

N° Réf :.....



Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila

Institut des Sciences et de la Technologie Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de

Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Spécialité: Biochimie appliquée

Thème:

Etude in vitro des pouvoirs antithrombotique et antioxydant du Séné (*Cassia angustifolia vahl*)

Présenté par :

- ANSERI Racha.
- BOUHENNACHE Samir.
- KABOUCHE Omar.

Devant le jury composé de:

- | | |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| - Présidente: MENAKH Mouna | MCB / Centre Universitaire de Mila |
| - Examinatrice: BOUKAZOULA Fatima | MCA / Centre Universitaire de Mila |
| - Promotrice : MANALLAH Ahlem | MAA / Centre Universitaire de Mila |

Remerciements

Avant tout nous remercions Dieu « **ALLAH** » le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour terminer ce travail.

Nous remercions également notre promotrice M^{me} Manallah Ahlem pour nous avoir encadré et dirigé ce travail et pour sa disponibilité et ses conseils.

On tien a remercié avec plus gratitude M^{me} Menakh Mouna d'avoir accepté à présidé le jury de ce mémoire.

On remercie également M^{me} Boukazoula Fatima d'avoir accepté de se joindre à ce jury comme examinatrice.

Un très grand merci au docteur Mermoul qui nous a aidé à réaliser nos travaux pratiques.

Nos remerciement vont également à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin par leurs conseils, leurs suggestions et par leurs encouragements à la réalisation de ce travail.

Je dédie ce travail



À mes parents

À mon frère et mes sœurs

À toute ma famille, proche ou éloignée

Racha

Dédicace

Qui sont les plus chers du monde, mes parents:

A Mon père, pourm'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour.

Père, ce travail est le tien.

A ma mère, voici l'aboutissement de tes nombreuses nuits de prières de ta sagesse et ta générosité pour votre petit fils. Chère mère, ce travail est le fruit de tes efforts.

A mes meilleurs amis merci et reconnaissance : omar , hadil , amir ,asma ,chayema , racha , fatima , ali , youssef , manar . Que dieu vous garde en bonne santé et vous accorde le succès dans votre vie.

Nous remercions Dieu le tout puissant qui nous a permis de mener à bien notre recherche scientifique : Dieu merci.

Nous adressons nos sincères remerciements et notre professeur superviseur Mme Manallah Ahlem pour tous les précieux conseils et informations qu'il nous a fournis et qu'ont contribué à l'achèvement du sujet de notre étude sous ses différents aspects.

En fin de compte, les meilleurs remerciements vont à toute la famille de l'Université Abdelhafid Boussouf, y compris les professeurs de spécialisation et le directeur de l'université.

Samir

Dédicace

A ma mère et mon père

A mon grand père et mes grands-mères

A toute ma famille

Et à tous mes collègues

Omar

Table des matières

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	1
Partie01 : Synthèse bibliographique	
Chapitre 01: Présentation du <i>Cassia angustifolia</i> vahl	
I. Etude de la plante	5
1. 1. Présentation de la famille Fabaceae	5
1.2. <i>Cassia angustifolia</i> vahl	5
1.2.1 Description botanique	5
1.2.2. Nom vernaculaire	7
1.2.3. Position systématique	7
1.2.4. Habitat et répartition géographique	8
1.2.5. Composition chimique de <i>Cassia angustifolia</i>	8
1.2.6. Propriétés organoleptiques de <i>Cassia angustifolia</i>	12
1.2.7. Usage traditionnel et propriétés biologiques	12
1.2.8. Effets indésirables et contre-indications de <i>Cassia angustifolia</i>	13
Chapitre 02: Métabolisme des plantes médicinales	
II. Introduction	15
II.1. Les métabolites primaires	15
II.2. Les métabolites secondaires	15
II.2.1. Composés phénoliques	16
II.2.1.2. Flavonoïdes	18
II.2.1.3. Stilbènes	19
II.2.1.4. Coumarines	19
II.2.1.5. Tanins	20
II.2.1.6. Lignanes	21
II.2.2. Alcaloïdes	22
II.2.3. Terpénoides	22

Chapitre 03: Activité antioxydante et antithrombotique	
III.1.L'oxydation dans le corps humain	25
III.1.1. Physiologie de l'oxydation	25
III.1.2. Physiopathologie de l'oxydation	25
III.1.3. Radicaux libres et Stress oxydatif	25
III.1.3.1. Radicaux libres	25
III.1.3.1.1.Principaux radicaux libres	26
III.1.3.2. Stress oxydatif	27
III.1.3.2.1.Origine et mécanisme du stress oxydatif	28
III.1.3.2.2.Conséquences du stress oxydant	29
III.1.3.2.3. Pathologies liées au stress oxydatif	30
III.1.3.3. Antioxydants	31
III.1.3.4. Polyphénols naturels comme antioxydants	34
III.2. Activité Antithrombotique	34
III.2.1. L'hémostase	34
III.2.1.1.Acteurs de l'hémostase	34
III.2.1.2. Physiologie de l'hémostase	36
III.2.2. Maladies thrombotiques	39
III.2.2.1. Thromboses veineuses	40
III.2.2.1.1. Physiopathologie	40
III.2.2.2. Thromboses artérielles	41
III.2.2.2.1. Physiopathologie	41
III.2.2.3. Traitement des maladies thrombotiques	42
III.2.2.3.1. Antiagrégants	43
III.2.2.3.2. Anticoagulants	43
III.2.2.3.3. Traitement fibrinolytique	44
III.2.2.4. Phytothérapie	44
Partie02 : Etude expérimentale	
Chapitre 01: Matériel et méthodes	
I.Matériel végétal	47
I.1. Echantillonnage	47
I.2. Méthodologie	47

I.3. Analyse qualitative	52
I.3.1. Caractérisation des métabolites primaires	54
I.3.2. Caractérisation des métabolites secondaires	54
I.4. Analyse quantitative	56
I.4.1. Dosage des polyphénols totaux par colorimétrie	56
I.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux	57
I.5. Activités biologiques	58
I.5.1. Etude de l'activité antioxydante	58
I.5.1.1. Test de DPPH	58
I.5.1.2. Activité anti-hémolytique	59
I.5.1.3 Test d'hémolyse	60
I.5.2. Etude de l'activité thrombotique	62
I.5.2.1. Evaluation de l'activité thrombolytique	62
I.5.2.2. Evaluation de l'activité anticoagulante	62
I.5.3. Analyse statistique	66
Chapitre 02: Résultats et discussions	
1. Rendement d'extraction	68
2. Analyse qualitative	69
3. Analyse quantitative	73
3.1. Dosage des polyphénols totaux	73
3.2. Dosage des flavonoïdes	75
4. Activités biologiques	77
4.1. L'activité antioxydante	77
4.1.1. Pouvoir antioxydant du radical libre DPPH	77
4.1.2. Pouvoir anti-hémolytique	79
4.1.3. Test d'hémolyse	80
4.2. L'activité antithrombotique	81
4.2.1. Pouvoir thrombolytique	81
4.2.2. L'activité anticoagulante	83
Conclusion et perspectives	88
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé en français	

Résumé en arabe
Résumé en anglais

Liste des figures

FigureN°	Titre	Page
01	Cassia angustifolia vahl	6
02	Feuilles, gousses, graines et poudre de feuilles de Cassia angustifolia	6
03	Répartition géographique de Cassia angustifolia vahl en inde	8
04	Structure chimique de l’anthracène.	9
05	Structure chimique des dérivés anthracéniques.	9
06	Structure chimique des dérivés hydroxyanthracéniques.	10
07	Structure chimique des sennosides A et B.	11
08	Structure chimique des sennosides C et D	11
09	Structure chimique de glucoside tinnevelline.	12
10	Répartition de différents métabolites secondaires des plantes	15
11	Différentes classes de polyphénols	17
12	Structure chimique de l’acide phénolique : l’acide de hydroxybenzoïque (A), et hydroxycinnamique (B)	18
13	Les principaux aglycones des flavonoïdes	18
14	Quelques exemples des structures chimiques des stilbènes	19
15	Quelques exemples des structures chimiques des coumarines.	19
16	Exemple des tanins hydrolysables.	20
17	Exemple des tanins condensés.	21
18	Exemples des structures chimiques des lignanes. (A) unité de phénylpropane C6-C3. (B)Sauriol A (lien β - β'). (C) rufescidride.	21
19	Structure chimique de la Colchicine et Caféine.	22
20	La structure de la molécule d'isoprène.	23
21	Balance entre les systèmes pro-oxydants et antioxydant.	28
22	Oxydation des radicaux libres.	29
23	Représentation de la balance de l’hémostase.	34
24	Schéma de la structure des vaisseaux.	35
25	Brèche vasculaire et différentes étapes de l’hémostase.	36
26	Les voies de la coagulation plasmatique.	39
27	Développement des thrombis au niveau des sacs valvulaires des veines du membre inférieur.	41

28	Représentation schématique d'une artère sténosée par une plaque d'athérosclérose	42
29	Feuilles du <i>Cassia angustifolia</i> vahl.	47
30	Broyage et tamisage des feuilles de <i>cassia angustifolia</i> vahl	48
31	Protocole d'extraction par décoction des composés phénoliques	49
32	Protocole d'extraction par macération des composés phénoliques	50
33	Extraction par soxhlet	52
34	Délipidation et décantation	52
35	Schéma représentatif du protocole de dosage des polyphénols totaux	57
36	Schéma représentatif du protocole expérimental de dosage des flavonoïdes	57
37	Structure chimique du radical DPPH [•] et de sa forme réduite	58
38	La préparation de l'activité anti hémolytique	60
39	La préparation de l'activité hémolytique.	61
40	Préparation d'un pool plasmatique déplaqueté	63
41	L'appareil de coagulomètre utilisé.	64
42	Réactifs utilisés pour l'évaluation de TCK	64
43	Réactif utilisé pour l'évaluation de TQ	65
44	Réactifs utilisés pour l'évaluation de FIB	66
45	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	73
46	Courbe d'étalonnage de quercétrine	75
47	Histogramme des valeurs des concentrations inhibitrices 50 de l'extrait, VitamineC, BHA et l'acide gallique en (µg/ml).	78
48	Taux d'hémolyse (%) des érythrocytes traités par le H ₂ O ₂ en présence de différentes concentrations d'extrait aqueux	79
49	Processus d'hémolyse par libération de l'hémoglobine.	80
50	Evolution de taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'extrait aqueux.	81
51	Lyse de caillots d'échantillons sanguins des sujets normaux (contrôle positif et négatif et différentes concentrations de solutions à tester).	82
52	Effet thrombolytique de l'extrait à différentes concentrations, exprimé en pourcentage et en présence d'un médicament fibrinolytique.	83
53	Capacité anticoagulante de l'extrait aqueux et lovenox vis-à-vis de la voie endogène.	84
54	Capacité anticoagulante de l'extrait aqueux vis-à-vis de la voie exogène	85
55	Capacité anticoagulante de l'extrait aqueux vis-à-vis le Fibrinogène	85

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	Page
01	Noms vernaculaires de <i>Cassia angustifolia</i> vahl.	7
02	Classification taxonomique de <i>Cassia angustifolia</i> vahl.	7
03	Principaux radicaux libres et leur structure chimique.	26
04	Les principales affections liées à la production des radicaux libres et des EOR.	31
05	Les composés antioxydants majeurs des cellules.	32
06	Nomenclature des facteurs de la coagulation.	38
07	Groupe chimique, réactifs d'identification et indicateurs utilisés.	53
08	Tableau récapitulatif regroupant les rendements des extraits de <i>Cassia Angustifolia</i> vahl.	68
09	Résultats des tests phytochimiques effectués sur les extraits de <i>Cassia angustifolia</i> Vahl.	69
10	Teneur en polyphénols totaux des extraits de la plante <i>Cassia angustifolia</i> vahl.	74
11	Teneurs en flavonoïdes des extraits obtenus de la plante <i>Cassia angustifolia</i> vahl.	76

Liste des abréviations

C.A : Cassia angustifolia.

Abs : Absorbance.

APG: Angiosperms Phylogeny Group.

ASC : Acide ascorbique.

AVK : anti vitamine k.

CAT : La catalase.

C°: Degré Celsius.

FCR : Folin Ciocalteu.

FX : Facteur X.

GSH : Glutathion.

GPx : Glutathion peroxydase.

GSSG : Glutathion oxydé.

HPLC : High Performance Liquid Chromatography.

H: Hydrogen.

H₂O₂: Peroxydes d'hydrogène.

H₃PMo₁₂O₄₀ : Acide phosphomolybdique.

H₃PW₁₂O₄₀: Acide phosphotungstique.

HCL : Acide chlorhydrique.

HOONO : le peroxydite.

CI₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%.

KOH : Hydroxyde de potassium.

mg : Milligramme.

Mg : Magnésium.

MtOH : Méthanol.

EtOH : Ethanol.

CuSO₄: Sulfate de cuivre.

FeCl₃: Chlorure de fer.

H₂SO₄: Acide sulfurique.

I₂ : Diode.

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

NH₄OH : Ammoniaque.

PH : Potentiel d'hydrogène.

PPP : Plasma pauvre en plaquettes.

RL : Les radicaux libres.

ROOH : Hydroperoxyde lipidique.

SOD: Syperoxyde dismutase.

TCK : Temps de céphaline kaolin.

TP : Taux de prothrombine.

TQ : Temps de Quick.

FIB : Taux de fibrinogène.

ADN : Acide ribonucléique.

BHT : Butyl Hydroxyl Toluène.

CE₅₀ : Concentration effective à 50%.

DPPH : 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl.

ERN : Espèces réactives du Nitrogène.

ERO : Espèces réactives de l'oxygène ou oxygénées.

HDL :High density lipoprotein ou lipoprotéine de haute densité.

MCV : Maladies cardio-vasculaires.

MTEV: Maladie thromboembolique veineuse.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

ROS: Reactive oxygen species.

TXB₂:Thromboxane B₂.

EHES : Extrait hydro-éthanolique du Séné.

EAG/mg.EXT : Equivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.

EQ/mg.EXT : Equivalent de quercétine par milligramme d'extrait.

S: Seconde.

h : heure.

T : Temps

µl : Microlitres.

min: Minute.

ml : Millilitre.

% : Pourcentage.

LC-MS : La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse.

INTRODUCTION

GENERALE



Introduction générale

epuis l'antiquité, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition. Qu'est-ce qui les a guidés à employer une plante plutôt qu'une autre? Le hasard? La religion? La superstition? L'expérience, certainement (**Iserin, 2001**).

Malgré le développement de l'industrie pharmaceutique les plantes médicinales occupent toujours une place importante dans le dispositif thérapeutique partout dans le monde. En effet, les remèdes naturels constituent une alternative dans les systèmes de soins primaires.

Les avancées de la médecine ont permis de mieux comprendre la physiologie du corps humain et les réactions chimiques permettant son bon fonctionnement. Dès lors, bon nombre de pathologies ont vu leurs mécanismes de survenue identifiés. L'oxydation, si elle est nécessaire à la vie, peut aussi avoir un effet délétère : le stress oxydant peut entraîner de sévères dommages cellulaires et de nombreuses pathologies telles que la sénescence cellulaire, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, et divers cancers (**Kiran et al., 2023**). Pour se protéger de ce type d'agression, notre organisme produit ou fait appel à une source exogène d'antioxydants (**Desmier, 2016**).

Par ailleurs, Les maladies thrombotiques artérielles ou veineuses constituent actuellement un problème majeur de santé publique et sont associée à une morbidité importante, à une mortalité prématurée et à des coûts économiques élevés (**kunutsor et al., 2020**) c'est pour ça de nombreuses études sont focalisées sur la découverte des agents antithrombotiques naturelles pour la prévention et le traitement de ces maladies vasculaires (**Choi et al., 2022**).

Les plantes médicinales constituent une source inépuisable et importante de substances bioactifs ayant des activités biologiques et pharmacologiques très variées (**Les et al., 2021**). Il a été largement démontré que ces propriétés curatives sont étroitement liées à la présence de centaines de composés bioactifs. Ces composés sont connus sous le nom de métabolites secondaires et constituent une large gamme de biomolécules, telles que les polyphénols, les alcaloïdes, terpènes, etc... (**Neha et al., 2019**).

La présente étude, est consacrée à la valorisation phytochimique d'une plante médicinale de la pharmacopée maritime '*Cassia angustifolia vahl*' appartient à la famille Fabacées et connue localement sous le nom de «Senna makki». Le choix de cette plante est basé sur le fait que cette dernière est surtout reconnue en thérapeutique traditionnelle pour ses propriétés remarquables (traitement de la constipation aiguë, les troubles intestinaux et digestifs, les maladies inflammatoires et respiratoires..).

Il a été mentionné par le *Messenger d'Allah* ﷺ où il a dit : « Je vous recommande, le séné et le sinoute (anis ou le fenouil selon les avis). Ils contiennent tous les deux une guérison contre toutes les maladies, sauf le sam qui est la mort » (Silsilat As-Sahihah/1798).

Pour cela, notre travail vise à atteindre les objectifs suivants:

- Préparation des extraits phénoliques à partir de la partie aérienne de *Cassia angustifolia vahl*.
- Détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes présent dans les extraits de la plante.
- Analyse et caractérisation phytochimique des extraits.
- Évaluation de l'activité antioxydante des extraits in vitro par deux tests (DPPH et le pouvoir anti-hémolytique).
- Évaluation de l'activité antithrombotique des extraits in vitro par plusieurs tests (temps de céphaline-kaolin (TCK), temps de Quick (TQ) et du taux de fibrinogène (FIB), ainsi que le test de pouvoir thrombolytique).

1^{ère} PARTIE

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE



I.ETUDE

ETHNOBOTANIQUE

De Cassia

Angustifolia Vahl



I. Etude de la plante

1. 1. Présentation de la famille Fabaceae

La famille des Fabaceae (Fabacées) également appelée la famille des haricots, des pois ou des légumineuses, est la famille principale du genre *Cassia* et la troisième plus grande famille de plantes à fleurs sur terre (**Asfaw et al., 2021**), appartient à l'ordre des Fabales. Comptant 765 genres et 19500 espèces, elle regroupe, selon la classification phylogénétique APG III (2009), 3 sous-familles : Caesalpinioideae, Mimosoideae et Faboideae. (**Petit., 2011**)

L'origine de cette famille se trouve chez les rosacées à gousse appelées par les premiers botanistes « légume » d'où le nom donné à la famille (**Blaise et al., 2020**), les Fabacées sont représentées par des plantes à port très variable, herbacées annuelles ou vivaces, dressées, lianes ou plantes volubiles, arbustes et même arbres. C'est une famille à répartition cosmopolite, présente dans tous les continents (à l'exception de l'Antarctique), des zones froides à tropicales (**Peirs., 2005 ; Herendeen., 2022**).

Elle représente une très grande famille de plantes économiquement importantes (**Shi et al., 2015**). Les graines de ces espèces constituent une source protéique végétale pour l'alimentation animale et humaine, elle produit également des essences d'exploitation, des plantes ornementales et médicinales (**Shreya et al., 2023**).

1.2. *Cassia angustifolia* vahl

communément appelé senna makki, c'est une espèce de petits arbustes de la famille des Fabacées qui est cultivé commercialement dans le sud de l'Inde, et utilisé dans divers systèmes de médecine indigène contre plusieurs maladies, presque chaque partie de la plante (c'est-à-dire les feuilles, les gousses et leurs graines) a différentes propriétés médicinales et peut être entre dans certain nombre de préparations pharmaceutiques (**Brinckmann et al., 2018**). Il peut être cultivé même dans des conditions salines et pluviales. La culture du séné n'exige pas beaucoup de dépenses en irrigation, fumure, pesticides, protection et autres soins avant et après récolte (**Tripathi., 1999**).

1.2.1 Description botanique

Le séné est un arbuste de 1 à 2 m de haut, à forte racine, parfois buissonnant que l'on trouve dans les pays tropicaux et subtropicaux (**Kumar et al., 2022**). Les tiges sont ligneuses. Les feuilles sont étroites et allongées, longues de 6 centimètres, larges de 1

centimètre et demi, aigues au sommet, minces et d'une belle couleur vert jaunissant à l'air humide. Les folioles sont légèrement asymétriques (5 cm de long sur 2 cm de large), ovales à lancéolées. Les nombreuses fleurs jaunes zygomorphes (3 cm) sont groupées en épis axillaires. Les gousses sont des follicules aplaties et membraneuses, de couleur verte ou brunâtre plus ou moins foncée, longues de 4 à 7 cm sur 1 à 3 de largeur, à contours elliptiques ou réniformes, bivalves et divisées intérieurement en une série médiane de petites loges qui contiennent, chacune, une graine faisant plus ou moins saillie à leur surface. Sa période de floraison est souvent entre mois d'avril à juin (Khurmet al., 2020)



Figure 1: *Cassia angustifolia* vahl (Khan., 2020).



Figure 2 : Feuilles, gousses, graines et poudre de feuilles de *Cassia angustifolia* (khan., 2020).

1.2.2. Nom vernaculaire

Les noms vernaculaires de *Cassia angustifolia* vahl sont présentés dans le tableau suivant:

Tableau 1 : Noms vernaculaires de *Cassia angustifolia* vahl.

langue	Noms
Arabe	العشرق; سنامكي
Français	Séné ; séné de tinnevelly
Anglais	Tinnevelly Senna ; Indian Senna

1.2.3. Position systématique

Selon **Dongarwar et al.(2020)**, la classification botanique de l'espèce *Cassia angustifolia* est présentée dans le tableau suivant

Tableau 2 : Classification taxonomique de *Cassia angustifolia* vahl d'après **Dongarwar et al. (2020)**.

Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophyta
Sous-embranchement	Angiospermae
Classe	Dicotyledoneae
Sous classe	Rosidae
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Sous famille	Caesalpinaceae
Genre	Cassia
Espèce	<i>Cassia angustifolia</i> Vahl

1.2.4. Habitat et répartition géographique

Cassia angustifolia vahl , plante commercialisée sous le nom de 'Tenivelly senna' ou 'Séné indien', est originaire de la péninsule arabe, de la somalie et du Yémen. Les médecins arabes ont utilisé le séné pour la première fois à des fins médicinales au IXe siècle. Il est également utilisé depuis longtemps dans la médecine traditionnelle arabe et européenne, principalement comme cathartique (**Kumar., 2022**). Il a été introduit en Inde au milieu du XVIIIe siècle par des marchands arabes de la région de Tirunelveli au Tamil Nadu. Actuellement, le séné est cultivé en Europe occidentale, en Afrique du Nord et dans les pays d'Asie du Sud-est (**Amrianto et al., 2023**).

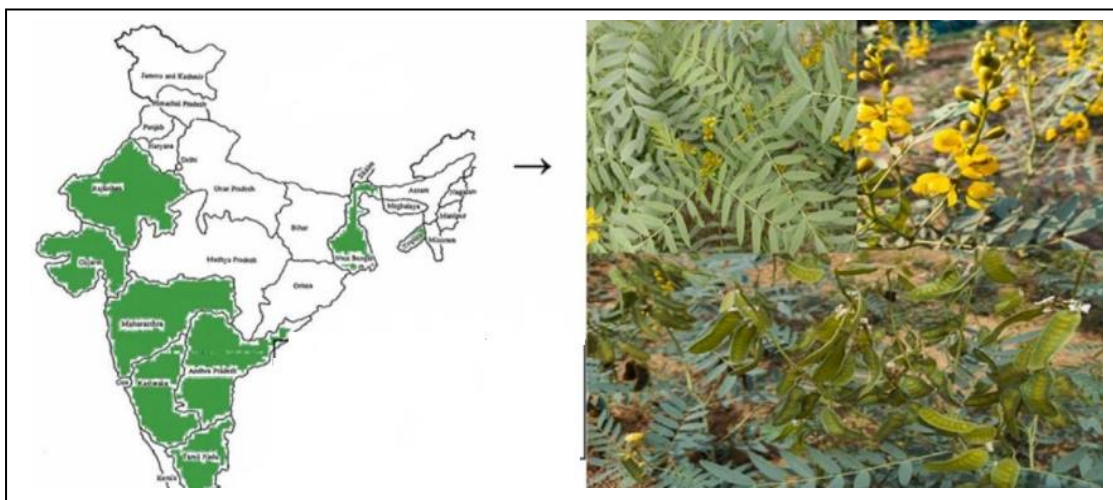


Figure 3 : Répartition géographique de *Cassia angustifolia* vahl en Inde (**kumar et al., 2022**).

1.2.5. Composition chimique de *Cassia Angustifolia* vahl

De nombreuses études phytochimiques ont montré que *Cassia angustifolia* vahl contient un amalgame de métabolites secondaires dans leurs diverses parties.

Les gousses et les feuilles de *Cassia angustifolia* possèdent de nombreux composés chimiques issus du métabolisme secondaire. Les composés majoritaires se forment essentiellement des dérivés anthracéniques. Ces derniers existent sous deux catégories :

- la première, la plus active pharmacologiquement est constituée des dérivés anthracéniques combinés en hétérosides appelés sennosides.

- La deuxième, inactive pharmacologiquement est constituée de dérivés anthracéniques libres (**Rouibi., 2011**)

De plus, le séné renferme 10 à 12 % de matière minérale, des flavonoïdes notamment le kaempférol, du polyol (le pennitol), du mannitol, des saponines, des polysaccharides, des dérivés naphtaléniques issus de la cyclisation d'un poly- β -cétoester, du mucilage, de l'huile essentielle et des polyphénols résines (**Khan., 2020**).

1.2.5.1. Structure chimique des dérivés anthracéniques libres

Les différentes structures de ce groupe sont caractérisées par la présence de composés phénoliques et des dérivés de l'anthracène (fig 4) à différents degrés d'oxydation (anthrones, anthranols, anthraquinones) (**Sahraoui., 2015**).

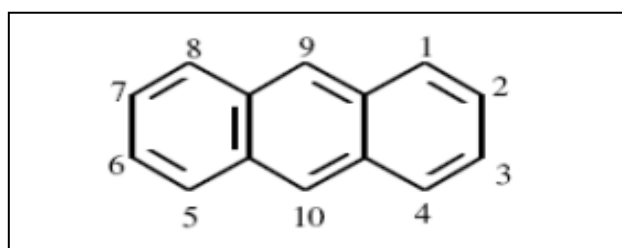


Figure4 : Structure chimique de l'anthracène.

Chez les anthrones le carbone C-10 est un carbone méthylénique. Selon le PH, ces anthrones peuvent être accompagnés de leurs formes oxydées, les anthranols. Au cours de la dessiccation des feuilles et des fruits, deux processus de transformation entrent en jeu : l'oxydation, qui conduit à des hétérosides anthraquinoniques et la dimérisation, qui engendre des hétérosides de dianthrones (**Bruneton.,2009**).

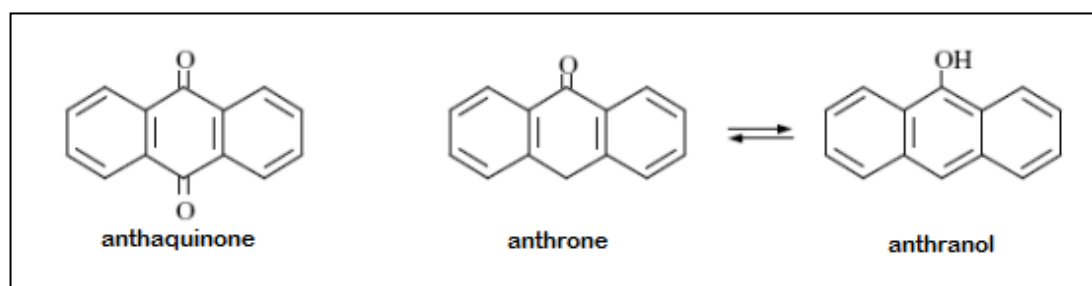


Figure 5 : Structure chimique des dérivés anthracéniques (**Bruneton.,2009**).

Selon que les anthrones constitutives du dimère ainsi formé sont identiques ou différentes, on parle d'homodianthrones et d'hétérodianthrones. Cette dimérisation est

une réaction enzymatique qui ne s'observe que chez le séné quand le séchage est effectué à la température modérée (40°C). Généralement, on désigne souvent anthrones et anthranols par le terme de (formes réduites) et les anthraquinones par celui de (formes oxydée) (**Bruneton., 2009**).

Du fait de l'instabilité des anthrones, les formes libres qui peuvent occasionnellement exister dans les feuilles sèches et les fruits du séné sont toujours des anthraquinones. Les formes réduites, quand à elles, n'existent que combinées c'est-à-dire sous forme d'hétérosides : anthracénosides ou sennosides (**Rouibi.,2011**).

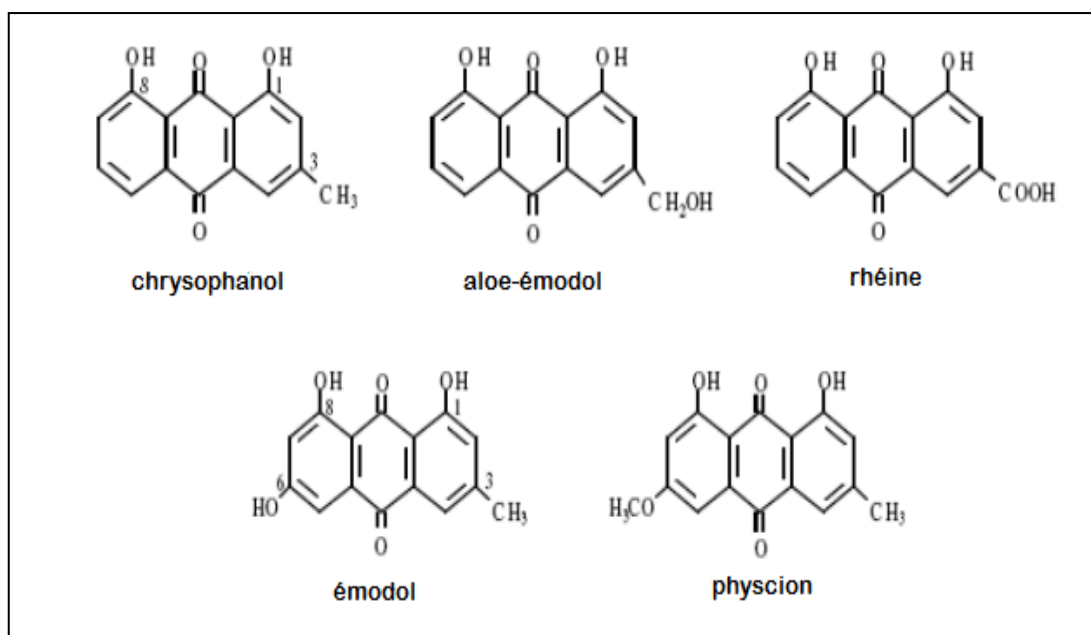


Figure 6 : Structure chimique des dérivés hydroxyanthracéniques (**Rouibi., 2011**).

1.2.5.2. Structure chimique des dérivés anthracéniques combinés en hétérosides ou sennosides.

Les hétérosides sont composés de deux parties :

- Celle qui renferme un sucre, le glucose. Elle exerce un effet favorable sur la solubilité des glucosides ainsi que leur absorption et son transport vers un organe.
- L'effet thérapeutique est déterminé par la seconde partie, la plus active, nommée aglycone ou génine. La liaison du glucose avec la génine engage normalement l'hydrolyse phénolique en C8. Plus de 80% des principes actifs du séné sont représentés par des sennosides A, B, C, D, G et la rhéine-8-glucose. (**Bruneton, .,2009**).

1.2.5.2.1. Les sennosides A et B

Les sennosides A et B sont majoritaires. Ce sont des diglucosides d'une génine homodianthronique symétrique (Bruneton.,2009).

