

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
جامعة عمار ثليجي بالغواط  
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم  
FACULTE DES SCIENCES  
قسم البيولوجيا  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



## Mémoire

*En vue de l'obtention du diplôme de Master*

*Filière : Sciences Biologiques*

*Option : Biochimie appliquée*

### THEME

---

**Etude de la capacité antioxydante des extraits de  
l'espèce *Asphodelus microcarpus***

---

**Présenté par :**

REMILI Nesrine  
MERCHLA Wafa  
BOUAZZA ABID Fatima z

**Encadré par :**

M<sup>me</sup>. Khacheba Ihcen  
M<sup>me</sup>. Boussoussa Hajer

# DEDICACE

*Je dédie ce modeste travail :*

*A celle qui a inséré le goût de la vie et le sens de la responsabilité ma*

*MERE.*

*A celui qui a été toujours la source d'inspiration et de courage mon*

*PERE.*

*Mes très chères sœurs : HALOUMA, SABRINA*

*Mon très cher frère: SAMI*

*Mon cher neveu : IYAD*

*Toute ma famille, mes tantes, mes cousins et mes cousines.*

*A tout mes amis (ies) : FAIZA, KAOUTHER, DIHYA, Khadidja,*

*Meriem*

*Tous les enseignants et toutes les enseignantes de Biologie*

*A toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation  
de ce travail, A tous mes amies en qui j'ai toujours trouvé soutien et  
réconfort,*

*A toute la famille REMILI*

# DEDICACE

*Je dédie ce modeste travail :*

*A celle qui a inséré le goût de la vie et le sens de*

*La responsabilité ma MERE.*

*A celui qui a été toujours la source d'inspiration*

*Et de courage mon PERE.*

*Mes très chères sœurs : Meriem, Nerdjes*

*Mes très chers frères: Hocine, Djawed*

*Toute ma famille, mes tantes, mes cousins et mes cousines. A*

*tout mes amis et sur tout à mon cher ami : Ismaïl Lourmil*

*A tous les enseignants et toutes les enseignantes de Biologie*

# DEDICACE

*C'est avec l'aide et la grâce du Dieu que j'ai achevé ce modeste travail  
que je dédie*

*A ma très chère mère*

*MADI NORA*

*Aucune dédicace ne saurait être assez .Tu représentes pour moi le  
symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple  
du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour  
moi.*

*A mon très cher père*

*MERCHLA HOCINE*

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

*A mes frères et sœurs*

*Salah, AKRAM, MARWA et MALAK*

*Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de  
réussite et beaucoup d'Amour*

*A mon futur mari*

*HICHEM*

*En signe d'amour et de gratitude pour m'avoir supporté .Pour sa  
patience, son soutien et ses nombreux encouragements*

*A mes chères amies*

*Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon  
affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs et des amis sur  
qui je peux compter*

*A tous les enseignants qui ont contribué à ma formation*

# REMERCIEMENT

*Nos remerciements s'adressent en premier dieu à Allah le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il nous a donné durant toutes ces longues années.*

*Nous remercions les membres du jury  
D 'avoir accepté de juger notre travail.*

*Nous tenons également à remercier notre encadreur*

*Mme Khechba I. et Mme Boussousa H. qui a assuré la direction de ce travail, ses conseils prestigieux et ses encouragements sans relâche, sa disponibilité et la confiance qu'il nous a accordée de nous initier à ce travail dans les meilleures conditions.*

*Nous remercions le chef de département de Biologie*

*Mr. CHAJBI. R*

*Nos remerciements vont aussi à tous nos enseignants de département  
- Université Ammar Teliđji,*

*LAGHOUAT- qui a contribué à notre formation*

*Merci à tous les techniciens de laboratoire de Biologie*

*Enfin, nous tenons à exprimer notre reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.*

## الملخص

ينتشر نوع *Asphodelus microcarpus* المعروف باسم "Barouag" على نطاق واسع في منطقة البحر الابيض المتوسط ، وهو معروف بعلاج التهابات الأذن ، وبيع من قبل المعالجين الأعشاب في مدينة الأغواط كنبات مدر للبول.

دراستنا هي جزء من مساهمة في تطوير المملكة النباتية في منطقة الأغواط كمصدر للمواد الطبيعية النشطة بيولوجية. في هذا السياق ، نحن مهتمون بتقييم النشاط المضاد للأكسدة لنوع *Asphodelus microcarpus*

تتكون الخطوة أولى في هذه الدراسة من استخلاص وقياس كمية المركبات الفينولية ، ثم ساهمنا في دراسة أنشطتها المضادة للأكسدة من خلال اختبارين كيميائيين في المختبر ، واختبار DPPH واختبار FRAP.

يتراوح إجمالي محتوى الفينول بين 2.4 و 3.9 مجم في مكافئ حمض الجاليك / جم من المادة الجافة. بينما محتوى الفالفونويد المعبر عنه كمكافئ كيرسيتين يتراوح بين 0.5 و 1 مجم / جم.

أظهرت جميع المستخلصات تأثيرات مضادة للأكسدة، حيث تراوحت EC50 بين 0.02 ميكروغرام / مل و 6.47 ميكروغرام / مل اختبار DPPH و 0.04 و 180.92 ميكروغرام / مل مكافئ لفيتامين ج بالنسبة لـ اختبار FRAP الذي سجل أفضل فعالية للمستخلصات:  $0.45 \pm 0.09$  Ethyl acetate (ميكروغرام / مل و  $180.92 \pm 4.15$ ).

قدم هذا العمل تكملة للمعرفة الإثنوفارماكولوجية والكيميائية النباتية للنباتات الطبية المحلية.

**الكلمات المفتاحية:** *Asphodelus microcarpus* ، نشاط مضاد لألكسدة ، مركبات فينولية ، اختبار DPPH ، اختبار FRAP

## Résumé

L'espèce *Asphodelus microcarpus* connue sous le nom de «Barouag» est largement répandue dans la région méditerranéenne elle est connue pour le traitement des otites, et est vendue région de Laghouat comme source de substances bioactives naturelles. Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antioxydante de L'espèce *Asphodelus microcarpus*.

La première démarche dans cette étude, consistait en une extraction et une quantification des composés phénoliques ensuite nous avons contribué à l'étude de leurs activités antioxydant par deux tests chimiques *in vitro* le test du DPPH et le test FRAP

Le contenu en phénols totaux est compris entre 2,4 et 3,9 mg en équivalent d'acide gallique / g de la matière sèche. Tandis que le contenu en flavonoïdes exprimé en équivalent de la quercétine est compris entre 0,5 et 1 mg/g.

Tout les extraits ont montré des effets antioxydant, d'EC<sub>50</sub> comprises entre 0,02 µg/ml et 6,47 µg/ml pour le test DPPH et de 0,04 et 180,92 µg/ml équivalent à la vitamine C pour le test FRAP, dont la meilleure activité a été enregistré pour les extraits : Acétate d'éthyle de (0,45 ± 0,09 ug/ml et 180,92 ± 4,15).

Ce travail a fourni un complément aux connaissances ethnopharmacologiques et phytochimiques des plantes médicinales locales.

**Mots clés :** *Asphodelus microcarpus* , Acitivité antioxydante, composés phénoliques, test DPPH, test FRAP

## **Abstract**

The species *Asphodelus microcarpus* known as "Barouag" is widely distributed in the Mediterranean region, it is known for the treatment of ear infections, and is sold by herbalists in the city of Laghouat as a diuretic plant.

Our study is part of a contribution to the development of the plant kingdom of the region of Laghouat as a source of natural bioactive substances. In this context we are interested in the evaluation of the antioxidant activity of the species *Asphodelus microcarpus*.

The first step in this study consisted of extracting and quantifying the phenolic compounds, then we contributed to the study of their antioxidant activities by two in vitro chemical tests, the DPPH test and the FRAP test.

The total phenol content is between 2.4 and 3.9 mg in gallic acid equivalent / g of dry matter. While the content of flavonoids expressed as quercetin equivalent is between 0.5 and 1 mg / g.

All the extracts showed antioxidant effects, with EC50 ranging between 0.02  $\mu\text{g} / \text{ml}$  and 6.47  $\mu\text{g} / \text{ml}$  for the DPPH test and 0.04 and 180.92  $\mu\text{g} / \text{ml}$  equivalent to vitamin C for the FRAP test, the best activity of which was recorded for the extracts: Ethyl acetate ( $0.45 \pm 0.09$   $\mu\text{g} / \text{ml}$  and  $180.92 \pm 4.15$ ).

This work provided a complement to the ethnopharmacological and phytochemical knowledge of local medicinal plants.

**Keywords:** *Asphodelus microcarpus*, Antioxidant activity, phenolic compounds, DPPH test, FRAP test.

# Abréviation

UV : Ultras violet.

MPOC : Maladie pulmonaire obstructive chronique.

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène.

SOD: Superoxyde dismutase.

BHT: Butylhydroxytoluène.

BHA: Butylhydroxyanisol.

DPPH: 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle.

FRAP: Pouvoir réducteur du fer ( $Fe^{3+}$ ).

ABTS: Sel d'ammonium de l'Acide 2,2'-azinobis-(3-éthylBenzoThiazoline-6Sulfonique).

EC<sub>50</sub>: Concentration of inhibitor required to produce 50% inhibition.

