

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**Université Des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Ecologie végétale**



N° d'ordre :
N° de série :

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences

**Filière : Biotechnologie Végétale
Spécialité : Biotechnologie Végétale**

THEME

**ACTIVITES BIOLOGIQUES DES MOLECULES BIOACTIVES
EXTRAITES DE QUELQUES PLANTES MEDICINALES**

Réalisée par: Mme NASSAR Meryem Ep. Boulahneche

Soutenue le: 27-11-2017

Devant le jury:

Présidente: TEBIBEL. S

Directrice de thèse: ZERIZER. S

Examineur: KHENNOUF. S

Examineur: NECIB. Y

Examineur: DJERROU. Z

Examinatrice: ZAIDI. N

Pr. Université Des Frères Mentouri Constantine 1

Pr. Université Des Frères Mentouri Constantine 1

Pr. Université Ferhat-Abbas Sétif

Pr. Université Des Frères Mentouri Constantine 1

MCA. Université 20 Aout 1955 Skikda

MCA. Université 20 Aout 1955 Skikda

2016 - 2017

Remerciements

Les travaux de recherche qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisés grâce à la collaboration des laboratoires de biologie cellulaire et moléculaire et le laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST) département de chimie- université des frères Mentouri Constantine , ainsi que le laboratoire de biomédical Département de Biomédical et sciences dentaires et les Images morphologiques et fonctionnelles université de Messine, Italie.

Je tiens à les remercier pour leur soutien financier qui m'a beaucoup facilité la réalisation de ce travail.

Ces travaux de recherche ont été effectués sous la direction de Madame le professeur Zerizer Sakina donc je tiens à exprimer toute ma gratitude pour ses encadrements de qualité et pour m'avoir accordé son confiance, merci. Aussi pour sa disponibilité et tout particulièrement pour son soutien scientifique et humain.

Mes remerciements vont également aux membres de jury pour avoir accepté d'examiner ces travaux de recherche :

Au président de jury Mme TEBIBEL Soraya, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury. Veuillez agréer l'expression de ma reconnaissance et de mes remerciements les plus sincères.

A mon premier examinateur Mr KHENNOUF Seddik pour l'honneur que vous m'avez fait d'accepter de juger ce travail. Veuillez agréer l'expression de ma reconnaissance et de mes remerciements les plus sincères.

A mon deuxième examinateur Mr NECIB Youcef pour l'honneur que vous m'avez fait D'accepter de juger ce travail. Veuillez agréer l'expression de ma reconnaissance et de mes remerciements les plus sincères.

A mon troisième examinateur, Mr DJERROU Zouhir pour l'honneur que vous m'avez fait d'accepter d'examiner ce travail. Veuillez agréer l'expression de ma reconnaissance et de mes remerciements les plus sincères.

A mon quatrième examinateur Mme ZAIDI Nedjoudja pour l'honneur que vous m'avez fait d'accepter d'examiner ce travail. Veuillez agréer l'expression de ma reconnaissance et de mes remerciements les plus sincères.

Mes remerciements vont également A Mr le Professeur Ricardoo Ientile , Monica Curro et Daniela Caccamo (Italie) j'adresse mes plus vifs remerciements pour leur aide, leur gentillesse au quotidien, tous leur encouragements et leur soutien dans les

moments difficiles, merci pour votre amitié. Je tiens également à leur exprimer mes sincères remerciements pour les nombreuses heures investies dans la réalisation et la correction d'une partie de ce travail.

Que vous dire, mes chers parents, vous étiez toujours là pour m'écoutez, me soutenir, me réconforter et m'encourager dans les moments de doute....Tous les mots ne suffiraient.

Merci a mon cher mari pour son soutien et ses encouragements.

Merci à mes proches notamment mes frères, mes sœurs, ma belle mère et mes beaux frères.

Merci a ma très proche amie pour ses encouragements.

Liste des abréviations

8-OH-dG	8-Hydroxy-2'-déoxyguanosine
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADMA	Diméthylarginine Asymétrique
ADP	Adénosine Di Phosphate
AGPI	Acides Gras Poly Insaturés
ALS	Sites Alkali Labiles
AMP	Monophosphate Activé
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
B12	Cobalamine
B6	Pyridoxine
B9	Acide folique
BHMT	Bétaïne-Homocystéine Méthyltransférase
CAM	Membrane Chorio Allantoïde
CAT	Catalase
CbIC	Adénosylcobalamine
CBS	Cystathionine-B-Synthase
COX- 2	Cyclooxygénase- 2
CPVR	Polyphénoliques du Vin Rouge
CT	Cholestérol Total
Cy3G	Cyanidine-3-Glucoside
DCFH-DA	2',7'- Dichlorofluoresceine-Diacétate
DDAH	Diméthylarginine Dimethyl Aminohydrolase
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
DO	Densité Optique
DPPH	2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil .
EDHF	Facteur Hyperpolarisant
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique
EGCG	Epigallocatechine-3-Gallate
eNOS	NO Synthase Endothéliale
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
GPX	Gluthation Peroxydase
GR	Glutathion Réductase

GSH	Glutathion réduit
GSTP1	Glutathion-S- Transférase P1
H₂O₂	Peroxyde d'Hydrogène
Hcy	Homocystéine
HDL	Lipoprotéine de Haute Densité
HHcy	Hyperhomocysténemie
HO-1	Hème Oxygénase-1
HOONO	Peroxynitrite
Hsp	Protéine du choc thermique
HTL	Homocystéine Thiolactone
iNOS	Oxyde Nitrique Synthase inducible
LDL	Faible Densité des Lipoprotéines
LMP	Faible point de fusion
LPH	Lactase Phlorizine Hydrolase
MAPK	Protéine Kinase Activée par Mitogène
MMP	Métalloprotéinase Matricielle
MTHFR	Méthylène Tétra-Hydrofolate Réductase
MTR	Méthionine synthase
MTT	Bromure de 3-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-2,5-Diphényltétrazolium
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NF-Kb	Facteur nucléaire kappa B
NMP	Normal Point de fusion
NO	Oxyde Nitrique
Nrf2	Facteur Nucléaire (erythroïde-derivé 2)
O₂•	Anion Superoxyde
OH	Radical Hydroxyle
PAR	Récepteur Activé par Protease
PARP	Poly-ADP-Ribose Polymérase
PKC	Protéine Kinase C
RES	Système Réticulo-Endothélial
ROO•	Radical Peroxyle
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SAH	S-Adénosyl Homocystéine
SAHH	S-Adénosyl Homocystéine Hydrolase
SAM	S-Adénosyl-Méthionine

SB	Simple Brin
SHU	Syndrome Hémolytique et Urémique
SIRT	Régulateur d'Information Silencieuse Recombinante
SOD	Superoxyde Dismutase
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TEAC	Capacité Antioxydante en Equivalent Trolox
THP-1	Cellules Monocytaire Humaine THP-1
TNF-a	Facteur alpha de Nécrose Tumorale
TVP	Thromboses Veineuses Profondes
UV	Ultra Violet
VCAM- 1	Molécule1 de l'Adhésion Vasculaire Cellulaire
VSMC	Cellules Musculaires Lisses Vasculaires

Liste des figures

Figure 01.	Voies de synthèse et de catabolisme de l'homocysté.....	05
Figure 02.	Différentes formes d'homocystéine plasmatique.....	08
Figure 03.	Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (EROs) et des antioxydants régulateurs de leur production.....	21
Figure 04.	Classification des polyphénols alimentaires	27
Figure 05.	Acides phénoliques typiques dans les aliments.....	28
Figure 06.	Squelette de base des flavonoides	29
Figure 07.	Isoflavones, neoflavones et les chalcones typiques dans les aliments	30
Figure 08.	Flavones, flavonoles, flavanones et flavanonols.....	31
Figure 09.	Flavanols et les procyanidines	32
Figure 10.	Anthocyanidines majeurs	33
Figure 11.	Structure de deux unités de base des tanins.....	34
Figure 12.	Structure de catéchine.....	35
Figure 13.	Structure de trans-resveratrol.....	36
Figure 14.	Bio-activités des polyphénols alimentaires.....	37
Figure 15.	Photos de la plante et les feuilles de <i>Thymus guyonii</i> de Noé.....	50
Figure 16.	Photo de l'espèce <i>Salvia verbenaca</i> L.....	53
Figure 17.	Photo de l'espèce <i>Stachys circinnata</i> l'Her.....	56
Figure 18.	Lieux de récolte des espèces étudiées.....	58
Figure 19.	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	61
Figure 20.	Principe chimique du test MTT	65
Figure 21.	L'oxydation de la dichloro-dihydro-fluoréscine diacétate (DCFH ₂ -DA) en dichloro-fluorescéine (DCF).....	66
Figure 22.	Protocole général de l'essai des comètes en conditions alcalines.....	69

Figure 23.	Pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait de <i>Thymus guyonii</i>	71
Figure 24.	Graphes de la valeur IC ₅₀ de l'extrait de <i>Thymus guyonii</i>	72
Figure 25.	Pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait de <i>Stachys circinnata</i>	72
Figure 26.	Graphes de la valeur IC ₅₀ de l'extrait de <i>Stachys circinnata</i>	73
Figure 27.	Pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait de <i>Salvia verbenaca</i>	74
Figure 28.	Graphes de la valeur IC ₅₀ de l'extrait de <i>Salvia verbenaca</i>	74
Figure 29.	Activité phagocytaire (K) chez des souris traitées avec différentes concentrations des trois extraits étudiés.....	76
Figure 30.	Taux de carbone clearance chez les souris traitées avec les différents extraits.....	77
Figure 31.	Indice phagocytaire corrigé α chez des souris traitées avec les différents extraits étudiés.....	78
Figure 32.	Variation du poids de foie par rapport au poids corporel.....	79
Figure 33.	Variation dans le poids de la rate par rapport au poids corporel	79
Figure 34.	Pourcentage de viabilité cellulaire des THP-1 incubées avec différentes concentrations des extraits, A : concentration 100 μ g/ml, B : la concentration 500 μ g/ml, C : la concentration 1000 μ g/ml.....	81
Figure 35.	Pourcentage de viabilité cellulaire des THP-1 incubées avec différentes concentrations de l'homocystéine	82
Figure 36.	Quantité des EROs produite par 100 μ M d'homocystéine en présence et absence des trois extraits.....	83
Figure 37.	Quantité des EROs produite par 1000 μ M d'homocystéine en présence et absence des trois extraits.....	84
Figure 38.	Cassures de l'ADN exprimées en % dans la queue des comètes des cellules THP-1 incubées avec les différents extraits testés avec et sans homocystéine pendant 24 h, A : la concentration 1 μ g/ml et B : la concentration 10 μ g/ml.....	86

- Figure 39.** Comètes des cellules THP-1 photographies par un microscope à épifluorescence et l'effet protectif des différents extraits *T.guyonii*, *S.circinnata* et *S.verbenaca* contre les altérations d'ADN induites par l'homocystéine.....87
- Figure 40.** Cassures de l'ADN exprimées en % dans la queue des comètes des lymphocytes incubées avec l'extrait *Thymus guyonii* avec et sans homocystéine (250 µM) pendant 24 h.91
- Figure 41.** Comètes photographiées par un microscope à épifluorescence montrant l'effet protectif de l'extrait *T.guyonii*, contre les altérations d'ADN induites par l'homocystéine 250µM sur les lymphocytes.....92

Liste des tableaux

Tableau 01.	Différents types d'hyperhomocystéinémie	10
Tableau 02.	Lieux de récoltes des plantes et caractéristiques géographiques et bioclimatiques des sites de récolte.....	57
Tableau 03.	Concentrations utilisées dans le test de l'activité immunomodulatrice.....	62
Tableau 04.	L'IC ₅₀ des trois extraits étudiés.....	75
Tableau 05.	Lésions de l'ADN dans les THP-1 exposées à l'homocystéine et les différents extraits (<i>T.guyonii</i> , <i>S.circinnata</i> , <i>S.verbenaca</i>) pendant 24h.....	89
Tableau 06.	Lésions de l'ADN dans les THP-1 exposées à l'homocystéine (250µM) et à l'extrait de <i>Thymus guyonii</i> pendant 24h.....	90

Sommaire

Introduction	01
Chapitre I : L’hyperhomocystéinémie	04
1- L’homocystéine.....	04
1-1-Définition de l’homocystéine.....	04
1-2-Métabolisme de l’homocystéine.....	04
1-2-1-Voies de la reméthylation.....	06
1-2-2-Voie de la trans-sulfuration.....	07
1-3-Formes d’homocystéine	07
1-4-L’homocystéine plasmatique.....	09
2- L’hyperhomocystéinémie.....	09
2-1-Généralités sur l’hyperhomocystéinémie.....	09
2-2-Classification des hyperhomocystéinémies.....	10
2-2-1-L’hyperhomocystéinémie sévère.....	11
2-2-2-L’hyperhomocystéinémie intermédiaire.....	11
2-2-3-L’ hyperhomocystéinémie modérée.....	11
2-3- Etiologies de l’hyperhomocystéinémie	12
2-3-1-Facteurs génétiques.....	12
2-3-2-Facteurs nutritionnels	13
2-3-3-L’insuffisance rénale chronique	14
2-3-4-Le diabète	15
2-3-5-Autres causes	15
2-4-L’hyperhomocystéinémie et les affections cardio-vasculaires.....	15
2-5-Mécanismes de la pathogénicité de l’hyperhomocystéinémie.....	17
2-5-1-Production du stress oxydant.....	17
2-5-1-Espèces réactives de l’oxygène (EROs).....	17
2-5-1-2-Stress oxydant et facteurs le favorisant.....	19
2-5-1-3-Principales cibles biologiques des EROs.....	19

• Acide désoxyribonucléique ou ADN.....	19
• Protéines.....	19
• Lipides membranaires.....	19
• Lipoprotéines.....	20
2-5-1-4-Défenses antioxydantes.....	20
• Superoxydes dismutases (SOD).....	21
• Glutathion peroxydases (GPxs).....	21
2-5-2- Dysfonction endothéliale et diminution de la production de NO.....	22
2-5-3- Altération de l'hémostase.....	22
2-5-4- Effets sur la musculature lisse vasculaire.....	22
2-6-Traitement de l'hyperhomocystéinémie	22
Chapitre II : Les polyphénols	25
1-Généralités sur les Polyphénols	25
2-Classification des polyphénols	26
2-1-Acides phénoliques.....	27
2-2-Flavonoïdes	28
2-3-Isoflavones	29
2-4-Flavones, Flavonoles, Flavanones et Flavanonols.....	30
2-5-Flavanols et proanthocyanidines.....	31
2-6-Anthocyanidines.....	32
2-7-Tanins.....	33
2-7-1-Tanins hydrolysables.....	33
2-7-2-Tanins condensés ou catéchiques ou proanthocyanidols.....	35
2-8-Stilbènes.....	35
3-Rôle et implications biologiques des polyphénols.....	36
3-1-Activité antioxydante.....	37
3-2-Outre que l'activité antioxydant.....	39
3-3-Activité anti-athérosclérose et cardioprotecteur.....	40

3-4-Effets neuro-protecteurs et anti-âge.....	41
3-5-Propriétés anti-inflammatoires.....	41
3-6-Propriétés anti-mutagénétiques et anti-carcinogénétiques.....	42
3-7-Amélioration des fonctions de l'endothélium.....	43
4-Biodisponibilité des polyphénols alimentaires.....	43
Chapitre III : Etude des plantes médicinales investiguées.....	47
1-Généralités sur la famille des Lamiaceae.....	47
2-Presentation du genre <i>Thymus</i>	48
2-1-Description botanique de l'espèce <i>Thymus guyonii</i> de Noé	49
2-2-Usages et propriétés.....	49
2-3-Classification de l'espèce	49
3-Le genre <i>Salvia</i>	51
3-1-Description botanique de l'espèce <i>Salvia verbenaca</i> L.....	51
3-2-Usages et propriétés.....	52
3-3-Classification de l'espèce	52
4-Le genre <i>Stachys</i>	54
4-1-Description botanique de l'espèce <i>Stachys circinnata</i> d'Her.....	54
4-2-Classification de l'espèce.....	55
Chapitre IV : Matériels et Méthodes.....	57
1- Matériels.....	57
1-1-Choix des plantes	57
1-2- Situation géographique des lieux de récolte.....	57
1-3-Récolte du matériel végétal	59
1-4-Identification botanique	59
1-5- Extraction.....	59
2-Les méthodes	60
2-1-Mesure du pouvoir antiradicalaire par le test DPPH.....	60

• Principe du test.....	60
• Détermination de l'indice IC50.....	61
2-2-Mesure de l'activité immunomodulatrice	61
• Choix des animaux.....	61
• Mesure de l'activité phagocytaire	61
• Analyses statistiques.....	63
2-3-Culture cellulaire	63
2-3-1-Test de viabilité cellulaire ou MTT	64
• Principe du test.....	64
2-3-2- Dosage de la production des espèces réactives de l'oxygène (EROs).....	65
• Principe du test.....	65
• Mode opératoire.....	66
2-3-3- Test des comètes (Single Cell Gel Electrophoresis).....	67
• Principe de la technique des comètes	67
2-3-3-1-Traitement avec l'homocystéine et les extraits des trois plantes.....	67
2-3-3-2-Préparation des lames	68
• Etape de lyse et d'électrophorèse.....	68
2-3-3-3- Coloration et acquisition des images.....	69
2-4- Test des comètes sur les lymphocytes	70
2-4-1-Isolement des lymphocytes	70
Chapitre V : Résultats et discussion	71
1-Resultats	71
1-1-Evaluation de l'activité antioxydante.....	71
1-1-1-L'extrait de <i>Thymus guyonii</i>	71
1-1-2- L'extrait de <i>Stachys circinnata</i>	72
1-2-Evaluation de l'activité immunostimulante des trois extraits (<i>Thymus guyonii</i> , <i>Stachys circinnata</i> et <i>Salvia verbenaca</i>).....	76
1-3-Résultats de cytotoxicité <i>in vitro</i> révélée par le test MTT.....	80

1-3-1-Cytotoxicité des extraits	80
1-3-2-Cytotoxicité de l'homocystéine.....	82
1-4-Quantification des espèces réactives de l'oxygène (EROs).....	82
1-5-Résultats du test des comètes "Single Cell Gel Electrophoresis" (SCGE).....	85
1-5-1-Sur les Monocytes.....	85
1-5-2-Sur les lymphocytes.....	90
2-Discussion.....	93
2-1-Etude de l'activité antiradicalaire.....	93
2-2-Etude de l'activité immunomodulatrice des trois extraits	95
2-3- Etude <i>in vitro</i> de l'activité cytotoxique.....	97
2-4-Cytotoxicité de homocystéine.....	99
2-5-Etude de la production des EROs.....	100
2-6-Dommages de l'ADN révélés par le test des Comètes.....	101
Conclusion	104
Perspectives	106
References bibliographiques	

Introduction

L'hyperhomocystéinémie est reconnue comme marqueur de risque d'athérosclérose dans la population générale (Clarke et al., 1991; Selhub et al., 1995), comme le laissait prévoir la survenue précoce d'accidents athéro-thrombotiques chez les patients atteints d'homocystinurie congénitale. Une élévation modérée de la concentration plasmatique totale de l'homocystéine était associée à un risque accru d'infarctus myocardique ou cérébral. Néanmoins, les résultats des études prospectives épidémiologiques sont discordants, et il n'existe pas d'étude interventionnelle montrant que la diminution de l'homocystéinémie abaisserait le risque cardiovasculaire dans la population générale (Caussé, 2008).

L'homocystéine provoque une production des espèces réactives de l'oxygène (EROs) et par conséquent un stress oxydant. L'homocystéine sensibilise les cellules au stress oxydant en diminuant l'expression de nombreuses enzymes anti-oxydantes dont la glutathion peroxydase (GPX) et l'hème oxygénase-1 (HO-1) (Koutroubakis et al., 2004).

Les radicaux libres oxygénés (H_2O_2 , peroxinitrite) provenant de l'oxydation de l'homocystéine peuvent entraîner des lésions au sein de l'ADN et altérer le message génétique, ils peuvent aussi modifier la structure primaire, secondaire et tertiaire des protéines entraînant la dépolymérisation des protéines comme le collagène ou l'élastine.

Les espèces réactives de l'oxygène (EROs) dont l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) sont produites naturellement par l'organisme. Du fait de l'efficacité des systèmes de défense naturelle, ces EROs n'ont pas d'effets néfastes majeurs.

Le corps humain se dispose d'un système antioxydant puissant, les enzymes antioxydants (tels que la superoxyde dismutase, le glutathion peroxydase et la catalase) et des vitamines (A, E et C), qui ont un rôle important dans la réduction des EROs dans les cellules.

Cependant, lorsqu'un déséquilibre se produit entre les systèmes antioxydants naturels et les EROs, l'organisme fait face à un stress oxydant. Les EROs en excès ont alors pour cible l'ADN, les lipides, les sucres et les protéines. Plusieurs maladies telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires, le diabète et les maladies dégénératives, sont associées à l'oxydation et au processus de vieillissement.

Pour cela on assiste de plus en plus à un intérêt croissant concernant les antioxydants naturels, en particulier ceux appartenant à la classe des polyphénols.

Les polyphénols sont de puissants inhibiteurs de la peroxydation lipidique, élément important pour la protection des produits manufacturés, alimentaires et cosmétiques, et ils complètent les systèmes enzymatiques de défense cellulaire, car leur activité antioxydante est principalement due à des propriétés redox qui peuvent jouer un rôle important dans l'absorption et la neutralisation des radicaux libres, la trempe singulet et tripletoxygène, ou décomposer des peroxydes (Nakatani,1997).

Les extraits bruts de fruits, d'herbes, de légumes, de céréales et d'autres matières végétales riches en composés phénoliques sont les plus recherchés par l'industrie alimentaire parce qu'ils ont de grandes quantités d'antioxydants autres que la vitamine C, la vitamine E et les caroténoïdes. Ils retardent l'oxydation et la dégradation des lipides et ainsi améliorer la qualité et la valeur nutritive des aliments (Spanos et al., 1990).

Les espèces de la famille des Lamiaceae, comme la sauge, l'origan et le thym, sont connues d'avoir des niveaux élevés d'antioxydants alimentaires en particulier les polyphénols (Zheng et al.,2001), ils sont considérés comme des antioxydants naturels jouant un rôle important dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs et par conséquent, induire des activités anticancéreuses incluant un anti-angiogénique pro-apoptotique, endommageant l'ADN (Leong et al., 2010).

Un certain nombre de composés phénoliques ont une forte activité antioxydante a été identifiée dans les extraits de ces plantes (Stangeland et al., 2009) .

L'objectif de cette étude était d'évaluer certaines plantes appartenant à la famille des Lamiaceae comme de nouvelles sources potentielles des antioxydants naturels et des composés phénoliques.

Notre choix est basé principalement sur des plantes endémiques qui ont une éventuelle utilisation en médecines traditionnelles, dans le but d'investiguer de nouvelles activités biologiques, notant qu'on se dispose de très peu d'informations sur les effets des extraits butanoliques des espèces choisies.

Le présent travail est original portant sur les activités investiguées, il est divisé en deux parties:

La première partie consiste à l'extraction et la séparation sur colonne des trois espèces étudiées, notre étude a été menée sur l'extrait butanolique.

La deuxième partie consiste à mettre en évidence quelques activités biologiques des extraits étudiés, pour cela deux analyses ont été appliqués.

Une analyse *in vitro* : consiste à investiguer l'activité antioxydante, cytotoxique, anti-génotoxique et l'aptitude à réduire la quantité des EROs des extraits butanoliques sur les cellules THP-1 , ces activités ont été analysées en présence de l'homocystéine.

Dans l'analyse *in vivo* nous avons utilisé des souris pour étudier l'activité immuno-modulatrice des trois extraits.

Chapitre I

L'hyperhomocystéinémie

Chapitre I : L'hyperhomocystéinémie

1-L'homocystéine

1-1-Définition de l'homocystéine

L'homocystéine est un acide aminé (élément de base d'une protéine) produit par l'organisme humain qui peut irriter les vaisseaux sanguins, entraînant un blocage des artères (artériosclérose).

L'homocystéine est normalement transformée en d'autres acides aminés utilisés par l'organisme. Si les taux d'homocystéine sont trop élevés, une carence en vitamines B dans l'organisme peut perturber ce processus. De nombreuses personnes affichant des taux élevés d'homocystéine n'absorbent pas assez d'acide folique, de vitamines B6 et B12 via leur alimentation. D'autres effets possibles d'un taux élevé d'homocystéine incluent des dégâts aux reins, du psoriasis ou des déficits congénitaux en enzymes utilisés pour transformer l'homocystéine dans l'organisme.

1-2-Métabolisme de l'homocystéine

L'homocystéine est un aminoacide porteur d'un groupement thiol (-SH), physiologique, mais non constitutif des protéines et qui n'est pas apporté par l'alimentation. Cet aminoacide est le produit de la déméthylation d'un aminoacide indispensable, la méthionine. L'homocystéine est métabolisée et catabolisée selon deux voies, principalement hépatiques (Figure 1).

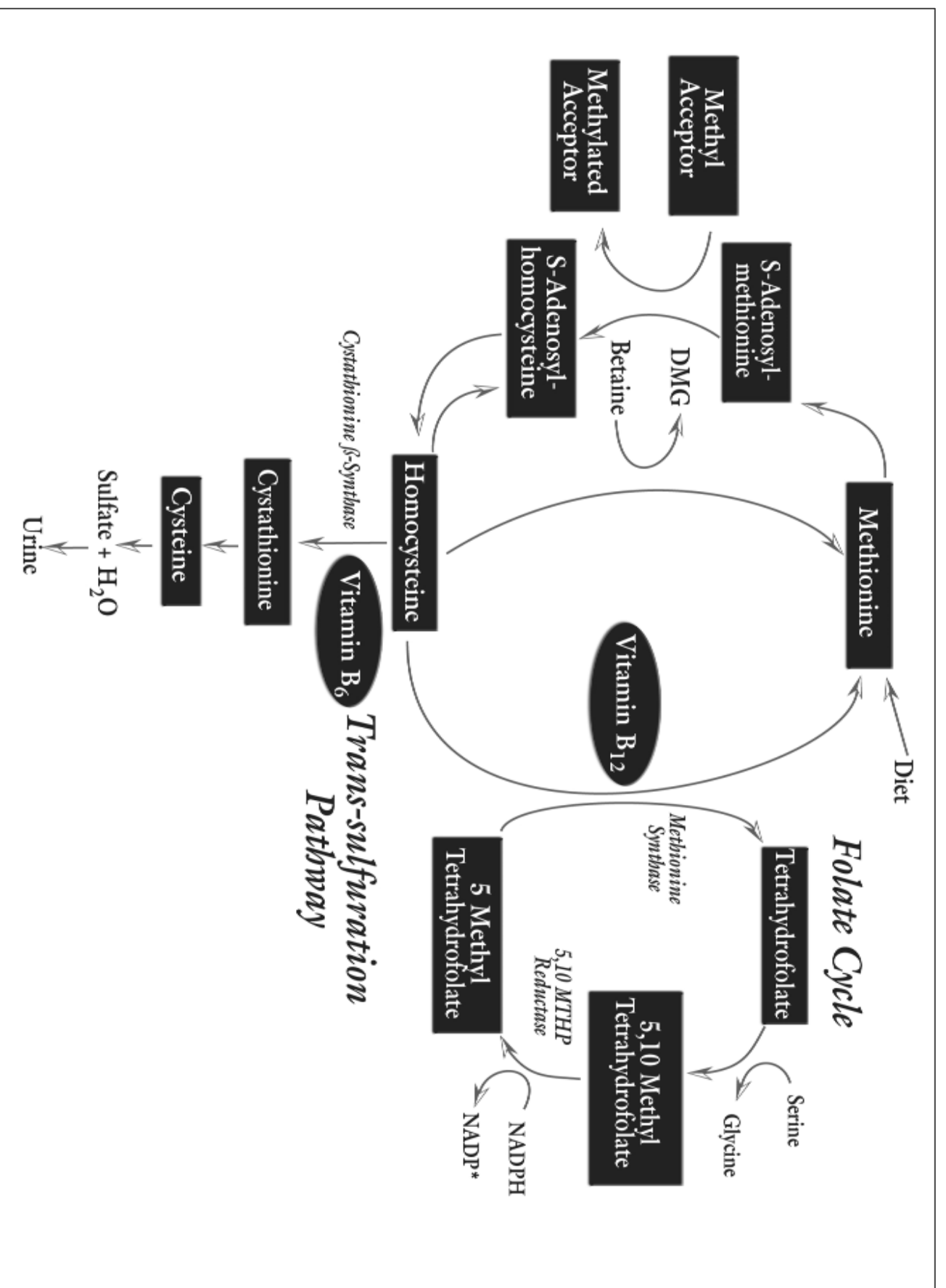


Figure 1 : voies de synthèse et de catabolisme de l'homocystéine (Guilliams, 2004)

1-2-1- Voies de la reméthylation

La reméthylation de l'homocystéine pour former de la méthionine est catalysée par une enzyme ubiquitaire: la méthionine synthase (MTR, E.C.2.1.1.13) dont le cofacteur est la vitamine B12. Le méthylène tétra-hydrofolate réductase (MTHFR) catalyse la synthèse du méthyltétrahydrofolate, qui est le donneur de groupements méthyles de la réaction précédente. Cette enzyme utilise la flavine adénine dinucléotide (FAD) comme cofacteur (Sunden et al., 1997).

Comme la méthionine synthase, la bétaine-homocystéine méthyltransférerase (BHMT, E.C.2.1.1.5) catalyse la reméthylation de l'homocystéine en méthionine, mais en utilisant la bétaine, et non le méthyltétrahydrofolate comme donneur de méthyle. La bétaine provient de la nourriture, comme les fruits de mer et les céréales ou l'oxydation de la choline. La BHMT est moins importante que la MTR car la BHMT n'est exprimée chez l'homme qu'au niveau du foie et du rein (Sunden et al., 1997).

La méthionine adénosyl transférase (MAT, E.C.2.5.1.6) catalyse la synthèse de S-adénosyl-méthionine (SAM) à partir d'ATP et de méthionine. Tous les organismes possèdent un ou deux des trois isoforme de la MAT: MATI, MATII et MATIII (Chamberlin et al., 2000).

La S-adénosyl-méthionine est le donneur universel de groupements méthyles nécessaires au maintien de la méthylation cellulaire: ADN, ARN, protéines, lipides... Ce transfert du groupe méthyle, qui est catalysé par des méthyltransférases, induit la synthèse de S-adénosylhomocystéine (SAH). La SAM joue aussi un rôle dans la régulation du métabolisme de l'homocystéine. SAM est un effecteur allostérique de la cystathionine-synthase (CBS, E.C. 4.2.1.22). La fixation de la SAM sur le domaine de régulation de la CBS pourrait ne pas être coopérative, cependant cette liaison favorise un changement de conformation de l'enzyme, libérant le site actif (Janosik et al., 2001).

Donc l'augmentation de SAM va provoquer un basculement du métabolisme de l'homocystéine vers son catabolisme, i.e. l'activation de la voie de transsulfuration.

La SAM est aussi un inhibiteur allostérique de la MTHFR, empêchant ainsi la reméthylation de l'homocystéine par une diminution de la synthèse de méthyltétrahydrofolate. A l'inverse, la SAH est très proche de la SAM, et l'antagoniste de SAM empêche le positionnement correct de la SAM sur sa protéine cible. La S-adénosyl homocystéine hydrolase (SAHH, E.C.3.3.1.1) catalyse la

réaction de conversion de SAH en homocystéine et en adénosine. C'est la seule réaction réversible parmi toutes les réactions chimiques impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine. Elle est plus en faveur de la synthèse de SAH que la synthèse de l'homocystéine (Janosik et al., 2001).

1-2-2- Voie de la trans-sulfuration

La voie de la trans-sulfuration est la seule voie de catabolisme de l'homocystéine chez les mammifères. La cystathionine U synthase (CBS, E.C. 4.2.1.22) condense le groupement thiol de l'Hcy avec l'hydroxyle d'une sérine pour former la L-cystathionine. Ensuite L-cystathionine est clivée et désaminée en cystéine et en V-cétobutyrate par la Cystéine-P-lyase (CGL, E.C. 4.4.1.1). Ces deux réactions irréversibles nécessitent la présence d'un cofacteur, le pyridoxal 5'phosphate ou vitamine B6. Cette réaction ne se déroule qu'au niveau du foie, du rein, de pancréas et d'intestin (Brosnan et al., 2004).

1-3- Formes de l'homocystéine

La présence d'homocystéine dans le plasma et dans l'urine a longtemps été méconnue en raison des faibles concentrations non détectables par chromatographie conventionnelle des acides aminés. En fait, l'amélioration des techniques de détection a permis de mettre en évidence l'homocystéine à des concentrations comprises globalement entre 5 et 15 $\mu\text{mol/l}$, dans le plasma du sujet normal, et de l'ordre de 3 à 10 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ dans l'urine. L'homocystéine détectée est en très faible partie sous forme réduite (groupement -SH libre) mais surtout sous forme oxydée, homocystine (condensation de deux homocystéines, HS-SH), de disulfures mixtes (homocystéine-cystéine, HS-SC), la fraction d'homocystéine libre ou acido-soluble représente une faible partie de l'homocystéine totale, la majeure partie de l'homocystéine plasmatique étant liée à des protéines (figure2). La fraction liée à des protéines représente plus de 70 % de l'homocystéine totale chez le sujet normal, l'albumine étant la principale protéine de liaison *via* des ponts disulfures (Demuth et al., 2000).

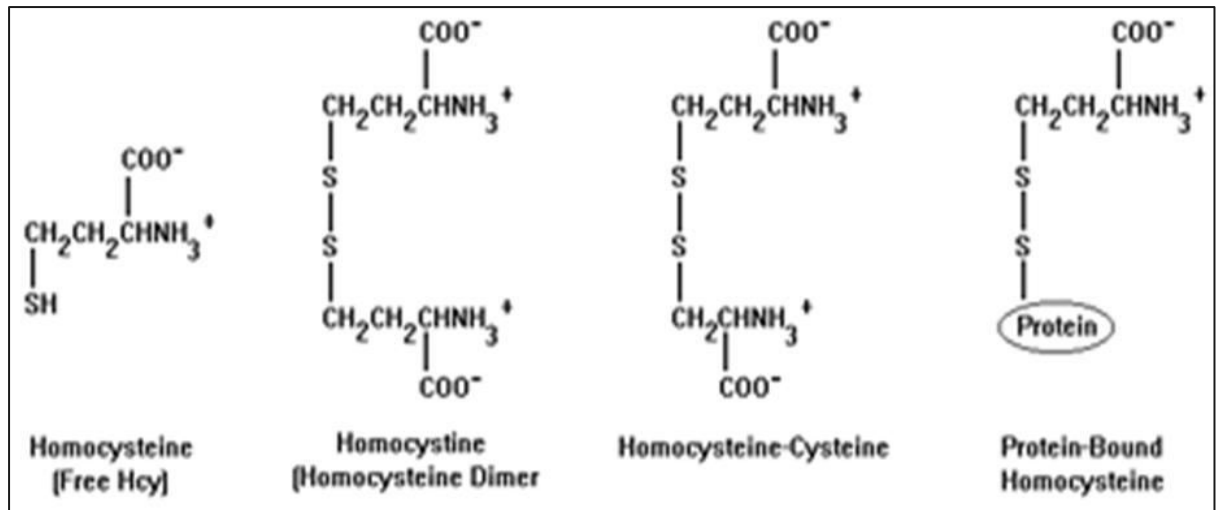


Figure 2: différentes formes d'homocystéine plasmatique (Demuth et al., 2000)

Le terme homocystéine est couramment utilisé pour désigner en fait l'homocystéine réduite et oxydée sous forme de disulfures, libre et liée à des protéines, le tout représentant l'homocystéine totale, ce terme devrait théoriquement être désigné sous l'appellation homocystéine (Wautrecht et al., 1997).

Une redistribution importante entre les formes libres et liées se produit lors du recueil et du traitement des échantillons de sang. À température ordinaire, il existe une rapide association des formes libres à des protéines plasmatiques lors du stockage à - 20 °C pendant quelques semaines, la majeure partie de l'homocystéine est alors liée à des protéines et seules des traces d'homocystéine libre peuvent être détectées, d'où l'intérêt de doser l'homocystéine totale, fraction libre ou acidosoluble qui peut être artificiellement diminuée et fraction liée après déprotéinisation.

Plusieurs études montrent que les concentrations d'homocystéine sont plus élevées chez l'homme jeune que chez la femme jeune, alors que celles de la femme ménopausée sont équivalentes à celles de l'homme. De même, des concentrations d'homocystéine plus basses ont été rapportées chez la femme enceinte. Cette diminution chez les femmes enceintes et chez les femmes en période d'activité génitale pourrait résulter d'une interaction directe de l'homocystéine avec les œstrogènes (Ueland et al., 1989).

1-4-L'homocystéine plasmatique

Dans la circulation sanguine, l'homocystéine est physiologiquement présente sous plusieurs formes. La fonction thiol libre de l'homocystéine est très réactive et engage facilement de liaisons disulfures. Ainsi 70 à 80 % de l'homocystéine est liée aux protéines plasmatiques, essentiellement à l'albumine, par des ponts disulfures.

Les formes libres sont elles mêmes à 90 % oxydées sous forme de disulfures (homocystine et disulfure mixte homocystéine-cystéine). La formation de ces ponts disulfures est spontanée et due à la réactivité des thiols terminaux. Seule une faible fraction de l'homocystéine (2 à 5 %) se trouve sous forme d'homocystéine libre réduite, qui est l'espèce réactive. La plupart des techniques de dosage utilise une réduction préalable et détermine donc l'homocystéinémie totale sans distinguer la forme thiol minoritaire et les formes disulfures (Ducros et al., 2001) .

Il est généralement considéré que l'homocystéinémie totale chez le sujet à jeun est comprise entre 7 et 14 μM . L'homocystéinémie varie en fonction du sexe et de l'âge puisque qu'elle est plus basse chez la femme avant 50 ans et également plus basse chez l'enfant, de l'ordre de 6 μM de 3 à 14 ans. On parle d'hyperhomocystéinémie pour des concentrations plasmatiques d'homocystéine supérieures à 15 μm (Ducros et al., 2001) .

2- L'hyperhomocystéinémie

2-1-Généralités sur l'hyperhomocystéinémie

L'hyperhomocystéinémie se réfère à une teneur plasmatique excessive en homocystéine supérieure à 15 $\mu\text{mol/l}$, pouvant atteindre 200 $\mu\text{mol/l}$. Elle est considérée comme un facteur impliqué dans plusieurs maladies cardiovasculaires, dépressives, et neurologique. Les niveaux élevés d'homocystéine plasmatique sont associés à plusieurs pathologies y compris le déclin cognitif lié à l'âge, les maladies cérébro-vasculaires, les accidents vasculaires cérébraux, et la démence vasculaire (Troen, 2005).

Elle est considérée aussi comme un facteur de risque indépendant et fort de la maladie d'Alzheimer (Seshadri et al., 2002). Elle entraînerait de nombreuses modifications du métabolisme cellulaire, en particulier au niveau de l'endothélium, d'où son rôle favorisant l'athérogénèse (Boushey et al., 1995). L'altération du

métabolisme de l'homocystéine (acide aminé dérivé du métabolisme de la méthionine) est due au déficit en folate, vitamine B12 et B6, la diminution des taux d'homocystéine est traitée par une supplémentation de la vitamine B par voie orale, tandis que d'autres études montrent que l'administration des vitamines ne donne pas de vrais bénéfices cliniques et suggèrent que la vitamine B peut par contre augmenter les risques cardiovasculaires (Lonn et al., 2006; Bonaa et al., 2006).

2-2-Classification des hyperhomocystéinémies

Notre organisme synthétise environ 20 μmoles par jour d'homocystéine, mais très peu comparativement se retrouve dans le sang, elle existe soit sous forme libre (30 %), soit liée aux protéines (70 %). Les valeurs normales de l'homocystéine totale varient en fonction de la technique de dosage employée, mais on retient que des valeurs entre 7 et 14 $\mu\text{mol/l}$ chez les sujets à jeun sont considérées comme normales. Le taux d'homocystéine reste stable dans la durée et on n'observe que de très faibles variations, faisant conclure que les taux mesurés lors d'un examen biologique sont valides et peuvent être utilisés dans des études cliniques (Wautrecht et al., 1997). Ces valeurs peuvent varier selon du sexe (normales hommes supérieures aux normales femmes), de l'âge (pour les femmes elles sont plus basses avant 50 ans, après 50 ans les valeurs rejoignent celles des hommes) chez les enfants (3-14 ans) les concentrations normales sont plus basses et se situent autour de 6 $\mu\text{mol/l}$ (tableau 1).

Tableau 1 : différents types d'hyperhomocystéinémies (Mouchabac, 2008)

Type	Dosage
Dosage moyen	10 $\mu\text{mol/l}$ (seuil 15 $\mu\text{mol/l}$)
Hyperhomocystéinémie modérée	15 à 30 $\mu\text{mol/l}$
Hyperhomocystéinémie intermédiaire	30 à 100 $\mu\text{mol/l}$
Hyperhomocystéinémie sévère ou majeure	>100 $\mu\text{mol/l}$

2-2-1-L'hyperhomocystéinémie sévère

Elles sont, pour l'essentiel, d'origine génétique, liées à un déficit homozygote exceptionnel en CBS (cystathionine-b-synthase) ou MTHFR dont la prévalence moyenne dans la population générale est de l'ordre de 1/200 000. Elle est caractérisée par des valeurs très élevées d'homocystéine plasmatique (>100 µmol/l) et urinaire avec retard de développement, ostéoporose, maladie thromboembolique, artériosclérose précoce.

Dans une enquête portant sur plus de 600 malades homozygotes pour la CBS, (Mudd et al.,1995) ont observé que plus de 50 % des patients présentaient des problèmes vasculaires avant l'âge de 30 ans , l'accident vasculaire cérébral représentait plus de 30 % des accidents artériels et les thromboses veineuses périphériques plus de 50 % des accidents thromboemboliques, associés à une embolie pulmonaire dans un cas sur cinq (Caussé et al ., 2001). Sur 68 cas de déficits congénitaux en MTHFR (44 cas de la littérature et 24 cas personnels), 4 ont présenté des thromboses dont 3 de notre série (McCully, 1969). Ces accidents thromboemboliques peuvent révéler le déficit à l'âge adulte.

Des manifestations psychiatriques rapportées dans quelques cas de déficit congénital en MTHFR pourraient être liées à des occlusions vasculaires. Plus de un patient sur cinq avec un mutant CblC a développé un SHU, caractérisé histologiquement par une micro- angiopathie thrombotique (McCully, 1969).

2-2-2-L'hyperhomocystéinémie intermédiaire

L'hyperhomocystéinémie intermédiaire est souvent causé par l'insuffisance rénale, la déficience de cobalamine modérée, déficience sévère en acide folique, ou la thermolabile 5,10 méthylène-tétrahydrofolate réductase associée avec des taux réduits de l'acide folique.

2-2-3-L'hyperhomocystéinémie modérée

Sa prévalence à l'état homozygote dans la population générale est 10 %. Étant donné le lien indiscutable entre l'hyperhomocystéinémie sévère et les maladies vasculaires précoces, il était licite de rechercher une éventuelle relation entre l'hyperhomocystéinémie modérée et les accidents vasculaires. En 1976, Wilcken et

Wilcken étaient les premiers à suggérer un rôle possible de l'hyperhomocystéinémie modérée dans les coronaropathies. Ils ont montré qu'environ 30 % des sujets souffrant de maladies coronaires confirmées angiographiquement présentaient une homocystéinémie modérée après test de charge à la méthionine. Depuis ces premières observations, de nombreuses études ont montré qu'une hyperhomocystéinémie modérée était fréquemment trouvée chez les malades avec une pathologie vasculaire, notamment un accident vasculaire cérébral (Cacoub et al., 1996 ; Faraci et al., 2004).

2-3-Etiologies de l'hyperhomocystéinémie

Une élévation de l'homocystéine plasmatique est due essentiellement à des facteurs génétiques ou nutritionnels.

2-3-1- Facteurs génétiques

Les facteurs génétiques impliquent des anomalies congénitales bloquant la voie de la transsulfuration ou de la reméthylation. Le plus anciennement connu est le déficit en Cbeta S, responsable de l'hyperhomocystéinémie et de l'homocystinurie massive d'où vient le nom "homocystinurie classique" donné à cette maladie, l'hyperhomocystéinémie dépasse souvent 400 $\mu\text{mol/l}$. Le déficit en Cbeta S est caractérisé à l'état homozygote, par des anomalies du squelette, une luxation du cristallin, mais aussi par une artériosclérose précoce et des complications thromboemboliques. C'est une affection rare qui touche environ 1/200 000 personnes alors que les porteurs hétérozygotes représentent près de 1/100 de la population (Caussé et al., 2001). Plus d'une trentaine de mutations ont été identifiées sur le gène de la Cbeta S mais aucune n'a été trouvée chez des malades ayant eu des accidents thromboemboliques précoces (Stanger et al., 2003).

Les anomalies portant sur la voie de la reméthylation sont moins bien connues et plus rares, les déficits en MTHFR sont caractérisés par une hyperhomocystéinémie dépassant généralement 150 $\mu\text{mol/l}$, ils sont associés à une homocystinurie importante, une hypométhioninémie et à une baisse importante des folates dans le sérum, dans les érythrocytes, diminution portant essentiellement sur les formes méthylées (Chango et al., 2000).

