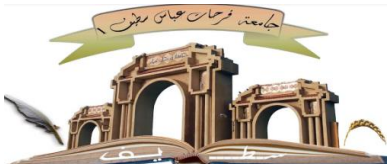
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1

Faculté de science de la

Nature et de la vie



جامعة فرحات عباس سطيف 1

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Biochimie

N°……/SNV/2024

MÉMOIRE

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER

Filière : Science biologique

Spécialité : Biochimie Appliquée

THÈME

Activités antioxydantes et anticoagulante des extraits polyphénoliques du *Tilia Cordata Greenspire* (الزيزفون الحلبي)

Présentée par :

Madoui Aya & Meziane Kaouther

Soutenue publiquement le : 02/07/2024

Devant le Jury

Président : BELATTAR Noureddine Pr. UFA Sétif 1.

Promoteur : AGGOUN Loubna MCS. UFA Sétif 1.

Examinateur : SIDANI Saïd MCS. UFA Sétif 1

Année Universitaire : 2023-2024


بسم الله الرحمن الرحيم

Remerciements

En premier lieu, je remercie Allah le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il nous a donné durant toutes les longues années d'études afin qu'on puisse arriver là.

Nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères à notre encadreur **MCS. AGGOUN Loubna**. Nous vous remercions pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu diriger ce travail. Nous avons trouvé auprès de vous le conseiller et le guide qui nous a reçues en toute circonstance avec sympathie, sourire et bien veillance. La pertinence de vos remarques et la justesse de vos corrections sont pour nous un exemple de rigueur

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury :

Pr. BELATTAR Noureddine et **MCS. SIDANI Said**

Pour l'intérêt qu'ils nous ont porté en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous tenons à exprimer notre sincère gratitude et notre respect à tous les enseignants du programme de master pour l'année académique 2023-2024. Leur présence ici témoigne de notre sincère reconnaissance de leurs contributions extrêmement précieuses.

Nos remerciements aussi pour les membres du laboratoire et toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

Je dédie ce travail à

Mes très chers parents « Rachid et Kamire », je tiens à vous remercier pour vos sacrifices en ce qui concerne mon éducation et ma réussite. Je ne peux exprimer avec des mots à quel point je vous suis reconnaissant. Vous avez été un pilier solide dans ma vie en me fournissant un soutien moral et matériel, en me motivant à poursuivre mes études et en me permettant de réaliser mes rêves. Que Dieu vous protège.

À mes frères bien-aimés : AbdIlah et Mohammed Al-Amine,

A mes adorables sœurs : Fatiha, Nour AL-Imane,

Merci à mes meilleurs amis : Amel, basma, Djihane,Rania .

Pour ses soutiens et leurs conseils précieux tout au long de mes études, Pour tout ce que vous m'avez donné jusqu'à présent.

Je termine avec le personne qui a partagé tout le travail et supporté en période de stress, mon binôme et meilleure amie Aya.

Kaouther ……

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

A mes parents qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout le Long de mes études :

A mon très cher père « abd Rahman »Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A ma très chère mère « Souad» : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.je vous souhaites toutes les bonnes choses du monde ; la bonheur la santé et une longue vie

A Mon âme-Cœur mon mari Ammar qui m'a soutenu est toujours présent à mes côtés à toutes mes entreprises Je lui souhaite le bonheur du monde

Tous mes enseignants surtout Dr Aggoun Loubna pour encadrement à mes Grands-mères « kaltoum , Fifi », grands-pères « Sassi , Lakhder ».

Egalement A mes tantes «Samra , Ratiba, Houria ,Sounai ,Mouna,Nadhira »

ET Toute ma famille sons exception.

À mes sœurs qui ne sont pas nées de ma mère « Rima , SOUMAI , KHAOULA »

A mon binôme et mon sœur kaouther et sa famille

A mes chères amies « Basma , Amal »

Toute la promotion de biochimie 2023-2024

et toute personne m'ayant aidé ou soutenue.

الملخص

تيليا كورداتا غرينسبير *Tilia cordata Greenspire*، المعروفة محلياً باسم الزيزفون الحلبي ، هي نبتة تستخدم لتزيين المناطق الحضرية من ناحية، وتستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي من ناحية أخرى. كان الهدف من هذه الدراسة هو تقييم الأنشطة المضادة للأكسدة والمضادة للتخثر للمستخلصات المتعددة الفينول التي تم الحصول عليها عن طريق نقع المسحوق المنقوع من الجزء الهوائي من شجرة الليمون (الأوراق والثمار) في الماء المقطر وحده وفي مخاليط هيدروكحولية (الميثانول والإيثانول بنسبة 80% : 20% و50% : 50%). كان إجمالي محتويات البوليفينول والفلافونويد في المستخلصات المختلفة التي تم قياسها بواسطة طريقتى الفولين-سياكولتيو وثلاثي كلوريد الألومنيوم الملون > 53.33 ± 0.0024 ميكروغرام مكافئ غازي/غرام و> 21.4 ± 0.00 ميكروغرام مكافئ/غرام من المستخلص الجاف على التوالي. يبدو أن الجزء الجوي من تيليا غني بالبوليفينول والفلافونويدات. بالإضافة إلى ذلك، تشير نتائج الفحص الكيميائي النباتي إلى وجود الأنثوسيانين، والعفص، والكومارين، والسكريات المختزلة. أظهر تقييم قوة مضادات الأكسدة عن طريق اختبارات DPPH والفينانثرولين أن المستخلصات البوليفينولية تعتبر من مضادات الأكسدة الطبيعية القوية مع انخفاض IC50 و A0.5 على التوالي. وباستثناء المستخلص المائي، أظهرت المستخلصات المائية الكحولية تأثيراً مضاداً للتخثر كبير جداً يعتمد على الجرعة (تمديد زمن تخثر الدم).

الكلمات المفتاحية : تيليا كورداتا جرينسبير؛ البوليفينول. الفلافونويدات. النشاط المضاد للأكسدة؛ نشاط مضاد للتخثر.

Summary

Tilia cordata Greenspire, known locally as zaizafoune d'Alep, is a plant used to decorate urban areas on the one hand, and widely used in traditional medicine on the other hand. The aim of the present study was to evaluate the antioxidant and anticoagulant activities of polyphenolic extracts obtained by maceration of the delipidated powder of the aerial part of the lime tree (leaves and fruit) in distilled water alone and in hydroalcoholic mixtures (methanol and ethanol at 80% : 20% and at 50% : 50%). The total polyphenol and flavonoid contents in the various extracts measured by the folin-ciacolteu and aluminium trichloride colorimetric methods were > 53.33 ± 0.0024 µg GAE/g of dry extract and > 21.4 ± 0.00 µg eq/mg, respectively. It appears that the aerial part of Tilia is rich in polyphenols and flavonoids. In addition, the phytochemical screening results indicate the presence of anthocyanins, tannins, coumarins and reducing sugars. Evaluation of antioxidant power by DPPH and phenanthroline tests showed that polyphenolic extracts are considered powerful natural antioxidants with low IC50 and A0.5 respectively. With the exception of the aqueous extract, the hydroalcoholic extracts showed a very significant anticoagulant effect which is dose-dependent (extension of blood clotting time).

Key words: *Tilia cordata greenspire*; Polyphenols; Flavonoids; Antioxidant activities; Anticoagulant activity.

Résumé

Tilia cordata Greenspire, connue localement sous le nom de zaizafoune d'Alep, est une plante utilisée pour décorer les zones urbaines d'un côté, et largement utilisée en médecine traditionnelle d'autre côté. La présente étude vise à évaluer les activités antioxydantes et anticoagulantes des extraits polyphénoliques obtenus par macération de la poudre délipidée de la partie aérienne de tilleul (feuilles et fruits) dans de l'eau distillée seule et dans les mélanges hydro-alcooliques (méthanol et éthanol à 80 %: 20% et à 50 %: 50%). Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux dans les différents extraits mesurées par les méthodes colorimétriques de folin-ciacolteu et de trichlorure d'aluminium sont > 53,33 ± 0,0024 µg GAE/g d'extrait sec et > 21,4 ± 0,00 µg eq/mg, respectivement. Il apparaît que la partie aérienne de Tillia est riche en polyphénols et en flavonoïdes. En plus, les résultats du criblage phytochimique indiquent la présence d'anthocyanes, de tanins, de coumarine, de sucre réducteur. L'évaluation du pouvoir antioxydant par les tests DPPH et phénanthroline a montré que les extraits polyphénoliques sont des antioxydants naturels puissants avec des valeurs IC_{50} et $A_{0,5}$ faibles qui varient en fonction du type d'extrait, respectivement. Tous les extraits aqueux alcooliques se sont révélés posséder une forte activité anticoagulante dose-dépendante (prolongation du temps de coagulation du sang), à l'exception de l'extrait aqueux.

Mots clés : *Tilia cordata greenspire* ; Polyphénols ; Flavonoïdes ; Activités antioxydants ; Activité anticoagulante.

Liste des abréviations

$A_{0,5}$: absorbance 0,5

BHT: Butyle Hydroxy Toluène

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EAG: équivalent d'acide gallique

ER : équivalent de rutine

IC_{50} : concentration inhibitrice de 50 %

ROS: espèce réactive de l'oxygène

Liste des figures

Figure 01 : Voies de biosynthèse des différentes classes de composés phénoliques…. ….p05
Figure 02 : Effets biologiques des polyphénols……p07
Figure 03 : Stress oxydant…….p09
Figure 04 : Structure d'un radical libre…….p10
Figure 05 : Représentation de l'hémostase primaire…….p14
Figure 06 :les voies de la coagulation……p16
Figure 07 : Le déroulement des étapes de la fibrinolyse…….…… p17
Figure 08 : Plaques d'athérome…… p18
Figure 09 : Formation d'une phlébite au niveau des veines de jambe…….…… .p19
Figure 10 :*Tilia cordata greenspire*……..……p21
Figure 11 : Carte de distribution naturelle du *Tilia cordata*……..……..p22
Figure 12 : La partie aérienne (feuilles et fruits) de *Tilia cordata Greenspire*……. …… p25
Figure 13 : Extraction des huiles fixes par Soxhlet et évaporation sous vide par rotavapor …… …….. .. p26
Figure 14 : Structure du DPPH et mécanisme de sa réduction par un antioxydant……...p29
Figure 15 : Evaluation de l'activité anticoagulante……...p30
Figure 16 : Rendement d'extraction obtenue à partir de la partie aérienne du tilleul……p31
Figure 17 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique…….p33
Figure 18: La teneur en polyphénols totaux des extraits ……..p34
Figure 19 : Courbe d'étalonnage de la rutine…….p34
Figure 20: La teneur en flavonoïdes totaux des extraits……p35

Liste des tableaux

Tableau 01 : Principales classes des composés phénoliques……p06
Tableau 02 : Activités biologiques de quelques composés phénoliques…….. p08
Tableau 03 : Les espèces réactives de l'oxygène……..p10
Tableau 04 : Facteurs de coagulation et leurs fonctions …… ….p15
Tableau 05 : Composition phytochimiques de *Tilia cordata* …….……..p24
Tableau 06 : Appareils et équipements……..p24
Tableau 07: Composition phytochimiques de la partie aérienne du *Tilia cordatta*….. p32
Tableau 08 : Concentration inhibitrice des extraits de *Tilia cordata greenspire* obtenues avec le test DPPH ……...p36
Tableau 09 : Concentration inhibitrice des extraits de *Tilia cordata greenspire* obtenues avec le test de phenantrolin……..p36
Tableau 10 : Activité anticoagulante des extraits de *Tilia cordata greenspire* évalué par le test de clotting time ……..……..p38

Table des matières

الملخص

Sammary

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction....1

I Phytochimie....3

I.1 Substances naturelles issues des végétaux....3

1.1.1Métabolites primaires....3

1.1.2. Métabolites secondaires....3

II.2. Localisation des composés phénoliques....4

II.3. Biosynthèse des composés phénoliques....4

II.3.1 Voie de l'acide shikimique....4

II.3.2. Voie de l'acétate....4

II.4 Classification des composés phénoliques....5

II.5 Rôles des composés phénoliques chez l'homme....7

III. Stress oxydatif....9

III.1 Définition....9

III.2 Radicaux libres....10

III.2.1 Classification des radicaux libres....10

III.2.2 Cibles biologiques des espèces réactives de l'oxygène....11

- Acide désoxyribonucléique ADN....11
- Proteins....11
- Lipides membranaires....11
- Lipoprotéines....11

III.2 Défenses antioxydants....12

IV. Hémostase....12

IV.1 Physiologie de l'hémostase....12

IV.1.1 Hémostase primaire....12

IV.1.2 Hémostase secondaire....14

IV.1.3 Fibrinolyse....17

IV.2 Maladies thrombotiques....17

IV.2.1 Thromboses artérielles....17

2.1. Thromboses veineuses.....18
3. Traitement des maladies thrombotiques.....19
V. Tilleul.....20
V. 1. Historique.....20
V. 2. Taxonomie.....20
V. 3 Description botanique.....21
V. 4 Répartition géographique du tilleul.....21
V. 3 Composition phytochimiques du tilleul.....22
V. 4 Utilisation traditionnel du *Tillia cordata Greenspire*.....23
I. Matériel.....24
1.1 Réactifs chimiques.....24
I.2 Appareils et équipements.....24
I.3 Matériel végétal.....25
II. Méthodes.....25
II.1 Extraction des composés phénoliques.....25
II. 2 Screening phytochimiques.....26
II.3 Dosage des polyphénols totaux.....27
II.4 Dosage des flavonoïdes totaux.....28
II.5 Évaluation de l'activité antioxydante.....28
II.6 Évaluation de l'activité anticoagulante (Effet sur le temps de coagulation).....30
I. Rendement d'extraction et criblage phytochimiques.....31
II. Quantification des polyphénols et des flavonoïdes totaux.....32
III. Activités antioxydants des extraits polyphénoliques.....35
IV. Activité anticoagulante des extraits polyphénoliques.....37
Conclusion..... 38

Introduction

Introduction

Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que les plantes médicinales représentent la base de leur médecine traditionnelle vis-à-vis de plusieurs pathologies liées aux troubles digestifs, les affections respiratoires, les infections urinaires, etc. Parmi ces plantes : *Tilia cordata greenspire* ou le tilleul à petit feuilles connue localement sous le nom de zaizafoune d'Alep, qui est une plante appartenant à la famille des Tiliaceae (Fawzy et al., 2018), qui sont traditionnellement utilisées comme tisane pour soulager les symptômes du catarrhe, de la toux et du rhume (Nakajima et al .,2006) utilisée pour décorer les zones urbaines d'un côté, et elle est largement utilisée en médecine traditionnelled'un autre côté. Récemment, ces propriétés thérapeutiquesont attiré l'attention de nombreuses scientistesqu'ilsont trouvés que ces bénéfiques sont attribuésàl'abondancede cette espèce en composés actifs appelés également les métabolites secondaires (Gurib-Fakim.2006). Parmi ces métabolites : lespolyphénols, les huiles essentielles quisont doués de nombreuses propriétés pharmacologiques particulièrement leurpuissance antioxydante qui aaussi attiré l'attention de nombreux chercheurs dans le cadre de la recherche d'antioxydants naturels utilisés dans divers domaines notamment dans les industries alimentaires et cosmétique.

L'effet de ces métabolites a été observé contre les différentes pathologies liées au stress oxydatif tel que les maladies thrombotiques et cardiovasculaires, le cancer, l'inflammation, et les maladies neurodégénérative .Pour cela, plusieurs études sont focalisées sur la recherche des anticoagulants naturels à base de plantes médicales pour traiter ces pathologies. Selon Fawzy et al. (2018), les résultats obtenu études montrent que la partie aérienne de cette plante est riches en flavonoïdes, phénols, tanins, et les huiles essentielles poser également de nombreux effets pharmacologiques y compris l'antioxydant, l'antimicrobiennes, l'anti inflammatoire, etc. Selon la British Herbal Pharmacopeia (2012), la fleur de *Tilia cordata* est dans le traitement de l'hypertension induite par le stress nerveux et l'artériosclérose.