GAE: Equivalent D'Acide gallique

EQ : Equivalent quercétine

Vit C : Vitamine C

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

# Liste des Tableaux

**Tableau 1.** Systématique, description, utilisation et principes actifs de la plante **Error!**

**Bookmark not defined.**

**Tableau 2.** Rendement d'extractions et la couleur de l'espèce *Asphodelus microcarpus*...19

**Tableau 3.** Teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes de plante étudiée.....21

**Tableau .4** Les valeurs d'EC<sub>50</sub> µg/ml des extraits de la plante *Asphodelus microcapus* et des antioxydants standards.....25

**Tableau 5.** Les valeurs de la capacité antioxydante des différents extraits de la plante *Asphodelus microcapus* et des Antioxydant standards.....28

# Liste des figures

<b>Figure 1.</b> La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Figure 2.</b> Réaction de chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes.....	<b>12</b>
<b>Figure 3.</b> La courbe d'étalonnage de la Quercétine.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Figure 4.</b> Principe du test de capacité de piégeage des radicaux DPPH.....	<b>14</b>
<b>Figure 5.</b> Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP.....	<b>16</b>
<b>Figures 6.</b> Courbes de la variation du pourcentage d'inhibition (%) en fonction de la concentration en antioxydants des extraits choisis par méthode DPPH.....	<b>23</b>
<b>Figures 7.</b> Courbes de la variation du pourcentage d'inhibition (%) en fonction de la concentration en antioxydants standards choisis par méthode DPPH.....	<b>24</b>
<b>Figures .8</b> Courbes de la variation des absorbances en fonction de la concentration des extraits choisis par méthode FRAP.....	<b>27</b>
<b>Figures .9</b> Courbes des variations des absorbances en fonction de la concentration des standards choisis par méthode FRAP.....	<b>27</b>

# Tables de matières

INTRODUCTION GENERALE .....	1
GENERALITES .....	1
I.Les plantes médicinales .....	5
I.1. Définitions .....	5
I.2 Principes actifs .....	5
II.Les composés phénoliques .....	5
II.1.Généralités .....	5
II.2.Activités biologiques .....	6
III L'activité antioxydant .....	7
III.1.Les radicaux libres .....	7
III.2.Le stress oxydant.....	7
III.3.Les antioxydants.....	7
III.3.a. Les antioxydants endogènes .....	8
III.3.b.Les antioxydants exogènes .....	8
III.4. Antioxydants naturels et de synthèses .....	8
PARTIE EXPERIMENTALES .....	9
I. 1. Matériel végétal .....	10
II. 2. Préparations des extraits .....	12
II.3. Quantifications des phénols .....	12
II. 3. 1. Dosage des phénols totaux.....	13
II. 3.2. dosage des flavonoïdes.....	13
II.4. Evaluations de l'activité antioxydante.....	14
II.4.1. Test DPPH .....	15
II.4.1.1 Principe du DPPH .....	15
II. 4.1.2. Protocol .....	16
II.4.2. Test FRAP.....	16
II. 4.2.1.Principe du FRAP .....	16

II.4.2.2.Protocol.....	16
RESULTATS ET DISCUSSION.....	17
III. 1. Préparations des extraits .....	18
III. 2. Dosage des composés phénoliques.....	19
III. 3. Evaluation de l'activité antioxydante.....	21
III.3.1 Piégeage de radicale DPPH.....	23
III.3.2. Pouvoir réducteur de fer FRAP.....	25
CONCLUSION.....	30
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	33

# **Introduction générale**



L'usage des plantes est une composante naturelle de la culture humaine. Depuis l'antiquité, l'Homme utilise les plantes comme une source principale de nourriture. IL a toujours tiré profit de son environnement végétal pour satisfaire ses besoins quotidiens tel que destiner les plantes à la santé, c'est la phytothérapie (Chaou, 2016).

Aujourd'hui comme jadis, la médecine moderne dépend beaucoup des plantes. Les laboratoires de chimie et de biologie à travers le monde ont emboité le pas à la médecine traditionnelle pour la recherche des voies et moyens de venir à bout aux diverses pathologies, ceci par la recherche de nouveaux principes actifs et la compréhension de leurs modes d'action (Beddou, 2015).

Parmi les originalités majeures des végétaux leurs capacités à reproduire des substances naturelle très diversifiées. En effet, à coté des métabolites primaires classiques, glucides, protides, lipides, ils accumulent fréquemment des métabolites secondaires. Ces derniers, représentent une source importante de molécules utilisables par l'Homme dans des domaines aussi différent tel que la pharmacologie et l'agroalimentaire (Macheix *et al*, 2005).

Les polyphénols attirent l'attention de plusieurs chercheurs due à leur diverses activités biologiques (activité antibactérienne, anti inflammatoire, antidiabétique, notamment l'activité antioxydante ; ils sont capables de piéger les radicaux libres (l'effet scavenger) générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (Lounis, 2012), les nutriments riches en polyphénols ont été souvent associés avec la diminution de risque de développer les maladies cardiovasculaires et l'arthrite rhumatoïde (Scalbert, 2005). De ce fait, la recherche de substances d'origine végétales douées d'activités antioxydants s'avère très utile pour l'amélioration du sante humain tout en évitant les effets indésirables des molécules de synthèse. (Mayouf, 2019)

Le présent travail, est consacré à la valorisation phytochimique d'une plante spontanée locale à savoir *Asphodelus microcarpus* (البرواق), qui consiste à évaluer l'activité antioxydante de ses extraits phénoliques. Le choix de cette plante est basé sur le fait qu'aucune étude d'activité antioxydante n'a été entreprise pour la valorisation de cette dernière.



Ce mémoire qui rentre dans le cadre de la valorisation des plantes spontanées locales, est une continuité d'un travail déjà réalisé sur cette même espèce en 2018 par l'évaluation de l'activité inhibitrice vis-à-vis de l' $\alpha$  – amylase.

Notre mémoire est structuré comme suit :

- Le premier chapitre est consacré à un aperçu bibliographique général sur les plantes médicinales, les composés phénoliques et l'activité antioxydant.
- Le deuxième chapitre décrit le protocole expérimental utilisé.
- Le troisième chapitre expose l'ensemble des résultats obtenus avec leurs discussions
- Et enfin notre mémoire se termine par une conclusion générale et perspective.

**Aperçu**  
**Bibliographique**



### I. Les plantes médicinales

#### I.1. Définitions

On appelle plante médicinale toute plante ayant des propriétés curatives et utilisées pour leurs propriétés thérapeutiques. Cela signifie qu'au moins une parties (feuille, tige, racine, etc..), peut être employée dans le but de se soigner. Les plantes médicinales sont utilisées depuis au moins 7 000 ans avant notre ère par les Hommes à l'état brut ou sous formes d'huiles, extraits, solutions aqueuses ou organiques ; ces préparations contiennent un ou plusieurs principes actifs utilisables à des fins thérapeutiques. (Adouane, 2015) c'est la phytothérapie, du grec *Phyto* et *Therapei* est l'art de se soigner par les plantes (Beddou, 2015).

Actuellement et grâce aux progrès scientifiques la thérapeutique a beaucoup évoluée et a utilisé la plante comme matière première pour la production des médicaments, et continuent de répondre à un besoin important (Djaoui *et al*, 2016)

#### I.2. Principes actifs

Les principes actifs d'une plante médicinale sont les composants biochimiques naturellement présents dans une plante, ils lui confèrent un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'Homme son activité thérapeutique. Ces molécule existent dans différente parte du végétale : les racines, écorces, sommités fleuries, feuilles, fleurs, fruits, ou encore les graines (Djaoui *et al*, 2016).

Les métabolites secondaires sont classés en trois grands groupes : les composés phénoliques, terpènes et alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (Boudjema, 2019).

### II. Les composés phénoliques

#### II.1. Généralités

Les poly phénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement (Benchegra *et al*, 2013). A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolés et identifiés. Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur



d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle *et al.*, 2004). Ces espèces atteignent 9000 (Belyagoubi, 2012).

Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs (Zouaoui, 2012).

Les composés phénoliques ne sont nullement des produits inertes du métabolisme, les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation organogène, floraison. Un rôle important est attribué aux phénols dans la résistance des plantes aux maladies. Les polyphénols sont aussi connus pour leurs effets protecteurs contre le rayonnement UV, l'effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs et pour ces propriétés antifongique et antibactérienne (Bouchouka, 2016).

A partir des années quatre-vingt, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt des polyphénols en particulier les flavonoïdes dont les propriétés antioxydantes sont très marquées (Belyagoubi, 2012).

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, tous dérivant de l'acide shikimique. Cette voie shikimate conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés: acide benzoïques, lignanes et lignines, coumarines (Duriot, 2016).

### **II.2. Activités biologiques**

Les poly phénols représentés majoritairement par les flavonoïdes, les tannins, les acides phénoliques, les stilbénes et les lignines suscitent un grand intérêt scientifique actuellement car ils sont considérés comme de puissant antioxydant, anti inflammatoire, antidiabétique et anticancéreux, Anti-athérosclérose et cardioprotecteur, Effets neuroprotecteurs sur les maladies anti-vieillessement et les maladies neurodégénératives, Propriétés antimutagènes / anticarcinogenic, Maintien de la santé et des effets gastro-intestinaux des enzymes digestives, Modulation des voies de transduction du signal, Amélioration des fonctions endothéliales, L'effet protecteur sur les fonctions des cellules immunitaires, Activité antiallergique, sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut



Régulation de la progression du cycle cellulaire, Modulation des effets hormonaux et l'activité contraceptive, Effet dans de traitement de la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) (Bechiri , 2016).

