

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
جامعة عمار تليدجي بالأغواط  
UNIVERSITÉ AMAR TELIDJI LAGHOUAT  
كلية العلوم  
FACULTE DES SCIENCES  
قسم البيولوجيا  
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE



## Mémoire

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

*Filière : Sciences Biologiques*

*Option : Biochimie Appliquée*

### THEME

---

**Contribution à l'étude de l'activité antioxydante des  
extraits polaires de la plante *Atractylis humilis***

---

Présenté par :

- M.KHIATI Hichem

**Devant le jury composé de :**

M. SIFI Ibrahim	MCA (Université Amar Téliidji, Laghouat)	Président
M. BOUKEROUIS Djoudi	MAA (Université Amar Téliidji, Laghouat)	Examineur
Mlle. ZAKHROUF Zohra	MAA (Université Amar Téliidji, Laghouat)	Promotrice

**Soutenu publiquement le : 04 /07/2022**

## Résumé

Cette étude porte sur la valorisation des plantes médicinales utilisée dans notre région. Nous avons étudié les teneurs en polyphénols et flavonoïdes ainsi l'activité antioxydante des différentes fractions des extraits hydroacétonique et hydrométhanoïque des racines de *Atractylis humilis* en utilisant les solvants suivants : dichlorométhane et acétate d'éthyle. On a remarqué des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes très variables entre les différentes fractions, dont la fraction d'acétate d'éthyle de système acétone-eau possède la plus haute teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes avec des valeurs de (12.84mg EAG/g extrait sec) et (6.1633mg EQ/g extrait sec) respectivement. L'activité antioxydante des différentes fractions des extraits d'*Atractylis humilis* a été évaluée par deux méthodes : piégeage de radical libre DPPH, piégeage du radical-cationique ABTS. Pour le test de DPPH et le test ABTS, la capacité antioxydante la plus élevée a été observée dans la fraction acétate d'éthyle de système d'extraction acétone-eau avec des valeurs de VCEAC 0.132 et 0.260 g de l'extrait / g de vit C respectivement

**Mots clés :** DPPH, ABTS, activité antioxydante, *Atractylis humilis*

## Abstract

This study focuses on the evaluation of medicinal plants used in our region. We studied the contents of polyphenols and flavonoids as well as the antioxidant activity of the different fractions of the hydroacetone and hydromethanoic extracts of the roots of *Atractylis humilis* using the following solvents: dichloromethane and ethyl acetate. Of which the fraction of ethyl acetate of the acetone-water system has the highest content of total polyphenols and flavonoids with values of (12.84mg EAG/g dry extract) and (6.1633mg EQ/g dry extract) respectively. The antioxidant activity of different fractions of the extracts of *Atractylis humilis* was evaluated by two methods: DPPH free radical trapping, ABTS duradical-cationic trapping. For DPPH test and ABTS test, the highest antioxidant capacity was observed in the ethyl acetate fraction of acetone-water extraction system with VCEAC values 0.132 and 0.260 g of extract/g of vit C respectively

**Key words:** DPPH, ABTS, antioxidant activity, *Atractylis humilis*.

## ملخص

تركز هذه الدراسة على تقييم النباتات الطبية المستخدمة في منطقتنا. درسنا محتويات البوليفينول الفلافونويد بالإضافة إلى النشاط المضاد للأكسدة لأجزاء مختلفة من مستخلصات الهيدروأسيون والهيدروميثانويك لجذور *Atractylis humilis* باستخدام المذيبات التالية: *dichlorométhane* و *éthyle acétate*. يتم تقييم النشاط المضاد للأكسدة في المستخلصات بتقنيتين و *ABTS*. لوحظ أن محتويات البوليفينول الكلي والفلافونويد تختلف اختلافاً كبيراً بين المستخلصات المختلفة، والتي يحتوي جزء منها أسيتات الإيثيل في نظام الأسيتون المائي على أعلى محتوى من إجمالي البوليفينول الفلافونويد بـ (12.84 ملجم / g). (*EAG* مستخلص جاف) و (6.1633 mg EQ *Atractylis humilis* بطريقتين. بالنسبة لاختبار *DPPH* واختبار *ABTS*، لوحظت أعلى قدرة مضادة للأكسدة في جزء أسيتات الإيثيل في نظام استخلاص الماء الأسيتون *VCEAC* بـ 0.132 و 0.26 جم من مستخلص / جم فيتامين C على التوالي

الكلمات المفتاحية: *Atractylis humilis* , مضادات الاكسدة *ABTS*, *DPPH*

## **Dédicace**

*A ma chère Mère*

*A mon Père*

*Dont le mérite, Les sacrifices et les qualités humaines*

*M'ont permis de vivre ce jour*

*A mes Frère et mes sœurs*

*A toute ma famille, et mes amis*

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour*

*que ce projet*

*Soit possible, Je vous dis merci.*

*Hichem*

# *Remerciement*

EN TOUT PREMIER LIEU, NOUS REMERCIONS LE BON DIEU, TOUT PUISSANT, DE NOUS AVOIR DONNÉES LA FORCE POUR SURVIVRE, AINSI QUE L'AUDACE POUR DÉPASSER TOUTES LES DIFFICULTÉS.

NOUS TENONS À REMERCIER SINCÈREMENT NOTRE ENCADREUR **MELLE ZAKHROUF ZOHRA** POUR SA DISPONIBILITÉ, SON AIDE, SES CONSEILS ET SES ORIENTATIONS. NOUS LA REMERCIONS VIVEMENT POUR LE CHOIX DU SUJET QUI EST ORIGINAL ET INTÉRESSANT.

NOS REMERCIEMENTS VONT AUX MEMBRES DU JURY POUR L'INTÉRÊT QU'ILS ONT BIEN VOULU PORTER À NOTRE TRAVAIL. NOUS REMERCIONS PARTICULIÈREMENT **SIFI IBRAHIM** POUR L'HONNEUR QU'ELLE NOUS FAIT EN ACCEPTANT DE PRÉSIDER LE JURY DE NOTRE MÉMOIRE. NOUS REMERCIONS ÉGALEMENT **BOUKEROUIS DJOUDI** POUR AVOIR ACCEPTÉ D'EXAMINER NOTRE TRAVAIL.

NOUS REMERCIONS ÉGALEMENT LES MEMBRES DU LABORATOIRE DE RECHERCHE ET SON DIRECTEUR **M. YOUSFI MOHAMED** POUR L'AIDE QU'ILS NOUS ONT APPORTÉ EN METTANT À NOTRE DISPOSITION LES MOYENS DE LEUR LABORATOIRE ; CE QUI NOUS A PERMIS DE RÉALISER LA PARTIE PRATIQUE DE NOTRE TRAVAIL DANS DE BONNES CONDITIONS.

ENFIN, NOUS REMERCIONS TOUS CEUX QUI ONT CONTRIBUÉ DE PRÈS OU DE LOIN À LA RÉALISATION DE CE MODESTE TRAVAIL.

# Table de matière

ملخص

RESUME

ABSTRACT

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION .....	1
<b>Chapitre I : La plante étudiée</b>	
<b>1 La plante étudiée .....</b>	<b>5</b>
1.1 Les Asteraceae .....	5
1.2 le genre <i>Atractylis</i> .....	5
1.3 L'espèce <i>Atractylis humilis</i> .....	6
1.3.1 Rappel botanique .....	6
1.3.2 Utilisation et propriété .....	7
<b>2 Le stress oxydant .....</b>	<b>7</b>
2.1 Définition .....	7
2.2 Les radicaux libres .....	8
2.3 Rôle des radicaux libres dans la physiologie cellulaire .....	9
2.3.1 Rôle dans la phagocytose .....	9
2.3.2 Rôle dans la communication cellulaire .....	10
<b>3 Les cibles des radicaux libres .....</b>	<b>11</b>
3.1 Les glucides .....	12
3.2 Les protéines .....	12
3.3 Les lipides .....	12
3.4 L'ADN .....	13

<b>4</b>	<b>Les systèmes antioxydants .....</b>	<b>13</b>
	<b>4.1 Les différentes localisations cellulaires des antioxydants .....</b>	<b>13</b>
	<b>4.2 Origines de l'antioxydant .....</b>	<b>14</b>
	<b>4.3 Modes d'action des antioxydants dans l'organisme .....</b>	<b>15</b>
<b>5</b>	<b>Les compose phénolique .....</b>	<b>16</b>
	<b>5.1 Les formes simples .....</b>	<b>17</b>
	<b>5.1.1 Acide hydroxy-benzoïque .....</b>	<b>17</b>
	<b>5.1.2 Acide hydroxy-cinnamique .....</b>	<b>18</b>
	<b>5.1.3 Les flavonoïdes .....</b>	<b>19</b>
	<b>5.2 Les formes complexes (condensé) .....</b>	<b>21</b>
	<b>5.2.1 Les tannins .....</b>	<b>21</b>
	<b>5.2.2 Les lignines .....</b>	<b>22</b>
<b>6</b>	<b>Activités biologiques des flavonoïdes .....</b>	<b>22</b>
	<b>6.1 Activité antioxydants .....</b>	<b>22</b>
	<b>6.2 Activité antimicrobienne .....</b>	<b>23</b>
	<b>6.3 Activité anti-inflammatoire .....</b>	<b>23</b>

## **Chapitre II : Matériel et Méthodes**

<b>1</b>	<b>Objectif .....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>Matériel utilisé .....</b>	<b>25</b>
	<b>2.1 Matériel et produits chimiques .....</b>	<b>25</b>
	<b>2.2 Matériel végétal .....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>Méthode d'extraction des composés phénolique .....</b>	<b>26</b>
	<b>3.1 Extraction par macération .....</b>	<b>26</b>
	<b>3.2 Extraction liquide / liquide .....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>Calcule de rendement d'extraction .....</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>Dosages des métabolites secondaires .....</b>	<b>29</b>
	<b>5.1 Dosage des polyphénols totaux .....</b>	<b>29</b>

5.2	Dosage des flavonoïdes .....	30
6	Evaluation de l'activité antioxydant .....	30
6.1	Méthode de piégeage de radical libre DPPH .....	30
6.2	Méthode de piégeage de radical ABTS•+ .....	31

### Chapitre III : Résultats et Discussion

1	Résultats du rendement d'extraction.....	34
2	Résultats de dosage des métabolites secondaires.....	36
2.1	Résultats du dosage des composés phénoliques .....	36
2.2	Résultat du dosage des flavonoïdes .....	38
3	Résultats de l'activité antioxydant.....	40
3.1	Résultats de l'activité antioxydante par Test DPPH .....	42
3.2	Résultats de l'activité antioxydante par Test ABTS .....	42

## Liste des Tableaux

**Tableau 1 :** Les principaux radicaux libres

**Tableau 2 :** Les types de protection antioxydant de l'organisme

**Tableau 3 :** Principaux modes d'action de quelques antioxydants

**Tableau 4 :** Les principales classes de composés phénoliques

**Tableau 5 :** Les différentes classes des flavonoïdes d'après

**Tableau 6 :** Les appareils et produits chimiques utilisés

**Tableau 7 :** représenté les rendements de chaque fraction

**Tableau 8 :** La teneur en polyphénols totaux (mg AG/g) de différentes fractions

**Tableau 9 :** La teneur en flavonoïdes (mg AG/g) de différentes fractions

**Tableau 10 :** Equivalent de l'extrait (g) pour 1 g de vitamine C le test DPPH

**Tableau 11 :** Equivalent de l'extrait (g) pour 1 g de vitamine C le test ABTS

## Liste des figures

- Figure 1 :** Images de l'espèce *Atractylis humilis*
- Figure 2 :** Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant
- Figure 3 :** Production de radicaux libres lors de la phagocytose d'une bactérie
- Figure 4 :** Rôle des radicaux libres dans la communication cellulaire
- Figure 5 :** Système de défense antioxydant
- Figure 6 :** l'acide salicylique et ses principaux dérivés naturels
- Figure 7 :** Les principaux dérivés de l'acide hydroxy-cinnamique
- Figure 8 :** Structure générale des flavonoïdes
- Figure 9 :** Une structure de lignine composée des trois monolignols
- Figure 10 :** plan générale de notre travail
- Figure 11 :** Schéma simplifié des étapes du procédé d'extraction par la macération
- Figure 12 :** Schéma simplifié des étapes du procédé d'extraction liquide-liquide
- Figure 13 :** Réduction du radical libre DPPH•
- Figure 14 :** Histogramme représente les rendements des extraits de chaque résidu
- Figure 15 :** La courbe d'étalonnage d'acide gallique
- Figure 16 :** Histogramme représente les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits d'*Atractylis humilis* (mg AG/g)
- Figure 17 :** La courbe d'étalonnage de Quercétine
- Figure 18 :** Histogramme représente les teneurs en flavonoïdes (mg AG/g)
- Figure 19 :** Courbes représentes pouvoir antioxydant de Vitamine C -Test DPPH
- Figure 20 :** Histogramme représente l'équivalent de l'extrait (g) pour 1 g de vitamine C le test DPPH
- Figure 21 :** Courbes représentes pouvoir antioxydant de Vitamine C -Test ABTS
- Figure 22 :** Histogramme représente l'équivalent de l'extrait (g) pour 1 g de vitamine C le test ABTS

## Abréviations

<b>ABTS•+</b>	2, 2'- Azino bis-(3-éthylbenzothiazoline- 6- sulfonique)
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AG</b>	Acide gallique
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	Trichlorure d'aluminium
<b>AO</b>	Les agents oxydants
<b>CAT</b>	La catalase
<b>CP</b>	Composés phénoliques
<b>DCM</b>	Dichlorométhane
<b>DPPH</b>	Le radical stable (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
<b>EAG</b>	Equivalent d'acide gallique
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentration efficace pour réduire 50% des radicaux libres
<b>ERO</b>	Les espèces réactives de l'oxygène
<b>EOA</b>	Espèces oxygénées active
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	Ion ferrique
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	Ion ferreux
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Chlorure de fer
<b>FL</b>	Flavonoïdes
<b>GSH</b>	Le glutathion
<b>HCl</b>	Chlorure d'hydrogène
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Le peroxyde d'hydrogène
<b>MèOH</b>	Méthanol
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Carbonate de sodium
<b>NaOH</b>	Hydroxyde de sodium
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Radical anion superoxydes
<b>OH•</b>	Radical hydroxyle
<b>ONOO•</b>	Radical perxynitrite
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	L'oxygène singulet
<b>PAF</b>	Platelet Activating Factor
<b>PF</b>	Polyphénol
<b>QR</b>	Quercétine
<b>R•</b>	Radical libre oxydant
<b>RL</b>	Radical libre
<b>RNS</b>	Espèces réactives de l'azote
<b>ROS</b>	Espèces réactives oxygénées
<b>ROO•</b>	Radicaux libres peroxylés
<b>VCEAC</b>	Vitamine C Equivalent Anti oxydant Capacité

# **Introduction**

Depuis plusieurs années, l'utilisation des plantes médicinales ou des préparations à base des plantes connaît un succès croissant. Ainsi, d'après les estimations, 80% de la population mondiale dépend principalement de la médecine traditionnelle **(OMS, 2002)**.

