et animal, elle agit pour éliminer les infections et favoriser la cicatrisation des plaies (Liu et *al.*, 2019). Il s'agit d'un système sophistiqué qui implique une série d'événements successifs dans le tissu afin d'éliminer la source primaire du dommage cellulaire. (Dos Reis Nunes et *al.*, 2020).

L'Algérie possède un patrimoine végétal important regroupant des plantes aromatiques, et médicinales qui sont utilisées dans le traitement des nombreuses pathologies (Amar et *al.*, 2010).

Retam *Retama* est un arbuste caractérisé par une distribution géographique très diversifiée, possédant à la fois des intérêts pharmacologiques et écologiques. En effet *R. retam* est une plante connue par ses vertus thérapeutiques.

Le genre *Retama* appartient à la tribu des *Genistae* de la famille des *Fabaceae* et comprend quatre espèces réparties dans le bassin méditerranéen, en Afrique du Nord et dans les îles Canaries. *Retama Retam* (Forssk.) est une plante spontanée commune dans le nord et l'est de

la Méditerranée. Des études pharmacologiques précédentes sur la plante ont révélé ses diverses propriétés médicinales : antibactériennes, antifongique, antihypertenseur, antioxydant, antiviral, diurétique, hypoglycémique, hépato protecteur, néphroprotecteur et cytotoxique (Djeddi et *al* ; 2013)

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail consiste à évaluer les activités anti-oxydante et anti-inflammatoire de l'extrait de la partie aérienne de *Retama Retam*.

CHAPITRE I : Généralités

sur *Retama retam*

CHAPITRE I : Généralités sur *Rétama retam*

I.1.Définition des plantes médicinales

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 médicinale. C'est-à-dire qu'elles sont présentées pour leurs propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales (**Ghabrier, 2010**).

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 (**Debuigne, 1974**). Ces plantes médicinales peuvent également avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques (**Sanago, 2006**).

D'autre part, il s'agit des plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont précurseurs dans la synthèse de drogues utile (**Abayomi,2010**). Leur action provient de leur composés chimiques (métabolisme secondaire) ou de la entre des différents composés présentes (**Sanago, 2006**).

L'expression "drogues brutes d'origine naturelle ou biologique" est utilisée par les pharmaciens ou les pharmacologues pour désigner les plantes ou parties de plantes qui ont des propriétés médicinales (**Abayomi, 2010**).

I.2. Définition de la phytothérapie

Le mot "phytothérapie" se compose étymologiquement de deux racines grecques: phuton qui signifie "plante" et thérapie qui signifie "traitement" (**Gayet, 2013**).

La phytothérapie est le traitement ou la prévention des maladies par l'usage des plantes. A la différence de la médecine classique, en phytothérapie, il est recommandé d'utiliser la plante entière, appelée aussi "Totum" plutôt que des extraits obtenus en laboratoire (**Vigan, 2012**).

I.3. Utilisation traditionnelle des plantes médicinales

Depuis 150 ans, la pharmacie reçoit des médicaments d'une efficacité exceptionnelle à base de plantes médicinales. De nombreuses études dans le domaine de l'ethnopharmacologie démontrent aujourd'hui que les plantes examinées pour une utilisation en médecine traditionnelle sont fréquemment des plantes utiles dans des modèles pharmacologiques en plus d'être quasiment non toxiques (**Gurib-Fakimm,2006**).

Aujourd'hui, les décoctions, les infusions, les macérations et les cataplasmes sont encore utilisés pour traiter de nombreuses conditions médicales. Cependant, la majorité d'entre eux ont été remplacés par des produits pharmaceutiques artificiels. Mais avec les informations d'aujourd'hui, il est possible d'examiner ces herbes et de faire l'action conseillée par nos ancêtres **(Bourrel, 1993)**.

a. Décoction

Après 24 heures de trempage à température ambiante, porter à ébullition et laisser mijoter environ 30 minutes. Laisser reposer la préparation 12 heures puis filtrer **(Delwiche, 2008)**.

b. Infusion

Mise en contact de la plante avec de l'eau bouillante pendant plusieurs minutes **(Beloued, 2009)**. Elle se pratique pour les feuilles, les fleurs, les petites graines...etc. En créole, on entend souvent les termes de « fêfused » ou « met' afugé » **(Julie, 2011)**.

c. Macération

Consiste à faire tremper les plantes dans de l'eau froide pendant plusieurs heures. Quant aux quantités, il faut prévoir une cuillère à café de plantes pour une tasse d'eau, une cuillère à soupe pour un bol, et trois cuillères à soupe pour un litre. Les plantes peuvent également macérer dans de l'alcool, de la glycérine ou un autre solvant **(Anne et Nogaret, 2003)**.

d. Cataplasmes

Préparation de plante en pâte pouvant être appliquée sur la peau dans un but thérapeutique. On peut également utiliser des bandes ou des compresses imbibées de préparation à base de plantes sur la peau **(Julie, 2011)**.

L'ethnopharmacologie et l'ethnobotanique ont pour but de comprendre les pratiques et les représentations relatives à la santé, à la maladie, ainsi que la description et l'évaluation thérapeutique des plantes utilisées dans les pharmacopées traditionnelles.

L'usage empirique des différentes préparations traditionnelles plantes est donc extrêmement important pour une sélection efficace de plantes puisque la plupart des métabolites secondaires de plantes employées en médecine moderne ont été découverts par l'intermédiaire d'investigations ethnobotaniques **(Gurib-Fakimm, 2006)**.

I.4. Les *Rétame*

Les Légumineuses du genre *Retama*, comptant quatre espèces (*R. monosperma* (L.) Boiss., *R. ratama* (Forssk.) Webb, *R. sphaerocarpa* (L.) Boiss. et *R. dasycarpa* (Cosson.). Ce sont des plantes pérennes arbustives appartenant à la sous-famille des Papilionideae et à la tribu des Genisteae et sont largement distribués dans le Nord de l'Afrique, dans les îles

Canaries, dans le Sud de l'Europe et dans l'Est de l'Asie (**Zohary, 1959**). Ces espèces présentent beaucoup de difficultés taxonomiques, elles ont été souvent attribuées à la tribu des Genisteae (**Polhill, 1994; Lopez et al., 1998**). Elles ont été classées dans différents genre; *Spartium* L., dans Genisteae Forssk. et enfin dans *Retama* Boiss.

I .4.1. Description générale du genre *Retama*

Le genre *Retama* est un genre d'espèces représenté par des arbustes ou arbrisseaux de un à quatre mètres de longs rameaux «joncailles» dépourvus ou avec peu de feuilles (xéromorphes) dans le but de s'adapter au milieu désertique où l'eau est rare. La chlorophylle se trouve dans l'écorce des rameaux qu'ils sont donc verts et remplacent les feuilles dans le phénomène d'assimilation chlorophyllienne. Les stomates sont rares et sont confinés dans des cryptes revêtues entourées de poils où l'air y est toujours humide et l'évaporation est fortement réduite. Les tiges sont rigides, leurs parois externes sont épaisses et l'épiderme est recouvert d'une épaisse cuticule (**Evanariet al., 1971 et Shallabyet al., 1972**). Les fleurs sont en grappe de couleur blanche ou jaune selon les espèces (**Shallabyet al., 1972**) .

