



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Amar Thelidji- Laghouat

FACULTE : Science

DEPARTEMENT : Biologie

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : DAOUDI Fatiha et CHERAIF Hadjer

DOMAINE : Science de nature et de vie

FILIERE : Biologie

OPTION : Biochimie des produits naturels

Thème

**L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits
méthanolique et acétonique d'espèce *Thapsia garganica***

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	qualité
KRAZA Lamia	Président
ZAKHROUF Zohra	Examinatrice
NEBEG Halima	Rapporteur
SIFI Ibrahim	Co-rapporteur

Promotion : Juin-2015

Remerciement

*Touts d'abord, nous remercions dieu qui a donné la force et
courage dans la vie et tout an long
de notre cycle des études*

*Un grand merci a madame NEBEGE Halima et monsieur
SIFI Ibrahim qui sont dirigé ce travaille, pour sa gentilleuse,
sa patience et sa disponibilité, merci infiniment*

*Enfin, nous remercions tous ceux qui ont
contribuons de près ou loin à l'élaboration de ce travaille.*

DEDICACE

Je dédie ce travail :

En premier lieu, nous tenons à remercier notre DIEU, notre créateur pour nous avoir donné la force pour accomplir ce travail.

A Mama compassion et mon très cher papa qui on sacrifie de leur vie pour moi, que dieu les protège, les prêtez bonne santé et longue vie.

A ma chère marie ; Nabil et toute sa famille

À mes sœurs : Zohra et son marie, Zineb, Amal,

À mes frères ; Bachir, Nasser, Anwar,

Aux petites enfants: Imane, Fatna, Ali, Mohamed, Ritaje,

A ma collègue le binôme Hadjer qui m'assistent avec moi dans ce travail.

A tous mes professeurs de ma carrière académique sans exception.

Fatiha

Merci

DEDICACE

*Je dédie ce travail à mes parents pour leur innombrables
et sacrifiées*

Mes frères et ma sœur chacun a son nom

Tous les profs de trajectoire de mon étude

A ma collègue Fatima

A mes amies d'études d'universitaire

Hadjer

Merci

Résumé :

Dans le cadre de la recherche de nouveaux antioxydants naturels, nous avons procédé à l'étude des extraits méthanolique et acétonique des fruits de *Thapsia Garganica* collectés à partir de la wilaya de Stif. Les résultats obtenus montrent que ces extraits ont des teneurs en phénols totaux varient entre 3,75 à 8,41 mg/g. Les teneurs en flavonoïdes varient entre 0,87 à 2,42. l'évaluation de l'activité antioxydant est réalisée par le test de DPPH et les résultats sont exprimés par les valeurs d'EC₅₀ montrent une corrélation importante entre le taux de flavonoïdes et les valeurs obtenus.

Mots clés : l'activité antioxydante, *Thapsia Garganica* , phénols, Flavonoïdes

ملخص:

في إطار البحث عن مضادات أكسدة جديدة أجرينا دراسة على مستخلص محلول الميثانول والأسيتون من بذور عشبة بونافع المقتطفة من ولاية سطيف، وقد أشارت النتائج إلى أن هذه المستخلصات محتواها الإجمالي من الفينولات تراوح ما بين 3.71 إلى 8.41 ملغ / غ. بينما تراوحت قيمة الفلافونيدات من 0.87 إلى 2.42 ملغ / غ. تم إجراء تقييم لنشاط مضادات الأكسدة من خلال اختبار DPPH وتم التعبير عن النتائج بـ EC₅₀ التي تبين وجود علاقة إيجابية بين مستوى فلافونيدات والقيم التي تم الحصول عليها. الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للأكسدة، الفينول، الفلافونيدات. البونافع

Abstract:

Within the framework of research on natural antioxidants, we conducted a study of methanol and acetone extracts of fruit *Thapsia Garganica* collected from the province of Stif. the Results show that these extracts have contents of total phenols vary between 3.75 to 8.41 mg / g. The levels of flavonoids ranged from 0.87 to 2.42. Evaluation of the antioxidant activity is performed by the DPPH test and the results are expressed as EC₅₀ show a significant correlation between the level of flavonoids and the values obtained.

Keywords: antioxidant activity, *Thapsia Garganica*, phenols, flavonoids.

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AGPI : Les acides gras polyinsaturés

ACT : Acétone

Al Cl₃ : Trichlorure d'aluminium

BHA : Butyl hydroxy anisole

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

EC₅₀ : Concentration nécessaire pour inhiber de 50% du radical DPPH

ERO : Les espèces réactives oxygénées

MeOH : Méthanol

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NO[•] : Le radical monoxyde d'azote

NO₂[•] : Le radical dioxyde d'azote

Na₂ CO₃ : Carbonate de sodium

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

ROO[•] : Le radical peroxy

RNS : Espèces réactives de l'azote

SODs : Le superoxydedismutase

SH ; Groupement sulfhydryle

OH[•] : Radical hydroxyl

O₂[•] : Le radical superoxyde

ONOO⁻ : Ion peroxydinitrite

λ : La longueur d'onde d'absorbance

Liste des figures

Figure 1 : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants.....	4
Figure 2: Les systèmes de défense contre les radicaux libres.....	10
Figure 3 : Structure chimique de base des flavonoïdes.....	14
Figure 4 : Photo de <i>Thapsia Garganica</i>	17
Figure 5: Représentation schématique des étapes d'extraction des phénols.....	20
Figure 6: Photo illustre le Rota-vapeur.....	21
Figure 7: La réduction du radical libre DPPH [•]	23
Figure 8: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (mg/ml).....	26
Figure 9 : Courbe d'étalonnage de la quercitine (mg/ml).....	27
Figure 10 : Histogrammes présentant les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes de différents échantillons (MeOH, MeOH /ACT, ACT).....	28
Figure 11: Représentation graphique de corrélation entre les phénols totaux et flavonoïdes.....	29
Figure 12 : Courbe représentative du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations	30
Figure 13 : Pouvoir antioxydant de Trolox, Vitamine C et BHA par le test DPPH.....	31
Figure 14: Classement croissant des valeurs EC ₅₀ (extraits et standard)	32
Figure 15 : Représentation graphique de la corrélation entre la teneur en polyphénols et les valeurs d'EC ₅₀	33
Figure 16 : Représentation graphique de la corrélation entre les flavonoïdes et les valeurs d'EC ₅₀	33

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principales affections liées a la production des EOR.....	5
Tableau 2 : Exemples d'antioxydants retrouvés dans les aliments.....	9
Tableau 3 : Structure des squelettes des polyphénols.....	12
Tableau 4 : Activité biologique de quelque composé phénolique.....	13
Tableau 5 : Source alimentaire des flavonoides.....	15
Tableau 6 : Aspect physique, couleur et le rendement des extraits bruts.....	25
Tableau 7 : La teneur en phénols totaux (mgEAG/g d'extrait sec).....	26
Tableau 8 : La teneur en flavonoïdes (mgEQ/g d'extrait sec).....	28
Tableau 9 : Les résultats de test DPPH (valeurs d'EC ₅₀ en µg/ml)	32

Introduction

Les plantes médicinales sont largement utilisées soit pour la prévention, soit pour le traitement curatif de plusieurs maladies .Parmi les propriétés derrière ces vertus, l'activité antioxydant tient une place de premier ordre.

Beaucoup de plantes médicinales contiennent un large spectre des substances phytochimiques qui sont des sources des antioxydants naturels tel que α tocophérols , les acides phénoliques , les flavonoïdes, et les tanins . (Lee *et al.* 2004).

Les polyphénols sont en effet doués de multiples vertus thérapeutiques, ils jouent un rôle très important, principalement, dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires et la peroxydation lipidique. Expliquant de ce fait leur grande utilisation dans la fabrication des médicaments. Ils interviennent aussi dans la protection des plantes contre les différentes attaques microbiennes (Bruneton. 1999).

L'utilisation de ces substances naturelles ne se limite pas seulement au domaine thérapeutique mais aussi au domaine industriel car elles sont de plus en plus préférées à l'usage des antioxydants synthétique tels que le BHT (Butyl-hydroxytoluène) , BHA (Butyl-hydroxyanisole) (Amarowicz *et al.* 2000).

Thapsia Garganica.L 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, cette plante a fait l'objet de plusieurs études scientifiques ces dernières années. Ces études ont montré qu'elle est une source importante de composés bioactifs (Avatoa .2001)

Ce travail est une contribution pour une meilleure connaissance de cette plante médicinale, notre objectif est donc d'apporter un fondement scientifique à ces utilisations traditionnelle par des études expérimentales, il comporte :

- ✚ Une analyse bibliographique sur l'activité antioxydante, les antioxydants ainsi qu'une bibliographie sur la plante étudiée ;
- ✚ La partie expérimentale avec la description du matériel végétal et les méthodes utilisées .Celles- ci comprennent :
 - Extraction des polyphénols par plusieurs solvants ;
 - Quantification des polyphénols et des flavonoïdes ;
 - Evaluation de l'activité antioxydant par le test de DPPH.
- ✚ Résultat et discussion
- ✚ Conclusion

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

1. Les plantes médicinales

1.1. Historique

Depuis toujours les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à leur richesse de ce qu'on appelle les métabolismes secondaires. L'utilisation des plantes liée à l'expérience et la transmission des informations glanées au cours du temps font que certains hommes deviennent capables de poser un diagnostic et de retrouver la plante capable de guérir le malade (**Fouché et al. 2000**)

Les populations babyloniennes et sumériennes utilisaient les plantes pour se soigner : 600 tablettes d'argiles mentionnent 1000 plantes pour leurs vertus curatives et plus de 800 remèdes sont décrits par les Egyptiens. (**Fouché et al. 2000**) Le soin de la peau a commencé 3.000 ans avant naissance du Christ, quand les Egyptiens ont enregistré en forme hiéroglyphique le soin de la peau sur des peintures de mur de temple (**Dwek. 2002**).

Ibn sina écrivait le « canon de médecine » ce livre survivra de base à l'enseignant de la médecine dans les universités de Louvain et de Montpellier jusqu'aux environs 1650, ibn al baytar (1197-1248) rédigea le très complet *sommes des simples* ; ce livre contenait une liste de 1400 préparations et plantes médicinales dont un millier était connues des auteurs grecs (**Fouché et al. 2000**)

1.2. Définition des plantes médicinales

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (**Farnsworth et al. 1986**).