La présente étude vise à évaluer les activités antioxydants et anticoagulantes des extraits polyphénoliques obtenu par macération du poudre délipidé de la partie aérienne de tilleul (feuilles et fruits) dans l'eau distillé seul et dans les mélanges hydroalcooliques (méthanol et éthanol à 80% : 20% et à 50% : 50%).

Notre recherche est divisée en trois sections :

- La première section est une synthèse bibliographique qui comprend des informations générales sur la plante, un profil de ses métabolites secondaires et quelques données sur ses propriétés anticoagulantes et antioxydantes.
- Le matériel et les méthodes utilisés pour l'extraction, le dosage colorimétrique des polyphénols et des flavonoïdes, le criblage phytochimique et les activités antioxydantes et anticoagulante sont résumés dans la deuxième section.
- La troisième section présentera les différents résultats qui seront obtenus ainsi que leurs discussions, et une conclusion générale avec certaines perspectives.

Synthèse bibliographique

I Phytochimie

La phytochimiedérivé de la chimie avec le préfix Phytos « plante », est la science qui étudie la structure, le métabolisme et la fonction des substances naturelles issues des végétaux, ainsi que les méthodes d'analyses, de purification et d'extraction appliquées à ces substances. Elle est indissociable d'autres science multidisciplinaire essentiellement la pharmacognosie (du grec : *pharmacon* signifiant drogue, et *gnôsis* signifiant connaissance) (Jean ,2009).

I.1 Substances naturelles issues des végétaux

Les substances naturelles est toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales. Ces substances sont issues du métabolisme des végétaux d'où son nom les métabolites. Elles sont distinguées en deux classes : métabolites primaires et métabolites secondaires) (Jean ,2009).

1.1.1Métabolites primaires

Ces molécules sont caractérisées par leur caractère nécessaire et vital à la survie de la cellule ou de l'organisme : Les glucides représentent une source d'énergie surtout au niveau des parois cellulaires (cellulose), les lipides constituent aussi une source d'énergie présente dans les membranes cellulaires, et les amino-acides représentent une source primaire de construction des protéines)(Jean ,2009).

1.1.2. Métabolites secondaires

Ce sont des molécules produites par les plantes supérieures à côté des métabolites primaires et qui ne sont pas, par définition, nécessaires et vitaux pour la cellule ou l'organisme. Ces molécules à structure chimique souvent complexe appartiennent àdes groupes chimiques variées (les composés phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les saponosides, les huiles essentielles, les alcaloïdes, etc), qui ont des intérêts multiples mis à profit dans les industries agro-alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques(Jean ,2009).

II. Composés phénoliques

II.1Généralités

Les composés phénoliques ou les polyphénols désigne toute substance hydrosoluble synthétisé par les plantes supérieures et définie dans leur structure par la présence d'un ou plusieurs cycles aromatiques à 6C portant un ou plusieurs groupes hydroxyle respectivement. Ces molécules ayant un poids moléculaire varie entre 500 et 3000 daltons. Ces métabolites secondaires forment le groupe des composés phytochimiques le plus diversifié (plus de 8000

molécules) et le plus spécifique avec des activités biologiques et pharmacologiques bénéfiques sur la santé humaine (Beta et al., 2005).

II.2. Localisation des composés phénoliques

A l'échelle de la cellule, les composés phénoliques sont principalement répartis dans deux compartiments : les vacuoles et la paroi. Dans les vacuoles, les polyphénols sont conjugués avec des sucres ou des acides organiques ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité pour la cellule. Au niveau de la paroi, on trouve surtout de la lignine et des flavonoïdes liés aux structures pariétales. Les composés phénoliques sont synthétisés dans le cytosol. Une partie des enzymes impliquées dans la biosynthèse des phényl-propanoïdes est liée aux membranes du réticulum endoplasmique où elles sont organisées en métabolons. D'autres organites du cytoplasme, comme des vésicules golgiennes ou des chloroplastes, peuvent participer à la biosynthèse des composés phénoliques mais ce ne sont pas des lieux d'accumulation (Macheix et al, 2005).

Au sein des même feuilles, la répartition des composés est variable, par exemple les anthocyanes et les flavonoïdes sont majoritairement présents dans l'épiderme.

II.3. Biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont issus de deux voies d'aromagenèse (Fig.1):

II.3.1 Voie de l'acide shikimique

Les deux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont à l'origine de la formation de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux (Fig.1). Ils sont formés, à partir de sucres simples dont l'érythrose 4-phosphate (issus du métabolisme primaire lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphate), par la voie connue de l'acide shikimique, conduisant à la formation de phénylalanine et de tyrosine qui, par désamination, donnent le précurseur immédiat des phénols, l'acide cinnamique (Jean, 2009). L'acide cinnamique est rapidement transformé en acide p-coumarique par l'addition d'un radical hydroxyle, et est à l'origine de la formation de très nombreux dérivés : acides hydroxybenzoiques, flavonoides, coumarines, lignanes, et lignines, etc. La tyrosine est également désaminée en acide p-coumarique (Hopkins, 1995).

II.3.2. Voie de l'acétate

C'est une voie à part de l'acétate qui conduit à des poly-B-cétoesters de longueur variable. Les polyacétates qui engendrent, par cyclisation, des composés souvent polycycliques : chromones, isocoumarines, xanthones, quinones… etc. La pluralité structurale des composés phénolique est due à cette double origine biosythétique est encore accrue par la possibilité très fréquente, d'une participation simultanée du shikimate et de l'accétate à

l'élaboration de composés d'origine mixte (flavonoïdes Iato sensu, stilbène, pyrones…etc) (Bruneton, 1999).

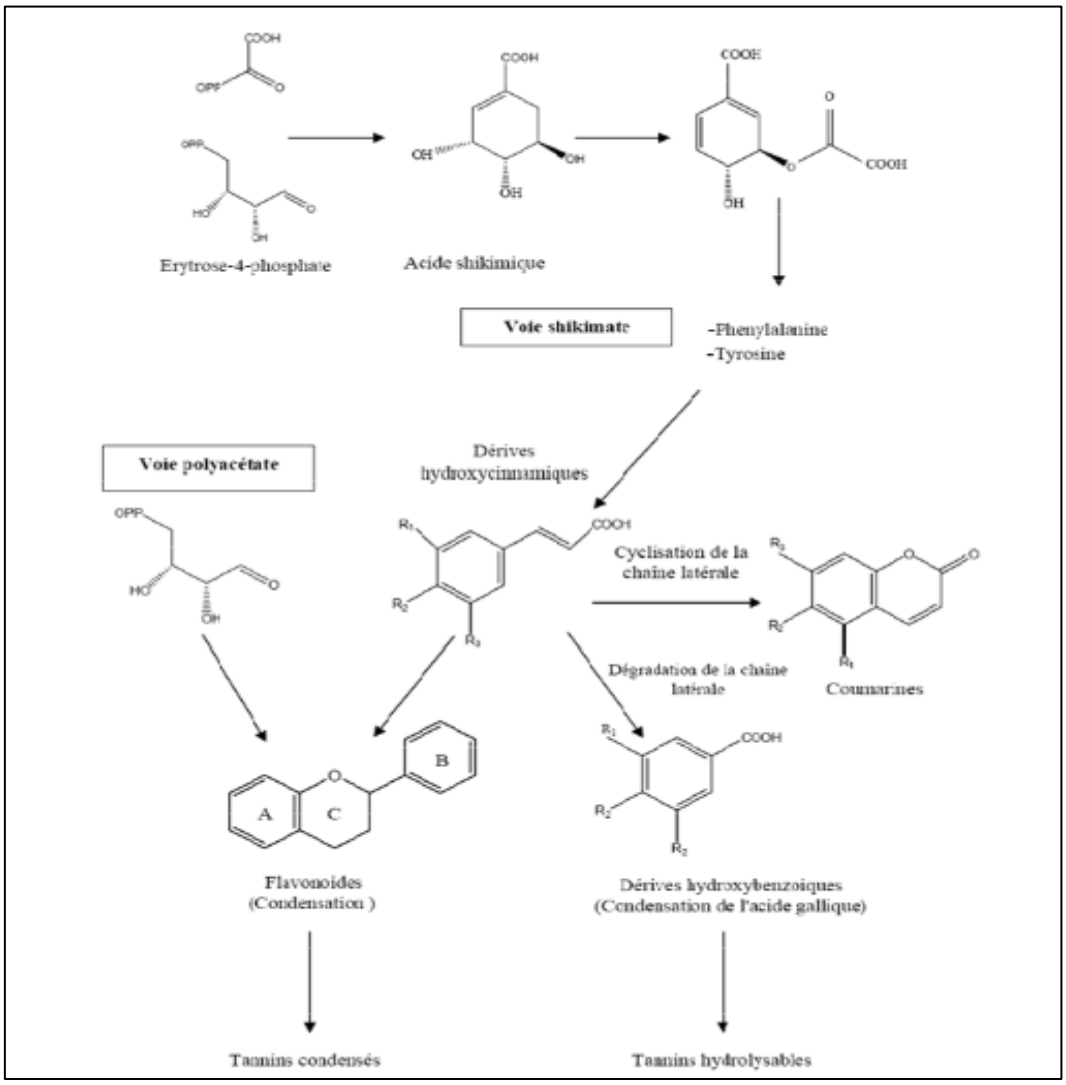
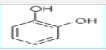
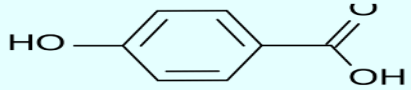
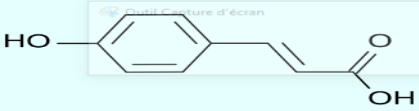
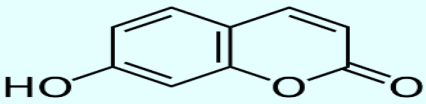
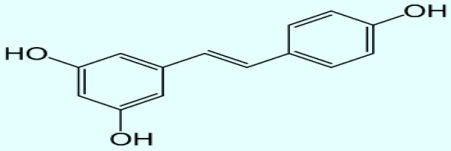
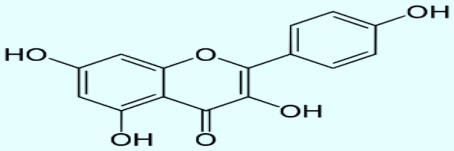
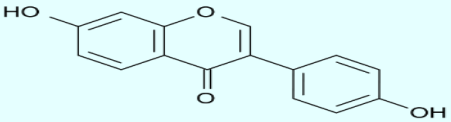
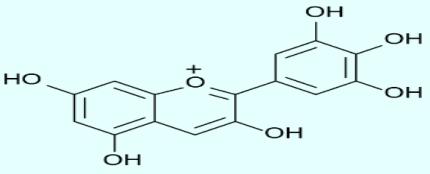
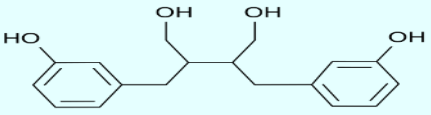
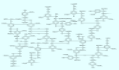


Figure 1 : Voies de biosynthèse des différentes classes de composés phénoliques (Boukerouis, 2008).

II.4 Classification des composés phénoliques

La structure des composés phénoliques va du simple noyau aromatique de faible poids moléculaire aux tanins complexes de très haut poids moléculaire. Ils peuvent être classés en fonction du nombre et de la disposition des atomes de carbone et les groupement OH dans chaque composant, de la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique, du degré de modification de ce squelette de base et des interactions potentielles entre ces molécules et d'autres molécules telles que les oses ou les acides organiques. Selon Hennebelle-crozier*et al.*, (2006), les principales classes de composés phénoliques sont représentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1: Principales classes des composés phénoliques

Squelette carboné	Classe	Exemple	Formule	Origine
C6	Phénols simples	catéchol		Busserole
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	acide p-hydroxybenzoïque		Epices, fraises
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques	acide p-coumarique		Tomates, ail
	Coumarines	Ombelliférone		Carottes, coriandre
C6-C4	Naphtoquinones	juglon		Noix
C6-C2-C6	Stilbénoïdes	trans-resvératrol		Raisin
	Flavonoïdes	Kaempférol		Fraises
C6-C3-C6	Isoflavonoïdes	Daidzéine		Graines de soja
	Anthocyanes	Delphinidol		Raisin Cabernet-Sauvignon
(C6-C3)	Lignanes	Entérodiol		Bactéries intestinales
(C6-C3)	Lignines			Bois, fruits à noyaux
(C6-C3-C6)	Tanins condensés	Procyanidol		Raisins, kaki

II.5 Rôles des composés phénoliques chez l'homme

Chaque jour, l'homme ingère avec ses nourritures (les fruits et les légumes) environ un gramme de polyphénols, soit dix fois plus que de vitamine C et 100 fois plus que de caroténoïdes ou vitamine E (Chun et al., 2007). Le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes, de leurs haute puissance antiradicalaire, liés aux nombreuses propriétés biologiques y compris : les activités antitumorale, antiinflammatoire, analgésique, antiallergique, antithrombotiques, antimicrobienne, et hépato protectrice (Fig.2) (Macheix et al 2005). Ils sont également connus pour moduler l'activité de plusieurs enzymes ou de récepteurs cellulaires. Par conséquent, ces rôles suscite de plus en plus d'intérêt la consommation des aliments riches en polyphénols pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, des maladies cardiovasculaires et neurodégénératives. En outre, les composés phénoliques favorisent la relaxation vasculaire et empêchent l'agrégation des plaquettes sanguines. Par conséquent, ils réduisent la coagulation du sang et le rendent plus fluide. En plus, ils empêchent la peroxydation des lipides circulants et membranaires et contribuent par conséquent à la lutte contre les plaques d'athérome. Ils sont aussi anxiolytiques et protèges nos artères contre l'athérosclérose et réduit le risque des thrombose (Allemand et al., 2005).

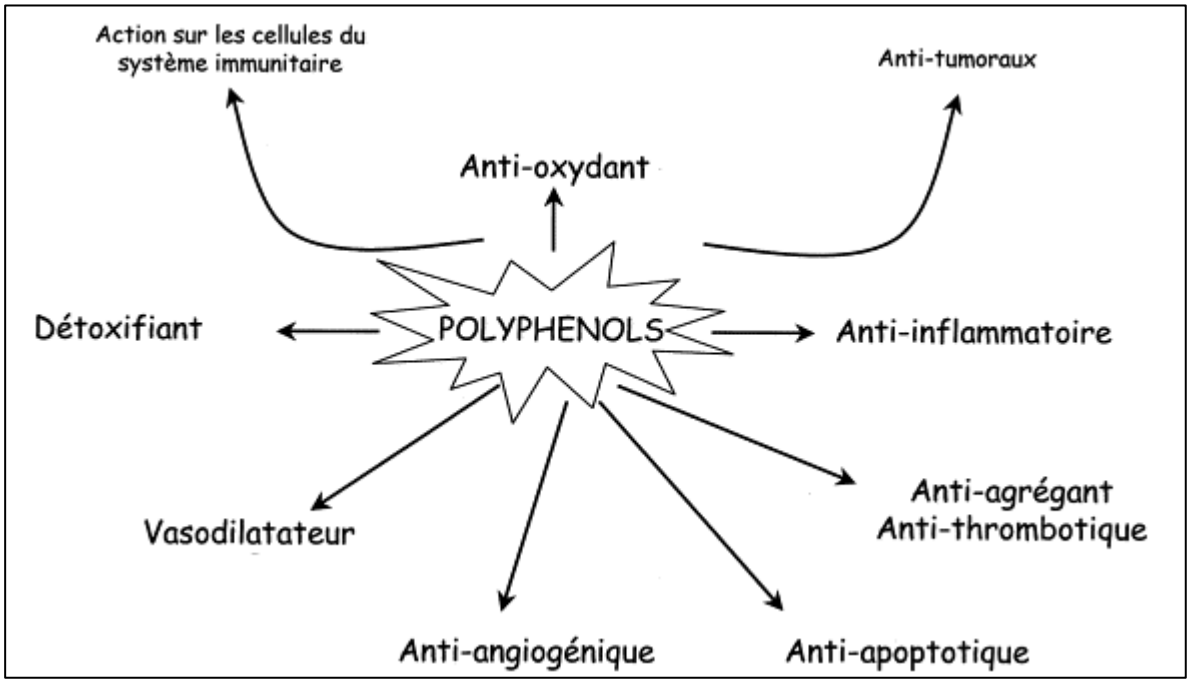


Figure 2: Effets biologiques des polyphénols ((Macheix et al 2005).).