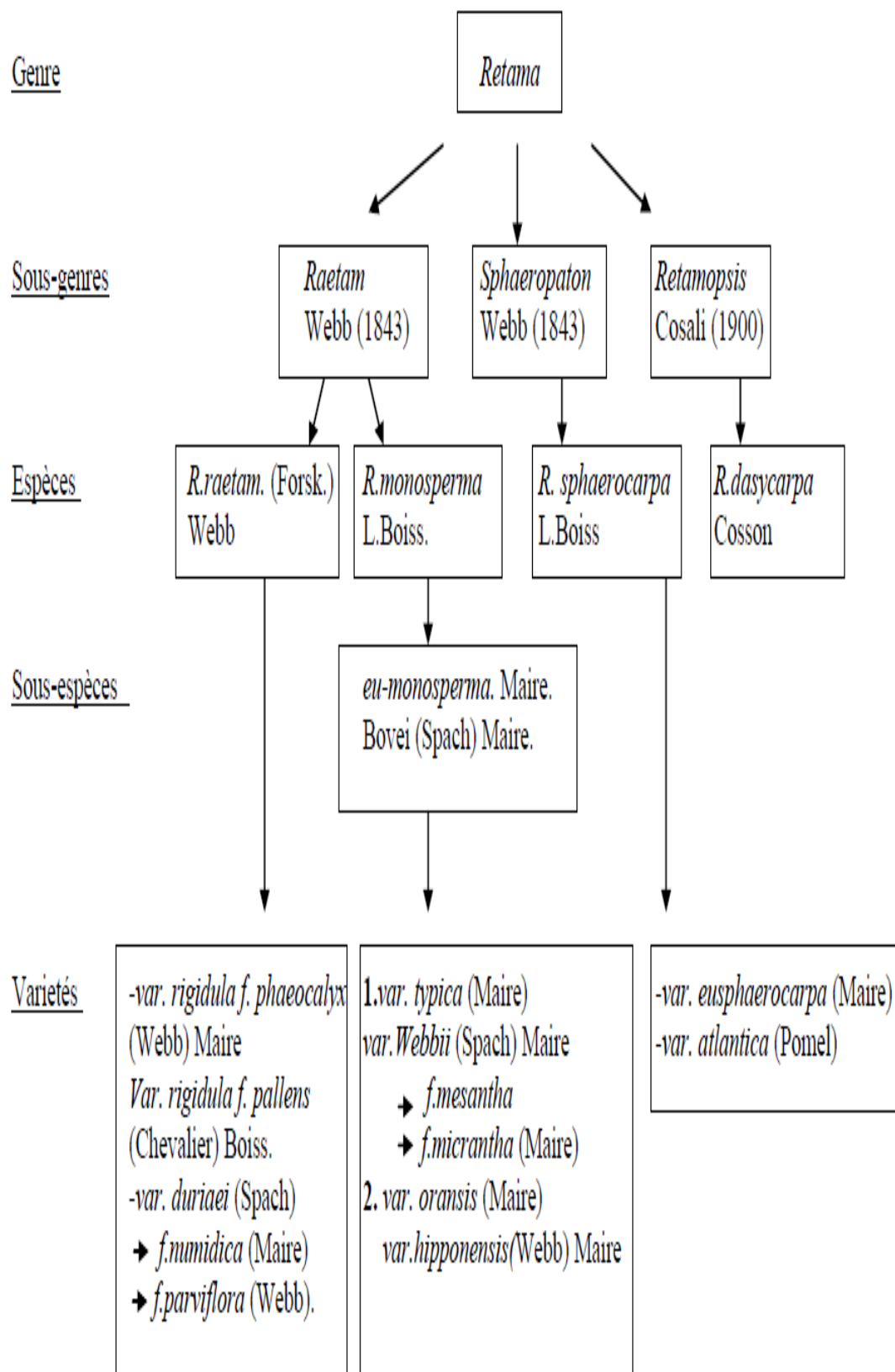


Figure1: Classification du genre *Retama* selon **Maire (1952-1987)**.

I.5. *Retama retam*

I .5.1. Définition

Les rétames sont des Légumineuses arbustives, occupant les zones arides, semi-arides et côtières, qualifiées de plantes fixatrices de dunes, leur nom dérive du nom biblique (ROTEM) qui fut changé par les arabes en (R'tem) ou (retam) (**ZOHARY, 1962 ; SHALLABY et al, 1972**).

I.5.2. Morphologie et phénologie

Retama retam est un arbuste saharien de 1 à 3,5m de hauteur. Le système racinaire est de type pivotant pouvant atteindre plusieurs mètres de profondeur. Des racines adventives sont également présentes sur les rameaux et colonisent la surface des dunes. Les rameaux sont veloutés. Les feuilles sont très caduques, les inférieures sont trifoliées, les supérieures sont simples et unifoliées (**Genmedoc, 2006; Damerджи et Amar, 2013**). Les fleurs sont blanches de 8 à 10mm, avec un étendard égalant la carène ou plus long. La gousse est non dilatée sur sa nature ventrale contenant une petite graine (**Quezel et Santa, 1962**).



Figure 2 :Photo de *Retama retam* (photo original)

I.5.3. Position systématique

Selon **Damerdji et Amar (2013)** les rétames sont classés dans le taxon suivant :

Tableau 1 : Classification scientifique de *Retama retam*

Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes.
Classe	Dicotylédones
Ordre	Fabales
Famille	Fabacées
Genre	Retama
Espèce	<i>Retamaraetam</i>
Nomsvernaculaires	Rtam

I.5.4. Composition chimique

Il été rapporté que l'espèce de *retam* contient des alcaloïdes, des flavonoïdes (Hayetet *al.*, 2008). Ainsi des composés phénoliques (**Saadaouiet *al.*, 2006**).**Kassem *et al.*, (2000)** ont mentionnés que flavonoïdes tandis que daidzéine, la vicénine-2, la naringénine, l'apignine sont présents dans les graines, la daidzéine 7,4'-diméthyléther, 7-O-glucoside de chrysoérol dans les feuilles. Ils ont aussi isolés deux nouveaux flavonoïdes de la partie aérienne, nommées la lutéoline 4'-O-néohespéridoside et 5,4'-dihydroxy- (3 ", 4"-dihydroxy) - 2 ".

I.5.5. Intérêt écologique et économique

Retama retam possède unextrême tolérance à la sécheresse et une acclimatation à l'écosystème du désert (Pnueli et al., 2002). De ce fait, elle permet d'améliorer la fixation et la fertilisation du sol (**Benmiloud et al., 2011**).

L'espèce *Retama retam* serve un meilleur fourrage, elle est aussi orientée vers l'industrie. Les fleurs peuvent être utilisées comme conservateur naturel dans les aliments et les produits pharmaceutiques ou industrielles grâce à ces effet antibactérienne (**Hayetet al., 2008**).

I.5.6. Utilisation en médecine traditionnelle

Retama retam est utilisé dans la médecine populaire sous le nom commun "R'tam" pour réduire l'inflammation de la peau, tandis qu'au Liban, il est utilisé comme la médecine traditionnelle à base de plantes contre les douleurs articulaires et au Grand Maghreb contre les maladies de la peau. Les études pharmacologiques antérieures sur l'usine ont révélé ses diverses propriétés médicinales: antibactérienne, antifongique, anti-hypertenseurs, anti-oxydantes, anti-viraux, diurétiques, hépato, néphroprotecteurs et effets cytotoxiques (**dziriet al., 2012; Djeddiet al., 2013**).

Une décoction de racine ou bien des feuilles de *Retamaraetam*, s'utilise contre le diabète. Le décocté de feuilles fraîches de *Retama retam* est utilisé comme bain de pieds en induisant l'hypoglycémie (**Benkhniqeeet al., 2014**).

Les fruits de Retam passent pour toxiques, ils produiraient des hallucinations, le Retem fixe les dunes (**Trabut, 2006**).

CHAPITRE II : Les activités biologiques

CHAPITRE II : Les activités biologiques

II.1.Activité Antioxydant

II.1.1.Oxydants

L'oxydation est le phénomène qui fait rouiller les métaux, qui fait flétrir les légumes et les fruits, rancir les graisses. Il modifie le goût et la couleur des aliments(**Rolland,2004**).

II.1.2. Les antioxydants

Par définition un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. Les antioxydants s'utilisent pour réduire l'oxydation du produit auquel ils sont mélangés. L'effet des antioxydants provient de deux mécanismes : 1) Ils neutralisent les radicaux libres et empêchent les réactions en chaîne initialisées par ces derniers. 2) Les antioxydants détruisent les hydroperoxydes (composés intermédiaires formant des radicaux libres en interrompant la liaison O-O), diminuant ainsi la vitesse de formation de radicaux libres (**Ribeiro et al., 2001**).

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

II.1.2.1. Classification

II.1.2.1.1. Les antioxydants endogènes

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

II.1.2.1.2. Les antioxydants exogènes

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

➤ **Médicaments**

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

➤ **Antioxydants naturels**

- **La vitamine C ou acide ascorbique**

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

- **La vitamine E ou tocophérol**

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

- **Le sélénium**

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

- **Le β -carotène :**

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

- **Les flavonoïdes :**

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

- **Les tanins :**

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

- **Les coumarines :**

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

- **Les phénols :**

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

II.1.2.2. Propriétés antioxydants

Les flavonoïdes présentent des activités anti oxydantes. Ces propriétés impliquent une diminution de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène in vivo. De nombreux travaux datant de ces dernières décennies ont montré en effet l'effet délétère d'un excès d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), également appelé « stress oxydant ». Cet excès pouvant être lié à une surproduction endogène ou bien à un déficit de système de défense visant à éliminer ces ERO, il peut être responsable du développement de pathologies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète, les maladies neurodégénératives etc. ... (MERIANE, 2018).