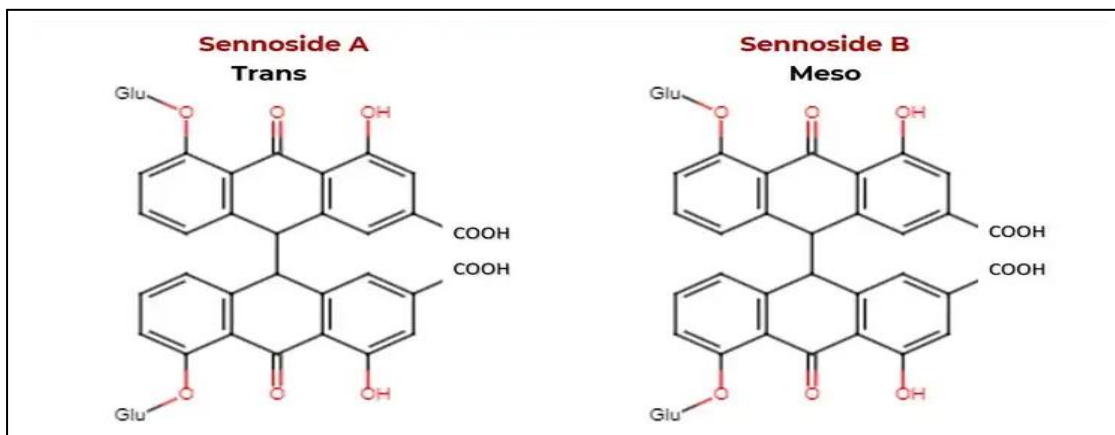


Figure 7 : Structure chimique des sennosides A et B.

1.2.5.2.2. Les sennosides C et D

Les sennosides C et D sont des composés qui ont la même structure chimique mais sont présents en petites quantités (Nilofer et al.,2022). Ce sont des diglucosides d'une génine hétérodianthronique dissymétrique (rhéine-anthrone + aloe-émодol anthrone).

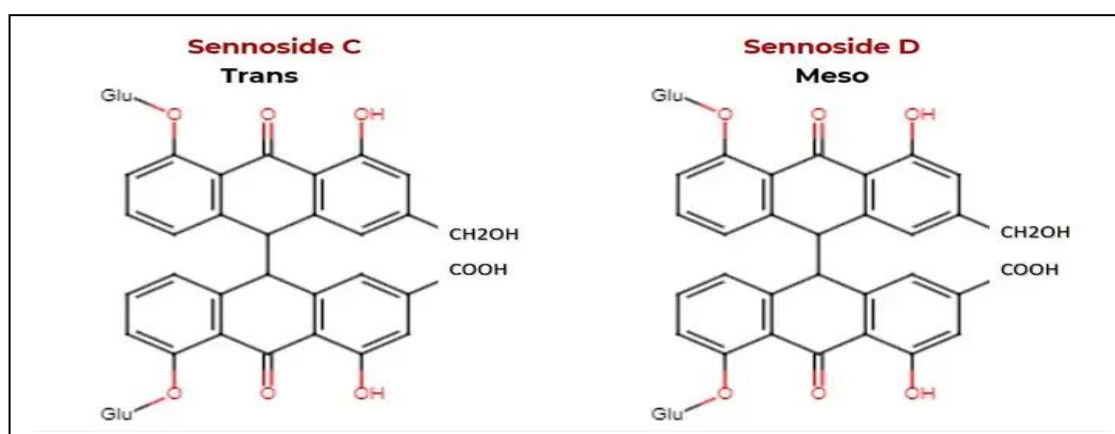


Figure 8: Structure chimique des sennosides C et D

1.2.5.2.3. La Rhéine-8-glucose

C'est un glucoside de naphtalène. Chez *Cassia Angustifolia*, il porte le nom de 6-de glucoside tinnevelline (Qayoom et al., 2023).

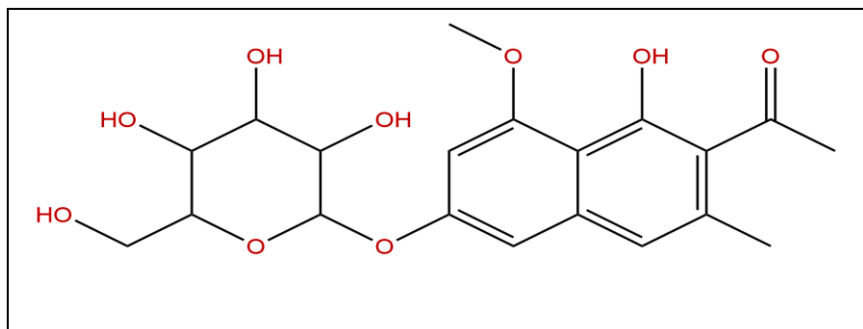


Figure 9 : Structure chimique de glucoside tinnevelline.

1.2.5.3. Localisation des sennosides dans la plante

Il existe des différences notables de composition entre les plantes fraîches et séchées. Dans les plantes fraîches, les composés anthracéniques libres sont majoritaires. Dans la plante séchée, on y trouve les dérivés anthracéniques combinés (**Bruneton.,2009**).

Dans les jeunes racines, on trouve des dérivés anthroniques de type chrysophanol. Dans les racines âgées on trouve souvent les dérivés de type anthraquinone. Dans les graines, les composés actifs sont localisés dans le péricarpe et sont semblables à ceux formés dans les feuilles. Les graines possèdent très peu de sennosides par rapport aux feuilles, mais il a été constaté que les cotylédons de plante de trois jours peuvent contenir des teneurs équivalentes à celles des feuilles. La teneur des sennosides dans les graines varie approximativement de 1.2 à 2.5% chez *Cassia angustifolia*. Dans les feuilles la teneur en sennosides varie de 2.5 à 8% (**Bruneton., 2009**).

1.2.6. Propriétés organoleptiques de *Cassia angustifolia*

La couleur des préparations du séné est jaune faible. Son arôme est unique, son goût est légèrement amer. C'est pourquoi il est recommandé de toujours le prendre en association avec d'autres plantes aromatiques.

1.2.7. Usage traditionnel et propriétés biologiques de *Cassia angustifolia*

Les racines et les parties aériennes de *Cassia angustifolia* sont couramment utilisées depuis l'Antiquité dans la médecine traditionnelle pour leurs propriétés médicinales. Ils sont connus pour leurs vertus anti-constipation, antiacides, antispasmodique. Ils sont utilisés comme remèdes pour traiter de diverses maladies de la peau, l'ulcère gastroduodénal, l'anémie, l'anorexie, les maladies respiratoires, les maladies cardiaques et la migraine (**Balasankar et al.,2013**), le diabète sucré et en tant qu'agents anti-inflammatoires, surtout dans les inflammations urinaires (**Osman et al.,2017 ; Cuellar et al., 2001**), le rhumatisme et la traitement des hémorroïdes.

Les métabolites secondaires du *Cassia angustifolia* confèrent à cette plante plusieurs propriétés biologiques et pharmacologiques. En effet, plusieurs phénols isolés de cette plante possèdent des propriétés analgésiques (**H.El-Morsy., 2013**), antimutagène, antioxydante, anti-obésité et cytotoxique contre des lignées cellulaires humaines de cancer (**Ishtiaq Ahmed et al., 2016**). L'extrait éthanolique de *C. Angustifolia* est caractérisé par un pouvoir antidiabétique, une activité inhibitrice de l'alpha-amylase. (**Kaushalkumar Jani et al., 2020**), et peut réguler les troubles du tractus gastro-intestinal après des opérations abdominales (**Srivastava et al., 2006**). Il possède également une activité anthelminthique, antimicrobienne, et antibactérienne surtout vis-à-vis *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (**Abbas et al., 2020 ; Lal et al., 2022**), et une activités insecticides et larvicides (**Kamaraj et al., 2010**). D'autres propriétés antivirale, anti-pollution ont été rapporté (**Rothan et al., 2014 ; Sydiskis et al., 1991**).

1.2.8. Effets indésirables et contre-indications de *Cassia angustifolia*

L'action laxative ou purgative du séné dépend de la quantité utilisée. Des quantités excessives peuvent causer des coliques intestinales, des vomissements ou nausées, une diarrhée occasionnelle, des crampes abdominales, des hépatites toxiques ou des flatulences.

Ces effets sont rares en cas d'utilisation conforme à la dose recommandée. Cette utilisation doit être de court terme (ne dépassant pas 2 semaines) .Comme pour les autres laxatifs stimulants, le séné est exclu pour les personnes souffrant d'inflammation du côlon tel que la maladie de Crohn, de maux intestinaux d'origine inconnue et de constipation chronique. De même, il n'est pas recommandé pour les personnes victimes d'une forte déshydratation, à cause des carences en sodium et en potassium qu'il peut entraîner, également il est contre-indiqué chez les personnes qui connaissent des troubles cardiaques, chez les femmes enceintes ou allaitantes et chez les enfants âgés de moins de 12 ans.

II. METABOLISME

DES PLANTES

MEDICINALE



II.Introduction

Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes. Elles renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme. On distingue ainsi deux groupes de métabolites: les métabolites primaires et les métabolites secondaires. **(Hartman., 2007)**

II.1. Les métabolites primaires

Les métabolites primaires sont des composés de faible poids moléculaire, communs à toutes les plantes **(Matthias et Kliebenstein., 2020)**. Elles se caractérisent par leur caractère essentiel et vital à la survie de la cellule ou de l'organisme **(Kahlouche., 2014)**.

- 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.
- Les amino-acides représentent une source primaire de construction des protéines **(Kahlouche.,2014)**.

II.2. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés qui ne sont pas nécessaires à la vie d'une cellule (organisme), mais jouent un rôle dans l'interaction de la cellule (organisme) avec son environnement. Ces composés sont souvent impliqués dans la protection des plantes contre les stress biotiques ou abiotiques **(Pagare et al., 2015)**.

Les métabolites secondaires sont composés principalement en trois grandes familles, les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes.

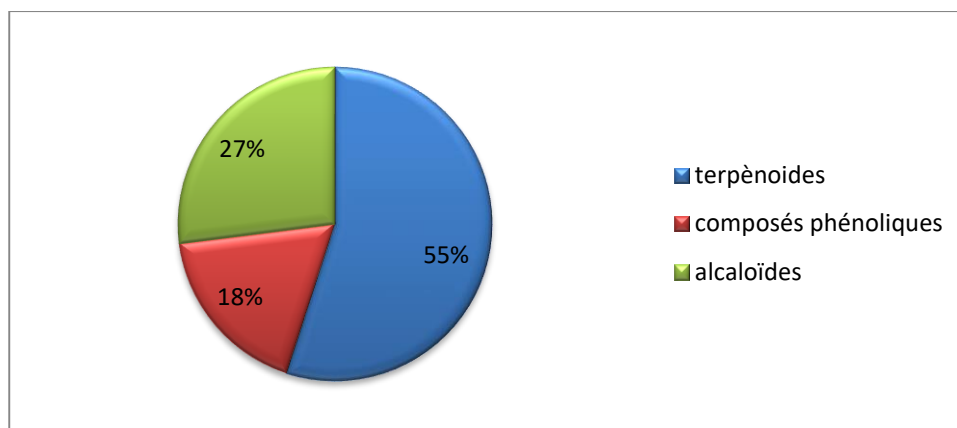


Figure10 : Répartition de différents métabolites secondaires des plantes **(Brahmkshatriya et Brahmkshatriya, 2013)**.

- Les substances phénoliques "Composés aromatiques" comme les flavonoïdes, les coumarines, les tanins, la lignine.
- Les terpènes, constituent le plus grand ensemble des métabolites secondaires avec plus de 22000 molécules. Cette catégorie contient les hormones végétales, les pigments, les stérols, les hétérosides et une grande partie d'huiles essentielles.
- Les alcaloïdes, par exemple la scopolamine, la morphine, La codéine, la caféine, la nicotine, la cocaïne et l'atropine (**Bouhaddouda., 2016**).

II.2.1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques, ou polyphénols sont des phytomicronutriments synthétisés par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. (**Gordon J McDougall., 2017**). Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes mais avec une répartition quantitative qui varient entre les différents tissus. Plus de 8000 structures ont été identifiées (**Waksmundzka-Hajnos et al., 2011**), allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins (**Faller et Fialho.,2010**). Ils sont synthétisés par l'ensemble des végétaux et ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences). Les polyphénols contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) (**Dini et Grumetto., 2022**).

De nombreuses études sont en faveur d'un impact positif de leur consommation sur la santé. En effet, les polyphénols pourraient permettre de prévenir de nombreuses pathologies comme le cancer, les maladies dégénératives, cardio-vasculaires, les troubles inflammatoires et les maladies infectieuses (**Khan et al., 2021**).

L'élément structural fondamental qui caractérise les composés phénoliques est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside...) (**Bruneton, 1999**).

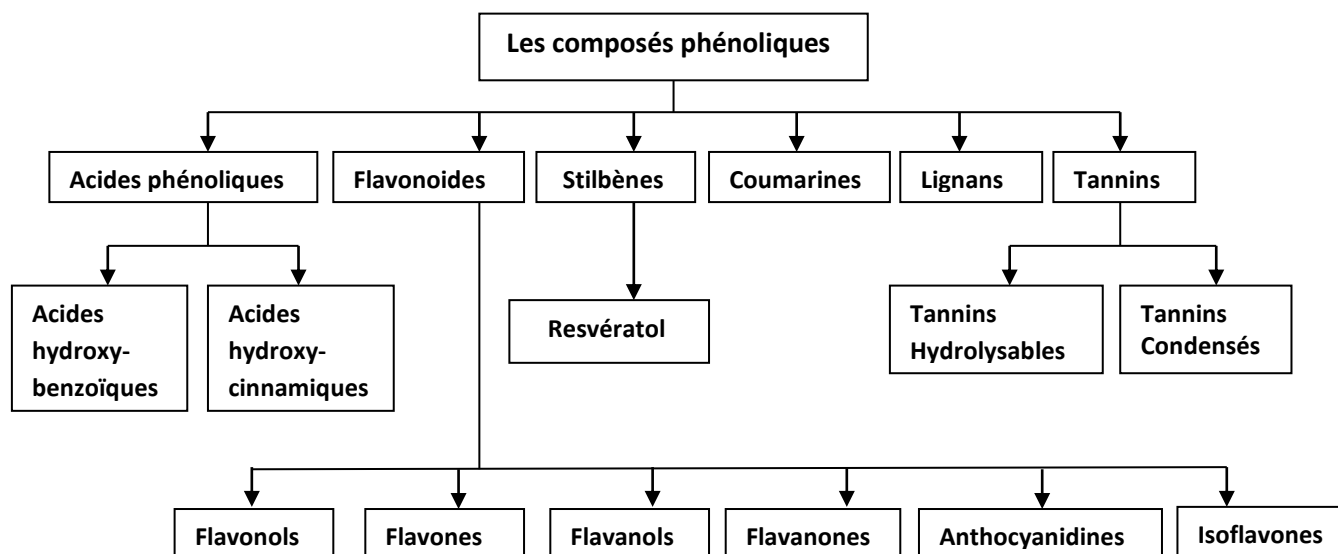


Figure 11 : Différentes classes de polyphénols (Watson, 2018).

II.2.1.1. Acides phénoliques

Cette classe est divisée en deux grands groupes distincts qui sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques.

✓ Acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques sont dérivés de l'acide benzoïque (dérivent par hydroxylation de l'acide benzoïque) et ont une formule de base de type C₆-C₁. Les dérivés substitués des acides hydroxybenzoïques sont les acides phénoliques prédominants dans les plantes. Les acides hydroxybenzoïques qui se produisent fréquemment dans les aliments comme des esters simples avec de l'acide quinique ou du glucose sont : l'acide protocatéchique, vanillique, ellagique, gallique, syringique, salicylique et l'acide gentisique (Călinoiu et Vodnar, 2018).

✓ Les acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure possède un cycle aromatique associé à trois carbones C₆-C₃, par exemple : l'acide caféique, l'acide férulique, p-coumarique (ses isomères o- et m-coumariques), et l'acide sinapique. Ces acides sont rarement présents à l'état libre et existent généralement sous forme d'esters ou de glycosides (Balasundram et al, 2006).

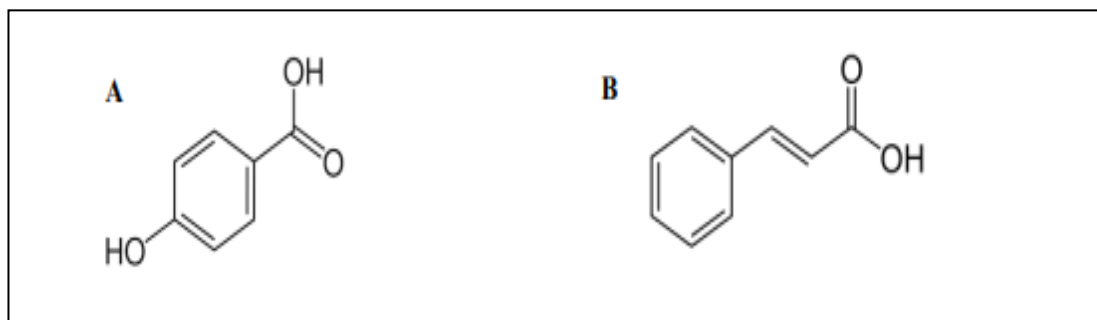


Figure 12: Structure chimique de l'acide phénolique : l'acide de hydroxybenzoïque (A), et hydroxycinnamique (B) (Călinoiu et Vodnar, 2018).

II.2.1.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes Ce sont le groupe le plus répandu et largement distribué de polyphénols végétaux. Ils sont présents dans différents tissus de plantes comme les fleurs, les fruits, les racines, les tiges et les feuilles. Ils forment le plus grand groupe de métabolites secondaires impliqué dans diverses fonctions dans les plantes tel que la coloration des tissus, la défense contre les pathogènes, l'attraction des pollinisateurs...etc. Jusqu'à présent plus de 8000 flavonoïdes ont été identifiés. La structure de base de flavonoïdes est dérivée du corps C15 dans le modèle C6C3C6 constitué de deux cycles aromatiques (A et B) reliés par un pont à 3 carbones qui est habituellement un hétérocycle oxygéné (cycle C). Ils peuvent être subdivisés en plusieurs classes (Figure 13) selon leur variation en structure (Sarma, 2011 ; Tapas et al., 2008).

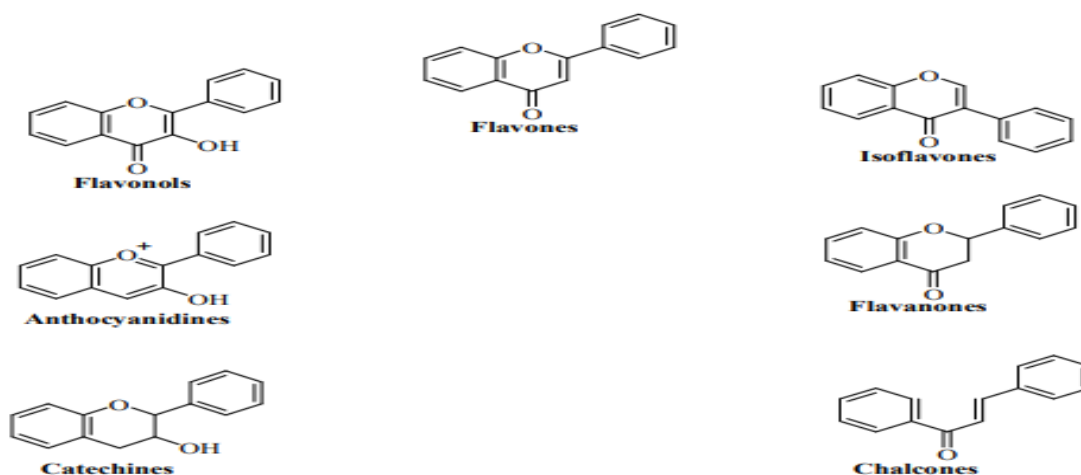


Figure 13 : Les principaux aglycones des flavonoïdes (Bouchouka, 2016).

II.2.1.3. Stilbènes

Les stilbènes ou les stilbénoides sont des polyphénols naturels formés à partir d'une structure comportant deux noyaux benzéniques liés par un pont de deux carbones C6-C2-C6(De Filippis et al., 2019). Ce sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux. Les sources principales des stilbènes sont les raisins, les vins, le soja et les arachides (Crozier et al., 2006).

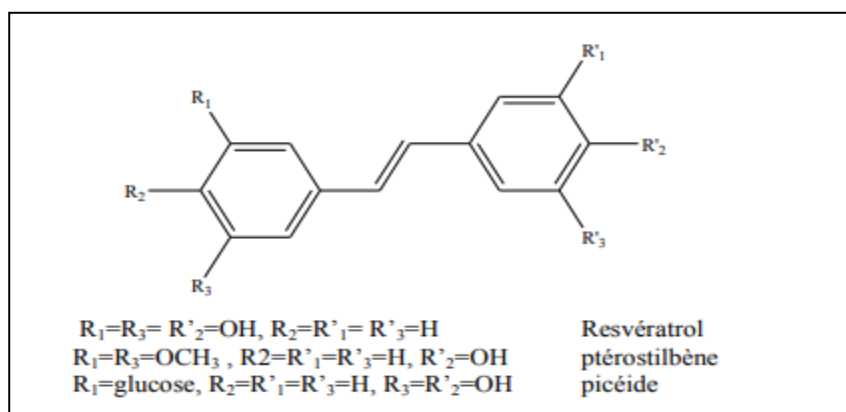


Figure 14 : Quelques exemples des structures chimiques des stilbènes.

II.2.1.4. Coumarines

Ce sont des substances naturelles, organiques et aromatiques constituées de neuf atomes de carbone caractérisées par le noyau 2H-1- benzopyrane-2-one. Les coumarines, très largement distribuées dans le règne végétal, ont la capacité de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Mpondo et al., 2015).

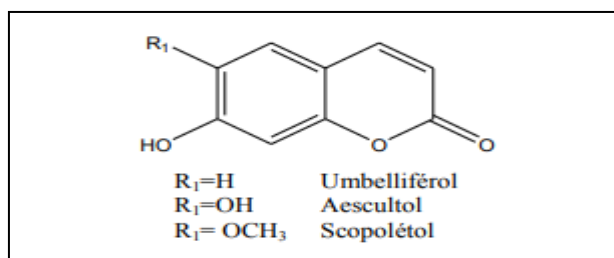


Figure 15 : Quelques exemples des structures chimiques des coumarines.

II.2.1.5. Tanins

Les tanins sont des polyphénols à haut poids moléculaire (500-5000). Leur saveur astringent mais ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Cette aptitude est liée à leur propriété de se combiner et de précipiter avec les protéines, ce qui explique leur tannant. Les tanins sont répandus dans le règne végétal mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les fagacées et les rosacées. L'accumulation de ces molécules dans le végétal s'effectue essentiellement dans toutes les parties de la plante : écorce, bois, feuilles, fruits et racines (**Catier et Roux., 2007**). Deux sous-classes se distinguent encore parmi les tannins : les tannins hydrolysables et les tannins condensés. Cette première sous-classe a une structure de base de polyesters d'acide gallique et d'ellagitannines (acide hexahydroxy-diphénique), avec comme plus illustre exemple l'acide tannique (Figure 16). La seconde sous-classe des tannins condensés correspond aux polymères d'unités catéchiques (Figure 17) (**Bravo, 1998**).

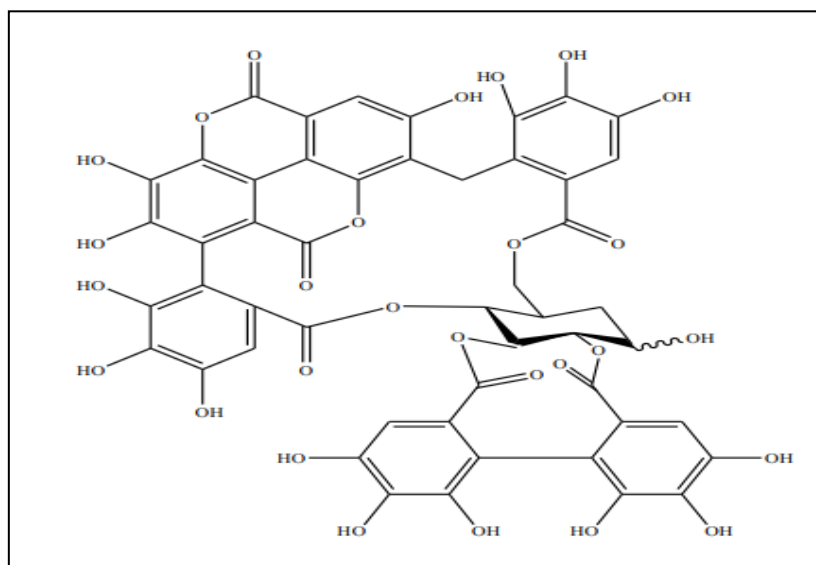


Figure 16: Exemple des tanins hydrolysables.

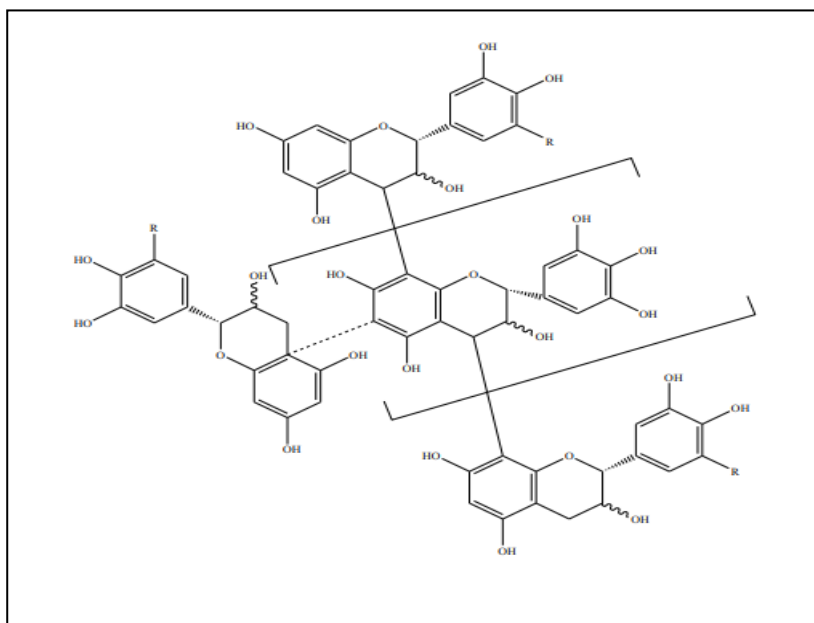


Figure 17: Exemple des tanins condensés.

II.2.1.6. Lignanes

Ce sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques (C6-C3). Leur distribution botanique est large, plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante dix familles (**Bouchouka, 2016**). On les trouve en plus forte concentration dans le lin et les graines de sésame et en faibles concentrations dans les fruits et les légumes (**Peterson et al., 2010**).

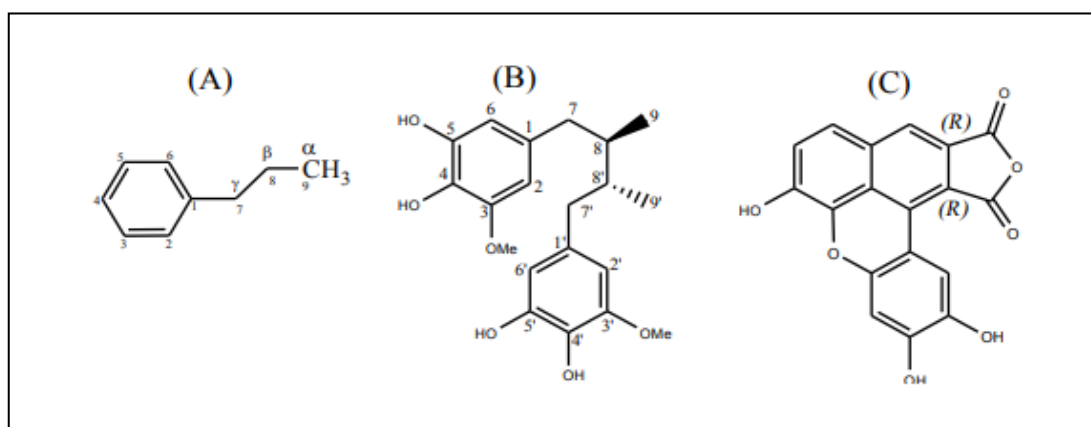


Figure 18 : Exemples des structures chimiques des lignanes. (A) unité de phénylpropane C6-C3. (B) Sauriol A (lien β - β'). (C) rufescidride.

II.2.2. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, avec un degré variable de caractère basique (**Marouf et Reynaud, 2007**). Ils peuvent être localisés dans toutes les parties de la plante mais se retrouvent le plus souvent dans certains organes, comme les organes végétatifs, les téguments de la graine, les tissus périphériques, l'épiderme et couches sous épidermiques des feuilles ... etc. Ils peuvent être spécifiques de la plante OU de l'organe végétatifs (**Bruneton., 1999**).

Les alcaloïdes sont utilisées dans de nombreux médicaments, ils affectent chez l'être humain le système nerveux particulièrement les transmetteurs chimiques tels l'acétyl choline, norepinephrine , acide aminobutyrique (GABA), dopamine et la serotonine. D'autres effets pharmacologiques sont attribués également aux alcaloïdes telles que l'effet analgésique (cocaïne), anti-cholinergique (atropine), anti-malaria (quinine), anti- hypertensive (réserpine), antitussive (codéine), stimulant centrale (caféine), dépressant cardiaque et diurétique narcotique (morphine), anti-tumeur et sympathomimétique (éphédrine) (**Badiga.,2011**).

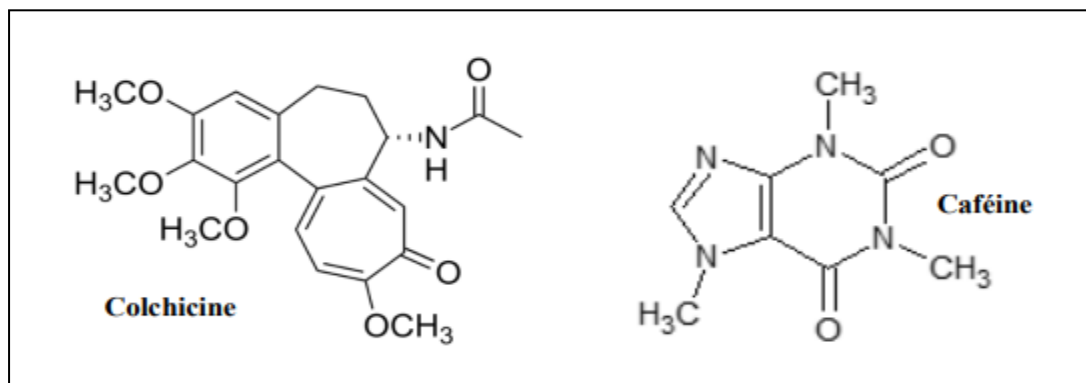


Figure 19: Structure chimique de la Colchicine et Caféine.

II.2.3. Terpénoides

Les terpènes (Terpénoides) représentent la plus grande classe de composés organiques rencontrés dans la nature avec plus de 40 000 structures signalées à ce jour. Sa structure chimique de base est constituée d'une unité isoprène (C₅H₈). Selon le nombre d'unités d'isoprène, les terpènes sont classés en mono-, sesqui- et di-terpènes (C₁₀, C₁₅ et C₂₀, respectivement) (**Sang cho et al., 2017**).

Ces molécules se présentent en forme des huiles essentielles, pigments (carotène), hormones (acide abscissique), des stérols (cholestérol) (Singh et al.,2017).En effet, ils possèdent un large éventail d'activités biologiques, notamment anticancéreuses, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antioxydantes et antiallergiques. (Yang et al.,2020).

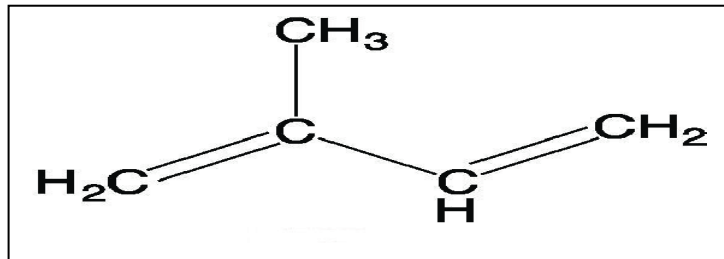


Figure 20 : La structure de la molécule d'isoprène.

