

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

Université Amar Telidji -Laghouat

Faculté des Sciences

Département de Biologie



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Biologie

Option : Biochimie appliquée

Thème

Etude de l'activité anti-oxydante *in vitro* des extraits de deux plantes spontanées

Présenté par : BOUCHEMAL Halima et BOUHALI Siham

Membre du jury :

Président: BOUBRIMA Youcef

Examinatrice: BENABED Houda Khedidja

Encadreur : BOUSSOUSSA Hadjer

Co-encadreur : KHACHEB Alhacen

2018-2019

Dédicaces

Avant toute chose je remercie Allah le tout puissant de m'avoir donné la santé, la patience et le courage pour réaliser ce travail.

Je dédie ce mémoire :

A mes chers parents, pour leur amour, leur sacrifices, leur encouragements

Et leurs prières tous les mots ne puissent exprimer mon amour et mon respect

A ma grande mère Khadîdja que dieu la garde pour nous.

A mes chères sœurs Khadîdja, Djehan

Vous étiez toujours là pour m'écouter, me reconforter et m'encourager dans les moments de doute... Tous les mots ne suffiraient pas... Sans vous

Et mes chers frères

A ma famille

A mes chers enseignants.

A mes très chers amies Iman, k̄heira, siham, hadjer et faiza

pour leur présence à mes côtés Et en fin à toute mes amis de

la promo de Biologie option de

Biochimie appliqué.

Halima

Dédicaces

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail
que je dédie :*

A mes très chers parents, les prunelles de mes yeux,

A ma très chère mère OUMHANI

*Le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse, l'exemple de dévouement. Rien
au monde ne vaut les efforts fournis, jour et nuit pour mon éducation et pour bien être.*

*A mon très cher père MOHAMMED qui a su se montrer patient, compréhensif et
encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.
Veuillez trouver ici, le témoignage de mon amour éternel. Que dieu vous procure santé,
prospérité et bonheur...*

A mes très chers frères : KHALIL, YOUSSEF, AHMED, ISMAIL ;

A mes très chères sœurs : NOUR EL HOUDA, DALLAL ;

*Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et affection que je porte
pour vous. Je vous souhaite un avenir plein de santé et bonheur,*

A tous les membres de ma famille ;

A mes amies et tous ceux qui me sont chers ;

A ma très chère amie BOUABOUCHE Meriem ;

A mon binôme BOUCHEMAL Halima qui m'a partagé ce travail ;

A tous mes enseignants du primaire, du secondaire et du supérieur, qui supporte moi.

A tous qui aime la science.

A vous...

Siham

Remerciements

Nous tenons à rendre grâce à ALLAH le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce travail.

Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à notre directrice de mémoire :

Mme Boussoussa Hadjer

Nous le remercions pour ses orientations, sa confiance, ses conseils, sa patience et ses encouragements qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.

*Nous adressons également nos remerciements sincères à notre Co-encadreur **Mme Khacheba Ihcen** pour son aide précieuse et ses conseils éclairés dans la direction de notre travail, ainsi que pour son immense gentillesse.*

*Nos remerciements les plus sincères s'adressent aussi à Monsieur **Boubrima youcef** qui a accepté de présider le jury.*

*Nos profonds remerciements sont adressés aussi à mademoiselle **Benabed Houda Khedidja** qui a accepté d'examiner ce travail.*

Un grand merci à tous nos enseignants du département de Biologie qui ont contribué à notre formation.

Nos remerciements le personnel des laboratoires des Départements des Biologiques et des Agronomiques.

Nos vifs remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué, de prêt ou de loin, à la réalisation de ce mémoire.

Résumé :

Les plantes médicinales sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments. L'objectif de ce travail est l'étude biologique des extraits phénoliques de la partie aérienne de deux plantes *Atractylis delicatula* et *Hylocereus sp*, avec un dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux ainsi que l'évaluation *in vitro* de l'effet anti radicalaire par la méthode de piégeage du radical libre DPPH et le test phosphomolybdate.

D'après les résultats obtenus nous avons constaté que tous les extraits d'*Atractylis delicatula* et *Hylocereus sp* sont riches en phénol totaux (teneurs varient de $0,35 \pm 0,002$ à $24,9 \pm 0,74$ mg/g EAG) et en flavonoïdes (teneurs entre $0,05 \pm 0,006$ à $13,68 \pm 0,28$ mg/g EQ) dans la deuxième partie. L'étude de l'activité antioxydante des extraits d'acétate d'éthyle pour les deux plantes *Atractylis delicatula* et *Hylocereus sp* ont montré une très forte activité antiradicalaire avec une valeur de $1,82 \pm 0,05$ et $0,74 \pm 0,008$ respectivement et elles sont proches à la vitamine C ($0,14 \pm 0,0008$) ; avec le test de pouvoir réducteur le plus élevé dont les valeurs des VCEAC sont $0.02 \pm 0,003$ et $0.01 \pm 0,006$ mg/g respectivement.

Mots clés : plantes médicinales, composés phénoliques, flavonoïdes, extraction, DPPH, VCEAC.

Abstract :

Medicinal plants are considered as a source of raw material essential for the discovery of new molecules necessary for the development of future drugs. The objective of this work is the study of phenolics extracts from the aerial part of two plants *Atractylis delicatula* and *Hylocereus sp*, by an assay of polyphenols and total flavonoids content and in vitro evaluation the antioxidant effect by DPPH free radical scavenging method and phosphomolybdenum test.

According to the results that are recorded, all extracts of *Atractylis delicatula* and *Hylocereus sp* are rich in total phenol (their contents vary from $0,35 \pm 0,002$ to $24,9 \pm 0,74$ mg / gGAE) and rich in flavonoids (their contents vary from $0,05 \pm 0,006$ to $13,68 \pm 0,28$ mg / g QE). The study of antioxidant activity of ethyl acetate extracts of the both plants *Atractylis delicatula* and *Hylocereus sp* showed a very strong antiradical activity with values of $1,82 \pm 0,05$ to $0,74 \pm 0,008$ mg/ml respectively that they are close to the vitamin C ($0.14 \pm 0,0008$) ;with the highest reductive power test whose VCEAC values are $0,02 \pm 0,003$ and $0,01 \pm 0,006$ mg/g respectively.

Keywords: medicinal plants, antioxidant activity, phenolics compounds, flavonoids, extraction, DPPH, VCEAC.

ملخص:

تعتبر النباتات الطبية مصدرا للمواد الخام الأساسية لاكتشاف جزيئات جديدة ضرورية لتطوير الأدوية المستقبلية. الهدف من هذا العمل هو دراسة الجزء الهوائي من النبتتين ساق الغراب *Atractylis delicatula* و حمار العلك *Hylocereus sp* مع اختبار كمية المركبات الفينولية والفلافونويدات الكلية وكذلك تقييم النشاط المضاد للأكسدة بواسطة طريقة تثبيط الجذور الحرة (DPPH) و اختبار فسفوموليبيدات.

من خلال النتائج التي تم الحصول عليها وجدنا أن جميع المستخلصات لكل من نبتة ساق الغراب و حمار العلك غنية بالمركبات الفينولية الكلية (تتراوح من $0,002 \pm 0,35$ إلى $0,74 \pm 24,9$ ملغ/غ) والفلافونويدات (تتراوح من $0,05 \pm 0,006$ إلى $13,68 \pm 0,28$ ملغ/غ). أظهرت دراسة نشاط مضادات الأكسدة في مستخلصات الأسيئات ايثيل للنبتين نشاطاً قوياً بقيمة $1.82 \pm 0,05$ و $0,05 \pm 0,74$ على التوالي وكانت قريبة من فيتامين "س" ($0,0008 \pm 0,14$) وكذلك مع اختبار فسفوموليبيدات أظهرت مقادير فعالة $0,02 \pm 0,003$ و $0,01 \pm 0,006$ ملغ/غ AEAC على التوالي.

الكلمات المفتاحية: النباتات الطبية ، المركبات الفينولية ، والفلافونويدات ، استخراج ، النشاط المضاد للأكسدة ، مستخلصات الأسيئات ايثيل. DPPH, VCEAC .

Liste des abréviations

% : pourcentage.

Abs : Absorbance.

Ac-Et : Acétate d'éthyle

ALCL₃ : trichlorure d'aluminium.

BHA : butylhydroxyanisole.

BHT : butylhydroxytoluène.

C : concentration.

CAT : catalase.

EVC : équivalent en vitamine C.

DCM : dichlorométhane.

DPPH : 1,1-diphényl -2-picrylhydrazyle.

EP : éther de pétrol

ERO : Espèce Réactive de l'Oxygène.

EQ : Equivalent Quercétine.

g/l : gramme par litre.

g : gramme.

EAG : équivalent en acide gallique.

H₂O₂: peroxyded'hydrogène.

HO°: radical hydroxyl.

HOO: radical hydroperoxydes.

I% : pourcentage d'inhibition.

IC₅₀ : concentration de l'extrait (antioxydante) qui inhibe du radical libre.

L : litre.

ml: millilitre.

mg/ml : milligramme par millilitre.

MS: Matière sèche.

nm : nanomètre.

MeOH : Méthanol.

O_2^- : anion superoxyde.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

PPM : phosphomolybdate.

R : rendement.

ROOH : Hydroperoxyde.

RO^\bullet : Radical alkoxy.

ROO^\bullet : les radicaux peroxydes.

RL : radicaux libres.

SOD : superoxyde Dismutase.

TBHQ : tetrabutylquinone

UV : Ultra-violet.

VC : vitamine c ou acide ascorbique.

VCEAC : capacité antioxydante équivalent à la vitamine C.

DRO : dérivés réactive de l'oxygène.

Liste de figures

Figure 01: Photo original illustrant la plante <i>Atractylis delicatula</i>	13
Figure 02: Photo illustrant la plante <i>Hylocereus sp.</i>	13
Figure 03 : Protocole d'extraction des composées phénolique de deux plantes.	16
Figure 04: Réaction d'un donneur d'hydrogène (antioxydante) avec le radical DPPH.	19
Figure 05 : Cylindre représentant le rendement d'extraction des différentes extraits de <i>Atractylis delicatula</i>	22
Figure 06: Cylindre représentant le rendement d'extraction du déférentes extraits de <i>Hylocereus sp</i> Erreur ! Signet non défini.	23
Figure 07: La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	27
Figure 08: La courbe d'étalonnage de la quercétine.....	28
Figure 09: Histogramme des teneurs en phénols et en flavonoïdes des extraits.	28
Figure10: Histogramme représentant l'IC50 de test de piégeage du radical liber DPPH de chaque extrait et les standards	30
Figure 11: Courbes représentant l'activité antioxydante des standards.	30
Figure 12: Courbes représentant l'activité antioxydante des extraits phénoliques de <i>Hylocereussp</i>	32
Figure 13: Courbes représentant l'activité antioxydante des extraits phénoliques de <i>l'Atractylis delicatula</i>	32
Figure 14: Courbes représentant le pouvoir réducteur des standards (test phosphomolybdate).	33
Figure 15: Courbes représentant le pouvoir réducteur des extraits de <i>l'Atractylis delicatula</i>	35
Figure 16: Courbes représentant le pouvoir réducteur des extraits de <i>Hylocereus sp.</i>	36

Liste des tableaux

Tableau 01: Les types des radicaux libres.	7
Tableau 02: Principales sources des ROS	8
Tableau 03: Couleur, masse et teneur des extraits des deux plantes étudiées.	22
Tableau 04: Couleurs des différents extraits des deux plantes étudiées après la récupération dans le méthanol.	24
Tableau 05: Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes de <i>Atractylis delicatula</i> et <i>Hylocereus sp.</i>	25
Tableau 06: Les IC ₅₀ du test de piégeage du radical libre DPPH de chaque extrait.	28
Tableau 07: Les IC ₅₀ du test de piégeage du radical libre DPPH des standards.	28
Tableau 08: Les valeurs d'VCEAC de test d'évaluation de l'activité antioxydante phosphomolybdate (PPM).	33

Table des matières

Introduction générale	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	5
I. Définition des Radicaux libres	6
I.1. Les types des radicaux libres	6
I.2. Principale source de ROS	7
II. Définition de stress oxydatif	8
II.1. Les cibles biologiques du stress oxydant	9
III. Plantes médicinales	9
IV. Classification des antioxydants suivant la nature chimique	10
IV.1. Les antioxydants synthétiques	10
IV.2. Les antioxydants naturels	10
Chapitre II : Matériel et méthodes	12
I. Matériel végétal	13
I.1. <i>Atractylis delicatula</i>	13
I.2. <i>Hylocereus sp.</i>	13
II. Méthode d'extraction des composés phénoliques	14
IV. Analyse quantitative des composés phénoliques	16
IV.1. Dosage des composés phénoliques totaux :	16
IV.2. Dosage des flavonoïdes	16
V. Evaluation de l'activité antioxydante	17
V .1. Test de DPPH	18
V .2. Test de phosphomolybdate (PPM) :	19
Chapitre III : Résultats et discussions	20
I. Détermination de rendement d'extraction :	22
II. Teneur en composés phénoliques	24
II.1. Dosage des composés phénoliques totaux.	25
II.2. Dosage des flavonoïdes	26
III. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	28
III.1. Résultats de pouvoir antioxydant d radical libre de DPPH	28
III.2. Le test de phosphomolybdate (PPM)	32
Conclusion	36
Références	39
Annexe	42

Introduction générale

Introduction générale

Notre organisme produit en permanence des molécules oxydantes qui sont des formes hautement réactives dérivées de l'oxygène (ERO). Ces dernières molécules dont font partie les radicaux libres. Dans les conditions normales, Ils sont produits en faibles quantités comme des médiateurs tissulaires et des produits de dégradation énergétique, cette production est parfaitement maîtrisée par notre système de défense. En effet, sous l'action des rayons ultraviolet, les radiations ionisantes, la déficience en antioxydants, les polluants tels que les métaux lourds et la cigarette, la balance (antioxydants/ pro-oxydants) est déséquilibrée, donc nous aurons une superproduction énorme des radicaux libres qui entraîne ce qu'on appelle : le stress oxydant (**Boussoussa ,2011**).