Les signes cliniques qui peuvent se manifester dès la période néonatale, au cours de l'enfance, de l'adolescence, voire de l'âge adulte, incluent un retard mental, des convulsions, une détérioration neurologique progressive, parfois des troubles psychiatriques à type de schizophrénie et des thromboses artérielles et veineuses, ces dernières peuvent même révéler le déficit à l'âge adulte (Conri et al., 2000).

À côté des déficits sévères dus à différentes mutations rares, il existe une autre mutation sur l'exon 4 changeant une cytosine en thymine au niveau de la base 677 (C677 => T). Cette mutation, présente à l'état homozygote chez plus de 10 % de la population générale, elle a été trouvée avec une fréquence plus élevée chez des patients ayant des maladies vasculaires et elle est associée à une diminution de l'activité enzymatique et à une augmentation de l'homocystéine plasmatique (Conri et al., 2000).

Certaines anomalies du métabolisme des cobalamines, bloquant la biosynthèse des formes actives de la vitamine B12, méthylcobalamine (mutant Cbl G ou E) et simultanément de l'adénosylcobalamine (mutant Cbl C, D ou F), se caractérisent aussi par une hyperhomocystéinémie et une hyperhomocystinurie avec une hypométhioninémie, associées dans le cas des mutants C, D ou F à une méthylmalonylacidurie. Les mutants E, G et C se caractérisent généralement par une pancytopénie avec anémie macrocytaire et mégaloblastose médullaire. Les mutants Cbl C ont souvent une insuffisance rénale avec hémolyse, hématurie et protéinurie proche du syndrome hémolytique et urémique (SHU), histologiquement, ce syndrome est caractérisé par une micro-angiopathie (Conri et al., 2000).

2-3-2- Facteurs nutritionnels

À côté des facteurs génétiques, l'augmentation de l'homocystéine est liée à des carences vitaminiques essentiellement en folates, vitamine B12 et vitamine B6. Dès les années 50, dans une enquête écossaise reprenant 108 cas d'anémies mégaloblastiques sévères identifiées chez plus de 2 500 sujets, l'incidence de mortalité était élevée et la cause essentielle était due à des accidents cardiovasculaires (Lawson et al., 1972).

Ballas et Saidi (1997) ont rapporté que les anémies mégaloblastiques, dues à des carences en B12 ou en folates, pouvaient être associées à des accidents thromboemboliques.

La carence folique généralement par défaut d'apport, est une situation très fréquente et s'accompagne dans la majorité des cas d'une élévation modérée de l'homocystéine, une corrélation négative a été observée entre les concentrations d'homocystéine plasmatique et les concentrations de folates plasmatiques et érythrocytaires (Den Heijer et al., 1996).

L'élévation de l'homocystéine est quasi constante dans les carences en vitamine B12, atteignant des valeurs très supérieures à celles observées dans les carences foliques. Cette élévation de l'homocystéine apparaît très précocement avant même les signes hématologiques et peut révéler une carence en B12 au cours des maladies neuro-psychiatriques inexplicables en l'absence d'anémie et de macrocytose. Cette hyperhomocystéinémie est aussi une aide importante pour le diagnostic de carence tissulaire en cobalamine chez des enfants souffrant d'anomalies congénitales du métabolisme de la vitamine B12, affections qui s'accompagnent habituellement de concentrations normales de vitamine B12 circulante (Den Heijer et al., 1996).

Les médicaments antifoliques tels que le méthotrexate, les anti-épileptiques qui induisent fréquemment des carences foliques, ou le protoxyde d'azote qui inactive la vitamine B12 augmentent les concentrations plasmatiques d'homocystéine (Ueland et al., 1989). La relation entre la carence en vitamine B6 et l'artériosclérose chez l'homme est bien établie. En outre, le tabac, les polluants tels que le monoxyde de carbone ou certains médicaments comme la théophylline induisent des carences en vitamine B6. Des concentrations basses de pyridoxal 5 phosphate ont été rapportées aussi chez des femmes prenant des contraceptifs oraux (Robinson et al., 1995) .

2-3-3-L'insuffisance rénale chronique

L'homocystéine plasmatique est augmentée chez les malades ayant une insuffisance rénale et la concentration d'homocystéine est en corrélation avec la créatinine sérique, et surtout avec le taux de filtration glomérulaire (Ueland et al., 1989). Chez les malades hémodialysés, les concentrations d'homocystéine sont élevées et diminuent

après dialyse. Le statut folique est un déterminant majeur de la concentration d'homocystéine chez les malades en hémodialyse. Il est probable que l'hyperhomocystéinémie contribue à l'incidence élevée de maladies artérielles occlusives observées chez ces patients (Robinson et al., 1996).

2-3-4-Le diabète

Des concentrations élevées d'homocystéine ont été aussi rapportées dans le diabète sucré de type I chez des malades avec des concentrations de créatinine sérique supérieures à 115 $\mu\text{mol/l}$ dues à la néphropathie diabétique. Cependant, une étude récente a montré l'absence d'association entre l'homocystéine plasmatique et la micro-angiopathie chez les malades avec un diabète sucré de type I (Agardh et al., 1994). Donc on ne peut exclure que l'accumulation d'homocystéine au cours de la néphropathie diabétique avancée puisse contribuer au développement accéléré de la macro-angiopathie chez les diabétiques.

2-3-5-Autres causes

Une hyperhomocystéinémie est aussi trouvée chez les alcooliques, probablement en relation avec les carences vitaminiques (Cravo et al., 1996) . Les affections néoplasiques, notamment les leucémies aiguës lymphoblastiques, sont généralement associées à des concentrations d'homocystéine élevées qui se normalisent après le début du traitement. Il peut y avoir une relation entre la dépendance des cellules tumorales vis-à-vis de la méthionine et l'hyperhomocystéinémie trouvée au cours des processus tumoraux (Cravo et al., 1996).

2-4-L'hyperhomocystéinémie et les affections cardio-vasculaires

Plusieurs études épidémiologiques ont montré une association fréquente entre l'hyperhomocystéinémie modérée et la pathologie occlusive artérielle (coronaire, cérébrale ou périphérique) et veineuse.

En 1969, McCully postulait déjà que l'accumulation d'homocystéine pouvait entraîner une athérosclérose.

En 1976, Wilcken et Wilcken montraient l'existence d'une association entre l'accumulation d'homocystéine plasmatique et la présence d'une atteinte coronaire.

En 1992, « la Physician's Health Study » a publié une étude cas-témoins réalisée par des médecins américains sur 15.000 hommes souffrant d'une atteinte coronaire, l'étude a montré que l'homocystéinémie mesurée était significativement plus élevée dans le groupe des 271 sujets qui présenteront un infarctus aigu du myocarde durant un suivi prospectif de 5 ans. La différence entre les valeurs moyennes d'homocystéinémie chez les sujets avec infarctus et les témoins était statistiquement significative ($11,1 \pm 4$ versus $10,5 \pm 2,8$ $\mu\text{mol/l}$). Au début de l'étude une hyperhomocystéinémie ($>15,8$ $\mu\text{mol/l}$) était retrouvée chez 11 % des malades contre seulement 2 % des témoins.

En 1997 Nygard et al. Ont défini un score pronostique de survie à partir du taux d'homocystéine chez des patients souffrant de maladie coronaire. Il s'agissait d'une étude prospective étudiant la relation entre le taux d'homocystéine plasmatique et la mortalité chez 587 patients souffrant d'une maladie coronaire (angor stable, angor instable, infarctus) confirmée à l'angiographie. Après un suivi moyen de 4,6 ans, 64 patients sont décédés. Une relation forte entre l'homocystéinémie et le taux de mortalité a été trouvée. Après 4 ans 3,8% des patients ayant un taux d'homocystéine < 9 $\mu\text{mol/l}$ sont décédés contre 24,4 % des patients présentant un taux >15 $\mu\text{mol/l}$. Dans cette étude, les patients avec une homocystéinémie $< 9\mu\text{mol/l}$ constituent le groupe de référence. Les rapports de mortalité par comparaison à ce groupe sont de 1,9 pour les patients dont l'homocystéinémie est comprise entre 9 et 14,9 $\mu\text{mol/l}$, 2,8 pour ceux dont l'homocystéinémie se situe entre 15 et 19,9 $\mu\text{mol/l}$, et 4,5 pour ceux dont l'homocystéinémie est supérieure à 20 $\mu\text{mol/l}$.

En 1996, Heijer et al. Ont identifié l'hyperhomocystéinémie comme étant un facteur de risque de thromboses veineuses profondes (TVP) dans la population générale. Ils ont mesuré le taux d'homocystéine plasmatique chez 269 patients ayant présenté un premier épisode de TVP et chez 269 sujets témoins sains. L'homocystéinémie moyenne était de 12,9 $\mu\text{mol/l}$ chez les patients et de 12,3 $\mu\text{mol/l}$ chez les témoins. Sur les 269 patients, 28 (10 %) avaient une homocystéinémie $>18,5$ $\mu\text{mol/l}$ contre 13 (5%) chez les contrôles. Cette étude montre que le risque de thrombose n'augmente pas chez les sujets dont l'homocystéinémie est inférieure à 18 $\mu\text{mol/l}$, et qu'il augmente légèrement lorsque l'homocystéinémie est comprise entre 18 et 22 $\mu\text{mol/l}$ et qu'il est multiplié par 4 lorsque l'homocystéinémie est supérieure à 22 $\mu\text{mol/l}$. Ceci démontre

l'existence d'un seuil en ce qui concerne le risque veineux alors que l'augmentation du risque artériel apparaît plutôt linéaire.

En 1995, la méta-analyse de Boushey et al. Réalisée à partir des résultats de 27 études, montre qu'une augmentation de l'homocystéinémie de 5 $\mu\text{mol/l}$ accroît autant le risque coronaire qu'une élévation de la cholestérolémie de 0,2 g/l. Ainsi, chaque augmentation supplémentaire de 5 $\mu\text{mol/l}$ d'homocystéine se traduit par un accroissement du risque relatif de maladie coronaire de 1,6 pour les hommes et 1,8 pour les femmes et est associée à des odds ratios de 1,5 pour les pathologies cérébro-vasculaires et de 6,8 pour les pathologies vasculaires périphériques.

Plusieurs méta-analyses confirment bien la relation entre l'hyperhomocystéinémie et les affections cardio-vasculaires et thrombo-emboliques. Citons « The Homocysteine Studies Collaboration » qui réunit des données portant sur 16.786 personnes saines et la publication de Wald et al qui porte sur vingt études prospectives et 72 études génétiques (Wald et al., 2002).

2-5-Mécanismes de la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie

Nous nous limiterons à décrire différentes hypothèses physiopathologiques qui peuvent sous-tendre la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie dans la maladie cardio-vasculaire. Notons que l'hyperhomocystéinémie est également incriminée dans de multiples mécanismes liés au vieillissement (Kuo et al., 2005).

2-5-1-Production du stress oxydant

Les radicaux libres oxygénés (H_2O_2 , peroxy-nitrite) provenant de l'oxydation de l'homocystéine peuvent entraîner des lésions au sein de l'ADN et altérer le message génétique, ils peuvent aussi modifier la structure primaire, secondaire et tertiaire des protéines entraînant la dépolymérisation des protéines comme le collagène ou l'élastine. Les radicaux libres peuvent encore altérer la fluidité membranaire en agissant au niveau des acides gras polyinsaturés et des phospholipides membranaires et participent aussi à la peroxydation lipidique des lipoprotéines athérogènes présentes dans l'intima artérielle (Caussé et al., 2001; Stanger et al., 2003; Guillard et al., 2003).

2-5-1-1-Espèces réactives de l'oxygène (EROs)

La chaîne respiratoire mitochondriale, dans laquelle les êtres aérobies puisent leur énergie, joue un rôle capital dans la cellule en couplant l'oxydation des coenzymes

transporteurs d'hydrogène ou d'électrons avec la phosphorylation de l'ADP (Adénosine Di Phosphate) en ATP (Adénosine Tri-Phosphate).

Les conséquences de cette activité mitochondriale sont doubles et paradoxales. D'une part, la mitochondrie fournit à la cellule une source d'énergie importante puisque 36 molécules d'ATP à haut potentiel énergétique sont générées lors de la réduction de l'oxygène. Par contre, dans les conditions physiologiques, environ 0,4 à 4 % d'électrons s'échappent, réagissent directement avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme et donnent naissance à des EROs. Celles-ci sont soit des radicaux libres comme l'anion superoxyde (O_2^-) ou le radical hydroxyle OH), soit des molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'oxygène singulet (1O_2). Dans cette chimie particulière, les métaux de transition, comme le Fe^{2+} et le Cu^{2+} , agissent comme catalyseurs dans la formation du radical hydroxyle (Delattre et al., 2005).

Le rôle des EROs est très complexe car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration.

Dans des conditions normales, elles sont générées en faible quantité et jouent un rôle de messagers secondaires capables, notamment, de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription. Citons aussi le processus de fécondation, au cours duquel les spermatozoïdes sécrètent des grandes quantités des EROs pour percer la paroi membranaire de l'ovule.

Le monoxyde d'azote radicalaire ou $NO\bullet$ est un composé important, il est notamment synthétisé par les cellules endothéliales via l'action de NO synthétases sur la L-arginine. C'est une molécule labile très diffusible, dont les effets régulateurs s'exercent sur la plupart des fonctions physiologiques de l'organisme (maintien du tonus vasculaire, neurotransmission, fonctionnement rénal...etc). Toutefois, le $NO\bullet$ peut former avec l'anion superoxyde ou le peroxyde d'azote (HOONO), un oxydant puissant et diffusible, capable d'endommager de nombreuses molécules organiques (Hare, 2004).

Formés en trop grande quantité, les ERO deviennent «pathologiques» en activant l'expression des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires ou des protéines d'adhésion. En outre, leur nature instable les rend très réactifs vis-à-vis de substrats biologiques et capables d'induire des modifications oxydatives délétères potentiellement impliquées dans l'apparition de pathologies (Hare, 2004).

2-5-1-2- Stress oxydant et facteurs le favorisant

Dans des conditions physiologiques, la production des EROs est parfaitement maîtrisée par les systèmes de défense de notre organisme : la balance antioxydants / pro-oxydants est en équilibre. Le stress oxydant résultera d'une situation où l'organisme ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques. Il est potentiellement impliqué dans le développement du vieillissement ou de pathologies associées au vieillissement (maladies cardio-vasculaires et neuro-dégénératives, cancer, diabète, dégénérescence musculaire, asthme) les sources de stress oxydant peuvent avoir diverses origines endogènes et exogènes (Haleng et al., 2007).

2-5-1-3- Principales cibles biologiques des EROs

- **Acide désoxyribonucléique ou ADN**

L'ADN est une cible privilégiée pour les ERO. La guanine, par exemple, peut réagir avec $\bullet\text{OH}$ pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (Haleng et al., 2007) .

- **Protéines**

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des EROs. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non- reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire (Haleng et al., 2007).

- **Lipides membranaires**

Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras poly-insaturés (AGPI) : c'est la phase

d'initiation. Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde ($\text{ROO}\bullet$), suffisamment réactif pour arracher un H^+ à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction (Atkin et al., 2005).

Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. Les peroxydes générés seront neutralisés par la glutathion peroxydase ou continueront à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes (malondialdéhyde, 4-hydroxynonéal) dont les activités pro-athérogènes sont bien connues (Haleng et al., 2007).

- **lipoprotéines**

L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de LDL oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. L'activité de ces récepteurs n'étant pas régulée par la concentration intracellulaire en cholestérol, les macrophages se transforment petit à petit en cellules spumeuses (rôle important dans les premières étapes de l'athérosclérose) (Nakajima et al., 2006). En outre, ces LDL oxydées sont immunogènes et les immuns complexes formés peuvent activer la voie classique du complément et générer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (Saad et al., 2006).

2-5-1-4- Défenses antioxydantes

Pour se protéger des effets délétères des EROs, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydants (figure 3). On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque, l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydants (Haleng et al., 2007).

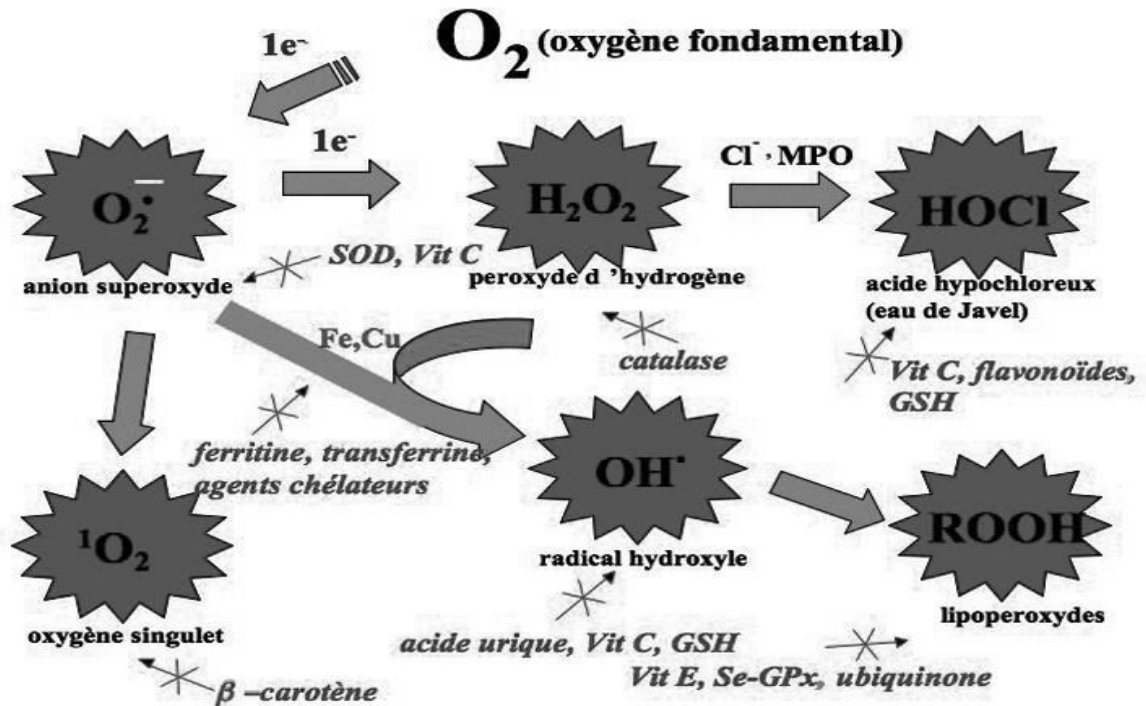


Figure 3 : Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (EROs) et des antioxydants régulateurs de leur production (Haleng et al 2007).

- **Superoxydes dismutases (SOD)**

Ces métalloprotéines, qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant, assurent l'élimination de l'anion superoxyde O_2^- par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. Chez l'homme, on décrit 3 isoenzymes : la Cu/Zn-SOD1 cytosolique, la Mn-SOD2 mitochondriale et la Cu/Zn-SOD3, qui diffèrent par la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire. La SOD3 est sécrétée par les cellules musculaires lisses et constitue le système antioxydant majeur de la paroi artérielle : son expression et sa sécrétion sont augmentées par les facteurs vasoactifs (histamine, endothéline 1, angiotensine II) et diminuées par l'homocystéine (Haleng et al., 2007).

- **Glutathion peroxydases (GPxs)**

La GPx est une séléno-protéine (cinq isoformes) qui réduit les peroxydes aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH). Son rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les

acides gras polyinsaturés. La GPx est effondrée en cas de déficit majeur en sélénium, elle est donc un bon reflet de cette carence. Toutefois, pour un apport adéquat en sélénium, les teneurs en GPx atteignent un plateau. Le dosage en GPx ne peut donc être utilisé comme marqueur d'une intoxication en sélénium. Cependant, sa synthèse étant rénale et hépatique, d'autres facteurs tels que l'insuffisance rénale ou la cytolyse hépatique peuvent modifier sa concentration (Haleng et al., 2007).

2-5-2- Dysfonction endothéliale et diminution de la production de NO

Sur le plan expérimental, l'homocystéine provoque une atteinte des cellules endothéliales, freine la libération de NO et affecte la vasotonicité. Ainsi, une charge en L-méthionine (100 mg/kg) chez 17 sujets normaux entraîne, dans l'heure suivante, une baisse de la dilatation artérielle médiée par le flux sanguin. Cet effet est prévenu par une supplémentation d'une semaine en vitamine C, sans que le taux d'homocystéine soit modifié, démontrant que l'effet de l'homocystéine est médié, au moins en partie, par le stress oxydant (Caussé et al., 2001; Guillard et al., 2003; Clarke et al., 2003; Hankey et al., 1999).

2-5-3- Altération de l'hémostase

Des résultats de travaux menés *in vitro* et chez l'animal suggèrent que l'hyperhomocystéinémie altère le phénotype antithrombotique physiologique des cellules endothéliales et démasque leur potentiel procoagulant (Cacoub et al., 1996; Conri et al., 2000).

2-5-4- Effets sur la musculature lisse vasculaire

L'homocystéine provoque une croissance et une prolifération accrue des cellules musculaires lisses impliquées dans l'athérogénèse. (Beaudeux et al., 2001).

2-6- Traitement de l'hyperhomocystéinémie

Les traitements visant à réduire les concentrations d'homocystéine chez les patients ayant une homocystinurie, un déficit en MTHFR ou un mutant Cbl sont actuellement bien standardisés. Ils consistent en l'administration de pyridoxine dans le cas d'une homocystinurie classique, d'acide folique ou folinique, de vitamine B12 associés à la bétaine pour améliorer les systèmes des reméthylations dans le cas de déficits en

MTHFR et de mutants Cbl. Étant donné les relations entre l'hyperhomocystéinémie modérée, risque de maladie vasculaire et la fréquence de la carence folique, la supplémentation par acide folique a été utilisée et son efficacité sur le contrôle de la concentration d'homocystéine plasmatique a été largement montrée. En outre, le traitement par acide folique semble normaliser l'activité de MTHFR chez la plupart des sujets qui ont une activité diminuée (Zittoun et al.,1997).

L'administration d'acide folique a même été proposée chez les malades avec une insuffisance rénale chronique pour prévenir les accidents vasculaires qu'il y ait ou non une carence en folates (Wilcken et al., 1988).

Les doses utilisées varient selon les études de (Mayer et al.,1996) entre 5 mg et 10 mg seules ou de 1 mg en association avec 10 mg de pyridoxine et 50 mg de cyanocobalamine ces mélanges ont fait preuve de leur efficacité dans la majorité des cas, cependant l'arrêt du traitement entraîne à nouveau une élévation de l'homocystéine. Les concentrations d'homocystéine ont été trouvées significativement plus basses chez des sujets d'âge moyen ou âgés prenant des multivitamines contenant des doses d'acide folique entre 200 et 400 mg.

Les sujets homozygotes pour la mutation C677 => T (T/T) qui ont des concentrations élevées d'homocystéine plasmatique et des concentrations abaissées de folates semblent avoir une meilleure réponse à la supplémentation folique que les sujets C/C ou C/T en terme de diminution de l'homocystéinémie. L'administration de vitamine B12 seule à moins d'une carence en B12 associée, ou de vitamine B6 seule, ne normalise pas les concentrations d'homocystéine (Malinow et al.,1997) .

Une analyse a été réalisée visant à estimer la réduction des concentrations d'homocystéine par acide folique et à calculer la réduction potentielle de mortalité par les maladies coronaires en augmentant les apports en acide folique. Cette étude a montré que, dans la population générale, 10 % des maladies coronaires pouvaient être attribuées à l'hyperhomocystéinémie, l'apport d'acide folique sous différentes formes, augmentation de la consommation d'aliments riches en folates, comprimés ou enrichissement de certains aliments en acide folique, pourrait ainsi réduire considérablement le risque de mortalité et prévenir les maladies vasculaires artériosclérotiques. La tendance est d'enrichir la teneur de certains aliments en acide

folique et la FDA envisage de supplémenter les céréales et les farines à raison de 140 mg d'acide folique/100 g. Toutefois, les suppléments en acide folique, quelles qu'en soient les modalités, doivent être bien contrôlés et se rapprochent des doses physiologiques et des apports recommandés oscillant entre 400 à 800 mg/j. En effet, des doses pharmacologiques administrées à titre de prévention de maladies thromboemboliques peuvent dissimuler une carence en vitamine B12 en masquant les manifestations hématologiques, et de ce fait être responsables de manifestations neurologiques, notamment chez les sujets âgés chez lesquels la prévalence en carence B12 est élevée (Tucker et al., 1996) .

La morbidité et la mortalité par accidents thromboemboliques constituent un problème de santé publique qui explique l'intérêt porté à l'hyperhomocystéinémie modérée comme facteur de risque d'accidents vasculaires, et justifient des essais de prévention par des moyens simples et peu coûteux (Tucker et al., 1996) .

Chapitre II

Les polyphénols

Chapitre II : Les polyphénols

Aujourd'hui, il existe de nombreuses preuves épidémiologiques et cliniques des bienfaits d'une consommation élevée de fruits et légumes pour la santé humaine. Cependant, il est très important d'identifier quels sont les constituants protecteurs des produits végétaux.

Les fruits et les légumes présentent plusieurs intérêts, faible densité énergétique, apport de fibres, minéraux et vitamines, mais ils sont aussi sources d'une grande variété de composés bioactifs appelés phytomicronutriments. Sous ce terme, selon les structures chimiques de base, on regroupe les polyphénols, les terpènes, les micro-constituants azotés ou soufrés. Les phytomicronutriments sont définis comme des composés non essentiels pour les processus de croissance et de développement mais qui, en préservant les fonctions de l'organisme tout au long de la vie, permettraient de vieillir en bonne santé plus longtemps (Holst et Williamson, 2008).

Parmi ces phyto-micronutriments, les polyphénols sont de loin les plus abondants et les plus consommés. Au cours des dix dernières années, ils ont d'ailleurs fait l'objet d'un fort engouement de l'industrie agro-alimentaire et de la communauté scientifique, avec des résultats qui mettent en exergue les effets santé potentiels associés à ces composés, notamment en lien avec la protection vasculaire (Williamson et al., 2005).

1-Généralités sur les polyphénols

Les polyphénols, dénommés aussi composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal qui appartiennent à leur métabolisme secondaire (Hynes et al., 2001 ; Torreggiani et al., 2005; Esparza et al., 2005). Élaborés par la voie de shikimate et caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide (Charpentier et Boizot, 2006).

Ces phytonutriments sont responsables de la pigmentation (teinte des feuilles, couleur des fruits et des fleurs) (Serrano et al., 2010) et jouent également un rôle dans la croissance, la reproduction et la protection des plantes contre les agressions pathogènes (Drewnoski et al., 2000; Zem et Fernandez, 2005).

Ils sont naturellement présents dans notre alimentation sous différentes formes telles que les vitamines A, C ou E, les carotènes et certains minéraux comme le sélénium et le zinc. On les retrouve en plus grandes quantités dans les fruits, les légumes et les céréales. A ce jour, les scientifiques ont identifié plus de 8000, allant de molécules simples à des composés hautement complexes.

L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau phénolique à 6 carbones auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (Kakhlon et al., 2002; Welch et al., 2002).

Les polyphénols présentent une activité antioxydant très forte contre le stress oxydant causé par les EROs, ils fournissent ainsi aux cellules de notre organisme une protection contre les méfaits causés par le vieillissement ou l'exposition prolongée à des éléments tels que les infections, les rayons UV du soleil, la pollution ou la fumée de cigarette.

Selon les résultats de certaines études conduites chez l'homme ces dernières années, les polyphénols seraient impliqués dans la prévention des maladies cardiovasculaires et peut-être également d'autres pathologies telles que les maladies neuro-dégénératives, le diabète, l'ostéoporose et les cancers (Milner, 1994; Duthie et al., 1994). Ces composés sont ainsi devenus en quelques années les molécules préférées des nutritionnistes, des épidémiologistes, des industriels de l'agroalimentaire et des laboratoires pharmaceutiques et cosmétiques.

2-Classification des polyphénols

Les polyphénols sont présents exclusivement et en abondance dans tous nos aliments et boissons d'origine végétale. Les teneurs en polyphénols dans les aliments sont affectées par les opérations de fractionnement, raffinage, broyage, fermentation, cuisson, conservation ou maturation qui se traduisent souvent par des réactions d'hydrolyse et d'oxydation des polyphénols. En fonction de leur structure chimique, les polyphénols sont répartis en différentes classes: acides phénoliques, flavonoïdes, lignanes, stilbénes et curcuminoïdes (figure 4).

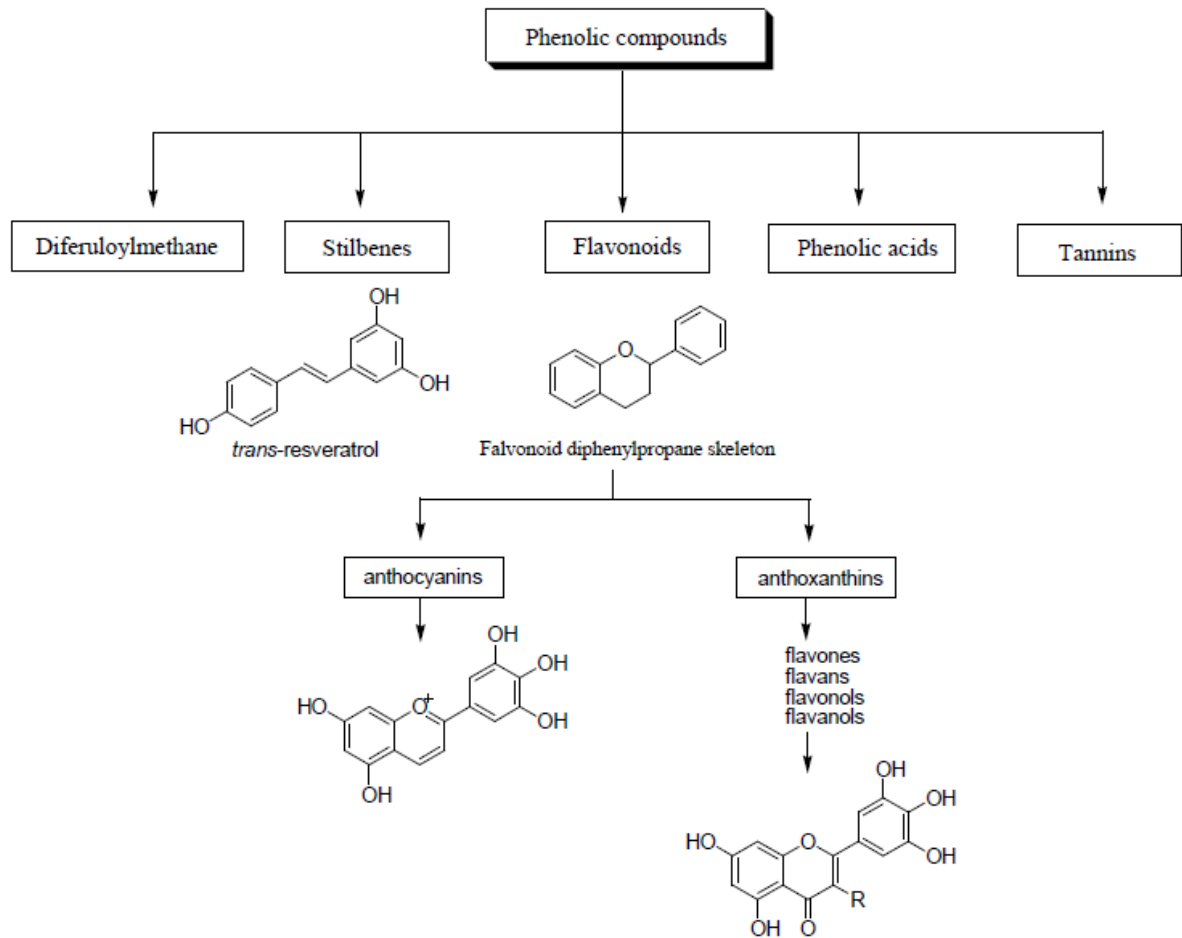


Figure 4 : classification des polyphénols alimentaires (Xiuzhen et al., 2007)

2-1- Acides phénoliques

Sont des composées phénoliques non flavonoides divisés en deux groupes principaux les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et les dérivés de l'acide hydroxycinnamique avec une structure basale C1–C6 et une structure combinée C3–C6 (figure 5). Les fruits et les légumes contiennent plusieurs acides phénoliques libres, par contre dans les graines et les semences des céréales surtout se trouvent principalement dans leur forme liée, ces acides peuvent être libres uniquement par une action enzymatique ou par un hydrolyse alcaline (Adom et al., 2002 ; Kim et al., 2006 ; Chandrasekara et al., 2010).

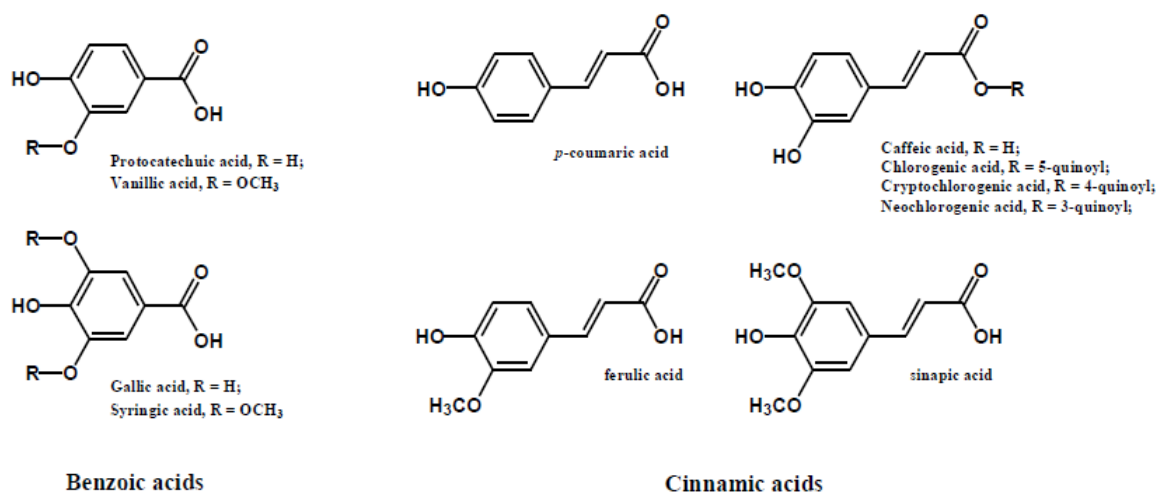


Figure 5 : acides phénoliques typiques dans les aliments (Tsao,2010).

2-2- Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le principal groupe de polyphénols, avec plus de 5000 composés différents identifiés dans le règne végétal. Ces molécules possèdent toutes un squelette chimique commun C₆-C₃-C₆ avec deux noyaux A et B de nature phénolique (Tsao, 2010) (figure 6). En fonction du nombre et de la structure chimique des carbones constitutifs ainsi que sur la base de la nature des substituants, les flavonoïdes sont classés en différentes catégories dont les plus importantes sont les flavanones, les flavonols, les flavones, les flavanols, les isoflavones et les anthocyanes (Tsao ,2010).

Et malgré que dans la plupart des flavonoïdes le noyau B est lié à la position C₂ du noyau C. dans certains d'autre le noyau B est lié à la position C₃ et C₄ du noyau C, une structure qui caractérise le groupe des isoflavones et les neo-flavonoïdes. Cependant les chalcones qui manquent du noyau C sont encore considérés comme des membres de la famille des flavonoïdes.

Ces structures basales des flavonoïdes sont aglycones, par contre dans les plantes la majorité de ces composées existent sous forme des glycosides dont leurs activités biologiques dépendent de leur structure et leur voie de glycosylation (Tsao ,2010).

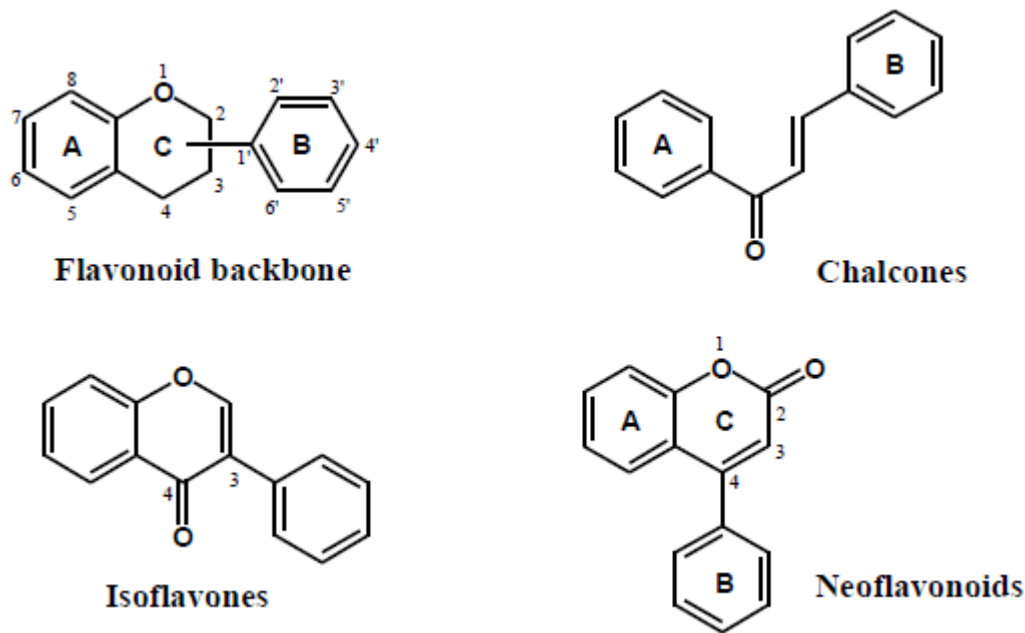


Figure 6: squelette de base des flavonoïdes (Tsao, 2010)

Les flavonoïdes sont généralement de puissants antioxydants, certains de ces composés présentent en effet une activité antioxydante jusqu'à 200 fois supérieure à celle de la vitamine E3. Ils ont ainsi la capacité de protéger les végétaux contre les effets néfastes des radicaux libres générés en réponse aux agressions de notre environnement (polluants, infections, rayonnement UV etc.) et qui favorisent le vieillissement cellulaire. D'autres sont également de bons inhibiteurs d'enzymes ou sont reconnus pour leurs propriétés antiseptiques ou anti-inflammatoires.

2-3- Isoflavones

Composés particuliers retrouvés chez les légumineuses, pour lesquels le cycle B est relié au carbone 3 du cycle C (Ex : le Genistéine et le daidzéine sont les principaux isoflavones qui se retrouvent dans le soja avec le glycétin, biochanin A et le formononétin (Wang et al., 1994; Mazur et al., 1998). Ces isoflavones se retrouvent la plupart du temps sous forme -O-glucosides et 6"-O-malonyl-7-O-glucosides. Certains dérivés d'isoflavones sont des bactériostatiques et sont spécifiquement induits lors d'infections par des organismes phytopathogènes. On retrouve en particulier de nombreuses phytoalexines des légumineuses (ex : phaseolline du haricot, glyceolline du soja). Les Neo-flavonoïdes ne se trouvent pas souvent dans des plantes alimentaires cependant le dalbergin considéré comme le neo-flavonoïde

le plus commun se trouve presque dans tout le règne végétal (Garazd et al., 2003) (figure 7). Alors que le noyau ouvert chalcone se trouve principales dans les fruits (pomme, houblon, la bière) (Tsao et al., 2003).

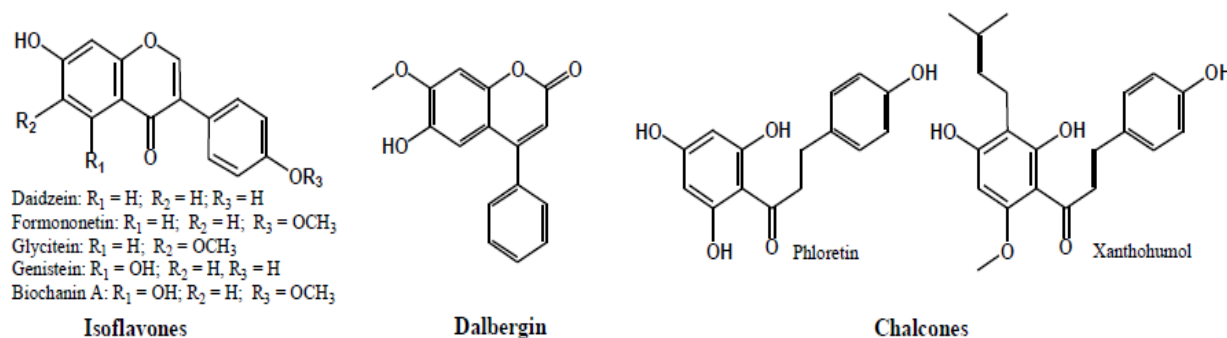


Figure 7 : Isoflavones, neoflavones et les chalcones typiques dans les aliments (Tsao, 2010)

2-4-Flavones, flavonoles, flavanones et flavanonols

Ces sous-groupes de flavonoïdes sont les plus communs dans tout le règne végétal. Les flavones et leurs dérivés 3-hydroxy flavonoles y compris leurs glycosides, méthoxides et d'autres produits acétylés ont tous trois noyaux, ce qui fait que c'est le plus large groupe parmi tous les polyphénols. Parmi les flavonoles aglycones les plus connus sont le quercetin et le kaempferol (figure 8) qui ont respectivement 279 et 347 combinaisons glycosidiques différentes (Tsao et al., 2009 ; Valant-Vetschera et al., 2006 ; Williams et al., 2006). Le nombre des flavanones et leurs dérivés 3 hydroxy flavanonoles connue aussi sous le nom de dihydroflavonoles qui ont été identifiés dans les 15 dernières années a augmenté de façon significative. Certaines flavanones ont une voie de substitution unique ex : flavanones prénylées, furanoflavanones, pyranoflavanones, flavanones benzylés ce qui donne un grand nombre de dérivés substitués de ce sous-groupe, un flavanonole bien connu est le taxifoline d'agrumes (Kawaii et al., 1999; Grayer, et al., 2006).

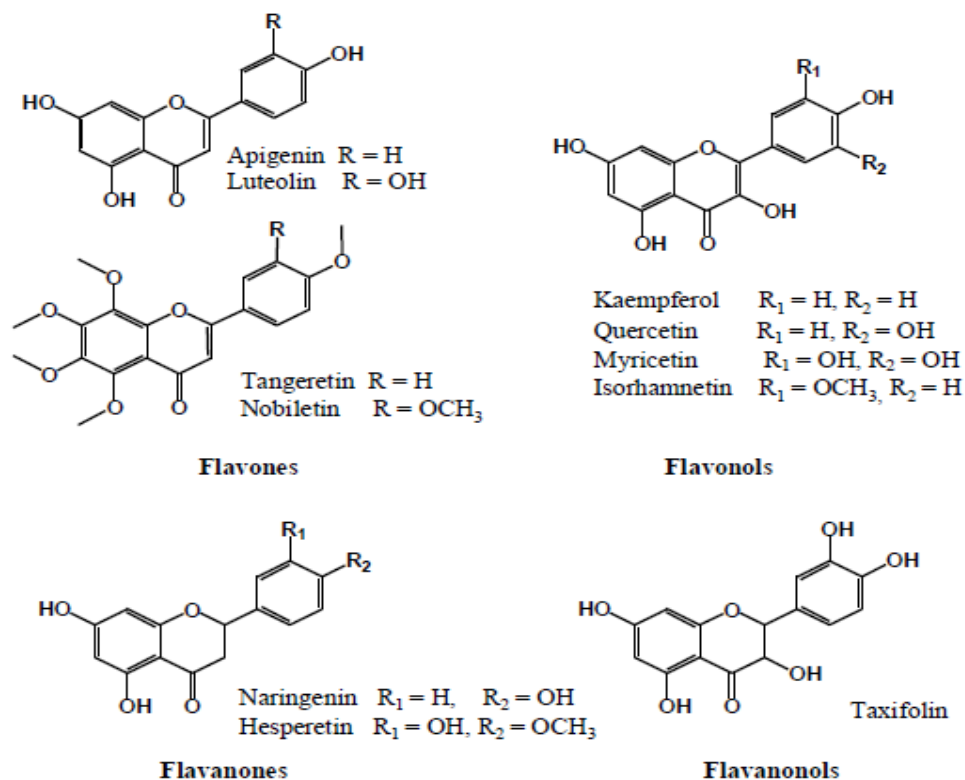


Figure 8 : flavones, flavonoles, flavanones et flavanonols (Tsao, 2010)

2-5- Flavanols et proanthocyanidines

Les flavanols ou flavan-3-ols nommés le plus souvent les catechines, se diffèrent de la plupart des flavonoïdes, car il n'existe pas une double liaison entre le C2 et C3, et aucun carbonyle C4 dans le cycle C des flavanols. L'hydroxylation en C3 permet au flavanols d'avoir deux centres chiraux sur la molécule (C2 et C3), ainsi quatre diastéréoisomères sont possibles. La catéchine est l'isomère avec la configuration trans et l'épicatéchine avec la configuration cis. Chacune de ces deux configurations a deux stéréo-isomères ex : (+) - catéchine, (-) - catéchine, (+) - épicatechine et (-) - épicatechine, (+) - Catéchine et (-) - épicatechine sont les deux isomères souvent retrouvés dans les plantes alimentaires (figure 9).