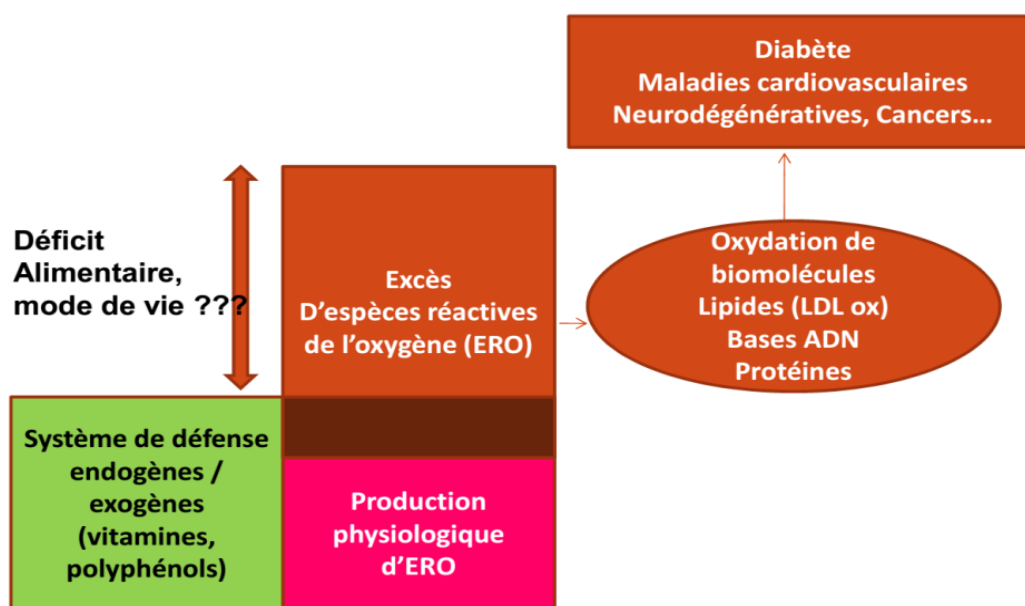


Figure 3 : Physiopathologie du stress oxydant (MERIANE, 2018).

Parmi ces ERO, le radical hydroxyle (HO.) est l'espèce réactive la plus nuisible. Les systèmes de défense de l'organisme sont soit des systèmes enzymatiques (SOD : superoxyde-dismutase, GSH-péroxydase : Glutathion peroxydase, catalase), soit des antioxydants

exogènes : vitamines (C, E), polyphénols (flavonoïdes, acides phénols etc....), caroténoïdes (carotène, lycopène, lutéine etc...) (MERIANE, 2018).

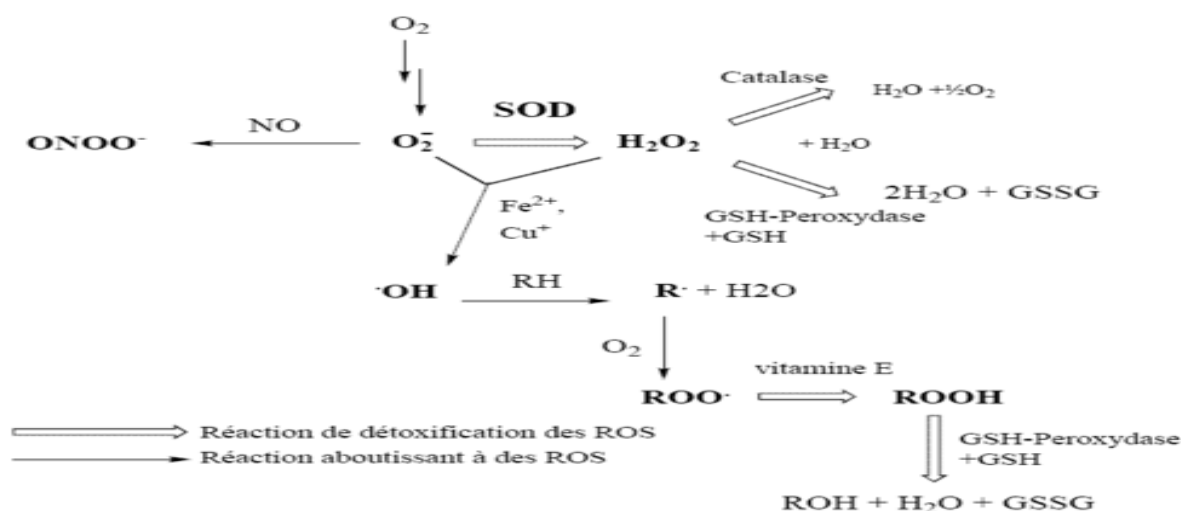


Figure 4 : Des principales espèces réactives de l'oxygène

II.2. Activité Anti-Inflammatoire

II.2.1. Définition de l'inflammation

L'inflammation est l'ensemble des mécanismes de défense par lesquels le corps reconnaît, détruit et élimine toutes les substances étrangères.

La réaction inflammatoire dépasse parfois ses objectifs, entraînant des effets délétères. Elle doit alors être gérée Samy (Iskandar et al , 2019)

II.2.2. Réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire se fait par l'intervention des cellules immunitaires (phagocytes, lymphocytes, polynucléaires neutrophiles, basophiles, etc.) et des molécules telles que les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Elle est caractérisée par quatre principaux signes macroscopiques qui s'observent au niveau des tissus affectés : une chaleur, une rougeur, un gonflement et une douleur (Yougbaré-Ziebrou, 2015).

II.2.3. Médiateurs chimiques de l'inflammation

Une importante activité métabolique accompagne l'inflammation. Des protéoglycanes et du collagène sont synthétisés, des enzymes protéolytiques sont activées et

entraînent la libération d'amines biogènes (histamine et sérotonine) puis favorisent la vasodilatation, la transsudation plasmatique et l'oedème.

Ces enzymes provoquent la fragmentation des chaînes peptidiques et la formation de polypeptides comme la bradykinine qui détermine contraction des fibres lisses ou comme la leucotoxine qui provoque la diapédèse des leucocytes. La bradykinine est inactivée par l'enzyme de conversion la quelle agit principalement sur l'angiotensine¹ pour la transformer en angiotensine 2.

Les prostaglandines E sont synthétisées et contribuent à la sensibilisation de la douleur et de la vasodilatation et la contraction des fibres lisses. La substance fondamentale faite de myco polysaccharides se dépolymérise.

Les « Slow Reacting Substances » apparaissent et contribuent à la réaction inflammatoire (**Souhel, 2010**).

II.2.4. Les facteurs étiologiques :

Les causes sont multiples. Elles déterminent les lésions cellulaires ou tissulaires qui vont déclencher l'inflammation :

- **Causes physiques** : ce sont les traumatismes, la chaleur, les rayonnements, le courant électrique.
- **Causes trophiques** par défaut de vascularisation.
- **Causes chimiques** : ce sont les acides, les bases, les corps étrangers exogènes ou endogènes.
- **Causes biologiques**: ce sont les bactéries, les virus, les parasites et les champignons, le venin, les toxines, le pollen.
- **Conflit immunitaire**

L'inflammation est souvent la conséquence d'une nécrose tissulaire qui, à son tour est secondaire à de nombreuses causes. Par exemple : une occlusion artérielle (**Souhel, 2010**)

II.2.5. Anti-inflammatoires

La thérapeutique anti-inflammatoire est généralement menée par des molécules de Synthèses du type anti-inflammatoire non stéroïdien ou stéroïdien (corticoïdes), ce sont des médicaments largement utilisés mais dont les effets secondaires sont parfois graves, en

particulier la toxicité sur le système rénal et digestif (irritations digestives pouvant aller jusqu'à l'ulcération gastrique) (**Das, 2011**).

II.2.5.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Anti-inflammatoires non stéroïdiens, sont parmi les médicaments contre la douleur les plus couramment prescrits. Il s'agit d'une classe thérapeutique très efficace contre la douleur et l'inflammation (**Wongrakpanichet *al.*, 2018**).

Ils représentent environ 5 à 10 % de tous les médicaments prescrits chaque année (**Onder et *al.*, 2004**).

Ces médicaments inhibent les enzymes cyclooxygénases (COX), qui sont des protagonistes déterminants dans la synthèse des prostaglandines, représentant un médiateur majeur du processus inflammatoire (**Wongrakpanich et *al.*, 2018**). Par rapport aux AINS non sélectifs qui inhibent à la fois la COX-1 et la COX-2, les inhibiteurs de la COX-2 (connus sous le nom de coxibs) n'inhibent que les enzymes COX-2. La COX-2 joue un rôle plus important dans la douleur et l'inflammation médiées par les prostaglandines, tandis que la COX-1 joue un certain rôle dans la protection de la muqueuse gastrique et dans l'hémostase plaquettaire(**Harirforoosh et *al.*, 2013**).

II.2.5.2. Anti-inflammatoire stéroïdiens (AIS)

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde (GC) qui sont des hormones stéroïdes produites par la glandes surrénale et régulées par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (**Faure, 2009 ; Ayroldiet *al.*, 2012**).