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines. Qu'en est-il exactement ? Est-ce une mode ou une réalité, et dans ce cas, pouvons-nous trouver de nouvelles armes médicamenteuses pour lutter contre ce phénomène ? (**Favier, 2003**).

Actuellement, la société scientifique, biologiste et chimiste, met en évidence le rôle tragique du processus oxydatif incontrôlable induit par les espèces réactives oxygénées (ERO). L'accumulation de ces molécules dans l'organisme aboutit à une chaîne réactionnelle radicalaire qui dégrade les molécules vitales biologiques. Parmi les activités biologiques attribuées aux plantes médicinales, l'activité antioxydant se révèle parmi les plus importantes en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le cancer, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant (**Fethoun et Saheb ,2015**).

Les substances d'origine végétale ont récemment suscité un grand intérêt du fait de leurs applications polyvalentes. Les plantes médicinales constituent la ressource biologique la plus riche en drogues des systèmes de médecine traditionnelle, des médicaments modernes, des compléments alimentaires, des intermédiaires pharmaceutiques et des entités chimiques pour la synthèse des médicaments (**Prashant et al, 2011**).

Les produits chimiques végétaux utilisés à ces fins sont en grande partie des métabolites secondaires, dérivés biosynthétiquement de métabolites primaires des plantes (glucides, acides aminés et lipides) et ne sont pas directement impliqués dans la croissance, le développement ou la reproduction de plantes. Ces métabolites secondaires peuvent être

Introduction générale

classés en plusieurs groupes selon leurs classes chimiques, tels que les alcaloïdes, les terpénoïdes et les composés phénoliques (**Ramawat et Mérillon, 2007**).

Parmi les diverses résolutions adaptées par l'OMS à divers niveaux indique que : les plantes médicinales sont d'une grande importance pour la santé des individus et des communautés (**Abayomi, 2010**). L'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme antioxydante demeure une tâche intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquentes ou non connu dans la médecine et les traditions médicinales folkloriques. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs tels les composés phénoliques (**Mohammedi, 2005**). Il nous a semblé donc intéressant d'inscrire notre travail dans ce contexte de recherche.

Les plantes médicinales ont des principes actifs utilisés pour prévenir, soigner ou soulager divers maux, dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne. Les plantes médicinales constituent une source inépuisable d'antioxydants dont les polyphénols qui attirent plus l'attention regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Ce sont des composés ubiquitaires que l'on retrouve dans les plantes. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes (**Mechernene, 2014**).

La reconnaissance des polyphénols comme antioxydants naturels est maintenant bien acquise et elle est pour une part à l'origine du regain d'intérêt que l'on porte à ces composés dans le domaine de la nutrition et de la pharmacologie (**Macheix et al, 2005**).

L'Algérie par sa position biogéographique offre une très grande diversité écologique et floristique, estimé à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 15% endémiques reste très peu explorées sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique (**Laroui, 2007**).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à effectuer une étude dans le but de renforcer les connaissances phytochimique des extraits de deux plantes à savoir les phénols

Introduction générale

totaux et les flavonoïdes de leurs fractions organiques, et par la mise en évidence de leur activité antioxydante.

Dans ce cadre s'inscrit ce travail consistant à tester les activités antioxydantes de nos plantes et qui sera donc réparti en trois chapitres : en commençant par une introduction générale, puis la synthèse bibliographique contenant un aperçu global sur le stress oxydatif et les métabolites biosynthétisés par les plantes qui jouent un rôle important dans l'activité antioxydante.

Le deuxième chapitre sera consacré à la partie expérimentale, qui est subdivisée en deux : Premièrement, nous nous sommes intéressés à l'extraction et la quantification des composés pouvant présenter une activité antioxydante comme les phénols totaux et les flavonoïdes.

Deuxièmement, nous avons évalué l'activité antioxydante et anti radicalaire de nos extraits phénoliques en adaptant deux tests chimiques, le test du DPPH et le test du phosphomolybdate.

Dans le dernier chapitre de ce mémoire nous représentons les différents résultats obtenus et leur discussion.

Nous terminons par une conclusion générale et perspective de recherche.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

La découverte d'espèces chimiques radicalaires présentes normalement dans l'organisme a bouleversé notre compréhension des mécanismes biologiques. Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable ; mais la production peut devenir excessive ou résulter de phénomènes toxiques exogènes et l'organisme va devoir se protéger de ces excès par différents systèmes antioxydants (**Favier, 2003**).

Plusieurs études ont bien montré le rôle des radicaux libres et des espèces oxygénées réactives dans la genèse de nombreuses maladies. En effet, La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides) (**Boughellou et Amara, 2015**).

I. Définition de Radicaux libres :

Selon la définition proposée par Helliwell et Gutteridge, (1996). Les radicaux libres sont des espèces capables d'exister indépendante, contenant un ou plusieurs électrons non appariés dits électrons célibataires, Ils peuvent donc être réducteurs ou oxydants. En jouant le rôle d'accepteur ou de donneur d'électrons, les radicaux libres ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs vis-à-vis des autres molécules (**Benali et Bencheikh, 2016**). Un radical libre est le plus souvent instable, donc réactif et sa durée de vie est très courte (de l'ordre d'une micro à nano-seconde). Généralement les réactions d'oxydoréduction font intervenir des intermédiaires radicalaires (**Bouguerne, 2012**).

L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé : espèces réactives de l'oxygène (**Abdelaziz, 2014**).

I.1. Les types des radicaux libres :

L'appellation ROS inclut les radicaux libres de l'oxygène : anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), radical hydroxyle (OH^{\bullet}) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (**Blandine, 2006**) : Tableaux 01

Tableau 1: les types des radicaux libres (Hocine et Gorine, 2017).

Oxygène	O ₂
Oxygène singlet	¹ O ₂
Anion super oxyde	O ₂ ^{·-}
Radical hydroxyle	OH [·]
Radical hydroperoxyde	HOO [·]
Radical peroxyde	ROO [·]
Hydroperoxyde	ROOH
Radical alkoxyde	RO [·]
Peroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂
Radical oxyde nitrique	NO [·]

I.2. Principale source de ROS :

L'environnement et le mode de vie sont également responsables de la création et de l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme. Ces facteurs environnementaux impliqués dans la génération de radicaux libres (Bouchouka ,2016) .En parallèle ces ROS sont produits physiologiquement en continu par les organismes aérobie notamment respiration et la phagocytose .on peut le résumé dans le tableau suivant :(Tableau 02).

Tableau 02 : principales sources des ROS (**Boughellou et Amara ,2015; Bouchouka, 2009**).

Sources endogènes	Sources exogènes
NADPH Oxydases	Tabagisme
Chaîne respiratoire mitochondrial	Alimentation malsaine
Xanthine Oxydase	Radiation ionisantes
Phagocytes	Radiation UV
NO synthase	Toxique environnementaux
Inflammation	Champ électrique
	Chimiothérapie
	Surpoids
	exercices physique mal géré
	Stress
	Pollution

Dans l'organisme l'autooxydation des petites molécules, comme la xanthine oxydase et la NADPH oxydase, le réticulum endoplasmique, les peroxysomes qui génèrent des ERO (**Blandine, 2006**)

Les radicaux libres peuvent également être produits lors de la défense Antibactérienne. Les cellules phagocytaires (macrophages, neutrophiles...) activées pendant la réaction inflammatoire, vont libérer un anion superoxyde $O_2\bullet$ (**Benali et Bencheikh ,2016**).

La production de ces espèces oxydantes est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. En effet, l'organisme a besoin d' O_2 pour produire de l'énergie au cours des réactions dites de respirations oxydatives (**Boughellou et AMARA ,2015**) .En effet, les

cellules convertissent 3 % de la quantité totale d'oxygène consommée en espèces réactives de l'oxygène (notées ERO) (Sekli et Belaidi, 2011).

II. Définition de stress oxydatif :

En 1991, Sies a défini la notion de stress oxydant comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des DRO (Bellaouar et Khemgani, 2016). Les ERO sont présentes dans la cellule à des doses raisonnables: leur concentration est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants. Ainsi, à l'état quiescent, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants (balance redox) est en équilibre. Cependant cet équilibre redox peut être rompu, soit par une production excessive d'ERO, soit par une diminution des capacités antioxydante. On parle alors de stress oxydant (Migdal et Serres, 2011).

II.1. Les cibles biologiques du stress oxydant :

II.1.1. Conséquences biochimiques du stress oxydant :

Une production modérée et contrôlée d'ERO peut entraîner une oxydation réversible des molécules environnantes. Les ERO agissent alors en véritables seconds messagers. À l'inverse, une surproduction d'ERO ou un déficit des systèmes de défense entraîne l'apparition d'un stress qui provoque l'oxydation, de manière non spécifique et irréversible de molécules biologiques (Migdal et Serres, 2011) (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Hocine et Gorine, 2017).

III. Plantes médicinales :

L'Homme a utilisé pour très longtemps des remèdes traditionnels à base de plantes dites médicinales sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. Une plante est dite médicinale lorsqu'un de ses organes renferme des substances actives, qui confèrent à cette dernière une activité pharmacologique pouvant conduire à des emplois thérapeutiques (Messili et Oulefki, 2013).

De nos jours, un grand nombre des plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt

vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives (**Temmir et Lheziel ,2015**), en raison de leur rôle préventif dans le traitement des maladies dégénératives (**Tiffany, 2012**).

IV. Classification des antioxydants suivant la nature chimique :

IV.1. Les antioxydants synthétiques :

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels (**Benali et Bencheikh ,2016; Fedala ,2015**).

Malgré la puissance de leur activité antioxydante, l'excès de ces antioxydants synthétiques peut être toxique. De ce fait, la recherche de nouvelles molécules possédant des propriétés antioxydantes, se sont orientées vers les substances naturelles issues des plantes médicinales et aromatiques, qui se sont intensifiées ces dernières années (**Mechernene ,2014**).

IV.2. Les antioxydants naturels

La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (**Blandine, 2006 ; Rabhi et Bachiri, 2016**).

IV.2.1. Systèmes antioxydants enzymatiques :

Pour contrôler la production permanente des ROS, les organismes vivants possèdent des systèmes de défense qui les protègent contre les dommages des ROS (**Bouguerne ,2012**).

Les antioxydants enzymatiques comme le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase et la glutathion réductase (GPX) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS (**Mika et al, 2004, Blandine., 2006**).

IV.2.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques :

Ces antioxydants se divisent en deux principales catégories, les endogènes (molécules issues de la biosynthèse) et les exogènes (vitamines, oligoéléments, ou antioxydants de synthèse) (**Bouguerne, 2012**).