Les flavanols sont retrouvés dans de nombreux fruits et en particulier dans les peaux des raisins, les pommes et les bleuets (Tsao et al., 2003). le Flavanols monomères (catéchine et l'épicatéchine) et leurs dérivés (par exemple, gallocatéchines) sont les principaux flavonoïdes qui se trouvent dans les feuilles de thé, de fèves et de cacao (chocolat) (Si et al., 2006 ; Prior et al., 2001). Le Catéchine et l'épicatéchine peuvent

former des polymères, qui sont souvent appelés proanthocyanidines car une scission par catalyse acide des chaînes polymériques produit les anthocyanidines.

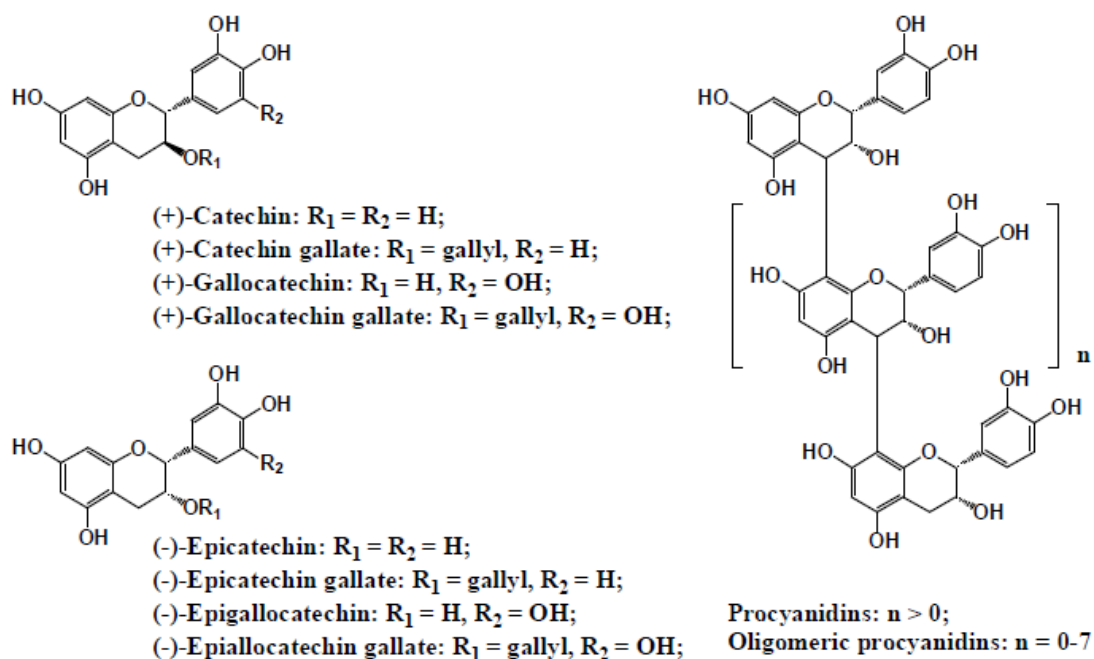


Figure 9 : flavanols et les procyanidines (Tsao, 2010)

2-6- Anthocyanidines

Contrairement aux autres flavonoïdes qui absorbent en général essentiellement dans le spectre ultra violet, les anthocyanidines sont les principaux composants des pigments colorés : rouges, bleues et violettes de la majorité des fleurs à pétales, fruits et légumes, et certaines variétés spéciales de céréales, par exemple, le riz noir (figure 10). Dans les plantes, les Anthocyanidines existent principalement sous des formes glycosidiques qui sont communément appelés anthocyanes. La cyanidine, la delphinidine et la pélagonidine sont les anthocyanidines les plus répandues (Anderson et al., 2006). En fait, 90 % des anthocyanines sont basées sur la cyanidine, la delphinidine et la pélagonidine et leurs dérivés méthylés (Anderson et al., 2006). Un total de plus de 500 anthocyanes sont connus en fonction des voies d'hydroxylation et Méthoxylation dans le noyau B ainsi que la glycosylation avec différentes unités de sucre (McCallum et al., 2007 ; Tsao et al., 2009).

La couleur des anthocyanines est dépendante du pH par exemple : le rouge dans le milieu acide et le bleu dans des conditions basiques. Cependant, d'autres facteurs tels

que le degré d'hydroxylation, la voie de méthylation des noyaux aromatiques, et la glycosylation peut également influencer sur la couleur de composés d'anthocyanine. Les anthocyanes sont chimiquement stables dans des solutions acides.

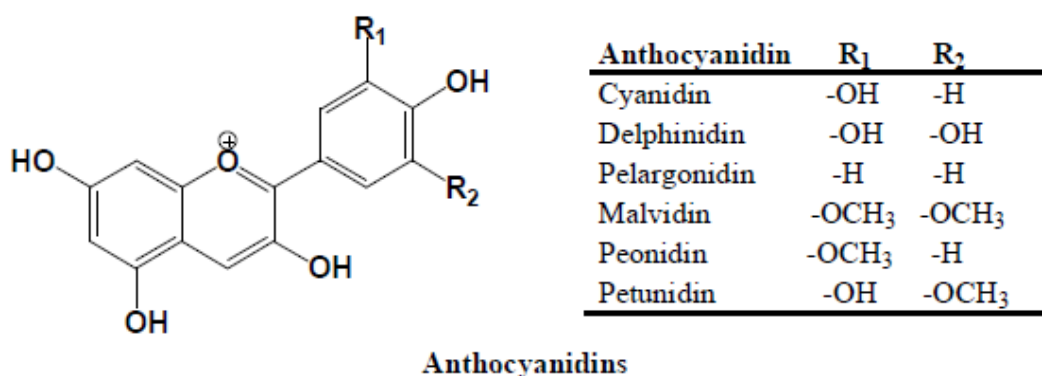


Figure 10 : anthocyanidines majeurs (Tsao,2010)

2-7-Tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques ayant la propriété de tanner la peau c'est-à-dire de la rendre dure et imputrescible en se fixant sur les protéines, la masse moléculaire des tanins peut aller jusqu'à 20 000 daltons (Haslam, 1989). Ces derniers forment une vaste famille de molécules caractérisées par la présence d'au moins un noyau aromatique associé à un ou plusieurs groupements hydroxyles phénoliques. De nos jours on distingue deux catégories des tanins les tanins condensés et les tanins hydrolysables.

2-7-1- Tanins hydrolysables

Il se compose de deux sous-groupes qui sont les tanins galliques et les tanins « ellagiques ». En fait, le terme « ellagique » concerne l'unité de base. Ce sont des esters d'un sucre ou d'un polyol apparenté et d'un nombre variable de molécules d'acides phénols. Les acides phénols en question sont l'acide gallique (à droite) et l'acide ellagique (à gauche) (figure 11).

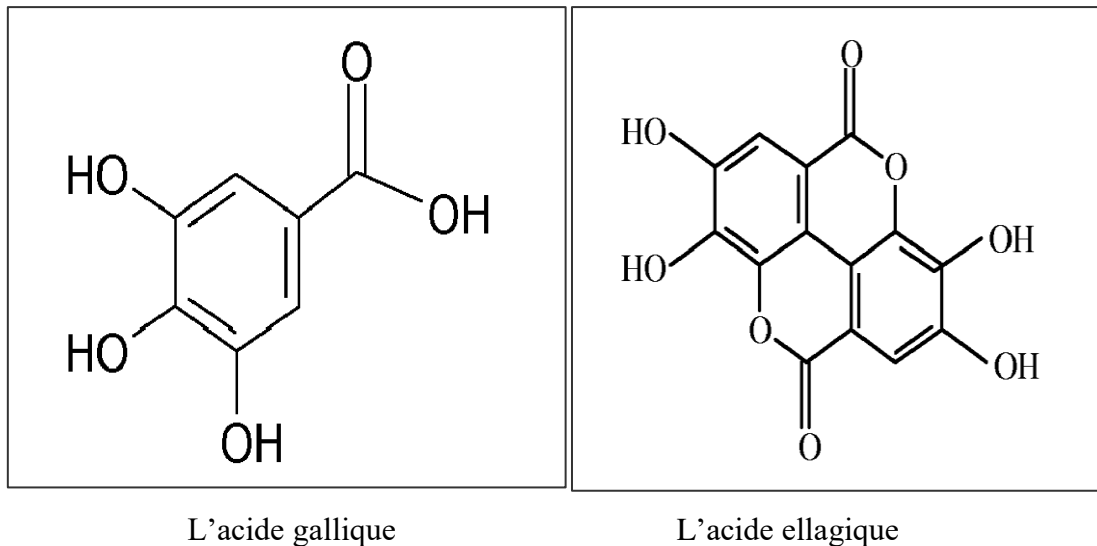


Figure 11 : structure de deux unités de base des tanins (Dharmananda,2003).

En fait, l'acide ellagique provient de la condensation de deux molécules d'acides galliques. D'ailleurs, le terme « ellagique » vient de « Ellag » qui est « Galle» à l'envers, il est important de préciser que seuls les triesters de l'acide gallique et du glucose et leurs enveloppes supérieures ont la propriété de précipiter les protéines. Cela veut dire que ne sont considérés comme des tanins seuls les composés qui renferment au minimum trois unités d'acide gallique. En dessous de trois molécules d'acide gallique il ne s'agit pas d'un tanin.

Ce composé est constitué d'une molécule de glucose sur laquelle vont se greffer cinq unités d'acide gallique. Ce sont donc des esters (condensation d'alcools avec des acides).

Ce sont des composés qui renferment au minimum trois molécules d'acide gallique et vont donc avoir la propriété de tanner la peau. Ce composé se forme à partir du β -O-galloyl-D-glucose sur lequel se greffe progressivement et successivement d'autres molécules d'acide gallique pour saturer la molécule de glucose en acide gallique et ainsi donner le composé final qui est le 1,2,3,4,6-penta O-galloyl- β -D-glucose (Dharmananda, 2003) .

2-7-2-Tannins condensés ou catéchiques ou proanthocyanidols

Ce sont des polymères flavaniques constitués d'unité flavan-3-ols, également appelée "catéchine ou épicatechine" (figure 12).

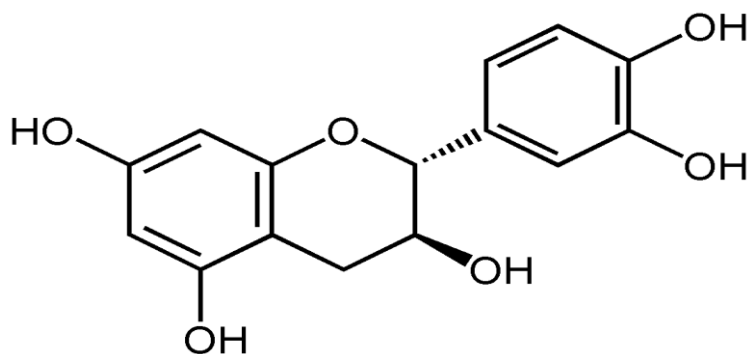


Figure 12 : structure de catéchine (Oyenihi et al.,2014)

Ces unités sont liées entre elles par des liaisons carbone-carbone ou des liaisons carbone-oxygène. C'est ce groupe de tannins qui justifie la classification de ces composés comme les flavonoïdes au sens large. Les tannins sont formés de deux ou de plusieurs unités flavan-3-ols et donc une seule unité de flavan-3-ol ne constitue pas la définition de tannin.

Les dimères les plus simples sont les procyanidols dimères (procyanidol B3) et c'est à partir de ce type de structure constituée au minimum de deux sous-unités flavan-3-ol qu'on a affaire à des tannins.

Cette molécule représente la condensation de deux sous-unités de catéchine.

Les tanins se répartissent dans différentes familles botaniques telles que les plantes ligneuses (comme le noisetier, le chêne, ou le châtaignier) ou les plantes fourragères notamment les légumineuses (comme le Sulla, le lotier pédonculé, le lotier corniculé, le sainfoin). On peut les trouver dans leurs fruits (comme les glands ou les marrons d'Inde) (Xiuzhen Han et al., 2007).

2-8- Stilbènes

Les stilbènes sont structurellement caractérisés par la présence d'un noyau 1,2-diphényléthylène substitué avec un hydroxyle sur les cycles aromatiques, il existe sous la forme de monomères ou oligomères. Le meilleur composé connu c'est le

trans-resveratrol (figure13) possédant une Skelton de trihydroxystilbène (Xiuzhen Han et al., 2007).

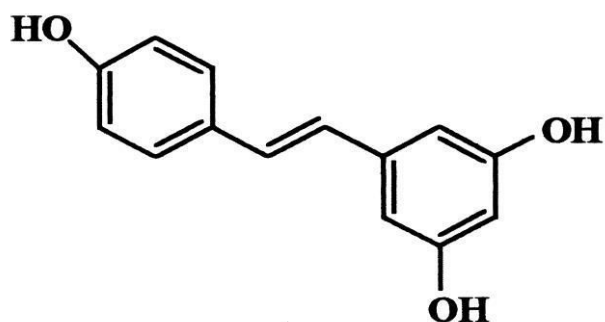


Figure 13 : structure de Trans-resveratrol (Tazzini, 2015)

3- Rôle et implications biologiques des polyphénols

Les polyphénols sont naturellement présents dans notre alimentation sous différentes formes telles que les vitamines A, C ou E, les carotènes et certains minéraux comme le sélénium et le zinc. On les retrouve en plus grandes quantités dans les fruits, les légumes et les céréales, Ainsi que dans des boissons telles que le thé, le café et le vin (Xiuzhen et al., 2007).

Le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes. antitumorale, anti-radicalaire, anti-inflammatoire, analgésique, antiallergique, antispasmodique, antibactérienne, hépatoprotectrice, estrogénique et/ ou anti-estrogénique (Xiuzhen et al., 2007).

Ils sont également connus pour moduler l'activité de plusieurs enzymes ou de récepteurs cellulaires. Les flavonoïdes un groupe des polyphénols favorisent la relaxation vasculaire et empêchent l'agglutinement des plaquettes sanguines. Par conséquent, ils réduisent la coagulation du sang et le rendent plus fluide. Ils limitent l'oxydation des lipides sanguins et contribuent à la lutte contre les plaques d'athérome (Xiuzhen et al., 2007).

Ils sont aussi anxiolytiques et protèges nos artères contre l'athérosclérose et réduit la thrombose (caillots dans les artères). Les exemples de quelques composés phénoliques et de leurs activités biologiques sont récapitulés (figure 14).

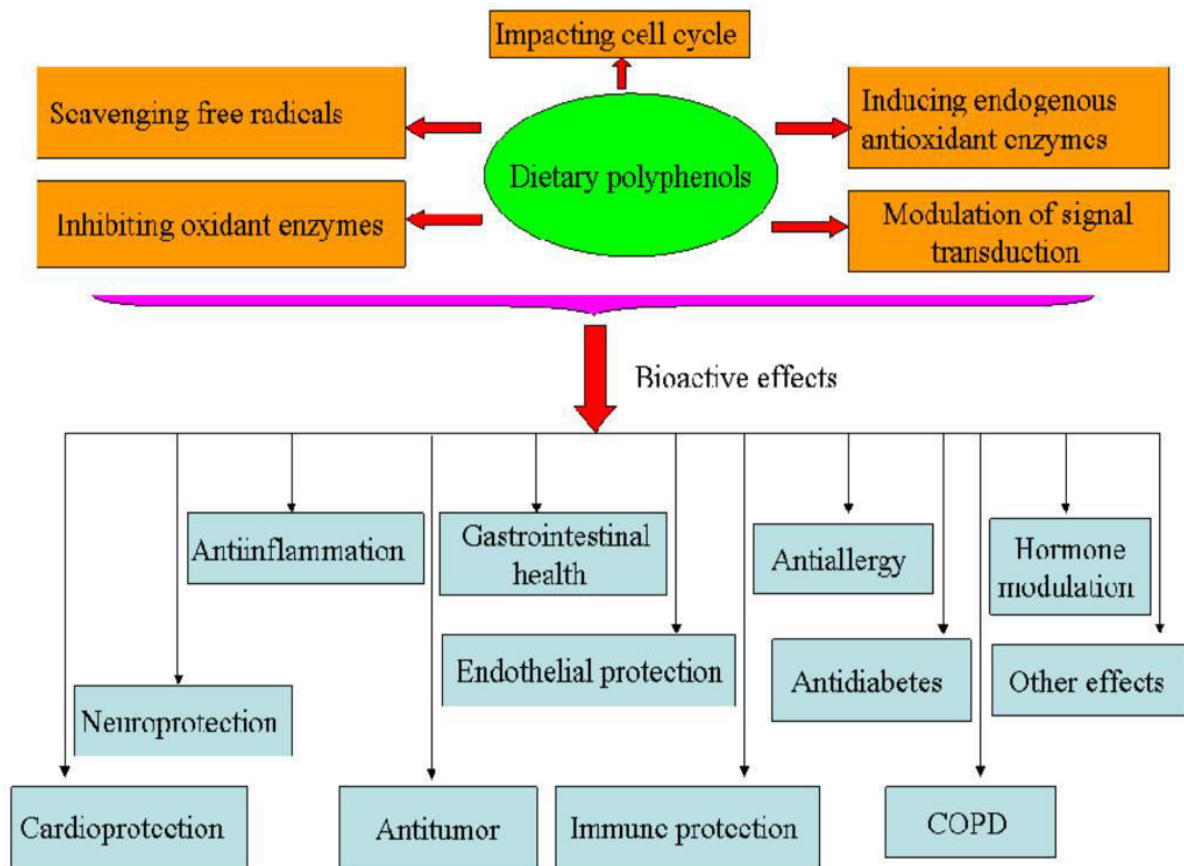


Figure 14 : bio-activités des polyphénols alimentaires (Xiuzhen et al., 2007)

3-1-Activité antioxydante

Les polyphénols sont des métabolites secondaires que les plantes produisent pour se protéger contre d'autres organismes, l'alimentation riche en polyphénols joue un rôle important dans la santé humaine. Une forte consommation de fruits, légumes et grains entières, (riches en polyphénols), abaisse le risque d'avoir de nombreuses maladies chroniques, dont le cancer, les maladies cardiovasculaires, l'inflammation chronique et de nombreuses maladies dégénératives (Milner et al., 1994 ; Duthie et al., 1994).

Des études ont montré que beaucoup de ces maladies sont liées au stress oxydatif causé par les espèces réactives de l'oxygène et d'azote (Xiuzhen et al., 2007).

Afin de faire face à un excès des radicaux libres produits par le stress oxydatif, les humains ont développé des mécanismes endogènes et exogènes afin de maintenir

l'homéostasie redox. Parmi ceux-ci, les polyphénols alimentaires ont été largement étudiés pour leurs fortes capacités antioxydantes et d'autres propriétés par lesquelles les activités cellulaires sont réglementées (Xiuzhen et al., 2007).

-L'acide Dihydrocaffeic était capable de piéger les radicaux libres (l'anion superoxyde, les radicaux hydroxyles et peroxydes) dans les cellules endothéliales humaines EAhy926 (Huang et al., 2004) .

-La curcumine et la quercétine augmentent *in vitro* et *in vivo* l'activité de plusieurs enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase (GPx) , la superoxyde dismutase (SOD) , la catalase (CAT) ou la glutathion réductase (GR) (Molina et al., 2003 ; Alía et al., 2004 ; Shen et al., 2007), aussi ils activent *in vitro* les systèmes de défense endogènes (Nishinaka et al., 2007) .

L'hydroxytyrosol pourrait accroître les activités de la CAT et de SOD chez les rats nourris sous un régime riche en cholestérol (Fki et al., 2007).

-La curcumine pourrait augmenter l'expression de la glutathion-S- transférase P1 (GSTP1) par l'activation de ARE et le Nrf2 dans les cellules HepG2 (Nishinaka et al., 2007) .

Plusieurs études ont montrés que les polyphénols en particulier , sont le contributeur prédominant de la totalité des activités antioxydantes dans les fruits , plutôt que de la vitamine C et que les polyphénols sont des antioxydants très puissants car ils peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un atome d'électrons ou d'hydrogène (Xiuzhen et al., 2007).

Le système hautement conjugué et certaines voies d'hydroxylation comme le groupe 3-hydroxy des flavonols sont importants dans l'activité antioxydante. Les polyphénols suppriment la génération des radicaux libres, ce qui réduit la vitesse d'oxydation en inhibant la formation ou la désactivation de l'espèce active et les précurseurs des radicaux libres. Ils agissent le plus fréquent comme des piègeurs des radicaux issus de la chaîne de peroxydation lipidique (les disjoncteurs de la chaîne) (Xiuzhen et al., 2007).

La chaîne cède un électron au radical libre ce qui neutralise les radicaux, ces derniers deviennent stables (moins réactifs), et ainsi les réactions de la chaîne arrêtent (Kerry et al., 1999; Valerio et al., 2001 ; Alía et al., 2006).

En plus de piégeage des radicaux, les polyphénols sont également connus comme des chélateurs de métaux. La chélation des métaux de transition tels que le Fe^{2+} peut réduire directement la vitesse de la réaction de Fenton ce qui empêche ainsi

l'oxydation provoquée par les radicaux hydroxyles hautement réactifs (Motohashi et al., 2004 ; Alía et al., 2006).

Les polyphénols n'agissent pas seul, il a été découvert que les polyphénols peuvent réellement fonctionner en tant que co-antioxydant, et qu'ils sont impliqués dans la régénération des vitamines essentielles (Scharf et al., 2003).

In vitro, plusieurs systèmes antioxydants ont été développés pour évaluer les activités antioxydantes totales, bien que ces procédés sont limités en termes de similitude avec les mécanismes d'action antioxydantes dans un système biologique, mais ils peuvent représenter mieux comment les polyphénols fonctionnent en tant qu'antioxydant ainsi que le rôle réel de polyphénols dans la santé humaine (Xiuzhen et al., 2007).

Du point de vue chimique, une fois les molécules de polyphénols cède un atome d'électron ou d'hydrogène elles deviennent elles-mêmes des radicaux libres, donc en cas de concentration très élevée, ils peuvent potentiellement causer des activités pro-oxydantes. Cependant, si oui ou non cette activité pro-oxydante se produit *in vivo* et cause des dommages à la santé humaine (Halliwell et al., 2008).

3-2-Outre que l'activité antioxydante

En plus du mode des actions antioxydantes cité au-dessus, d'autres mécanismes tel que l'inhibition de la xanthine oxydase et l'élévation des antioxydants endogènes sont également considérés comme importants (Disilvestro et al., 2001).

Les polyphénols peuvent induire des enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase, la catalase et le superoxyde dismutase qui décomposent les hydroperoxydes : le peroxyde d'hydrogène et les anions superoxydes, respectivement, et inhibent l'expression de certaines enzymes telles que : la xanthine oxydase.

Cependant les activités antioxydantes directes et indirectes des polyphénols peuvent jouer un rôle important dans la réduction du stress oxydatif via les mécanismes mentionnés ci-dessus, le rôle réel de ces composées au niveau cellulaire peut avérer plus compliqué.

Il y a une vue émergente que les phytochimiques, en particulier les polyphénols et leurs métabolites *in vivo* exercent des actions modulatrices dans les cellules par des actions sur les voies de signalisation de la protéine kinase et le lipide kinase (Williams et al., 2004).

Bien que les polyphénols tels que les flavonoïdes peuvent être absorbés par le tractus gastro-intestinal, les concentrations plasmatiques sont faibles, généralement moins de

1 $\mu\text{mol/l}$, en partie à cause de la rapidité du métabolisme dans les tissus humains (Rechner et al., 2002 ; Manach et al., 2004 ; Halliwell et al., 2008). Mais pour la plupart des polyphénols c'est une concentration très faible pour exhiber une activité antioxydante significative, ainsi certains chercheurs ont suggéré qu'il est peu probable que les polyphénols agissent comme antioxydants *in vivo*. Ainsi, l'attention devrait être portée à d'autres fonctions que les activités antioxydantes habituelles (Halliwell et al., 2008; Williams, et al., 2004).

À la suite de ces vues la nutriginomique a émergé comme un nouveau domaine de recherche multidisciplinaire, non seulement pour les polyphénols, mais pour tous les composés phytochimiques. Les effets sur les biomarqueurs impliqués dans les voies citées ci-dessus ainsi que dans d'autres voies peuvent conduire à des changements dans les fonctions cellulaires, ainsi des avantages potentiels pour la santé.

Williams et al. (2004) suggèrent également que la bonne compréhension des mécanismes d'action des flavonoïdes en tant qu'antioxydants ou en tant que modulateurs de signalisation cellulaire, et l'influence de leur métabolisme sur ces propriétés sont la clé pour l'évaluation de ces puissants biomolécules comme étant des agents anticancéreux, cardio-protecteurs et des inhibiteurs de neuro-dégénération (Williams, et al., 2004).

3-3-Activité anti-athérosclérose et cardioprotecteur

Des études ont montré que certains des polyphénols alimentaires exercent des activités anti-athérosclérose et cardioprotection. L'oleuropéine inhibe *in vitro* l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) (Petroni et al., 1995) et la quercétine diminue la peroxydation lipidique, régule l'expression des lipoprotéines de haute densité (HDL) (Gouedard et al., 2004).

Le proanthocyanidine pourrait réduire de manière significative l'apoptose des cardiomyocytes en inhibant l'ischémie-reperfusion induite par l'activation de NH_2 terminal kinase (JNK - 1 et c-Jun) chez les rats mâles (Sprague-Dawley) (Sato et al., 2001).

En outre, la proanthocyanidine peut régler les niveaux de ARNm CD36 et des protéines des oxLDL traités dans les cellules mononucléaires du sang périphérique (Dedoussis et al., 2004).

Le resvératrol a montré *in vitro*, qu'il pourrait diminuer l'expression de la molécule 1 de l'adhésion vasculaire cellulaire (VCAM-1), la cyclooxygénase-2 (COX-2) (Subbaramaiah et al., 1998), et l'ARNm de la métalloprotéinase matricielle (MMP-9) (Li et al., 2003) par la suppression de l'activation du facteur nucléaire AP-1 (Subbaramaiah et al., 1998).

L'hydroxytyrosol pourrait non seulement réduire le cholestérol total (CT) et le cholestérol de faible densité des lipoprotéines (LDL-C), mais aussi ralentir le processus de peroxydation lipidique chez les rats nourris avec des aliments riches en cholestérol (Fki et al., 2007).

3-4-Effets neuro-protecteurs et anti-âge

Il y a un intérêt considérable, pour les effets neuro-protecteurs des polyphénols alimentaires, en particulier en tant qu'antioxydants (Hartman et al., 2006). Le resvératrol a eu un impact sur les déficits cognitifs en activant la phosphorylation de la protéine kinase C (PKC), sécrétant la transthyréine pour empêcher l'agrégation Aβ (Beta amyloïde) dans les cellules cultivées d'hippocampe de rat (Bastianetto et al., 2007). Et de stimuler l'activité de l'adénosine monophosphate (AMP) kinase dans les cellules Neuro2A et les neurones primaires (Dasgupta et al., 2007).

L'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) a stimulé l'activité déacétylase de la protéine SIRT1 (recombinant silent information regulator two ortholog 1) dans les cellules humaines HT29 de (De Boer et al., 2006).

La curcumine pourrait perturber les plaques existantes et restaurer les neurites déformées dans des souris modèle de la maladie d'Alzheimer. Ils avaient été considérés comme des agents thérapeutiques pour modifier le processus de vieillissement, et comme des possibles agents neuro-protecteurs dans les maladies neuro-dégénératives progressives telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (Garcia-Alloza et al., 2007).

3-5-Propriétés anti-inflammatoires

L'inflammation induite par le stress oxydatif est médiée par l'activation du facteur NF-κB (Necrosis factor kappa B) et AP-1. Il affecte une grande variété de processus de signalisation cellulaire conduisant à la production de médiateurs inflammatoires et de remodelage de la chromatine (Camacho-Barquero et al., 2007; Rahman et al.,

2006). Celui-ci permet l'expression de gènes pro-inflammatoires telles que l'interleukine - 1 bêta (IL- 1 β), IL- 8, le facteur alpha de nécrose tumorale (TNF-a), et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS).

Les effets indésirables du stress oxydatif sont contrôlés par les effets antioxydants et anti -inflammatoires des polyphénols alimentaires tels que la curcumine et le resvératrol *in vivo* et *in vitro* (Kim et al., 2003 ; Shakibaei et al., 2007 ; Nonn et al., 2007 ; Camacho-Barquero et al., 2007) , le resvératrol inhibe l'expression génique pro-inflammatoire par l' inhibition de la protéine inhibitrice (IKB) , ce qui inhibe la transactivation du NF-kB, ainsi qu' il restaure les voies Trans-répressive par l'activation des histone désacétylases dans les cellules RAW 264.7 (Tsai et al., 1999).

3-6-Propriétés anti-mutagénétiques et anti-carcinogénétiques

Les polyphénols alimentaires pourraient moduler divers processus biochimiques impliqués dans la cancérogenèse. La curcumine exerce des activités anti-tumorales par l'inhibition de la prolifération cellulaire et l'angiogenèse, le blocage de la progression du cycle cellulaire de la tumeur et l'induction de la mort cellulaire programmée *in vivo* et *in vitro* (Kunnumakkara et al., 2007 ; Collett et al., 2004).

Les cascades de signalisation cellulaire médiés par le Facteur nucléaire kappa B (NF-Kb) ou la protéine activatrice 1 (AP- 1) agissent comme un centre actif dans la régulation de nombreux processus biochimiques (Kundu et al., 2004 ; Collett et al., 2004).

Le resvératrol peut bloquer l'activation de la mitogen-activated protein kinases (MAPK) et AP- 1 dans la peau des souris (Kundu et al., 2004). La consommation de baies et de fruits rouges riches en polyphénols a contribué à la réduction du cancer grâce aux nombreux mécanismes exemple l'inhibition *in vitro* de l'activité mono-oxygénases du cytochrome humain P450 (Schwarz et al., 2003) , le blocage de la tyrosine kinase du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) (Lee et al., 2002) et la diminution de l'activité de la protéine kinase de CKII (Yoon et al., 2002).

3-7-Amélioration des fonctions de l'endothélium

Plusieurs études ont montré que les composés polyphénoliques du vin rouge (CPVR) ont pu inhiber la prolifération et la migration des cellules vasculaires. Les CPVR induisent la relaxation dépendante d'endothélium médiée par l'oxyde nitrique (NO) dans les artères isolées. L'activation de l'enzyme NO synthase endothéliale (eNOS) est due à deux mécanismes distincts :

- Une augmentation du $[Ca^{2+}]$.
- Une phosphorylation de l'eNOS par l'activation de la voie phosphoinositide 3 (PI3)-kinase / Akt (Martin et al., 2002).

En outre, Les composés polyphénoliques du vin rouge, en stimulant la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs), principalement les anions superoxydes, sont capables d'activer la voie PI3-kinase/Akt dans les cellules endothéliales, cette voie de signalisation intracellulaire est impliquée dans la stimulation de relaxations dépendantes de l'endothélium médiées par le facteur hyperpolarisant EDHF.

Les CPVR a augmenté également la libération de prostacycline endothéliale et a inhibé la synthèse et les effets de l'endothéline-1 dans des cellules endothéliales (Khan et al., 2002; Wollny et al., 2003; Dell'Agliet al., 2004).

Les CPVR pourraient empêcher l'activation des métalloprotéinases matricielles -2 (MMP- 2) et l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) dans les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) (Oak et al., 2003 ; Oak et al., 2004).

In vivo, tous ces mécanismes pourraient contribuer à expliquer les effets vasodilatateurs, vaso-protecteurs et anti-hypertenseurs des polyphénols. La cyanidine-3-glucoside (Cy3G) et EGCG pourraient améliorer l'activité de l'eNOS vasculaires et améliorer la fonction endothéliale vasculaire dans les cellules endothéliales vasculaires bovine (Xu et al., 2004). Les catéchines ont des effets anti- angiogéniques en réduisant la vascularisation de la membrane chorio-allantoïde de poulet (CAM) (Maiti et al., 2003).

4-Biodisponibilité des polyphénols alimentaires

Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans l'alimentation humaine. Ils montrent une diversité structurelle considérable, qui influence largement

leur biodisponibilité. Les propriétés biologiques des polyphénols dépendent de la quantité consommée et de leur biodisponibilité (Manach et al., 2004).

La biodisponibilité semble différent grandement entre les différents polyphénols, et les polyphénols les plus abondants dans notre alimentation ne sont pas nécessairement ceux menant aux plus fortes concentrations de métabolites actifs dans les tissus cibles (Manach et al., 2005).

Les isoflavones et les acides phénoliques tels que l'acide caféique et l'acide gallique sont les polyphénols les mieux absorbés suivie par les catéchines, les flavanones , et les glucosides de quercétine , mais avec une cinétique différente. Les polyphénols les moins absorbées sont ceux qui ont un grand poids moléculaire tels que le proanthocyanidines , les catéchines du thé et les anthocyanes (Gonthier et al.,2003).

L'acide ellagique a été détecté dans le plasma humain à une concentration maximale de (31,9 ng/ml) après 1 h de post ingestion (Seeram et al., 2004). L'absorption des flavanols tels que les catéchines a été augmentée lorsque les polyphénols du thé ont été administrés en tant que supplément de thé vert sous forme de capsule consommé en absence de nourriture , cela conduit à une petite mais significative augmentation de l'activité antioxydante du plasma comparée aux polyphénols de thé consommés sous forme de thé noir ou de thé vert (Chow et al., 2005 ; Henning et al., 2004) .

Aucune différence de concentrations n'a été observée dans le plasma EGCG (épigallocatechine-3-gallate) et le Trolox équivalent déterminé par le test TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) après l'administration d'une grande dose unique sous la forme soit d' EGCG purifiée ou l'extrait du thé vert (Polyphenon E) (Henning et al., 2005).

L'hydroxytyrosol, le principal composé phénolique de l'huile d'olive. Tuck et al (2001) ont montré que l'administration d'un dosage de l'hydroxytyrosol a base de huile par voie intraveineuse et par voie orale entraîne une élimination significative des composés phénoliques dans l'urine dans 24 heures par rapport au méthode de dosage orale sous forme de solution aqueuse. Les estimations de la biodisponibilité de l'hydroxytyrosol lorsqu'il est administré dans une solution d'huile d'olive et lorsqu'il est administré sous forme de solution aqueuse par voie orale est de 99% et 75 % respectivement (Tuck et al., 2001).

Une fois absorbés, les polyphénols sont conjugués à des groupes glucuronides , de sulfate et de méthyle dans l'intestin muqueuses et les tissus internes. Les polyphénols non conjugués sont pratiquement absentes dans le plasma. De telles réactions facilitent leur excrétion et limitent leur toxicité potentielle.

L'épigallocatechine gallate (EGCG) et l'épicatéchine gallate (ECG) étaient présents dans le plasma dans la plupart du temps sous une forme libre, tandis que l'épicatéchine et l'épigallocatechine étaient principalement présents sous forme de glucuronide et sulfate conjugués (Chow et al ., 2005).

Des données récentes suggèrent que le bêta- glucosidases et peut-être aussi la lactase phloridzine hydrolase (LPH) dans l'intestin grêle sont capables d'hydrolyser les flavonoïdes glucosides et ces composés sont donc prises comme l'aglycone libre et non pas comme les glycosides intacts (Rasmussen et al., 2003).

Il a été signalé qu'environ 98 % d'hydroxytyrosol est présent dans le plasma et l'urine sous formes conjuguées , principalement le glucuronoconjugates ce qui suggère un effet de premier passage intestinal et hépatique des formes primaires ingérées (Covas et al., 2007; Miro-Casas et al., 2003; Caruso et al., 2001) et la 3 -O- glucuronide de l'hydroxytyrosol présente une activité plus forte en tant que piègeur de radicaux que l'hydroxytyrosol lui-même (Tuck et al., 2002).

Les principaux métabolites identifiées *in vitro* et *in vivo* étaient l'hydroxytyrosol O-méthylée, les glucuronides d' hydroxytyrosol et un glutathionyle conjugué d'hydroxytyrosol (Tuck et al., 2002 ; Corona et al., 2006). Il a rapporté que l'hydroxytyrosol et ses métabolites sont capables de se lier le LDL humain après ingestion d'huile d'olive (De la Torre-Carbot et al., 2006).

Les polyphénols atteignant le côlon sont largement métabolisés par la microflore en grande partie les acides phénoliques de faible poids moléculaire. Il a été montré que les concentrations plasmatiques de tous les métabolites varient de 0 à 4 $\mu\text{mol/l}$ avec un apport de 50 mg d'aglycones équivalent et l'excrétion urinaire relative varie de 0,3 % à 43 % de la dose ingérée selon le polyphénol (Manach et al., 2005).

Les propriétés biologiques soit des dérivés conjugués ou des métabolites microbiens seront essentielles pour mieux évaluer les effets des polyphénols alimentaires sur la santé humaine. Par ailleurs, certains effets des polyphénols ne nécessitent pas l'absorption à travers la barrière intestinale.

Leur rôle en tant que chélateurs du fer dans la lumière intestinale est brièvement discuté. L'acide tannique et la catéchine, les deux interagissent avec l'intestin mais il semble que seulement la catéchine qui peut traverser l'intestin. En outre, ils fournissent des preuves pour la liaison de l'acide tannique et la catéchine par les protéines endogènes dans la lumière intestinale. Ce qui peut limiter leur absorption par l'intestin grêle (Carbonaro et al., 2001).

Chapitre III

**Etude des plantes
médicinales investiguées**

Chapitre III : Etude des plantes médicinales investiguées

1-Généralités sur la famille des Lamiaceae

La famille des Lamiaceae est une famille de plantes herbacées à buissonnantes (rarement arbustives). Elle contient plus de 250 genres et près de 7000 espèces (Cantino, 1999) qui se répartissent sur tout le globe, mais principalement du bassin méditerranéen à l'Asie centrale. Cette famille est connue depuis longtemps à cause des propriétés médicinales et aromatiques des plantes qu'elle renferme.

Les Lamiaceae fructifient en donnant des tétrakènes (4 graines regroupées au fond du calice). Les tiges (jeunes) ont une section carrée (sauf quelques rares cas). Sur les nœuds apparents, les feuilles sont opposées (parfois verticillées) souvent décussées, et quasiment toujours entières. Elles ne possèdent jamais de stipules et elles sont souvent odorantes et couvertes de poils sécréteurs (monocellulaires). La place des Lamiacées dans la classification systématique botanique APG (Angiosperm phylogeny group) est la suivante (Guignard, 2001; Bray, 2005) :

- Ordre: Lamiales (17800 espèces regroupées en vingt familles)
- Embranchement: Spermatophytæ
- Sous-embranchement: Angiospermae
- Classe: Dicotyledonae
- Sous classe: Asteropsidae
- Groupe: Euasterideae
- Super-ordre : Lamianeae
- Ordre: Lamiale
- Famille: Lamiaceae

La famille des Lamiaceae est une famille de plantes angiospermes dicotylédones à fleurs gamopétales irrégulières qui regroupe surtout des plantes herbacées et sous-arbustives réparties dans le monde entier. Les Lamiacées herbacées, annuelles ou vivaces, par exemple les thym, les lavandes et les romarins sont surtout abondants dans les régions méditerranéennes (Moreau, 1960).

La sous famille des Lamioïdes est un groupe monophylétique, établi par la constatation de similitudes dans les caractères de l'ADN de différents genres tels que : *Lamium*, *Stachys*, *Galeopsis* (Judd, 2002).

2-Présentation du genre *Thymus*

Le thym est une plante originaire du bassin méditerranéen, elle se présente sous la forme d'un sous-arbrisseau de type vivace et particulièrement touffu, à tiges quadrangulaires et ligneuses et à feuilles sessiles. Ces dernières sont assez petites, de forme lancéolée et de couleur gris-vert. Sa taille peut atteindre une trentaine de centimètres et sa fleur affiche une teinte rosâtre. Petite, de 4 à 6 millimètres, elle se regroupe en épis foliacés et elle est visible de juin à octobre. La plante préfère les terrains plutôt rocailleux, secs et très ensoleillés et peut pousser jusqu'à des altitudes supérieures à 1 500 mètres. La récolte est généralement effectuée à la fin de l'été (Salgueiro et al., 1997).

Le genre *Thymus* (arabe ' Zaatar '), appartenant à la famille des Lamiacées, comprend environ 400 espèces (Morales, 1997; Pedersen, 2000) qui poussent spontanément principalement dans le Nord de l'Afrique (Maroc, Tunisie, Algérie, et Libye), l'Égypte, l'Espagne ainsi qu'en Sibérie et en Europe Nordique.

Cependant, la plupart des espèces se concentrent dans le pourtour du bassin méditerranéen (Morales, 1997; Pedersen, 2000). Le nom *Thymus* dérive du mot grec « thymos » qui signifie parfumer à cause de l'odeur agréable que la plante dégage (Pariante, 2001).

Le thym est l'une des plantes les plus utilisées comme épices et extraits à fort pouvoir antibactérien et anti inflammatoire. En effet, le thym « Zaatar » est très utilisé en médecine traditionnelle sous plusieurs formes : les feuilles sont utilisées en infusion contre la toux, en décoction pour guérir les maux de tête, hypertension et gastrites, en usage externe comme cicatrisants et antiseptiques.

Les feuilles de thym sont riches en huile essentielle dont les propriétés sont mises à profit en phytothérapie. Très antiseptique, le thym est utilisé à ce titre pour soigner les infections pulmonaires. Son action antiseptique s'exerce également sur le système digestif, notamment en cas de diarrhée et il est aussi vermifuge (Askarne et al., 2013)

Les espèces algériennes à feuilles linéaires constituent en particulier un complexe qu'il est souvent illusoire de chercher, la flore algérienne comprend douze espèces de *Thymus*, neuf d'entre eux sont endémiques on cite : *Thymus fontanesii*, *Thymus commutatus* (Ball), *Thymus dreatensis*, *Thymus numidicus*, *Thymus guyonii*, *Thymus*

lanceolatus, *Thymus pallidus*, *Thymus glandulosus*, *Thymus hirtus*, *Thymus algeriensis*, *Thymus ciliatus*, et *Thymus capitatus* (Quezel et Santa, 1963).

L'huile essentielle de thym est caractérisée par un fort potentiel antimicrobien (Cosentino et al., 1999), et par un remarquable effet antioxydant (Dragland et al., 2003). Elle possède une activité antifongique (Ruberto et al., 2002) et acaricide vis-à-vis de *Varroa destructor* (parasite qui affecte les abeilles) (Aviana et al., 2002).

2-1- Description botanique de l'espèce *Thymus guyonii* de Noé

Selon Quezel et Santa (1963) le *Thymus guyonii* est une espèce endémique de l'Algérie avec des feuilles de 5-7 mm, ovoïdes, tout au plus 2 fois plus longues que larges. Calice glabre. Fleurs blanches petites (5-6 mm) en inflorescences courtes (1-2 cm). Tiges plus au moins prostrées rampantes rocailles (figure 15). Considérée comme une espèce rare qui pousse dans le Sahara algérien.

Le *Thymus guyonii* est connu selon Quezel et Santa (1969) sous les noms suivant :

Nom commun: Thym

En arabe : Zaateur, Zaatar.

Répartition: dans le Sahara Algérien (Djelfa et Ghardaïa)

2-2-Usages et propriétés

Thymus guyonii est une espèce connue localement pour ses activités antispasmodique et expectorantes (Lehbili et al., 2013).