Environ 35000 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. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (**Elqaj et al. 2007**)

1.3. Domaines d'application des plantes médicinales

Les plantes médicinales sont employées dans plusieurs domaines, par exemple :

❖ En médecine

- Plusieurs plantes sont utilisées en tant que médecine pour l'homme par exemple :
Zygophyllum album : ses extraits aqueux sont utilisés dans le traitement des diarrhées et du diabète, Ils antiseptiques, et stimulants (**Atta et al. 2004**).
- *Solanummelongena l* : Traitement de l'asthme, des bronchites et de choléra' les infections de la peau, et antirhumatiques (**Gardés et al. 2003**
- *Azadirachta indica* ; contre le diabète (*Azadirachta indica*). (**Bourass et Houchi. 2013**)
- *Thapsia Gareganica* ; traitement de cancer de prostate (**Isaac. 2005**)

❖ En alimentation

Les épices et les herbes aromatiques utilisées dans l'alimentation sont pour une bonne part responsable de plaisir de la table, considérée comme condiments et aromates. La popularité des épices et herbes aromatiques a été et reste très liée à leurs propriétés organoleptiques. (**Bourass et Houchi. 2013**)

❖ En cosmétique

Des extraits de plantes sont intégrés dans plusieurs produits de beauté, parfums et articles de toilette et dans des produits d'hygiène. (**Bourass et Houchi. 2013**)

2. le stress oxydatif

2.1. Définition

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les systèmes oxydants et les capacités anti oxydantes de l'organisme (**figure 1**), ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles (**Pincemail et al. 1999**).

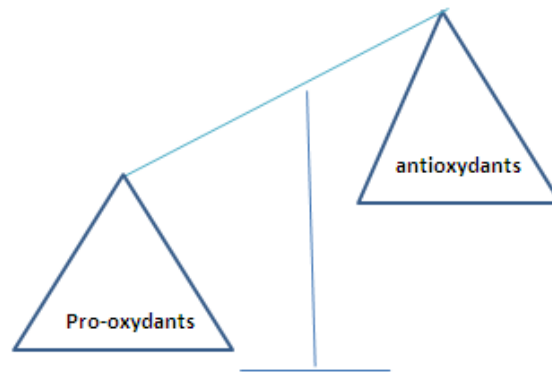


Figure 1 : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants (Pincemail et al. 1999).

2.2. Les origines de stress

Un état de stress oxydant existe lorsqu'au moins une des trois conditions suivantes est présente:

- ❖ Excès des espèces réactives d' O_2 , N_2 ou Cl_2
- ❖ Défenses insuffisantes (endogènes et exogènes) c'est-à-dire nos défenses d'antioxydant proviennent d'antioxydants contenus dans notre alimentation et par les apports fabriqués par notre propre organisme les deux insuffisant
- ❖ Mécanismes de réparation insuffisants c'est à dire réparation tissulaire et cellulaire insuffisants d'après l'action de l'antioxydant. (Dacosta. 2003).

2.3. Les radicaux libre

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron célibataire sur son couche externe, cette propriété rend ces éléments très réactifs, et instables du fait de la tendance de cet électron, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (Dacosta. 2003).

2.3.1. Espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives oxygénées (ERO) incluant les radicaux libres comme le radical hydroxyl($OH^\bullet$), le radical superoxyde($O_2^\bullet$) et sa forme protonnée($HO_2^\bullet$), le radical peroxy($ROO^\bullet$) et les espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet sont des molécules hautement réactives (Chu et al. 2010).

2.3.2. Espèces réactives de l'azote (RNS)

Les espèces réactives du nitrogène incluent le radical monoxyde d'azote ($\text{NO}^\cdot$), l'anion peroxynitrite (ONOO^-), le radical dioxyde d'azote ($\text{NO}_2^\cdot$) et d'autres oxydes d'azote sont produits par la réaction du monoxyde d'azote avec $\text{O}_2^\cdot$ (Wiseman et Halliwell. 1996)

2.4. Les conséquences biologiques de stress oxydatif

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreuses pathologies (Tableau 1) comme facteur déclenchant ou associé à des complications (Favier. 2003). Il peut être associé à l'athérosclérose, l'asthme, l'arthrite, la cataractogénèse, l'hyperoxie, l'hépatite, l'attaque cardiaque, les vasospasmes, les traumatismes, les accidents vasculaires cérébraux, les pigments d'âge, les dermatites, les dommages de la rétine, les parodontites et les cancers (Cohen *et al.* 2000). Néanmoins, la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux (Favier. 2003)

Tableau 1 : Les principales affections liées à la production des ERO (Meziti. 2008)

<i>Pathologies</i>	<i>Références</i>
Lésions de répercussion post-ischémique	(Zweier et Talukder. 2006)
Maladies auto-immunes	(Halliwell et guetteridge. 1999)
Arthrite rhumatoïde	(Ahsan <i>et al.</i> 2003)
Maladies inflammatoires	(Dension et Afanas'ev. 2003)
Maladies d'Alzheimer, de parkinson	(Sorg. 2004)
Emphysème	(Iechuer-Michel <i>et al.</i> 2001)
Diabète sucré	(Pal Yu. 1994)
Certains cancers	(Valko <i>et al.</i> 2007)
Anémie drépanocytaire	(Martinez-Cayuela. 1995)

2.4.1. Oxydation de l'ADN

Le dommage oxydatif aux acides nucléiques inclue l'addition des bases et des groupes de sucres, cassures au niveau de la simple et double hélice ainsi que la formation des liaisons croisées avec d'autres molécules (**Beckman et Ames. 1998**). La thymine et la guanine sont plus susceptibles aux modifications suivies de la cytosine et l'adénine. La thymine glycol est le produit d'oxydation majeur, et sa présence dans l'urine sert d'indicateur du dommage de l'ADN. La réduction de la guanine résulte de l'ouverture de sa structure cyclique formant le formamidopyrimidine. Son oxydation, cependant, conduit à la formation du 8-hydroxy-2' déoxyguanosine, un produit majeur dont la présence dans l'urine sert de bio-marqueur du dommage oxydatif de l'ADN et qui est capable d'induire des mutations spécifiques conduisant au développement du cancer (**Pincemail et al. 1999**).

2.4.2. Oxydation des glucides

Le glucose peut s'oxyder en présence des ions métalliques conduisant à la libération des cétoaldéhydes, H_2O_2 et $OH\cdot$ 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**)

2.4.3. 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. L'oxydation protéique catalysée par les ions métalliques conduit à l'addition de groupes carbonyles, la formation des liaisons croisées et la fragmentation des chaînes peptidiques. Les produits de la peroxydation lipidique peuvent réagir avec le groupement sulphydryle de la cystéine ou avec les acides aminés basiques (histidine, lysine) affectant leurs caractéristiques biologiques (**Ahsan et al. 2003**). Le dommage oxydatif des protéines peut affecter la fonction des récepteurs, des enzymes et des protéines de transport, etc., et peut même générer de nouveaux antigènes qui provoquent des réponses immunitaires (**Aruoma. 1999; Favier. 2003**). Les produits du dommage oxydatif des protéines peuvent

contribuer au dommage secondaire comme l'inactivation des enzymes de réparation de l'ADN et la perte de fidélité des ADN polymérases (**Aruoma. 1999**).

2.4.5. Oxydation des lipides

Les acides gras polyinsaturés (AGPI), une des principaux constituants lipidiques des membranes cellulaires et des lipoprotéines, sont la cible privilégiée des EOR. Leurs produits d'oxydation peuvent participer en tant que second messager à la régulation de fonctions métaboliques, de l'expression des gènes et de la prolifération cellulaire. Ils peuvent aussi, et surtout, se comporter comme des substances toxiques responsables des dysfonctionnements et d'altérations cellulaires (perte d'acides gras polyinsaturés, diminution de la fluidité membranaire, modification de l'activité des enzymes et des récepteurs membranaires) (**Beckman et Ames. 1998 ; Lehucher-Michel. 2001**).

3. Les antioxydants

3.1. Définition

Pour contourner les dommages causés par les ERO, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants. Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible. Ainsi, les antioxydants servent à contrôler le niveau des espèces réactives pour minimiser le dommage oxydatif (**Halliwell et Gutteridge. 2007**).

Un bon antioxydant doit respecter quelques critères:

- ❖ Être capable de piéger directement et spécifiquement les radicaux libres
- ❖ Chélater des ions de métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^{+})
- ❖ Interagir avec d'autres antioxydants
- ❖ Avoir un effet positif sur l'expression génique
- ❖ Être rapidement absorbé
- ❖ Avoir une concentration qualifiée de « physiologique » dans les tissus et les fluides biologiques
- ❖ Être efficace en milieu aqueux et/ou dans le milieu membranaire (**Valko et al. 2004**)

3.2. Utilisation des antioxydants

- ❖ Dans l'industrie chimique : pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie pour protéger les métaux de l'oxydation.
- ❖ Dans l'industrie agro-alimentaire : pour éviter le rancissement des corps gras.

(Valko *et al.* 2004)

3.3. Classification des antioxydants

3.3.1. Les antioxydants exogènes

Sont les antioxydants naturels présent dans l'alimentation (**Tableau 2**), les fruits et les légumes sont généralement riches en antioxydants naturels tels que :

- ❖ **La vitamine E** (tocophérol) prévient la peroxydation des lipides membranaires in vivo en capturant les radicaux peroxydes, Elle est retrouvée dans les huiles végétales, dans les noix, les amandes, les graines, le lait, les œufs et les légumes à feuilles vertes (**Aouissa. 2002**).
- ❖ **Le β carotène** possède, outre l'activité provitaminique A, la capacité de capter l'oxygène singulet. Il est présent dans les légumes verts, les épinards, les carottes, la papaye et d'autres fruits jaunes (**Aouissa. 2002**).
- ❖ **La vitamine C** est un puissant réducteur et joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E, elle est présente dans les légumes, le chou, le persil, les agrumes, le kiwi (**Sies et Stahl. 1995**).
- ❖ **Le sélénium** est un antioxydant essentiel. Il agirait comme une coenzyme pour la glutathion Peroxydase, enzyme antioxydante capable de réduire les lipides oxydés des membranes cellulaires. On le trouve dans la viande, le poisson, et les céréales (**Sies et Stahl. 1995**).
- ❖ **Les Composés phénoliques** ces substances sont très utilisées dans la médecine traditionnelle et moderne pour leurs activités antioxydantes (**Rice-Evans et al. 1996**). Vue leurs propriétés redox les plus élevées, les polyphénols agissent comme des agents réducteurs, donneur d'hydrogène en piégeant les radicaux libres et en

chélatant les ions (Rice-Evans *et al.* 1995; Cook et Samman, 1996; Valko *et al.* 2006).