Chaque classe chimique de polyphénols semble être utilisée pour ses vertus spécifiques (Tableau 2).

Tableau 2: Activités biologiques de quelques composés phénoliques (Hennebelle, 2006).

Composés phénoliques		Activité biologique
Ac. Phénols	- Ac. caféique - Ac. salicylique	- Antibactérienne - Antifongique - Antioxydante
Tanins	- Tanin gallique - Proanthocyanidine	- Effet stabilisant sur le collagène - Antioxydant - Antidiarrheique - Antiseptique - Vasoconstricteur
Flavonoïdes	- Lutéoléine - Catéchine - Hespéridine - Quercetine - Naringénine	- Antitumorale - Anticarcinogène - Anti -inflammatoire - Antioxydante, antiallergique, antiulcéreuse - Antivirale, antimicrobienne, hypotenseur - Diurétique
Coumarines	- Dicoumarol	- Anticoagulant, antioxydant - Protectrice vasculaire - Antioedémateuse

Ces composées peuvent en effet intervenir :

- Comme une source potentielle d'antioxydants naturels et qui peuvent être utilisés dans l'industrie pharmaceutique. Dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions avec leur environnement biologique et physique (microorganismes symbiotiques ou parasites, les champignons, les insectes), résistance aux UV, ce qui explique leur localisation dans les tissus externes (Gould *et al.*, 2006), soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux ;
- Un rôle de signal, des flavonoïdes permet la mise en place de la symbiose entre des Fabacées et des bactéries, ce qui permet à ces plantes de fixer directement l'azote atmosphérique (Treutter, 2006). Ils participent aux phénomènes de pollinisation puisqu'ils sont responsables de la coloration des fleurs (Macheix *et al*., 2005).
- Dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles…) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, etc.) et des produits qui en dérivent par

transformation ; peuvent contenir des traces d'éléments vitaux tels que le sélénium, le fer, le zinc, la vitamine C, la β-carotène et une grande partie d'acides aminés (Polzonetti*et al*., 2003) ;

- Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes dans la santé et la beauté de la peau (Hennebelle*et al*., 2004).

III. Stress oxydatif

III.1 Définition

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre les défenses antioxydant de l'organismeet la génération des radicaux libres liés aux plusieurs facteurs tel que le tabac, l'alcool, l'obésité, l'exercice physique intense, les rayons UV, déficience dans le système antioxydantsendogène, et aux mauvaises habitudes alimentaires, etc.(Hussein et al, 20011) (Fig.3). A long terme, cedéséquilibre pro-oxydant/antioxydant au sein d'un même organisme peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies (cancer, maladies cardiovasculaires et inflammatoires, etc.) liées aux dommages au niveau des macromolécules tel que la peroxydation lipidique, les mutations au niveau des acides nucléiques, etc. (Lugemwa et al ., 20011),(Pogacnik et al .,2013), Dans un souci de prévention et de traitement, il faut optimaliser nos défenses antioxydants (Benslama, 2020).

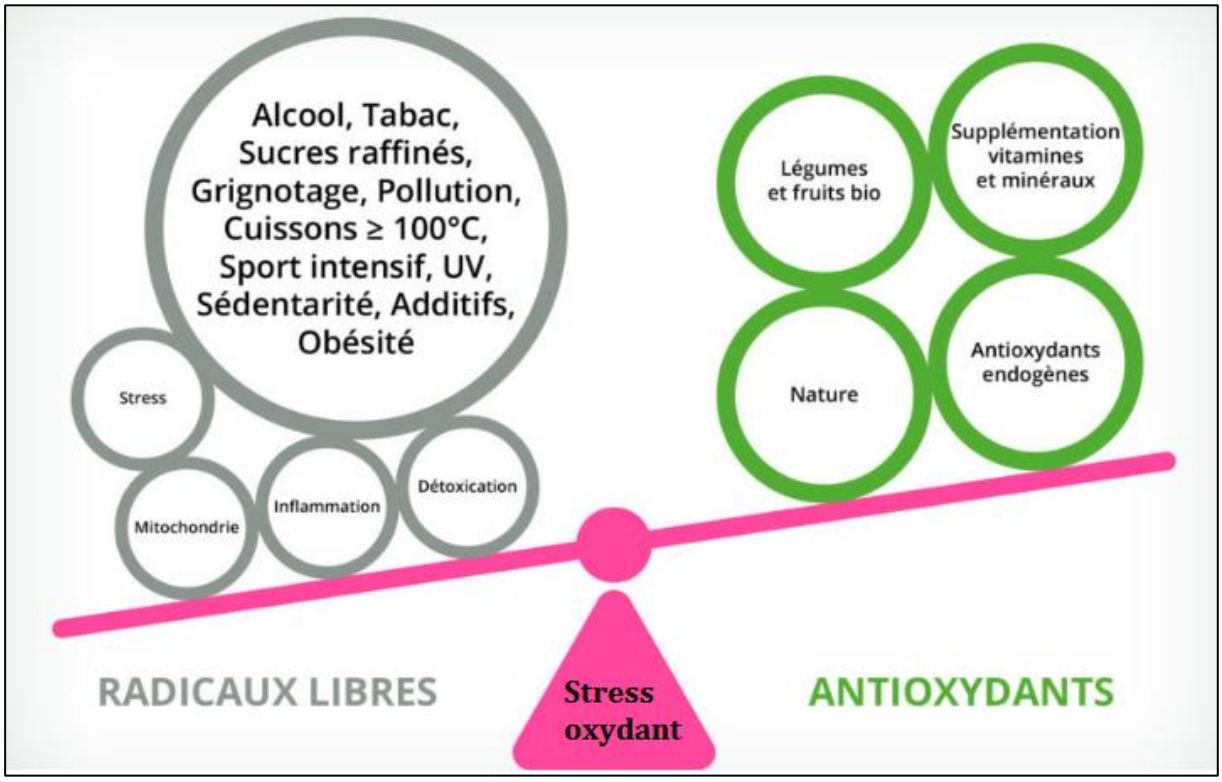


Figure 03 : Stress oxydant (Berdoulat., 2020).

III.2 Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique contenant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe (Fig.4). Cela lui rend très réactif et extrêmement instable qui a toujours tendance à remplir son orbitale pour devenir stable, il va donc se réduire en oxydant un autre composé (Goudable et Favier, 1997) qui va se trouver déstabilisée à son tour (Berdoulat., 2020).

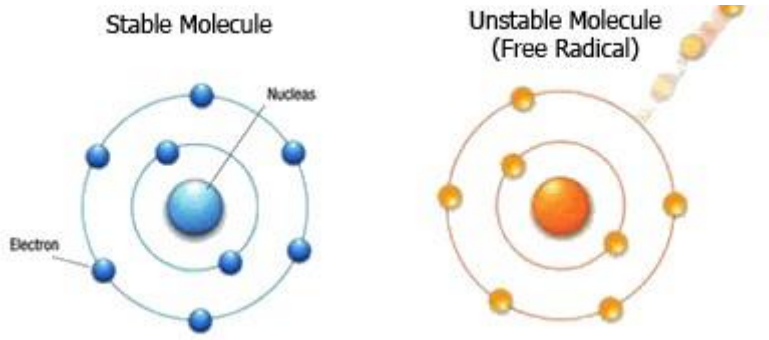


Figure 4 : Structure d'un radical libre(par Berdoulat., 2020).

III.2.1 Classification des radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être dérivées de l'oxygène (ROS), de la réduction ou de l'oxydation des composés azotés (RNS) et de la conversion redox de composés contenant du soufre (RSS) (Bourgonje*et al.*2020). Les ROS ont longtemps été considérées comme des sous-produits toxiques du métabolisme normal de l'oxygène, composant nécessaire à la vie, et peut avoir des effets néfastes sur l'organisme impliquées dans de nombreuses pathologies dont le stress oxydatif (Hamma, 2019), Ces ROS sont classés en :

Tableau3 : Les espèces réactives de l'oxygène

Espèces Réactives de l'Oxygène		Réaction
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$	$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot-}$ (réaction de Fenton)
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	$O_2^{\cdot-} + e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$ (réaction d'Haber Weiss)
Radical hydroxyle	$HO^{\cdot}$	$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^{\cdot} + HO^- + Fe^{3+}$ (1) $H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \longrightarrow O_2 + HO^{\cdot} + HO^-$ (2) $H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2\,H_2O + O_2$ $H_2O_2 + 2\,GSH \longrightarrow 2\,H_2O + GSSG$
Radical Peroxyle	$RO_2^{\cdot}$	$R^{\cdot} + O_2 \longrightarrow RO_2^{\cdot}$
Hydroperoxyde	RO_2H	$RO_2^{\cdot} + RH \longrightarrow RO_2H + R^{\cdot}$

O_2 : oxygène ; e^- : électron ; H^+ : ion hydrogène ; Fe^{2+} : ions ferreux, Fe^{3+} : ions ferriques, GSH : glutathion réduit ; GSSG : Glutathion oxydé ; HO^- : anion hydroxyde.

III.2.2 Cibles biologiques des espèces réactives de l'oxygène

- **Acide désoxyribonucléique ADN**

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

- **Proteins**

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

- **Lipides membranaires**

Le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras poly-insaturés (AGPI) : c'est la phase d'initiation. Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygènepour former un radical peroxyle (ROO•), suffisamment réactif pour arracher un H^+à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction (Atkin et al ., 2005)Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. Les peroxydes générés seront neutralisés par la glutathion peroxydase ou continueront à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes (malondialdéhyde, 4-hydroxynonénal) dont les activités pro-athérogènes sont bien connues.

- **Lipoprotéines**

L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de LDL oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. L'activité de ces récepteurs n'étant pas régulée par la concentration intracellulaire en cholestérol, les macrophages se transforment petit à petit en cellules spumeuses (rôle important dans les

premières étapes de l'athérosclérose)(Nakajima et al .,2006). En outre, ces LDL oxydées sont immunogènes et les immuns complexes formés peuvent activer la voie classique du complément et générer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (Saad et al.,2006).

III.2 Défenses antioxydants

Pour se protéger des effets délétères des ROS, l'organisme dispose d'un ensemble de systèmes de défense appelé les antioxydants. On distingue deux sources d'antioxydants. L'une est apportée par l'alimentationsousforme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, etc.), de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases, et de quelques oligo-éléments comme le sélénium, le cuivre, et le zinc, qui sont des cofacteurs de ces enzymes antioxydants. Les polyphénols constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux. L'alimentation fournit environ 1 g de polyphénols par jour, principalement par l'apport en fruits et, dans une moindre mesure, en légumes et en céréales. Ils sont présents sous forme d'anthocyanine dans les fruits rouges, sous forme de flavonoïdes dans les agrumes, l'huile de lin et sous forme d'épicatéchine dans le thé, le chocolat, les pommes, les oignons et les algues brunes. Globalement, ce sont d'excellents piégeurs des ROS et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre.

IV. Hémostase

L'hémostase, définie comme l'arrêt d'un saignement, vient du grec, « haeme signifiant sang » et « stasis signifiant arrêter » (Meyer et al., 2008).

IV.1 Physiologie de l'hémostase

L'hémostase est un processus physiologique qui est déclenché par une brèche vasculaire. Il vise à son obturation et au colmatage de la fuite sanguine du vaisseau endommagé par deux étapes distinctes mais intriquées et dépendantes l'une de l'autre : l'hémostase primaire et l'hémostase secondaire (De Revel et Doghmi., 2004), jusqu'aux leurs ré-perméabilisation ultérieure par fibrinolyse.

IV.1.1 Hémostase primaire

L'hémostase primaire est le mécanisme d'urgence mettant en jeu les plaquettes sanguines circulantes qui adhèrent à l'endothélium pour former le thrombus blanc ou clou plaquettaire en une durée de 3 à 5 min. En général, les plaquettes, le facteur de von

Willebrand et le vaisseau blessé sont les principaux acteurs intervenant dans l'hémostase primaire (Fig.5). Ce dernier est conçu en deux phases complémentaires :

a) **Phase vasculaire :** dès qu'il y a une brèche vasculaire, la première réaction de l'organisme est une vasoconstriction localisée qui peut soit arrêter leshémorragies soit au moins réduire le flux sanguin.

b) **Phase plaquettaire :** elle se déroule en trois étapes :

- **L'adhésion plaquettaire :**c'est un phénomène passif qui s'effectuevia des interactions spécifiques entre les récepteurs des plaquettes et leurs ligands au niveau du sous-endothélium(Pench,2015). L'interaction se fait essentiellement par l'intermédiaire des glycoprotéines GPIb-IX-V qui se lient au facteur Von Willebrand présent au niveau du sous endothélium et la GPIa-IIa qui se fixe au collagène également présent au niveau du vaisseau lésé (Boujaada, 2019).
- **L'activation plaquettaire :** lorsque les plaquettes adhèrent au sous-endothélium du vaisseau lésé, cela entraîne leur activation, qui se manifeste par la libération des contenus des granules, y compris l'ADP (Adénosine di-phosphate), dans la circulation sanguine(Martin, 2016). Cela favorise et stabilise l'agrégation des plaquettes, ce qui entraîne la formation du clou plaquettaire. Ces réactions donnent également aux plaquettes activées la possibilité d'exposer des phospholipides (PL) à leur surface, ce qui contribuera à la prochaine étape : la coagulation.
- **L'agrégation plaquettaire :**l'adhérence des plaquettes au sous-endothélium par le VWF permet à la GP IIb-IIIa de fixer le fibrinogène soluble en présence du calcium, ce qui crée des ponts entre les plaquettes activées (agrégation) (Perin, 2015; Boujaada, 2019). Le VWF a aussi la capacité de créer un lien entre deux molécules de GP IIb-IIIa. Selon (Geurbaz ,2017), cet agrégat qui permet de refermer la brèche vasculaire est désigné sous le nom de "thrombus blanc" ou "clou plaquettaire".

