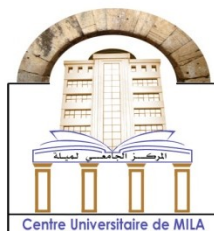


N° Ref :.....



Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila

Institut des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Thème :

**Contribution à l'étude des molécules bioactives et
activités biologiques de la plante *Cistus sp.***

Présenté par :

- BENABDERRAHMANE Wissal
- CHAITA Kahina
- GUENIFI Ghazelane

Soutenu devant le jury :

- Président : BOUBENDIR Abdelhafid (MCA)
- Examinatrice : BOUCHEKRIT Moufida (MCB)
- Promoteur : BOUTELLAA Saber (MAA)

Année Universitaire: 2018/2019

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières

Liste des Abréviations.....	I
Liste des figures.....	III
Liste des tableaux.....	IV
INTRODUCTION.....	1

1ère Partie : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : ASPECTS BOTANIQUES.

1. Présentation de la famille des Cistaceae.....	3
2. Genre <i>Cistus</i>	4
2.1. Description botanique.....	4
2.2. Place à la systématique.....	5
3. Métabolites secondaires isolés.....	5
3.1. Flavonoïdes.....	6
3.1.1. Flavonols et flavones.....	6
3.1.2. Flavan-3-ols et proanthocyanidines.....	7
3.2. Acides phénoliques.....	8
3.3. Les tanins.....	9
3.4. Phytohormones et vitamines.....	9
3.5. Les composés volatils.....	10
3.5.1. Les terpènes.....	10
4. Ethnopharmacologie.....	12
4.1. Usage traditionnel.....	12
4.2. Usage moderne.....	13
4.2.1. Activité antibactérienne et antifongique.....	14
4.2.2. Activité antivirale.....	15
4.2.3. Activité myorelaxante.....	16
5. La toxicité.....	16

Chapitre II : ACTIVITÉS BIOLOGIQUES

1. Stress oxydatif et activité antioxydante.....	18
1.1. Définition du stress oxydant.....	18
1.2. Définition des antioxydants.....	19
1.3. Définition des radicaux libres.....	19
1.4. Mode d'évaluation de l'activité antioxydante.....	19
1.4.1. Test de réduction du radical-cation ABTS•+ (test TEAC).....	19
1.4.2. Test de réduction d'un complexe ferrique (test FRAP).....	20
1.4.3. Test de capture des radicaux peroxy (test ORAC).....	20
1.4.4. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	20
1.4.5. Test de blanchissement du β -carotène.....	21
1.5. Activité antioxydante du genre <i>Cistus</i>	21
2. Activité anticoagulante.....	23
2.1. Notion de l'hémostase.....	23
2.2 Exploration de la coagulation.....	23
2.2.1. Temps de cephaline + Activateur (TCA).....	24
2.2.2. Temps de Quick (TQ).....	24
2.2.3. Temps de thrombine et dosage du fibrinogène (TT).....	25
2.3. Anticoagulants synthétiques	25
2.3.1. Héparine.....	25
2.3.2. Anti vitamines K (AVK).....	26
2.4. Anticoagulants naturels.....	26
2.4.1. Coumarines.....	26
2.4.2. Anticoagulants dérivés des algues.....	27
2.4.3. Flavonoïdes	27



2ème Partie : EXPERIMENTATION

Chapitre I: Matériel et méthodes

1. Matériel.....	28
1.1. Matériel chimique.....	28
1.2. Matériel végétal.....	28
2.Méthode de travail.....	28
2.1. Récolte de la plante.....	28
2.2. Préparation des extraits.....	28
2.2.1. Séchage et broyage.....	28
2.2.2. L'extraction.....	29
2.3. Détermination des rendements d'extraction.....	31
3. Dosage des phénols totaux	31
3.1 .Principe	31
3.2. Mode opératoire	31
4. Dosage des flavonoïdes	31
4.1. Principe	31
4.2. Mode opératoire	32
5. L'activité antioxydante in vitro: Piégeage du radical libre DPPH	32
5.1. Principe	32
5.2. Mode opératoire	33
6. Activité anticoagulante	34
6.1. Tests de coagulation	34
6.2. Extraits testés	34
6.3. Principe	34
6.4. Mode opératoire	35

Chapitre II : Résultats et discussion

1. Rendement d'extraction	36
2. Quantification des polyphénols et des flavonoïdes	37
2.1. Polyphénols	37
2.2. Flavonoïdes	39
3. Activité antioxydante.....	42
3.1. Pouvoir antiradicalaire de l'extrait <i>n</i> -hexane de <i>Cistus sp</i>	43
3.2. Pouvoir antiradicalaire de l'extrait CHCl ₃ de <i>Cistus sp</i>	43
3.3. Pouvoir antiradicalaire de l'extrait ACOET de <i>Cistus sp</i>	44
3.4. Pouvoir antiradicalaire de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>Cistus sp</i>	45
3.5. Pouvoir antiradicalaire de l'extrait hydrométhanolique de <i>Cistus sp</i>	45
3.6. Comparaison du pouvoir antiradicalaire entre les extraits de <i>Cistus sp</i>	49
4. Activité anticoagulante.....	51
Conclusion.....	54
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	55

ANNEXES

Résumé

Liste des abréviations

Abs: Absorbance.

ABTS: Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique).

AlCl₃: Trichlorure d'aluminium.

AVK: Anti vitamineK.

BHA: Butylatedhydroxyanisole.

CH₃COOCH₂CH₃: Acétate d'éthyle.

CUPRAC: Capacité antioxydante par réduction du cuivre.

DM: Dry matter (matière sèche).

DMSO: Diméthylsulfoxyde.

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

DW: Dry weight (poids sec).

EI-MS: Electron ionization mass spectrometer.

EAG : Equivalent d'acide gallique.

EQ : Equivalent quercitine.

FC : Folin-Ciocalteu.

FRAP: Ferric ion Deducing Antioxydant Parameter.

HPLC: Chromatographie en phase liquide à haute performance.

I %: Pourcentage de l'activité anti-radicalaire.

IC₅₀: Concentration d'inhibition de 50% du DPPH[•]

Mo₈₀₃ : Molybdène.

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium.

NC: Néocuproéne.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

ORAC : Capacité d'absorbance du radicale oxygéné.

SRB: Sulforhodamine B.

TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Substances.

TCA: Temps de céphaline plus activateur.

TCK : Temps de Cephaneline Kaolin.



TP : Taux de Prothrombine.

TQ : Temps de Quick.

TRAP: Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter.

TT :Temps de Thrombine.

Liste des Figures

Numéro	Intitulé	Page
Figure 1	Répartition géographique des plantes Cistaceae	04
Figure 2	Structures de l'acide benzoïque et acide cinnamique	08
Figure 3	La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants	18
Figure 4	Diagramme d'extraction de <i>Cistus sp.</i>	30
Figure 5	Réaction du radical DPPH transformé en DPPHH	33
Figure 6	Rendements de différents extraits de <i>Cistus sp.</i>	36
Figure 7	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	37
Figure 8	Teneur en polyphénols de différents extraits de <i>Cistus sp.</i>	38
Figure 9	Courbe d'étalonnage de la quercétine	40
Figure 10	Teneur en flavonoïdes de différents extraits de <i>Cistus sp.</i>	40
Figure 11	Variation du pourcentage d'inhibition de DPPH de l'extrait <i>n</i> -hexane	43
Figure 12	Variation du pourcentage d'inhibition de DPPH de l'extrait de CHCl ₃	44
Figure 13	Variation du pourcentage d'inhibition de DPPH de l'extrait ACOET	44
Figure 14	Variation du pourcentage d'inhibition de DPPH de l'extrait <i>n</i> -butanolique	45
Figure 15	Variation du pourcentage d'inhibition de DPPH de l'extrait HMeOH	49
Figure 16	Temps de coagulation des extraits de <i>Cistus sp.</i>	51

Liste des Tableaux

Numéro	Intitulé	Page
Tableau 1	Distribution géographique des huit taxons des Cistaceae	03
Tableau 2	Classification systématique de <i>Cistus sp.</i>	05
Tableau 3	Distribution des Flavonols et Flavones dans le genre <i>Cistus</i>	06
Tableau 4	Distribution des flavan-3-ols et proanthocyanidines dans le genre <i>Cistus</i>	07
Tableau 5	Distribution des acides phénoliques dans le genre <i>Cistus</i>	08
Tableau 6	Distribution des tanins dans le genre <i>Cistus</i>	09
Tableau 7	Distribution des monoterpènes dans le genre <i>Cistus</i>	11
Tableau 8	Distribution des sesquiterpènes dans le genre <i>Cistus</i>	11
Tableau 9	Distribution des diterpènes dans le genre <i>Cistus</i>	12
Tableau 10	Les valeurs d'IC ₅₀ et les pourcentages d'inhibition des différents extraits de <i>Cistus sp.</i> et les deux standards	47

Remerciement

L'information et la formation ne sont que directives mais le fruit et l'épanouissement en sont la résultante.

Tout d'abord, nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et les moyens afin de pouvoir accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer nos plus vives reconnaissances à notre encadrant monsieur Boutellaa Saber (MAA) docteur au département de Biologie au centre Universitaire Abdelhafid Boussouf Mila.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements et gratitude à monsieur Boubendir Abdelhafid (MCA) pour avoir accepté de présider notre travail.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements et gratitude à Madame Bouchekrit Moulida (MCB) pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Nos remerciements s'adressent également à toute l'équipe du laboratoire de biochimie à la polyclinique de Sonaoua au niveau de Mila et surtout au responsable Monsieur Benremitta Ayoub.

Un grand Merci à tout ce qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

Dédicaces

♥ Je tiens en tout premier lieu à remercier
le bon dieu Allah

♥ Une chance m'a été offerte
pour dédier ce travail
aux personnes qui
très chers

♥ *À* ma mère Afifa

♥ *À* mon père Abdelhafid

♥ *À* mes jolies sœurs wiam et Dana

♥ *À* Abdessamed

♥ *À* mon oncle Malek et ma grande mère Aicha

♥ *À* toutes mes proches amies

♥ *À* mon encadrant Monsieur Saber Boutellaa

♥ **Wissal** ♥



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

*Mes chers parents qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras et
de suivre le bon chemin*

A ma chère grand-mère pour son encouragement durant mon travail

A ma sœur et mon frère

A toute ma famille, mes amis et collègues

Kahina



Dédicaces

D'un sentiment plein d'amour, de sincérité et de fidélité, je dédie ce travail:

À mes chers parents: Toufik et Fatiha à qui je dois ce qui je suis

À mes chers frères: Adnane, Abdel madjid et Adem

À ma chère sœur Nesrine et à ma chère belle sœur Lamia

Pour leurs soutiens infinis et leurs aides incessantes, à qui je souhaite un meilleur avenir.

À ma nièce Aridj et mes neveux: Mohammed adib et Eyass

À mes chères amies et à tous ceux qui j'aime et qui je respecte

Et j'espère conserver à jamais les souvenirs et liens qui nous unissent.

Ghozlane



INTRODUCTION

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'actualité malgré son ancienneté, elle a été la passion des plus grandes civilisations (chinoise, égyptienne, babylonienne, grecque, romaine, etc.) qui ont eu recours aux plantes médicinales pour leurs propriétés diverses (**Lahsissene et al, 2009**).

Au cours de ces dernières années, plusieurs raisons ont mené au rétablissement de l'usage des plantes médicinales. Elles sont d'abord d'un coût inférieur aux médicaments de synthèse, puis elles arrivent à un moment où les gens sont désillusionnés devant la médecine moderne qui n'a pu remédier à tous les maux. Selon l'OMS (**2008**), plus de 80% de la population mondiale utilisent les plantes médicinales pour se soigner (**Gonçalves et al, 2013**).

En effet les substances naturelles sont douées de propriétés thérapeutiques dues à ses métabolites secondaires ou variées grâce aux différents principes actifs qu'elles contiennent (**Berreguioua, 2016**).

Les polyphénols font justement partie de ces métabolites secondaires produits par les plantes pour se prémunir des attaques d'organismes externes (**Edeas, 2010**). Il a été établi que les polyphénols alimentaires jouent un rôle important dans la prévention des maladies dégénératives, du cancer et des maladies cardiovasculaires (y compris les troubles liés au sang d'où plusieurs études sont focalisées sur la recherche des anticoagulants naturels pour traiter les maladies thrombotiques sans effets secondaire des traitements d'anticoagulants synthétiques) (**Cordier et al, 2012**).

Ces maladies, selon des études récentes, sont liées au stress oxydatif des espèces réactives de l'oxygène et l'azote. Phytochimiquement, les polyphénols sont avérés comme des antioxydants puissants capables de neutraliser les radicaux libres, en donnant un électron ou un atome d'hydrogène, et cela signifie que les substances naturelles d'origine végétale sont douées de plusieurs activités biologiques (**Mezni et al, 2018**).

La flore algérienne présente un énorme intérêt scientifique pour les chercheurs en ethnobotanique, pharmacopée ou dans le domaine de la valorisation des substances naturelles (**Bechlem, 2018**).

Dans cette perspective? nous sommes intéressés à l'étude de la plante *Cistus sp.* qui appartient à la famille des Cistaceae. Plante connue fréquemment dans le bassin Méditerranéen par ses vertus médicinales les plus divers comme analgésique, antimicrobien,

anti-tumoral, anti-inflammatoire, gastroprotecteur et antioxydant (**Baslar S et al., 2002., Ustun O et al., 2004., Wang B., Qiu Y. L., 2006**).

Le but évident est d'élargir nos connaissances quant à la composition chimique de cette espèce et de mettre en valeur *in vitro* ses propriétés: antioxydantes et anticoagulantes. Cette dernière n'a fait l'objet d'aucune étude antérieure conséquente.

Ainsi, ce manuscrit est scindé en deux parties:

- Dans la première partie, nous aborderons les différentes connaissances bibliographiques: aspects botaniques, principaux molécules isolés à partir de différents espèces de *Ciste* et ethnopharmacologie.
- Dans la partie expérimentale, nous développerons dans le premier chapitre le matériel et les méthodes analytiques utilisées pour: l'extraction, le dosage colorimétrique des polyphénols et des flavonoïdes, l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits obtenus en utilisant le test DPPH, l'évaluation de l'activité anticoagulante en se procédant au test de Prothrombine (TP). Le deuxième chapitre sera consacré aux résultats obtenus dans notre étude et discussions.

Première partie
RECHERCHE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

ASPECTS BOTANIQUES







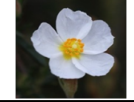



1. Présentation de la famille des Cistaceae

Les plantes de la famille Cistaceae sont en général des arbustes, sous-arbrisseaux et plus rarement des plantes herbacées. Elles peuvent être vivaces ou annuelles et sont caractéristiques des milieux secs et ensoleillés. Selon Beatriz Guzman, cette famille compte environ 200 espèces réparties en 8 genres que sont: *Cistus*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum*, *Tuberaria*, *Crocانthemum*, *Hudsonia* et *Lechea*. Les espèces qui caractérisent tous ces genres sont principalement localisées dans les zones tempérées du nord, particulièrement dans la région méditerranéenne (**Tableau 1**) (**Laraoui, 2016**).

En effet, toutes les espèces relevant des cinq premiers genres mentionnés ci-dessus, sont distribuées presque exclusivement dans le bassin méditerranéen. Les espèces constituant les trois derniers genres cités se rencontrent dans les régions tempérées de l'Amérique (**Figure 1**) (**Laraoui, 2016**).

Tableau 1. Distribution géographique des huit taxons des Cistaceae (**Laraoui, 2016**).

Taxon	Nombre d'espèces	Localisation	Images
<i>Helianthemum</i>	110	Europe centrale et méridionale, Russie, Asie centrale, Afrique du Nord (Algérie, Maroc, Tunisie, Lybie,...), Amérique .	
<i>Cistus</i>	21	Régions méditerranéennes, Afrique du Nord.	
<i>Crocانthemum</i>	20	Côtes atlantiques d'Amérique (Californie et Mexique).	
<i>Lechea</i>	17	Amérique du Nord .	
<i>Tuberaria= Xolantha</i>	12	Régions méditerranéennes occidentales et méridionales du Nord .	
<i>Fumana</i>	9	Europe méridionale, régions méditerranéennes .	
<i>Halimium</i>	8	Europe méridionale, Afrique du Nord, région méditerranéenne occidentale.	
<i>Hudsonia</i>	2	Amérique du Nord.	

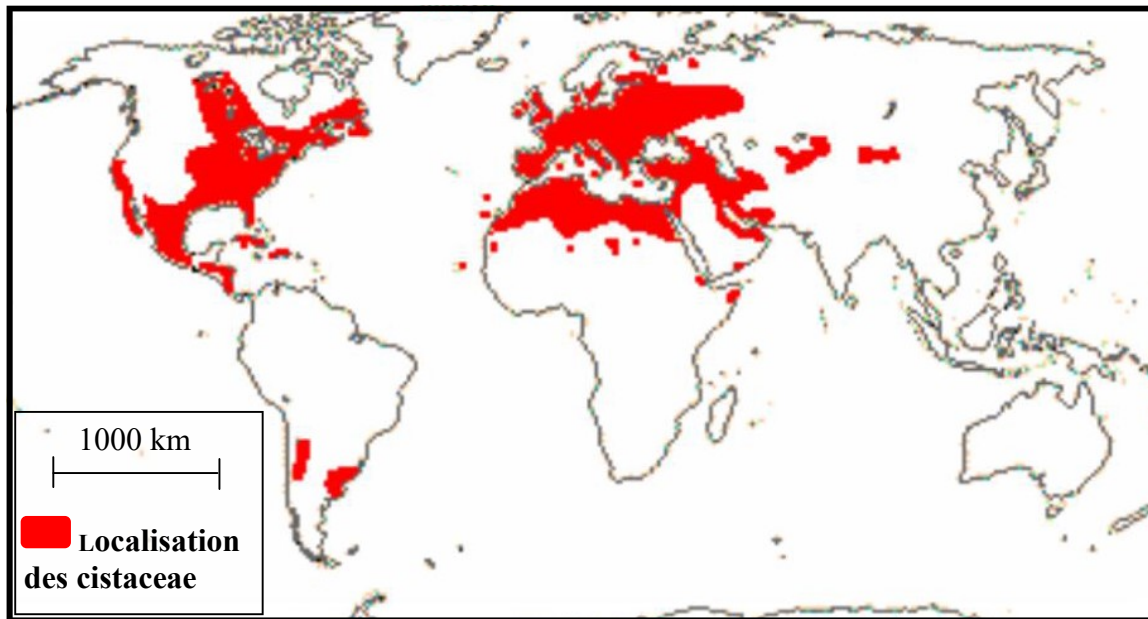


Figure 1. Répartition géographique des plantes Cistaceae (Laraoui, 2016).

2. Genre *Cistus*

Le genre *Cistus* comporte plusieurs espèces sous forme d'arbustes éternels. Ces arbustes sauvages se développent dans les bords marocains et méditerranéens (Guzmán et Vergas, 2009) avec 11 espèces de *Cistus* en Algérie: *C. ladaniferus* L., *C. sericeus*, *C. salvifolius* L., *C. Libanotis* L., *C. Polymorphus*, *C. villosus* L., *C. incanus*, *C. corsicus*, *C. crispus* L., *C. albidus* L., *C. monspeliensis* L. (Quezel et Santa, 1962).

2.1. Description botanique

Les *Cistes* sont des arbrisseaux appartenant à la famille des Cistaceae et au genre *Cistus*, qui rassemble une vingtaine d'espèces originaires des bords de la Méditerranée. Ils poussent spontanément dans les garrigues et talus du Midi aux sols secs, bien ensoleillés, que le sol soit caillouteux, pauvre, acide ou calcaire. Ils forment de petits buissons de 0,30 à 1,50 m environ de haut. Leur feuillage, qui varie selon les variétés du vert foncé au vert argenté en passant par le jaune ou le panaché, est persistant et leurs feuilles souvent velues sont poisseuses au toucher. La floraison dure d'avril à juillet est très abondante. Leurs jolies fleurs en coupe à 5 pétales chiffonnés ne durent qu'un jour, mais sont aussitôt remplacées par d'autres (Quezel et Santa, 1962).

Tous les *Cistes* poussent en climat sec et en terrain pauvre, mais ils s'adaptent aux climats océanique et semi-continentale. Ils sont semi-rustiques, supportant le gel jusqu'à -10 ou -15°C selon les variétés et les emplacements plus ou moins abrités (Quezel et Santa, 1962).

2.2. Place à la systématique

La séparation taxonomique du genre repose sur des observations phénotypiques, notamment des caractères morphologiques comme la forme, le nombre de nerfs, la couleur et les trichomes des feuilles et des tiges, ainsi que des caractéristiques de reproduction telles que le nombre de pétales et de sépales, la forme et la couleur des fleurs, le nombre de taille de style. La taxonomie de genre basée sur le phénotype a été confirmée récemment à l'aide d'approches moléculaires et de chimiotypage de plantes (Dimitra et al, 2014).

Tableau 2. classification systématique de *Cistus sp.* (Laraoui, 2016).

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Tracheobionta ou Angiospermes
Classe	Magnoliopsida ou Dicotylédones
Sous-classe	Dilleniidae
ordre	Malvales
famille	Cistaceae
genre	<i>Cistus</i>
espèce	<i>Cistus sp.</i>

3. Métabolites secondaires isolés

De nombreuses plantes ont des défenses contre un large éventail de facteurs de stress et leurs variations de défense peuvent dépendre de la concentration en métabolites secondaires. Comme la plupart des caractères d'organismes, les métabolites secondaires des plantes sont variables à toutes les échelles, notamment parmi les espèces, les populations, les individus et les différentes parties de la plante (Christina et al, 2016).

3.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes isolés ou mis en évidence dans les plantes Cistaceae sont constitués essentiellement de flavonols *O*-méthoxylés et/ou *O*-glycosylés, flavanols et flavones. Bien que des génines de type myricétine, apigénine, lutéoline, gossypétine, herbacétine et isorhamnétine ont été isolés à partir de feuilles et de résine de cretan de *Cistus creticus sub sp.*, la présence de flavonoïdes dérivés du kaempférol et quercétine est particulièrement remarquable dans cette famille (Dimitra, 2014).

3.1.1. Flavonols et flavones

Le genre *Cistus* est caractéristique de la région méditerranéenne. La comparaison chimique des résines fraîchement récoltées de différentes espèces de ce genre telles que *C. ladanifer*, *C. palinhæ*, *C. albanicus*, et *C. parviflorus*, effectuée par Peter Proksch et Paul-Gerhard Gülz (1984), a permis de définir les flavonoïdes *O*-méthoxylés comme marqueurs chimio-taxonomiques (Vogt et al, 1987).

Tableau 3. Distribution des Flavonols et Flavones dans le genre *Cistus*.

	Flavonols et flavones	Espèce	Pays	Références
1	Apigénine	<i>C. ladanifer</i>	Espagne	Christina et al, 2016.
2	3-méthyléther de kaempférol			
3	4'-méthyléther d'apigénine			
4	7-méthyléther d'apigénine			
5	3,7-di- O -méthyléther de kaempférol			
6	Myricétine	<i>C. monspeliensis</i>	Espagne	Dimitra et al, 2014.
7	Apigénine-6-C-glucoside	<i>C. ladanifer</i>	Espagne	Barros et al, 2013.
8	Apigénine-6-C-rutinoside		Portugal	

3.1.2. Flavan-3-ols et proanthocyanidines

Les études phytochimiques réalisées par Frank Peterleit et ses collaborateurs (1991), dans leurs recherches systématiques des polyphénols des *Cistes*, ont permis l'isolement et l'identification de flavonoïdes de types flavan-3-ol et proanthocyanidine (Tableau 4).