L'étude de l'activité antioxydante des plantes est aujourd'hui devenue importante, car on peut retrouver dans les végétaux de puissants antioxydants. Actuellement, la société scientifique, biologiste et chimiste, met en évidence le rôle tragique du processus oxydatif incontrôlable induit par les espèces réactives oxygénées (ERO). Le stress oxydant est lié à de nombreuses pathologies, par exemple l'athérosclérose, les cancers, le diabète de type 2, les maladies neurodégénératives et rhumatismales. Quel que soit le cas, le risque est aggravé avec l'accumulation de ces molécules dans l'organisme en aboutissant à une chaîne réactionnelle radicalaire qui dégrade les molécules vitales biologiques à savoir l'ADN, les lipides, les protéines et les glucides. C'est pour cela que la recherche sur les antioxydants dans les plantes s'est beaucoup développée ces dernières années, afin de permettre de trouver les meilleurs antioxydants possibles dans l'espoir de protéger notre santé et même guérir ces différentes maladies **(Benhammou, 2011)**.

D'autre part, l'alimentation joue un rôle très important dans l'apport en antioxydants exogènes qui vont venir soutenir l'effet des antioxydants endogènes. En effet, les antioxydants sont principalement apportés par les végétaux, on y retrouve notamment les polyphénols (acides phénoliques, flavonoïdes, lignines, stilbènes), les vitamines (vitamine E, vitamine C et vitamine A) ainsi que les oligoéléments (cuivre, manganèse, sélénium et zinc) **(Guillouty, 2016)**.

L'espèce *Atractylis humilis* L. appartenant au genre *Atractylis* L. est connue sous le nom commun "Atractyle humble" et "Chardon-fuseau". L'espèce *A. humilis* est utilisée dans notre région dans les recettes traditionnelles de traitement contre le cancer. Les études sur ses activités biologiques sont très limitées. C'est dans ce contexte d'étude que s'inscrit ce présent travail, dont l'objectif principal étant d'évaluer l'activité antioxydante de différentes fractions de l'extrait de l'espèce d'*Atractylis humilis*

Au préalable nous avons procédé à la détermination de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes. En second temps, nous avons évalué l'activité antioxydante en moyen de deux méthodes :

- Le test DPPH
- Le test ABTS

Ce manuscrit alors, est subdivisé en trois parties essentielles. La première a été consacrée à une synthèse bibliographique portée principalement sur la plante étudiée, les activités antioxydantes et composés phénoliques. Alors que, la deuxième a été réservée pour l'explication des protocoles expérimentaux adaptés en réponse aux objectifs de cette étude qui est basée sur :

- ✓ L'extraction des composés phénoliques de la plante.
- ✓ Dosage des composés phénoliques et des flavonoïdes.
- ✓ Evaluation de l'activité antioxydante par le test de DPPH, ABTS.

En dernier rang, nous avons exposé les différents résultats obtenus accompagnés de leurs discussions.

# **Etude Bibliographique**

## **1. La plante étudiée**

### **1.1 Les Astéraceae**

La famille des Astéraceae est une importante famille de plantes dicotylédones qui comprend près de 13 000 espèces réparties en 1500 genres (**Bremer K.,1994**).

Les Astéraceae connaissent une distribution géographique mondiale, à l'exception de l'Antarctique. Elles s'acclimatent bien aux régions tropicales et subtropicales semi-arides, à la toundra alpine et arctique et aux régions tempérées. Elles sont, en revanche, peu présentes dans la forêt tropicale. Ce sont essentiellement des plantes herbacées même s'il peut exister des arbres, des arbustes ou des lianes (**Bremer ,1994**).

Les plantes de la famille Astéraceae se caractérisent surtout par leur inflorescence, des fleurs regroupées en capitules, plus ou moins fréquemment convexe, sur l'extrémité élargie d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des involucre (**Ozenda, 1991**). Les fleurs (fleurons), stériles, unisexuées ou hermaphrodites, sont caractérisées par leurs anthères soudées, les ovules ont une position basale dans l'ovaire. On peut les diviser en trois groupes suivant l'aspect des capitules : les tubuliflores, les liguliflores et les radiées (**Judd et al., 1990**).

### **1.2 Le genre *Atractylis***

Les plantes du genre *Atractylis* sont connues pour leurs propriétés thérapeutiques et usage populaire pour le traitement de diverses maladies telles que la cholélithiase, les troubles tumoraux et circulatoires, les parasites intestinaux, les ulcères, l'intoxication par morsure de serpents et l'hépatite, et pour leurs effets diurétiques (**Yong et al., 2012**). En Europe du Sud, les fleurs de l'espèce *A. humilis* sont utilisées pour coaguler le lait.

De plus, plusieurs activités biologiques de diverses plantes de ce genre ont été bien documentées à savoir les propriétés diurétiques, (**Larrey et Pageaux, 1995**), anti-inflammatoires, (**Melakhessou et al., 2018**) et antiprolifératives (**Guo et al., 2013**).

En effet, des substances naturelles appartenant à plusieurs classes chimiques à savoir les di terpènes, les tri terpènes, les saponines, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les flavonoïdes C-glycosylé et composés phénoliques ont été identifiés (**Chabani et al., 2013**). Néanmoins, il convient de noter que les trois espèces *A. flava*, *A. serratuloides* et *A. cancellata* (**Badaoui et al., 2019**).

Poussant en Algérie ont déjà fait l'objet d'études phytochimiques et plusieurs composés ont été isolés dont la plupart appartient aux classes chimiques mentionnées précédemment.

### 1.3 L'espèce *Atractylis humilis*

#### 1.3.1 Rappel botanique

Plante à petites feuilles, lancéolées linéaires à bords épaissis en nervure marginale et régulièrement dentés épineux. Capitules de 15 mm globuleux, fleurs du rayon, parfois rayonnantes. Sa racine est grise, ligneuse ; ses tiges sont droites, longues de 1-2 de, glabres : son involucre est cylindrique, court, glabre, formé d'écailles imbriquées. Tronquées au sommet et d'où part une épine droite, simple et aussi longue que l'écaille elle-même. *Atractylis humilis* est répandue dans le nord saharien, (Quezel et Santa., 1963).

Elle est désignée sous le nom *vernaculaire* : en arabe : الدقة, kabyle : ⵏⵉⵏⵏⵉⵏⵉ et possède un synonyme *Atractyle humble*

Cette plante croit dans les forêts sur les rochers et les sols pierreux,



**Figure 1:** Images de l'espèce *Atractylis humilis*.

Cette espèce est classée comme suit :

<b>Famille:</b>	Asteraceae
<b>Sous famille :</b>	Carduoideae
<b>Tribu :</b>	Cardueae
<b>Sous tribu :</b>	Carlininae
<b>Genre :</b>	<i>Atractylis L.</i>
<b>Espèce :</b>	<i>Atractylis humilis</i>
<b>Synonyme :</b>	<i>Atractyle humble</i>
<b>Noms vernaculaires :</b>	knoud, $\mathcal{K}/\%/\Lambda\mathcal{O}$ الدقة

### 1.3.2 Utilisation et propriété

. En Europe du Sud, les fleurs de l'espèce *A. humilis* sont utilisées pour coaguler le lait.

Localement, dans la région des Aurès en Algérie (hautes montagnes de Bellezma, Batna), la plante *A. humilis* est connue sous le nom de "Degâa" et sa poudre est employée comme pommade pour traiter l'acné juvénile. L'espèce *A. humilis* est appelée "Knoud" dans la région d'El-Bayadh, ses racines sont préconisées sous forme de décoction pour leur effet gastralgique.

De plus, plusieurs activités biologiques de diverses plantes de ce genre ont été bien documentées à savoir les propriétés diurétiques, purgatives, anti-inflammatoires, antipyrétiques et antiprolifératives (**Bruneton,, 1999**).

## 2 Le stress oxydant

### 2.1 Définition

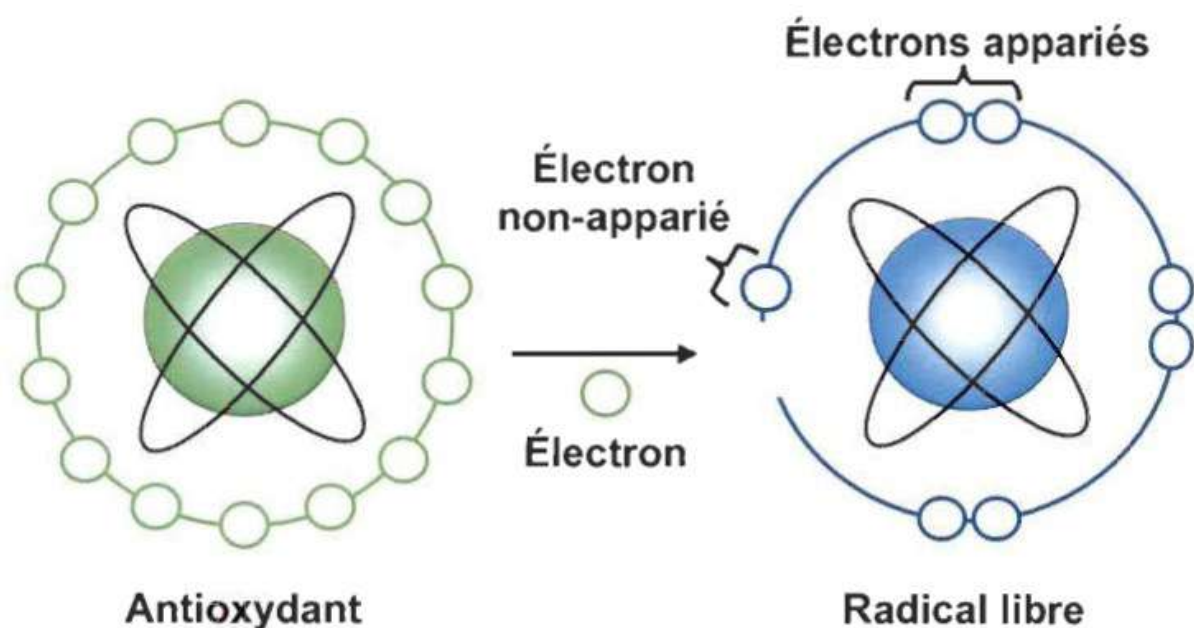
Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et le système antioxydant d'un organisme. Il est susceptible d'entraîner

une immunodépression. (Fabrice *et al.* 2009). L'origine de cet équilibre peut également être de nature exogène : une alimentation pauvre en antioxydants, une exposition aux rayons ultraviolets à l'action de substance oxydante (solvants, pesticide, anesthésique, tabac, métaux lourds) (Benyamina, 2017)

Ou de nature endogènes comme les réactions enzymatiques (NADPH oxydase, lipoxygénase et la xanthine oxydase (Enzyme dans le foie)), Mitochondries, Phagocytoses, Peroxysomes, Métaux de transition, Exercice physique, Inflammation, Choc.(Bendif, 2017), cette surproduction au-delà des capacités antioxydants des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydant qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies, inflammatoires, auto-immunes, neurodégénératives, cardiaques, diabète ou certains cancers. Pour échapper à ces graves conséquences du stress oxydant, l'apport d'antioxydants s'avère nécessaire (Amarti *et al.* 2013).

## 2.2 Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique qui possède un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe. La présence d'un électron non apparié confère à ces molécules une grande instabilité, c'est-à-dire qu'elles sont extrêmement réactives et que leur durée de vie est courte. (Figure ci-dessous).



**Figure 2** : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant

Les radicaux libres agissent comme des accepteurs d'électrons et arrachent, donc des électrons à d'autres molécules. Cette perte caractéristique d'un électron correspond au phénomène d'oxydation et les radicaux libres sont donc considérés comme des agents oxydants puisqu'ils incitent les molécules à donner des électrons. (**Carange, 2010**)

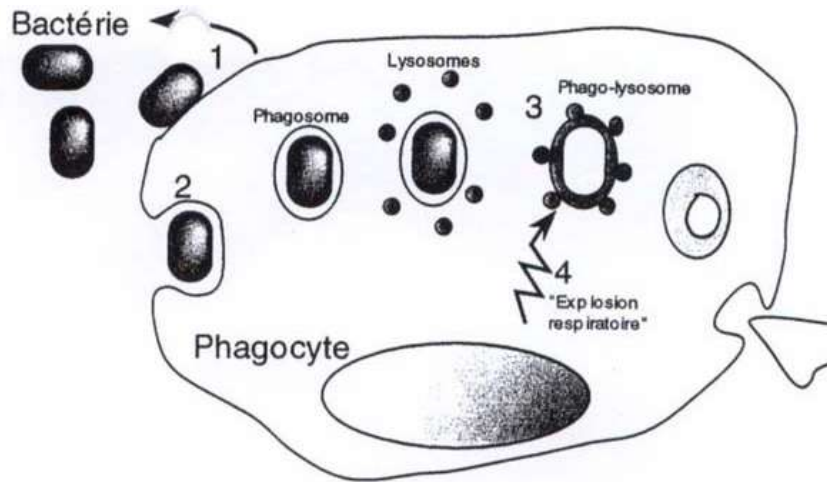
**Tableau 1 :** Les principaux radicaux libres

<b>ERO</b>	<b>Symbole Chimique</b>	<b>Propriete</b>
L'anion super oxyde	$O_2 \bullet-$	Radical forme par la réduction mono électronique de l'oxygène, peu réactif mais toxique ( <b>Lee et al., 2004</b> )
Le radical hydroxyle	$OH\bullet$	l'espèce radicalaire la plus réactive de l'oxygène, a une demi-vie dextremement courte d'environ $10^{-9}$ s, capable de réagir très rapidement avec la plupart des biomolécules  (ADN, protéines et lipides) ( <b>Bartosz, 2003</b> )
L'oxygène singlet	$O_2$	La forme excitée de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité ( <b>Milane, 2004</b> )
Le peroxyde d'hydrogène	$H_2 O_2$	

## **2.3 Rôle des radicaux libres dans la physiologie cellulaire**

### **2.3.1 Rôle dans la phagocytose**

Les radicaux libres jouent un rôle essentiel dans le bon déroulement de la réaction immunitaire. Ils sont produits par les cellules phagocytaires pour être utilisés dans la lutte contre les bactéries. Après sa phagocytose par un macrophage, une bactérie se retrouve dans une vésicule appelée phagosome. Celui-ci va fusionner avec un lysosome pour donner un phago-lysosome. Alors, une succession de réactions appelées « explosion respiratoire » a lieu. Son but est de générer des oxydants bactéricides ( $H_2O_2$ ,  $O_2\bullet-$ ,  $OH\bullet$ ,  $NO\bullet$ ) (**Pastre,2005**).



**Figure 3 :** Production de radicaux libres lors de la phagocytose d'une bactérie (Pastre, 2005)

### 2.3.1 Rôle dans la communication cellulaire

Les ROS peuvent agir en tant que « *molécule-signal* » et ainsi intervenir dans la communication intracellulaire et intercellulaire. Ils participent à l'expression de certains gènes et à leur régulation. Cela leur confère un rôle important dans les phénomènes de croissance et de mort cellulaire (Pastre, 2005).

Les mécanismes de communication cellulaire faisant intervenir les radicaux libres ne sont pas encore élucidés. Les principes généraux sont présentés sur la figure 04.

Les radicaux libres joueraient un rôle dans la régulation de l'expression des gènes.

La présence de radicaux libres dans le milieu extracellulaire est à l'origine de l'activation de certains facteurs de transcription par des mécanismes encore mal compris. Il en résulte ensuite l'expression des gènes correspondants. (Pastre, 2005).

Les radicaux libres extracellulaires peuvent interagir avec certains récepteurs membranaires et les activer. Ils sont ensuite à l'origine d'un signal cellulaire.