Tableau 2 : Exemples d'antioxydants retrouvés dans les aliments (Bougandora. 2011)

Antioxydant	Protège contre	Sources
Vitamine C	Les maladies cardiovasculaires, Les cataractes, et certains types de cancers	Agrumes, tomate, melon, kiwi, poivron, brocoli
Vitamine E	Les maladies de prostate, ralenti la maladie d'Alzheimer	Noix et graines, huiles, fruit et légumes
Caroténoïdes	Les cancers en particulier le cancer du poumon et les maladies cardiovasculaires	Carotte, patate douce, courge, brocoli, chou frisé, épinard, fruité, abricot, pêché
Flavonoïdes	Cancer	Bleuet, cerise, canneberge, mure, cassis, prune, raisin rouge
Sélénium	Réduction de l'incidence des cancers de la prostate, du colon et du poumon	Céréales, complètes, noix, oignon, ail, viande

3.3.2. Les antioxydants Endogènes

Ce sont les antioxydants enzymatiques tels que ;

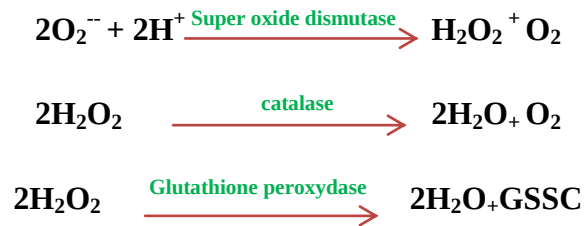
- ❖ **Le superoxyde dismutase (SODs) ;** une classe d'enzymes apparentées qui catalysent la dégradation de l'anion superoxyde en O_2 et H_2O_2 , Les cellules humaines possèdent une enzyme SOD mitochondriale ayant le manganèse dans son site actif (MnSOD) ainsi qu'une enzyme SOD cytosolique et une SOD extracellulaire ayant le cuivre et le zinc (Cu-ZnSOD) comme coenzymes (Favier. 2003).
- ❖ **les catalases et les peroxydases ;** Les catalases sont des enzymes localisées dans les peroxysomes et catalysent la conversion du H_2O_2 en H_2O et O_2 . (Blokhina *et al.* 2003).
- ❖ **les glutathion peroxydases ;** éliminent le H_2O_2 par son utilisation dans l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) (Aruoma. 1999).

3.4. Mode d'action des antioxydants

Selon leurs modes d'actions, les antioxydants sont classés en deux catégories :

3.4.1. Système de défense primaire

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces. Cette ligne de défense est constituée de superoxyde dismutase (SOD), de catalase et de peroxydase (Favier. 2006). Ces enzymes antioxydantes permettent l'élimination des radicaux libres primaires, selon les réactions suivantes :



De ce fait elles préviennent la formation des radicaux libres organiques à partir des lipides membranaires notamment et contribuent donc à la protection des membranes de la peroxydation lipidique (Dacosta. 2003).

3.4.2. Système de défense secondaire

Ce sont des molécules exogènes. Contrairement aux enzymes antioxydantes, une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes (Figure 2) (Dacosta. 2003).

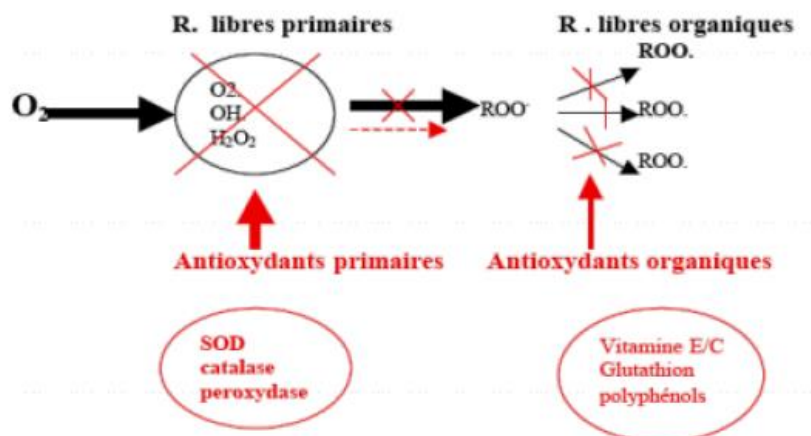


Figure 2 : Les systèmes de défense contre les radicaux libres (Kohen et Nyska. 2002).

Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydants *in vivo*, elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, le β -carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques,...etc. **(Kohen et Nyska. 2002)**

4. Les composés phénoliques

4.1. Généralités

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). 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 **(Macheix *et al.* 2005)..**

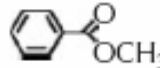
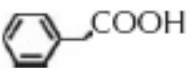
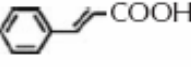
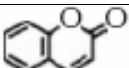
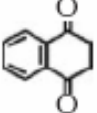
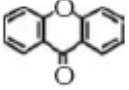
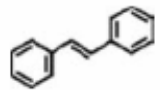
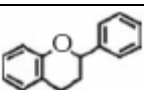
Les composés phénoliques peuvent constituer des signaux de reconnaissance entre les plantes, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel, D'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales **(Macheix *et al.* 2005).**

4.2. Classification des polyphénols

Les polyphénols répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) **(Hennebelle *et al.* 2004)**, Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 **(Harbone. 1993).**

Ils sont divisés en plusieurs catégories : anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénols, xanthones et autres phloroglucinols où les flavonoïdes représentent le groupe le plus commun et largement distribué **(Tableau 3)**

Tableau 3 : Structure des squelettes des polyphénols (Crozier et al. 2006).

<i>Nombre de carbone</i>	<i>Squelette</i>	<i>classification</i>	<i>Exemple</i>	<i>Structure de base</i>
7	C ₆ -C ₁	Acide Phénols	Acide gallique	
8	C ₆ -C ₂	Acétophénone	Gallacetphénone	
8	C ₆ -C ₂	Acide Phényl Acétique	Acide p- hydroxyphénul- acétique	
9	C ₆ -C ₃	Acide hydroxy cinnamique	Acide p- coumarique	
9	C ₆ -C ₃	Coumarine	Esculitine	
10	C ₆ -C ₄	Naphthquinones	Juglone	
13	C6-C1-C6	Xanthone	Mangiferine	
14	C6-C1-C6	Stilbéne	Resveratrol	
15	C6-C3-C6	Flavonoïde	Naringénine	

4.3. Rôle et intérêt des composés phénoliques

Le rôle des composés phénoliques est maintenant reconnu dans différents aspects de la vie de la plante et de l'homme. Ils peuvent en effet intervenir:

- ❖ Dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV), soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux (**Benarous. 2006**),
- ❖ Dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles...) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes,...) et des produits qui en dérivent par transformation, (**Benarous. 2006**),
(Le tableau 4) illustre les activités biologiques des quelques classes des polyphénols

Tableau 4 : Activité biologique de quelque composés phénoliques (Brunten. 1993 ; Hannebelle. 2006)

<i>Composés phénoliques</i>		<i>Activité biologique</i>
Acide Phénols	✓ Acide caféique	Antibactérienne
	✓ Acide Salicylique	Antifongique Antioxydant
Flavonoïdes	✓ Lutéoline	Anti-tumorale
	✓ Catéchine	Anti-carcinogène,
	✓ Hespéridine	Anti inflammatoire,
	✓ Quercetine	Antioxydant,
	✓ Naringénine	Antiallergique, Anti ulcère, Antivirale,
Tannins	✓ Tannins gallique	Effet stabilisant sur le collagène, antioxydant,
	✓ Proanthocyanidin	anti-diarrhéique, Effet antiseptique
Caumarines	✓ Dicoumarol	Anticoagulant, Antioxydant, protectrice, Vasculaire et Antioedémateuse

4.4. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels du règne Végétal (**Ghedira. 2005**), qui sont caractérisés par la présence d'une structure phénolique dans leur molécule, et même d'une structure flavone ce qui les distingue des autres polyphénols (**Toufektsian et al. 2008**).

Aujourd'hui plus de 9000 flavonoïdes ont été répertoriés et il en reste des milliers d'autres à découvrir puisque le squelette des flavonoïdes peut être substitué par différents groupements comme des groupements hydroxy, méthoxy, méthyl, benzyl et isoprényl (**Beecher. 2003 ; Williams et Grayer. 2004 ; Kueny-Stotz. 2008**).

4.4.1. Structure chimique et classification

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, et de ce fait, possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement phenyl-2 chromane. (**Figure 3**), ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation de noyau pyranique central (**Bruneton. 1999**)

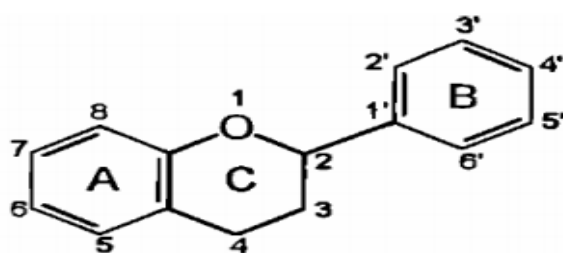


Figure 3 : Structure chimique de base des flavonoïdes (Bruneton, 1999)

4.4.2. Localisation et distribution des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs, les flavonoïdes sont omniprésents dans les organes aériens où ils sont localisés dans les tissus superficiels (**Remsy et al. 1996**), au niveau cellulaire, les flavonoïdes, sous forme d'hétérosides, sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux (**Bruneton. 1993**).

Ils sont largement abondants dans les légumes feuillés (salade, choux, épinards, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits, On en trouve également en quantité importante dans nombreuses plantes médicinales et très spécifiquement dans les herbes aromatiques comme le thym, le persil, le romarin et le céleri (**Bronner et Beecher. 1995**), (**le tableau 5**) regroupe la distribution nutritionnelle de quelque flavonoïde.

Tableau 5 : Source alimentaire des flavonoïdes (Marfak. 2003)

<i>Flavonoïdes</i>	<i>Aliments</i>
Flavanones Naringénine	Fruits de genre citrus
Flavones Chrysine Apigénine Lutéoléine	Peau des fruits Persil, thym, romarin, céleri Persil, céleri
Flavonols Kaempférol Quercétine myricétine	Radis, brocoli, thé noir Oignon, pomme, olive, vin rouge, tomate vin rouge
Flavan-3-ols Epicatechine Catéchine Epigallocatechine	Thé vert-Thé noir Thé vert-Thé noir Vin rouge
Anthocyanidols Cyanidol Malvidol épigénidol	Cassis, myrtilles Raisins, fraises, cassis Framboises, fraises

4.4. Quelques propriétés des flavonoïdes

- ❖ Les flavonoïdes protègent les plantes contre les radiations UV, elles sont également impliquées dans les processus de défense de la plante contre les infections bactériennes et virales.
- ❖ Agissent comme des pigments ou des co-pigments.
- ❖ fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire.