III. ACTIVITE
ANTIOXYDANTE ET
ANTITHROMBOTIQUE



III.1. L'oxydation dans le corps humain

III.1.1. Physiologie de l'oxydation

Dans des conditions physiologiques, l'oxygène moléculaire est un élément crucial pour la vie des organismes aérobiques, toutefois il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou encore les espèces oxygénées réactives (EOR). Aux doses faibles, les EOR sont très utiles pour l'organisme et jouent des rôles importants dans divers mécanismes physiologiques tel que la transduction du signal, l'entretien et le fonctionnement de l'organisme ainsi que dans le processus de la fécondation, de la maturation et du mouvement cellulaires (Favier, 2003). Ils jouent aussi un rôle majeur dans la production de médiateurs cellulaires, l'élimination des produits toxiques et la défense contre l'invasion des microbes et des virus, de même que contre les cellules tumorales (Senghor, 2020). Ces espèces réactives participent dans de nombreuses fonctions biologiques. À titre d'exemple le NO joue un rôle dans plusieurs processus physiologiques tel que la protection cardiaque, la régulation de la pression artérielle, la neurotransmission et les mécanismes de défense. Les espèces réactives ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $NO^{\cdot}$) interviennent aussi dans la maturation, l'hyperactivation des spermatocytes et la fusion de spermatocyte avec l'ovocyte. Les espèces réactives oxygénées et azotées participent aussi dans la différenciation cellulaire l'apoptose, l'immunité et la défense contre les micro-organismes (Lemaoui, 2011).

III.1.2. Physiopathologie de l'oxydation

Les EOR deviennent néfastes et toxiques pour l'organisme à des doses excessives. Cette surproduction des EOR au delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydant qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies allant de l'artériosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, les ischémies et le processus du vieillissement (Meziti, 2009).

III.1.3. Radicaux libres et Stress oxydatif

III.1.3.1. Radicaux libres

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif (Benmlih et al., 2012). L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé : espèces réactives de l'oxygène (Merouane et al., 2014).

Les radicaux libres sont électriquement neutres ou chargés (ioniques) et comprennent dans les milieux biologiques l'atome d'hydrogène, le radical hydroxyle, l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée), etc (**Favier, 2003**) (Tableau 3). Les radicaux libres sont des espèces chimiques relativement instables qui jouent un rôle dans l'action de certains traitements anticancéreux, de même qu'à l'origine du vieillissement. Leur structure comprend un électron célibataire qu'ils cherchent à appairer en attaquant et en endommageant les molécules voisines (**Dia, 2019 ; Andrés juan et al., 2021**). L'appellation « dérivés réactifs de l'oxygène » n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit (radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$), monoxyde d'azote ($NO^{\cdot}$),...), et certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante (peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), peroxydinitrite ($ONOO^{\cdot}$)) (**Oueslati, 2017**).

III.1.3.1.1. Principaux radicaux libres

- L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$: La molécule d'oxygène, mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde. Cet anion intervient comme facteur oxydant dans de nombreuses réactions.
- Le radical hydroxyle $OH^{\cdot}$: Il est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique.
- Le radical peroxyde: $ROO^{\cdot}$.
- L'oxygène singulet : forme « excitée » de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité.

Tableau 3: Principaux radicaux libres et leur structure chimique (**Phaniendra et al., 2015**).

Radicaux libres (nomenclature)	Structure chimique
Radical hydroxyle	$OH^{\cdot}$
Radical hydroperoxyde	$HOO^{\cdot}$
Radical peroxyde	$ROO^{\cdot}$
Radical alkoxyde	$RO^{\cdot}$
Peroxyde d'hydrogène*	H_2O_2
Peroxydinitrite	$ONOO^{\cdot}$
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$

* Espèce active de l'oxygène, non radicalaire.

La grande majorité des radicaux libres sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (prolifération cellulaire normale, métabolisme normal, état redox normal pour l'expression de gènes) (Defraigne et al., 2008). Ils jouent également un rôle important dans la production de médiateurs cellulaires, l'élimination des produits toxiques et la défense contre l'invasion des microbes et des virus, ainsi que contre les cellules tumorales. Les radicaux libres peuvent être aussi impliqués dans la pathogenèse des maladies qui peuvent éventuellement conduire au dérèglement de l'organisme et à son vieillissement (Senghor, 2020).

III.1.3.2. Stress oxydatif

Lorsque l'un des systèmes protectifs de l'organisme contre la toxicité des radicaux libres (RL) montre un échec, l'action des radicaux libres devient incontrôlable, ce qui conduit à des dommages au niveau des molécules, des cellules, des organes et potentiellement à la mort de l'organisme (Durackova et al, 2008). La conséquence des effets nocifs des RL et des métabolites réactifs est dite «stress oxydant». Ce terme est défini initialement comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants (Figure 21) en faveur des premiers (Chiha et al., 2016). Cette définition ne signale aucun effet délétère d'un tel changement sur la fonction des tissus et n'indique pas l'origine de ce déséquilibre s'il est dû à une augmentation de la production des oxydants ou à une diminution de la capacité réductrice des tissus. Selon les points de vue actuels, le stress oxydant peut être défini comme étant un déséquilibre entre la production et l'élimination des métabolites réactifs de l'oxygène et du nitrogène en faveur de leur production conduisant à des dommages potentiels et à des dégâts cellulaires irréversibles (Kehili, 2016, Smaga et al., 2015).

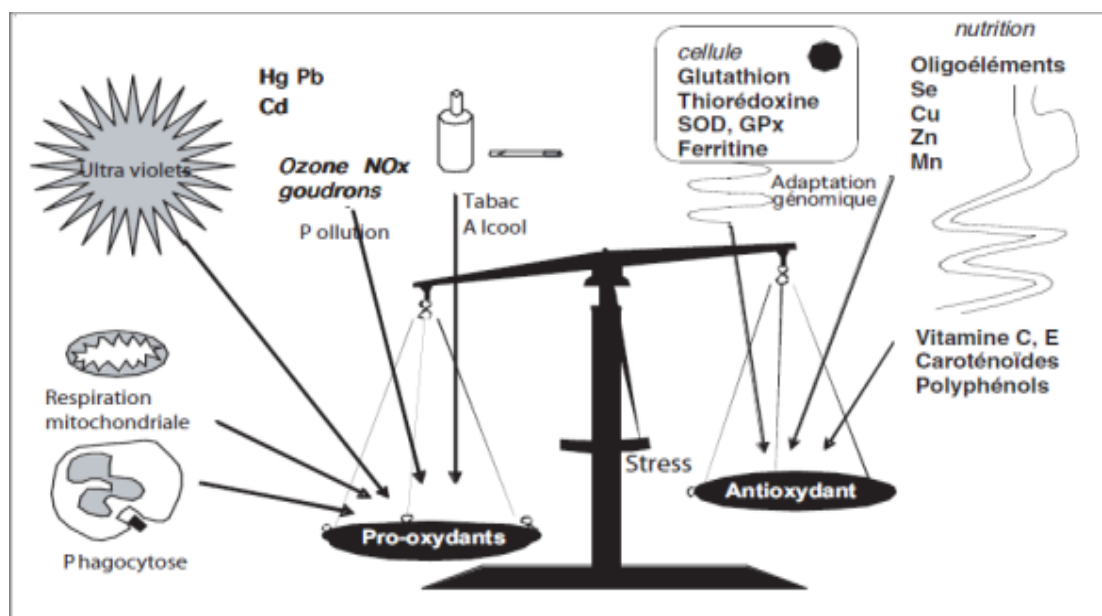


Figure 21 : Balance entre les systèmes pro-oxydants et antioxydant (Favier et al., 2006).

Les mécanismes d'oxydation des composés insaturés biologiques (acides gras, caroténoïdes, polyphénols...) sont souvent des réactions radicalaires avec l'oxygène moléculaire et présentent trois phases principales (Marc et al, 2004).

Une phase d'initiation dont l'intervention d'un radical hydroxyle $\text{HO}^\bullet$, qui arrache un atome d'hydrogène en position. Une phase de propagation ou il se forme un radical peroxyde ($\text{ROO}^\bullet$) qui déstabilise une deuxième molécule d'acide gras polyinsaturés AGPI conduisant à un hydroperoxyde lipidique (ROOH) et à un nouveau radical, assurant ainsi la propagation du processus et enfin une phase de terminaison, où se recombinent les différents radicaux pour aboutir à des composés stables. Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes des cycles redox, produites dans l'organisme, tels que l'oxydation des molécules comme les quinones. Ce cycle redox a lieu soit spontanément, soit surtout lors de l'oxydation de ces composés au niveau du cytochrome P450. Les rayonnements ainsi que les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi capables de générer des radicaux libres (Favier, 2003).

III.1.3.2.1. Origine et mécanisme du stress oxydatif

Face à la rupture de l'équilibre de la balance pro-oxydants et antioxydants l'organisme peut être confronté à une production beaucoup trop importante de radicaux libres pour être maîtrisée, Ceci sera observée dans les intoxications

aux métaux lourds, dans l'irradiation, dans les ischémies/reperfusions suivant des thromboses. La rupture d'équilibre peut provenir d'une défaillance nutritionnelle ou de la carence en un ou plusieurs des antioxydants apportés par la nutrition comme les vitamines ou les oligo-éléments, Enfin, la mauvaise adaptation peut résulter d'anomalies génétiques responsables d'un mauvais codage d'une protéine soit enzymatiquement antioxydante soit synthétisant un antioxydant (comme le gamma glutamyl synthétase produisant le glutathion), soit régénérant un antioxydant, soit couplant la défense à l'énergie (comme la G6PD), soit d'un promoteur de ces mêmes gènes que la mutation rendra incapable de réagir à un excès de radicaux. Généralement le stress oxydant sera la résultante de plusieurs de ces facteurs et se produire dans un tissu et un type cellulaire bien précis, objet de la défaillance et non pas dans tout l'organisme (Senghor, 2020).

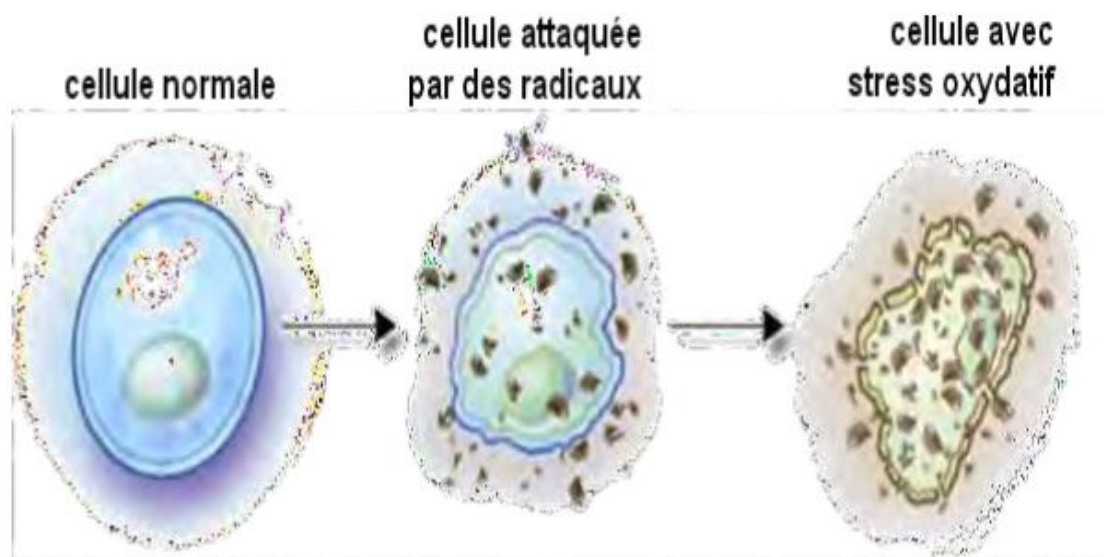


Figure 22 : oxydation des radicaux libres (Senghor, 2020).

III.1.3.2.2. Conséquences du stress oxydant

En cas de stress oxydatif, une partie des RL échappe au système de contrôle et vont donc pouvoir attaquer des cibles cellulaires (Sall, 2018). Les radicaux libres provoquent la peroxydation des lipides membranaires, altérant la perméabilité des membranes, et la structure des lipoprotéines. Les radicaux libres entraînent également une rigidité de la membrane augmentant à perméabilité. Ils provoquent la dénaturation et l'inactivation des protéines (oxydation des acides aminés, désamination en dérivés carbonylés, fragmentation des chaînes polypeptidiques). Certaines protéines peuvent

au contraire être activées après modifications, comme pour certains facteurs de transcription. Au niveau de l'ADN, de nombreuses lésions sont induites par les RLO. Les bases de l'ADN sont en effet très sensibles aux RLO, qui induisent la formation de nombreux dérivés, par addition, oxydation ou fragmentation. **(Hininger)**

L'équilibre de la balance pro-antioxydante est important pour l'homéostasie de la cellule. En effet, lorsque sa toxicité est maximale, le stress oxydant peut conduire à la mort cellulaire. Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies **(Rajendran et al., 2014)**. La multiplicité des conséquences médicales de ce stress ne doit pas nous surprendre car il sera, selon les maladies, localisé à un tissu (cataracte) et des types cellulaires particuliers, mettra en jeu des espèces radicalaires différentes et sera associé à d'autres facteurs variables et à des anomalies génétiques spécifiques d'un individu.

Par la création de molécules biologiques anormales et la surexpression de certains gènes, Selon Ismail et al (2010), le stress oxydatif sera la cause initiale essentielle de plusieurs pathologies parmi lesquelles l'athérosclérose, vieillissement accéléré, cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu. Ainsi les relations entre stress oxydant et cancer s'avère très étroites, les radicaux libres intervenant dans l'activation des procarcinogènes en carcinogènes, créant des lésions de l'ADN, amplifiant les signaux prolifération et inhibant les antioncogènes comme P53.

Le stress oxydant sera aussi un des facteurs potentialisant la genèse de maladies plurifactorielles telles le diabète, la maladie d'Alzheimer les rhumatismes et les maladies cardio-vasculaires **(Hininger)**.

III.1.3.2.3. Pathologies liées au stress oxydatif

De nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de différentes maladies humaines, allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète (Tableau 4). Le rôle du stress oxydant a été également évoqué même dans des processus physiologiques tel que le vieillissement. De plus, la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux avec

une diminution de l'efficacité des systèmes de réparations et de dégradations des constituants oxydés (**Benslama, 2020 ; Pizzino et al., 2017**).

Tableau 4 : Les principales affections liées à la production des radicaux libres et des EOR.

Pathologie	Références
Diabète	(Asmat et al., 2015)
Cancer	(Pizzino et al., 2017)
Troubles neurodégénératifs	(Niedzielska et al., 2015)
Maladies cardiovasculaires	(Dubois-deruy et al., 2020)
Maladies inflammatoires	(Hussain et al., 2016)
Arthrite rhumatoïde	(Flores et al., 2016)
Maladies respiratoires	(Santus et al., 2014)
Vieillesse	(Liguori et al., 2018)
Athérosclérose	(Khosravi et al., 2019)
Maladies rénales	(Gyuraszova et al., 2020)

III.1.3.3. Antioxydants

Il peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (**Cano et al., 2006**). C'est une molécule qui est capable de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permet de maintenir au niveau de la cellule et de l'organisme des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres (**Azat Aziz et al., 2019**).

En effet, les cellules possèdent un ensemble complexe de défenses anti-oxydantes. Celles-ci peuvent être divisées en systèmes non enzymatiques, apportés par une

alimentation saine et équilibrée sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque. Deplus, certains oligoéléments tels que le sélénium, le cuivre et le zinc, cofacteurs des enzymes antioxydantes et des systèmes enzymatiques constitués d'enzymes (superoxyde dismutase (SOD), catalase et glutathion peroxydase (GPX)), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases (Tableau 5)(**Fettah, 2019**)

Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extra cellulaires (**Chiha et al.,2016**).

Tableau 5 : Les composés antioxydants majeurs des cellules (**Benabed, 2018**).

Catégorie	Structure	Site	Actions
Systèmes enzymatiques			
Superoxyde dismutase (SOD)	Cu/Zn SOD	Le cytosol aussi le noyau	Dismutation d'O ₂ ⁻ .enH ₂ O ₂ .
	MnSOD	La mitochondrie	
	CuSOD	Le plasma	
Catalase	Homoprotéine tetramérique	Peroxisomes	Dismutation de l'H ₂ O ₂ et réduction de l'éthyl et le méthyl hydroperoxyde
Cycle redox de GSII			
GSH peroxydase	Selenoprotéine	Cytosol, aussi la mitochondrie	Réduction d' H ₂ O ₂ et autres hydroperoxydes (peroxydes de lipides, produits de lipoxygenase)
GSH réductase	Protéine dimérique	Cytosol, aussi la mitochondrie	Réduction de disulfides à faible poids moléculaire

Composés liposolubles			
α -tocophérol (Vitamine E)	Vitamine liposoluble	Fluides extracellulaires	Conversion d' $O_2^{\cdot-}$ et $\cdot OH$ et les radicaux peroxy des lipides en des formes moins réactives
β -carotène	Précurseur de la vitamine A	Membranes	Piégeage d' $O_2^{\cdot-}$, et réagit directement avec les radicaux peroxy
Bilirubine	Produit du catabolisme d'hémoprotéine	Sang, tissus	Réagit avec $ROO^{\cdot}$
Composés hydrosolubles			
Acide ascorbique (Vitamine C)	Vitamine hydrosoluble	Large distribution dans les liquides intra et extracellulaires	Piégeage direct d' $O_2^{\cdot-}$, et $\cdot OH$, neutralise les oxydants des neutrophiles stimulés
Acide urique	Base purine oxydée	Large distribution	Piégeage d' $OH^{\cdot}O_2^{\cdot-}$ prévient l'oxydation de la vitamine C, se lie aux métaux de transition
Glucose	Carbohydrate	Large distribution	Piégeage d' $\cdot OH$
Cystéine	Acide aminé	Large distribution	Réduction de plusieurs composés organiques
GSH (glutathion)	Tripeptide	Intracellulaire	Réaction direct avec $O_2^{\cdot-}$, et $\cdot OH$ et les radicaux libres organiques

La réaction d'oxydation est souvent une réaction en chaîne, les antioxydants bloquent cette chaîne et empêchent ainsi les radicaux libres d'attaquer les cellules du corps. Les antioxydants vont se lier aux radicaux libres et réalisent une réaction

d'oxydation avec eux, ce qui va les rendre inoffensifs et donc rendre impossible leurs oxydations par les protéines ou les acides gras (**Kraza, 2021**).

III.1.3.4. Polyphénols naturels comme antioxydants

Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. Leurs structures leur confèrent une activité antioxydante et anti-radicalaire aussi importante (**Lezoul, 2021 ; Apak et al 2007**). Ils peuvent agir en tant qu'agents réducteurs, donneurs d'hydrogène, chélateurs de métaux et piègeurs d'oxygène singulet (**Ezez Asfaw.,2022**).

III.2. Activité Antithrombotique

III.2.1. L'hémostase

L'hémostase concerne l'ensemble des mécanismes biochimiques et cellulaires qui concourent à la prévention et à l'arrêt des saignements, comme en cas de lésion vasculaire, et d'un autre côté préviennent et régulent la formation d'un caillot et sa dissolution (**Batty et al., 2010**).

L'hémostase est un processus localisée et rapide. Elle est souvent représentée comme une balance en état d'équilibre. Toute rupture de l'équilibre fait pencher la balance soit vers le risque thrombotique (Thrombose veineuse, AVC, Embolie pulmonaire...) soit vers le risque hémorragique (allant de la simple pétéchie à l'hémorragie mortelle) (Fig 23) (**Amiral, 2020**).

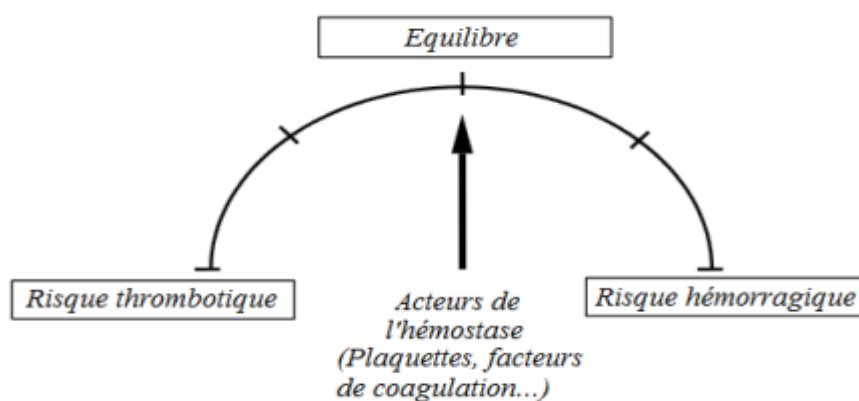


Figure 23 : Représentation de la balance de l'hémostase (**Gibout.,2014**).

III.2.1.1. Acteurs de l'hémostase

Quatre acteurs majeurs interviennent dans l'hémostase primaire : la paroi vasculaire, les plaquettes, le facteur Willebrand et le fibrinogène.

III.2.1.1.a. Paroi vasculaire

La paroi vasculaire est organisée de l'extérieur vers l'intérieur selon 3 tuniques (Fig 24), la tunique externe ou adventice est constituée essentiellement de tissu conjonctif et est riche en collagène et en fibres élastiques, elle permet la motricité nerveuse et l'apport nutritif aux vaisseaux. La média constitue la charpente musculo-élastique des vaisseaux. Enfin l'intima, en contact avec le sang, possède une monocouche de cellules endothéliales et une structure sous-endothéliale (**Sinegre, 2021**)

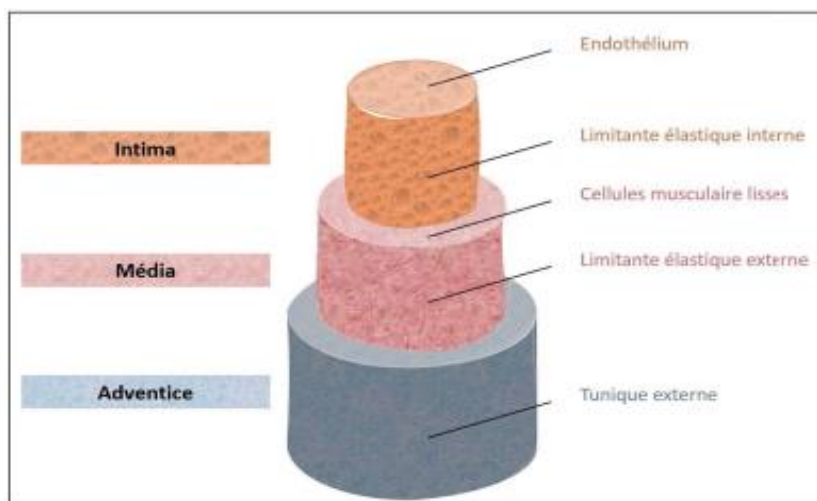


Figure 24 : Schéma de la structure des vaisseaux (**Sinegre., 2021**).

III.2.1.1.b. Plaquettes (Thrombocytes)

Les thrombocytes ou plaquettes sont les cellules de l'hémostase primaire. Ils sont formés dans la moelle osseuse à partir de la fragmentation cytoplasmique des mégacaryocytes. Leur durée de vie s'étend de 7 à 10 jours, elles circulent dans le sang à une concentration allant de 150 à 400 G/L; Elles sont également stockées dans la rate et le foie ou elles sont éliminées par les hépatocytes ou les macrophages (**Quach et al., 2018**).

III.2.1.1.c. Facteur de von Willebrand (FvW)

C'est une glycoprotéine multimérique synthétisée par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes, et stockée respectivement dans les granules alpha et dans les corps de Weibel-Palade. Le facteur de Willebrand est principalement éliminé par les macrophages du foie et de la rate. Dans la circulation sanguine, dans des conditions de flux laminaire, il circule sous une forme globulaire peu affine pour les plaquettes (**Connie et al., 2019**).

III.2.1.1.d. Fibrinogène

Le fibrinogène est une glycoprotéine soluble hexamérique de 340 kDa¹⁷. Sa synthèse est principalement hépatique. En situation physiologique, le fibrinogène a un taux plasmatique, chez l'adulte, compris entre 2 et 5mg/L¹⁷. On le retrouve dans le plasma et les granules alpha. Aussi nommé le facteur I de la coagulation (**Denizot, 2020**). Il joue un rôle dans l'hémostase primaire et la coagulation, dont il est le substrat final. Lors de l'hémostase primaire, en présence de calcium, il est le cofacteur participant à l'agrégation plaquettaire par formation de ponts interplaquettaires. Tant que les plaquettes sont liées entre elles par le fibrinogène, l'agrégat formé est fragile car le fibrinogène est soluble (**Prevot, 2016**).

III.2.1.2. Physiologie de l'hémostase

En cas de rupture de la paroi d'un vaisseau sanguin, trois phases étroitement liées sont classiquement décrites dans la littérature (Fig25): l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse (**Ponsen, 2019**).

- L'hémostase primaire : ferme la brèche vasculaire par un "thrombus blanc" (clou plaquettaire).
- La coagulation : qui consolide ce premier thrombus en formant un réseau de fibrine emprisonnant des globules rouges (thrombus rouge).
- La fibrinolyse : permet la destruction des caillots, ou la limitation de leur extension (**Hyeulle, 2010**).

Ces trois étapes sont initiées simultanément dès que le processus d'hémostase est enclenché (**Schved, 2007**).

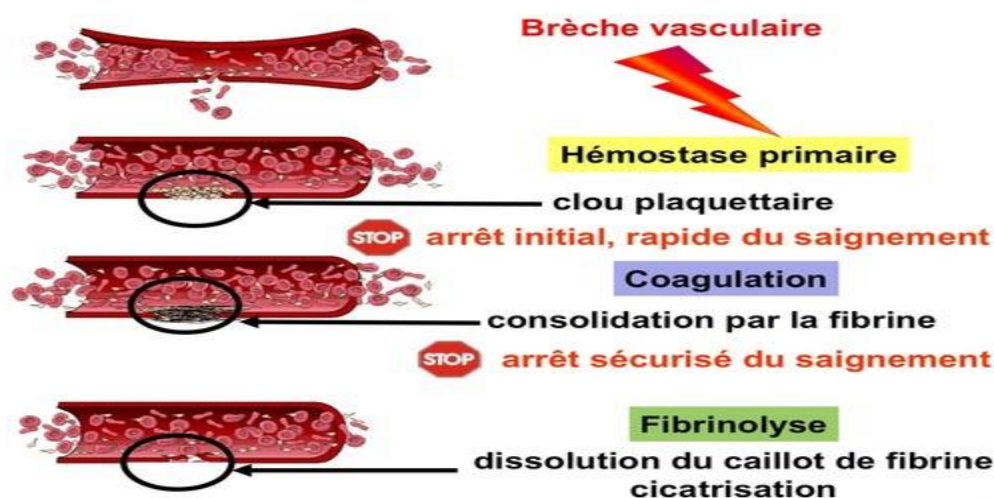


Figure 25 : Brèche vasculaire et différentes étapes de l'hémostase.

III.2.1.2.1. L'hémostase Primaire

L'hémostase primaire est la première étape du processus de réparation tissulaire. Elle correspond à l'ensemble des interactions complexes entre la paroi vasculaire, les plaquettes et les protéines adhésives du sous-endothélium lors d'une brèche vasculaire. Ce phénomène arrête le saignement par formation d'un caillot ou clou plaquettaire (**Harif, 2015**). Elle comprend essentiellement deux temps : temps vasculaire et temps plaquettaire.

III.2.1.2.2. Coagulation plasmatique

La coagulation plasmatique est la deuxième étape de l'hémostase. Elle est constituée d'une activation en cascade de protéines circulant sous forme zymogène (facteurs II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII) (Tableau6), qui acquièrent une activité enzymatique de type sérine-protéase (facteurs II activés ou IIa, Va, etc). Ces facteurs circulants sont synthétisés au niveau du foie. Cette cascade aboutit à la transformation du fibrinogène (facteur I) soluble en fibrine insoluble. Parmi ces facteurs, certains nécessitent pour être actifs d'être synthétisés en présence de vitamine K (facteurs vitamines K dépendants : II, VII, IX, X). La coagulation est initiée par le contact entre le facteur tissulaire et le facteur VII, qui s'active en facteur VIIa . Le facteur tissulaire (FT) est un récepteur exprimé par de nombreuses cellules de l'organisme, mais est absent physiologiquement du secteur vasculaire. Il peut être exprimé par les cellules endothéliales à l'occasion d'une agression ou à la surface des monocytes activés lors d'une infection par exemple. Le couple FVIIa-FT est capable d'activer le FX en FXa, mais aussi le FIX en FIXa qui activera ensuite le X. La génération du Xa nécessite la liaison du X à des phospholipides anioniques, fournis par la membrane plaquettaire. Elle est fortement accélérée par le VIIIa. Les facteurs antihémophiliques A et B (FVIII et FIX) garantissent donc la formation de FXa en quantité suffisante, et sont indispensables à l'hémostase normale. Une autre boucle d'amplification est créée par l'activation du FXI par la thrombine (IIa). Le XIa ainsi formé peut activer le FIX (**Meyer et al., 2008 ; Nony, 2018**). Le système de la coagulation fait intervenir généralement trois voies : une voie extrinsèque, une voie intrinsèque et autre commune (Fig26).

Tableau 6 : Nomenclature des facteurs de la coagulation (**Meyer et al.,2008**).

Facteur	Synonyme	Voie de coagulation*	Classe fonctionnelle	Activité
Prékallicréine (PK)	Facteur Fletcher	I		Fonctionne avec HMWK et FXII
Kininogène de haut PM (HMWK)	ct	I		Cofacteur d'activation du FXII par kallicréine Cofacteur d'activation FXI par FXIIa Précurseur de la bradykinine
FI	Fibrinogène (Fg)	I et E		Clivé par la thrombine en fibrine
*FII	Prothrombine (PT)	I et E	Sérine protéase	Activé à la surface de plaquettes par complexe PT
FIII	Facteur tissulaire (TF)	E	Cofacteur	Cofacteur du FVII
FIV	Calcium	I et E		
FV	Proaccéléline	I et E	Cofacteur	Activé par thrombine Va est cofacteur de l'activation FII par FXa
FVI	Accéléline	I et E	Cofacteur	Synonyme de FVa
*FVII	Proconvertine	E	Sérine protéase	Activé par thrombine
FVIII	Facteur antihémophilique A	I	Cofacteur	Activé par thrombine FVIIIa = cofacteur d'activation FX par FIXa
*FIX	Facteur antihémophilique B = F. Christmas	I	Sérine protéase	Activé par FXIa
*FX	F. Stuart	I et E	Sérine protéase	Activé par le complexe ténase et par VIIa - TF
FXI	Plasma thromboplastine antécédent (PTA)	I	Sérine protéase	Activé par FXIIa
FXII	F. Hageman	I	Sérine protéase	Activé par HMWK et kallicréine
FXIII	F. stabilisant de la fibrine	I et E	Transglutaminase	Activé par thrombine Stabilise le caillot de fibrine

III.2.1.2.2.a. Voie extrinsèque

Ou coagulation exogène, est déclenchée par la fixation du facteur tissulaire (FT), ou thromboplastine tissulaire, sur le facteur VII pour former le complexe FT-VIIa qui active à son tour le facteur X. Le FT n'est pas une protéine plasmatique : on le retrouve sur la face externe de la membrane cytoplasmique de plusieurs cellules, comme les fibroblastes ou certaines cellules de la région sous-endothéliale des parois vasculaires. Le complexe FT-VIIa active également le facteur IX de la voie intrinsèque (**Nizamaldin et al., 2012**).

III.2.1.2.2.b. Voie intrinsèque

Ou coagulation endogène, le complexe FT/Facteur VII activé est également capable d'activer le facteur IX ou facteur anti-hémophilique B. Le Facteur IXa se fixe à la surface des phospholipides en présence de facteur VIIIa (facteur anti-hémophilique A active) pour former en présence de calcium un complexe enzymatique: le complexe Ténase activateur du FX qui rejoint la voie de la coagulation initiée par le FT(**Meyer et al., 2008**).

III.2.1.2.2.c. Voie commune

La voie commune de la coagulation se fait par une série de réactions enzymatiques visant à transformer le fibrinogène en fibrine (**Boutgourine, 2019**). Grâce au facteur

X activé, la prothrombine (facteur II) sera activée en thrombine qui polarisera le fibrinogène (facteur I) en filaments de fibrine insoluble et activera le facteur XIII qui à son tour stabilisera le caillot sanguin (Piquard, 2019).