2-3-Classification de l'espèce

D'après Quezel et Santa (1963), la systématique de *Thymus guyonii* est la suivante :

- Embranchement: Phanérogames ou Spermaphytes
- Sous-embranchement: Angiospermes
- Classe: Eudicots
- Sous-classe: Astéridées
- Ordre: Lamiales
- Famille: Lamiacées
- Genre: *Thymus*
- Espèce: *Thymus guyonii* de Noé

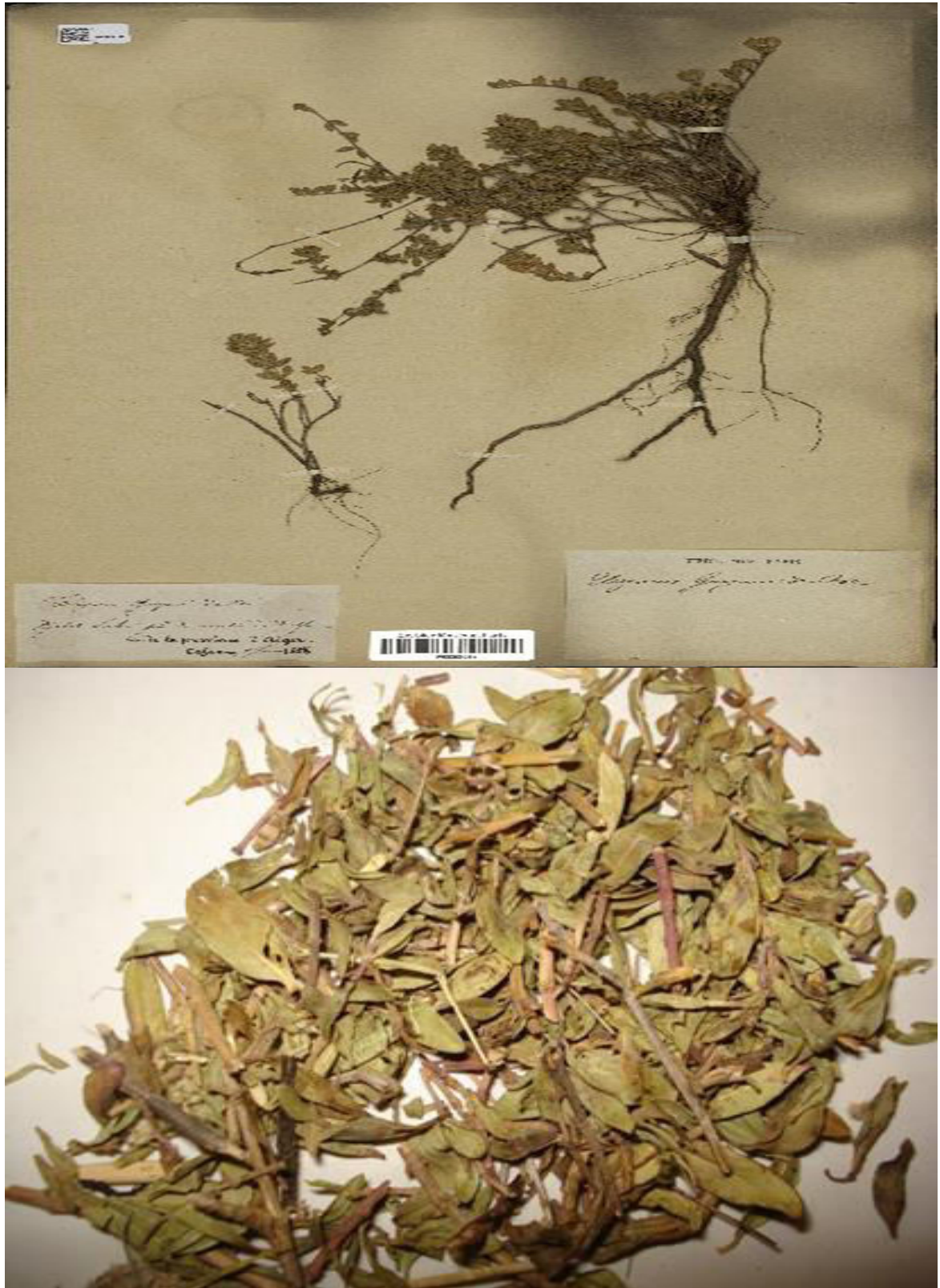


Figure 15 : photos de la plante et les feuilles de *Thymus guyonii* de Noé (Zeghib, 2013)

3-Le genre *Salvia*

Le genre *Salvia* appartient à la sous-famille Nepetoideae de la famille des Lamiacées. Le genre se compose d'environ 900 espèces. De nombreuses espèces de *Salvia* sont utilisées comme tisane, ainsi que dans le domaine cosmétique, parfumerie et les industries pharmaceutiques à travers le monde. Les espèces de *Salvia* sont généralement connus pour leurs multiples effets pharmacologiques y compris leurs propriétés antibactériennes, antivirales, antioxydantes, antipaludéens, anti-inflammatoires, antidiabétiques, cardio-vasculaires, antitumorales. De plus, certaines études ont montré qu'une partie de ces activités dépend de la composition d'huile essentielle (Alizadeh et Shaabani, 2012).

Chaque espèce contient une grande quantité de flavonoïdes et de matières tannantes (par exemple, l'acide caféique, l'acide chlorogénique, l'acide ellagique, l'acide gallique). Dans certaines espèces du genre *Salvia* l'acide rosmarinique et ses dérivés sont censés être responsables de différentes activités telle que l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, astringente, antibactérienne (Alizadeh et Shaabani, 2012).

3-1-Description botanique de l'espèce *Salvia verbenaca* L.

Plante vivace de 8-30 cm, velue au sommet, odorante plus ou moins glanduleuse dans le haut, commune. Elle croît dans les pelouses sèches, les talus et au bord des chemins. Les tiges un peu ramifiées portent les grappes de fleurs bleues foncées au printemps. Les feuilles, la plupart à la base, sont découpées en lobes irréguliers crénelés-dentés. Celles de la base sont obtuses au sommet, celle du haut de la tige sont aiguës. Les fleurs assez petites, d'un bleu pâle ou blanchâtre, en verticilles ordinairement rapprochés formant une grappe assez courte, calice fructifère à lèvres presque fermées, hérissé de poils étalés, corolle de 10-15 mm, 2 fois aussi longue que le calice, à lèvres écartées, très inégales, la supérieure comprimée et courbée en faux, le style peu ou point saillant (figure 16).

Cette espèce préfère souvent les terrains calcaires et argileux, elle se trouve en général, à des basses altitudes, elle peut s'élever jusqu'à 865m. Elle s'élève en Europe, au Sud-ouest de l'Asie, au Nord de l'Afrique et naturalisé dans l'Amérique du Nord (Bonnier, 1990).

Nom commun: sauge à feuilles de verveine, sauge fausse verveine.

En arabe : Zergtoun, Koussa, Meryiamia, khiyata (Quezel et Santa 1969)

Répartition: dans toute la région méditerranéenne

Ecologie: talus, bords de routes, lieux ensoleillés et plutôt sec.

3-2-Usages et propriétés

La recherche a montré que *Salvia verbenaca* est utilisée avec d'autres herbes médicinales pour traiter le rhume. Les feuilles et les sommités fleuries sont stomachiques et stimulantes (Bonnier, 1990). Bien que moins efficace que la sauge officinale, cette espèce sert à faire des infusions toniques et stimulantes (Beniston, 1984). Les feuilles fraîches hachées sont appliquées aussi en cataplasme, sur les plaies et les abcès vidés pour faciliter leur cicatrisation (Lahsissene et al., 2009).

3-3-Classification de l'espèce

D'après Quezel et Santa (1963), la systématique de *Salvia verbenaca* est la suivante :

- Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes
- Sous-embranchement : Angiospermes
- Classe: Eudicots
- Sous-classe: Astéridées
- Ordre: Lamiales
- Famille: Lamiacées
- Genre: *Salvia*
- Espèce: *Salvia verbenaca* L

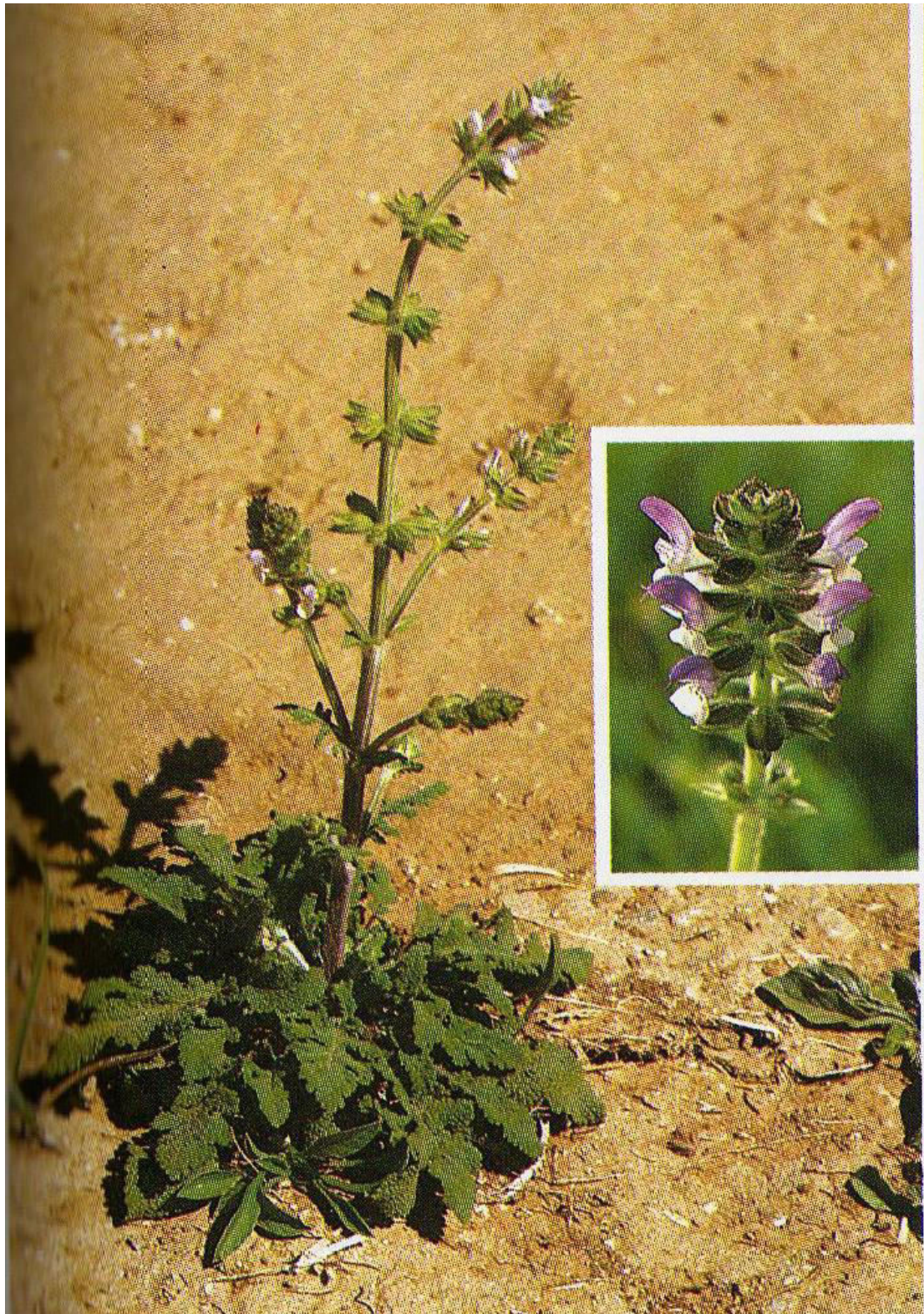


Figure 16: photo de l'espèce *Salvia verbenaca* L (Bayer et al., 1990)

4-Le genre *Stachys*

Le genre *Stachys* est distribué dans les régions méditerranéennes, environ trois cents espèces de *Stachys* sont signalées, se sont des plantes annuelles à racines grêles, dépourvues de rejets stériles, des plantes vivaces à souche épaisse émettant en général des rejets stériles.

Les espèces du genre *Stachys* sont des plantes dicotylédones à fleurs complètes monopétales irrégulières de la famille des Lamiacées, ce genre renferme des plantes dont la plupart sont indigènes de l'Europe, les fleurs sont soit axillaires, verticillées ou en épis avec une couleur jaunes ou jaunâtres plus au moins tachées de brun ou de rouge, les feuilles sont opposées et entières.

Le calice à cinq dents aiguës le tube de la corolle est court, le limbe a deux lèvres la supérieure concave et l'inférieure a trois lobes, les deux latéraux sont réfléchis avec quatre étamines, les deux extérieurs rejetées sur les côtes de la corolle après la fécondation (Quezel et Santa ,1963).

Plusieurs espèces du genre *Stachys* sont utilisées dans la médecine traditionnelle comme médicaments.

En outre, les études pharmacologiques ont confirmé que les extraits ou de composants de plantes appartenant au genre *Stachys* exercent des effets antibactérien, anti-inflammatoire, antitoxique et antianoxia (Rezazadeh et al ., 2009). Les espèces de ce genre sont utilisées dans les médecines populaires pour traiter les tumeurs génitales, les tumeurs inflammatoires, la toux et les ulcères. Les thés préparés à partir de ces plantes sont utilisées en phytothérapie en raison de leurs propriétés carminatives, sédatives, laxatifs, antispasmodiques, diurétiques et emménagogues (El Beyrouthy , 2009).

4-1-Description botanique de l'espèce *Stachys circinnata* l'Her

L'espèce a une taille varie entre 20 et 50 cm a feuilles épaisses plus au moins réticulées gaufrées, revêtues d'un épais tomentum de poils courts. Epis florifères disjoints dans le bas, très denses dans le haut. Corolle rosée ou blanche à anneau de poils oblique et incomplet - Rocailles AC: dans toute l'Algérie et surtout en montagne (figure 17).

Nom commun: stachide, épiaire

Répartition: dans toute la région méditerranéenne, l'Asie

Ecologie: espèce des pieds de rochers et de falaises, généralement sur sols nitrés.

4-2-Classification de l'espèce

Règne: Plantae

Sous embranchement: Tracheobionta

Division: Magnoliopsida

Sub-classe: Asteridae

Ordre: Lamiales

Famille: Lamiaceae

Sub-famille: Lamioideae

Genre: *Stachys*

Espèce: *Stachys circinnata* l'Her

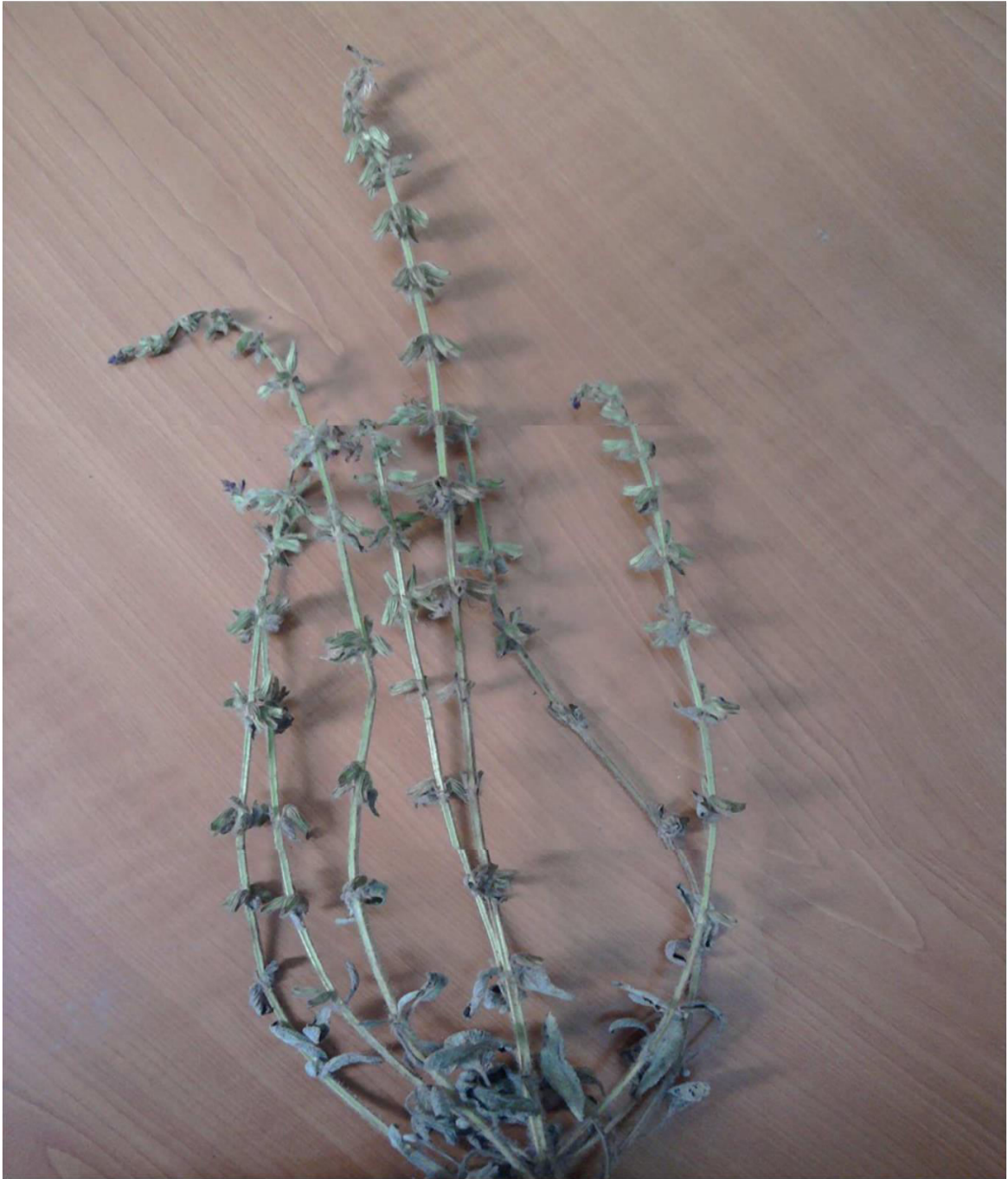


Figure 17 : photo de l'espèce *Stachys circinnata* l'Her (Laggoune, 2011)

Chapitre IV

Matériels et Méthodes

Chapitre IV : Matériels et Méthodes

1-Matériels

1-1-Choix des plantes

Le choix du matériel végétal a été porté sur trois espèces (une endémique et deux communes) appartenant à la famille des Lamiacées connue avec ses propriétés aromatiques et médicinales.

1-2-Situation géographique des lieux de récolte

Les trois espèces ont été récoltées de trois endroits différents (figure 18) mais dans la même période, les différents sites et les étages géographiques sont représentés dans le tableau 02.

Tableau 2 : lieux de récolte des espèces et caractéristiques géographiques et bioclimatiques des sites de récolte (Google earth).

Plantes	Sites	Période de Récolte	Partie étudiée	Altitude (m)	Etage bioclimatique
<i>Thymus guyonii</i>	Zelfana (Ghardaïa)	Avril	Feuilles	363 m	Aride
<i>Stachys circinnata</i>	Djbel el wahch (Constantine)	Avril	Feuilles	854 m	Semi-aride
<i>Salvia verbenaca</i>	Oued aabdi (Batna)	Avril	Feuilles	1298 m	Semi-aride

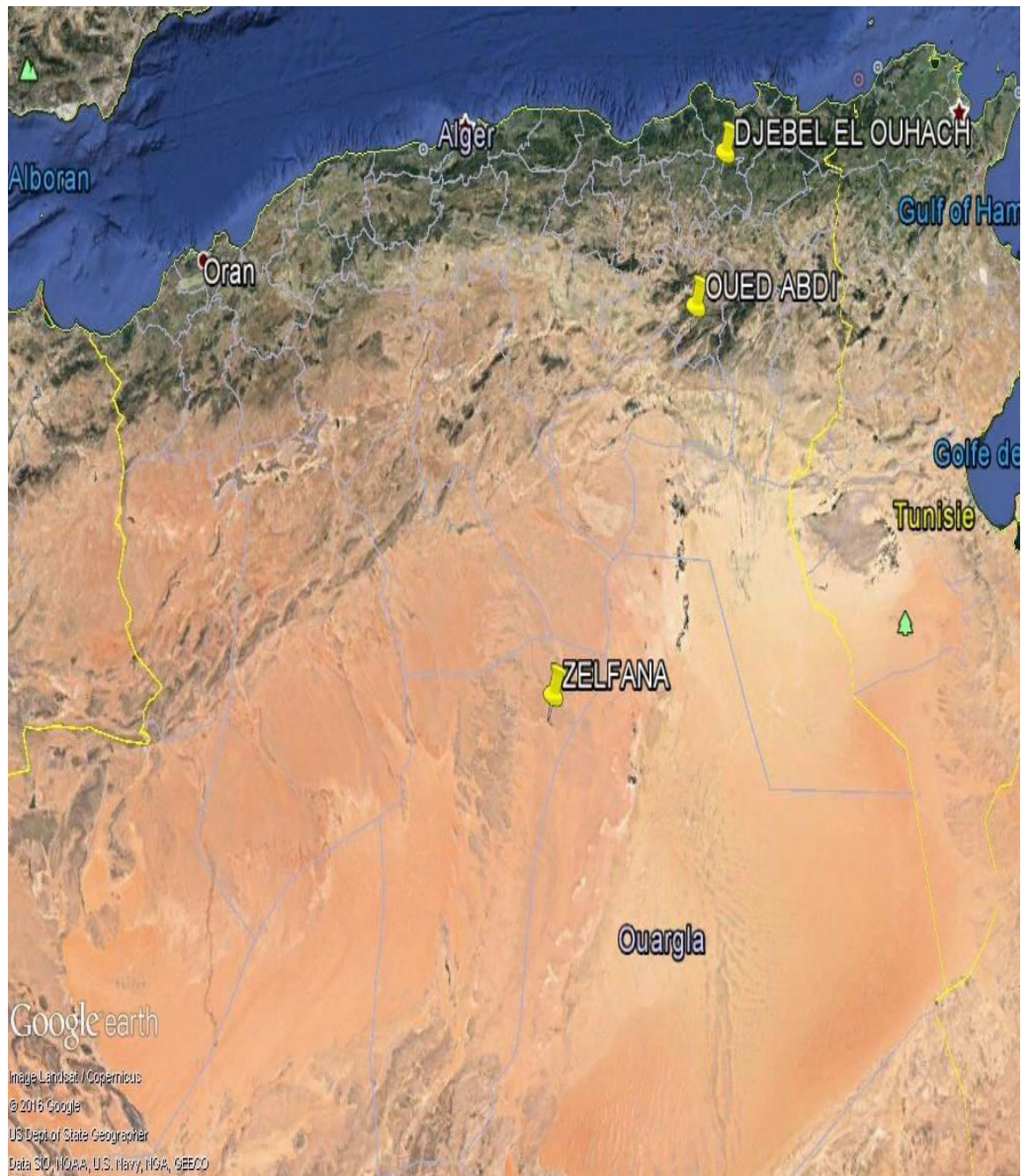


Figure 18 : lieux de récolte des espèces étudiées (Google earth).

1-3- Récolte du matériel végétal

Le matériel végétal est séché à l'ombre, à l'abri de l'humidité dans un endroit sec à température ambiante afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, le séchage est de 7 jours en moyenne pour les trois plantes, les parties aériennes ont été coupées en petits morceaux ensuite broyées grossièrement dans un moulin électrique, puis pesées.

1-4-Identification botanique

Les différentes espèces ont été identifiées par le professeur Gérard De Belair (Faculté des Sciences, Université Badj-Mokhtar-Annaba). L'extraction a été réalisée au Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST), Université des Frères Mentouri Constantine.

1-5-Extraction

L'extraction des trois plantes a été réalisée selon le protocole décrit par (Gonnet, 1973). 1000 g de la matière végétale de chaque espèce a subi une macération dans un mélange hydroalcoolique (EtOH/H₂O: 7/3, v/v) pendant 72 heures répété chaque 24. Les trois extraits hydroalcooliques récupérés sont réunis et concentrés à sec. L'extrait brut est traité avec une quantité d'eau bouillante, pour assurer la récupération des composés restés accolés à la paroi du ballon d'évaporation, la solution obtenue est laissée au repos pendant une nuit pour décantation.

Celle-ci permet le dépôt de la chlorophylle, des cires, du sable, des résines, après filtration, on obtient une solution aqueuse. A l'aide d'une ampoule à décanter de 1l, nous avons procédé à des extractions successives de type liquide-liquide, par affrontement à des solvants organiques de polarité croissante : L'éther de pétrole qui permet d'éliminer les matières grasses, les chlorophylles et les impuretés.

Le chloroforme qui permet l'extraction des aglycones méthoxylés et peu hydroxylés, l'acétate d'éthyle qui permet l'extraction des aglycones polyhydroxylés et monoglycosylés et partiellement les diglycosylés et dernièrement le *n*-butanol qui accède aux hétérosides polyglycosylés et aussi les hétérosides de type C-glycosyle.

La phase aqueuse et le solvant sont agités énergiquement puis laissés au repos pendant 30 minutes, la phase aqueuse (qui est au fond de l'ampoule) et la phase chargée de molécules spécifiques sont récupérées séparément.

Les 4 phases organiques récupérées sont évaporées sous pression réduite et pesées, puis reprises par 10 ml du méthanol, les extraits obtenus sont ensuite stockés à une température ambiante jusqu'à leur utilisation.

2-Méthodes

2-1-Mesure du pouvoir anti radicalaire par le test DPPH

- **Principe du test**

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH). Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène. C'est l'un des premiers radicaux utilisés pour étudier la relation structure / activité antioxydante des composés phénoliques. L'activité antioxydante a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH.

Pour étudier l'activité antiradicalaire des trois extraits, nous avons effectué le test au 2, 2'-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) selon la méthode décrite par Bruits et Bucar (2000). Les différentes dilutions (5, 3, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.025 et 0.01 mg/ml) sont préparées à partir d'une concentration mère de 10 mg d'extrait/1ml de méthanol. La solution de DPPH (100 µM) a été préparée dans le méthanol absolu à l'avance (au moins 1-2 heures) car la solubilisation est difficile, et elle ne se conserve pas plus de 4-5 jours à -5°C et à l'obscurité. Chaque extrait a été dissous dans une solution de 70% méthanol et 30% d'eau distillée. Un volume de 30µl de chaque solution d'extrait à tester est mélangé avec 3 ml de la solution de DPPH, le mélange réactionnel est agité vigoureusement pendant 10 secondes.

Le mélange est incubé à température ambiante (25°C) à l'abri de la lumière. Après 20 minutes d'incubation, l'absorbance est lue à 517 nm contre un « blanc » qui ne contient que du méthanol et DPPH.

Le DPPH, radical libre de couleur violette est réduit en un composé de couleur jaune en présence des composés anti-radicalaires, l'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre, est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire (figure 19). L'activité anti-radicalaire des différents extraits est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH (%) qui est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition du DPPH (\%)} = ((\text{Abs B} - \text{Abs E}) / \text{Abs B}) \times 100.$$

Dont :

Abs B : l'absorbance du Blanc.

Abs E: l'absorbance de l'extrait.

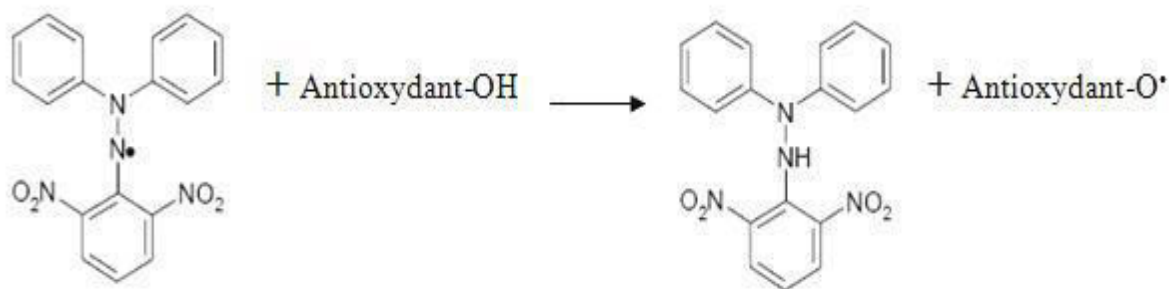


Figure 19: réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Congo, 2012)

- **Détermination de l'indice IC₅₀**
- Le IC₅₀ qui est la concentration d'extrait de plante responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH, est déterminé sur le graphique représentant le pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des extraits utilisés, les calculs ont été réalisés par le Logiciel Microsoft Excel.

2-2-Mesure de l'activité immunomodulatrice

- **Choix des animaux**

Les souris utilisées pour réaliser cette technique appartient au genre *Albinos*, espèce *Mus musculus* âgés de 2 à 3 mois ayant un poids entre 24 et 31g élevées au sein de l'animalerie du laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, Université des Frères Mentouri, Constantine.

Afin d'éviter les variabilités inter-sexe, nous n'avons utilisé que des souris mâles. Les souris sont maintenues dans l'animalerie du laboratoire où règne une température constante (18°C±2) et un éclairage pendant 12±2 h. Les animaux ont accès à volonté à la nourriture (granulés) et l'eau.

- **Mesure de l'activité phagocytaire**

L'indice phagocytaire a été déterminé par la méthode de (Biozzi et al., 1970). Pour réaliser cette étude, les souris ont été divisées en quatre groupes GI, GII, GIII et GIV, dont chacun comprend 6 souris, les souris du groupe I (témoin) ont reçu une injection intrapéritonéale 0,9% de NaCl (0,5 ml/souris).

Tandis que les souris des groupes II-III- et IV ont reçu différentes concentrations (50, 150 et 200 mg/kg) (tableau 3) de chaque extrait administré par voie intrapéritonéale. Après 48h de l'injection intra péritonéale, les souris de tous les groupes reçoivent une solution d'encre carbone à une dose de (0.1ml/10g) à travers la queue.

Le mélange est composé de 3ml d'encre carbone, 4ml de solution saline (NaCl) et 4 ml de gélatine (3%) (tableau 3).

Tableau 3: concentrations utilisées dans le test de l'activité immunomodulatrice

Traitement	Groupes	Les doses	Nombre de souris
Contrôle	GI	0,9% de NaCl	6
L'extrait de <i>Thymus guyonii</i>	GII	50	6
	GIII	150	6
	GIV	200	6
L'extrait de <i>Stachys circinnata</i>	GII	50	6
	GIII	150	6
	GIV	200	6
L'extrait de <i>Salvia verbenaca</i>	GII	50	6
	GIII	150	6
	GIV	200	6

Les échantillons de sang ont été prélevés de la veine retro-orbital à l'aide des capillaires en verre après 5 et 15 minute de l'administration de la solution d'encre carbone. Les 14 gouttes récupérées de chaque souris ont été mélangées avec 4 ml (0,1%) de carbonate de sodium afin de détruire les érythrocytes ensuite la lecture de l'absorbance se fait à l'aide d'un spectrophotomètre dans la longueur d'onde est 675nm. Ensuite les souris ont été sacrifiées afin de mesurer le poids des organes actifs (foie et rate).

L'activité phagocytaire est exprimée par l'indice phagocytaire K qui mesure la fonction de l'ensemble des cellules du système réticuloendothélial qui est en contact avec du sang circulant ainsi que par l'indice phagocytaire corrigé α qui exprime cette activité par unité du poids des organes actifs foie et rate (Biozzi et al., 1970).

Alors que la clearance carbone rate exprime la demi-période de l'encre carbone dans le sang, ces indices sont calculés en utilisant les formules cités ci-dessous :

$$K = \frac{\ln OD1 - \ln OD2}{t2 - t1}$$

$$t_{1/2} = 0,693/K$$

$$\alpha = \sqrt[3]{K} \times \frac{\text{poids corporel de l'animal}}{\text{poids du foie} + \text{poids de la rate}}$$

OD1 et OD2 représentent la densité optique aux temps t1 et t2 respectivement exprimés en minute.

- **Analyses statistiques**

Les résultats ont été analysés par one way-ANOVA, un test de comparaison multiple et Tukey un test de comparaison de moyennes (SPSS version 9), la valeur P* <0.05 est considérée statistiquement significative.

2-3-Culture cellulaire

La ligne cellulaire était conservée dans l'azote liquide et à chaque nécessité elle a été cultivée durant deux à trois semaines avant le début des tests. Les cellules de la lignée cellulaire monocyttaire humaine THP-1 sont cultivées en suspension dans un milieu RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) complété avec 10% (vol/vol) sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, et un mélange d'antibiotique a été ajouté au milieu de culture 50 µg/ml de streptomycine et 50 U/ml pénicilline incubées dans une température de 37°C.

La culture est réalisée dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO₂. Un renouvellement du milieu est réalisé tous les deux ou trois jours dans des flasques de 100 ml, ce renouvellement est effectué quand le nombre des cellules dépasse 500000 cellules /ml) via une centrifugation à 1000 g pendant 5 minutes à température ambiante. Le culot est suspendu dans un milieu frais et les cellules sont comptées sur cellules mal-assez, cette étape est nommée « passage ». Les cellules

sont utilisées jusqu'au passage 15 et sont maintenues à une densité cellulaire proche à 5×10^5 cellules/ml.

2-3-1-Test de viabilité cellulaire ou MTT

- **Principe du test**

Dans le but d'évaluer l'influence des différents extraits sur la viabilité cellulaire, nous avons appliqué le test colorimétrique MTT ou bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (Sigma), qui permet d'évaluer la croissance globale d'une lignée cellulaire donnée. Il est basé sur la réduction du MTT en formazan par la succinate déshydrogénase présente dans la membrane interne des mitochondries.

Le test colorimétrique MTT a été décrit par Carmichael et al. (1987). Il est basé sur la mesure du nombre de cellules vivantes, métaboliquement actives et capables de réduire le tétrazolium par le succinate déshydrogénase mitochondrial en cristaux de formazan violet (figure 20).

L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes et elle est quantifiée par spectrophotométrie en utilisant un lecteur de microplaques à 540 nm.

Les cellules sontensemencées dans des plaques a 96 puits à des concentrations variant de 10000 à 50000 cellules /ml pendant 24 h dans 100 μ l du milieu contenant 10 % de SVF avant d'être traitées. Le traitement est réalisé pendant la phase de croissance.

Ensuite, les cellules sont incubées avec l'homocystéine et les différents extraits à tester pour une durée de 24h.

La plaque de 96 puits a été divisée en plusieurs groupes : contrôle contenant uniquement des cellules, des cellules traitées avec l'homocystéine (100 μ M) et des cellules traitées avec les trois extraits, chaque extrait a été utilisé à des concentrations croissantes allant de 100, 500 jusqu'à 1000 μ g/ml. Chaque niveau de concentration a été répété 3 fois. A la fin de l'incubation, le milieu de culture est retiré par une centrifugation (200 g pendant 5min) et remplacé par un nouveau milieu de culture (100 μ l).

Pour chaque concentration étudiée, un volume de 10 μ l de la solution MTT (Sigma) (5 mg/ml, en tampon PBS) est ajouté aux puits. Après 4 h d'incubation à 37°C en

atmosphère humide, un autre volume de 100 µl de la solution de lyse qui est l'acide isopropanol (0,04M HCL dans l'isopropanol absolue) est ajouté aux puits et la plaque est incubée à 37°C pendant la nuit afin de lyser les cellules et libérer les cristaux de formazan formés. La densité optique est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques de type (Tecan Italia, Cologno Monzese, Italie) à une longueur d'onde de 540 nm. La couleur du milieu passe du jaune au bleu-violacé.

L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentées lors du test mais aussi à leur activité métabolique. Ce test est utilisé pour comparer la croissance des cellules témoins à celle des cellules traitées par les molécules.

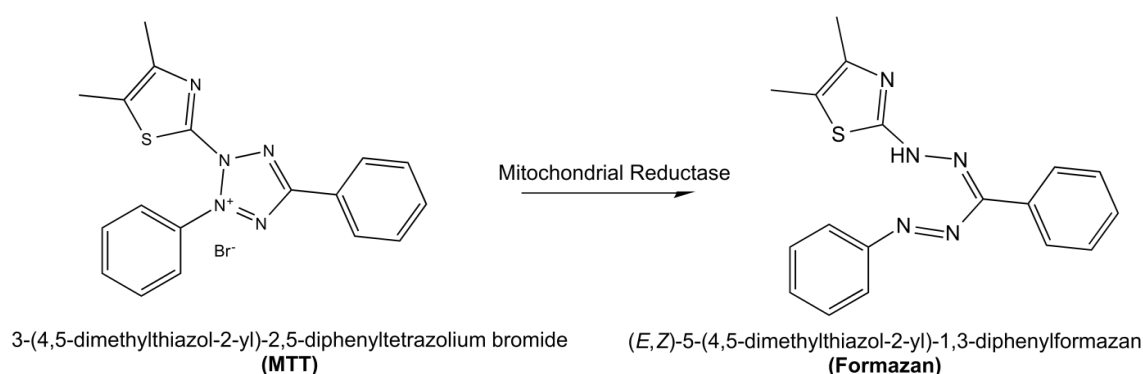


Figure 20: principe chimique du test MTT (Brescia et Banks., 2009)

2-3-2-Dosage de la production des espèces réactives de l'oxygène (EROs)

- **Principe du test**

La production des espèces réactives de l'oxygène (EROs) a été mesurée par la méthode de dichlorofluoresceine en microplaque. Le test est basé sur l'utilisation de la 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine-diacétate (H₂DCF-DA) une sonde non fluorescente. La H₂DCF-DA traverse la membrane plasmique avant d'être clivée en DCFH par les estérases intracellulaires. La DCFH peut alors être oxydée en DCF fluorescente par le peroxyde d'hydrogène intracellulaire ou d'autres EROs

(figure 21). Cette fluorescence émise est mesurée à 450 nm. Ce fluorochrome est fréquemment utilisé pour quantifier les EROs, bien que son oxydation ne permette pas de déterminer précisément les types des EROs présents dans la cellule (Afri et al., 2004). Cependant, la DCFH est capable de détecter aussi bien les EROs présents dans la membrane plasmique que ceux présents dans le cytoplasme (Yoshida et al., 2003).

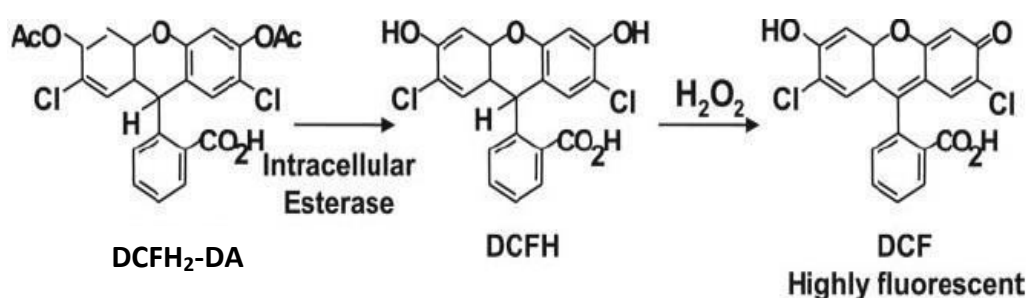


Figure 21: l'oxydation de la dichloro-dihydro-fluoresceine diacétate (DCFH₂-DA) en dichloro-fluorescéine (DCF) (Dikalov et al., 2007)

- **Mode opératoire**

Dans le but d'évaluer la production des EROs, les monocytes THP-1 ont été cultivées dans des plaques à 12 puits dont la concentration utilisée est 5×10^5 , incubées avec les différents extraits en présence et absence de l'homocystéine pendant 24 h à 37°C dans une atmosphère humidifiée avec 5% de CO₂. Ensuite les cellules sont rincées avec le PBS et incubées pendant 30 min avec (5 μM) de dichloro-dihydro-fluorescéine diacétate (H₂DCF-DA) à 37°C dans une atmosphère humidifiée avec 5% de CO₂.

Après 30 minutes les cellules sont rincées avec le PBS après une centrifugation à 200 g pendant 5 minutes, ensuite suspendus dans 200 ml de PBS supplémenté avec 0,1 M de K₂PO₄ et 0,5% Triton X -100. Les échantillons sont placés dans une plaque de 96 puits à fond transparent.

La fluorescence issue de l'oxydation de H₂DCF-DA a été mesurée par le lecteur de microplaque à fluorescence, le filtre d'excitation est centré à 485nm et le filtre d'émission est centré à 480 nm (Lee et al., 2002). Les intensités de fluorescence

reflétant la production des EROs ont été exprimées en pourcentage de l'intensité de fluorescence des cellules THP-1 cultivées.

2-3-3- Test des comètes (Single Cell Gel Electrophoresis)

- **Principe de la technique des comètes**

Le test des comètes *in vitro* en conditions alcalines (Single Cell Gel Electrophoresis), est une technique d'électrophorèse rapide et sensible pour analyser les lésions d'ADN dans les noyaux des cellules isolées en gel d'agarose en présence d'un agent génotoxique dans des conditions alcalines où le pH= 13, à ce pH une augmentation de la migration d'ADN est associée à une augmentation des cassures simple brin (SB), des cassures simple brin associés à une réparation incomplète de l'ADN et aux sites alcali-labiles (ALS).

Ces cassures peuvent être réparées, leur effet étant alors non persistant, elles peuvent être létales pour la cellule ou elles peuvent se fixer sous forme de mutation stable se traduisant par une altération viable permanente. Elles peuvent aussi entraîner des dommages chromosomiques de type de ceux qui sont associés à de nombreuses maladies humaines comme le cancer.

La plus part des agents génotoxiques induisent beaucoup plus de cassures SB et/ou des ALS que des cassures doubles brins, cette version du test des comètes à pH >13 offre une plus grande sensibilité pour identifier des agents génotoxiques.

Pour évaluer l'effet génotoxique (dégradation de l'ADN) de l'homocystéine sur les cellules THP- 1, nous avons utilisé le test des comètes décrit par (Fairbairn et al., 1995 ; Di Pietro et al ., 2008).

2-3-3-1-Traitement avec l'homocystéine et les extraits des trois plantes.

Une plaque de 24 puits a été divisée en 14 groupes : groupe contrôle (uniquement des cellules), cellules traitées avec l'homocystéine dont la concentration utilisée est 100µM, cellules traitées avec chaque extrait à part à des concentrations de 1 et 10 µg/ml avec et sans homocystéine, la plaque de 24 puits est incubée à une température de 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO₂. Signalons que chaque groupe est répété trois fois.

Remarque

Chaque extrait a été dissous dans le DMSO à une concentration de 50 mg/ml, la concentration de DMSO n'a jamais dépassée 1%.

2-3-3-2-Préparation des lames

- **Etape de lyse et d'électrophorèse**

Les différentes étapes de ce test sur cellules somatiques eucaryotes sont décrites ci-après et ont servi de base au test des comètes que nous avons appliqué sur les monocytes THP-1. Une préparation préalable de lames de microscope est nécessaire à la parfaite adhérence du gel. Celles-ci ont déjà été trempées brièvement dans 1% d'agarose à fusion normale (Normal Melting Point) préparé dans du PBS (tampon phosphate) et maintenu à 60°C dans un bain-marie. Les lames sont ensuite séchées à température ambiante pendant une durée minimale de 24 h, puis stockées à 4 ° jusqu'à utilisation.

Après 24 h d'incubation avec l'homocystéine et les différents extraits, les cellules THP-1 ont été rincées deux fois avec le PBS.

La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 200 g pendant 5 min. Le culot cellulaire est mis en suspension immédiatement avec 50 µl (0,5%) d'agarose à faible point de fusion (Low Melting Point) préparé dans une solution de PBS maintenu à 37°C dans un bain-marie dont la concentration cellulaire est 10^5 cellules, puis déposée sur les lames de verre et aussitôt chaque lame est recouverte d'une lamelle.

Après solidification, une deuxième couche de 50 µl d'agarose (LMP) est déposée sur chaque lame et aussitôt recouverte d'une lamelle et placée sur un plan glacé pour solidification durant 5 minutes. Après retrait de la lamelle, chaque lame est immergée dans une solution de lyse fraîchement préparée (100 mM EDTA, 2,5 M de NaCl, 10 mM de Tris, 1% de Triton X-100, pH 10, 4 °) pendant 2h.

Après l'étape de lyse, les lames sont immergées dans une cuve d'électrophorèse horizontale contenant du tampon d'électrophorèse (NaOH 10N, 200 mM EDTA, pH >13). La dénaturation de l'ADN est effectuée pendant 20 min à 25°.

L'électrophorèse est ensuite réalisée pendant 30 min (25 V, 300 mA). Après électrophorèse, les lames sont rincées 3 fois pendant 5 min avec du tampon Tris (0,4

M, pH= 7,5), déshydratées par trempage dans une solution de méthanol absolu pendant 5 min chacun pour éliminer le tampon alcalin.

Les lames ont été séchées pendant une nuit à température ambiante puis conservées à 40 ° C jusqu'à utilisation (Di Pietro et al ., 2008).

2-3-3-3-Coloration et acquisition des images

L'évaluation quantitative des comètes est réalisée à l'aide d'un système d'analyse d'image semi-automatique. La coloration de l'ADN a été effectuée à l'aide du bromure d'éthidium et les lames sont analysées à l'aide d'un microscope à épifluorescence DM IRB à 400 × grossissement (Leica Microsystem, Heidelberg, Mannheim, Germany), équipé d'une caméra numérique, (Canon Power Shot S50, Milan, Italy) (figure 22).