Tableau 4. Distribution des flavan-3-ols et proanthocyanidines dans le genre *Cistus*.

	Flavan-3-ols et proanthocyanidines	Espèce	Pays	Références
9	quercétin-3-O-rhamnoside	<i>C. creticus</i> sub sp	Italie	Filippo et al, 2016.
10	tricétin-4'-O-β-D glucopyranoside			
11	tricétine-4'-O-β-D rutinoside			
12	3'-méthoxy-quercétine- 3-O-(3-β-d-glucopyranosyl-2-rhamnopyranosil-4-glucopyranosyl-2-rhamnopyranosil) -glucoside			
13	3', 4'-diméthoxyquercétine-3-O-rhamnopyranoside			
14	Epicatéchine-(4β→6)-catéchine	<i>C. incanus</i>	Allemagne	Laraoui, 2016.
15	Epigallocatechine-3-O-gallate-(4β→6)-gallocatéchine			
16	Epigallocatechine-(4β→8)-catéchine			
17	Epigallocatechine-(4β→8)-gallocatéchine			
18	Epigallocatechine-3-O-gallate-(4β→8)-gallocatéchine			
19	Gallocatéchine-(4α→8)-gallocatéchine			

3.2. Acides phénoliques

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïques et cinnamiques (Figure 2) (Bruneton, 1993).

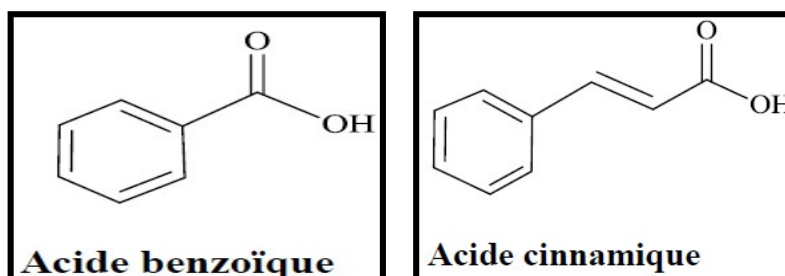


Figure 2. Structures de l'acide benzoïque et acide cinnamique (Laguerre et al, 2007).

Tableau 5. Distribution des acides phénoliques dans le genre *Cistus*.

	Acides phénoliques	Espèces	Pays	Références
20	L'acide salicylique	<i>C. incanus</i> <i>C. albidus</i>	Allemagne	Peer, 2014
21	l'acide gentisique			
22	l'acide protochatéchui- que			
23	l'acide vanillique			
24	l'acide caféique			
25	l'acide sinapinique			
26	l'acide néochlorogéni- que			
27	l'acide cryptochlorogé- nique			
28	l'acide chlorogénique			
29	l'acide gallique	<i>C. monspeliensis</i> <i>C. populifolius</i> <i>C. salviifolius</i> <i>C. laurifolius</i> <i>C. ladanifer</i> <i>C. incanus</i> <i>C. crispus</i> <i>C. albidus</i> <i>C. cranus</i> <i>C. clusii</i>	Espagne	Dimitra et al, 2014

3.3. Les tanins

Les tanins constituent un autre groupe de substances phénoliques, qui ont un caractère oligomérique ou polymérique. Les tanins sont aussi communément appelés agents tannants (Peer, 2014) et peuvent complexer les protéines et les glucides polymères. Basé sur la structure chimique des blocs de construction monomères, les tanins sont divisés en quatre groupes : tanins condensés (proanthocyanidines), phlorotannins, tanins hydrolysables et Le quatrième groupe décrit les polymères mélangés des éléments structurels des tanins et d'autres macromolécules (Peer, 2014).

Tableau 6. Distribution des tanins dans le genre *Cistus*.

	tanins	Espèces	Pays	Références
30	proanthocyanidines	<i>C. incanus</i>	Allemagne	Peer, 2014.
31	Phlorotannins(1,3,5-trihydroxybenzène)			
32	gallotannin			
33	ellagitannine	<i>C. monspeliensis</i> <i>C. populifolius</i> <i>C. salviifolius</i> <i>C. laurifolius</i> <i>C. ladanifer</i> <i>C. incanus</i> <i>C. crispus</i> <i>C. albidus</i> <i>C. cranus</i> <i>C. clusii</i>	Espagne	Dimitra et al, 2014.

3.4. phytohormones et vitamines

La production de phytohormones et de vitamines a été étudiée dans les graines de *C. albidus*, les feuilles et les fleurs, en relation avec la maturité des plantes. Le principal composé de vitamine E contenu dans les graines de *C. albidus* était l' α -tocophérol, dont la teneur était plus élevée chez les plantes matures que chez les plus jeunes (Dimitra et al, 2014).

De même, les graines de plantes matures présentaient des concentrations plus élevées d'acide salicylique et d'acide jasmonique, ce qui n'était pas le cas pour les fleurs et les feuilles, où aucune différence de concentration n'a été observée entre les groupes d'âge (Dimitra et al, 2014).

3.5. Les composés volatils

Nommés parfois essence végétale (latin : *essentia*, « nature d'une chose ») (Soualeh et Soulimani, 2016). Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatiles, isolées des plantes par expression mécanique (Guinoiseau E, 2010), Ou par hydrodistillation du végétal. Une fois la phase aqueuse éliminée par décantation du distillat, la phase organique supérieure contient essentiellement des substances volatiles terpéniques à 10 et 15 atomes de carbones, dites mono- et sesquiterpènes (Nicolas et Elisabeth, 2013).

La composition générale des huiles essentielles extraites de quelques plantes Cistaceae est un mélange de terpènes (monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes labdaniques) et leurs dérivés esters (Dimitra et al, 2014).

3.5.1. Les terpènes

La teneur en métabolites et les substances volatiles dans le *Ciste* sont influencées par plusieurs facteurs, notamment les phénomènes diurnes, saisonniers, écologiques, la sécheresse, la température, l'âge de la plante et les précipitations (Dimitra et al, 2014).

De plus, en fonction du type de trichome qu'elles contiennent, les espèces de *Ciste* peuvent être fortement productrices de monoterpènes et de sesquiterpènes, alors que d'autres de diterpènes (Dimitra et al, 2014).

Tableau 7. Distribution des monoterpènes dans le genre *Cistus*.

	Monoterpènes	Espèces	pourcentage	Pays	Références
34	α -pinène	<i>C. monspeliensis</i>	54% à 87%	Italie	Noguès et al, 2015.
35	myrcène				
36	limonène				
37	3-carène				
38	α -pinène	<i>C. ladanifer</i>	17.07%	Espagne	Aranzazu et al, 2015 Loizzo et al, 2013 Verdeguer et al, 2012
39	Bornyl acétate		15.34%		
40	Camphène	<i>C. clusii</i>	22.8%		

Tableau 8. Distribution des sesquiterpènes dans le genre *Cistus*.

	sesquiterpènes	Espèces	Pourcentage	Pays	Références
41	bicycloélémente	<i>C. albidus</i>	0.18%	Espagne	Aranzazu et al, 2015
42	acorénone				
43	α -amorphène		1.62%		
	E- Caryophyllène		19.26%		
	B-bourbonène		13.27%		
44	Trans-cadina-1,4diène	<i>C. clusii</i>	0.04%		
45	δ -amorphène		0.42%		
46	cyclosativene	<i>C. ladanifer</i>	0.43%		
		<i>C. clusii</i>	2.11%		

Tableau 9. Distribution des diterpènes dans le genre *Cistus*.

	Diterpènes	Espèce	Pays	Références
47	acide 6 β -acétoxy-7-oxo-8-labden-15-oïque	<i>C. ladanifer</i>	Espagne	Christina et al, 2016.
48	acide 7-oxo-8-labden-15-oïque			
49	acide oxocativique			
50	15,18-diacétoxy-3-èn-cis-clérodane	<i>C. monspe-liensis</i>	Grèce	Kalpoutzakis et al, 2003. Laraoui, 2016.
51	15-acétoxy-3-èn-cis-clérodan-18-ol			
52	Acide 15-acétoxy-cis-clérodan-3-èn-18-oïque			
53	15-acétoxy-cis-clérodan-3-èn-18-al			
54	15-hydroxy-cis-clérodan-3-èn-18-al			

4. Ethnopharmacologie

4.1. Usage traditionnel

Divers préparation à base d'espèce de *Ciste*, ont fréquemment employées comme remède en médecine traditionnelle du bassin méditerranéen notamment en Portugal, Espagne, Sud de la France, Italie, Algérie, Maroc, Turquie, Grèce pour leurs divers effets : analgésique, antimicrobien, anti-tumoral, antiviral, anti-inflammatoire, antifongique, gastroprotecteur et antioxydant (Baslar et al, 2002, Ustun et al, 2004, Wang et Qiu, 2006).

- L'espèce *Cistus ladaniferus L.*, plus connue sous le nom *Ciste* à gomme, sécrète du labdanum qui est une sorte de gomme-résine produite par les glandes oléifères présentes au niveau des feuilles, rameaux et des sommités fleuries de la plante. Cette résine extraite par immersion du *Ciste* dans de l'eau chaude carbonatée, est un produit noirâtre possédant une odeur ambrée et une saveur amère.

La même plante est largement utilisée en thérapeutique traditionnelle pour guérir un bon nombre de maladies. Dans la région d'Al Haouz-Rhamna (Maroc), la poudre des graines associée avec celle de la nigelle (*Nigella sativa*) est employée pour traiter le diabète (Benkhniq et al, 2014). Elle est aussi utilisée à grande échelle par les populations locales du nord du Maroc comme antiacide, anti-diarrhéique et antispasmodique (Aziz et al, 2006). En Espagne, les infusions de ses feuilles et fleurs sont employées comme remède pour soulager les maux gastriques, l'inflammation et nettoyer les blessures (Crespo et al, 2009).

- En Algérie, le décocté des feuilles de *Cistus albidus* est utilisé pour apaiser les douleurs gastriques et comme hypoglycémiant et en cataplasme, on les emploie contre les abcès (Lahsissene et al, 2009). Les feuilles sont également consommées sous forme de tisane, en infusion dans du thé, comme digestif. Cette plante est aussi utilisée contre les maux d'intestins (Bammi et Douira, 2002).
- *Cistus creticus* L. (Syn. *C. incanus* ou *C. villosus*), espèce très répandue sur le pourtour du bassin méditerranéen, est un arbrisseau mesurant environ un mètre. La décoction de ses feuilles agit contre les coliques (Bellakhdar, 1998).
- En Turquie, l'espèce *C. salvifolius* L. est utilisée contre les hémorragies et la bronchite (Bellakhdar, 1998). et également employé pour le traitement de la fièvre, la diarrhée, le rhumatisme, les dermatoses, et d'autres maladies inflammatoires. Dans certains pays méditerranéens les infusions des feuilles de *Cistus salvifolius* sont utilisées pour le traitement du cancer (Guvenc et al, 2005).
- *Cistus monspeliensis* L. Les fleurs, en décoction, sont utilisées contre les douleurs d'estomac. Le décocté de la plante entière est utilisé, en cataplasme, pour traiter les blessures. La décoction des branches est employée contre l'asthme (Lahsissene et al, 2009).

4.2. Usage moderne

L'usage moderne des plantes des *Cistus* est illustré dans le passage de la plante au principe actif c'est-à-dire la naissance de la chimie des substances actives d'origine végétale qu'ils s'agissent des molécules pures ou d'extraits au sens large (préparation

phytothérapeutique ou l'huile essentielle) (Cos et al, 2006).

Toutes les espèces de *Ciste* sécrètent des huiles essentielles en quantités différentes, composées principalement de composés monoterpéniques, sesquiterpéniques et diterpéniques, mais toutes ne sont pas entièrement caractérisées. Plusieurs espèces de *Cistes* sécrètent également le «labdanum», un exsudat collant recouvrant les feuilles et les tiges principalement en été, qui partage la composition terpénoïde avec l'huile essentielle (Berreghioua, 2016).

De nombreuses études ont ainsi exploré les propriétés pharmacologiques de la résine sécrétée par les feuilles de *Cistus*. Ces propriétés comprennent les propriétés allergéniques, anti-agrégantes, anti-leucémiques, anti-oxydantes, antibactériennes, anti-péroxydantes, anti-proliférantes, anti-radicales, antiseptiques, antiulcéreuses, astringentes, bactéricides, cardio-protectrices, cytotoxiques, dermo-protectrices, diurétique, fongicide, gastro-protecteur, hémostatique, myorelaxant, nervine, sédatif, spasmolytique, stimulant (Dimitra et al, 2014).

Ci-dessous, nous discutons certaines des fonctions biologiques les plus étudiées des espèces de *Ciste* et de la nature chimique des puissants groupes de composés correspondants produits par les plantes.

4.2.1. Activité antibactérienne et antifongique

Des extraits de feuilles organiques et aqueux de *C. monspeliensis*, ainsi que de *C. villosus* (= *incanus*), poussant naturellement au Maroc et en Tunisie, présentaient des propriétés antimicrobiennes et antifongiques principalement actives contre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae* et *Pseudomonas aeruginosa*, ainsi que levure *Candida glabrata* (Bouamama et al, 2006).

Les extraits de fleurs de *C. monspeliensis* étaient actifs contre les espèces de bactéries à Gram positif du genre *Staphylococcus* et avaient des effets inhibiteurs de croissance significatifs sur l'épiderme de *Staphylococcus* (Dimitra et al, 2014).

L'huile essentielle extraite des feuilles de *C. creticus sub sp. Eriocephalus*, dont les constituants principaux sont l'oxyde de manoyle et l'oxyde de 13-épi-manoyle, a montré

une activité plutôt faible contre *E. coli* et *P. aeruginosa*, modérée contre *Candida albicans*, *Micrococcus luteus* et *S. epidermidis* et surtout contre *S. aureus* et *Bacillus subtilis* (Demetzos et al, 1995), tandis que la fraction d'huile volatile avait une activité *in vitro* élevée contre *Borrelia burgdorferi* au sens strict (Dimitra et al, 2014).

L'activité antimicrobienne d'extraits d'oxyde de manoyle de *C. creticus sub sp.* Les fruits, les feuilles et la résine de *Cistus creticus* ont été trouvés dépendants de l'espèce vis-à-vis des *staphylocoques* à Gram positif, inactifs vis-à-vis des bactéries à Gram négatif (Anastasaki et al, 1999).

Plusieurs diterpènes semi-synthétiques du type labdane de la résine "ladano" de *C. creticus* ont été signalés pour leur activité antimicrobienne à la fois contre les bactéries gram positives et gram négatives ainsi que contre les champignons pathogènes, les effets les plus importants étant présentés par deux dérivés esters chloroéthylcarbamidiques (Dimitra et al, 2014). *C. ladanifer* et *C. populifolius* les extraits aqueux avaient une activité antibactérienne contre *E. coli* (Barrajón-Catalán et al, 2010).

Les composés phénoliques présents dans les extraits de tissus aériens de *C. ladanifer* ont montré une activité antifongique contre les espèces de *Candida* (Barros et al, 2013) de manière dose-dépendante (Barrajón-Catalán et al, 2010). Une forte activité antimicrobienne contre les bactéries à Gram positif a également été démontrée chez *C. ladanifer* et contre les bactéries à Gram négatif pour *C. populifolius* (Barrajón-Catalán et al, 2010).

4.2.2. Activité antivirale

L'extrait riche en polyphénols *CYSTUS052* dérivé de *C. incanus* s'est avéré présenter une puissante activité virale anti-influenza sans provoquer d'effets secondaires toxiques ni induire de résistance aux virus (Ehrhardt et al, 2007).

La première étude clinique a montré que l'extrait de *C. incanus* (*CYSTUS052*) pouvait être utilisé pour le traitement des infections des voies respiratoires supérieures et inférieures (Dimitra et al, 2014). De plus, les extraits de *C. ladanifer* et de *C. populifolius* ont pu inhiber la réplication du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) (Abad et al, 1997).

4.2.3. Activité myorelaxante

Les effets myorelaxants d'extraits aqueux de *C. incanus* et de *C. monspeliensis* ont été illustrés sur des bandes de muscle lisse longitudinal de l'iléon et de l'aorte de rat d'une manière dépendante de la concentration et réversible (**Attaguile et al, 2004**).

Les auteurs ont attribué l'inhibition de la mobilité intestinale des composés polyphénoliques aux fortes concentrations de flavonoïdes produits par les plantes de *Ciste* (**Attaguile et al, 2004**).

De plus, les extraits aqueux de *C. populifolius* et de *C. ladanifer* ont été évalués in vitro sur des modèles animaux et leurs effets spasmolytiques significatifs liés à la dose et analgésiques ont été démontrés (**Dimitra et al, 2014**).

5. La toxicité

La toxicité des plantes médicinales peut être liée à des mélanges de composés actifs qu'elles contiennent tels que les terpènes, les alcaloïdes, les saponines, et d'autre substance chimique, qui augmente le risque de réactions indésirable par leurs effets additifs ou synergique (**Saad et al, 2006**).

Selon la durée, la fréquence et la quantité de produit toxique auxquelles un individu est exposé, on observe plusieurs types de toxicité (**Alain, 2002**).

Classiquement, en présence d'une substance inconnue la première étape dans la recherche d'une activité pharmacologique débute par l'étude de la toxicité et en particulier par l'évaluation de la dose létale 50 (DL 50) (**Rollan, 1988**).

Certains métabolites secondaires produits par différents espèces de *Cistus* exercer des effets toxiques sur les mammifères. Les composés les plus toxiques sont l'acide gallique et les tanins, néfastes pour le foie et les reins. Plusieurs cas de toxicité mortelle chez les bovins ont été rapportés, dus à l'ingestion de *C. salviifolius* (**Yeruham et al., 2002**).

La consommation directe des feuilles de ces plantes ou de leurs extraits (sous forme d'infusions de thé) en plus grandes quantités peut devenir nocive et même mortelle (**Dimitra et al, 2014**). En citant une étude réalisée évalue la toxicité potentielle de l'extrait aqueux de feuilles de l'arbuste *C. ladaniferus* (extrait *CL*) par la méthode d'administration orale aiguë et subchronique chez la souris et le rat (**El Kabbaoui et al, 2017**).

Cependant, les résultats obtenus au cours de l'essai de toxicité aiguë, lorsqu'on a administré à des souris des doses de 3 000 et 5 000 mg/kg, l'extrait de *CL* a produit un taux de mortalité de 10 à 30%, respectivement, et induit des signes de toxicité. En revanche, aucune mortalité ni effet indésirable n'a été noté aux doses de 1000 et 2000 mg/kg. La dose létale médiane (DL50) de l'extrait a été estimée à plus de 5000 mg/kg. (El Kabbaoui et al, 2017).

Dans l'étude subchronique, l'extrait de *CL* n'induit pas de mortalité ni d'effets indésirables liés au traitement en ce qui concerne le poids corporel, le comportement général, le poids relatif des organes, les paramètres urinaires, hématologiques et biochimiques. L'extrait de plante pourrait être classé dans la classe 5, puis considéré comme une substance non toxique (El Kabbaoui et al, 2017).

CHAPITRE II

ACTIVITÉS BIOLOGIQUES



1. Stress oxydatif et activité antioxydante

1.1. Définition du stress oxydant

Les radicaux libres sont des molécules instables et fortement réactives, entraînant le stress oxydant, qui est défini comme un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants . Il peut se produire en raison de la surproduction d'oxydants, la diminution de la défense antioxydante ou une combinaison de ces deux facteurs (Suresh et al, 2008) (figure 3).

Les protéines ainsi que les lipides sont les cibles principales des ROS. Ces derniers causent la peroxydation lipidique, l'oxydation des protéines et les altérations de l'ADN (Deaton et Marlin, 2003), provoquant ainsi le développement du cancer, du diabète, des maladies neuro-dégénératives et des maladies cardio-vasculaires (Krim, 2014).

L'organisme humain a développé des systèmes de défense pour traiter ce phénomène (stress oxydant) et lutter contre les espèces réactives qui sont préjudiciables à la vie humaine (Laguerre et al, 2007).

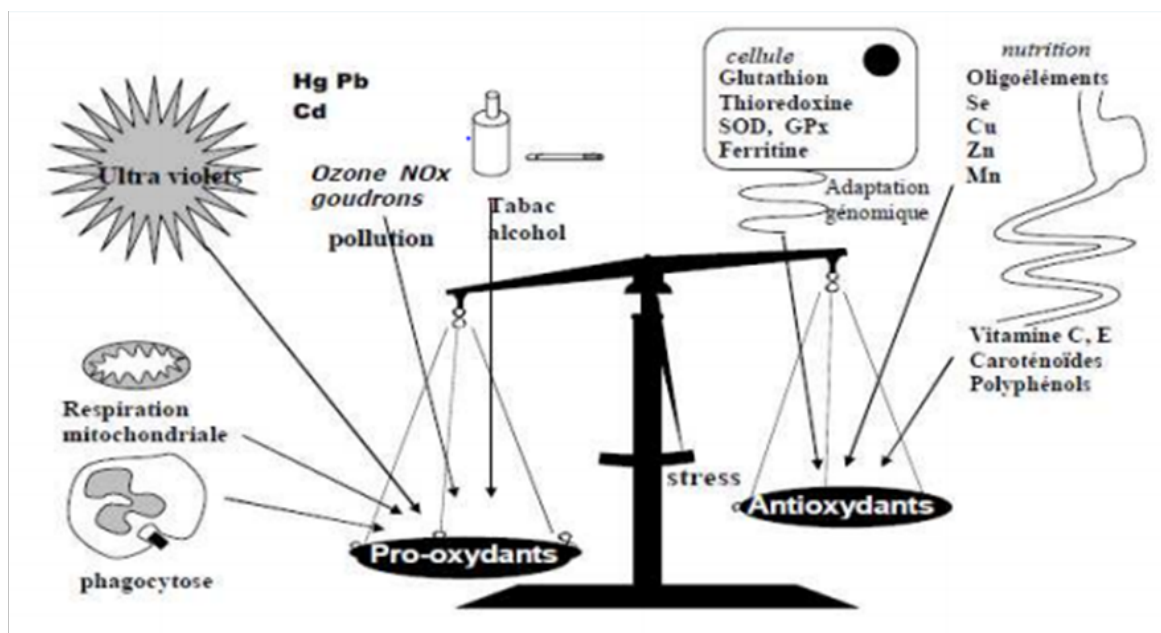


Figure 3. La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (Krim, 2014).

1.2. Définition des antioxydants

Un nouveau concept beaucoup plus général a défini un antioxydant comme "une substance qui retarde, empêche ou élimine les dommages oxydatifs à une molécule cible". Les antioxydants peuvent empêcher ou retarder les processus d'oxydation causés par les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ils ont la capacité de contrecarrer les effets néfastes des radicaux libres dans les tissus (**Abdel-Hameed, 2009**).

1.3. Définition des radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. Dans les phénomènes de stress oxydant, les radicaux libres qui interviennent ont une propriété caractéristique commune, celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène. Ceci leur confère la dénomination d'espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) ou de l'azote (ERA ou RNS) (**Zerargui, 2015**).

1.4. Mode d'évaluation de l'activité antioxydante

Il est clair qu'il serait difficile de développer une méthode qui prenne en compte tous les paramètres et qui soit applicable sur tous les substrats et les antioxydants. Afin de choisir la bonne méthode, il faut savoir ce que l'on va mesurer et évaluer (**El Kalamouni, 2010**).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes ROO• par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter); les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter); ou les radicaux ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH• (diphényl-picrylhydrazyle) (**BENSOUICI, 2014**).