D'autres substances exogènes sont apportées par l'alimentation, telles que la vitamine E (tocophérol), la vitamine C (acide ascorbique), et les caroténoïdes. D'autres

Composés comme les alcaloïdes, les polyphénols et les huiles essentielles sont également

Considérés comme antioxydants exogènes (**Fethoun et Saheb, 2015**).

IV.2.2.3. Polyphénols:

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, qui sont généralement de faible poids moléculaires (**Fethoun et Saheb, 2015**). Ils sont les composants le plus large et le plus répandu dans le règne végétal et font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (**Kessoum, 2014**).

Les composés phénoliques forment une grande famille de composés chimiques très divers (plus de 8000 composés connus) (**Bensaci et Khadir, 2016**). Il est dérivé non azoté, dont l'élément structural de base est un noyau benzénique, auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle libre ou engagé (**Latreche et Saadi, 2013**). Les polyphénols peuvent être conjugués, avec un ou plusieurs résidu(s) glucidique(s) ou être liés à d'autres composés chimiques tels que des acides carboxyliques, des amines, des lipides ou avec d'autres phénols (**Boulkroune, 2012**).

Rôle et intérêt des composés phénoliques :

- ✓ Les travaux de (Nitsch et Nitsch, 1961; Alibert et *al.* 1977) ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques tel que le contrôle de la croissance (**Belyagoubi, 2012**), et également Ils permettent aux végétaux de se défendre contre les rayons ultraviolets (**Belyagoubi, 2012**)
- ✓ les composés phénoliques (acides phénols, flavonoïdes et tannins) ont une grande affinité pour les ions divalents de métaux lourds initiateurs d'oxydation. Ils sont,

de plus, capables de capturer des radicaux libres. Ils ont donc un rôle antioxydant et antiradicalaire (**Bensaci et Khadir, 2016**).

- ✓ Le terme « tannin » a été utilisé à l'origine pour décrire des substances végétales capables de transformer des peaux d'animaux en cuirs (**Kessoum, 2014**).
- ✓ sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation (**Kessoum, 2014**).
- ✓ certains flavonoïdes comme la quercétine et la myricétine inhibent fortement la xanthine oxydase qui catalyse la réaction de transformation de l'hypoxanthine en acide urique (**Boukroune, 2012**).

Chapitre II :

Matériel et méthodes

I .Matériel végétal :

I.1. *Atractylis delicatula*

I.1.1 Description botanique :

Règne : Végétal

Ordre : Asterales

Famille : *Astéracées*

Genre : *Atractylis*

Espèce : *Atractylis delicatula*

Nom arabe : ساق الغراب



OUED METLILI : Mai 2002

Figure 01: Photo illustrant la plante *Atractylis delicatula*.

I.2. *Hylocereus sp*

I.2.1 Description botanique :

Règne : Végétal

Ordre : Caryophyllales

Famille : *Cactaceae*

Genre : *Hylocereus*

Espèce : *Hylocereus sp*

Nom arabe : حمّار العلك



Figure 02: Photo original illustrant la plante *Hylocereus sp*.

Les deux plantes de notre étude ont été achetées à partir d'un arboriste. Les parties aérienne des plantes sont séchées à l'ombre, en suite elles sont broyées finement et tamisées afin d'obtenir des poudres fines. Elles sont stockées et conservées dans un endroit sec jusqu'à leur utilisation.

II. Méthode d'extraction des composés phénoliques.

Pour extraire les composés phénoliques, nous avons utilisé un système de solvant (méthanol/eau ; 80/20 ; v/v). Une quantité de 2g de chaque poudre de plante est macérée dans un mélange hydro-alcoolique deux fois pendant 48 heures, à température ambiante et à l'abri de lumière. Les extraits bruts de deux plantes, sont filtrés et soumis à une évaporation grâce un rota-vapeur, à la température de 40°C.

Chaque phase aqueuse restante est soumise à une extraction liquide-liquide avec des solvants de polarité croissante. Elle est lavée tout d'abord, plusieurs fois avec de l'éther de pétrol jusqu'à épuisement des pigments.

Par la suite, les phases aqueuses dépigmentées, sont lavées par un même volume (20 ml) de dichlorométhane plusieurs fois puis, avec l'acétate d'éthyle jusqu'à épuisement de la couleur.

Les fractions organiques obtenues (d'éther de pétrol, dichlorométhane et d'acétate d'éthyle) sont séchées avec le sulfate de sodium anhydre et filtrés, ensuite évaporées à sec sous pression réduite à 40°C. Les résidus obtenus sont récupérés dans 12 ml de méthanol absolu (98°) et conservés à 4°C (Figure 3).

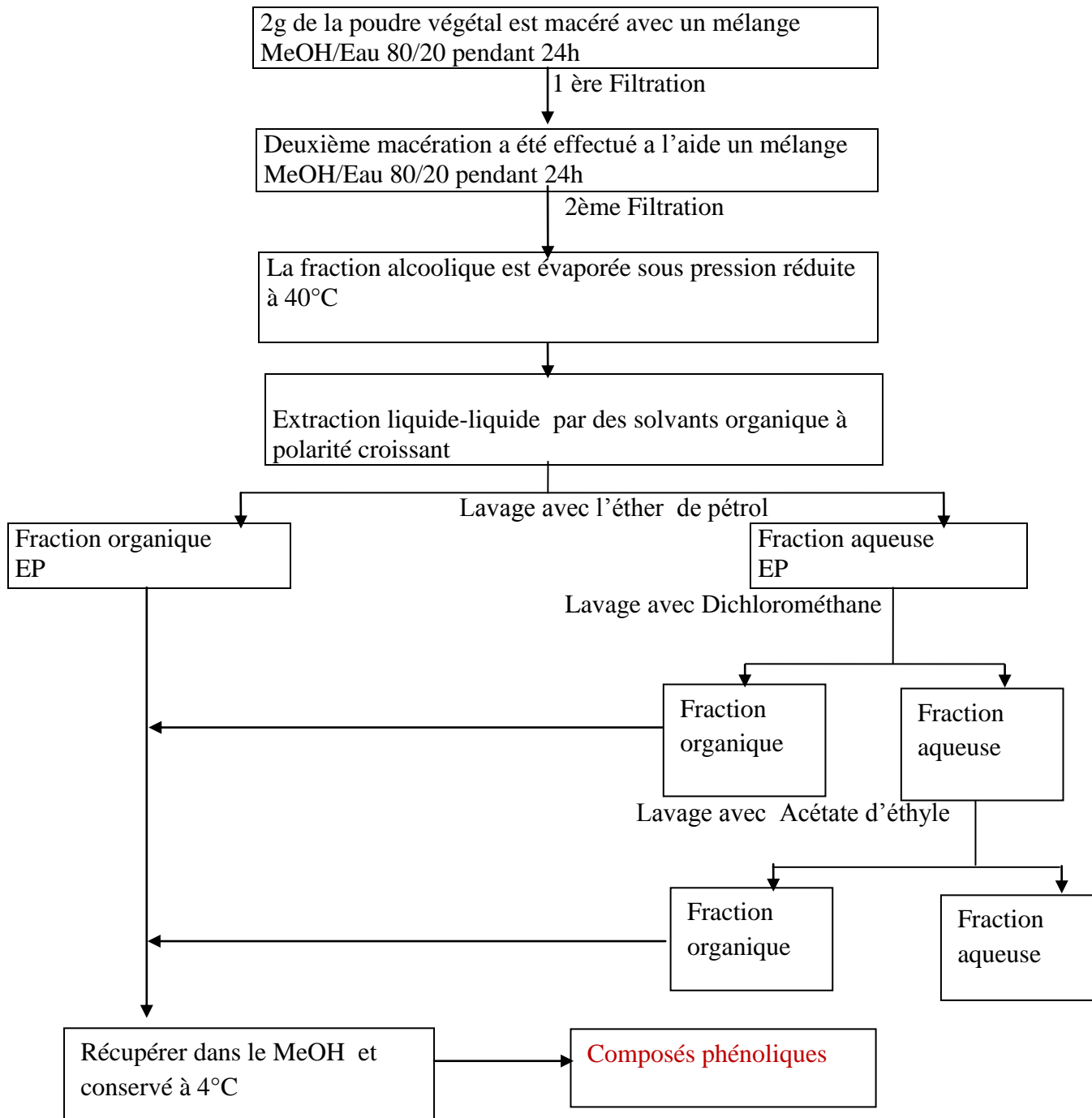


Figure03 : Protocole d'extraction des composées phénolique de deux plantes.

III. Analyse quantitative des composés phénoliques :

Cette analyse permet d'avoir une estimation sur la teneur en phénols totaux de nos échantillons. Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode adaptée de Singleton et Ross en utilisant le réactif de Folin- Ciocalteu, tandis que les flavonoïdes ont été quantifiés par le dosage direct par le trichlorure d'aluminium d'après une méthode adaptée de Lamaison et Carnat (**Temmir et Lheziel, 2015**).

III.1. Dosage des composés phénoliques totaux :

Afin de quantifier les teneurs en phénols totaux dans nos extraits, nous avons choisi l'acide gallique comme standards, pour établir une courbe d'étalonnage.

a) Principe :

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (W_8O_{23}). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 760 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Boizot et Charpentier, 2006**).

b) Protocole :

La courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir de la solution mère d'acide gallique, à des différentes concentrations ont été préparées en milieu aqueux. On prend 100 μ L de chaque solution diluée suivi par l'ajout de 500 μ L du réactif de Folin-ciocalteu diluée 10 fois. Après 2min, 2ml de carbonate de sodium Na_2CO_3 à 2% sont ajoutés, puis le mélange est maintenu à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante.

L'absorbance de chaque solution préparé est mesuré par spectrophotomètre UV Visible de type JENWAY UV-6405 à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc préparé de la même manière sauf qu'il ne contient pas acide gallique.

III.2. Dosage des flavonoïdes :

Afin de quantifier les teneurs en flavonoïdes dans nos extraits, nous avons choisi la quercétine comme standards, pour établir une courbe d'étalonnage.

Principe :

La quantification des flavonoïdes à été effectuée par une méthode adaptée par Lamaison et Carnat (1991) en utilisant le trichlorure d'aluminium comme réactif (**Temmir et Lheziel, 2015**). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe acide stable avec les groupements hydroxyles des flavonoïdes. Ce complexe de coloration jaune, absorbe à une longueur d'onde de 430 nm (**Boussoussa, 2011**)

Le complexe flavonoïdes-aluminium est déterminée par des méthodes spectrophotométriques (**Temmir et Lheziel, 2015**).

b) Protocole :

La courbe d'étalonnage :

A partir d'une solution méthanolique de la quercétine, des solutions diluées ont été préparées. 500 µl de chaque solution diluée est mélangé avec 500 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à 2%, puis le mélange est maintenu à l'obscurité pendant 20 minutes à une température ambiante.

L'absorbance de chaque solution préparé est mesuré par spectrophotomètre UV Visible de type JENWAY UV 6405, à une longueur d'onde de 430 nm contre un blanc préparé de la même manière sauf qu'il ne contient pas la quercétine.

Les valeurs ainsi obtenues à partir le dosage des phénols et flavonoïdes, nous permet de tracer les courbes d'étalonnages.

Remarque : Les tests ont été effectués trois fois afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats.

IV. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante *in vitro* de nos extraits a été évaluée par deux méthodes colorimétriques à savoir le test de DPPH et le test phosphomolybdate et les résultats sont comparés aux étalons de références acide gallique, quercétine et de la vitamine C. Tous les essais ont été effectués au moins deux fois afin de vérifier la reproductibilité.

IV.1. Test de DPPH :

a) Principe :

Le composé chimique 2,2- diphényl -1-picrylhydrazyle (DPPH) possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères et restent dans leur forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue violette bien caractéristique de la solution de DPPH. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue due à une recombinaison des radicaux DPPH, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm (**figure 4**). En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2.2 diphényl- 1- picryl hydrazyle) de couleur violette se réduit en 2,2 diphényl -1- picryl hydrazine de couleur jaune (**Fadili et al ,2015**).

