



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Moléculaire et Santé

Intitulé :

**Evaluation phytochimique et étude des activités biologiques
d'une plante médicinale Algérienne (*Foeniculum vulgare*)**

Présenté et soutenu par : KISSOUM AMINA

& KHALFAOUI KHADIDJA

Le : 17/06/2015

Jury d'évaluation :

Président du jury : MOKRANI El hassen (Maitre assistant A - UFM Constantine).

Rapporteur : DEMMAK Rym Gouta (Maitre assistant A – UC3 Constantine).

Examineur : MOSBAH Asma (Maitre assistant A -UFM Constantine).

*Année universitaire
2014 - 2015*

Remerciement

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

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à tous nos professeurs qui ont contribué à notre formation

Nous désirons exprimer notre profond remerciement et vive reconnaissance à notre encadreur Melle. DEMMAK R. (Maitre assistant A. à l'a faculté de Médecine) pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigoureuse scientifique, sa disponibilité, ses précieux conseils, la confiance qu'elle nous a accordé et pour son suivi régulier à l'élaboration de Ce travail

Nous exprimons nos vifs remerciements à Mr MOUKRANI El hassen (Maitre assistant A. à l'université Frères Mentouri) pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury

Nous remercions également Madame MOSBAH.A (Maitre assistant A. à l'université Frères Mentouri) d'avoir accepté d'être parmi les membres du jury de ce mémoire.

Merci aussi à Madame Zoughleçh (Maitre assistant A. à l'université Frères Mentouri) pour toute l'aide qu'elle nous a apporté au cours de notre travail au laboratoire.

Nous adressons nos remerciements aux personnes qui nous ont aidé dans la réalisation de ce mémoire et spécialement au personnel du laboratoire de biochimie en particulier Zahra, Nabil, Yasser et Ammar

Nous ne voudrions pas oublier tous nos collègues que nous avons côtoyés au Laboratoire de biochimie, notamment : Lokmen, Maya.H, Roumeissa, Randa, Yasmin, Merieme.b, Alima et bien d'autres encore...

A toute personne qui a participé de près ou de loin directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail

Amina & Khadidja

œ Dédicace œ

Ce mémoire est dédié à ma très chère mère FATIHA qui m'a quitté l'année passée mais elle est toujours dans mon esprit et dans mon cœur elle m'a toujours poussé et motivé dans mes études. je l'a dédie aujourd'hui ma réussite qui représente l'aboutissement du soutien et des encouragements qu'elle m'a prodigués tout au long de ma scolarité. Qu'elle en soit remerciée par ce travail

Que dieu Le miséricordieux t'accueille dans son éternel paradis

A mon cher père pour son soutien et son amour.

À la pensée de mes grands parents paternels.

A ma grande mère maternelle pour son amour.

A mes sœurs Kenza et Noussa pour leur soutien moral et pour leur amour et soins

A mon ange Maya Loudjeine la petite fille de Kenza

A mon frère Rabah pour son exemple et le soutien apporté pendant toute ma vie.

A mon fiancé FATEH qui m'a beaucoup encouragée tout au long de ce travail.

Merci d'avoir montré beaucoup de patience avec moi durant les moments les plus stressants, merci pour ta fidélité et ta gentillesse.

A ma chère amie et mon binôme Khadidja j'ai partagée avec elle les joies et les difficultés au suivi de notre travail.

A ma chère amie Bouchera qui a partagé toutes les bons et les mauvais moments avec moi

A toutes ma famille et mes amies

Amina



DEDICACE

Je dédie ce mémoire

♥ A Ma mère Laatra qui m'a soutenu durant toute ma vie ,qui m'a appris a aimé le travail et le comportement pour son amour infini et sa bienveillance jour et nuit .Merci maman ♥.

A Mon père Maamar Pour son patience, son amour, son soutien.

A ma sœur : Fatima, Merci pour tous ce que tu as fait pour moi.

A mon cher frère : yaakoub.

A ma meilleure amie qui est toujours avec moi : sara

A toute ma famille.

A mon binôme et ma meilleure amie Amina.

A toutes mes amies et surtout Asma. , Amina

A mes ami(e)s de la promotion de master BMS.

A tous ceux que je l'aime....

Khadidja

Listes des tableaux et des figures

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification du fenouil.....	4
Tableau 2 : Les différentes classes des terpénoïdes.....	7
Tableau 3 : Classification des composés phénoliques.....	8
Tableau 4 : Exemples d'antioxydants retrouvés dans les aliments.....	24
Tableau 5 : Gamme de dilution décroissante du décocté pour la mesure de l'indice de mousse.....	26
Tableau 6 : préparation de la gamme d'étalonnage de l'acide gallique.....	30
Tableau 7 : préparation de la gamme d'étalonnage de quercétine.....	31
Tableau 8 : Résultats du criblage phytochimique de la partie aérienne de <i>Foeniculum vulgare</i>	36
Tableau 9 : Tableau récapitulatif regroupant les rendements des différents extraits.....	37
Tableau 10 : Teneurs en phénols totaux dans les extraits Butanol et Acétate d'éthyle.....	38
Tableau 11 : Teneurs en flavonoïde dans les extraits Butanol et Acétate d'éthyle.....	40
Tableau 12 : Regroupement des résultats de la CCM.....	42
Tableau 13 : Diamètres en mm des zones d'inhibition de l'extrait acétate d'éthyle.....	43
Tableau 14 : Diamètres des zones d'inhibition de l'extrait chloroforme.....	43
Tableau 15 : Diamètres en mm des zones d'inhibition de l'extrait butanolique.....	44
Tableau 16 : Les valeurs d'IC50 des extraits étudiés.....	48