Les radicaux libres peuvent intervenir en tant que second messenger intracellulaire. La fixation d'un ligand extracellulaire sur son récepteur membranaire est à l'origine d'une succession de réactions conduisant à la genèse de ROS. (Pastre, 2005).

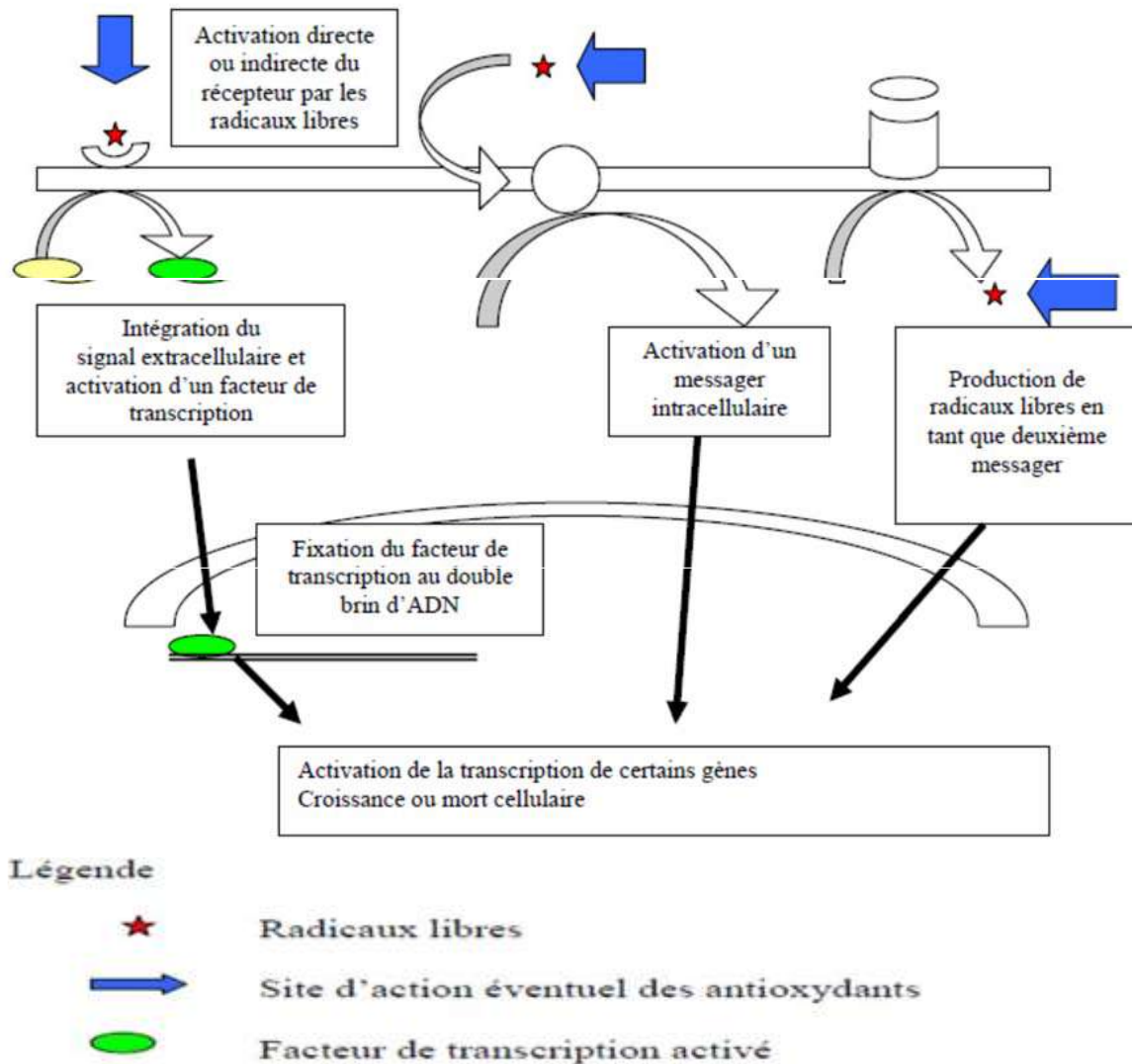


Figure 4 : Rôle des radicaux libres dans la communication cellulaire (Pastre, 2005).

### 3 Les cibles des radicaux libres

Les radicaux libres sont instables et cherchent à s'apparier avec un électron d'une autre molécule. Ils sont à l'origine de réactions en chaîne qui conduisent à des destructions cellulaires. Leurs structures cibles essentielles sont l'ADN, les membranes cellulaires mais aussi toutes les molécules pouvant être déstabilisées (Pastre, 2005).

#### 3.1 Les glucides

Les radicaux libres peuvent agir sur le glucose et générer des intermédiaires réactifs. Les dommages oxydatifs peuvent alors se propager via l'attaque des radicaux.

### **3.2 Les protéines**

Les radicaux libres peuvent aussi les protéines l'électron non apparié des radicaux libres peut s'attaquer à la structure de certaines protéines, en particulier les protéines porteuses d'un groupement sulfhydryle (-SH), c'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et entraîner la formation de ponts entre protéines, une fragmentation ou une dénaturation de la protéine (**Lacolley et al., 2008**). Les protéines sont sensibles à l'action du radical HO•, celui-ci peut, en effet, réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, les plus sensibles à son action sont les acides aminés aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine, ou celui ayant un noyau imidazole comme l'histidine, sur lesquels le radical HO• s'additionne et provoque un changement de conformation de la molécule de protéine (**Pasquier, 1995**).

### **3.3 Les lipides**

Les radicaux libres peuvent attaquer les lipides et notamment les acides gras mono et polyinsaturés (AGPI) des phospholipides membranaires. Ils sont à l'origine de réaction de peroxydation

Il s'agit d'une succession de réactions radicalaires à l'origine de la libération de molécules réactives. En l'absence d'antioxydants, la réaction s'auto-entretient car les espèces produites peuvent à nouveau réagir entre elles.

Cette réaction est à l'origine de la formation d'hydroperoxydes lipidiques. Ceux-ci s'accumulant dans la membrane, entraînent la diminution de sa fluidité et de sa perméabilité. Sa fonction étant complètement perturbée, la membrane se désorganise. Si les dégâts sont trop importants, les peroxydes peuvent conduire à la mort de la cellule.

Les peroxydes lipidiques peuvent aussi réagir avec d'autres composés cellulaires et être à l'origine de molécules très toxiques. Par exemple, ils peuvent réagir avec l'ADN et être à l'origine de substances mutagènes.

### **3.4 L'ADN**

La molécule de l'ADN constitue une cible cellulaire importante pour les attaques radicalaires.

Les modifications observées après l'action du radical HO• sont très nombreuses: conversion des résidus thymine en thymine glycol et 5-hydroxy méthyl uracile, de la guanine en 8-hydroxy guanine, oxydation du désoxyribose entraînent une coupure des brins de la double hélice. Ces dénaturations peuvent avoir de graves conséquences sur la

réplication du génome et conduisant ainsi à la mutagénèse, la carcinogénèse et la mort cellulaire (Leverve *et al.*, 2001).

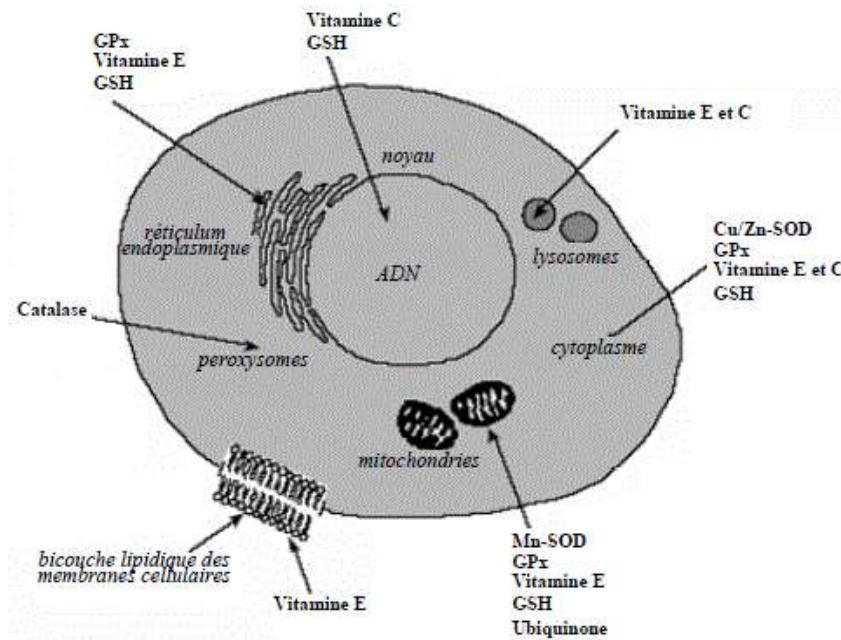
#### 4. Les systèmes antioxydants

Les antioxydants sont définis par Halliwell & Gutteridge (1995) comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat ». Ils peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine.

##### 4.1 Les différentes localisations cellulaires des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés en molécules liposolubles ou hydrosolubles.

Selon leurs caractéristiques physico-chimiques, ils auront une localisation cellulaire préférentielle : les membranes cellulaires pour les substances liposolubles et le cytosol et/ou le milieu extracellulaire pour les substances hydrosolubles. Ils seront particulièrement efficaces sur les radicaux libres présents dans chaque type de milieu, respectivement (Figure 5) (Opara, 2002).



**Figure 5 :** Système de défense antioxydant (Pastre, 2005)

## 4.2 Origines des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés en deux catégories (Tableau 2) avec :

- Les enzymes antioxydants directement synthétisées par l'organisme.
- Les nutriments antioxydants dont les apports sont nécessaires par l'alimentation.

Cette dernière classe d'antioxydants nous intéresse particulièrement puisque nous verrons s'il est possible de renforcer les défenses de l'organisme en augmentant les apports exogènes de ces différentes molécules.

**Tableau 2 :** Les types de protection antioxydant de l'organisme

<b>Système antioxydants enzymatiques endogènes</b>	<b>Système antioxydants non enzymatiques exogènes d'origine alimentaire</b>
- Superoxydes dismutase - Glutathion peroxydase - Catalase (s)	- Vitamine E (alpha tocophérol) - Vitamine C (acide ascorbique) - Caroténoïdes - Polyphénols - Minéraux et oligoéléments

## 4.3 Modes d'action des antioxydants dans l'organisme

Il existe plusieurs types de molécules à activité antioxydant dont les mécanismes d'action sont différents (Tableau 03).

**Tableau 3 :** Principaux modes d'action de quelques antioxydants

	<b>Molécules</b>	<b>Mode d'action</b>
<b>Défenses non enzymatiques</b>	<i>Vitamine E</i>	<i>Piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles et superoxydes</i>
	<i>Vitamine C</i>	
	<i>Beta carotène</i>	
<b>Défenses enzymatiques</b>	<i>Superoxyse dismutase</i>	<i>Catalyse la dismutation de l'anion superoxydes en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub></i>
	<i>Catalase</i>	<i>Catalyse la dismutation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub></i>
	<i>Glutathion peroxydase</i>	<i>Action réductrice sur hydroperoxydes de R-OOH en R-OH</i>

Selon leur mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories :

- ✓ Système de défense primaire : la catalase (CAT), le glutathion (GSH). Ces antioxydants préviennent la production de ROS en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation. Ils agissent donc en prévention.
- ✓ Système de défense secondaire : les tocophérols. Ces molécules sont dites *chain breaking*. Elles réagissent avec les ROO• et/ou les R•, bloquant ainsi les réactions de propagation. Ce type d'antioxydant permet d'éviter le passage de formes peu réactives (O2•-) à très réactives (OH•).

## 5. Les composés phénoliques

Ces polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés par les végétaux pour se défendre contre les agressions environnementales. Il s'agit des dérivés non azotés connus par une grande variété structurale dont environ 8000 composés ont été identifiés (Buchanan *et al.*, 2000).

Les polyphénols peuvent se regrouper en deux grands groupes : Les non flavonoïdes dont les principaux composés sont : les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les lignines et les coumarines (Hoffmann, 2003) et les flavonoïdes, dont on caractérise principalement : les flavones, flavanones, flavonols, isoflavonones, anthocyanines, proanthocyanidines et flavanols (Pincemail *et al.*, 2007).

**Tableau 4 :** Les principes classes de composés phénoliques

Squelette Carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C6	Phénols simple	<i>Catéchol</i>	/
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	<i>p-hydroxybenzoïques</i>	Epices, Fraise
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	<i>Acides p-coumarique</i> <i>Scopolétine, Esculétine</i>	Pomme de terre Citrus
C6-C4	Naphtoquinones	<i>Juglone</i>	Noix
C6-C2-C6	Stilbène	<i>Resvératrol</i>	Vigne
	Flavonoïdes	/	/

<b>C6-C3-C6</b>	Flavonols	<i>Quecétine</i>	Fruits, Légumes
	Anthocyanes	<i>Cyanidine</i>	Fleurs, Fruits rouges
	Flavanols	<i>Catéchine</i>	Pomme, Raisin
	Flavanones	<i>Naringénine</i>	Citrus
	Lignines	<i>Daidzéine</i>	Soja, Pois
<b>(C6-C3)2</b>	Tannins	<i>Pinorésinol</i>	Pin
<b>(C6-C3)n</b>			Bois, Noyau
<b>(C15)n</b>			Raisin rouge, Kaki

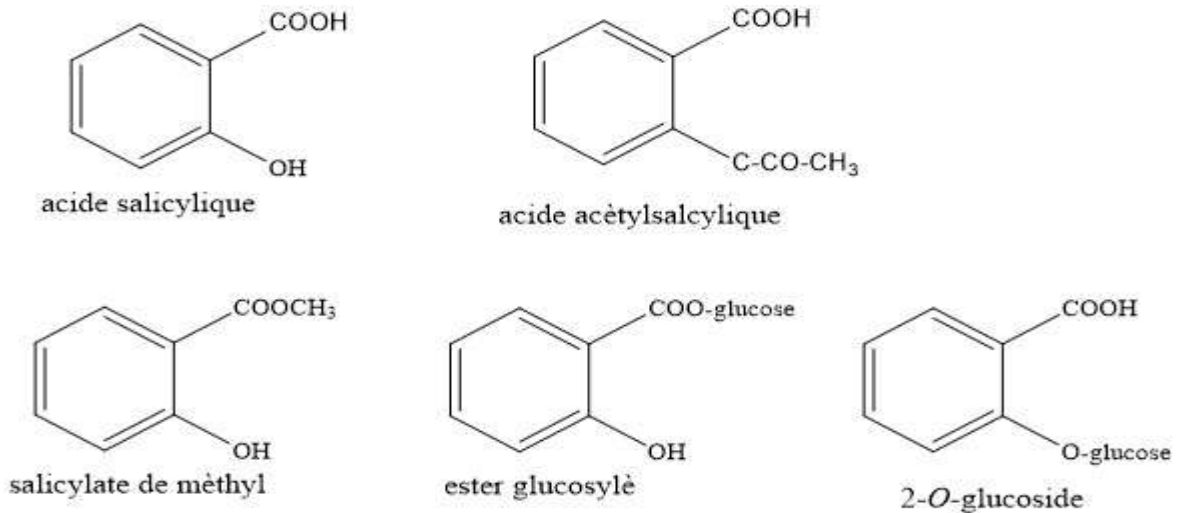
## 5.1 Les formes simples

Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C6 (non présent naturellement chez les végétaux) aux flavonoïdes en C15 et à des molécules proche (**Macheix *et al.*, 2005**).