### III. L'activité antioxydant

#### III.1. Les radicaux libres

L'oxygène est indispensable à la vie. Pourtant, il est fortement impliqué dans formation de radicaux libres très réactifs : superoxyde, perhydroxyle, hydroxyle, peroxyde et peroxyde d'hydrogène qui sont regroupés sous le terme d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) et entraîner des pathologies variées dans certaines situations (Guillouty, 2016).

Les radicaux libres constituent une proportion importante des ERO. Un radical libre se définit comme une espèce chimique, (atome ou molécule) possédant un ou plusieurs électron(s) célibataire(s) sur sa couche externe de valence lui conférant une grande instabilité et donc une grande réactivité. La genèse de ces radicaux libres au sein de l'organisme est un processus physiologique en réponse à un facteur exogène tel que l'agression par des microorganismes, des métaux lourds, des rayonnements ionisants, des rayons ultra-violet ou encore la fumée de cigarette. (Desmier, 2016).

#### . III.2. Le stress oxydant

Le stress oxydatif est caractérisé par un déséquilibre entre la production des espèces radicalaires et les capacités de défense antioxydante de l'organisme. La production d'espèces réactives de l'oxygène est utile mais peut être néfaste pour l'organisme lors d'une production excessive et en l'absence de mécanismes de défense. C'est ce que l'on appelle le stress oxydatif. Celui-ci peut favoriser la survenue de pathologies (cancers, maladies cardiovasculaires, maladies dégénératives) ainsi qu'un vieillissement prématuré. Une des principales fonctions déclenchées par le stress oxydatif est la mort cellulaire programmée ou apoptose (Guillouty, 2016).

#### III.3. Les antioxydants

Les antioxydants réduisent le stress oxydatif dans les cellules ; ce sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libre dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxique des espèces réactives de l'oxygène (Seladji, 2015)



Les antioxydants réagissent avec les oxydants et soit stoppent, soit ralentissent le processus d'oxydation. Pendant cette réaction, les antioxydants s'oxydent et deviennent parfois des radicaux qui peuvent se transformer en dérivés stables ou persister un certain temps sous forme radicalaire. Les formes radicalaires des antioxydants peuvent devenir pro oxydants dans certaines conditions. Ainsi les antioxydants peuvent agir comme piègeurs de radicaux libres et / ou activateurs de la défense antioxydante des systèmes enzymatiques pour supprimer les dommages des radicaux dans les systèmes biologiques (D amel *et al.*, 2016)

Il existe deux classes d'antioxydants :

**A. Les d'antioxydants endogènes :** Les antioxydants endogènes sont principalement les enzymes (SOD superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase) ou de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine). A cela s'ajoutent quelques oligo-éléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs importants pour l'activité de certains enzymes antioxydantes

**B. Les d'antioxydants exogènes :** de nombreux antioxydants exogènes sont présents dans l'alimentation apportant un soutien significatif dans la lutte antioxydant. Nous les trouvons dans les fruits (pommes, poires, fruits rouges...), les légumes (brocoli, oignon...), les boissons (café, thé, vin...) ainsi que dans les épices, le cacao ou encore les céréales. (Desmier ,2016)

### III.4. Antioxydants naturels et de synthèses

La plupart des antioxydants utilisés commercialement par exemple, butylhydroxytoluène (BHT) et butylhydroxyanisole (BHA)] sont synthétiques et certains d'entre eux ont été soupçonné de causer ou de favoriser des effets négatifs sur la santé tel que les cancers (Shahin, 2008) et, par conséquent, certaines restrictions sont placées sur leurs applications et il y a une tendance à les remplacer par des antioxydants naturels. Ces dernières années, la recherche d'antioxydants naturels en particulier à partir de plantes a augmenté et certaines plantes médicinales ont été largement étudiées pour des activités anti-oxydantes

Les antioxydants naturels proviennent principalement de plantes sous forme de composés phénoliques (flavonoïdes, acides phénoliques et les alcools, stilbènes, tocophérols, tocotriénols) l'acide ascorbique et les caroténoïdes (D amel *et al.*, 2016)

# **Partie**

# **Expérimentales**




### II .1. Matériel végétale

Notre étude, a été réalisée sur une plante spontanée locale du genre *Asphodèle* qui regroupe plus de 20 espèces largement répandues dans la région méditerranéenne à savoir *Asphodelus microcarpus* connue sous le nom de «Barouag» à l'est de l'Algérie (tableau II.1). La plante est connue par leurs activités hypoglycémiantes et sont vendues chez les herboristes de la ville de Laghouat comme plantes antidiabétique

La plante a été récoltée dans la commune d'Oued Morra, de la Wilaya de Laghouat à environ 90 km du chef lieu ; durant le mois d'Avril 2019, dans un endroit propre, loin de tout impact de pollution. Après la récolte, la partie aérienne de la plante a subi plusieurs étapes de traitements (nettoyage, séchage, et broyage puis tamisée à la même granulométrie. La poudre obtenue a été mise dans bocal en verre hermétiquement fermés et conservée jusqu'à extraction.



**Tableau 1.** Systématique, description, utilisation et principes actifs de la plante utilisée

<b><i>Asphodelus microcarpus</i></b>	
<b>Systématique</b> (Mayouf, 2019)	<b>Photo</b>
<b>Règne:</b> Plantae	
<b>Division:</b> Angiospermes	
<b>Classe :</b> Monocotylédones	
<b>Ordre :</b> Liliiflorae	
<b>Famille :</b> Liliaceae	
<b>Genre :</b> <i>Asphodelus</i>	
<b>Espèce :</b> <i>Asphodelus microcarpus</i>	
<b>Nom vernaculaire :</b> Asphodèle	
<b>Nom commun en arabe :</b> البرواق	
Dans l'est algérien : Barouag Dans le centre algérien : Balouaz Chez les berbères : Ighri	
<b>Description botanique</b>	
<p>C'est une plante vivace sous forme d'un arbrisseau de 1 mètre de hauteur environ. Les feuilles longues et étroites ayant une largeur de 1 à 4 cm et une longueur de 50 à 60 cm, creusées en gouttière triangulaire et groupées en rosettes à la base de la tige. Les fleurs sont de 35 mm de diamètre, avec des 6 pétales blancs allongé composé de filament blanc et une anthère orange, et un ovaire centrale et supérieure enfermée par une capsule de couleur orange saumon. <i>Asphodelus microcarpus</i> possède des fruits sous forme de petites capsules un peu rétrécies à la base à valves minces, elliptiques à bords plans. Les racines sont fortement renflées en forme des tubercules cylindrique. (Mayouf, 2019).</p>	
<b>Utilisation en alimentation et médecine traditionnelle</b>	
<p>Les plantes de genres asphodèle sont utilisées à l'Ouest d'Algérie et au Maroc contre toutes les formes d'abcès et contre les rhumatismes, les racines fraîches de l'Asphodèle macérées dans de l'huile servent à traiter les otites, la poudre sèche de ces racines est utilisée en cataplasmes dans les douleurs des rhumatismes, la poudre sèche d'Asphodèle mélangée avec l'orge est conseillée comme diurétique et le suc de la racine de l'Asphodèle est utilisée dans le traitement des mycoses cutanées (Djeffal <i>et al.</i>, 2016).</p> <p>Pour soulager les douleurs dentaires. Une autre utilisation médicinale qui n'est plus utilisée actuellement est celle de la dermatite et les brûleurs du soleil</p> <p><b>Alimentation :</b> Tous les asphodèles sont comestibles :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Graines : comme condiment oléagineux à la façon des graines du pavot</li> <li>- Racines : cuites à l'eau ou sous la cendre</li> <li>- Jeunes pousses et grappes de fleurs : à la manière des asperges (Mayouf, 2019).</li> </ul>	
<b>Principes actifs</b> (Zellagui, 1998)	
<p>Les racines contiennent : des Alcaloïdes. Les Graines contiennent : des Stérols, des Lipides, des glucides. Les Feuilles contiennent : des Glucosides.</p>	



## **II.2. Préparation des extraits**

1 g de chaque poudre précédemment obtenue a subit une extraction par fractionnement à température ambiante et à l'obscurité par une série de solvants a polarité croissante commençant par l'hexane jusqu'à épuisement total dans un but de dépigmentation et de délipidation. Les extraits on ensuite été filtré puis les résidus on été repris pour une série de macération dans : le dichlorométhane , l'acétate d'éthyle , l'éthanol et le méthanol successivement pendant 72 h pour obtenir quatre extraits organiques bruts pour chaque plante.

Les extraits bruts ont été évaporés sous pression réduite à 40°C et les résidus sec on été repris dans 10 ml de méthanol et conservée a 4°C jusqu'a analyse.