Liste des figures

Figure 1: Le fenouil sauvage.....	3
Figure 2 : <i>foeniculumvulgare</i>	4
Figure 3 : Structure de base des terpénoïdes.....	7
Figure 4 : Principaux acides hydroxycinnamiques.....	9
Figure 5 : Principaux acides hydroxybenzoïques.....	9
Figure 6 : Structure deCoumarines.....	9
Figure 7 : Structure de base des flavonoïdes.....	10
Figure 8: Des exemples des structures chimiques des flavonols.....	10
Figure 9: Des exemples des structures chimiques des flavones.....	11
Figure 10: Des exemples des structures chimiques des flavanones.....	11
Figure 11: Deux exemples des structures chimiques des flavan-3-ols.....	11
Figure 12: Deux exemples des structures chimiques des isoflavones.....	12
Figure 13: Structures chimique d'anthocyane.....	12
Figure 14: Structure de base de Tanins galliques et Tanins ellagiques.....	13
Figure 15 : Structure de tanins condensés.....	13
Figure 16: Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants.....	17
Figure 17: Acide Ascorbique (vitamine C).....	20
Figure 18: n-tocophérol.....	20
Figure 19 : β -carotène.....	21
Figure 20 : Morine.....	22
Figure 21: Manguiférine.....	22
Figure 22: Resvératol.....	23
Figure 23 : Extraction liquide-liquide.....	28
Figure 24: Histogramme de rendement de l'extraction.....	37
Figure 25: Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols	38

Figure26 :Histogramme de dosage des polyphénols.....	39
Figure27 : Courbe d'étalonnage du Quercitine.....	40
Figure28 :Histogramme de dosage de flavonoïdes.....	40
Figure29 : Chromatographie sur couche mince des extraits de <i>foeniculumvulgare</i>	41
Figure 30 : Les zones d'inhibition d' <i>E.Colide</i> l'extrait butanolique.....	45
Figure 31 : Les zones d'inhibition de <i>staphylococcus aureus</i> de l'extrait butanolique.....	45
Figure 32 . Les zones d'inhibition de <i>pseudomonasaeruginosade</i> l'extrait butanolique.....	45
Figure 33 . Les zones d'inhibition d' <i>E.Colide</i> l'extrait acétate d'éthyle.....	46
Figure 34 . Les zones d'inhibition de <i>staphylococcus aureusde</i> l'extrait acétate d'éthyle.....	46
Figure 35 . Les zones d'inhibition d' <i>E.Colide</i> l'extrait chloroforme.....	46
Figure 36 . Les zones d'inhibition de <i>staphylococcus aureusde</i> l'extrait chloroforme.....	46
Figure 37 . Les zones d'inhibition de <i>pseudomonasaeruginosade</i> l'extrait chloroforme.....	47
Figure 38 : Pourcentage d inhibition du radical libre DPPH en fonction desConcentrations de la Quercétine.....	47
Figure 39 : Pourcentage d'inhibitions du radical libre DPPH en fonction des Concentrations de l'extrait acétate d'éthyle.....	48
Figure 40 : histogramme représentant le pouvoir d'inhibition des différents extraits.....	49

Abréviations

% : Pourcentage

[] : Concentration

Abs : Absorbance

AcOEt : Acétate d'éthyle

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

CCM : Chromatographie sur couche mince

CI50: Concentration inhibitrice à 50%

cm : centimètre

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle)

DO : Densité Optique

FeCl₃ : Trichlorure de fer

g : gramme

GPx : la glutathion peroxydase

GSH: Glutathion

H₂O : Eau

HCl : Acide chlorhydrique

HClO : L'acide hypochloreux

H₂SO₄ : Acide sulfurique

H₂O₂ : le peroxyde d'hydrogène

MeOH : Méthanol

Mg : Milligramme

Min : Minutes

ml : Millilitre

Mm : Millimètre

n-BuOH : n- butanol

NO•: Monoxyde d'azote

O₂•: anion superoxyde.

OH•: radical hydroxyl.

ONOO – Le peroxy nitrite

RO• : Radical oxyl.

ROO• : Radical peroxy.

SOD : superoxyde dismutase

UV : Ultra-violet

µg : microgramme

µl : Microlitre

Table des matières

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre I: Rappels bibliographiques

1. Présentation de la plante (<i>Foeniculum vulgare Miller</i>).....	3
1.1. Historique.....	3
1.2. Généralités.....	3
1.3. Description botaniques	3
1.4. Taxonomie et classification.....	4
1.5. Habitat et répartition géographique	4
1.6. Utilisation thérapeutique du fenouil	5
1.6.1. Usage traditionnelle	5
1.6.2. Utilisation en pharmacologie.....	5
1.7. Composition chimique du fenouil	5
1.7.1. Huiles essentiels.....	6
1.7.2. Autres constituants.....	6
2. Les Métabolites Secondaires	6
2.1. Introduction	6
2.2. Classification des métabolites secondaires	6
2.2.1. Les terpénoïdes	6
2.2.2. Les hétérosides	7
2.2.3. Les composés phénoliques	7
2.2.3.1. Les acides phénoliques simples (C6-C1 ou C6-C3)	8
2.2.3.2. Les flavonoïdes	9
2.2.3.3. Les anthocyanidines.....	12
2.2.4. Les tanins	12
2.2.5. Les saponosides.....	13
2.2.6. Les alcaloïdes	14
3. Les activités biologiques	15
3.1. Activité antibactérienne	15
3.1.1. Définition des antibiotiques	15

3.1.2. Les différents types d'antibiotiques.....	15
3.1.3. Le mode d'action des antibiotiques	15
3.1.4. L'antibiogramme	16
3.2. Activité antioxydant.....	16
3.2.1. Généralités	16
3.2.2. Stress oxydatif.....	17
3.2.3. Réaction de l'organisme vis a vis des radicaux libres	18
3.2.4. Les antioxydants	18
3.2.5. Mécanisme d'action des antioxydants	19
3.2.5.1. Médicaments.....	19
3.2.5.2. Source naturels.....	19