II.2.5.3. Anti-inflammatoires traditionnels

Les effets anti-inflammatoires des polyphénols, qui peuvent être exercées au niveau moléculaire, sont dépendants de la structure spécifique des composés polyphénoliques. Les fonctions de macrophage, y compris la production de cytokines, peut également être affectée par certains flavonoïdes par la modulation de la cyclo-oxygénase inductible (COX-2) et l'oxyde nitrique synthèse inductible (iNOS). Plusieurs études expérimentales ont rapporté les effets immun modulateur des composés polyphénoliques sur l'immunité humorale et cellulaire (**Neyestani, 2008 ; Madhuriet *al.*, 2008**).

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

III.1. L'objectif

L'objectif de notre travail réalisé au sein de laboratoire pédagogique biochimie 03de l'Université de Mostaganem consiste à explorer les activités anti oxydante et anti-inflammatoire de *Retama retam*

III.2. Matériel du laboratoire utilisé

1. Verrerie : erlenmeyer, entonnoir, bécher, verre de montre, pipette pasteur, flacons et tubes a essais.

2. Appareil utilisé : balance (KERN kb), étuve, spectrophotomètre (6715 UV/Vis JENWAY), réfrigérateur, pH-mètre, agitateur magnétique, agitateur (stuart) ,rotavapeur (bouchi) , centrifugeuse (sigma).

3. Autres matériel : spatule, portoir, barreau (agiter les milieux), pince, micropipette. Papier filtre.

4. Réactifs chimiques

- Éthanol (C_2H_6O).
- Méthanol (CH_3OH).
- Eau distillée.
- Acide chlorhydrique(HCl).
- Acide acétique(CH_3COOH).
- Hydroxyde de sodium($NaOH$).
- Chlorure de sodium($NaCl$).
- DMSO (dimethylsulphoxide).
- DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).
- Diclofénacde sodium.
- Magnésium (Mg^{2+}).

Chlorure de potassium (KCl).

5. Matériel végétal

La plante a été cueillie à la fin du mois de février dans la région kharouba à Mostaganem (35°56'0"N, 0°5'25"E).

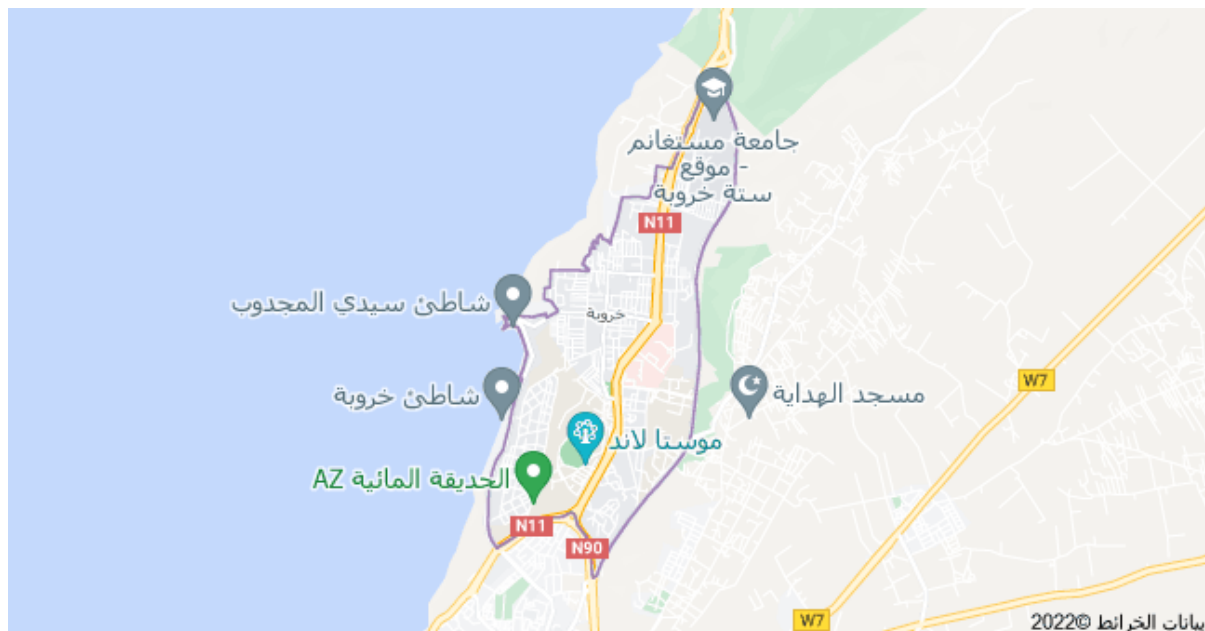


Figure 5 : Localisation géographique de la wilaya de Mostaganem -Algérie (région kharouba)

5.1. Opération Pulsar

Après une opération de drainage, la plante est séchée dans l'ombre, loin de l'humidité, de la lumière et du soleil, pendant 21 jours, en présentant une ventilation appropriée jusqu'à ce que la plante se désintègre

5.2. Broyage et tamisage

Dans un broyeur électrique le matériel végétal a été broyé puis tamisé jusqu'à l'obtention d'une poudre fine et homogène.

III.3. Protocole expérimental

III.3.1. Préparation d'extrait

Afin d'extraire les principes actifs de la plante testée, une extraction de type solide/liquide (macération) a été réalisée avec deux solvants, le méthanol et l'acétone. D'après (Ncube et al., 2008) le meilleur rapport d'extraction est de 1/10 (P/V) ainsi, le protocole adapté est le suivant

- 100g de poudre de l'échantillon est mis à macérer dans 1000 ml d'Ethanol
- Le mélange est soumis à une agitation mécanique, à température du laboratoire

- pendant 24heures.
- A la fin de la macération, une filtration est réalisée afin de séparer le solide
- du liquide solution éthanolique
- La solution obtenueest évaporée sous vide à 57°C au rotavapeur (bouchi)



Figure 6: Macération des plantes *Retama retam*

III.3.2.Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est calculé par la formule suivante

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = [(P1 - P0)/E]. 100$$

P₁ : poids du ballon avec l'extrait sec en g.

P₀ : poids du ballon vide en g.

E : poids de la poudre végétale en g.



Figure7:Appareillage d'extraction sous vide

III.3.3.Détermination de l'activité anti-oxydante

II.3.3.1. L'activité antioxydant par mesure de la activité anti radicalaire sur le DPPH

Principe :

L'utilisation de ce radical comme réactif est basée sur le fait que dès que le radical DPPH réagit avec un composé anti radicalaire, celui-ci libère un hydrogène après réduction conduisant ainsi à un changement de couleur (passant du violet foncé au jaune clair. On peut donc visualiser très rapidement une activité anti radicalaire, simplement suite à un changement

de coloration du radical (DPPH) voir (Figure8)(MERIANE, 2018)

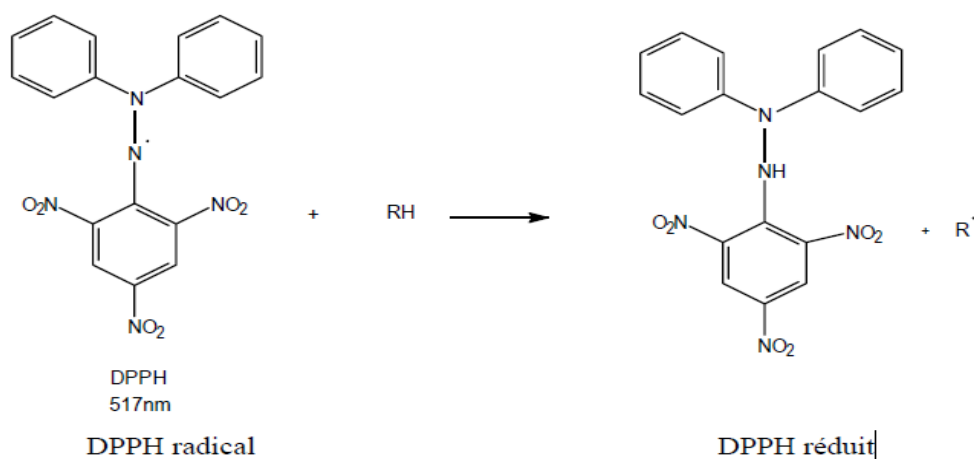


Figure 8 : Structure moléculaire du radical 1,1-Diphényle-2-picryl-hydrazyl (DPPH).(MERIANE, 2018).

Cette activité peut d'ailleurs même être mesurée en quantifiant par spectrophotométrie la réduction de l'absorbance à 515 nm quand le radical libre stable réagit avec un antioxydant.