### 5.1.1 Acide hydroxy-benzoïque

Les acides hydroxybenzoïques (*p*-hydroxybenzoïque, vinylique, gallique, salicylique...) sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C6-C1 (Figure 6). Ils sont particulièrement représentés chez les Gymnospermes et les Angiospermes d'où ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal. Les acides hydroxybenzoïques existent fréquemment sous formes d'esters ou de glycosides (**Macheix *et al.*, 2005**).

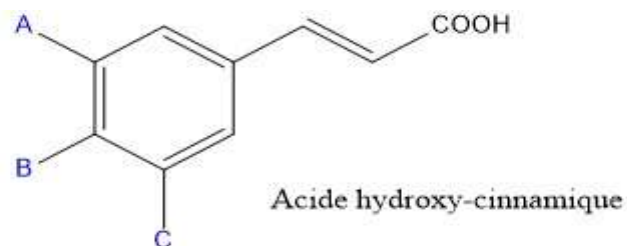
Les principaux acides hydroxybenzoïques retrouvés dans les végétaux sont les acides *p*-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique et syringique (**Chanforan, 2010**).



**Figure 6 :** l'acide salicylique et ses principaux dérivés naturels  
By ChemDraw

### 5.1.2 Acide hydroxy-cinnamique

Les acides hydroxy-cinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) dérivé de celle de l'acide cinnamique. Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires (par méthylation chez les acides féruliques ou sinapique) sont des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules (Macheix *et al.*, 2005).



A+B+C = H	→	acide cinamique non phenolique
A+C = H et C = OH	→	acide <i>p</i> -coumarique
A+B = OH et C = H	→	acide caféique
A = OCH <sub>3</sub> et B = OH et C = H	→	fêmarique
A+C = OCH <sub>3</sub> et B = OH	→	sinapique

**Figure 7 :** Les principaux dérivés de l'acide hydroxy-cinnamique (Macheix *et al.*, 2005)  
By ChemDraw

### 5.1.3 Les flavonoïdes

L'ensemble des flavonoïdes, de structure générale en C<sub>15</sub> (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), comprend à lui seul plusieurs milliers de molécules regroupées en plus de dix classes dont certaines ont une très grande importance biologique et technologique : les anthocyanes, pigment rouge ou bleus, les flavones, les flavonols, de couleur crème ou jaune clair, les flavanes dont les produits de condensation sont à l'origine d'un groupe important de tannins et les isoflavones qui jouent un rôle dans la santé humaine (Macheix *et al.*, 2005).

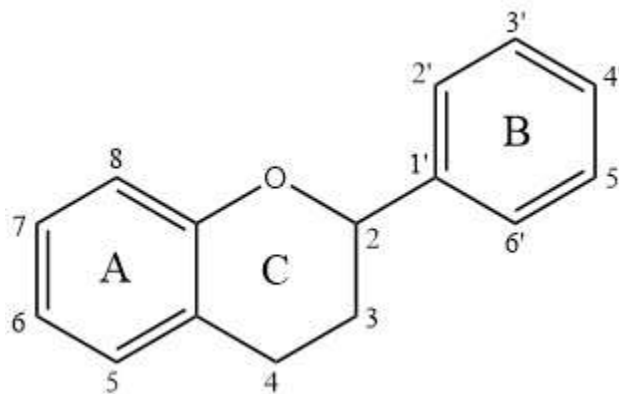
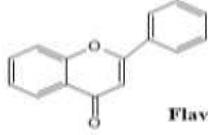
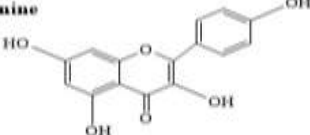
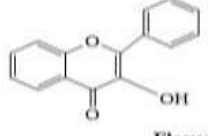
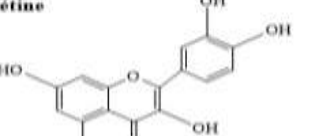
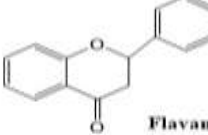
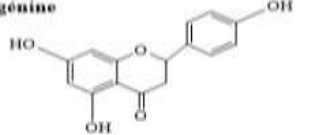
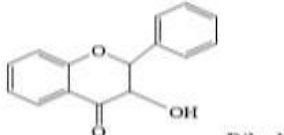
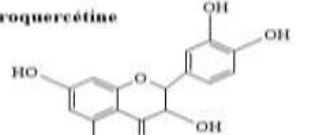
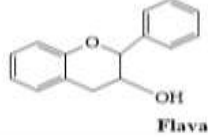
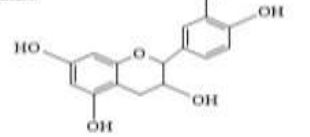
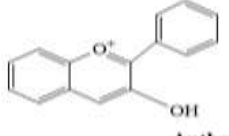
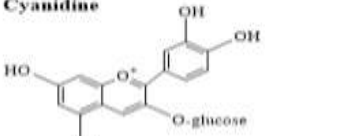


Figure 8 : Structure générale des flavonoïdes (Macheix *et al.*, 2005) By ChemDraw

**Tableau 5** : Les différentes classes des flavonoïdes d'après (Bruneton, 2009) By ChemDraw

Structure de sous classe des flavonoïdes	Exemples
 <p><b>Flavone</b></p>	 <p><b>Apigénine</b></p>
 <p><b>Flavonol</b></p>	 <p><b>Quercétine</b></p>
 <p><b>Flavanone</b></p>	 <p><b>Naringénine</b></p>
 <p><b>Dihydroflavonol</b></p>	 <p><b>Dihydroquercétine</b></p>
 <p><b>Flavanol</b></p>	 <p><b>Catéchine</b></p>
 <p><b>Anthocyanidine</b></p>	 <p><b>Cyanidine</b> O-glucose</p>

### Flavones

Les flavones sont structurellement très similaires aux Flavonols et ne diffèrent que par l'absence d'hydroxylation en position 3 sur le cycle C (**Tableau 4**). Elles sont principalement représentées dans l'alimentation par l'apigénine et la lutéoline. Contrairement aux Flavonols, elles sont moins répandues dans les fruits et les légumes. Par conséquent, leur apport alimentaire est très faible (**Fraga., 2009**).

### Flavonols

Les flavonols sont caractérisés par la présence d'une double liaison en position 2-3 et d'un groupement hydroxyle en C3 (**Tableau 4**). Elles sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal, leur couleur varie du blanc au jaune, elles sont essentiellement représentées par la quercétine, le kaempférol et la myricétine. Les flavonols

qui s'accumulent dans les tissus végétaux sont presque toujours sous la forme conjugués glycosylés (**Fraga., 2009**).

### **Flavanones**

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2, 3 et par la présence d'un centre d'asymétrie en position 2 (**Tableau 4**). Chez les flavanones naturelles, le carbone 2 est normalement de configuration S. Elles existent sous forme libre ou sous forme glycosylée (**Portet., 2007**).

La principale source des flavanones reste les agrumes qui sont caractérisés par l'accumulation des montants élevés en ces composés. Les agrumes incluent les oranges amères, les citrons, les pamplemousses, les mandarines, les clémentines et les oranges douces. Parmi les formes libres des flavanones, on cite la naringénine qui est retrouvée dans le pamplemousse et l'orange amère. Le plus souvent, les flavanones existent sous forme glycosylée en position 7, comme L'hespéridine, qui est retrouvée dans le citron, l'orange douce et la mandarine, et les néohesperidosides responsables du goût amer du pamplemousse et de l'orange (**Tomas et al., 2000**)

### **Flavan-3-ols ou flavanols**

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C4 (**Tableau 4**). Elles sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés. Les flavan-3-ols sont très abondant dans les fruits comme les abricots, les cerises, les raisins,... etc (**Fraga., 2009**).

Les flavanols sont largement répandus dans les fruits et légumes, mais la source la plus riche de flavanols au sein de l'alimentation humaine est certainement le thé. Ce dernier contient principalement de la (-)-épicatéchine, de la (-)-épigallocatechin-3-O-gallate et de la (-)- épigallocatechine (**Del Rio et al., 2010**).

### **Anthocyanes**

Les anthocyanes (en grec Anthos signifie fleur, et kyanos signifie bleu) sont des pigments hydrosolubles présents dans la plupart des espèces. Ces pigments sont des dérivés du cation 2-phénylbenzopyrylium plus communément appelé cation flavylum. Ils sont accumulés dans les vacuoles cellulaires (**Kerio et al., 2012**) et ils sont responsable des couleurs rouges, violettes et bleues dans les fruits, les légumes, les fleurs et les graines, mais aussi jouent un rôle important dans la physiologie végétale comme attracteurs des insectes et dans la dispersion des graines (**Shipp et Abdel-Aal., 2010**).

Les anthocyanes sont stabilisés dans les plantes par des interactions avec des acides aminés, des tanins, des 4-oxo-flavonoïdes (**Vierling., 2008**).

## **5.2 Les formes complexes (condensé)**

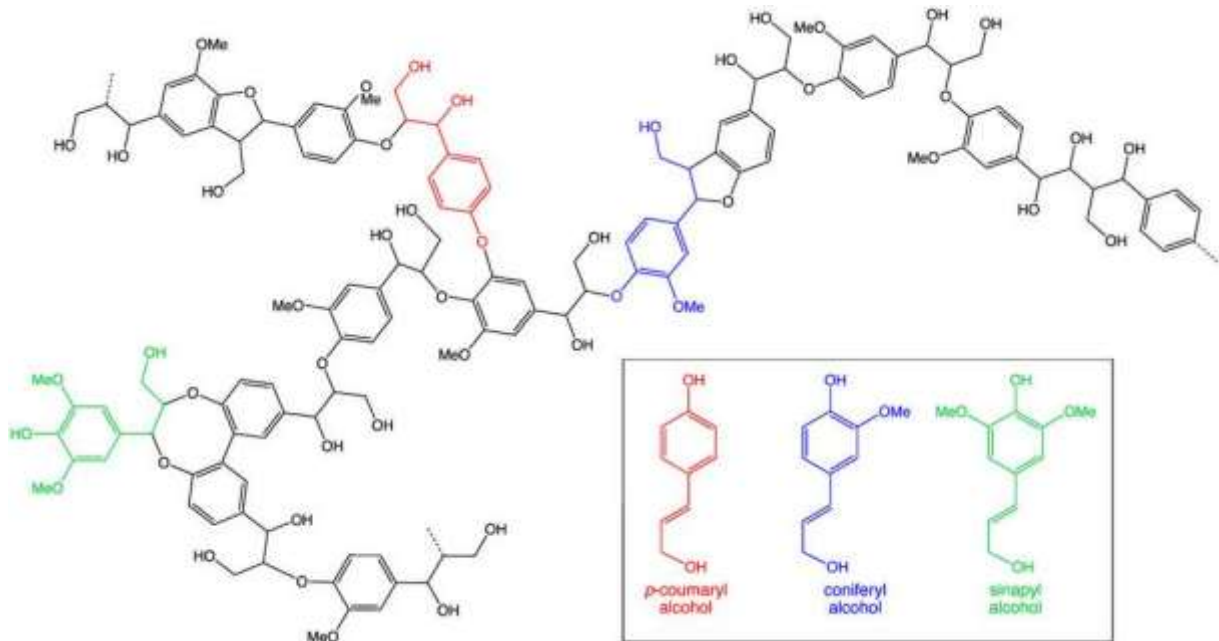
Ces composés résultent généralement de la condensation de certaines des formes simples précédemment citées, selon la nature des constituants impliqués et selon le type de condensation, on obtient des composés plus ou moins complexes pouvant encore présenter une hydro-solubilité suffisante pour être présents dans la vacuole (tannins, certains produits de brunissement) ou au contraire acquérir un caractère lipophile marqué et s'accumuler alors dans les structures pariétales (lignine, formes présentes dans la cutine et la subérine...).

### **5.2.1 Les tannins**

Les tannins sont des formes phénoliques condensées capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter (protéines modèle : gélatine, albumine, hémoglobine). Les tannins ont une importance économique et écologique considérable et sont responsables de l'astringence de nombreux fruits et légumes et des produits qui en sont dérivés (vin, thé, bière...), ils sont utilisés depuis l'antiquité par l'homme pour le traitement des peaux d'animaux. Ils sont classés en deux grands groupes de tannins : tannins hydrolysables et tannins condensés.

### **5.2.2 Les lignines**

Les lignines constituent une classe importante de substances naturelles du règne végétal. Il s'agit des dimères ramifiés de phénylpropaniques (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>). Ces derniers sont formés par dimérisation de trois types d'alcools : alcool *p*-coumarique, alcool coniférique et alcool sinapique.



**Figure 9** : Une structure de lignine composée des trois monolignols (wiki)

## 6. Activités biologiques des flavonoïdes

### 6.1 Activité antioxydants

Les flavonoïdes sont considérés comme des agents antioxydants très puissants en raison de leur structure, se rapportant en particulier à la position des groupements hydroxyles sur les noyaux aromatiques, et la capacité des composés aromatiques à supporter une délocalisation électronique.

Ces dernières années, un intérêt particulier a été accordé aux propriétés antioxydants des flavonoïdes (**Chae *et al.*, 2013**), qui seraient attribuées à :

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

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber la peroxydation lipidique causée par les ERO dans la bicouche phospholipidique. Du fait de leur caractère hydrophile, les flavonoïdes peuvent interférer avec les réactions en chaîne à l'interface des membranes et prévenir ainsi la propagation de ces réactions en chaîne.

Cette même activité antioxydante leur permet de réguler les radicaux comme l'oxyde nitrique qui favorise une bonne circulation sanguine, coordonne l'activité du système immunitaire avec celle du cerveau et module la communication entre les cellules de ce dernier (Mladěnka *et al.*, 2010).

### **6.2 Activité antimicrobienne**

De nombreux flavonoïdes possèdent des propriétés antimicrobiennes (Divya *et al.*, 2014). Des synergies ont été mises en évidence pour certaines de ces molécules. Des études *in vivo* sur animaux se sont révélées encourageantes après injection de la sophoraisoflavone par voie intra-péritonéale chez des souris infectées par *Salmonella typhimurium* (Cushnie & Lamb, 2005). Il a été démontré que les 5-hydroxyflavanones et les 5 hydroxy-isoflavanones avec un, deux ou trois groupements hydroxyles en position 7, 2' et 4' inhiberaient la croissance de *Streptococcus sp*, l'hydroxylation la plus importante pour l'activité étant celle en position 2'. Par contre, les méthoxylations diminuent considérablement les effets antibactériens (Chen *et al.*, 2012).

### **6.3 Activité anti-inflammatoire**

Bien que l'inflammation soit un phénomène normal d'autodéfense de l'organisme, elle est parfois incontrôlée dans les maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde) ou lorsqu'elle est liée aux réponses allergiques (asthme) (Benavente *et al.*, 1997). De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire. Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes. La quercétine a un effet anti-inflammatoire en inhibant quelques enzymes de synthèse tel que la cyclooxygénase (Gunawardena *et al.*, 2014)

# **Matériels et Méthodes**

## 1. Objectif

Notre travail a été réalisé dans le laboratoire des sciences fondamentales de l'université Amar Téliidji–Laghouat. Le présent travail a pour objectif l'étude de l'activité antioxydante des extraits polaire de l'espèce *Atractylis humilis* par différentes méthodes. Le matériel et les méthodes utilisés dans ce travail sont décrits ci-dessous.