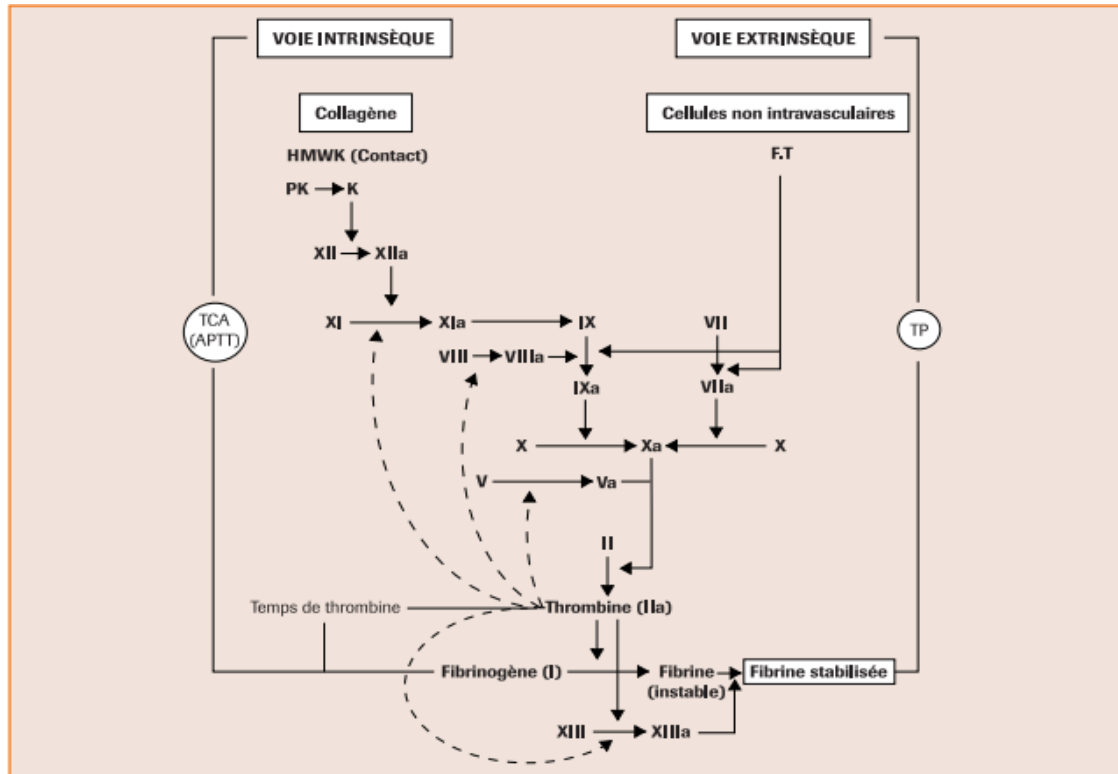


Figure 26 : Les voies de la coagulation plasmatique (Meyer et al, 2008).

III.2.1.2.3. Fibrinolyse

Dernier processus physiologique de l'hémostase, la fibrinolyse permet la dissolution du caillot de fibrine après cicatrisation totale de l'endothélium lésé. Il s'agit d'une cascade enzymatique déclenchée de manière légèrement différée par rapport à la coagulation permettant délimiter l'extension du caillot et de le lyser, afin de rétablir la perméabilité vasculaire (Gaussem et al.,2021).

III.2.2. Maladies thrombotiques

La thrombose est le processus pathologique qui aboutit à formation d'un caillot de sang (thrombus) par l'interaction de la paroi vasculaire avec les plaquettes et la fibrine. La formation du clou hémostatique a pour conséquence l'entrave de la circulation sanguine dans une veine (thrombose veineuse) ou une artère (thrombose artérielle)(Besbes, 2015).

La maladie thromboembolique artérielle et la maladie thromboembolique veineuse sont fréquentes et ont été longtemps considérées comme deux entités distinctes tant

par leur physiopathologie que par leurs conséquences (Schved., 2017 ; Kossa Esaie et al, 2022).

L'acteur principal de la complication artérielle aiguë est la plaquette, alors que dans la thrombose veineuse c'est la cascade de la coagulation qui joue un rôle central (Kossa Esaie et al, 2022).

III.2.2.1. Thromboses veineuses

La thrombose veineuse, plus communément appelée phlébite, consiste en une obstruction veineuse partielle ou totale par un thrombus endoluminal dont la localisation est possible dans tout l'arbre veineux avec prédominance aux membres inférieurs. Dans un territoire donné, la localisation peut être une thrombose veineuse profonde (TVP) ou une thrombose veineuse superficielle (TVS) (Dao et al., 2017).

III.2.2.1.1. Physiopathologie

Une thrombose veineuse consiste en l'oblitération plus ou moins complète d'une veine profonde par un thrombus dont le mécanisme de formation résulte d'une coagulation intra vasculaire localisée, induite principalement par la conjugaison de trois facteurs regroupés sous le terme de triade de Virchow, car décrit par ce dernier en 1856 (Mistler, 2013).

Ces trois facteurs primordiaux sont : stase veineuse, lésion de l'endothélium vasculaire, troubles de l'hémostase.

-Les causes de stase veineuse sont l'immobilisation, l'alitement prolongé, la compression extrinsèque, l'insuffisance veineuse, l'insuffisance cardiaque congestive.

-L'endothélium normal exprime des propriétés anticoagulantes et sécrète également des facteurs procoagulants. Une lésion endothéliale entraîne un déséquilibre entre ces propriétés pro et anticoagulantes aboutissant à la formation d'un thrombus. Elles sont causées par des lésions traumatiques, des corps étrangers ou secondaires à l'hypoxie locale favorisée par la stase veineuse (Paugam, 2015).

-Les troubles de la coagulation peuvent être provoqués par un syndrome inflammatoire, une leucémie, une thrombocytemie, une polyglobulie ou une thrombophilie génétique.

Ces trois mécanismes sont intriqués et agissent en synergie pour aboutir à la formation de la thrombose (Paugam, 2015).

Le thrombus veineux se développe généralement dans les zones de bas débit sanguin comme les sinus veineux ou les sacs valvulaires des veines profondes des membres inférieurs comme le montre la figure 27(Mistler, 2013).

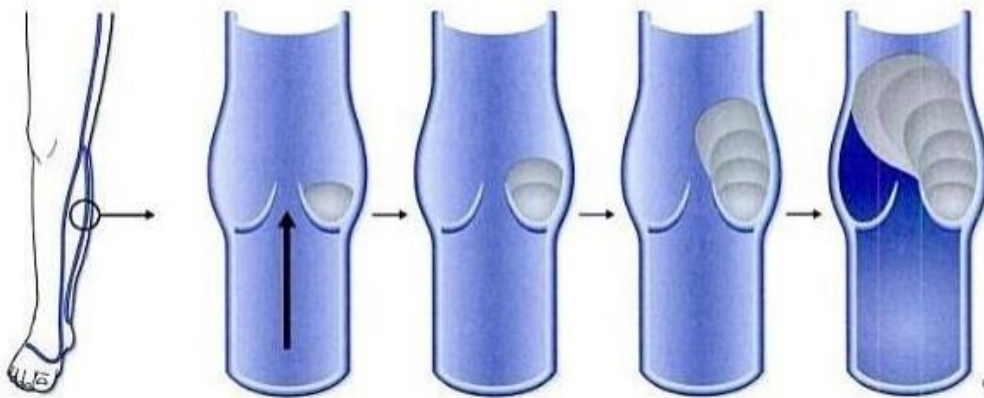


Figure 27: Développement des thrombis au niveau des sacs valvulaires des veines du membre inférieur (Mistler, 2013).

III.2.2.2. Thromboses artérielles

Les thromboses artérielles sont globalement plus fréquentes que les évènements thromboemboliques veineux (Sennaoui et al.,2015).

La thrombose artérielle est un processus survenant généralement dans des vaisseaux malades présentant un épaississement de la paroi vasculaire suite à la formation de plaques athéromateuses. La croissance des lésions athéromateuses entraîne un rétrécissement progressif de la lumière du vaisseau qui impacte les conditions hémorhéologiques locales et affecte ainsi les fonctions adhésives et activatrices des plaquettes. L'érosion ou la rupture d'une plaque d'athérosclérose expose une surface thrombogène, entraînant l'adhérence, l'activation et l'agrégation des plaquettes qui peuvent former des thrombi occlusifs, empêchant l'irrigation des tissus situés en aval et entraînant leur nécrose. Le thrombus peut également emboliser, relâchant des fragments qui peuvent obstruer des vaisseaux de plus petits calibres. Ces phénomènes sont responsables de pathologies ischémiques graves comme les syndromes coronariens aigus (infarctus du myocarde), les accidents vasculaires cérébraux (AVC) et l'ischémie des membres inférieurs (Maurer, 2014).

III.2.2.2.1. Physiopathologie

Les mécanismes pathologiques de la formation d'une thrombose artérielle ressemblent à ceux de l'hémostase physiologique (Cazenave et al, 2003). La thrombose artérielle correspond au développement d'un thrombus composé

principalement de plaquettes et de fibrine dans une artère malade. Elle représente la complication majeure de l'athérosclérose, qui est une maladie dégénérative de la paroi des artères de gros et moyen calibre, caractérisée par l'accumulation de lipides et d'éléments fibreux **(Libby et al. 2011)** (Figure 28). La croissance d'une lésion athéromateuse diminue progressivement la lumière vasculaire, menant à une sténose, qui modifie les conditions théologiques locales. L'érosion ou la rupture de la plaque d'athérosclérose mène à l'exposition d'un matériel thrombogène, au contact duquel les plaquettes adhèrent, s'activent et agrègent pour former un thrombus. Ce dernier peut conduire à l'occlusion d'une artère soit au site de formation, soit après fragmentation du thrombus en embolies, dans une artère de plus petit calibre située en aval. Ceci entraîne des complications ischémiques graves comme les syndromes coronariens aigus (SCA), les accidents vasculaires cérébraux (AVC) ou l'ischémie des membres inférieurs. La thrombose artérielle représente la première cause de mortalité dans le monde (OMS 2011)(**Maurer, 2014**).

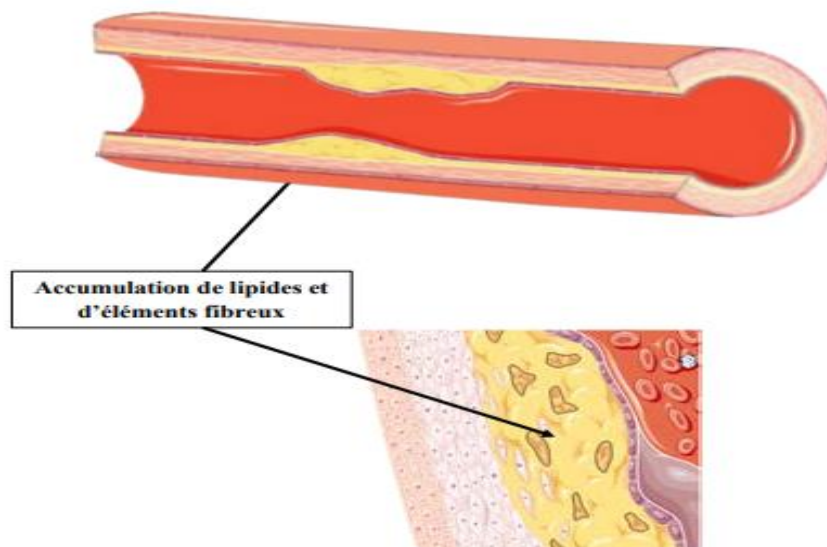


Figure 28: Représentation schématique d'une artère sténosée par une plaque d'athérosclérose **(Maurer,2014)**.

III.2.2.3. Traitement des maladies thrombotiques

Le traitement pharmacologique est primordial pour limiter les dommages des thromboses artérielles et veineuses. L'objectif de ce traitement est la récanalisation du vaisseau occlus et éviter une réocclusion précoce. Actuellement, il existe trois classes

d'agents pharmacologiques antithrombotiques utilisables, les antiagrégants, les anticoagulants, et les fibrinolytiques (Tlili, 2015).

III.2.2.3.1. Antiagrégants

Les antiagrégants (aspirine, clopidogrel, ticagrelor...) représentent à l'heure actuelle le traitement de référence des thromboses artérielles, mais les anticoagulants sont aussi recommandés en association avec les antiagrégants et les fibrinolytiques pour traiter les syndromes coronaires aigus et l'infarctus cérébral (Tlili, 2015).

III.2.2.3.2. Anticoagulants

Les anticoagulants ont révolutionné le diagnostic de beaucoup de complications thrombotiques et des maladies thromboemboliques (Amiral, 2020). ». Ils agissent à différents niveaux de la cascade de la coagulation mais empêchent tous la formation du caillot de fibrine. Les anticoagulants sont également utilisés pour la prévention et le traitement d'événements thrombotiques sévères. Les plus utilisés sont jusqu'à présent l'héparine et ses dérivés et les anti-vitamines K (AVK)(Kortchinsky et al., 2013).

III.2.2.3.2.a. Héparines

Il existe deux types des héparines utilisables et administrées par voie intraveineuse ou sous cutanée, l'héparine non fractionnée (HNF) et les héparines de bas poids moléculaire (HBMP). L'héparine non fractionnée est composée d'un mélange hétérogène de chaînes polysaccharidiques sulfatées de taille et de structures différentes extraites de la muqueuse intestinale de porc. Le poids moléculaire varie de 5000 à 35000 daltons alors que les héparines de bas poids moléculaire sont issues de la dépolymérisation des chaînes polysaccharidiques de l'HNF par des procédés chimiques ou enzymatiques, leurs poids moléculaire varient de 3000 à 5000 daltons. L'HNF et les HBPM forment un complexe avec l'anticoagulant physiologique l'antithrombine III potentialisant son effet sur l'inactivation de divers facteurs de coagulation. Le complexe HNF-antithrombine III inactive le plus notamment les facteurs Xa et la thrombine (facteur IIa), mais à un moindre degré les facteurs IXa, XIa et XIIa, alors que le complexe HBPM-antithrombine III inhibe particulièrement le facteur Xa et à moindre degré la thrombine (Lemaoui, 2011).

III.2.2.3.2.b. Antivitamines K

La vitamine K est un élément nécessaire dans la synthèse au niveau du foie de quatre facteurs de la coagulation, la prothrombine II, la proconvertine VII, le facteur Stuart X, et le facteur antihémophilique B (le facteur IX). Elle intervient dans la carboxylation des molécules d'acide glutamique de l'extrémité –N- terminale de la chaîne glycoprotéinique de chacun de ces facteurs. Cette carboxylation est nécessaire pour l'activité biologique et la fixation de ces facteurs sur les surfaces phospholipidiques plaquettaires (**Batty P, Smith G, 2010**).

III.2.2.3.3. Traitement fibrinolytique

Les agents fibrinolytiques (streptokinase, urokinase, dérivés de l'activateur tissulaire de plasminogène...) ont pour but de lyser le thrombus artériel ou veineux et il est associé le plus souvent à un traitement antiagrégant et anticoagulant (**Lemaoui, 2011**).

III.2.2.4. Phytothérapie

Les plantes médicinales qui ont des propriétés anticoagulantes peuvent influencer 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 (**Neu, 2011**).

2^{ème} PARTIE

ETUDE

EXPÉRIMENTALE



I.MATERIELS ET

METHODES



Les différents protocoles réalisés dans cette étude ont été menés au sein du laboratoire de la « biochimie appliqué » au département de biologie, Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf Mila. Ce travail comprend l'étude phytochimique, l'extraction des polyphénols et leur caractérisation quantitative et qualitative, puis l'évaluation in vitro des activités antioxydante et antithrombotique des polyphénols de *Cassia angustifolia vahl*.

I. Matériel végétal

I.1. Echantillonnage

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué des feuilles de *Cassia angustifolia vahl*. Elles ont été achetées chez un ancien herboriste de la ville de Mila en Février 2023.



Figure 29 : Feuilles du *Cassia angustifolia vahl*. (Photo personnelle, 2023).

I.2. Méthodologie

I.2.1. Préparation des échantillons

Une bonne préparation des échantillons est essentielle pour toute analyse fiable. Les échantillons des feuilles ont été d'abord débarrassés de toutes impuretés, puis séchées à l'ombre à l'abri de la lumière, et à température ambiante.

Après séchage, les feuilles ont été pulvérisées à l'aide d'un broyeur électrique pour obtenir une poudre fine, Cette dernière est récupérée après tamisage et conservée dans des bocaux en verre fermés hermétiquement et stockés à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation.



Figure30 : Broyage et tamisage des feuilles de *cassia angustifolia vahl* (Photo personnelle, 2023).

I.2.2. Extraction des composés phénoliques

Parmi les différentes étapes que constituent l'analyse et l'identification des molécules bioactives, l'étape d'extraction, qui a pour but la désorption des molécules d'intérêt des sites actifs de la matrice végétale, est primordiale puisqu'elle détermine la nature et la quantité des molécules extraites et par conséquent le succès des étapes suivantes (Michel, 2011).

Dans notre étude, trois méthodes d'extraction ont été utilisées pour analyser les composés phénoliques : l'extraction Soxhlet, la macération et la décoction.

I.2.2.1. Préparation de l'extrait aqueux

Pour l'extrait aqueux décocté, 20 g de la poudre végétale a été extraite avec de l'eau distillée (1 litre) à 75 °C pendant 30 min jusqu'à l'ébullition. Le mélange est ensuite filtré et séché dans l'étuve à 37 °C pendant 72 h. Le résidu sec obtenu a été récupéré dans des flacons fumés et conservé à +4°C pour protéger ses caractéristiques physicochimique (Fig31).

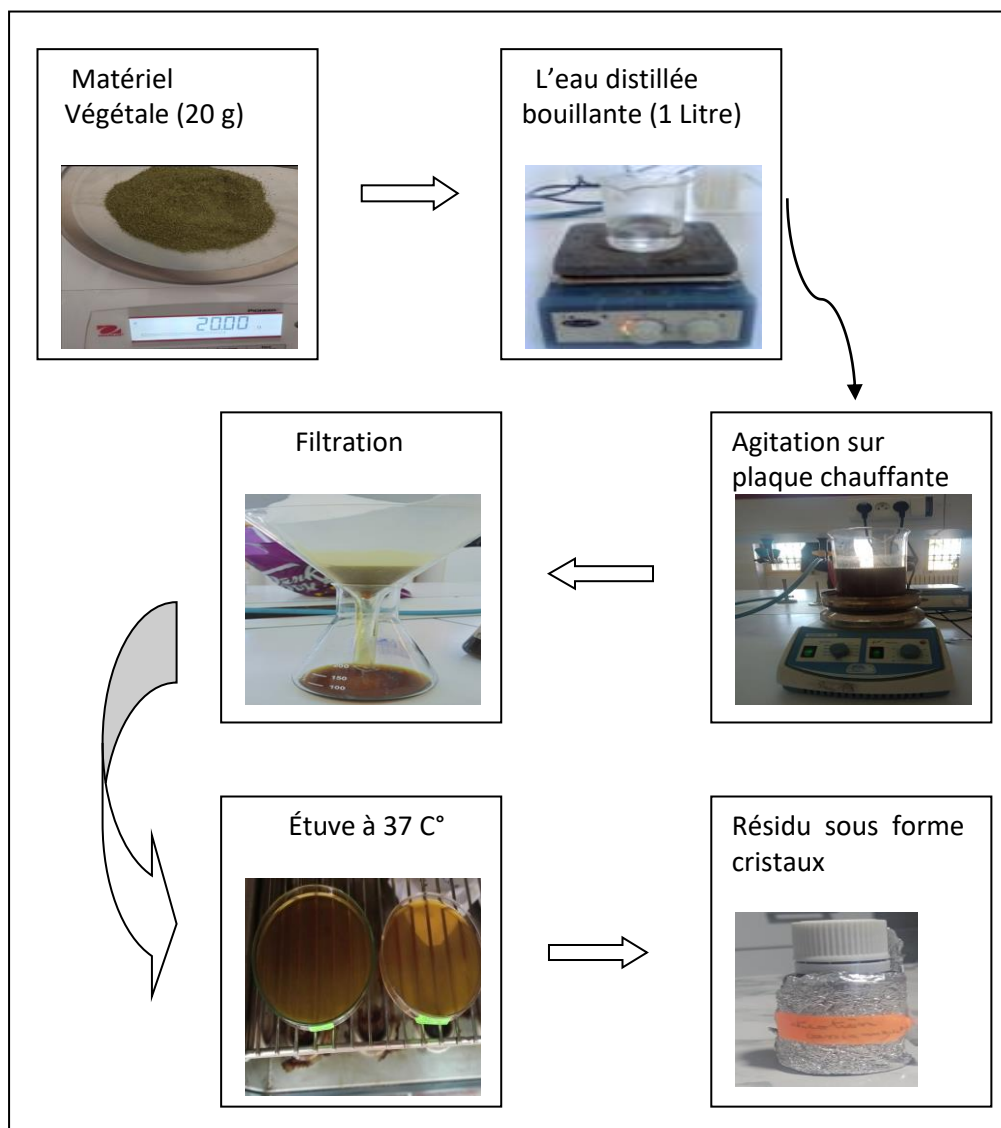


Figure31 : Protocole d'extraction par décoction des composés phénoliques(**Photo personnelle, 2023**).

I.2.2.2. Préparation de l'extrait éthanolique

Une quantité de 20g de matière végétale broyée (*Cassia angustifolia*) a été macéré dans 300ml d'éthanol (70%) sous agitation mécanique à une température ambiante pendant 2 à 3 jours. Après filtration par papier filtre de type Wattman, les filtrats ont été combinés et évaporés sous pression dans un évaporateur rotatif à 40 °C pour éliminer l'éthanol. La solution obtenue est séchée à l'étuve afin d'obtenir un résidu pâteux de couleur brun foncé qui représente l'extrait brut. (fig32)

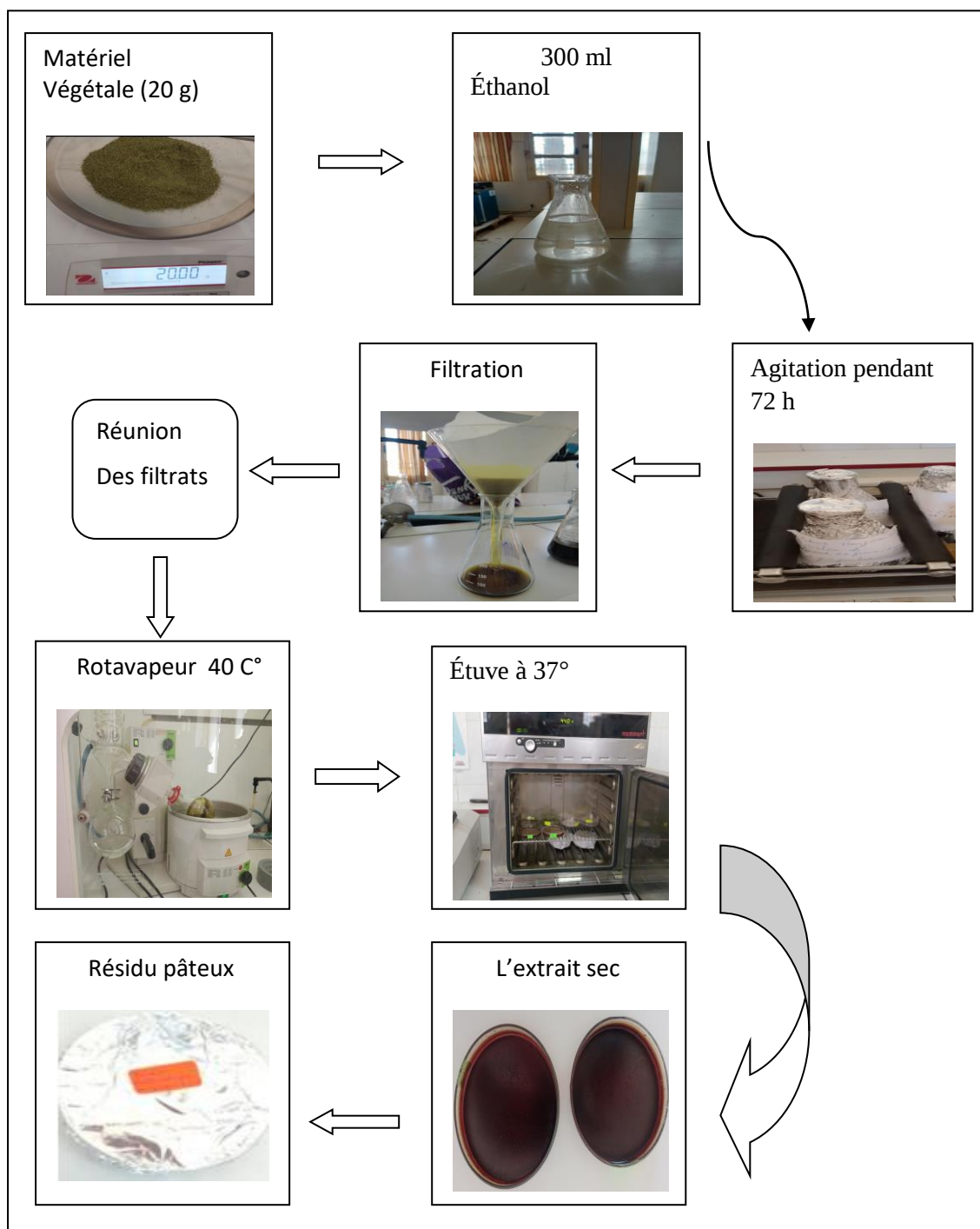


Figure32 : Protocole d'extraction par macération des composés phénoliques (Photo personnelle, 2023).

Les extraits ont été pesés et stockés à sec jusqu'à l'utilisation, et le rendement d'extraction de chaque extrait doit être calculé.

✓ Calcul de rendement

La production rentable d'extraits est le rapport entre la masse d'extrait et celle de la plante sèche en poudre. Il est calculé par la formule donnée par **Falleh et al (2008)**.

$$R (\%) = (M_e / M_v) \times 100$$

R : La production rentable d'extraits(%).

M_e : masse de l'extrait après évaporation du solvant en mg.

M_v : masse sèche de l'échantillon végétal en mg.

I.2.2.3. Extraction par Soxhlet

L'extraction au Soxhlet a été retenue comme technique d'extraction car elle favorise l'extraction relativement complète des métabolites présents dans la matrice végétale. Les extractions au Soxhlet ont été effectuées de façon séquentielle, en utilisant des solvants de polarité croissante (Figure 33). Cette approche d'extraction permet de fractionner grossièrement les divers produits naturels de la matrice végétale (Sirois,2008).

Le corps de l'extracteur contient une cartouche en cellulose remplie de matériel végétal. Cette cartouche est fixée sur un réservoir de solvant et est surmonté d'un réfrigérant. Le solvant est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction et le matériel végétal est toujours en contact avec du solvant fraîchement distillé. L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair c'est-à-dire sans une proportion significative de soluté (Houghton et Raman, 1998).

Pour la présente étude, l'extraction par Soxhlet est utilisée et l'hexane est le solvant d'extraction choisi pour cette méthode. Pour optimiser le rendement en huiles et pour bien épuiser la poudre de feuilles de *Cassia angustifolia*, l'extraction a duré pendant (6) heures en utilisant 200ml d'hexane chauffé par une chauffe ballon.

Afin de décanter le solvant (hexane) de la matière grasse (huile de feuille) obtenue (Fig34), le filtrat est recueilli et subi une évaporation sous vide à l'aide d'un rotavapeur type Buchi et à température de 35C°. Les huiles sont récupérées et stockées dans des flacons opaques bien scellés à l'abri de la lumière et à une température de 4°C, cela pour éviter toute dégradation de l'essence.



Figure 33 : Extraction par soxhlet.

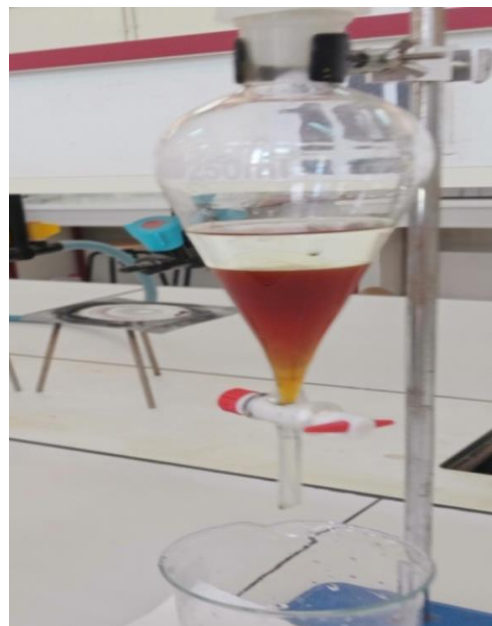


Figure 34: Délipidation et décantation.

✓ Calcul de rendement

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante sec à traiter. Il est calculé par la formule suivante:

$$R = P_H / P_P \times 100$$

R : Rendement d'huile essentielle (%).

P_H : poids de l'huile essentielle extraite en g.

P_P : poids de la plante traitée en g.

I.3. Analyse qualitative

Le screening phytochimique d'une drogue végétale représente toujours la première étape de l'étude chimique et permet d'orienter les recherches ultérieures (**Blond et al., 2014**).

Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des phénomènes de précipitation ou coloration. Ces techniques permettent de déterminer les différentes familles des métabolites primaires et secondaires contenus dans un organe végétal.

Les composés phytochimiques sont nombreux, mais on peut dénombrer les principaux : les alcaloïdes, les polyphénols (flavonoïdes, tannins, anthocyanes), les coumarines, les saponosides, les stéroïdes, les stérols, les terpènes, les protéines...etc. (Tableau 7)

Tableau 07 : Groupes chimiques, réactifs d'identification et indicateurs utilisés.

Groupe chimique	Réactifs d'identification	Indicateur
Métabolites primaires		
Lipides	- Papier filtre - Extrait aqueux	- Formation de taches translucides au niveau des gouttelettes
Protéines	- NaOH 20% - CuSO ₄ 2%	- Une coloration violette, avec une teinte rougeâtre
Métabolites secondaires		
Tanins	- FeCl ₃ (1%)	-Une coloration verdâtre ou bleu noirâtre
Saponosides	- Indice mousse>1cm	-Apparition d'une mousse persistante
Flavonoïdes	- HCl - Copeaux de magnésium	-Une coloration rouge ou orange
Alcaloïdes	-H ₂ SO ₄ (10%) -Réactif de Bouchardat	- Précipité brun
Anthraquinones	-NH ₄ OH (10%)	-Une coloration rouge
Quinones libre	-NaOH 1%	-Une coloration jaune, rouge ou violet
Anthocyanes	-NH ₄ OH -H ₂ SO ₄	-Une coloration rouge en milieu acide, et bleu violacée en milieu basique
Coumarines	-KOH (10%) -HCl (10%)	- Précipitation rouge brune
Composés réducteurs	- Réactif de Fehling - Eau distillée	- Précipité rouge brique
Séroïdes	-Anhydride acétique -H ₂ SO ₄	-Une coloration violette qui vire au bleu puis au vert
Terpénoïdes	- Chloroforme -H ₂ SO ₄	-Formation d'un anneau marron rouge à l'interphase
Mucilage	-Alcool absolu	-Formation d'un précipité mousseux
Substances phénoliques	-FeCl ₃ (2%)	-Une coloration bleu noirâtre ou vert plus ou moins foncée
L'amidon	-I ₂	-Une coloration bleue nuit
Glycosides cardiaque	- Chloroforme - H ₂ SO ₄	-Une coloration brun-rougeâtre

I.3.1. Caractérisation des métabolites primaires

Détection des lipides

Sur du papier filtre, quelques gouttes de chaque extrait sont déposées, le papier est ensuite séché. La présence de taches translucides au niveau des gouttelettes indique la présence de lipides (Bruneton, 2009).

Détection des protéines

Les protéines ont été mises en évidence par la réaction du Biuret. 1g de broyat a été ajouté à 2 ml de NaOH aqueux à 20% dans un tube à essai, auxquels sont ajoutées 2 à 3 gouttes d'une solution aqueuse de CuSO_4 à 2%. L'apparition d'une coloration violette indique une réaction positive (Ould Abdellahi et al., 2017).

I.3.2. Caractérisation des métabolites secondaires

Détection des Alcaloïdes

Quelques milligrammes de résidu sec de l'échantillon (l'extrait éthanolique) ont été dissouts dans 15 ml d'acide sulfurique à 10%. Après filtration, ont été ajoutées 2 à 3 gouttes de réactif de Bouchardat, la formation de précipite brun indique la présence des alcaloïdes. (Diaby, 2019).

