

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
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 des produits naturels

THEME

**Evaluation de l'activité antioxydante des extraits phénoliques de
l'espèce « *Thapsia garganica* »**

Présenté par :
M^{elle}. HAMIDAT Amina

Devant le jury :

Président(e) : M^{ème}. KRAZA Lamia

Rapporteur : M. SIFi Ibrahim

Co-Rapporteur : M^{ème}. NEBEG Halima

Examinatrice : M^{elle}. ZAKHROUF Zohra

Soutenu publiquement le : 01/06/ 2016

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Mes parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience. Si je suis arrivée ici, c'est grâce à chacun de vous.

Mes Chers frères, chaque un a son nom, l'idéal Omar et sa femme, Ahmed et sa femme et leur fils Obaida ,

Souad et son mari, Mohamed, Abdelkader.

Mes très chères amis Nour el Houda, Hanna, Zahra,

Imane, Meriem.

Tous mes collègues de promotion 2015-2016 de Biochimie.

Remerciements

*Je tiens à remercier notre Dieu le tout puissant qui m'a donné
la force et la patience d'accomplir ce travail.*

*En seconde lieu, je tiens à remercier mes parents pour leurs
contributions, leur soutien et leur patience.*

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon encadreur
Monsieur Sifi Ibrahim pour sa disponibilité, ses précieux
conseils et son aide durant toutes les périodes du travail.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à Madame Nebeg Halima
pour ses directives et ses conseils judicieux ont contribué
fortement à l'élaboration de ce travail.*

*Je tiens à remercier également aux membres du jury pour
l'intérêt qui' ils ont porté à ma recherche en acceptant
d'examiner ce travail.*

*Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes
proches et mes amis, qui m'ont toujours soutenue et encouragée
au cours de la réalisation de ce travail.*

Merci à tous et à toutes.

يهدف هذا العمل إلى دراسة المستخلصات الفينولية مع تقييم نشاطها المضاد للأكسدة لنبته طبية تُعرف بالديراس أو بونافع (*Thapsia gargania*) و المقتطفة من منطقة تاجموت (الأغواط). يعتني الجزء الأول من هذه الدراسة باستخراج و تقييم كمية المركبات الفينولية، الفلافونويدية بكاشف Folin-Ciocalteu و ثلاثي كلوريد الألمنيوم على التوالي. أما الجزء الثاني فهو يخص دراسة النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات الفينولية باستخدام طريقة تثبيط الجذر الحر DPPH* و طريقة إرجاع الحديد (FRAP). فُدر مردود الاستخلاص بالنقع في الميثانول لكل من الأوراق و البذور بنسبة 9.4% و 7.6% على التوالي. أظهرت النتائج المحصل عليها أن كمية المركبات الفينولية تتراوح قيمتها بين $67,295 \pm 0,09$ مغ/غ و $34,035 \pm 0,22$ مغ/غ مكافئ حمض الغاليك لكل من مستخلص الأوراق و البذور على التوالي، أما محتوى الفلافونويدات المكافئ للكيرستين هي في حدود $04,574 \pm 0,24$ مغ/غ بالنسبة للأوراق و $03,050 \pm 0,50$ مغ/غ بالنسبة للبذور. بالمثل كانت كمية الكلوروفيل الإجمالي والكروتين تختلف من عينة إلى أخرى. بينت نتائج اختبارات النشاط المضاد للأكسدة أن كل من مستخلص الأوراق و البذور يُظهر خصائص مضادة للأكسدة في مستويات مختلفة و المستخلص الأكثر نشاطا هو مستخلص الأوراق. نفس الشيء بالنسبة لاختبار إرجاع الحديد.

الكلمات المفتاحية: *Thapsia gargania*، المركبات الفينولية، الفلافونويدات، الجذور الحرة، النشاط المضاد للأكسدة، DPPH، FRAP.

Résumé

Nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude des extraits phénoliques avec l'évaluation de ses propriétés antioxydants d'une plante médicinale locale (*Thapsia gargania*) connue par le nom de dreass ou *bounafaa*, récoltée à partir de la région Tadjemout (*Laghouat*). La première partie de cette étude concerne l'extraction et la quantification des phénols totaux, des flavonoïdes par le réactif du Folin-Ciocalteu par le trichlorure d'aluminium respectivement. La deuxième partie concerne l'étude de l'activité antioxydante des extraits phénoliques de la plante (feuilles, graines) en utilisant deux techniques : piégeage du radical libre DPPH*, réduction de fer (FRAP). Les résultats obtenus montrent que le rendement d'extraction de la macération des feuilles et graines dans le méthanol est 9.4% pour les feuilles suivi par l'extrait des graines à raison de 7.6 %. Les teneurs en phénols totaux varient de $67,295 \pm 0,09$ et $34,035 \pm 0,22$ mg EAC/g de résidus sec d'extrait des feuilles et des graines respectivement. Les teneurs en flavonoïdes exprimées en équivalent de quercétine sont de l'ordre de $04,574 \pm 0,24$ mg EQ/g résidus sec d'extrait des feuilles et $03,253 \pm 0,50$ mg EQ/g résidus sec d'extrait des graines. De même, les résultats de la quantification des chlorophylles totaux et des caroténoïdes varient d'un extrait à une autre. Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante montrent que les deux extraits phénoliques de la plante étudiée présentent des propriétés antioxydantes à différents niveaux. La même chose pour le test de FRAP.

Mots clés : *Thapsia gargania*, composés phénoliques, flavonoïdes, radicaux libres, activité antioxydante, DPPH, FRAP.

Abstract

We are interested in this work to the study of phenolic extracts with the evaluation of its antioxidant properties of local medicinal plant (*Thapsia gargania*) known by the name of dreass or *bonafaa*, harvested from the region Tadjemout (*Laghouat*). The first part of this study concerns the extraction and the quantification of total phenolics, flavonoids by the Folin-Ciocalteu reagent, the aluminium trichloride respectively. The second part concerns the study of the antioxidant activity of phenolic extracts of the plant (leaves, seeds) using two techniques: DPPH radical scavenging, reducing iron (FRAP). The results obtained show that the extraction yield of the maceration of leaves and seeds in methanol is 9.4% for sheets followed by the extract of the seeds at a rate of 7.6%. The polyphenol contents vary from 67.295 ± 0.09 and 34.035 ± 0.22 mg EAC/g dry residues from the leaves and seeds respectively. The contents of flavonoids expressed as quercetin equivalent is in the order of 04.574 ± 0.24 mg EQ/g dry residues from the leaves and 03.253 ± 0.50 mg EQ/g dry residues from the seeds. Similarly, the results of quantification of total chlorophylls and carotenoids vary from one sample to another. The methods for evaluating the antioxidant activity showed that two phenolic extracts of the plant have antioxidant properties studied at different levels. The same for the FRAP test.

Key words: *Thapsia gargania*, flavonoids, polyphenol, free radicals, antioxidant activity, DPPH, FRAP.

Liste des tableaux

Tableau 1. Principaux acides hydroxybenzoïques.	09
Tableau 2. Principaux acides hydroxycinnamiques.	10
Tableau 3. Principaux types de coumarines.	11
Tableau 4. Quelques classes des flavonoïdes.	13
Tableau 5. Aspect, couleur, la masse et le rendement d'extraction de chaque extrait.	35
Tableau 6. Teneur en composés phénoliques de chaque extrait de la plante.	37
Tableau 7. La teneur de chlorophylle et caroténoïdes pour les deux extraits de la plante étudiée.	38
Tableau 8. Les valeurs de l'EC ₅₀ (µg/ml) de chaque solution test par le DPPH.	42
Tableau 9. Les valeurs de TEAC du test FRAP des extraits de la plante étudiée.	45

Liste des figures

Figure 1. Structure de base des flavonoïdes.	11
Figure 2. Exemple de tannins hydrolysables (Pentagalloylglucose).	14
Figure 3. Exemple de tannins condensés.	15
Figure 4. La double vie des ERO.	18
Figure 5. Photographie de <i>Thapsia garganica</i> .	25
Figure 6. La poudre obtenue le broyage du matériel végétal.	26
Figure 7. Les extraits méthanoliques.	27
Figure 8. Les résidus secssolubilisés dans le méthanol.	27
Figure 9. Protocole d'extraction des composés phénoliques.	28
Figure 10. Structure de l'acide gallique.	31
Figure 11. Structure de la quercétine.	32
Figure 12. Réduction du radical libre DDPH.	33
Figure 13. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (mg/ml).	36
Figure 14. Courbe d'étalonnage de la quercétine.	37
Figure 15. Comparaison entre les teneuses des composes dosés.	38
Figure 16. Résultat de réduction du radical libre DPPH' en présence des extraits.	39
Figure 17. Courbes représentes le pourcentage d'inhibition de DDPH en fonction des concentrations des extraits phénoliques.	40
Figure 18. Pouvoir antioxydant de Trolox, Vitamine C et BHA par le test DDPH.	41
Figure 19. Classement croissant des valeurs d'EC ₅₀ (Extraits et standards).	43
Figure 20. Réduction du fer ferrique en fer ferreux en présence des antioxydants.	44
Figure 21. Pouvoir antioxydante de Trolox, extraits phénoliques par le test FRAP.	44

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
AG:	Acidegallique
AGPI :	Acides Gras PolyInsaturés
AlCl₃ :	Trichlorure d'aluminium.
BHA :	Hydroxyanisol butyle
BHT :	Butylhydroxytolène
CAT :	Catalase
Da :	Dalton
DPPH[•] :	2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl
DPPH-H :	2,2-diphényl-1-picrylhydrazine
ERO :	Espèces Réactives de l'Oxygène
EC₅₀ :	Efficient concentration 50
Fe²⁺ :	Fer ferreux
Fe³⁺ :	Fer ferrique
FRAP :	Ferricreducingantioxidant power
GPx :	Glutathion peroxydase
GSH :	Glutathion réduit
GSSG :	Glutathion oxydé
H₂O₂ :	Hydroperoxyde
HCl :	Acide chlorhydrique
HOO[•] :	Peroxyde d'hydrogène
H₃PW₁₂O₄₀ :	Acide phosphotungstique
H₃PM₁₂O₄₀ :	Acide phosphomolybdique
K₃Fe(CN)₆ :	Ferricyanure de potassium
MeOH :	Méthanol
M₀₈O₂₃ :	Molybdène
Na₂CO₃ :	Carbonate de sodium
NO :	Oxyde d'azote
NO₂ :	Dioxyde d'azote
NO[•] :	Monoxyde d'azote

O₂ :	Oxygène
O₂^{·-} :	Superoxyde
ONOO⁻ :	Peroxynitrite
PM :	Poids moléculaire
ROS :	ReactiveOxygenSpices
RO₂[·] :	Peroxyles lipidiques
RO₂H :	Hydroperoxyde
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
SOD :	Superoxydedismutase
TBHQ :	Tert-butylhydroquinone
TEAC :	Trolox Equivalent AntioxidantCapacity
TC :	Tannins condenses
TH :	Tannins hydrolysables
Tg :	Thapsigargine
Trolox :	Acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2-carboxylique
W₈O₂₃ :	Tungstène
α-T[·] :	α-tocophéryle
α-TH :	α-tocophérol

Tableau des matières

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction	01

Synthèse bibliographiques

Chapitre I : La phytothérapie et les plantes médicinales

I. Généralité sur la phytothérapie et les plantes médicinales	03
I.1 Définition de la phytothérapie	03
I.2 Différents types de la phytothérapie	03
I.3 Les avantages de la phytothérapie	03
I.4 Les risques associés à la phytothérapie	04
I.5 Les plantes médicinales	04
I.5.1 Définition des plantes médicinales	05
I.5.2 Parties utiles des plantes médicinales dans la phytothérapie	05
I.5.3 Importance des plantes médicinales	06

Chapitre II : Les composés phénoliques

II.1 Généralités sur les métabolites secondaires	07
II .2 Les composés phénoliques	08
II .2.1 Définition des composés phénoliques	08
II .2.2 Classification des composés phénoliques	08
II .2.2.1 Les formes les plus simples	09
II .2.2.1.1 Les acides phénoliques	09
II .2.2.1.2 Les flavonoïdes	11
II .2.2.2 Les formes condensées	14
II .2.2.2.1 Les tannins	14
II .2.2.2.2 Les lignines	15
II .2.3 Biosynthèse des composés phénoliques	16
II .2.3.1 Voie d'acide shikimique	16
II .2.3.2 Voie d'acide acétique	16
II.3 Propriétés biologiques des composés phénoliques	16
II.3.1 L'activité antioxydante des composés phénoliques	17
II.3.1.1 Les radicaux libres	17

II.3.1.2	Le stress oxydatif	18
II.3.1.2.1	Définition du stress oxydatif	18
II.3.1.2.2	Les conséquences moléculaires du stress oxydatif	19
II.3.1.3	Les antioxydants	20
II.3 .1.3.1	Définition	20
II.3 .1.3.2	Systèmes de défenses antioxydants	20
	A. Systèmes enzymatiques	20
	B. Systèmes non enzymatiques	21
II.3 .1.3.3	Les antioxydants synthétiques	22
II.3 .1.3.4	Mode d'action des polyphénols	22

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

I.1	Présentation de la plante étudiée	23
I. I.1	Description botanique, répartition géographique	23
I. I.2	Classification	24
I. I.3	Usages	24
I. I.3.1	Usages traditionnels	24
I. I.3.2	Usages thérapeutiques	25
I.2	Extraction des composés phénoliques	26
I.2.1	Récolte et séchage	26
I.2.2	Préparation des extraits bruts	26
I.2.3	Calcul du rendement d'extraction	29
I.3	Dosage des quelques métabolites secondaires	29
I.3.1	Dosage des phénols totaux	29
I.3.1.1	Principe de la méthode	29
I.3.1.2	Protocole expérimental	29
I.3.2	Dosage des flavonoïdes	31
I.3.2.1	Principe de la méthode	31
I.3.2.2	Protocole expérimental	31
I.3.3	Dosage des chlorophylles et des caroténoïdes	32
I.4	Evaluation de l'activité antioydante	32
I.4.1	Méthode de piégeage du radical libre DDPH	32

I.4.1.1	Principe de la méthode	33
I.4.1.2	Protocole expérimental	33
I.4.2	Méthode de la réduction du fer FRAP	33
I.4.2.1	Principe de la méthode	33
I.4.2.2	Protocole expérimental	34
Chapitre II : Résultats et Discussions		
II.1	Rendement d'extraction	35
II.2	Résultats de dosage des quelques métabolites secondaires	36
II.2.1	Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes	36
II.2.2	Résultats de dosage des chlorophylles et des caroténoïdes	38
II.3	Résultats d'évaluation de l'activité antioxydante	39
II.3. 1	Résultats du pouvoir antioxydant « test DPPH* »	39
II.3. 2	Résultats du test de la réduction du fer « FRAP»	43
Conclusion		47
Références bibliographiques		49

Introduction

Les radicaux libres sont produits en permanence par notre organisme. Aux doses faibles, ils sont très utiles pour l'organisme et jouent des rôles importants dans divers mécanismes physiologiques **(Meziti, 2012)**.