1.4.1. Test de réduction du radical-cation ABTS•+ (test TEAC)

Dans la méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), l'activité antioxydante d'un extrait est déduite de sa capacité à inhiber un radical précis: le radical ABTS•+ (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6- sulfonique).

Cette capacité est comparée au Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8- tétraméthylchroman-2-carboxylique, analogue structural hydrosoluble de la vitamine E). Initialement, la formation du radical cation ABTS•+ résulte d'un arrachement d'un électron de l'un des atomes d'azote de la molécule ABTS par un oxydant (persulfate de potassium). En présence de Trolox ou d'antioxydants donneurs de H•, ce radical ABTS•+ de coloration bleu-vert est réduit en ion ABTSH+ incolore. Le suivi de cette décoloration à 734 nm permet d'évaluer le potentiel antiradicalaire de l'extrait (**BIDIE et al, 2011**).

1.4.2. Test de réduction d'un complexe ferrique (test FRAP)

Le test FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power) est développé pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ (Le ferricyanure de potassium) en fer ferreux (Fe²⁺). En effet, le Fe³⁺ participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Doukani et al, 2014**).

1.4.3. Test de capture des radicaux peroxydes (test ORAC)

Le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) évalue la capacité d'un antioxydant à réduire la vitesse d'oxydation de la fluorescéine par des radicaux peroxydes ROO• générés par l'AAPH (**Techer, 2013**).

1.4.4. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

La méthode CUPRAC (cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) est basée sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproène (NC), cuivre (Cu²⁺)₂NC₂-Cu²⁺. En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre-neocuproène est réduit et cette réaction est quantifiée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm (**Bensouici et al, 2016**).

Le principe de ce test se base sur la conversion des hydroxydes phénoliques en quinones à travers la réduction du complexe Cu²⁺-Nc, produisant ainsi un complexe chromogène de Cu²⁺-Nc qui absorbe à 450 nm (**Bensouici et al, 2016**).

1.4.5. Test de blanchissement du β -carotène

Cette méthode est basée sur la perte de la couleur jaune du β -carotène et donc de la consommation de celui-ci, due à la réaction avec les radicaux qui sont formés par l'oxydation de l'acide linoléique en émulsion. Le blanchissement du β -carotène, ralenti en présence d'antioxydants, est mesuré par un suivi spectrophotométrique à 470 nm. L'absorbance est ainsi lue au temps 0 puis au bout de deux heures. Cette méthode est sensible, ceci étant dû à la forte absorption du β -carotène mais est plus lente que celle du DPPH. Récemment, la méthode a été améliorée grâce à l'utilisation de microplaques à 96 puits. Cette méthode est largement utilisée dans l'évaluation de l'activité anti-oxydante de différents types d'échantillons tels que les composés seuls, les extraits de plantes, de graines, de fruits, de légumes (Issa et al, 2013).

1.5. Activité antioxydante du genre *Cistus*

Les espèces de *Ciste* riches en composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes, présentent des propriétés antioxydantes importantes. Ils sont considérés comme des agents antioxydants très puissants en raison de leur structure, se rapportant en particulier à la position des groupements hydroxyles sur les noyaux aromatiques, et la capacité des composés aromatiques à supporter une délocalisation électronique. Ces dernières années, un intérêt particulier a été accordée aux propriétés antioxydantes des flavonoïdes (Soo Cheon et al, 2013), qui seraient attribuées à:

- leur capacité à piéger directement les radicaux libres.
- leur pouvoir de chélater les ions métalliques impliqués dans la production des espèces oxygénées réactives (EOR).
- leur capacité d'inhiber quelques enzymes en particulier les oxydases et d'inhiber les enzymes pro-oxydantes.

Ils exercent leur capacité antioxydante au travers de la stimulation ou de la protection des systèmes antioxydants endogènes. En effet, ils sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. Cette même activité antioxydante leurs permet de réguler les radicaux comme l'oxyde nitrique qui favorise une bonne

circulation sanguine, coordonne l'activité du système immunitaire avec celle du cerveau et module la communication entre les cellules de ce dernier (Saffidine, 2015).

Il a été confirmé que l'espèce *Cistus laurifolius* est caractérisée par des propriétés antioxydantes (Sadhu et al, 2006). Dans l'extrait de feuilles et de petites branches de *Cistus laurifolius*, la présence de 16 composés bioactifs a été déterminée par les techniques de RMN 1 H et 13 C et la spectrométrie de masse EI-MS. Les composés suivants de *Cistus laurifolius* ont montré l'aptitude à capter les radicaux libres: la 3-O-méthyl quercétine, la 3,7-O-diméthyl quercétine, l'acide ellagique, la quercétine 3-O- α - rhamnoside, 1-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-2-[4-(3- α -L-rhamnopyranoxypropyl)-2-méthoxyphénoxy]-1,3-propanediol, olivil 9-O- β -D-xyloside, berchemol 9-O-rhamnoside et (7S, 8R)-dihydrodédihydrodiconiférol, l'alcool 9'-O- α -L-rhamnoside (isomère majeur). Il a été observé que *Cistus incanus* et *Cistus parviflorus* montrent tous deux une activité élevée des radicaux toxiques libres épurateurs (Stępień et al, 2018).

Dans des études ultérieures, il a été observé que la teneur en composés phénoliques antioxydants dans les extraits de *Cistus populifolius* était supérieure à celle de *Cistus ladanifer*. En outre, l'analyse de la capacité des extraits à inhiber la formation de radicaux lipidiques peroxy a confirmé que *Cistus populifolius* possède une activité antioxydante supérieure à celle de *Cistus ladanifer* (Stępień et al, 2018).

Il a également été confirmé que d'autres espèces de *Ciste*, notamment *Cistus incanus* L. et *Cistus monspeliensis* L., contiennent de nombreux composés à potentiel antioxydant, notamment des polyphénols et des flavonoïdes. Leur capacité antioxydante a également été examinée en raison de la présence de phénols, des flavonoïdes et des tanins des extraits obtenus à l'éthanol, à l'hexane et à l'eau des feuilles de *Cistus monspeliensis* et de *Cistus salvifolius*. L'activité antioxydante la plus élevée a été démontrée par des extraits à l'éthanol des deux espèces de *Ciste*. Les résultats de la recherche indiquent que le bon choix du type de solvant affecte l'obtention d'un extrait à haute teneur en antioxydants (Stępień et al, 2018).

Les recherches de Loizzo et al. (2013) ont indiqué que les huiles essentielles des espèces *Cistus creticus*, *Cistus salvifolius*, *Cistus libanotis*, *Cistus monspeliensis* et *Cistus villosus* présentaient des propriétés antioxydantes (Loizzo et al, 2013). Elles ont indiqué

que les plus grandes propriétés antioxydantes avaient des huiles essentielles dérivées de *Cistus monspeliensis* et *Cistus libanotis*. Ils ont également analysé leur activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase (BChE) (Stępień et al, 2018).

Les résultats des travaux de recherche susmentionnés soulignent que les extraits des espèces de *Ciste* susmentionnées sont une source de composés à fort potentiel antioxydant et peuvent être utilisés dans le traitement de nombreuses maladies causées par le stress oxydatif et peuvent être utiles dans la prévention et le traitement de la maladie d'Alzheimer (Stępień et al, 2018).

2. Activité anticoagulante

Les anticoagulants sont nécessaires au traitement à court terme des troubles thrombotiques artériels et veineux et à la prévention à long terme des récurrences. Bien que certains médicaments présentent quelques limitations liées à ces applications cliniques, La recherche de nouvelles substances ayant des activités anticoagulantes et anti thrombotiques est donc pertinente (Félix-Silva et al, 2014)

Les plantes médicinales ont toujours été la première source de molécules anticoagulantes et anti thrombotiques (Félix-Silva et al, 2014).

2.1. Notion de l'hémostase

L'hémostase est l'ensemble des mécanismes qui concourent à maintenir le sang à l'état fluide à l'intérieur des vaisseaux, soit arrêtent les hémorragies et empêchent les thromboses. On distingue classiquement trois temps de l'hémostase :

- l'hémostase primaire, ferme la brèche vasculaire par un "thrombus blanc" (clou plaquettaire).
- la coagulation qui consolide ce premier thrombus en formant un réseau de fibrine emprisonnant des globules rouges (thrombus rouge).
- la fibrinolyse, permet la destruction des caillots, ou la limitation de leur extension. Ces trois temps sont initiés simultanément dès qu'est enclenché le processus d'hémostase (De Revel et al ,2004).

2.2 Exploration de la coagulation

L'exploration de la coagulation est nécessaire pour apprécier un risque hémorragique. Elle s'inscrit dans le cadre du dépistage d'anomalies de l'hémostase. Il existe divers modèles ou tests pour dépister l'activité de coagulation (cordier et al, 2012).

2.2.1. Temps de cephaline + Activateur (TCA)

Le TCA mesure le temps de coagulation à 37 °C d'un plasma en présence de phospholipides (céphaline), d'un activateur de la phase contact (kaolin, acide ellagique, célite ou autre) et de calcium. Le temps obtenu est exprimé par rapport au temps du plasma témoin, dont la valeur moyenne varie entre 30 et 40 secondes selon les réactifs utilisés. Le résultat peut également être exprimé en rapport malade/témoin. Le TCA explore la voie de la coagulation déclenchée par le contact (voie dite « endogène ») et il est donc en fonction de la concentration plasmatique de chacun des facteurs de coagulation impliqués : facteurs de la phase contact (facteurs XII, KHPM, prékallikréine), facteurs XI, IX, VIII, X, V, II et fibrinogène. Il n'explore pas les plaquettes qui sont remplacées par la céphaline, ni le facteur VII. Seuls les déficits en facteurs VIII, IX et XI sont associés à un risque hémorragique. Les déficits en facteur XII, KHPM et PK sont le plus souvent asymptomatiques (**Raber AN, 1990**).

Le TCA est allongé lorsqu'il dépasse de 6 à 8 secondes le temps du témoin, mais la frontière n'est pas stricte. L'allongement du TCA doit être interprété en fonction du contexte clinique (notion d'antécédents hémorragiques personnels et/ou familiaux, existence d'une maladie associée) et des résultats des examens de coagulation effectués parallèlement (TQ, etc.). L'allongement du TCA peut être isolé ou associé à un allongement du TS ou à un allongement du TQ. (**Asaaidi, 2012**).

2.2.2. Temps de Quick (TQ)

Le TQ appelé improprement le temps de prothrombine (TP) est le temps de coagulation à 37 °C d'un plasma en présence de thromboplastine (mélange de facteur tissulaire et de phospholipides) et de calcium. Le temps de coagulation du plasma du patient est comparé à celui d'un témoin, voisin de 12 secondes pour la plupart des réactifs. Le résultat est exprimé en pourcentage d'activité, en désignant ce pourcentage sous le nom de taux de prothrombine (TP). Le pourcentage est calculé en utilisant une courbe d'étalonnage à l'aide de dilutions d'un plasma témoin qui, par définition, correspond à 100 % de la normale. Les valeurs inférieures à 70 % sont considérées comme pathologiques. Un autre mode d'expression est exclusivement réservé à la surveillance des traitements anticoagulants par les antagonistes de la vitamine K (AVK). Le TQ explore de façon globale les facteurs de

coagulation de la voie exogène de la coagulation (facteurs VII, X, V, II et fibrinogène) (Asaaidi, 2012).

2.2.3. Temps de thrombine et dosage du fibrinogène (TT)

Le temps de thrombine (TT) est la mesure du temps de coagulation d'un plasma après apport d'une quantité connue de thrombine. Le taux de fibrinogène est mesuré par méthode chronométrique de vonClaus (François, 2008). La vitesse de coagulation est fonction de la quantité et de la qualité du fibrinogène et de la présence ou non d'inhibiteurs de la fibrinof ormation (héparine non fractionnée [HNF], produits de dégradation de la fibrine...). Les résultats sont exprimés en secondes, par référence à un témoin. Une variante de ce test, utilisant des concentrations élevées de thrombine, permet de mesurer la concentration plasmatique de fibrinogène. Elle est normalement comprise entre 2 et 4 g/L (Asaaidi, 2012).

2.3. Anticoagulants synthétiques

Les anticoagulants sont utilisés pour la prévention et le traitement d'événements thrombotiques sévères. Les plus utilisés sont jusqu'à présent l'héparine et ses dérivés et les anti-vitamines K (AVK). De nombreuses études cliniques ont démontré leur action dans la prévention et le traitement de complications thromboemboliques (Kortchinsky et al, 2013).

2.3.1. Héparine

L'héparine existe en deux types utilisables, administrées par voie intraveineuse ou sous cutanée, l'héparine non fractionnée (HNF) et les héparines de bas poids moléculaire (HBMP). L'héparine non fractionnée est composée d'un mélange hétérogène de chaînes polysaccharidiques sulfatées, de taille et de structures différentes. La masse moléculaire des molécules constituant l'HNF varie de 3000 à 30000Da. Alors que les héparines de bas poids moléculaire sont issues de la dépolymérisation des chaînes polysaccharidiques de l'HNF par des procédés enzymatiques (Elalamy, 2012).

L'HNF et les HBPM fonctionnent en formant un complexe avec l'anticoagulant physiologique l'antithrombine III potentialisant son effet sur l'inactivation de divers facteurs de coagulation. Le complexe HNF-antithrombine III inactive le plus notamment les facteurs Xa et la thrombine (facteur IIa), mais à un moindre degré les facteurs IXa, XIa et XIIa, alors que le complexe HBPM-antithrombine III inhibe particulièrement le facteur Xa et à moindre degré la thrombine (Batty et Smith, 2010).

2.3.2. Anti vitamines K (AVK)

La vitamine K intervient dans la carboxylation des molécules d'acide glutamique de l'extrémité N- terminale de la chaîne glycoprotéinique de quatre facteurs de la coagulation FII, FVII, FX et FIX. Cette carboxylation est nécessaire pour l'activité biologique et la fixation de ces facteurs sur les surfaces phospholipidiques plaquettaires, et elle nécessite la présence de la forme réduite de vitamine K (KH₂). Ce dernier est transformé après la carboxylation en époxyde de vitamine K, qui est régénérée via la vitamine K époxyde réductase, pour être utilisée dans une autre réaction de carboxylation. Les anti-vitamines K exercent leurs effets anticoagulants en inhibant le recyclage de vitamine K, ce qui conduit à la perte de l'activité enzymatique des facteurs vitamines K dépendants et par conséquent la ralentie de la vitesse de la coagulation (**Hirsh et al, 2001**).

2.4. Anticoagulants naturels

Les maladies thrombotiques cardiovasculaires entraînent une mortalité et une hospitalisation généralisées, ce qui incite à rechercher anticoagulants naturels comme solution de remplacement de certains médicaments qui ont marqué des effets indésirables (**Mira et al 2015**).

Soixante-cinq remèdes à base de plantes ont été identifiés comme ayant une capacité antiplaquettaire, anticoagulante ou coagulante. Les composés bioactifs comprenaient : les polyphénols, les taxanes, les coumarines, les flavonoïdes, les saponines, les fucoïdanes et les polysaccharides (**cordier et al ,2012**).

2.4.1. Coumarines

Les coumarines possèdent un tropisme nerveux et sanguin (anticoagulant). Leur action sur le cerveau est sédatif et calmant. L'action anticoagulante des coumarines s'exerce, entre autres, par interférence dans la synthèse de la prothrombine au niveau hépatique (**Garabeth et al, 2007**).

Les anticoagulants à base de coumarine (warfarine, Coumadin) sont prescrits après une crise cardiaque ou pour la prévenir en cas de risque accru. Ils peuvent aussi réduire les risques de thrombose, soit la formation de caillots dans les veines et les artères entravant la circulation sanguine (**Garabeth et al, 2007**).

L'hyuganine C, un coumarine qui a été isolé à partir d'une plante médicinale *Angelica shikokiana* (Apiaceae) a montré une activité anticoagulante modéré (Mira et al 2015).

La suberosine et suberenol deux coumarines qui ont été isolé à partir de la plante *Ferulago carduchorum* (Apiaceae) ont même montré une activité anticoagulante qui pourrait être plus efficace en tant que nouvelle formulation industrielle contenant un agent anticoagulant ou un composé toxique utilisé en excès (Golfakhrabadi et al, 2014).

2.4.2. Anticoagulants dérivés des algues

Les algues bladderwrack (Fucaceae) constituent une matière première potentielle pour la fabrication de substances biologiquement actives. Ce matériau contient le polysaccharide fucoïdane, ainsi que des polyphénols, des lipides et d'autres composants biologiquement actifs. Les ressources de *Fucus* sont les mers blanc et Barents, où les stocks de *Fucus vesiculosus* L. sont importants (plus de 300 000 tonnes). Des études actives sur les propriétés anticoagulantes du fucoïdane sont en cours et ont démontré que le fucoïdane affecte les propriétés rhéologiques du sang de la même manière que l'héparine. Les polyphénols d'algues brunes, principalement le phloroglucinol et ses polymères - phlorotannins - ont la capacité d'inactiver sélectivement les inhibiteurs de la plasmine dans le plasma, et sont considérés comme des agents potentiels le traitement des thromboses (Obluchinskya et al, 2015). Le DFE (Dry Fucus Extrait) sous forme de pommade isolée à partir de *Fucus vesiculosus* a montré que L'application locale de DFE sur des rats Wistar mâles a entraîné une augmentation statistiquement significative du temps de prothrombine, ce qui prouve que cet extrait a eu une incidence sur les voies de coagulation extrinsèque (Obluchinskya et al, 2015).

2.4.3. Flavonoïdes

certaines flavonoïdes tels que le kaempférol, la lutéoline, la quercétine, le kaempférol-3-O-glucoside et kaempférol-3-O-rutinoside isolée à partir de *Angelica shikokiana* (Apiaceae) présentaient une activité anticoagulante très élevé (Mira et al 2015).

Deuxième partie
EXPERIMENTATION

CHAPITRE I

MATERIEL

ET METHODES



1. Matériel

1.1. Matériel chimique

- Les solvants organiques utilisés dans les différents compartiments de cette étude sont de qualités analytiques et ils sont les suivants : Ethanol ; Méthanol ; *n*-hexane ; Chloroforme (CHCl₃) ; Acétate d'éthyle (CH₃COOCH₂CH₃) ; *n*-butanol.
- Les réactifs chimiques sont le DPPH diphénylpicryl-β-hydrazyl (C₁₈H₁₂N₅O₆) et le Folin-Ciocalteu (FC) (**Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany**).
- Les sels sont : carbonate de sodium (Na₂CO₃) et trichlorure d'aluminium AlCl₃ (**Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany**).
- D'autres produits chimiques utilisés : la quercétine, vitamine C (l'acide ascorbique), l'acide gallique, le BHA (**Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany**), DMSO, l'héparine (**LEO**), l'Aspégic et le Bio-TP (**BIOLABO**).

1.2. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est la partie aérienne (tiges, feuilles et fleurs) de la plante *cistus sp.*

2. Méthode de travail

Notre travail a été effectué au niveau des laboratoires pédagogiques du département de science de la nature et de la vie au centre universitaire Abdelhafid boussouf (Mila) en collaboration avec le laboratoire de biochimie du polyclinique de Senaoua à Mila.

2.1. Récolte de la plante

La plante a été récoltée en mois de Juin 2017 en pleine floraison de la région de Mila Nord Est Algérien (36°36'07,73" Nord, 6°18'09.26" E Long. et 477 m d'altitude). Les parties aériennes (tiges, feuilles, et fleurs) ont été utilisés ensembles.

2.2. Préparation des extraits

2.2.1. Séchage et broyage

La plante fraîchement récoltée est laissée sécher à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant un mois, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, et ensuite broyée grossièrement dans un moulin électrique jusqu'à obtention d'une poudre. Cette dernière a été conservée dans des sacs en papier et stockée à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à l'utilisation.

2.2.2. Extraction

Il sert à extraire le maximum de molécules chimiques contenant dans les parties aériennes de la plante *Cistus sp.* en utilisant des solvants organiques qui accélèrent et augmentent le rendement d'extraction. Notre mode d'extraction s'est effectué sur deux plans:

En premier lieu, une macération hydroalcoolique, on introduit 80 g de la poudre végétale dans un bécher et ajouter un mélange de solvant méthanol et eau distillée (70/30) (V/V), agiter de temps en temps, couvrir le récipient et laisser macérer pendant 24h. Cette macération est répétée 03 fois en filtrant et renouvelant le solvant à chaque fois, ce qui permet d'extraire le maximum de produits.

Les trois filtrats sont réunis et concentrés à sec au moyen d'un évaporateur rotatif. Cette étape consiste à reprendre le résidu sec avec quelques millilitres d'eau distillée bouillante.

En second, l'extrait hydrométhanolique (phase aqueuse) récupéré va subir différents fractionnements liquide-liquide en utilisant des solvants organiques ayant un degré de polarité croissante (allant du moins polaire au plus polaire).

Les solvants utilisés successivement sont les suivants :

- *n*-hexane.
- chloroforme.
- Acétate d'éthyle.
- *n*-butanol.

Ces affrontements se font dans une ampoule à décanter, la phase aqueuse et les solvants sont mélangés énergiquement en laissant s'échapper à chaque fois les gazes.

Après un repos d'une à deux heures, on récupère séparément la phase organique d'une part, et la phase aqueuse d'autre part, le solvant utilisé se charge des composés spécifiques, on obtient à la fin quatre extraits selon le diagramme d'extraction qui suit.