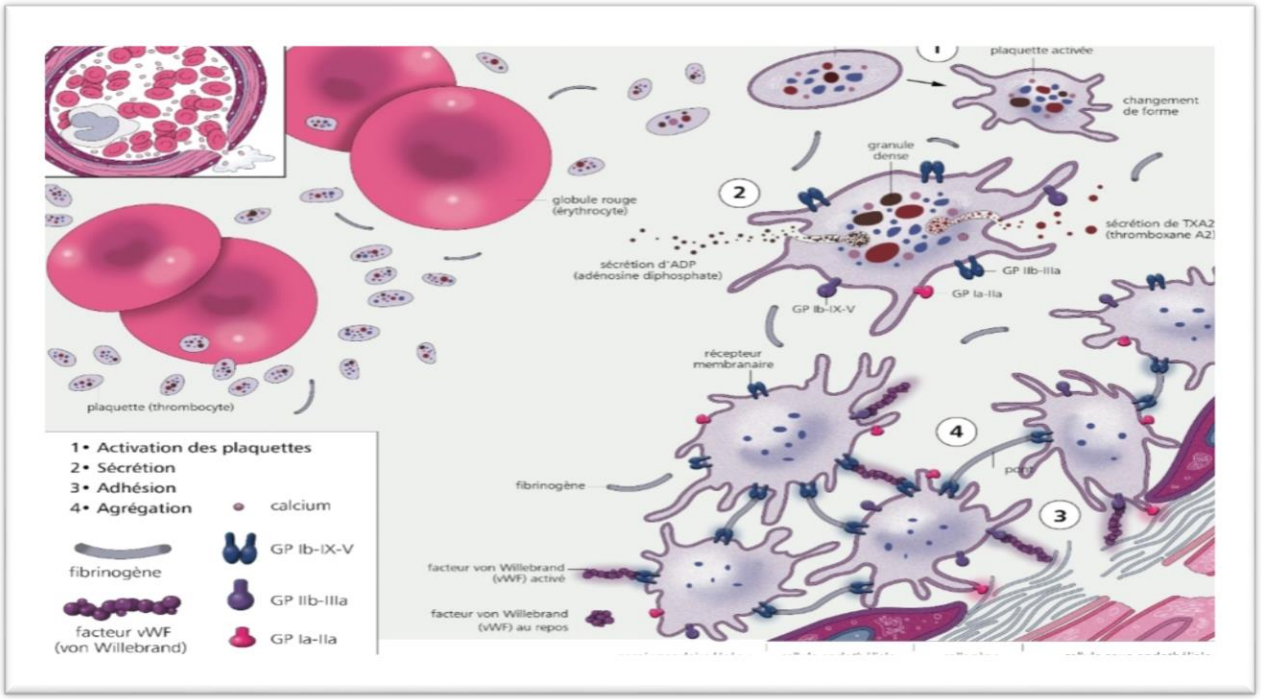


Figure 5 : Représentation de l'hémostase primaire (Antoine et al.,2024)

IV.1.2 Hémostase secondaire

Le thrombus plaquettaire formé est consolidé par la constitution d'un réseau de fibrine qui enserre les plaquettes agrégées dans ses mailles. La fibrine insoluble est générée à partir d'une protéine plasmatique soluble, le fibrinogène, sous l'action de la thrombine, produit final de la cascade d'activation enzymatique du système de la coagulation (De Revel et Doghmi., 2004).

En général, la coagulation ou également appelé l'hémostase secondaire, comprennent une série d'activationsenzymatiques en cascade de facteurs (au nombre de 13 dont les numéros correspondent à la chronologie de leurs découvertes) synthétisés et sécrétés sous la forme zymogène par le foieet les cellules endothéliales en dehors du foie (Tableau 4), qui surviennent à la surfacedes phospholipides membranaires de certaines cellules (plaquettes, cellules endothéliales, monocytes) et conduisant à la fin à la formation du caillot de fibrine en une durée de 5 à 10 min.

Tableau 4 : Facteurs de coagulation et leurs fonctions (De Revel et Doghmi., 2004).

Facteurs de coagulation et substances apparentées			
N°	Nom	Origine	Fonction
I	Fibrinogène	Foie et plaquettes	forme des caillots (fibrine)
II	Prothrombine	Foie	active I, V, VIII, XI, XIII, protéine C, plaquettes. Vitamine K dépendant
III	Facteur tissulaire		Co-facteur VIIa
IV	Calcium	Plasma	
V	Proaccélérine	Foie, plaquettes	co-facteur X.
VI	(accelérine; ancien nom du Facteur Va)		
VII	Proconvertine	Foie	active IX, X. Vitamine K dépendant
VIII	Facteur antihémophile A	Foie	co-facteur IX
IX	Facteur Christmas ou facteur antihémophile B	Foie	active X. Vitamine K dépendant
X	Facteur Stuart-Prower	Foie	active II. Vitamine K dépendant
XI	Facteur Rosenthal, Antécédent de la thromboplastine plasmatique	Foie	active XII, IX and prékallikréine
XII	Facteur Hageman	Foie	active prékallikréine et fibrinolyse
XIII	Facteur fibrin-stabilizing	Foie, moelle osseuse	stabilise la fibrine
	Facteur de von Willebrand	Plaquettes et cellules endothéliales	lie VIII, intermédiaire de l'adhésion des plaquettes
	Prékallikréine ou Facteur Fletcher		active XII et prékallikréine ; scinde HMWK
	Kininogène de haut poids moléculaire (HPMK)		soutient l'activation réciproque de XII, XI, et prékallikréine
	fibronectine		médiateur adhésion cellulaire

En général, trois voies sont impliquées dans la coagulation : les voies intrinsèque et extrinsèqueet commune (Fig.6).

❖ **Voie extrinsèque**

Le rôle principal de cette voie est de générer rapidement une grande quantité de thrombine est initiée par le contact entre le facteur tissulaire (FT), libéré par les cellules endothéliales, et lefacteur VII, qui s'active en facteur VIIa (Contantet al., 2015). Le complexe FT-FVIIa est responsable de l'activation de facteur X et aussi de facteur IX et par conséquence de prothrombine en thrombine.

❖ **Voie intrinsèque**

La voie intrinsèque, également appelé la voie endogène, est celle dans laquelle tous les éléments nécessaires de la coagulation sont présents dans le plasma sans apport extérieur. Cette voie est initiée par l'activation du Facteur XII lors de son interaction avec les structures électronégatives de la matrice sous-endothéliale (collagène, sulfatides, glycosaminoglycanes) (Vogler et al, 2009), Cette activation conduit ensuite à l'activation de la prékallikréine en kalikriéne, qui peut alors activer le Facteur XII. Le FXII activé catalyse la transformation de la forme zymogène du facteur XI à la forme protéolytique activée (XI a) qui active par la suite

le facteur IX, (Renné et al, 2006).Ce dernier se lie à la surface de phospholipides anioniques des plaquettes (F3P) et forme en présence des ions de calcium et de facteur VIII, le complexe tenase qui est responsable à l'activation du facteur X. le facteur Xa forme à son tour avec son cofacteur, le facteur Va, les phospholipides plaquettaires et en présence des ions de calcium, le complexe prothrombinase qui catalyse la transformation de prothrombine en thrombine (Caen et al ,1975).

❖ **Voie commune**

La thrombine génère des monomères et des polymères de fibrine insolubleà partir du fibrinogène et active les facteurs solubles V, VIII et XI. La thrombine active également le facteur XIII, une enzyme qui catalyse la formation de liaisons covalentes entre les molécules de fibrine permettant la formation d'un caillot également appelé thrombus.

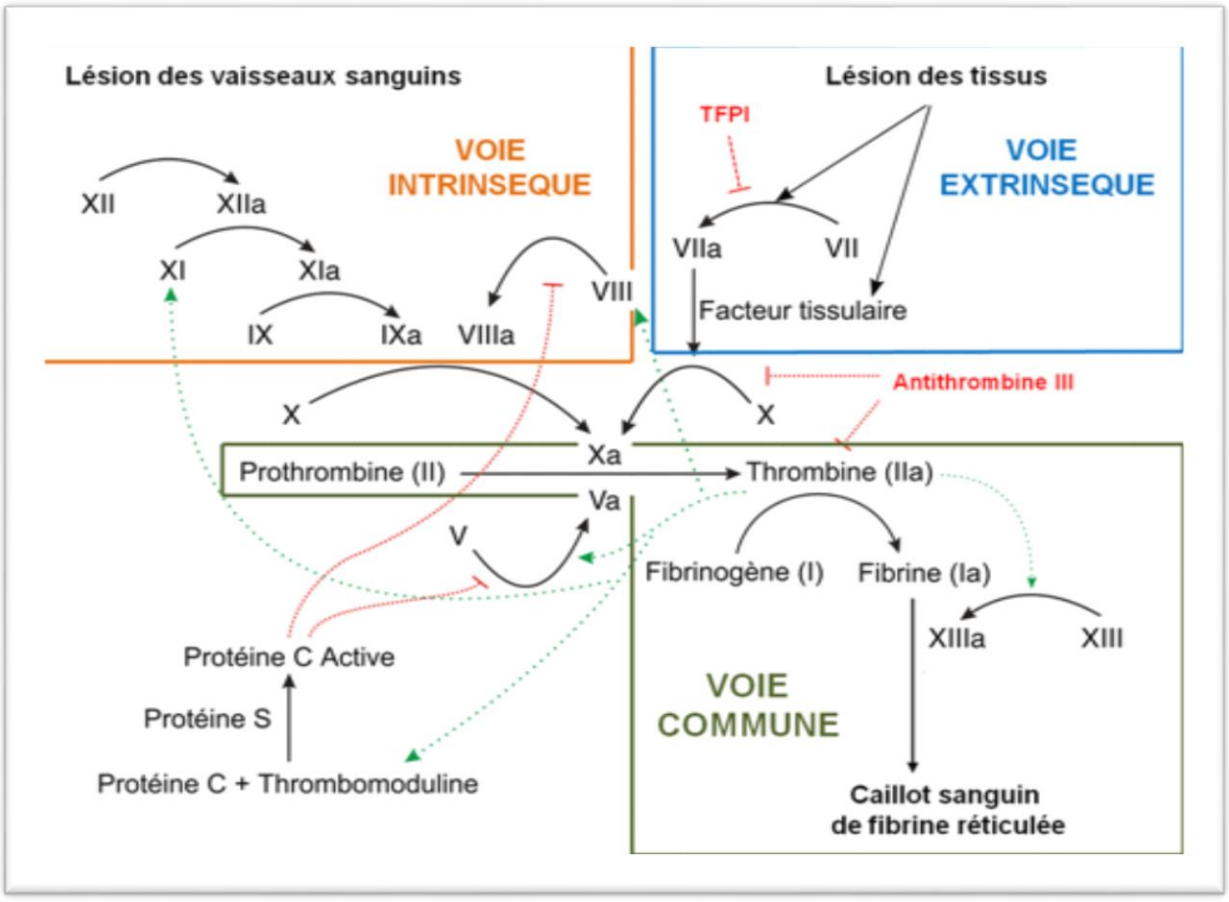


Figure 06 :les voies de la coagulation (Poupard., 2017)

IV.1.3 Fibrinolyse

Les cellules vasculaires endothéliales lésées libèrent les activateurs du plasminogène, qui activent à son tour la fibrinolyse. Les activateurs du plasminogène catalysent le clivage du plasminogène, générant ainsi la plasmine, qui dégrade le caillot de la fibrine (fig.07). Il permet la reperméabilisation des vaisseaux thrombosés. En général, le système fibrinolytique est en équilibre entre deux contraintes détruire les caillots intravasculaires qui se forment et ne pas provoquer d'hémorragies par dissolution de caillots hémostatiques et du fibrinogène.

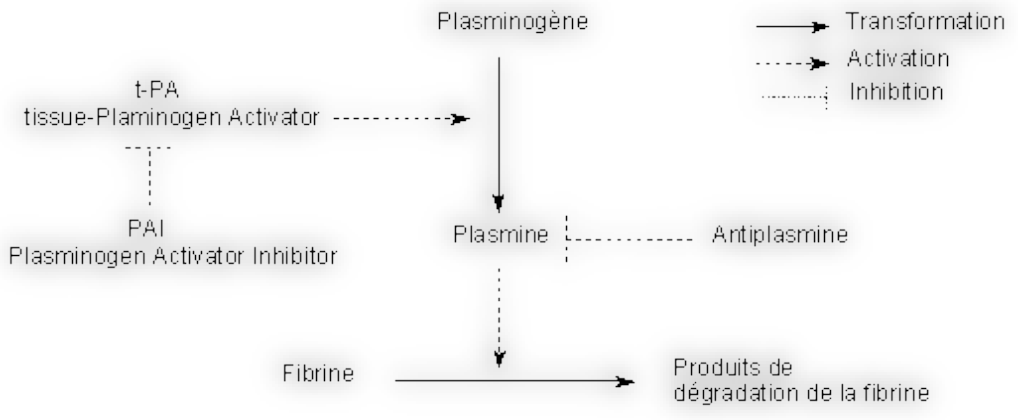


Figure 07: Le déroulement des étapes de la fibrinolyse (https://www.researchgate.net/ 2024).

IV.2 Maladies thrombotiques

Les thromboses sont les maladies vasculaires les plus fréquentes (lacut et al., 2008) qui résultent d'une interaction complexe entre les protéines circulantes de la coagulation, les plaquettes et la paroi vasculaire (Jensen et al, 2002). Elle correspond aussi à la formation d'un caillot de sang (thrombus) dans une veine ou une artère. Le stress oxydant est aussi considéré comme la clé principale de ces perturbations.

IV.2.1 Thromboses artérielles

La thrombose artérielle est un caillot ou thrombus blanc constitué d'amas plaquettaire consolidé par un réseau fibrineux elle se formepar des plaques d'athérome (accumulation de lipides, de calcium, de sang et de produits fibreux) se déposent au niveau des parois des artères ce qui a pour conséquence la diminution de leur calibre et au maximum leur occlusion et elle installe en général de façon progressive (Fig. 8). Les facteurs favorisant la formation des plaques d'athérome sont : le tabac, l'alcool, l'hypercholestérolémie,le diabète, l'hypertension artérielle, l'obésité, etc. La thrombose artérielle est actuellement considérée comme lacause principale de la mortalité dans le monde, qui est responsable des

complications cliniques très dangereuses regroupées entroiscatégories : les syndromes coronariens aigus, l'accident vasculaire cérébral et l'ischémie aigue des membres inférieurs .

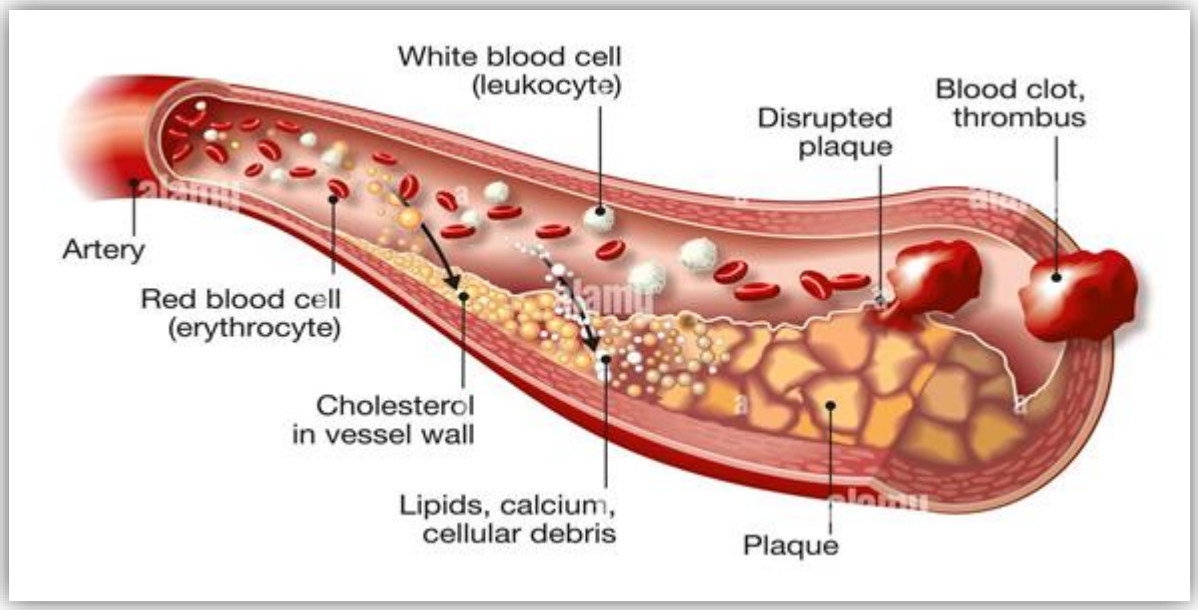


Figure 8 : Plaques d'athérome (www.alamy.com)

2.1.Thromboses veineuses

La thrombose veineuse correspond à la formation d'un caillot sanguin (thrombus) au sein du réseau veineux. Elle survient généralement au niveau des membres inférieurs, bloquant totalement ou partiellement la circulation sanguine. On distingue deux types de thromboses selon la localisation du caillot : La thrombose veineuse superficielle, encore appel para-phlébite ou phlébite superficielle. Elle touche les veines de petit calibre, situées dans le tissu sous-cutané (veines saphènes). Par contre La thrombose veineuse profonde, ou phlébite. Elle prend naissance au sein de veines de plus gros calibre, insérées à proximité des artères, au cœur du système musculaire de la jambe (Fig. 9). Périphérique ou profonde, la thrombose n'a pas la même gravité. En effet, le caillot de la phlébite profonde peut migrer accidentellement jusqu'à l'artère pulmonaire et l'obstruer. Il provoque alors une embolie pulmonaire dont les conséquences pulmonaires et cardiaques mettent en jeu le pronostic vital. La para-phlébite, quant à elle, ne provoque que rarement une embolie pulmonaire : les veines saphènes fonctionnent en effet comme un réseau secondaire au réseau veineux profond. Une thrombose veineuse superficielle entraîne cependant des complications locales dermatologiques (dermite ocre, ulcère variqueux) et une gêne fonctionnelle. Elle peut aussi se compliquer en thrombose veineuse profonde.