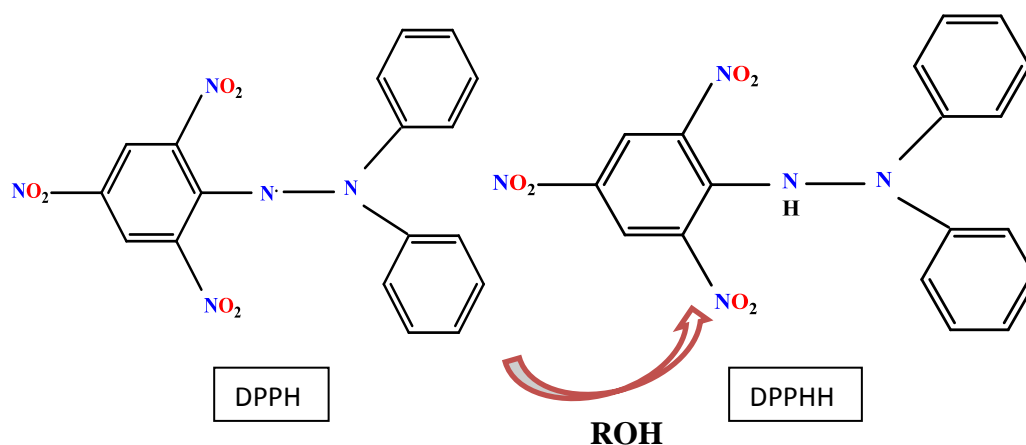


Figure04: Réaction d'un donneur d'hydrogène (antioxydant) avec le radical DPPH.

b) Protocole :

Nos extraits testés pour le leur pouvoir antiradicalaire, ont été solubilisés dans du méthanol à différentes concentrations. 0.5 ml de chaque dilution est mélangé avec 0.5ml de la solution méthanolique du DPPH (250 μ M), ce mélange est incubé à l'abri de la lumière pendant 30 min. l'absorbance du milieu réactionnel est mesurée par spectrophotomètre de type JENWAY UV-6405 à 517 nm contre un blanc.

L'activité antioxydante des trois standards (l'acide gallique, la quercétine et la vitamine C) ont été mesurées suivant la procédure citée précédemment.

Calcul du pourcentage d'inhibition :

L'inhibition du radical libre de DPPH (I%) est calculé par la formule suivante.

$$I\% = (A \text{ blanc} - A \text{ échantillon}) / A \text{ blanc} \times 100$$

I(%) : pouvoir d'inhibition.

A blanc: Absorbance du blanc.

A échantillon: Absorbance de l'échantillon.

IV.2. Test de phosphomolybdate (PPM) :

a) Principe :

Le test du pouvoir réducteur du molybdate phosphate est un essai direct qu'on emploie principalement pour mesurer la puissance des antioxydants non enzymatiques. Il repose sur la réduction des molybdates en molybdènes en présence des extraits en donnant une coloration verte détectable par l'UV à une longueur d'onde de 695nm (**Bouchria et Bougrine, 2018**).

b) Protocole :

Ce test consiste à mélanger 200µl de chaque dilution méthanolique de l'extrait avec 2ml d'un réactif composé de (0,6 M) d'acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4mM de molybdate d'ammonium). Les tubes ont été ensuite bien fermés puis incubés à bain marie à 90°C pendant 90min. la mesure de l'absorbance est effectuée dans un spectrophotomètre de type JENWAY UV-6405 à 695 nm contre un blanc. Le témoin est constitué de 200 µl de méthanol mélangé avec 2ml du réactif mentionné ci-dessus. L'acide gallique, la quercétine et la vitamine C choisies comme standards ont été traitées dans les mêmes conditions.

Chapitre III :

Résultats et discussions

I. Détermination de rendement d'extraction :

La préparation des extraits des plantes étudiées est réalisée par l'utilisation d'une série des solvants à polarité croissante permettant ainsi la séparation des composés selon leur degré de solubilité dans les solvants organiques utilisés dans notre étude. Après l'extraction et la récupération des 3 extraits de chaque plantes, leur rendement a été déterminé par la formule suivante :

$$R\% = \text{masse de résidu d'extrait} / \text{masse de la poudre végétale} \times 100$$

Les résultats obtenus sont présentes dans le tableau suivant :(Tableau 03)

Tableau 03: Couleur, masse et teneur des extraits des deux plantes étudiées.

Espèce végétale	Les fractions	Couleur de résidu sec	La masse de résidu sec (g)	Le rendement %
<i>Hylocereus sp</i>	Fraction d'éther de pétrol	Jaune clair	0,16 g	8%
	Fraction de Dichlorométhane	Vert clair	0,17 g	8,5%
	Fraction d'acétate d'éthyle	Vert foncé	0,3 g	15%
<i>Atractylis delicatula</i>	Fraction d'éther de pétrol	Jaune clair	0,32 g	15,8%
	Fraction de Dichlorométhane	Jaune clair	1,19 g	59,51%
	Fraction d'acétate d'éthyle	Vert jaunâtre	0,51 g	25,48%

Nous remarquons que les rendements de l'extraction varient considérablement entre le 8% à 59,51% dans les différents extraits des plantes étudiées, dont les résultats sont représentés dans le tableau précédent.

La teneur la plus élevée s'est trouvée dans la fraction de dichlorométhane d'*Atractylis delicatula* 59,51%, alors que la teneur la plus faible a été enregistrée dans la fraction d'éther de pétrole 8% de *Hylocereus sp* par rapport les autres. Ceci, peut être expliqué par la richesse ou la pauvreté des composés phénoliques présents dans nos plantes.

Chez l'espèce *Atractylis delicatula* nous constatons que la fraction de dichlorométhane donne un bon rendement 59,51% par rapport à celui de son extrait d'acétate d'éthyle 25,48%, suivi par l'éther de pétrole avec un rendement le plus faible de 15,8%. Les résultats représentent dans la figure suivante :

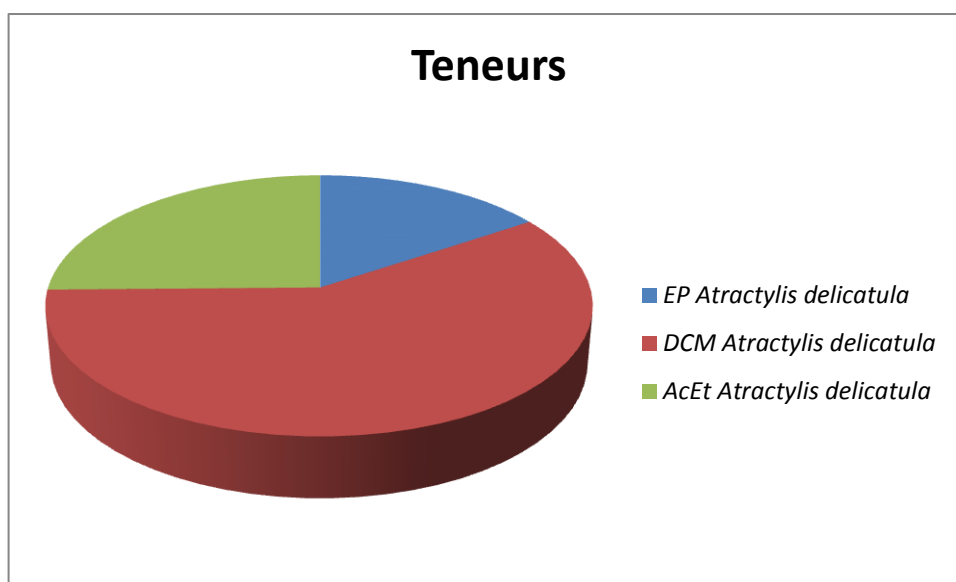


Figure05: Cylindre représentant le rendement d'extraction des extraits de la plante *Atractylis delicatula*.

En comparant nos résultats avec l'étude de Bouchria et Bougrine (2018) sur la plante *Atractylis delicatula* nous remarquons que les extraits organiques de dichlorométhane 7,7% donnent une bonne teneur par rapport à celle d'acétate d'éthyle 0,9%. Ceci, pourrait être dû à la nature des composé phénolique extraits par dichlorométhane ; possédant ainsi une polarité intermédiaire qui permettra se solubiliser la plupart des phénols comme les flavonoïdes, acides phénoliques...

D'autre part, nous observons chez *Hylocereus sp* un rendement plus élevé de la fraction d'acétate d'éthyle 15%, suivi par le dichlorométhane et l'éther de pétrole avec des teneurs sensiblement proches de 8,5% et 8% respectivement. Pour cette raison, nous remarquons que dans les extraits de

Hylocereus sp les teneurs en composés phénoliques augmente avec l'augmentation de la polarité de chaque fraction. Les résultats représentés dans la figure suivante :

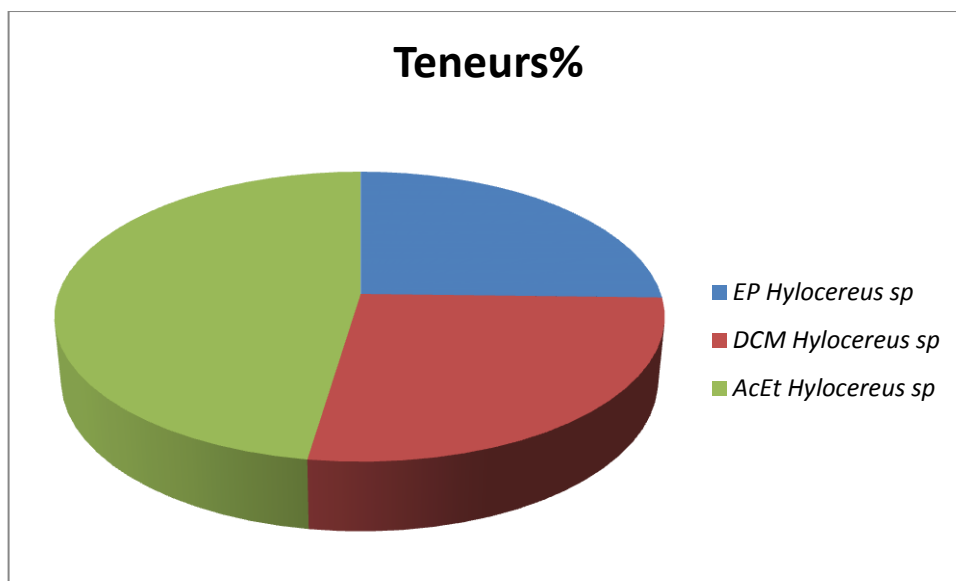








Figure06: Cylindre représentant le rendement d'extraction des extraits de la plante *Hylocereus sp*.

D'après les résultats qui ont été enregistrés, nous observons que tous les extraits d'*Atractylis delicatula* donnent clairement le meilleur rendement par rapport aux extraits de l'autre plantes. Sachant que la masse de départ des deux plantes c'est le même (2g).

Le rendement d'extraction est tributaire à plusieurs facteurs qui peuvent influencer les performances de l'extraction, tels que la taille des particules, la nature du solvant, la température, le temps d'extraction et le degré d'agitation. L'utilisation d'un mélange hydro alcoolique comme solvant donne des résultats satisfaisants dans un processus d'extraction (**Bouchouka, 2016**).

Après les extractions liquide-liquide, nous avons récupéré les différents résidus secs dans le méthanol. Les couleurs des extraits méthanolique préparés présentés dans le tableau suivant :

Tableau04:couleurs des différents extraits des deux plantes étudiées après la récupération dans le méthanol.

Plantes	<i>Atractylis delicatula</i>			<i>Hylocereus sp</i>		
Extraits	Ether de pétrol (EP)	Dichlorométhane (DCM)	Acétate d'éthyle (Ac-Et)	Ether de pétrol (EP)	Dichlorométhane (DCM)	Acétate d'éthyle (Ac-Et)
Couleurs	Vert clair	Vert clair	Vert	Rose clair	Vert jaunâtre	Vert d'olive
Images						

II. Teneur en composés phénoliques.

Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des différents extraits des deux plantes étudiées a été effectué par le réactif de Folin-Ciocalteu et le trichlorure d'aluminium($AlCl_3$). Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau ci-après (Tableau 05).