III.3.3.2. Protocole

Le test antioxydant a été réalisé avec la méthode au DPPH (Sanchez et al., 1998). 50µl de l'EERR à différentes concentrations (de 0,0125 à 5mg/ml) ont été ajoutés à 1,95 ml de la solution éthanolique du DPPH (0,025g/l). Parallèlement, un contrôle négatif a été préparé en mélangeant 50µL de méthanol avec 1,95 ml de la solution éthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance a été faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 515 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. Le contrôle positif a été représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont

l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration le test a été répété 3 fois



Photo originale

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%).

$$\text{Inhibition \%} = \frac{(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{test}}) \times 100}{\text{Abs}_{\text{control}}}$$

Où:

Abs_{control} : Absorbance du contrôle à la longueur d'onde 515nm;

Abs_{test} : Absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde 515nm.

III.3.3.3. Détermination de la concentration inhibitrice IC50%

Le paramètre IC50 qui indique le pouvoir antioxydant d'un composé ou d'un extrait et qui est défini comme étant la concentration de l'extrait exprimée en mg/ml nécessaire pour balayer 50% du radical DPPH. La valeur d'IC50 de chaque extrait est déduite à partir des équations des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de chaque extrait. Il faut rappeler que plus la valeur de IC50 est petite plus l'activité antioxydant des extraits est grande (**Bokhari et al., 2013**).

III.3.4.Exploration de l'activité anti-inflammatoire:

III.3.4.1. Méthode de stabilisation des membranes HRBC :

III.3.4.1.1.Préparation des globules rouges :

Le sang (10 ml) doit être prélevé d'une personne saine qui n'a pris aucun médicament anti-inflammatoire. Le sang prélevé sera mélangé avec un volume égal de solution d'Alsever stérilisée (2% de dextrose, 0,8% de citrate de sodium, 0,05% d'acide citrique et 0,42% de chlorure de sodium dans l'eau).

Le mélange doit être centrifugé à 3000 tr / min pendant 10 min et les cellules emballées doivent être utilisées directement.

III.3.4.1.2. Hémolyse induite par la chaleur :

La principale en cause est la stabilisation de la lyse membranaire HRBC induite par l'hypotonie. Le mélange d'essai contenait l'extrait (50, 100, 250, 1000, 2000 µg/ml) / médicament standard diclofénac sodium (50, 100, 250, 500, 1000, 2000 µg/ml), 1 mL phosphate buffer (0,15M, pH 7,4), 2 mL d'hyposaline (0,36%), 0,5 ml de HRBC, ont été incubés à 37°C pendant 30 min et centrifugés pendant 20 min à 3000 rpm. La teneur en hémoglobine de la suspension a été estimée au spectrophotomètre à 560 nm (**Yoganandam et al., 2010**). L'expérience a été réalisée en trois exemplaires pour tous les échantillons. L'hémolyse de pourcentage produite en présence d'eau distillée a été prise à 100%.

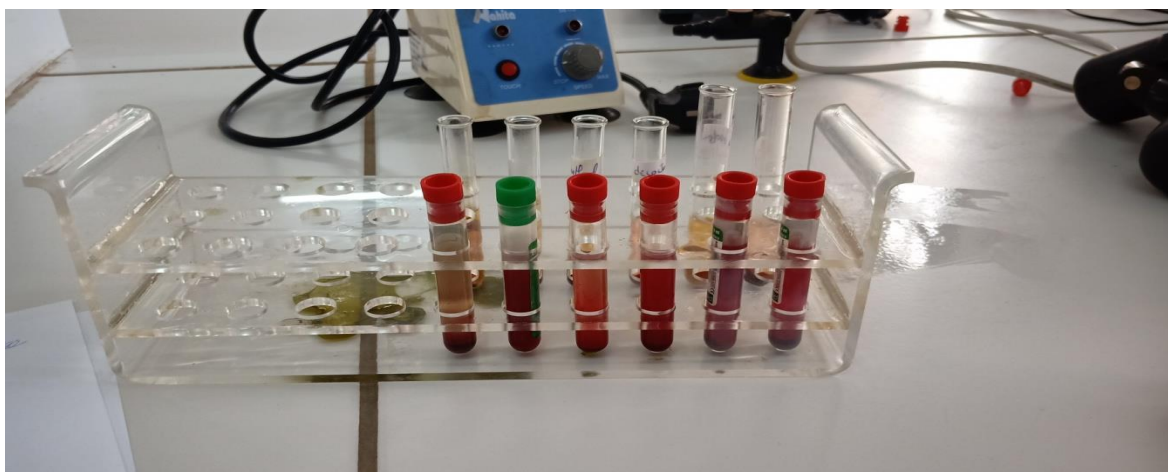


Photo originale

III.3.4.2. Test de l'inhibition des protéines :

Le mélange réactionnel (5 ml) se compose de 0,2 ml d'albumine d'œuf (provenant d'un œuf de poule frais), 2,8 ml de solution saline tampon phosphate (PBS, pH -6,4) et 2 ml de concentrations variables de suspension bactérienne. Un volume similaire d'eau bidistillée sert de contrôle. Ensuite, les mélanges doit être incubés à 37° C dans un incubateur pendant 15 minutes puis chauffés à 70 ° C pendant 5 minutes. Après refroidissement, leur absorbance est mesurée à 660 nm en utilisant un véhicule comme blanc. Le Diclofénac sodique à la concentration finale de (50, 100, 300, 600, 1200, 2500, µg / ml) est utilisé comme médicament de référence et traité de façon similaire pour la détermination de l'absorbance. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines doit être calculé en utilisant la formule suivante :

Pourcentage d'inhibition=100×[Vt/Vc-1]%
--

Où :

Vt= absorbance de l'échantillon d'essai.

Vc= absorbance du témoin.

L'extrait ou la concentration de médicament pour une inhibition de 50% (IC50) est déterminée à partir de la courbe dose-réponse en traçant le pourcentage d'inhibition par rapport au contrôle par rapport à la concentration de traitement.

Chapitre IV : RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre IV : RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1 Extraction

La préparation de l'extrait à partir des feuilles de *Retama retam* broyées a été effectuée par l'éthanol. Cette extraction a permis d'obtenir un extrait brut : l'extrait éthanolique de *Retama retam* (EERR).

Après extraction et récupération de l'extrait, le rendement, la couleur et l'aspect physique sont déterminés et représentés dans le **tableau 2** :

Tableau2:Caractéristiques de l'extrait éthanolique de *Retama retam*

Extrait	Couleur	Aspect	Rendement
EERR	Verte foncée	Liquide huileux	29.1 %

IV.2.Etude de l'activité antioxydante

IV.2.1. Test de piégeage du radical libre DPPH

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques. Dans ce test, les antioxydants réduisent le DPPH ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényle- picrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez et al, 1998).

L'activité antioxydant de l'extrait éthanolique de *Retama retam* et de l'antioxydant 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.

Les résultats relatifs à l'activité anti-oxydante sont exprimés dans **tableau 3**.

Contrôle=0.581		
C ug/ml	ABS 517 nm	I%
5	0.167	71,256
2.5	0.428	26,333
1.25	0.504	13,253
0.625	0.510	12,220
0.312	0.514	11,531

Tableau 3 : Affiche les résultats d'un test DPPH

Nous traçons le graphique du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait :

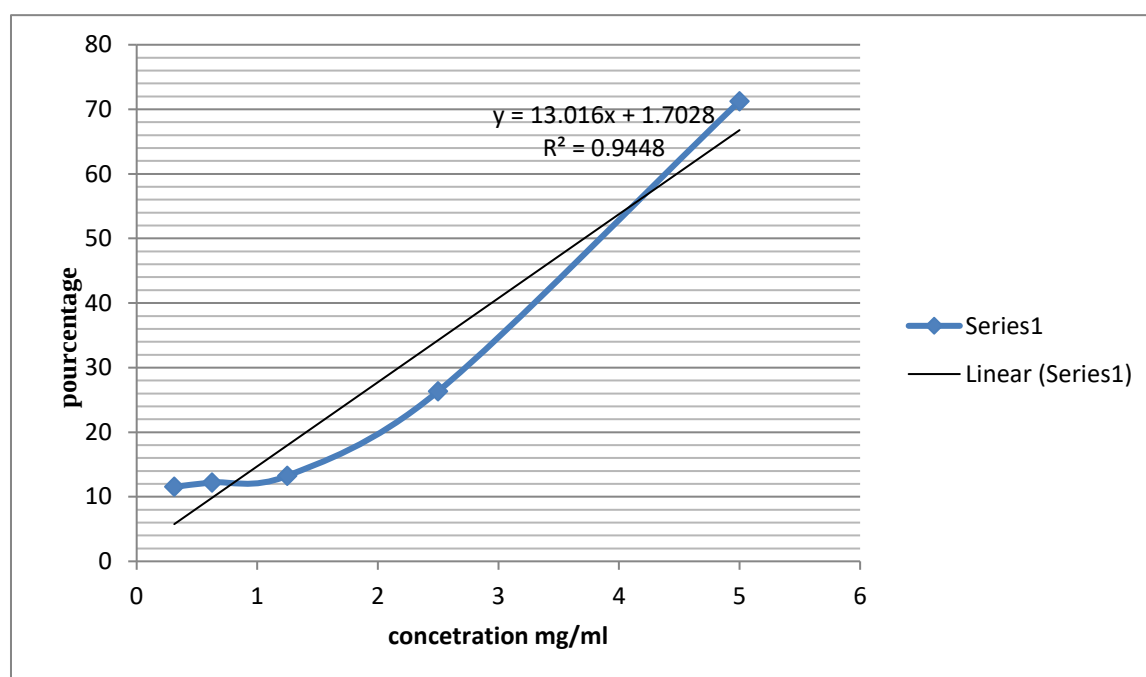


Figure 9 : Courbe de test DPPH d'extrait éthanolique de *Retama retam*

D'après ces résultats, on remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration de l'EERR. Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, nous avons introduit le paramètre IC50.