## **II.3. Quantification des phénols**

### **II.3.1. Dosage des phénols totaux**

Le dosage des phénols totaux a été effectué par la méthode adaptée de **Singleton et Ross (1965)** avec le réactif de Folin-Ciocalteu commercial. Le réactif est formé d'acide phosphotungestique  $H_3PW_{12}O_{40}$  et d'acide phosphomolybdique  $H_3PM_{12}O_{40}$ , qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleu de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 760 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. (Belyagoubi, 2012; Bellebcir, 2008 ; Kada ,2018).

Pour réaliser le dosage, 100 µl de chaque extrait dilué à différentes concentrations sont mélangés à 500 µl du réactif de folin-Ciocalteu. Après deux minutes d'incubation, 2 ml de carbonate de sodium  $Na_2CO_3$  sont ajouté. Les tubes sont ensuite agités et placés à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante.

La lecture de l'absorbance de chaque solution préparée est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible de type BIOCHROM LIBRA S6, à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc. Les valeurs de l'absorbance sont proportionnelles à la quantité de polyphénols présente dans nos extraits. Et les résultats sont présenté en mg équivalent d'acide gallique/g de matière sèche.

Une courbe d'étalonnage d'un phénol standard : L'acide gallique a été établi (Figure II.1) en suivant le même protocole décrit précédemment.

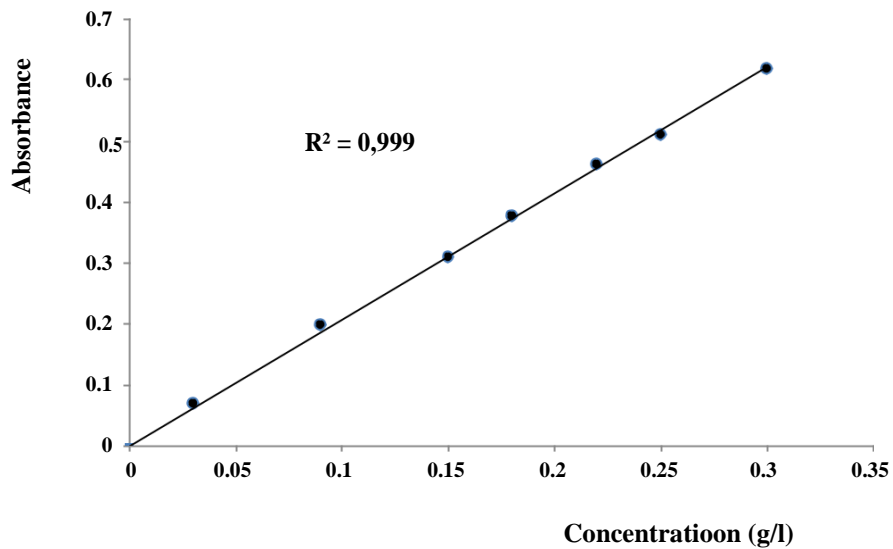


Figure 01. La courbe d'étalonnage de l'acide gallique

### II.3.2. Dosage des flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes ont été mesurés par une méthode adaptée de Lamaison et Carnat (1991) en utilisant le trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) comme réactif. (Bahorun, 1997). Pour réaliser le dosage, 500  $\mu\text{l}$  de chaque solution diluée a été mélangée à 500  $\mu\text{l}$  d' $\text{AlCl}_3$  puis incubé à la température ambiante pendant 20 minutes. La lecture de l'absorbance de chaque solution préparée a été mesurée dans le même spectrophotomètre à une longueur d'onde de 430 nm contre un blanc. Les valeurs de l'absorbance ainsi obtenues sont proportionnelles à la quantité de flavonoïdes présente dans nos extraits. Et les résultats sont présentés en mg équivalent quercétine /g de matière sèche (Belyagoubi ,2012; Benchebra ,2013 ; Kada ,2018).

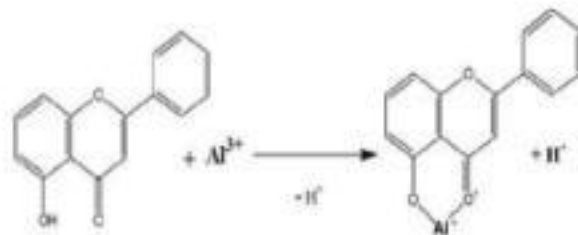
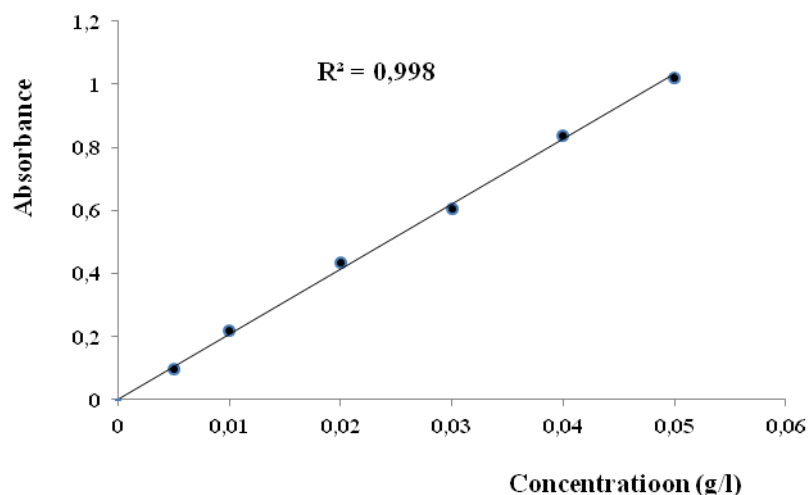


Figure 02. Réaction de chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes (Amrouche, 2017)



Une courbe d'étalonnage d'un flavonoïde : La quercétine a été établie (Figure II.3) en suivant le même protocole décrit précédemment.



**Figure 03.** La courbe d'étalonnage de la quercétine

### II.4. Evaluation de l'activité antioxydante

Les antioxydants présentent une grande diversité moléculaire agissant contre les processus d'oxydation de différentes manières.

Plusieurs méthodes sont utilisées afin de mesurer l'activité antioxydante d'un matériel biologique. Les plus couramment utilisées sont celles faisant intervenir des composés chromogènes, des radicaux naturels qui stimulent les espèces réductrices d'oxygène. Ces méthodes sont répandues en raison de leur facilité, leur rapidité et leur sensibilité. La présence d'antioxydants conduit à la disparition de ces chromogènes radicalaires, on retrouve le test au radical libre DPPH• (2,2-DiPhényl-1-PicrylHydrazyle) ainsi que le test au radical libre ABTS• qui est obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'Acide 2,2'-azinobis-(3-éthylBenzoThiazoline-6Sulfonique)). Ces deux tests sont les plus utilisés mais on peut également retrouver d'autres méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant FRAP (Ferric ion Reducing Anti oxidant Parameter) (Guillouty, 2016).

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de nos extraits, a été réalisée par deux tests chimiques *in vitro* le test du DPPH et le test FRAP

### II.4.1. Test DPPH

Dans ce test chimique, on s'intéresse à mesurer l'activité de balayage du radical libre par les fractions antioxydantes de nos huiles essentielles en employant le radical stable 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH')

#### II.4.1.1. Principe du DPPH

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle a été l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité des composés phénoliques. Il s'agit d'un test largement utilisé car il est simple et relativement reproductible (Guillouty, 2016)

Cette méthode est basée sur la réduction d'un radical libre très stable : le 2,2'-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène, comme R<sub>2</sub>-NH, R-OH et R-SH. (Guillouty, 2016) (figure II.4). Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant l'atome d'hydrogène.

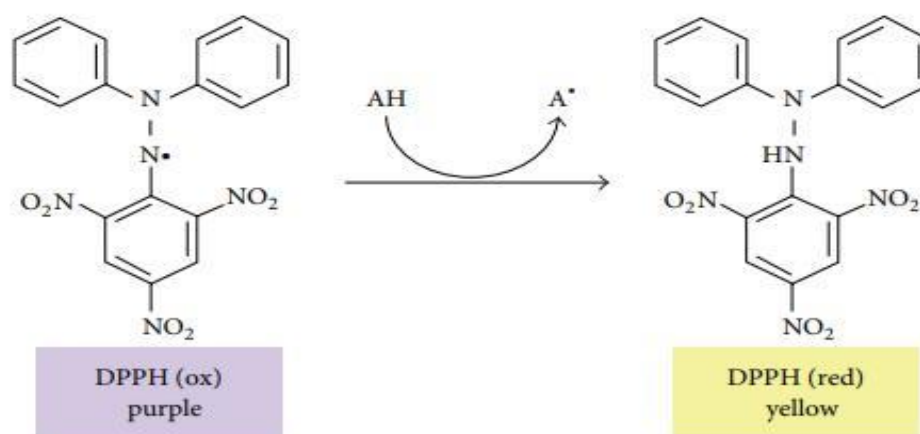


Figure 04. Principe du test de capacité de piégeage des radicaux DPPH.

Le DPPH est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517 nm. En présence de composés anti radicalaires, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant au jaune (Bentabet *et al.*, 2014). La réduction du radical libre (DPPH) par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence d'un donneur d'hydrogène ((Desmier, 2016).

Plusieurs facteurs peuvent entrer en jeu lors de la réaction, en particulier les conditions de la réaction (temps, rapport antioxydant/DPPH•, type de solvant, pH). Le test s'effectue à température ambiante afin d'éviter tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles. (Guillouty, 2016)



### II.4.1.2. Protocol

Pour effectuer le test DPPH : 500 µl de l'échantillon dilué on été à 500 µl de la solution de DPPH. Après une incubation de 30 min, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Trois essais ont été réalisés pour chaque extrait.