Tableau05: Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes d'*Atractylis delicatula* et *Hylocereus sp.*

Les plantes	Extrait des plantes	Phénol totaux (mg/g EAG)	Flavonoïdes totaux (mg/g QE)
<i>l'Atractylis delicatula</i>	Ether de pétrol(EP)	0,35±0,002	0,05±0,006
	Dichlorométhane(DCM)	2,21±0,04	0,55±0,003
	Acétate d'éthyle (Ac-Et)	24,90±0,74	13,68±0,28
<i>Hylocereus sp</i>	Ether de pétrol(EP)	3,28±0,003	0,08±0,001
	Dichlorométhane(DCM)	3,24±0,028	0,18±0,007
	Acétate d'éthyle (Ac-Et)	10,54±0,37	6,85±0,95

mg EAG/g MS : milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec.

mg EQ/g MS : milligramme équivalent de catéchine par gramme d'extrait sec.

II.1. Dosage des composées phénoliques totaux :

Les analyses quantitatives des phénols totaux, sont déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage et les valeurs sont exprimées en mg par un gramme de matière sèche équivalent d'acide gallique: (figure 7)

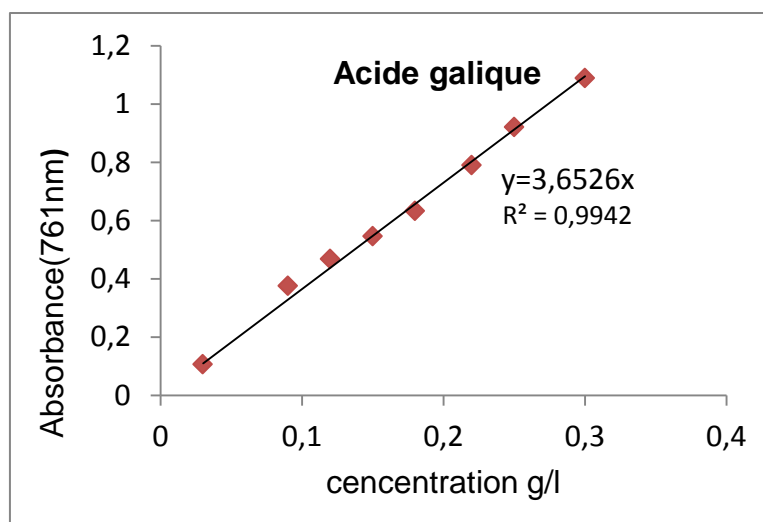


Figure07: la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Selon les valeurs mentionnées dans le tableau, nous remarquons que la quantité en phénols totaux varie largement dans les extraits bruts de $0,35 \pm 0,002$ à $24,9 \pm 0,74$ mg EAG/g MS.

Parmi les six extraits étudiés, l'extrait d'acétate d'éthyle d'*Atractylis delicatula* et *Hylocereus sp* possède la meilleur teneur en phénols totaux de $24,9 \pm 0,74$ et $10,53 \pm 0,37$ mg EAG/g MS, Puis dichlorométhane $2,21 \pm 0,04$ et $3,24 \pm 0,028$ m EAG g /g MS, suivi par $0,35 \pm 0,002$ et $3,28 \pm 0,003$ mg EAG /g MS respectivement.

II.2. Dosage des flavonoïdes :

Les analyses quantitatives des flavonoïdes, est déterminé à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage exprimé en mg équivalent quercétine, les résultats représente dans la figure 8.

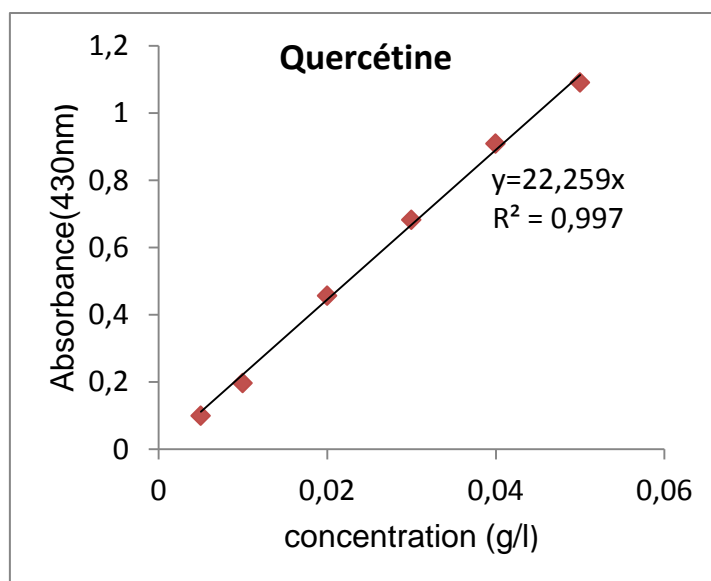


Figure 08: la courbe d'étalonnage de la quercétine.

La détermination quantitative des flavonoïdes totaux révèle que l'extrait Acétate d'éthyle *Atractylis delicatula* et *Hylocereus sp* est en premier ordre avec une teneur de $13,68 \pm 0,28$ et $6,85 \pm 0,95$ mg /g EQ, Puis dichlorométhane $0,55 \pm 0,003$ et $0,18 \pm 0,007$ mg/g EQ, suivi par l'éther de pétrole $0,05 \pm 0,006$ et $0,08 \pm 0,001$ mg/g EQ respectivement.

Les valeurs moyennes de la concentration en phénols totaux et flavonoïdes de la partie aérienne sèche des deux plantes sont représentées dans la figure 9.

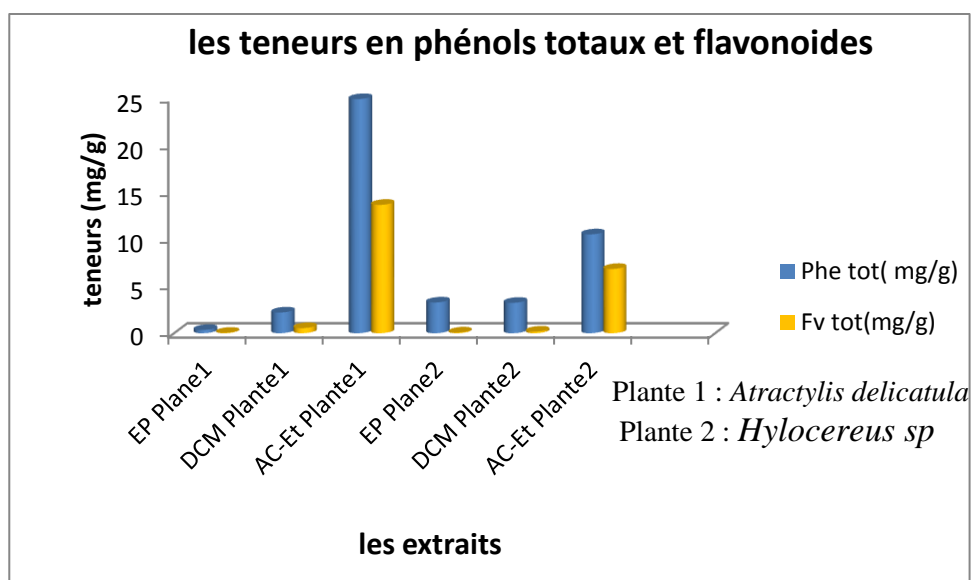


Figure 09: Histogramme les teneurs en phénols et en flavonoïdes des extraits.

La comparaison entre les teneurs en flavonoïdes et celles en phénols totaux dans nos extraits, indique qu'elles sont toutes inférieures à ces dernières, ce qui est justifié par la richesse de nos extraits par d'autres structures chimiques non flavonoïdiques.

III. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro* :

III.1. Résultats de pouvoir antioxydant du radical libre de DPPH :

L'activité antioxydante des différents extraits testés et les standards *vis-à-vis* du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violet à la couleur jaune mesurable à 517 nm. Cette capacité de réduction a été déterminée par une diminution de l'absorbance.

Les résultats obtenus dans ce test nous ont permis de tracer les graphes présentant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en composés phénoliques, les graphes sont représentés dans la figure (11,12 et 13).

A partir de ces données, la concentration efficace IC_{50} (aussi appelée EC_{50} pour Efficient concentration) a été déterminée. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant. Sachant que, IC_{50} est la concentration d'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH.

Tableau06: Les IC_{50} du test de piégeage du radical libre DPPH de chaque extrait.

Les plantes	Extrait des plantes	IC_{50} (mg/ml)
<i>l'Atractylis delicatula</i>	Dichlorométhane(DCM)	36,33±0,24
	Acétate d'éthyle (Ac -Et)	1,82±0,05
<i>Hylocereus sp</i>	Dichlorométhane(DCM)	19,35 ±5,05
	Acétate d'éthyle (Ac -Et)	0,74 ±0,008

Les deux antioxydants standards choisis pour cette étude à savoir, la vitamine C, l'acide gallique et la quercétine.

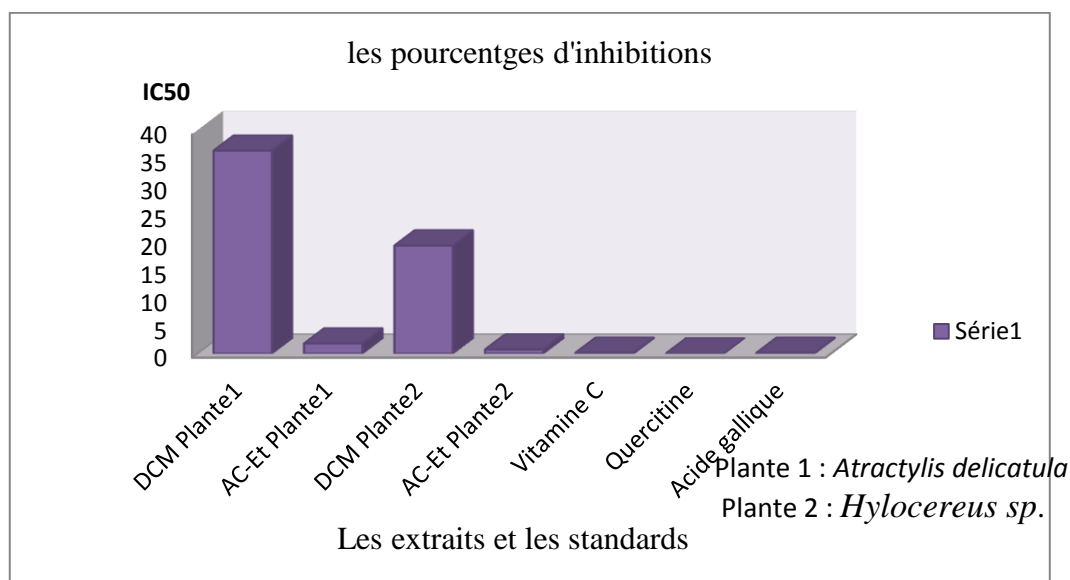
Tableau 07: Les IC₅₀ du test de piégeage du radical libre DPPH des standards.

Les standards	IC ₅₀ (mg/ml)
Vitamine C	0,14 ±0,0008
Quercétine	0,01 ±0,001
Acide gallique	0,13±0,002

Pour l'ensemble de ces extraits, les valeurs des IC₅₀ varient entre 0,74±0,008 et 36,33 ±0,24 mg/ml. La capacité antioxydante la plus élevée qui correspond à la valeur d'EC₅₀ la plus faible a été enregistrée avec l'extraits Acétate d'éthyle chez les deux plantes : *Hylocereus sp* 0,74±0,008 mg/ml et l'*Atractylis delicatula* 1,82±0,05 mg/ml par rapport les autres extraits.

Alors que les extraits de DCM d'*Atractylis delicatula* et *Hylocereus sp* présentent une faible activité antiradicalaire 36,33 ±0,24 mg/ml et 19,35±5,05 mg/ml respectivement.

On a enregistré pour l'extrait pur d'éther de pétrole une faible activité antioxydante avec un pourcentage d'inhibition égale 3,5% pour l'*Atractylis delicatula* et 7,75% pour *Hylocereus sp*. Contrairement à l'extrait d'Acétate d'éthyle qui a montré une bonne activité pour les deux plantes. Ce qui prouve l'influence du nature de solvant sur l'extraction des composés phénoliques. Les résultats représentent dans la figure 10.

**Figure10 :** Histogramme représente l'IC₅₀ de test de piégeage du radical liber DPPH de chaque extrait et les standards.

Afin de comparer l'activité antioxydante par piégeage du radical libre DPPH de nos extraits phénoliques avec celle de quelques antioxydantes de référence. Nous remarquons que l'extrait d'Acétate d'éthyle de *Hylocereus sp* avec IC_{50} de $0,74 \pm 0,008$ mg/ml proche à l' IC_{50} du Vitamine C $0,14 \pm 0,0008$. Par contre les autres extraits possèdent une faible activité antioxydante.