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Extraction des substances actives	24
1.1. Matériel végétal.....	24
1.2. Screening phytochimique.....	24
1.2.1. Préparation de l'infusé.....	24
1.2.2. Protocole expérimentale des composés phénoliques	24
a) Criblage des flavonoïdes.....	24
b) Mise en évidence des polyphénols	25
c) Mise en évidence des tanins condensés.....	25
d) Criblage des tanins catéchiques	25
e) Criblage des triterpènes.....	25
f) Mise en évidence des saponosides.....	26
g) Mise en évidence des alcaloïdes	26
1.3. Préparation de l'extrait brut.....	27
1.4. Extraction liquide-liquide.....	27
2. Analyses quantitatives des extraits	29
2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	29
2.2. Dosage des flavonoïdes.....	30

2.3. Chromatographie sur couche mince CCM.....	32
3. Etude des activités biologiques des substances actives.....	32
3.1. Test de l'activité antibactérienne.....	32
3.1.1. Souches bactériennes.....	33
3.1.2. Test de l'activité inhibitrice.....	33
3.2. Test de l'activité antioxydante.....	34
3.2.1. Effet scavenger du radical libre DPPH.....	34

Chapitre III: Résultats et discussions

1. Résultats de l'étude phytochimique de <i>Foeniculum vulgare</i>	36
1.1. Résultats de l'étude qualitative	36
1.2. Détermination du rendement.....	37
2. Résultats de l'étude quantitative.....	38
2.1. Dosage des composés phénoliques totaux	38
2.2. Dosage des flavonoïdes	39
2.3. La chromatographie sur couche mince.....	41
3. Résultats des tests biologiques.....	42
3.1. Test de l'activité antibactérienne.....	42
3.2. Résultats du pouvoir antioxydant.....	48
Conclusion.....	50
Références bibliographiques	

Annexe

Résumés

Introduction

Depuis l'antiquité, l'homme n'a cessé de chercher à subvenir à ses besoins en puisant dans la nature qui lui assure non seulement ses besoins nutritionnels et vestimentaires mais également médicamenteux [1].

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales dans l'optique de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé humaines [2].

De plus, la médication par les produits de synthèse devient préoccupante car elle présente de nombreux effets néfastes pour la santé. A cet effet, l'étude de substances actives ou principes actifs d'origine naturelle moins toxiques suscite un regain d'intérêt des scientifiques, du fait qu'elle permet la mise au point de nouveaux médicaments [3].

En effet, ces plantes constituent un patrimoine précieux pour l'humanité et plus particulièrement pour la majorité des communautés démunies des pays en voie de développement qui en dépendent pour assurer leurs soins de santé primaire et leurs subsistances. Elles utilisent la plupart des espèces végétales, tant ligneuses qu'herbacées, comme médicaments. Une croyance bien répandue est que toute plante soigne. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 80% des populations africaines ont recours à la médecine et à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de santé [4].

Les plantes possèdent des milliers de substances actives à l'intérieur de leurs organes (feuilles, fleurs, racines...) et peuvent, selon des techniques chimiques (extraction, distillation...), permettre l'isolation du principe actif pour l'utiliser en pharmacie. Ces remèdes naturels sont bien souvent très efficaces avec moins d'effets secondaires reconnus que beaucoup de médicaments de synthèse, mais peuvent néanmoins être mortels ou toxiques pour l'organisme lorsqu'ils sont mal utilisés [5].

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse. De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, alcaloïdes, terpènes ...etc. [6].

L'Algérie vu sa position biogéographique privilégiée et son étendu entre la Méditerranée et l'Afrique subsaharienne est considérée parmi les pays connus pour leur

diversité floristique [7] à laquelle s'ajoute une tradition séculaire d'utilisation traditionnelle des plantes. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% sont endémiques. Ce potentiel de plantes médicinales comporte des milliers d'espèces présentant divers intérêts et constituent un axe de recherche scientifique particulier [8].

Dans le cadre de l'axe de recherche sur la valorisation de la biodiversité floristique Algérienne et plus particulièrement des plantes aromatiques et médicinales, nous avons entrepris l'étude phytochimique du fenouil sauvage (*foeniculum vulgare*) afin de justifier scientifiquement l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle [3].

En fixant comme principal objectif, l'extraction et l'évaluation phytochimique des métabolites secondaires du *foeniculum vulgare*.

Dans un deuxième temps, tester l'activité antioxydante et antibactérienne de la plante à l'égard de souches bactériennes.

Chapitre 1 :
Rappel
bibliographique

1. Présentation de la plante (*Foeniculumvulgare* Miller)

1.1. Historique

Le fenouil est une herbe avec une grande histoire d'utilisations médicinale et culinaire. Le nom de *Foeniculuma* été donné à cette plante par les Romains et est dérivé du mot latin *foenum*, c'est-à-dire herbe. Le fenouil est communément appelé "besbes" par les populations locales [9].

Le nom du genre vient du latin *foenum* (foin), ou *funiculis* (petit filet), en référence aux lanières des feuilles, *Vulgare* indique une plante commune [10].

1.2. Généralités

Fenouil (*Foeniculumvulgare*) est une plante médicinale et aromatique appartenant à la famille des ombellifères (*Apiaceae*), connu et utilisé par les humains depuis l'Antiquité. Il a été cultivé dans tous les pays entourant la mer Méditerranée en raison de sa saveur. Le regain d'intérêt dans le produit naturel plutôt que des agents synthétiques a de nouveau attiré l'attention sur les plantes comme source de composés aromatiques [11].



Figure 1: le fenouil sauvage.

1.3. Description botanique

Foeniculumvulgare Mille est une plante bisannuelle herbacée et vivace peut pousser jusqu'à 2,5 m de hauteur avec des tiges creuses. Les feuilles sont constituées de trois à quatre folioles réparties en lanières filiformes d'environ 0,5 mm de large. Les fleurs jaunes se présentent en ombelles. Le fruit est une graine sèche 4-10 mm de long [12].



Figure 2 : *foeniculumvulgare*.

1.4. Taxonomie et classification

Le classement actuel des plantes de fenouil est principalement basé sur leur utilisation Il y a une seule espèce du fenouil (*Foeniculumvulgare* Miller) Cette espèce est divisée en deux sous-espèces: vulgare et *piperitum*[13].