Nous avons également, mesuré le pouvoir antioxydant par la même procédure pour l'acide gallique, la Vitamine C et la quercétine pris comme antioxydants de référence afin de référer l'activité de nos extraits.

Les mesures de densités optiques de chaque solution d'extrait à différentes dilutions nous ont permis de calculer le pourcentage d'inhibition du DPPH (Bentabet *et al.*, 2014) suivant la formule :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_{517}^{\text{Contrôle}} - A_{517}^{\text{Extrait}}}{A_{517}^{\text{Contrôle}}} \times 100$$

Où :

$A_{517}^{\text{Contrôle}}$  : Désigne l'absorbance de la solution de DPPH seul à 517 nm;

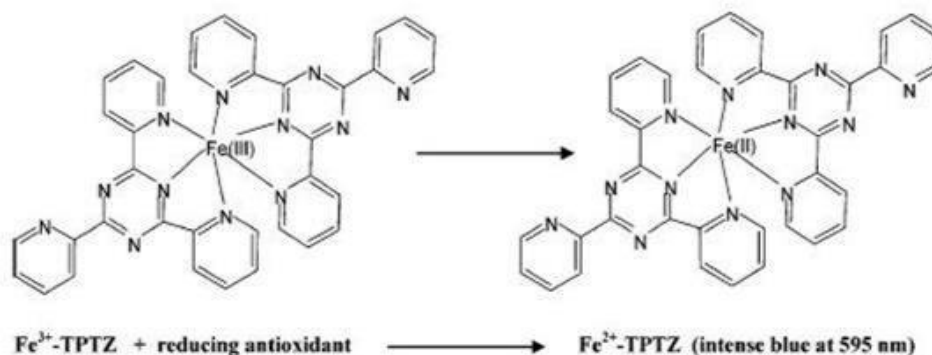
$A_{517}^{\text{Extrait}}$  : Désigne l'absorbance du DPPH en présence de l'extrait testé à 517 nm.

L'efficacité antioxydante des extraits est déterminée ensuite par le calcul du paramètre  $EC_{50}$  «efficient concentration» qui représente la concentration d'inhibiteur (antioxydant) nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres (Bougandoura, 2012).

### II.4.2. Test FRAP

#### II.4.2.1. Principe

Dans cette partie de notre étude, l'activité antioxydante a été évaluée à l'aide de la méthode FRAP (Ferric reducing antioxidant power) qui détermine la capacité antioxydante totale, c'est une technique rapide, facile et reproductible. Ce test est basé sur la réduction d'un complexe ferrique tripyridyletriazine ferrique (TPTZ- $Fe^{3+}$ ) en sa forme ferreux (TPTZ- $Fe^{2+}$ ) à pH faible, en présence des composés antioxydants en raison de la présence de groupes donneurs d'électrons et la formation subséquente d'un complexe de couleur bleu, dont l'absorbance est mesurée à 593 nm (Bentabe 2014).



**Figure II.5.** Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP (Ferric reducing antioxidant power) entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)- TPTZ et un antioxydant (AH) (Chandra, 2016).

#### II.4.2.2. Protocol

Pour réaliser le test FRAP, 100  $\mu\text{l}$  de l'échantillon dilué on été mélangé à 1 ml de la solution de FRAP. Après 5 min d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 593 nm. Trois essais ont été réalisés pour chaque extrait.

Nous avons également, mesuré le pouvoir antioxydant par la même procédure pour la Vitamine E pris comme antioxydant de référence afin de référer l'activité de nos extraits.

L'efficacité antioxydante des huiles essentielles est déterminée par équivalence à la vitamine C. La vitamine C est communément reconnue comme un antioxydant naturel majeur dans notre alimentation et se trouve possédant une activité anti-cancérigènes. Sur ces fins, une plus grande attention a été concentrée sur la détermination de la capacité antioxydante totale par la capacité antioxydante équivalente à la vitamine C.

Ce dosage est un dosage très populaire et la valeur est affectée par la comparaison de la capacité anti-oxydante ou de la capacité de piégeage des radicaux d'un antioxydant à celui de la vitamine C. Ce paramètre, est défini donc comme étant la concentration de la solution standard de la vitamine C possédant la capacité antioxydante équivalente à une solution de 1 mM de la substance étudiée (extrait). Plus la valeur est importante, plus le pouvoir antioxydant des extraits est important (Desmier, 2016)

# **Résultats et discussions**



### III.1. Préparation des extraits

La partie aérienne d'*Asphodelus microcarpus* choisi pour l'extraction a subi une délipidation et de dépigmentation par l'hexane jusqu'à épuisement.

L'extraction des principes actifs de la plante étudiée, a été effectuée par une série de solvant à polarité croissante à savoir : le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, l'éthanol et le méthanol successivement. Les teneurs et les couleurs de chaque extrait bruts sont consignés dans le (Tableau III.1).

**Tableau 2.** Teneurs, aspect et couleurs des quatre extraits de l'espèce *Asphodelus microcarpus*.

Espèce	Aspect	Extrait	Couleur	Teneur (%)
<i>Asphodelus microcarpus</i>	Visqueux	Dichlorométhane	Jaune	21%
		Acétate d'éthyle	Orange foncé	0,93%
		Éthanol	Orange foncé	15,35%
		Méthanol	Jaune foncé	13,14%

D'après les résultats de l'extraction, on remarque que tous les extraits ont montré des aspects visqueux de différentes couleurs variant du jaune à l'orange.

Les extraits ont enregistré des valeurs de teneurs d'extraction différente allons de 0,93 % pour l'extrait acétate d'éthyle et 21% pour l'extrait Dichlorométhane. L'extrait dichlorométhane a enregistré la meilleur teneur (21%) suivi par l'extraits éthanol et méthanol qui enregistré 15,35 et 13,14% respectivement, Alors que l'extraits acétate d'éthyle a enregistré la teneur la plus faible (0,93%); cette différence de teneur entre les différentes extraits plantes pour une même plante dans les différents solvants, peut être expliquée par le type de solvants choisi. Egalement les caractéristiques et la composition de la plante et même de la granulométrie et



des interaction solide-liquide (solvant) ou à des facteurs liés aux procédures d'extraction employées en tenant compte la durée d'extraction, le type du contact matière-solvant, la taille des particules de l'échantillon, l'agitation et la température.

Si on compare les teneurs des différents solvants on remarque qu'elles sont proches pour les extraits éthanol et méthanol (15,35% et 13,14% respectivement), Cela veut dire qu'il a eu presque la même diffusion du solvant dans la poudre dans l'étape de macération et probablement à la nature du solvant utilisé.

On constate que les variations de teneurs en matière sèche de l'espèce *Asphodelus mcirocarpus* peuvent être dues à plusieurs facteurs combinés, liés aux des caractéristiques physicochimiques des solvants utilisés et de leur polarité, ce dernier joue un rôle déterminant sur la quantité ainsi que sur le type de composés phénoliques à extraire et la sensibilité de ces derniers.

#### **II.2. Dosage des composés phénoliques :**

Avant toute étude d'activité inhibitrice, nous avons effectué un dosage des phénols totaux sur les différents extraits préparés à partir de six plantes.

Le dosage des phénols totaux a été réalisé par le réactif Folin-Ciocalteu et les teneurs ont été exprimé par mg EAG/ g de matière sèche. Quant au dosage des flavonoïdes, nous avons utilisé le trichlorure d'aluminium comme réactif et les teneurs ont été exprimé par mg EQ/ g de matière sèche

Le tableau III.2, résume les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes pour chaque plante.



**Tableau 3.** Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/g), flavonoïdes (mg EQ/g) de la partie aérienne d'*Asphodelus microcarpus*.

Espèce	Extrait	Teneur en Phénols Totaux (mg/g) EAG	Teneur en Flavonoïdes (mg/g) EQ
<i>Asphodelus mucrocarpus</i>	Dichlorométhane	Non déterminer	0,5 ±0,04
	Acétate d'éthyle	2,4 ±0,2	1 ±0,1
	Éthanol	3,9 ±0,5	0,8 ±0,1
	Méthanol	3,07 ±0,2	0,8 ±0,08

D'après le **Tableau 3**, Les résultats montrent que les teneurs en polyphénols totaux varient entre 2,4 et 3,9 mg EAG/g, L'extrait éthanol a enregistré la teneur la plus élevée en phénols totaux 3,9 mg GAE / g, Alors que l'extrait acétate d'éthyle enregistre la teneur la plus faible en phénols totaux 2,4 mg GAE/g. Compte au dosage des flavonoïdes, les teneurs ont varié entre de 0,5 et 1 mg EQ/g. La teneur la plus élevée a été enregistrée pour l'extrait acétate d'éthyle 1 mg EQ/g par contre l'extrait dichlorométhane a enregistré la teneur la plus faible 0,5 mg EQ /g.