L'activité antioxydante la plus faible est enregistré chez l'extrait de dichlorométhane d'*Atractylis delicatula*, malgré que ce dernier a montré la teneur la plus élevée de 59,51% ce qui indique l'existence des autres composés non phénoliques.

D'après l'étude effectuée par Bouchria et Bougraine, (2018) sur *Atractylis delicatula*, par le test de DPPH sur des extraits méthanolique et éthanolique. Les résultats ont révélé une activité antioxydante avec une valeur de $3,86 \pm 0,04$ et $34,20 \pm 0,97$ mg/g respectivement, ce qui signifie l'influence de solvant sur les molécules antioxydantes.

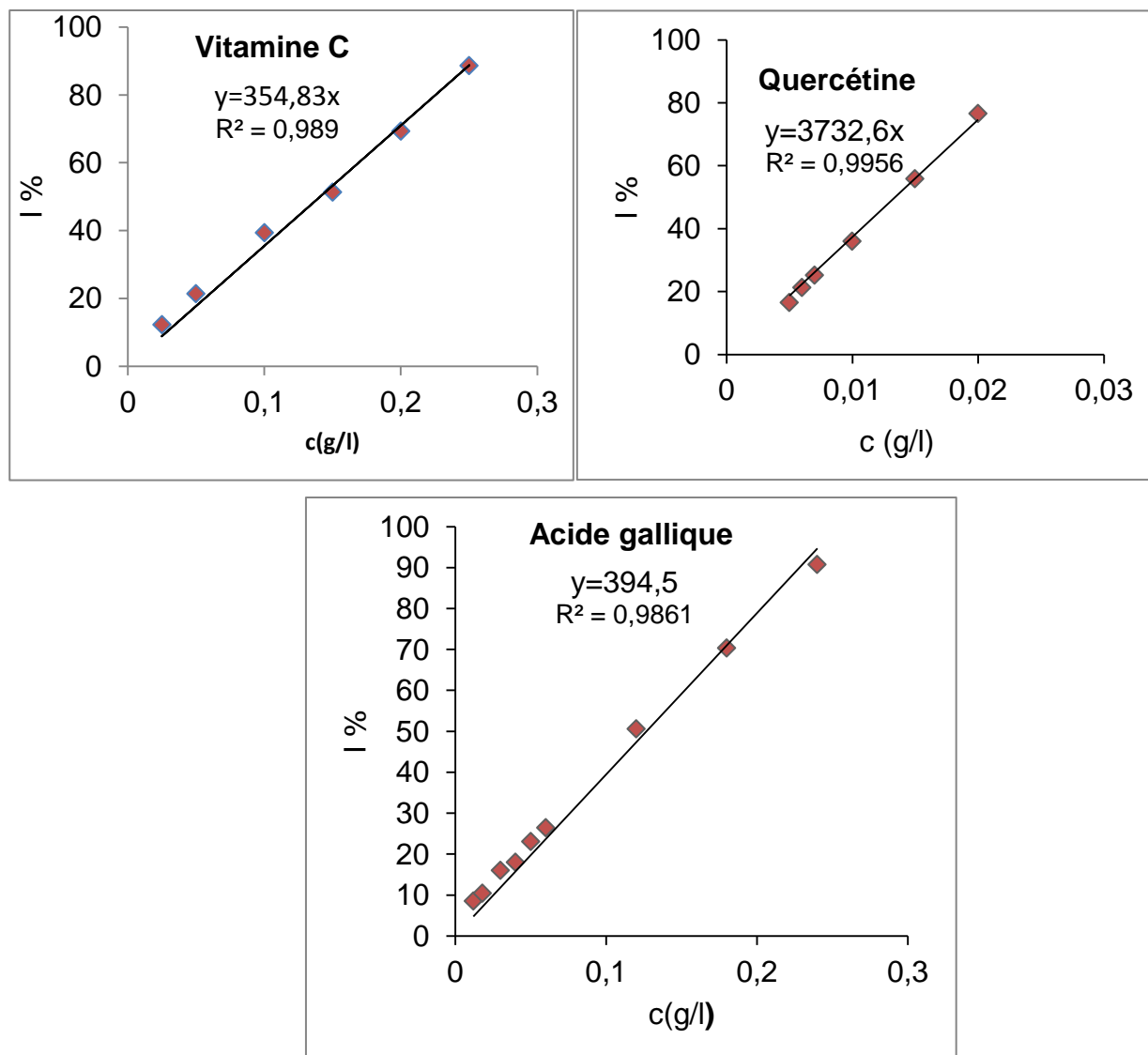


Figure11: Courbes représentant l'activité antioxydante des standards.

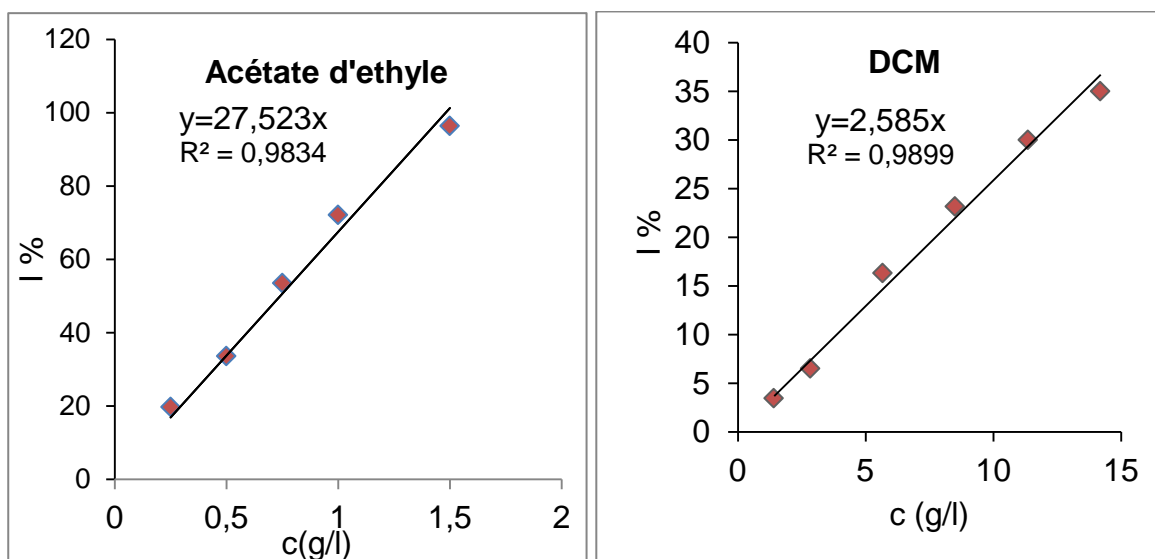


Figure12: Courbes représentant l'activité antioxydant des extraits phénoliques de *Hylocereus sp.*

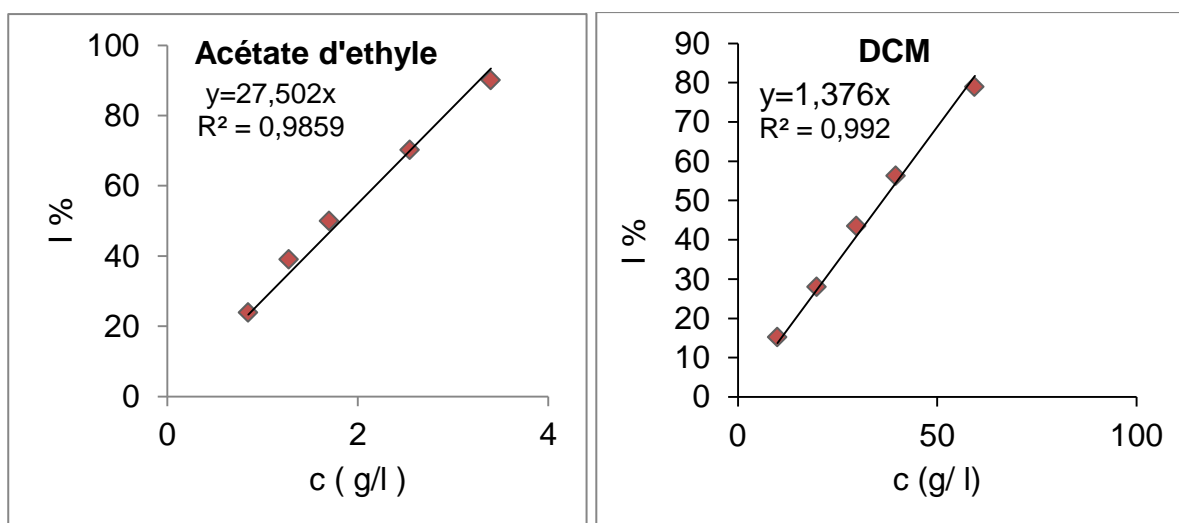


Figure13: Courbes représentant l'activité antioxydant des extraits phénoliques de *Atractylis delicatula*.

III.2. Le test de phosphomolybdate (PPM) :

L'évaluation de l'activité antioxydante de nos extraits est référée par rapport à celle d'acide ascorbique (vitamine C) dont la courbe d'étalonnage est montrée dans les figures (14, 15 et 16). Les résultats des valeurs d'VCEAC sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau08: les valeurs d'VCEAC de test d'évaluation de l'activité antioxydante phosphomolybdate (PPM).

Les plantes	Les extraits	Valeurs d'VCEAC
<i>l'Atractylis delicatula</i>	éther de pétrol	0,002±0,0005
	Dichlorométhane	0,001±0,0004
	Acétate d'éthyle	0,01±0,006
<i>Hylocereus sp</i>	éther de pétrol	0,002±0,001
	Dichlorométhane	0,01±0,002
	Acétate d'éthyle	0,02±0,003
Quercétine		0,76±0,007
Acide gallique		0,1±0,001

Parmi les six extraits des plantes étudiées, les VCEAC varient globalement entre 0.02±0.003 et 0.001±0.0004 mg/g EVC.

Parmi les extraits des deux plantes étudiées, nous ne constatons que l'extrait d'acétate d'éthyle de *Hylocereus sp* est le plus active avec une valeur 0,02±0.003 mg/g EVC.

La plus faible activité antioxydante est enregistrée pour l'extrait dichlorométhane d'*Atractylis delicatula* avec une valeur de 0,001±0.0004 mg/g EVC. Ce résultat peut être interprété par la pauvreté de cet extrait en molécules antioxydantes.

Pour les deux plantes ; l'*Atractylis delicatula* et *Hylocereus sp*, l'extrait acétate d'éthyle représente l'activité antioxydante la plus forte avec des valeurs 0,01 ±0.89et 0,020.78 mg/g EVC respectivement par rapport aux autres extraits.

Concernant les extraits d'éther de pétrole, la plante de *Hylocereus sp* possède une activité antioxydante égale à $0,002 \pm 0,001$ mg/g EVC plus importante que celle d'*Atractylis delicatula* avec une valeur de $0,002 \pm 0,0005$ mg/g EVC.

Dans le but d'évaluer l'activité antioxydante de nos extraits étudiés par le test PPM, nous avons comparé les valeurs de VCEAC trouvés par rapport aux composés standards à savoir l'acide gallique, quercétine et vitamine C. Nous avons observé que ces derniers présentent une capacité réductrice plus forte par rapport à celle de nos extraits.