Détection des flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml d'extrait avec quelques gouttes d'acides chlorhydrique (HCl) concentré et quelques milligrammes de tournures de magnésium(Mg). La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition de la couleur rose, rouge ou jaune (Trease et Evans, 1987).

Détection des coumarines

Une masse de 20g de la poudre végétale a été macéré dans 40ml d'éthanol pendant 2 à 3 heures. Après filtration, 5 ml du filtrat ont été ajoutés à 5ml de KOH (10%) et 5ml d'HCl (10%). La précipitation rouge brune révèle la présence des coumarines (Trease et Evans, 1987).

Détection des tanins

Les Tanins sont mis en évidence par le test au chlorure ferrique. L'ajout de FeCl_3 à 1% à 2ml des différents extraits permet de détecter la présence ou non de tanins. La couleur vire au bleu noir en présence des tanins galliques et au brun verdâtre en présence des tanins catéchiques (Sasi-kumar et al., 2014).

Détection des saponosides

Une masse de 2g de la poudre végétale a été chauffée dans 40 ml d'eau distillée jusqu'à l'ébullition, après refroidissement, le mélange a été filtré et vigoureusement

agité. La présence de saponines a été indiquée par la formation et la persistance d'une couche de mousse de 1 cm après les 15 minutes.

Détection des quinones libres

Sur un volume de chaque extrait quelques gouttes de NaOH à 1% sont ajoutées. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres (Pochapski et al., 2011).

Détection des anthraquinones

Pour la détection des anthraquinones, à 10 ml d'extrait sont ajoutés 5 ml de NH_4OH à (10%). Après agitation, L'existence des anthraquinones est confirmée par l'apparition de la couleur rouge (R Shaikh et al., 2020).

Détection des terpénoïdes

Les extraits ont été traités avec du chloroforme (CHCl_3) suivi de l'ajout de quelques gouttes de H_2SO_4 concentré (3ml), la formation de deux phases et une couleur marron indique la présence des terpénoïdes (Pathak et al., 2011).

Détection des stéroïdes

Dans un bécher, on introduit 5 ml d'anhydride acétique à 5 ml de l'extrait, qui sont repris dans un tube à essai dans lequel sont ajoutés 0,5 ml de H_2SO_4 concentré. L'apparition d'une coloration violette qui vire au bleu puis au vert indique une réaction positive (Daira et al., 2016).

Détection des composés réducteurs

La détection des composés réducteurs consiste à traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec de l'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique (El-Haoud et al., 2018).

Détection des mucilages

1ml du décocté des échantillons à 10% est additionné à 5ml d'alcool absolu. La formation d'un précipité floconneux indique la présence de mucilage.

Détection des glycosides cardiaques

Deux ml de chloroforme est ajouté à 1 ml de l'extrait, l'apparition d'une coloration brun-rougeâtre après l'ajout de H_2SO_4 indique la présence des glycosides cardiaques (Berrani et al., 2015).

Détection des substances phénoliques

Les substances phénoliques sont mises en évidence par le test au chlorure ferrique. L'ajout de FeCl_3 à 2ml d'extrait aqueux révèle la présence ou non de ces

substances. La formation d'une coloration bleu noirâtre ouvert plus ou moins foncée fut le signe de la présence des polyphénols (N'guessan et al, 2007).

Détection des anthocyanes

Ont été identifiées par l'ajout de 5 ml de l'extrait aqueux à 5 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) puis 5 ml d'ammoniaque (NH_4OH). Une coloration rouge en milieu acide et bleue violacée en milieu basique témoigne de la présence d'anthocyanes (Daira et al., 2016).

Détection des l'amidon

Pour la détection de l'amidon, quelque goutte de l'iode (I_2) est ajoutée à 10 ml d'extrait aqueux, l'apparition d'une coloration bleu nuit révèle la présence d'amidon.

I.4. Analyse quantitative

1.4.1. Dosage des polyphénols totaux par colorimétrie (méthode de Folin Ciocalteu)

Le dosage spectrophotométrie des polyphénols totaux dans les extraits de feuilles de la plante étudiée a été réalisé selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Siangu et al., 2019) (Figure 35.)

Principe

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 760 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Boizot et Charpentier., 2020).

Mode opératoire

La teneur en composés phénoliques des différents extraits est estimée selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Siangu et al., 2019). En effet, 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué dix fois), a été ajouté à 200 μ l d'extrait d'échantillon convenablement dilué. Après 4 min, 800 μ l de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (7.5%) a été ajoutée. Après 2 h d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à la longueur d'onde $\lambda = 760$ nm.

La teneur en polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage (Fig 45) établie avec l'acide gallique (25-200 μ g/ml) et est exprimée en μ g d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ g EAG/mg d'extrait).

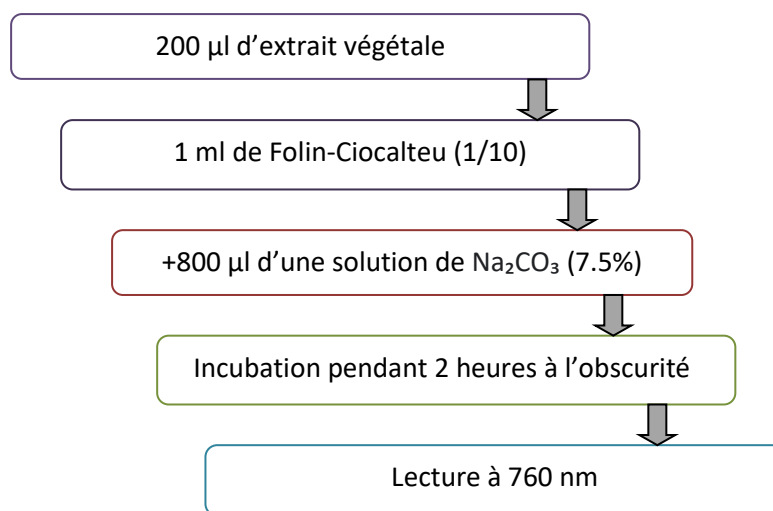


Figure35: Schéma représentatif du protocole de dosage des polyphénols totaux.

1.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux

✚ Principe

Le réactif utilisé est : le chlorure d'aluminium (AlCl₃ 2%). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des carbones 4 et 5 des flavonoïdes par ce réactif, elle entraîne la formation d'un complexe jaune très stable (Ali-Rachedi et al., 2018).

✚ Mode opératoire

La méthode du trichlorure d'aluminium (Siangu et al., 2019) est utilisée pour quantifier la teneur des flavonoïdes dans les extraits de *Cassia angustifolia vahl*. La méthode consistait à ajouter 1 ml d'extrait ou standard à 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2%). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm.

La teneur en flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (5-60 µg/ml) (Fig46) et est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

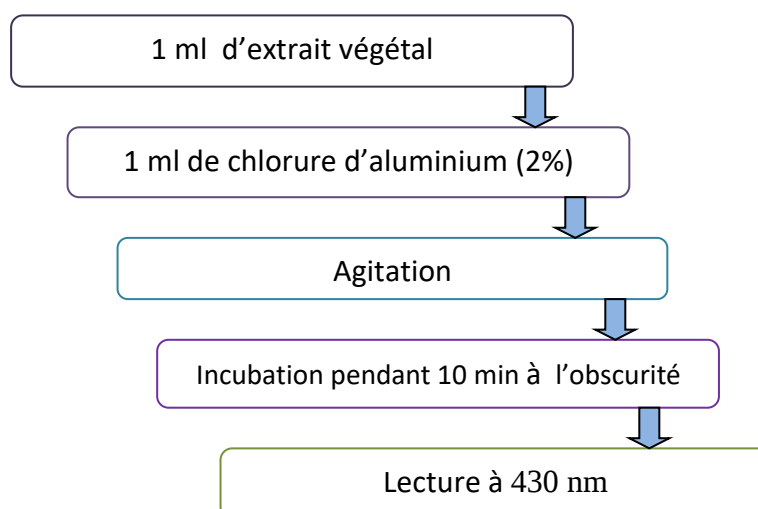


Figure 36: Schéma représentatif du protocole expérimental de dosage des flavonoïdes.

I.5. Activités biologiques

I.5.1. Etude de l'activité antioxydante

L'évaluation de la capacité antioxydant d'un produit peut être réalisée selon plusieurs méthodes. Au cours de cette étude, nous avons choisi d'évaluer l'activité antioxydante par deux techniques chimiques, à savoir : le piégeage du radical libre DPPH et le pouvoir anti-hémolytique.

I.5.1.1. Test de DPPH

✚ Principe de la méthode

La molécule de 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) est un radical libre stable, dont la solution possède une coloration violette et une absorption caractéristique à 517 nm. Quand une solution de DPPH[•] est mélangée avec une substance donneuse d'atomes d'hydrogène, antioxydante, la forme réduite du radical est générée et accompagnée d'une perte de couleur (Figure37) (Raquibul et al., 2009).

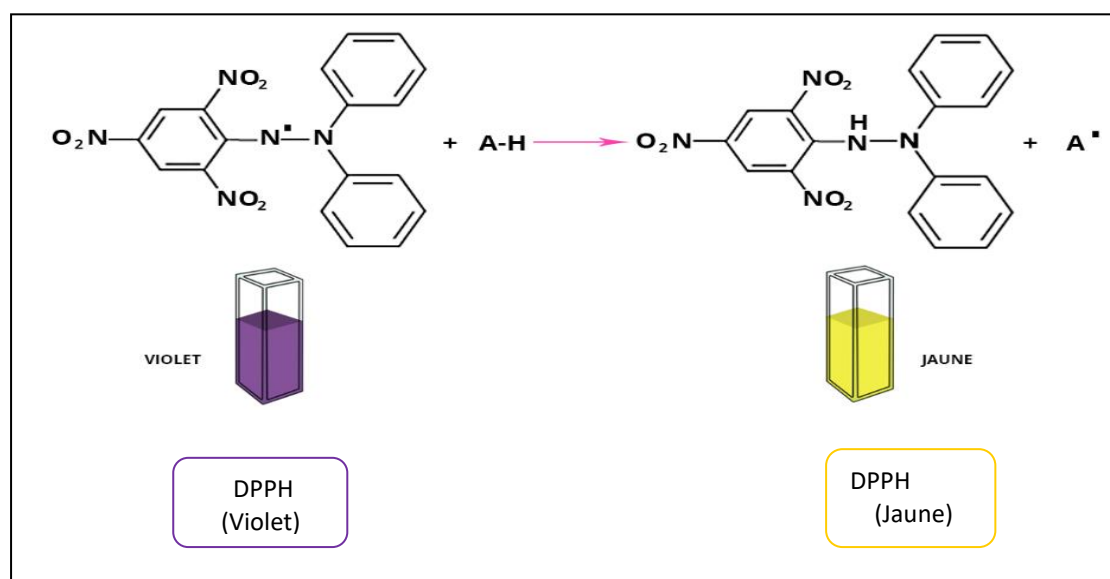


Figure37 : Structure chimique du radical DPPH[•] et de sa forme réduite.

✚ Mode opératoire

L'activité antioxydant de l'extrait de *Cassia angustifolia* est déterminée en utilisant le DPPH comme un radical libre relativement stable Selon le protocole décrit par **Mansouri et al., (2005)** en y apportant quelques modifications. La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol, 50 µl de l'extrait et standards (BHT, acidegallique,acide ascorbique) à différentes concentrations (20, 40, 60,80,100 µg/ml) ont été ajoutés à 1950 µl d'une solution

méthanolique de DPPH. Ensuite, le mélange est laissé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance a été mesurée à 517 nm en utilisant la solution méthanolique de DPPH comme solution de contrôle (blanc).

Les résultats exprimés en IC₅₀, ce paramètre est défini comme étant la concentration de l'antioxydant qui cause la perte de 50% du radical libre DPPH. Les valeurs d'IC₅₀ moyennes ont été calculées à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de chaque extrait. Il faut rappeler que plus la valeur de IC₅₀ est petite, plus l'activité antioxydante des extraits est grande (Popovici et al., 2009).

Les échantillons et les témoins sont évalués dans les mêmes conditions opératoires. La décroissance de l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre et le % IC (pourcentage d'inhibition) est calculé suivant la formule ci-dessous :

$$(\%) \text{inhibition} = \frac{(A_c - A_e)}{A_c} \times 100$$

Où

A_c: L'absorbance du blanc

A_e: L'absorbance de l'extrait.

I.5.1.2. Activité anti-hémolytique

Principe

Ce test permet de suivre l'évolution positive ou négative d'un antioxydant sur l'état des défenses d'un individu vis-à-vis des espèces radicalaires. Il s'agit de soumettre à une agression oxydante une suspension d'hématies. Les globules rouges vont donc mettre en jeu leurs équipements antioxydants pour lutter contre l'agression jusqu'à ce que la membrane soit modifiée et que la cellule laisse échapper son contenu. Ainsi l'évaluation de l'activité anti-hémolytique se fait par mesure spectrophotométrique de l'hémoglobine à 540 nm. Dans ce test, la lyse érythrocytaire est induite par le H₂O₂ (Chehiti-Hacid 2016).

Mode opératoire

Selon le protocole décrit par Ebrahimzadeh et al. (2010). L'hémolyse érythrocytaire a été évaluée en utilisant l'H₂O₂ comme initiateur de radicaux libres.

250 µl d'extrait aqueux de différentes concentrations (20, 40, 80, 100µg/ml) ont été mélangés avec 1 ml de la suspension d'érythrocytes à 4% qui avait été pré-incubés à température ambiante pendant 5 minutes, après avoir compléter le volume à 2,5ml avec du NaCl à 0.9%, ont été additionnés 250µl d' H₂O₂ à 10%. Les mélanges obtenus ont été incubés à 37°C durant 2 h et centrifugés à 300 g pendant 10 min.

Le contrôle positif (hémolyse totale) est préparé en mélangeant 2 ml de la suspension avec 2ml d' H₂O₂.

La lecture des densités optiques se fait au spectrophotomètre à 540nm contre un contrôle négatif (absence d'hémolyses), le taux d'hémolyse est calculé en pourcentage par rapport à l'hémolyse totale selon la formule suivant :

$$\text{Hémolyse (\%)} = \frac{DO_e}{DO_c} \times 100$$

DO_e: Densité optique en présence de l'extrait.

DO_c: Densité optique du contrôle positif (absence de l'extrait).

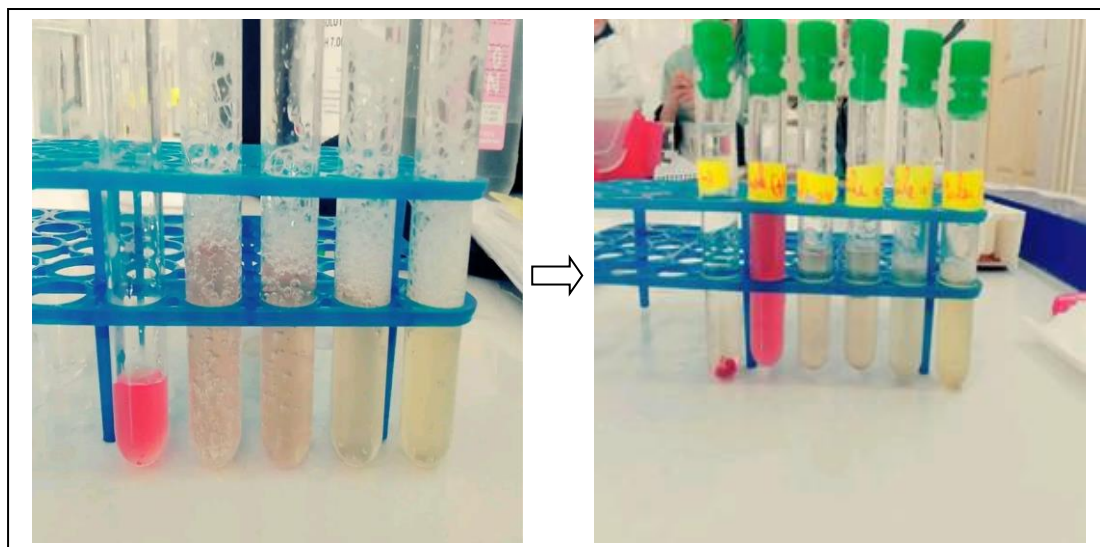


Figure38: La préparation de l'activité anti hémolytique.

I.5.1.3. Test d'hémolyse

Le test de l'effet hémolytique des extraits aqueux des feuilles de *Cassia angustifolia* a été évalué in vitro sur une suspension érythrocytaire du sang humain incubée dans un tampon phosphate salin (PBS), pH 7.

✚ Préparation de la suspension d'érythrocytes

Huit échantillons de sang ont été recueillis à partir des personnes saines (non pas de maladies chroniques) dans un tube à héparine ont été centrifugés à 1500 (tour/min) pendant quelques minutes. Après centrifugation, le culot a été lavé trois fois avec du tampon phosphate stérile par centrifugation à 1500 tour/min pendant 5 min pour chaque lavage. Les cellules ainsi obtenues ont été remises en suspension de (0,5%) en utilisant une solution saline normale (**Mouffouk, 2019**).

✚ Réalisation des tests

L'activité hémolytique in vitro a été évalué selon la méthode de **Kumar et al (2011)**. Un volume de 0,5 ml de la suspension cellulaire auparavant préparée a été mélangé avec 0,5 ml des dilutions de l'extrait de la plante préparées à différentes concentrations dans le tampon phosphate (125, 250, 500 et 1000 µg/ml).Après l'incubation pendant 30 min à 37 °C dans un bain marie. Les tubes ont été centrifugés à 1500 rpm pendant 10 min. l'absorbance de l'hémoglobine libre dans le surnageant a été mesurée spectrophoto-métriquement à 540 nm. Une solution saline tamponnée et de l'eau distillée ont été utilisées comme contrôles positif et négatif respectivement. Le pourcentage d'hémolyse a été calculé selon la formule suivante:

$$\text{Hémolyse (\%)} = \frac{\text{Abs t} - \text{Abs n}}{\text{Abs c} - \text{Abs n}} \times 100$$

Dont : Abst est l'absorbance de l'échantillon à 540 nm, Absn est l'absorbance du contrôle positif (la solution saline) et Absc est l'absorbance du contrôle négatif (eau distillée).

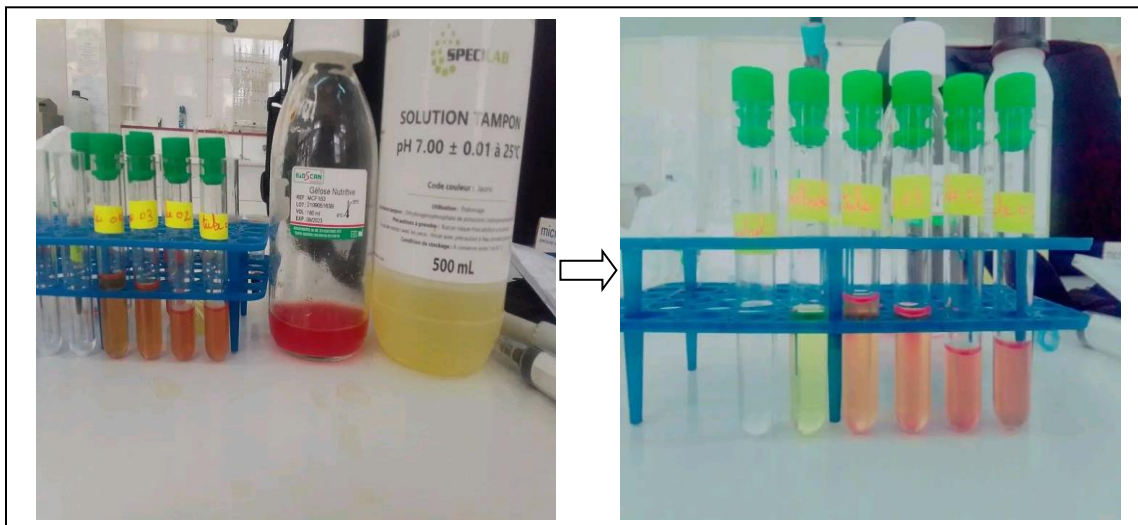


Figure39 : La préparation de l'activité hémolytique.

Analyse statistique

Les courbes et les histogrammes sont tracés par Microsoft Excel 2007, les résultats de test effectué sont exprimés en moyenne $\pm$ l'écart type.

I.5.2. Etude de l'activité thrombotique

I.5.2.1. Evaluation de l'activité thrombolytique

La lyse du caillot a été évalué selon la méthode effectuée précédemment in vitro (Sanjeevkumar et al., 2014) en y apportant quelques modifications. Le sang veineux prélevé des volontaires sains a été transféré dans 5 tubes Eppendorf stériles pré-pesés (500 μ l/tube) et incubé à 37°C pendant 45 minutes. Après la formation du caillot, le sérum a été complètement aspiré (sans perturber le caillot formé) et chaque tube ayant un caillot a été à nouveau pesé pour déterminer le poids de celui-ci. Chaque tube Eppendorf a été correctement étiqueté et différentes concentrations de l'extrait aqueux (25,50,100 μ l) ont été ajoutées aux tubes. Tous les tubes ont ensuite été incubés à 37°C pendant 90 minutes. Après incubation, le liquide obtenu a été retiré et les tubes ont été à nouveau pesés pour observer la différence de poids après la rupture du caillot. La différence de poids prise avant et après la lyse du caillot a été exprimée en pourcentage de caillot lysé. Contrôle positif (médicament fibrinolytique) et négatif (l'eau distillée) ont été utilisés.

$$\text{Poids du caillot} = \text{poids du tube contenant le caillot} - \text{poids du tube seul}$$

$$\% \text{ de lyse du caillot} = \frac{\text{Poids du caillot lysé}}{\text{Poids du caillot avant la lyse}} \times 100$$

I.5.2.2. Evaluation de l'activité anticoagulante

L'activité anticoagulante des extraits de la plante étudiée (*Cassia angustifolia vahl*) a été réalisée au sein du laboratoire d'analyses médicales Dr Mermoul à Baynan.

Cette activité a été évaluée in vitro à l'aide de trois tests chronométrique globaux, Temps de Quick (TQ), temps de céphaline kaolin (TCK) et taux de fibrinogène (FIB).

Préparation du pool plasmatique déplaquettés

Un pool de plasmas déplaquetté constitué d'un mélange de plasma de 8 volontaires sains non traités, dont les TQ et TCK sont normaux et comparables. Après les prélèvements, les échantillons de sang ont été recueillis dans des tubes contenant une solution anticoagulante de citrate de sodium à 3.2% et à raison de 1 volume pour 9

volumes du sang, puis ont été centrifugés à 3000 tours/minutes pendant 10 minutes. Le mélange de ces plasmas déplaquetté obtenus a été conservé à -10°C pour la réalisation des examens de la coagulation sanguine (Bourahima et al., 2021).

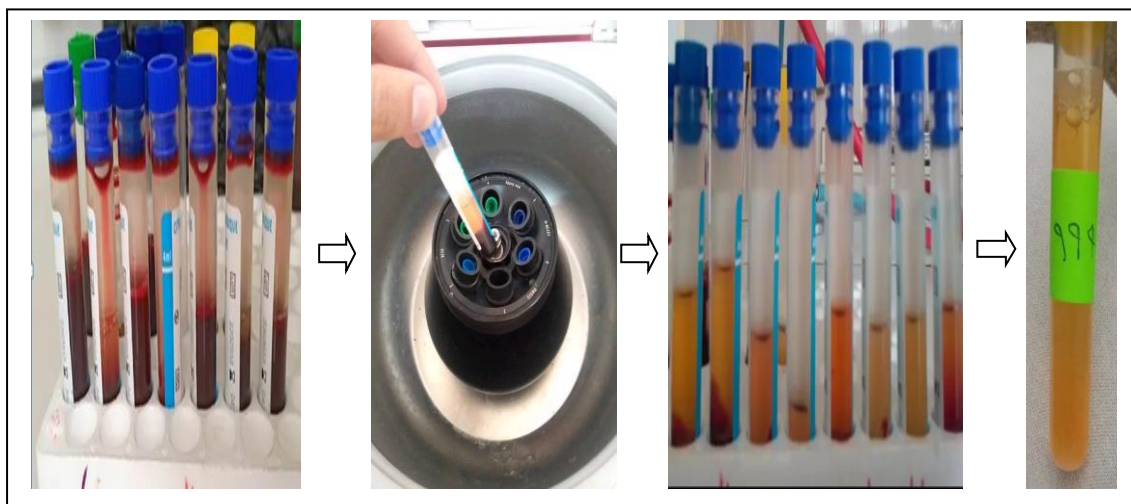


Figure40: Préparation d'un pool plasmatique déplaquetté (Photo personnelle, 2023).

I.5.2.2.1. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène

🔧 Principe

L'activité anticoagulante in vitro des extraits de l'espèce *Cassia angustifolia* vis-à-vis de la voie endogène de la coagulation a été évaluée en utilisant le test du temps de céphaline-Kaolin (TCK), un examen qui permet d'explorer l'activité des facteurs plasmatiques de la voie endogène (intrinsèque) de la coagulation. Il consiste à déterminer le temps de coagulation à 37 C° d'un plasma déplaquetté et recalcifié en présence de phospholipides (céphaline) et d'un activateur (le kaolin) du système contact de la coagulation(Bourahima et al., 2021).

🔧 Mode opératoire

L'effet de l'extrait aqueux sur la voie endogène de la coagulation a été réalisé selon la méthode décrit par Liang et ses collaborateurs avec légère modification. 100µl de plasma pauvre en plaquettes préchauffé durant 2 min à 37C° a été mélangé avec (50,100 µl) d'extrait. Après 15 min d'incubation à 37°C, 100 µl de solution de céphaline-kaolin ont été additionnés au mélange, qui a été ré-incubé durant 3 min sous agitation à 37°C. Le temps de coagulation a été mesuré à l'aide d'un coagulomètre par l'ajout de 100 µl de chlorure de calcium (0,025M) préchauffé. En parallèle, un

contrôle positif de Lovenox et un contrôle négatif (substitution des échantillons par une solution de NaCl à 0,9%) sont réalisés dans les mêmes conditions.



Figure41 : l'appareil de coagulomètre utilisé.



Figure42: Réactifs utilisés pour l'évaluation de TCK (Photo personnelle, 2023).

I.5.2.2.2. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène (TQ)

🌈 Principe

L'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène de la coagulation a été réalisée en utilisant un test de coagulation appelé le temps de Quick (TQ) ou le taux de prothrombine (TP). C'est un test chronométrique semi-global qui permet d'explorer les déficits en facteurs de la voie du facteur tissulaire, aussi appelée voie extrinsèque de la coagulation (Anne-Claire, 2019). Il consiste à mesurer le temps de coagulation à 37 C° d'un plasma citraté pauvre en plaquettes (PPP) et recalcifié en

présence de phospholipides (thromboplastine) et de calcium. Les facteurs de la voie exogènes sont activés et le temps de formation du caillot est mesuré (Caquet, 2004).

🔧 Mode opératoire

L'effet de l'extrait sur la voie exogène de la coagulation a été évalué selon la procédure décrite par Liang et ses collaborateurs. Ainsi, les facteurs de la voie exogène sont activés et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot a été mesuré.

100 μ l de plasma déplaqueté préchauffé pendant 2 min à 37°C ont été mélangés avec différents volumes d'extrait (50, 100 μ l). Après 15 min d'incubation à 37°C, 200 μ l du réactif la thromboplastine calcique (préchauffée au moins 15 minutes à 37°C) a été additionné au mélange et le temps de la coagulation a été donc enregistré à l'aide d'un coagulomètre.

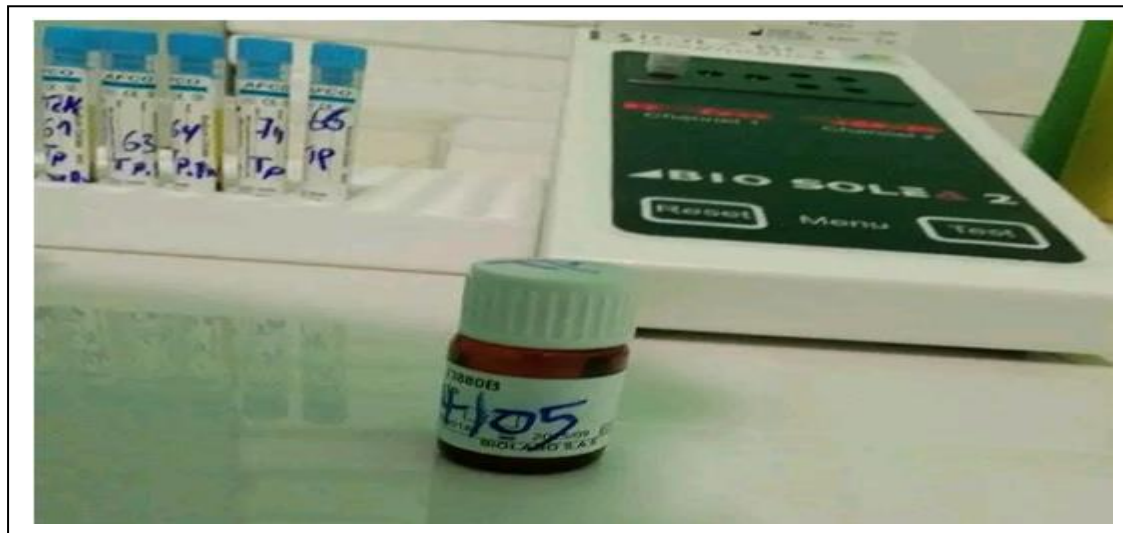


Figure43: Réactif utilisé pour l'évaluation de TQ (Photo personnelle, 2023).

I.5.2.2.3. Taux de fibrinogène (FIB)

🔧 Principe

Le fibrinogène est une glycoprotéine plasmatique synthétisée par l'hépatocyte. Il constitue le substrat de la thrombine (IIa). Sous l'action de la thrombine, le fibrinogène soluble est transformé en fibrine insoluble, formant l'armature du caillot. La mesure du fibrinogène par une technique chronométrique (technique de Clauss) permet l'exploration de l'étape de fibrinoformation. Ce test est couramment utilisé dans l'exploration de coagulation de première intention. (Boutière-Albanèse).

🔧 Mode opératoire

L'effet de l'extrait aqueux sur le facteur de fibrinogène a été réalisé selon la fiche technique (biolabo) et Dr mermoul.

450 μ l de réactif 1 ont été ajoutés à 50 μ l du mélange (plasma+ extrait), le mélange obtenue à été incubé pendant 3 min à 37°C. Le temps de la coagulation a été donc mesuré à l'aide d'un coagulomètre par l'ajout de 200 μ l de mélange (R1+plasma) et 200 μ l de R2.



Figure44: Réactifs 1 et 2 utilisés pour l'évaluation de FIB (Photo personnelle, 2023).

I.5.3. Analyse statistique

L'analyse statistique des données relatives aux divers paramètres physico-chimiques mesurés et dosages a été réalisée à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel.

RESULTATS ET

DISCUSSIONS



1. Rendement d'extraction

L'extraction des substances phénoliques par les trois méthodes : aqueuse, l'extraction par des solvants à polarité croissante (éthanol) et l'extraction par soxhlet de la plante étudiée, nous a permis de déterminer les valeurs des rendements pour chaque extrait par rapport au poids initial du matériel végétal sec mis en poudre. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau8 : Tableau récapitulatif regroupant les rendements des extraits de *Cassia angustifolia vahl.*

Extrait	Caractères organoleptiques		Rendement %
	Aspect	Couleur	
Aqueux	Poudreux	Marron foncé	15%
Éthanolique	Visqueux	Marron foncé	19%
Huile essentielle	Luisant	jaune-orangé	39,2%

D'après les résultats obtenus, Nous avons constaté que le rendement (19%) de l'extrait éthanolique représente le rendement le plus élevé, suivi par le rendement de l'extrait aqueux (15%).

On remarque également que cette plante est riche en huile essentielle avec un rendement de (39,2%).