Dans les conditions normales, cette production est parfaitement maîtrisée par notre système de défense. En effet, sous l'action des rayons ultra-violet, la déficience en antioxydants, les polluants tels que la cigarette ; la balance (antioxydants /pro-oxydants) est déséquilibrée, donc nous aurons une superproduction énorme des radicaux libres qui entraîne ce qu'on appelle « le 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 processus du vieillissement **(Bossokpi , 2003 ; Meziti, 2012)**.

Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant / antioxydant afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme. Les antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études pour le traitement des maladies dans lesquels le stress oxydant est incriminé **(Meziti, 2012)**.

Les risques et les effets néfastes des antioxydants synthétiques utilisés comme additifs alimentaires et la nécessité de les substituer par des antioxydants naturels issus de plantes ont été questionnés ces dernières années **(Meziti, 2012)**.

Les plantes médicinales constituent une source inépuisable de substances ayant des activités biologiques et pharmacologiques très variées **(Belyagoubi, 2012)**. Ils restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments et la source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futur médicaments **(Maurice, 1997)**.

Les propriétés pharmacobiologiques des plantes médicinales dépendent de la présence des agents bioactifs variés appartenant à différentes classes biochimiques (les composés phénoliques, les alcaloïdes, les huiles essentielles), dont font partie les composés phénoliques **(Smalle et Catling, 2000)**.

L'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme l'activité antioxydante, antimicrobienne, antitumorale et antiinflammatoire, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes ayant une utilisation rare ou moins fréquente ou non connues dans les traditions médicinales. Ces plantes représenteraient une nouvelle source

de composés actifs qui se présentent généralement par leurs métabolites secondaires. **(Bouhamide et Bounoua, 2012).**

La flore algérienne regorge de plusieurs espèces de plantes encore peu ou pas étudiées, mais dotées de réelles propriétés pharmacologiques. La maîtrise totale et parfaite des différentes propriétés de ces plantes, est aujourd'hui un objectif qui occupe une grande importance. **(Bentabet et al., 2014).**

C'est dans cet objectif que s'inscrit notre étude en tentant d'évaluer l'activité antioxydante des extraits phénoliques d'une plante médicinale endémique : *Thapsia garganica*, c'est une plante médicinale très répandue en Algérie mais non investiguée sur les plans phytochimique et pharmacologique à cause de l'ignorance de sa valeur médicale **(Avatoa .2001).**

Cette étude a comme objectif d'apporter un fondement scientifique à ces utilisations traditionnelles par des études expérimentales, elle comporte :

- Une analyse bibliographique concernant la phytothérapie, les plantes médicinales et leurs métabolites secondaires;
- Une partie expérimentale avec la description du matériel végétal et les méthodes utilisées. Celles-ci comprennent :
 - ✓ Présentation de protocole d'extraction des polyphénols, flavonoïdes, chlorophylles totaux, et leurs quantifications.
 - ✓ L'évaluation de l'activité antioxydante par deux méthodes (Test DDPH, Test FRAP).
 - ✓ Présentation des résultats obtenus et leurs analyses.

Synthèse bibliographiques

La phytothérapie et les plantes médicinales

I. Généralité sur la phytothérapie et les plantes médicinales

I.1 Définition de la phytothérapie

La phytothérapie, du grec *phyton*= végétal et *therapein*= soigner, est étymologiquement l'art de se soigner par les plantes .Autrement dit, contrairement à l'allopathie qui utilise majoritairement des principes actifs de synthèse, la phytothérapie emploie les plantes, donc des principes actifs végétaux **(Berthet, 2014)**.

Les principes actifs végétaux regroupent les substances végétales et les préparations végétales. Ainsi, un médicament à base de plantes, ou phyto-médicaments, est un médicament dont les substances actives sont exclusivement des substances végétales ou préparations à base de plantes, seules ou en association **(Berthet, 2014)**.

I.2 Différents types de la phytothérapie

- **Aromathérapie** : est une thérapeutique qui utilise les essences des plantes, ou huiles essentielles, substances aromatiques secrétées par de nombreuses familles de plantes, ces huiles sont des produits complexes à utiliser souvent à travers la peau **(Strang, 2006)**.
- **Gemmothérapie** : se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les radicules **(Strang, 2006)**.
- **Herboristerie** : correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. L'herboristerie se sert de la plante fraîche ou séchée; elle utilise soit la plante entière, soit une partie de celle-ci (écorce, fruits, fleurs). La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération. Ces préparations existent aussi sous forme plus moderne de gélule de poudre de plante sèche que le sujet avale **(Strang, 2006)**.
- **Phytothérapie pharmaceutique** : utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présentés sous forme de sirop, de gouttes, de gélules, de lyophilisats... **(Strang, 2006)**.

I.3 Les avantages de la phytothérapie

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont pas eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria (**Bouhamide et Bounoua, 2012**).

Les plantes médicinales sont faciles à utiliser, seraient potentiellement efficace et peu coûteuses. Le mode de préparation et d'administration sont des facteurs déterminants dans un traitement (**Bouhamide et Bounoua, 2012**).

La phytothérapie qui repose sur des remèdes naturels est bien acceptée par l'organisme, et souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques comme l'asthme ou l'arthrite (**Iserin et al, 2001**).

Selon les estimations de l'OMS (Organisation mondiale de la santé), plus de 80 % de la population mondiale, surtout dans les pays en voie de développement, ont recours aux traitements traditionnels pour satisfaire leurs besoins en matière de santé et de soins primaires (**Hamza, 2011**).

I.4 Les risques associés à la phytothérapie

Bien que le public et certains professionnels de santé croient que les phyto-médicaments sont relativement inoffensifs parce qu'ils sont naturels (**Fragroso et al., 2008**), plusieurs études, et articles scientifiques récents ont montré les conséquences sévères des effets secondaires de ces produits (**Cseke et al.,2006 ; Fragroso et al., 2008**), d'où vient l'intérêt des études pharmacologiques et cliniques pour évaluer l'efficacité et sûreté des phyto-médicaments, et en général des plantes médicinales (**Beers,2007 ; Fragroso et al., 2008**).

Les effets secondaires des plantes médicinales et leurs extraits peuvent aller à des symptômes gastro-intestinaux doux, réactions allergiques, complications neurologique, hépato-toxicité, néphro-toxicité, et parfois la mort (**Berrin et al., 2006 ;Cseke et al.,2006 ; Shaohua et al.,2006**). Ils peuvent avoir lieu à travers différents mécanismes, citant par exemple la toxicité. Ce sont généralement les alcaloïdes qui sont responsables de cet effet, qui s'exprimer par des nausées, diarrhées, réactions cutanées et même d'une hépato-

toxicité ou neuro-toxicité (Cseke *et al.*, 2006 ; Fragroso *et al.*, 2008). Cet effet peut être référé à la consommation des suppléments alimentaires adultérés, non contrôlés, contenant des plantes toxiques, des ingrédients actifs de quantité et qualité inconnues (Cseke *et al.*, 2006). Ou à l'utilisation prolongée d'un remède de phytothérapie (Kraft, 2009).

I.5 Les plantes médicinales

I.5.1 Définition des plantes médicinales

Les plantes médicinales regroupent l'ensemble des plantes dont un ou plusieurs de leurs organes sont utilisés pour leurs vertus thérapeutiques. Il peut s'agir de la tige, des feuilles, de l'écorce ou encore des racines qui sont employées à des fins curatives .Parmi les principes actifs les plus courants des plantes médicinales, on peut nommer les polyphénols, les terpènes, les stéroïdes et les alcaloïdes (Hordé, 2016).

De tout temps les plantes ont été utilisées pour soigner et introduites comme principe actif ou agent parfumant de topiques médicamenteux (Avenel, 2015).

Les plantes ont fourni à l'homme les drogues utiles pendant des siècles. Malgré la disponibilité de différentes approches pour la découverte thérapeutique, les produits naturels restent l'un des meilleurs réservoirs de la médecine traditionnelle (Malek *et al.*, 2015). Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains (Elqaj *et al.*, 2007).

I.5.2 Parties utiles des plantes médicinales dans la phytothérapie

Les principes actifs qui sont derrière l'effet thérapeutique des plantes se trouvent réparties d'une manière non équitable entre les différentes parties de ces dernières, dont quelles que unes en contiennent dans les feuilles par exemple et d'autres dans les racines. C'est pour cela dans certaines recommandations de leur usage, il y' lieu à préciser la partie de la plante à appliquer. Dans le recours à leur utilisation, les feuille sont répandues (26.3%), suivis par les fruits (11.32%), la plante entière (9.74%), les racines (8.68%), les graines (6.58%), les fleurs (4%) (Elbeyrouthy *et al.*, 2008).

I.5.3 Importance des plantes médicinales

La plupart des espèces végétales contiennent des substances qui peuvent agir, à un niveau ou un autre, sur l'organisme humain et animal (**Iserin et al., 2001**). L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes.

Beaucoup de végétaux et de certains compléments alimentaires sont une bonne source d'antioxydants et d'anti-inflammatoires. (**Wargovich et al., 2001**). Les plantes médicinales sont donc importantes pour la recherche pharmaceutique et comme matière première pour la synthèse des médicaments (**Decaux, 2002**).

L'importance économique des plantes médicinales occupe une place importante dans les marchés nationaux des pays en développement. Ainsi, l'Allemagne importe chaque année plus de 75 millions d'euros de plantes médicinales, provenant majoritairement de pays en développement et en transition. La vente durable de matériel végétal peut donc considérablement améliorer la balance commerciale des pays exportateurs et représente un facteur important de développement (**Kasperek et al-Janabi, 2008**).

Les composés phénoliques

II. Les composés phénoliques

II.1 Généralités sur les métabolites secondaires

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à reproduire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques) (**Macheix *et al.*, 2005**), les plantes produisent un grand nombre de composés. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent de réactions chimiques ultérieures, d'où le nom de « métabolites secondaires» (**Cheriet, 2011**).

Ces molécules ont été identifiées dans presque toutes les parties de la plante : les feuilles, les racines, les tiges, les fleurs, les graines et l'écorce (**Lee *et al.*, 1994**), cependant d'autres seront au contraire localisés préférentiellement dans une seule catégorie d'organes (**Guignard *et al.*, 1985**). Cette distribution varie d'une espèce à l'autre (**Seghiri, 2007**).

Les métabolites secondaires végétaux peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes, par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement (**Harrar, 2012**).

La plupart des métabolites secondaires des végétaux sont phytoalexines, c'est-à-dire des molécules biologiquement actives (**Bourgaud, 2001**).

Chez l'homme ces éléments trace représente une source importante de molécules utilisables dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (**Macheix *et al.*, 2005**).

Selon leur origine biosynthétique, les métabolites secondaires sont classés en trois groupes majeurs (alcaloïdes, terpènes, composés phénoliques), qui sont très inégalement répartis (**Macheix *et al.*, 2005**), chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (**Krief, 2003 ; Haven *et al.*, 2000**).

II.2 Les composés phénoliques

II.2.1 Définition des composés phénoliques

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc (**Bruneton, 1999 ; Lugasi *et al.*, 2003**).

En effet les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus (**Lugasi *et al.*, 2003**).

Les composés phénoliques sont synthétisées par les plantes au cours de leurs développements naturels et en réponse à des conditions de stress : infection, blessure, radiations UV et autres (**Benarous, 2014**).

Les polyphénols sont présents partout dans tous les organes de la plante et les principales sources alimentaires sont les fruits et les légumes, les légumes secs... (**Middleton *et al.*, 2000**).

II.2.2 Classification des composés phénoliques

Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui chez les végétaux. Bien qu'étant très diversifiés, ils ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonction hydroxyles (**Macheix *et al.*, 2005**). Ces composés peuvent être classés de plusieurs façons

D'après Macheix et al (2005), les composés phénoliques sont regroupées en nombreuses classes qui se différencient par :

- La complexité du squelette de base (allant d'un simple C₆ à des formes très polymérisées).
- Le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...).
- Les liaisons possibles de ces molécules de bases avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques...).

II.2.2.1 Les formes les plus simples

Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant du simple phénol C₆ aux flavonoïdes C₁₅ et à des molécules proches (Macheix *et al.*, 2005).

II.2.2.1.1 Les acides phénoliques

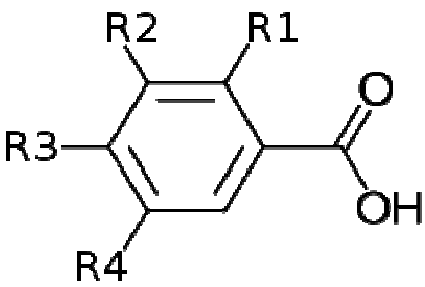
Le terme acide-phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et hydroxyle phénolique (Bruneton, 1999). Ce terme réservé aux dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (Macheix *et al.*, 2005).

Les acides phénoliques participent directement aux réactions de stress environnementaux comme les attaques par les ravageurs et contribuent au processus de guérison de la plante par la lignification des tissus endommagés (Manach *et al.*, 2004).

➤ Acides hydroxybenzoïques

Sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C₆-C₃). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou des glycosides. Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans le tableau 1 (Harrar, 2012).

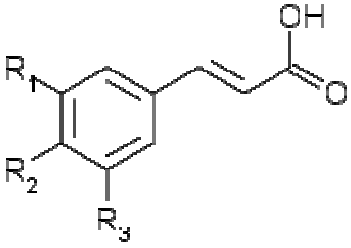
Tableau 1. Principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

	R1	R2	R3	R4	Exemples
	H	H	OH	H	Acide hydroxybenzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

➤ **Acides hydroxycinnamiques**

Dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C₆-C₃).
 Existents souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzoïque, conduisent une réactivité chimique importante de ces molécules (Harrar, 2012). Les principaux acides hydroxycinnamiques sont représentés dans le tableau 2.

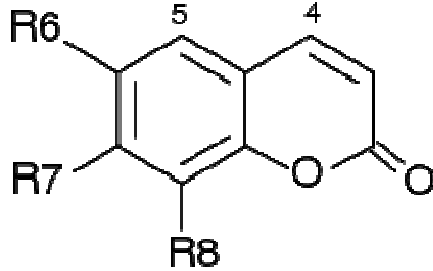
Tableau 2. Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheyner, 2006).