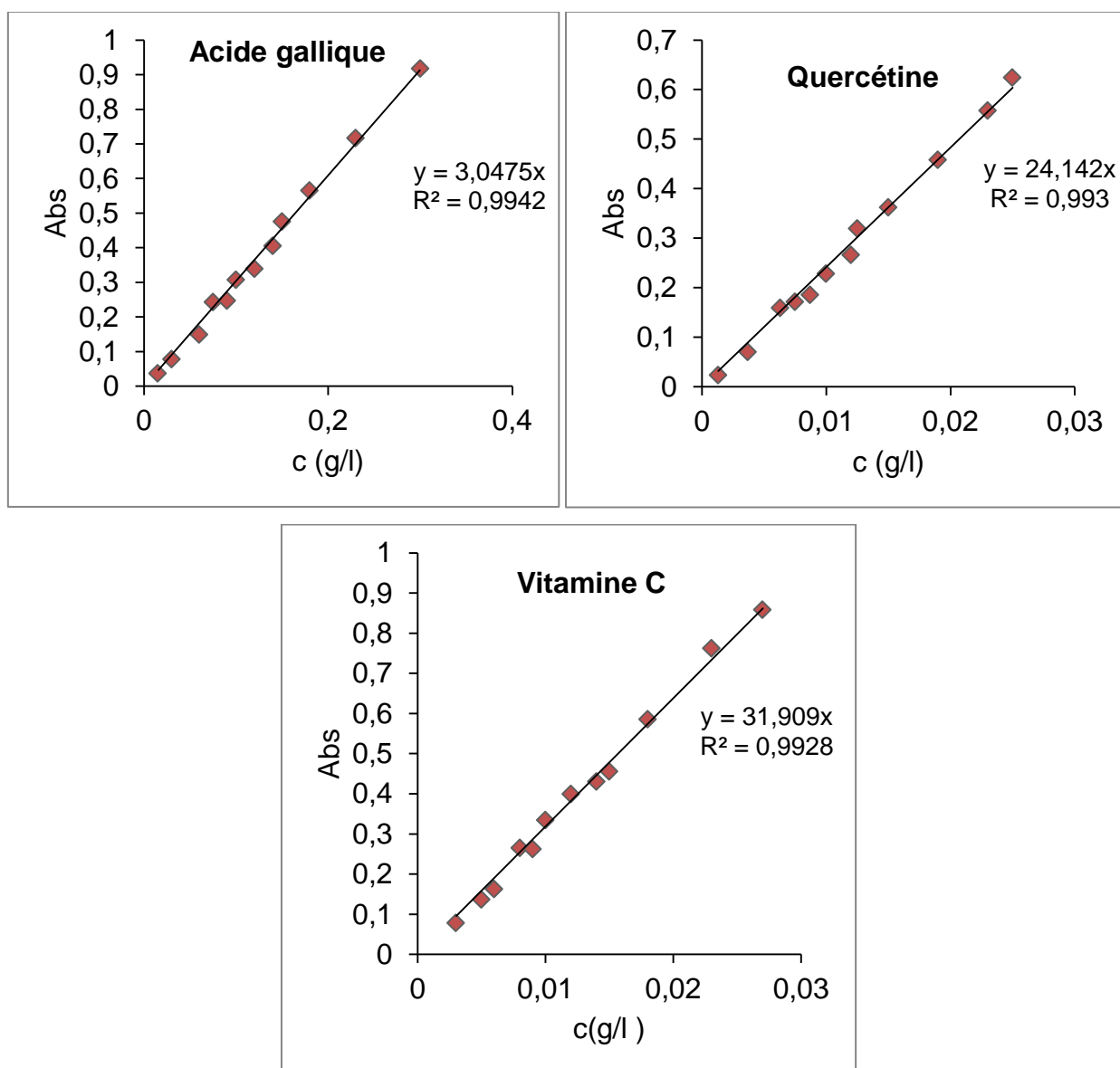


Figure14: Courbes représentant le pouvoir réducteur des standards (test phosphomolybdate).

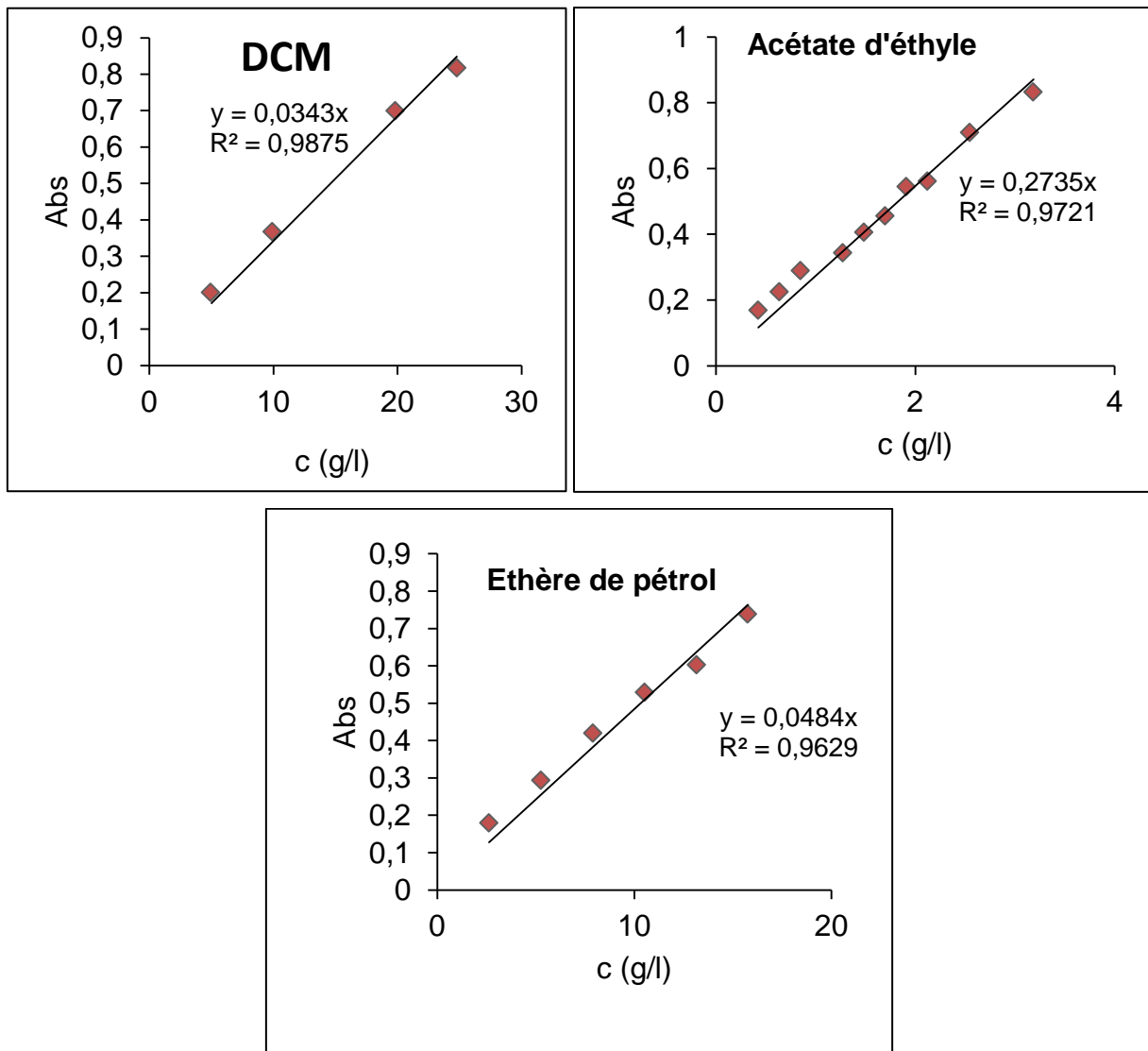


Figure15: courbes représentant le pouvoir réducteur des extraits de *Atractylis delicatula*.

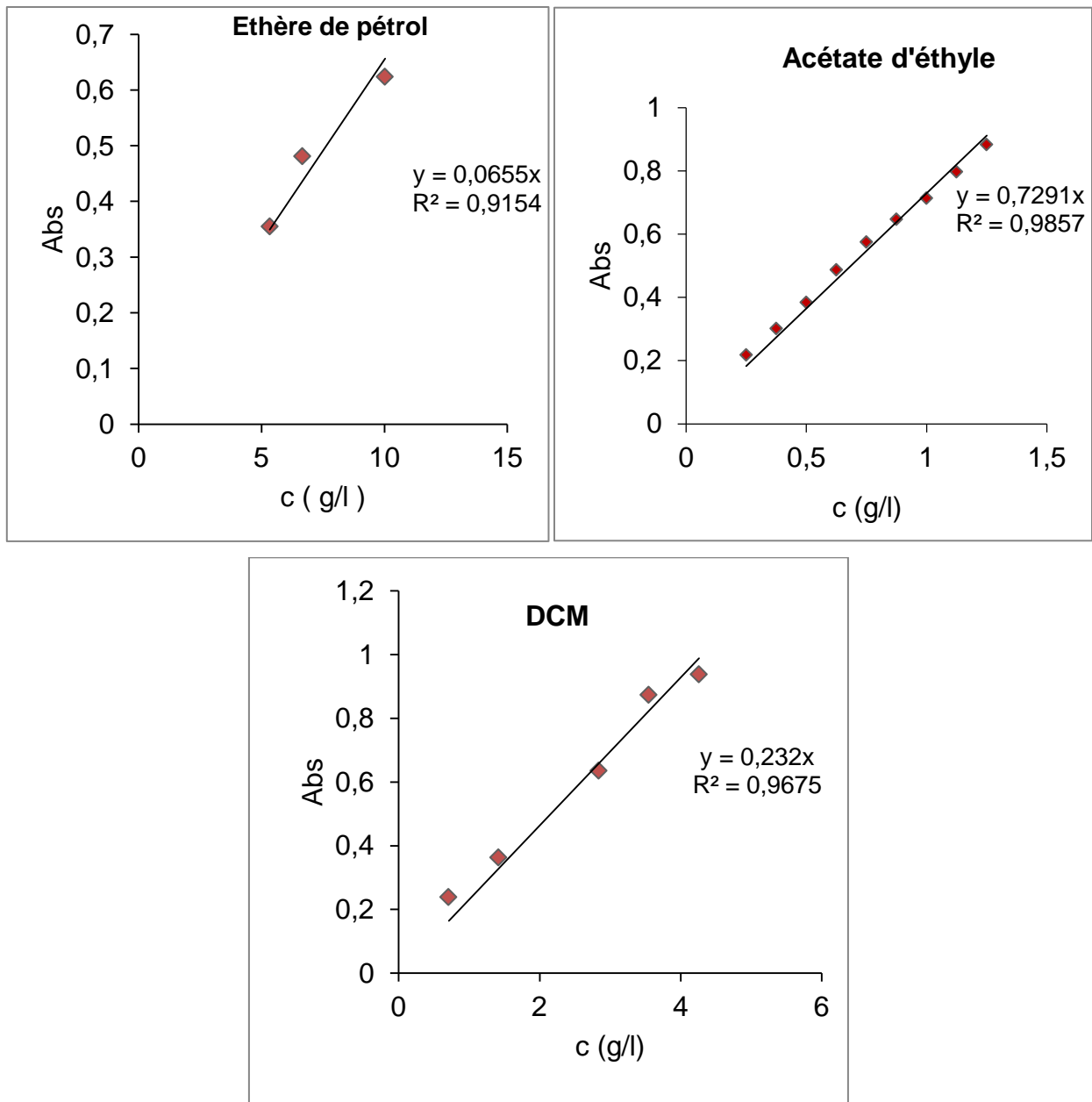


Figure16: courbes représentant le pouvoir réducteur des extraits de *Hylocereus sp.*

Conclusion

Conclusion

Les plantes aromatiques et médicinales sont la source de la majorité des antioxydants naturels et elles restent encore sous exploitées dans le domaine médicale. Dans l'industrie pharmaceutique, sachant que les antioxydants sembleraient contribuer de manière significative à la prévention des maladies, le développement de nouveaux médicaments à base d'antioxydants d'origine naturelle doit être à l'ordre de jour (**Bouras et Houchi, 2013**).

L'objectif de la présente étude est double. Le premier objectif étant l'extraction et l'estimation de rendement des plantes *Atractylis delicatula* et *Hylocereus sp.* Le second objectif est l'évaluation de l'activité antioxydante de ces dernières en utilisant deux méthodes, DPPH• et phosphomolybdate.

La première étape qui consiste à l'extraction des composés phénolique par la macération à froid puis l'extraction liquide-liquide avec des solvants à polarité croissante nous a permis de calculer le rendement de chaque extrait. Nous constatons que le rendement de l'extraction varie considérablement. Les pourcentages enregistrés sont compris entre 8 et 59,51%. Les extraits de l'espèce *Atractylis delicatula* donne clairement le meilleur rendement 59,51%.

La teneur des phénols totaux la plus élevée est retrouvée dans l'extrait Acétate d'éthyle d'*Atractylis delicatula* avec une valeur de $24,9 \pm 0,74$ mg/g EAG. En parallèle, la quantification des flavonoïdes a été effectuée par la méthode au trichlorure d'aluminium qui donne une couleur jaune avec les flavonoïdes. Nous avons observé que l'extrait d'Acétate d'éthyle d'*Atractylis delicatula* possède aussi la meilleur teneur $13,68 \pm 0,28$ mg/g EQ.