Figure 9: Formation d'une phlébite au niveau des veines de jambe (Ligue française contre la maladie veineuse thrombo-embolique 2007)

3. Traitement des maladies thrombotiques

Le traitement pharmacologique est essentiel pour prévenir une ré-occlusion précoce et limiter les dommages causés par les thromboses artérielles et veineuses en favorisant la recanalisation du vaisseau occlusif. Il existe en fait trois groupes d'agents antithrombotiques utilisables en thrombo-thérapie :

- Les antiagrégants (aspirine, clopidogrel, ticagrelor…) représentent à l'heure actuelle le traitement de référence des thromboses artérielles (Aubry et al ,2010)
- Les anticoagulants (les héparines non fractionnée, les héparines de bas poids moléculaire, et les anti-vitamines K) représentent le traitement principal de la maladie veineuse thromboembolique, et
- Le traitement fibrinolytique (streptokinase, urokinase, activateur tissulaire de plasminogéne …) a pour but de lyser le thrombus artériel ou veineux.

En général, les anticoagulants sont recommandés en association avec les antiagrégants et les fibrinolytiques pour traiter les syndromes coronaires aigus et l'infarctus cérébral (Helft et al, 2009). Dans les dernières décennies, les plantes médicinales qui possèdent des propriétés anticoagulantes peuvent influer directement sur l'hémostase et/ou modifier l'action des antithrombotiques. De nombreuses plantes possèdent un effet antiagrégant plaquettaire (par l'inhibition des cyclo-oxygénase, modification des taux de prostaglandine, inhibition de PAF…etc), des propriétés fibrinolytiques ou inhibitrices de la thrombine.

V. Tilleul

V. 1. Historique

Depuis l'antiquité, la Tilleul est un arbre légendaire, majestueux et admiré. Au fil des siècles, de nombreux mythes et légendes ont attribué au tilleul des pouvoirs magiques et thérapeutiques. Reconnu pour ses vertus médicinales et divinatoires, il est associé à des divinités féminines dans de nombreuses traditions anciennes. Dans la mythologie grecque, cette essence fut, à l'origine, une femme nommée Philyra, mère du centaure Chiron dont le nom signifie tilleul. C'est un « Arbre sacré » en Égypte, où des masques en bois de tilleul ont été découverts dans des sarcophages du Fayoum, la plus grande oasis d'Égypte, mais aussi dans la religion catholique pour sa feuille en forme de cœur représentant le « Sacré Coeur ». Lors de la révolution française, plus de 60000 tilleuls furent plantés dans toutes les communes de France, source de la dénomination d'« arbre de la liberté ». D'autres noms sont associés au tilleul comme « l'arbre de justice » favorisant la réconciliation, « l'arbre médecin » dont les druides utilisaient les feuilles pour combattre les maladies. Au Moyen Âge, les tilleuls étaient plantés près des hôpitaux en raison de ses propriétés apaisantes. Lors de la deuxième guerre mondiale, en période de carence alimentaire, ses feuilles étaient séchées et broyées en poudre, car très riches en protéines. En général, le tilleul compte une cinquantaine d'espèces et de nombreux cultivars dans le monde entier, les plus importantes étant le *Tilia Cordata Greenspire* ou tilleul à petites feuilles, le *Tilia Platy phyllos* ou tilleul à grandes feuilles, et le *Tilia Tomentosa* ou tilleul argenté dont les feuilles ont un reflet argenté (Christine, 2023).

Tilia cordata Greenspire

V. 2. Taxonomie

Tilia cordata Greenspire, ou tilleul à petites feuilles ou un arbre à miel est une espèce populaire pour l'aménagement paysager et les environnements urbains. En outre, en raison de sa large tolérance écologique, cette espèce pourrait devenir vitale pour la foresterie, face au changement climatique, mais elle est menacée d'extinction.

Selon la troisième version de la classification botanique phylogénétique des angiospermes établie par l'AngiospermPhylogency Group (APG III, 2009), la tilleul à petites feuilles appartient à la famille des Malvaceaeenciennement§ connu des Tiliaceae ou des malvacées :

Règne: Plantae

Sous règne: Tracheobionta

Division: Magnoliphyta

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Dilleniidae

Ordre: Malvales

Famille : Tiliaceae

Genre : Tilia

Espèce : *Tilia cordata Greenspire*

V. 3 Description botanique

Le tilleul à petites feuilles est un grand arbre qui peut atteindre 12 à 15 m de haut et 14 m de large, ces feuilles sont caduques à une forme cordées avec un tronc central, vert foncé en été et jaune-doré en automne. Les fleurs ont une forme vraiment particulière, regroupées en grappes, sont très mellifères et produisent de grandes quantités de nectar et de pollen, s'ouvrant en apex axillaires flexibles sur de longues tiges.

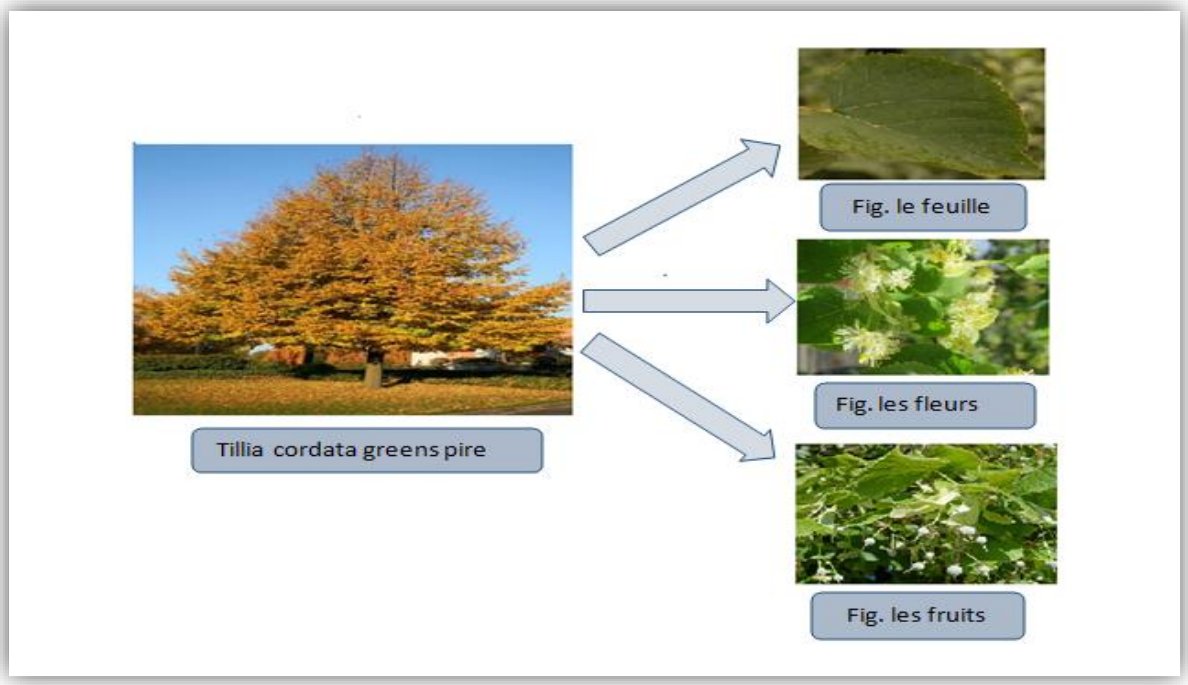


Figure 10 : *Tilia cordata Greenspire*

V. 4 Répartition géographique du tilleul

L'aire naturelle du tilleul à petites feuilles comprend presque toute l'Europe (Fig. 11) : des îles britanniques à l'Oural, du sud des Pays scandinaves à l'Italie. Il est présent dans toute

la France, jusqu'à 1 500 m d'altitude, mais il est commun seulement dans le Nord-est et les Pyrénées. En région méditerranéenne comme dans l'Algérie, la plante est rare et on ne le trouve qu'en situation rupicole (Pierre, 2009).

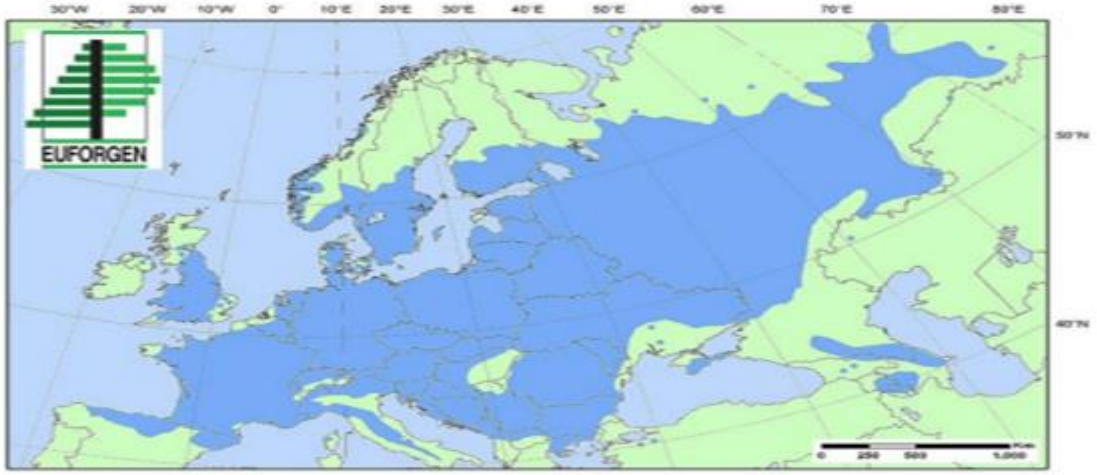


Figure 11 : carte de distribution naturelle du tilleul à petites feuille (EUFORGEN, 2009)

V. 3 Composition phytochimiques du tilleul

Le tilleul est une plante qui est riches en nutriments bénéfiques pour la santé humaine (Tableau 5).

Tableau 5 : Composition phytochimiques de *Tilia cordata Greenspire* (Barnes et al. 2007)

Métabolites primaires	
Acides aminés	Alanine, cystéine, cystine, isoleucine, leucine, phénylalanine et sérine
Carbohydrates	Polysaccharides de mucilage (3%). Cinq fractions sont identifiées : l'arabinose, le galactose, le rhamnose, avec des quantités moindres de glucose, de mannose et de xylose ; des dérivées d'ose dont les acides galacturonique et glucuroniques
Métabolites secondaires	
Flavonoïdes	Kaempférol, quercétine, myricétine et leurs glycosides (principalement Kaempférol-3-O-βD-(6″-E-p-coumaroyl)-glucopyranoside – tiliroside)
Huiles essentielles et terpènes	(0,02 % à 0,1 %) ; de nombreux composants, notamment des alcanes (citral, citronellal), des alcools phénoliques (citronellol, eugénol), limonène, α-pinène, le terpinéol (monoterpènes), le farnésol (sesquiterpène)
Acides phènolique	Acide caféique, acide chlorogénique et acide p-coumarique
Autres compounds	tanin (condensé) et tocophérol (phytostérol)

V. 4 Utilisation traditionnel du *Tilia cordata Greenspire*

Tilia Cordata est utilisé dans la médecine populaire comme sédatif en cas d'anxiété et de troubles du sommeil. Il possède également des propriétés diurétiques et diaphorétiques. Elle est également utile pour traiter l'hypertension artérielle causée par l'athérosclérose et la toux associée au rhume. Ces plantes contiennent de nombreux dérivés tels que des hydrocarbures, des esters, des terpénoïdes, de la quercétine, du kaempférol, des composés phénoliques, des tanins condensés et de la scopolétine. Les fleurs de tilleul ont été utilisées pour traiter de nombreuses affections, notamment les infections bactériennes et les affections respiratoires, et pour réduire le stress. D'autres effets peuvent être attribués aussi à la présence des flavonoïdes tel que : les activités anti-inflammatoire, antinociceptique, néphroprotectrice, et antioxydants, etc Fawzy et *al* ,2018)

Matériel et méthodes

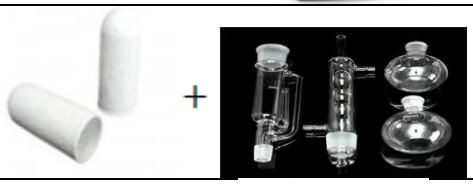
I. Matériel

1.1 Réactifs chimiques

Les solvants (éther de pétrole, méthanol, éthanol) étaient de qualité analytique et achetés à Biochem Chemopharma. Le réactif de Folin-ciocalteu, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), et le butylhydroxyl-toluène (BHT) ont été obtenus auprès de Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich GmbH, Stern-heim, Allemagne). Le bicarbonate de sodium (Na_2CO_3) et le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) proviennent de BiochemChemopharma. La solution saline tampon (NaCl ; 0,9 %) et le citrate trisodium (3,2 %) ont été obtenus auprès de la pharmacie.

I.2 Appareils et équipements

Les appareils et les équipements sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Appareils et équipements	**Figure**
Balance de précision	
Soxlet +cartouche + ballon de 250 ml	
Chauffe ballon	
Oscile(Prolab)	
Centrifugeuse	
Rotavapeur (Heidolph)	
Béchers + Micropipettes+ Tubes à essai+ Vortex	

I.3 Matériel végétal

L'ensemble de lapartie aérienne (feuilles et fruits) de la plante de *Tillia cordata Greenspire* (fig. 12A) utilisé dans cette étude a été acheté en février (2024) auprès d'un herboriste spécialisé dans le traitement traditionnel par les plantes médicinales à Sétif. L'échantillon a été broyé à l'aide d'un broyeur électrique (moulin à café) puis tamisé à l'aide d'un tamis afin d'obtenir des particules de même tailles (fig. 12B).