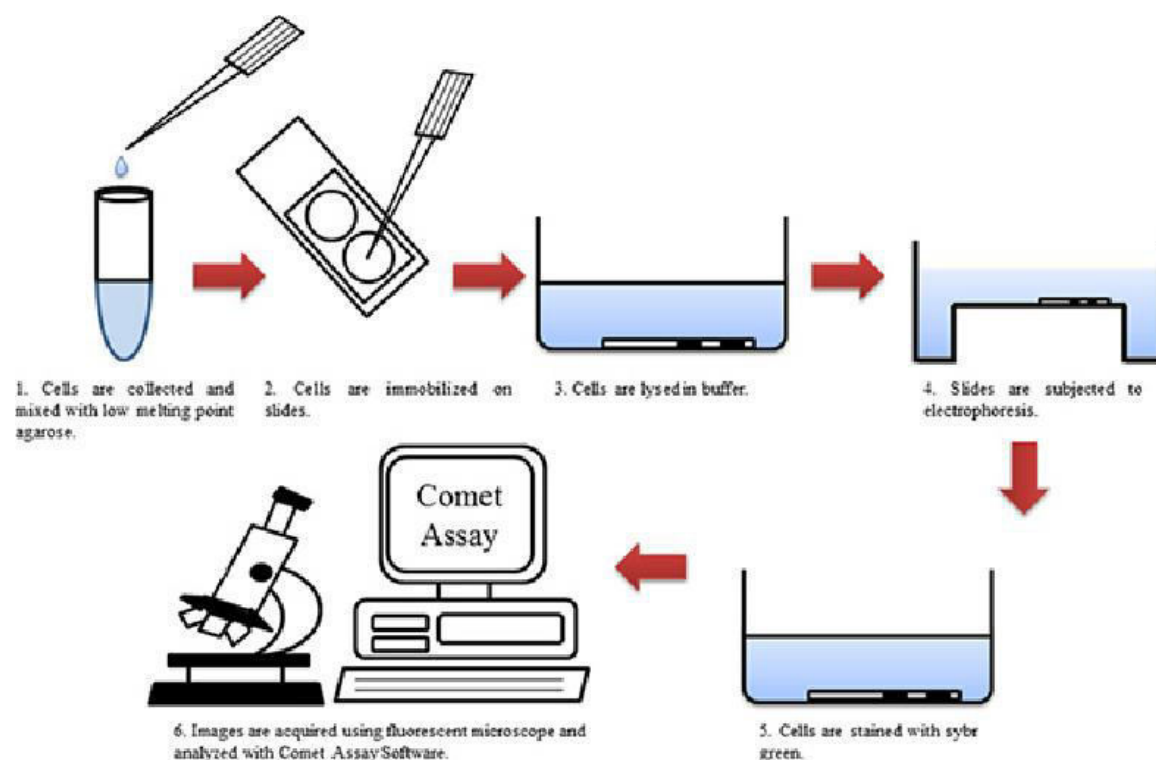


Figure 22 : protocole général de l'essai des comètes en conditions alcalines
(Nowsheen et al., 2012)

Echantillon de départ : suspension cellulaire

Etape 1 et 2 : inclusion des cellules au sein de différentes couches de gels d'agarose successivement déposés et laissés polymérisés sur une lame de microscopie.

Etape 3 : lyse des cellules (2 h à l'obscurité).

Etape 4 : électrophorèse (30 V, 300 mA, 30 min) à l'obscurité.

Etape 5 : neutralisation puis marquage de l'ADN par le bromure d'éthidium.

2-4- Test des comètes sur les lymphocytes

2-4-1-Isolement des lymphocytes

10 ml de sang a été prélevé d'un donneur sain (homme) par une ponction veineuse. Les lymphocytes sont séparés en utilisant le protocole de gradient de densité, sur Histopaque-1077.

En bref, le sang est dilué 1: 1 avec du PB, stratifié sur 600 µl d'Histopaque et centrifugé à 800 g pendant 20 minutes, La couche «buffy», une couche opalescente contenant des cellules mononucléaires, est aspirée dans 5 ml de PBS ensuite centrifugée à 250 g pendant 10 minutes pour granuler les lymphocytes.

Le culot est remis en suspension dans du RPMI-1640 milieu de culture, supplémenté de 10% du sérum de veau fœtale.

Les cellules sont incubées pendant 24h avec la concentration 1 µg/ml de l'extrait de *Thymus guyonii* en présence et absence de l'homocystéine (250µM). Afin d'évaluer l'effet de l'homocystéine et l'extrait (*Thymus guyonii*) sur les lymphocytes, les mêmes étapes du test des comètes appliquées sur les monocytes THP-1 ont été reproduites.

Chapitre V

Résultats et discussion

Chapitre V : Résultats et discussion

1-Résultats

1-1-Evaluation de l'activité antiradicalaire

1-1-1- L'extrait de *Thymus guyonii*

L'activité antiradicalaire des extraits de *Thymus guyonii*, *Stachys circinnata* et *Salvia verbenaca* a été déterminée par la méthode de réduction du radical DPPH.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait de *Thymus guyonii* révèle une forte activité antiradicalaire, 90% à la concentration 0,03 mg/ml qui est très proche a celle montrée par la quercétine (96%), l'activité augmente en augmentant la concentration 94% à 0,05 mg/ml (figure 23).

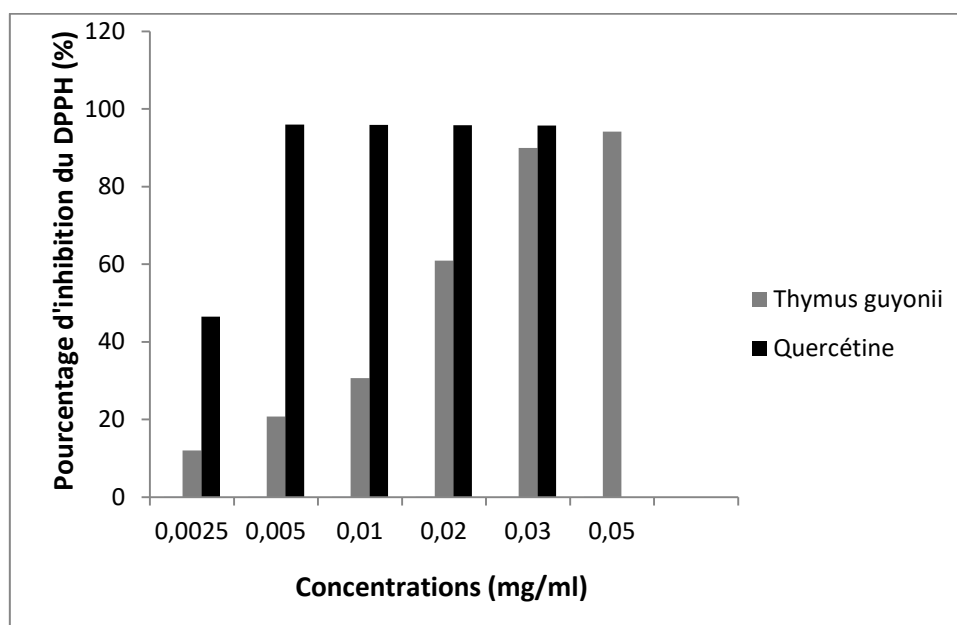


Figure 23 : pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait de *Thymus guyonii*.

La valeur IC_{50} de l'extrait *Thymus guyonii* a été déterminée à partir de l'équation de la régression linéaire de l'activité antiradicalaire (%) par rapport aux différentes concentrations de l'extrait (figure 24).

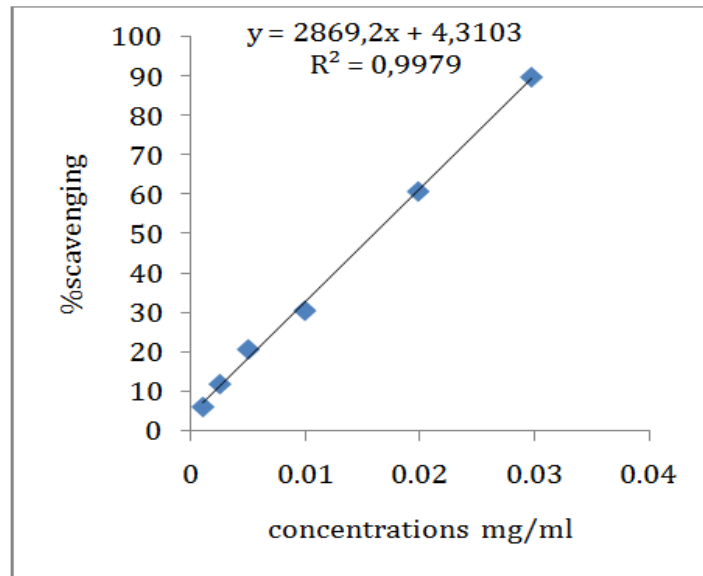


Figure 24: graphe de la valeur IC_{50} de l'extrait de *Thymus guyonii*

1-1-2- L'extrait de *Stachys circinnata*

À partir de la figure citée ci-dessous nous avons remarqué que l'extrait de *Stachys circinnata* a une faible activité antiradicalaire à des concentrations faibles, cependant cette activité augmente jusqu'à 90% (0,1 mg/ml) en augmentant les concentrations (figure 25).

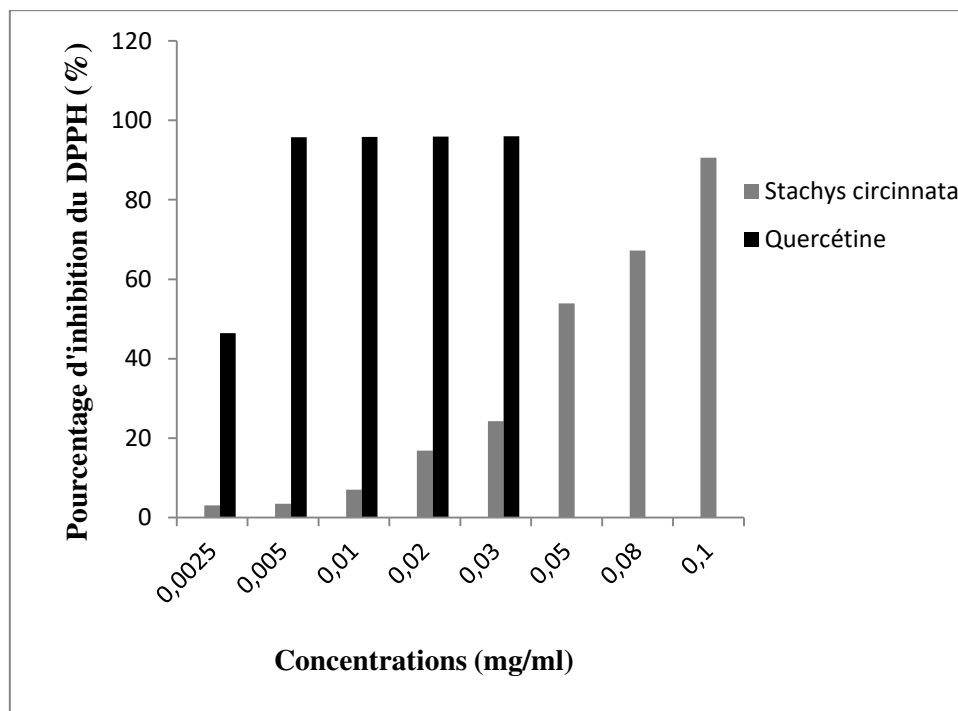


Figure 25 : pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait de *Stachys circinnata*

La valeur IC_{50} de l'extrait de *Stachys circinnata* a été déterminée à partir de l'équation de la régression linéaire de l'activité antiradicalaire (%) par rapport aux différentes concentrations d'extrait utilisées (figure 26).

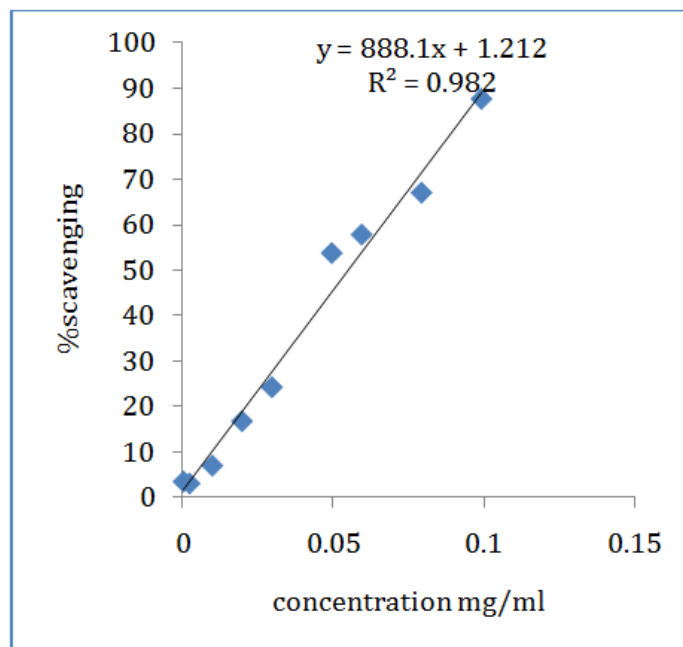


Figure 26 : graphe de la valeur IC_{50} de l'extrait de *Stachys circinnata*

La figure 27 montre que l'extrait de *Salvia verbenaca* possède une activité antiradicalaire modérée à des concentrations variant de [0,01-0,05] , cette activité augmente jusqu'à 95% à la concentration 0,1 mg/ml.

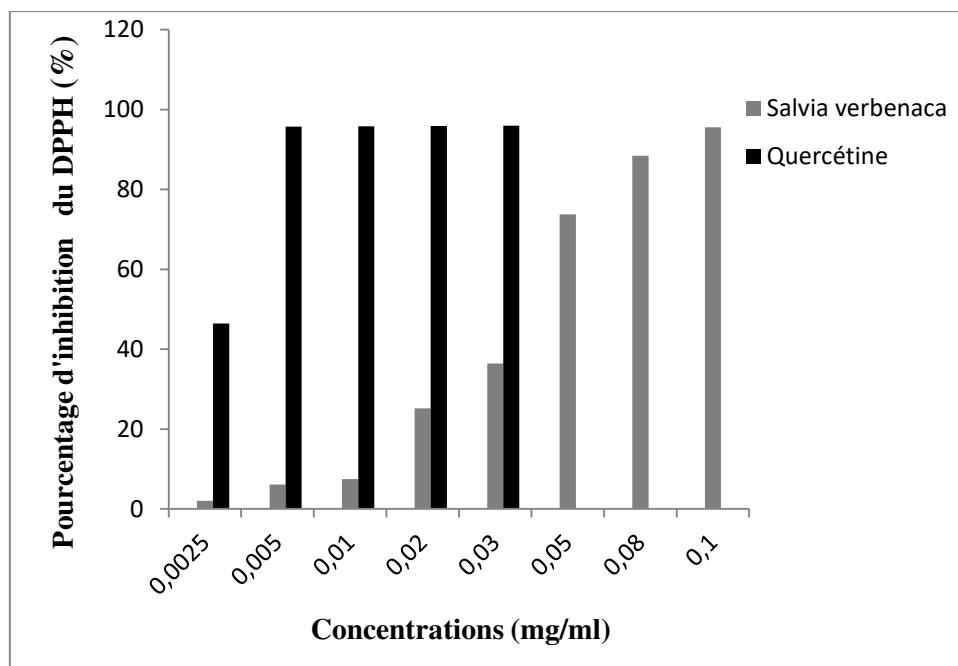


Figure 27: pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait de *Salvia verbenaca*.

La valeur IC_{50} de l'extrait de *Salvia verbenaca* a été déterminée à partir de l'équation de la régression linéaire de l'activité antiradicalaire (%) par rapport aux différentes concentrations de l'extrait (figure 28).

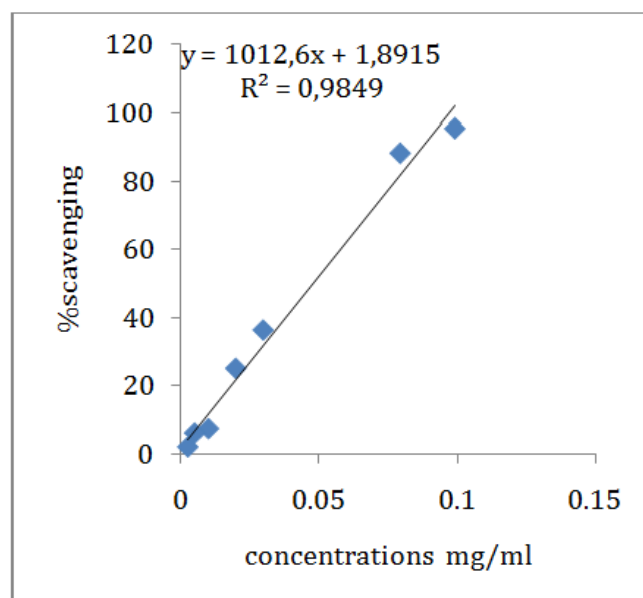


Figure 28: graphe de la valeur IC_{50} de l'extrait de *Salvia verbenaca*

Les trois extraits ont montré une bonne activité antiradicalaire, cependant l'extrait de *Thymus guyonii* révèle la plus forte activité antiradicalaire 90% à une concentration très basse de 0,03 mg/ml et 94% à une concentration de 0,05 mg/ml (figure 23).

De nombreuses recherches réalisées sur l'activité antiradicalaire ont montré une corrélation entre l'activité antiradicalaire et les composés phénoliques (Bidié et al., 2011 ; Jasna et al., 2012 ; Katsarou et al., 2012 ; Santos-Sanchez et al., 2014).

Les résultats de mesure des concentrations de l'indice de demi-inhibition (IC_{50}), qui est inversement proportionnelle à la valeur du potentiel antioxydant, sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4: l' IC_{50} des trois extraits étudiés

Extraits testés	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	R^2
<i>Thymus guyonii</i>	15,90	0,997
<i>Stachys circinnata</i>	54,92	0,984
<i>Salvia verbenaca</i>	47,50	0,982
Quercétine	12	0,5

Ces résultats montrent que les deux extraits de *Stachys circinnata* et *Salvia verbenaca* possèdent une bonne activité à céder le proton pour neutraliser le radical DPPH, tandis que l'extrait de *Thymus guyonii* possède une très puissante activité à céder le proton pour neutraliser le radical DPPH, et par suite l'extrait butanolique représente un très bon pouvoir antioxydant, résultat conforme à celui cité par la bibliographie (les flavonoïdes sont des capteurs puissants de radicaux) (Exarchou et al.,2003; Pizzale et al.,2002 ; Dorman et al.,2004).

1-2-Evaluation de l'activité immunomodulatrice des trois extraits (*Thymus guyonii*, *Stachys circinnata* et *Salvia verbenaca*)

Les données obtenues montrent qu'il y a une différence dans les moyennes de l'indice phagocytaire (K) entre les groupes (GI, GII, GIII, et GIV) pour chaque extrait étudié, nous constatons que la valeur de l'indice phagocytaire K augmente en augmentant les doses. La différence existe aussi entre les groupes des trois espèces étudiées. La valeur la plus élevée de l'indice phagocytaire a été remarquée dans les groupes GIV de *Stachys circinnata* ($0,105 \pm 0,018$) et *Salvia verbenaca* ($0,095 \pm 0,012$) qui ont montré une différence significative par rapport au contrôle GI (* $p < 0,05$) (figure 29).

Cependant, l'extrait de *Stachys circinnata* montre un effet plus élevé que l'extrait de *Salvia verbenaca*, l'extrait restant de *Thymus guyonii* ne montre aucune augmentation significative, cela a été remarqué pour toutes les doses utilisées.

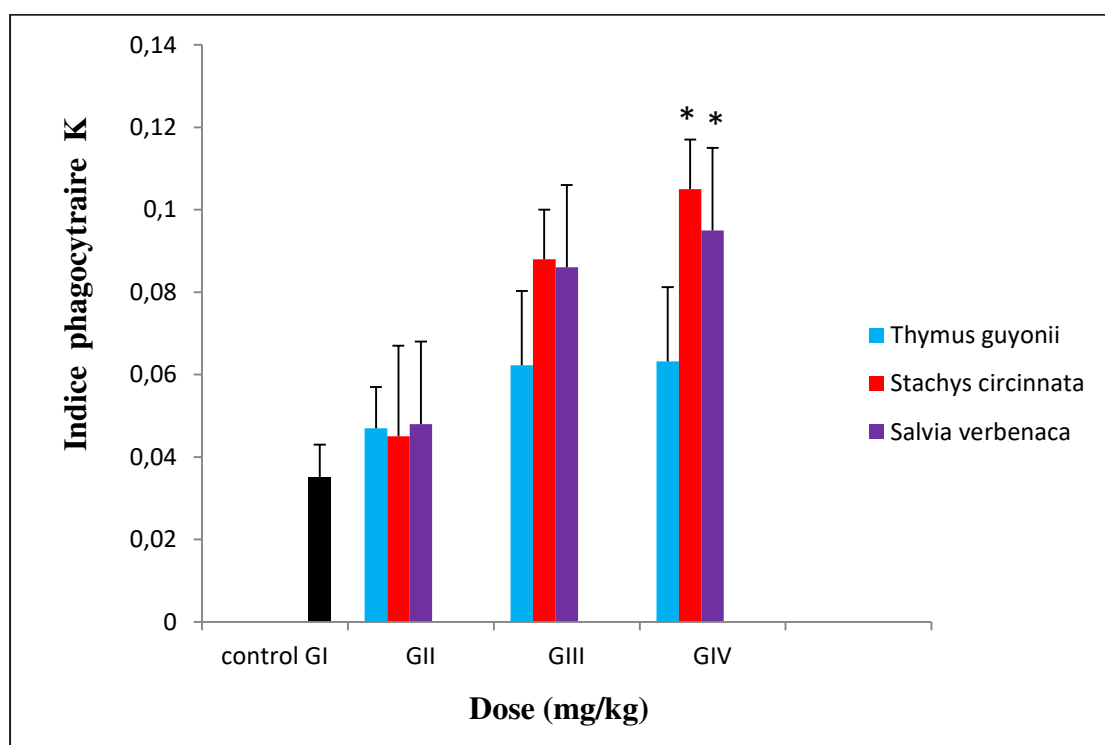


Figure 29: activité phagocytaire (K) chez des souris traitées avec différentes concentrations des trois extraits étudiés

Comme on le voit sur la figure 30, il existe une variation considérable dans la moitié du temps de carbone colloïdal qui se diminue en augmentant la dose, la variation existe même entre les groupes des trois extraits mais pas significativement.

L'effet de l'extrait de *Salvia verbenaca* a été plus rapide dans le groupe GIII en comparaison avec le même groupe des deux autres extraits *Thymus guyonii* et *Stachys circinnata*., alors que dans le groupe GIV c'est l'extrait de *Stachys circinnata* qui était le plus rapide.

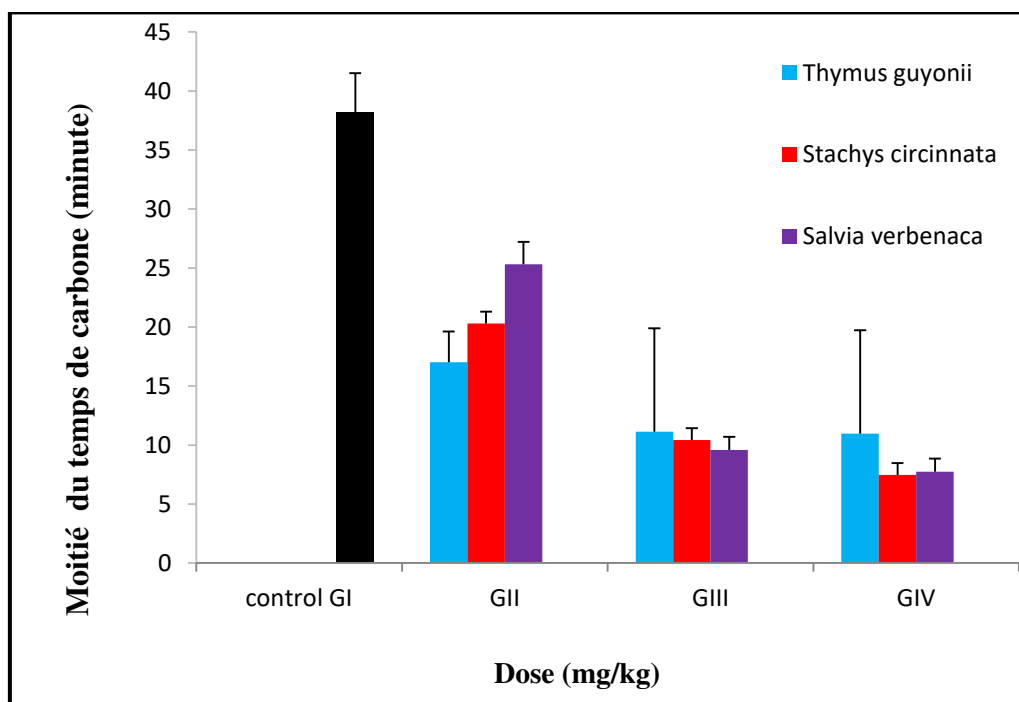


Figure 30: taux de carbone clearance chez les souris traitées avec les différents extraits

Les résultats concernant l'indice phagocytaire corrigé α ont montré qu'il existe une augmentation significative dans le groupe III qui correspond à la dose (150 mg/kg) pour l'extrait de *Stachys circinnata* et l'extrait de *Salvia verbenaca* quand il est comparé avec le contrôle GI (* $p < 0,05$) (figure 31). L'indice α est aussi élevé dans le groupe GIV de l'extrait *Salvia verbenaca* mais il n'est pas significatif quand il est comparé avec le contrôle.

La comparaison entre les groupes des différents extraits ne montre aucune augmentation significative.

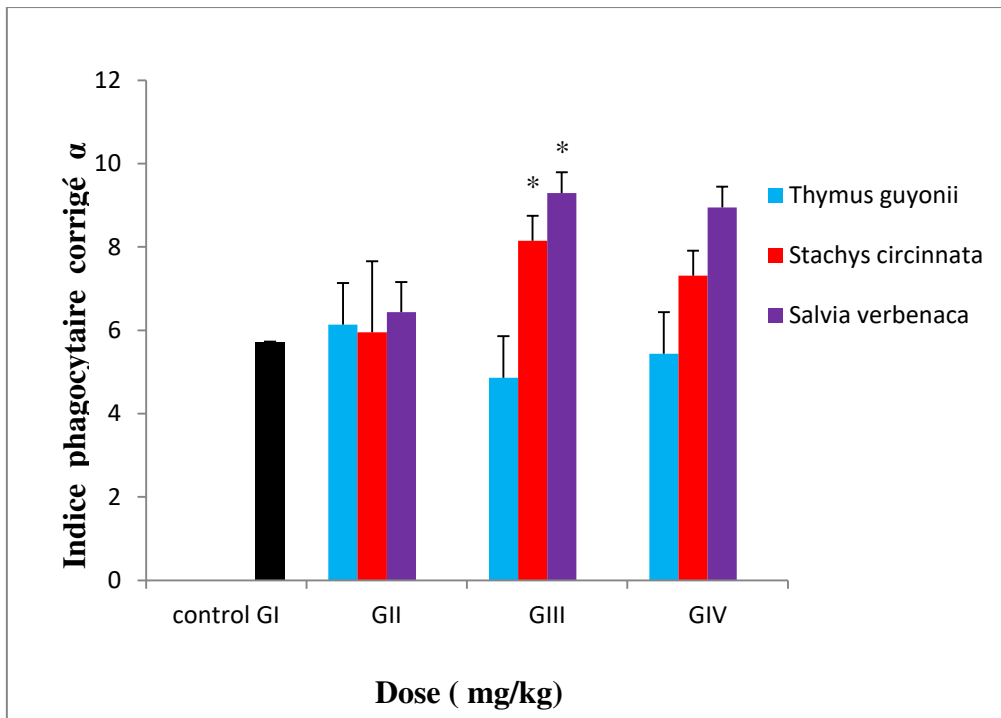


Figure 31: l'indice phagocytaire corrigé α chez les souris traitées avec les différents extraits étudiés

Les figures 32 et 33 montrent que le poids du foie et de la rate chez les souris exprimé en pourcentage de poids corporel n'a pas produit une différence significative par rapport au groupe contrôle (GI) $p > 0,05$. Ceci indique que le poids des organes phagocytaires n'a pas été affecté.

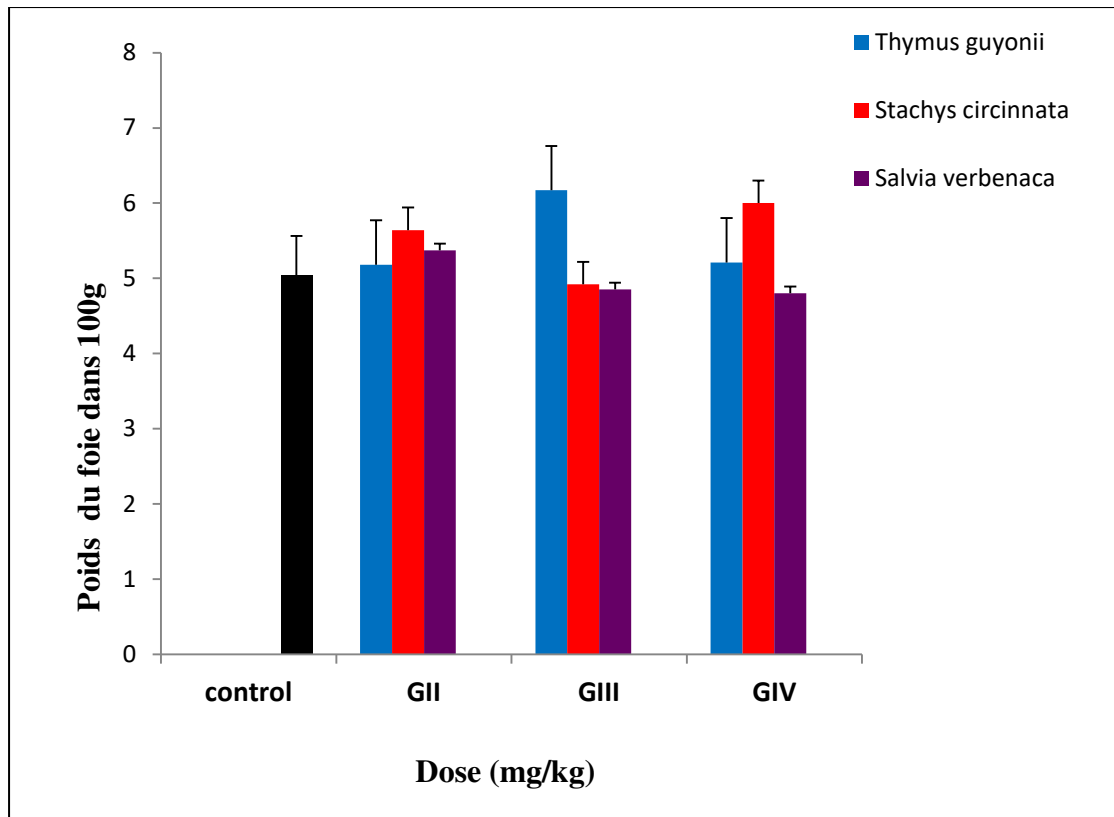


Figure 32 : variation du poids de foie par rapport au poids corporel

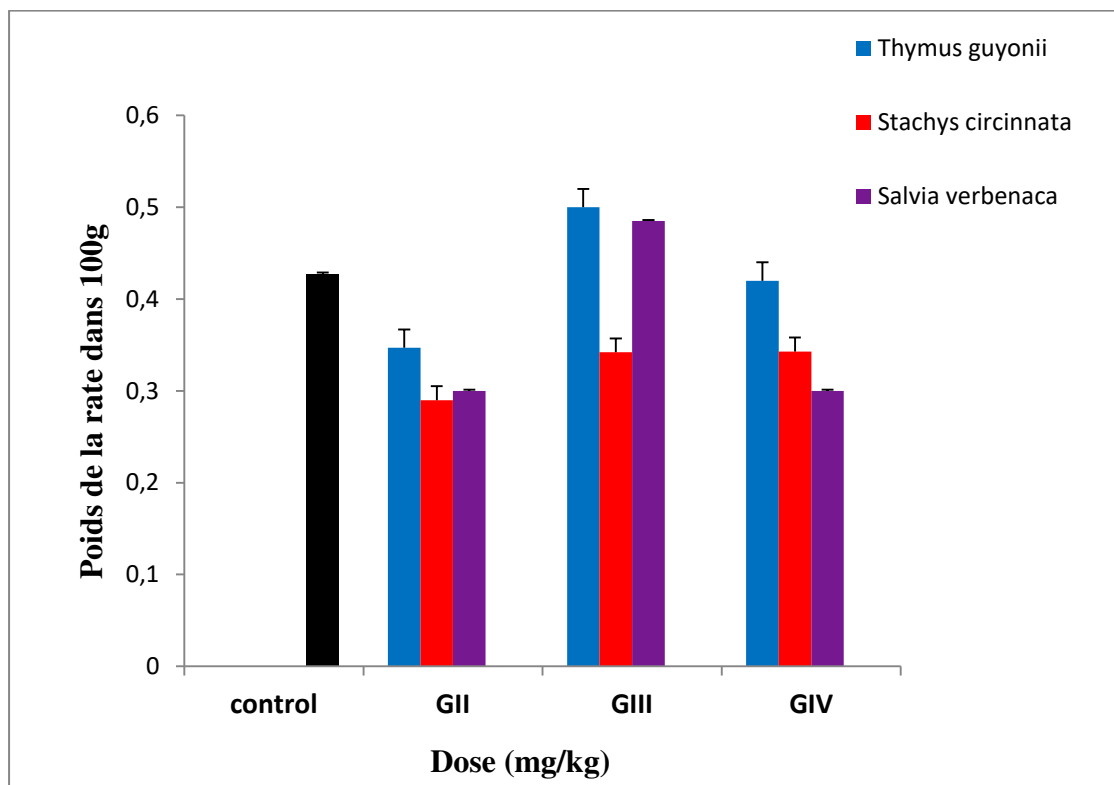


Figure 33 : variation du poids de la rate par rapport au poids corporel

1-3-Résultats de cytotoxicité révélés par le test MTT

1-3-1- Cytotoxicité des extraits

Les études de cytotoxicité ont été effectuées dans le but de sélectionner les concentrations non toxiques des extraits. La gamme des concentrations testées pour les extraits des trois plantes a été (100, 500 et 1000 µg / ml). Après 24 heures d'incubation, les résultats sont indiqués dans la figure 34 relative à la toxicité des extraits.

Les résultats montrent que le pourcentage de survie des cellules baisse ou augmente en fonction des concentrations d'extraits butanoliques des trois plantes.

L'homocystéine à 100 µM n'a pas causé d'effets significatifs sur la viabilité cellulaire où le pourcentage de survie est de 93%.

L'extrait de *Thymus guyonii* : le pourcentage de survie des cellules baisse de 100 % à 96% pour des concentrations de 100 µg/ml, ou encore de 75% pour la concentration 500 µg/ml.

L'extrait de *Stachys circinnata*: le pourcentage de survie des cellules baisse de 100% à 93% pour des concentrations de 100µg/ml et de 78 % pour la concentration de 500 µg/ml.

L'extrait de *Salvia verbenaca*: les pourcentages de survie pour les trois concentrations de cet extrait semblent plus faibles par rapport à ceux révélés par les deux premiers extraits.

Le pourcentage de survie pour les concentrations 100 et 500 et de 89% et 61% respectivement.

Cependant, une augmentation de la mort cellulaire a été observée avec tous les extraits à plus forte concentration (1000 µg / ml), en particulier avec l'extrait de *Salvia verbenaca* où on constate une réduction significative (*P < 0,05) de l'ordre de 70% et seulement 30% de cellules viables.

De ce fait, on peut parler de cytotoxicité des extraits qui est accompagnée par une baisse de viabilité cellulaire à des concentrations très élevées (1000 µg/ml).

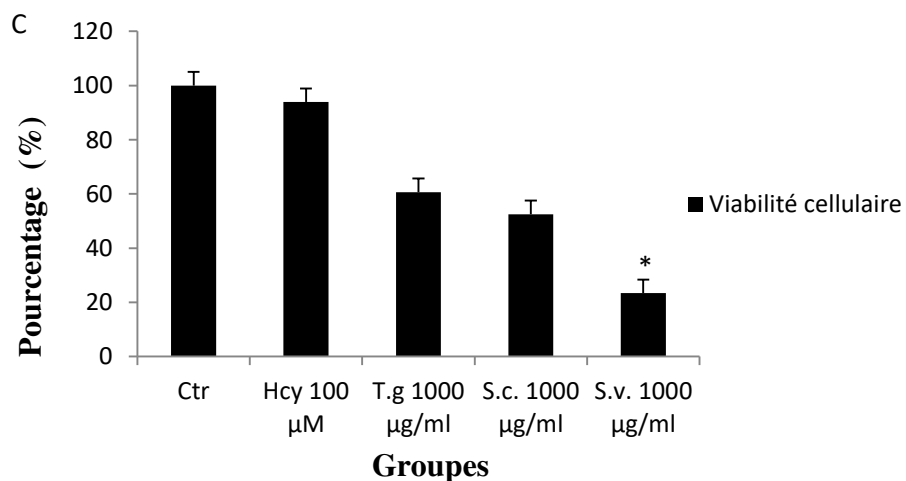
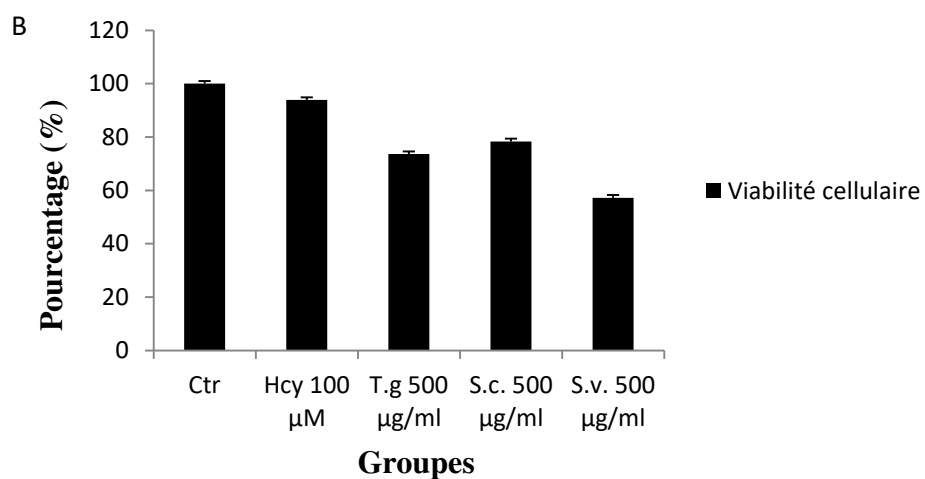
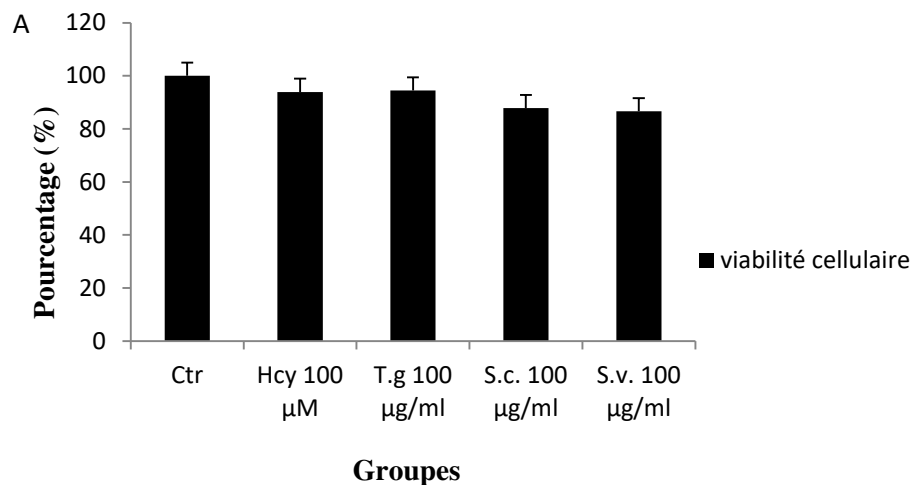


Figure 34 : pourcentage de viabilité cellulaire des THP-1 incubées avec différentes concentrations des extraits, A : concentration 100 µg/ml, B : la concentration 500 µg/ml, C : la concentration 1000 µg/ml

1-3-2- Cytotoxicité de l'homocystéine

Le test MTT a démontré que le traitement avec 100-1000 μM d'homocystéine n'a pas affecté de manière significative le nombre de cellules viables par rapport au contrôle.

Nous avons remarqué que l'homocystéine à 100 μM ne cause pas d'effets significatifs sur la viabilité cellulaire où le pourcentage de survie est resté très élevé (93%). Cependant la viabilité des cellules diminue en augmentant la concentration de l'homocystéine, à 250 μM on a 86% des cellules viables et à 1000 μM la viabilité cellulaire réduit considérablement, elle est de 78% (figure 35).

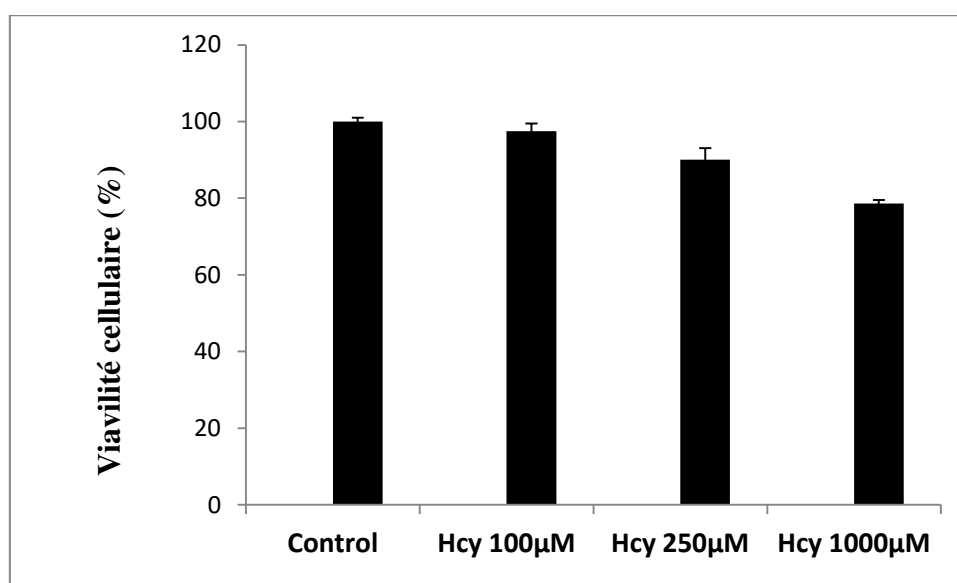


Figure 35: pourcentage de viabilité cellulaire des THP-1 incubées avec différentes concentrations de l'homocystéine.

1-4- Quantification des espèces réactives de l'oxygène (EROs)

D'après les résultats indiqués dans les figures 36 et 37, nous avons observé que l'homocystéine induit une hausse de production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). La production des EROs par l'homocystéine a été évaluée au moyen de la $\text{H}_2\text{DCF-DA}$.

Dans le présent travail, la $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ a permis, en présence de deux concentrations d'homocystéine (100 μM et 1000 μM), de détecter une hausse dose-dépendante des

EROs (figures 36 et 37). Également, une diminution significative de cette production des EROs en présence d'antioxydants a été observée.

La quantité des EROs produite par les cellules THP-1 a été mesurée en présence des extraits avec et sans homocystéine. La figure 36 présente les résultats obtenus après l'incubation avec 100 μ M d'homocystéine.

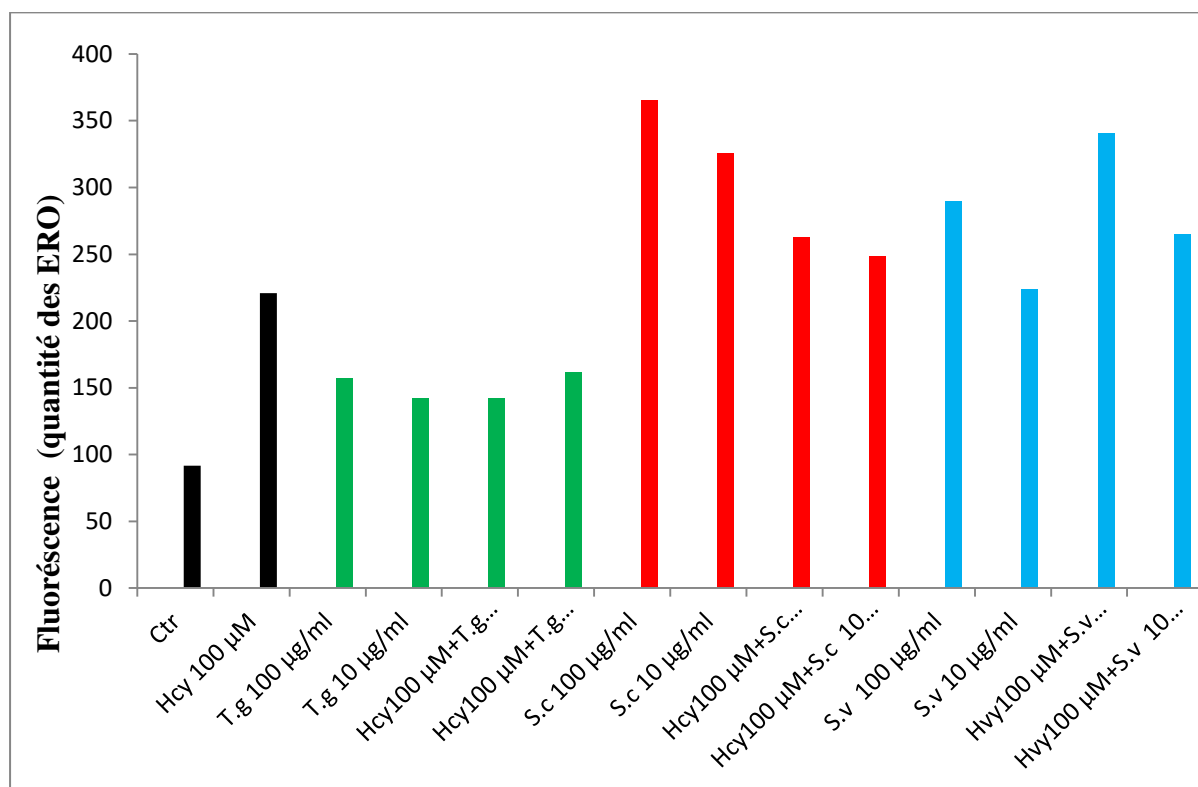


Figure 36 : quantité des EROs produite par 100 μ M d'homocystéine en présence et absence des trois extraits.