Si on compare les teneurs en flavonoïdes à celles des teneurs en composés phénoliques pour tous les extraits, on remarque qu'elles sont toutes inférieures par rapport les teneurs en phénols totaux. Ce qui indique que les extraits contiennent d'autres composés phénoliques possédant autres structures chimiques que celles des flavonoïdes (Acide phénoliques, tanins, silènes...). La teneur en flavonoïdes dépend alors de la méthode d'extraction, des solvants utilisés, le traitement de la matière végétale (récolte, organe de la plante utilisé, séchage et conservation), et la méthode d'extraction, solvants utilisées. Ainsi elle dépend par d'autres facteurs par exemple l'exposition à la lumière et la technique récolte de stockage. (Turkmen Erol et al, 2009 ; Rawel et al., 2005).



Une étude faite par (Mayouf, 2019) sur même espèce végétale ayant utilisé la même procédure d'extraction réalisée dans notre étude ont montré des teneurs en phénols largement plus importantes que celles observées chez notre plante *Asphodelus microcarpus*. Par contre les teneurs de flavonoïdes sont inférieures par rapport à notre étude. Cette différence d'activité montre que les taux en phénols totaux et en flavonoïde varient selon le solvant utilisé pour l'extraction et ou par l'espèce végétale. Ces variations sont probablement liées à un facteur écologique qui concerne, l'espèce, le sol, le climat et les périodes de récolte. Ces facteurs peuvent jouer un rôle dans la teneurs de ces composées phénoliques.

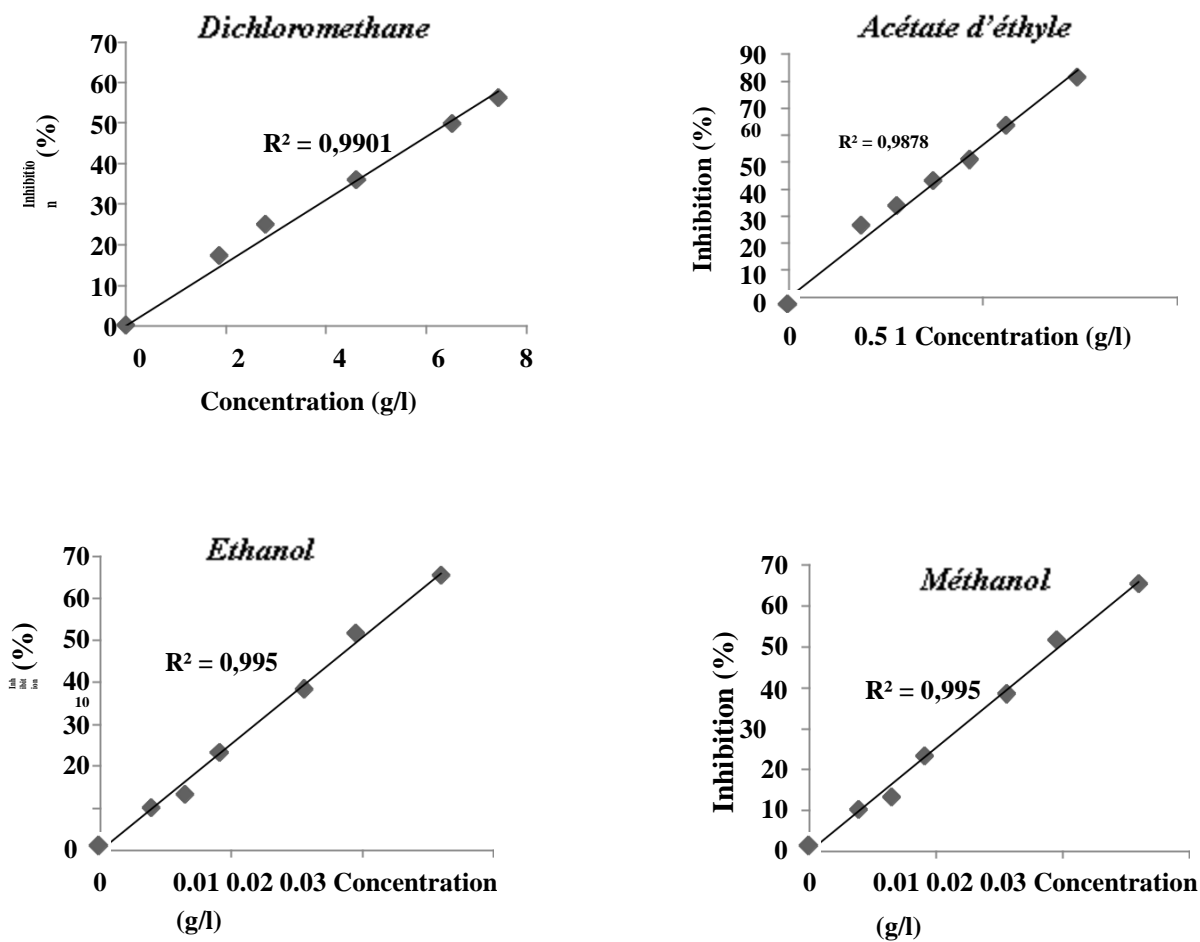
### III.3. Evaluation de l'activité antioxydante

#### III.3.1. Piégeage du radicale DPPH

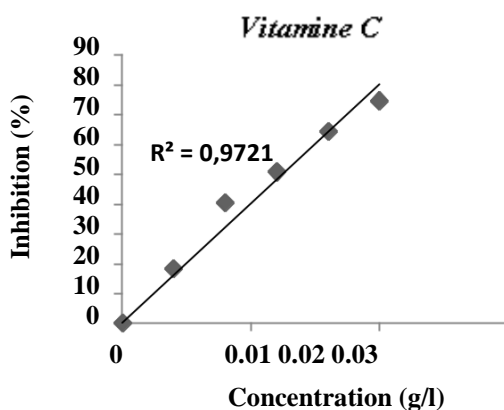
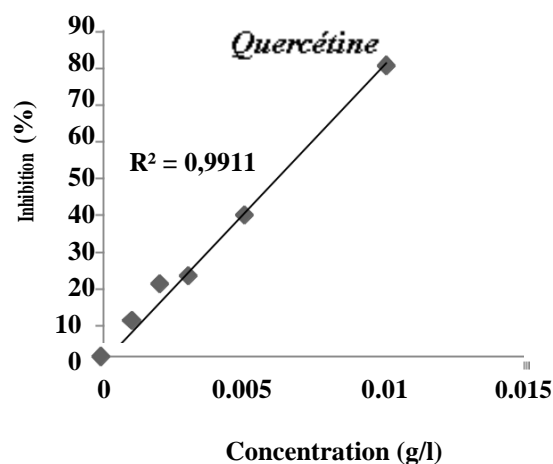
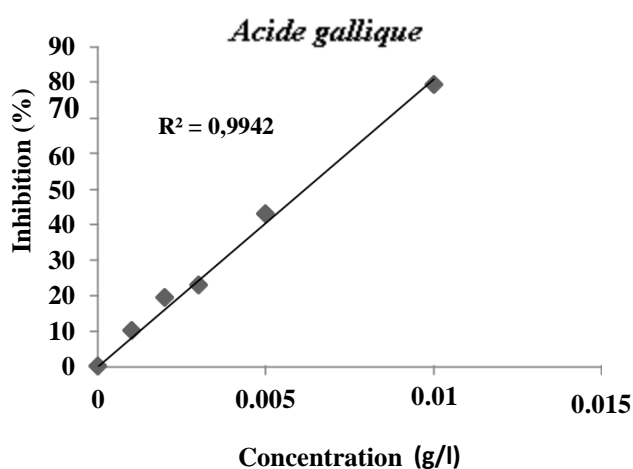
Dans le but d'évaluer l'activité antioxydante de notre espèce *Asphodelus microcarpus*, nous avons utilisés le test de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle (DPPH) *in vitro*. Le test DPPH se caractérise par sa capacité de former des radicaux libres stables. La présence de ces radicaux DPPH donne lieu à une coloration violette foncée de la solution, qui absorbe à 517 nm.

Les mesures de densités optiques de chaque solution d'extrait à différentes dilutions nous ont permis de calculer le pourcentage d'inhibition du DPPH

Les figures qui suivent représentent les tracés du pourcentage d'inhibition (%) en fonction de la concentration en antioxydants (phénols) (Figure III.1) ainsi que la Figure III.2 qui représente la variation des pourcentages d'inhibition (%) en fonction des concentrations en g/ml des trois antioxydants standards choisis pour cette étude à savoir l'Acide gallique, la Quercetine et la Vitamine C, développant une gamme de concentrations qui donne des taux d'inhibition compris entre 20 et 80 % qui chez les plantes dépendra de la capacité anti radicalaire de ces dernières, qui représente une meilleure approche pour interpréter les données.



**Figures 6. :** Courbes de la variation du pourcentage d'inhibition (%) en fonction de la concentration en phénols des extraits d'*Asphodelus microcarpus* par méthode DPPH.



**Figures 7.** Variation du pourcentage d'inhibition (%) en fonction de la concentration en antioxydants standards choisis pour l'étude du test DPPH.