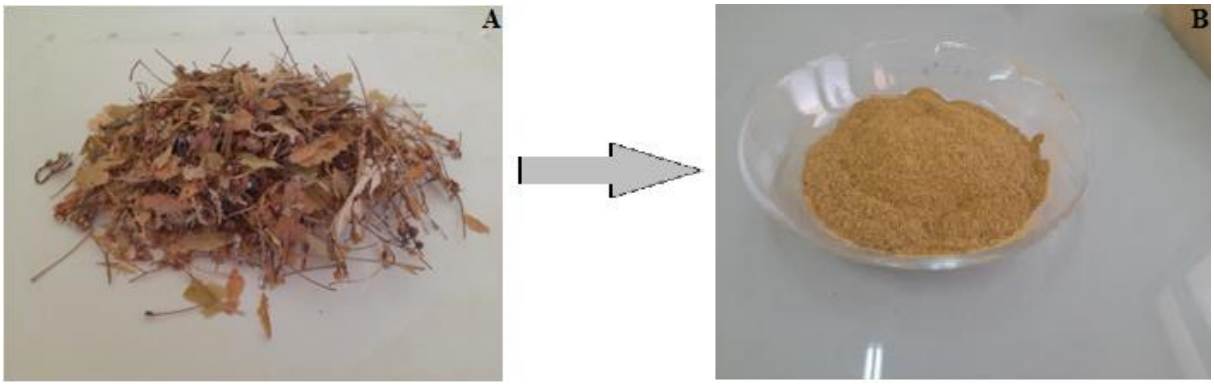


Figure 12 : La partie aérienne (feuilles et fruits) de la variété *Tilia cordata Greenspire*

II. Méthodes

II.1 Extraction des composés phénoliques

Initialement, l'échantillon a subi une délipidation (élimination des huiles fixes) par un solvant apolaire dont l'éther de pétrole tout on utilisant un Soxlet. C'est une extraction solide-liquide dont laquelle un poids de 30 g de ce broyat est disposé dans une cartouche cellulosique, puis la cartouche est introduite dans l'extracteur «Soxhlet » équipé à sa base d'un ballon contenant environ 200 ml d'éther de pétrole. Le solvant est porté à ébullition à l'aide d'une chauffe ballon pendant 3 heures. Les huiles fixes contenues dans la phase organique sont récupérées après évaporation sous vide par rotavapor à température de 40C° (fig. 13), et le rendement d'extraction exprimé en pourcentage (%) a été calculé par gravimétrie selon la formule suivante :

$$\text{Teneur en huile fixe (p/p)} = \frac{\text{Poids d''huile fixe obtenu}}{\text{Poids du plante utilisée}} \times 100$$

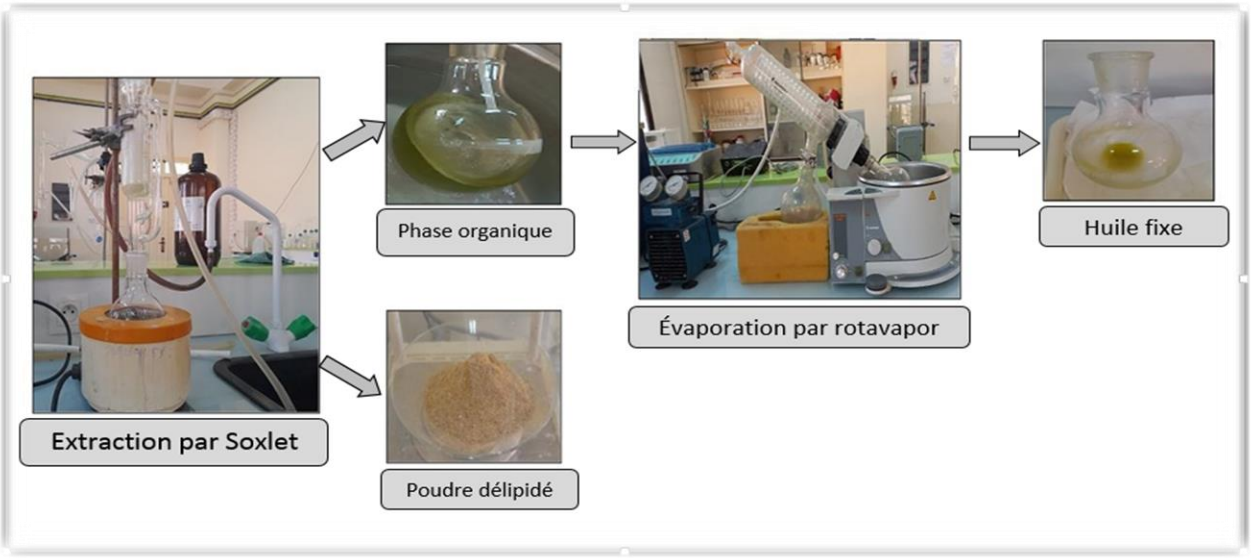


Figure 13 : Extraction des huiles fixes du matériel végétal par Soxhlet et évaporation sous vide par rotavapor.

Les extraits phénoliques ont été aussi préparés par une extraction solide-liquide, on utilisant des mélanges de solvants organiques polaire (méthanol et éthanol) avec l'eau à différents pourcentages (80%, 50%), ou on utilisant l'eau distillé seul. Chaque 10 g de la poudre délipidé est mis à macérer dans l'un des solvants précédemment cité avec un rapport de 1/10 (p/v) pendant 24 heures à température ambiante et sous oscillation (agitation à l'aide d'un Oscill). Après filtration sous vide effectuée à travers un entonnoir de N° 4, le culot a été soumis à une deuxième extraction pendant 12 heures dans les mêmes conditions afin d'assurer une extraction complète de ces métabolites. Les surnageants récupérés ont été collectés, centrifugées à 4000 rpm pendant 15 minutes et séchés à 40°C et sous pression réduite dans un évaporateur rotative. Le rendement d'extraction en composé phénolique est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenue après séchage complet dans l'étuve à 40ºC et la masse du matériel végétal traité. Enfin, ces extraits sont conservés à 4°C dans l'obscurité jusqu'à utilisation.

II. 2 Screening phytochimiques

Plusieurs tests ont été utilisés pour identifier la présence de certains métabolites secondaires dans les extraits aqueux et hydro-alcooliques de *Tilia cordata* préparés à une concentration de 10 mg/ml. Ces tests comprennent :

- **Saponines**

Selon (N'Guessan et *al.* 2009) ; 1 ml de chaque extrait a été ajouté à 2 ml d'eau chaude. Après 15 secs d'agitation rapide et d'une manière verticale, le mélange est laissé reposer pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante supérieure à 1 cm indique la présence de saponines.

- **Anthocyanes**

La présence des anthocyanes dans les extraits est mise en évidence par l'addition à 2 ml de l'infusé, quelques gouttes d'ammoniaque. L'apparition une couleur rouge, indique la présence de ces métabolites.

- **Tanins**

2 à 3 gouttes de la solution de $FeC1_3$ à 1% ont été ajoutées à 1 ml de chaque extrait. Après quelques minutes d'incubation, un test positif est révélé L par l'apparition d'une coloration bleu-noir ou bleu-vert (Karumi et *al*. 2004).

- **Coumarines**

La révélation des coumarines est mise en évidence à partir d'un mélange de 1ml de sirop dilué 1 :10 et de 1ml NaOH à 10% .la formation d'une couche jaune indique la présence des coumarines.

- **Alcaloïdes**

Mettre quelques gouttes du réactif de dragendorff dans un tube à essai contenant l'extrait, si la couleur change au marron foncé ça prouve l'existence des alcaloïdes.

- **Amidon**

Quelques gouttes de l'iode (I_2) sont ajoutées à la décoction contenue dans un tube à essai, et on observe le changement de la couleur vers le bleu, ce qui indique la présence d'amidon.

- **Sucres réducteurs**

Les sucres réducteurs ont été mis en évidence dans l'extrait (5ml) par la liqueur de Fehling (5 ml). La formation d'un précipité rouge brique après 2-3 min de chauffage au bain marie à 70°C indique une réaction positive (Békro et *al*., 2007).

II.3 Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux dans les extraits hydroalcooliques et aqueuse de *Tiliacordata* a été déterminée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteudécrit par Singleton et Ross, (1965) avec quelques modifications. La méthode est basée sur la réduction des constituants de réactif de Folin-Ciocalteu dont l'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_4$) et l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) en présence des fonctions hydroxyles (–OH) des phénols en un complexe ayant une couleur bleu constitué d'oxyde de tungstène (W_8O_{23}) et de

molybdène (MO_8O_3). L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés (Boizot et Charpentier., 2006). Brièvement, dans des tubes à hémolyse en verre, un volume de 200 µl de chaque extrait (1 mg/ml) a été mélangé avec 1 ml de réactif Folin-Ciocalteu 10 fois dilué. Après 4 min d'incubation, 800 µl d'une solution de Na_2CO_3à 7,5 % ont été ajoutés et les milieux sont mélangés vigoureusement. Les tubes sont ensuite maintenus à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante. Les absorbances sont lue à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS**.** Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (0,03 à 0,3 mg/ml). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

II.4 Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux dans les différents extraits a été déterminée aussi par la méthode colorimétrique du trichlorure d'aluminium décrit par Bahorun et al. (1996) avec toujours quelques modifications. La méthode est basée sur la formation d'un complexe très stable de couleur jaune, entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (Lagnika, 2005). Ce dernier présente une absorption maximale à 430 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes présente dans l'extrait.

Dans des tubes à hémolyse en verre, un volume de 1 ml de chaque extrait (1 mg/ml) a été additionné à un volume égal d'une solution d'$AlCl_3$ (2% dans le méthanol). Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 min d'incubation à l'abri de la lumière. Une courbe d'étalonnage établie par la rutine préparé à différentes concentrations de 0.01 à 0.1 mg/ml dans les mêmes conditions opératoires. La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de rutine par gramme d'extrait (mg ER/g d'extrait).

II.5 Évaluation de l'activité antioxydante

II.5.1 Test de DPPH

Le DPPH (2,2 diphenyl-1-picryl hydrazyl) est un radical stable qui possède un électron célibataire sur l'atome d'azote, caractérisé par une couleur violette et un pic d'absorption spectrale maximale à 517nm. En présence d'antioxydant (A) synthétiques comme le BHT et le BHA ou naturelle tel que les composés phénoliques ; l'électron célibataire devient apparié qui lui confère la décoloration de la solution de DPPH du violet

(forme radicalaire DPPH·) au jaune (forme réduite DPPH-H) (fig.14), indiquant ainsi la capacité de ces composés à scavenger ce radical.(Ramadan ,2010).

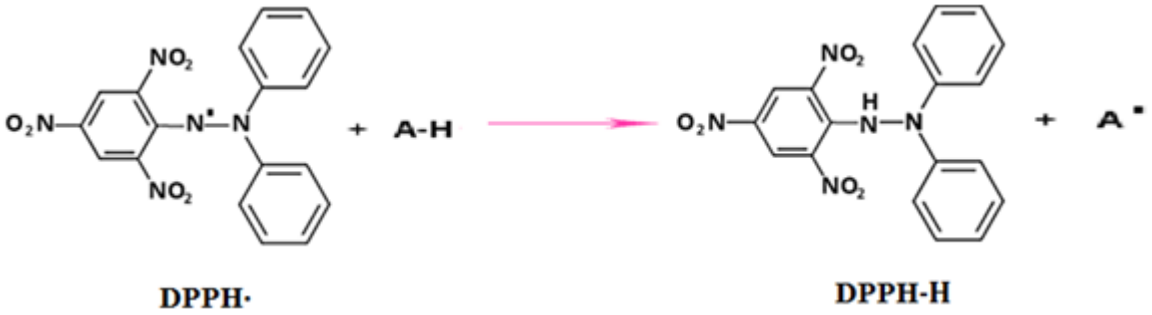


Figure 14 : Structure du DPPH et mécanisme de sa réduction par un antioxydant

Dans des tubes à essai, 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH fraichement préparée à une concentration de 2,4% sont ajoutés à chaque 50 µl des différentes concentrations d'échantillon préparées dans les solvants d'extraction précédemment citées. Après incubation pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance (abs) du milieu réactionnel est mesurée à 517nm par spectrophotomètre. Dans les mêmes conditions, le méthanol et la rutine à différents concentrations sont utilisés comme blanc et control positif respectivement. L'activité anti-radicalaire est exprimée en pourcentage d'inhibition (I%) calculé selon la formule suivante :

$$I\ \% = [abs_{blanc} - abs_{échantillon} / abs_{blanc}] \times 100$$

La valeur d'IC_{50} (concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH) est déterminée pour chaque échantillon.

II.5.2 Test de phénanthroline

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Le test du phénanthroline est également une méthode spectrophotométrie et colorimétrique, simple et facilement applicable pour estimer la capacité des antioxydants naturels de réduire le Fe(III) en Fe(II) en présence de phénanthroline. Cela se traduit par l'apparition d'une couleur rouge orangé dont l'intensité est proportionnelle à l'activité antioxydant. (Zam et *al*, 2017).

Dans des tubes à essai, 100µl d'échantillon préparée à différentes concentrations, 500 µl de la solution $FeCl_3$ à 0,2%, 300 µl de la solution phénanthroline à 0,5%, et 1100 µl de méthanol sont mélangées. Dans les mêmes conditions, le méthanol et le BHT à différents concentrations sont utilisés comme blanc et control positif respectivement. Après incubation à l'obscurité et à température ambiante pendant 20 min, l'absorbance (abs) du milieu réactionnel est mesurée à

510 nm par spectrophotomètre. L'activité antioxydant est exprimée ensuite par la valeur d'$A_{0,5}$ (concentration d'extrait nécessaire pour inhiber la réduction de 50% de la forme Fe(III)).

II.6 Évaluation de l'activité anticoagulante (Effet sur le temps de coagulation)

L'activité anticoagulante des extraits a été évaluée in ex-vivo en utilisant du sang humain selon le protocole établi par Alamgeer et al., (2018) avec simple modification. La procédure a impliqué l'utilisation de quatre concentrations différentes de l'extrait. Brièvement, 70 µL de chaque extrait préparés à différents concentration dans l'eau physiologique (0,9%), ou des témoins (le témoin positif étant le citrate de sodium et le témoin négatif étant l'eau physiologique) ont été distribués dans des tubes eppendorf. Puis, 370 µL de sang frais Sang humain (obtenu par prélèvement dans des tubes sec à partir de donneurs volontaires sains et non-fumeurs et qui n'ont pas pris de traitement médical pendant au moins quinze jours) ont été ajoutés immédiatement aux tubes contenant les échantillons ou les témoins, le tout est mélangé à température ambiante doucement et manuellement à l'aide d'un cure-dents. Ensuite, une vérification toutes les 30 secondes est effectuée pour déterminer si le sang est coagulé (formation d'un caillot) (Fig.) en comparaison avec le témoin positif.



Figure 16 : Evaluation de l'activité anticoagulante.

Résultat et Discussion

I. Rendement d'extraction et criblage phytochimiques

L'extraction d'huile fixe de la partie aérienne (feuilles et fleurs) de la plante de *Tillia cordataGreenspire* par Soxhlet à l'aide d'éther de pétrole a permet d'obtenir un produit graisseux de couleur verdâtre. L'huile obtenue est caractérisée par une odeur aromatisée avec un aspect crémeux. Le rendement en huile (donc de la matière grasse) est de 3,53%, et par conséquent le rendement en matière sèches est de 96,46%. Ainsi, il apparait que *Tillia cordata* est riche en huile et en matière organique.

Les extraits polyphénoliques ont été préparés par macération utilisant des mélanges hydroalcooliques (éthanol/eau, méthanol/eau) à différentes pourcentages et de l'extrait obtenu avec de l'eau seule. Les rendements d'extraction exprimés en pourcentage (%), en termes d'extraits sec qui sont est défini comme le ratio du poids de l'extrait obtenu au poids de la plante traitée sont présentés par la figure ci-dessous.