Tableau 1 : classification du fenouil [14].

Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Tracheophyta</i>
Subdivision	<i>Spermatophytina</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Apiales</i>
Famille	<i>Apiaceae</i>
Genre	<i>Foeniculum</i>
Espèce	<i>Vulgare</i>
Nom botanique	<i>Foeniculumvulgare</i> Mill

1.5. Habitat et répartition géographique

Le fenouil est originaire de la région méditerranéenne [15]. Il est généralement considéré comme indigène sur les rives de la mer méditerranée mais est devenu largement naturalisée dans de nombreuses parties du monde, en particulier sur les sols secs, près de la côte de la mer et sur les berges de la rivière [12]. Il a été cultivé dans la Russie, l'Inde, la Chine et le Japon [15].

1.6. Utilisation thérapeutique du fenouil

Foeniculum vulgare est une importante et bien connue, plante médicinale et aromatique avec effet carminative, digestive, galactogène et diurétique, indiquée dans le traitement des troubles respiratoires et gastro-intestinales [12].

1.6.1. Usage traditionnelle

Foeniculum vulgare a été largement utilisé dans la médecine traditionnelle pour le traitement d'un certain nombre de maladies, par exemple, les douleurs abdominales, antiémétique, apéritif, l'arthrite, le cancer, pour calmer les coliques de l'enfant et du nourrisson, la conjonctivite, la constipation, dépuratif, la diarrhée, tréma, emménagogue, fièvre, flatulence, gastralgies, la gastrite, l'insomnie, les douleurs du foie, ulcère de la bouche, et les maux d'estomac. Les parties aériennes (feuilles, tiges et fruits / graine) de *F. vulgare* sont largement utilisées comme galactagogues favorisant la montée du lait [14].

1.6.2. Utilisation en pharmacologie

Foeniculum vulgare Millauprès des différentes activités pharmacologiques mentionnées dans la médecine traditionnelle iranienne et la phytothérapie moderne tels qu'un antioxydant, cytotoxiques, anti-inflammatoire, antimicrobien, bronchodilatateur, oestrogénique, diurétique, lithontripic, galactogogue, emménagogue, antithrombotique, hypotenseur, gastroprotecteur, hépatoprotecteur, améliorant la mémoire, et les activités antimutagènes. Aucun événement indésirable grave n'a été enregistré après l'ingestion de *F. vulgare* l'exception de quelques cas de réactions allergiques [16].

❖ Les formes de préparation (formes galéniques)

- > Tisane de fenouil
- > Décoction de fenouil (racine)
- > Gélule de fenouil
- > Teinture de fenouil
- > Extrait de fenouil en fluide [14].

1.7. Composition chimique du fenouil

F. vulgare contient 6,3% d'humidité, 9,5% de protéines, 10% de matières grasses, 13,4% de minéraux, de fibres et de 18,5% à 42,3% de glucides. Les minéraux et les vitamines présentes dans *F. vulgare* sont le calcium, le potassium, le sodium, le fer, le phosphore, la thiamine, la riboflavine, la niacine et la vitamine C [12].

1.7.1. Huiles essentiels

Les principaux composants d'huiles essentielles des fruits de *F. vulgare* sont trans-anethole, estragol, fenchone, et α phellandrène [17]. Il renferme également de l'alcool anisique, de l'anisaldéhyde ainsi que des monoterpènes (1 à 5%): (R)-limonène, α -pinène, camphre, p-cymène, myrcène, α - et β -phellandrènes, sabinène, γ -terpinène, cis- β -ocymène et terpinolène [18].

1.7.2. Autres constituants

- Acide phénylacryliques, alcools phénylalyliques, acides phénolcarboxyliques.
- Hydroxycoumarines (traces) : osthénol, scoparine et ombélliférone.
- Furanocoumarines (traces) : bergaptène, impérorine et psoralène.
- Flavonoïdes (peu abondants).
- Trimères de stilbènes et leurs hétérosides.
- lipides 9 à 21%
- protéines 20 à 30% [18].

2. Les Métabolites Secondaires

2.1. Introduction

Les métabolites secondaires sont souvent considérés comme n'étant pas essentiels à la vie de la plante. Ils sont bio synthétisés à partir de métabolites primaires et jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème. Plus de 8500 métabolites secondaires sont déjà connus [19].

2.2. Classification des métabolites secondaires

Les plantes sont capables de produire de nombreux métabolites secondaires qui sont classés selon leur structure chimique en quatre groupes majeurs sont :

- Les terpénoïdes.
- Les hétérosides.
- Les composés phénoliques ou aromatiques.
- Les alcaloïdes.

2.2.1. Les terpénoïdes

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique [20].

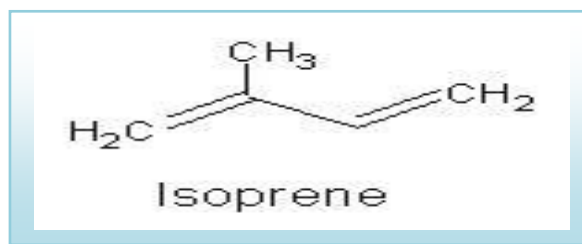


Figure 3 : Structure de base des terpénoïdes.

Ils sont formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta carbonées ramifiées dérivées du 2-methylbutadiène, appelées unités isopréniques (C₅H₈) n. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des anneaux. De ce fait les terpènes sont classifiés comme suit [19]:

Tableau 2: les différentes classes des terpénoïdes.

Terpènes	Unités isopréniques	Atomes de carbone
Monoterpénoïdes	2	10
Sesquiterpénoïdes	3	15
Diterpénoïdes	4	20
Sesterpénoïdes	5	25
Triterpénoïdes	6	30

Les terpènes sont les principaux composants de la résine végétale et des huiles essentielles extraites de ces plantes.