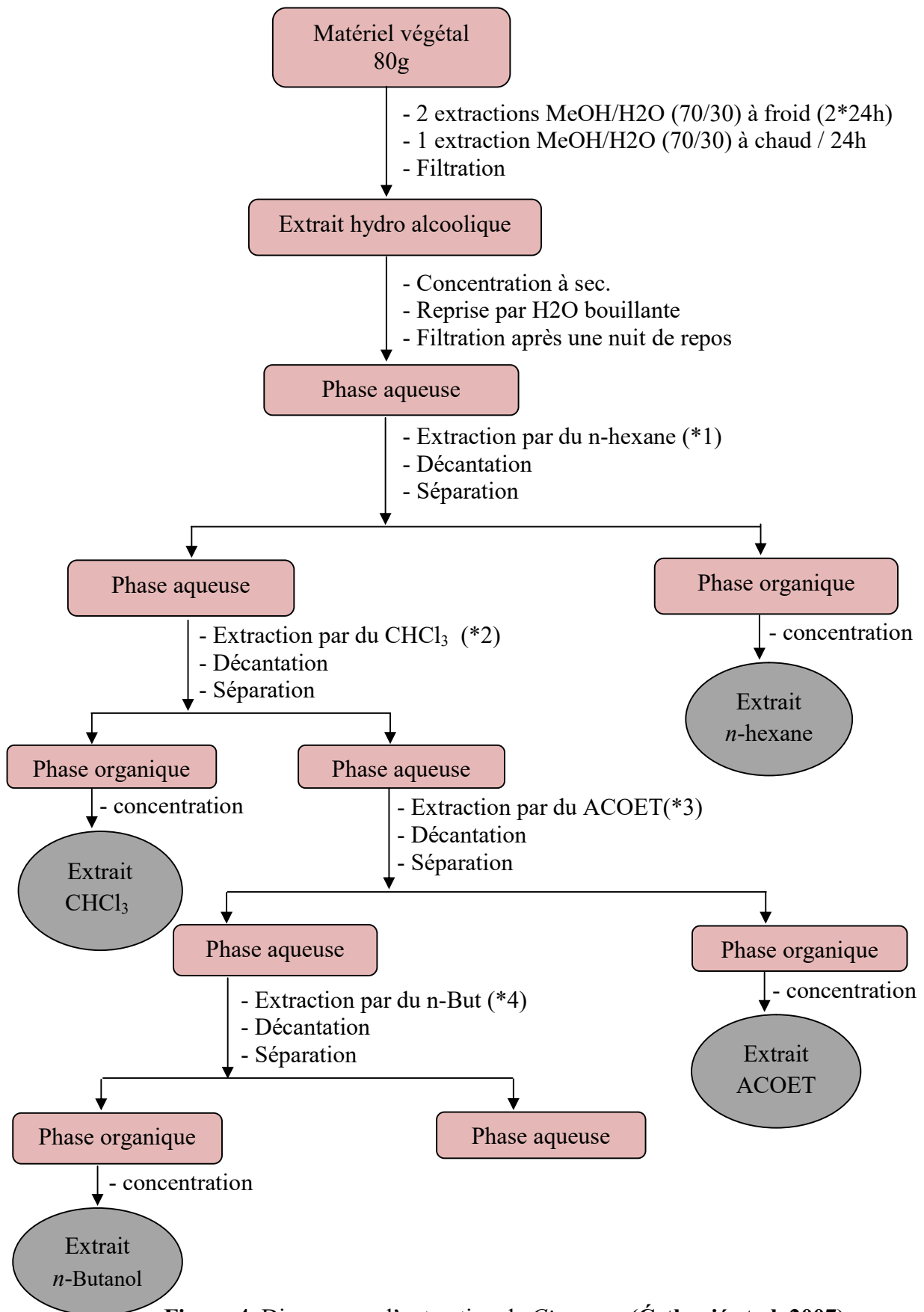


Figure 4. Diagramme d'extraction de *Cistus sp.* (Ćetković et al, 2007).

2.3. Détermination des rendements d'extraction

Les rendements des extractions sont calculés suivant la formule ci-dessous:

$$Rdt \% = \frac{P \text{ (extrait sec)}}{P \text{ (Poudre végétale sèche)}} \times 100$$

3. Dosage des phénols totaux

3.1. Principe

Les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits sont déterminées selon la méthode de Folin-Ciocalteu. Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait (**Ribereau Gayon., 1968 ; Singleton et al, 1999**).

3.2. Mode opératoire

Brièvement, 0,5 ml de chaque extrait est ajouté à 2,5 ml du réactif de Folin Ciocalteu (10 fois dilué dans l'eau). Ensuite, 2 mL de carbonate de sodium Na₂CO₃ (7,5 %, m/v) sont ajoutés afin de favoriser un milieu alcalin pour démarrer la réaction d'oxydoréduction. Le mélange est ensuite incubé pendant 1h à température ambiante et à l'obscurité.

L'intensité de la coloration bleue produite a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde 760 nm. La quantification des polyphénols totaux a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un standard étalon (l'acide gallique) à différentes concentrations (5, 10, 20, 40, 80 µg/ml) dans les mêmes conditions que les extraits et les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG / mg Ext).

4. Dosage des flavonoïdes

4.1. Principe

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par ce réactif (le trichlorure d'aluminium), elle entraîne la formation d'un complexe jaunâtre (la réaction entre les groupements hydroxyles des flavonoïdes et le AlCl₃ par chélation des métaux qui absorbe dans le visible à 430 nm (**Swain et al, 1959**)).

4.2. Mode opératoire

1 ml d'échantillon dissous a été placé dans un tube à essai, avec 1mL d' AlCl_3 (2% m/v). Ce milieu réactionnel a été bien agité et laissé au repos pendant 15minutes à l'obscurité et à température ambiante. Les absorbances ont été mesurées immédiatement à une longueur d'onde égale à 430 nm.

Les teneurs en flavonoïdes totaux dans chaque extrait sont calculées en se référant à l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon la quercétine à différentes concentrations (5, 10, 20, 40, 80, $\mu\text{g/ml}$) et dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage .les résultats sont exprimées en microgrammes d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ /m g}$ de l'extrait).

5. L'activité antioxydante *in vitro*: Piégeage du radical libre DPPH

De nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de plantes. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Pour étudier l'activité anti-radicalaire des extraits éthanoliques *Cistus sp.*, nous avons utilisé le test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle).

5.1. Principe

La molécule de 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (α , α -diphényl- β picrylhydrazyle; DPPH: 1) est caractérisée par un radical libre stable du fait de la délocalisation de l'électron disponible sur la molécule dans son ensemble, de sorte que les molécules ne se dimérisent pas, comme ce serait le cas avec la plupart des autres radicaux libres. La délocalisation donne également lieu à la couleur violet foncé, caractérisée par une bande d'absorption dans une solution d'éthanol centrée autour de 517 nm. Ce test est très utilisé, car il est rapide, facile et non couteux (figure 7) (Blois, 1958; Molyneux, 2003).

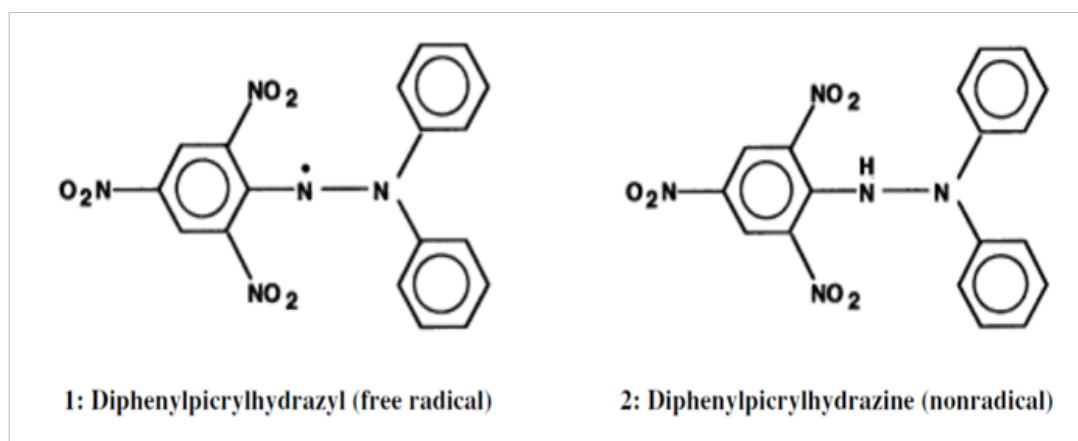


Figure 5. Réaction du radical DPPH transformé en DPPHH (Molyneux,2003).

5.2. Mode opératoire

0,4 ml de chaque extrait et standards à différentes concentrations a été introduit dans des tubes puis 1,6 ml de solution éthanolique de DPPH (10^{-4} M) fraîchement préparée ont été ajoutés. Le mélange est vigoureusement agité au vortex, les mélanges ont été placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes, la lecture du changement de couleur a été effectuée par la mesure de l'absorbance à la longueur d'onde 517nm.

Le contrôle négatif est composé de la solution de DPPH dans le méthanol seul, et le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard le BHA et acide ascorbique, avec des concentrations de 6,25 à 200 μ g/ml.

L'activité antioxydante de nos extraits est exprimée en IC_{50} , ce paramètre est défini comme étant la concentration de l'antioxydant qui cause la perte de 50% du radical libre DPPH. Les valeurs d' IC_{50} moyennes ont été calculées par les régressions linéaires des trois essais séparés où l'abscisse est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée par le pourcentage de réduction (PR) du radical DPPH, qui est calculé par la formule suivante :

$$I \% = \frac{(\text{Abs Control négatif} - \text{Abs Echantillon})}{\text{Abs Control négatif}} \times 100$$

Où : I % : Pourcentage de l'activité anti-radicalaire.

Abs Echantillon : Absorbance de l'échantillon.

Abs Control négatif : Absorbance du control négatif (solution de DPPH seulement).

6. Activité anticoagulante

6.1. Extraits testés

L'extrait de *n*-butanol et l'extrait HMeOH, ont été étudiés pour leur activité anticoagulante. La dilution des extraits a été réalisée dans du DMSO de manière à ce que la concentration totale en DMSO ne dépasse pas 30%. Seul le DMSO à une concentration de 30% et moins ne posait aucun problème de turbidité et il était possible de mesurer le TP (Duric et al, 2015).

Des extraits de *n*-butanol et l'extrait HMeOH ont été préparés à des concentrations de 1 mg/ml ; 0,75 mg/ml ; 0,5 mg/ml et 0,25 mg/ml.

Deux contrôles positifs ont été préparés: l'Aspégic à une concentration de 1 mg/ml et l'héparine à des concentrations de 0.001 mg/ml ; 0.002 mg/ml.

6.2. Test de coagulation

Il existe trois tests classiques de la coagulation qui sont le Temps de Cephaline Kaolin (TCK), Taux de Prothrombine (TP) et le Temps de Thrombine (TT) (Rousseau, 2013). Ils mesurent le temps écoulé depuis l'activation de la cascade de coagulation à des points différents jusqu'à la génération de la fibrine (Raber, 1990). Un seul test de coagulation TP est réalisé dans ce travail qui est le taux de Prothrombine (TP) .

6.3. Principe

Le temps de prothrombine est le temps nécessaire à la génération de fibrine après activation du facteur VII, il mesure l'intégrité de la voie extrinsèque et de la voie commune (facteur VII, V, X, prothrombine et fibrinogène). Un plasma citraté mélangé à un activateur (thromboplastine) est incubé à 37°C, le temps de formation du caillot est enregistré. Sa valeur normale est habituellement entre 11 et 15 secondes, ceci dépend du réactif utilisé (Raber, 1990).

6.4. Mode opératoire

Les essais sont effectués selon la méthode de **Qi et al (2012)**. Les temps de prothrombine sont mesurés comme suit : 90 μ L de plasma humain citraté normal sont mélangés avec 10 μ L des différentes fractions à des concentrations allant de 0.25mg/ml à 1mg/ml puis incubés à 37°C pendant deux minutes, 200 μ L du thromboplastine pré-incuber à 37°C pendant 15 mn sont ajoutés et le temps de coagulation est enregistré à l'aide d'un chronomètre.

CHAPITRE II
RÉSULTATS ET
DISCUSSION

1. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction correspond au pourcentage des principes actifs dissouts dans un solvant organique et/ou aqueux utilisé pour l'extraction. Il est déterminé à partir du poids de l'extrait sec par rapport au poids de la matière végétale sèche réduit en poudre. Les résultats sont représentés dans la **figure 6**.

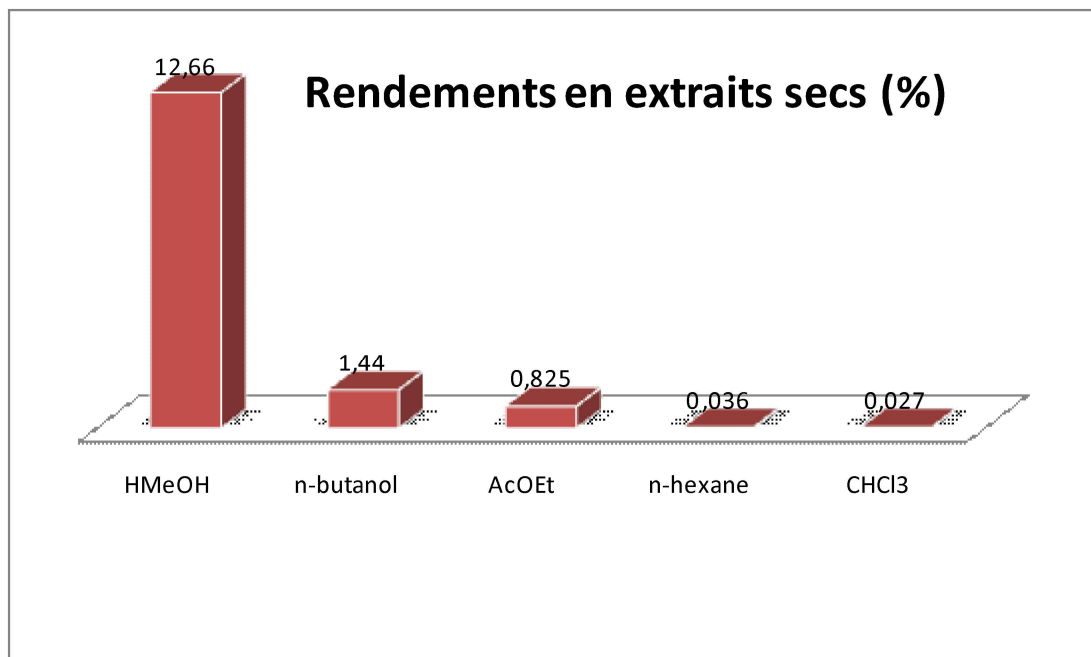


Figure 6. Rendements de différents extraits de *Cistus sp.*

D'après les résultats obtenus, Nous avons constaté que le rendement (12.664%) de l'extrait hydrométhanolique 70% représente le rendement le plus élevé, suivi par le rendement de l'extrait *n*-butanol (1.437%), puis par l'extrait d'acétate d'éthyle qui a donné un rendement de (0.825%).Cependant, l'extraction à l'*n*-hexane, qui a pour but de délipidère la matière végétal a conduit un rendement faible de (0.036%) ,suivi par le chloroforme en dernier qui a donné un rendement de (0.027%).

Nous pouvons dire que les solvants polaires donnent des rendements meilleurs que les solvants apolaires, étant donné que les solvants polaires ont la capacité de diffuser à l'intérieur de la poudre végétale ,d'atteindre la matrice végétale et de récupérer par conséquent le plus possible des métabolites. Tandis que les solvants apolaires, non miscibles avec l'eau, n'ont pas la capacité d'extraire le maximum des molécules bioactives à cause de la présence de l'eau contenue dans le tissu végétal (**Ghedadba et al, 2014**).

Selon l'étude de **Merck (2017)**, l'extrait éthanolique 70% de *Cistus albidus* originaire de la France présentait un rendement en matière sèche de 21.1% alors que l'extrait éthanolique 75% de *Cistus emerus* et de *Cistus sempervirens* marquait un rendement en matière sèche de 17.7% et 14.1% respectivement.

La valeur du rendement dépend de plusieurs facteurs tels que : structure et pH du sol, salinité du lieu de récolte, température, air, altitude...etc. Comme elle peut être liée aux conditions expérimentales et aussi elle dépend la phase végétative et le temps de récolte (**Penchev et al, 2010**).

2. Quantification des polyphénols et des flavonoïdes

2.1. Polyphénols

L'analyse quantitative des phénols des extraits des deux plantes étudiées a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage dressée à partir d'une gamme de solutions standard d'acide gallique établie séparément. La quantité des phénols totaux dans les extraits est exprimée en microgramme d'équivalents d'acide gallique par 1 milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG/mg EXT}$).

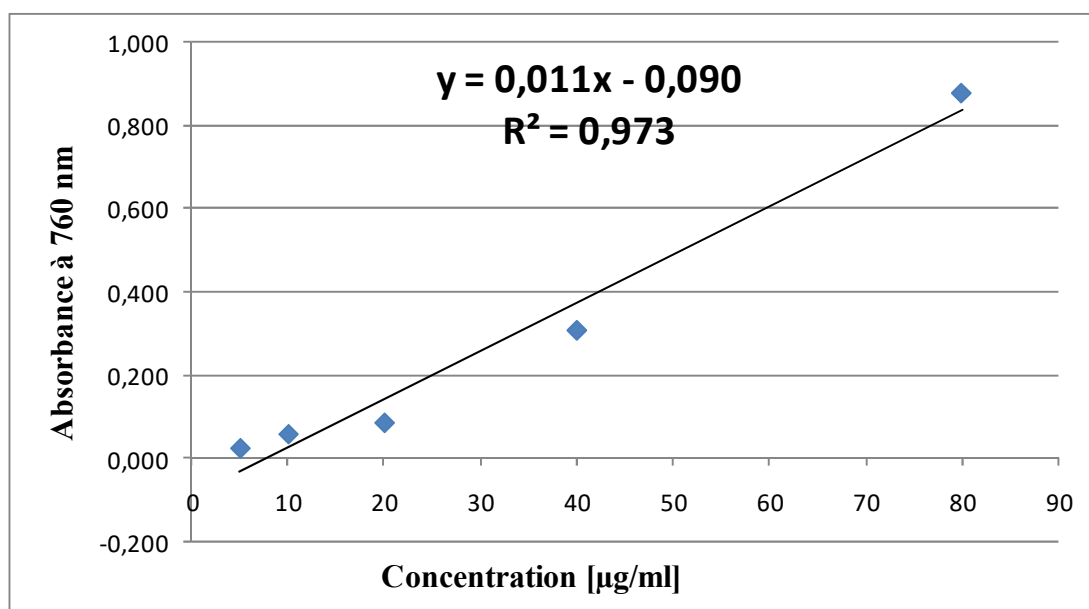


Figure 7. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

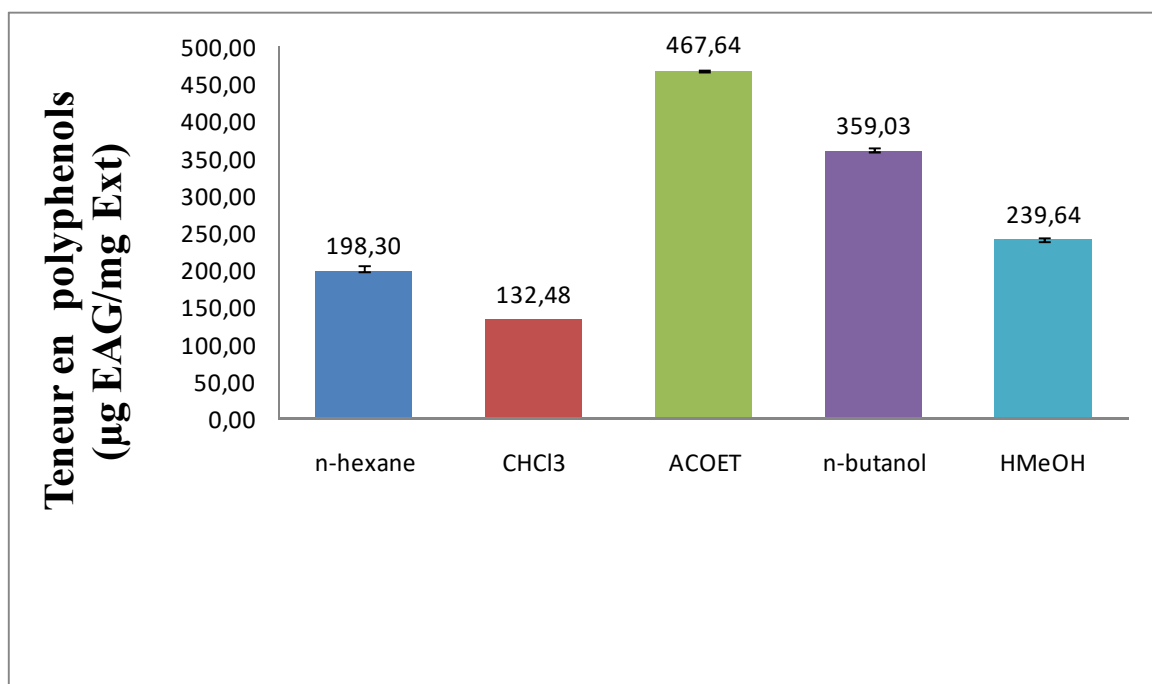


Figure 8. Teneurs en polyphénols de différents extraits de *Cistus sp.*

Les résultats ont montré que les extraits de la plante possèdent des quantités différentes en polyphénols dont lesquelles les extraits ACOET ($467,64 \pm 0,36$ µg EAG/mg Ext), *n*-butanol ($359,03 \pm 4,55$ µg EAG/mg Ext) et HMeOH 70% ($239,64 \pm 2,18$ µg EAG/mg Ext) sont les plus riches en polyphénols respectivement par rapport aux extraits *n*-hexane ($198,30 \pm 6,83$ µg EAG/mg Ext) et CHCl₃ ($132,48 \pm 0,92$ µg EAG/mg Ext).

Si on compare nos résultats du dosage de polyphénols avec des études précédemment faites, on constate que selon les travaux de **Mahmoudi et al (2016)**, les extraits éthanoliques à 70% de *C. salvifolius* et de *C. monspeliensis* de la région de l'est du Maroc présentaient des phénols totaux allant de 50 à 56 mg EAG/g DW. Ces résultats sont Cinq fois inférieur à celle de notre extrait hydrométhanologique.

En se référant à la littérature une étude de **Sayah et al (2017)**, faite sur les parties aériennes de *Cistus salvifolius* et *Cistus monspeliensis* récoltées au Maroc, a montré que l'extrait HMeOH 80% de ces deux espèces présentaient des teneurs en polyphénols (336.51 ± 1.22 mg EAG/ g DW et 282.53 ± 0.58 mg EAG/ g DW) respectivement et sont presque similaire de notre extrait.

Une étude de **Rebaya et al (2016)** faite sur la partie aérienne (feuilles et fleurs) de *Cistus salvifolius* originaire de la Tunisie a montré que l'extrait éthanolique 95% avait la teneur la plus élevée en polyphénols (530,62±0,38 mg EAG/g DM; 380.2±0.17 mg EAG/g DM) dans les feuilles et fleurs respectivement, suivi par l'extrait *n*-butanol (470.40±1.63 mg EAG/g DM; 270.5±0.0 mg EAG/g DM) dans les feuilles et fleurs respectivement, alors que les extraits ACOET et dichlorométhane ont montrés la teneur la plus faible (120.11±0.15 mg EAG/g DM feuilles; 70.83±0.29 mg EAG/g DM fleurs) et (110.96±0.14 mg EAG/g DM feuilles; 80.43±0.75 mg EAG/g DM fleurs) respectivement.

En comparant les résultats obtenus sur les feuilles de *Cistus salvifolius* avec notre étude réalisée sur la partie aérienne de *Cistus sp.* on constate que la teneur la plus élevée en polyphénols a été manifestée par l'extrait d'ACOET six fois supérieur à celui des feuilles et des fleurs de *Cistus salvifolius*. Ainsi que, l'extrait CHCl₃ de *Cistus sp.* a marqué la teneur la plus faible en polyphénols avec des valeurs presque similaire à celle de l'extrait dichlorométhane des feuille et presque deux fois supérieur à celle des fleurs de *Cistus salvifolius*.

Toute fois, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études.

2.2. Flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃), en adaptant la même procédure utilisée pour l'établissement de la courbe d'étalonnage, en remplaçant la quercétine par des dilutions des extraits jusqu'à une concentration appropriée. La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par 1 milligramme de l'extrait (µg EQ/mg EXT).