- ❖ Agis sur la régulation de l'élongation des tiges et interviennent dans la maturité des fruits.
- ❖ Sont à l'origine des goûts amers et astringents afin de repousser les animaux herbivores (Subramanian et al. 2007).

5. Etude bibliographique sur la plante étudiée

5.1. Noms vernaculaires

Nom français : Thapsia

Nom anglais : Smooth thapsia

Nom arabe : Deeriass, Bou - Nefa.

5.2. Etude botanique de la plante

La classification complète de l'espèce *Thapsia Garganica* est donnée comme suit (Hazerchi. 2013)

Règne: Plantes

Embranchement: Spermatophytes

Sous Embranchement: Angiospermes

Classe: Dicotylédones

Ordre: Apiales

Famille: Apiaceae

Genre: Thapsia

Espèce: *Thapsia Garganica*.L

5.3. Biotope et distribution géographique

Thapsia Garganica (**figure 4**) est une plante toxique, son aire de répartition est méditerranéenne, présente en Algérie, au Maroc, en Tunisie, et en Libye. Elle s'agit d'une plante herbacée vivace (Ait youssef. 2006)

- Sa racine possède une écorce qui se présente sous forme de fragments, leur face externe est de couleur jaune brunâtre très claire, leur face interne est blanche, l'odeur de l'écorce de racine est presque nulle alors que sa saveur est à la fois piquante et caustique ;

- Les feuilles sont glabres ou à peine pubescentes en dessous, elles sont de couleur verte, leur forme diffère selon leur place ;
- L'inflorescence est en ombelle ;

Le fruit est de forme elliptique, comprimé à sa face dorsale, possède des marges fortement ailées : ces ailes latérales, très développées, sont cordiformes à leurs extrémités, et sont finement striées ; elles ont une couleur jaune brillante (**Ait youssef. 2006**)



Figure 4 : Photo de *Thapsia Garganica* et son fruit (Photo original.2014)

5.4. Usage traditionnelle

L'écorce de racine est utilisée pour traiter la stérilité féminine, les douleurs rhumatismale, les entorses et surtout pour les maladies pulmonaires graves. (**Hammiche. 1991**), Elle est connue par les Berbères et les Arabes dans le traitement de la pathologie pulmonaire. Sa préparation est particulière : pour l'« engraissement », elle est préparée sous forme d'une pâte absorbée. Contre les douleurs et les problèmes pulmonaires, ils utilisent la racine qui est préparée souvent avec de l'huile pour frotter la partie du corps malade. (**Hammiche. 1991**)

5.5. Usage thérapeutiques

La résine figurait sous forme d'extrait mou, a la pharmacopée française 1937 et servait à préparer divers papiers révulsifs sparadraps et topiques utilisées en usage externe, elle n'est plus utilisées depuis longtemps. **(Isaac. 2005)**

La plante fait l'objet d'investigations dans le traitement du cancer de la prostate, les données précliniques semblent prometteuses une rémission dans l'évolution de tumeur apparaît avec toxicité minimale **(Isaac. 2005)**

Les composés bioactifs principaux synthétisés par *Thapsia garganica* sont : thapsigargine, thapsigargicin, notrilobolid et thapsivillosin. **(Makunga et al. 2003).**

Des recherches scientifiques sur les activités biologiques de ces composés a mené à l'identification du thapsigargin et du thapsigargacin en tant qu'inhibiteurs sélectifs puissants de Ca^{2+} -ATPases dans le réticulum endo et sarcoplasmique des cellules animales. Une recherche Pharmacologique a également prouvé que ces thapsigargins ont une capacité de stimuler sélectivement les différentes cellules du système immunitaire **(Makunga et al. 2003).**

.

Chapitre II :

Matériel et méthode

1. Objectif

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de biochimie, département de biologie, Université Amar Thelidji, Laghouat. Il a comme but la détermination de taux des phénols ainsi que l'évaluation de l'activité anti-oxydante des différents extraits de l'espèce *Thapsia Garganica*.

2. Matériel

Le matériel utilisé dans ce travail, est décrit comme suit.

2.1. Matériel végétale

Le présent travail concernera les fruits de *Thapsia Garganica* qui sont collectés le mois de juin 2013 de la région de Bougâa wilaya de Sétif, les fruits sont ovales avec une couleur verte, de 1 jusqu'à 2 cm de long, et presque de 1 cm de largeur, largement ailés. Les ailes sont minces et d'une couleur jaune.

La matière végétale a été préparée de cette manière :

- Séchage à l'air, à l'ombre et à température ambiante pendant 4 mois.
- Séparation des graines des ombelles et enlèvement des impuretés.
- Les ailes ont été séparées manuellement des graines.
- Les graines sont finement broyées.

2.2. Produits chimique

Les produits chimiques utilisés sont les suivants :

- ✓ Méthanol (MeOH)
- ✓ Acétone (ACT)
- ✓ Folin – ciocalteu
- ✓ Carbonate de sodium ($\text{Na}_2 \text{CO}_3$)
- ✓ Trichlorure d'aluminium (Al Cl_3)
- ✓ Acide gallique
- ✓ Quercétine
- ✓ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

3. Méthodes de préparation des extraits phénoliques

Cette étape consiste à extraire le maximum de molécules phénoliques par l'utilisation des solvants organiques à différentes polarités, pour une manipulation plus aisée, nous avons choisi des lettres pour nommer les différents systèmes de solvant : E₁(MeOH) et E₂ (MeOH /Acétone) et E₃ (Acétone)

3.1. Protocole d'extraction

La Macération: trois macérations à froid dans des solvants à polarité décroissante (méthanol ; 100%), (méthanol 50% ; Acétone (50%) , (Acétone 100%) ont été réalisées sur 10 g du poudre végétale .

Remarque : Cette macération est répétée 2 fois pour chaque échantillon.

La filtration : les trois extraits sont filtrés à l'aide de papier filtre.

Evaporation : les extraits bruts sont évaporés à sec sous pression réduite à 45 °C

Le schéma ci-dessous représente le protocole d'extraction des composés phénoliques.

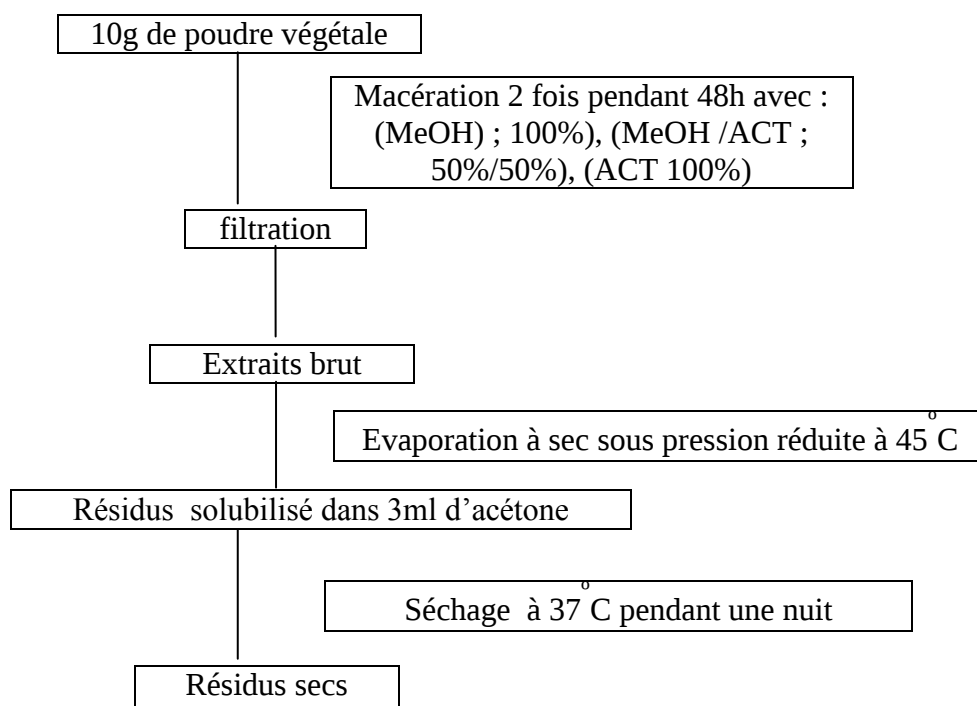


Figure 5: Représentation schématique des étapes d'extraction des phénols (original. 2015)

3.2. Calcul de Rendement

Le pourcentage en extrait brut est calculé par la formule suivant :

$$R\% = \frac{m}{m^{\circ}} \times 100$$

- ✓ **R%** : Rendement exprimé en %.
- ✓ **m** : Masse en gramme de l'extrait sec résultant.
- ✓ **m°** : Masse en gramme de matériel végétale à traiter. (Abdi et Ben maizoura. 2014)

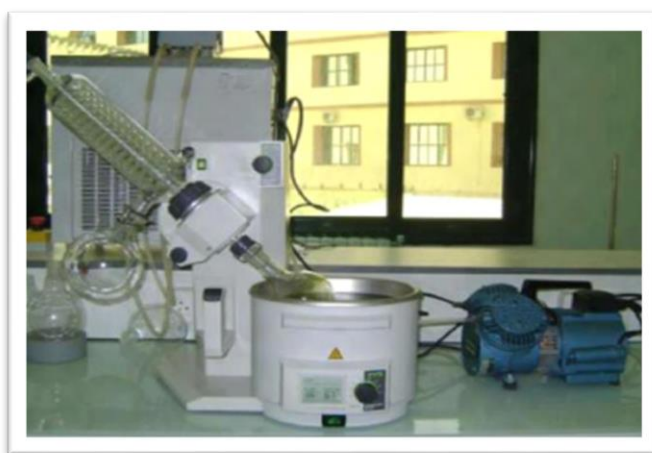


Figure 6: photo illustre le Rota-vapeur. [original. 2015]

3.3. Préparation des solutions

100 mg de chaque résidu sec est dissous dans le méthanol afin d'avoir des solutions méthanolique d'une concentration de 100mg/ml.

4. Dosage des composés phénoliques

4.1. Dosage des polyphénols totaux

Le contenu en composées phénolique dans les extraits (E₁) et (E₂) et (E₃) a été déterminé graphiquement au biais de la méthode deFolin –ciocalteux, basé sur la réduction d'acide phosphotungstique(H₃PW₁₂O₄₀) et phospho-molibdique (H₃PMo₁₂O₄₀), lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃). (Ribéreau-Gayon.1968).

4.1.1. Mode opératoire

40 µl de solution diluée de l'extrait et 3.16 ml d'eau distillé sont ajouté à 200µl de réactif de *Folin –Ciocalteu*, après 3min d'incubation, 600µl de la solution Na_2CO_3 (20%) est ajouté ; la solution finale est incubée pendant 30 min à 40°C pour déterminer l'absorbance à 765 nm contre un blanc.