	R1	R2	R3	Exemples
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p-coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	H	Acide sinapique

➤ **Coumarines**

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale (Macheix et al., 2005). Les coumarines ont un squelette en C₆-C₃, mais ils possèdent un atome d'oxygène hétérocyclique dans le cadre de l'unité C₃ (Vermerris et Nicholson, 2006). Appartiennent au groupe des composés connus par des benzo- α -pyrone (O'Kennedy et Thornes, 1997) ils sont substitués en 7 par un hydroxyle. Ce sont des substances organiques aromatiques caractérisées par une saveur amère et qui se présentent chez les végétaux aux niveaux des différents organes sous forme de cristaux blancs ou jaunâtre (Bruneton, 2009). Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres (Cowan, 1999). Le tableau 3 regroupe les principaux types de coumarines.

Tableau 3. Principaux types de coumarines (Macheix *et al.*, 2005).

	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH3	OH	H	Scopolétol
	OCH3	OH	OH	Fraxétol
	H	OH	OH	Daphnétole

II.2.2.1.2 Les flavonoïdes

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange, cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus qui signifie jaune (Prochazkova D *et al* , 2010).

De nos jours, plus de 8000 flavonoïdes ont été identifiés. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones constitué de deux unités aromatiques : deux cycles en C₆ (A et B) reliés par un hétérocycle en C₃ (Figure1) (Bruneton 1999 ; Pitta, 2000).

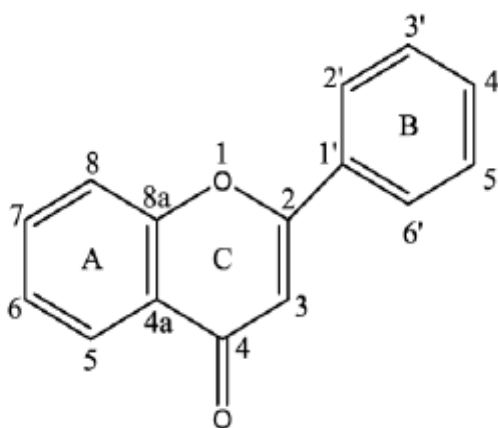


Figure 1. Structure de base des flavonoïdes (Krishna *et al.*, 2001).

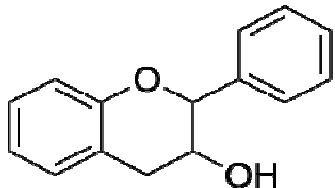
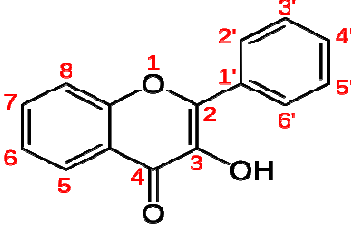
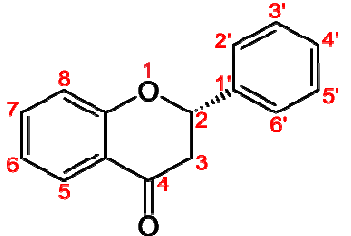
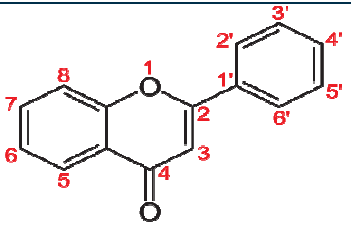
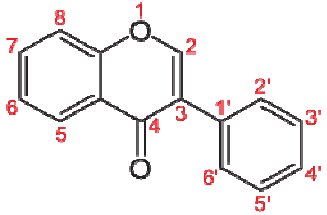
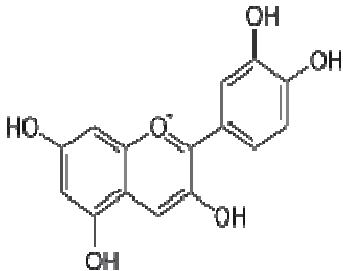
Structuralement les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C (**Pitta, 2000**). quatorze groupes différents ont été identifiés dont six groupes sont particulièrement les plus réponsus et les mieux caractérisés : flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols, anthocyanidines (**Heim et al., 2002 ; Hendrich,2006**).

Les composés de chaque classe se distinguent entre eux par le nombre, la position et la nature des substituants (groupement hydroxyles, et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B (**Heim et al., 2002**).

De façon générale les flavonoïdes se trouvent soit à l'état libre, dans ce cas ils sont dits aglycones soit sous forme glycosides et dans ce cas une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles ils sont liés à des sucres tels que le glucose, l'arabinose, galactose, glucorhamnose, ils peuvent en outre des monomères ou des oligomères (**Dacosta, 2003**). La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone ou génine (**Heim et al., 2002**).

Il est important de noter, que les flavonoïdes sont rencontrés dans les fruits et les légumes, et ils constituent des pigments responsables de colorations jaune, orange et rouge des différents organes végétaux. Les travaux sur les flavonoïdes confirment leurs diverses propriétés antioxydants, vasculoprotectrices.... (**Boussoussa, 2011**). Le tableau 4 regroupé quelques classes des flavonoïdes et leurs propriétés biologiques.

Tableau 4. Quelques classes des flavonoïdes (Bellebcir, 2008).

Classe	Formule	Sources	Propriétés
Flavanols		raisins, Thé, cacao	-Antioxydants naturels. -anticancéreuses.
flavonols		Oignon, pomme, brocoli, fruits rouges	- antihistaminique, anti-inflammatoire et antioxydante.
flavanones		Les Agrumes : orange, citron, pamplemousse, mandarine, orange amère	- neutralisation des radicaux libres. - amélioration de l'absorption de la vitamine C. - la prévention des cancers de la peau.
flavones		oignon, brocoli, pomme	- Anti-inflammatoires. - Anticancéreux.
Isoflavones		Soja	- phytoestrogéniques. - Source de phytoestrogènes.
Anthocyanes		Myrtille, mûre, raisin noir, aubergine, prune...	- la lutte contre le vieillissement cellulaire en améliorant l'élasticité et la densité de la peau. - Présente comme des couleurs brillant dans les fruits et les légumes. - antiseptiques urinaire.

II.2.2.2 Les formes condensées

Ces composés résultant généralement de la condensation de certaines formes simples précédemment évoquées. Selon la nature des constituants impliqués et selon le type de condensation, on obtient des composés plus ou moins complexes (Macheix *et al.*, 2005).

II.2.2.2.1 Les tannins

Les tannins ou tanins sont des polyphénols polaires d'origine végétale existant dans différentes parties de la plante : écorces, bois, feuilles, fruits et racines. Ayant un poids moléculaire (PM) compris entre 500 et 3000 Da (Brunet, 2008).

Les tannins sont des substances qui ont la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible : le cuir (Bruneton, 1999). Cette propriété de tannage provient de la création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène de la peau. Les tannins sont des macromolécules qui se divisent selon leur structure en deux groupes distincts. Les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Harvey et Allan, 1992).

➤ Les tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables (THs) sont des polyesters de glucides et d'acide phénol (Figure 2), ils sont facilement scindés par les enzymes de tannase en ose et en acide phénol (Paris et Hurabielle, 1982).

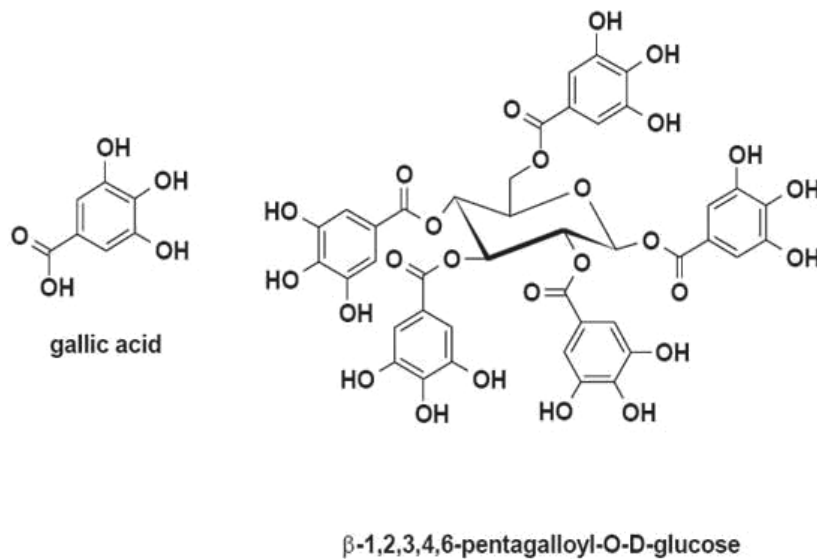


Figure 2. Exemple de tannins hydrolysables Pentagalloylglucose (Brunet, 2008).

➤ Les tannins condensés

Les tannins condensés (TCs) sont des oligomères ou des polymères de flavon-3-ols (éventuellement de flavon-3,4-diols) dérivés de la catéchine ou de ses nombreuses isomères. Sont liées entre elles par des liaisons carbone-carbone (Figure 3). Contrairement aux tanins hydrolysables, ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule, ils sont résistants à l'hydrolyse et seules des attaques chimiques fortes permettant de les dégrader (Macheix *et al.*, 2005 ; Bruneton, 1999).

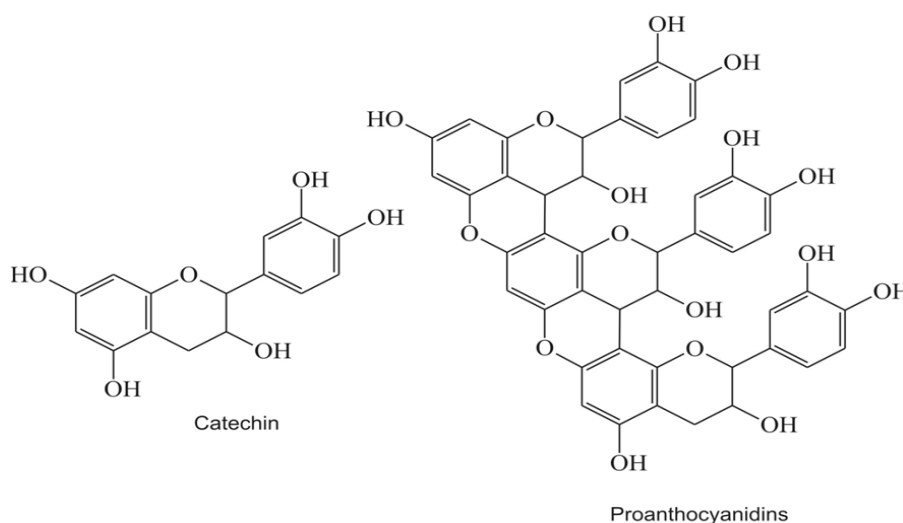


Figure 3. Exemple de tannins condensés (Lucia, 2012).

II.2.2.2 Les lignines

La lignine est un polymère très complexe que l'on retrouve dans toutes les plantes vasculaires, assurant les propriétés de rigidité et d'hydrophobicité des parois des tissus vasculaires. Ce polymère tridimensionnel est synthétisé au niveau de la paroi (Wertz, 2010).

Les lignines résultent de la polymérisation tridimensionnelle de trois molécules phénoliques de bases dénommées monolignols et qui sont les alcools coumarylique, coniférulique et sinapylique, correspondant respectivement aux acides p-coumarique, férulique et sinapique (Macheix *et al.*, 2005).

II.2.3 Biosynthèse des composés phénoliques

II.2.3.1 Voie d'acide shikimique

Les acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont à l'origine de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux, ces acides aminés sont formés à partir des sucres simples issus du métabolisme primaire par la voie de l'acide shikimique. La désamination de la phénylalanine donne naissance au précurseur direct des phénols : l'acide cinnamique. (**Yahiaoui, 2012**).

II.2.3.2 Voie d'acide acétique

Cette voie donne naissance aux flavonoïdes dont le squelette de base a une double origine :

- ✓ Trois molécules d'acétyl COA (cycle A)
- ✓ Une molécule de p-coumaryl COA (cycle B et hétérocycle C)

La condensation de ces unités donne naissance aux flavonoïdes et particulièrement aux pigments anthocyanes et flavonols ou encore certaines monomère de types flavanols dont la polymérisation conduit aux tanins condensés (**Yahiaoui, 2012**).

II.3 Propriétés biologiques des composés phénoliques

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs divers propriétés physiologiques comme les activités antiallergique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, cardioprotective et vasodilatatoire (**Middleton *et al.*, 2000 ; Ksouri *et al.*, 2007**).

Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (**Leong et Shui, 2002**).

D'après les études multiples attestant de l'impact positif de la consommation de polyphénols sur la santé et la prévention des maladies, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou des suppléments alimentaires (**Hennebelle *et al.*, 2004**).

II.3.1 L'activité antioxydant des composés phénoliques

Notre organisme produit en permanence des molécules oxydantes qui sont des formes hautement réactives dérivées de l'oxygène. Ces dernières molécules dont font partie les radicaux libres qui sont très nocives pour l'organisme (**Favier, 2003**).

II.3.1.1 Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomiques ou moléculaires, contenant un ou plusieurs électrons libres non appariés sur leurs couches externes (**Lehucher-Michel et al., 2001**), ces molécules sont très instables et réagies rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (**Martine-Cayuela, 1995**).

Parmi les espèces radicalaires les plus intéressantes se trouvent les espèces réactives de l'oxygène qui sont des radicaux libres qui dérivent de la molécule d'oxygène, par addition d'un électron. les principales espèces réactives de l'oxygène sont: le radical superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxyde d'azote ($ONOO^{\cdot}$), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Jacques et André, 2004 ; Gutteridge, 1993 ; Favier, 2003**).

Dans tous les systèmes vivants, ces espèces sont produites habituellement par voie endogène durant le métabolisme cellulaire (**Kumari et Kakkar, 2008**). Les ERO sont aussi produites dans des circonstances pathologiques intrinsèques telles que le dysfonctionnement de la mitochondrie (**Montagnier, 2009**). Des facteurs exogènes à savoir les polluants environnementaux, les radiations, les solvants organiques, le tabac ainsi que les agents pathogènes sont aussi incriminés dans la production des ERO (Figure 4) (**Ansari, 1997**).