La quantité des EROs produite après l'incubation avec l'homocystéine 100 μ M augmente de 2,56 fois à la quantité initiale des EROs présentée dans le contrôle. Tandis que l'incubation avec l'homocystéine 1000 μ M donne une augmentation de l'ordre de 2,93 fois par rapport au niveau initiale (contrôle).

Cependant la quantité des EROs produite en présence des extraits diffère d'un extrait à un autre. L'incubation avec l'extrait *Thymus guyonii* provoque une légère augmentation de la quantité des EROs, cela a été remarqué pour les deux concentrations 10 μ g/ml et 100 μ g/ml.

L'incubation avec l'extrait *Stachys circinnata* montre une quantité très importante des EROs, elle est même plus élevée que la quantité produite par l'homocystéine (100µM et 1000µM).

L'incubation avec l'extrait *Salvia verbenaca* provoque une augmentation de la production des EROs plus importante que la quantité provoquée par l'homocystéine (100µM et 1000µM).

La quantité des EROs produite en présence de l' l'extrait de *S.circinata* (10µg/ml et 100 µg/ml) et l'homocystéine (100µM et 1000µM) ou l'extrait *S.verbinaca* et l'homocystéine (100µM et 1000µM) n'a pas réduit.

Cependant la production des EROs en présence de l'extrait de *Thymus guyonii* (10 µg/ml et 100 µg/ml) et l'homocystéine (100µM et 1000µM) a diminué considérablement, la diminution de la quantité des EROs a été plus importante avec la concentration 100 µg/ml qu'avec la concentration 10 µg/ml.

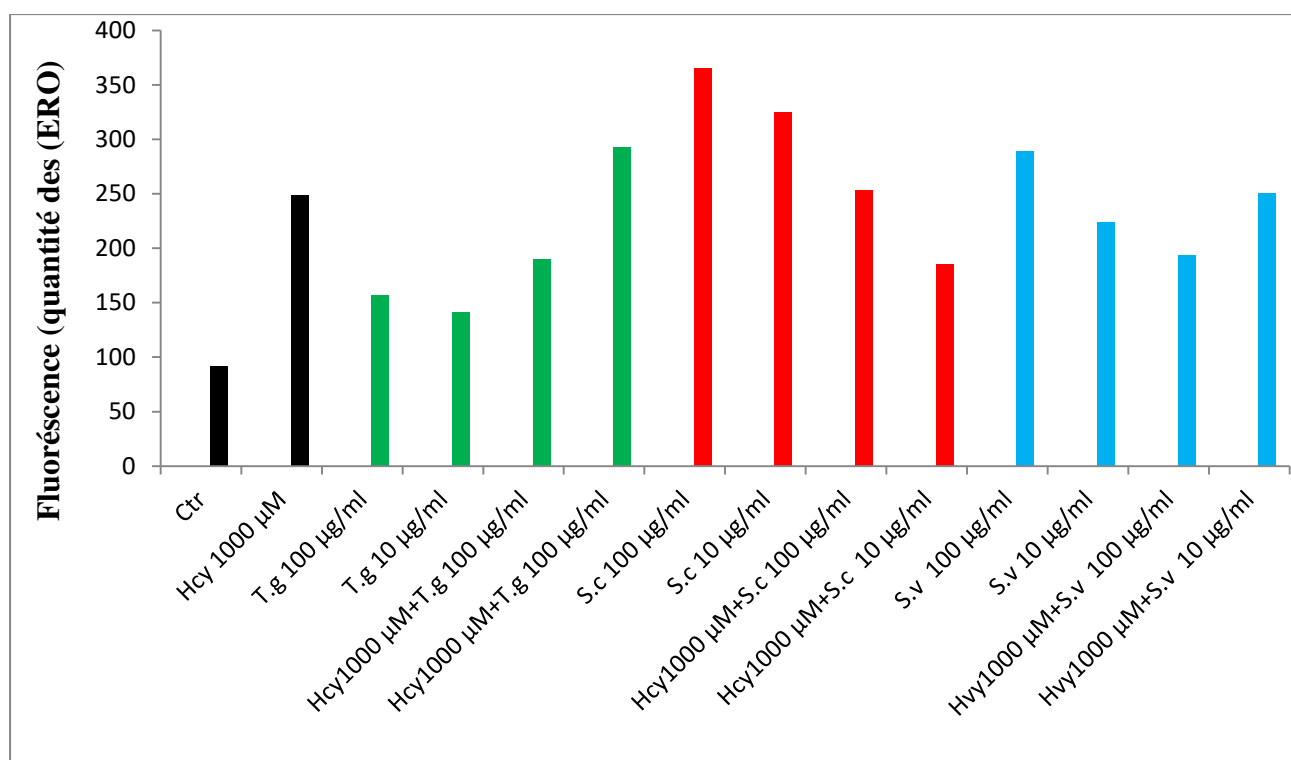


Figure 37: quantité des EROs produite par 1000µM d'homocystéine en présence et absence des trois extraits.

1-5-Résultats du test des comètes "Single Cell Gel Electrophoresis" (SCGE)

1-5-1-Sur les Monocytes

Dans notre étude les cellules ont été incubées avec deux concentrations (1 et 10 µg / ml) pour chaque extrait avec et sans homocystéine pendant 24 h. Les résultats concernant l'induction de cassures de l'ADN par l'homocystéine sont présentés sur la figure 38.

Dans un premier temps, cinq paramètres relatifs au test des comètes ont été comparés, il s'agit de paramètres individuels de mesure de la taille de la queue, de la tête et de la comète, le pourcentage de l'ADN dans la queue et le pourcentage de l'ADN dans la tête, ces derniers sont les paramètres les plus informatifs sur les effets de l'homocystéine et les extraits étudiés (figure 38).

Les résultats ont montré que le traitement des cellules THP-1 avec l'homocystéine (100 µM) induit une augmentation significative des cassures dans les brins d'ADN par rapport aux cellules témoins (*p < 0,001).

En effet, les valeurs de la longueur de la queue, de la comète et le pourcentage (%) de l'ADN dans la queue étaient significativement plus élevées que celles des cellules témoins et par rapport à tous les groupes traités dans cette étude (figure 38).

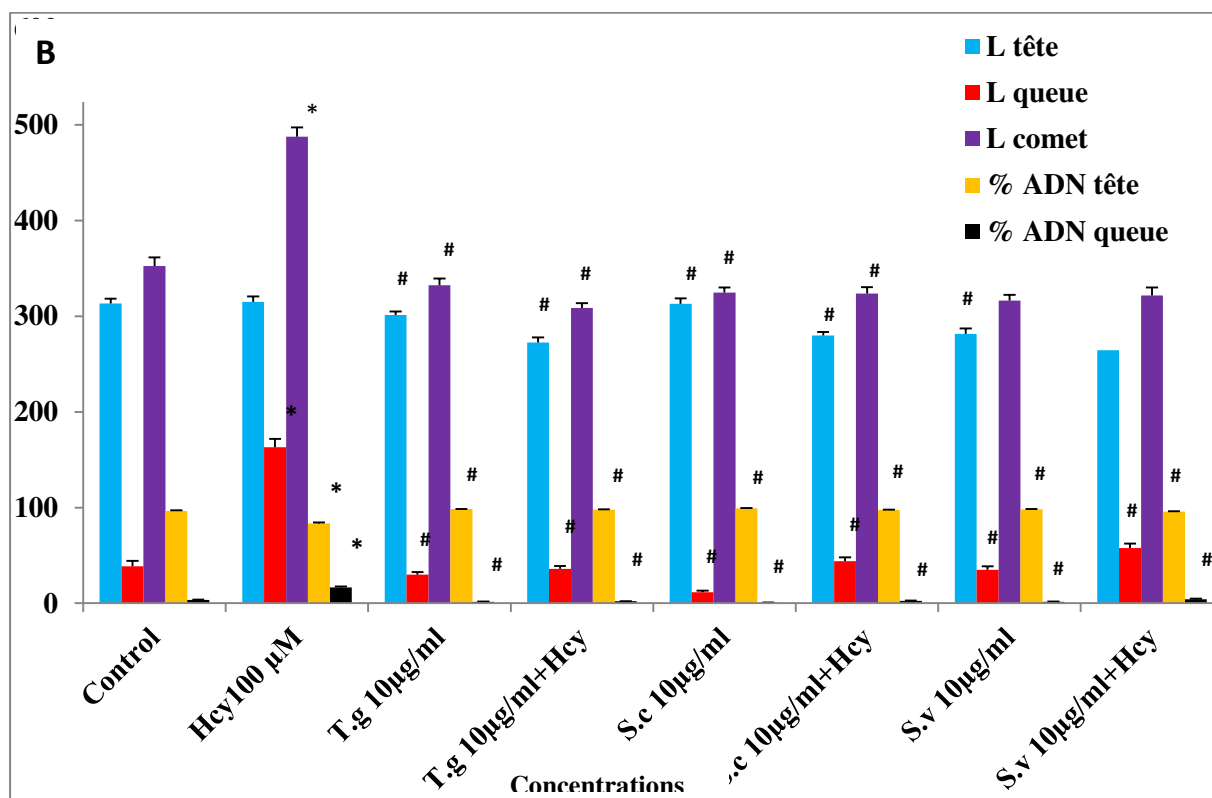
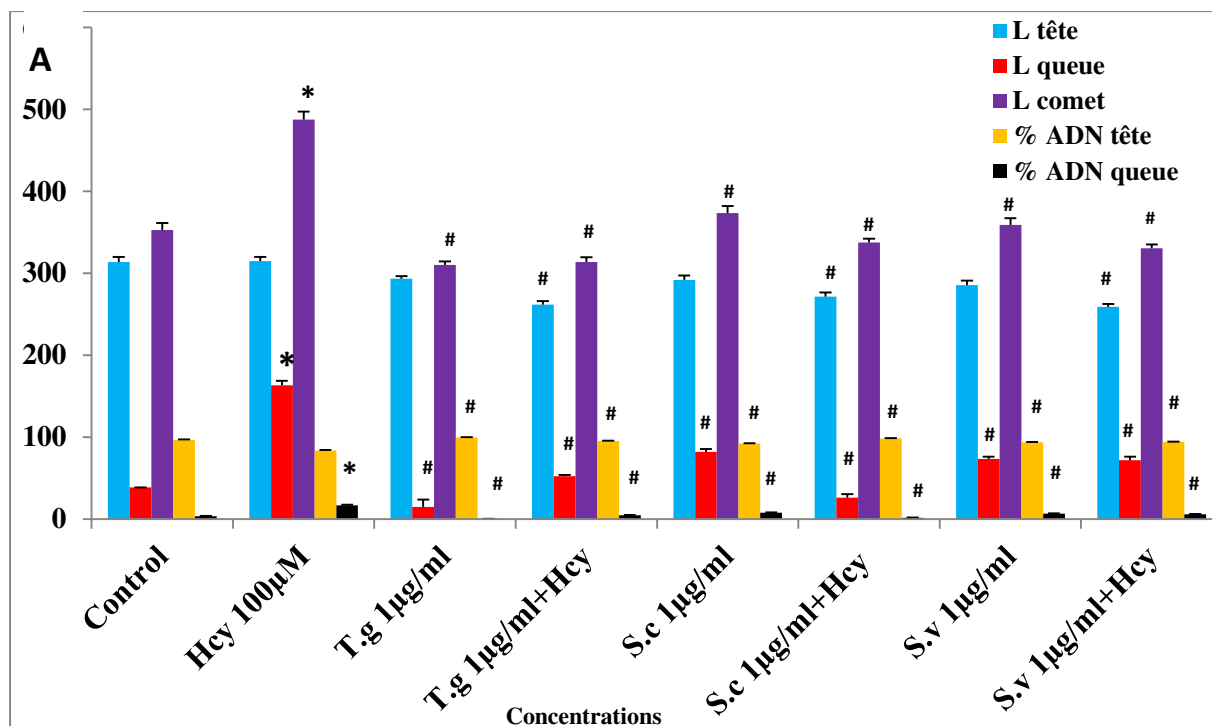


Figure 38: cassures de l'ADN exprimées en % dans la queue des comètes des cellules THP-1 incubées avec les différents extraits testés avec et sans homocystéine pendant 24 h, A : la concentration 1 µg/ml et B : la concentration 10 µg/ml. *P < 0.001 comparé au groupe contrôle #P < 0.001 comparé au groupe des cellules traitées avec l'homocystéine.

Nous avons constaté que le traitement des cellules avec les deux concentrations (1 et 10µg/ml) pour chacun des extraits n'a pas provoqué une dégradation de l'ADN et presque la totalité des noyaux des cellules sont restées intactes avec un aspect sphérique. Nous constatons aussi que les groupes des cellules incubées avec l'homocystéine et chacun des extraits testé (*T.guyonii*, *S.circinnata*, *S.verbenaca*) ne montre aucune dégradation de l'ADN, à l'inverse il y a une diminution significative (*p < 0,001) de la longueur de la queue, la longueur de comète et le % d'ADN dans la queue par rapport au groupe des cellules traitées uniquement avec l'homocystéine, cela a été remarqué avec les deux concentrations pour chaque extrait (figure 39).

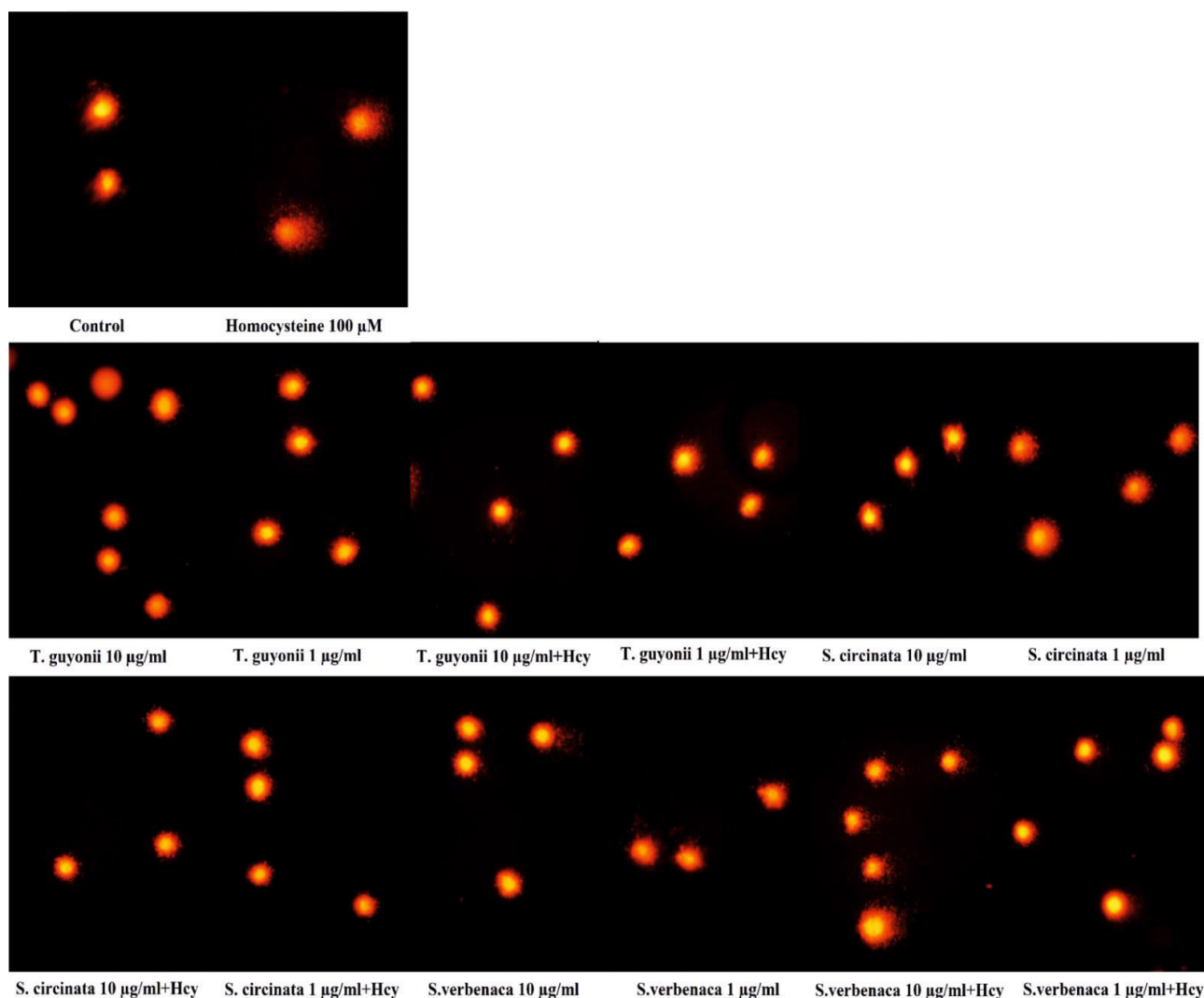


Figure 39: comètes des cellules THP-1 photographies par un microscope à épifluorescence et l'effet protectif des différents extraits *T.guyonii*, *S.circinnata* et *S.verbenaca* contre les altérations d'ADN induites par l'homocystéine.

Le traitement des cellules THP-1 avec les extraits des trois plantes dont les concentrations sont 1 et 10 µg/ml a donné différents degrés de protection de l'ADN contre les dommages induits par l'homocystéine.

En calculant l'effet protectif de chaque extrait nous avons trouvé que le meilleur effet est fourni par l'extrait de *S.circinnata* et *T.guyonii* dont les concentrations sont 1 et 10 µg/ml respectivement (tableau 5). Le résultat est confirmé par l'analyse des photos microscopiques qui ont montré que l'intensité de la fluorescence dans la queue était inexcitable et les comètes se manifestent avec un aspect complètement sphérique. Alors que l'extrait de l'espèce *S. verbenaca* a montré un degré de protection significatif (*p< 0,001) mais plus faible que les deux autres extraits et cela a été remarqué pour les deux concentrations testées (tableau 5).

Nous signalons que l'analyse individuelle des comètes a été réalisée grâce au logiciel CASP 1.2.2 (CASP Lab, GNU public license), fournissant cinq paramètres qui sont : la longueur de la tête, longueur de la queue, la longueur de comète, % de l'ADN dans la queue, % de l'ADN dans la tête sélectionnés pour les analyses statistiques. L'étude a été réalisée sur plus de 50 cellules pour chaque échantillon, les taux de dommages et d'altérations subis par l'ADN pour les divers groupes testés ont été comparés au contrôle par le test statistique ANOVA.

Tableau 5: lésions de l'ADN dans les THP-1 exposées à l'homocystéine et les différents extraits (*T.guyonii*, *S.circinnata*, *S.verbenaca*) pendant 24h. Les données sont exprimées en moyenne \pm erreur type relative

Groupes	L tête	L queue	L comèt	%DNA tête	%DNA queue	%DNA protection
Contrôle	313,4 \pm 6,546	38,6 \pm 5,697	352,5 \pm 8,93	96,57 \pm 0,5188	3,41 \pm 0,518	
Homocystéine 100 μ M	314,86 \pm 4,782	163,034 \pm 8,751*	487,48 \pm 9,6375*	83,38 \pm 0,935*	16,61 \pm 0,935*	
<i>T.guyonii</i> 10 μ g/ml	301,35 \pm 5,815 [#]	30,03 \pm 2,693 [#]	332,17 \pm 7,0795 [#]	98,36 \pm 0,197 [#]	1,63 \pm 0,197 [#]	
<i>T.guyonii</i> 1 μ g/ml	29 \pm 3,115	14,9 \pm 1,879 [#]	310,06 \pm 4,4974 [#]	99,68 \pm 0,068 [#]	0,31 \pm 0,066 [#]	
<i>T.guyonii</i> 10 μ g/ml +Hcy	272,58 \pm 3,503 [#]	35,98 \pm 2,975 [#]	308,54 \pm 4,9998 [#]	97,99 \pm 0,223 [#]	2,002 \pm 0,223 [#]	87,947
<i>T.guyonii</i> 1 μ g/ml +Hcy	261,48 \pm 4,391 [#]	52,12 \pm 3,398 [#]	313,6 \pm 5,8782 [#]	95,42 \pm 0,323 [#]	4,57 \pm 0,323 [#]	72,486
<i>S.circinnata</i> 10 μ g/ml	313 \pm 5,15	11,68 \pm 1,51 [#]	324,68 \pm 5,4629 [#]	99,34 \pm 0,145 [#]	0,65 \pm 0,145 [#]	
<i>S.circinnata</i> 1 μ g/ml	291,56 \pm 5,663	81,92 \pm 4,423 [#]	373,48 \pm 8,2838 [#]	92,14 \pm 0,44 [#]	7,85 \pm 0,440 [#]	
<i>S.circinnata</i> 10 μ g/ml +Hcy	279,82 \pm 5,514 [#]	43,86 \pm 4,207 [#]	323,68 \pm 6,5664 [#]	97,58 \pm 0,322 [#]	2,41 \pm 0,322 [#]	85,490
<i>S.circinnata</i> 1 μ g/ml +Hcy	271,47 \pm 5,108 [#]	26,01 \pm 2,635 [#]	337,39 \pm 4,57669 [#]	98,38 \pm 0,211 [#]	1,61 \pm 0,221 [#]	90,307
<i>S.verbenaca</i> 10 μ g/ml	281,4 \pm 3,783	35 \pm 3,72 [#]	316,4 \pm 5,9429 [#]	98,29 \pm 0,261 [#]	1,66 \pm 0,258 [#]	
<i>S. verbenaca</i> 1 μ g/ml	285,36 \pm 5,607	73,51 \pm 4,355 [#]	359,06 \pm 8,0734 [#]	93,71 \pm 0,466 [#]	6,46 \pm 0,464 [#]	
<i>S.verbenaca</i> 10 μ g/ml +Hcy	264,4 \pm 5,894 [#]	57,85 \pm 4,607 [#]	321,61 \pm 8,2575 [#]	95,69 \pm 0,413 [#]	4,3 \pm 0,413 [#]	74,111
<i>S. verbenaca</i> 1 μ g/ml +Hcy	258,75 \pm 3,707 [#]	71,63 \pm 3,779 [#]	330,38 \pm 4,6583 [#]	94,08 \pm 0,333 [#]	5,91 \pm 0,333 [#]	64,419

Le pourcentage de la capacité protectrice a été calculé selon l'équation suivante : **100 - [(TDC Pour les extraits +Hcy)/ TDC Hcy]*100**. TDC représente le pourcentage de l'ADN dans la queue de la comète. * P < 0.001 comparé au groupe contrôle [#]P < 0.001 comparé au groupe des cellules traitées avec l'homocystéine.

1-5-2-Sur les lymphocytes

Les résultats ont montré que le traitement des lymphocytes avec l'homocystéine (250 μ M) induit une augmentation hautement significative des cassures dans les brins d'ADN par rapport aux cellules témoins (*p < 0,001). En effet, les valeurs de la longueur de la queue, la longueur de la comète et le pourcentage (%) de l'ADN dans la queue étaient significativement plus élevées que celles des cellules témoins (figure 40) et par rapport aux lymphocytes incubées soit uniquement avec l'extrait de *Thymus guyonii* soit avec l'extrait et l'homocystéine (tableau 6).

Tableau 6: lésions de l'ADN dans les THP-1 exposées à l'homocystéine (250 μ M) et à l'extrait de *Thymus guyonii* pendant 24h. Les données sont exprimées en moyenne \pm erreur type relative.

Groupes	L tête	L queue	L comèt	ADN tête	ADN queue	% Protection
Contrôle	172 \pm 9,23	40,2 \pm 10,62	214,26 \pm 14,45	91,11 \pm 2,84	6,4 \pm 2,83	
Homocystéine 250μM	197,00 \pm 4,79*	129 \pm 6,08*	326,13 \pm 7,26*	68,71 \pm 2,2*	31,27 \pm 2,2*	
<i>T.guyonii</i> 1μg/ml	135,66 \pm 2,82 [#]	24,29 \pm 3,63 [#]	159,95 \pm 4,91 [#]	95,29 \pm 1,00 [#]	4,42 \pm 0,98 [#]	
<i>T.guyonii</i> 1μg/ml + Homocystéine 250μM	169 \pm 3,54 [#]	31,45 \pm 2,44 [#]	202,45 \pm 4,58 [#]	95,3 \pm 2,48 [#]	4,49 \pm 0,44 [#]	85,641

*P < 0.001 comparé au groupe contrôle, [#]P < 0.001 comparé au groupe des cellules traitées avec l'homocystéine.

Nous avons constaté que le traitement des cellules avec l'extrait de *Thymus guyonii* n'a pas provoqué une dégradation de l'ADN et presque la totalité des noyaux des lymphocytes sont restés intacts. La figure 40 correspondant aux différents groupes des lymphocytes montre que les lymphocytes incubées avec l'homocystéine et l'extrait de *Thymus guyonii* ne révèle aucune dégradation de l'ADN, à l'inverse il y a une diminution significative (*p < 0,001) de la longueur de la queue, la longueur de comète et le % d'ADN dans la queue par rapport au lymphocytes traitées uniquement avec l'homocystéine (250 μ M).

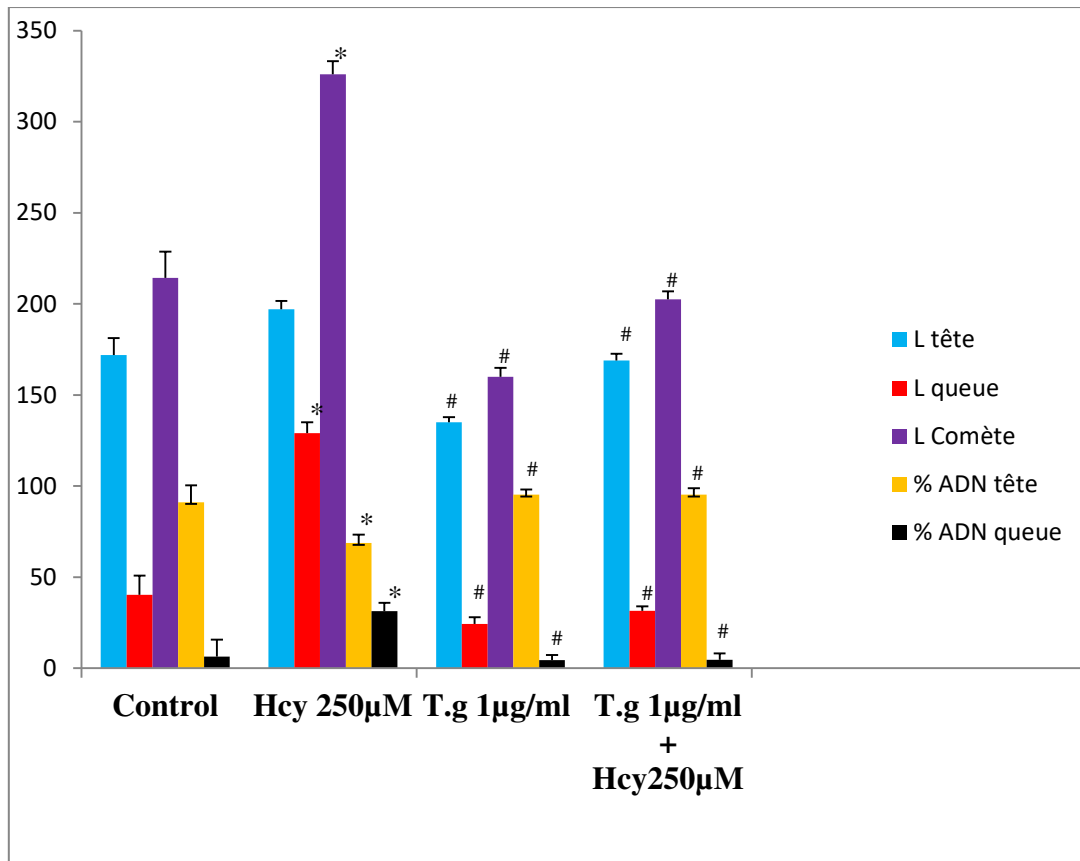
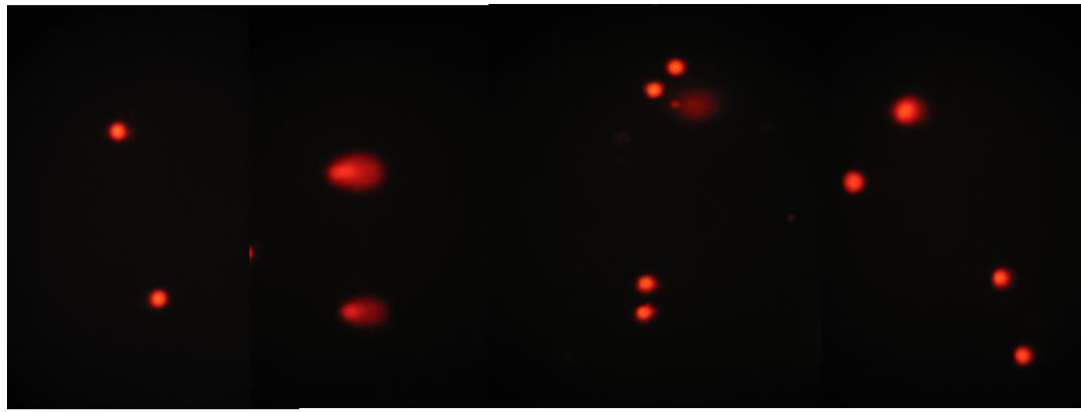


Figure 40: cassures de l'ADN exprimées en % dans la queue de chaque comète des lymphocytes incubées avec l'extrait *Thymus guyonii* avec et sans homocystéine (250 µM) pendant 24 h. *P < 0.001 comparé au groupe, contrôle #P < 0.001 comparé au groupe des cellules traitées avec l'homocystéine.

Les cellules apparaissent avec un aspect complètement sphérique et ressemblent aux lymphocytes du groupe contrôle (figure 41), cela signifie que l'extrait a impliqué un puissant effet protectif (85,641) contre les altérations induites par l'homocystéine (250 µM).



Control

Homocystéine
250µM

Thymus guyonii
1µg/ml

Thymus guyonii
1 µg/ml +
homocystéine 250µM

Figure 41 : comètes photographiées par un microscope à épifluorescence montrant l'effet protectif de l'extrait *T.guyonii*, contre les altérations d'ADN induites par l'homocystéine 250µM sur les lymphocytes.

2-Discussion

2-1-Etude de l'activité antiradicalaire

De nos jours, il y a un grand intérêt dans le monde entier pour trouver de nouveaux et sûrs antioxydants de sources naturelles pour prévenir la détérioration par oxydation des aliments et pour minimiser les dommages oxydatifs des cellules vivantes.

De nombreuses études ont montré que les composés phénoliques sont responsables d'une bonne activité antioxydantes (Okuda, 1983).

Les espèces de la famille des Lamiacées, représentent une bonne source des antioxydants car elles sont riches en composés phénoliques : les di terpènes phénoliques, les acides phénolique carboxyliques, les flavonoïdes isolés à partir du romarin, de la sauge, l'origan et le thym (Ozgen et al.,2006 ; Tepe et al ., 2005). Dans de nombreux cas, les composés phénoliques ont des activités antiradicalaires plus efficaces que l'ex- tocophérol et une activité comparable à celle des antioxydants synthétiques, BHA (butylated hydroxyanisole) and BHT (butylated hydroxytoluene) (Svetiana et al., 2001).

Dans cette étude nous avons évalué le pouvoir antiradicalire des trois extraits en utilisant la méthode du DPPH. Les résultats diffèrent sensiblement selon les extraits testés ainsi que les concentrations utilisées. Avec la méthode du DPPH, l'activité antiradicalaire augmente en augmentant la concentration, l'extrait butanolique de l'espèce *Thymus guyonii* marque une activité anti radicalaire très forte avec une IC₅₀ de 15,9 µg/ml ensuite l'extrait de *Salvia verbenaca* avec une IC₅₀ de 47,5µg/ml alors que l'extrait de l'espèce *Stachys circinnata* montre une activité modérée avec une IC₅₀ de 54,92 µg/ml.

Ces valeurs correspondent à la concentration pouvant piéger 50 % des radicaux libres présents dans la solution de DPPH, après 30 minutes d'incubation en présence des composés testés.

Nous avons suggéré que cette activité antiradicalaire est due à la présence de composés phénoliques qui sont un groupe important de composés pharmacologiquement actifs possédant une activité antiradicalaire et qui peuvent considérablement retarder ou empêcher l'oxydation des substances facilement oxydables (Shahidi et Wanasundara , 1992 ; Bors et al., 2001).

Selon l'équipe du laboratoire LOST dirigé par Pr Zahia Kabouche Le contenu en composés phénoliques totaux pour l'extrait de *Thymus guyonii* est de 19.11g/100g , 14.5 g/100g pour *Stachys circinnata* et 8,45g/100g pour *Salvia verbenaca* .

L'extrait de *Thymus guyonii* montre la plus haute activité antiradicalaire , elle est même très proche à la valeur de la quercétine, aussi l'extrait de l'espèce *Thymus guyonii* montre la plus haute teneur en polyphénols totaux, de nombreux chercheurs ont trouvé une relation entre la teneur en composés phénoliques totaux et l'activité antiradicalaire totale (Safaei - Ghomi et al., 2009 ; Bidié et al., 2011 ; Jasna et al., 2012 ; Katsarou et al., 2012 ; Santos-Sanchez et al., 2014).

L'analyse chimique réalisée par (Lehbili et al., 2013) sur l'huile essentielle de l'espèce *Thymus guyonii* la même espèce utilisée dans cette étude montre une richesse par le carvacrol (55,55%), le thymol (19,51%) et le p- cymène (6,25%). Donc il est clairement évident à partir des résultats obtenus que le thymol et le carvacrol constituaient les principaux phénols monoterpènes d'huile de thym.

Selon Stahl-Biskup et Saez (2002), les espèces du genre *Thymus* sont caractérisées par leur richesse en monoterpènes phénoliques et leurs huiles essentielles sont riches en thymol et carvacrol. La forte activité antiradicalaire de thym dépend grandement de sa composition chimiques elle est principalement attribué à la présence de carvacrol et de thymol (Stahl-Biskup et Saez , 2002).

Une autre étude réalisée par Bektas et al. (2005) sur l'activité antiradicalaire de deux variétés de l'espèce *T. sipyleus* montre que l'huile essentielle provenant de la variété *rosulans* semble être plus active à cause de sa richesse en thymol et carvacrol alors que la variété la moins active, est riche en composés oxygénés.

Une étude réalisée par (Lagoune, 2011) sur l'huile essentielle de *Stachys circinnata* l'Her présente les plus hauts pourcentages en globulol, α -cadinol et spathuléol (40.3%, 16.2%, 12.7% respectivement), ces pourcentages n'ont jamais été observés dans une huile essentielle du genre *Stachys*.

D'après Kianbakht et al. (2011) les espèces appartenant au genre *Salvia* ont une activité inhibitrice de l'absorption des lipides antioxydants, inhibitrice de la peroxydation lipidique et des effets anti-inflammatoires et par conséquent, la sauge peut être efficace dans le traitement de l'hyperlipidémie.

Notre résultat concorde avec celui de Rababah et al. (2011) qui a montré que les espèces du genre *Salvia* présentent une grande capacité à inhiber le DPPH en raison de leur richesse en composés phénoliques. Cette forte activité antiradicalaire pourrait être utilisée pour le traitement et la prévention des maladies dégénératives associées au stress oxydatif.

Une autre étude réalisée sur le thé de sauge a montré qu'il est efficace dans l'amélioration du profil lipidique, dans les défenses antioxydants et l'expression de la protéine Hsp70 des lymphocytes chez des volontaires humains. La Sauge peut également inhiber la peroxydation lipidique induite par le pro-oxydation chez les rats (Oboh and Henle, 2009 ; Sa et al., 2009) .

La présence d'une activité antiradicalaire importante au niveau de l'espèce *Thymus guyonii* nous a amené à suggérer son utilisation comme additif naturel pour remplacer les antioxydants synthétiques dont certains pourraient présenter des effets cancérigènes.

Quelques composés phénoliques (les acides phénoliques, les flavonoïdes, les quinones, les coumarines) ont prouvé une activité antiradicalaire efficace et ont également eu des activités anticancéreuses, anticarcinogénique, antimutagenique (Ho et al., 1994 ; Owen et al., 2000 ; Tapiero et al., 2002). De même, quelques molécules de tanin (par exemple, les polyphénols de thé) ont une activité anticancéreuse ou antimutagenique (Chung et al., 1998).

2-2-Etude de l'activité immunomodulatrice des trois extraits

L'emploi des substances à propriétés immunomodulatrices dans l'alimentation est une stratégie qui a retenu l'attention de la communauté scientifique ces dernières années. De nombreux extraits de plantes pourraient s'avérer efficaces dans la prévention des maladies, notamment par leurs interactions possibles avec le système immunitaire (Wenk, 2003).

Les plantes et leurs composés bioactifs quand ils sont identifiés sont une classe d'une diversité exceptionnelle et le potentiel des produits dérivés des plantes commence à peine à être évaluée de manière rigoureuse *in vivo*. Les herbes et les épices sont utilisés depuis des siècles à travers le monde à des fins thérapeutiques (Stein et Kil, 2006).

L'échinacée, la réglisse, la griffe du chat et l'ail sont connus pour leurs propriétés immunomodulatrices (Craig, 1999). Les huiles essentielles sont souvent les composés biologiquement actifs, mais d'autres préparations à base de plantes démontrent un certain nombre d'activités biologiques.

Les Lamiacées sont une grande famille de plantes aromatiques : basilic, aneth, fenouil, marjolaine, menthe, romarin, origan, sauge et thym (Craig, 1999). Les mélanges des huiles essentielles à base de thymol et de carvacrol (dont les sources principales sont le thym et l'origan semblent prometteurs en raison d'une part de leur propriétés antimicrobiennes (Cosentino et al., 1999) et d'autre part de leur potentiel immunomodulateur (Woollard et al., 2007). Le thymol, lorsqu'il est utilisé seul à un taux d'incorporation de 1%, semble agir sur l'immunité humorale et augmente les concentrations sériques en IgA et IgM (Trevisi et al., 2007).

Selon les résultats obtenus dans cette étude nous suggérons que *Stachys circinnata* présente un meilleur effet dans l'amélioration de l'activité immunomodulatrice du système réticulo-endothélial (R. E. S) par rapport aux deux autres espèces.

La présence de cette activité a déjà fait ses preuves dans d'autres espèces appartenant au même genre, tels que *Stachys mialhesi* (Benmebarek et al., 2013).

Aussi ces résultats sont en accord avec ceux de l'Aribi et al. (2013) qui ont rapporté que l'administration des graines d' *Argania spinosa* (une espèce qui appartient à la famille des Lamiacées) chez la souris a augmenté l'indice phagocytaire à différentes concentrations.

Une autre étude de Benmebarek et al. (2014) a rapporté que l'extrait de *Stachys ocymastrum* augmente l'activité phagocytaire à faible concentration (50 mg/kg) en stimulant le système réticulo-endothélial, tandis que les concentrations élevées de 100 et 500 mg/kg de l'extrait diminuent considérablement l'activité phagocytaire, d'une manière dose-dépendante en inhibant l'endothélium du réticulum.

Le système réticulo-endothélial (R.E.S) est considérée comme la première ligne de défense et fonctionnellement reconnu par sa capacité à piéger les débris ou autres corps étrangers (Stuart et al., 1973).

Le taux d'élimination des particules de carbone par les phagocytes intra-vasculaires dans le foie et la rate qui sont considérés comme les principaux organes où les

macrophages éliminent les substances indésirables de la circulation, est mesuré par l'activité phagocytaire réticulo-endothélial (Dalmo et al., 1997).

Les résultats ont montré que l'augmentation de l'indice phagocytaire corrigé α n'est pas associée à une augmentation significative dans le poids du foie et de la rate, cette augmentation de l'activité phagocytaire est peut être due à une augmentation de l'activité tissulaire du système réticuloendothélial. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Cherdrungsi (1989) qui a signalé que l'exposition chronique des rats à des altitudes élevées stimule l'activité phagocytaire du système réticuloendothélial qui est due principalement à l'augmentation de l'activité tissulaire du système réticuloendothélial et non à l'activité des tissus hypertrophiés.

Dans cette étude, nous avons remarqué que l'extrait de l'espèce *Thymus guyonii* qui a la plus forte activité antiradicalaire et la plus forte teneur en composés phénoliques, aussi connus par son potentiel immunomodulateur (Woollard et al., 2007) ne montre aucune activité immunomodulatrice importante.

Cependant *Stachys circinnata* qui a une activité antiradicalaire modérée a montré la plus grande activité immunomodulatrice. L'extrait de *Salvia verbenaca* a montré une activité antiradicalaire modérée mais une importante activité immunomodulatrice. A partir de ces résultats, nous suggérons que cette différence est due à la différence dans la composition chimique des composés secondaires entre les trois extraits.

2-3-Etude *in vitro* de l'activité cytotoxique

L'étude de l'activité cytotoxique nous a clairement montré que les extraits butanoliques des trois espèces étudiées n'avaient pratiquement aucune activité cytotoxique sur la croissance cellulaire globale de la lignée cellulaire THP-1 soit aucun effet néfaste sur la viabilité cellulaire des THP-1 à la concentration 100 $\mu\text{g/ml}$, une concentration qui est considérée comme élevée.

Bien que les extraits testés contenant les flavonoïdes, plusieurs études ont montré que certains de ces composés notamment les alcaloïdes, les flavonoïdes et les saponosides possèderaient des propriétés anti-tumorales (Fiot et al., 2006).

Les flavonoïdes ne sont pas généralement cytotoxiques, mais cette efficacité dépend d'une part de leur glycolisation éventuelle et d'autre part de leur degré de méthylation (Sparg et coll, 2004).

Une étude cytotoxique réalisée par (Zeghib, 2013) sur la lignée cellulaire tumorale Vero a montré que l'huile essentielle de l'espèce *Thymus guyonii* n'exerce aucune activité antiproliférative.

Nos résultats montrent que les extraits de *Thymus guyonii*, *Stachys circinnata* n'ont pas un effet cytotoxique sur la multiplication des monocytes THP-1 puisque même à des concentrations très élevées comme 500µg/ml, le pourcentage de survie est resté supérieur et proche à 80%.

Tandis que l'extrait de l'espèce *Salvia verbenaca*, présente une diminution de la viabilité cellulaire des THP-1 qui a été obtenue de manière dose-dépendante avec une réduction significative (* p<0,05) aux concentrations 500 (61%) et 1000µg/ml (30%). L'activité cytotoxique de *Salvia verbenaca* peut être associée à la présence de métabolites secondaires toxiques présents dans la plante.

Les effets cytotoxiques des espèces appartenant au genre *Salvia* sur des lignées cellulaires tumorales a été également signalé (Cardile et al., 2009).

Selon l'étude de (Dehaghi, 2014) l'huile de *Salvia verticillata* a montré une activité cytotoxique sur les lignées cellulaires HT- 29, T -47D, Caco- 2 et NIH 3T3. D'autres études ont montré que , l' α - humulène et la β - caryophyllène des métabolites qui rentrent dans la composition des huiles essentiels des espèces du genre *Salvia* ont été décrits comme des composés cytotoxiques contre les lignées cellulaires A- 549 , DLD- 1 , M4BEU , HeLa , Bel- 7402 et CT- 26 (Legault et al.,2003; Sylvestre et al.,2005; Sylvestre et al.,2006; Hou et al.,2006).

Une autre étude a vérifié que à la fois le linalol et l' α -pinène présentent une activité cytotoxique contre le mélanome B16 murines et les HL- 60 cellules leucémiques humaines (Tatman et al., 2002). Le Limonène l'un des constituants qui se trouvait dans l'huile de *S. verticillata* (3,80%) a des effets chimio-protectrices contre quelques tumeurs des rongeurs et des humains (Ren et al.,1998), donc il est prévisible à observer l'activité cytotoxique contre l'examen des lignées cellulaires.

2-4-Cytotoxicité de l' homocystéine

Plusieurs études réalisées *in vivo* et *in vitro* ont montré les effets cytotoxiques de l'homocystéine, tandis que les concentrations dans lesquelles l'homocystéine devient un agent cytotoxique puissant induisant une mort cellulaire significative ne sont pas encore confirmées.

Notre étude réalisée sur les monocytes THP-1 par le test MTT a démontré que l'homocystéine provoque une décroissance de la viabilité cellulaire qui augmente en augmentant la concentration, mais elle n'est pas significativement cytotoxique.

Une autre étude réalisée *in vitro* par (Ferlazzo et al., 2008) sur la lignée cellulaire Neuro2a par le test MTT a démontré que le traitement avec 10-250 μM d'Hcy n'a pas affecté de manière significative le nombre de cellules viables par rapport aux témoins. Tandis que 500 μM d'Hcy a considérablement réduit la viabilité cellulaire.

Hemendinger et al. (2011) ont étudié *in vitro* la cytotoxicité de l'homocystéine sur des cellules hybrides & dérivées d'un motoneurone de neuroblastome (cellules couramment utilisées dans les études thérapeutiques dans la SLA). Cette étude confirme que l'homocystéine est toxique pour le motoneurone à des concentrations millimolaires, en induisant une activation de la caspase 3/7 et une apoptose, par un mécanisme indépendant de la génération des radicaux libres. Cette apoptose est inhibée par la méthylcobalamine, avec une diminution de l'activité de la caspase 3/7, alors que l'introduction de la tétrahydrofolate (THF) ne diminue pas l'apoptose.