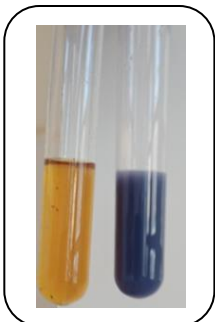
Nous avons noté aussi que les rendements d'extraction varient entre les différents extraits. Cette différence se distingue également dans un même extrait d'une méthode d'extraction à l'autre. Ceci, revient en fonction de plusieurs facteurs comme des recherches l'avaient montré, parmi lesquels l'influence de la méthode d'extraction, du temps de macération et du degré d'agitation, d'autre part, le cycle végétatif, ainsi que de la période de récolte et de la localisation géographique de la plante, leur polarité et leur poids moléculaire, la durée et les conditions de stockage influencent également sur le rendement d'extraction (Liu et al., 2015).

2. Analyse qualitative

Le criblage phytochimique nous a permis de mettre en évidence l'existence de certains types de métabolites primaires et secondaires dans notre plante et d'avoir une bonne idée sur ses activités pharmacologiques. La révélation de ces composés bioactifs est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation et changements de couleur.

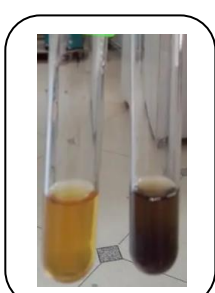
Les résultats obtenus à partir des tests préliminaires pour le screening phytochimique, évalués sur les feuilles de l'espèce *Cassia angustifolia* et sont regroupés dans le Tableau suivant.

Tableau9: Résultats des tests phytochimiques effectués sur les extraits de *Cassia angustifolia* Vahl.

Tests phytochimiques	Résultats	Description des résultats	Observation
Métabolites primaires			
Lipides	+++	La présence des lipides a été mise en évidence par l'apparition de taches translucides au niveau des gouttelettes.	
Protéines	++	- L'apparition d'une coloration violette, indique la présence des protéines dans cette plante.	
Métabolites secondaires			

Tanins	+++	L'apparition d'une coloration marron vire au vert. indique la présence des tannins dans notre plante.	
Saponosides	++	L'apparition d'une mousse persistante avec une hauteur de 1 cm confirme la richesse de C Angustifolia en saponines.	
Flavonoïdes	+++	La coloration jaune obtenue, confirme l'existence des flavonoïdes dans cette plante.	
Alcaloïdes	+++	La formation d'un précipité brun, indique la présence d'alcaloïdes dans notre plante avec une quantité importante.	
Anthraquinones	+++	La coloration rouge obtenue, confirme la présence des anthraquinones dans cette plante.	

Quinones libres	+++	L'apparition de la coloration jaune confirme la richesse de <i>C. Angustifolia</i> en quinones.	
Anthocyanes	++	La formation d'une coloration rouge en milieu acide et bleu-violet en milieu basique a montré la présence d'une quantité moyenne d'anthocyanes.	Milieu acide  Milieu basique 
Coumarines	+++	La formation d'un précipité rouge brune confirme l'existence des coumarines dans cette plante.	
Composés réducteurs	++	La formation d'un précipité rouge brique indique la présence des sucres réducteurs.	
Stéroïdes	+	L'apparition d'une coloration violette qui vire au bleu, indique la présence des stéroïdes dans l'extrait de <i>C. Angustifolia</i> .	

Terpénoïdes	++	la formation de deux phases et une couleur marron indique la présence des terpénoïdes.	
Mucilages	+++	La formation d'un précipité floconneux indique la présence de mucilage dans notre plante.	
Substance Phénoliques	+++	L'apparition d'une coloration bleu noirâtre indique la présence de Substances phénoliques.	
Glycosides cardiaques	++	l'apparition d'une coloration brun-rougeâtre a montré la présence de glycosides cardiaque dans notre plante.	
L'amidon	+++	L'apparition d'une coloration bleu nuit indique l'existence de l'amidon dans cette plante.	

Les résultats ont été évalués comme suit : +++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement positif ; - : Négatif

D'après les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus, nous avons remarqué la richesse des feuilles de *Cassia angustifolia vahl* en alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, anthraquinones, quinones libres, l'amidon, triterpènes, polyphénols, anthocyanes, glycosides cardiaques, coumarines, lipides, protéines, saponosides, sucres réducteurs, stéroïdes et mucilages.

La présence d'une large gamme de constituants phytochimiques indique que cette plante pourrait être utilisée d'une multitude de façons qui peuvent être bénéfiques pour la population. Une partie importante des produits naturels issus des plantes, des biomolécules et des métabolites primaires et secondaires présente généralement une sorte d'activité biologique (Zheng et al., 2021). Ils sont largement utilisés dans la thérapie humaine, vétérinaire, et la recherche scientifique et dans d'innombrables autres domaines. Ce qui explique l'intérêt et l'attention particulière portée par les chercheurs, à travers des études scientifiques sur cette plante (Albahim et al., 2021).

3. Analyse quantitative

3.1. Dosage des polyphénols totaux

Afin de caractériser les extraits préparés à partir de feuilles de la plante *Cassia angustifolia vahl*, un dosage des phénols totaux est effectué avant d'entamer l'étude des activités biologiques. La teneur en composées phénoliques de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (fig45), et exprimée en microgramme d'équivalents d'acide gallique par 1 milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG/mg EXT}$).

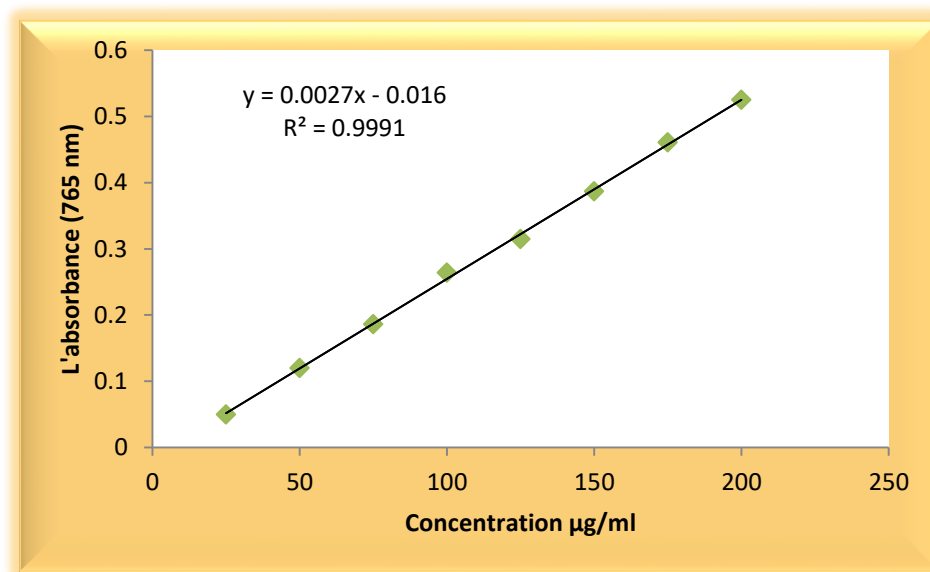


Figure 45: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

En se basant sur les valeurs d'absorbance des diverses solutions d'extrait, ayant réagi avec le réactif de Folin-Ciocalteu et comparées à la solution étalon en équivalent d'acide gallique, les résultats de l'analyse colorimétrique des phénols totaux sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Teneur en polyphénols totaux des extraits de la plante *Cassia angustifolia* vahl.

Méthodes d'extraction	Extrait	Teneur en Polyphénols totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$) équivalent en acide gallique
Extraction aqueuse	Aqueux	$523 \pm 4,55$
Extraction par un solvant à polarité croissante	Méthanol	$474 \pm 2,18$

D'après les résultats montrés dans le Tableau 10, nous constatons que les teneurs en phénols totaux diffèrent d'un extrait à l'autre selon les méthodes d'extraction et les solvants utilisés.

Selon la synthèse des résultats obtenus, les teneurs en polyphénols totaux révèlent que l'extrait aqueux contenait la plus grande concentration en composés phénoliques ($523 \pm 4,55 \mu\text{g EAG}/\text{mg Ext}$), suivie de l'extrait méthanolique avec un taux de ($474 \pm 2,18 \mu\text{g EAG}/\text{mg Ext}$). Cela peut s'expliquer par le fait que l'extraction aqueuse est très sensible à la réduction de tous les groupements hydroxyles, et pas seulement des phénoliques. La méthode est donc malheureusement peu spécifique, car de nombreux autres composés réducteurs peuvent interférer avec d'autre composée que les polyphénols tels que les protéines, les sucres simples (glucose), les glycoprotéines et les pigments (GómezCaravaca et al., 2006).

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Tahira et al (2020), qui ont montré dans leur étude réalisée au Pakistan sur cette même espèce, que l'extrait aqueux donne la valeur la plus élevée en phénols totaux ($400 \text{mg EAG}/\text{g}$) par rapport au l'extrait méthanolique ($360 \text{mg EAG}/\text{g}$).

Il faut cependant noter que les résultats obtenus dans la présente étude sont nettement supérieurs à ceux trouvés par d'autres auteurs (**Ishtiaq Ahmed et al., 2016 ; Bellassoued et al., 2019**) qui ont utilisé un procédé extractif différent de celui que nous avons utilisé.

Aussi, il a été rapporté que le contenu phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique), tel que la partie de la plante utilisée en plus de facteurs extrinsèques (conditions climatiques température élevée exposition solaire, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage sécheresse, salinité)(**Bammou et al., 2020**).

3.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été évalué selon la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et l'étalon été la quercétine (Fig 46). La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par 1 milligramme de l'extrait ($\mu\text{g EQ/mg EXT}$). Les taux des flavonoïdes des deux extraits ont été obtenus à partir de la courbe d'étalonnage qui suit une équation de type : $y = 0,026 x + 0,100$ sachant que $R^2 = 0,998$.

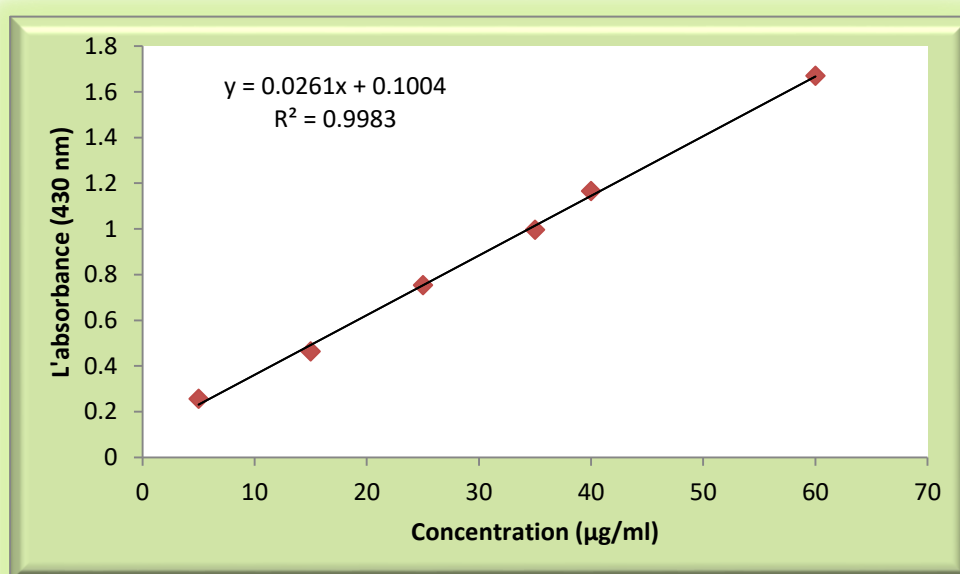


Figure46: Courbe d'étalonnage de quercétine.

Tableau11 : Teneurs en flavonoïdes des extraits obtenus de la plante *Cassia angustifolia* vahl.

Méthodes d'extraction	Extrait	Teneur en Flavonoïdes totaux (µg/mg) équivalent en quercétine
Extraction aqueuse	Aqueux	8,92 ±0.47
Extraction par un solvant à polarité croissante	Méthanol	5,23±0,18

D'après ces résultats, nous avons remarqué la teneur la plus élevée est enregistré dans l'extrait aqueux avec un taux de (8,92 ±0.47 µgEQ/mg Ext) suivi par l'extrait méthanolique avec une teneur de (5,2±0,18µg EQ/mg Ext).

Dans une étude réalisée par **Vijayasekhar et al. (2016)**, a montré que les teneurs en flavonoïdes de l'extrait méthanolique sont très loin et supérieures que celles enregistrées dans la présente étude (34,8µg EQ/mg). Cette teneur a été obtenue à partir de la même espèce poussant en l'Inde, ce qui laisse supposer que l'écologie de la plante est un facteur déterminant sur sa composition en flavonoïdes.

Dans une autre étude réalisée par **Laghari et al. (2011)**, La teneur en flavonoïde et supérieures aux résultats actuels, ils ont enregistré une teneur égale à (26,3mg EQ/g). Cette teneur a été obtenue à partir de la même espèce poussant au Pakistan. Cependant, ils ont utilisé des procédés extractifs différents (extraction par ultrasons, micro-ondes etc..) de celui que nous avons utilisé.

Il est évident que les taux en flavonoïdes dans nos extraits sont inférieurs aux teneurs en phénols totaux, ce qui indique que les extraits possèdent d'autres composés phénoliques comportent d'autres structures chimiques que celle des flavonoïdes (acide phénolique, tanins..) par d'autres composés non flavonoïdiques.

En conclusion, les extraits issus des méthodes d'extraction aqueuse et des solvants à polarité croissante (méthanol) ont révélé une richesse importante en composés phénoliques et flavonoïdiques, qui sont susceptibles d'avoir une activité antioxydant en plus d'autres activités biologiques (**Djeridane et al.,2006**).

4. Activités biologiques

4.1. L'activité antioxydante

Il existe plusieurs méthodes qui diffèrent par leurs principes d'analyse et leurs conditions expérimentales et les antioxydants ont des contributions différentes au potentiel antioxydant total (Wojdyło et al., 2007). Pour cette raison, il est recommandé d'utiliser au moins deux tests pour confirmer l'activité antioxydant. Dans cette étude, nous avons utilisé deux méthodes pour réaliser la capacité antioxydant in vitro de différents extraits obtenus à partir de feuilles de *Cassia angustifolia* à savoir : DPPH et le pouvoir anti hémolytique. Ces tests ont été choisis pour leur facilité de mise en œuvre pour évaluer l'activité antioxydant.

4.1.1. Pouvoir antioxydant du radical libre DPPH

L'effet de piégeage des extraits sur le radical DPPH est exprimé en valeurs d'IC₅₀ (µg/ml). Les IC₅₀ de l'extrait ont été déterminés à partir des graphes représentant le pourcentage d'inhibition en fonction de la variation en concentration de chaque extrait « I% = f (C) », les graphes sont représentés dans l'annexe 1. Les IC₅₀ des standards choisis pour ce test, à savoir l'acide gallique, BHT et la vitamine C, ont été aussi déterminées afin de les comparer à celles de l'extrait (Kraza, 2021).

Les résultats de l'activité antioxydante montrent que le pourcentage d'inhibition de l'extrait hydro-éthanolique de *Cassia angustifolia* est supérieur à 30% à des concentrations de l'ordre de 60 et 80 µg/ml respectivement (Tableau 1) (Annexe 1).

Les IC₅₀ sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs faibles reflètent un effet anti-radicalaire important (Villano et al., 2007).

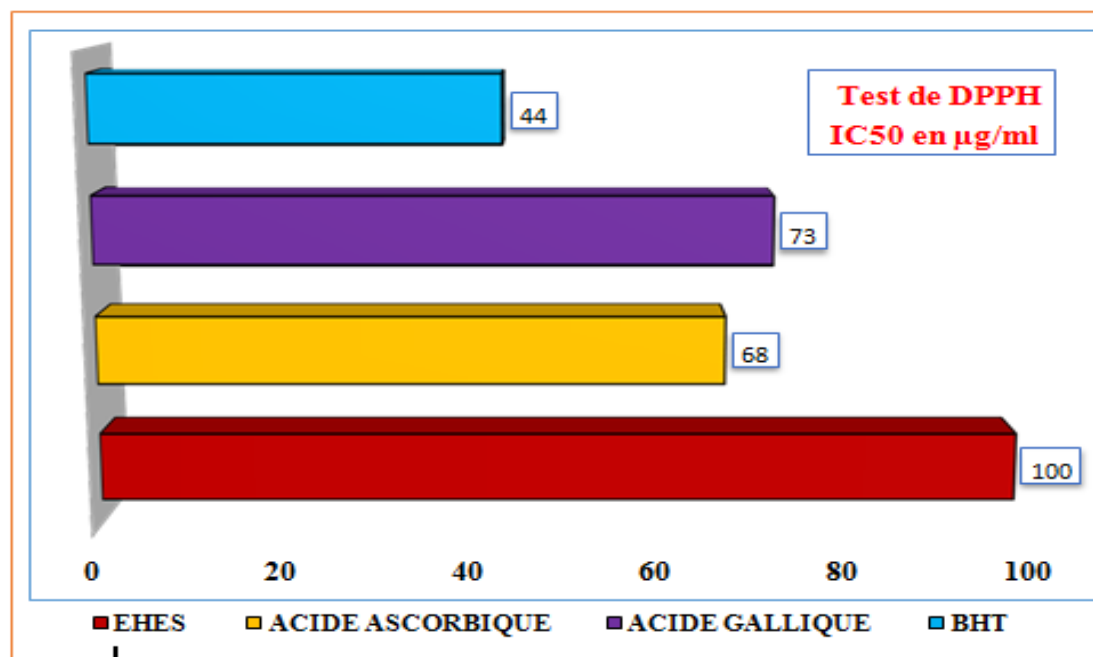


Figure 47: Histogramme des valeurs des concentrations inhibitrices 50 de l'extrait, VitamineC, BHA et l'acide gallique en (µg/ml).

Selon les résultats trouvés, l'extrait hydro-éthanolique des feuilles de *Cassia angustifolia vahl* est doté d'un pouvoir antioxydant modéré, leur IC₅₀ est de (100 ± 0.0031mg/ml) ce qui est supérieure à celle enregistrée pour l'acide ascorbique, l'acide gallique et BHT dont les valeurs des IC₅₀ de (68,85± 0.0031, 73,60±0.018, 44,19± 0.264 µg/ml) respectivement.

Une étude similaire a été réalisée par **Ishtiaq ahmed et al. (2016)** concernant l'activité antioxydante de l'extrait aqueux, méthanolique et éthanolique de graines de *Cassia angustifolia* du nord du Pakistan, il a été constaté que l'extrait éthanolique présentait une activité maximale de piégeage des radicaux libres DPPH (93 %) à une concentration de 500 µg/ml avec une valeur de IC₅₀ de (2,41 ± 0,02 µg/ml). Ces extraits montrent une activité très significative comparativement à nos résultats et ce qui montre que les graines ont la capacité de piéger les radicaux libres DPPH mieux que les feuilles.

Une autre étude de **Laghari et al (2011)** sur des feuilles et des fleurs d'une même espèce utilisant différentes techniques d'extraction, les meilleurs résultats étant obtenus avec la technique assistée par micro-ondes avec une valeur (IC₅₀ de 3,6 ± 7,4 µg/ml). **A.Omer et al. (2022)** ont déterminé des IC₅₀ égales à (24.74 ± 0.64µg/ml) pour l'extrait méthanolique.

L'extrait est parfois un facteur déterminant. Ainsi, l'activité antioxydante et la quantité des phénols d'un extrait sont des paramètres qui dépendent fortement du procédé d'extraction, de la nature du solvant et de sa polarité (Kraza, 2021).

En effet, plusieurs études indiquent que l'activité anti-radicalaire des extraits est relativement dépendante de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux. Ainsi, Ouedraogo et al. (2015) ont rapporté que la concentration en polyphénols totaux est corrélée significativement avec la capacité antioxydante.

4.1.2. L'activité anti hémolytique de l'extrait aqueux de *C.angustifolia* contre l'hémolyse induite par le stress oxydatif.

L'activité anti hémolytique détecte la capacité de toute substance à stabiliser la membrane et à réduire le degré de lyse de ces cellules. Dans cette partie d'étude, nous nous sommes intéressés à évaluer l'effet protecteur que pourrait avoir l'extrait aqueux de *Cassia angustifolia* sur la préservation de l'intégrité membranaire des érythrocytes. L'activité anti hémolytique des extraits a été mesurée par rapport à la peroxydation des érythrocytes induite par le peroxyde d'hydrogène.

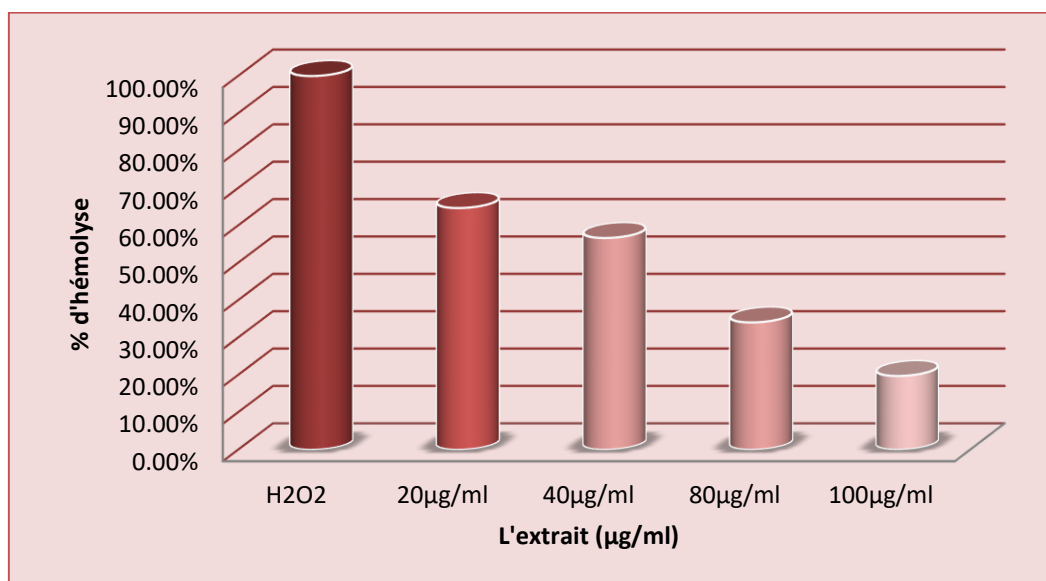


Figure48 : Taux d'hémolyse (%) des érythrocytes traités par le H₂O₂ en présence de différentes concentrations d'extrait aqueux de *C.Angustifolia*.

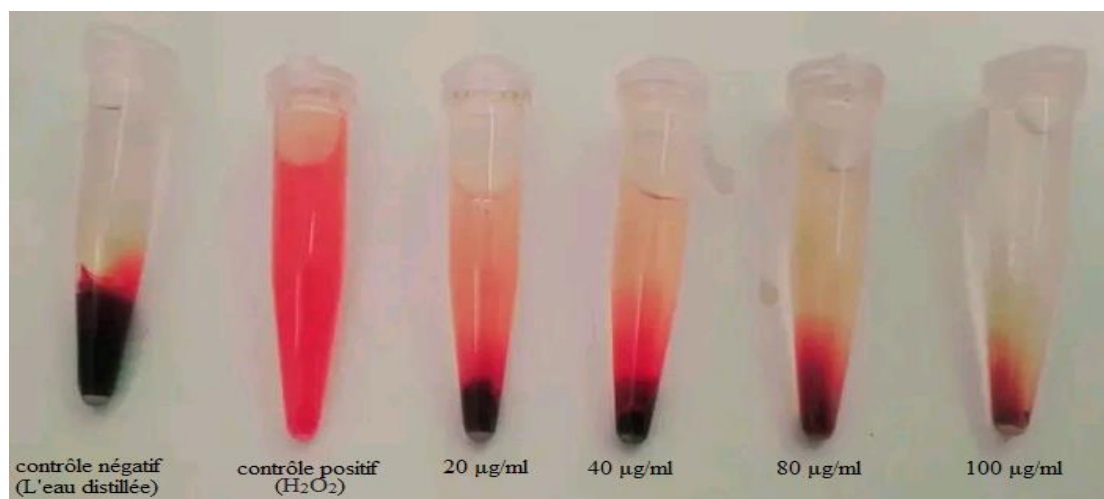


Figure49 : Processus d'hémolyse par libération de l'hémoglobine.

D'après ces résultats, on constate qu'il existe une relation inverse entre la concentration de l'extrait et l'effet hémolytique.

L'extrait aqueux a montré une activité anti hémolytique appréciable avec des pourcentages supérieurs à 56% à des faibles concentrations (20µg/ml) jusqu'à (40 µg/ml) qui sont proche du pourcentage de témoin, le volume (80µg/ml) a montré une activité anti hémolytique modérée avec un pourcentage de 34,93 %. En revanche, le taux d'hémolyse est plus inférieur (19,74%) lorsque la concentration est élevée (100 µg/ml).

Les feuilles de *Cassia angustifolia* ont présenté une activité inhibitrice dépendante de la concentration vis-à-vis de l'hémolyse érythrocytaire induite par le peroxyde d'hydrogène, attribuée aux constituants bioactifs, qui exercent des effets protecteurs contre les lésions oxydatives des macromolécules biologiques telles que les lipides et les protéines de la membrane érythrocytaire (Zhu et al.,2012).

De plus, l'extrait de feuilles de cette plante présente une activité anti hémolytique puissante en raison de la présence de flavonols et de glycosides, qui peuvent protéger les globules rouges d'une hémolyse oxydative causée par les radicaux libres (Azab et al., 2019). En outre, la liaison des flavonoïdes, tanins et terpénoïdes aux membranes des globules rouges inhibe de manière significative la peroxydation des lipides et améliore en même temps leur intégrité contre la lyse (Ouffai et al.,2022).

4.1.3. Test d'hémolyse

Le test d'hémolyse a été réalisé parce que, même si une plante possède un pouvoir antioxydant puissant, son utilisation en médecine traditionnelle et dans les

préparations pharmacologiques sera impossible en présence de leur effet hémolytique, qui est un indicateur de cytotoxicité (Chaouche et al., 2020).

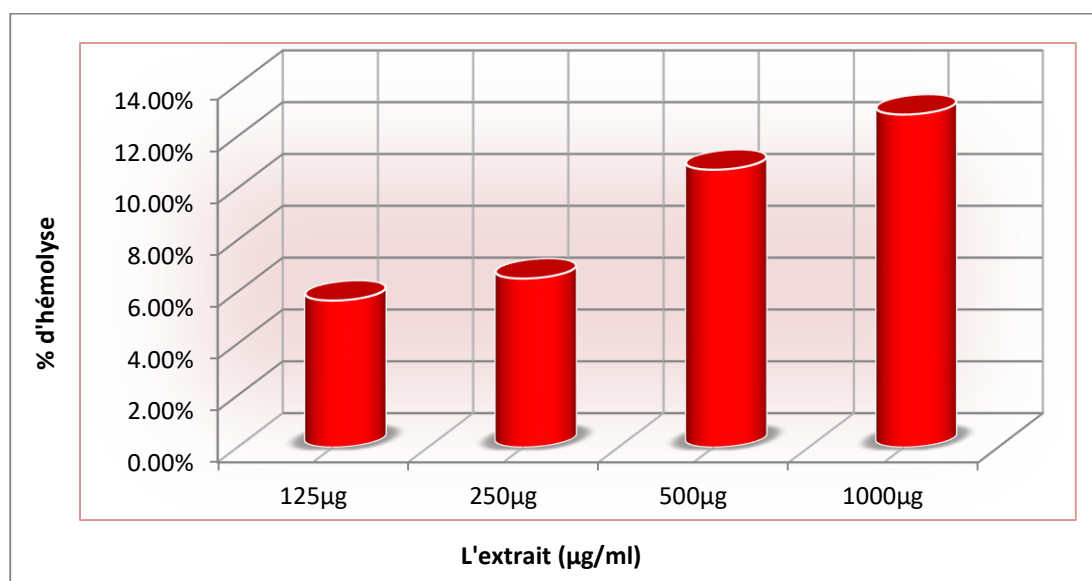


Figure 50: Evolution de taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'extrait aqueux.

Les résultats obtenus montrent que les pourcentages d'effet hémolytique sont directement proportionnels à l'augmentation des concentrations de l'extrait aqueux.

L'extrait aqueux a montré une légère activité hémolytique avec des pourcentages inférieurs à 11% à des concentrations de (125 µg/ml) jusqu'à (500 µg/ml), le taux d'hémolyse est plus élevé (12,85%) à une concentration finale (1000 µg/ml), ainsi tous les taux d'hémolyse obtenus à partir des différentes concentrations de l'extrait aqueux sont supérieurs à les taux d'hémolyse de contrôle positif (solution saline tamponnée).

Donc, d'après nos résultats, nous constatons que les extraits aqueux de *Cassia angustifolia* présentent un effet toxique très faible face aux érythrocytes isolés, avec un taux d'hémolyse qui ne dépasse pas le 12 % à une concentration de (1000µg/ml), ce qui les caractérise par l'absence de risque de cytotoxicité, elles sont également protègent les globules rouges du risque de stress oxydatif.

4.2. L'activité antithrombotique

4.2.1. Pouvoir thrombolytique

Dans le cadre de la découverte des médicaments cardioprotecteurs à partir de ressources naturelles, les extraits de *C.angustifolia* ont été examinés contre les thromboses. Les résultats sont présentés dans le la figure 51 et 52.

L'ajout de 100 μ l de contrôle positif (médicament fibrinolytique) au caillot et après une incubation ultérieure pendant 90 minutes à 37°C a montré (60,00%) de lyse du caillot. D'autre part, l'eau distillée a été traitée comme contrôle négatif qui présentait un pourcentage négligeable de lyse du caillot (2,01 %), cela a clairement confirmé que la dissolution du caillot ne se produit pas lorsque de l'eau est ajoutée au caillot.

Lorsque les caillots ont été traités avec différentes concentrations d'extrait (25, 50, 100 μ l), l'extrait concentré (contenant 100 μ l) auquel on n'a pas ajouté d'eau a présenté l'activité thrombolytique la plus élevée avec (51,50 %) qui est proches du contrôle positif, suivi des extraits dilués (50, 25 μ l) auquel (50, 75 μ l) d'eau ont été ajoutés respectivement, démontrent une faible activité thrombolytique (22,46 %) et (11,5 %).

On déduit donc que l'extrait concentré ayant l'activité thrombolytique la plus élevée par rapport aux autres extraits dilués.

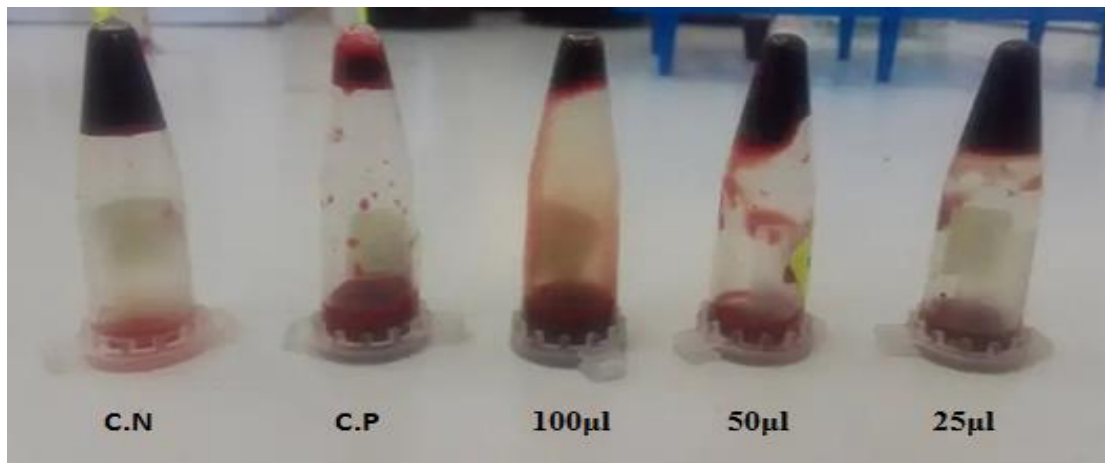


Figure51: Lyse de caillots d'échantillons sanguins des sujets normaux (contrôle positif et négatif et différentes concentrations de solutions à tester).