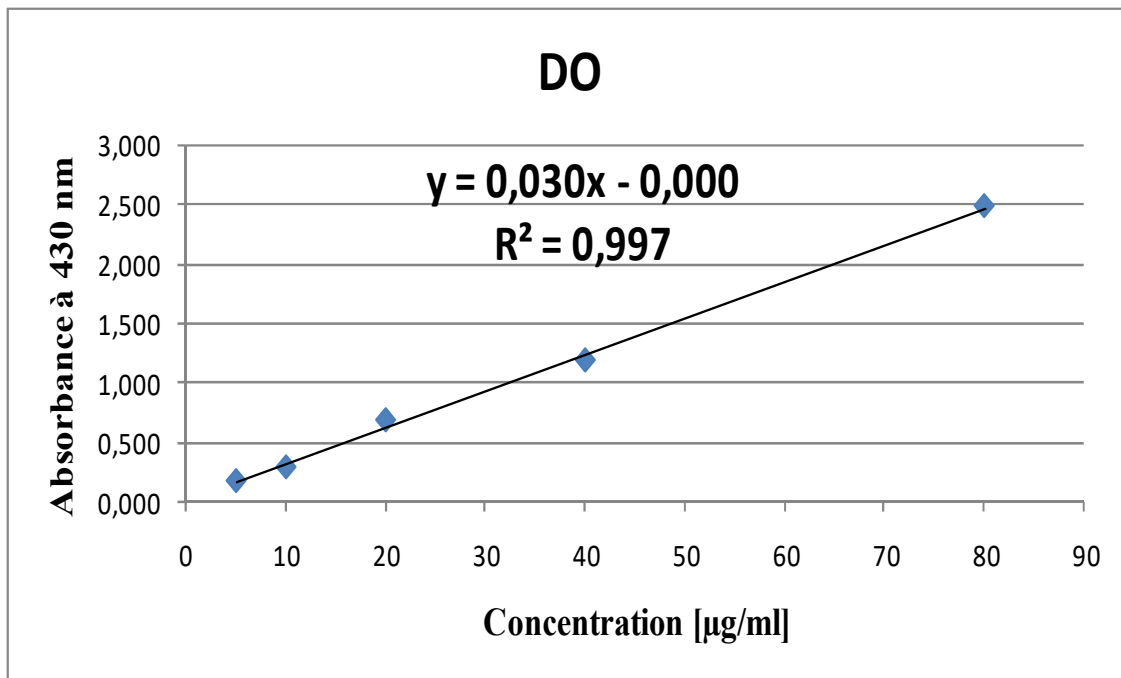


Figure 9. Courbe d'étalonnage de la quercétine.

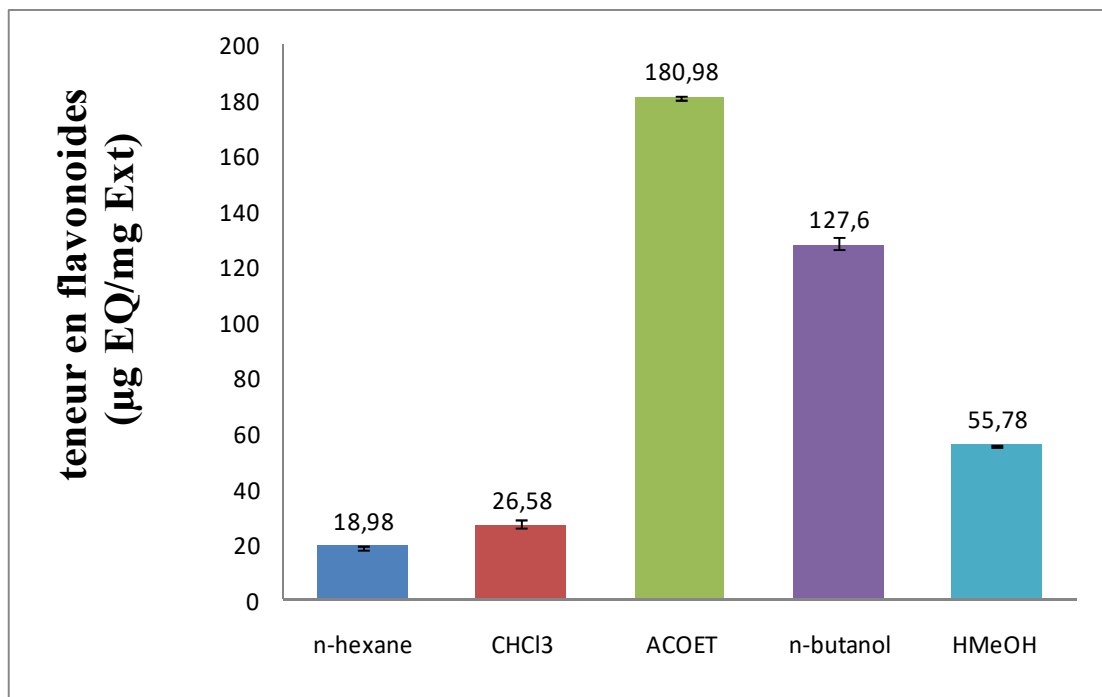


Figure 10. Teneur en flavonoïdes de différents extraits de *Cistus sp.*

Les résultats ont montré que les extraits de la plante possèdent des quantités différentes en flavonoïdes dont lesquelles les extraits ACOET ($180,98 \pm 0,34 \mu\text{g EQ/mg Ext}$), et *n*-butanol ($127,6 \pm 3,07 \mu\text{g EQ/mg Ext}$) sont les plus riches en flavonoïdes respectivement par rapport aux extraits HMeOH ($55,78 \pm 0,08 \mu\text{g EQ/mg Ext}$), CHCl_3 ($26,58 \pm 2,20 \mu\text{g EQ/mg Ext}$) et *n*-hexane ($18,98 \pm 0,47 \mu\text{g EQ/mg Ext}$).

En ce qui concerne la teneur totale en flavonoïdes, selon l'étude faite par **Zidane et al (2013)** l'extrait éthanolique 100% de *C. ladanifèr* marocain présentait une teneur totale en flavonoïdes ($61.10 \pm 0.53 \text{ mg EQ/ g DW}$; $59.64 \pm 0.3 \text{ mg EQ/ g DW}$) dans les feuilles et fleurs respectivement, alors que *C. libanotis* présentait une teneur ($15.82 \pm 0.55 \text{ mg EQ/ g DW}$; $63.59 \pm 0.15 \text{ mg EQ/ g DW}$) dans les feuilles et fleurs respectivement. La quantité de composés actifs tels que les composés phénoliques et flavonoïdes déposés dans chaque partie de la plante est généralement différente.

En comparaison les teneurs en flavonoïdes de l'extrait HMeOH de *Cistus sp.* qui possédait des valeurs presque similaire à celle des feuilles et des fleurs de *C. ladanifèr* d'une part. D'autre part le même extrait de *Cistus sp.* présentait une teneur en flavonoïdes presque similaire à celle des fleurs et quatre fois supérieur à celle des feuilles de l'extrait éthanolique de *C. libanotis*.

En revanche une autre étude de **Sayah et al (2017)**, sur les parties aériennes de *Cistus salvifolius* et *Cistus monspeliensis* marocain a montré que l'extrait HMeOH 80% de ces deux espèces présentaient des teneurs deux fois supérieur en flavonoïdes ($188.66 \pm 2.9 \text{ mg EAG/g DW}$ et $154.00 \pm 2.30 \text{ mg EAG/g DW}$) respectivement, par rapport à notre extrait.

Une étude de **Rebaya et al (2016)** faite sur la partie aérienne (feuilles et fleurs) de *Cistus salvifolius* d'origine tunisien. Les résultats ont montré que la quantité des flavonoïdes dans tous les extraits était plus élevée dans les feuilles que dans les fleurs. L'extrait éthanolique 95% avait la teneur la plus élevée en flavonoïdes ($270.84.2 \pm 0,02 \text{ mg EAG/g DM}$; $260.40 \pm 0.35 \text{ mg EAG/g DM}$) dans les feuilles et fleurs respectivement, suivi par l'extrait *n*-butanol ($270.80 \pm 0.33 \text{ mg EAG/g DM}$; $250.03 \pm 0.55 \text{ mg EAG/g DM}$) dans les feuilles et fleurs respectivement, alors que les extraits ACOET et dichlorométhane contenaient des concentrations beaucoup plus faible ($35 \pm 0.63 \text{ mg EAG/g DM}$; $42.3 \pm 0.7 \text{ mg EAG/g DM}$) et ($20.6 \pm 0.35 \text{ mg EAG/g DM}$; $24.5 \pm 0.04 \text{ mg EAG/g DM}$) respectivement.

D'après les valeurs des teneurs en flavonoïdes des différentes fractions étudiées de *Cistus sp.* on s'aperçoit clairement que la plus forte teneur en flavonoïdes a été manifestée par l'extrait ACOET cinq fois supérieur à celui des feuilles et quatre fois à celui des fleurs de *Cistus salvifolius*. Ainsi que, notre extrait *n*-butanol présentait une teneur en flavonoïdes la moitié que celle de *Cistus salvifolius*. De plus l'extrait HMeOH de *Cistus sp.* a marqué une teneur de un cinquième inférieur en flavonoïdes par rapport au même extrait de l'étude de **Rebaya**, alors que l'extrait CHCl₃ et dichlorométhane contenaient des teneurs en flavonoïdes presque similaire.

À cet effet, il semble que les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes varient quelque peu chez le *Ciste* et dépendent de l'espèce, du tissu végétal évalué, de la saison, des conditions de croissance, de la préparation de l'échantillon et des méthodes d'analyses.

3. Activité antioxydante

Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est un radical libre organique stable avec une bande d'absorption à 517 nm. Il perd cette absorption lorsqu'il accepte un électron ou une espèce de radicaux libres, ce qui entraîne une décoloration visuellement perceptible du violet au jaune.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Cistus sp.* étudiée par le test de DPPH sont exprimés par le pourcentage d'inhibition (I %) du radical DPPH par les extraits et sont représentés graphiquement (I % en fonction de la concentration) et portés par rapport à ceux obtenus pour le BHA et l'acide ascorbique pris comme antioxydants de référence.

Le test de DPPH établie pour les antioxydants de référence (**figure 12**) a montré que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est très élevés pour les deux produits: BHA 76% et acide ascorbique 91% à la concentration de 50 µg/ml. La concentration inhibitrice piégeant 50 % du radical DPPH (IC₅₀) a été trouvée de 15.51± 4,58 µg/ml pour BHA et de 4,92± 0,02 µg/ml pour l'acide ascorbique.

3.1. Activité antiradicalaire de l'extrait *n*-hexane de *Cistus sp*

La variation du pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction des différentes concentrations du *n*-hexane par rapport aux deux standards sont illustrés dans la figure ci-dessous.

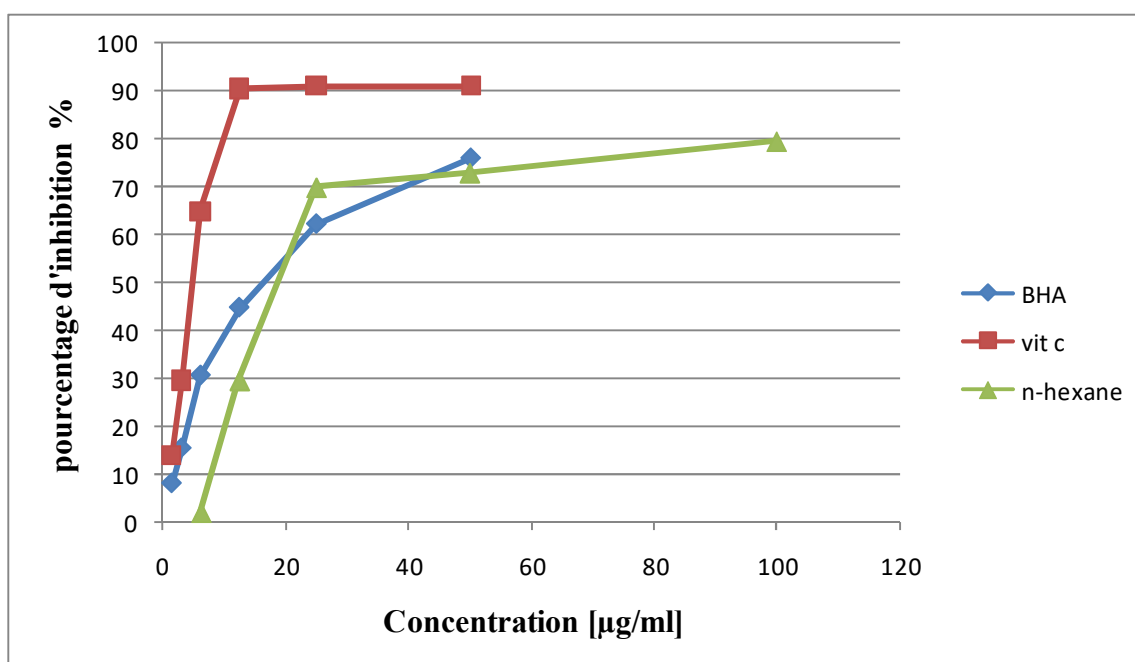


Figure 11. Variation du pourcentage d'inhibition de DPPH de l'extrait *n*-hexane.

On remarque que l'activité antioxydante de l'extrait *n*-hexane exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH est concentration-dépendante, dont laquelle cet extrait montre une meilleure activité (72.95%) à une concentration de 50 µg /ml moins importante que celle de la vitamine C et proche de celle du BHA. La plus faible activité (1.88%) a été enregistré à une concentration de 6.25µg /ml.

3.2. Activité antiradicalaire de l'extrait CHCl₃ de *Cistus sp*

La variation du pouvoir d'inhibition de DPPH en fonction des différentes concentrations du CHCl₃ par rapport aux deux standards sont illustrés dans la figure ci-dessous.

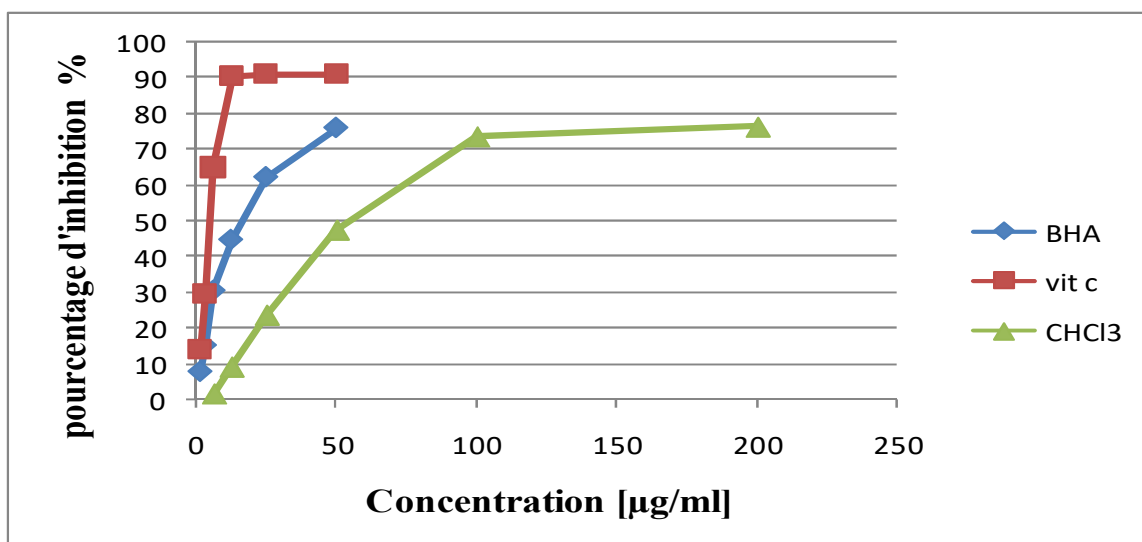


Figure 12. Variation du pourcentage d'inhibition de DPPH de l'extrait de CHCl₃.

On déduit que l'activité antioxydante de l'extrait de exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH est concentration-dépendante, dont laquelle cet extrait montre une meilleure activité (76.26%) à une concentration de 200 µg/ml moins importante que celle des standards. La plus faible activité (1.22%) a été enregistré à une concentration de 6,25 µg/ml.

3.3. Activité antiradicalaire de l'extrait ACOET de *Cistus sp*

La variation du pouvoir d'inhibition de DPPH en fonction des différentes concentrations de l'ACOET par rapport aux deux standards sont illustrés dans la figure ci-dessous.

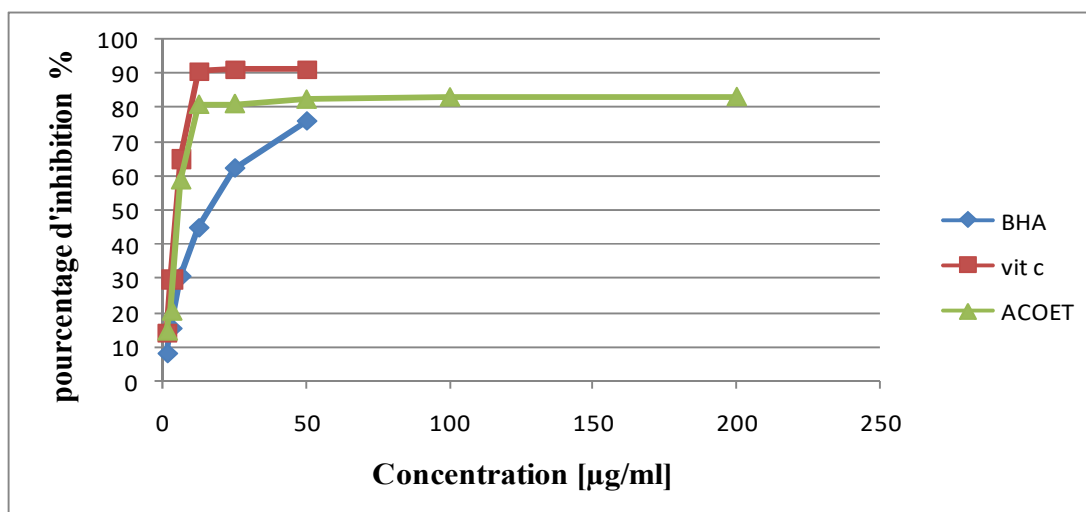


Figure 13. Variation du pourcentage d'inhibition de DPPH de l'extrait ACOET.

L'activité antioxydante de l'extrait ACOET exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH est concentration-dépendante, dont laquelle cet extrait montre une meilleure activité (82.34%) à une concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$ meilleure que celle du BHA et moins importante que celle de la Vitamine C. La plus faible activité (14.77%) a été enregistré à une concentration de 1.562 $\mu\text{g/ml}$.

3.4. Activité antiradicalaire de l'extrait *n*-butanol de *Cistus sp*

La variation du pouvoir d'inhibition de DPPH en fonction des différentes concentrations du *n*-butanol par rapport aux deux standards sont illustrés dans la figure ci-dessous.

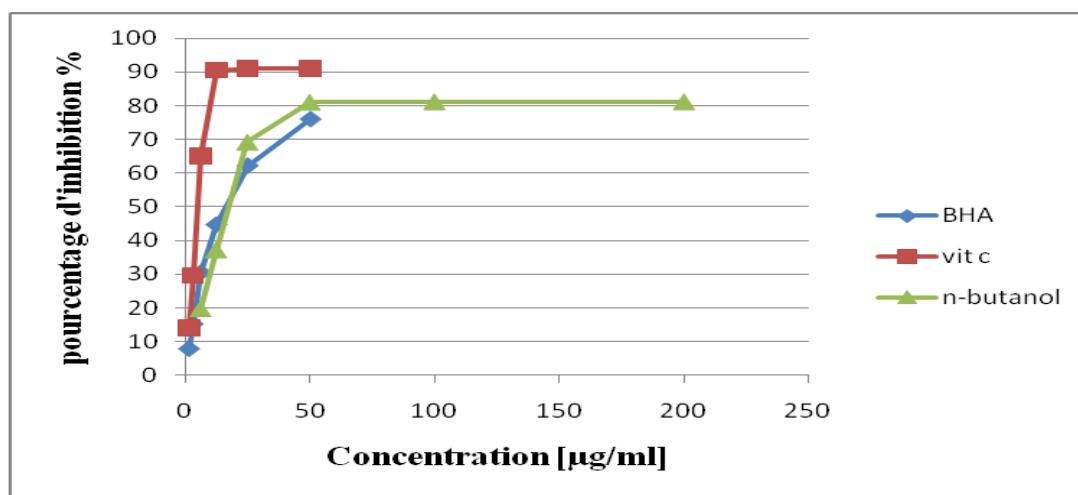


Figure 14. Variation du pourcentage d'inhibition de DPPH de l'extrait *n*-butanolique.

Le graphe illustré en **figure 14**, montre clairement une activité anti-radicalaire dose dépendante de l'extrait *n*-butanol avec l'enregistrement d'une valeur maximale du pourcentage d'inhibition du radical DPPH (80.99%) à une concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$ meilleure que celle du BHA et moins importante que celle de la Vitamine C, alors que la valeur minimale (19.87%) a été enregistré à une concentration de 6.25 $\mu\text{g/ml}$.

3. 5. Activité antiradicalaire de l'extrait HMeOH de *Cistus sp*

La variation du pouvoir d'inhibition de DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait HMeOH par rapport aux deux standards sont illustrés dans la figure ci- dessous.

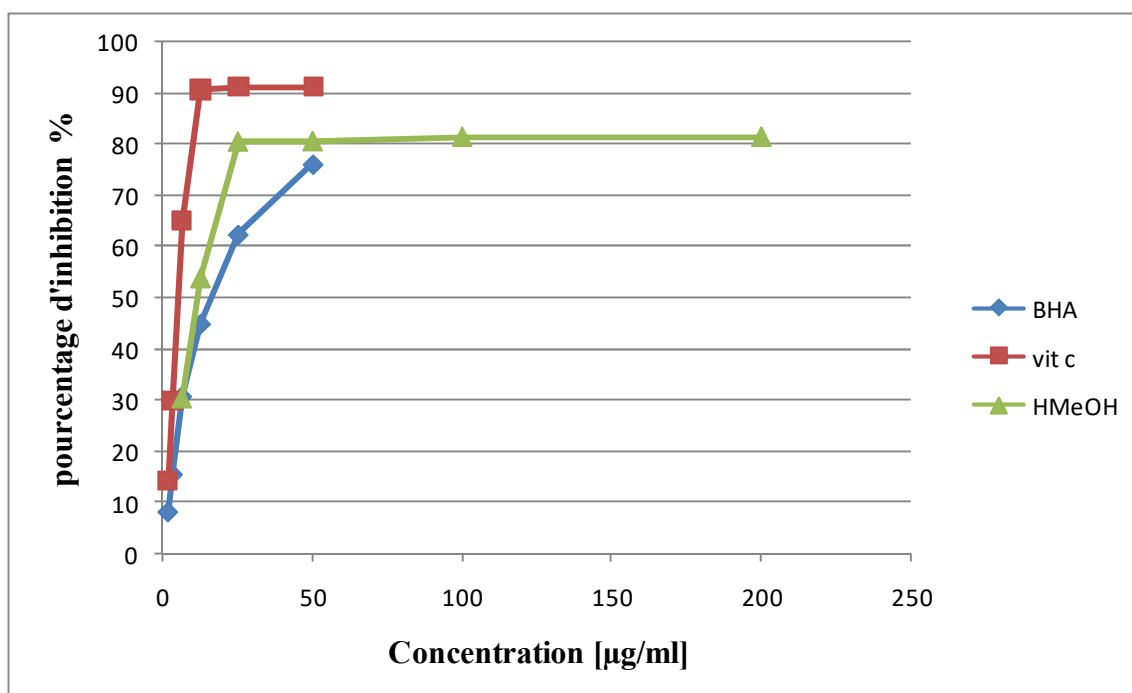


Figure 15. Variation du pourcentage d'inhibition de DPPH de l'extrait HMeOH.