4.1.2. La courbe d'étalonnage

Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir des solutions d'acide gallique de concentration allant de 0.2g/l jusqu'à 0.9g/l, .

4.2. Dosage des flavonoïdes

Le contenu total en flavonoïdes a été déterminé par le procédé décrit par **Kumaran et Karunakaran (2007)**. Un mélange composé de 50µl de chaque extraits, 950µl de MeOH et 1ml d' AlCl_3 (préparé dans le MeOH).est incubé pendant 15 min à l'obscurité. Ensuite l'absorbance a été mesurée à $\lambda = 420$

4.2.1. La courbe d'étalonnage

La quercétine a été utilisée comme étalon pour tracer la courbe d'étalonnage. Une solution mère de concentration 0.5g/l préparé dans le MeOH a été diluée pour obtenir des solutions filles de concentration allant de 0.1 g/l à 0.5g/l.

5. Evaluation de l'activité antioxydants

Les méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant d'un produit pur ou d'un mélange sont nombreuses. Elles sont fondées sur la détermination des produits qui résultent de l'oxydation ou, au contraire, mesurent l'efficacité d'une substance à piéger des radicaux, dans notre cas nous avons utilisés une seule méthode (test DPPH) pour évaluer l'activité antioxydante des différents extraits (**Sanchez-Moreno .2002 ;Huang et al .2005**)

5.1. Méthode de piégeage de radical « DPPH »

5.1.1. Principe de la méthode

Le DPPH ou bien 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl est un radical libre stable, à température ordinaire il présente une couleur violette caractéristique. Les antioxydants présents dans l'échantillon le réduisent (**figure.7**), ce qui entraîne une décoloration facilement mesurable par spectrophotométrie à 517 nm. Plus la diminution de l'absorbance du DPPH est importante plus le pouvoir antioxydant des extraits est élevé. (Pokornyy *et al.* 2001 ; Roginsky et Lissi. 2005).

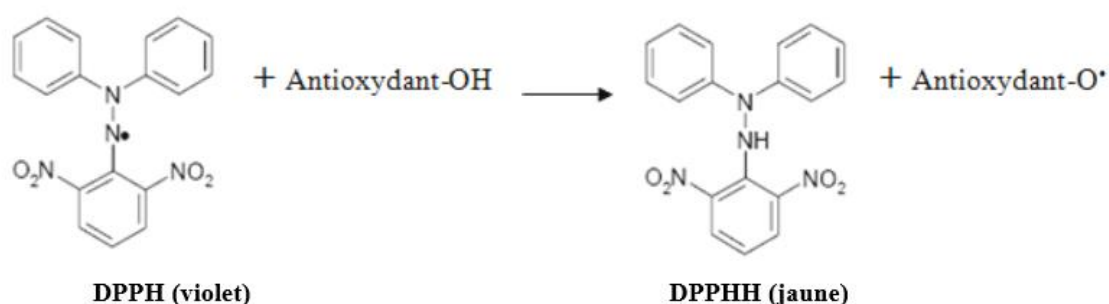


Figure 7: La réduction du radical libre DPPH (Celik *et al.* 2007)

5.1.2. Mode opératoire

Un volume de 100µl de chaque solution fille des trois extraits récemment préparée dans le MeOH est ajouté à 1.9 ml de solution de DPPH fraîchement préparée dans le MeOH. Après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est lu contre un blanc à 517 nm.

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

$$I\% = (1 - A/A_0) \times 100$$

A : Absorbance de la solution de DPPH' en présence de l'échantillon.

A₀ : Absorbance de la solution de DPPH' en absence de l'échantillon.

A partir de la courbe du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations, les valeurs de EC_{50} (concentration des extraits à 50% de neutralisation des radicaux libres) ont été déterminées en (ug / ml).

Les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence (standards), comme l'acide ascorbique (Vitamine C) , Trolox et BHA. (**Molynex .2004**).

6. Etude statistique

Tous les expériences ont été faite en trois essais, et les résultats sont présentés en : *Moyenne $\pm$ l'erreur standard (SD)* .le logiciel Sigma Plot ® 12.0 a été utilisé pour tracer

Les courbes nécessaires (courbe d'étalonnages, courbes du pouvoir antioxydant).

Le modèle choisis pour nos données expérimentales est :

$$y = a . x + b$$

Tel que (a) et (b) sont des paramètres calculés par le logiciel.

Chapitre III :
Résultat et discussion

1. Résultats du rendement d'extraction

L'extraction a été effectuée par des solvants à polarité décroissante, ceci nous a permis de déterminer le rendement d'extraction, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Aspect physique, couleur et le rendement des extraits bruts.(Original.2015)

Extraits	Aspect	Couleur	Rendement(%)
<i>MeOH</i>	Pâteux	Vert fonçais	13.9
<i>MeOH/ACT</i>	Pate visqueuse	Vert clair	15.7
<i>ACT</i>	pâteux	Vert à jaune	7.40

Nous constatons que le rendement le plus élevé a été détecté pour l'extrait MeOH/ACT avec 15.7 %, par contre le plus faible a été remarqué pour l'extrait d'acétone avec 7.40% seulement.

Généralement le rendement d'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de l'environnement tels que le climat, la localisation géographique, la photopériode, le stade végétatif, les conditions de séchage, la nature des solvants utilisé dans l'extraction, la durée d'extraction. (Tsai *et al* .2008)

Ainsi dans ce travail, l'utilisation de deux solvants à polarité différente (MeOH/ACT) , a augmenté le rendement d'extraction parce qu'il a permet d'extraire les composé polaires et moyennement polaires au même temps.

Cette méthode d'extraction menée à température ambiante est la plus adaptée pour les composés phénoliques, parce que la température élevée provoque la destruction des composées phénoliques, la diminution de leur rétractibilité dans les solvants, comme elle affect leur quantification.

La couleur verte des échantillons est due à la présence de chlorophylle , alors leurs aspect pâteux peut être liée à la présence des cires.

2. Résultats de dosage des composés phénoliques

L'étude quantitative des extraits phénoliques à l'aide du dosage spectrophotométrique, avaient pour objectif la détermination de la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes.

2.1. Teneur en phénols totaux

L'analyse quantitative des phénols totaux des extraits a été réalisée par la méthode de *Folin –ciocalteu*, la teneur en composée phénolique de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**figure 8**).

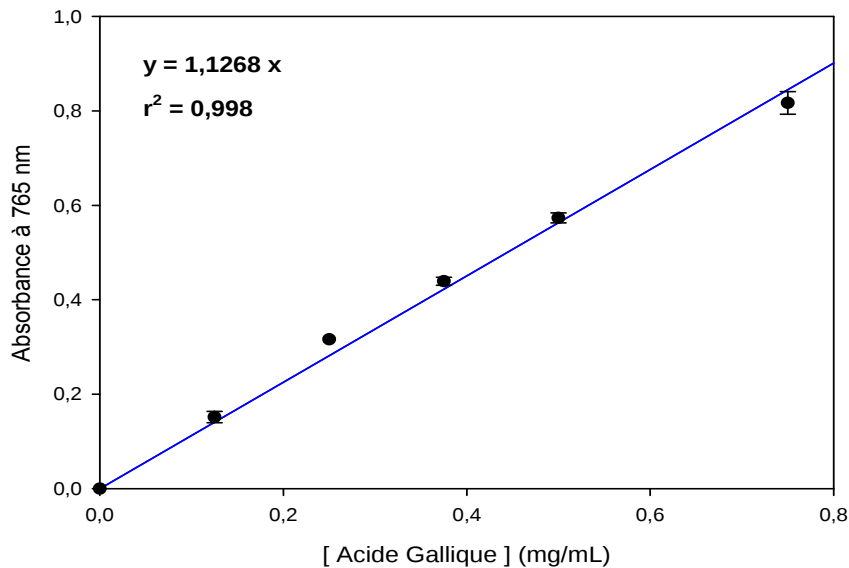


Figure 8: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (mg/ml). (Original.2015)

Le tableau ci-dessus représente la teneur en phénols totaux des trois échantillons

Tableau7:La teneur en phénols totaux (mgEAG/g d'extrait sec) (Original.2015)

Extraits	Teneur en phénols totaux (mg/g d'extrait sec)
<i>MeOH</i>	8,41 ± 0,18
<i>MeOH/Acétone</i>	6,11 ± 0,48
<i>Acétone</i>	3,75 ± 0,33

Le taux le plus élevé a été détecté dans : l'extrait méthanolique avec une concentration de 8,41 mg EAG /g, suivie par le mélange (MeOH/ACT) avec 6,11 mg EAG /g, tandis que la teneur la plus basse a été remarquée dans l'extrait acétonique avec une taux de 3,75mg EAG /g.

Ces résultats, montre que les fruits de *Thapsia Garganica* sont riches en phénols polaires, puisque la capacité d'extraction de chaque solvant est en fonction du degré de polarité des molécules présent dans la matière végétale, d'autre part l'acétone a une polarité moyenne, est il utilisé pour l'extraction de quelques types de lipide c'est pour ça le contenu en phénols de la fraction acétonique été la plus faible .

2.2. Teneur en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes de nos extraits, a été effectuée par la méthode de trichlorure d'allimnme, pour cet objectif une courbe d'étalonnage réalisée par le quercetine a été tracée (figure 9)

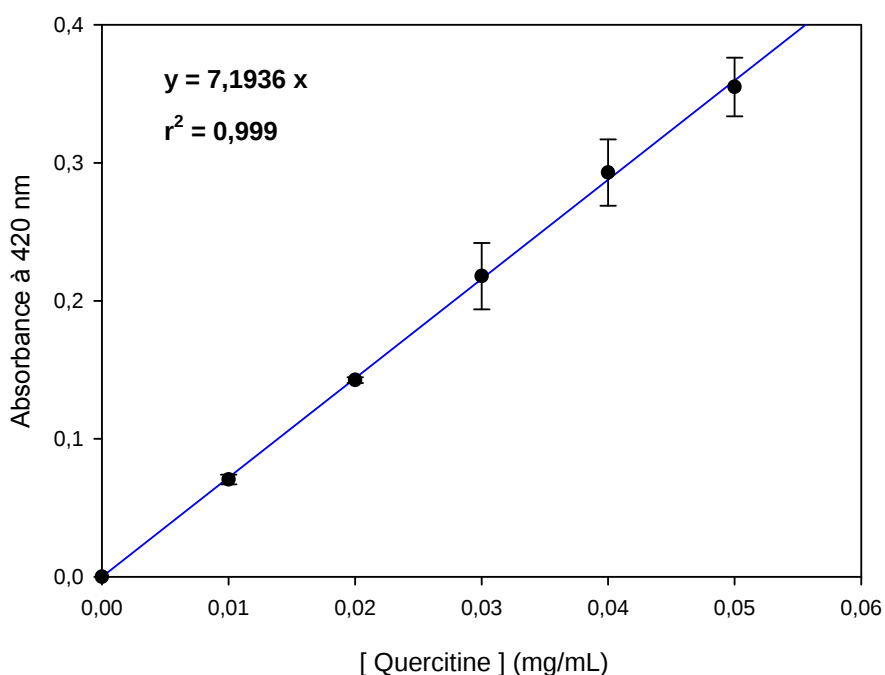


Figure 9 : Courbe d'étalonnage de la quercetine (mg/ml)

La teneur en flavonoïdes est déterminée graphiquement et les résultats sont présentés dans le **tableau 8**.