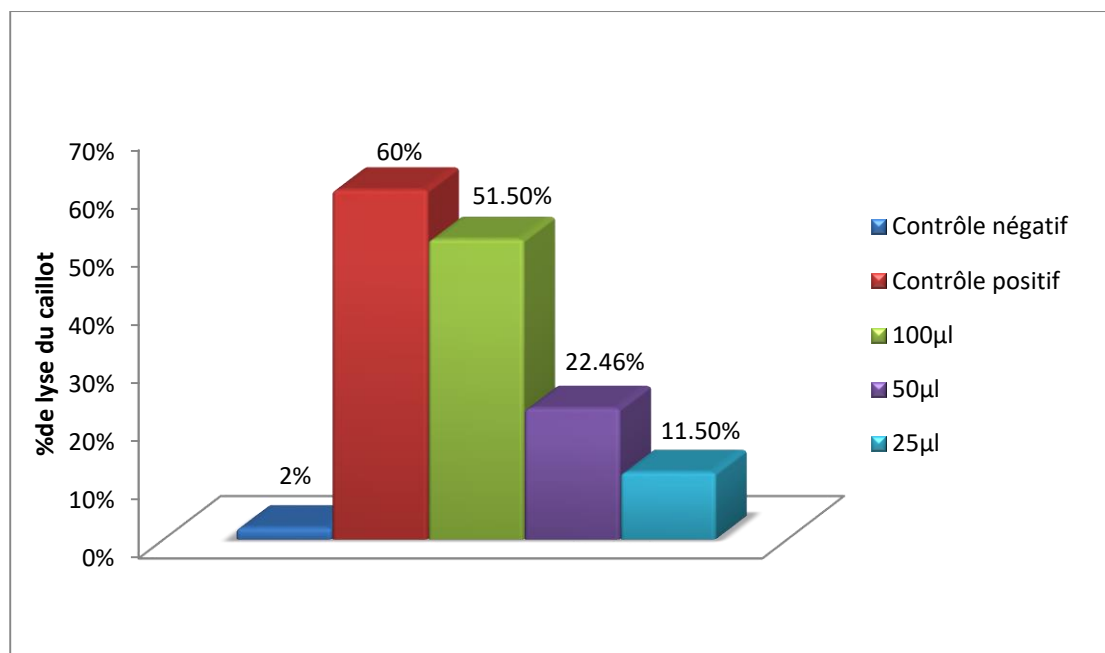


Figure52 : Effet thrombolytique de l'extrait à différentes concentrations, exprimé en pourcentage et en présence d'un médicament fibrinolytique.

Hossain et ses collaborateurs en (2012), ont étudié in vitro l'effet thrombolytique des différents extraits de feuilles de *Cassia angustifolia*, collectée dans la région de Mymensingh au Bangladesh. Ces auteurs, ont détecté que l'extrait de l'n-hexane de cette espèce présentait une activité thrombolytique élevée avec (53.22%).

En guise de conclusion et sur la base des résultats ci-dessus, il est évident que ces feuilles de plantes peuvent avoir des effets importants dans le domaine thrombolytique. Elle indique également la possibilité de développer de nouveaux médicaments dans les domaines thrombolytiques à partir de *Cassia angustifolia*. D'autre étude sont nécessaires pour isoler et caractériser les composées responsables de la lyse des caillons sanguines.

4.2.2. L'activité anticoagulante

Pour rechercher un allongement au niveau du temps de coagulation, nous avons testé le pouvoir d'activité anticoagulante de nos extraits aqueux de *cassia angustifolia* par l'évaluation in vitro vis-à-vis de la voie endogène et la voie exogène de la coagulation à l'aide de trois tests chronométriques, le TCK et le TQ et le FIB.

4.2.2.1. Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène

Les résultats de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène de l'extrait aqueux de *Cassia angustifolia* et lovenox sont représentés dans la figure 53.

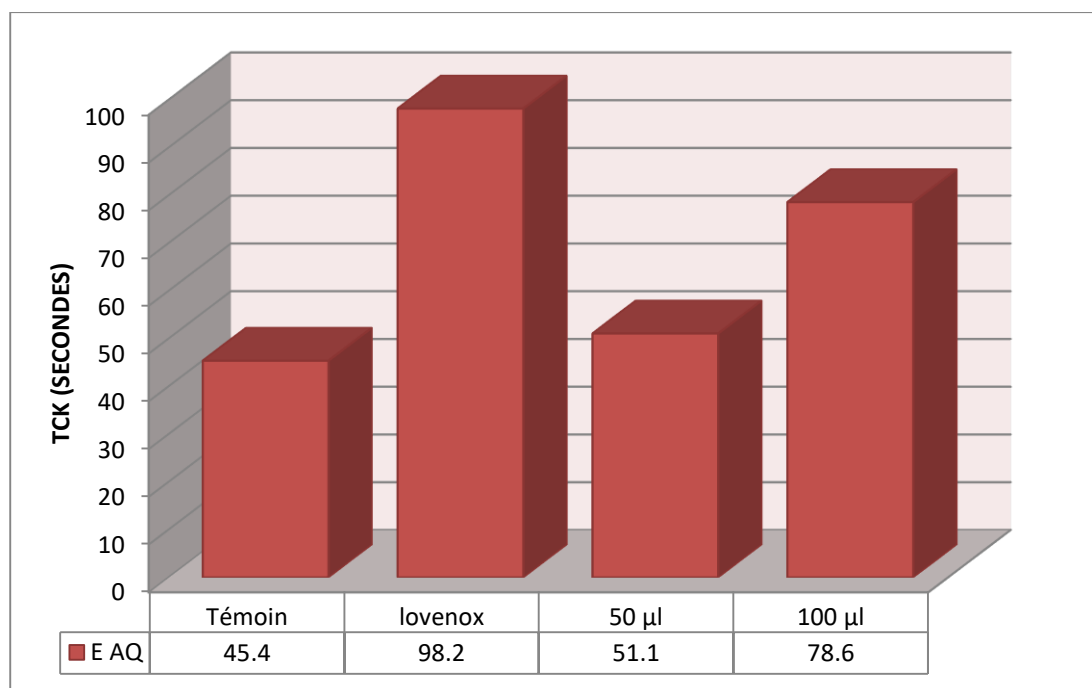


Figure53: Capacité anticoagulante de l'extrait aqueux et lovenox vis-à-vis de la voie endogène.

A la lumière des résultats obtenue, il ressort que l'extrait aqueux de *Cassia angustifolia* exerce une activité anticoagulante positivement corrélée avec le volume de l'extrait vis-à-vis de la voie endogène.

Le volume 50µl est capable d'exercer une activité anticoagulante estimée par un TCK de 51,1 S. Alors que, le volume 100 µl a une activité anticoagulante estimée par un TCK de 78,6 S, et qui sont supérieurs à celui du témoin (45,4S) et proches du lovenox (98,2S). Donc, les extraits testés ont une très bonne activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène.

4.2.2.2. Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène

Les résultats de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène de l'extrait sont représentés dans la figure54.

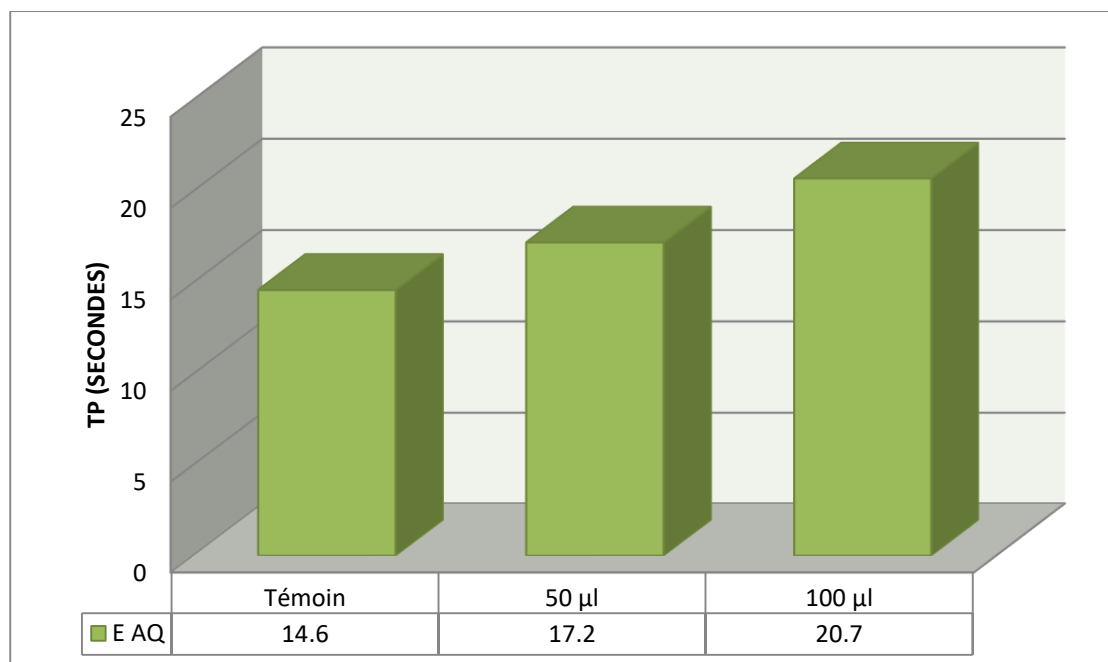


Figure54: Capacité anticoagulante de l'extrait aqueux vis-à-vis de la voie exogène.

A partir de la figure 54, des valeurs à l'ordre de 17,2 S et 20,7 S pour le TQ des extraits aqueux de *Cassia angustifolia* à des concentrations de (50, 100µl) respectivement ont été enregistrées par rapport à celui du témoin à 14,6 S. Donc, les extraits testés n'ont pas une grande activité anticoagulante remarquable vis-à-vis de la voie exogène.

4.2.2.3. Taux de Fibrinogène (FIB)

Les résultats de l'activité anticoagulante vis-à-vis le taux de fibrinogène de l'extrait sont représentés dans la figure55.

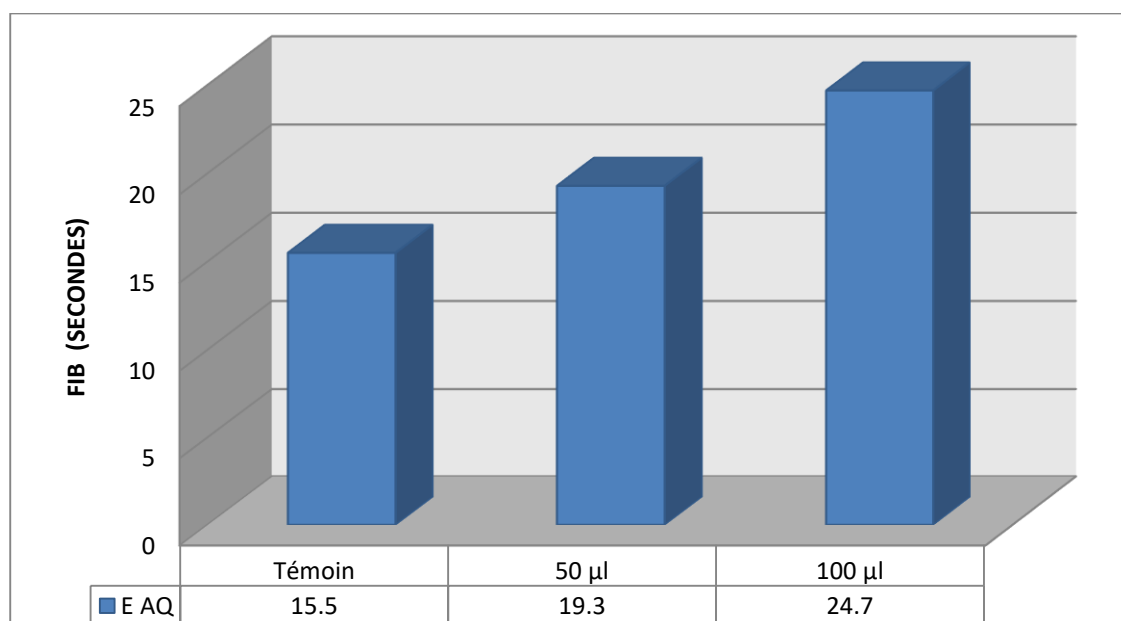


Figure55: Capacité anticoagulante de l'extrait aqueux vis-à-vis le Fibrinogène.

Selon la figure55, on remarque que les extraits aqueux testées donnent des FIB égalent à 19,3 à une concentration de 50µl et 24,7 S à une concentration de 100 µl, et qui sont un peu supérieur de témoin (15,5). Cela nous a permis de conclure que il n'y a pas de différence significative entre le temps de coagulation de témoin et le temps des extraits testées.

➤ Discussion

D'après nos connaissances et nos recherches, aucune n'a été menée sur les propriétés anticoagulantes du genre *Cassia* ou de la famille Fabaceae, de ce fait le sujet de cette étude est considéré comme étant le premier de son genre qui s'inscrit dans le cadre des études intéressées à la prévention et la thérapie des maladies thrombotiques et cela par la recherche d'une éventuelle activité anticoagulante des polyphénols de *Cassia angustifolia*.

Les résultats obtenus dans notre travail montrent que les extraits testées exercent une activité anticoagulante importante vis-à-vis la voie endogène et plus moins par la voie exogène et la fibrinogénation.

De plus, au vu du résultat du criblage phytochimique, il a été constaté que notre plante contient un amalgame de métabolites primaires et secondaires, et ces composés bioactifs spécialement les flavonoïdes, les alcaloïdes, les saponines, les coumarines et les polyphénols ont été signalés comme ayant des capacités d'agrégation antiplaquettaire et peuvent être considérés comme des agents à fort potentiel antithrombotique (Kubatka et al., 2022).

CONCLUSION

GENERALE ET

PPERSPECTIVES



Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales ont toujours été une source intarissable de substances naturelles bioactives telles que les composés phénoliques, ces composés suscitent actuellement l'intérêt de nombreux chercheurs en raison des bénéfices qu'elles pourraient procurer à l'homme notamment pour la santé.

Ce travail a été réalisé dans le cadre de l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante et antithrombotique des extraits phénoliques obtenus par deux méthodes d'extractions de la partie aérienne de la plante médicinale *Cassia angustifolia vahl*, plante de la pharmacopée maritime et largement utilisées dans la médecine traditionnelle. Elle a été choisie parmi les espèces les moins étudiées. Donc, ce travail est une contribution à une meilleure connaissance de cette espèce végétale.

Le criblage phytochimique réalisé par les réactions de caractérisation nous a permis de mettre en évidence la présence de divers métabolites primaires et secondaires tels que : lipides, protéines, alcaloïdes, polyphénols, flavonoïdes, tanins, stérols, triterpènes, coumarines, saponosides, anthraquinones, quinones libres, l'amidon, anthocyanes, glycosides cardiaques, sucres réducteurs, stéroïdes et mucilages dans cette plante. Les résultats de ce balayage nous amènent à extraire différents composés phénoliques dans notre plante. Après l'extraction de ces différents métabolites, nous avons réalisé les quantités de polyphénols totaux et de flavonoïdes dans les extraits de cette plante, les teneurs varient respectivement entre $523 \pm 4,55$ et $474 \pm 2,18$ μg en équivalent d'acide gallique par milligramme de la matière sèche et entre $8,92 \pm 0,36$ et $5,23 \pm 0,07$ μg équivalent en quercétine par milligramme de la matière sèche.

Ensuite, nous avons procédé à l'évaluation du pouvoir antioxydant de l'extrait hydro-éthanolique et de quelques antioxydants commerciaux pris comme références (Acide gallique, BHT, Vitamine C) par deux tests chimiques in vitro le test du DPPH et le pouvoir anti-hémolytique, ont décelé des activités antioxydantes notable chez l'extrait de la plante étudiée, ainsi cet extrait ont montré un effet protecteur plus important contre l'hémolyse érythrocytes induite par l' H_2O_2 avec un taux de 19,74%.

À la recherche de l'activité antithrombotique d'extrait de *Cassia angustifolia vahl*, nous avons testé l'effet thrombolytique de l'extrait aqueux contre les thromboses.

Nous avons pu prouver in vitro à travers cette étude la capacité thrombolytique de ceux-ci, avec un taux de lyse 51.50%. En effet, l'activité anticoagulante a été évaluée in vitro en utilisant les tests du temps de céphaline-kaolin (TCK), du temps de Quick (TQ) et le test de fibrinogène (FIB). L'étude de l'effet d'extrait sur l'allongement du temps de coagulation des deux voies a permis de démontrer que cet extrait exerce une activité anticoagulante vis-à-vis les deux voies de la coagulation mais cette activité est plus marquée sur la voie endogène que sur la voie exogène et du fibrinogène.

Il ressort de ce travail que *Cassia angustifolia vahl*, est un produit fort intéressant et très riche en substances bioactives qui pourrait être utilisé en pharmacutique et dans divers domaines. Les résultats obtenus sont très encourageants et prometteurs tant au niveau de l'activité antithrombotique, qu'au niveau de l'activité antioxydante.

Pour la continuité de ce travail avec plus d'efficacité, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- ✚ Caractérisation quantitative des substances phénoliques par des techniques de séparation plus performantes HPLC ou LC/MS.
- ✚ identifier et caractériser les principes actifs et les substances responsables de ces propriétés pharmacologiques ainsi que leurs modes d'actions.
- ✚ Evaluation d'autres activités pharmacologiques comme l'activité anti-inflammatoire, antidiabétique, anti-virale et anticancéreuse.
- ✚ Des études similaires in vivo pourraient être intéressantes.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES



Références bibliographiques

A

Ali-Rachedi F., Meraghi S., Touaibia N., Sabrina M.(2018).Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *Scabiosa Atropurpurea* sub. *Maritima* L. Bulletin de la Société Royale des sciences de liège, 87:13-21.

Asfaw M.M., AbebeFB. (2022). Traditional Medicinal Plant Species Belonging to Fabaceae Family in Ethiopia: A Systematic Review. International Journal of Plant Biology;12:8473.

Amrianto A , Ningsiha K.N., Ode Ishaka S.S ., Fitriana U.A., Salsabilaa S., Salama D.A. (2023). Development and validation of analysis method for sennoside B in *Cassia angustifolia* using UPLC-MRM/MS. Current Research on Biosciences and Biotechnology ; 4(2):269-274.

Abbas S.R., Rani G. (2020).Medicinal Significance of Alexandrian Senna.Journal of natural sciences ; 8(1): 24-29

AsmatI., Khan A., Khan I. (2015).Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review.Saudi Pharm J. 24(5): 547–553.

Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S.E., Bektaşoğlu B., Berker K.I., ÖzyurtD. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. Molecules 12(7), 1496- 1547.

Andrés Juan C., Pérez de la lastra J.M, Plou J.F.,Pérez lebena E.(2021).The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies.Int.J. Mol.Sci ;22(9), 4642

Azat Aziz M., Shehab Diab A., Abdulrazak Mohammed A. (2019).Antioxidant Categories and Mode of Action.intechopen.83544.

Amiral, C. (2020). Développement de tests de laboratoire pour le suivi de patients sous traitement anticoagulant. . Biotechnologies ; 03150803.

Azab A.E., Adwas A.A., Elsayed A.S.I., Quwaydir F.A.(2019).Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. Appl Biotechnol Bioeng;6(1):43-47.

Albahim J., Alosaimi J.S., Altaher A.M., Almulayfi R.N., Alharbi N.F.(2021).Employment of *Cassia angustifolia* leaf extract for zinc nanoparticles fabrication and their antibacterial and cytotoxicity.Saudi J Biol Sci. Jun; 28(6): 3303–3308.

A.Omer H., Caprioli G., Abouelenein D., Mustafa A.M., Ibrahim Uba A., Ak G., Ozturk R.B., Zengin G., Yagi S.(2022).Phenolic Profile, Antioxidant and Enzyme

Inhibitory Activities of Leaves from Two Cassia and Two Senna Species. *Molecules* ;27, 5590.

B

Berrani A., Aicha Lrhorfi L., Dahmani F., Fkhir H., Bengueddour R. (2015). Criblage phytochimiques de deux plantes médicinales : *Vitex agnus Cactus* et *Anabasis aretioides*. *Science lib Mersenne*, V7 N°151201.

Blond A.S. Boutefnouchet X. Cachet, K., Cottet G. Genta-Jouve R., Grougnet M., Kritsanida F.-H. Porée.(2014). *Pharmacognosie Université Rêne Descarte (paris)*, pp :04.

Boizot N., Charpentier J.-P. (2020). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA*, pp.79-82. hal02669118f.

Boutière-Albanèse B . Laboratoire d'hématologie, centre hospitalier universitaire Conception, 147 boulevard Baille, 13385 Marseille cedex (France). *EM Consulte* ;90-20-0085

Bammou M., Bouhlali E.D.T, Sellam K., El Rhaffari L., Ibijbijen J., Nassiri L. (2020). Évaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits aqueux des feuilles et des fleurs de *Bituminaria bituminosa* (L.) Stirton. *phyto-0226*.

Blaise K.N., Selvarai J., Tane P., Nchiozem A., Simo I., Mvnl C., Palanisamy D. (2020). A Review on *Adenocarpus mannii*; A main Species of the Genus *Adenocarpus*. *Current Traditional Medicine*,6, 3-12

Brinckmann J., Smith T. (2018). *Cassia angustifolia* and *Cassia senna* (syn. *Cassia acutifolia*, *Senna alexandrina*) *Family: Fabaceae (Leguminosae)*. *HerbalGram* ; 120 :6-13

Balasankar D., Vanilarasu K., Selva Preetha P., Rajeswari M., Umadevi S., Bhowmik D.(2013). *Journal of Medicinal Plants Studies*; 1(3): 2320-3862.

Bruneton J. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4e ed.)

Brahmkshatriya P.P., Brahmkshatriya P.S.(2013). Terpenes: Chemistry, Biological Role, and Therapeutic Applications. *Natural Products* : 2665–2691.

Bruneton J.(1999). *Pharmacognosie ,Phytochimie ,Plantes médicinales*. 3ème édition. France : Tech et Doc – Lavoisier. Technique & Documentation, Paris.

Badiaga M. (2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, université de Bamako.10 p.

Bouhaddouda N. (2016). Activités antioxydants et antimicrobienne de deux plantes du sol local: *origanum vulgare* et *menthapulegium*. Thèse doctorat, univ. annaba, p.10.

Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006). Phenolic Compounds in Plants and Agri-Industrial By-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses. *Food Chemistry*, 99 : 191-203.

Bouchouka E. (2016). Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes. Thèse de doctorat en science, PP 23

Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11) : 317-333.

Benmlih M., Ghanam J. (2012). Polyphénols d'Huile d'Olive, Trésors Santé. Médicatrix, Embourg, Belgique.

Benabed K.H. (2018). Composition chimique et activité antioxydante des huiles essentielles et extraits phénoliques de deux espèces de la famille des Lamiaceae (Doctoral dissertation, Université Kasdi Merbah- Ouargla ; 126).

Benslama A. (2020). Etude phytochimique et activités antioxydante et hépatoprotectrice des extraits de *Thymus pallidus*. Thèse doctorat en Science biologique, Université Ferhat Abbas-Sétif, pp : 9.

Batty P., Smith J.G. (2010). Haemostasis. *Surgery (Oxford)* ; 28(11):530–535.

Boutgourine M. (2019). Guide d'hémostase à l'usage de l'étudiant en médecine. Thèse pour l'obtention du doctorat en médecine. Université cadi ayyad. Pp :11.

Besbes S. (2015). Rôle de la Protéine C, un anticoagulant naturel, dans l'association thrombose et cancer. *Cancer*. Université Paris Sud - Paris XI; Université du Centre (Monastir, Tunisie). Faculté de Pharmacie. Français. ffNNT :PA11T048ff. fftel-01220590.

Bourahima B., Donatien B.C., Noël D.D., Herman W.B., Leslie T.D., Romual D. S., Karamoko O. (2021). Comparative study of the anticoagulant powers of the aqueous macerate, ethanolic macerate and aqueous decoction of the leaves of *Uvaria chamae* P. Beauv. (Annonaceae). *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* 11(2-s) : 82-88.

Bellassoued K., Hamed H., Ferdaws, Kallel, G., VanPelt, R., Makni, J., Ayadi F., Elfeki A. (2019). Antioxidant and hepatopreventive effects of *Cassia angustifolia* extract against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Archives of Physiology and Biochemistry* 127(3):1-11.

C

Caquet R. (2004). 250 examens de laboratoire : prescription et interprétation (9ème Ed), Masson (Paris), pp :388-389.

Chaouche T.M., Haddouchi F., Boudjemai O., Ghellai I. (2020). Activité antioxydante et hémolytique des extraits de *Ziziphus jujuba* Mill et *Rhamnus*

alaternus (Rhamnaceae) d'Algérie. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 89, articles, p :1 –14.

Cuéllar M.J., Giner R.M., Recio M.C., Manez S., Rios J.L. (2001). Topical anti-inflammatory activity of some Asian medicinal plants used in dermatological disorders. *Fitoterapia*;72(3):221-9.

Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H.(2006). Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd.

Călinoiu L., Vodnar D.(2018). Whole grains and phenolic acids: A review on bioactivity, functionality, health benefits and bioavailability. *Nutrients*. 10(11): 1615-1624.

Catier O., ROUX D. (2007). Botanique pharmacognosie phytothérapie. Paris 3^e édition. Pp113. ISBN : N 2915585520.

Cano N., Barnoud D., Schneider S.M., Vasson M.P., Hasselmann, M.,Leverve, X. (2006).Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Edition Springer, p 255.

Chiha F., Benkara Y., Sellami A., Karouche S. (2016). Stress oxydant : Influence d'une complementation nutritionnelle en antioxydants et adaptation a l'exercice physique.Science humaines n°45,,pp52-63.

Clemente-Suarez V.J.,Bustamante-sanchez,A.,Mielgo-Ayusu,J.,Martinez Guardado,I., Martin-Rodriguez,A.,Tornero-Aguilera,J.F.(2023).Antioxidants and Sports Performance.*Nutrients* ; 15(10), 2371.

Connie H.,MillerP.(2019). Évaluation en laboratoire du traitement de la maladie de von Willebrand. Médecine transfusionnelle et hémostase (troisième édition).

Choi J.H., Kim S.(2022).In Vitro Antithrombotic, Hematological Toxicity, and Inhibitor Studies of Protocatechuic, Isovanillic, and p-Hydroxybenzoic Acids from *Maclura tricuspidata* (Carr.) Bur.*Molecules* ; 27(11) :3496

Cazenave P., Gachet C., Lanza F., Wiesel M.L. (2003). Plaquettes et thrombose artériellePlatelets and arterial thrombosis.Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine ;187(1),pp :35-46.

Chehtit-HacidF.(2016). Etude de la variabilité biochimique, physiologique et évaluation des activités biologiques des polyphénols de deux espèces du genre *Pistacia* (*P. lentiscus* L. et *P. atlantica* Desf.). Université Mouloud Mammeri de TiziOuzou.

D

Dia W. (2019). Optimisation de l'extraction des polyphénols des (*Phoenix dactylifera*) L par différents solvants et méthodes. Thèse de doctorat, Université Kasdi Merbah-Ouargla, pp : 28 ,29

Dubois-deruy E., Victoriane P., Annie T., Florence P. (2020). Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants (Basel)*.14; 9(9):864.

Durackova Z., Djrolo F., HOUNGBE H., Avode G., Attoulou V., Addra B., Kodjoh, N., Avimadj M. (2008). Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. *Mitochondrial medicine*. . Gvozdzakova A (ed), 19-43.

De Filippis B., Ammazalorso A., Amoroso R. & Giampietro L. (2019). Stilbene derivatives as new perspective in antifungal medicinal chemistry. *Drug Develop Res.* 80(3): 285-293.

Dini I., Grumetto, L. (2022). Recent Advances in Natural Polyphenol Research. *Molecules*.11; 27(24):8777.

Dongarwar A.S., Indurwade N.H., Nimbekar T.P., Sonwane P., Selokar S. (2020). Phytochemical screening and pharmacological activity of *Cassia angustifolia* Bark. *Global Journal for Research Analysis*; 9(1).

Daira N.E., Maazi M.C., Chefrour A. (2016). Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale (*Ammoides verticillata* Desf. Briq.) De l'Est Algérien. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* ; 85,pp :276 - 290

Diaby A. (2019). Screening phytochimique et dosage des polyphénols et des flavonoïdes des feuilles de *Dialium guineense* Willd. Thèse de doctorat en pharmacie. N° 122

Defraigne J.O., Pincemail J. (2008). Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Rev. Med. Liège*. 63: pp :10 -19.

Denizot V.(2020). Pathologies de l'hémostase: hémophilies et maladie de Willebrand. Thèse d'exercice | Université de Limoges | 1992 3 Licence CC BY-NC-ND 3.0 ;pp :27.

Dao D., Righini M., Guessous I.(2017). Thrombose veineuse profonde - Service de médecine de premier recours – DMCPRU – HUG.

Djeridane A., Yousfi M., Boubekour N., Boutassouna D.(2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing Phenolic compounds. *Food Chemistry*;97(4):654-660.

Desmier T. (2016). Les antioxydants de nos jours, définition et application. Thèse d'exercice .Université de Limoges ; pp :13.

E

Ebrahimzadeh M.A, Nabavi S.F., Nabavi S.M. ,Eslami M.(2010). « antioxidant and antihemolytic activities of *mentha piperita* ». *pharmacologyonline* 9: 744-52.

El-Haoud H., Boufellous M., Berrani A., Tazougart H., Bengueddour R. (2018). Phytochemical screening of a medicinal plant: *Mentha spicata* L. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 9: 226-233.

Ezez Asfaw D.(2022). Antioxidant Properties of Phenolic Compounds to Manage Oxidative Stress / A Review. Journal of Advances in Agronomy and Crop Science, Vol 1: 202.

F

Flores C.M., Gonzalez-Chavez S.A., Delrio-Najera D., Pacheco Tena C.(2016). Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. Biomed Res Int.: 6097417.

Favier A. (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Review .l'actualite chimique, 108-115.

Favier A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. Ann Pharm Fr. vol(64): pp390-396.

Fettah A. (2019). Étude phytochimique et évaluation de l'activité biologique (antioxydante-antibactérienne) des extraits de la plante *Teucrium polium* L. sous espèce *Thymoides* de la région Beni Souik, Biskra. Thèse doctorat en Chimie, Université Mohamed Khider-Biskra, pp : 42

Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C., (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs and their biological activities. Compte Rendu de Biologie, 331: 372–379

G

Gyurászová M., Gurecká R., Bábícková J., Tóthová L. (2020). Oxidative Stress in the Pathophysiology of Kidney Disease: Implications for Noninvasive Monitoring and Identification of Biomarkers. Oxidative Medicine and Cellular Longevity (Vol. 2019).

Gordon J McDougall.(2017). Phenolic-enriched foods: sources and processing for enhanced health benefits. Proc Nutr Soc;76(2):163-171.

Gómez-Caravaca A.M., Gómez-Romero M., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41(4) : 1220-1234.

Gibout M. (2014). La coagulation et ses enjeux : état des lieux sur les traitements actuels et sur l'accompagnement à l'officine rendu possible par les entretiens pharmaceutiques. Sciences pharmaceutiques ; 01018091.

Gaussem P., Plawinski L., Anglés-cano E. (2021). Physiologie et exploration de la fibrinolyse. Elsevier Masson SAS, 1984(21)44399-2.

H

Hyeulle C. (2010). Iatrogénie et dispensation des antagonistes de la vitamine K à l'officine. Université Henri Poincaré – Nancy1; pp :11.

Hussain T., Bie T., Yulong Y., Francois B., Myrlene T., Najma R. (2016). Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us. *Oxid Med Cell Longev*.16: 7432797.

Hininger-Favier I. Laboratoire de Biologie du stress Oxydant. Faculté de Pharmacie. Grenoble.

Harif M. (2015). Hémostase: de la physiologie à la pathologie. 282074149 ;pp. 237.

Hartmann T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68: 2831 - 2846.

Herendeen P., Cardoso D., Herrera F., Wing S. (2022). Fossil papilionoids of the Bowdichia clade (Leguminosae) from the Paleogene of North America. *American Journal of Botany*; 109:130–150.

H. El-Morsy T. (2013). Antibiotic Properties of Leaf Extracts of *Senna alexandrina* (L.). *J Am Sci*;9(1):288-29

Hossain K., Musfizur H., Most Nazma P., Mahmudul H., Siddiqui I., Ahsanul H. (2012). Antimicrobial, cytotoxic and thrombolytic activity of *Cassia senna* leaves (family: Fabaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02 (06): 186-190.

Houghton P.J., Raman A. (1998). Laboratory Hand book for Fractionation of Natural Extracts. Chapman et Hall, 1ère éd, Londres.