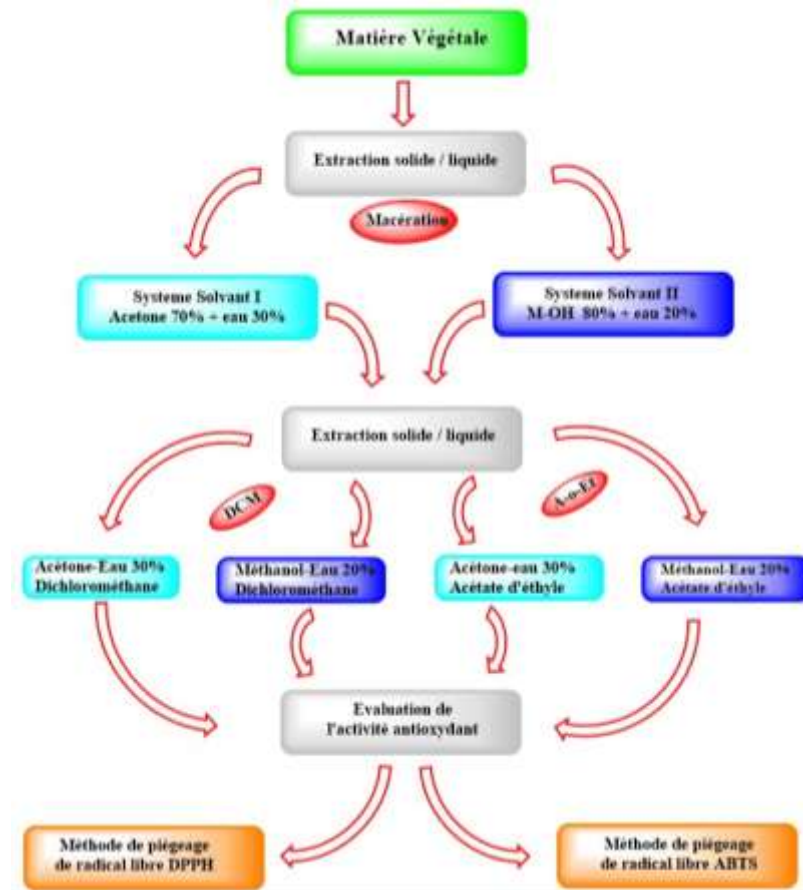


Figure 10 : plan générale de notre travail

## 2. Matériel utilisé

### 2.1 Matériel et produits chimiques

Les appareils et les produits chimiques utilisés durant le travail expérimental sont cités dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 6** : Les appareils et produits chimiques utilisé

<b>Appareils et instruments</b>	<b>Caractéristiques/fabricant</b>
Rota vapeur Spectrophotomètre UV/Visible Balance électronique de précision Agitateur magnétique plaque chauffante Agitateur vortex Micropipettes (variable)	<i>R220 BUCHI</i> <i>SHIMADZU UV 1601</i> <i>OHAUS 10-4g</i> <i>Stuart max 300°C</i> <i>Ficher Scientifique (40 Hertz)</i> <i>100 et 1000 µl</i>
<b>Produits chimiques</b>	<b>Fabricant</b>
<b>Solvants organiques</b> Méthanol Acétone Hexane Acétate d'éthyle	<i>Sigma-Aldrich Germany</i> <i>Honeywell Fluka Germany</i> <i>Riedel-de-Haën Germany</i> <i>Riedel-de-Haën Germany</i>
<b>Composés pure</b> Acide gallique monohydrate Quercétine	<i>Sigma-Aldrich Germany</i> <i>Sigma-Aldrich Germany</i>
<b>Réactifs</b> DPPH ABTS Réactif de <i>Folin ciocalteau</i>	<i>Sigma-Aldrich Germany</i> <i>Sigma-Aldrich Germany</i> <i>Sigma-Aldrich Germany</i>

## 2.2 Matériel végétal

Les plantes d'*Atractylis humilis* ont été récoltée en 2019 dans la région d'Aflou à Laghouat. Les racines de la plante sont ensuite lavées séchées, broyées et conservées dans des sacs en papier à l'abri de la lumière et l'humidité pour des analyses ultérieures.

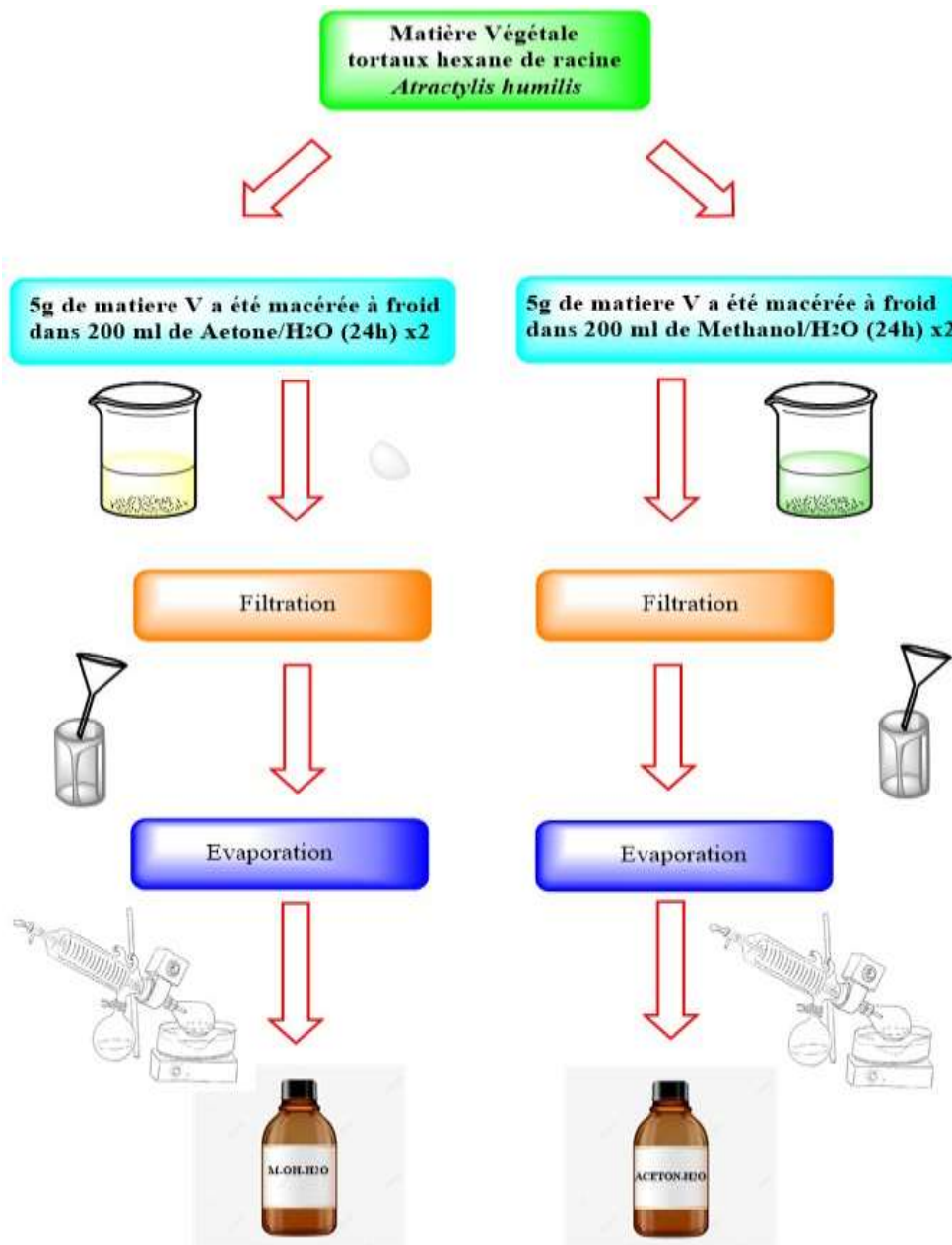
## 3 Méthode d'extraction des composés phénolique

### 3.1 Extraction par macération

La première étape de l'extraction est réalisée par une simple macération, Il s'agit du contact à froid entre le produit et le solvant pendant un temps déterminé. Cette méthode est utilisée pour extraire des principes altérables à la chaleur.

Cette étape consiste à extraire le maximum de molécules bioactives contenues dans la plante en utilisant 2 systèmes d'extraction : acétone/H<sub>2</sub>O (70/30) et méthanol/H<sub>2</sub>O (80/20) comme solvants organiques qui accélère et augmente le rendement d'extraction.

En principe 5 gramme de poudre ( tourtaux d'hexane), a été macérée dans 100ml pour chaque système de solvant pendant 24 heures à température ambiante, après chaque étape de filtration, le solvant est évaporé à sec sous pression réduite à 40<sup>0</sup> C.

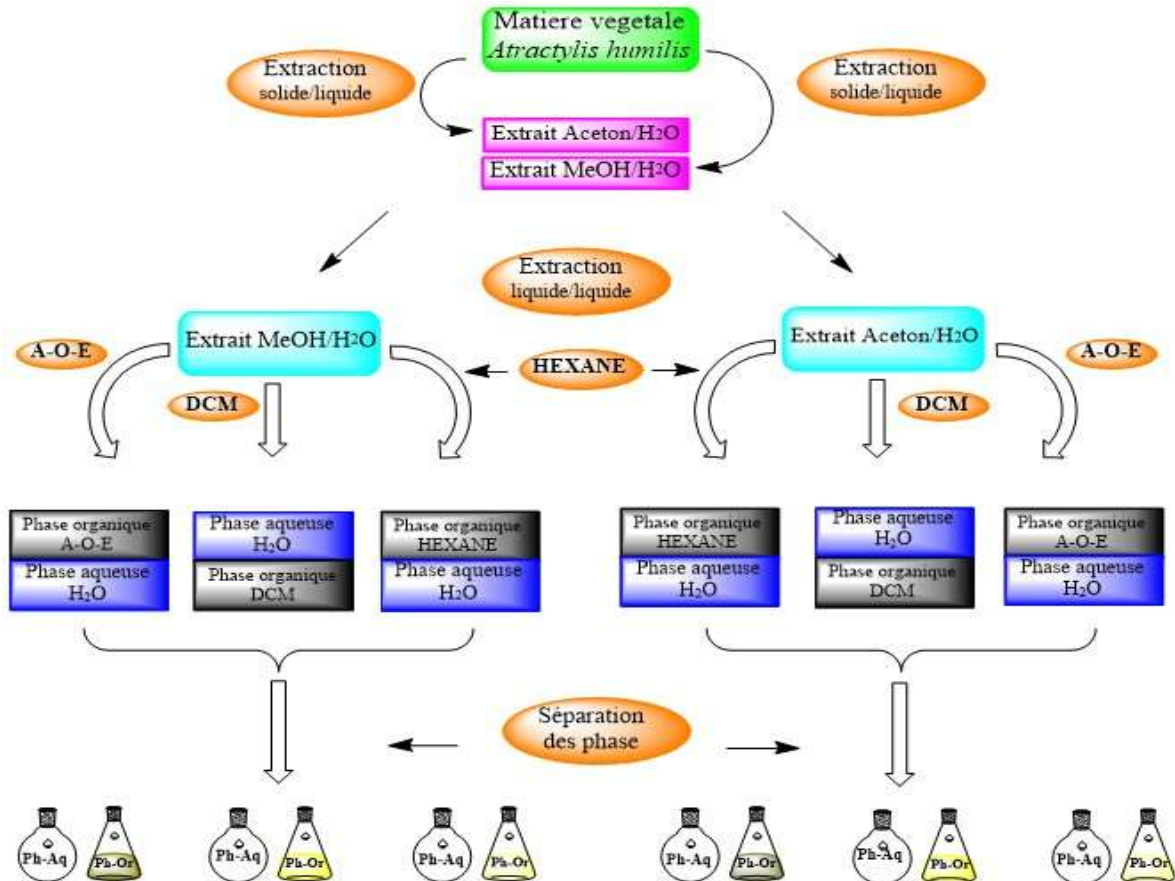


**Figure 11** : Schéma simplifié des étapes du procédé d'extraction par la macération (By ChemDraw)

### 3.2 Extraction liquide / liquide

L'extraction liquide - liquide, également connue sous le nom d'extraction par solvant, est une méthode permettant de séparer les composés en fonction de leur solubilité relative dans deux liquides différents non miscibles, généralement de l'eau et un solvant

organique. Il consiste à transférer un (ou plusieurs) soluté contenu dans une solution vers un autre liquide non miscible (solvant). **Hamia et al. (2014)**, dans notre travail nous avons réalisé le fractionnement en utilisant le dichlorométhane et le l'acétate d'éthyle comme solvants. (Figure 12)



**Figure 12 :** Schéma simplifié des étapes du procédé d'extraction liquide-liquide

La phase organique est évaporée à sec sous pression réduite à 40° C. Le résidu sec est conservé à 4° C.

#### 4. Calcul de rendement d'extraction

Le rendement de l'extraction est déterminé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Rendement} = \frac{\text{masse de résidu sec}}{\text{masse de matière végétale}} \times 100$$

## 5. Dosages des métabolites secondaires

Cette analyse permet d'avoir une estimation sur les teneurs en phénol totaux, les flavonoïdes

### 5.1 Dosage des polyphénols totaux

#### *Principe*

Tout le contenu phénolique dans l'extrait brut a été déterminé par spectrophotomètre au biais de la méthode *Folin-Ciocalteu*, rapportée dans (**Slinkard & Singleton, 1977**), le réactif est formé d'acide phosphotungestique  $H_3PW_{12}O_{40}$  et d'acide phosphomolybdique  $H_3PM_{12}O_{40}$ , qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène.

#### **Mode opératoire**

250  $\mu$ l de réactif de *Folin* (10%) est ajouté à 50 $\mu$ l d'échantillon ou standard avec des dilutions convenables. Après 2 min, 1 ml d'une solution de carbonate de sodium 2% (m/v), sont additionnés au milieu réactionnel. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 760 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique et elle est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec de la plante (mg EAG/g d'extrait sec).

#### **La courbe d'étalonnage**

Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir des solutions d'acide gallique de concentrations allant de 0.05 à 0.35 g/l .

### 5.2 Dosage des flavonoïdes

#### **Principe**

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode citée par **Djeridane et al. (2006)** en utilisant le trichlorure d'aluminium comme réactif.

Le trichlorure d'aluminium forme un complexe acide stable avec le groupement carbonyle C-4 et aussi les groupements hydroxyles C-3 et C-5 des flavones et flavonols, en plus il forme des complexes acides labiles avec les groupements di-hydroxyles en ortho du cycle A ou B des flavonoïdes (**Mabry et al., 1970**), ce complexe est de coloration jaune absorbe fortement à une longueur d'onde de 430 nm.

## Protocole

0.5ml de chaque solution diluée dans le méthanol ou de l'extrait végétal dilué est mélangé avec 0.5ml du trichlorure d'aluminium 2% (m/v), ces solutions ont été maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 430nm.

## La courbe d'étalonnage

La Quercétine a été utilisée comme étalon pour tracer la courbe d'étalonnage. Une solution mère de concentration connue préparé dans le méthanol a été diluée pour obtenir des solutions filles de concentrations différentes de 0.0083 à 0.0415 g/l.