Tableau 8:La teneur en flavonoïdes (mgEQ/g d'extrait sec).(Original.2015)

Extraits	Teneur en flavonoïdes (mg/g d'extrait sec)
<i>MeOH</i>	2 ,42 ± 0,22
<i>MeOH/Acétone</i>	1,00 ± 0,01
<i>Acétone</i>	0,87 ± 0,06

La teneur en flavonoïdes est exprimée en équivalent de quercetine/g de résidu sec, variée entre 0,87 à 2,42, cette variation de la quantité des flavonoïdes entre les trois extraits peut être due à la différence de polarité des solvants utilisés pour l'extraction.

Les résultats de dosage des phénols totaux et flavonoïdes son illustrées ci –dessous (**figure 10**).

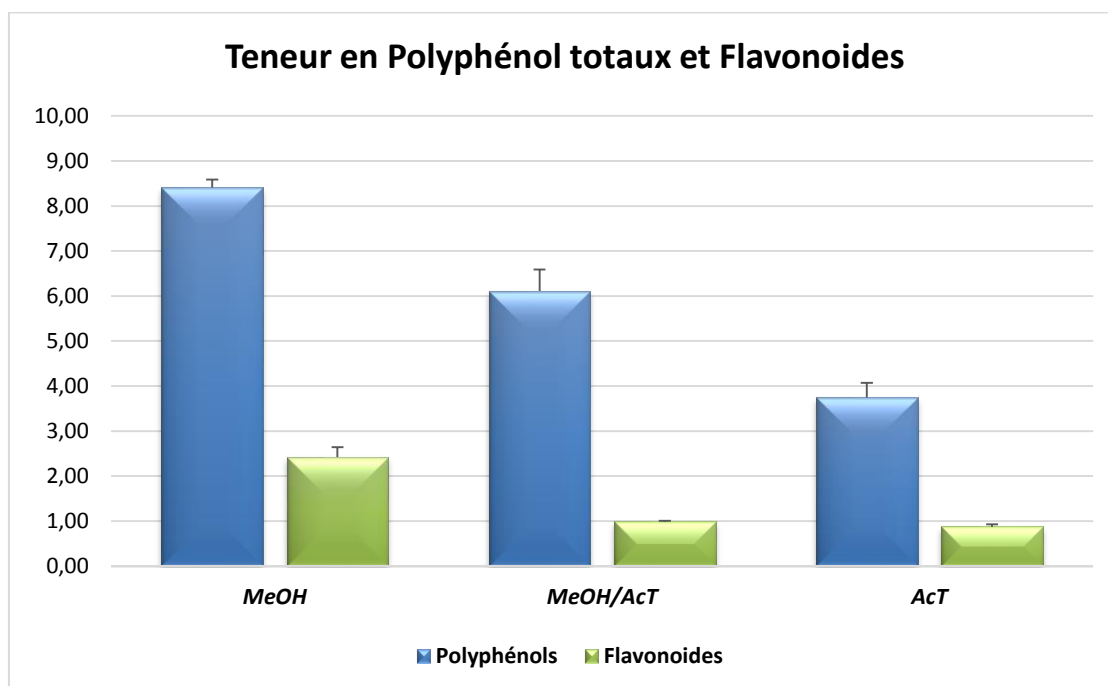


Figure 10 : Histogrammes présentant les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes de différents échantillons (MeOH,MeOH /ACT,ACT).

On remarque que l'extrait qui possède le taux le plus élevé en polyphénols contient aussi la plus haute teneur en flavonoïdes. Ces derniers seraient donc les principaux représentants des polyphénols dans les graines de *Thapsia Garganica*.

A partir de ces résultats, on remarque que la quantité des flavonoïdes est variable dans les différents extraits, mais cette variabilité est dans le même sens que celui remarqué pour les phénols totaux, ce qui explique la corrélation positive trouvée entre la teneur en phénols et celle en flavonoïdes avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,8066$ (figure11).

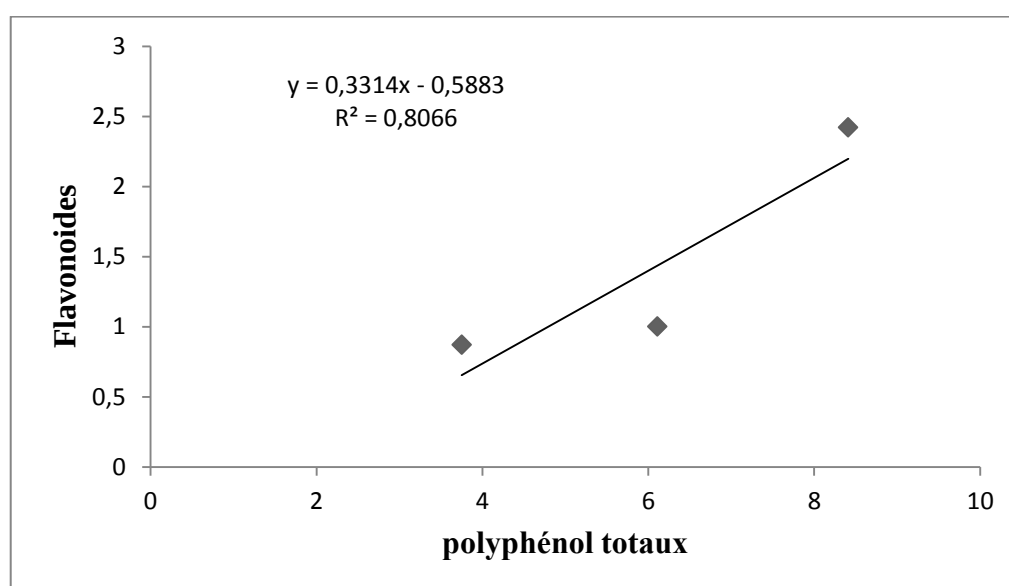


Figure 11: Représentation graphique de corrélation entre les phénols totaux et les Flavonoïdes.(Original .2015)

3. Résultats du pouvoir antioxydants

3.1. Test DPPH[•]

Nous avons utilisés une seule méthode (test DPPH) pour évaluer l'activité antioxydante des trois extraits, pour calculer la valeur d' EC_{50} nous avons tracé la courbe de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration(**figure 12**), de la même façon, nous avons calculé l' EC_{50} des standards (Trolox, Vitamine C et BHA) (**Figure 13**) .

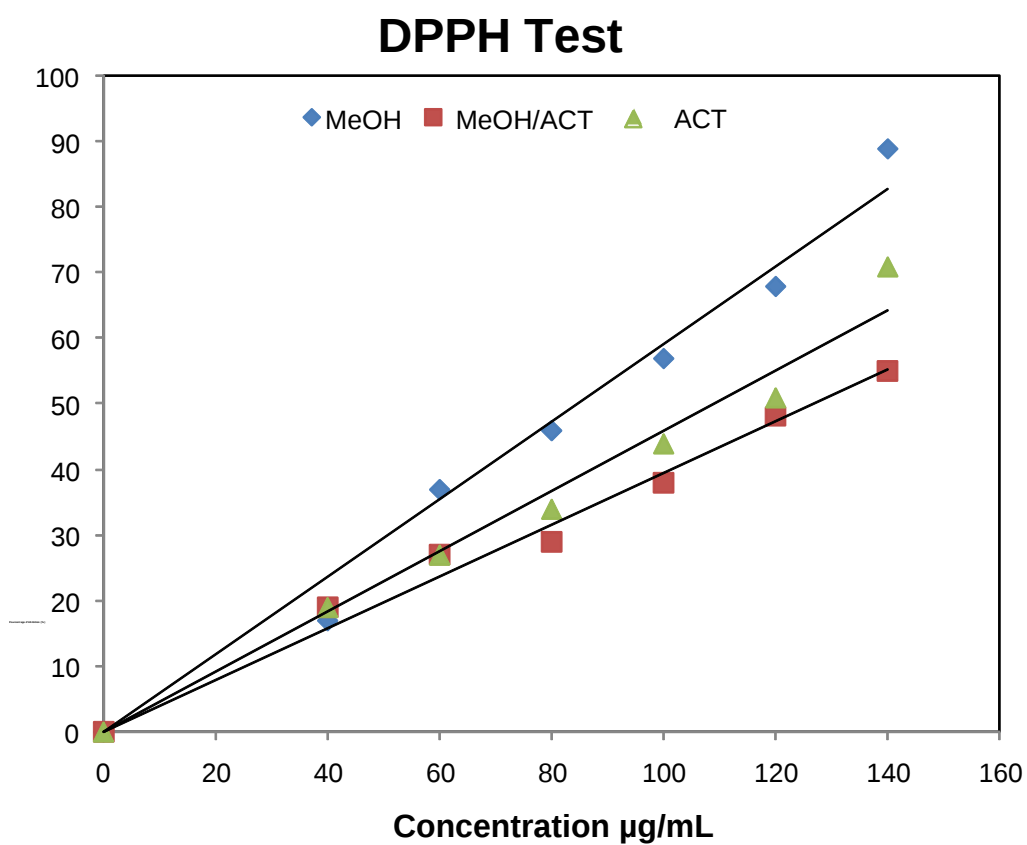


Figure 12 : Courbe représentative du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations.(Original.2015)