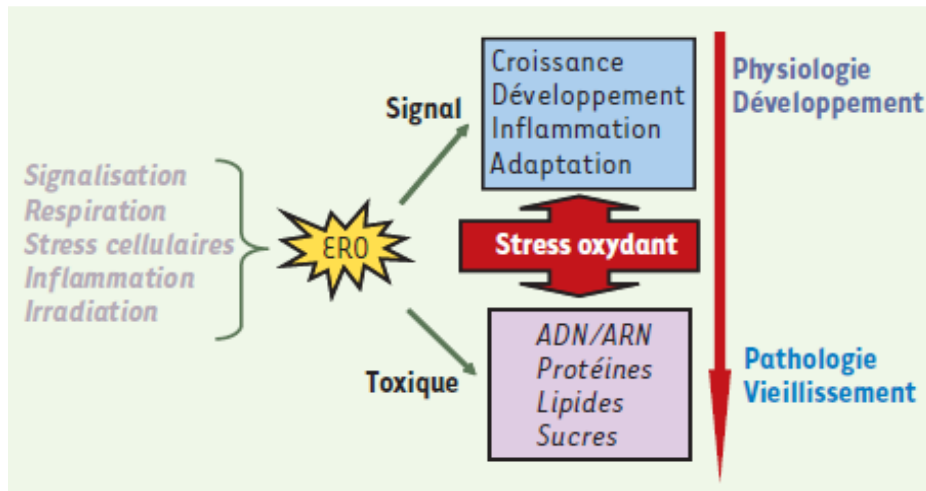


Figure 4. La double vie des ERO (Barouki, 2006).

II.3.1.2 Le stress oxydatif

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines (Favier, 2003).

II.3.1.2.1 Définition du stress oxydatif

Le stress oxydatif est le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (Boyd *et al.*, 2003). Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire (Morel et Barouki, 1999).

Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/ pro-oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux libres, l'excès de ces radicaux est appelé stress oxydant (Favier, 2003).

Le stress oxydant se traduit au niveau des mitochondries par une peroxydation lipidiques, oxydation des protéines, oxydation et des mutations dans l'ADN qui peuvent être à l'origine de la survenue de certains cancers (Boussoussa, 2011).

II.3.1.2.2 Les conséquences moléculaires du stress oxydatif

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines, de lipides et des glucides, mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (**Favier, 2003**). Les principales cibles radicalaires sont:

A) Oxydation de l'ADN

Les radicaux libres peuvent induire des effets mutagènes ou l'arrêt des réplifications de l'ADN. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, ce qui donne naissance à un grand nombre de bases modifiées (**Krippeit-Drews et al., 1994**).

B) Oxydation des protéines

Les structures (primaire, secondaire et tertiaire) et les fonctions des protéines sont aussi altérées par les ERO. Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées (**Ahsan et al., 2003**).

C) Oxydation des lipides

Parmi les cibles les plus susceptibles à l'action des ERO sont les acides gras polyinsaturés comme l'acide linoléique et l'acide arachidonique. L'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir d'une molécule d'acide gras polyinsaturé initie le processus de la peroxydation lipidique. Un atome d'hydrogène est pris d'une deuxième molécule d'acide gras polyinsaturé résultant en un nouveau radical libre (**Ahsan et al., 2003**). Ces radicaux peuvent déclencher une chaîne de réactions de peroxydation au niveau des acides gras des phospholipides membranaires, conduisant à l'altération de la membrane et la perte de l'organisation de sa structure de bicouche lipidique qui est nécessaire à la fonction des enzymes liées et des récepteurs (**Evans, 2000**).

D) Oxydation des glucides

Le glucose peut s'oxyder en présence des ions métalliques conduisant à la libération des cétoaldéhydes, H₂O₂ et OH qui peuvent entraîner la coupure des protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde. Ce phénomène de glycosoxydation est très

important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Favier, 2003).

II.3.1.3 Les antioxydants

II.3 .1.3.1 Définition

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS. L'ensemble de ces molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003).

II.3 .1.3.2 Systèmes de défenses antioxydants

La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (Goudable et Favier, 1997).

A. Systèmes enzymatiques

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes: la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) (Avisar *et al.*, 1989). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Marfak, 2003).

➤ **La superoxyde dismutase**

Les superoxydes dismutases (SODs) sont une classe d'enzymes apparentées qui catalysent la dégradation de l'anion superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante (Favier, 2003).



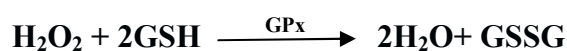
➤ **La catalase**

Présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante (Sorg, 2004).



➤ **Les glutathions peroxydases**

La glutathion peroxydase est une enzyme qui constitue l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection car elle est capable non seulement de détoxifier le peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras (**Ganther, 1999**). La glutathion peroxydase se trouve dans le cytoplasme et dans les mitochondries, elle catalyse la transformation de peroxyde d'hydrogène en deux molécules d'eau. Tandis que les glutathion peroxydases éliminent le H₂O par son utilisation dans l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) et requièrent le sélénium dans leur site actif pour cette activité (**Aruoma, 1999**).



B. Systèmes non enzymatiques

➤ **La vitamine C**

La vitamine C ou acide ascorbique est une molécule hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes. Elle est connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire (**Retsky et al., 1999**). Ses propriétés antioxydantes sont attribuées à sa capacité d'être réduit en radical ascorbyle après la perte d'un électron ou d'un proton (**Valko et al., 2006 ; Van Antwerpen, 2006**).

➤ **La vitamine E**

La vitamine E ou α -tocophérol, est un antioxydant liposoluble, elle se localise entre les chaînes d'acides gras des phospholipides qui constituent les membranes et les lipoprotéines. Le rôle essentiel de la vitamine E est de capter les radicaux peroxydes lipidiques RO₂· qui propagent les chaînes de peroxydation (**Gardès-Albert et al., 2003**).

➤ **Les caroténoïdes**

Les caroténoïdes tels que le β -carotène constituent une vaste famille de composés qui sont généralement des bons capteurs de radicaux hydroxyles et peroxydes ce qui les rend susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique. En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capter l'oxygène singulet, $^1\text{O}_2$, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire (**Gardès-Albert et al., 2003**).

➤ **Les polyphénols**

Plusieurs études épidémiologiques ont montré qu'il y a un rapport inverse entre la prise d'aliments riches en polyphénols (les fruits et les légumes) et le risque des maladies reliées à l'âge comme les maladies neurodégénératives (**Hu, 2003 ; Bubonja-Sonje *et al.*, 2011**). Cette relation est souvent attribuée aux puissantes activités anti-oxydantes des flavonoïdes et d'autres polyphénols associées à leurs propriétés redox permettant d'éliminer les effets d'espèces réactives de l'oxygène (**Ketsawatsakul *et al.*, 2000**).

II.3 .1.3.3 Les antioxydants synthétiques

Les antioxydants synthétiques sont utilisés depuis de nombreuses années. Mais, récemment beaucoup d'études ont porté sur la toxicité élevée des antioxydants synthétiques utilisés dans l'industrie alimentaire, comme, par exemple, le butylhydroxytolène (BHT), l'hydroxyanisole butyle (BHA), le tert-butylhydroquinone (TBHQ) (**Khelfallah , 2013**).

II.3 .1.3.4 Mode d'action des polyphénols

Les composés phénoliques agissent comme donneurs de protons ou d'électrons, comme chélateurs de métaux de transition (**Márquez-García *et al.*, 2009**), et comme inhibiteurs d'enzymes génératrices de radicaux libres et inducteurs de la synthèse d'enzymes antioxydantes (**Hennebelle *et al.*, 2004**). Grâce à leur diversité structurale, les composés phénoliques exercent une activité antioxydante via plusieurs mécanismes et agissent à différents niveaux des réactions radicalaires (**Derbel et Ghedira, 2005**). Cette activité est étroitement liée à leurs propriétés structurales, à savoir le nombre et la position des groupements hydroxyles et le degré de méthylation, de glycosylation et de polymérisation (**Heim *et al.*, 2002**).

Partie expérimentale

Matériels et Méthodes

L'objectif de travail

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Biochimie, département de Biologie université Amar Telidji -Laghouat-, il a pour objectif d'évaluer l'activité anti-oxydante des composés phénoliques de l'espèce *Thapsia garganica* (les feuilles et les graines) par le biais de deux méthodes : la méthode de DPPH[•] et la méthode de FRAP.

Le matériel et les méthodes expérimentales utilisés dans ce travail, sont décrits dans cette partie.

I.1 Présentation de la plante étudiée

I. I.1 Description botanique, répartition géographique

Thapsia garganica (Adrias, bounafaa) est une plante vivace, de la famille des Apiécées (ombellifères), à tige florifère dressée, peu ramifiée, environ de 1,50 m d'hauteur. Elle a des grandes feuilles en touffe, très découpées, pourvues d'un pétiole en gaine à la base. Les feuilles supérieures sont réduites à une gaine large et épaisse, les fruits sont ovales et longs de plus de deux centimètres, et largement ailés. La racine est volumineuse, noirâtre à l'extérieur et blanche à l'intérieur (Figure 5) (**Mohammedi et al., 2014**).

Thapsia garganica est une plante méditerranéenne, abondant surtout dans le Maghreb et en Algérie où il est adapté à la sécheresse et à l'aridité des steppes et des montagnes sahariennes (**Hammiche et al., 2013**).

I. I.2 Classification

La classification complète de *Thapsia garganica* est donnée comme suit (**Hazerchi, 2013**).

Règne : Plantes

Embranchement : Spermatophytes

Sous embranchement : Angiosperme

Classe : Dicotylédones

Ordre : Apiales

Famille : Apiaceae

Genre: *Thapsia*

Espèce: *Thapsia garganica. L*



Source : <http://www.teline.fr>

Figure 5. Photographie de *Thapsia garganica*.

I. I.3 Usages

I. I.3.1 Usages traditionnels

L'écorce de racine trouve encore quelques emplois en médecine traditionnelle maghrébine, pour traiter la stérilité féminine, les douleurs rhumatismales, les entorses et surtout, pour les maladies pulmonaires graves (**Hammiche et al. 2013**).

Les racines et les graines de *Thapsia garganica* sont utilisées en médecine traditionnelle en Europe et dans certains pays arabes de la côte méditerranéenne : des onguents sont ainsi préparés dans le but de soulager des rhumatismes ou certains maux pulmonaires (**Macé, 2012**).

En médecine populaire algérienne, l'usage de cette plante toxique est réservé aux traitements externes, généralement sous forme de décoction aqueuse ou de macération huileuse de racine, en applications locales contre les douleurs rhumatismales, ou quelquefois sur le thorax pour traiter les bronchites (**Khacheba, 2008**).

On l'utilise aussi, mélangé à la farine du son, contre les morsures d'animaux (**Bellakhdar, 1997**).

I.I.3.2 Usages thérapeutiques

L'étude des constituants chimiques principaux à l'origine de la propriété thérapeutique de *Thapsia garganica* a conduit l'équipe danoise de Christensen à l'isolement en 1978 de deux molécules : la thapsigargine et la thapsigargicine, leur activité libératrice d'histamine a ensuite été démontrée, ce qui expliquait les réactions inflammatoires observées sur la peau (**Macé, 2012**).

La complexité structurale des thapsigargines (extraite des racines et des feuilles) et leurs activités biologiques cytotoxiques, ainsi que d'autres pro-drogues issu de celle-ci sont actuellement en cour d'étude pour la lutte contre le cancer. L'une des pro-drogues (G-202) est particulièrement active contre le cancer avancé de la prostate (**Macé, 2012**).

I.2 Extraction des composés phénoliques

I.2.1 Récolte et séchage

Les feuilles de l'espèce *Thapsia garganica* ont été récoltées en février 2016 dans la région de Tadjmout (Laghout) et les graines ont été récoltées l'année passée. Les feuilles et les graines de la plante sont ensuite séchées, broyées et conservées dans des sacs en papier à l'abri de la lumière et l'humidité jusqu'aux analyses ultérieures (Figure 6).



Figure 6. La poudre obtenue après le broyage du matériel végétal.

I.2.2 Préparation des extraits bruts

➤ Macération par l'hexane (dépigmentation)

Une quantité de 5 g des feuilles et des graines broyées est macérée dans 50 ml de l'hexane pendant 48 heures (2 macérations successives, en renouvelant le solvant chaque 24 heures) à température ambiante et à l'obscurité afin d'éliminer toutes traces de composés apolaires (pigments, lipides). Les mélanges sont ensuite filtrés.

➤ Macération par le méthanol

La phase résiduelle obtenue après la filtration de chaque extrait est macérée dans 100 ml de méthanol pendant 48 heures (2 macérations successives) à l'obscurité et à température ambiante. Après filtration, les solutions méthanoliques des feuilles et des graines (Figure 7) ont été évaporées à sec dans un rotavapeur à 45°C. Les résidus secs sont repris par le méthanol et conservés jusqu'au déroulement de l'analyse (Figure 8).



Figure 7. Les extraits méthanoliques.



Figure 8. Les résidus secs solubilisés dans le méthanol.

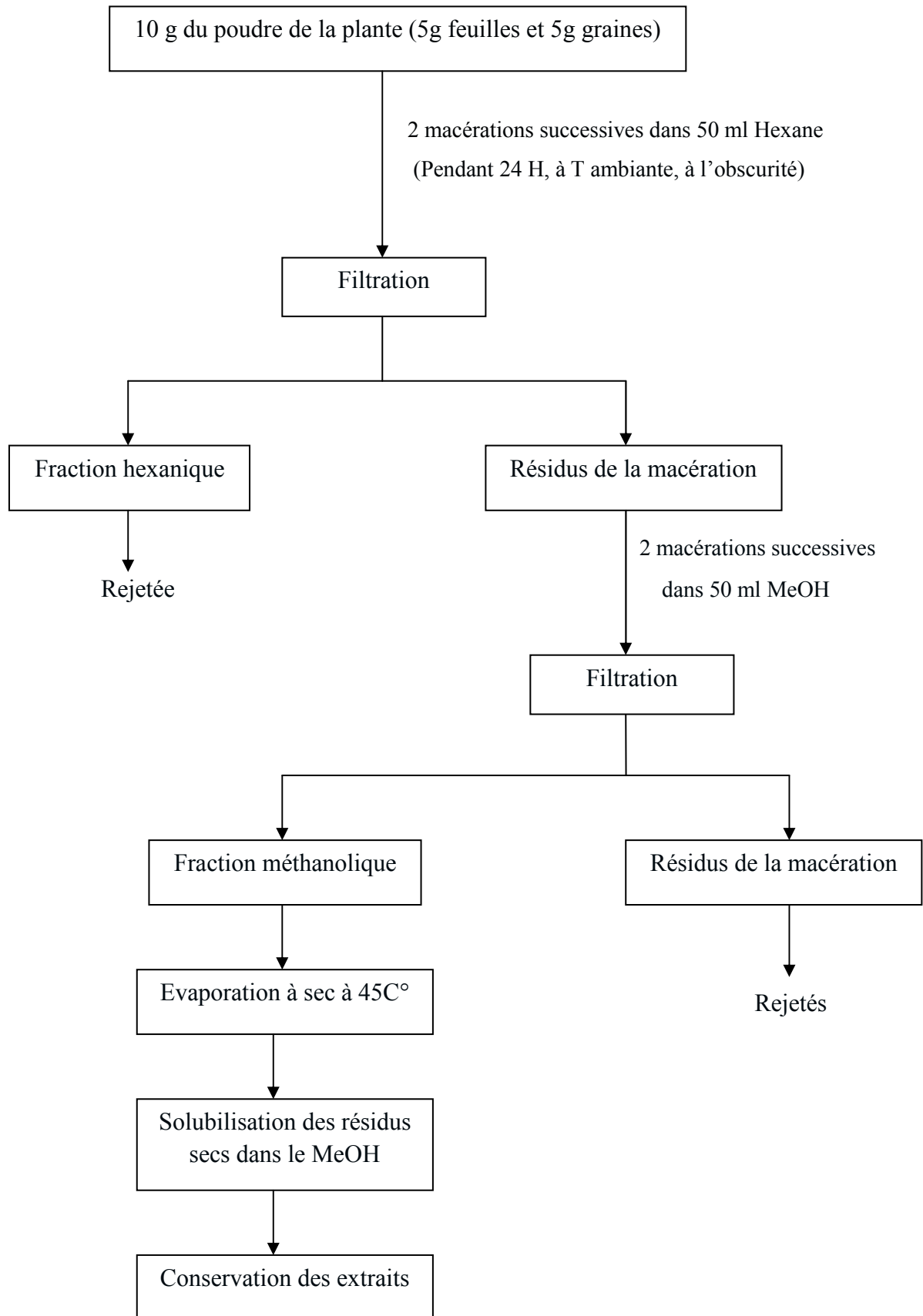


Figure 9. Protocole d'extraction des composés phénoliques.