2.2.2. Les hétérosides

Les hétérosides ou glycosides sont des molécules formées par combinaison d'oses et de substances non glucidique appelées aglycones ou génines .ce sont le secondaire le plus anciennement connues .il forment des substances de réserve localisées dans les vacuoles cellulaires .les hétérosides se différencient entre eux par leurs génines qui appartiennent à tous les groupes de métabolisme secondaire (flavonoïde, saponosides , et tanins) et par le mode de liaison entre le génine et l'ose ainsi que par la nature de la partie glucidique.il sont classés selon la nature de la liaison en C-, N , O- , S- hétérosides [3].

2.2.3. Les composés phénoliques

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés parla présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au

moins ungroupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc.

En effet les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le pluslargement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliquesconnus.

Les principales classes de composants phénoliques sont : les acides phénoliques (acidecaféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent

plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines. Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétauxsupérieurs : racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits [6].

Tableau 3: classification des composés phénoliques.

Structure	Classe
C6	phénols simples
C6-C1	acides benzoïques et composés voisins
C6-C2	acétophénones et acides phénylacétiques
C6-C3	acides cinnamiques et composés voisins
C6-C3	coumarines, isocoumarines et chromones
C15	chalcones, auronnes, dihydrochalcones
C15	flavanes
C15	flavones
C15	flavanones
C15	flavanols
C15	anthocyanidines
C15	anthocyanines
C30	biflavonyles
C6-C1-C6, C6-C2-C6	benzophénones, xanthonnes, stiblènes
C6, C10, C14	benzoquinones, naphthoquinones,
C18	anthraquinones
Lignanes, neolignanes	betacyanines et betaxanthines
Lignines	dimères ou oligomères
Tanins	polymères
Phlobaphènes	oligomères ou polymères
	polymères

2.2.3.1. Les acides phénoliques simples (C6-C1 ou C6-C3)

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts qui sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques [21].

❖ Acides hydroxycinnamiques

Dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C6-C3).
Existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les

degré d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent une réactivité chimique importante de ces molécules [22].

R1=R2=H Acide cinnamique (non phénolique)

R1=H, R2=OH Acide *p*-coumarique

R1=R2=OH Acide caféique

R1=OCH₃, R2=OH Acide férulique

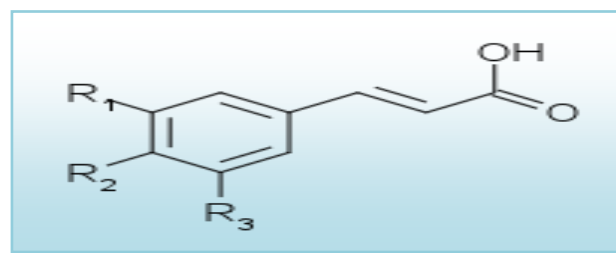


Figure 4 : Principaux acides hydroxycinnamiques.

❖ Acides hydroxybenzoïques

Sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C6-C1). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides [22].

R1=R2=R4=H, R3=OH Acide *p*-hydroxybenzoïque

R1=R4=H, R2=R3=OH Acide protocatéchique

R1=R4=H, R2=OCH₃, R3=OH Acide vanillique

R1=H, R2=R3= R4=OH Acide gallique

R1=OH, R2=R3= R4=H Acide salicylique

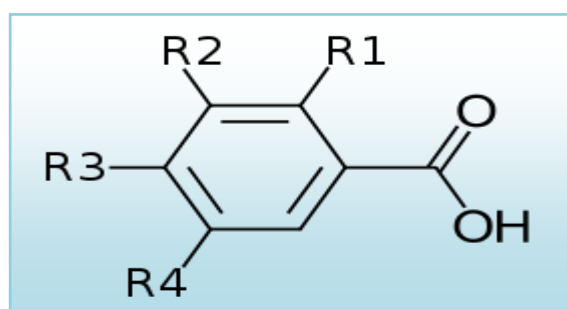


Figure 5 : Principaux acides hydroxybenzoïques.

❖ Coumarines C6-C3

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique [22].

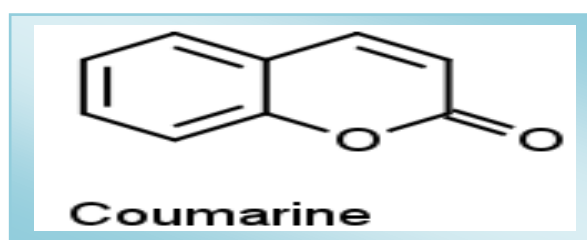


Figure 6 : Structure des Coumarines.

2.2.3.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les représentants les plus nombreux dans la famille des polyphénols (plus de 5 000 molécules isolées). Ce sont des pigments végétaux jaune orangé (leur nom venant du mot latin *flavus* : jaune) [23]. Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (C6-C3-C6), ils contiennent quinze atomes de carbone dans leur structure de base: deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbones liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C [21].

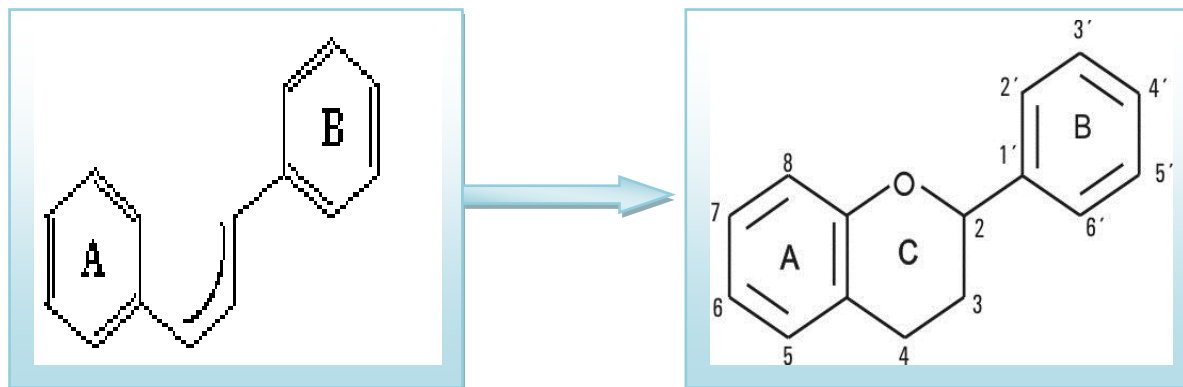


Figure 7 : Structure de base des flavonoïdes.