IV.2.2.Evaluation de l'IC50

L'IC50 est inversement lié à la capacité antioxydant d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydant d'un composé est élevée (**Pokorny et al., 2001**).

La concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50 % du radical DPPH a été calculée par régression linéaire des taux d'inhibition calculés en fonction des différentes concentrations des extraits préparés.

D'après l'équation linéaire $Y = 13,01X + 1,702$ Du graphe des variations du pourcentage en fonction des concentrations des extraits, on calcul IC50 qui est la concentration de l'extrait qu'il faut pour d'inhibition 50% du radical libre

$$\text{IC } 50 = 3.71 \text{ mg/ml}$$

IV.2.3. Acide ascorbique

Nous traçons le graphique du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'acide ascorbique :

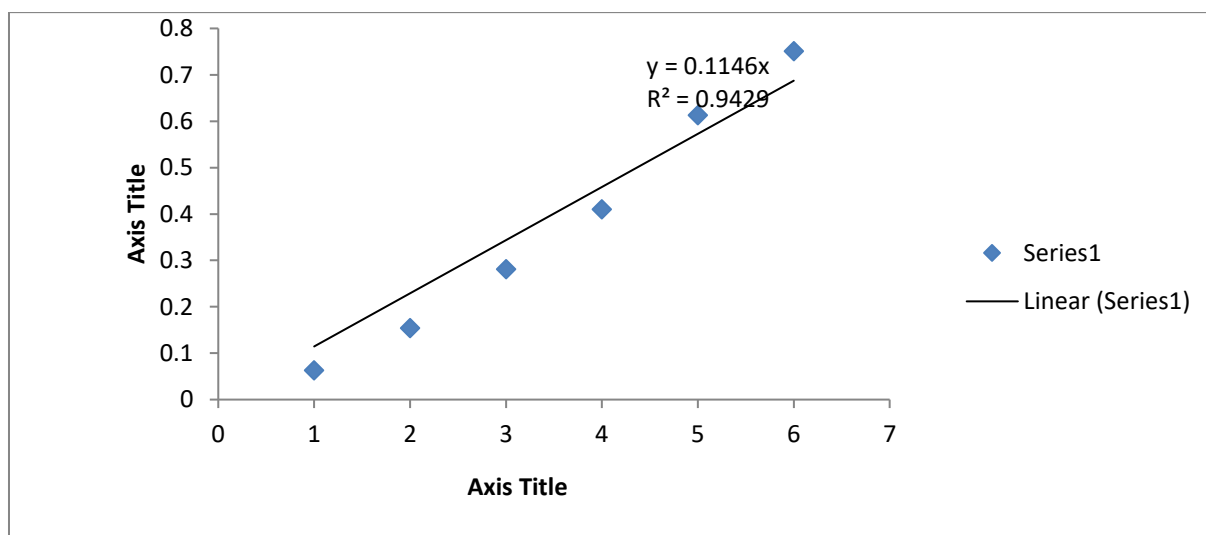


Figure 10 : Courbe étalonnage d'acide ascorbique

D'après l'équation linéaire $Y = 0,114X$ Du graphe des variations du pourcentage en fonction des concentrations des extraits, on calcul IC50 qui est la concentration de l'extrait qu'il faut pour d'inhibition 50% du radical libre

L'échantillon	IC50
Acide ascorbique	3.70 mg/ml
<i>Retama retam</i>	3.71 mg/ml

Tableau 4 : Les valeurs des IC50 des extraits testés.

Les résultats présentés dans le **tableau 4** pour l'activité anti-extrême de l'extrait de plante *Retama retam* ont montré que l'extrait testé présentait une activité anti-radicalaire avec une IC de 50% de l'ordre de 3,71 mg/ml. Comparé à l'antioxydant standard (acide ascorbique) montrant IC50% = 3,7 mg/ml, nous constatons que notre extrait a une activité égale par rapport à la norme

IV.3. L'activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée selon deux tests :

IV.3.1. Stabilisation des membranes des globules rouges humains

La méthode de la stabilisation des membranes des GRH a été choisie pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait de *Retama retam* in vitro car la membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomiale et sa stabilisation implique que l'extrait peut ainsi stabiliser les membranes lysosomiales. La Stabilisation de la membrane lysosomiale est importante dans la limitation de la réponse inflammatoire en empêchant la libération de constituants lysosomiques des neutrophiles activés tels que les protéases qui provoquent une inflammation des tissus et d'autres dommages lors de la libération extracellulaire (Shendkar et al., 2014). L'hémolyse induite par l'hypotonie peut découler de la lyse des cellules en raison de la perte de pression osmotique du liquide intracellulaire et des composants électrolytiques. L'extrait peut inhiber les processus (Suresh et al., 2014).

Les résultats obtenus sont exprimés dans **tableau 5**

Tableau 5 : Les valeurs de l'inhibition de l'extrait et du Diclofénac

Contrôle=0.414			
C ug/ml	I% l'extrait	C ug/ml	I% Diclofénac

50	72,36	50	76,58
100	72,99	100	78,90
250	71,94	300	70,67
500	72,15	600	75,94
1000	71,30	1200	76,19
2000	79,89	2500	77,41

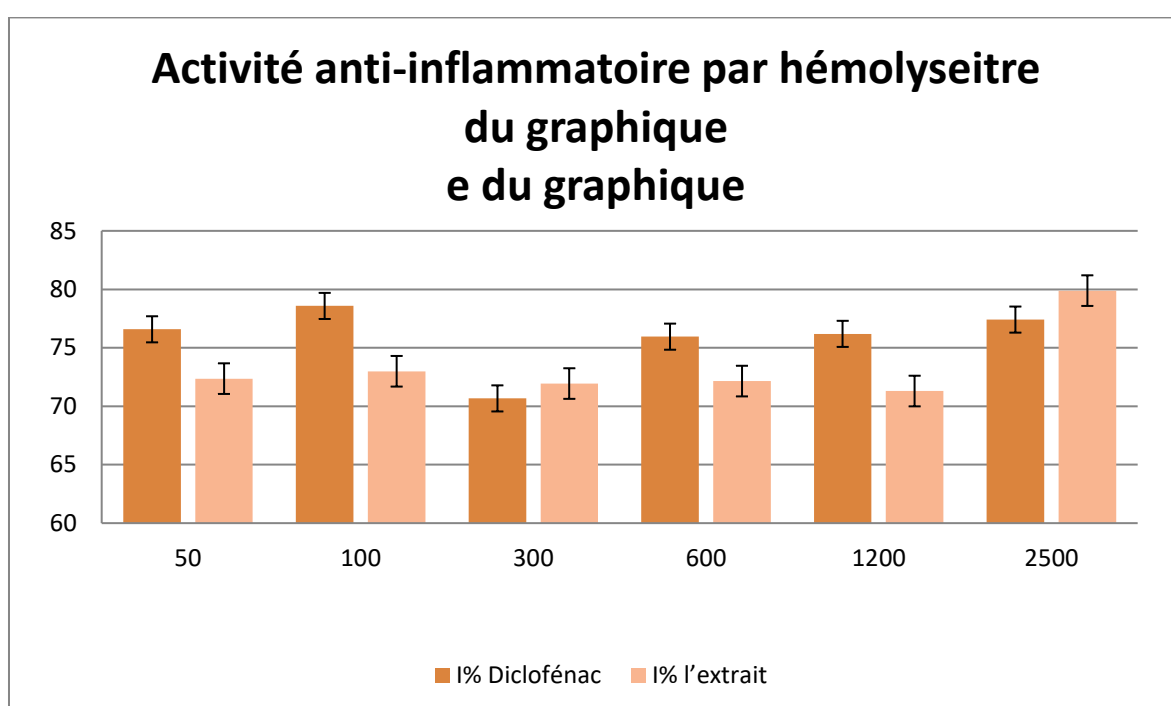


Figure 11:Activité anti-inflammatoire de l'extrait et du diclofénac par hémolyse

La figure 12 représente l'activité anti-inflammatoire in vitro de notre extrait qui repose sur l'inhibition d'hémolyse des globules rouges humains (GRH) comparant avec la solution standard Diclofénac de sodium. Les résultats obtenus montrent que le pourcentage d'effet hémolytique de l'extrait *Retama retam* en augmentation lors de l'augmentation des concentrations et elles sont supérieures à celle du Diclofénac.