Les pourcentages d'inhibition ainsi déterminés à partir des tracés précédents, nous ont permis de déterminer la concentration d'inhibition à 50% ( $EC_{50}$ ) des antioxydants présents dans les extraits phénoliques exprimés en  $\mu\text{g/ml}$  qui représentent la concentration de l'inhibiteur nécessaire pour diminuer 50% des radicaux libres dans le milieu réactionnel. De même, nous avons calculé les  $EC_{50}$  de l'Acide gallique, la Quercétine et la Vitamine C afin de les comparer avec ceux des extraits phénoliques. Les valeurs d' $EC_{50}$  obtenues sont résumées dans le tableau III.3



**Tableau .4** Les valeurs d'EC<sub>50</sub> µg/ml des extraits de la plante *Asphodelus microcarpus* et des Antioxydant standards.

Espèce	Extrait	EC <sub>50</sub> µg/ml
<i>Asphodelus microcarpus</i>	Dichlorométhane	6,47 ± 0,06
	Acétate d'éthyle	0,45 ± 0,09
	Éthanol	4,35 ± 0,50
	Méthanol	0,02 ± 0,00
<b>Antioxydant standards</b>		
	Acide gallique	0,3 ± 0,00
	Quercétine	0,6 ± 0,00
	Vitamine C	0,001 ± 0,00

D'après le résultat du test DPPH présenté dans le tableau précédent les valeurs d'EC<sub>50</sub> ont variée globalement entre 0,02 et 6,47 µg/ml. L'extrait dichlorométhane a enregistré la valeur d'EC<sub>50</sub> la plus élevée (6,47 µg/ml) par rapport aux autres extraits, suivi de l'extrait éthanol 4,35 µg/ml tandis que les extraits acétate d'éthyle et méthanol ont enregistrés les valeurs faible 0,45 et 0,02 µg/ml respectivement. D'après ces résultats, on remarque que les extraits acétate d'éthyle et méthanol présentes une activité antioxydante plus forte par rapport les autres extraits et dont la teneur en polyphénols est élevée d'où cette bonne activité est peut être due à la teneur en composés phénoliques.

Si on compare nos résultats avec une étude faite par (Mayouf, 2019) sur la même espèce *Asphodelus microcarpus* on remarque une activité largement plus inférieure par rapport à celle enregistrée dans notre étude avec une valeur d'EC<sub>50</sub> de 33,3 µg/l. Cette différence est peut être due à plusieurs facteurs la durée de l'extraction, le lieu de récolte, les conditions climatiques.....etc.

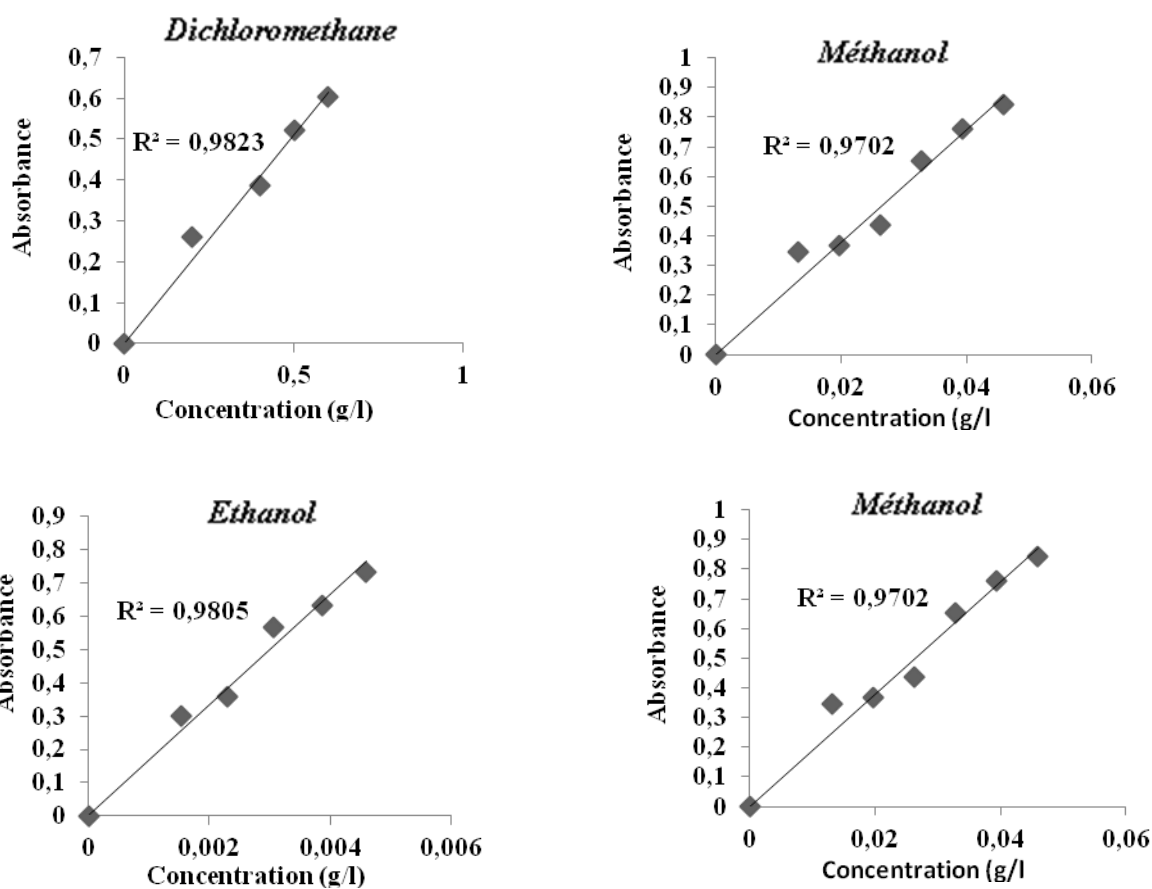


Comparativement aux antioxydants de référence nous avons constaté que l'extrait méthanol a présenté une plus forte activité que celles de l'acide ascorbique et quercétine. On peut dire que la variation de la capacité antioxydante de notre plante comparativement à celle des antioxydants standards choisis pour l'étude pourrait être due à la teneur et/ou la présence de certaines molécules potentiellement actives de flavonoïdes et / ou phénoliques dans les extraits. Les résultats suggèrent que notre plante peut remplacer les antioxydants de synthèse puisqu'ils présentent un potentiel inhibiteur des radicaux libres supérieurs à celui observé pour deux des antioxydants de référence.

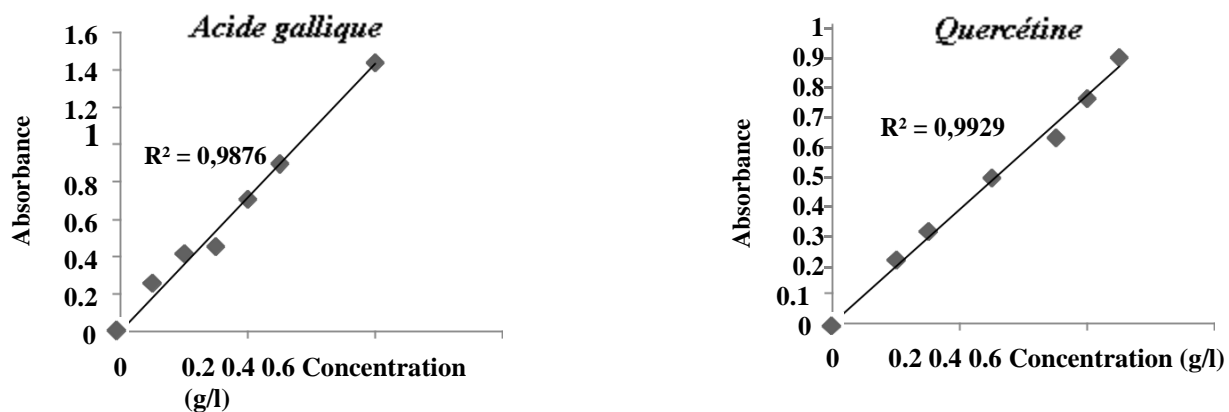
#### III.3.2. Pouvoir réducteur de fer (FRAP)

En parallèle au test de piégeage du radical libre DPPH, le pouvoir réducteur du fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dans les extraits de notre plante choisie a été évalué en utilisant la méthode FRAP suivant le protocole décrit par Oyaizu (1986). Ce test est basé sur la réduction chimique du  $\text{Fe}^{3+}$  en sel de fer par les antioxydants qui donnent la couleur bleu qui permet de mesurer les capacités antioxydantes de nos extraits.

À partir des mesures des absorbances de chaque extrait à différentes concentrations (dilutions), nous avons tracé les courbes exprimant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en composés phénoliques issus de l'extraction par macération à température ambiante par solvant à polarité croissante (figures III.3). De plus, nous avons tracé les courbes de trois antioxydants de synthèse l'acide gallique et la quercétine figure III.4), afin de référer le pouvoir antioxydant de nos extraits à celui de la vitamine C.



Figures 8. Variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols totaux des extraits d'*Asphodelus microcarpus* par méthode FRAP.



Figures 9. Variation de l'absorbance en fonction de la concentration en antioxydants standards choisis pour l'étude du test FRAP.



Ce dosage est un dosage très populaire et la valeur est affectée par la comparaison de la capacité anti-oxydante ou de la capacité de piégeage des radicaux d'un antioxydant à celui de la vitamine C. Ce paramètre, est défini donc comme étant la concentration de la solution standard de la vitamine C possédant la capacité antioxydante équivalente à une solution de 1 mM de la substance étudiée (extrait). Plus la valeur importante, plus le pouvoir antioxydant des extraits sont important. De ce fait l'activité antioxydante de nos extraits a été référée à celle de la vitamine C en termes d'équivalence. À partir des pentes tirées des graphes ci-dessus, nous avons calculé la capacité antioxydante pour chaque extrait et les résultats sont résumés dans le tableau II.3.