## 6. Evaluation de l'activité antioxydant

### 6.1 Méthode de piégeage de radical libre DPPH

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle et les composés phénoliques font généralement intervenir à la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'un antioxydant. Parmi ces techniques d'analyses on a utilisé le test DPPH• (2,2 diphenyle-1-picryl-hydrazyle), joue sur le transfert d'électron singulet pour différentes concentration de l'extrait et une comparaison avec des antioxydants de références.

#### Principe

La méthode est basée sur la réduction de la solution alcoolique de DPPH• en présence d'un donneur d'hydrogène H• (le cas d'un antioxydant). La solution de DPPH• montre une forte bande d'absorption à 515 ~ 517 nm, avec une couleur violet foncé et qui se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie (Figure13).

La décoloration qui en résulte est stoechiométrique ; elle concerne le degré de réduction. Le DPPH• restant, mesuré après un certain temps, correspond inversement à l'activité de piégeage des radicaux libres par l'antioxydant (**Brand-Williams et al., 1995; Molyneux, 2004**).

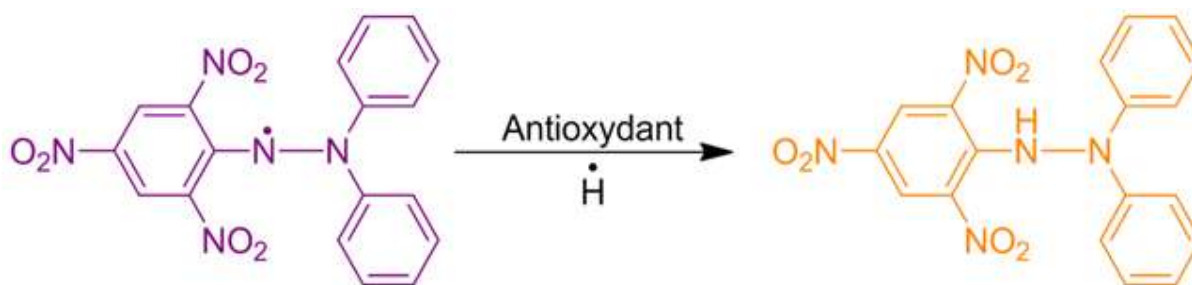


Figure 13 : Réduction du radical libre DPPH• (Molyneux, 2004)

### Protocole

Un volume de 0.5 ml, de chaque solution fille (Extrait brut de chaque solvant), récemment préparée dans le MeOH, est ajouté à 0.5 ml de solution de DPPH• fraîchement préparée. Après 30 min d'incubation, à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est lu contre le blanc A<sub>0</sub> (0.5ml de la solution de DPPH et de 0.5ml de méthanol) à 517 nm par spectrophotomètre (UV/Vis).

Le pourcentage (%) d'inhibition des radicaux libres de DPPH• a été calculé par la relation suivante :

$$I \% = [\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}] \times 100.$$

### 6.2 Méthode de piégeage de radical ABTS<sup>•+</sup>

Ce test est basé sur la réaction entre un radical cationique stable ABTS<sup>•+</sup> (2,2-azinobis-(3-éthyl benzothioazoline-6-sulfonic acide) (générateur de radicaux libres) et une substance donneur de protons, se produit immédiatement après l'ajout d'une solution de potassium persulfate K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, ce radical cation ABTS<sup>•+</sup> est un chromogène stable à température ambiante, peut être mesure dans un spectromètre à  $\lambda = 417$  nm.

### Protocole

En utilisant la méthode modifiée de **Re et al. (1999)**, le radical ABTS<sup>•+</sup> a été préparé par l'ajout de volume de ABTS avec le potassium persulfate incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 24 heures en présence de l'enzyme peroxydase et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Une série des dilutions ont été préparés vitamine C utilisé comme référence de volume 100µl, est ajouté à 1ml d'une solution d'ABTS<sup>•+</sup>.

Le mélange est incubé pendant 5 min à l'obscurité. Ensuite l'absorbance a été mesurée contre le blanc à 417 nm par spectrophotomètre (UV-Visible).

Le pourcentage (%) d'inhibition de piégeage du radical ABTS<sup>•+</sup> a été calculé par la formule suivante :

$$I \% = [\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}] \times 100.$$

# **Résultats et discussions**

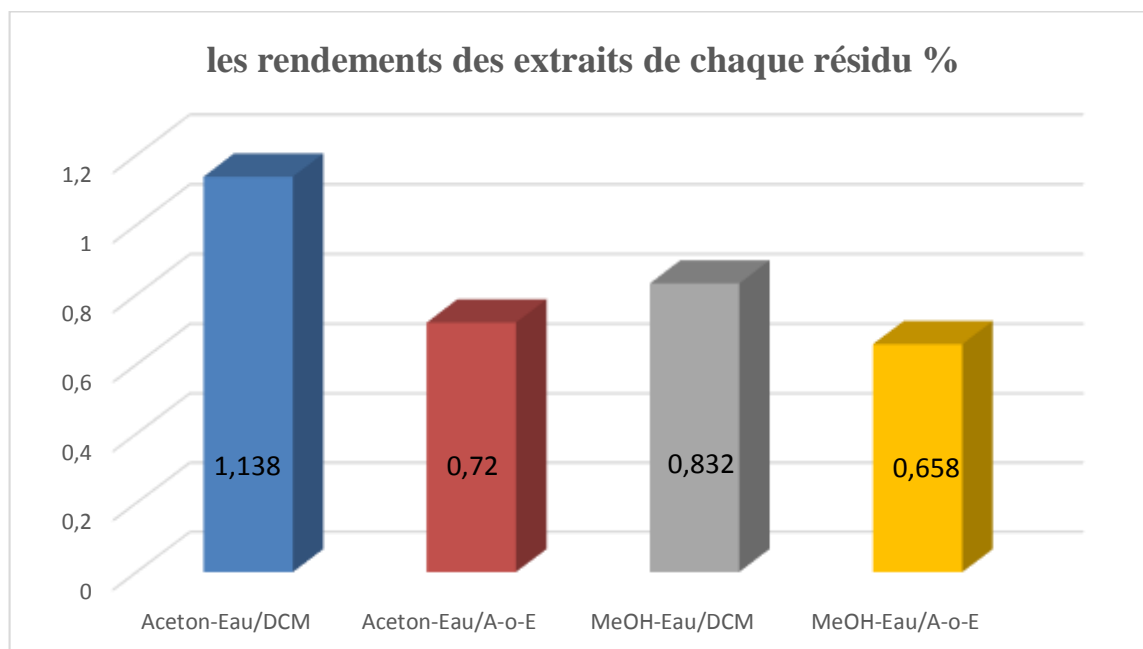
## 1. Résultats du rendement d'extraction

L'extraction des différents composés les plus abondants dans notre plante nous ont permis de calculer le rendement de chaque extrait. Le rendement, qui a été déterminé en masse d'extrait par rapport à matière végétale sèche, est exprimé en pourcentage. Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau 7

**Tableau 7** : les rendements des extraits avec les aspects de chaque résidu

Fractions	Rendement %	Aspect de résidu sec
<b>Acétone/H<sub>2</sub>O</b> Dichlorométhane	<b>1.138</b>	Pateux
<b>Acétone/H<sub>2</sub>O</b> Acétate d'éthyle	<b>0.72</b>	Pateux
<b>Méthanol/H<sub>2</sub>O</b> Dichlorométhane	<b>0.832</b>	Pateux
<b>Méthanol/H<sub>2</sub>O</b> Acétate d'éthyle	<b>0.658</b>	Pateux

Le rendement d'extraction est varié de 0,658% à 1,138 % dans des différentes fractions de solvants de la plante étudiée.



**Figure 14** : Histogramme représente les rendements des extraits de chaque résidu

La fraction de DCM de système Acétone-Eau présente le rendement le plus élevé avec un pourcentage de 1,138%. Par contre le rendement le plus faible a été marqué pour la fraction Acétate d'éthyle de système méthanol-Eau (0.658%).

On peut dire que l'extraction des composés phénoliques à partir de la matière végétale dépend de plusieurs facteurs qui contribuent à son efficacité :

- la méthode d'extraction,
- la granulométrie des particules,
- la durée d'extraction,
- la nature et le volume des solvants utilisés.

Le rendement de l'extraction varie en fonction de l'espèce végétale. L'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de récolte et séchage.

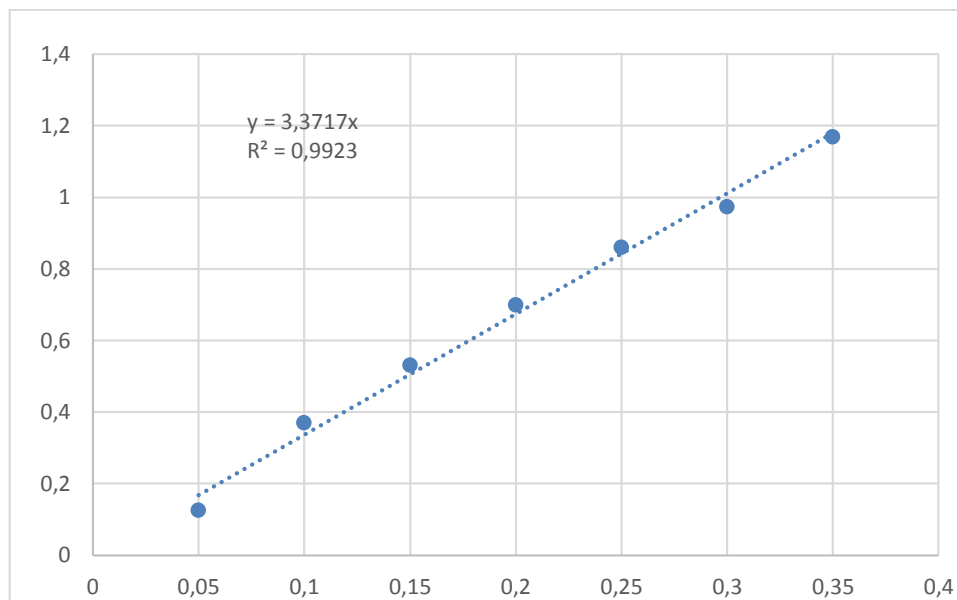
Le contenu de chaque espèce en métabolites et de la nature de solvant utilisé dans l'extraction ou fractionnement et de sa polarité. L'utilisation de différents solvants à polarité différente permet de séparer des composés selon leurs degrés de solubilité dans le solvant d'extraction (**Herzi, 2013**).

## **2. Résultats de dosage des métabolites secondaires**

### **2.1 Résultats du dosage des composés phénoliques**

Le dosage de polyphénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique en utilisant le réactif de *Folin-Ciocalteu*. La teneur en composés phénoliques de chaque fraction a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage (figure 16) qui est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec de la plante (mg EAG/g d'extrait sec).

Les teneurs en polyphénols totaux sont présentés dans le tableau 8.



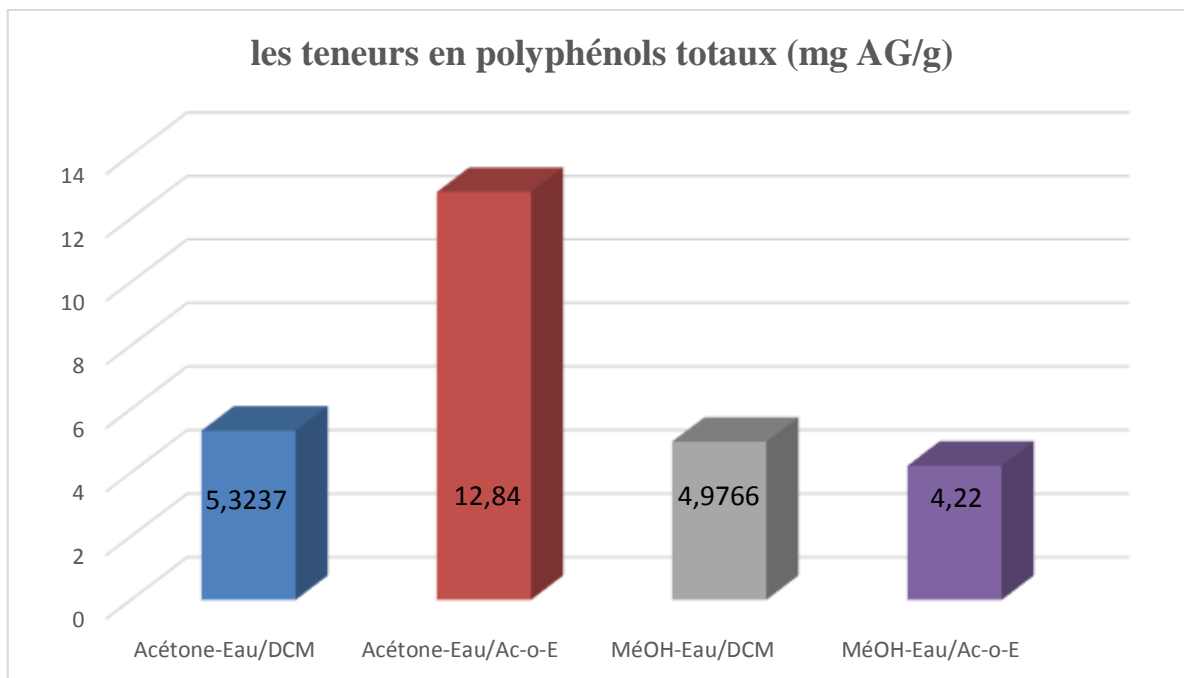
**Figure 15 :** La courbe d'étalonnage d'acide gallique

**Tableau 8 :** La teneur en polyphénols totaux (mg AG/g) de différentes fractions

Fractions	Composés Phénoliques (mg AG/g extrait sec)
Acétone/H <sub>2</sub> O Dichlorométhane	5.3237 ±0.0843
Acétone/H <sub>2</sub> O Acétate d'éthyle	12.8400 ±0.5650
Méthanol/H <sub>2</sub> O Dichlorométhane	4.9766 ±0.1594
Méthanol/H <sub>2</sub> O Acétate d'éthyle	4.2200 ±0.1960

Selon les résultats illustrées dans le tableau ci-dessus, on distingue que la fraction acétate d'éthyle d'acétone-eau possède la plus haute teneur en polyphénols totaux (12.84mgEAG/g extrait sec), suivi par la fraction de dichlorométhane d'acétone-Eau, de dichlorométhane de méthanol-Eau, et la fraction d'acétate d'éthyle de Méthanol-Eau avec des teneurs de 5,32mg EAG/g extrait sec, 4,9766mg EAG/g d'extrait sec et 4.22mg EAG/g d'extrait sec respectivement.

Les valeurs des teneurs sont regroupées dans l'histogramme suivant



**Figure 16 :** Histogramme représente les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits d'*Atractylis humilis* (mg AG/g)

Par ailleurs, le réactif de *Folin-Ciocalteu* utilisé dans ce dosage n'est pas spécifique des polyphénols, car il réagit également avec les protéines, les sucres réducteurs, l'acide ascorbique...etc. De telles interférences peuvent être négligées car ces composés sont en proportions trop faibles par rapport aux composés phénoliques non protéiques dans les extraits (**Boizot & Charpentier, 2006**). Les composés phénoliques sont généralement solubles dans les solvants organiques polaires et les solutions aqueuses, et sont peu solubles dans les solvants organiques apolaires (**Bruneton, 2009**).