I.2.3 Calcul du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction (%) est calculé en appliquant la formule suivante :

$$R(\%) = (m/m_0) \times 100$$

R (%) : Rendement exprimé en %.

m :masse de l'extrait sec résultant exprimé en (g).

m₀ :masse du matériel végétal exprimé en (g).

I.3 Dosage des quelques des métabolites secondaires

I.3.1 Dosage des phénols totaux

I.3.1.1 Principe de la méthode

En pratique, plusieurs méthodes sont appliquées pour estimer la teneur en phénols totaux, mais aucune n'est apte seule de détecter tous les composés phénoliques. Parmi elles, la méthode de Folin-Ciocalteu est utilisée depuis environ un siècle pour doser la quantité des phénols dans les plantes (**Vermerris et Nicholson, 2006**).

Le principe est basé sur la réduction du réactif Folin-Ciocalteu de couleur jaune, qui est un mélange de l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et l'acide phosphomolybdique ($H_3PM_{12}O_{40}$), par les groupements hydroxyles des polyphénols, en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). Pour cette méthode spectrophotométrique, il faut établir une courbe d'étalonnage qui relie les absorbances aux différentes concentrations, comme celle de l'acide gallique ou chlorogénique. Les concentrations en composés phénoliques sont alors rapportées en équivalent d'acide gallique ou chlorogénique respectivement (**Vermerris et Nicholson, 2006**).

Pour estimer la teneur en phénols totaux dans nos extraits, nous avons utilisé cette méthode, suivant le protocole décrit par Slinkard et Singleton (1977). Le phénol standard utilisé dans cette méthode est l'acide gallique dont la formule chimique est présentée dans la figure 10.

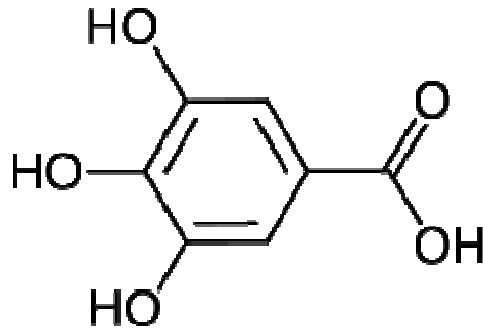


Figure 10. Structure de l'acide gallique.

I.3.1.2 Protocole expérimental

Pour la réalisation de la courbe d'étalonnage, différentes concentrations de l'acide gallique allant de 0,1 à 1 g/L ont été préparées. Par la suite, 40µl de chaque solution préparée et 3,16 ml d'eau distillée sont ajoutés à 200 µl de réactif Folin-Ciocalteu, après 3 min d'incubation, 600 µl de la solution Na₂CO₃ (20%) est ajouté (favoriser un milieu alcalin pour déclencher la réaction d'oxydoréduction), la solution finale est incubée pendant 30 min à 40°C. La lecture d'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 765 nm contre le blanc 40 µl MeOH (même solution sans la solution de l'acide gallique).

L'analyse quantitative des phénols totaux des extraits phénoliques (Feuilles et graines) a été réalisée par la même procédure (même protocole sauf que l'acide gallique est remplacé par l'extrait dilué).

Les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme du poids sec de la plante en poudre en appliquant la formule suivante :

$$C = (c \times V) / m \quad (\text{Debbab, 2015})$$

C : La teneur en phénols totaux (mg d'acide gallique/ g de matière sèche).

c : La concentration de l'acide gallique établie à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

V : Volume de l'extrait.

m : Le poids de la matière sèche (g).

I.3.2 Dosage des flavonoïdes

I.3.2.1 Principe de la méthode

Le contenu en flavonoïdes a été déterminé en adaptant le procédé modifié, décrit par Djeridane *et al* (2006). Cette méthode utilise le trichlorure d'aluminium (AlCl_3) qui interagit spécifiquement avec les flavonoïdes en donnant une couleur jaune foncée. L'intensité de la coloration est évaluée par spectrophotomètre à $\lambda = 420 \text{ nm}$. De même que le dosage des phénols totaux, le dosage des flavonoïdes nécessite aussi l'établissement d'une courbe d'étalonnage d'un flavonoïde standard. Le flavonoïde standard utilisé dans cette méthode est la quercétine dont la formule chimique est représentée dans la figure 11.

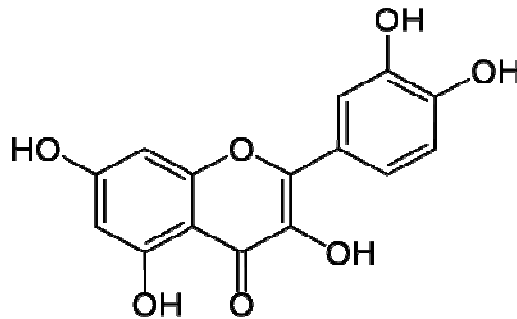


Figure 11. Structure de la quercétine.

I.3.2.2 Protocole expérimental

A partir de la solution mère de la quercétine préparée dans le méthanol de concentration massique 0,5 g/l, on prépare des solutions filles de concentration différentes variant entre 0,01 g/l et 0,05 g/l. On met un volume de 20 μl de chaque solution préparée de la quercétine ou de l'extrait dilué lors de la quantification des flavonoïdes, 30 μl de MeOH, 1ml d' AlCl_3 (2%) et 0,95 ml d'eau distillée, le tout est incubé pendant une heure à l'obscurité. La lecture d'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 420 nm contre le blanc 20 μl MeOH. A partir des valeurs des absorbances obtenue, nous avons tracé la courbe d'étalonnage de la quercétine.

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits est exprimée en milligramme équivalents de quercétine par gramme du poids de la matière sèche (mg EQ/g).

I.3.3 Dosage des chlorophylles et des caroténoïdes

La teneur en chlorophylle totale et les caroténoïdes totaux ont été déterminées selon le procédé de Peksel *et al.* (2010). 10 mg d'extrait des plantes a été dissous dans 10 ml d'eau distillée. On mesure l'absorbance de l'échantillon à 450, 645 et 663 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

La chlorophylle totale et la teneur en caroténoïdes totaux ont été calculés à l'aide des équations suivantes :

$$\text{Chlorophylle a } (\mu\text{g/ml}) = 12,7 A_{663} - 2,69 A_{645}$$

$$\text{Chlorophylle b } (\mu\text{g/ml}) = 22,9 A_{645} - 4,68 A_{663}$$

$$\text{Total chlorophylle } (\mu\text{g/ml}) = 20,2 A_{645} + 8,02 A_{663}$$

$$\text{Total caroténoïde } (\mu\text{g/ml}) = 4,07 A_{450} - [(0,0435 \times \text{chlorophylle a}) + (0,367 \text{Chlorophylle b})].$$

I.4 Evaluation de l'activité antioxydante

I.4.1 Méthode de piégeage du radical libre DDPH

I.4.1.1 Principe de la méthode

Le DDPH[•] (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires (donneur d'hydrogène), le radical DPPH[•] est réduit et change de couleur en virant au jaune (Figure 12) (Lim, 2015).



Figure 12. Réduction du radical libre DPPH[•] (Molyneux, 2004).

I.4.1.2 Protocole expérimental

Un volume de 1 ml de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations ou de standard utilisé sont ajoutés à 1ml de la solution méthanolique du DDPH[•] (1mM) fraîchement préparée. Après incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance des échantillons est lue à l'aide d'un spectrophotomètre calibré par le méthanol à 517 nm.

Le pourcentage d'inhibition du radical libre DDPH[•] est calculé à partir de la relation suivante :

$$I\% = \left(\frac{Ac - Ae}{Ac} \right) \times 100$$

I (%) : pouvoir d'inhibition en %.

A_c: absorbance de la solution de DPPH en absence de l'extrait (contrôle).

A_e: absorbance de la solution de DPPH en présence de l'extrait (échantillon testé).

Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur EC₅₀ qui est la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH (**Samarthet al., 2008**), les résultats sont exprimés par rapport à un standard comme l'acide ascorbique, Trolox et BHA (**Molyneux, 2004**).

I.4.2 Méthode de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

I.4.2.1 Principe de la méthode

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) présent dans la complexe K₃Fe(CN)₆ en fer ferreux (Fe²⁺). En effet le Fe³⁺ participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à λ = 750 nm (en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu vert). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Berker et al, 2007**).

I.4.2.2 Protocole expérimental

400 µl de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 1 ml de l'acide chlorhydrique HCl (1M) et 200 µl de SDS (1%) et 300 µl d'une solution de ferricyanaure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ (1%), l'ensemble est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 minutes puis refroidi à température ambiante, 200 µl d'une solution de chlorure ferrique $FeCl_3$ (0,1%) est ajouté au mélange réactionnel. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 750 nm contre un blanc (MeOH) (**Berker *et al.*, 2007**).

Résultats et Discussions

II.1 Rendement d'extraction

L'extraction est une étape très importante pour l'isolement et l'identification des principes actifs à haute valeur ajoutée à partir de la matière végétale, notamment le cas des polyphénols, qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêt grâce à leur activités biologiques diverses en particulier leur propriétés antioxydante. Beaucoup d'études ont souligné l'influence de différentes conditions physico-chimique sur les rendements d'extraction des composés phénoliques d'origine végétale, tels que le temps et la température d'extraction, le pH, la méthode d'extraction, la composition chimique des échantillons et la polarité du solvant (**Debbab, 2015**). Pour qu'une extraction soit optimale et efficace, il est convenu de respecter plusieurs facteurs.

L'extraction des composés phénoliques par deux macération successive du poudre des feuilles et des graines de la plante étudiée (*Thapsia garganica*) dans le méthanol, nous a permet de déterminé le rendement de leurs extraits bruts.

L'aspect, la couleur ainsi que le rendement de chaque extrait par rapport au poids sec de plante, et la masse, sont représentés dans le tableau ci-dessous (tableau 5).

Tableau 5. Aspect, couleur, la masse et le rendement d'extraction de chaque extrait.

Extrait	La masse de résidu sec (g)	Aspect et couleur de résidu sec	R (%)
Feuilles	0.47	Pâte visqueuse, Verte foncée	9.4
Graines	0.38	Pâte visqueuse, Marron claire	7.6

Nous constatons que l'extrait brut des feuilles enregistre un rendement élevé de l'ordre de 9.4% suivi par l'extrait des graines à raison de 7.6 %. Cette différence pourrait être due principalement à la richesse ou la pauvreté de la plante en composés solubles dans le solvant utilisé (MeOH) ou bien à la taille des particules de la poudre végétale (**Vermerris et Nicholson, 2006**). Ainsi que la composition chimique d'une partie à l'autre est diffère dans les plantes.

II.2 Résultats de dosage des quelques métabolites secondaires

II.2 .1 Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes

Afin de caractériser les extraits préparés à partir de la plante étudiée, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydants des plantes leur sont attribués.

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait est déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu (Slinkard et Singleton 1977) à partir de la courbe d'étalonnage, exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par un gramme de la matière végétale sèche (Figure 13). Le dosage des flavonoïdes à été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (Djeridane *et al* 2006) en utilisant comme standard la quercétine, la quantification des flavonoïdes à été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage et les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de quercétine par un gramme de la matière végétale sèche (Figure 14).

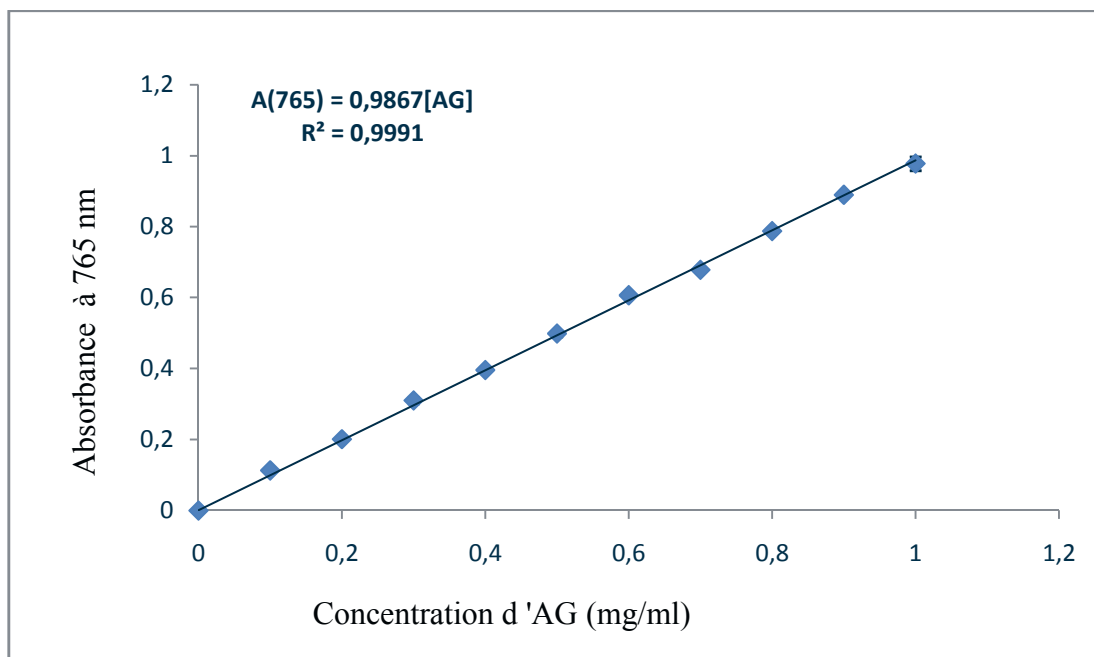


Figure 13. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (mg/ml).