**Tableau 5.** Les valeurs de la capacité antioxydante des différents extraits de la plante *Asphodelus microcapus* et des Antioxydant standards.

Espèce	Extrait	Capacité antioxydante
<i>Asphodelus microcarpus</i>	Dichlorométhane	0,04 ± 0,00
	Acétate d'éthyle	180,92 ± 4,15
	Éthanol	163,74 ± 2,4
	Méthanol	20,30 ± 2,6
<b>Antioxydant standards</b>		
	Acide gallique	5,8.10 <sup>3</sup> ± 0,8
	Quercétine	1,9.10 <sup>3</sup> ± 0,06

Au regard du tableau précédent, nous remarquons que les valeurs varient globalement entre 0,04 et 180,92. Tout nos extraits phénoliques on présenté des propriétés antioxydantes intéressantes qui se sont manifesté par des valeurs largement supérieures à un excepté l'extrait Dichlorométhane. Nous constatons que la l'extrait d'acétate d'éthyle détient le meilleur pouvoir réducteur avec capacité antioxydante équivalente à la vit C égale 180,92, suivi de l'extrait éthanol 163,74 .par contre l'extrait dichlorométhane et méthanol on montré une faible capacité à réduire le fer 0,04 et 20,30 respectivement



Si nous classons nos extraits selon la puissance de réduction de fer par rapport vitamine C, nous obtiendrons l'ordre suivant : acétate d'éthyle, éthanol, méthanol et le dichlorométhane. Les valeurs de capacité de réduction sont proportionnelles à l'activité antioxydante. La valeur de capacité la plus élevée correspond à l'efficacité la plus importante.

Si on compare ces résultats aux teneurs en extraits, nous remarquons que la capacité de réductions du fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration en extraits,

Le pouvoir réducteur de l'espèce d'*Asphodelus microcarpus* est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants. Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle. (Bougandoura et al, 2012).

Si en comparant nos résultats avec les antioxydants de références l'acide gallique et la quercétine nous constatons que tous nos extraits ont un pouvoir antioxydant inférieur à celles déterminées pour les antioxydants standards.

D'un autre côté les résultats d'activité antioxydante entre les deux tests, on montré que celles déterminées par le test DPPH sont plus intéressante par rapport au test FRAP, selon ces résultats on peut dire que la variété et la méthode d'extraction ont une influence sur l'activité antioxydante .

Au finale, les tests DPPH et FRAP sont rapides, sensibles et plus fréquemment appliquées pour l'évaluation préliminaire du potentiel antioxydant de diverses substances naturelles, Bien que les principes de base soient un peu similaires, le test DPPH est le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité anti-oxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre, tandis que le test FRAP basée sur la réaction chimique de réduction du  $Fe^{3+}$  présent dans le complexe  $K^+Fe(CN)_6$  en  $Fe^{+2}$  (Aïra, 2019).

# **Conclusion générale**



## CONCLUSION

---

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée dans ces dernières années grâce aux vertus thérapeutiques qu'elles procurent. Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement à une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées par la plante non seulement comme des agents chimique contre les maladies, les herbivores et les prédateurs mais aussi comme des agents médicinaux. Ces molécules naturelles de nature phénolique sont très recherchées en phytothérapie vue les effets secondaires des médicaments de synthèse.

L'objectif primordial assigné par cette étude englobait le même contexte nous nous sommes intéressés à l'évaluation des propriétés antioxydantes d'extraits phénoliques de l'espèce *Asphodelus microcarpus* utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement de diverses maladies.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une extraction organique par cinq solvants à polarité croissante (hexane, dichloromethane, acétate d'éthyle, éthanol et méthanol) pour la plante choisie. Dans un second lieu nous avons procédé à la quantification des composés phénoliques par des méthodes spectrophotométriques. Le dosage des phénols totaux a été réalisé par la méthode de folin – Ciocalteu. Tandis que l'évaluation des composés flavonoïdiques a été effectuée par complexation au trichlorure d'aluminium.

Les résultats d'analyses du contenu en phénols totaux ont montré des teneurs varient respectivement entre 0,2 et 3,9 mg en équivalent d'acide gallique par gramme de la matière sèche et entre 0,5 et 1 mg équivalent en quercétine par gramme de la matière sèche. Dont on peut conclure la plante est en possession d'un matériel moyennement riche en flavonoïdes.

Dans un second temps nous avons évalué l'activité antioxydante des quatre extraits et de trois antioxydants commerciaux pris comme références (la Vitamine C, l'acide gallique et la quercétine) par deux tests chimiques *in vitro* : le test du DPPH, le test de FRAP.

Les résultats, ont décelé des activités antioxydantes modérés comparativement aux antioxydants standards avec des valeurs d'EC50 comprises entre 0,02µg/ml et 6,47 µg/ml pour le test DPPH et de 0,04 et 180,92 µg/ml équivalent à la vitamine C pour le test FRAP.



L'activité antiradicalaire contre le radical DPPH varie d'un échantillon à un autre. Tous les extraits ont montrés des aptitudes distinctes à piéger le radical DPPH. La fraction acétate d'éthyle est la plus active à piéger le radical DPPH, a présenté une forte activité en comparaison avec tous les autres extraits avec une capacité antioxydante de l'ordre de  $0,45 \pm 0,09$  ug/ml et  $180,92 \pm 4,15$  respectivement.

De tous les résultats obtenus, nous avons déduit que la fraction acétate d'*Asphodelus microcarpus* présente une bonne activité antioxydante qui pourrait être utilisé dans le domaine pharmaceutique.

L'ensemble de ces résultats a permis d'évaluer les activités antioxydantes de la plante choisie et de sélectionner les familles des composés phénoliques d'intérêts biologiques afin de mieux connaître, de valoriser et d'utiliser ces ressources dans le domaine thérapeutique. Pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- L'isolement et l'identification de la ou les molécule (s) bioactive (s) responsables de l'activité antioxydantes par des techniques chromatographiques et spectrales.
- L'utilisation d'autres méthodes pour l'étude de l'activité antioxydante telle que les méthodes électrochimiques.
- Des études *in vivo* seront souhaitables pour déterminer les tissus et organes cibles par les extraits d'*Asphodelus microcarpus* et rechercher leurs mécanismes d'action au niveau tissulaire et moléculaire.
- L'étude d'autres activités biologiques sur l'espèce en question telles que l'activité antifongique et anti-inflammatoire.

# **Les références bibliographiques**



- 1- ADOUANE Selma ; 2015. Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des Aurés.
- 2- Aïra REZAIRE ., 2012. Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa)
- 3-
- 4- BEDDOU Fawzia, 2015. Produits naturels, aspects nutritionnels et activités biologique.
- 5- BOUGANDOURA N ; BENDIMERAD N, 2012. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq.
- 6- BELYAGOUBI N ; BENHAMMOU N, 2012. Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien pages 2-3
- 7- BENNACER Kahina ; SOUFIT Samira, 2013. Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique et l'activité Antimicrobienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*
- 8- Benghanou M. (2012) ; La phytothérapie entre la confiance et méfiance, Mémoire Professionnel – Institut de formation paramédical. Chettia- Alger.
- 9- CHAOU Selma, 2017. Caractérisation phytochimique de la partie aérienne de la plante médicinale *Inula viscosa* L. (Asteraceae) de la région de Djinet (Boumerdes)
- 10- DESMIER Thomas. , 2016. Les antioxydants de nos jours : définitions et applications
- 11- DIOP1, 2015, Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (Verbenaceae).
- 12- DJEFFAL Amel ; SMAILI Naoual, 2017. Etude phytochimique et biologique de deux plantes de genre *Asphodelus*: *Asphodelus microcarpus* et *Asphodelus tenuifolius*.



- 13- GUILLOUTY Amandine. , Le 9 décembre 2016. Plantes médicinales et antioxydants.
- 14- JORITE S, 2015 ; La Phytothérapie, une discipline entre passé et futur : de l'herboristerie aux pharmacies dédiées au naturel. Université Bordeaux 2.
- 15- KALLA ALI ; 2012. Etude et valorisation des principes actifs de quelques plantes du sud algérien : *Pituranthos scoparius*, *Rantherium adpressum* et *Traganum nudatum*.
- 16- Macheix JJ, et Fleuriet A. ; Jay-Allemand C, 2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires'importance économique. Ed. Presses polytechnologiques et universitaires romandes, France, 192 p.
- 17- Mayouf Nozha ; 2019. Propriétés antioxydant, anti-inflammatoire et immunomodulatrice des extraits d'*Asphodelus microcarpus* pages 33-34.
- 18- N. Bentabet, Z. Boucherit-Otmani, K. Boucherit., 2014. Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Bécharen Algérie.
- 19- SOFOWORA. A, 2010. Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Académie suisse des sciences naturelles.
- 20- Serigne Omar S et *al*, 2015, Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (Verbenacea).
- 21- SELADJI. 2014. études phytochimique, activité antioxydant et antimicrobiennes des extraites de cinq plante médicinale et analyse de leur huile essentielle