➤ Les principales classes de flavonoïdes

Les principales classes des flavonoïdes sont : les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les isoflavones et les anthocyanes, ils varient dans leurs caractéristiques structurales par la diversité fonctionnelle autour de l'oxygénation de l'hétérocycle [21].

a) Flavonols

Les flavonols sont caractérisés par la présence d'une double liaison en position 2-3 et d'un groupement hydroxyle en C3 (figure 8). Elles sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal, leur couleur varie du blanc au jaune, elles sont essentiellement représentées par la quercétine, le kaempférol et la myricétine. Les flavonols qui s'accumulent dans les tissus végétaux sont presque toujours sous la forme conjugués glycosylés [21].

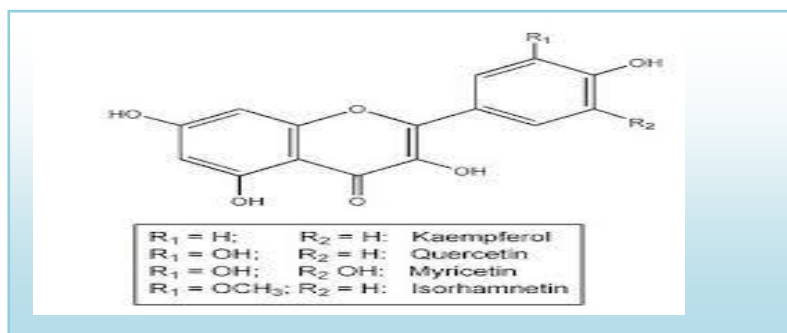


Figure 8: Des exemples des structures chimiques des flavonols.

b) Flavones

Les flavones sont structurellement très similaires aux flavonols et ne diffèrent que par l'absence d'hydroxylation en position 3 sur le cycle C (figure 8). Elles sont principalement représentées dans l'alimentation par l'apigénine et la lutéoline. Contrairement aux flavonols, elles sont moins répandues dans les fruits et les légumes. Par conséquent, leur apport alimentaire est très faible [21].

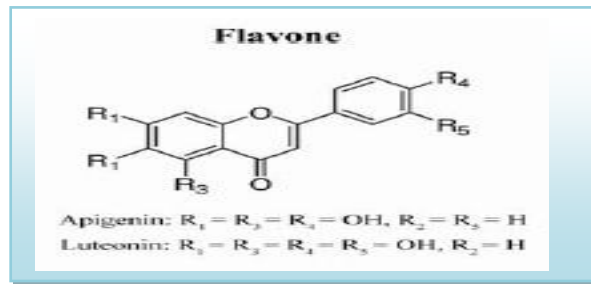


Figure 9: Des exemples des structures chimiques des flavones.

c) Flavanones

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2, 3 et par la présence d'un centre d'asymétrie en position 2 (figure 10). Chez les flavanones naturelles, le carbone 2 est normalement de configuration S. Elles existent sous forme libre ou sous forme glycosylée [21].

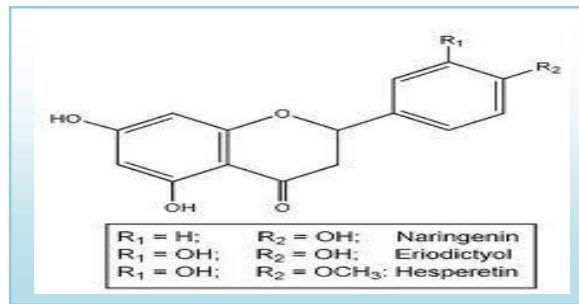


Figure 10: Des exemples des structures chimiques des flavanones.

d) Flavan-3-ols ou flavanols

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C4 (figure 11). Elles sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés. Les flavan-3-ols sont très abondants dans les fruits comme les abricots, les cerises, les raisins, ... etc [21].

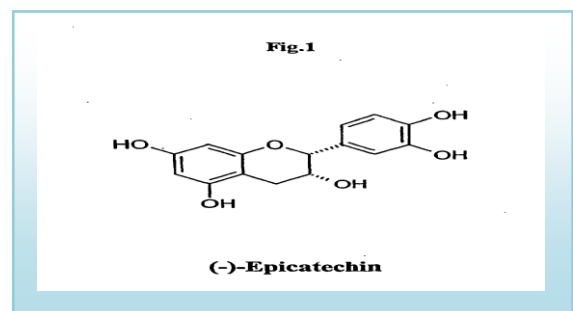
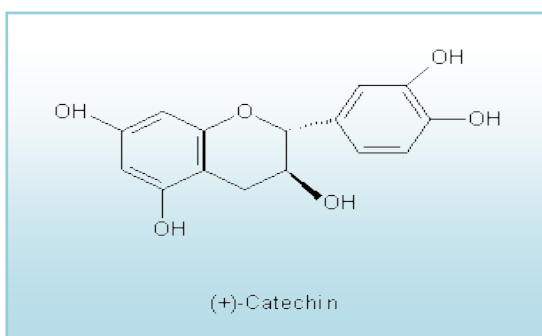


Figure 11: Deux exemples des structures chimiques des flavan-3-ols.

e) Isoflavones

Les isoflavones sont considérées comme des dérivés des flavones, elles représentent une sous-classe importante et très distinctive des flavonoïdes. Contrairement à la plupart des autres flavonoïdes, les isoflavones sont caractérisées par la présence d'un cycle B fixé à C3 plutôt que la position C2 (figure 12). Ils ont une distribution très limitée dans le règne végétal

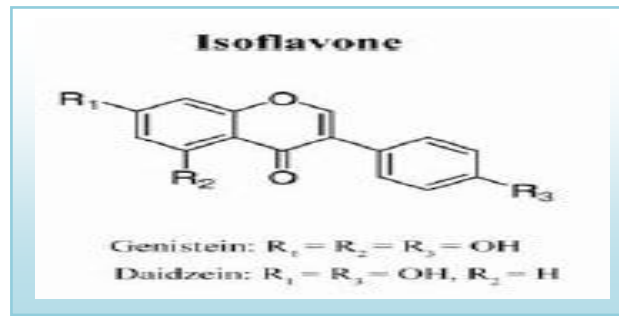


Figure 12: Deux exemples des structures chimiques des isoflavones.