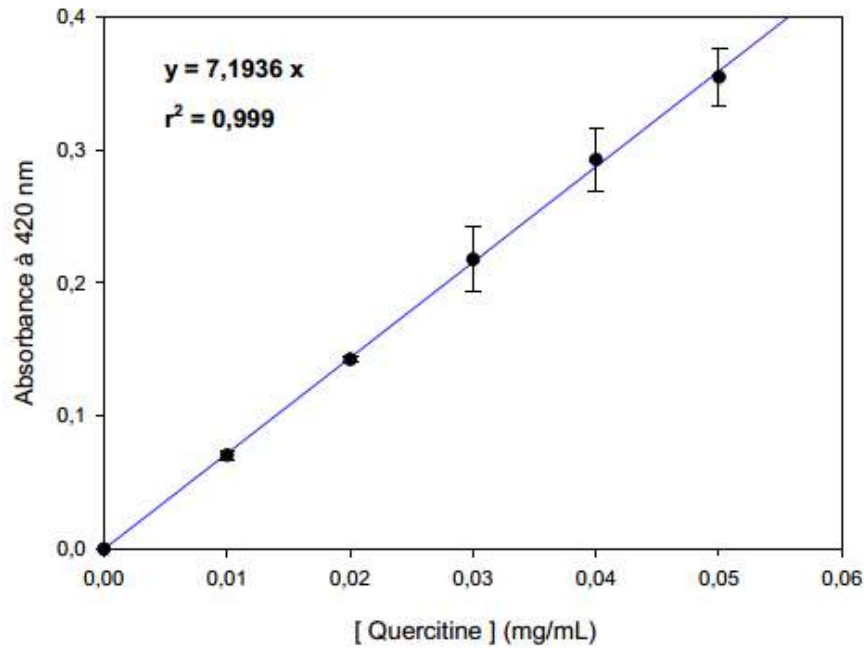


Figure 14. Courbe d'étalonnage de la quercétine (mg/ml).

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6. Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes des extraits de la plante.

	Gaines	Feuilles
Polyphénol Totaux (mg EAG/g résidus sec)	34,035 ± 0,22	67,295± 0,09
Flavonoïdes (mg EQ/g résidus sec)	03,253 ± 0,50	04,574 ± 0,24

Dans les deux parties de la plante étudiée, nous avons remarqué une variabilité des teneurs en polyphénols et flavonoïdes, la partie avec les teneurs les plus hautes est celle des feuilles de l'ordre de 67,295± 0,09 mg EAG/g résidus sec et 04,574 ± 0,24 mg EQ/g résidus sec des polyphénols et flavonoïdes suivi par les graines avec des teneurs de 34,035 ± 0,22 mg EAG/g résidus sec et 03,253 ± 0,50 mg EQ/g résidus sec.

Cette différence pourrait être due principalement à la différence de composition chimique de chaque partie de la plante et la répartition inégale des polyphénols dans différentes partie des plantes.

II.2 .2 Résultats de dosage des chlorophylles et des caroténoïdes

Les résultats de teneur en chlorophylles et caroténoïdes sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 7. La teneur de chlorophylle et caroténoïdes pour les deux extraits de plante étudiée.

	Gaines	Feuilles
Chlorophylles (a) (µg/mL)	0,234 ± 0,03	2,457 ± 0,03
Chlorophylles (b) (µg/mL)	0,177 ± 0,05	1,220 ± 0,04
Chlorophylles total (µg/mL)	0,411 ± 0,08	3,676 ± 0,01
Caroténoïdes totaux (µg/mL)	0,299 ± 0,03	0,683 ± 0,01

Les résultats de la quantification des chlorophylles et des caroténoïdes varient d’une partie à une autre de la plante. L’extrait des feuilles enregistre un teneur élevé de l’ordre de 3,676 ± 0,01 µg/ml (chlorophylles total) et 0,683 ± 0,01 µg/ml (caroténoïdes totaux) suivi par l’extrait des graines à raison de 0,411 ± 0,08 µg/ml (chlorophylles total) et 0,299 ± 0,03 µg/ml (caroténoïdes totaux). La richesse des feuilles par les chlorophylles et les caroténoïdes par rapport les graines pourrait être dues principalement à la fonction des feuilles (la photosynthèse).

La comparaison entre les polyphénols totaux, flavonoïdes, Chlorophylles et les caroténoïdes des extraits phénoliques sont présentés dans la figure 15.

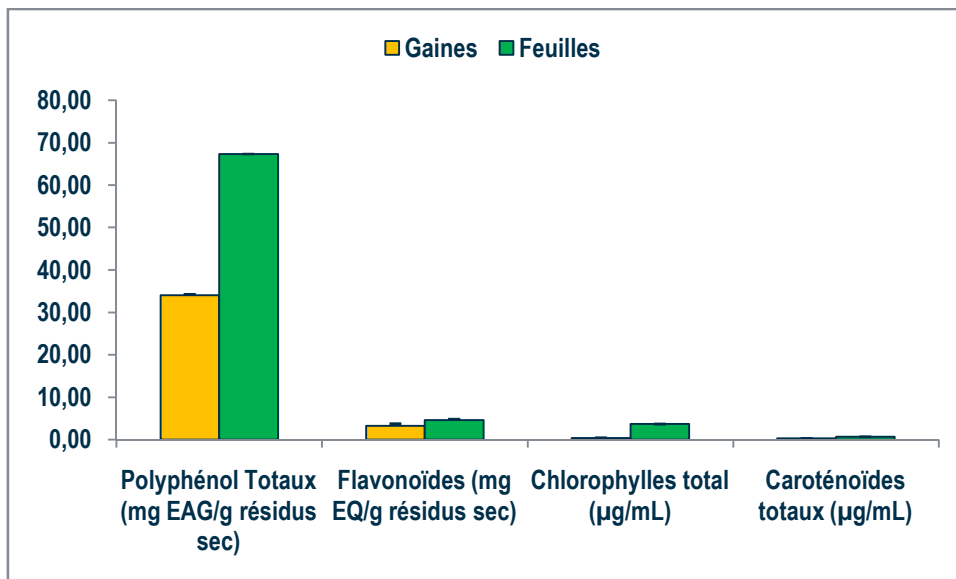


figure 15. Comparaison entre les teneures des composes dosés.

A partir la figure 15, on remarque toujours que l'extrait méthanolique de feuilles présent les teneurs les plus élevés en molécules bioactif.

A travers cette étude et a partir les résultats enregistrés, on peut dire que la plante *Thapsia garganica* est une plante très riche par des molécules bioactifs qui possèdent des propriétés biologiques très intéressent.

II.3 Résultats d'évaluation de l'activité antioxydante

II.3. 1 Résultats du pouvoir antioxydant « test DPPH' »

L'activité antiradicalaire des extraits et des antioxydants standards vis-à-vis du radical DPPH' a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à 517 nm en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) (Figure 16). Le test de DPPH est une méthode fréquemment employée pour évaluer le potentiel antioxydant de différents composés naturels vue sa rapidité, sa fiabilité et son faible coût (Senthilkumar *et al.*, 2012).



Figure 16. Résultat de réduction du radical libre DPPH' en présence des extraits.

Les mesures de densités optiques de deux extraits à différentes dilutions nous permettent de tracer les courbes qui figurant la variation du pourcentage d'inhibition % en fonction de la concentration de chaque extrait phénolique $I\% = f(C)$ et de déterminer les valeurs des EC_{50} . Les résultats sont représentés dans la figure 17.

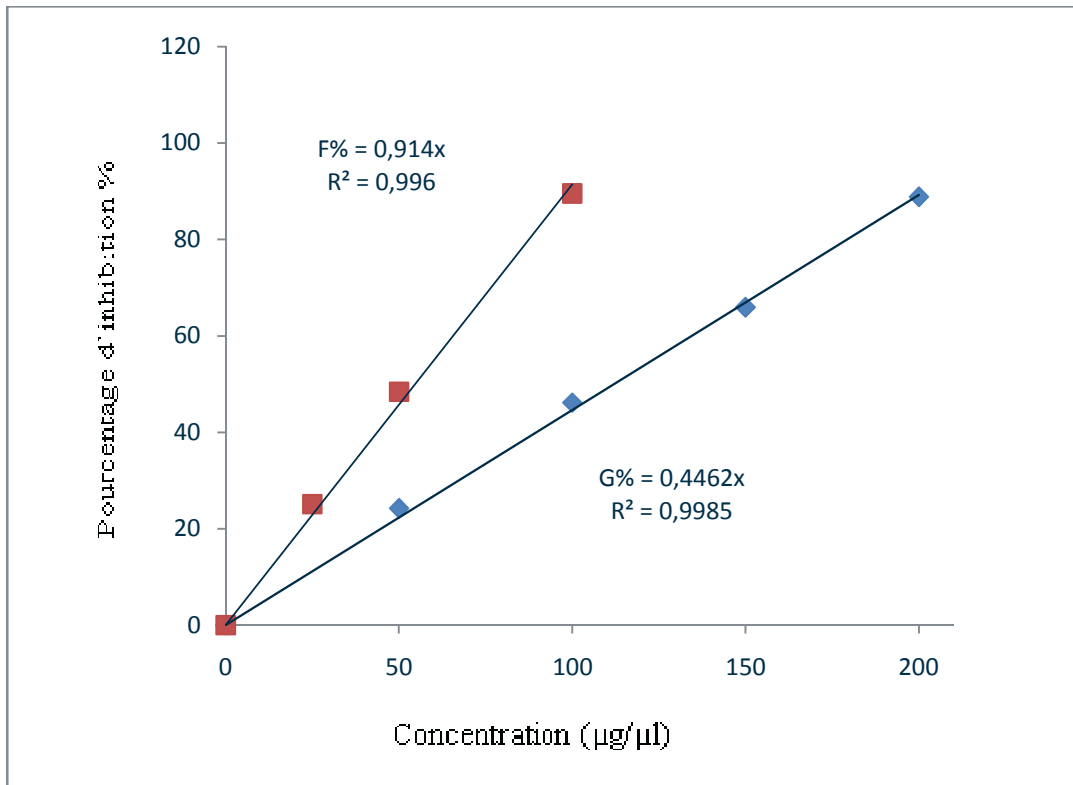


Figure 17. Courbes représentes le pourcentage d'inhibition de DDPH en fonction des concentrations des extraits phénoliques.

D'après la figure 17, les deux extraits sont capables de piéger le radical libre DPPH^{*} de manière concentration-dépendante. On constate que le taux d'inhibition du DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait des feuilles ou des graines.

Puisque la valeur d' EC_{50} présente la concentration d'inhibition nécessaire pour réduire 50% des radicaux libres et qui est inversement proportionnelle à l'activité antioxydante, nous avons déterminé les valeurs des EC_{50} de chaque extrait phénolique/ standards à partir des représentations graphiques $I\% = f(c)$ (Figure 17 et Figure 18 respectivement).

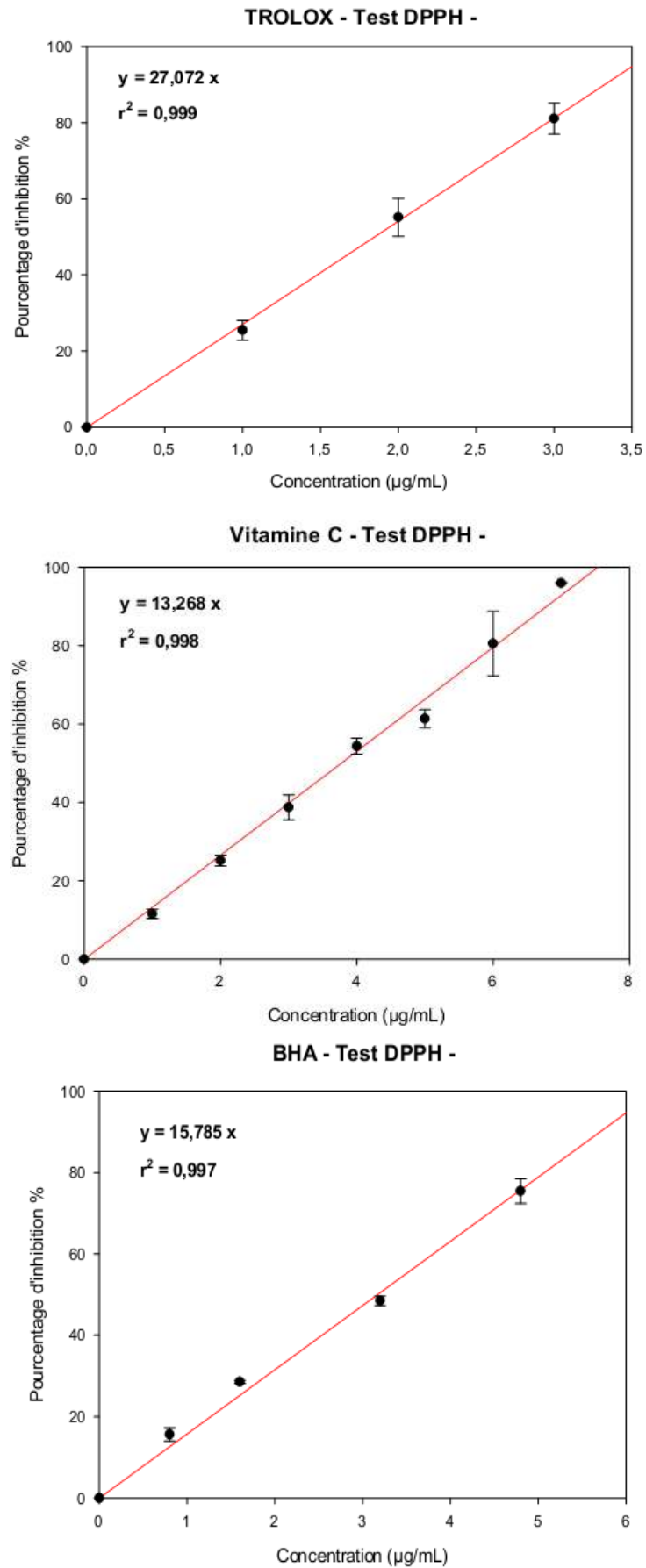


Figure 18. Pouvoir antioxydant de Trolox, Vitamine C et BHA par le test DDPH.

Les valeurs déterminées d'EC₅₀ en (µg/ml) de chaque extrait du test de piégeage du radical libre DPPH[•] et des standards utilisés (antioxydants de référence), sont regroupés dans le tableau 8.

Tableau 8. Les valeurs de l'EC₅₀ (µg/ml) de chaque solution testé par le DPPH[•].