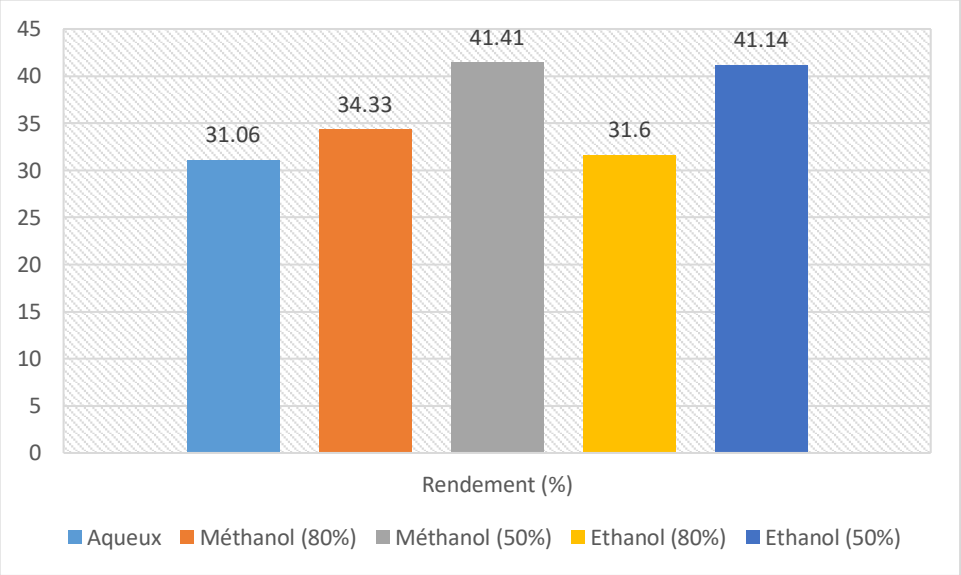


Figure 16 : Rendement d'extractionobtenue à partir de la partie aérienne du tilleul

Dans cette étude, différentes fractions d'éthanol et de méthanol avec de l'eau distillée (50 %, 80 %) ont été utilisées. Nous avons mené nos expériences et constaté que les mélanges hydroalcooliques à 50% donnent des rendements un peu plus élevés que l'eau seule. En plus, le mélange méthanol/eau est meilleur par rapport aux mélanges éthanol/eau. Le type de solvant utilisé et les concentrations d'extraction utilisés ont un impact significatif sur les rendements. Le rendement en composés phénoliques est influencé par la solubilité des composés phénoliques et la polarité du solvant. Selon la littérature, l'éthanol, le méthanol à différentes concentrations avec de l'eau distillée ont été couramment utilisés comme les

meilleurs solvants pour l'extraction des polyphénols (Zam et al., 2017). Ces constatations nous amènent à conclure que l'extraction par combinaison hydroalcoolique donne de meilleurs résultats que l'extraction par l'eau.

Afin de mettre en évidence la présence ou l'absence de certains composés appartenant aux familles chimiques des métabolites secondaires, nous avons réalisé des tests phyto chimiques spécifiques fondés sur des réactions de coloration, de turbidité ou de précipitations, en utilisant les méthodes décrites dans la littérature (Haddouchi, 2016). Sur la base des résultats obtenus des différents tests de screening phytochimique utilisés (tableau 07), il a été démontré que *Tilia cordatta* est riche en divers métabolites : primaires comme les carbohydrates réducteurs et huiles fixes, et secondaires comme les anthocyanes, les coumarines, et les tanins. La plante est pauvre en saponine, en alcaloïde et en amidon.

Tableau 07 : Composition phytochimiques de la partie aérienne du *Tilia cordatta*

Extrait	Saponine	Anthocyane	Tanin	Coumarine	Alcaloïde	Amidon	Sucre réducteur
Aqueux	-	+	Bleu vert +	++	-	-	++
Méthanol (50%)	-	+	Bleu vert +	++	-	-	++
Méthanol (80%)	-	+	Bleu vert +	++	-	-	++
Ethanol (50%)	-	+	Bleu vert +	++	-	-	++
Ethanol (80%)	-	+	Bleu vert +	++	-	-	++

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux obtenus par (Fawzy et al, 2018) ou le screening phytochimique de la partie aériennes de *Tilia cordata* ont montré la présence aussi de carbohydrates, de saponines, de tannins, de flavonoïdes, de tri-terpènes, et coumarines, de et de flavonoïdes. En outre, l'extrait a montré des propriétés anti-tyrosinase et antioxydant. Les phyto-constituants et le rendement d'extraction de la tige (parties aériennes) de *Tilia cordata* n'ont pas encore été décrits dans des études antérieures.

II. Quantification des polyphénols et des flavonoïdes totaux

La teneur en polyphénols totaux contenus dans les extraits de la partie aérienne de *Tillia cordata* a été déterminée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est la méthode la plus ancienne, simple et reproductible conçue pour la détermination de la quantité des polyphénols dans les extraits des plantes médicinales. En général, l'acide gallique est le

standard employé le plus souvent dans cette méthode (Cittan et *al.*, 2018). Dans nos études, on y utilisant un graduant de concentration allant de 6,25 à 2OO µg/ml. Les résultats sont représentés par une courbe d'étalonnage où Y représentent les absorbances obtenues à 765 nm et X représente les concentrations en µg/ml (fig.16).

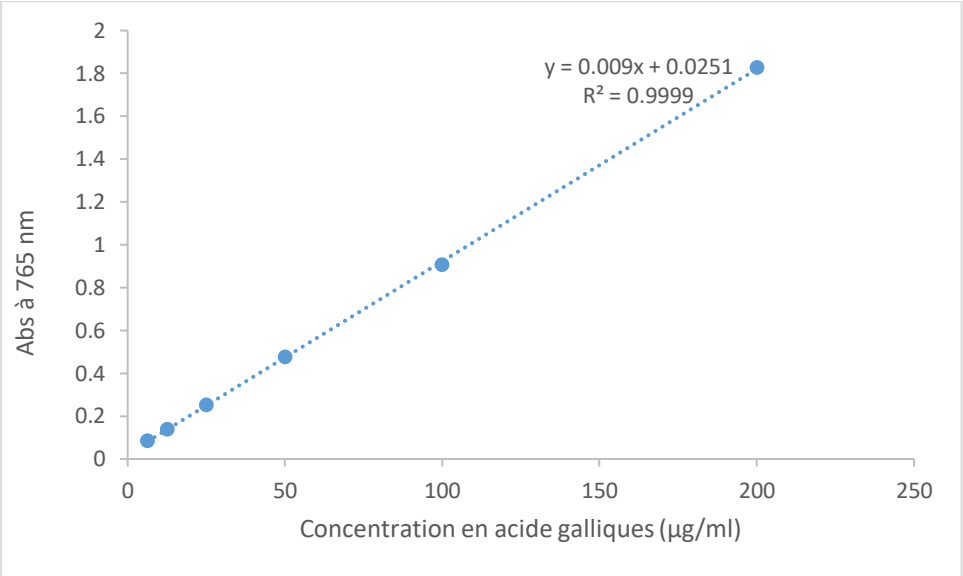


Figure 17 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

L'équation de régression linéaire obtenue à partir de cette courbe est utilisée pour estimer la concentration des polyphénols dans les différents extraits étudiés. D'après les résultats obtenus, il apparue que l'extrait méthanolïque (80%) contient la plus grande teneur en composés phénolique (63,111 mg EAG/g d'extrait) par rapport aux autres extraits (fig. 18).

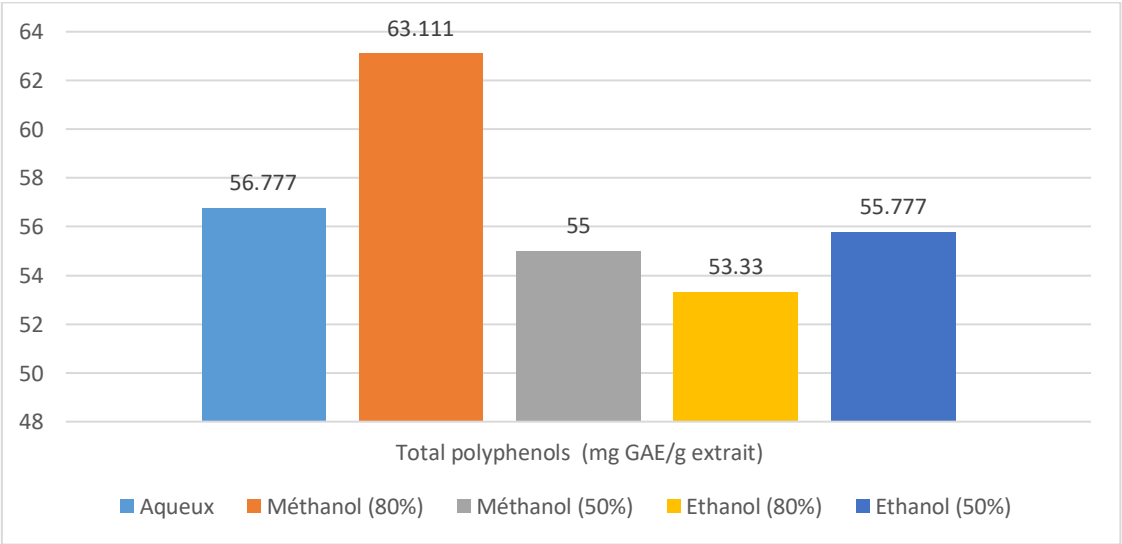


Figure 18 : La teneur en polyphénols totaux des extraits étudiés

La teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits de la partie aérienne de *Tillia cordata* a été déterminée par la méthode de trichlorure d'aluminium. La rutine est le standard employé dans cette méthode. Dans nos études, on y utilisant un graduant de concentration allant de 1,25 à 4O µg/ml. Les résultats sont représentés par une courbe d'étalonnage où Y représentent les absorbances obtenues à 430 nm et X représente les concentrations en µg/ml (Fig.19).

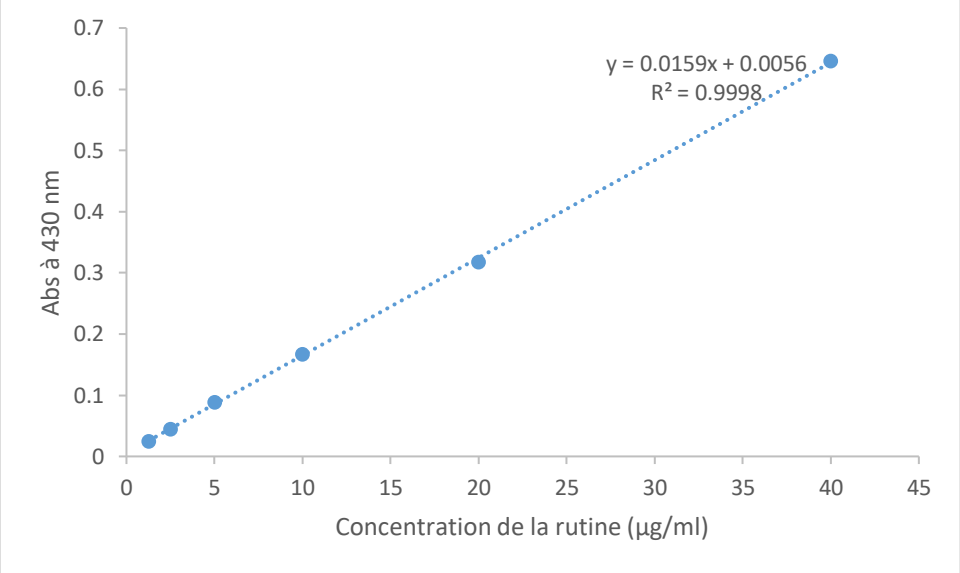


Figure 19 : Courbe d'étalonnage de la rutine

La teneur en flavonoïdes le plus important est trouvé dans l'extrait aqueux (30.73 mg ER/g d'extrait), suivie par l'extrait hydro-èthanolique à différentes fractions (Fig. 20).

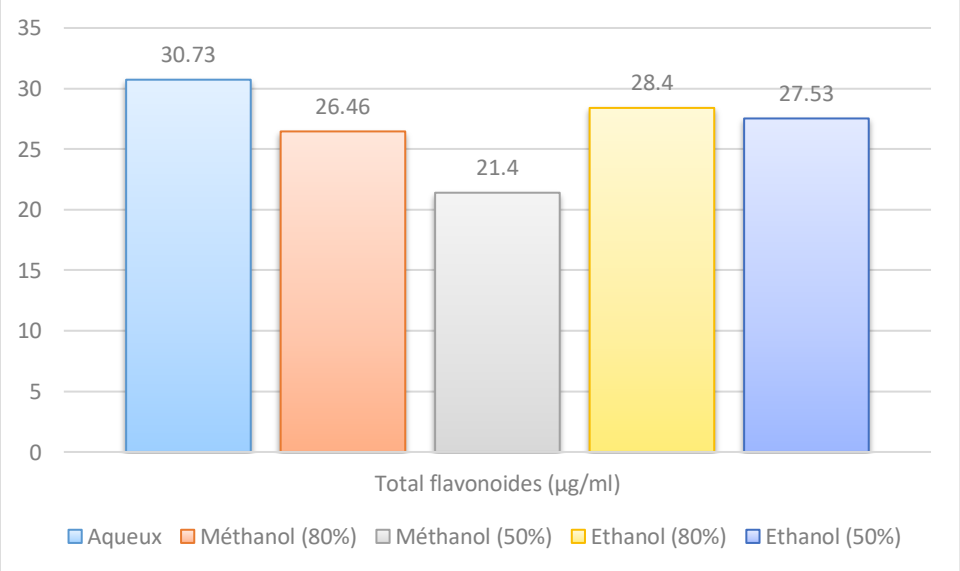


Figure 20 : La teneur en flavonoïde totaux des extraits étudiés

Les résultats obtenus sont comparable à ceux trouvé par Cittan et *al* , (2018), où la teneur en polyphénols de l'extrait aqueux obtenu par infusion et (58,86 ± 21,51 mg EGA /g d'échantillon sec), mais inférieur à ceux obtenu par la méthode ultrasons (111,84 ± 13,99 mg EGA /g d'échantillon sec).

Par contre, Zam et *al* . (2017) montre que la teneur en polyphénols dans l'extrait ethanolique à 40%, obtenu par décoction pendant 30 min à 75°c, est de 13 .7±0.0021 µg EGA /ml. Cela peut être expliqué par l'effet de la température utilisé qui provoque la diminution du rendement phénolique car la quantité d'éthanol a été perdue sous forme de gaz et d'une possible dégradation de composés phénoliques provoqués par l'hydrolyse, réactions redox et polymérisation.

Selon la littérature, les différences observés dans les teneurs en polyphénols totaux des extraits de la parie aerienne du *Tilia coradata* est liés aux divers facteurs tels que le climat, le sol, l'altitude et la variété de la plante étudier (Wojdyło et *al*, 2007; Yesil et *al*, 2007). En plus, ces variations sont liés aux conditions de stochage de la plante, les solvants et les méthodes d'extraction utilisé (Albu et *al*, 2004 ; Wada et *al*, 2004).

III. Activités antioxydants des extraits polyphénoliques

Les activités antioxydants des extraits de polyphénols de *Tillia cordata* ont été évaluées in vitro à l'aide de deux tests spectrophotométries complémentaires : DPPH et phenantroline. En général, les extraits au méthanol et à l'éthanol ont eu un bon effet piégeur vis-à-vis du radical libre DPPH qui est de manière dose-dépendante. En termes d'IC_{50} : ces activités exprimés en terme d'IC_{5O} sont un peu efficaces que la rutine (IC_{50} = 337,83±2,01 µg/ml). Néanmoins, l'extrait au méthanol présentait une activité de piégeage légèrement supérieure à celle à l'éthanol et à l'aqueux sans différence significative. A l'inverse, ils présentent une faible efficacité par rapport aux BHT. Concernant le dosage du pouvoir réducteur par le test de phenantroline, les extraits ont montré presque la même activité antioxydant en réduisant le Fe(III) en forme Fe(II), qui est élevée. Cette activité est plus de 100 fois inférieure à celle du BHT (IC_{50} =2,24±0,01 µg/ml).