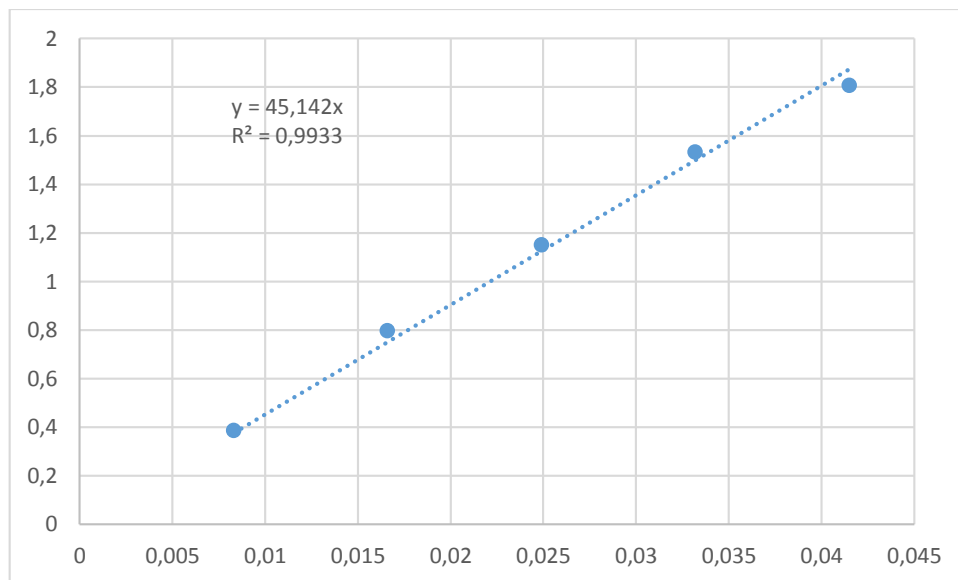
En comparant nos résultats avec les travaux de (**Sifouane, 2021**), nos résultats restent inférieurs avec les teneurs de leurs extraits : l'extrait AcOEt (140,97  $\mu\text{g}$  EAG/mg ex) et l'extrait n- BuOH (113,77  $\mu\text{g}$  EAG/mg ex) de la même espèce.

Les quantités de composés phénoliques et flavonoïdes dans les extraits bruts peuvent varier en fonction de divers facteurs environnementaux tels que la température, l'humidité, l'intensité lumineuse et les minéraux. Cependant, d'autres facteurs comme la culture et les lieux de culture, les procédures de stockage et les conditions opératoires d'extraction peuvent également affecter ces contenus

## 2.2 Résultat du dosage des flavonoïdes

Concernant la détermination de la teneur en flavonoïdes totaux de nos fractions, elle a été effectuée au moyen d'un dosage spectrophotométrie par la méthode d'AlCl<sub>3</sub>.

Les taux des flavonoïdes des extraits ont été calculés à partir de la courbe d'étalonnage tracée, en utilisant la Quercétine comme standard. Les résultats sont exprimés en termes de mg EQ/g d'extrait sec.

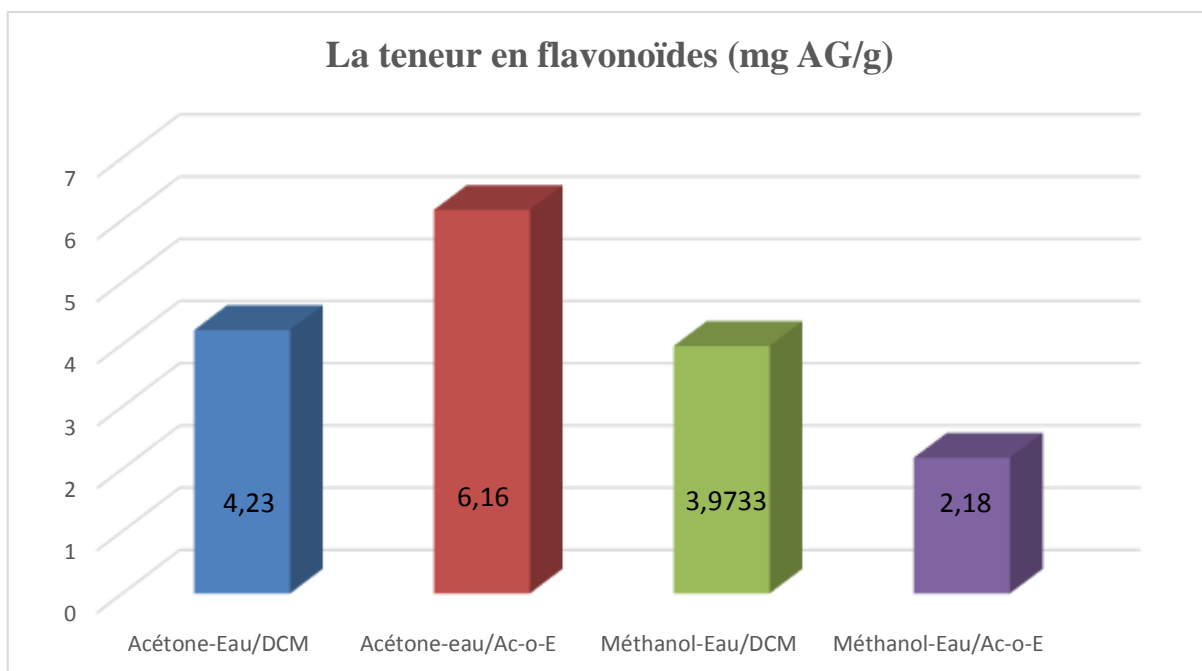


**Figure 17 :** La courbe d'étalonnage de Quercétine

Le tableau 9 représente la teneur des flavonoïdes dans différentes fractions.

**Tableau 9 :** La teneur en flavonoïdes (mg AG/g) de différentes fractions

Fractions	Composés flavonoïdes (mg Q/g extrait sec)
Acétone/H <sub>2</sub> O Dichlorométhane	<b>4.2300</b> ±0.104
Acétone/H <sub>2</sub> O Acétate d'éthyle	<b>6.1633</b> ±0.073
Méthanol/H <sub>2</sub> O Dichlorométhane	<b>3.9733</b> ±0.118
Méthanol/H <sub>2</sub> O Acétate d'éthyle	<b>2.18</b> ±0.4015



**Figure 18 :** Histogramme représente les teneurs en flavonoïdes (mg AG/g)

D'après les résultats, nous avons constaté que tous les fractions préparés contiennent des flavonoïdes mais à des concentrations très variables et un peu faibles. La fraction d'acétate d'éthyle de système acétone-eau présente la teneur la plus élevée en flavonoïdes (6.1633 mg EQ/g extrait sec), suivi par la fraction de dichlorométhane d'acétone-eau et la fraction de dichlorométhane de méthanol-eau (4.2300 et 3.9733 mg EQ/g extrait sec) par contre la fraction présentent acétate d'éthyle de système méthanol - eau un teneur faible en flavonoïdes avec un valeur (2.18mg EQ/g extrait sec).

Toujours si on compare nos résultats avec les travaux de (**Sifouane ,2021**), nos résultats reste inférieurs avec les teneurs en flavonoides de leurs extraits : l'extrait AcOEt (107,40 µg EAG/mg ex) et l'extrait n- BuOH (97,91 µg EAG/mg ex) de la même espèce.

Selon **Benazzouz & Benabderrahmane (2017)**, le contenu en polyphénol varie qualitativement et quantitativement d'une plante à autre, cela peut être attribué à plusieurs facteurs :

- ✓ Facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol agressions et maladies.
- ✓ Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante.

- ✓ La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux.

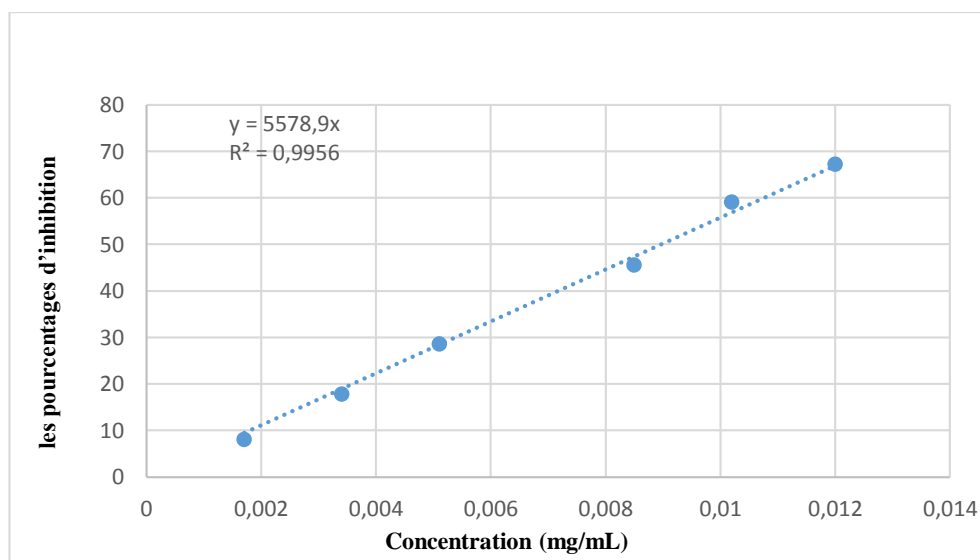
### 3. Résultats de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante *in vitro* de nos fractions a été évaluée par deux méthodes colorimétriques complémentaires à savoir le test de DPPH, ABTS, les résultats sont comparés aux étalons de référence

#### 3.1 Résultats de l'activité antioxydante par le test DPPH

La méthode DPPH a été largement appliquée pour estimer l'activité antioxydante, les mesures de densités optiques de nos extraits à une dilution et concentration bien déterminée nous ont permis de calculer le pourcentage d'inhibiteur nécessaire pour diminuer le taux des radicaux libres. En effet, plus le pourcentage d'inhibition est plus grande plus l'activité anti-radicalaire est importante.

Les résultats de l'activité antioxydante par le test de DPPH sont exprimés par **VCEAC** mg/g de l'extrait sec. Qu'on peut définir comme la quantité de vitamine C qui présente le même pouvoir antioxydant d'un gramme de l'extrait.



**Figure 19 :** Courbes représentes pouvoir antioxydant de Vitamine C -Test DPPH

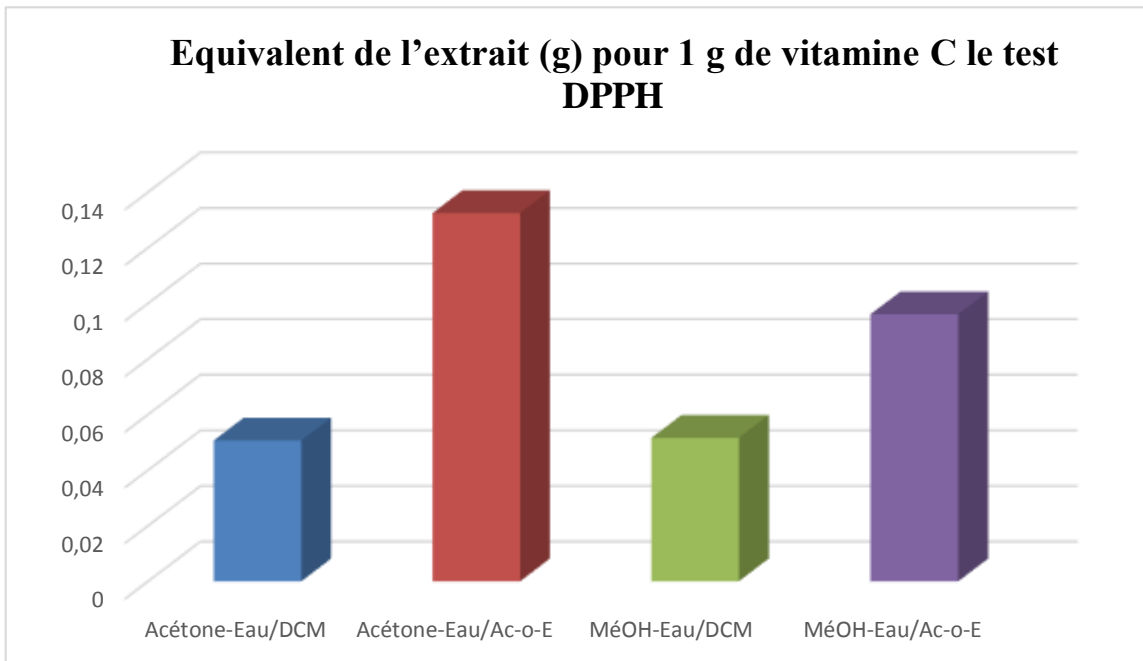
Pour comparer les pouvoirs antioxydant entre vitamine C et notre extraits les valeurs calculées de rapport de comparaison avec la vitamine C sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 10** : Equivalent de l'extrait (g) pour 1 g de vitamine C le test DPPH•

Extrait	Concentration g/mL	VCEAC	Interprétation
Acétone/H <sub>2</sub> O Dichlorométhane	0.00012	0.050644 ± 0.001183	1g de l'extrait a un pouvoir antioxydant équivalent de 0.050644 g de vitamine C
Acétone/H <sub>2</sub> O Acétate d'éthyle	0.00012	0.13246 ± 0.003143	1g de l'extrait a un pouvoir antioxydant équivalent de 0.13246 g de vitamine C
Méthanol/H <sub>2</sub> O Dichlorométhane	0.00012	0.051591 ± 0.001137	1g de l'extrait a un pouvoir antioxydant équivalent de 0.051591g de vitamine C
Méthanol/H <sub>2</sub> O Acétate d'éthyle	0.00012	0.096076 ± 0.001073	1g de l'extrait a un pouvoir antioxydant équivalent de 0.096076 g de de vitamine C

A la lumière des résultats dans le tableau ci-dessus l'extrait le plus puissant par le test de DPPH• c'est celui d'Acétate d'éthyle de système Acétone/H<sub>2</sub>O. Et le plus faible c'est l'extrait de Dichlorométhane toujours de système Acétone/H<sub>2</sub>O.