Comme indiqué dans les résultats précédentes, la **figure 15** montre que l'extrait HMeOH et les standards ont même présenté une activité anti-radicalaire dose dépendante. Une valeur de (80.48%) du piégeage du radical libre DPPH par l'extrait HMeOH moins importante que celle de la Vitamine C a été enregistrée à une concentration de 50 µg /ml. Ainsi, la plus faible activité anti-radicalaire a été enregistrée par l'extrait HMeOH à une concentration de 6.25 µg /ml (30.28%).

3.6. Comparaison antiradicalaire entre les extraits de *Cistus sp*

Afin de comparer l'activité antioxydante de différents extraits de *Cistus sp* par la méthode du piégeage du radical libre DPPH et avec les standards, des valeurs d'IC₅₀ correspondants à la concentration de l'antioxydant qui cause la perte de 50% du radical libre DPPH sont calculés. Dont l'activité antioxydante est inversement proportionnelle aux valeurs d'IC₅₀. Les résultats sont montrés dans le **tableau 10**.

Tableau 10. Les valeurs d'IC₅₀ et les pourcentages d'inhibition des différents extraits de *Cistus sp.* et les deux standards.

Extraits	IC ₅₀ (µg/ml)	% d'inhibition à 6.25 µg/ml
BHA	15,51±4,58	30.62±5.58
Vitamine C	4,92±0,02	65.06±0.44
HMeOH	11,52±0,36	30.28±0.47
<i>n</i>-hexane	18,79±0,79	1.88±1.13
CHCl₃	55,5±9,84	1.22±0.38
ACOET	5,51±0,18	58.86±0.08
<i>n</i>-butanol	17,5±0,06	19.87±0.18

L'extrait AcOEt a révélé l'activité anti-radicalaire la plus élevée (5,51±0,18 µg/ml), très proche de celle de la vit C (4,92±0,02 µg/ml) et mieux que le BHA (15.51±4.58 µg/ml). suivi par l'extrait HMeOH (11.52±0.36 µg/ml) qui est aussi proche de la vit C et mieux que le BHA, ensuite l'extrait *n*-Butanol (17.5±0.06 µg/ml) qui a exercé une activité anti radicalaire presque similaire que celle de l'extrait HMeOH. Enfin, les extraits *n*-hexane et CHCl₃ ont manifestés les activités les moins importantes (18.79±0.79 µg/ml) et (55.5±9.84 µg/ml) respectivement.

Les extraits polaires (extrait ACOET et l'extrait *n*-Butanol) ont manifesté des activités relativement élevées par rapport à celles manifestées par les extraits apolaires (extrait CHCl₃ et l'extrait *n*-hexane). Ceci pourrait être due à la richesse des extraits polaires en composés phénoliques, flavonoïdes et en tannins condensés. Plusieurs études ont montré que les flavonoïdes ont une très forte activité réductrice des radicaux libres. Le type de solvant et son polarité affectent le transfert d'électron et d'atomes d'hydrogène qui représente un aspect clé dans la mesure de l'activité antioxydante.

Ces résultats sont assez similaires avec ceux de **Mahmoudi et al (2016)** qui ont montré que l'activité de piégeage du DPPH[•] *in vitro* d'extraits aqueux, éthanoliques à 70 % et d'hexane de *C. salvifolius* et *C. monspeliensis* originaire de Tunisie présentaient les valeurs de balayage radicalaire IC₅₀ les plus élevées pour *C. salvifolius* (7 µg/ml) et *C. monspeliensis* (9 µg/ml). En revanche, des extraits à l'éthanol à 70% de feuilles de *C. salvifolius* et

de *C. monspeliensis* présentaient l'IC₅₀ la plus faible 0,1 µg / ml et 0,2 µg / ml respectivement. D'après ces résultats, on constate que l'extrait *n*-hexane de *C. salvifolius* et de *C. monspeliensis* présentait une activité deux fois supérieur à notre extrait, alors que l'extrait éthanolique de ces deux espèces exerçait une activité beaucoup plus élevée par rapport à notre extrait HMeOH.

Les résultats de l'activité anti-radicalaire des extraits polaires sont aussi en accord avec ceux obtenus par l'étude de **Rebaya et al (2016)** faite sur la partie aérienne (feuilles et fleurs) de *Cistus salvifolius* récolté en Tunisie, a montré que tous les extraits polaires présentaient des activités antioxydantes élevées. Les meilleurs pouvoirs réducteurs ont été obtenus par l'extrait éthanolique 95% (3.52 µg / ml feuilles; 11.79 µg / ml fleurs) suivi par l'extrait *n*-butanol (20.74 µg / ml feuilles; 29.16 µg / ml fleurs), puis CHCl₃ et dichlorométhane qui ont marqué des valeurs similaires supérieur à 52.38 µg / ml dans les feuilles et les fleurs.

Dans une autre étude de **Rebaya 2014**, l'analyse de l'activité antioxydante des feuilles et des fleurs de *Halimium halimifolium* (Cistaceae) récoltée en Tunisie. Les meilleurs activités ont été manifesté dans les feuilles par l'extrait éthanolique 70% (1.19 µg/ml) suivi par l'extrait *n*-butanol (11.78 µg/ml), puis CHCl₃ (35.87 µg/ml) et en dernier l'extrait dichlorométhane qui a marqué une valeur supérieur à 52 µg/ml. Ainsi, cette activité a été observé dans les fleurs dont l'extrait *n*-butanol (14.17 µg/ml) a marqué la meilleure activité, suivi par l'extrait éthanolique 70% (15.09 µg/ml) puis l'extrait dichlorométhane supérieur à 52.38 µg/ml, et en dernier l'extrait CHCl₃ (61.30 µg/ml).

Les résultats obtenues dans ce présent manuscrit sont comparés avec celles obtenus sur les feuilles de *Halimium halimifolium*. On dédit que, la meilleure activité antioxydante a été signalée par l'extrait CHCl₃ sept fois supérieur à celui des feuilles et douze fois supérieur à celui des fleurs de *Halimium halimifolium*. Par ailleurs, l'extrait CHCl₃ de *Cistus sp.* a manifesté la plus faible activité antiradicalaire avec des valeurs d'IC₅₀ presque similaires à celle de l'extrait dichlorométhane des feuilles et des fleurs de *Halimium halimifolium*.

De la même optique, **sayah et al (2017)** a confirmé l'activité antioxydante par la méthode de piégeage du radical libre DPPH de l'extrait HMeOH de *Cistus salvifolius* (3,30 ± 0,25 µg/ml) et *Cistus monspeliensis* (4,18 ± 0,26 µg/ml), indiquant une activité

antioxydante élevée. Ces derniers résultats suggèrent que la capacité antioxydante totale élevée de l'éthanol à 70% et de l'extrait aqueux par rapport aux extraits à l'hexane pourrait être due (au moins en partie) au contenu phénolique et flavonoïde présent dans ces extraits polaires.

Selon les résultats de notre étude, il est indiqué clairement que l'extrait HMeOH de *Cistus sp.* est doté d'une activité antioxydante moyennement faible par rapport à celle de *Cistus salvifolius* et *Cistus monspeliensis*.

La recherche sur les polyphénols et les flavonoïdes étaient largement étayées par les capacités antioxydantes potentielles de ces composés et par la pertinence supposée de la détérioration des systèmes biologiques induite par les radicaux libres et de son association avec des maladies **(Perez-Vizcaino et Fraga, 2018)**.

Selon la littérature citée dans notre bibliographie, les propriétés antioxydantes ont été attribuées aux acides phénoliques, aux tanins et aux flavonoïdes. La plante *Cistus sp.* est une très bonne source d'antioxydants naturels (catéchine, épicatechine, quercétine, gallotannins, ellagitannins, ellagiques, kaempférol, acide caféique, acide chlorogénique, acide gallique...) ayant des activités antioxydantes prometteuses **(Stępień et al, 2018)**.

L'étude confirme également une certaine corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité anti-radicalaire, mise en évidence dans un grand nombre des travaux. Des études sur la relation entre la structure chimique des composés phénoliques et leur pouvoir piègeur des radicaux libres ont montré que l'activité anti-radicalaire est dépendante du nombre, de la position et de la nature des substituants sur les cycles B et C (groupements hydroxyles, metaxylés, glycosylés) et le degré de polymérisation **(popovici et al, 2009)**.

Ces mêmes paramètres sont liés également à la polarité des composés. L'activité plus élevée de l'acide gallique (groupement 3,4,5-tri-OH sur le cycle aromatique) peut être attribuée à sa plus forte polarité par rapport aux flavaloïdes **(popovici et al, 2009)**.

L'acide caféique a la capacité de piégeage de plusieurs espèces réactives, telles que le DPPH, peroxyde, hydroxyle, anion radical superoxyde, et peroxydinitrite **(Chandrasekara, 2018)**.

Il a été démontré que l'acide chlorogénique et l'acide caféique éliminent le sesquioxyle d'azote, les radicaux libres organiques, hypochloreux, superoxyde, radicaux hydroxyle et peroxydite ainsi que les radicaux peroxyde (**Chandrasekara, 2018**).

Les flavonoïdes agissent en générant des radicaux phénoliques moins réactifs et plus stables par réaction directe avec les radicaux libres.

Le caractère antioxydant de la quercétine par exemple est associé à la structure chimique, en particulier à la présence et à la localisation des substitutions hydroxyle (-OH) et du noyau B de type catéchol (**Wang et al., 2006**). Les propriétés structurales d'une capacité antioxydante puissante sont dues à la présence d'un groupe ortho-dihydroxy ou catéchol dans le cycle B, une double liaison 2,3 et une substitution hydroxyle en positions 3 et 5. De plus en plus de preuves démontrent que la quercétine, qui se caractérise par une forme d'hydroxylation de 3, 5, 7, 30 et 40 et par un cycle B du catéchol, contient toutes les propriétés structurales d'un agent antioxydant (**Ozgen et al, 2016**).

Selon l'étude de **Doğan et al., 2015**, les femmes exposées à une chimiothérapie et susceptibles d'être enceintes devraient être traitées avec des molécules antioxydantes, telles que la quercétine, afin de réduire le risque de lésions des tissus cérébraux du fœtus.

Certaines études expérimentales sur les animaux indiquent que les effets antioxydants de la quercétine diminuent les lésions oxydatives des tissus tels que le cerveau, les lésions cardiaques de reperfusion ischémique et l'exposition à des agents induisant un stress oxydatif (**Doğan et al., 2015**). Il est bien établi que les antioxydants naturels sont généralement inoffensifs pour le corps humain. Ce sont des molécules qui empêchent le vieillissement précoce en bloquant les effets catastrophes des radicaux libres, de nombreuses maladies et réactions en chaîne (**Ozgen et al, 2016**).

L'épicatéchine, caractérisée par la présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3, est considérée également comme un antioxydant fort (**popovici et al, 2009**).

Il a été rapporté que les acides phénoliques et les flavonoïdes ont été associés à des avantages pour la santé notamment la prévention et le traitement de divers types de maladies telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives (**Mezni et al, 2018**).

4. Activité anticoagulante

L'activité anticoagulante des extraits sélectionnés le *n*-butanolique et l'extrait HMeOH a été évalué *in vitro* à l'aide d'un test chromométriques, le temps de prothrombine (TP) exprimé en secondes et porté par rapport aux résultats obtenus par les standards (Héparine et Aspégic).

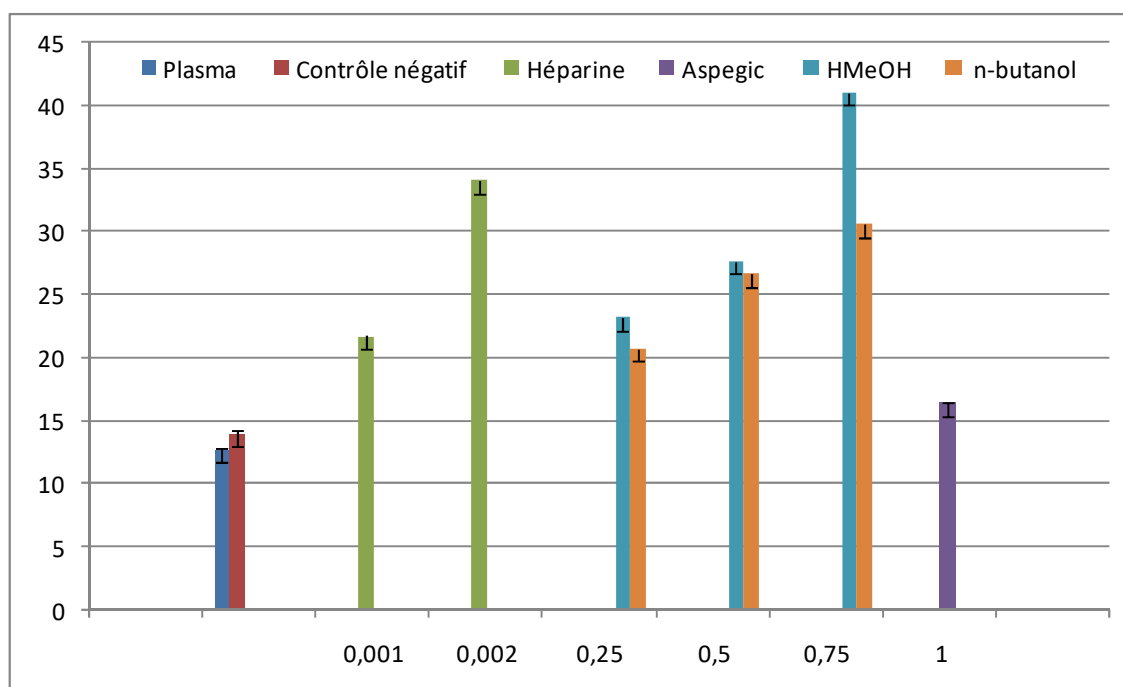


Figure 16. Temps de coagulation des extraits de *Cistus sp.*

Les extraits montrent des temps de coagulation différents. Notant que le control négatif (DMSO) a donné un temps de coagulation estimée de 13.95 secondes très proche de celui du plasma qui a marqué un temps de coagulation égale à 12.66 secondes. Alors que, le control positif (Aspégic) a marqué un temps de coagulation estimé de 16.36 ± 0.01 secondes à une concentration de 1mg/ml. D'autre part, l'héparine a donné des temps de coagulation trop élevés ($21.7 \pm 0,31$ secondes et $34.04 \pm 0,27$ secondes) à des très faibles concentrations 0.001 mg/ml et 0,002 mg/ml respectivement.

L'observation général de l'histogramme montre que les deux extraits allongent le temps de prothrombine à des faibles concentrations.

L'extrait HMeOH a subi le temps de coagulation le plus élevé avec 41.09 ± 0.54 secondes; 27.63 ± 0.42 secondes et 23.13 ± 0.97 secondes à des concentrations de 0.75 mg/ml; de 0.5 mg/ml et 0.25 mg/ml respectivement par rapport à l'extrait *n*-butanolique 30.58 ± 0.25 ; 26.62 ± 0.13 et 20.66 ± 0.33 secondes aux même concentrations. La prolongation du temps de coagulation induite par les deux extraits de *Cistus sp.* fait que l'extrait HMeOH est le premier qui possède l'activité anti-coagulante la plus grande que le second extrait le *n*-butanolique par une différence minimale de 2,47 secondes.

Globalement, l'évaluation de la capacité anticoagulante des extraits établi par le test chronométriques d'exploration de la coagulation TP montre que ces extraits exercent une activité anticoagulante importante vis-à-vis l'héparine qui est un traitement clinique puissant qui concoure à maintenir le sang à l'état fluide à l'intérieur des vaisseaux, soit arrête les hémorragies et empêche les thromboses.

A la lumière des résultats obtenus , on peut ressortir que les deux extraits analysés sont loin de remplacer l'héparine. Mais malgré la légère activité anticoagulante de ces extraits, on estime que leur consommation régulière et continue va réduire ou éliminer les risques des maladies thromboemboliques.

D'après nos connaissances et jusqu' à ce jour là, il y n'y a aucun travail de recherche fait l'objet de l'étude des propriétés anticoagulantes du genre *Cistus* ni de la famille Cistaceae. Par ailleurs , très peu de travaux ont été réalisés sur les plantes médicinales d'une façon générale. Citant l'étude de **Duric et al (2015)** faite sur les feuilles d'*Artemisia dracuncululus L.* originaire de Bosnie-Herzégovine qui appartient à la famille des Astraceae a montré que l'extrait méthanolique préparé à des concentration de 5% ; 1,5% ; 0,75% et 0,09% présente l'activité anticoagulante la plus élevé avec des temps de coagulation marqué respectivement : 27.4 secondes ; 27,7 secondes et 23,7 secondes indiquant que, l'extrait méthanolique possède un fort effet sur l'augmentation du TP due à la présence des coumarines dans les feuilles du matériel végétal.

Une étude antérieure de **Mekhfi et al (2014)** sur l'activité anti agrégante de cinq plantes: *Arbutus unedo* (Ericaceae), *Urtica dioïca* (Urticaceae) et *Petroselinum crispum* (Apiaceae), *Cistus ladaniferus* (Cistaceae) et *Equisetum arvense* (Equisetaceae) d'origine marocaine, a été prouvé *in vivo* sur un groupe de rats Wistar (383 ± 16.9 g).

Une classification de ces plantes en fonction de leur propriété anti-agrégante montre que *Cistus ladaniferus* (83.8 ± 3.3 pour thrombine 1U/ml) exerce l'effet inhibiteur le plus important et que l'*Urtica dioïca* (36.9 ± 6.1 pour thrombine 1U/ml) a l'activité la plus faible.

CONCLUSION

Les plantes médicinales jouent un rôle déterminant dans la conservation de la santé des hommes et dans la survie de l'humanité. La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles représentent une source inépuisable de composés naturels bioactifs qui agissent directement sur l'organisme.

Le présent travail a porté sur la quantification des composés phénoliques totaux et flavonoïdes et évaluation de l'activité antioxydante et anticoagulante de différents extraits obtenus par extraction successive de la plante *Cistus sp.* Les parties aériennes de cette plante sont soumis à des extractions hydro-alcooliques et des affrontements avec des solvants de polarité croissante (*n*-hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol). La détermination des rendements en extraits a montré une rentabilité chez les extraits polaires (*n*-butanol et HMeOH) par rapport au autres extraits (ACOET, *n*-hexane et CHCl₃). Les extraits obtenus subissent des dosages des composés phénoliques totaux et flavonoïdes par les méthodes spectrométriques qui utilisent le Folin-Ciocalteu et chlorure d'aluminium comme réactifs, qu'ils ont montré la richesse de ces extraits en ces composés.

Les composés phénoliques sont principalement reconnus pour leur importante activité antioxydante. Cette activité a été révélé par la méthode de piégeage du radical libre DPPH d'où nos extraits possèdent un pouvoir antioxydant puissant.

La plante *cistus sp* possède plusieurs propriétés biologiques parmi lesquelles l'activité anticoagulante étudié dans notre travail dont les résultats sont encourageants et stimulent à entreprendre d'autre projets de recherches sur les espèces de cette famille. Ainsi, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- Caractérisation quantitative des composés polyphénoliques par des méthodes de séparation plus performantes HPLC ou LC/MS.
- La confirmation de l'effet antioxydant par l'utilisation d'autres tests comme : FRAP, ABTS, β -carotène et autres.
- L'essai de l'activité anticoagulante par d'autres tests : le test du temps de céphaline-kaolin (TCK) et du temps de Quick (TQ).
- Détermination de l'effet cytotoxique en réalisant l'activité de cytotoxicité.
- L'étude des activités biologiques *in vitro* constitue un point de départ essentiel pour entreprendre des études *in vivo* sur modèle animal.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

- **Abad MJ., Bermejo P., Villar A., Sanchez Palomino S., Carrasco L., 1997.** Antiviral activity of medicinal plant extracts. *Phytother. Res*, 1: p 198-202.
- **Abdel-Hameed, E., 2009.** Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. *Food Chem.* 114, 1271–1277.
- **Alain Damier. 2002.** Guide du traitement des déchets.3 édition. Dunod. Paris.
- **Anastasaki T., Demetzos C., Perdetzoglou D., Gazouli M., Loukis A., Harvala C., 1999.** Analyse des diterpènes de type labdane de *Cistus creticus* (sous-espèces *creticus* et sous-espèces *eriocephalus*), par GC et GC-MS. *Planta Med*, 65 : p 735-739.
- **Aránzazu M., Maria J., Stephen J., Enrique B., Vicente M., Cristina R., Antonio S., 2015.** Volatile profile of Spanish *Cistus* plants as sources of antimicrobials for industrial applications. *Industrial Crops and Products*, 74 : P 425-433.
- **Asaaidi K., 2012.** Hemostase fœtale humaine de la physiologie a la pathologie intra-uterine et perinatale. Thèse de doctorat : pharmacie. Université de Mouhamed V-Rabat, 110 p.
- **Attaguile G., Perticone G., Mania G., Savoca F., Pennisi G., Salomone S., 2004.** *Cistus incanus* et *Cistus monspeliensis* inhibent la réponse contractile dans le muscle lisse de rat isolé. *J. Ethnopharmacol*, 92 : p 245-250.
- **Aziz M., Tab N., Karim A., Mekhfi H., Bnouham M., Ziyat A., Melhaoui A, Legssyer A., 2006.** Relaxant effect pf aqueous extract of *Cistus ladaniferus* on rodent intestinal contractions. *Fitoterapia*, 77: p 425-428.

B

- **Bammi J., Douira A., 2002.** Les plantes médicinales dans la forêt de l'achach (plateau central, Maroc). *Acta Botanica Malacitana*, 27: p 131-145.
- **Barrajón-Catalán E, S. Fernández-Arroyo D., Saura E., Fernández-Gutiérrez E., Segura-Carretero A., et al. 2010.** Les extraits aqueux de Cistaceae contenant des ellagitannins présentent une capacité antioxydante et antimicrobienne, ainsi qu'une activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses humaines. *Food Chem. Toxicol*, 48 : p 2273-2222.
- **Barros L., Dueñas M., Alves CT., Silva S., Henriques M., Santos-Buelga C., et al. 2013.** Activité antifongique et caractérisation chimique détaillée des extraits phénoliques de *Cistus ladanifer*. *Cultures Ind. Prod*, 41 : p 41-45.
- **Baslar S., Dogan Y., H. Mert H., 2002.** A study on the soil-plant interactions of some *Cistus* L. species distributed in West Anatolia. *Turkish Journal of Botany*, 26: p149-159.
- **Batty P., Smith G., 2010.** Anticoagulation. *Surgery*, vol. 28 (6), 243-247.
- **Bellakhdar J., 1998.** Pharmacopée traditionnelle marocaine, Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Ibis Press, Paris, 770.
- **Benchlem H., 2018.** Etude phytochimique et biologique de deux plantes médicinales algériennes. thèse de doctorat : chimie. Université des frères Mentouri–Constantine, 242 p.
- **Benkhniq O., Ben Akka F., Salhi S., Fadli M., Douira A., Zidane A., 2014.** Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète dans la région d'Al Haouz-Rhamna (Maroc). *Journal of Animal & Plant Sciences*, 23: p 3539-3568.
- **Berreghioua M.A., 2016.** Investigation phytochimique sur des extraits bioactifs de deux brassicaceae médicinales du sud algérien : *Moricandia arvensis* et *Zillamacroptera*. Thèse de doctorat : chimie organique. Université aboubaker belkaid-Tlemcen, 257 p.