L'activité antioxydante des différents extraits évalués par deux méthodes : la méthode de radicale libre DPPH et le test phosphomolybdate. En comparant l'activité des différents extraits avec les IC₅₀ des standards utilisés on a observé que tous les standards ont une activité plus forte que les extraits étudiés.

D'après les résultats de DPPH, nous pouvons déduire que l'IC₅₀ des différents extraits varie de $0,74 \pm 0,008$ mg/ml pour Ac-Et *Hylocereus sp* à $36,33 \pm 0,24$ mg/ml pour l'extrait DCM l'*Atractylis delicatula*. Cela qui nous permet de constater que l'extrait Ac-Et de *Hylocereus sp* ont une capacité antioxydante moyenne et dépendante de la composition en métabolites secondaire de l'extrait comparativement à vitamine C, agent antioxydant de référence ($0,14 \pm 0,0008$ mg /g).

Conclusion

L'activité antioxydante est montrée chez *Hylocereus sp.* Un pouvoir de piéger le DPPH. Un peu plus important que celui des autres extraits de *Atractylis delicatula*.

Pour les résultats du test PPM, l'extrait d'acétate d'éthyle de *Hylocereus sp.* montre l'activité réductrice le plus puissant égale $0,02 \pm 0,001$ par rapport aux autres. Contrairement, l'extrait de dichlorométhane de *Atractylis delicatula* qui représente l'activité le plus faible avec une valeur $0,001 \pm 0,0004$ mg/g EVC.

Selon les résultats obtenus dans cette étude, nous pouvons dire que les deux plantes est riche en phénols totaux et en flavonoïdes. Les extraits de l'acétate d'éthyle et dichlorométhane pour les deux plantes donne une bonne activité antioxydante soit une capacité de piégeage de radicaux libres et le pouvoir réducteur, particulièrement l'acétate éthyle de *Hylocereus sp.*

Enfin ces résultats restent préliminaires et nécessitent des études complémentaires, pour cela il serait intéressant de tester d'autres méthodes pour mieux évaluer l'activité antioxydante, citant à titre d'exemple: FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter), et ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). En plus, étudier les différents facteurs influençant la variabilité de la composition en différents constituants et élargir l'étude sur d'autres organes des plantes étudiées afin de déterminer l'organe le plus riche en composés antioxydants.

Effectuer d'autres dosages comme le dosage : les tanins. Identifier leurs composés antioxydants des deux plantes, par des techniques plus avancées tel que HPLC. Etudier d'autres propriétés biologiques de ces plantes à savoir les propriétés : Antifongiques, anti-inflammatoire, antimicrobienne et d'autres.

Notre perspective d'avenir est orienter les chercheurs scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires de l'activité antioxydante des composés phénoliques et huiles essentielles des deux plantes. De ce fait, d'autres études concernant l'identification des molécules bioactives, la confirmation de la capacité antioxydante de ces plantes par des tests *in vivo* et évaluation de leurs efficacités dans le domaine de traitement (chez les patients atteints des maladies causées par le stress oxydatif) et/ ou la prévention contre leurs dangers et le vieillissement surtout avec le développement de l'âge et l'existence de pollution, radiations ultra violettes, électronique, ionisante, des sports mal gérés et des alimentations malsaines.

Références

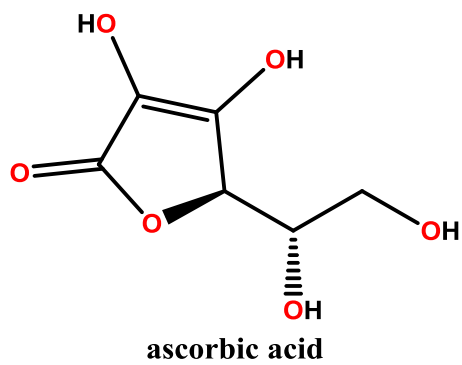
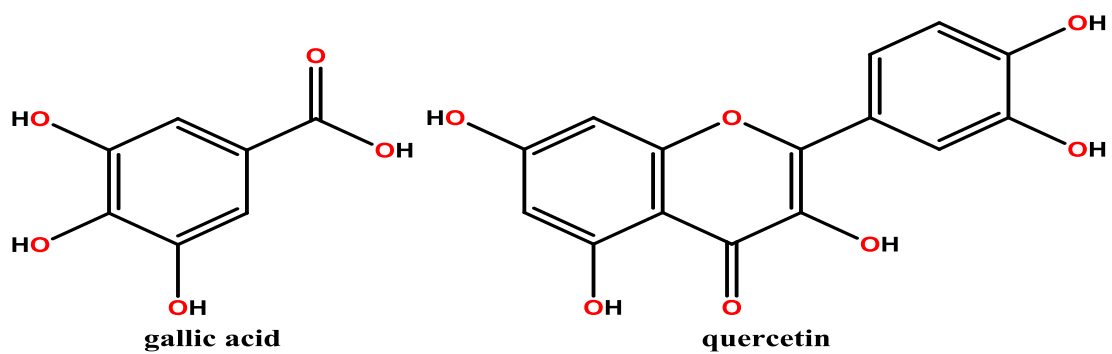
Références

- **Abdelaziz, M., NOUI, A., Medjahed, H., Nedjari, K., Benhadj, A et Saadi, A. (2014).** Activité antioxydante des composés phénoliques d'huile d'olive extraite par méthode traditionnelle. Available online at <http://ajol.info/index.php/ijbcs> .Int. J. Biol. Chem. Sci. 8(4): 1865-1870, August 2014 .ISSN 1997-342X (Online), ISSN 1991-8631 (Print). p1865.
- **Boizot, N et Charpentier J.P. (2006)** .Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, Numéro spécial 2006. p80.
- **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. P 8, 9, 20,21
- **Abayomi, S. (2010).** plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique (Medicinal plants and traditional medicine in Africa). Edition Diffusion 22-24, boulevard Arago 75013 Paris (édition originale, Spectrum Books Limited, Ibadan, 1982.Copyright au nom de l'auteur). p46.
- **Belyagoubi, N. (2012).** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-ouest Algérien. Thèse de doctorat. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen. p5, 6.
- **Benali, D et Bencheikh, S. (2016).**Contribution à l'étude des propriétés antioxydants de certaines huiles essentielles extraites des épices. .mémoire de master. Université kasdi Merbah Ouargla. P11, 12,20
- **Bensaci, S et Khadir , A. (2016).**Contribution à l'étude de la vertu thérapeutique des extraits de quelques plantes utilisées dans la médecine populaire de la région de Ouargla .Mémoire de master. Université kasdi Merbah Ouargla .p5, 11.
- **Bouchouka, E. (2016).**extraction des polyphénols et l'étude des activités antioxydantes et antibactérienne de quelques plantes sahariennes. Thèse de Doctorat. Université de Badji Mokhtar Annaba. P 10,68.
- **Bouchria s et Bougrine, k. (2018).** étude de l'activité antioxydante des extraits de quelques plantes médicinale locales. Mémoire de master. Université Amar Telidji –Laghouat. p15.
- **Boughellout, M et Amara, T. (2015).** les effets protecteurs des plantes médicinales contre le stress oxydant. Mémoire de master. Université des Frères Mentouri Constantine. p 5.
- **Bouguerne, B. (2012).** conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose). Thèse de doctorat. Université de Toulouse .p14, 16.
- **Boulkroune, N. (2012).** Etude de l'activité antioxydante d'une plante médicinale «*Matricariapubescens*»: effets de la durée et du solvant d'extraction. Thèse de doctorat. Université Abderrahmane mira Bejaïa. p18.
- **Bouras F et Houchi A. (.2013).** étude de l'activité antioxydante de la plantes *rumex vesicarius*. Mémoire de master. Université kasdi Marbah Ouargla. p3.
- **Boussoussa, H. (2011).** activité antioxydante et antibactériennes des extraits phénoliques des fleurs de *Rhanterium adapressum*. Mémoire de magister. Université Amar Telidji –Laghouat. p 12 ,32.
- **Bellaouar, N et Khemgani, O. (2016).** Le potentiel antioxydant *in vitro* et l'activité biologique des dithiolethiones. Mémoire de master. Université kasdi Merbah ouargla.p6
- **Fadili, K., Amalich, S., Soro, K., N'dedianhoua, Bouachrinem, Mahjoubi, M., El Hilali, F., Zair, T. (2015).** Polyphénols content and antioxidant activity of two species from Moroccan High Atlas: *Rosmarinus officinalis* and *Thymus satureioides*. Zair International Journal of Innovation and Scientific Research ISSN 2351-8014 Vol. 17 No. Aug. p. 24-33 (2015) Innovative Space of Scientific Research Journals (2015) p28.
- **Fethoun, M et Saheb, Rosa. (2015).** Evaluation de l'activité antioxydant de différents extraits de *Foeniculum vulgare*. Mémoire de master. Université A. MIRA Béjaïa. P1, 9, 10, 13,15.
- **Hocine, F et Gorine, M. (2017).** évaluation de l'exposition au plomb et cadmium et impact sur quelques paramètres du statut oxydant/anti oxydant chez les ouvriers exposes aux fumées de soudage. Mémoire de master. Université Aboubekr Belkaid Tlemcen. p9, 14.
- **Kessoum, S. (2014).**Activité antioxydant des polyphénols d'*Artemisia herba alba* .Mémoire de master. Université Abderrahmane MIRA de BEJAIA. p9, 10,13.
- **Latreche, S et Saadi, N. (2013).**Activité antioxydante et effet sur la peroxydase de l'extrait méthanolique des feuilles de *citrus grandis* (pamplemousse). Mémoire de Master. Université Abderrahmane MIRA de Bejaia. p16.
- **Mechernene, B. (2014).** Évaluation de l'activité antioxydante de quelques extraits de la racine de *Bryonia dioica*. Mémoire de master. Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen. p6.
- **Macheix, J.J ; ANNIE, Fleuri, C., Alleman, J. (2005).** les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. P181.
- **Messili, K et Oulefki, N. (2013).**Activités anti-hyperuricémique et antixanthine oxydoréductase *in vivo* de l'extrait aqueux de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*. Mémoire de master. Université Abderrahmane mira-Bejaia .p01

Références

- **Migdal, C et Serres, M. (2011).** Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. médecine/sciences 2011 ; 27 : 405-12. Synthèse revues. Université Lyon 1, France. p 409,411
- **Mohammedi, Z. (2005).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de Magister. Université de Tlemcen. p 1.
- **Mika, A., Minibayeva, F., Beckett, R., Lüthje S. (2004).** Possible functions of Milane H. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère peroxydant ou thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg I.155p.
- **Rabhi, H et Bachiri, K. (2016).** Etude de l'activité antioxydante *in vitro* extraite à partir des plantes : *Punicagranatum*, *Oleaeuropaea*, *figus carica*. Mémoire de master, Université Constantine. p39.
- **Sekli-Belaidi, F (2011).** Fonctionnalisation de surfaces d'électrodes par un film de poly (3,4-éthylènedioxythiophène) PEDOT pour l'élaboration de microcapteur spécifique des acides ascorbique et urique : application à l'étude des propriétés antioxydantes du sérum sanguin. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. p 15
- **Temmir, K et Lheziel, A. (2015).** Etude de l'activité antioxydante des extraits phénoliques de quelques plantes médicinales. mémoire de master .Université Amar Thelidji-Laghout. p4, 21, 22
- **Tiffany Claudia Eversley. (2012).** Le potentiel antioxydant de l'alimentation tel qu'estimé par le score ORAC : une comparaison des apports des personnes âgées avec démence du type Alzheimer avec ceux des témoins sans problèmes cognitifs .Mémoire Université de Montréal. p31.
- **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant (Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique). Article de l'actualité chimique. p108
- **Ramawat K.G et Mérillon J.M. (2007).** Bioactive Molecules and Medicinal Plants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p 01
- **Prashant Tiwari, Bimlesh Kumar, Mandeep Kaur, Gurpreet Kaur, Harleen Kaur. (2011).** Phytochemical screening and Extraction: A Review. internationale pharmaceuticasciencia. Jan-Mar 2011 / Vol 1 / Issue 1.p 98

Annexe



Les structures chimiques des standards utilisés traité par chemspider