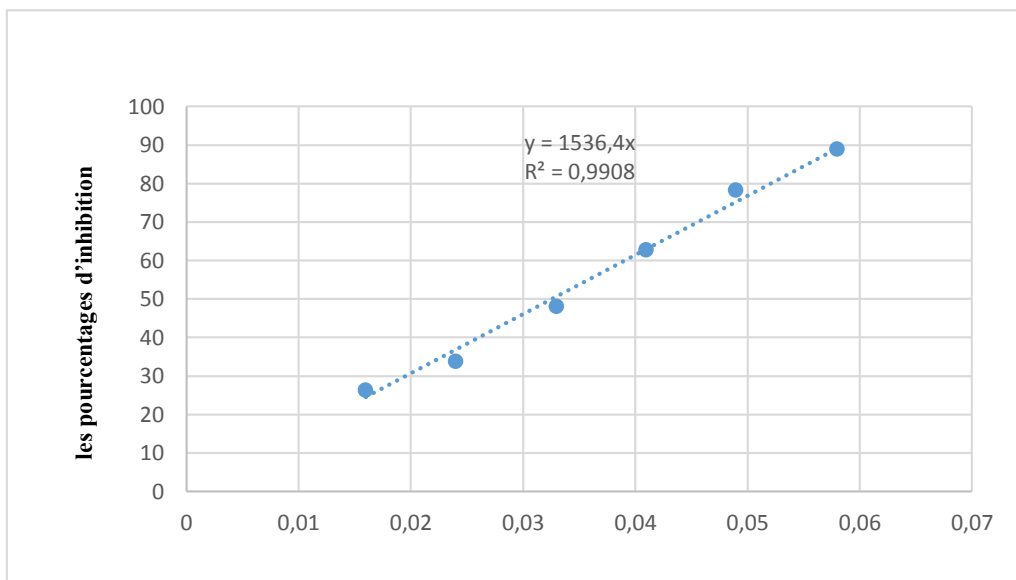
En comparant nos résultats avec les travaux de (Sifouane ,2021), leurs résultats montrent une activité importante de pouvoir antioxydant des extraits de AcOEt de n-BuOH avec des valeurs de IC<sub>50</sub> de 49,98 et 16,94 µg/mL des deux extraits respectivement



**Figure 20 :** Histogramme représente l'équivalent de l'extrait (g) pour 1 g de vitamine C le test DPPH

### 3.2 Résultats de l'activité antioxydante par Test ABTS

La méthode d'ABTS présente une coloration bleue turquoise lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes. La forme réduite confère à la solution une décoloration. La courbe d'inhibition de référence (vitamine C) et les valeurs de **VCEAC** mg/g de l'extrait sec sont représentées ci-dessous



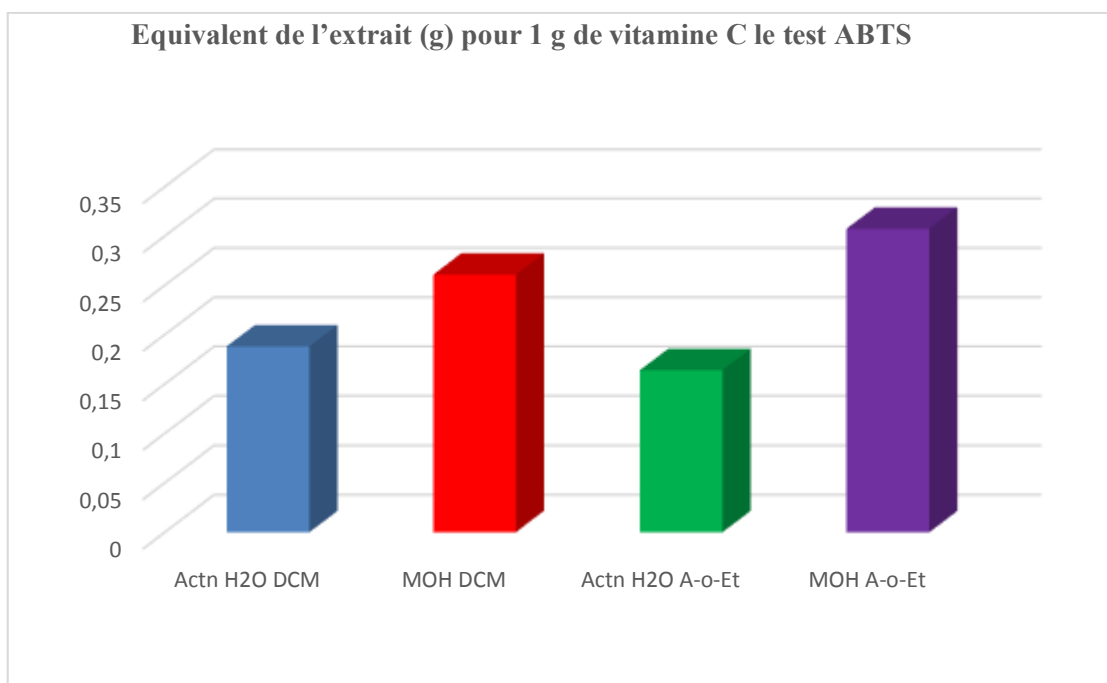
**Figure 21 :** Courbes représentes pouvoir antioxydant de Vitamine C -Test ABTS

**Tableau 11 :** Equivalent de l'extrait (g) pour 1 g de vitamine C le test ABTS

<b>Extrait</b>	<b>Concentration g/mL</b>	<b>VCEAC</b>	<b>Interprétation</b>
<b>Acétone/H<sub>2</sub>O Dichlorométhane</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.188070014± 0.005619</b>	<b>1g de l'extrait a un pouvoir antioxydant équivalent de 0.1880700g de vitamine C</b>
<b>Acétone/H<sub>2</sub>O Acétate d'éthyle</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.260904 ± 0.024804</b>	<b>1g de l'extrait a un pouvoir antioxydant équivalent de 0.260904 g de vitamine C</b>
<b>Méthanol/H<sub>2</sub>O Dichlorométhane</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.163904± 0.011159</b>	<b>1g de l'extrait a un pouvoir antioxydant équivalent de 0.163904 g de vitamine C</b>
<b>Méthanol/H<sub>2</sub>O Acétate d'éthyle</b>	<b>0.00012</b>	<b>0.307334 ± 0.022138</b>	<b>1g de l'extrait a un pouvoir antioxydant équivalent de 0.307334 g de vitamine C</b>

A la lumière des résultats dans le tableau ci-dessus l'extrait le plus puissant par le test de ABTS c'est celui d'Acétate d'éthyle de système Méthanol /H<sub>2</sub>O. et le plus faible c'est l'extrait de Dichlorométhane toujours de système Méthanol /H<sub>2</sub>O.

La variation des résultats des activités antioxydantes peut être expliquée par la différence de réactivité des extraits bruts due à leur composition chimique, leurs interactions synergétiques ou antagoniques et la polarité des systèmes



**Figure 22** : Histogramme représente l'équivalent de l'extrait (g) pour 1 g de vitamine C le test ABTS

# Conclusion

## Conclusion

Un grand nombre des plantes médicinales possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui sont utilisées dans plusieurs applications et dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, agriculture et cosmétologie. Depuis plusieurs années, l'utilisation de plantes médicinales ou de préparations à base de plantes connaît un succès croissant.

Aujourd'hui, plus de la moitié de la population mondiale pratique la phytothérapie.

Et comme la phytothérapie suscite un renouveau d'intérêt, nous sommes intéressés dans ce travail à l'effet de l'extrait phénolique de la plante médicinale *Atractylis humilis* et son activité antioxydante.

L'ensemble des résultats obtenus au cours des analyses quantitatives par spectrophotométrie UV/visible, nous a permis de trouver des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes très variables entre les différentes fractions, dont la fraction d'acétate d'éthyle de système acétone-eau possède la plus haute teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes avec des valeurs de (12.84mg EAG/g extrait sec) et (6.1633mg EQ/g extrait sec) respectivement.

L'activité antioxydante des différentes fractions de l'extrait de *Atractylis humilis* a été évaluée par deux méthodes : piégeage de radical libre DPPH, piégeage duradical-cationique ABTS. Pour le test de DPPH et le test ABTS, la capacité antioxydante la plus élevée a été observée dans la fraction acétate d'éthyle de système d'extraction acétone-eau et la fraction d'acétate d'éthyle de système méthanol-eau.

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

- Elargir le panel des activités antioxydants *in vitro* et *in vivo* et pourquoi pas d'autres tests biologiques : anticancéreuse et anti-inflammatoire.
- Caractériser et isoler les principes actifs responsables à ces propriétés pharmacologiques.

# **Références Bibliographiques**

## Références bibliographiques

Amarti F, Satrani B , Ghanmi M , Aafi A , Farah A, Lotfi A, El Ajjouri M , Guedira A et Chaouch A ,(2013), Activité antioxydante et composition chimique des huiles essentielles de quatre espèces de thym du Maroc, *Acta Bot. Gallica*, 158 (4), 513-523.

Bartosz, G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, 9(1), 5-21

Benavente-García, O.; Castillo, J.; Marin, F. R.; Ortuño, A. & Del Río, J. A. (1997). Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(12), 4505-4515.

Benazzouz, N. E. H. & Benabderrahmane, W. (2017). *Etude de l'activité antioxydante des extraits de feuilles d'aloë vera (l.) burm et de Solenostemma argel (delile) hayne.* (Matser - Microbiologie fondamentale et appliquée), Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem. 62p.

Bendif H, (2017), Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro des extraits actifs de quelques Lamiaceae: *Ajuga iva (L.) Schreb.*, *Teucrium polium L.*, *Thymus munbyanus subsp. Coloratus* (Boiss. et Reut.) Greuter et Burdet et *Rosmarinus eriocalyx* Jord et Furr, (thèse de doctorat), l'Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger, 154pp.

Benhammou, N. (2011). *Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien.* (Doctorat en Biologie), Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen. 174p.

Benyamina- Behadada A, (2017), Etude des effets de l'extrait d'*Artemisia absinthium L.* Chez les rats intoxiqués au plomb. Etude neurocomportementale, biochimique et in silico de composés d'*Artemisia absinthium L.* A potentiel thérapeutique ciblant les récepteurs du système Nerveux Central, (thèse de doctorat), Université d'Oran 1, 213 pp.

Benzie, I. F. & Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.

Blandine G, (2006), Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®, (thèse de doctorat), Université Joseph Fourier - Grenoble 1, 195 pp.

Boizot, N. & Charpentier, J.-P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA*, In: Numéro spécial, 79-82.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technology*, 28, 25-30.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technology*, 28, 25-30.

Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales* (4e ed.). Paris: Lavoisier, 1269p.

Buchanan, B.; Gruissem, W. & Jones, R. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists. Courier Companies. Inc. Waldorf, MD.

Cao, G.; Alessio, H. M. & Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(3), 303-311.

Carange J, (2010), Rôle Antioxydant et Anti-apoptotique des Brassinostéroïdes, une nouvelle stratégie de Neuroprotection, Université du Québec, 125 pp.  
(Chabani et al., 2016)

Chanforan, C. (2010). Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. Thèse de Doctorat : Université D'AVIGNON et des PAYS de VAUCLUSE.

Chibani S, (2013), Etude phytochimique et biologique de six plantes médicinales de l'est Algérien, (thèse de doctorat), Université Constantine 1, 199 pp.

Chae, S. C.; Lee, J.-H. & Park, S. U. (2013). Recent studies on flavonoids and their antioxidant activities. *EXCLI journal*, 12, 226.

Chen, Y.-H.; Yang, Z.-S.; Wen, C.-C.; Chang, Y.-S.; Wang, B.-C.; Hsiao, C.-A. & Shih, T.-L. (2012). Evaluation of the structure–activity relationship of flavonoids as antioxidants and toxicants of zebrafish larvae. *Food chemistry*, 134(2), 717-724.

Djeridane, A.; Yousfi, M.; Nadjemi, B.; Boutassouna, D.; Stocker, P. & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654-660.

Divya, N.; Thenmozhi, S.; Sureshkumar, B. & Selvan, M. (2014). Antibacterial activity of medicinal plant against wound infected pathogens. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(11), 4942.

Fabrice R, Karine B, Jean-Michel G, Jean-François G, Roland F, Michel B, Catherine G, (2009), Evaluation et correction du stress oxydatif du porcelet en post-sevrage, *Journées Recherche Porcine*, 41, 173-178.

Fraga, C. G. (2009). Plant phenolics and human health : Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology. *John Wiley & Sons Edition*, pp 5-13.

Guillouty, A. (2016). *Plantes médicinales et antioxydants*. (Doctorat en Pharmacie), Université Toulouse III Paul Sabatier. (2016/TOU3/2103): 102p.

Gunawardena, D ; Govindaraghavan, S. & Münch, G. (2014). Anti-inflammatory properties of cinnamon polyphenols and their monomeric precursors *Polyphenols in Human Health and Disease* (pp. 409-425): Elsevier.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problem and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246, 501-514.

Herzi, N. (2013). *Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO<sub>2</sub>-supercritique et des techniques conventionnelles*. (Doctorat de l'Université de Toulouse), INPT. 185p.

Hoffmann, D. (2003). Medical Herbalism : The Science and Practice of Herbal Medicine. *Edition Inner Traditions / Bear & Co.*, p 90.

Lacolley, P.; Babuty, D.; Boulanger, C.; Ghaleh, B.; Loirand, G.; Pinet, F. & Samuel, J. (2008). *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux* (1 ed.): JOHN LIBBEY EUROTEXT, 664p.

Lee, J.; Koo, N. & Min, D. B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 3(1), 21-33.

Leverve, X.; Cosnes, J.; Erny, P. & Hasselmann, M. (2001). *Traité de nutrition artificielle de l'adulte* (2nd ed.): Springer Paris, 931p.

Lewin, G.; Magin, D.; Ismailov, D. Y. & Popov, I. (2000). Photochemiluminescence as a tool to determine the antioxidant activity in biological systems. Mathematic modeling. *Voprosy meditsinskoi khimii*, 46(4), 419-426.

Li, C.; Oldham, C. D. & May, S. W. N. (1994). N-Dimethyl-1,4-phenylenediamine as an alternative reductant for peptidylglycine. Alpha-amidating mono-oxygenase catalysis. *Biochemistry Journal*, 300, 31-36.

Mabry, T.; Markham, K. & Thomas, M. (1970). *The systematic identification of*

*flavonoids*. 1970. Paper presented at the Library of Congress Catalog Card.

Macheix, J. J.; Fleuriot, A. & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique* (P. p. e. u. romandes Ed. 1er ed.)p.

Magali M,(2013), Origine et conséquences du stress oxydant, (doctorat en pharmacie), école nationale vétérinaire d'alfort, 113 pp.

Milane, H. (2004). *La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques*. (Thèse de doctorat), Université Luis Pasteur (Strasbourg 1). p.

Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan, V. & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84, 407-412.

Mladěnka, P.; Zatloukalová, L.; Filipský, T. & Hrdina, R. (2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(6), 963-975.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J Sci Technol*, 26(2), 211-219.

Opara, E. C. (2002). Oxidative stress, micronutrients, diabetes mellitus and its complications. *The journal of the Royal Society for the Promotion of Health*, 122(1), 28-34.

Oueslati K, 2017, Caractérisation et modélisation de la production des radicaux libres oxygénés par la chimie de fenton dans un milieu mimétique de la viande, (thèse de doctorat), Université Clermont auvergne ,210 pp.

Pasquier, C. (1995). Stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires*, 1995(276), 87-92.

Pastre, J. (2005). *Interêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques*. (DOCTEUR VÉTÉRINAIRE), Université Paul-Sabatier de Toulouse. Retrieved from [http://oatao.univ-toulouse.fr/1341/1/celdran\\_1341.pdf](http://oatao.univ-toulouse.fr/1341/1/celdran_1341.pdf) (2005 – TOU 3 – 4116): 120p

Pincemail, J., Degruene, F., Voussure, S., Malherbe, C., Paquot, N. & Defraigne, J.-O. (2007). Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme* 21, 66–75.

Sánchez- Moreno, C. & Larrauri, J. A. (1998). Main methods used in lipid oxidation determination. *Food Sci Technol Int*, 4, 391-399.

Slinkard, K. & Singleton, V. L. (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.

Tomas-Barberan, F. A., Ferreres, F. & Gil, M. L. (2000). Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing. *Atta-ur-Rahman (Ed.) Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 23, p747

Vierling, E. (2008). Aliments et boissons : filières et produits. *Wolters Kluwer France Edition*, p 153.

Wayner, D. D. M.; Burton, G. W.; Ingold, K. U. & Locke, S. (1985). Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS letters*(187), 33-37.

Winston, G. W.; Regoli, F.; Dugas, A. J.; Fong, J. H. & Blanchard, K. A. (1998). A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radic Biol Med*, 24, 480-493.