- **Bensouici Ch., 2014.** Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques de deux plantes du genre *Sedum* (Crassulaceae). thèse de doctorat : chimie organique. Université frères Mantouri-Constantine, 250 p.
- **Bensouici Ch., Kabouche A., Karioti A, Öztürk M, Duru M.E., Bilia A.R., Kabouche Z., 2016.** Compounds from *Sedum caeruleum* with antioxidant, anticholinesterase, and antibacterial activities. *Pharmaceutical Biology*, 54:1, 174-179.
- **Berreghioua M.A., 2016.** Investigation phytochimique sur des extraits bioactifs de deux brassicaceae médicinales du sud algérien : *Moricandia arvensis* et *Zillamacroptera*. Thèse de doctorat : chimie organique. Université aboubakerbelkaid-Tlemcen, 257 p.
- **Bidie A.F., N'Guessan B.B., Yapo A.F., N'Guessan J.D., Djaman A.J., 2011.** Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *science et nature*, 8(1) : p 1-11.
- **Blois, M.S. 1958.** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181: 1199-1200.
- **Bouamama H., Noël T., Villard J., Benharref A., Jana M., 2006.** Activités antimicrobiennes des extraits de feuilles de deux espèces marocaines de *Cistus L. J. Ethnopharmacol.* 104, 104-107.
- **Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 2ème Ed. Lavoisier, Paris.

C

- **Ćetković G.S., Mandić A. I., Jasna M. Č., Djilas Sonja M., Tumbas V.T., (2007),** HPLC Screening of phenolic Compounds in winter Savory (*Satureja montana L.*) Extracts, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30: 293–306.
- **Chandrasekara A., 2018.** Phenolic Acids. Department of Applied Nutrition, Wayamba University of Sri Lanka, Makandura, Gonawila, Sri Lanka.
- **Cordier W., Steenkamp V., 2012.** Herbal remedies affecting coagulation. *Pharmaceutical Biology*, 50 (4): p 443-452.

- **Cos P., Vlietinck A., Vanden Berghe D., Maes L., 2006.** Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro "proof-of-concept". *J. Ethnopharmacol*, 106: p 290-302.
- **Crespo Martín M., CardenalGalván A., Peral Pacheco D., Vallejo Villalobos J.R., 2009.** Jarapringosa (*Cistus ladanifer*), usos, utilidades y curiosidades en Extremadura. *Revista de Estudios Extremeños*, Tomo LXV; número III : p 1637-1650.
- **Cristina V., Juan C., Natividad Ch., Teresa S., 2016.** Intra-population variation of secondary metabolites in *Cistus ladanifer* L.molécule, 21, 945: P 12.

D

-
- **Deaton CHM., Marlin DJ., 2003.** Exercise-associated oxidative stress. *Clin Tech Equine Pract*, 2(3) : 278-91.
 - **Demetzos C., Loukis A., Spiliotis V., Zoakis N., Stratigakis N., Katerinopoulos H E., 1995.** Composition et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cistus creticus* L. *J. Essent. OilRes*, 7 : p 407-410.
 - **De Revel T., Doghmi K., 2004.**the normal Haemostatic Process.*EMC-Dentiserie*, vol .(1): p 71-81.
 - **Dimitra P., Antigoni P.,Vasiliki F., Stella G., Stefanos K., Angelos K.,2014.** Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties.*De face .chem*, 2: P 35.
 - **Doğan Z, Kocahan S, Erdemli E, Köse E, Yılmaz , Ekincioğlu Z, Ekinci N, Türköz Y. 2015.** Effect of chemotherapy exposure prior to pregnancy on fetal brain tissue and the potential protective role of quercetin. *Cytotechnology*. 67: p 1031-1038.

- **Doukani K., Tabak S., Derriche A., Hacini Z., 2014.** Etude physicochimique et phytochimique de quelques types de miels Algériens. *Ecologie-environnement*, 10 : p 37-49.
- **Duric K., E., Kovac-Besovic E., Niksic H., Muratovic S., Sofic E., 2015.** Anticoagulant activity of some *Artemisia dracunculus* leaf extracts *.Basic medical sciences*,15(2): p 9-15.

E

- **Edeas M., 2010.** Polyphénols et jus de grenade. *Phytothérapie*. 8: 16–20.
- **Ehrhardt C., Hrinčius ER, Korte V., Mazur I., Droebner K., Poetter A., et al. 2007.** CYSTUS052, un extrait de plante riche en polyphénol, exerce une activité anti-virus de la grippe en culture cellulaire, sans effets secondaires toxiques ni tendance à induire une résistance virale. *Antiviral Res*, 76 : p 38-47.
- **Elalamy., 2012.** héparine : structure, propriétés pharmacologiques et activités. Elsevier Masson SAS 13-022 D10.
- **El Kabbaoui M., Chda A., El-Akhal J., Azdad O., Mejrhit N., Aarab L., Bencheikh R., Tazi A., 2017.** Acute and sub-chronic toxicity studies of the aqueous extract from leaves of *Cistus ladaniferus L.* in mice and rats. *Ethnopharmacologie*, 209: p147-156.
- **El Kalamouni Ch., 2010.** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de doctorat: Sciences des Agroressources. Université de Toulouse, p 263.

F

- **Félix-silva J., Souza Th., Barros Gomes Camara R., Cabral B., Arnobio Antonio Silvia-junior., Rabecchi M.M., ZucolottoM.S., Hugo Alexandre Oliveira Rocha., Matheus de freitas Fernaudes-Pedrosa., 2014.** Activités in vitro anticoagulantes et antioxydantes de *Jatropha gossypifolia*. (Euphobiaceae) visant des applications thérapeutiques. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14 : p 405.

- **Filippo M., Domenico L., Fabrizio P., Gregorio P., Stefano D., 2016.** Phytochemical analysis of *Cistus creticus subsp.*, Poor in labdanum. eriocephalus (Viv.) Greuter and Burdet growing in central Italy. *Systématique biochimique et écologie*, 66 : p 50-57.
- **François Le frère., 2008.** Hématologie et transfusion, pages : 47-48.

G

- **Garabeth F., Bouaoun D., Elyafi-Elzahri G., 2007.** Etude quantitative des coumarines d'une plante sauvage *Prangos asperula* Boissier. *Phytotherapie*, 5 : p 259-263.
- **Ghedadba N., Hambaba L., Aberkane M.C., Oueld-Mokhtar S.M., Ferchan N., Bousselela H., 2014.** Évaluation de l'activité hémostatique in vitro de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubium vulgare* L. *Algerian Journal of Natural Products*, 2(2) : p 64-74.
- **Gonçalves S., Gomes D., Costa P., et Romano A., 2013.** The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*. 43: 465– 471.
- **Golfakhrabadi F., Abdollahi M., RezaShamsArdakani M, Saeidnia S., Akbarzadeh T, NiliAhmadabadi A., Ebrahimi A, Yousefbeyk F., Hassanzadeh A., Khanavi M., 2014.** Anticoagulant activity of isolated coumarins (suberosin and suberenol) and toxicity evaluation of *Ferulago carduchorum* in rats. *PharmBiol*, 52(10) : p 1335-1340.
- **Guinoiseau E., 2010.** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat : biochimie-biologie moléculaire. Université de Corse, 149 p.
- **Guvenc A., Yildiz S., Ozkan A.M., Erdurak C.S., Coskun M., Yilmaz G., Okuyama T., Okada Y., 2005.** Antimicrobiological studies in Turkish *Cistus species*. *Pharm. Biol*, 43: p 178.
- **Guzmán B., Vergas P., 2009.** Historical biogeography and character evolution of Cistaceae (Malvales) based on analysis of plastid *rbcL* and *trnL-trnF* sequences *Organisms. Diversity & Evolution*, 9: 83–99.

H

- **Hirsh J., Dalen JE., Poller L., Deykin D., 2001.** Oral Anticoagulants: Mechanism of Action Clinical Effectiveness, and Optimal Therapeutic Range. *CHEST*; 119:8S–21S.

I

- **Issa N.K., Abd-Aldjabar R.S., 2013.** Evaluation of Antioxidant Properties of Morusnigra L. Fruit Extracts [II]. *Biological Sciences*, 6 (4): p 258-265.

K

- **Kalpoutzakis E., Aligiannis N., Skaltsounis A.-L. et Mitakou S., 2003.** Diterpènes de type Cis-Clérodane de *Cistus monspeliensis*. *J. Nat. Prod.* 66:p 316-319.
- **Kortchinsky T., VIGUE B., Samama C., 2013.** Antagonisation des héparines et des nouveaux anticoagulants Reversal for heparins and new anticoagulant treatments ,37-49.
- **Krim M., 2014.** L'importance des antioxydants (Gingembre) dans la réduction des effets toxiques induits par les chromates chez les rats. Thèse de doctorat : Biochimie appliquée. Université de BADJI MOKHTAR- ANNABA,207 p.

L

- **Laguerre M., Lecomte J., Villeneuve P., 2007.** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244 – 282.
- **Lahssissene H., Kahoudji A., Tijane M., Hseini S., 2009.** Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (MAROC occidentale). *LEJEUNIA*, N° 186_2: p 22.
- **Laraoui H., 2016.** Métabolites secondaires de *Fumana montana* et *Fumana thymifolia* (Cistaceae). Thèse de doctorat : Chimie Organique. Université Hadj Lakhdar-BATNA, 205 p.

- **Loizzo M.R., Ben Jemia M., Senatore F., Bruno M., Menichini F., Tundis R., 2013.** Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus species* essential oils. *Food Chem. Toxicol*, 59 : p 586–594.

M

- **Mahmoudi H., Aouadhi Ch., Kaddour R., Greuber M., Zargouni H., Zaouali W., Ben Hamida N., Ben Nasri M., Ouerghi Z., Hosni K., 2016.** Comparaison of antioxydant and antimicrobial activities of two cultivated *Cistus Species* from Tunisia. *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 32, n. 1, p. 226-237, Jan./Feb.
- **Mekhfi H., El Haouari M., Legssyer A., Bnouhama M., Aziz M., Atmani F., Remmal A., Ziyat A., 2004.** Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants. *Ethnopharmacology*, 94 : p 317-322.
- **Merck F., 2017.** La biodiversité végétale au service des ingrédients naturels : Etude des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes d'extrait végétaux et développement d'un conservateur pour l'industrie cosmétique. Thèse de doctorat : Chimie. Ecole doctorale sciences fondamentales et appliquées –NICE, 321 p.
- **Meznia F., Slamaa A., Ksourib R., Hamdaouib G., Khoujaa M.L., Khaldi A., 2018.** Phenolic profile and effect of growing area on Pistacialentiscus seed oil. *Food Chemistry*, 257 : p 206- 210.
- **Mira A., Alkhiary W., Shimizu K., 2015.** Antiplatelet and Anticoagulant Activities of Angelica shikokiana Extract and Its Isolated Compounds. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 23(1) : p 91-99.
- **Molyneux P., 2003.** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol* ,26 (2) : p 211-219.

N

- **Nicolas G., Elisabeth D., 2013.** Une offrande de ciste dans une tombe carthaginoise (VIe-Ve s. av. J.-C.). Une approche interdisciplinaire alliant archéo-ethnobotanique et chimie organique analytique. *Archeo Sciences*, 37 : p 51-66 p.

- **Nogués I., Medori M., Calfapietra C., 2015.** Limitations of monoterpene emissions and their antioxidant role in *Cistus sp.* under mild and severe treatments of drought and warming. *Environmental and Experimental Botany*, 119 : p 75-86.

O

- **Obluchinskya. D., Makarova M. N., Pozharitskaya O. N., Shikov A. N., 2015.** Effects of ultrasounds treatment on the chemical composition and anticoagulant properties of dry *Fucus* extract. *Pharmaceutical Chemistry*, 49(3) : p 35 -38.
- **Ozgen S., Kivilcim Kilinc O., Selamoglu Z., 2016.** Antioxidant Activity of Quercetin: A Mechanistic Review. *Food Science and Technology*, 4(12) : p 1134-1138.

P

- **Peer R., 2014.** Phenolische Inhaltsstoffe in *Cistus incanus* Tee – Charakterisierung und Stabilität innerhalb der Teezubereitung. Thèse de doctorat: Lebensmittelchemie. Universität Hamburg, 179 p.
- **Perez-Vizcaino F., Fraga G .C., 2018.** Research trends in flavonoids and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 646 : p 107-112.
- **Penchev P., Angelov G., Condoret J.M., 2010.** Extraction des agents antioxydants (acide rosmarinique) à partir de la mélisse (*Melissa officinalis* L.). *Génie Industriel*, 5 : p 115-123.
- **Popovici C., Saykova I., Tylkowski B., 2009.** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Génie industriel*, 4 : p 25-39.

Q

- **Quezel P., Santa S., 1963.** Nouvelle Flore De L'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales ; Vols Ii. Ed Cnrs, Paris, France ; 592p.

- **Qi X., Mao W., Chen Y., Chen y., Zhao C., Li N., Wang C., Yan M., Lin C., Chan J., 2012.** Chemical characteristics of an anticoagulant active sulfated polysaccharide from *Enteromorpha clathrata*. *Carbohydrate polymers*, p 1804- 1810.

R

- **Rabaya A., IgueledBelghit S., Cherif J.k., Trabelsi-Ayadi M., 2016.** Total phenolic compounds and antioxidant potential of Rokrose (*Cistus Salviifolius*) Leaves and flowers grown in Tunisia. *pharmacognosy and phytochemical*,8(2) : p 327-331.
- **Rebaya A., IgueldBelghith S., Baghdikian B., MahiouLeddet V., Mabrouki F., Olivier E., Cherif J.M., TrabelsiAyadi M., 2015.** Total Phenolic, Total Flavonoid, Tannin Content, and Antioxidant Capacity of *Halimium halimifolium* (Cistaceae). *Applied Pharmaceutical Science*, 5(1) : p 52-57.
- **Raber AN.,1990.**Coagulation tests. *Clinical methods*, p 739-742.
- **RIBÉREAU-GAYON P., 1968.** Les composés phénoliques des végétaux, Dunod Éd. Paris.
- **Rolland A., 1988.** Pharmacological study and contribution to the botanical and chemical study of *Eschscholtzia California*. Doctorate of the university of M and z, mention pharmacognosie, p 441.
- **Rousseau A., 2013.** La coagulation physiologie et pharmacologie. Université Laval. p 117.

S

- **Saad B., Azaizeh H., Abu-Hijleh G., Said O., 2006.** Safety of traditional Arab herbal medicine. *Evidence-Based Complement. Alternat. Med*, 3(4): 433-439.
- **Sadhu S K., Okuyama E., Fujimoto H., Ishibashi M., Yesilada E., 2006.** Composants inhibiteurs et antioxydants de la prostaglandine de *Cistus laurifolius*, une plante médicinale turque. *J. Ethnopharmacol*, 108 : p 371-378.

- **Saffidine K., 2015.** Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamuscaeruleus* L. et de *Plantago major* L. Thèse de doctorat : microbiologie. univesrité de FARHAT ABBAS-SETIF, 132 p.
- **Sayah K., Marmouzi I., NaceiriMrabeti H., CherrahY., Mon et Abess F., 2017.** Activité antioxydante et potentiel inhibiteur de *Cistus Salviifolius(L).*et de *Cistus monspeliensis (L).* Extrait de parties aériennes contre des enzymes clés liées à l'hyperglycémie.*Biomed*, : p 7.<http://dx.doi/10.1155/2017/2789482>.
- **Singleton V.L., Orthofer R. , Lamuela-Raventos R.M., 1999.**Analysis of total phenols and other oxidant substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299: p 152.
- **Soo Cheon C., Jai-Heon L., and Sang U. P. 2013.** Recent studies on flavonoids and their antioxidant activities. *Experimental and Clinical Sciences*, 12: 225–230.
- **Soualeh N., Soulimani R. ,2016.** Huiles essentielles et composés organiques volatils, rôles et intérêts. *phythérapie*, 14 : P 44-57.
- **Stępień A., Aebisher D., Bartusik-Aebisher D., 2018.** Biological properties of *Cistus species*, *Eur J Clin Exp Med*, 16 (2): p 127–132.
- **Suresh Kumar K., Ganesan K., SubbaRaoPV. 2008.**Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycusalvarezii* (Doty) Doty–An edible seaweed. *Food Chem*, ; 107 (1) : 289-95.
- **Swain T., Hillis W.E., 1959.** The phenolicsconstituants of *Prunusdomestica* -I- the quantitative analysis of phenolics constituents.*J Sci Food Agric*, 10: p 63–81.

T

- **Techer S., 2013.** Criblage d'activités biologiques de plantes endémiques ou indigènes de La Réunion - Recherche de molécules antivirales ciblant le virus du chikungunya. Thèse de doctorat : chimie. Université de la Réunion-France,245 p.

U

-
- **Ustun O., Gurbuz I., Kusmenoglu S., Turkoz S., 2004.** Fatty acid content of three *Cistus species* growing in Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, 40: p 526- 528.

V

-
- **Verdeguer M., Blázquez M. A., Boira H., 2012.** Chemical composition and herbicidal activity of the essential oil from a *Cistus ladanifer L. population from Spain*. *Nat. Prod. Res*, 26 : p 1602-1609.
 - **Vogt T., Proksch P-G. Gülz P., Wollenweber E., 1987.** Rare 6- and 8-Omethylated epicuticular flavonols from two *Cistus species*. *Phytochemistry*, Vol. 26, No. 4, p 1027-1030.

W

-
- **Wang B., Qiu Y L., 2006.** Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 16: p 299-363.

Y

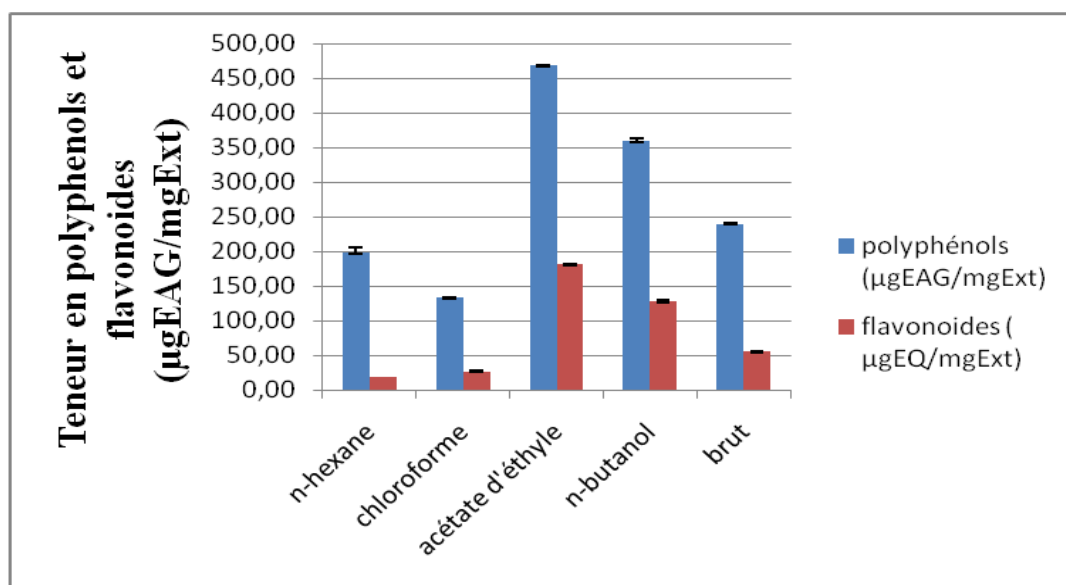
-
- **Yeruham I., Orgad U., Avidar Y., Perl S., Liberboim M., Adler H., et al. 2002.** Syndrome de rétention urinaire chez les vaches de boucherie probablement dû à l'ingestion de *Cistus salvifolius*. *Rev. Méd. Vét*, 153 : p 627-634.

Z

-
- **Zerargui F., 2015.** Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis L.* et caractérisation des substances bioactives. thèse de doctorat : biochimie. Université de FARHAT ABBAS-SETIF, 169 p.
 - **ZIDANE, H., ELMIZ, M., AOUINTI, F., TAHANI, A., WATHELET, J., SINDIC, M., ELBACHIRI A., 2013.** Chemical composition and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts of *Cistus ladanifer* and *Cistus libanotis* growing in Eastern Morocco. *African Journal of Biotechnology*. v. 12, n. 34, p. 5314-5320.