3. Les anthocyanidines

Les anthocyanidines sont toujours hydroxylés en position 3, elles se caractérisent par l'absence du groupe hydroxyle à la position 4. Les anthocyanidines les plus abondants sont: la pélagonidine, la cyanidine et la péonidine [6].

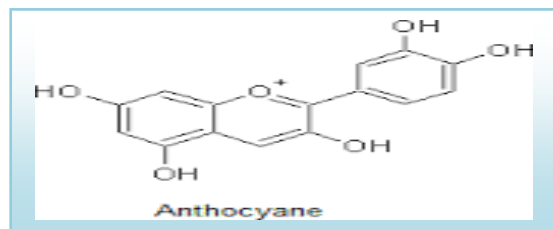


Figure 13: structures chimique d'anthocyane.

2.2.4. Les tanins

Ils sont définis comme étant des composés poly-phénoliques, hydrosolubles (\neq Hydrosolubles), de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 KD (polymères) ayant la propriété de tanner la peau c'est-à-dire de la rendre imputrescible (l'empêche de pourrir), propriété liée à leur aptitude à se combiner à des macromolécules (protéines), à précipiter les alcaloïdes et la gélatine[23].

➤ Types et structures

Selon la structure, on a deux types de tanins : les tanins hydrolysables et les tanins condensés, dits aussi : proanthocyanidines [22].

a) Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement scindés par les enzymes de tannases en oses et en acide phénol, selon la nature de celui-ci on distingue: les tanins galliques, et les tanins ellagiques [6].

a-1-Tanins galliques (Gallo tanins)

Ils donnent par l'hydrolyse des oses et de l'acide gallique.

a-2- Tanins ellagiques (Ellagitanins)

Ils sont scindés par les enzymes en oses et en acide ellagique [6].

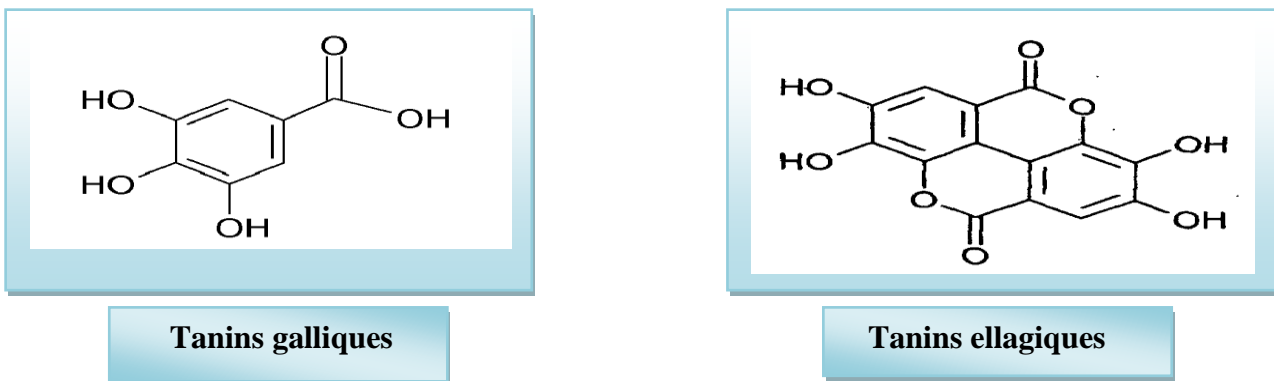


Figure 14: Structure de base de Tanins galliques et Tanins ellagiques.

b) Les tannins condensés

Ce sont des proanthocyanidines. C'est-à-dire, des composés polyphénoliques hétérogènes : dimères, oligomères ou polymères de flavanes, flavan-3-ols, 5-flavanols, 5-deoxy-3-flavanols et flavan-3,4-diols. Les tanins condensés sont des molécules hydrolysables, leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre.

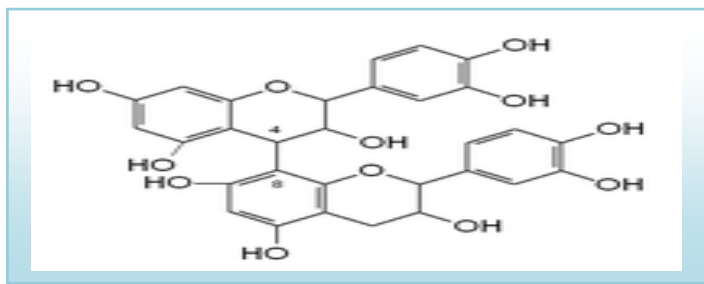


Figure 15 : structure de tanins condensés.

2.2.5. Les saponosides

Les saponines sont des métabolites secondaires hétérosidiques, fréquemment rencontrés chez les végétaux supérieurs en particulier chez les Dicotylédones (racines, fruits, écorces, tiges, feuilles ou graines), mais sont synthétisés également par certains animaux marins tels que les concombres de mer ou les étoiles de mer.

Le nom saponoside est dérivé du mot latin *sapo* qui veut dire savon, qui évoque le caractère moussant de leur solution aqueuse. Ce pouvoir tensio-actif est dû au caractère amphiphile des molécules, à la fois lipophile (la partie aglycone ou génine) et hydrophile (la partie osidique). Les saponosides sont des composés, pour la plupart, très polaires et sont souvent retrouvés sous forme de mélanges complexes dans la plante. Ils possèdent en outre un large spectre de propriétés biologiques et pharmacologiques notamment des propriétés immunomodulatrice, immunoadjuvante, cytotoxique, antitumorale et hypocholestérolémiant [1].