Valeur de l'EC ₅₀ (µg/ml)	
Extraits	
Feuilles	55,42 ± 0,09
Graines	111,24 ± 0,41
Standards	
Trolox	1,85 ± 0,12
BHA	3,17 ± 0,13
Vitamine C	3,77 ± 0,17

Selon les résultats enregistrés (tableau8), Nous observons une importante activité antiradicalaire chez l'extrait des feuilles qui se traduit par de faible valeur d'EC₅₀ (55,42 ± 0,09) suivi par l'extrait des graines qui enregistré la grande valeur d'EC₅₀ (111,24 ± 0,41). Donc on peu dire que l'extrait méthanolique des feuilles, réduit fortement le radical DPPH[•] par rapport à l'extrait des graines.

Il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, tocophérol, flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH[•] en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (**Bougandoura et Bendimerad , 2012**). Les polyphénols contenus dans les extraits de *Thapsia garganica* sont probablement responsables de l'activité antioxydante.

Selon Popovici (2009), plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, type de solvant, pH) et le profil phénolique en particulier (**Debbab, 2015**).

Afin de comparer l'activité antioxydante par piégeage du radical libre DPPH[•] de nos extraits phénoliques avec celle de quelques antioxydants de référence (Trolox, Vitamine C, BHA). Nous avons groupés les valeurs des EC₅₀ dans l'histogramme présenté dans la figure 18.

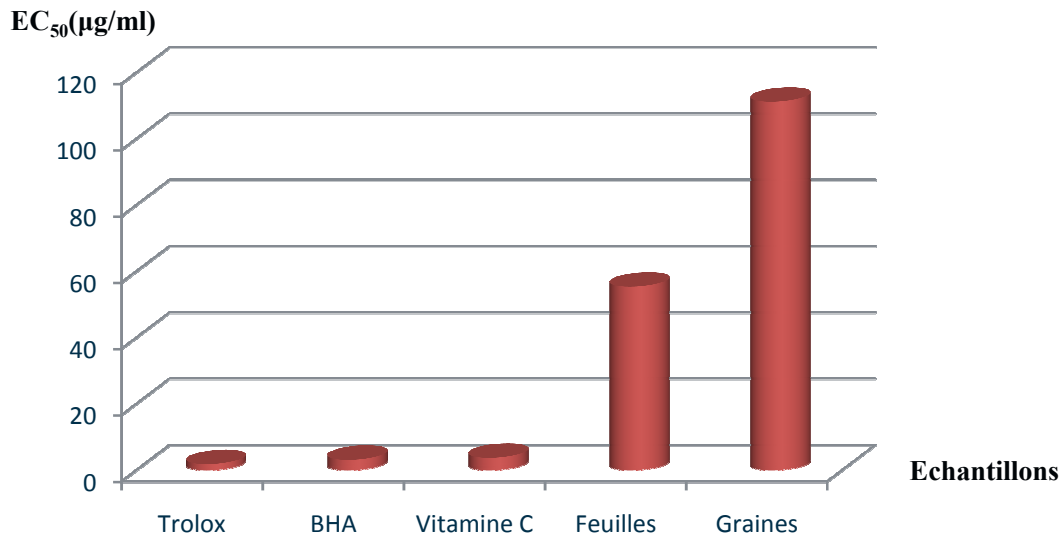


Figure 19. Classement croissant des valeurs d'EC₅₀ (Extraits et standards).

En comparant les valeurs des EC₅₀ d'extrait testé des deux parties de *Thapsia garganica* par rapport à celle des antioxydants standards (Vitamine C, Trolox, BHA), nous remarquons que l'activité antiradicalaire de nos extraits est inférieure (EC₅₀ élevé) à la capacité du piégeage du radical DPPH[•] des substances de référence (EC₅₀ faible) et le Trolox représente l'antioxydant le plus fort.

II.3. 2 Résultat du test de la réduction du fer « FRAP »

L'activité antioxydante des extraits méthanolique de *Thapsia garganica* a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible (Bougandoura et Bendimerad , 2012).

Le pouvoir réducteur d'un extrait, qui peut servir comme réflexion de son activité antioxydante, a été déterminée en utilisant le test de réduction de fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺) , par lequel la couleur jaune de la solution d'essai change en couleur bleu-vert en présence des antioxydants dans l'échantillon (Figure 20), ceci selon la puissance réductrice de l'échantillon.



Figure 20. Réduction du fer ferrique en fer ferreux en présence des antioxydants.

La mesure de l'absorbance a été faite par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 750 nm. Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonction des différentes concentrations utilisées (Figure 20). Le Trolox, ont été utilisé comme standard. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées (Berker *et al*, 2007).

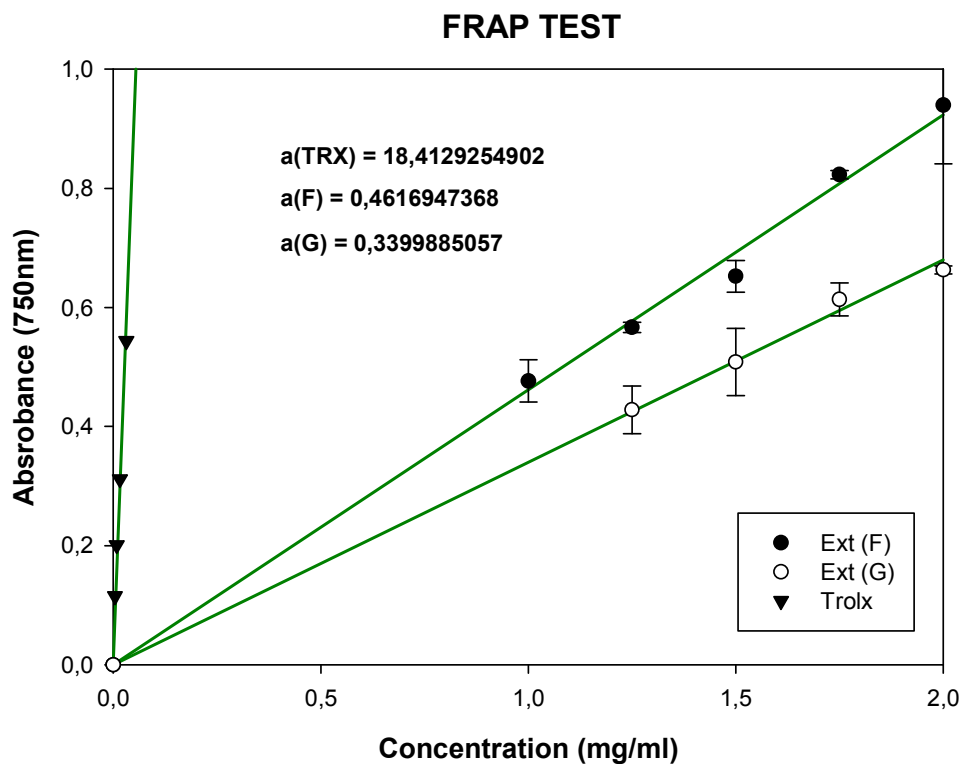


Figure 21. Pouvoir antioxydante de Trolox, extraits phénoliques, par le test FRAP.

On remarque que la capacité de réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons.

Les valeurs de TEAC (Trolox Equivalent Antioydan Capacity) ont été déterminées pour nos extraits à partir des représentations graphiques (Figure 21). Les valeurs des TEAC sont regroupées dans le tableau 9.

Tableau 9. Les valeurs de TEAC du test FRAP des extraits de la plante.

Extrait	FRAP Test (mg de Trx/g de résidu sec)
Feuilles	25,06 ± 0,75
Graines	18,46± 0,29

Les résultats obtenus montrent que la capacité de nos extraits à réduire le fer ferrique inférieure à celle de la référence (Trolox) pour l'extrait phénolique de deux parties de la plante (feuilles et graines). Cette réduction est plus ou moins variable entre les deux parties. Donc on peut dire que la plante présente d'activité antioxydante nettement inférieure que celle de la référence.

Discussions

Le pouvoir réducteur des différents extraits peut être dû à leur capacité à donner des électrons. Le pouvoir réducteur peut être attribué principalement aux composés bioactifs associés à l'activité antioxydante tels que les composés phénoliques totaux, les flavonoïdes et autres antioxydants hydrophiles et hydrophobes qui sont de bons donneurs d'électrons et peuvent terminer la chaîne de réaction de radicaux libres par conversion des radicaux libres en produits plus stables (**Yen et al., 2008**).

Une étude récente menée par Alghazeer *et al.*, (2012) sur l'activité antioxydante de plusieurs espèces de plantes médicinales de la Lybie, l'espèce *Thapsia garganica* a été révélée un taux de polyphénols et de flavonoïdes de 28,53 mg EAG/g et 13,35mg ER/g respectivement, avec une activité antioxydante (EC₅₀) de 50 µg/ml. L'auteur suggère que cette activité antioxydante est liée à la quantité des composés phénoliques totaux de la plante.

Les polyphénols sont des antioxydants les plus abondants dans le régime humain et sont des constituants répandus de fruits et de boissons, comme le thé, le café (**Landete, 2012**). Ils représentent plusieurs classes, comme les acides phénoliques, les proanthocyanidines et des flavonoïdes (**Beecher, 2003**). Les études épidémiologiques, cliniques et animales confirment le rôle des polyphénols dans la prévention de diverses maladies chroniques, y compris les maladies cardiovasculaires, les maladies inflammatoires et métaboliques, maladies neurodégénératives et certains cancers (**Middleton et al., 2000 ; Mitjavila et Moreno, 2012**).

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques, ce qui nous amène à la conservation de la biodiversité végétale locale.

De nos jours, dans le monde l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source de substances et de composés naturels bioactif et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires.

Notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières.

Cette richesse commence à être investiguée dans beaucoup de projets de recherche. Dans ce présent travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'extrait phénolique de deux parties feuilles et graines de l'espèce *Thapsia garganica* afin d'évaluer leurs propriétés antioxydantes. Ces dernières, ont fait l'objectif d'une étude détaillée, commençant par l'extraction et dosage des composés phénoliques ainsi que l'évaluation de leurs effets anti-radicalaire (anti-DDPH, test FRAP).

L'extraction des composés phénoliques a été faite sur une poudre fine de deux parties de la plante étudiée en utilisant le méthanol comme solvant extracteur. Les rendements de cette étape montrent que l'extrait phénolique des feuilles a un rendement moyennement important en comparaison avec les graines (Feuilles 9.4%, Graines 7.6 %).

Quantitativement, l'évaluation du contenu des polyphénols totaux de deux extraits en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu révèle la présence des quantités importantes en polyphénols. De même nous avons dosé les flavonoïdes par la méthode d' $AlCl_3$ qui nous mène à conclure que cette plante contient une quantité acceptable de flavonoïdes. Il ressort de ces analyses que les feuilles sont riches en composés phénoliques et en flavonoïdes par rapport aux graines.

Le potentiel anti-radicalaire des extraits a été déterminé par la méthode de réduction du radical libre DPPH[•] dont les résultats montrent que ces extraits possèdent une activité anti-radicalaire. Ceci s'explique par la présence des composés phénoliques dans cette plante qui sont considérées comme des agents antioxydants de première classe et peuvent être

employées pour des applications thérapeutiques, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace à la prévention des maladies telles que le cancer, et les maladies cardiovasculaires.

Au cours de cette étude nous avons réalisé également le test de FRAP en suivant la réduction du fer ferrique en fer ferreux en présence des antioxydants. Nous avons constaté, que les extraits phénoliques de la plante étudiée ont la capacité de réduire le fer. Cette capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des antioxydants. La pouvoir réducteur peut être donc attribué principalement aux composés bioactifs associés à l'activité antioxydante existant dans la plante.

A la lumière des résultats obtenus, les extraits phénoliques de la plante étudiée *Thapsia garganica* sera de bonnes sources de molécules bioactive à caractère anti-radicalaire. Et cet effet, cette étude mérite d'être approfondie en proposant comme perspectives de :

- Déterminer la structure des substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être une alternatif des médicaments synthétiques.
- Appliquer des méthodes d'évaluation d'autres activités biologiques (activité anti-inflammatoire, antimicrobienne, anticancéreuse.... etc.
- Vérifier les propriétés biologiques de cette plante in vivo, pour obtenir une vue globale sur les propriétés thérapeutiques de la plante *Thapsia garganica*.

Références bibliographiques

1. **Ahsan H, Ali A and Ali R (2003).** Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical and Experimental Immunology*, (131). P 398-404.
2. **Alghazeer, R. , El-Saltani, H. , Saleh, N. , Al-Najjar, A. and Hebail, F. (2012)** Antioxidant and antimicrobial properties of five medicinal Libyan plants extracts. *Natural Science* (4). P 324-335.
3. **Ansari K N (1997).** The free radicals-the hidden culprits-an update. *Indian Journal of Medical Sciences* (51). P 319-336.
4. **Aruoma O I (1999).** Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. (1). P 53-63.
5. **Avatoa P., Francesco P. F., et Rositoa, I. (2001)** .The Genus *Thapsia* as a Source of Petroselinic Acid. *Hereditas*. Vol 36, p 845-850.
6. **Avenel M. (2015).** Allergie de contact et phytothérapie. *Revue française d'allergologie*. P 150-152.
7. **Avissar N., Whitin J C., and Allen P Z. (1989).** Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* **2**: 15850-15855.
8. **Barouki R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/Science* (22). P 266-272.
9. **Beecher G.R. (2003).** Overview of dietary flavonoid nomenclature occurrence and intake. *Journal of nutrition*, 133 (10): 3248-3254.
10. **Beers H M., Fletcher J A., Jones V T., Porter R ., Berkwits M ., Kaplan L J. (2007).** Larousse. L'encyclopédie Médicale. Le Manuel Merk. Les éditions Larousse. Paris. P 1870.
11. **Belguidoum M. (2012).** Une approche phytochimique pour différencier deux espèces de genre *Zygophyllum*.
12. **Bellaakhdar J. (1997).** La pharmacopée marocaine Médecine arabe ancienne et savoirs populaire.s. .Saint-Etienne. P 764.
13. **Bellebcir L. (2008).** Etude des composés phénoliques en tant Que marqueurs de biodiversité chez les céréales. En vue de l'obtention du Diplôme de Magister. P 119.
14. **Benarous K. (2014).**étude de l'activité antioxydante et de l'activité inhibitrice des extraits de *Pegunum harmala*, *Inonotus hispidus*, *Marrubium vulgare*, *Ziziphus lotus* et *Achillea santotina* sur la lipase de *candida rugosa*. Thèse de doctorat, L'école normale supérieure de Kouba-Alger.