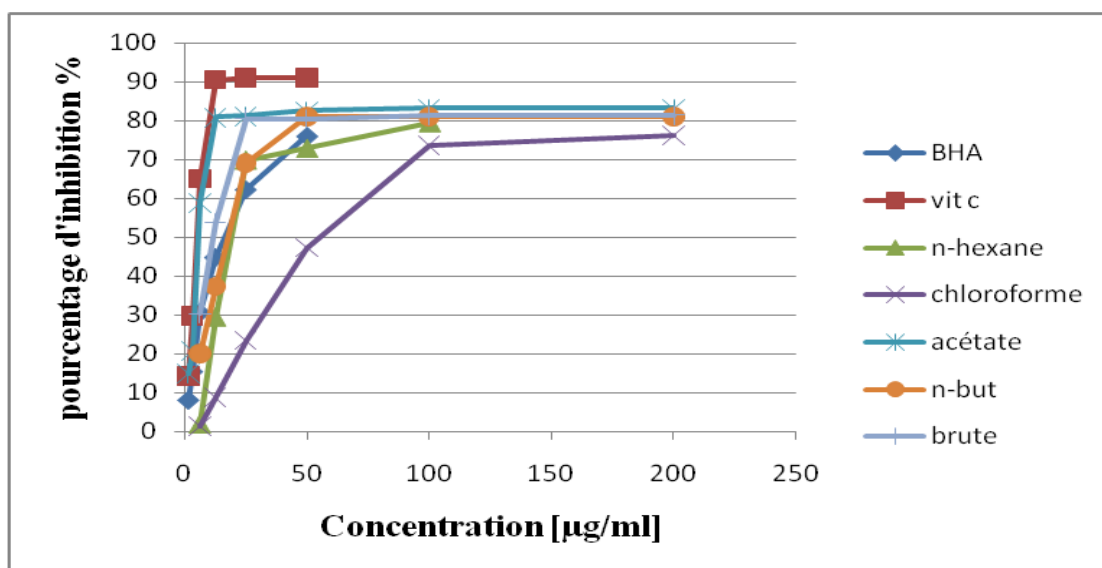
ANNEXES



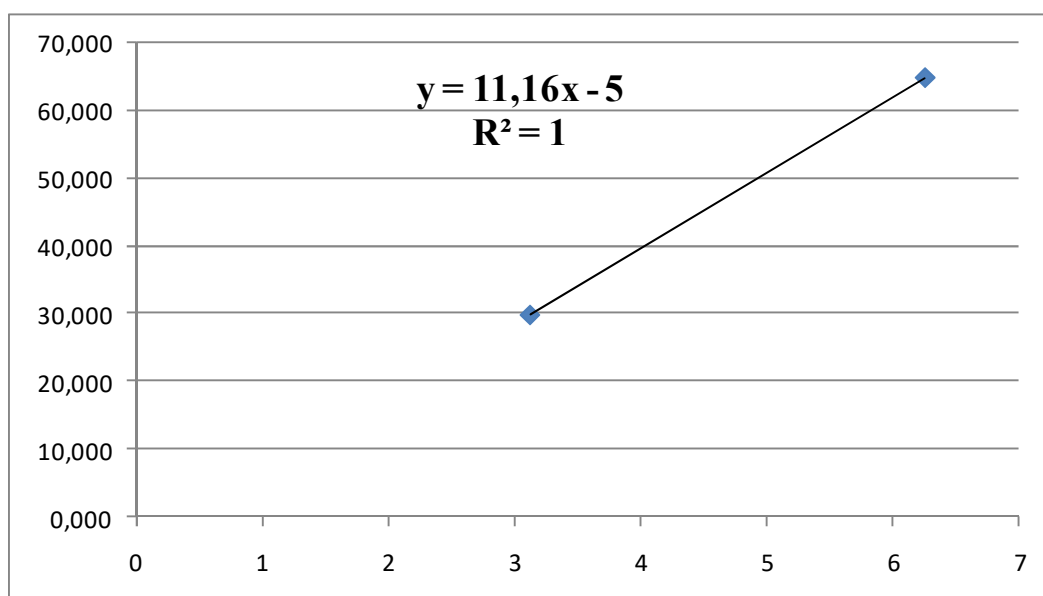
Annexe 1. Teneur en polyphénols et en flavonoïdes des différents extraits de *Cistus sp.*

Annexe 2. Activité antioxydante des différents extraits de *Cistus sp.*

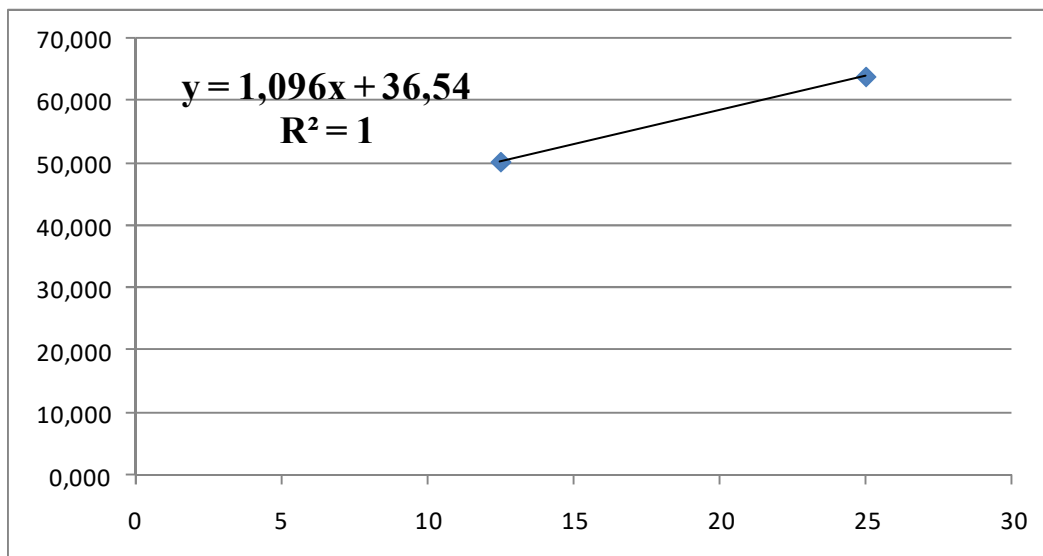
µg/ml	n-hexane	CH Cl3	AC EOT	n-butanol	Brut	Vitamine C	BHA
200	nd	76,26±4,79	83,12±0,08	80,99±0,09	81,35±0,09	nd	nd
100	79,55±0,12	73,54±0,95	83,00±0,08	81,12±0,46	81,35±0,09	nd	nd
50	72,95±2,65	47,29±1,63	82,34±0,16	81,12±0,27	81,48±0,09	91,13±0,17	76,05±2,61
25	69,91±0,37	23,34±4,02	81,08±0,59	69,14±1,58	80,41±0,28	91,06±0,08	62,28±2,35
12,5	29,46±5,55	8,75±2,20	80,84±1,27	37,24±1,30	53,74±1,70	90,63±0,00	44,81±7,68
6,25	1,88±1,13	1,22±0,38	58,86±0,08	19,87±0,18	30,28±0,47	65,06±0,44	30,62±5,58
3,125	nd	nd	20,60±8,83	nd	nd	29,75±0,17	12,72±0,00
1,562	nd	nd	14,77±2,80	nd	nd	14,13±0,00	8,02±5,23



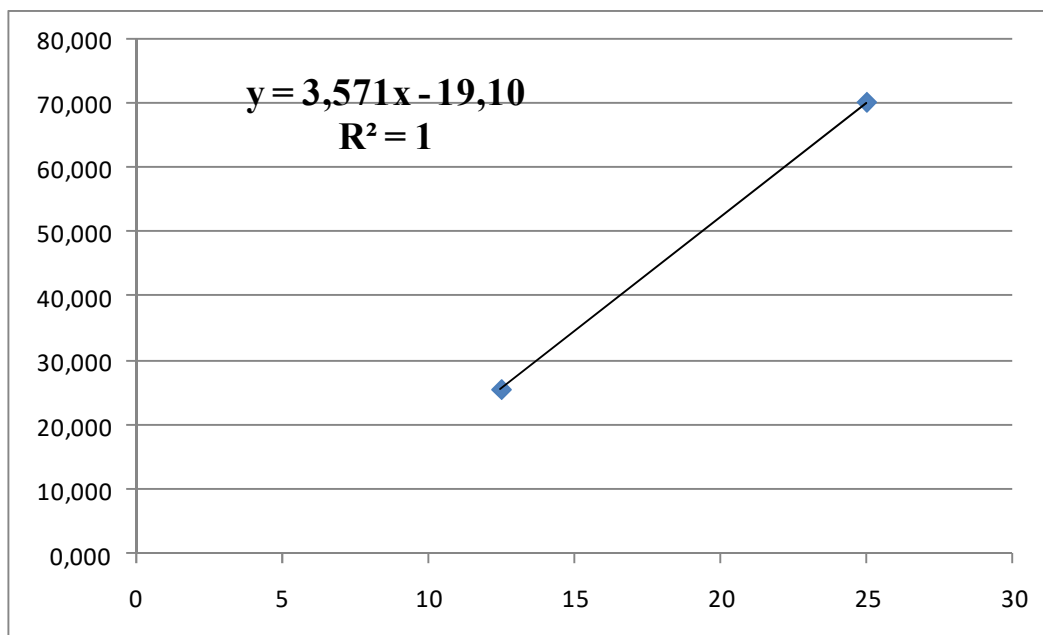
Annexe 3. Pourcentages d'inhibition du radicale DPPH des différents extraits de *Cistus sp.*



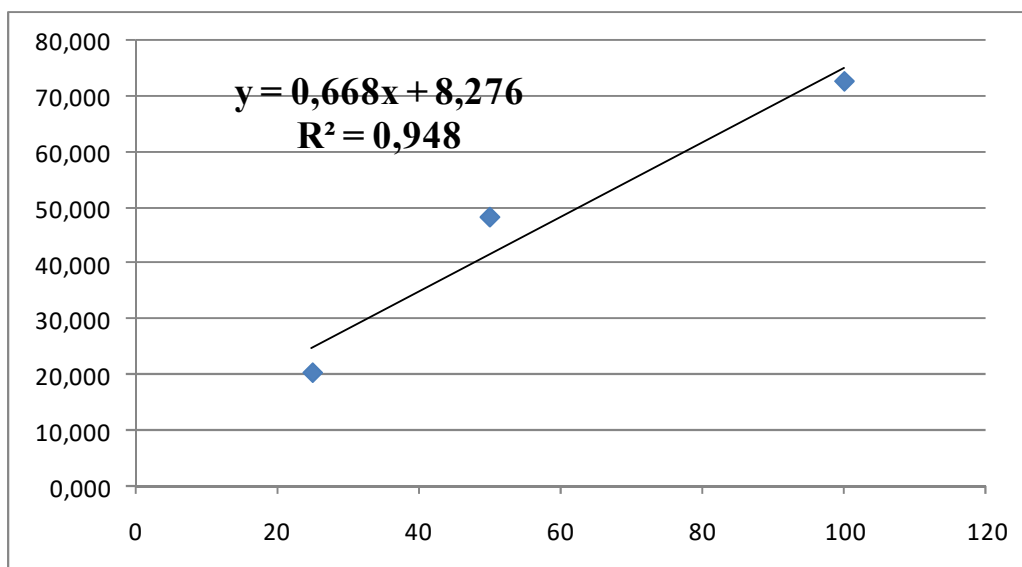
Annexe 4. Détermination de l'IC₅₀ de l'acide ascorbique (vitamine C).



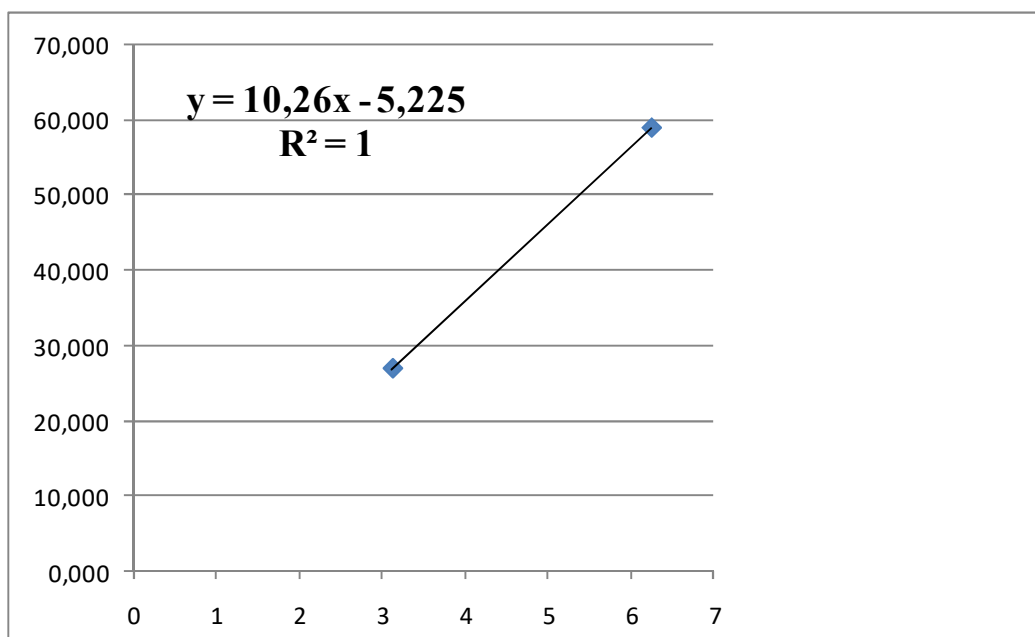
Annexe 5. Détermination de l'IC₅₀ de BHA.



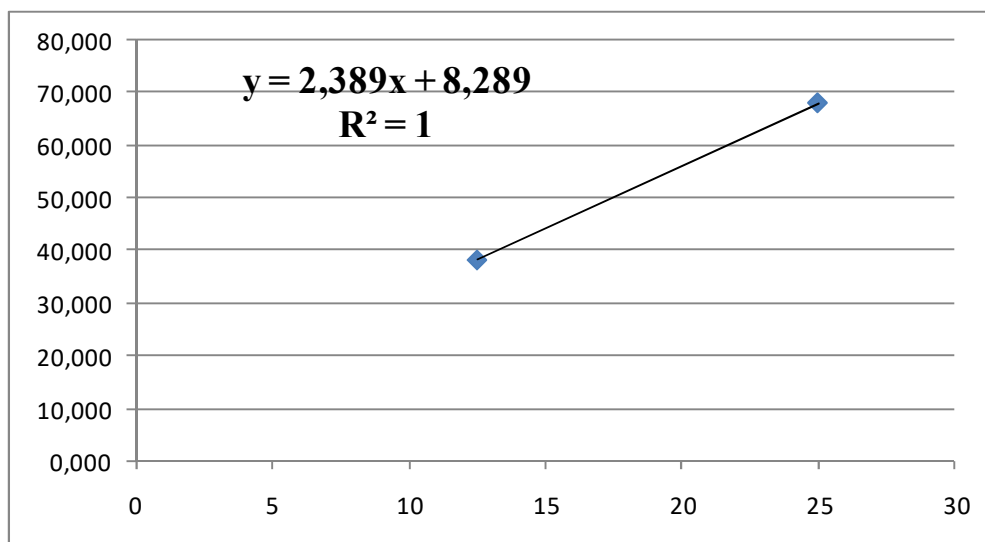
Annexe 6. Détermination de l'IC₅₀ de l'extrait n-hexane de *Cistus sp.*



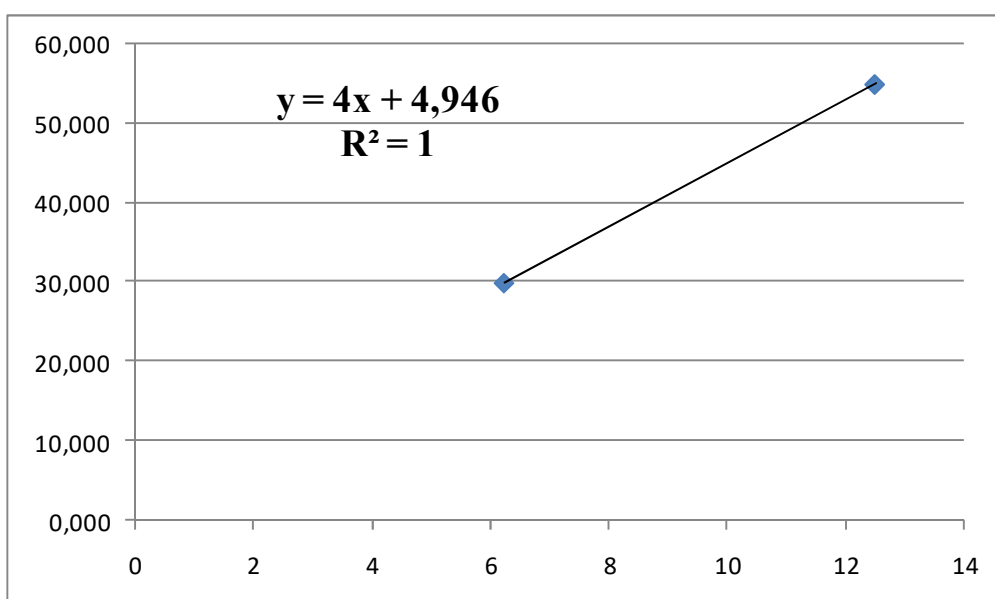
Annexe 7. Détermination del'IC50 de l'extrait chloroforme de *Cistus sp.*



Annexe 8. Détermination del'IC50 de l'extrait acétate d'éthyle de *Cistus sp.*



Annexe 9. Détermination del'IC50 de l'extrait n-butanol de *Cistus sp.*

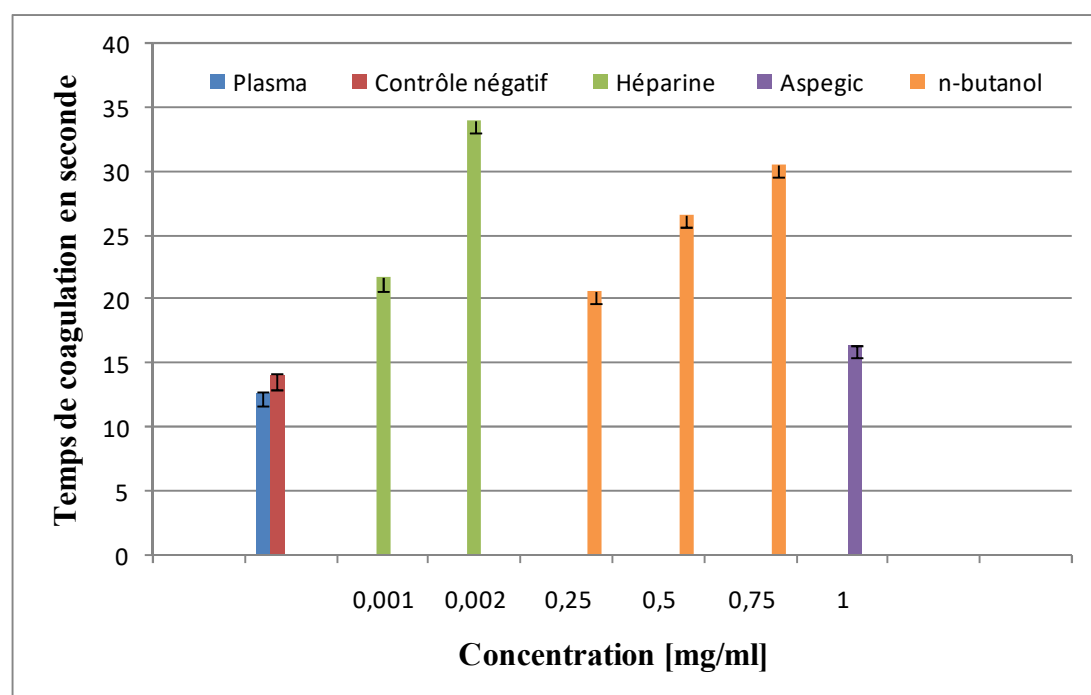


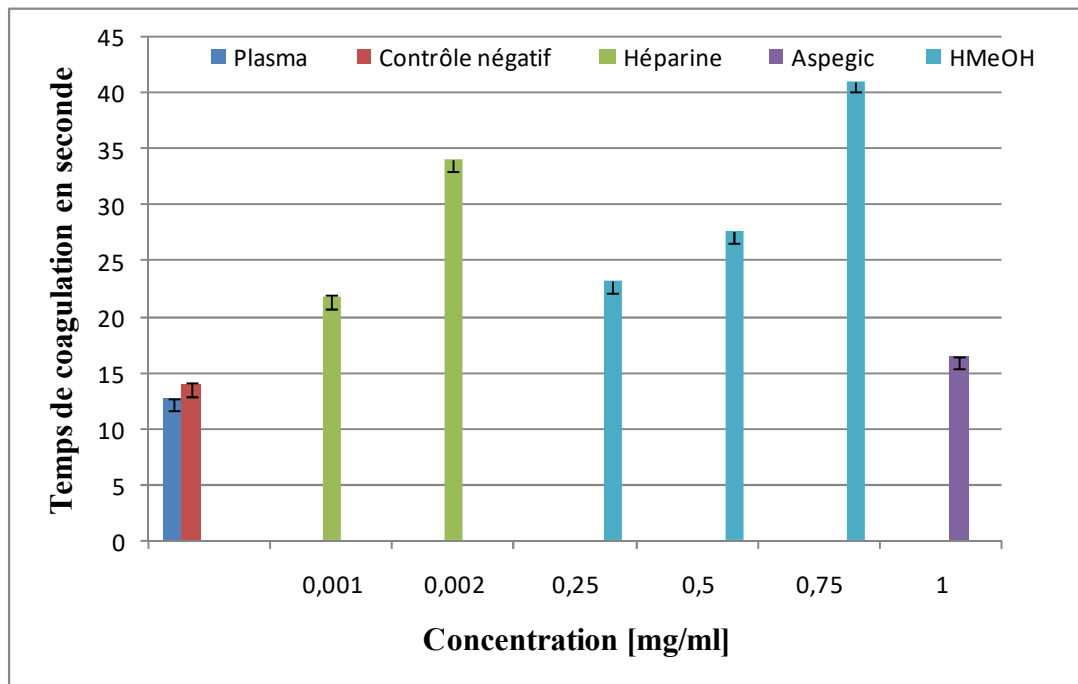
Annexe 10. Détermination del'IC50 de l'extrait hydrométhanolique de *Cistus sp.*

Annexe 11. Activité anticoagulante des différents extraits de *Cistus sp.*

[mg/ml]	Héparine	n-butanol	Brut
0,05	21,7±0,31	nd	nd
0,06	34,04±0,27	nd	nd
0,25	nd	20,66±0,33	23,13±0,97
0,5	nd	26,62± 0,13	27,63± 0,42
0,75	nd	30,58±0,25	41,09± 0,54

Nd: non défini.

Annexe 12 : Taux de prothrombine des standards et de l'extrait n-butanol de *Cistus sp.*



Annexe 13. Taux de prothrombine des standards et de l'extrait HMeOH de *Cistus sp.*

Résumé

Le présent travail porte sur l'investigation phytochimique et biologique de la plante *Cistus sp.* (Cistaceae) de la région de Mila. En effet, Cinq extraits sont préparés, à partir des parties aériennes de cette plante, dont un extrait brut hydrométhanolique et quatre fractions obtenus à partir de ce dernier selon la polarité. L'analyse semi quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes a montrée une grande richesse de tous les extraits en ces molécules notamment les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol. Le pouvoir antioxydant des différents extraits a été mesuré à l'aide de la méthode de DPPH, les résultats obtenus montre que tous les extraits peuvent agir en tant que piègeurs du radical libre DPPH à toutes les concentrations, les IC₅₀ dont l'ordre du pouvoir antioxydant était: ACOET > HMeOH > *n*-butanol > *n*-hexane > CHCl₃. Les résultats de l'activité anticoagulante ont montré que les extraits HMeOH et *n*-butanol sont capable de prolonger le temps de coagulation à une faible concentration (0.25 mg/ml) en enregistrant des valeurs très remarquables.

Mots clés : *Cistus sp.*, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydante , activité anticoagulante.

Abstract

This work focuses on the phytochemical and biological investigation of the plant *Cistus sp.* (Cistaceae) from Mila Eastern of Algeria. Indeed, Five extracts are prepared from the aerial parts of this plant, including a crude hydromethanolic extract and four fractions obtained from the latter according to the polarity. The semi-quantitative analysis of the total polyphenols and flavonoïds has shown high amountS in all extracts, particularly in ethyl acetate and *n*-butanol extracts. The antioxidant power of the various extracts was measured using the DPPH method, the obtained results show that all the extracts can act as free-radical scavengers at all concentrations, the IC₅₀ whose order of power antioxidant was: ACOET> HMeOH> *n*-butanol> *n*-hexane> CHCl₃. The results of the anticoagulant activity showed that the HMeOH and *n*-butanol extracts are able to extending the coagulation time at a low concentration (0.25 mg / ml) by recording very remarkable values.

Keywords: *Cistus sp.*, polyphenols, flavonoïds, antioxidant activity, anticoagulant activity.

ملخص:

يهدف هذا العمل إلى تقييم المواد الفعالة بيولوجيا من خلال دراسة التحليل الفيتوكيميائية والبيولوجية لنبته *Cistus sp.* (Cistaceae) المتواجدة بمنطقة ميلة. من أجل ذلك، تم تحضير خمسة مستخلصات من الأجزاء الهوائية لهذا النبات ، بما في ذلك مستخلص الهيدروميثانول الخام وأربعة مستخلصات تم الحصول عليها انطلاقا من هذا الأخير وفقاً لدرجة القطبية. و قد أظهر التحليل نصف الكمي للمركبات الفينولية الكلية والفلافونويدات محتوى عالي عند جميع المستخلصات لا سيما مستخلصي الأسيئات إيثيل و *n*-بيوتانول. تم تقدير النشاط المضاد للأكسدة لمختلف المستخلصات باستخدام طريقة DPPH، وقد أظهرت النتائج أن جميع المستخلصات تملك قدرة على اقتناص الجذور الحرة بمستويات جيدة عند مختلف التراكيز، هذا و قد تم تسجيل قيم IC₅₀ الموافقة لترتيب فعالية النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات كالتالي: ACOET < HMeOH < *n*-بيوتانول < *n*-هيكسان < CHCl₃. كما أظهرت نتائج النشاط المضاد للتخثر أن مستخلصات HMeOH و *n*-بيوتانول قادرة على تمديد زمن التخثر عند تركيز منخفض (0.25 مغ/مل) حيث تم تسجيل قيم ملحوظة للغاية.

الكلمات المفتاحية: *Cistus sp.*، الفينولات المتعددة، الفلافونويدات، فعالية مضادة للأكسدة، النشاط المضاد للتخثر.