IV.3.2. Inhibition de la dénaturation de l'albumine des œufs

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation (**Bagad et al., 2011 ; Falcão et al., 2016**).

Les méthodes actuelles de détection et d'isolement d'un large éventail de composés anti-inflammatoires aux premiers stades du processus de découverte de médicaments utilisent un grand nombre d'animaux. À cet égard, il existe des problèmes éthiques concernant l'utilisation d'animaux aux premiers stades de la découverte de médicaments pour les maladies inflammatoires et dégénératives, à partir de produits naturels, en utilisant des voies d'isolement axées sur l'activité lorsque de nombreux composés, supérieurs à 100, sont présents dans l'extrait brut. ou fraction (**Abdullah et al., 2013 ; Bakchiche et Gherib, 2014**).

C'est la raison principale pour laquelle le procédé d'utilisation des effets anti-dénaturants (stabilisants) in vitro de l'ovalbumine traitée thermiquement (immunogènes) comme test de criblage pour la détection de composés anti-inflammatoires est proposé sans l'utilisation d'animaux dans les premières étapes du processus de découverte de médicaments (**Chaouche et al., 2014 ; Williams et al., 2006**).

La figure 13 montre les résultats de l'activité anti-inflammatoire in vitro de l'extrait de *retama retama* qui consiste à évaluer le taux d'inhibition de la dénaturation de l'albumine des œufs. D'après les résultats nous avons observé un rapprochement de taux d'inhibition de la dénaturation de l'albumine des œufs entre l'anti inflammatoire standard (diclofénac sodium) et le mucilage étudié

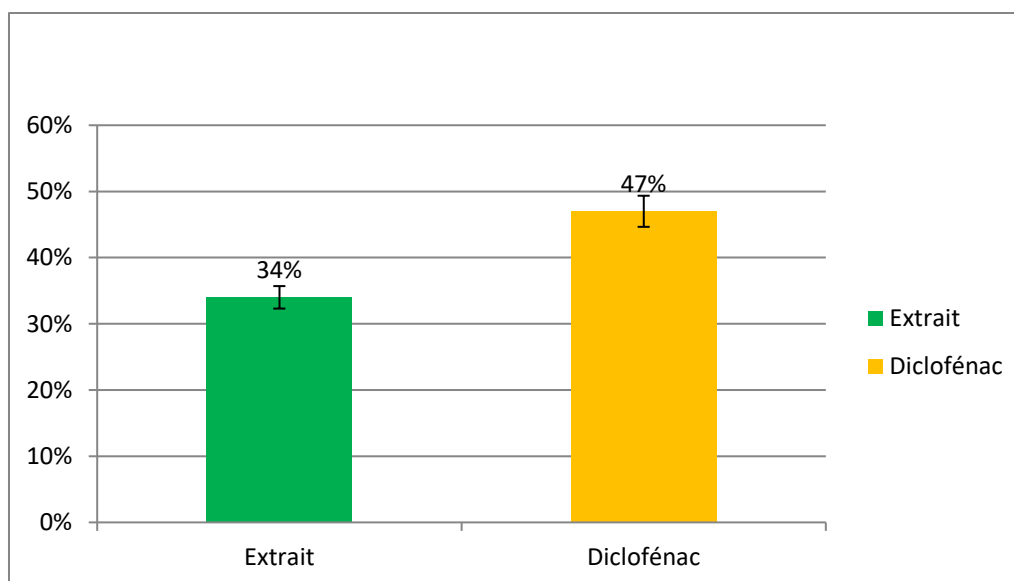


Figure 12 : pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines obtenu par notre extrait était efficace avec une inhibition égale à 34%. Les résultats obtenus pour cet extrait sont presque identiques par rapport diclofenac, un médicament anti-inflammatoire utilisé comme standard qui a affiché un pourcentage d'inhibition de 47% à la même concentration.

CONCLUSION

CONCLUSION

L'utilisation et la connaissance des plantes médicinales constituent un véritable patrimoine et un gain pour l'humanité. Et son importance dans le domaine de la santé publique s'est imposée ces dernières années grâce aux traitements qu'ils procurent sans l'apparition d'effets secondaires observés lors de l'utilisation de médicaments chimiques. Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme de molécules bioactives synthétisées par la plante non seulement comme des agents chimiques contre les maladies, les herbivores et les prédateurs mais aussi comme des agents médicinaux tels que les antioxydants

Ce présent travail contribue à la caractérisation des activités antioxydante et anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique de *Retam retama*. Notre extrait qui a été réalisé par macération à froid avec acétone a donné un rendement de **29,1%**.

L'activité antioxydante a été explorée par la méthode de réduction du radical libre 1,1 diphenyl- 2-picryl-hydrazyl (DPPH) et L'extrait éthanolique testé possède un potentiel anti- radicalaire appréciable avec un IC50 de 3.7 mg/ml.

L'analyse biologique effectuée sur les érythrocytes isolées à partir du sang humain par l'extrait éthanolique montre que la plante *Retam retama* un effet de la stabilité des membranes des globules rouges de 79%.

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines de notre extrait est de 34%, par rapport la diclofénac, ce qui représente un bon résultat.

D'après les résultats on peut dire que cette espèce locale *Retama retam* peut constituer une source naturelle de composés naturels à usage biologique et thérapeutique intéressants.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances photochimiques biologiquement actives, une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antioxydantes et anti-inflammatoires de *Retama retam*.

Références bibliographiques

1. Abdullahi mn., ilyas n., ibrahim h. Evaluation of phyto-chemical screening and analgesic activity of aqueous extract of the leaves of *microtrichia perotitii* dc (asteraceae) in mice using hotplate method. *Med plant res* 2013;3: 37-43
2. Amar, a., harrache, d., atmani, f., bassou, g., & grillon, f. (2010). Effet de *parietaria officinalis* sur la cristallisation de l'oxalate de calcium, dans l'urine. *Phytothérapie*, 8(6), 342-347.
3. Anne, s., nogaret, e. (2003). *La phytothérapie se soigner par les plantes*. Eyrolles. 20p.
4. Ayroldi e., cannarile l., miglierati g., nocentini g., delfino d.v., riccardi c., 2012.mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with mapk signaling pathways. *The faseb journal*, vol 26, no 12, p. 4805-4820
5. Azzi, a., davies, k.j.a., kelly, f., 2004. Free radical biology-terminology and critical thinking. *Febs lett* 558, 3-6.
6. Bagad,y.m., umarkar, a.r., tati,a.u., surana, s.j. (2011). Investigation of anti-inflammatory and analgesic activity of *bridelia airyshawii* (euphorbiaceae). *J. Pharm. Res.*:4(5);1326- 1332.
7. Bakchiche b., gherib a. Activités antioxydantes des polyphenols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle d'algérie [antioxidant activities of polyphenol extracts from medicinal plants in algerian traditional pharmacopoeia]. *Int j innovation applied studies* 2014;9: 167-72.
8. Belaïch r., boujraf s., 2016 facteurs inflammatoires et stress oxydant chez les hémodialysés : effets et stratégies thérapeutiques. *Médecine des maladies métaboliques*, 10(1), 38-42p.
9. Beloued, a. (2009). *Plantes médicinales d'algérie* (7é éd.). Alger: ben aknon.
10. Benkhniq, o., ben akka, f., salhi, s., fadli, m., douira, a., et zidane, l. (2014). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète dans la région d'alhaouz-rhamna (maroc). *Journal of animal &plant sciences*, 23(1), 3539-3568.
11. Benmiloud-mahieddine, r., abirached-darmency, m., brown, s. C., kaid-harche, m., &