Tableau 8 : Concentration inhibitrice des extraits de *Tilia cordata greenspire* obtenues avec le test DPPH

Extraits	IC_{50} (µg/ml)
Methanol (50%)	187,852
Methanol (80%)	101,875
Ethanol (50%)	313,0232
Ethanol (80%)	78,373
Aqueux	316,543

Tableau 9 : Concentration inhibitrice des extraits de *Tilia cordata greenspire* obtenues avec le test de phenantrolin

Extraits	$AC_{0,5}$ (µg/ml)
Methanol (50%)	364,3
Methanol (80%)	292
Ethanol (50%)	474,4
Ethanol (80%)	418,7
Aqueux	330,6

Selon la littérature, Négri et al. (2013), ont analysé l'extrait hydro-éthanolique en utilisant chromatographie liquide avec spectrométrie de masse et à découvert que les principaux flavonoïdes étaient : la quercétine-3,7-di-O-rhamnoside, le kaempférol-3,7-di-O-rhamnoside et le kaempférol 3-O-(6”-pcoumaroyl glucoside) ou le tiliroside. Ces flavonoïdes et les composés phénoliques suppriment ou éliminent l'oxygène radical espèces soit par inhibition enzymatique, soit par chélation de traces éléments dans la génération de radicaux libres ; ou une régulation positive et protéger les enzymes antioxydants impliquées dans les défenses [22]. Une étude antérieure menée par Lugemwa et al. (2013) avait montré que la teneur phénolique des feuilles de tilleul était de 375,6 ± 7,8 mg/l (équivalent à 0,75 mg/100 g de poids sec). Cette valeur était corrélé à une IC_{50} de 3,76 ± 0,10 mg/ml. Nos résultats a indiqué que l'activité de piégeage des radicaux de l'extrait n'était pas lié à sa teneur en phénols car le rendement maximum de composés phénoliques ont donné une IC_{50} d'environ 0,6611 mg/ml, alors que la meilleure IC_{50} (0,3303 ± 0,0896 mg/ml) a été obtenu en utilisant de l'éthanol à 60 % à 75 °C pendant 30 min et était corrélé à un rendement phénolique de 0,49 ± 0,0014 g/100g matière sèche. Plusieurs études dans la littérature ont rapporté qu’il n'y a pas de corrélation positive entre l'activité antioxydant et la quantité de composés phénoliques.

IV. Activité anticoagulante des extraits polyphénoliques

L'étude suggère que les extraits polyphénoliques de *Tillia cordata* comptent parmi les antioxydants naturels les plus puissants. Ils sont également considérés comme les agents anticoagulants les plus puissants en raison de leur capacité à allonger le temps de coagulation qui est dose-dépendant (Tableau 10). Les extraits méthanolique et éthanolique présentent des effets anticoagulants substantiels varient proportionnellement en dose par rapport à l'extrait aqueux et au control négatif (2min50s), mais elles sont compatible à l'effet observé avec le citrate de sodium, utilisé comme un contrôle positif (> 3 heures) dont il n'aura pas de formation de caillot.

Cette activité démontrant qu'ils avaient la capacité d'inhiber les facteurs de coagulation sur les deux voies de coagulation extrinsèques et intrinsèques. Pour cela, des tests spécifiques sont nécessaires tel que : le test de temps de prothrombine (PT) et le test temps de céphaline activée (APTT). Les composés phénoliques sont considérés comme des puissant anticoagulant peuvent être utilisés à la fois dans la prévention et dans le traitement des complications thrombo-emboliques et les anomalies cardiovasculaires contrairement à l'héparine, qui génère certains effets secondaires tels que la thrombocytopénie, les saignements et les complications gastro-intestinales (Gbadamosi & Feick., 2023). Ces doubles activités, antioxydante et anticoagulante, déterminées dans la présente étude constituent une stratégie fondamentale dans le traitement des thromboses. En fait, il a été constaté que les métabolites secondaires tels que les polyphenols peuvent inhiber l'activité des sérines protéases, du FXa et de la thrombine, des enzymes impliquées dans les voies de coagulation (Gogoi et *al*., 2018). Les données de la littérature sur les effets anticoagulants des polyphénols de *Tillia cordata* sont limitées

Tableau 10 : Activité anticoagulante des extraits de *Tillia cordata greenspire* évalué par le test de clotting time

Concentrations (mg/ml)	2,5	5	10	15	20	30	40	50
Méthanol (50%)	**3min 4s**	**4 min30 S**	**3 min 51s**	**4min 25s**	**>24h**	**56min50s**	**>24h**	**>24h**
Méthanol (80%)	**3min 58s**	**5 min33s**	**4min 50 s**	**6min 49 S**	**7min 7s**	**>24h**	**>24h**	**>24h**
Ethanol (50%)	**3 min 55s**	**3 min27s**	**4min 35 s**	**1 h15 min**	**2h38min**	**>3h**	**>3h**	**>3h**
Ethanol (80%)	**3min 49s**	**3 min56 S**	**5 min 11s**	**5min 39 s**	**6min 29s**	**>24h**	**>24h**	**>24h**
Aqueux	**3min 10 S**	**3 min 20s**	**4 min 33s**	**5min 24 s**	**4min 49s**	**6min 07s**	**14min 26s**	**14min 26s**

Conclusion et Perspectives

Dans le cadre de la valorisation des composés polyphénoliques de la partie aérienne de *Tillia cordata greenspire* à travers l'étude de leurs effets préventifs et curatifs contre le stress oxydant et les complications cliniques des maladies thrombotiques.

L'étude phytochimique nous a permis de détecter les principaux composées polyphénoliques et des flavonoïdes telles que les tanins, les coumarines, les anthocyanes, à côté des sucres réducteurs.

Le dosage colorimétriques des polyphénols et des flavonoïdes totaux nous a permis de conclure que *Tillia cordata* est riches en ces métabolites secondaires qui sont potentiellement intéressants pour les propriétés antioxydants et anticoagulante trouvées, ce qui en fait une alternative protectrice et thérapeutique avec une utilisation sûre contre le stress oxydant et les thromboses veineux.

Parmi les perspectives qu'on a proposé :

- Isolement et identification des molécules majeurs responsables de ces activités antioxydants et anticoagulante par des méthodes analytiques précises telles que l'HPLC, l'HPLC–SM, et RMN, etc.
- Application des tests in vitro spécifiques pour l'estimation de l'activité anticoagulante in vitro (test TP et test TCK).
- Evaluation *in vitro* eu même *in vivo* de ces effets attribués, en plus d'autres effets biologiques tels que l'effet antiagrégant et anticancéreux des extraits phénoliques de *Tillia cordata* tout en utilisant des techniques spécifiques.

Références Bibliographique

A.F. Vinha, V.P.B. Sérgio, C. Ana and M. Marisa, (2013) Comparison Between the Phytochemical and Antioxidant Properties of Plants Used in Plant Infusions for Medicinal Purposes. J. Agric. Sci., 5(11) 11-19.

Albu S, Joyce E, Paniwnyk L, Lorimer J. P, Mason T. J. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from Rosmarinus officinalis for the food and pharmaceutical industry. Ultrasonics Sonochemistry. 11: 261–265.

Antoine , (2024) ,pathologie de lhemostase primaire , int /hen .

Atkin, M. A., Gasper, A., Ullegaddi, R., & Powers, H. J. (2005). Oxidative susceptibility of unfractionated serum or plasma: response to antioxidants in vitro and to antioxidant supplementation. Clinical Chemistry, 51(11), 2138-2144.

Aubry, P., & du Fretay, X. H. (2010, December). Traitements antithrombotiques du syndrome coronarien aigu avec sus-décalage ST. In Annales de cardiologie et d'angeiologie (Vol. 59, No. 6, pp. 335-343). Elsevier Masson.

Bekro, Y. A., Mamyrbekova, J. A., Boua, B. B., Bi, F. T., & Ehile, E. E. (2007). Etude ethnobotanique et screening phytochimique de Caesalpinia benthamiana (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpiniaceae). Sciences & nature, 4(2), 217-225.

Benslama, A. (2020). Etude phytochimique et activités antioxydante et hépatoprotectrice des extraits de Thymus pallidus, thèse de doctorat en science, Université Ferhat Abbas Sétif1.
Berdoulat C,(2022), Articles Longévité Médecine alternative Oxydation, Solutions.

Beta, T., Nam, S., Dexter, J. E., & Sapirstein, H. D. (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. Cereal chemistry, 82(4), 390-393.

Boizot N.,Charpentier J.P., 2006 : Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre fustier. Le cahier des techniques de l'Inra.P : 79- 82.

Boujaada, A. (2019). Apport de la thrombolyse in situ dans le traitement de l'ischemie aiguë du membre inferieur (a propos de 03 cas), (Doctoral dissertation).

Bourgonje, A., Feelisch, M., Faber, K., Pasch, A., Dijkstra, G., & van Goor, H. (2020).Oxidative Stress and Redox-Modulating Therapeutics in Inflammatory Bowel Disease. Trends In Molecular

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie : Phytochimie, Plants Médicinales. 3émeEd Tec et Doc. Paris, P, 101-120.

Caen, J., Lrrieu, M. J., & Samama, M. (1975). L'hémostase: méthodes d'exploration et diagnostic pratique (2 éme Ed). Expansion Scientifique Française (Paris), p15-20.

Contant, M.M., Martini, F.H., Ober, W.C., Bartholomew, E.F., Nath, J.L., Bélanger, H., Mayrand, M. (2015). La biologie humaine : une approche visuelle (Edition 2015). ERPI.

De Revel, T., & Doghmi, K. (2004). Physiologie de l'hémostase. EMC-dentisterie, 1(1), 71-81.

Fawzy, G., Younes, K., Waked, E., & Mahmoud, H. (2018). Anti-inflammatory, Antinociceptive and Nephroprotective activities of Tilia cordata and Isolation of Bioactive Compounds. J. Mat. Environ. Sci, 9, 1908-1914.

Geurbaz, F.E. (2017). Resistance Aux Anti Vitamine K. (Thèse Doctorat). Université Mohammed V, Rabat.

Goudable, J., Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Nutrition Clinique Et Métabolisme, 11(2), pp.115-120.

Gould, P. J., Fei, S., & Steiner, K. C. (2006). Modeling sprout- origin oak regeneration in the central Appalachians. Canadian Journal of Forest Research, 37(1), 170-177.

Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular aspects of Medicine, 27(1), 1-93.

Haddouchi, F., Chaouche, T. M., & Halla, N. (2016). Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. Phytothérapie, 16(S1), S254-S262.

Hamma, A. (2019). Rôle du stress oxydatif dans le cancer de la prostate. Journal Algérien de Médecine, 27(1), pp.19-23.

Helft, G., & Leger, P. (2009, August). Que retenir de la littérature récente concernant les antithrombotiques?. In Annales de cardiologie et d'angeiologie (Vol. 58, No. 4, pp. 230-235). Elsevier Masson.

Hennebelle, T. (2006). Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants: Marrubium peregrinum, Ballota larendana, Ballota pseudodictamnus (Lamiacées) et Lippia alba (Verbénacées) (Doctoral dissertation, Lille 1).

Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Phytothérapie, 2, 3-6.

Hussein, S. Z., Yusoff, K. M., Makpol, S., & Yusof, Y. A. M. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents increase with gamma irradiation in two types of Malaysian honey. Molecules, 16(8), 6378-6395.

Jean, B. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.). Lavoisier

Jean-PhilippeZ. (2009) Les plantes en pharmacie, Ed. Dauphin, paris, , p.1-184

Jensen, R. (2002). Clinical presentation of arterial thrombosis vs. venous thrombosis. Clini Hemos Rev, 16(8), 1-6.

Karumi, Y. (2004). Identification of Active Principles of M. balsamina (Balsam Apple) Leaf Extract Y. Karumi," PA. Onyeyili and "VO Ogugbuaja. Journal of Medical Sciences, 4(3), 179-182.

L.Lagnika, ,**(2005)**"*Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises*" Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg, page :249.

LACUT, K., DELUC, A., LE MOIGNE, E., & MOTTIER, D. (2008). Existe-t-il un lien entre la maladie artérielle athéromateuse et la maladie veineuse thromboembolique. MT. Médecine thérapeutique, 14(1), 32-36.

Lugemwa, F. N., Snyder, A. L., & Shaikh, K. (2013). Determination of radical scavenging activity and total phenols of wine and spices: A randomized study. Antioxidants, 2(3), 110-121.
Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. EPFL Press.

Martin S and Andriantsitohaina R.(2002) ,Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. Annales de cardiologie etd'angéiologie. 51 ; 304-315.

Martin, T. (2016). Dosage de l'activité du facteur Willebrand: comparaison de la méthode de référence manuelle à deux techniques automatisées (Doctoral dissertation, Éditeur inconnu). Medicine, 26(11), pp.1034-1046.
Meyer, N., Oberegelsbacher, C., Dürr, T. D., Schäfer, A., & Huber, A. (2008). An eGFP-based genetic screen for defects in light-triggered subcelluar translocation of the Drosophila photoreceptor channel TRPL. Fly, 2(1), 36-46.

Michael B. Streiff, MD, (2023) Johns Hopkins University School of Medicin.
N'Guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G., Traoré, D., & Aké-Assi, L. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). Sciences & Nature, 6(1).

Nakajima, K., Nakano, T., & Tanaka, A. (2006). The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: the comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. Clinica Chimica Acta, 367(1-2), 36-47.
P. Bradley, ed. British Herbal Compendium., 1(1992) 142–144.

Penche, L. (2015). Peut-on prédire le risque hémorragique par le biais d'un interrogatoire médical? (Doctoral dissertation, Université Toulouse lll-Paul Sabatier).

Perin, M., Ardillon, L., Delahousse, B., Denhaut, R., Salame, E., Remerand, F., & Gruel, Y. (2015). Comparaison in vitro de l'effet du plasma frais congelé (PFC) et d'un concentré de complexe prothrombinique (CCP) sur la génération de thrombine (TGT) en transplantation hépatique orthotopique (THO). Anesthésie & Réanimation, 1, A162-A163.

Pogacnik, L., & Ulrih, N. P. (2011). Determination of antioxidants in medicinal herbs. Bulletin of the Transilvania University of Brasov. Series VI: Medical Sciences, 95-102.
Poupard, N. (2017). Conception de polysaccharides sulfatés inhibiteurs de l'héparanase pour le traitement de l'angiogénèse tumorale (Doctoral dissertation, Université de La Rochelle).

Ražná, K., Žiarovská, J., Ivanišová, E., Urbanová, L., Harenčár, Ľ., Kováčik, A., ... & Hrubík, P. (2021). Flowers Characteristics of Selected Species of Lime-Tree (Tilia spp.) in Terms of

miRNA-Based Markers Activity, Mannose Expression and Biological Compounds Content. Forests, 12(12), 1748.

Renné, T., Nieswandt, B., & Gailani, D. (2006). The intrinsic pathway of coagulation is essential for thrombus stability in mice. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 36(2), 148-151.

Saad, A. F., Virella, G., Chassereau, C., Boackle, R. J., & Lopes-Virella, M. F. (2006). OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. Journal of lipid research, 47(9), 1975-1983.

Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. Environmental Chemistry Letters, 4(3), 147-157.

Vogler, E. A., & Siedlecki, C. A. (2009). Contact activation of blood plasma coagulation. Biomaterials, 30(10), 1857-1869.

Wissam, Z., Bushra, J., Zein, N., & Saleh, D. (2017). Extracting and studying the antioxidant capacity of polyphenols in dry linden leaves (Tilia cordata). Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 6(3), 258-262.

Wojdyło A, Oszmian´ski J, Czemerys R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry. 105: 940–949.

Zerargui, F., Saffidine, K., Guemmaz, T., Laroui, H., Arrar, L., & Baghiani, A. (2022). Antithrombotic, antihemolitic and analgesic activities of Ephedra alata alanda extracts. Annals of the Romanian Society for Cell Biology, 26(01), 3767-3783.