I

Ishtiaq Ahmed S., Qasim Hayat M., Tahir M., Mansoor Q., Ismail M., Keck K., Bares R. (2016). Pharmacologically active flavonoids from the anticancer, antioxidant and antimicrobial extracts of *Cassia angustifolia* Vahl. *BMC Complement Altern Med* ;11;16(1):460.

Iserin P. (2001). Encyclopédie des plantes médicinales. 2ème édition. Londres ;pp :7

K

Khurm M., Wang X., Zhang H., Hussain S.N., Qaisar M.N., Hayat K., Saqib F., Zhang X., Zhan G., Guo Z. (2020). The genus *Cassia* L.: Ethnopharmacological and phytochemical overview. John Wiley & Sons Ltd. *Phytotherapy Research*;1–50.

Kumar G., Karthik L., Rao K.V.B. (2011). Hemolytic activity of Indian medicinal plants towards human erythrocytes: an in vitro study. *Elixir Applied Botany*. 40, 5534-5537.

Kraza L. (2021). Evaluation de l'activité antioxydante, antimicrobienne et antidiabétique des composés phénoliques d'une plante médicinale *Globularia alypum* L. dans la région de Laghouat. Thèse doctorat en Biologie végétale, Université Larbi Ben M'hidi Oum El-Bouaghi, pp :24,25.

Khosravi M., Poursaleh A., Ghasempour G., FarhadS., Najafi M. (2019). The effects of oxidative stress on the development of atherosclerosis. *Biol Chem.* 27;400(6):711-732.

Khan J., Deb P.K., Priya S., Medina K.D., Devi R., Walode S.G.(2021). Dietary Flavonoids: Cardioprotective Potential with Antioxidant Effectsand Their Pharmacokinetic, Toxicological and Therapeutic Concerns. *Molecules* 26, 4021.

Kamaraj C., Rahuman A., Mahapatra A., Bagavan A., Elango G.(2010).Insecticidal and larvicidal activities of medicinal plant extracts against mosquitoes. *Parasitol Res*;107(6):1337-49

Kaushalkumar Jani D., Goswami S. (2020).Antidiabetic activity of *Cassia angustifolia* Vahl.and *Raphanus sativus* Linn. leaf extracts.*J Tradit Complement Med*; 10(2): 124–131.

Kumar A .,Gupta A.K.,Siddiqui S., Siddiqui M.H., Jnanesha A.C., Lal R.K. (2022).An assessment, prospects, and obstacles of industrially important medicinal crop Indian Senna (*Cassia angustifolia* Vahl.): A review. *Industrial Crops and Products* :187(1).

Kehili N. (2018). L’effet protecteur d’un antioxydant naturel contre le stress oxydatif induit par le chlorure de cadmium, Thèse de Doctorat en Biologie Animale et Environnementale, Université Badji-Mokhtar-annaba, pp : 4.

Kossa Essaie S., Florent K.K., Christelle G., Eugenie M.S., Christophe K.K (2022).Prevalence and determinants of subclinical atherosclerosis during venous thromboembolism at Cardiology Institute of the Abidjan. *Rev int sc méd Abj* - ISSN 1817-5503,RISM ;24,3:311-317

Kortchinsky T., Vigué B., Samama C.M.(2013).Antagonisation des héparines et des nouveaux anticoagulantsReversal for heparins and new anticoagulant treatments. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* ;32(1),pp :37-49.

Kubatka P., Mazurakova A., Koklesova L., Samec M., Sokol J., Mathews Samuel S., Kudela E., Biringer K., Bugos O., Pec M., Link B.(2022).Antithrombotic and antiplatelet effects of plant-derived compounds: a great utility potential for primary, secondary, and tertiary care in the framework of 3P medicine. *EPMA Journal* volume 13 ;pp : 407–431.

Kahlouche-Riachi F.(2014).Evaluation chimique et activité antibactérienne de quelques plantes médicinales d'Algérie. Thèse doctorat, Université Frères Mentouri.Constantine.pp :15.

Kiran T.R., Otlu O., Karabulut A.B. (2023).Oxidative stress and antioxidants in health and disease.*Journal of Laboratory Medicine* ;10 :1515.

Kunutsor S., Laukkanen J. (2020).Incidence of venous and arterial thromboembolic complications in COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Thromb Res*; 196: 27–30

L

Lezoul N.E.(2021). Étude des procédés d'extraction des substances bioactives à partir des plantes médicinales.Thèse de doctorat. Université Mouhammed Boudiaf-Oran.1.pp :41.

Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L. Della M. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 13: 757-772.

Lal RK., Kumar Gupta A., Siddiqui S., Siddiqui M., Jnanesha AC., Lal RK., Kumar A.(2022). An assessment, prospects, and obstacles of industrially important medicinal crop Indian Senna (*Cassia angustifolia* Vahl): A review.*Industrial Crops and Products* ; Vol187, Part B, 115472

Liu W., Liu J., Yin D.,Zhao X. (2015). Influence of ecological factors on the production of active substances in the anti-cancer plant *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) TS Ying. *PLoS one*, 10(4), e0122981.

Lemaoui A.(2011). Activités antioxydante et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa*.L Algérienne.Mémoire de Magister. Université Ferhat Abbas-Sétif,pp :8,24

Libby P.,Ridker P.M., Hansson G.K.(2011). "Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis." *Nature* : 473(7347): 317-325.

Les F., Casedas G., Lopez V. (2021).Bioactivity of Medicinal Plants and Extracts.*Biology (Basel)* ;10(7): 634.

Laghari A.,Memon S.,Nelofar A., Laghari A.H. (2011). extraction, identification and antioxidative properties of the flavonoid-rich fractions from leaves and flowers of *cassia angustifolia*. *american journal of analytical chemistry*,2 :871-87

M

Mpondo E.M., Yinyang J., et Dibong S.D. (2015). Valorisation des plantes médicinales à coumarines des marchés de Douala Est (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences*, 85(1): 7804-7823.

Matthias E.,KliebensteinD. (2020).Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy.*Plant Physiol*.Sep; 184(1): 39–52.

Michel T. (2011). Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*) (Thèse de doctorat). Université d'Orléans.

Masyita A., Mustika Sari R., Dwi Astuti A., Yasir B., Rahma Rumata N., Bin Emran T., Nainu F., Simal-Gandara J. (2020). Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chemistry*: X, 13

Marouf A., Reynaud J.(2007). La botanique d'A à Z : 1662 définitions. Dunod, Paris. 352p

Marc F., Davin A., Deglène-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M., Fritsch P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *M/S : médecine sciences*, 20(4) : 458–463.

Meziti A. (2009). Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa*. Mémoire de magister en biochimie appliquée, Université El-Haj Lakhdar-Batna, pp :14.

Merouane A., Noui A., Medjahed H., Nadjari benhadj ali K., Saadi A. (2014). Activité antioxydante des composés phénoliques d'huile d'olive extraite par méthode traditionnelle, 8(4): 1865-1870.

Mansouri A, Embarek G, Kokkalou E. Kefalas P.(2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera* L.) *Food Chem.* ;89:411–420.

Maurer E. (2014). Etude du rôle des étapes initiales d'adhérence des plaquettes sanguines et du flux pulsatile dans l'agrégation plaquettaire. *Hématologie*. Université de Strasbourg. Français. ffNNT : STRAJ009ff. fftel-01296486f, pp :88 ,89.

Mistler A.(2013). Le risque thrombotique en chirurgie orthopédique majeure et sa prévention par les traitements anticoagulants. *Sciences pharmaceutiques*.ffhal-01731737.

Meyer O., Jude P.B., Dominique L., Susen S., Hachulla E. (2008). L'hémostase et ses anomalies dans les maladies inflammatoires.Paris ; 11_080407, pp :4,5.

Majhenic L., kerget M.S., Knez Z. (2007) Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*. 104 : 1258–1268.

N

Nony C. (2018). Prise en charge d'un patient traité par anticoagulant oral en fonction des structures sanitaires (hôpital, officine) : comment optimiser les échanges ville-hôpital pour . Université de Limoges.pp :24.

Nilofer., Srivastavac Y.,KumarA., Kharé P.,Singh A.,Singh S.(2022). Variation in morphophysiological responses and differential expression of sennoside biosynthesis pathway genes under water stress in *Cassia angustifolia* Vahl.*Industrial Crops and Products*.184.

N'geussan K. , Beugré K., Guédé N.Z., Dossahoua T.,LaurentK.(2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature* , 6 N°1 : 1 – 15.

Niedzielska E., Smaga I., Gawlik M., Moniczewski A., Stankowicz P., Joanna, P., Malgorzata F. (2015). Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol.* 53(6):4094-4125.

Neu C.(2011). Les interactions entre les antithrombotiques et les plantes médicinales. Thèse de doctorat en Sciences Pharmaceutiques. Université Henri Poincaré, NANCY 1. France. pp :137.

Neha K., Haider M.R., Pathak A., Yar M.S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *Eur J Med Chem*, 178: 687-704

Nizamaldin Y., AbiNajm S., El Hage M., Samson J.(2012). Hémostase locale en chirurgie orale, 1ère partie: physiologie de l'hémostase, EDP Sciences, Vol 18, 119-127.

O

Oueslati K. (2017). Caractérisation et modélisation de la production des radicaux Libres oxygénés par la chimie de Fenton dans un milieu mimétique de la viande. Thèse doctorat en Sciences des aliments, Université clermont auvergne - France, pp :22.

Osman N.N., Al-ahmadi A.M., Ghazwani A.H., Alhoraibi H.M., Alanbari K.H., Backer W.S.(2022). Role of Senna, Cassia angustifolia and Fennel, *Foeniculum vulgare* in Ameliorating Nephropathy in Diabetic Rats. *Bioscience Biotechnology Research Communications* ;15(1).

Ould Abdellahi L., Kerrouri S., Bouabid B., El Yahyaoui O., Sammama A., Ould Ahmed Beddih M.L., Ould Habiboullah H., Idoumou M., Bengueddour R. (2017). Phytochimic Screening and characterization of the substances present in the extracts of two marine algal: *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt, 1955 and *Cystoseira tamariscifolia* (Hudson); Harvested from the bay of the star in Mauritania. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*; 6(5): 1510-1514

Ouedraogo A., Koala M., Dabire C., Hema A., Bazie V., Ouattara L., Gnoula, C.H., Pale, E., Nebie, R. (2015). Teneur en phénols totaux et activité antioxydante des extraits des trois principales variétés d'oignons (*Allium cepa* L.) cultivées dans la région du CentreNord du Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* .9(1): 281-291

Ouffai K., Azzi R., Abbou F., Lahfa F.B.(2022). Antihemolytic and antioxidant activities of aerial parts extracts of *Zygophyllum album* L. and *Globularia alypum* L. from Algeria. *J Nat Prod Res App* 2022, 1(3): 41-55.

P

Petit A.C.(2011). Toxicité et utilisation de quelques Fabaceae alimentaires et médicinales. Thèse de doctorat, université Henri Poincaré-NANCY-I, pp. 2

Pochapski M.T., Fosquiera E.C , Esmerino L.A., Dos Santos E.B., Farago P.V, Santos F.A, Groppo F.C. (2011). Phytochemical screening, antioxidant, and

antimicrobial activities of the crude leaves' extract from *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Pharmacogn Mag.* 7(26):165.

Pathak N., Sanjay K., Bhat N.M., Rathod J.D. (2011).Phytopharmacological properties of Coriander sativum as a potential medicinal tree.*Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1 (04):20-25.

Peirs C.(2005).Contribution à d'étude phytochimique de *Galega officinalis* L. (Fabaceae). Thèse de doctorat. Ecole doctorale : sciences des procédés (France), pp. 25-27

Pizzino G., Natasha, I., MariapaolaC., Giovanni, P., Federica M., Vincenzo A., Francesco, S., Domenica, A., Alessandra, B. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 17: 8416763.

Peterson J., Dwyer J., Adlercreutz H., Scalbert A., Jacques P.,McCullough M. L. (2010). Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutr. Rev.* 68(10): 571–603.

Phaniendra A., Babu jestadi D., PeriyasamyL. (2015).Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases.*Indian J Clin Biochem.* Jan; 30(1): 11–26.

Prévot D. (2016). La prise en charge des risques hémorragiques en odontologie pédiatrique. *Médecine humaine et pathologie* ; pp :18

Paugam A.L. (2015). Incidence des thromboses veineuses musculaires surales isolées dans une population bien définie et analyse des pratiques professionnelles. *Sciences du Vivant [q-bio].*ffdumas01906230f.

Piquard L. (2019). L'hémostase, une incroyable mosaïque de réactions ordonnées ! Consulté le 15 mars 2023, sur <https://www.actusoins.com/313263/hemostase-une-incroyable-mosaiquede-reactions-ordonnees.htm>

Ponsen A.C. (2019). Hemo-Ionic, un nouvel hémostatique actif sur la réparation tissulaire : de l'hémostase à la phase de maturation. Université Paris-Saclay préparée à l'Université Paris Sud.

Pagare S., Bhatia M., Tripathi N., Pagare S., & Bansal Y.K. (2015).Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9(3): 293-304.

Q

Quach M.E., Chen W.,Li R. (2018). Mechanisms of platelet clearance and translation to improve platelet storage.*Blood* 131, 1512–1521.

Quiñonez-Flores C., González-ChávezS.,Danyella Del Río, N.,César Pacheco, T.(2016).Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. *Biomed Res Int.* 16: 6097417.

Qayoom I., Ansari A.P., Huzaifa A., Habib A., Reshi B.M., Ahmed N.Z., Anwar, N.(2023).Sana (*Cassia angustifolia* Vahl.): A Potent Detoxifying Drug in Unani System of Medicine - An Appraisal/ Insight. *J. Adv. Res. Pharm. Sci. Pharmacol*; 6(2)

R

Rothan H.A., Zulfarnain M., Ammar Y.A., Tan E.C., Rahman N.A., Yusof R. (2014).Screening of antiviral activities in medicinal plants extracts against dengue virus using dengue NS2B-NS3 protease assay. *Trop Biomed*;31(2):286-96.

R Shaikh J., Patil M.K. (2020). Qualitative tests for preliminary phytochemical screening: An overview. *International Journal of Chemical Studies* 2020; 8(2): 603-608.

Raquibul S. Mokarram M.H ., Raushanara M.D., Mariam, J., Ehsanul, Md. H. M., Shafiqur, Rahman .(2009). DPPH free radical scavenging activity of some Bangladeshi medicinal plants. *Journal of Medicinal plants research*, 3(11): 875- 879.

Rajendran P., Nandakumar N., Rengarajan T., Palaniswami, R., NesamonyGnanadhas, E., Lakshminarasiah, U., Gopas, J., Nishigaki, I. (2014).Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*,2(5);436:332-47.

R Shaikh, J., Patil, M.K. (2020). Qualitative tests for preliminary phytochemical screening: An overview. *International Journal of Chemical Studies* 2020; 8(2): 603-608.

Rouibi A. (2011). Etude phytochimique et activité antimicrobienne des molécules actives de *Cassia acutifolia* et de *Cassia obovata*. Effet du stress salin et thermique sur la callogenese et la biosynthèse des molécules actives chez *Cassia obovata*. Thèse doctorat en Biologie. Université Saad Dahleb de Blida,pp :36,35

S

Srivastava M., Srivastava S., KhatoonS., Rawat A.K., Mehrotra S., Pushpangadan P. (2006).Pharmacognostical Evaluation of *Cassia angustifolia*.Seeds.*Pharmaceutical Biology* ;44(3).

Shreya R., Sharma B.,Alam A., Sharma S.K. (2023). Ethnomedicinal importance of Fabaceae family (Angiosperms) among the tribes of Rajasthan, India. *Natural resources for human health*;3:237-247.

Sasikumar R., Balasubramanian P., Govindaraj P., Krishnaveni T. (2014). Preliminary studies on phytochemicals and antimicrobial activity of solvent extracts of *Coriandrum sativum* L. roots (Coriander). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(6): 74-78.

Sydiskis R.J, Owen D.G, Lohr J.L., Rosler K.H., Blomster R.N. (1991). Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. *Antimicrob Agents Chemother*; 35(12):2463-6.

Sahraoui. (2015). Les dérivés hydroxyanthracéniques laxatifs. *pharm3an_pharmacognosie*.

Senghor A.A. (2020). Activité antioxydante des racines de *Terminalia avicennioides*. Thèse de doctorat, Dakar, N°041.

Sarma J.C.(2011). Naturally occurring polyphenols and their utility, pages 19-29, in *Chemistry of Phenolic Compounds: State of the Art*, Baruah J.B., Nova Science Publishers, Inc., New York.

Sang Cho K., Ran Lim Y., Lee K., Lee J., Ho Lee J., Soon Lee Im. (2017). Terpenes from Forests and Human Health. *Toxicological Research*, 33(2) : 97-106.

Shi C.Q., Liu M., Zhang X.X., Cheng X.Y., Wang C.(2015). Développement et morphologiques études de la suspensor et coleorhizae in some taxa of the subfamily mimosoideae (Fabaceae). *Pak. J. Bot.*, 47(1): 341-345

Sennaoui F.M., Robert-Ebadi H., Righini M.(2015). Thrombose veineuse profonde des membres inférieurs. 11-730-10.

Singh R., Parihar P., Singh M., Bajguz A, Kumar J., Singh S., Singh V.P., Prasad S.M.(2017). Uncovering Potential Applications of Cyanobacteria and Algal Metabolites in Biology, Agriculture and Medicine: Current Status and Future Prospects. *Frontier Microbiology*, 8(10).

Sall M.I. (2018). Pouvoir antioxydant de l'extrait hydroethanolique des gousses de *Piliostigma reticulatum* (dc) hochst. Thèse de doctorat, Dakar, N°96.

Santus P., Corsico A., Solidoro P., Braido F., Di Marco F., Scichilone N. (2014). Oxidative stress and respiratory system: pharmacological and clinical reappraisal of N-acetylcysteine. *COPD*; 11(6):705-17.

Smaga, I., Niedzielska, E., Gawlik, M., Moniczewski, A., Krzek, J., Przeglasiński, E., & Filip, M. (2015). Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. *Pharmacological Reports*, 67(3): 569-580.

Sinegre, T. (2021). Impact de l'épicatéchine sur l'hémostase et la structure du caillot de fibrine. Santé. Université Clermont Auvergne, Français. ffnnt : 2021UCFAC037ff. fftel-03621206.

Schved J. F. janvier.(2007). Physiologie De L'hémostase. Faculté de Médecine Montpellier – Nîmes.

Schved, J.F. (2017). Physiopathologie des thromboses. *Horizons Hémato* // Avril/Mai/Juin // Volume 07 // Numéro 02.

Sirois C. (2008) Valorisation des extraits de pin gris (*Pinus banksiana*) par l'étude de leurs compositions chimiques et leurs activités biologiques. Mémoire. Université du Québec à Chicoutimi : 31-32.

Siangu B. N., Sauda S., John M.K., Njue W.M. (2019). Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of selected Kenyan medicinal plants, sea algae and medicinal wild mushrooms. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 13(3):43-48.

Sanjeevkumar C.B., Hanumantappa B.N., Londonkar R.L. (2014). Evaluation of in vitro anti-thrombolytic activity and cytotoxicity potential of *typha angustifolia* L leaves extracts. *Int J Pharm Pharm Sci*, 6(5): 81-85.

T

Trease G.E, Evans W.C. (1989). *Pharmacognosy* (11e éd.). London, UK, Baillière Tindall.

Tahira Y., Azam M., Ummaimah, Raza Basran M.A. (2020). Bioactive compounds, antioxidant and antineoplastic activities of Asian herbs. *Chula Med J* Vol. 64 No. 2 April - June 2020;193-204.

Tripathi Y.C. (1999). *Cassia angustifolia*, a versatile Medicinal crop. *International Tree Crops Journal* 10 : 121-129.

Tapas A. R., Sakarkar D. M. Kakde R.B. (2008). Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7 (3), 1089-1099.

Tlili M.L. (2012). Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergularia tomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional). Magister en Biologie Option biochimie et analyse de bioproduits. UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA, pp :27,28.

V

Villano D., Fernández-Pachón M.S., Moya M.L., Troncoso A.M., García-Parrilla M.C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71(1):230-5.

Vijayasekhar V.E., Prasad M.S., Joshi S., Narendra K., Krishna A., Satya K.R., Sambasiya Rao S. (2016). Assessment of Phytochemical Evaluation and In-vitro Antimicrobial Activity of *Cassia angustifolia*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical*, 8(2): 305-312.

W

Waksmundzka-Hajnos, M. & Sherma, J. (2011). « High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical science. *Chromatographic Science Series* », p. 477-478.

Watson R.R., Preedy V.R., Zibadi S. (2018). Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease. 2 Eds., Academic press. 484.

Wojdyło A., Oszmiański J., & Czemerys R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 105(3), 940-949.

Y

Yang W., Chen X., Li,Y., Guo S.,Wang Z.,Yu X.(2020).Advances in Pharmacological Activities of Terpenoids. *Natural Product Communications* ;15(3).

Yuniarto A., Sukandar E.Y., Fidrianny I., Setiawan F.,Ketut I. (2018). Antiobesity, Antidiabetic and Antioxidant Activities of Senna (*Senna alexandrina* Mill.) and Pomegranate (*Punica granatum* L.) Leaves Extracts and Its Fractions. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research (eIJPPR)*, 8(3):18-24.

Z

Zheng R., Li S., Zhang X., Zhao C. (2021). Biological Activities of Some New Secondary Metabolites Isolated from Endophytic Fungi: A Review Study.*Int J Mol Sci*, 22(2): 959.

Zhu H.,Jia Z., Wang X., Misra H., Li Y.(2012).Oxidative stress in spinal cord injury and antioxidant-based intervention.*Spinal Cord* 50, 264–274.

Sites Web

<https://www.elsevier.com/fr-fr/connect/medecine/guide-des-analyses-en-hematologie>.

<https://www.lemanip.com/2021/12/hemostase-physiologie.html>.

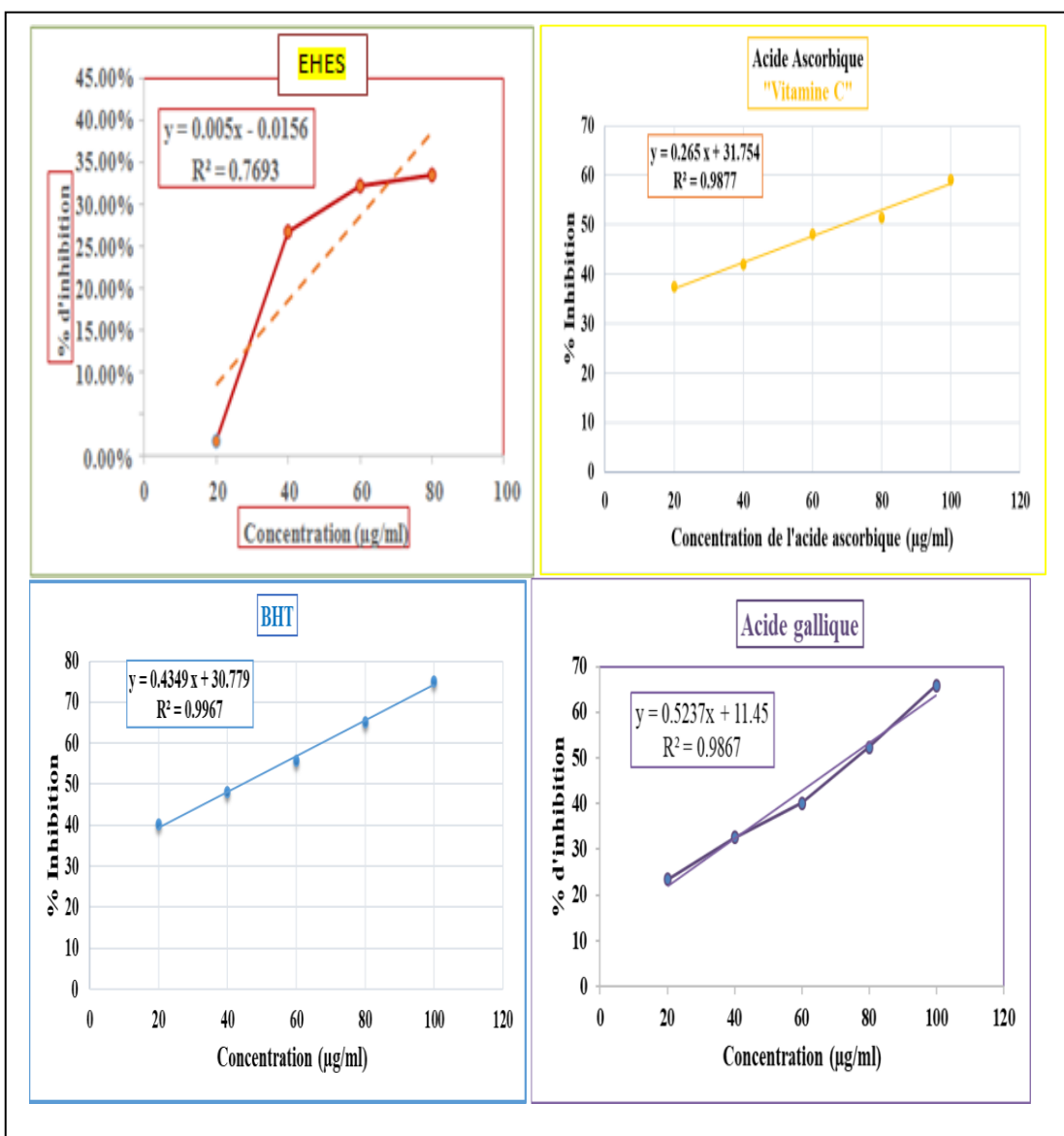
<https://quizlet.com/fr-fr/fiches-de-memorisation/hemostase-g-hemo-primaire-698632516>.

ANNEXES



Annexe 1

Les représentations graphiques ($I\%=f(C)$) du test de DPPH de l'extrait végétale et des antioxydants standards (vitamine C, BHT, Acide gallique).



RESUME



Résumé

 *Cassia angustifolia vahl* de la famille des Fabaceae appelé localement « Senna makki », est une plante largement utilisée à des fins médicinales dans les quatre coins du monde.

La présente étude vise à évaluer l'activité antioxydante et antithrombotique des extraits phénoliques de la plante *Cassia angustifolia vahl* et leur caractérisation phytochimique.

La détermination du rendement en extraits bruts de feuilles de *Cassia angustifolia* a prouvé que les rendements varient considérablement selon le solvant d'extraction (EtOH ou décocté), dont la quel le rendement est plus important dans l'extrait éthanolique (19%).

L'analyse qualitative des extraits de feuilles de *Cassia angustifolia* par criblage phytochimique à révéler l'existence de nombreux constituants, parmi lesquels, les alcaloïdes, les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins. Alors que l'analyse quantitative permet de montre que l'extrait décocté de feuilles est le plus riche en composés phénoliques et en flavonoïdes avec une teneur de $523 \pm 4,55$ μg EAG/mg d'Ext et $474 \pm 2,18$ μg EQ/mg d'Ext respectivement.

L'activité antioxydante a été évalué in vitro par le test du DPPH• et le test du pouvoir anti-hémolytique. Les résultats obtenus montrent que l'extrait peut agir en tant que piègeurs du radical libre DPPH à toutes les concentrations.

Cette capacité antioxydante est confirmée par le test du pouvoir anti-hémolytique. En effet, cet extrait a montré un effet protecteur plus important contre l'hémolyse érythrocytes induite par l' H_2O_2 .

L'évaluation de l'activité antithrombotique a été également réalisée in vitro en utilisant les tests du temps de céphaline-kaolin (TCK), du temps de Quick (TQ) et du taux de fibrinogène (FIB) et le pouvoir thrombolytique. Les temps de coagulation obtenus sur un plasma normal en présence de cet extrait, indiquent qu'ils exercent une activité anticoagulante sur les deux voies de la coagulation, mais cette activité est plus marquée sur la voie endogène que sur la voie exogène. Ainsi, cet extrait a montré un bon pouvoir thrombolytique contre les caillots.

Mots clés : *Cassia angustifolia vahl*, composés phynoliques, thrombose, activité antioxydante, activité antithrombotique.

ملخص

نبات *Cassia angustifolia vahl* الذي ينتمي إلى عائلة Fabaceae و المسمى محليا 'سنامكي' و هو نبات يستخدم على نطاق واسع للأغراض الطبية في كافة أنحاء العالم. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الأنشطة المضادة للأكسدة والنشاط المضاد للتخثر للمستخلصات الفينولية لنبات السنامكي وكذلك توصيفها الكيميائي النباتي. أظهر تحديد مردود المستخلصات الخام أن المردود يختلف اختلافا كبيرا وفقا لمذيب الاستخلاص (الايثانول او الماء المغلي)، حيث يكون مردوده اكبر في المستخلص الايثانولي (19%). يظهر التحليل النوعي لمستخلصات اوراق هذا النبات من خلال الفحص الكيميائي النباتي وجود العديد من المكونات، من بينها القلويات، متعدد الفينول، الفالفونويد، والتابينات. بينما يبين التحليل الكمي أن مستخلص الاوراق الناتج عند استعمال الماء المغلي كمذيب هو الأغنى بالمركبات الفينولية وبالفالفونويد بمحتوى $4.55 \pm 523 \mu\text{g EAG/mg d'Ext}$ و $474 \pm 2,18 \mu\text{g EQ/mg d'Ext}$. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة في المختبر باستخدام طريقة DPPH واختبار القدرة المضادة للانحلال. وقد أظهرت النتائج أن المستخلص يملك القدرة على اقتناص الجذور الحرة بمستويات جيدة عند مختلف التراكيز. تم تأكيد هذه القدرة المضادة للأكسدة من خلال اختبار القدرة المضادة للانحلال. في الواقع، أظهرت هذا المستخلص تأثيراً وقائياً كبيراً ضد انحلال الدم الناجم عن بيروكسيد الهيدروجين. تم إجراء تقييم النشاط المضاد للتخثر أيضاً في المختبر باستخدام اختبار زمن السيغالين-كولين ووقت البروثرومبين و اختبار الفيبرينوجين. تشير أوقات التخثر المتحصل عليها في بلازما طبيعية في وجود هذا المستخلص إلى أنها تمارس نشاطاً مضاداً للتخثر على كلا مسارين التخثر، ولكن هذا النشاط يتميز بدرجة أكبر على المسار الداخلي منه على المسار الخارجي، كذلك أظهر هذا المستخلص قوة جيدة ضد الجلطات الدموية. **الكلمات المفتاحية:** السنامكي، المركبات الفينولية، تجلط الدم، النشاطية المضادة للتأكسد، النشاطية المضادة للتخثر.

Abstract

 *Cassia angustifolia vahl*, belonging to Fabaceae Family, locally named « Senna makki », is a plant widely used for medicinal purposes in all four corners of the world.

The present study aims to assess the antioxidant and antithrombotic activities of phenolic extracts of the *Cassia angustifolia vahl* plant and their phytochemical characterization.

The determination of the yield of crude extracts from the leaves of *Cassia angustifolia* proved that the yields vary considerably according to the extraction solvent (EtOH or decocted), of which the yield is greater in the ethanolic extract (19%).

Qualitative analysis of *Cassia angustifolia* leaf extracts by phytochemical screening revealed the existence of many constituents, including alkaloids, polyphenols, flavonoids and tannins. While the quantitative analysis shows that the decocted leaf extract is the richest in phenolic compounds and flavonoids with a content of $523 \pm 4.55 \mu\text{g EAG} / \text{mg of Ext}$ and $474 \pm 2.18 \mu\text{g EQ} / \text{mg of Ext}$ respectively.

The antioxidant activity was evaluated in vitro by the DPPH• test and the anti-hemolytic power assay. The obtained results show that the extract can act as free-radical scavengers at all concentrations. This antioxidant capacity is confirmed by the anti-hemolytic power test. Indeed, this extract showed a greater protective effect against erythrocyte hemolysis induced by H_2O_2 .

The evaluation of the antithrombotic activity of *Cassia angustifolia* was also evaluated in vitro by using the cephalin-kaolin time (TCK), prothrombin time (TQ) and fibrinogen test (FIB) and the thrombolytic power. The coagulation times obtained on normal plasma in the presence of this extract indicate that they exert an anticoagulant activity on the two coagulation pathways, but this activity is more marked on the endogenous pathway than on the exogenous pathway. Thus, this extract showed a good thrombolytic power against clots.

Key words: *Cassia angustifolia vahl*, phenolic compounds, thrombosis, antioxidant activity, antithrombotic activity.