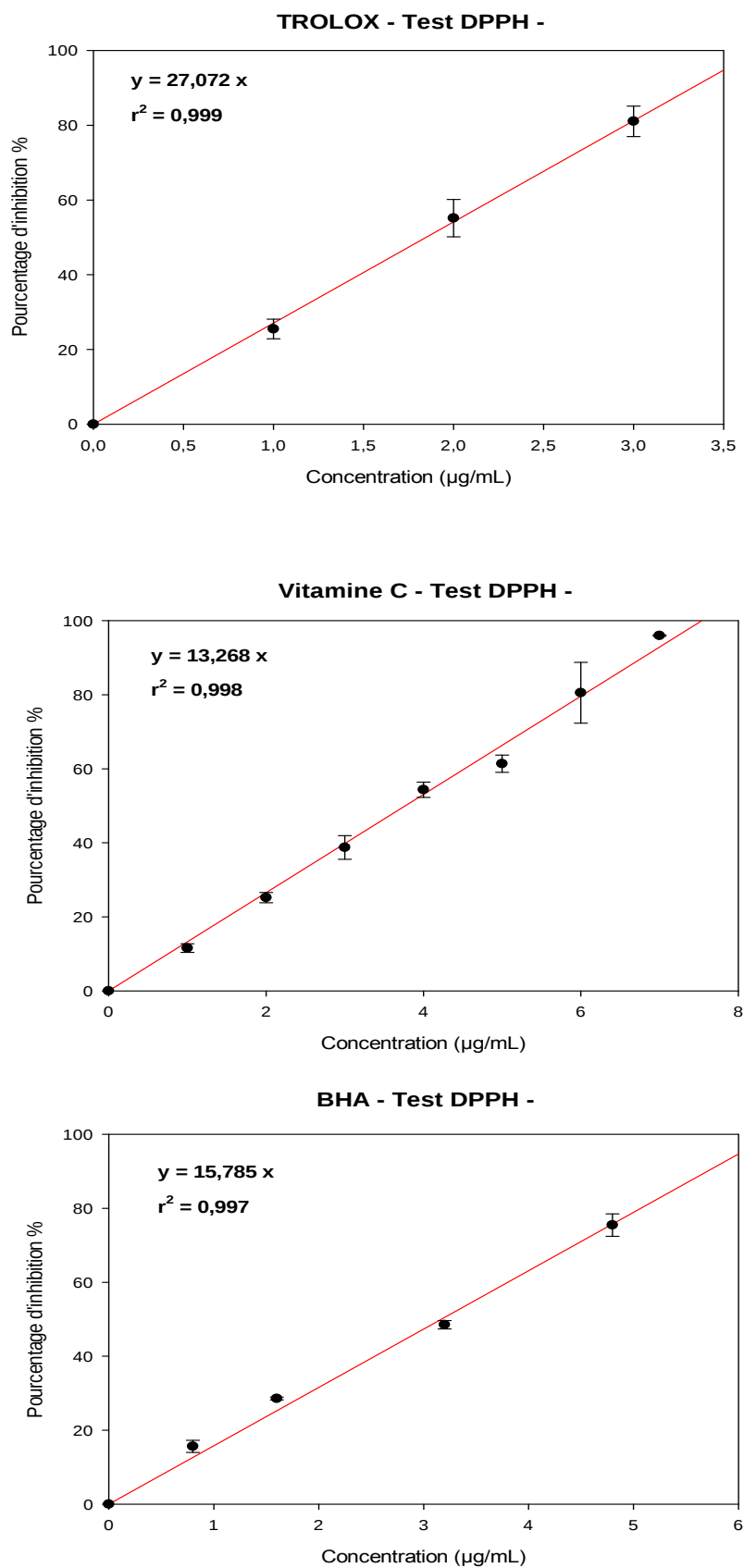


Figure 13 : Pouvoir antioxydant de Trolox, Vitamine C et BHA par le test DPPH.

À partir de chaque courbe on calcule le paramètre EC_{50} , les résultats obtenus sont représentés dans le tableau et la figure ci-dessus.

Tableau 9 : Les résultats de test DPPH (valeurs d' EC_{50} en $\mu\text{g/ml}$) .

	Valeurs de l' EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
MeOH (MeOH)	$84,53 \pm 0,00$
MeOH /Acétone(MeOH/ ACT)	$128,02 \pm 0,00$
Acétone (ACT)	$108,92 \pm 0,00$
Trolox1	$1,85 \pm 0,12$
Vitamine C	$3,77 \pm 0,17$
BHA	$3,17 \pm 0,13$

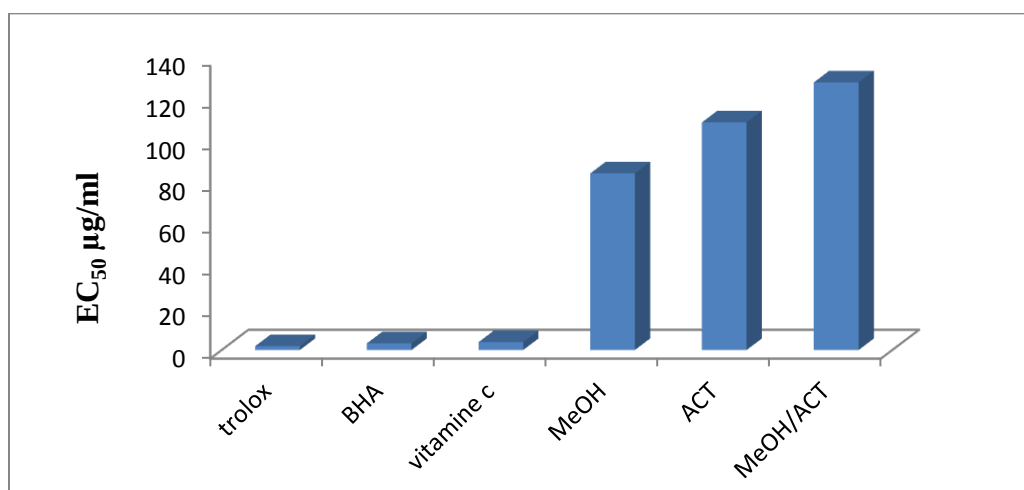


Figure 14: Classement croissant des valeurs EC_{50} (extraits et standard)

Les valeurs d' EC_{50} sont inversement proportionnelles à l'effet inhibiteur des radicaux libres, donc les petites valeurs indiquent un potentiel anti- radicalaire important.

Par l'analyse de ces résultats on remarque que les trois fractions ont des potentiels d'inhibition différents, En effet, la fraction méthanolique présente l' EC_{50} le plus faibles, alors que les deux autres extraits ont des pouvoirs d'inhibitions proches.

La partie la plus prometteuse de ces résultats est l'activité antioxydante de la fraction méthanolique avec une valeur d'EC₅₀ qui est égale à 84,53 µg/ml.

Afin d'étudier la relation entre l'activité antioxydante et le taux de polyphénols et flavonoïdes des trois échantillons nous avons tracé les deux graphiques présenté ci-dessus.

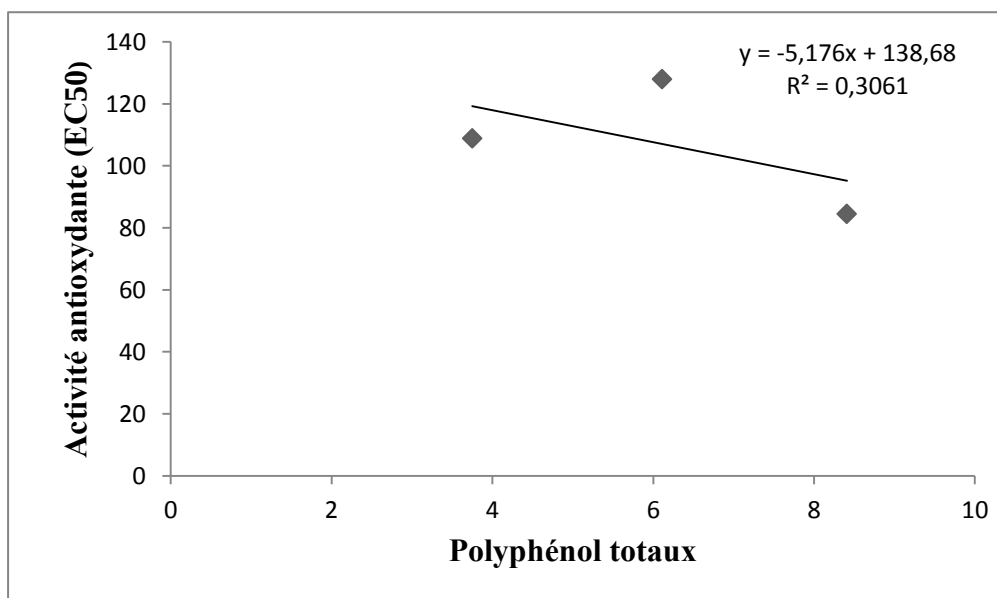


Figure 15 : Représentation graphique de la corrélation entre la teneur en polyphénols et les valeurs d'EC₅₀. (Original.2015)

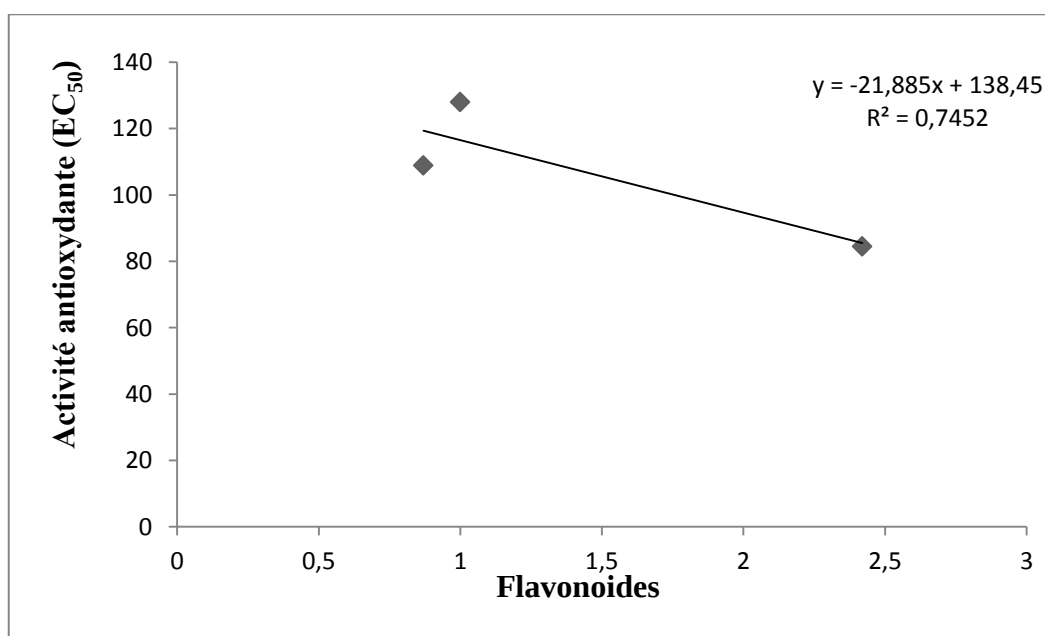


Figure 16 : Représentation graphique de la corrélation entre les flavonoïdes et les valeurs d'EC₅₀ (Original.2015)

Selon **Boskou et al. (2006)** la capacité antioxydante dépend de la qualité ainsi que la quantité des composées phénoliques.