Références bibliographiques

- siljak-yakovlev, s. (2011). Genome size and cytogenetic characterization of three algerian retama species. *Tree genetics & genomes*, 7(5), 987.
12. Bokhari, j., khan, m.r, shabbir, m., rashid, u., jan s., & zai, j.a. (2013). Evaluation of diverse antioxidant activities of *galium aparine*. *Molecular and biomolecular spectroscopy*, 102, 24–29.
13. Bourrel, c. (1993). Analyse chimique, activités biologiques et antioxydant d'extraits de plantes aromatiques sélectionnées. Thèse de doctorat en sciences des agro ressources, université de toulouse, france.
14. Chaouche tm., haddouchi f., ksouri r., atikbekkara f. Evaluation of antioxidant activity of hydromethanolic extracts of some medicinal species from south algeria. *J chinese med assoc* 2014;77: 302-7.
15. Chenini-bendiab hadjer (2022).Thèse de doctorat. Contribution à l'étude phytothérapeutique : neuroprotectrice, anti-inflammatoire, anti-ulcère, antidiabétique et antioxydante des dattes algériennes (*phoenix dactylifera* l.). Université abdelhamid ibn badis mostaganem
16. Damerdj, a et amar, a. (2013). Composition et structure des gastéropodes dans les stations à retama raetam (fabaceae) dans la région de naâma (algérie). *Afrique science*, 09(1), 77-88.
17. Das k., tiwari r.k.s. and shrivastava d.k., 2010: techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: current methods and future trends. *Journal of medicinal plants research*, 4(2), 104-111.
18. Delwiche, p. (2008). Soigner le jardin par les plantes. Ed. Nature et progrès belgique.
19. Djeddi s., karioti1 a., yannakopoulou e., papadopoulos k., chatter r.
20. Djeddi, t., karioti s., yannakopoulou, a., papadopoulos, e., chatter, k., & skaltsa, r.h. (2013). Analgesic and antioxidant activities of algerian *retama raetam* (forssk.) Webb & berthel extracts. *Records of naturel products*, 7(3),169-176
21. Dos reis nunes c, arantes mb, pereira smf, leandro da cruz l, de souza passos m, de Moraes lp, vieira ijc, de oliveira db (2020). Plants as sources of anti inflammatoryagents. *Molecules*. 25(16): 3726. Doi: 10.3390/molecules25163726.
22. Dziri, s., hassen, i., fatnassi, s., mrabet, y., casabianca, h., hanchi, b., & hosni, k. (2012). Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*allium roseum* var. *Odoratissimum*). *Journal of functional foods*, 4, 423-432.
23. Et skaltsa h., (2013). Analgesic and antioxidant activities of algerian *retama*

Références bibliographiques

24. Falcão, s., baptista, p., freire, c., vilas-boas, m., ferreira, i.c.f.r.(2016).antioxidant activity of agaricus sp. Mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. Food chem.:111;61–66
25. Faure s., 2009. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens. Actualités pharmaceutiques, vol 48, no 489, p. 53-58.
26. Gayet, c. (2013). *Guide de poche de phytothérapie*. Paris: quotidien malin.
27. Genmedoc. (2006). Pratiques de germination dans les banques de semences du réseau genmedoc. 175p.
28. Gurib-fakimm a. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of medicine*, 27, 1-93p.
29. Harirforoosh s, asghar w, jamali f (2013). Advers effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. J pharm pharm sci. 16(5): 821-47. Doi: 10.18433/j3vw2f.
30. Hayet, e., maha, m., samia, a., mata, m., gros, p., raida, h., ... & mahjoub, a. (2008). Antimicrobial, antioxidant, and antiviral activities of *retama raetam* (forssk.) Webb flowers growing in tunisia. *World journal of microbiology and biotechnology*, 24(12), 2933-2940. Doi 10.1007/s11274-008-9835-y.
31. Julie, m.j. (2011). Enquête prospective ou sein de la population consultant dans les cabinets de médecine générale sur l'île de la réunion: à propos des plantes médicinales, utilisation, effets, innocuité et lien avec le médecin généraliste. Mémoire de doctorat en médecine, université bordeaux 2, france.
32. Kassem, m., mosharrafa, s. A., saleh, n. A. M., & abdel-wahab, s. M. (2000). Two new flavonoids from *retama raetam*. *Fitoterapia*, 71(6), 649-654.
33. Liu ch, abrams nd, carrick dm, chander p, dwyer j, hamlet mrj, kindzelski al, prabhudas m, tsai sya, vedamony mm, wangc, tandon p (2019). Imaging inflammation and its resolution in health and disease: current status, clinical needs, challenges, and opportunities. *Faseb j*. 33(12): 13085–13097. Doi: 10.1096/fj.201902024
34. López-lázaro m., martin-cordero c.f., iglesias-guerra m.j., ayuso gonzalez., 1998. An isoflavone glucoside from *retama sphaerocarpa* boiss. *Phytochemistry*., 48(2):401-402.
35. Madhuri v., darshan s.k. and kent l.e., 2008. Health effects of foods rich in polyphenols. In: wild-type food in health promotion and disease prevention. Humana press inc., totowa, pp. 393-412.

Références bibliographiques

36. Maire r., 1952-1987. Flore de l’afrique du nord (maroc, algérie, tunisie, tripolitaine, cyrénaïque et sahara). Volumes i à xvi. Lechevalier, paris in encyclopédie biologique.
37. Neyestani t.r. 2008: polyphenols and immunity. In: wild-type food in health promotion.
38. Onder g, pellicciotti f, gambassi g, bernabei r (2004). Nsaid-related psychiatric adverse events: who is at risk? *Drugs*. 64(23): 2619-27. Doi: 10.2165/00003495-200464230-00001.
39. Pnueli, l., hallak-herr, e., rozenberg, m., cohen, m., goloubinoff, p., kaplan, a., & mittler, r. (2002). Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume retama raetam. *The plant journal*, 31(3), 319-330.
40. Polhill r.m., 1994. Complete synopsis of legume genera. In « phytochemical dictionary of leguminosae »(ildis)and chcd, eds., vol.1, xlix-ivi.
41. Quezel, p., & senta, s. (1963). *Nouvelle flore de l’algerie et des régions désertique méridinales*. Ed, tome ii: pari.
42. Quzel, p., et santa s. (1962). *Nouvelle flore de l’algérie et des régions désertiques méridionales*. Ed, tome i: paris.
43. Raetam (forssk.) Webb & berthel extracts. *Rec. Nat. Prod*, 7(3), 169-176 p.2(2),pp 1260-1263.
44. Saadaoui, b., bekir, j., akrouit, j., ammar, s., mahjoub, a., & mars, m. (2007). Etude de la composition et du pouvoir antioxydant des composés phénoliques de quelques espèces végétales de l’aride tunisien. *Revue des régions arides*, 316-321.
45. Sanchez, c., larrauri, j. A., saura-calixto, f. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the scienceof food and agriculture*. Vol 76(2), pp 270-276.
46. Shalaby a.f., monayeri m.o., etman m.n., el habibi a.m., youcef n.m., 1972. Gremination of some desert medicinal plant under different condition. *Desert. Inst. Bull.*, a. R. E., 22(2): 433-444.
47. Shallaby a., monayeri m., etman ma., el habibi am., youssef mp., 1972- germination of some desert medicinal plant under different condition : mém. Mag. Univ. Des sciences et de la technologie d’oran mohamed boudiaf (u.s.t.o) oran.
48. Shendkar, a. K., chaudhari, s. K., shendkar, y. K. (2014). In vitro antiarthritic activity of withaniacoagul ansdunal fruits. *Iajpr*, vol 4, pp 915-924.

Références bibliographiques

49. Suresh, s., dao, m., du, e. (2014). Quantitative biomechanics of healthy and diseased human red blood cells using dielectrophoresis in a microfluidic system. *Extreme mechanics letters*. Vol 1,pp 35-41.
50. Trabut, l.c. (2006). *Noms indigènes des plantes d'afrique du nord. Répertoire des noms des plantes spontanées, cultivées et utilisées*. Ibis press: paris.
51. Vigan, m. (2012). *Progrès dermato- allergologie*. John libbey eurotext besancon: france.
52. Williams l., hibbert s., porter r., bailey-shaw y., green c. Jamaican plants with in vitro antioxidant activity. Research signpost. In *biologically active natural products for the 21st century*. Lad williams (ed.) 2006, pp.1-12.
53. Wongrakpanich s, wongrakpanich a, melhado k, rangaswami j (2018). A comprehensive review of non-steroidal anti-inflammatory drug use in the elderly. *Aging dis*. 9(1): 143–150. Doi: 10.14336/ad.2017.0306.
54. Yoganandam, g. P., ilango, k., de, s. (2010). Evaluation of anti-inflammatory and membrane stabilizing properties of various extracts of *punica granatum l.*(lythraceae). Vol
55. Zohary m., 1959. A revision of the genus *retama* (boiss). *Bull. Res. Counc. Isr.*, 7(d): 1–2.
56. Zohary m., 1962-plant life of palestine, israel, and jordan, michael zohary. Ronald, newyork, 1962.science 1962: vol.163.n°,35, 15, pp.523.

ANNEXES

❖ Solution d'Alsever

1. 2 % de dextrose
2. 0.8 % de citrate de sodium
3. 0.05 % d'acide citrique
4. 0.42 % de chlorure de sodium

❖ Solution du Tampon phosphate saline

1. 1000 ml d'eau distillée
2. 8 g NaCl
3. 0.2 g Na₂ HPO₄
4. 0.24 g KH₂ PO₄
5. pH à 7.4.