15. **Bentabet N., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K. (2014).** Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *PharmacognosiePhytothérapie* © Springer-Verlag France. P 1-8.
16. **Berker K. I., Guclu K., Tor I., et Apak R. (2007).** Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72(3). P 1157-1165.
17. **Berrin Y., Ali O., Umut S., Meltem E., Murat B., Barut Y. (2006).** Multi-organ toxicity following ingestion of mixed herbal preparations :unusual but dangerous adverse effect of phytotherapy. *European Journal of Internet Medicine* (17). P 230-132.
18. **Berthet O. (2014).** Y a-t-il une place pour la phytothérapie dans la prévention des maladies cardiovasculaires ?. *Sciences pharmaceutiques* .P 44-45.
19. **Berthod A., Billardello B., Geoffroy. (1999).** Polyphenols in countercurrent chromatography. An example of large scale separationl. *Analusis*. EDF Sciences, Wiley-VCH (27). P 750-757.
20. **Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., Mc Analley B. (2003).** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *Glyco science et Nutrition*. 4(6). P 7.
21. **Bougandoura N. Bendimerad N. (2012).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp.Nepeta (L.) Briq.*
22. **Bouhamide A., Bounoua H (2012).** Thèse d'ingénieur d'état en biologie. Université Amar Telidji –Laghouat. P1-6.
23. **Bourgaud F ., Gravot A., Milesi S., Gontier E .(2001).** *Plant Science*. Vol 161. P 839-851.
24. **Boussoussa H. (2011).** Activité antioxydante et antimicrobienne des extraits phénoliques des fleurs de *Rhanterium adpressus*. Thèse de Magister en biologie. Université Amar Telidji –Laghouat. P 7-33.
25. **Brunneton J (1999).** Flavonoïdes. In : *Pharmacognosie, Phytochimie: Plantes médicinales*. 3^{ème} édition. Technique et Documentation Paris. P 227-673.

26. **Bubonja-Sonje M., Giacometti J and Abram M (2011).** Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, 127, 1821-1827.
27. **Cheriet T. (2011).** Recherche et détermination structurale des métabolites secondaire de linaria atlantica Boiss et Reut. Thèse de Magister en chimie organique. Université Mentouri Constantine. P 39.
28. **Cowan M. (1999).** Plant products as Anitimicrobial Agents, *Clin. Microbiol Re*, 12(4). P 564-582.
29. **Cseke J L., Kirakosyan A., Kaufman P B., Warber S., Dume J A., Brielmann H L. (2006).** Natural products from plants. Taylor et francis group 2nd ed. New York. P551.
30. **Dacosta Y. (2003).** Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. 317p. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).
31. **Debbab S. (2015).** Etude phytochimique et biologique des différentes extraits d'Alpinia officinarum. Mémoire de Master en Biologie. Université Amar Téliidji – Laghouat .P 33.
32. **Decaux I. (2002).** Phytothérapie : Mode d'emploi: Le bien public.
33. **Derbel S. et Ghedira K. (2005).** Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*, 1 : P 28-34.
34. **Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., et Capasso F. (1999).** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life. Sci.* **65 (4):** 53-337.
35. **Elbeyrouthy M., Arnold N, Delelis-dusollier N., et Dupony F. (2008).** Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon, *Journal of ethnopharmacology*. 120:P 315-334.
36. **Elqaj M., Ahami A., et Belghyti D.(2007).** La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Paperpresentedat the journée scientifique «ressources naturelles et antibiotique ».Maroc.
37. **Evans W J (2000).** Vitamin E, vitamin C and exercise. *American Journal of Clinical Nutrition.* (72). P 647-652.
38. **Favier A. (2003).** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. P 110-113.

39. **Fragoso R L., Reyes-Esparaza J., Burchielb S., Herrera-Ruiza D.,Torrese E. (2008).** Risks and Benifits of commonly used herbal médecines in México. *Toxicol Appl pharmacol.*277(1) P125-135.
40. **Ganther H E. (1999).** Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxinreductase. *Carcinogenesis.*20 (19): P 1657- 1666.
41. **Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z et Jore D (2003).** Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'actualité chimique. P 91-96.
42. **Goudable, J ., Favier A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme.* (11). P 20-115.
43. **Guignard J L., Cosson L., Henry M. (1985).** Abrégé de phytochimie. Masson.
44. **Gutteridge J M. (1993).** Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. *Free Radic. Res. Commun.* (19). P 141-158.
45. **Hammiche V. Merad R. Azzouz M. (2013).** Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. Springer Paris Berlin Heidelberg New York © Springer-Verlag France, Paris. P 285-287.
46. **Hamza N. (2011).** Effets préventif te curatif de trois plantes médicinales utilisées dans la wilaya de Constantine pour le traitement du diabète de type 2 expérimental induit par le régime higt fat chez la souris C57BL/6J.
47. **Harborne J B. (1997).** Recent advances in chemical ecology. *Nat Prod Rep* (14).P 83-98.
48. **Harrar A. (2012).** Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Thèse de Magistère en Biochimie et physiologie expérimentale. Université Ferhat Abbas -Sétif. P 7-9.
49. **Heim E K. Tagliaferro A R. Bobilya D J. (2002).** Flavonoid antioxidants : chemistry , metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* (13). P 572-584.
50. **Hendrich A B. (2006).** Flavonoid-membrane interactions : possible consequence for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta pharmacologica Sinica* (27) .P 27-40.
51. **Hennebelle T., Sahpaz S., et Bailleul F. (2004) .** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: P 3-6.

- 52. Hordé P. (2016).** Plantes médicinales –définition.
- 53. Hu F B (2003).** Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *American Journal of Clinical Nutrition*, **78**. P 544-551.
- 54. Hurabielle M., and Eberle J. (1982).** Flavonoids of *Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*. *Planta Med.* **46** (2):124–125.
- 55. Iserin P., Masson M., Restellini J P., Ybert E De Laage de Meux A., Moulard F., Botrel A. (2001).** Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins (Larousse Ed.): Larousse.
- 56. Jacques B, and André R. (2004).** Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. P : 217-225.
- 57. Kasperek M., al-Janabi S. (2008).** Plantes médicinales, La diversité biologique au service de la santé. *Deutsch Gesellschaft für Technische Zusammenarbit.* P 146-149.
- 58. Ketsawatsakul U., Whiteman M and Halliwell B (2000).** A reevaluation of the peroxy-nitrite scavenging activity of some dietary phenolics. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **279**. P 692-699.
- 59. Khacheba I. (2008).** Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur l'alpha-amylase. Thèse d'Ingénieur d'Etat en Biologie. Université Amar Télidji – Laghouat .P 32.
- 60. Khelfallah A. (2013).** Etude comparative du contenu phénolique et du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales et des céréales alimentaires. Thèse Magistère en Biologie appliquée. Université Constantine 1.
- 61. Kraft K. (2009).** Complementary / Alternative Médecine in the context of prevention of disease and maintenance of health. *Preventive Medicine* (49). P 88-92.
- 62. Krief S. (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal. Thèse doctorat muséum national d'histoire naturelle. P 32.
- 63. Krippeit-Drews P., Lang F., Haussinger D. and Drews G. (1994).** H₂O₂ induced hyperpolarization of pancreatic B-cells. *Pflugers Arch.* (**426**). P 552-554.
- 64. Krishna D. Chaluvadi M. Raj N. Sripal R. (2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol* (33). P 2-16.

65. **Ksouri R., Megdiche W., Debez A., Falleh H., Grignon C., Abdelly C. (2007).** Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant. Physiol Bioch*, (45). P 244-249.
66. **Kumari A. Kakkar P (2008).** Screening of antioxidant potential of selected barks of Indian medicinal plants by multiple in vitro assays. *Biomedical and environmental sciences* (21).P 24-29.
67. **Landete, J.M. (2012).** Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **52**, 936–948.
68. **Lee Y J., Erdos G., Hou Z., Kim S H., Kim J H., Cho J M., Corry P M. (1994).** Mechanism of quercetin-induced suppression and delay of heat shock gene expression and thermotolerance development in HT-29 cells. *Molecular and cellular biochemistry*. (137).P 141-154.
69. **Lehucher-Michel M P., Lesgards J F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M. (2001).** Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. 30: 1076-1081.
70. **Lim S., Choi J., Park H. (2015)** .Antioxidant activities of fucoidan degraded by gamma irradiation and acidic hydrolysis. *Radiation Physics and Chemistry* 1. 09 : P 23-26.
71. **Leong. LP., Shui. G. (2002).** An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem*, (76). P 69-75.
72. **Lugasi A., Hovari J., Sagi K., and Biro L. (2003).** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *J.Acta.biologica. szegediensis.* **47 (1-4):**119-125. (Cited in Mohammedi Z, 2005).
73. **Lutge U., Kluge M., Bauer G. (2002).** Botanique 3ème Ed : Technique et documentation. Lavoisier .Paris. 211p.
74. **Lysette Bossoki I P. (2003).** Etude des activités biologiques de lam (Rutaceae) .Thèse université Bamamo. P 128.
75. **Macé F. (2012).** Approche efficace des thapsigargines (guaianolides) et synthèse d'azulènes rouges via un intermédiaire commun de type bicyclo [5.3.0]décane. Thèse doctoral en chimie organique. Université de Grenoble Français. P 9-15.
76. **Malek B, Habib M., Mssada K., Ben Jannet H., Aouni M., et Boulbaba S. (2015).** Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of roots extracts from the Tunisian *Scabiosa arenaria* Forssk, *Industrial Crops and Products*. P62-69.

77. **Marfak A. (2003).** Thèse de doctorat Radiolyse Gamma des flavonoïdes ; Etude de leur réactivité avec des radicaux issus des alcools. P: 6-10.
78. **Márquez-García B., Fernández M.Á. et Córdoba F. (2009).** Phenolics composition in Erica sp. differentially exposed to metal pollution in the Iberian Southwestern Pyritic Belt. *Bioresource Technology*, 100: P 446-451.
79. **Martinez-Cayuela M. (1995).** Oxygen free radicals and human disease. *Biochem.*77: P 147- 161.
80. **Maurice N. (1997).** L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXI^e siècle. Ed. Lavoisier. Paris. P 12-14.
81. **Meziti A. (2012).** Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa*. L'Étude in vitro et in vivo. Thèse de Magister en biologie. Université El-Haj Lakhdar - Batna.P1.
82. **Mohammedi D. Mohammedi S. Keek G. (2014).** Principales intoxications végétales chez les ruminants en zone méditerranéenne. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 67 (4). Algérie. P 17-163.
83. **Molyneux P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxydant activity of the flavonoids from *Anaphalis sinica* Hance form; songklanakarin J. Sci, Technol, 26. P 211-219.
84. **Montagnier L (2009).** Oxidative stress in preventive medicine. *Free Radical Research (43)*. P 27-97.
85. **Middleton E.J., Kandaswami C., Theoharides T.C. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer *Pharmacol. Rev.*, 52. P 673–751.
86. **Mitjavila M.T. et Moreno J.J. (2012).** The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases. *Biochem. Pharmacol.*,84 : 1113-1122
87. **Mitra S. (2003).** Sample preparation Techniques in Analytical chemistry. John Wiley et Sons edition Hoboken. New Jersey. P 162-458.
88. **O'Kennedy R., Thornes R D. (1997).** Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action. John Wiley and Sons Inc. New York. N.Y.Origine des pharmacopées traditionnelles et élaboration des pharmacopées savantes. P 293-318.
89. **Paris M et Hurabielle. (1981).** Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie. Tome 1. Ed Masson. Paris. P 102-107.

90. **Pietta P G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*. **63**: 1035-1042.
91. **Prochazkova D., Bousova I., Wilhelmova N. (2011).** Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* (82): P 513-523.
92. **Retsky K ., Chen J Zeind et Frei B (1999).** Inhibition of copper-induced LDL Loxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. *Free Radical Biology and Medicine* 26 (1-2). P 90-98.
93. **Rolland Y. (2004).** Antioxydants naturels végétaux. *OCL*, 11. P 419-424.
- Samarth R., Panwar M., Soni A., Kumar M., et Kumar A. (2008).** Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant Extract *Food Chemistry*, 106. P 868-873.
- Sarni-Manchado P., Cheynier V (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec & Doc, Paris. P 2-10.
94. **Seghiri R. (2007).** Thèse de Doctorat. Université Mentour – Constantine.
95. **Senthilkumar P., et Sudha S. (2012).** Antioxidant and antibacterial properties of methanolic extract of green seaweed *Chaetomorpha* from Gulf of Manner : Southeast coast of India. *Jundishapur J Microbiol.* 5: P 411-415.
96. **Shaohua Z ., Ananda S., Ruxia Y., Liang R., Xiaorui C., Liang L. (2006).** Fatal renal failure due to the chinese herb “Guan Mu Tong” (*Aristolochia manshuriensis*): Autopsy finding and review of literature. *Forensic Science International*.
97. **Smalle E. P.M ., Catling P.M. (2000).** Les cultures médicinales canadiennes. Les presses scientifiques du CNRC. P 281.
98. **Sorg O. (2004).** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus aaaBiologies.* (327). P 649-662.
99. **Strang C. (2006).** Larousse médical. Paris : larousse. P 2.
100. **Tsao R., et Deng Z. 2004,** Separation procedure for naturally occurring antioxydant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*(812). P 85-99.
101. **Valko M., Rhodes C J., Moncol J., Izakovic M., Mazur, M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol Interact*, 160. P 1–40.
102. **Van Antwerpen P. (2006).** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myeloperoxydase /

- peroxyde d'hydrogène /chlorure. Thèse de doctorat en Sciences Pharmaceutiques, Académie universitaire Wallonie-Bruxelles.
- 103. Vermerris W., Nicholson R. (2006).** Phenolic compound biochemistry . Springer. The Netherlands.
- 104. Wargovich M., Woods C., Hollis D., Zander M. (2001).** Herbals, Cancer prevention and Health, The Journal of nutrition.131, p. 3034 -3036.
- 105. Wertz J L . (2010).** La Lignine. Document ValBiom – Gembloux AgroBio Tech. P 5.
- 106. Yahiaoui N. (2012).** Etude de l'adsorption des composés phénoliques des margines d'olive sur carbonate de calcium, hydroxyapatite et charbon actif. Thèse de Magistère en chimie. Université Mouloud Mammeri –Tizi ouzou.
- 107. Yaltirak T., Aslim B., Ozturkb S ., Alli (2011).** Antimicrobial and antioxidant activities of russuladelica Fr. Food and Chemical Toxicology. P 2052-2056.
- 108. Yen Y., Shih C., et Chang C.(2008),** Effect of adding ascorbic acid and glucose on the antioxidative properties during storage of dried carrot. Food Chemistry (107). P 265-272.

Site Web :

1. dico-sciences-animales.cirad.fr.
2. Biodiversité végétale du sud-ouest marocain Xavier Bassières
<http://www.teline.fr> .