Nous avons essayé de trouver une corrélation linéaire entre les valeurs d'EC₅₀ et les teneurs en phénols totaux, mais le coefficient de corrélation obtenu été un peu faible ($R^2 = 0,33$), par contre une bonne corrélation ($R^2 = 0,7452$) a été constaté entre l'activité antioxydante et la teneur en flavonoïdes (**figure 16**), ces résultats suggère que les flavonoïdes sont les contributeurs majeurs dans l'activité antioxydante des fruits de *Thapsia garganica*.

Conclusion

Le présent travail a pour objectif la caractérisation des fruits de *Thapsia Garganica* provenant de la région de Bougaâ (wilaya de Setif) à travers l'étude de la teneur et les propriétés antioxydante des différents extraits issus de trois systèmes de solvants d'extraction (MeOH, MeOH /ACT , ACT).

L'extraction des composés phénoliques a été effectuée par des solvants à polarité décroissante, et nous avons trouvé une grande différence entre le pouvoir extracteur de méthanol et celle de l'acétone.

Le dosage des phénols totaux, par la méthode de Folin –ciocalteu a donné des concentrations allant de 3,75 à 8,41 mg /g , les flavonoïdes ont été dosés par la méthode de $AlCl_3$ et les résultats révèlent une variation de concentration entre 0,87 et 2,42 mg /g.

L'étude de l'activité antioxydante des trois extraits révèle une capacité importante de réduction du radical libre DPPH par cette plante, la corrélation entre les valeurs d' EC_{50} obtenus par le test DPPH et les teneurs en phénols totaux est faible par rapport à la corrélation entre l'activité antioxydante et les teneurs en flavonoïdes, ces résultats montrent que les flavonoïdes sont les premiers contributeurs dans l'activité antioxydante des fruits de *Thapsia garganica*

Finalement, Les résultats obtenus servent donc à mieux connaître cette espèce, et nous encourage à la choisir comme une source pour d'autres études plus approfondies pour préciser la nature des composées phénoliques, en utilisant des méthodes plus avancées telles que l' HPLC, la HPLC-MS.

***Référence
bibliographique***

Avatoa, P., Francesco, P. F., et Rositoa, I., 2001 .The Genus *Thapsia* as a Source of Petroselinic Acid. *Hereditas*. Vol 36, p 845-850.

Atta, A.H., Mouneir,Antidiarrhoeal S.M., 2004. activity of some Egyptian medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 92, 303–309.

Ait youssef, M., 2006. *Plants médicinales de Kabylie*. Ed : Ibis press, Paris. p 313-316. *Technol*. Vol, 26(2), p 211-219.

Ahsan, H., Ali A and Ali, R., 2003. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical and Experimental Immunology*

Amarowicz, R ., Karamac , M., 2000. Antioxidant activity of phenolic fraction of lentil .*Pol .J.Food Nutr .Sci .*,9 :106.

Aruoma, O I ., 1999. Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 8 (1), 53-63.

Aouissa, I ., W., R.,2002. Etude des activites biologiques et de la toxicite aigue de l'extrait aqueux des feuilles de mangifera indica l. (anacardiaceae). Thèse de doctorat .Université de Bamako.127 p.4

Abdi , M., ben Maizoura. F.2014.activité antioxydante de *Pinus Alepensis*, Mémoire pour obtention du cadre de l'ingénieure en Genie-biologie

Benarous, K., 2006. Effets des extraits de quelques plantes medicinales locales sur les enzymes alpha amylase, trypsine et lipase, mémoire d'Ingénieur d'état, Université Amar Telidji Laghouat, Algérie.

Bruneton, J., 1993. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Techniques et Documentation. 2ème Ed. Lavoisier. Paris, 274-285.

Beecher, GR., 2003. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J. Nutri.*, 133 (10), 3248S-3254S.

Boskou,G .,Salta,FN.,Chrysostomou ,S.,Mylona ,Chiou,A., Andikopoulos ,K.,2006. Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market, *Food Chem.*, 94,558-564.

Bruneton, J., 1999. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Techniques et Documentation. 3ème Ed. Lavoisier. Paris, 199-388.

- Bougandora, N.**, 2011. Pouvoir antioxydante et anti microbien des extrait d'espèces végétales *Saturzjacalaminthasspneta* (nabta) et *Ajugavia* L.(chendgoura) de l'ouest d'Algérie (Thèse de Majistère), faculté des Sciences, Université Abou BakrBelkaid-Tlemcen. p125
- Beckman, K B., Ames, B N.**, 1998. The Free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78 (2), 547-581.
- Blokhina, O., Virolainen, E ., Fagerstedt, K V.**, 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review. *Annals of Botany*, **91** : 179-194.
- Bronner, W., E., Beecher, G., R.**, 1995. Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. *J. Chromatog. A*; **705**: 247-256.
- Bourass, Fatima Zohra., Houchi, Abdelbasset.**, 2013. Étude de l'activité antioxydante de *Rumex Vesicarius* L. ouregella.
- Chu, W L., Lim, Y W., Radhakrishnan, A K and Lim P E.**, 2010. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10 (53), 2-8.
- Cohen J H., Kristal A R and Stanford J L.**, 2000. Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, **92** :61-68.
- Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H.**, 2006. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Edt Blackwell Publishing Ltd.
- Celiktas, O.Y., Bedir E., F. Sukan, V.**, 2007. In vitro antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry*, 101, 1457–1464.
- Dweck, AC.**, 2002 *Herbal Medicine for the skin. Their Chemistry and Effects on skin and Mucous Membranes*. Personal Care Magazine. 3(2),19-21
- Dacosta, Y.**, 2003. Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques. Ed. Yves Dacosta, Paris, p. 317.
- Densiov, E.T., Afanas'ev, I.B.**, 2005. IN: *Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology*. Eds: Taylor & Francis Group (U.S.A), p: 703-861
- Elqaj, M., Ahami A., et Belghyti, D.**, 2007. La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.

- Favier, A .,** 2003. Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique
- Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel A. S., Soejarto, D. D. et Guo Z.,** 1986. Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. Bulletin de l'organisation mondiale de la santé. 64 (2) : 159-164.
- Favier, A.,** 2006. Stress oxydant et pathologies humaines. Ann. Pharm. Fr. 64: 390-396.
- Fouché, J.G.,Marquet, A., et Hambuckers, A.,** 2000. Les plantes Médicinales. De la plante au médicament. Observatoires du Monde des plantes sart-Tilman.
- Ghedira, K.,** 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytother.; **3**: 162-169.
- Gardés, M.,Albert, Z., Abedinzadeh,D.,jore,** 2003.l'actualité chimique P269-270
- Halliwell, B., and Gutteridge, J M C.,** 2007. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford (fourth edition).
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L.,** .2005.The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays.Journal of Agricultural & Food Chemistry. **53** :1841-1856
- Hennebelle, T.,** 2006. Investigation chimique et chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants. *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota Pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbenacées). Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat Chimie Organique et Macromoléculaire. Université des Sciences et Technologique de Lille, Lille 1. Ecole Doctorale Sciences de la Matière du rayonnement et de l'Environnement. France.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F.,** 2004. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Phytothérapie, **1**: 3-6
- Harbone, J.B.,** 1993. Introduction to Ecological Biochemistry, 4th Ed; Academic Press:London.
- Isaacs, JT.,** 2005 .New strategies for the medical treatment of prostate cancer. BJU International Suppl 2: 35–40
- Kohen, R., and Nyska A.,** 2002. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. Toxicol. Path. **30**: 620-650.
- Lee, J., ,Min, DB .**2004. Reactive oxygen species ,aging and antioxidative nutraceuticals , comprehensive Review in food Science and food Safety.

- 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.
- Makunga, N. P., Jager, A. K., et van Staden, J.,** 2003. Micropropagation of *Thapsia garganica* a medicinal plant. Plant Cell Rep. Vol 21, p 967-973.
- Molyneux, P.,** 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity , Songklanakarin J. Sci.
- Meziti, Asma.,** 2008. thème de l'activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L. Étude *in vitro* et *in vivo*.
- Macheix, J., Fleuriet, A. et Jay-Allemand, C.H.,** 2005. les composés phénoliques des végétaux. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. 192p
- Marfak, A.,** 2003 Radiolyse Gamma des flavonoïdes. Etude de leurs réactivité avec des radicaux issues des alcools. formation de depsides. Thèse pour obtenir le cadre de docteur de l'université de Limoges. spécialité. biophysique. 187p
- Martínez-Cayuela, M.,** 1995. Oxygen free radicals and human disease. Biochimie. **77**: 147-161.
- Pincemail, J., Meurisse M., Limet R et Defraigne, J O.,** 1999. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. Vaisseaux, Cœur, Poumons, 4 (5).
- Pal, Yu .,** 1994. Cellular defences against damage from reactive oxygen species. Physiopathological Reviews. 74: 139-155.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., et Gordon, M.H.,** 2001. Antioxidants in food: practical applications. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. New York, USA p. 108-109.
- Rice-Evans, C.A., Sampson, J., Brameley, P.M., Holloway, D.E.,** 1997. Why do we expect carotenoids to be antioxidants *in vitro*? Free Radical Res, 26: 381-398.
- Remy C., Manach C., Texier O., and Regerat F.,** 1996. Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. Med. Nutr.; 32: 17-27.
- Ribéreau-Gayon, P.,** 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Ed., Paris. p. 254.
- Roginsky, V., et Lissi, E.,** 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food Chemistry, 92:235–254.
- Sies H., Stahl W.,** 1995. Vitamins E and C, β carotene and other carotenoids as antioxidant. Am. J. Clin. Nutr., **62**:1315.
- Sorg, O.,** 2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. Comptes Rendus Académie des Sciences. **327**: 649-662.

Subramanian, S., Stacey, G., and Yu, O., 2007. Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends Plant Sci.*; **12**: 282-285.

Sanchez-Moreno, C., 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology*. **8**: 121-137.

Tsai P.J ., Wua S.C. et Cheng Y.K ., 2008. Role of polyphenols in antioxidant capacity of napiergrass from different growing seasons. *Food Chemistry* ,106,27-32

Valko, M., M. Izakovic., M. Mazur., C. J. Rhodes et J., Telser., 2004. "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence." *Molecular and Cellular Biochemistry* **266**(1-2): 37-56.

Wiseman, H., and Halliwell, B ., 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*, **313**, 17-29

Zweier., J.L., Talukder ., M.A.H., 2006. The role of oxidants and free radicals in reperfusion Injury. *Cardiovascular Research*. **70**: 181-190