Cependant une étude réalisée par (Škovierov et al., 2009) a révélé que les cellules humaines de glioblastome incubées *in vitro* avec l'homocystéine (50 μM) montre une décroissance de la viabilité cellulaire. La même étude a démontré que l'homocystéine est un agent toxique puissant capable d'induire la mort des cellules gliales humaines dans le cerveau chez des personnes atteintes de l'hyperhomocystéinémie (Selley et al., 2002). La même étude suggère que l'homocystéine est un agent cytotoxique même à des concentrations modérées variant entre (30-100 μM) par plusieurs mécanismes :

- Déclenchement de la mort cellulaire par une augmentation du stress oxydatif (Imamura et al., 2007).

- Agissant comme un agoniste pour les récepteurs du glutamate, par sa capacité à induire une augmentation dans le niveau de Ca_2^+ cytosolique (Olney et al., 1987; Lipton et al., 1997; Folbergrova et al., 2001 ; Ziemińska et al., 2003) en induisant des dommages de l'ADN et un changement dans l'énergie métabolique associé à la disponibilité réduite de l'ATP (Krugman et al., 2002).

2-5-Etude de la production des EROs

Dans notre étude, il est clair que le traitement des cellules THP-1 avec l' Hcy (100 μ M) pendant 24 h induit un stress oxydatif par la production des EROs dans les cellules THP-1.

In vitro, l'homocystéine provoque aussi des lésions des cellules endothéliales en fait, l'homocystéine est rapidement oxydée conduisant à la formation d'homocystéine de disulfures mixtes et d'homocystéine thiolactone.

L'oxydation du groupement -SH génère des composants très oxydants : anions superoxydes O_2^- , peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , et de radicaux hydroxyl OH^\cdot qui expliqueraient les lésions cellulaires observées. Ces radicaux favoriseraient la discontinuité des cellules endothéliales *in vitro* et la survenue de l'artériosclérose (Loscalzo,1996).

De nombreuses études suggèrent que l' homocystéine est impliqué dans un sens ou dans l'autre dans la génération des EROs, le mécanisme par lequel elle produit les EROs est lié au groupe thiol, qui est facilement oxydé dans le plasma et dans les milieux de culture en présence des catalyseurs métalliques de transition et l'oxygène moléculaire, conduisant à la formation des espèces réactives de l' oxygène (EROs) ou indirectement, en diminuant les taux d'enzymes antioxydantes intracellulaires tel que le glutathion peroxydase et la superoxyde dismutase qui sont impliqués dans l'élimination des EROs (Upchurch et al., 1996).

La surproduction des radicaux libres induite par le taux élevé d'Hcy est considérée comme l'un des mécanismes provoquant de nombreux effets pathologiques (Kanani et al ., 1999; Weiss et al. , 2002) tels que, les dommages dans les cellules de la paroi vasculaire, les lésions endothéliales , la différenciation des monocytes en macrophages (Weiss et al ., 2001; Loscalzo, 1996 ; Ataiel et al., 2012) et la mort neuronale par apoptose ou par nécrose (Sotoudeh et al., 2002). Il est également l'un

des mécanismes proposés pour induire des dommages d'ADN, la cancérogenèse et l'apoptose (Oikawa et al ., 2003; Skurk et al., 2004).

Une étude réalisée par (Tyagi et al., 2006) a montré que l'homocystéine active la PAR-4 (récepteur activé par la protéase) ce qui induit une production des espèces réactives de l'oxygène par une augmentation de l'enzyme NADPH oxydase et une diminution de l'enzyme thiorédoxine. L'augmentation du stress oxydatif via les EROs augmente également l'expression de la NO synthase inductible (iNOS) et la formation ultérieure du nitrotyrosine. L'Hcy diminue indirectement la NO synthase endothéliale (eNOS) en diminuant l'expression de la diméthylarginine diméthylaminohydrolase (DDAH), ce qui provoque l'accumulation de la diméthylarginine asymétrique (ADMA) et la production directe des EROs, causant une diminution de la biodisponibilité du NO sans aucun changement significatif dans les niveaux basiques du NO.

2-6-Dommages de l'ADN révélés par le test des comètes

Les tests de génotoxicité ont pour objet de détecter les dommages de l'ADN (direct ou indirect) engendrés par l'action d'agents génotoxiques.

Le test des comètes est une technique sensible permettant de mesurer de nombreuses atteintes à l'ADN (cassure simple et double brin, adduits à l'ADN instables).

L'absence de dommage de l'ADN, dans un type cellulaire à un moment donné, est attribuable soit réellement à l'absence d'agression, soit à une réponse adéquate de la cellule à l'agression, en particulier par l'induction d'une réponse immunitaire contrôlée, des mécanismes antioxydants, détoxifications et de réparations (Bals et Hiemstra, 2004, Gochfeld, 1997).

Dans la présente étude, nous avons examiné *in vitro* l'influence de l'homocystéine sur les monocytes THP-1 et les lymphocytes, en particulier la dégradation de l'ADN des monocytes THP-1 et des lymphocytes induite par l'homocystéine.

Notre objectif était d'observer les effets protecteurs des trois extraits (*Thymus guiyonii*, *Stachys circinnata* et *Salvia verbenaca*) sur la réduction des dommages de l'ADN induits par l'homocystéine.

Les dommages de l'ADN et la génotoxicité de l'homocystéine ont été mesurés avec le dosage des comètes sur les cellules THP-1. En présence de l'homocystéine les

dommages étaient extrêmement significative (* $p < 0,001$) exprimés par une longue queue de la comète et un pourcentage accru de l'ADN dans la queue de la comète. Selon (Kruman et al., 2000) les dommages de l'ADN, l'activation de la poly-ADP-ribose polymérase (PARP) et l'induction de la protéine p53 par l'homocystéine sont impliqués dans l'apoptose neuronale.

La dégradation de l'ADN est liée aussi à un taux élevé des EROs principalement le radical hydroxyle (OH^\cdot) qui est un ERO très réactif et réagit avec l'ADN (Dizdaroglu, 1993).

Cependant, d'autres EROs comme le superoxyde (O_2^\cdot) ou le H_2O_2 sont impliqués dans sa production (Eberhardt et al., 2001).

Les dommages de l'ADN peuvent être sous la forme des sites abasiques, des modifications dans les bases d'ADN, des lésions de sucre ou des ruptures simples et doubles brins.

Dans le cas de l'exposition à l'homocystéine seul, nous avons remarqué une dégradation de l'ADN des cellules THP-1. Bien que la concentration d'homocystéine utilisée n'a pas diminué la viabilité cellulaire d'une manière significative selon les résultats obtenus, les trois extraits avec les deux concentrations testées ont montré une puissante capacité à réduire les dommages de l'ADN, les mécanismes potentiels derrière ces propriétés protectrices contre les dommages de l'ADN peuvent être liés aux activités antiradicalaires de ces plantes qui appartiennent à la famille des Lamiacées connue avec des niveaux élevés d'antioxydants alimentaires en particulier les polyphénols (Weiss et al., 2001; Halvorsen et al., 2006).

Les polyphénols sont considérés comme des antioxydants naturels qui jouent un rôle important dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs ces derniers sont responsables des activités anticancéreuses y compris l'activité pro-apoptotique, l'activité qui endommage l'ADN et l'activité anti-angiogénique (Leong et al., 2010).

Dans cette étude, la longueur de la queue de chaque comète et la quantité d'ADN dans la queue de comète ont été significativement diminuées dans tous les groupes des cellules traitées avec les extraits testés par rapport à la longueur de la queue de la comète et la quantité d'ADN dans la queue de la comète dans le groupe des cellules traitées uniquement avec l'homocystéine (cellules exposées à l'homocystéine sans extraits, * $p < 0,001$).

Cependant, l'effet le plus efficace sur la réduction des dommages de l'ADN a été observé avec l'extrait de *S.circinnata* et *T.guyonii* dont les concentrations sont 10 µg/ml et 1 µg/ml respectivement.

La concentration 1µg/ml de l'extrait *Thymus guyonii* a montré une grande efficacité où l'effet protecteur de l'extrait est resté très élevé (85,641), même après l'incubation des lymphocytes avec une concentration très élevée d'homocystéine (250µM).

Ce potentiel effet protecteur contre les dommages de l'ADN induits par l'homocystéine peut être lié à leur composition chimique riche en composés phénoliques (Ghorab et al., 2014).

A la lumière des résultats obtenus les extraits de *Thymus guyonii*, *Stachys circinnata* et *Salvia verbenaca* peuvent être en mesure de diminuer le stress oxydatif induit par l'homocystéine ainsi avoir une activité thérapeutique contre les dommages de l'ADN.

Conclusion

Conclusion

La particularité des plantes médicinales est d'être une source riche et exclusive d'une grande diversité des composés bioactifs qui participent à leurs effets santé. Si les phytomicronutriments ne sont pas essentiels pour la croissance et le développement des grandes fonctions de l'organisme, ils pourraient jouer un rôle déterminant dans le maintien de la santé ou de la réduction du risque de maladie à l'âge adulte et au cours du vieillissement. Cela signifie qu'ils pourraient être indispensables pour augmenter la qualité de vie en réduisant l'incidence des maladies chroniques liées à l'âge.

Le présent travail a porté sur l'étude phytochimique de *Thymus guyonii*, *Stachys circinnata* et *Salvia verbenaca*, trois espèces médicinales et endémiques appartenant à la famille des Lamiaceae. Ces trois plantes sont utilisées dans la médecine traditionnelle Algérienne.

L'étude bibliographique préalable réalisée sur les trois espèces a montré qu'il ya très peu d'informations sur ces plantes concernant surtout leurs activités biologiques. Pour cette raison, nous avons réalisée des analyses *in vivo* et *in vitro* afin de mettre en évidence quelques activités biologiques.

Dans l'analyse *in vitro* nous avons analysé l'activité antioxydante et en incubant nos extraits avec les cellules THP-1 en présence d'un taux élevé d'homocystéine nous avons évalué l'activité cytotoxique, anti-génotoxique ainsi que leur aptitude à diminuer la quantité des EROs produite.

Les résultats de nos travaux ont montré l'existence de l'activité antiradicalaire dans les trois extraits testés mais une très forte activité anti radicalaire a été remarquée dans l'extrait de *Thymus guyonii* par rapport aux deux autres extraits.

Le test MTT a révélé que les extraits étudiés n'exercent aucun effet cytotoxique sur les cellules THP-1 surtout dans la gamme des concentrations testée sauf l'extrait *Salvia verbenaca* qui a causé une baisse significative de viabilité avec la concentration 1000µg/ml.

Le test de quantification des EROs par la H₂DCF-DA a révélé que l'homocystéine induisait une hausse de la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs).

Cependant la quantité des EROs produite en présence des extraits diffère d'un extrait à un autre. L'extrait *Thymus guyonii* ne provoque qu'une très faible quantité des EROs, alors que les deux autres extraits de *Stachys circinnata* et *Salvia verbenaca* montre une quantité très importante des EROs, elle est même plus élevée que la

quantité produite par l'homocystéine (100 μ M et 1000 μ M) cela signifie que les deux extraits peuvent avoir une activité prooxydante.

Le test des comètes a été utilisé pour évaluer l'effet génotoxique de l'homocystéine sur les cellules THP-1 monocytes, nos résultats ont montré que la concentration 100 μ M de l'homocystéine provoque une fragmentation significative de l'ADN des monocytes, tandis que l'incubation des monocytes avec l'homocystéine et les différents extraits testés montre l'absence de fragmentation de l'ADN où les noyaux gardent leurs états sphériques. Cela signifie que les trois extraits peuvent avoir un effet antigénotoxique protecteur de l'ADN.

L'analyse *in vivo* a été réalisée sur des souris appartenant à l'espèce *Mus musculus* dans le but d'évaluer l'activité immun-modulatrice des trois extraits étudiés cette analyse a montré que l'extrait de *Stachys circinnata* et *Salvia verbenaca* exhibèrent une activité immuno-modulatrice dont la plus forte revient à l'extrait de *Stachys circinnata*. Cependant, l'extrait de *Thymus guyonii* ne montre aucune activité stimulante pour le système immunitaire.

Le présent travail nous a permis de mettre en évidence quelques activités biologiques des extraits étudiés mais notre étude nécessite d'être complétée par un certain nombre de travaux.

Finalement nous espérons avoir apporté notre modeste contribution à la valorisation de la médecine traditionnelle pour parvenir à mettre à la disposition de la population quelques activités à base de plantes médicinales efficaces et accessibles.

Perspectives

Ce travail a pu fournir des données sur quelques activités *in vivo* et *in vitro* des trois extraits étudiés, mais il serait mieux d'enrichir cette étude en utilisant d'autres techniques de biologie moléculaires tels que la PCR en temps réel afin de voir l'expression de certains gènes en présence des extraits.

Nous espérons aussi utiliser des techniques de biologie moléculaires afin d'évaluer l'effet des trois extraits sur les activités de quelques enzymes antioxydantes tel que SOD dismutase et la catalase.

Aussi appliquer d'autres stratégies associatives pour répondre à la question de la génotoxicité de l'homocystéine afin de déterminer précisément les effets mutagènes, associés.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Adom KK., Liu RH. (2002). Antioxidant activity of grains. *J. Agric Food Chem.*, 50 (21): 6182-6187

Agardh CD., Agardh E., Andersson A. (1994). Lack of association between plasma homocysteine levels and microangiopathy in type 1 diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest.*, 54(8) : 637-41.

Alía M., Ramos S., Mateos R., Granado-Serrano AB., Bravo L., Goya L. (2006). Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 212(2):110-118.

Alizadeh A., Shaabani M. (2012). Essential oil composition, phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity in *Salvia officinalis* L. cultivated in Iran. *Advances in Environmental Biology.*, 6(1) : 221-226.

Anderson OM., Jordheim M. (2006). The anthocyanins. In *Flavonoids: Chemistry Biochemistry and Applications* Anderson,OM., Markham KR., Eds.,CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton FL. USA., p: 472-551.

Aribi B., Zerizer S., Kabouche Z. (2013). Immunomodulatory activity of *Argania Spinosa* seeds. *Int J Pharm Pharm Sci.*, 5(3):488-91.

Askarne L., Talibi I., Boubaker H., Boudyach EH., Msanda F., Saadi B., Ait BenAoumar, A. (2013). Use of Moroccan medicinal plant extracts as botanical fungicide against citrus blue mould. *Lett Appl Microbiol.*, 56(1):37-43.

Ataie1 A., Ataee A., Shadifar M., Shahabi S., Aghajanpour Hosseinpour Y. (2012). Interaction of Memantine with Homocysteine on the Apoptosis in the Rat Hippocampus c lls. *IJMCM* .,1(3): 145-152.

Atkin MA., Gasper A., Ullegaddi R. (2005). Oxidative susceptibility of unfractionated serum or plasma : response to antioxidants in vitro and to antioxidants supplementation. *Clin Chem.*, 51(11): 2138-2144.

Aviana A., Edadi R., Tahmasebi G. (2002). Laboratory evaluation of some plants essentielles of control *Varroa destructor* experimental and applied. *Acarology.*, 27(4): 319-327.

Ballas SK., Saidi, P. (1997). Thrombosis megaloblastic anaemia and sickle cell disease : a unified hypothesis. *Br J Haematol.*, 96(4) : 879-80.

Bals R., Hiemstra PS. (2004). Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J.*, 23(2): 327-33.

Bayer E., Buttler KP., Finkenzeller X., Grau J (1990). Guide de la flore méditerranéenne. Delachaux et Niestlé. Paris., p: 179.

Beaudeau JL., Jacob N., Giral P . (2001). Nouveaux marqueurs biologiques non lipidiques de l'athérosclérose. *Ann Med Interne.*, 152(27): 169-179.

Bektas., Munevver TS., Askin AH., Dimitra D., P. Moschos P., Atalay S. (2005). Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* sub sp. *Sipyleus* var. *rosulans*. *J. Food Engin.*, 66: 447-454.

Beniston, WS. (1984). Fleurs d'Algérie. Alger, Algérie. Ed Entreprise National du Livre.

Benmebarek A., Zerizer S., Lakhel H., Kabouch Z. (2014). Biphasic dose response effect of *Stachys Ocymastrum* on the reticuloendothelial system phagocytic activity. *Int J Pharm Pharm Sci .*, 6(9):975-1491.

Benmebarek A., Zerizer S., Laggoune S., Kabouche,Z. (2013). Immunostimulatory activity of *Stachys mialhesi* de Noé. *Allergy Asthma Clin Immunol.*, 9(1): 1492-9.

Bidié A., N'Guessan BB., Yapo AF., N'Guessan JD., Djaman AJ. (2011). Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences et Nature.*, 8:1-11

Biozzi G., Benacerraf B., Halpern BN. (1970). Effet de la vaccination par *Plasmodium berghei* irradié sur l'activité phagocytaire du système réticuloendothélial au cours de l'infection du rat par ce plasmodium. *Bull World Health Organ.*, 42(1):163-8.

Bonaa KH., Njolstad I., Ueland PM., Schirmer H., Tverdal A., Steigen T., Wang H., Nordrehaug JE., Arnesen E., Rasmussen K. (2006). Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med.*, 354(15): 1578-88.

Bonnier G. (1990). La grande flore en couleurs de Gaston Bonnier. France, Suisse, Belgique et pays voisins. 4 tomes. Editions Belin. Paris., p: 1401.

Boushey CJ., Beresford SA., Omenn GS., et al. (1995). A quantitative assessment of plasma homocysteine as a factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA.*, 274(13): 1049-1057.

Bray L. (2005). Phylogénie des Angiospermes. <http://www.botanique.org>.

Brescia P., Banks P. (2009). Quantifying cytotoxicity of thiostrepton on mesothelioma cells using MTT assay and the epoch microplate spectrophotometer. BioTek Instruments.

Brosnan JT., Jacobs RL., Stead LM., Brosnan ME. (2004). Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism. *Acta Biochim Pol.*, 51(2): 405-13.

Burits M., Bucar F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phyto Ther Res.*, 14(5):323-8.

Cacoub P., Gatel A., Sbai A. (1996). Hyperhomocystéinémie athérosclérose et thromboses artérielles et veineuses. *Ann Méd Interne.*, 147: 352-360.

Camacho-Barquero L., Villegas I., Sanchez-Calvo JM., Talero E., Sanchez-Fidalgo S., Motilva V., Alarcon de la Lastra C. (2007). Curcumin a Curcuma longa constituent acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. *Int Immuno Pharmacol.*, 7(3): 333-342.

Cantino. (1999). Caryopteris (Lamiaceae) and the conflict between phylogenetic and pragmatic considerations in botanical nomenclature - Systematic botany . Quarterly journal of the American Society of Plant Taxonomists., 23(3): 369-386.

Carbonaro M., Grant G., Pusztai A. (2001). Evaluation of polyphenol bioavailability in rat small intestine. *Eur J Nutr.*, 40(2): 84-90.

Cardile V., Russo A., Formisano C., Rigano D., Senatore F., Arnold NA., Piozzi F. (2009). Essential oils of *Salvia bracteata* and *Salvia rubifolia* from Lebanon: chemical composition antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells. *J Ethnopharmacol.*, 126(2): 265-272.

Carmichael J., De Graff WG., Gazdar AF., Minna, JD., Mitchell JB. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, 47(4): 936-942.

Caruso D., Visioli F., Patelli R., Galli C., Galli G. (2001). Urinary excretion of olive oil phenols and their metabolites in humans. *Metabolism.*, 50(12): 1426-1428.

Caussé E. (2008). Intérêt du dosage de l'homocystéine en médecine générale. 20ème Forum Médical de Ranguel.

Caussé E., Candito M., Charpiot P. (2001) Journée nationale d'homocystéine Toulouse 21 septembre 2001. *Ann Biol Clin.*, 59: 339-353.

Chamberlin ME., Ubagai T., Mudd SH., Thomas J., Pao VY., Nguyen TK., Levy HL., Greene C., Freehauf C., Chou JY.(2000). Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: novel mutations and clinical variations. *Am J Hum.*, 66(22): 347-55.

Chandrasekara A., Shahidi F. (2010). Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *J. Agric Food Chem.*, 58(11): 6706-6714.

Chango A., Potier D., Courcy G. (2000). L' 5,10-méthylentetrahydrofolate reductase common mutations folate status and plasma homocysteine in healthy French adults of the Supplementation en Vitamines et Minéraux Antioxydants cohort. *Br J Nutr.*, 84(6): 891-896.

Charpentier JP., et Boizot N. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Amélioration génétique et physiologie forestières. INRA., p: 79.

Cherdrungsi P. (1989). Reticuloendothelial phagocytic activity in high altitude acclimatized rats. *Aviation Space and Environmental Medicine.*, 60(4): 329-31.

Chow HH., Hakim IA., Vining DR., Crowell JA., Ranger-Moore J., Chew WM., Celaya CA., Rodney SR., Hara Y., Alberts DS. (2005). Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of Polyphenon E in healthy individuals. *Clin. Cancer Res.*, 11(12): 4627-4633.

Chung KT., Wong TY., Huang YW., Lin Y. (1998). Tannins and human health : a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.*, 38(6): 421-464.

Clarke R., Den Heijer M., Sherliker P. (2003). Homocysteine and risk of cardiovascular disease and venous thrombosis in Arnout J., de Gaetano G., Hoylaerts M., Peerlinck K., Van Geet C., Verhaeghe R. Ed., *Thrombosis. Fundamental and clinical aspects.* Leuven University Press Leuven., 25: 353-370.

Collett GP., Campbell FC. (2004). Curcumin induces c-jun N-terminal kinase-dependent apoptosis in HCT116 human colon cancer cells. *Carcinogenesis.*, 25(11): 2183-2189.

Congo M. (2012). Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliférative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica* L. (Salvadoraceae). Thèse de pharmacie. Université d'Ouagadougou. Burkina Faso., p: 42.

Conri C., Constans J., Parrot F. (2000). Homocystéinémie : rôle en pathologie vasculaire. *La Presse Médicale.*, 29: 737-741.

Corona G., Tzounis X., Assunta Dessi M., Deiana M., Debnam ES., Visioli F., Spencer JP. (2006). The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation. *Free Radic. Res.*, 40(6): 647-658.

Cosentino S., Tuberoso CI., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F. (1999). *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Lett Appl Microbiol.*, 29(2):130-135.

Covas MI. (2007). Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacol Res.*, 55(3): 175-186.

Craig WJ. (1999). Health-promoting properties of common herbs. *Am J Clin Nutr.*, 70(3): 491-499.

Cravo ML., Gloria LM., Selhub J., Nadeau ,MR., Camilo ME., Resende MP., Cardoso JN., Leitao CN., Mira FC. (1996). Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism : correlation with folate vitamin B-12 and vitamin B-6 status. *Am J Clin Nutr.*, 63(2): 220-4.

Dharmananda S. (2003). Gallnuts and the Uses of Tannins in Chinese Medicine.

Dalmo RA., Ingebrigsten K., Bogwald J. (1997). Non-specific defense mechanisms in fish with particular reference to the reticulo-endothelial system (RES). *J Fish Dis .*, 20: 241-73.

Dasgupta B., Milbrandt J. (2007). Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci. USA.*, 104(17): 7217-7222.

De Boer VC., de Goffau M.C., Arts I.C., Hollman PC., Keijer J. (2006). SIRT1 stimulation by polyphenols is affected by their stability and metabolism. *Mech Ageing Dev.*, 127(7): 618-627.

Dehaghi K ., Ostad SN., Maafi N., Pedram S., Ajani Y., Hadjiakhoondi A., Khanavi M. (2014). Cytotoxic activity of the essential oil of *Salvia verticillata* L. *Res J of Pharmacognosy .*, 1(3): 27-33.

De la Torre-Carbot K., Jauregui O., Castellote AI., Lamuela-Raventós RM., Covas MI., Casals I., López-Sabater MC. (2006). Rapid high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry method for qualitative and quantitative analysis of virgin olive oil metabolites in human low-density lipoproteins. *J. Chromatogr. A.*, 1116(2): 69-75.

Dedoussis GV., Kaliora AC., Psarras S., Chiou A., Mylona A., Papadopoulos NG., Andrikopoulos NK. (2004). Antiatherogenic effect of *Pistacia lentiscus* via GSH restoration and down regulation of CD36 mRNA expression. *Atherosclerosis.*, 174(2): 293-303.

Delattre J., Beaudoux JL., Bonne font-Rousselot D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant aspects biologiques et pathologiques. Première édition. Ed. Tec et Doc Lavoisier. Paris., p: 547.

Dell'Agli M., Busciala A., Bosisio E. (2004). Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc. Res.*, 63(4): 593-602.

Demuth K., Drunat S., Paul JL., Moatti N. (2000). Hyperhomocystéinémie et athérosclérose. *Synthèse* 16(10) : 1881-90.

Den Heijer M., Koster,T., Blom HJ., Bos GMJ., Briët E., Reitsma PH., Vandenbroucke JP., Rosendaal FR. (1996). Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med.*, 334 : 759-62.

Dikalov S., Griending KK., Harrison DG. (2007). Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies. *Hypertension.*, 49(4):717-727.

Di Pietro A., Visalli G., La Maestra S. (2008). Biomonitoring of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of subjects with dental restorative fillings. *Mutat res.*, 650(2): 115-122.

Disilvestro RA. (2001). Flavonoids as Antioxidants. In *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*; Wildman REC., Ed.,CRC Press: Boca Raton FL. USA., p: 127-142.

Dizdaroglu M. (1993). Chemistry of Free Radicals Damage to DNA and nucleoproteins. in *DNA and free radicles*. Ed Halliwell B Aruoma OI Ellis horwood Ltd Chichester. UK., p: 19-39.

Dorman HJD., Bachmayer O., Kosar M., Hiltunen R.(2004). Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in turkey. *J Agric Food Chem.*, 52(4):762-70.

Drewnowski A., Gomez-Carneros C. (2000). Bitter taste phytonutrients and the consumer: a review. *Am J of Clin Nutr.*, 72(6): 1424-1435.

Ducros V., Candito M., Caussé E., Couderc R., Demuth K., Diop ME ., Drai J., Gachon AM., Garcia I., Gerhardt MF., Philippe-Bourgeois C., Read MH., Sauvart MP. (2001). Dosage de l'homocystéine plasmatique : étude des facteurs de variation pré-analytiques sur la concentration en homocystéine plasmatique totale. *Ann de Bio Clinique.*, (59) 1: 33-9.

Duthie GG., Brown KM. (1994). Reducing the risk of cardiovascular disease. In *Functional Foods: Designer Foods Pharma foods Nutraceuticals*; Goldberg I., Ed.; Chapman & Hall: New York. USA., p: 19-38.

El Beyrouthy M., Arnold-Apostolides N., Dupont F. (2009). Trichomes morphology of six Lebanese species of *Stachys* (Lamiaceae). *Fl Medit.*, 19: 129-139.

Esparza I., Salinas I., Santamaria C., Garcia-Mina JM., Fernandez JM. (2005). Electrochemical and theoretical complexation studies for Zn and Cu with individual polyphenol. *Analytica Chimica Acta.*, 543(1): 267-274.

Exarchou V., Godejohann M., Van Beek TA., Gerothanassis IP., Vervoort J LC. (2003). UV-solid-phase extraction-NMR-MS combined with a cryogenic flow probe and its application to the identification of compounds present in Greek oregano. *Anal Chem.*,75(22): 6288-94.

Fairbairn DW., Olive PL., O'Neill KL. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res.*, 339(1):37-59.

Faraci FM., Lentz SR. (2004). Hyperhomocysteinemia oxidative stress and cerebral vascular dysfunction. *Stroke.*, 35(2): 345-347.

Ferlazzo N., Condello S., Currò M., Parisi,G., Ientile R., Caccamo D . (2008). NF-kappaB activation is associated with homocysteine-induced injury in Neuro2a cells. *BMC Neuroscience.*, 9:62-67

Fiot J., Sanon S., Azas N., Mahiou V., Jansen O., Angenot L., Balansard G., Ollivier E. (2006). Phytochemical and pharmacological study of roots and leaves of *Guiera Senegalensis* J.F. Gmel (Combretaceae). *J of Enthopharmacology.*, 106(2): 173-178.

Fki I., Sahnoun Z., Sayadi S. (2007). Hypocholesterolemic effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol recovered from olive mill wastewater in rats fed a cholesterol-rich diet. *J. Agric Food Chem.*, 55(3): 624-631.

Folbergrova J., Haugvicova R., Mares P. (2001). Attenuation of seizures induced by homocysteine acid in immature rats by metabotropic glutamate group II and group III receptor agonists. *Brain Res.*, 908: 120-129.

Garazd MM., Garazd YL., Khilya VP. (2003). Neoflavones. 1. Natural distribution and spectral and biological properties. *Chem Nat Comp.*, 39(1): 54-121.

Garcia-Alloza M., Borrelli LA., Rozkalne A., Hyman BT., Bacsikai BJ. (2007). Curcumin labels amyloid pathology *in vivo* disrupts existing plaques and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. *J. Neurochem.*, 102(4): 1095-1104.

Ghorab H., Kabouche A., Kabouche Z. (2014). Comparative compositions of essential oils of *Thymus* growing in various soils and climates of North Africa. *J. Mater. Environ Sci.*, 5(1): 298-303.

Gochfeld M. (1997). Factors influencing susceptibility to metals. *Environ Health Perspect.*, 105(4): 817-22.

Gonthier MP., Donovan JL., Texier O., Felgines C., Remesy C., Scalbert A. (2003). Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radic Biol Med.*, 35(8): 837–844.

Gouedard C., Barouki R., Morel Y. (2004). Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Mol Cell Biol.*, 24(12): 5209-5222.

Grayer RJ., Veitch NC. (2006). Flavanones and dihydroflavonols. In *Flavonoids: Chemistry Biochemistry and Applications* Anderson OM., Markham KR., Eds., CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton FL. USA., p: 918-1002.

Guignard JL. (2001). *Botanique systématique moléculaire.* Masson. Paris.

Guilland JC., Favier A., Potier de Courcy G. (2003). L'hyperhomocystéinémie : facteur de risque ou simple marqueur ?. *Patho Bio.*, 51(2): 101-110.

Guilliams TG. (2004). Homocysteine – A Risk Factor for Vascular Diseases: Guidelines for the Clinical Practice. *The J of the Am Nutraceutical Association.*,7(1): 11-23.

Haleng J., Pincemail J., Defraigne JO., Charlier C., Chapelle JP. (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liege.*, 62(10): 628-638.

Halliwell B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Arch Biochem Biophys.*, 476: 107-112.

Halvorsen BL., Carlsen MH., Phillips KM. (2006). Content of redox-active compounds (ie antioxidants) in foods consumed in United States. *Am J Clin Nutr.*, 84(1): 95-135.

Hankey GJ., Eikelboom JW.(1999). Homocysteine and vascular disease. *Lancet.*, 354: 407-413.

Hare J. (2004). Nitroso-redox balance in the cardiovascular system. *N Engl J Med.*, 351(9): 2112-2114.

Hartman RE., Shah A., Fagan AM., Schwetye KE., Parsadanian M., Schulman RN., Beth Finn M., Holtzman DM. (2006). Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.*, 24(3): 506-515.

Haslam E. (1989). Plant polyphenols - Vegetal tannins revisited: Cambridge University Press (Bio Essays volume 12).UK., p: 230.

Hemendinger RA., Armstrong EJ., Brooks BR. (2011). Methyl Vitamin B12 but not methylfolate rescues a motor neuron-like cell line from homocysteine-mediated cell death. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 251(3): 217-25.

Henning S.M., Niu Y., Liu Y., Lee NH., Hara Y., Thames GD., Minutti RR., Carpenter CL., Wang H., Heber D. (2005). Bioavailability and antioxidant effect of epigallocatechin gallate administered in purified form versus as green tea extract in healthy individuals. *J Nutr Biochem.*, 16(10): 610-616.

Henning SM., Niu Y., Lee NH., Thames GD., Minutti RR., Wang H., Go VL., Heber D. (2004). Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea black tea or a green tea extract supplement. *Am. J. Clin. Nutr.*, 80(6): 1558-1564.

Ho CT., Osawa T., Huang MT., Rosen RT. (1994). Food Phytochemicals for Cancer Prevention II: Teas Spices and Herbs. American Chemical Society Washington DC.

Holst B., Williamson G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current opinion in biotechnology.*, 19(2): 73-82.

Hou J., Sun T., Hu J., Chen S., Cai X., Zou G. (2006). Chemical composition cytotoxic and antioxidant activity of the leaf essential oil of *Photinia serrulata*. *Food Chem.*, 103(2): 355-358.

Huang J., de Paulis T., May JM. (2004). Antioxidant effects of dihydrocaffeic acid in human EA.hy926 endothelial cells. *J. Nutr. Biochem.*, 15(12): 722-729.

Hynes MJ., O’Coinceanainn M. (2001). The kinetics and mechanisms of the reaction of iron(III) with gallic acid gallic acid methyl ester and catechin. *J of Inorganic Biochemistry.*, 85(3): 131-142.

Imamura K., Takeshima T., Nakaso,K., Nakashima K. (2007). Homocysteine is toxic for dopaminergic neurons in primary mesencephalic culture. *Neuroreport.*, 18(13): 1319-1322.

Janosik M., Kery V., Gaustandes M., Maclean KN., Kraus JP. (2001). Regulation of human cystathionine beta-synthase by S-adenosyl-L-methionine: evidence for two catalytically active conformations involving an autoinhibitory domain in the C-terminal region. *Biochemistry.*, 40(35):10625–10633.

Jasna M., Sanja P., Snježana K., Stanzer D., Andrea S., (2012) . Spirit drinks: a source of dietary polyphenols. *Croat. J. Food Sci. Technol.*, 4(2): 102-111.

Judd WS., Campbell CS., Kellogg EA., Stevens P. (2002). Botanique systématique – une perspective phylogénétique. De Boeck Université Paris et Bruxelles.

Kakhlon O., Cabantchik ZI. (2002). The labile iron pool: characterization measurement and participation in cellular processes1. *Free Radical Biology & Medicine.*, 33(8): 1037-1046.

Kanani PM., Sinkey CA., Browning RL., Allaman M., Knapp HR., Haynes WG. (1999). Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocysteinemia in humans. *Circulation.*, 100(11): 1161- 1168.

Katsarou A.,Rhizopoulou S., Panagiotis K., (2012). Antioxidant Potential of the Aerial Tissues of the Mistletoe *Loranthus europaeus* Jacq. *Rec Nat Prod.*, 6(4): 394-397.

Kawaii S., Tomono Y., Katase E., Ogawa K., Yano M. (1999). Quantitation of flavonoid constituents in *Citrus* fruits. *J Agric Food Chem.*, 47(9): 3565-3571.

Kerry N., Rice-Evans C. (1999). Inhibition of peroxynitrite-mediated oxidation of dopamine by flavonoid and phenolic antioxidants and their structural relationship. *J. Neurochem.*, 73(1): 247-253.

Khan NQ., Lees DM., Douthwaite JA., Carrier MJ., Corder R. (2002). Comparison of red wine extract and polyphenol constituents on endothelin-1 synthesis by cultured endothelial cells. *Clin Sci. (Lond).*, 103(48): 72-75.

Kianbakht S., Abasi B., Perham M., Hashem Dabaghian F. (2011). Antihyperlipidemic effects of *Salvia officinalis* L. leaf extract in patients with hyperlipidemia: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Phytother Res.* , 25(12):1849-1853

Kim HY., Park EJ., Joe EH., Jou I. (2003). Curcumin suppresses Janus kinase-STAT inflammatory signaling through activation of src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2 in brain microglia. *J Immunol.*, 171(11): 6072-6079.

Kim KH., Tsao R., Yang R., Cui SW. (2006). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chem.*, 392(95): 466-473.

Koutroubakis IE., Malliaraki N., Dimoulios PD., Karmiris K., Castanas E., Kouroumalis EA. (2004). Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.*, 495(9): 1433-7.

Kruman H., Culms C., Chan LS., Kruman Y., Guo Z1., Penix L., (2000). Homocysteine Elicits a DNA Damage Response in Neurons That Promotes Apoptosis and Hypersensitivity to Excitotoxicity. *JNeurosci.*, 20(18): 6920-6926.

Kundu JK., Chun KS., Kim SO., Surh YJ. (2004). Resveratrol inhibits phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression in mouse skin: MAPKs and AP-1 as potential molecular targets. *Biofactors.*, 21(4): 33-39.

Kunnumakkara AB., Guha S., Krishnan S., Diagaradjane P., Gelovani J., Aggarwal BB. (2007). Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation angiogenesis and inhibition of nuclear factor kappaB- regulated gene products. *Cancer Res.*, 67(94): 3853-3861.

Kuo HK., Sorond FA., Chen JH. (2005). The role of homocysteine in multisystem age-related problems: a systematic review. *J Gerontol A BiolSci Med Sci.*, 60(9): 1190-1201.

Laggoune S. (2011). Etude phytochimique et biologique de plantes médicinales du genre *Stachys*. Thèse de doctorat. Université Mentouri. Constantine., p: 127

Laggoune S., Brouard I., Leon F., Calliste CA., Duroux JL., Bermejo J., Kabouche Z and Kabouche A. (2011). Lignans and an Abundant flavones glycoside with Free-Radical Scavenging Activity from the Roots of the Endemic Species *Stachys mialhesi* de Noé. *Rec Nat Prod.*, 5(3): 238-241.

Lahsissene H., Kahouadji A., Tijane M., et Hseini S. (2009). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de zaër (Maroc occidental). *Lejeunia.*, 186:0457-4184.

Lawson DH., Murray RM., Parker JLW (1972). Early mortality in the megaloblastic anaemias. *Quart J Med.*, 41(7): 1-14.

Lee LT., Huang YT., Hwang JJ., Lee PP., Ke FC., Nair MP., Kanadaswam C., Lee MT. (2002). Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells. *Anticancer Res.*, 22(3): 1615-1627.

Legault J., Dahl W., Debiton E., Pichette A., Madelmont JC. (2003). Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. *Planta Med.*, 69(5): 402–407.

Lehbili M., Chibani S., Kabouche A., Semra Z., Smati FS., Abuhamdah Touzani R., Kabouche Z. (2013). Composition antibacterial and antioxidant activity of the essential oil of *Thymus guyonii* de Noé from Algeria. *Der Pharmacia Lettre.*, 5(2): 306-310.

Leong CAN., Kinjo Y., Tako M., Iwasaki H., Oku H., Tamaki H. (2010). Flavonoid Glycosides in the Shoot Sys-tem of *Okinawa taumu* (Colocasia). *Food chemistry.*, 119(2): 630-635.

Li YT., Shen F., Liu BH., Cheng GF. (2003). Resveratrol inhibits matrix metalloproteinase-9 transcription in U937 cells. *Acta Pharmacol. Sin.*, 24(11): 1167-1171.

Lipton SA., Kim WK., Choi YB., Kumar S., D'emilia DM., Rayudu PV., Arnelle DR., Stamler JS. (1997). Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the Nmethyl- D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 94(11): 5923-5928.

Lonn E., Yusuf S., Arnold MJ., Sheridan P., Pogue J., Micks M., McQueen MJ., Probstfield J. (2006). Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med.*, 354(15): 1567–77.

Loscalzo J. (1996). The oxidant stress of hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest.*, 98(1) : 5-7.

Maiti TK., Chatterjee J., Dasgupta S. (2003). Effect of green tea polyphenols on angiogenesis induced by an angiogenin-like protein. *Biochem.Biophys. Res Commun.*, 308(1): 64-67.

Malinow MR., Nieto FJ., Kruger WD., Hess DL., Gluckman RA., Block PC., Holzgang CR., Anderson PH., Seltzer D., Upson B., Lin QR. (1997). The effects of folic acid supplementation on plasma total homocysteine are modulated by multivitamin use and methylenetetrahydrofolate reductase genotypes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 17(6): 1157-62.

Manach C., Donovan JL. (2004). Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic Res.*, 38(8): 771-785.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.*, 79(5): 727-747.

Martin S., Andriambeloson E., Takeda K., Andriantsitohaina R. (2002). Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production. *Br J Pharmacol.*, 135(6): 1579-1587.

Mayer EL., Jacobsen DW., Robinson K. (1996). Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.*, 27(3): 517-27.

Mazur WM., Duke JA., Wahala K., Rasku S., Adlercreutz H. (1998). Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in Humans. *J. Nutr. Biochem.*, 9(4): 193-200.

McCallum JL., Yang R., Young JC., Strommer JN., Tsao R. (2007). Improved high performance liquid chromatographic separation of anthocyanin compounds from grapes using a novel mixed-mode ion-exchange reversed-phase column. *J. Chromatogr.*, 1148(1): 38-45.

Milner JA. (1994). Reducing the risk of cancer. In *Functional Foods: Designer Foods Pharmafoods Nutraceuticals*; Goldberg I., Ed.; Chapman & Hall: New York NY. USA., p: 39-70.

Miro-Casas E., Covas ML., Farre M., Fito M., Ortuño J., Weinbrenner T., Roset P., De la Torre R. (2003). Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clin Chem.*, 49(6): 945-952.

Molina MF., Sanchez-Reus I., Iglesias I., Benedi J. (2003). Quercetin a flavonoid antioxidant prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. *Biol. Pharm. Bull.*, 26(10): 1398-1402.

Morales R. (1997). Synopsis of the genus *Thymus* L in the Mediterranean area. *Logascalia.*, 19(2): 249-262.

Moreau F. (1960). Botanique: procaryotes (cyanophites et bactéries). Eucaryotes (algues champignons et végétaux supérieurs). La plante dans ses rapports avec le milieu." Ed. Paris Gallimard.

Motohashi H., Yamamoto M. (2004). Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol. Med.*, 10(11): 549-557.

Mouchabac S. (2008). Homocystéine hyperhomocystéinémie et dépression. *Tendances et Débats.*, 32(2) : 9 – 18.

McCully KS. (1969). Vascular pathology of homocystéinemia: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Pathol.*, 56:111-112.

Mudd SH., Levy HL. (1995). Plasma homocyst(e)ine or homocysteine ?. *N Engl J Med.*, 333(5): 328-9.

Nakajima K., Nakano T., Tanaka A. (2006). The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis : The comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clin Chim Acta.*, 367(2): 36-47.

Nishinaka T., Ichijo Y., Ito M., Kimura M., Katsuyama M., Iwata K., Miura T., Terada T., Yabe-Nishimura C. (2007). Curcumin activates human glutathione S-transferase P1 expression through antioxidant response element. *Toxicol Lett.*, 170(3): 238-247.

Nonn L., Duong D., Peehl DM. (2007). Chemopreventive anti-inflammatory activities of curcumin and other phytochemicals mediated by MAP kinase phosphatase-5 in prostate cells. *Carcinogenesis.*, 28(26): 1188-1196.

Nygaard O., Nordrehaug JE., Refsum H., Ueland PM., Farstad M., Vollset SE. (1997). Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.*, 337(4): 230-6.

Oak M.H., El Bedoui J., Anglard P., Schini-Kerth VB. (2004). Red wine polyphenolic compounds strongly inhibit pro-matrix metalloproteinase-2 expression and its activation in response to thrombin via direct inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase in vascular smooth muscle cells. *Circulation.*, 110(13): 1861-1867.

Oak MH., Chataigneau M., Keravis T., Chataigneau T., Beretz A., Andriantsitohaina R., Stoclet JC., Chang SJ. Schini-Kerth VB. (2003). Red wine polyphenolic compounds inhibit vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells by preventing the activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Arterioscler.Thromb.Vasc. Biol.*, 23(24): 1001-1007.

Oboh G., Henle T. (2009). Antioxidant and inhibitory effects of aqueous extracts of *Salvia officinalis* leaves on pro-oxidant-induced lipid peroxidation in brain and liver *in vitro*. *J Med Food.*, 12 (1): 77–84.

Oikawa,S., Murakami K., Kawanishi S. (2003). Oxidative damage to cellular and isolated DNA by homocysteine: implications for carcinogenesis. *Oncogene.*, 22: 3530-3538.

Okuda T., Kimura Y., Yoshida T., Hatano T., Okuda H., Arichi S. (1983). Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal and drugs. Inhibitory

effects of lipid peroxydation in mitochondria and microsome of lever. Chem Pharm Bull., 31: 1625-1631.

Olney JW., Price MT., Salles KS., Labruyere, J. Ryerson R., Mahan k., Friedrich G., Samson L. (1987). L-homocysteic acid: an endogenous excitotoxic ligand of the NMDA receptor. Brain Res Bull., 19(5): 597–602.

Oyenihi AB., Brooks NL., Oguntibeju OO., Aboua G. (2014). Antioxidant-Antidiabetic Agents and Human Health.chapitre Antioxidant -Rich Natural Products and Diabetes Mellitus. InTech ,. 10:5772-57192.

Owen RW., Giacosa A., Hull WE., Haubner R., Spiegelhalder B., Bartsch H. (2000). The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. EJC., 36(10): 1235-1247.

Ozgen U., Mavi A., Terzi Z., Yildirim A., Coskun M., Houghton PJ. (2006). Antioxidant properties of some medicinal Lamiaceae species. Pharm Biol., 44:107-12.

Pariente L. (2001). Dictionnaire des sciences pharmaceutique et biologique. 2ème Ed. Académie nationale de pharmacie. Paris., p: 1643.

Pedersen JA. (2000). Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy. Biochem Syst Ecol., 28: 229-253.

Petroni A., Blasevich M., Salami M., Papini N., Montedoro G.F., Galli C. (1995). Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. Thromb Res., 78(2): 151-160.

Pizzale L., Bortolomeazzi R., Vichi S., Überegger E., Conte LS. (2002). Antioxidant activity of sage *Salvia officinalis* and *S. fruticosa* and oregano *Origanum onites* and *O. ndercedens* extracts related to their phenolic compound content. J Sci Food Agric., 82:1645-51.

Prior RL., Lazarus SA., Cao G., Muccitelli H., Hammerstone JF. (2001). Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries *Vaccinium*

spp. using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem.*, 49(3): 1270-1276.

Quezel P. and Santa S. (1963), Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Meridionales. Tome II. Ed. CNR. S. Paris., p: 360, 805.

Rababah TM., Ereifej KI., Esoh RB., Al-u'datt MH., Alrababah MA., Yang W. (2011). Antioxidant activities total phenolics and HPLC analyses of the phenolic compounds of extracts from common Mediterranean plants. *Nat Prod Res.*, 25(6):596–605.

Rasmussen SE., Breinholt VM. (2003). Non-nutritive bioactive food constituents of plants: bioavailability of flavonoids. *Int J Vitam Nutr Res.*, 73(5): 101-111.

Rechner AR., Kuhnle G., Bremner P., Hubbard GP., Moore KP., Rice-Evans CA. (2002). The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic Bio Med.*, 33(2): 220-235.

Ren Z., Gould MN. (1998). Modulation of small G protein isoprenylation by anticancermonoterpenes in situ mammary gland epithelial cell. *Carcinogen.*, 19(5): 827- 832.

Rezazadeh S., Pirali-Hamedani M., Hadjiakhondi A., Ajani Y., Yarigar-Ravesh M., Shafiee A. (2009). Chemical composition of the essential oils of *Stachys atherocalyx* and *S. sylvatica* from Iran. *Chemistry of Natural Compounds.*, 45: 742-745.

Robinson K., Gupta A., Dennis V., Arheart K., Chaudhary D., Green R., Vigo P., Mayer EL., Selhub J., Kutner M., Jacobsen DW. (1996). Hyperhomocysteinemia confers an independent increased risk of atherosclerosis in end-stage renal disease and is closely linked to plasma folate and pyridoxine concentrations. *Circulation.*, 94(11) : 2743-8.

Robinson K., Mayer EL., Miller DP., Green R., van Lente F., Gupta A., Kottke-Marchant K., Savon SR., Selhub J., Nissen SE., Kutner M., Topol EJ., Jacobsen

DW. (1995). Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate. Common and independent reversible risk factors for coronary artery disease. *Circulation.*, 92: 2825-30.

Ruberto G., Bratta MT., Sari M., Kaâbeche M. (2002). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance J.*, 17: 251-254.

Sa CM., Ramos AA., Azevedo MF., Lima CF., Fernandes-Ferreira M., Pereira-Wilson C .(2009). Sage tea drinking improves lipid profile and antioxidant defences in humans. *Int J Mol Sci.*, 10(9):3937–3950.

Saad B., Azaizeh H., Abu Hijleh G., and Said O. (2006). Safety of Traditional Arab herbal medicine. *eCAM.*, 3(4):433-439.

Safaei-Ghomi J., Meshkatsadat MH., Shamai S., Hasheminejad M., Hassani A. (2009). Chemical **characterization** of bioactive volatile molecules of four *Thymus* species using nanoscale injection method. *Dig. J. Nanomater Bios.*, 4(4): 835-841.

Santos-Sanchez NF., Flores-Parra A., Valadez-Blanco R., Fernandez-Rojas B., Martinez-Vasquez JB., Salas-Coronado R (2014). Polyphenolic content free radical scavenging activity and isolation of Tiliroside from *Heliocarpus terebinthinaceus* (Tiliaceae) Seeds. *Journal of Biological Sciences.*, 14(5): 376-380.

Sato M., Bagchi D., Tosaki A., Das DK. (2001). Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia–reperfusion-induced activation of JNK-1 and c-JUN. *Free Radic Biol Med.*, 31: 729-737.

Scharf G., Prustomersky S., Knasmuller S., Schulte-Hermann R., Huber WW. (2003). Enhancement of glutathione and g-glutamylcysteine synthetase the rate limiting enzyme of glutathione synthesis by chemoprotective plant-derived food and beverage components in the human hepatoma cell line HepG2. *Nutr Cancer.*, 45: 74-83.

Schwarz D., Roots I. (2003). *In vitro* assessment of inhibition by natural polyphenols of metabolic activation of procarcinogens by human CYP1A1. *Biochem Biophys Res Commun.*, 303: 902-907.

Seeram NP., Lee R., Heber D. (2004). Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate *Punica granatum* L. juice. *Clin Chim Acta.*, 348(2): 63-68.

Selhub J., Jacques PF., Wilson PW. (1993). Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA.*, 270(22): 2693-8.

Selley ML., Close DR., Stern SE (2002). The effect of increased concentrations of homocysteine on the concentration of (E)-4-hydroxy-2-nonenal in the plasma and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.*, 23(3): 383-388.

Serrano M., Zapata PJ., Castillo S., Guillén F., Martínez-Romero D., Valero D. (2010) . Antioxidant and nutritive constituents during sweet pepper development and ripening are enhanced by nitrophenolate treatments. *Food Chemistry.*, 118(3): 497-503.

Seshadri S. (2002). Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine.*, 346(7): 476-483.

Shahidi F., Wanasundara P. (1992). Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 32(1): 67-103.

Shakibaei M., John T., Seifarth C., Mobasheri A. (2007). Resveratrol inhibits IL-1beta-induced stimulation of caspase-3 and cleavage of PARP in human articular chondrocytes in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1095(21): 554-563.

Shen SQ., Zhang Y., Xiang JJ., Xiong CL. (2007). Protective effect of curcumin against liver warm ischemia/reperfusion injury in rat model is associated with regulation of heat shock protein and antioxidant enzymes. *World J Gastroenterol.*, 13(13): 1953-1961.

Si W., Gong J., Tsao R., Kalab M., Yang R., Yin Y. (2006). Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *J Chromatogr.*, 1125(2): 204-210.

Škovierova H., Mahmood S., Blahovcova E., Hatok J., Lehotsky J., Murin R . (2009). Effect of homocysteine on survival of human glial cells. *physiological research.*, 3: 145-152.

Skurk C., Walsh K. (2004). A new mechanism of homocysteine-mediated endothelial cell 18 cytotoxicity. *Hypertension.*, 43: 1168-1170.

Newsheen S., Xia F., Yang ES. (2012). Assaying DNA Damage in Hippocampal Neurons Using the Comet Assay. *J Vis Exp.*, 10(70): 1-6.

Sotoudeh M., Li YS., Yajima N. (2002). Induction of apoptosis in vascular smooth muscle cells by mechanical stretch. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 282(5):1709-1716.

Spanos GA., Wrolstad RE., Heatherbell DA. (1990). Influence of processing and storage on the phenolic composition of apple juice. *J. Agric. Food Chem.*, 38(7): 1572-1579.

Sparg SG., Light ME., Staden J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *J Ethnopharmacol.*, 94(3): 219-243.

Stahl-Biskup E., Saez F. (2002). **Thyme the genus *Thymus* Taylor and Francis.331pp in Ghasemi-pirbalouti A., Rahimmalek M., Malekpoor F., Karimi A. (2011).** Variation in antibacterial activity thymol and carvacol contents of wild populations of *Thymus daenensis* subs *pdanensis* Celak. *Plant Omics Journal.*, 4:209-214.

Stangeland T., Remberg SF., Lye KA. (2009).Total antioxidant activity in 35 Ugandan fruits and vegetables. *Food Chem.*, 113(1): 85- 91.

Stanger O., Herrmann,W., Pietrzik K. (2003). German Austrian and Swiss Homocysteine Society : Consensus Paper on the rational Clinical Use of homocysteine folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases – Guidelines and Recommendations. *Clin Chem Lab Med.*, 41(11): 1392-1403.

Stein HH., Kil DY.(2006). Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: Dietary tools part 2. *Anim Biotechnol.*, 17(2): 217–231.

Stuart AE., Habshaw IA., Davidson A. (1973). Phagocytes *in vitro*. In: Handbook of Experimental Immunology. Weter DM. 2nd ed. Blackwell Sciences Publication.

Subbaramaiah K., Chung WJ., Michaluart P., Telang N., Tanabe T., Inoue H., Jang M., Pezzuto J.M., Dannenberg AJ. (1998). Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J Biol Chem.*, 273(34): 21875-21882.

Sunden SL., Renduchintala MS., Park EI., Miklasz SD., Garrow TA. (1997). Betaine-homocysteinemethyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Arch Biochem Biophys.*, 345(1): 171-4.

Svetlana K., Tatjana KP. (2001). Antioxidant activity of essential oils of different wild *Thymus vulgaris*. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia.*, 20(1): 61-66.

Sylvestre M., Legault J., Dufour D., Pichette A. (2005). Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. *Phytomedicine.*, 12(4): 299-304.

Sylvestre M., Pichette A., Longtin A., Nagau F., Legault J. (2006). Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *J Ethnopharmacol.*, 103(1): 99–102.

Tapiero H., Tew KD., Ba N., Mathé G. (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?. *Biomedicine and Pharmacotherapy.*, 56(4): 200-207.

Tatman D., Mo H. (2002). Volatile isoprenoid constituents of fruits vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 Cytotoxicity of the essential oil of *Salvia verticillata* 33 leukemia cells. *Cancer Letters.*, 175(2): 129-139.

Tazzini N. (2015). Polyphenols in grapes and wine: chemical composition and biological activities. *Plant Foods Hum Nutr.*, 70(4):454-62.

Tepe B., Sokmen M., Akpulat HA., Sokmen A. (2005). *In vitro* antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey. Food Chem., 90(1):685-9.

Torreggiani A., Tamba M., Trincherio A., Bonora S. (2005). Copper (II)–Quercetin complexes in aqueous solutions : spectroscopic and kinetic properties. J Mol Struct. 744-747.

Trevisi P., Merialdi G., Mazzoni M., Casini L., Tittarelli C., De Filippi S., Minieri L., Lalatta-Costerbosa G., Bosi P. (2007). Effect of dietary addition of thymol on growth salivary and gastric function immune response and excretion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in weaning pigs challenged with this microbe strain. Ital J Anim. Sci., 6: 374-376.

Troen AM. (2005). The central nervous system in animal models of hyperhomocysteinemia. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry., 29(7): 1140-1151

Tsai SH., Lin-Shiau SY., Lin JK. (1999). Suppression of nitric oxide synthase and the down regulation of the activation of NF- κ B in macrophages by resveratrol. Br J Pharmacol., 126(1):673-680.

Tsao R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols . Nutrients., 2(12): 1231-1246.

Tsao R., McCallum J. (2009). Chemistry of Flavonoids. In Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry Nutritional Value and Stability de la Rosa LA., Alvarez-Parrilla E., Gonzalez-Aguilar G., Eds., Blackwell Publishing (Chapter 5): Ames IA. USA., p: 131-153.

Tsao R., Yang R., Young JC., Zhu H. (2003). Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). J Agric Food Chem., 51(21): 6347-6353.

Tuck KL., Hayball PJ., Stupans I. (2002). Structural characterization of the metabolites of hydroxytyrosol the principal phenolic component in olive oil in rats. *J Agric Food Chem.*, 50(8): 2404-2409.

Tuck KL., Freeman MP., Hayball PJ., Stretch GL., Stupans I. (2001). The *in vivo* fate of hydroxytyrosol and tyrosol antioxidant phenolic constituents of olive oil after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats. *J Nutr.*, 131(7): 1993-1996.

Tucker KL., Mahnken B., PWF Jacques ,P., Selhub J. (1996). Folic acid fortification of the food supply. Potential benefits and risks for the elderly population. *JAMA.*, 276(23) : 1879-85.

Tyagi N., Ovechkin AV., Lominadze D., Moshal KS., Tyagi SC. (2006). Mitochondrial mechanism of microvascular endothelial cells apoptosis in hyperhomocysteinemia. *J Cell Biochem.*, 98(5):1150–1162.

Ueland PM., Refsum H. (1989). Plasma homocysteine a risk factor for vascular disease : plasma levels in health disease and drug therapy. *J Lab Clin Med.*, 114(5): 473-501.

Upchurch GR., Welch GN., Loscalzo J. (1996). Homocysteine EDRF and endothelial function. *J Nutr.*, 126(4): 1290-1294

Valant-Vetschera KM., Wallenweber E. (2006). Flavones and Flavonols. In *Flavonoids: Chemistry Biochemistry and Applications* Anderson OM., Markham KR., Eds., CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton FL. USA., p: 618-748.

Wald DS., Law M., Morris JK. (2002). Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *Br Med J.*, 325(7374): 1202-1206.

Wang H., Murphy PA. (1994). Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.*, 42(8): 1666-1673.

Wautrecht JC. (1997). Hyperhomocystéinémie : facteur de risque d'athéromatose précoce. *Rev Méd Brux.*, 18: 103-106.

Weiss N., Keller C., Hoffmann U., Loscalzo J. (2002). Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia. *Vasc Med.*, 7(3): 227-239.

Weiss N., Zhang YY., Heydrick S., Bierl C., Loscalzo J. (2001). Over expression of cellular glutathione peroxidase rescues homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 98(22): 12503-12508.

Welch KD., Davis TZ., Aust SD. (2002). Iron Autoxidation and Free Radical Generation: Effects of Buffers Ligands and Chelators. *Archives of Biochemistry and Biophysique.*, 397(2): 360–369.

Wenk GL. (2003). Inflammation in Alzheimer's disease: its role and an opportunity for therapy. *Brain Aging.*, 3:16-20.

Wilcken DEL., Dudman NPB., Tyrrell PA., Robertson MR. (1988). Folic acid lowers elevated plasma homocysteine in chronic renal insufficiency : possible implications for prevention of vascular disease. *Metabolism.*, 37 : 697-701.

Wilcken DEL., Wilcken B. (1976). The pathogenesis of coronaryarterydesease : a possible role for the methioninemetabolism. *J Clin Invest.*, 57(4): 1079-1082.

Williams CA. (2006). Flavone and flavonol O-glycosides. In *Flavonoids: Chemistry Biochemistry and Applications* Anderson OM., Markham KR., Eds., CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton FL. USA., p: 749-856.

Williams RJ., Spencer JP., Rice-Evans C. (2004). Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules? *Free Radic. Biol. Med.*, 36(7): 838-849.

Williamson G., Barron D., Shimoi K., Terao J. (2005). *In vitro* biological properties of flavonoid conjugates found in vivo. *Free Radic. Res.*, 39(7): 457-469.

Wollny T., Chabielska E., Malinowska-Zaprzalka M., Nazarko J., Rozmysłowicz-Szermińska W., Buczko W. (2003). Effects of Bulgarian red and white wines on primary hemostasis and experimental thrombosis in rats. *Pol. J. Pharmacol.*, 55(3): 1089-1096.

Woollard AC., Tatham KC., Barker S. (2007). The influence of essential oils on the process of wound healing: a review of the current evidence. *J. Wound Care.*, 16(6): 255-257.

Xiuzhen H., Tao S., Hongxiang L. (2007). Dietary polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences.*, 8(9): 950-988.

Xu JW., Ikeda K., Yamori Y. (2004). Cyanidin-3-glucoside regulates phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.*, 574(3):176-80.

Yang CS., Landau JM., Huang MT., Newmark HL. (2000). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review Nutrition.*, 21(1): 381-406.

Yoon SH., Kim YS., Ghim SY., Song BH., Bae YS. (2002). Inhibition of protein kinase CKII activity by resveratrol a natural compound in red wine and grapes. *Life Sci.*, 71(18): 2145-2152.

Yoshida Y., Shimakawa N., Itoh E., Niki E. (2003). Action of DCFH and Bodipy as a probe for radical oxidation in hydrophilic and lipophilic domain. *Free Radical Research.*, 37(8): 861-872.

Zeghib A. (2013). Etude phytochimique et activité antioxydante, antiproliférative, antibactérienne, et antivirale d'extraits d'huiles essentielles de quatre espèces endémiques du genre *Thymus*. Thèse de doctorat. Université des Frères Mentouri. p: 60, 156.

Zem TL., Fernondez ML., (2005). Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *The Journal of Nutrition.*, 135(10): 2291-2294.

Zheng W, Wang SY. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem.*, 49(11): 5165-5170.

Ziemińska E., Stafiej A., Lazarewicz JW (2003). Role of group I metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in homocysteine-evoked acute neurodegeneration of cultured cerebellar granule neurones. *Neurochem Int.*, 43: 481-492.

Zittoun J., Bories D., Tonetti C., Pignon C., Tulliez M. (1997).
L'hyperhomocystéinémie est conditionnée par des interrelations étroites entre le statut folique et la méthylène tétrahydrofolate réductase. *Hématologie.*, 37(63) :3.

Résumé

Ce travail de thèse s'attache à identifier quelques activités biologiques des trois espèces appartenant à la famille des Lamiaceae distribuées en Algérie, dans le but de trouver des alternatives thérapeutiques.

Les activités ciblées dans ce travail sont l'activité cytotoxique sur la lignée cellulaire humaine (THP-1), l'activité antioxydante évaluées *in vitro* par le test de DPPH, l'activité immuno-modulatrice, l'activité anti-génotoxique dont l'homocystéine a été utilisé comme agent génotoxique et l'aptitude à réduire le niveau des EROs en présence de l'homocystéine.

Les résultats obtenus ont permis de mettre plus particulièrement, en évidence les activités biologiques des différents extraits. L'extrait de l'espèce *Thymus guyonii* a montré la meilleure activité antioxydante, une meilleure activité anti-génotoxique et une meilleure aptitude à réduire les EROs produits *in vitro* par l'homocystéine.

L'extrait de *Stachys circinnata* a montré une bonne activité antioxydante, la meilleure activité immuno-modulatrice et une meilleure activité anti-génotoxique.

L'extrait de *Salvia verbenaca* a montré une bonne activité antioxydante, une bonne activité immuno-modulatrice et une bonne activité anti-génotoxique.

Le test de viabilité cellulaire a montré que les trois extraits ne sont pas cytotoxiques et la viabilité cellulaire diminue uniquement lorsque les concentrations sont très élevées.

Les mots clés :

Thymus guyonii, *Stachys circinnata*, *Salvia verbenaca*, homocystéine, THP-1, EROs, génotoxique, cytotoxique, immunomodulatrice, antioxydante.

Summary

This work focuses on identifying some biological activities of three species belonging to Lamiaceae family distributed in Algeria (one of them is endemic) in order to find alternatives therapeutiques.

The targeted activities in this work were the cytotoxic activity on the human cell line (THP-1 cells), the antioxidant activity evaluated *in vitro* by the DPPH test, evaluation of the immunomodulatory activity, the anti-genotoxic activity where homocysteine was used as a genotoxic agent and the ability to reduce the ROS level in the presence of homocysteine.

The results obtained allowed to highlight in particularly the biological activities of the various extracts. The extract of *Thymus guyonii* showed the best antioxidant activity a very potent anti-genotoxic activity and a potent ability to reduce *in vitro* the quantity of ROS produced by homocysteine.

The extract of *Stachys circinnata* showed a good antioxidant activity, the best immunomodulatory activity and a very potent anti-genotoxic activity.

The extract of *Salvia verbenaca* showed a good antioxidant activity, a good immunomodulatory activity and a good anti-genotoxic activity.

The cell viability test showed that the three extracts were not cytotoxic and cell viability decreases only when the concentrations are very high.

Keywords: *Thymus guyonii*, *Stachys circinnata*, *Salvia verbenaca*, homocysteine, THP-1, ROS, genotoxic, cytotoxic, immunomodulatory, antioxydant.

الملخص

يندرج عمل هذه الأطروحة إلى الكشف عن بعض الأنشطة البيولوجية لثلاثة أنواع نباتية تنتمي للعائلة الشفوية المنتشرة في الجزائر (من بينها نوع مستوطن بالجزائر فقط) لهدف البحث عن بدائل علاجية.

-الأنشطة المستهدفة في هذا العمل هي:

- النشاط السمي لمستخلصات الأنواع الثلاث على خلايا THP-1 .

- النشاط المضاد للأكسدة عن طريق اختبار DPPH وهذا بتقييم قدرة المستخلصات على تحفيز النشاط المناعي.

- النشاط المضاد للتسمم الجينومي حيث أستعمل في هذا الاختبار الحمض الأميني الهوموسيسيتين كعامل سمي للجينوم و قدرة المستخلصات على خفض مستوى المركبات المتفاعلة مع الأكسجين في وجود الهوموسيسيتين وقد سمحت النتائج المتحصل عليها بتسليط الضوء بشكل خاص على مختلف الأنشطة البيولوجية للأنواع الثلاث.

مستخلص *Thymus guyonii* أظهر أفضل نشاط مضاد للأكسدة أفضل نشاط مضاد لتسمم الجينوم و أفضل قدرة لتخفيض مستوى المركبات المتفاعلة مع الأكسجين.

مستخلص *Stachys circinnata* أظهر وجود نشاط جيد مضاد للأكسدة و أفضل نشاط محفز للجهاز المناعي و نشاط قوي مضاد لتسمم الجينوم.

مستخلص *Salvia verbenaca* أظهر وجود نشاط جيد مضاد للأكسدة و وجود نشاط محفز للجهاز المناعي و نشاط جيد مضاد لتسمم الجينوم.

إختبار حيوية الخلايا أظهر أن المستخلصات بدون سمية و أن حيوية الخلايا تتخفض فقط عندما تكون التراكيذ المستعملة مرتفعة جدا.

الكلمات المفتاحية : *Thymus guyonii*, *Stachys circinnata*, *Salvia verbenaca*, الهوموسيسيتين, THP-, 1, تسمم الجينوم, تسمم الخلايا, محفز للجهاز المناعي, مضاد الأكسدة.

Original Article

ANTIOXIDANT AND THE IMMUNOMODULATORY ACTIVITIES EXHIBITED BY THREE PLANTS FROM LAMIACEAE FAMILY

MERYEM NASSAR^{a,b}, SAKINA ZERIZER^{a*}, ZAHIA KABOUICHE^c, AHMED KABOUICHE^c, SARA BECHKRI^c

^aUniversité des frères Mentouri Constantine, Department of Ecology, Constantine, Algeria. Option Biotechnology, Laboratory: Ethnobotany Palynology and Ethnopharmacology –Toxicology Constantine, Algeria, ^bUniversiy of 20 Aout 1955 Skikda Department of Biology, ^{a*} Université des frères Mentouri Constantine, Department of Animal Biology, Laboratory: Ethnobotany Palynology and Ethnopharmacology –Toxicology Constantine, Algeria; ^c Université des frères Mentouri Constantine, department of chemistry, laboratory of therapeutic substances, 25000 Constantine, Algeria
Email: zerizersakina@yahoo.fr

Received: 29 Dec 2014 Revised and Accepted: 22 Jul 2015

ABSTRACT

Objective: The aim of this work was screening of the antioxidant activity and immunomodulatory effects of the crude extracts from the aerial parts of three Algerian endemic species from *Lamiaceae*.

Methods: DPPH radical scavenging assay was used to find the antioxidant activity of *Stachys circinata*, *Salvia verbenaca* and *Thymus guyonii* and the immunostimulant potential of these plants extracts on the phagocytic activity which was measured by the carbon clearance rate test.

Results: Our results obtained in this study shown that the IC50 of *Thymus guyonii*, *Salvia verbenaca* and *Stachys circinata* were 15,90;47,50 and 54,92 respectively. The phagocytic index was increased significantly in animals injected with *Stachys circinata* and *Salvia verbenaca* at doses of 200 mg/kg $P \leq 0,05$ but not significantly with *Thymus guyonii* when compared to the control group. The clearance rate of carbon was faster but not significantly $P \geq 0,05$ and the corrected phagocytic index α was increased at the group GIII with *Salvia verbenaca* but not significantly when compared with other groups $P \geq 0,05$.

Conclusion: The *Stachys circinata* and *Salvia verbenaca* extracts proved an immune-stimulatory effect on the reticuloendothelial system and *Thymus guyonii* extract revealed anti-oxidant activity.

Keywords: *Thymus guyonii*, *Salvia verbenaca*, *Stachys circinata*, Immunostimulatory activity, DPPH radical scavenging assay.

INTRODUCTION

The immune system comprises two functional divisions; the innate immune system consists of cellular components, soluble factors, physical barriers and the reticulo-endothelial system (RES) [1]. The adaptive immune system produces a specific reaction and immunologic memory to each pathogen and comprises cellular components and soluble factors [1].

The reticulo-endothelial system consists of the phagocytic cells such as monocytes and macrophages that kill the invading organism by Phagocytosis [2]. Immunomodulation is the regulation and modulation of immunity either by enhancing or by reducing the immune response. Modulation of immune response may involve induction, expression or amplification of immune response [3].

There are many plants having immuno stimulatory activity and some drugs are believed to enhance the natural resistance of the body to infection [3]. In recent times, there is a great focus on medicinal plants belonging to *Lamiaceae* family, which is a very large family represented by about 236 genera and 7172 species in the world [4] and well known with their therapeutic applications against many disorders such as common cold, throat infections, acaricidal, psoriasis, seborrheic eczema, hemorrhage, menstrual disorders, miscarriage, ulcer, spasm and stomach problems [5-7] related to their richness with polyphenols compounds from several classes [8].

Thymus guyonii de Noé, locally known for its antispasmodic, activities and antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* [9]. *Salvia verbenaca* locally named Essaffaya and particularly used in treating the healing of wounds [10], rich with flavonoids, tannins which can be used as a potential source of useful drugs [11] and *Stachys circinata* till now there is no photochemical studies about this species.

In numerous *in vitro* studies the antioxidant activity of *Lamiaceae* species has been already revealed [12-14]. It's known that natural's antioxidants from plants such as polyphenols play an important role

in the protection of cells from oxidative damage and consequently induce anticancer activities including pro-apoptotic, DNA damaging anti-angiogenic, and immunostimulatory effects [15]. These proprieties make this family a good source of dietary compared to much other foods. However, there is a very few studies concerning the immunomodulatory activity of herbs belonging to this family [8]. The objective of the present study was to evaluate the antioxidant and immunostimulatory effects of three crude extracts obtained from *Thymus guyonii*, *Stachys circinata* and *Salvia verbenaca* belonging to *Lamiaceae* family.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Collection

The aerial parts of *Thymus guyonii*, *Salvia verbenaca* and *Stachys circinata* were collected from zalfana (Ghardaia), Batna and Djebel El-Ouahch (Constantine, Algeria) respectively.

Preparation of the extract

Air-dried and powdered aerial parts (1 kg) of *Thymus guyonii*, *Salvia verbenaca* and *Stachys circinata*, were extracted with 70 % MeOH. The residue was suspended in water and extracted successively with petroleum ether, dichloromethane, Ethylacetate and n-BuOH. We used for both activities the n-BuOH extract.

Determination of antioxidant activity

The antioxidant activity was measured with bleaching of purple colored methanol solution of DPPH by using [16]. This spectrophotometric assay uses stable radical 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) as a reagent [16, 17].

30 μ l of various concentrations (10, 6, 5, 3, 2, 1 mg/ml) of each species extract in methanol was added to 3 ml of a 0.004 % methanol solution of DPPH. After 20 min of incubation in the dark

room, the absorbance was read against a blank at 517 nm. Inhibition free radical DPPH in percent (I %) was calculated in following way:

$$I \% = (\text{Ablank} - \text{Asample}) / \text{Ablank} \times 100$$

Where A blank is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test compound), and A sample is the absorbance of the test compound. Extract concentration providing 50 % inhibition (IC50) was calculated from the linear regression algorithm of the graph plotted inhibition percentage against extract concentration. For the calculation of these values, Microsoft Excel software was used.

Determination of immunostimulant activity

Animals

Adult male *Mus Musculus* mice (2.5-3 month old) from central pharmacy Algeria, weighing (22-36g) were used for determination of the phagocytic activity. The animals were kept under standard laboratory conditions of humidity, temperature (25±1 °C with 12:12 light: dark cycles), and allowed free access to food and water. The animal studies were conducted after obtaining clearance from Institutional Animal Ethics Committee and the experiments were conducted in strict compliance according to ethical principles and provided by the Committee for the Purpose of Control and Supervision of Experiments on Animal (CPCSEA).

Phagocytic index

The phagocytic index was determined by the method of [18]. For each species extract we used the same concentrations, Animals were divided into four groups, consisting of six mice in GI, GII, GIII and GIV. Group I (control) was given 0, 9 % NaCl (0, 5 ml/mouse I. p.), Groups II-III-and IV administered by I. P injection with different concentrations of each plant extracts (50, 150 and 200 mg/kg/) respectively.

After 48h of I. P injection, mice were administered with carbon ink suspension at a dose of (0.1 ml/10g through the tail vein; the mixture consisted of black carbon ink 3 ml, saline 4 ml and 3 % gelatin solution 4 ml. Blood samples were taken from the retro orbital vein by using glass capillaries, at 5 and 15 min. Blood sample drops (14) were mixed with 0.1 % sodium carbonate solution (4 ml) for the lysis of erythrocytes and the absorbance measured at 675 nm using a spectrophotometer. The animals were sacrificed and the liver and spleen dissected and weighed immediately in the wet state.

The phagocytic activity is expressed by the phagocytic index K which measures all the reticuloendothelial system function in the contact with the circulating blood and by corrected phagocytic index α which expresses this activity by unit of active weight organs: liver and spleen.

The clearance rate is expressed as the half-life period of the carbon in the blood ($t_{1/2}$, min). These are calculated by means of the following equations [18, 19].

$$K = \frac{\ln OD1 - \ln OD2}{t2 - t1}$$

$$t_{1/2} = 0,693 / K$$

$$\alpha = \sqrt[3]{K} \times \frac{\text{Body weight of animal}}{\text{Liver wt} + \text{spleen wt}}$$

Where OD1 and OD2 are the optical densities at times t1 and t2 respectively.

Statistical analysis

Results were analyzed for differences between the groups across dietary treatments by one-way ANOVA test and Tukey's multiple comparison tests (SPSS version 9), P-values* < 0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

The scavenging activity against DPPH radical

The present data showed that the three extracts presented a good antioxidant activity which was increased by increasing the concentration of the samples extracts. The highest antioxidant

activity of *Stachys circinata* was 90 % at concentration 0,1 mg/ml (fig. 3) and 95 % at the same concentration for *Salvia verbenaca* (fig. 2) however the highest antioxidant activity of *Thymus guyonii* at concentration 0,03 mg/ml was 0, 99 % (fig. 1).

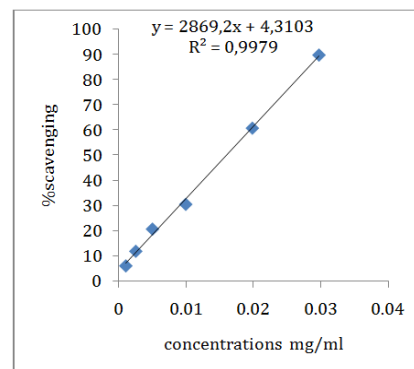


Fig. 1: It shows the scavenging activity of *Thymus guyonii*

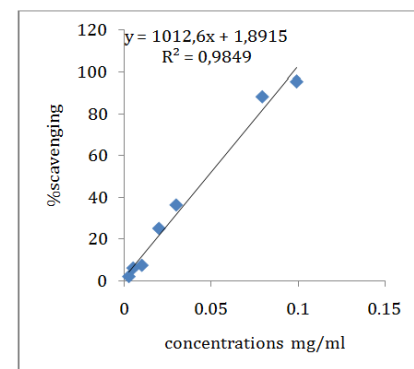


Fig. 2: It shows the scavenging activity of *Salvia verbenaca*

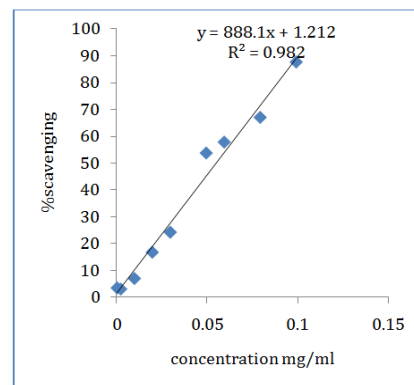


Fig. 3: It shows the scavenging activity of *Stachys circinata*

The measurement results of the half-inhibition concentrations (IC50), which is inversely proportional to the antioxidant potential value, were calculated from the linear regression of the % antioxidant activity versus extracts concentrations.

The Results are shown in table 1.

Table 1: It shows IC50 of the tested extracts

Tested extracts	IC50 (µg/ml)	R ²
<i>Thymus guyonii</i>	15,90	0,997
<i>Salvia verbenaca</i>	47,50	0,982
<i>Stachys circinata</i>	54,92	0,984

The results shown in table 1 indicated that the *Thymus guyonii* extract has the lowest IC50 and exhibited the highest DPPH free radical scavenging ability, three fold more potent compared to *Salvia verbenaca* and *Stachyscircinata* extracts.

Immuno stimulant activity

The present data showed that there is a difference in the means for the phagocytic index (K) between groups (GI, GII, GIII, and GIV) and the phagocytic index for groups GIV of *Stachys circinata* (0,105±0,018) and *Salvia verbenaca* (0,095±0,012) have significant difference when compared to the control GI $P \leq 0,05$.

However, the *Stachys circinata* extract showed a higher effect than *Salvia verbenaca*, the remaining extract of *Thymus guyonii* showed no significant increase at all doses.

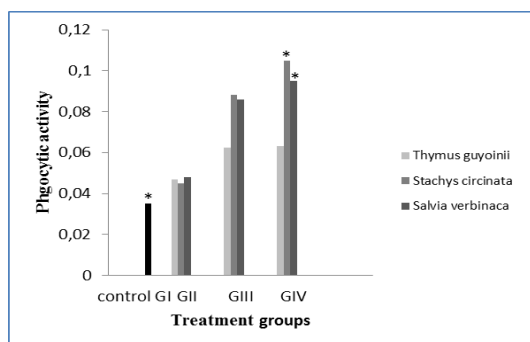


Fig. 4: It shows the phagocytic activity of mice treated with three different extras

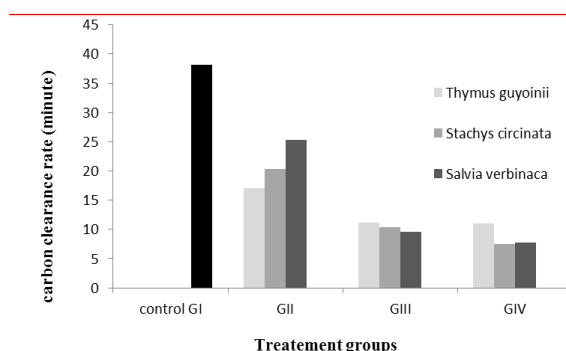


Fig. 5: It shows the carbon clearance rate of mice treated with three different extracts

As shown in the fig. 5, the half time of colloidal carbon were decreased between groups but not significantly and with *Stachyscircinata* was faster when compared with the groups GI, GII, GIII of the extracts *Thymus guyoini* and *Salvia verbenaca*.

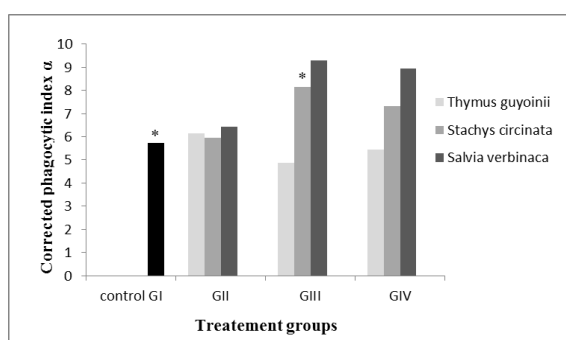


Fig. 6: It shows the corrected phagocytic index alpha of mice treated with three different extracts

The results of this study showed that there is a significant increase of the corrected phagocytic index α at the group III with *Stachys circinata* when it is compared with the control GI $p \leq 0,05$ (fig. 6). And was higher at the GIII with *salvia verbenaca* (0,095±1,71) but not significantly when it is compared with GI, GII and GIV of the two extracts (*Thymus guyounii* and *Stachys circinata*) $p \geq 0,05$.

DISCUSSION

According to these results, we are suggesting that *Stachys circinata* exhibit a better effect in enhancing the immunostimulant activity of the reticuloendothelial system (R. E. S) the presence of this activity was already proven in other species belonging to the same genus such as *Stachys mialhesi* [20]. Also this result agrees with those of ARIBI *et al.*[21]and KEHILI *et al.* [22] who reported that the administration of *Argania spinosa* seeds and *Phoenix dactylifera* respectively in the mouse increased the phagocytic index at different concentrations. In other study of ASSIA *et al.* [23] reported that *Stachys ocymastrum* extract enhanced the phagocytic activity at low concentration (50 mg/kg) by stimulating the reticulum endothelial and then at high concentrations of 100 and 500 mg/kg the extract decreased the phagocytic activity, in a dose dependant manner by inhibiting the reticulum endothelial.

The reticuloendothelial system (R. E. S) is considered as the first line of defense and functionally recognized by its ability to scavenge debris or other foreign matter [24]. The rate of removal of carbon particles, by the sessile intravascular phagocytes in the liver and spleen which are considered to be the main organs in where endothelial cells and macrophages eliminate undesirable substances from circulation is measured by reticuloendothelial phagocytic activity [25].

In this study we noticed that *Thymus gyuonii* which has the highest antioxidant activity showed no significance for immunostimulant activity however *Stachys circinata* which has the lowest antioxidant activity showed a higher significance for immunostimulant activity, the remaining extract of *Salvia verbenaca* showed a moderate significance for both activities. From these results, we are suggesting that this difference is due to the difference in composition of secondary compounds between the three extracts.

CONCLUSION

The overall observations of the present work suggested that *Stachys circinata* held appreciable immunostimulant property which acted by activating the function of the reticuloendothelial system. However, *Thymus guyonii* showed an antioxidant activity three fold higher than the other extracts. The remaining extract of *Salvia verbenaca* showed a moderate significance for both activities.

The current study has provided that the plants studied here can be seen as a potential source of useful drugs. Further studies are going on these plants in order to fig. out other biological activities.

ACKNOWLEDEMENT

The authors are grateful to the Ministry of Scientific Research, Algeria for the financial support.

CONFLICT OF INTERESTS

Declared None

REFERENCES

1. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. KUBY Immunology. 4th ed. New York: WH Freeman; 2000.
2. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Delivery Rev* 2004;56:1649-59.
3. Sunitil K, Priyanka G, Shalini S, Dinesh K. A review on immunostimulatory. *J Chin Integr Med* 2011;9:117-28.
4. Harley RM, Atkins S, Budantsev AL, Cantino PD, Conn BJ, Grayer R. The families and genera of vascular plants. *Lamiales*. Springer 2004;2:167-282.
5. Takayama K, Kilburn JO. Inhibition of synthesis of arabino galactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1493-9.

6. Ozgen U, Mavi A, Terzi Z, Yildirim A, Coskun M, Houghton PJ. Antioxidant properties of somemedicinal *Lamiaceae* species. *Pharm Biol* 2006;44:107-12.
7. Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA, Sokmen A. *In vitro* antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey. *Food Chem* 2005;90:685-9.
8. Nurmi A. Health from herbs? Antioxidant studies on selected *Lamiaceae* herbs *in vitro* and in humans; 2008. p. 50-1.
9. Lehibli M, Chibani S, Kabouche A, Semra Z, Smati F, Abuhamdah S, et al. Composition, antibacterial and antioxidant activity of the essential oil of *Thymus guyonii* de Noé from Algeria. *Scholars Res Library* 2013;5:306-10.
10. Negré R. Petite Flore des régions arides du Maroc occidental. Paris, Editions du C. N. R. S. Tomes; 1962. p. 2.
11. Belmekki N, Bendimerad N, Seladji M. Phytochemical constituents of some Algerian medicinal plants. *Scholars Res Library* 2012;2:558-62.
12. Exarchou V, Godejohann M, Van Beek TA, Gerotheranassis I P, Vervoort. J LC-UV-solid-phase extraction-NMR-MS combined with a cryogenic flow probe and its application to the identification of compounds present in Greek oregano. *Anal Chem* 2003;75:6288-94.
13. Pizzale L, Bortolomeazzi R, Vichi S, Überegger E, Conte LS. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. indercedens*) extracts related to their phenolic compound content. *J Sci Food Agric* 2002;82:1645-51.
14. Dorman HJD, Bachmayer O, Kosar M, Hiltunen R. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected *Lamiaceae* species grown in turkey. *J Agric Food Chem* 2004;52:762-70.
15. Leong ACN, Kinjo Y, Tako M, Iwasaki H, Oku H, Tamaki H. Flavonoid glycosides in the shoot sys-tem of okinawa taumu (*Colocasia*). *Food Chem* 2010;119:630-5.
16. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res* 2000;14:323-8.
17. Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helv Chim Acta* 1997;80:1144-52.
18. Biozzi G, Benacerraf B, Halpern BN. Effet de la vaccination par *Plasmodium berghei* irradié sur l'activité phagocytaire du système réticuloendothélial au cours de l'infection du rat par ce plasmodium. *Bull World Health Organ* 1970;42:163-8.
19. Shah AS, Wakade AS, Juvekar AR. Immunomodulatory activity of methanolic extract of *Murraya koenigii* (L) Spreng leaves Indian. *J Exp Biol* 2008;46:505-9.
20. Benmebarek A, Zerizer S, Laggoune S, Kabouche Z. Immunostimulatory activity of *Stachys mialhesi* de Noé. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2013;2:1492-9.
21. Aribi B, Zerizer S, Kabouche Z. Immunomodulatory activity of *Argania Spinosa* seeds. *Int J Pharm Pharm Sci* 2013;5:488-91.
22. Kehili HS, Zerizer S, Kabouche Z. Immunostimulatory activity of *Phoenix dactylifera*. *Int J Pharm Pharm Sci* 2014;6:73-6.
23. Benmebarek A, Zerizer S, Lakhal H, Kabouch Z. Biphasic dose response effect of *Sachys Ocymastrum* on the reticuloendothelial system phagocytic activity. *Int J Pharm Pharm Sci* 2014;6:975-1491.
24. Stuart AE, Habshaw IA, Davidson A. Phagocytes *in vitro*. In: *Handbook of Experimental Immunology*. Weter DM. 2nd ed. Blackwell Sciences Publication; 1973.
25. Dalmo RA, Ingebrigsten K, Bogwald J. Non-specific defense mechanisms in fish, with particular reference to the reticulo-endothelial system (RES). *J Fish Dis* 1997;20:241-73.

Nom et Prénom : NASSAR Meryem
Doctorat en sciences
Filière : Biotechnologie Végétale
Spécialité : Biotechnologie Végétale

THEME
ACTIVITES BIOLOGIQUES DES MOLECULES BIOACTIVES EXTRAITES
DE QUELQUES PLANTES MEDICINALES

Résumé :

Ce travail de thèse s'attache à identifier quelques activités biologiques des trois espèces appartenant à de la famille des Lamiaceae distribuées en Algérie, dans le but de trouver des alternatives thérapeutiques.

Les activités ciblées dans ce travail sont l'activité cytotoxique sur la lignée cellulaire humaine (THP-1), l'activité antioxydante évaluées *in vitro* par le test de DPPH, l'activité immuno-modulatrice, l'activité anti-génotoxique dont l'homocystéine a été utilisé comme agent génotoxique et l'aptitude à réduire le niveau des EROs en présence de l'homocystéine.

Les résultats obtenus ont permis de mettre plus particulièrement, en évidence les activités biologiques des différents extraits. L'extrait de l'espèce *Thymus guyonii* a montré la meilleur activité antioxydante, une meilleur activité anti- génotoxique et une meilleur aptitude à réduire les EROs produits *in vitro* par l'homocystéine.

L'extrait de *Stachys circinnata* a montré une bonne activité antioxydante, la meilleur activité immun-modulatrice et une meilleur activité anti-génotoxique.

L'extrait de *Salvia verbenaca* a montré une bonne activité antioxydante, une bonne activité immuno-modulatrice et une bonne activité anti-génotoxique.

Le test de viabilité cellulaire a montré que les trois extraits ne sont pas cytotoxiques et la viabilité cellulaire diminue uniquement lorsque les concentrations sont très élevées.

Les mots clés :

Thymus guyonii, *Stachys circinnata*, *Salvia verbenaca*, homocystéine, THP-1, EROs, génotoxique, cytotoxique, immunomodulatrice, antoxydante.

Soutenu le: 27-11-2017

Devant le jury:

Présidente: TEBIBEL. S

Directrice de thèse: ZERIZER. S

Examineur: KHENNOUF. S

Examineur: NECIB. Y

Examineur: DJERROU. Z

Examinatrice: ZAIDI. N

Pr. Université Des Frères Mentouri Constantine 1

Pr. Université Des Frères Mentouri Constantine 1

Pr. Université Ferhat-Abbas Sétif

Pr. Université Des Frères Mentouri Constantine 1

MCA. Université 20 Aout 1955 Skikda

MCA. Université 20 Aout 1955 Skikda

2016 / 2017