2.2.6. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, avec un degré variable de caractère basique. Depuis l'identification du premier alcaloïde en 1806, plus de dix mille alcaloïdes ont été isolés des plantes [1].

Les alcaloïdes forment une grande famille hétérogène de métabolites secondaires, qui présentent un intérêt par leurs propriétés pharmacologiques et leurs applications en médecine. Ils provoquent chez l'homme diverses réponses physiologiques et psychologiques, à forte dose sont très toxiques. Ce sont des composés azotés naturels et dont le goût est amer. Leur synthèse a lieu au niveau du réticulum endoplasmique, puis se concentrent dans la vacuole. Les alcaloïdes issus du métabolisme des acides aminés sont des alcaloïdes vrais. Les alcaloïdes constituent une classe de produits naturels présentant une grande diversité structurale. Leurs propriétés biologiques, aussi variées que leurs structures, continuent à être bénéfiques dans les traitements de différentes maladies ou des dysfonctionnements de l'organisme humain [24].

3. Les activités biologiques

3.1. Activité antibactérienne

3.1.1. Définition des antibiotiques

Ce sont des substances chimiques élaborées par des microorganismes; ces substances possèdent le pouvoir d'inhiber la croissance ou le développement d'autres microorganismes (bactéries) dans lesquelles elles pénètrent en perturbant le métabolisme ou en agissant spécifiquement sur une étape essentielle de ce dernier mais qui sont dépourvus de toxicité pour les autres cellules humaines ou animales. Le cadre des antibiotiques était limité d'abord à des substances d'origine biologique produites par des champignons, s'est élargi plus tard et comprend actuellement d'autres produits possédant la même action antibactérienne, mais obtenus par synthèse [25].

3.1.2. Les différents types d'antibiotiques

Les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelle et leurs dérivés. Ils peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique. Les antibiotiques synthétiques sont obtenus, soit à partir de dérivés totalement artificiels, soit en recréant des substances initialement extraites de micro-organismes. Les antibiotiques semi-synthétiques sont issus de la modification, en laboratoire, de substances produites par des micro-organismes [26].

3.1.3. Le mode d'action des antibiotiques

Le mode d'action des antibiotiques est, soit bactériostatique (empêche le développement microbien) essentiellement tétracyclines, phénicolés, macrolides; soit bactéricide (qui détruit les germes) les bêta-lactamines, les aminosides, les polypeptides [25].

Les antibiotiques agissent sur les micro-organismes selon plusieurs mécanismes dont certains sont connus:

a- Action sur la paroi bactérienne : la synthèse des mucopeptides de la paroi bactérienne est perturbée par l'inhibition de certaines enzymes : peptido-glycane synthétase, transpeptidase. Les β -lactamines, la cyclosérine, la bacitracine, la vancomycine, la fosfomycine, agissent par ce mécanisme, de préférence sur les bactéries jeunes dont la paroi est en cours d'édification. Les bactéries Gram positif dont la paroi est riche en mucopeptides sont les plus sensibles

b -Action sur la membrane cytoplasmique et la membrane extérieure des bactéries Gram négatif :

Certains antibiotiques se fixent sur les phospholipides de la membrane cytoplasmique, entraînant une altération de la perméabilité de cette membrane Ils opèrent comme des agentstensioactifs cationiques. Les constituants cellulaires s'échappent du cytoplasme bactérien, ce qui provoque la mort cellulaire. La gramicidine et la tyrocidine agissent par ce mécanisme.

c- Action sur la réplication de l'ADN : certains antibiotiques perturbent la réplication de l'ADN. Il s'agit des quinoléines.

d - Action sur la traduction de l'ARNm: l'ARNm et l'ARNt sont les cibles des antibiotiques et les mécanismes de traduction de l'ARN m sont troublés, Certains antibiotiques se fixent sur la sous unité ribosomale 30 S, d'autres interviennent de diverses manières sur la sous unité ribosomale 50 S. Nous retrouvons ici les aminosides, les macrolides, les lincosamides, les streptogramines, les cyclines, les phénicolés, l'acide fusidique [27].

3.1.4. L'antibiogramme

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans un but épidémiologique ou thérapeutique. Un antibiogramme permet donc de tester sur milieu de culture, l'action de molécules antibiotiques sur une souche bactérienne. Il donnera des indications sur l'efficacité in vitro de ces antibiotiques [28].

3.2. L'Activité antioxydante

3.2.1. Généralités

L'oxydation est une des plus importantes manifestations à l'origine du vieillissement des produits alimentaires et cosmétiques. Les dégradations oxydatives affectent les qualités nutritionnelles et sensorielles des aliments et peuvent avoir des répercussions sur la santé du consommateur.

Elles sont également mises en causes dans le vieillissement des tissus biologique et des organismes ainsi que dans de nombreuses pathologies.

Les principaux agents oxydants sont les espèces réactives de l'oxygène, des enzymes (Lipoxygénase, peroxydase), des ions métalliques (Cu, Fe) et les peroxydes lipidiques, qui concourent tous à la formation en chaîne de radicaux libres. Ceux-ci attaquent les

protéines, les acides nucléiques, les acides gras insaturés, les vitamines ou d'autres constituants.

L'homme et les animaux ont développé des systèmes de défense contre ces agressions:

Enzymes de détoxification (glutathion peroxydase, catalase, superoxydedismutase, glutathion réductase), complexation du fer et du cuivre par des protéines, agents antioxydants.

L'alimentation apporte une grande variété d'antioxydants: vitamine E et C, polyphénols, pigments caroténoïdes [27].

3.2.2. Stress oxydatif

Des molécules prooxydantes appelées radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites quotidiennement dans l'organisme. Ces dernières sont cependant contrôlées par les antioxydants. Un stress oxydatif survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres (figure 16). Toutefois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant/antioxydant [21].

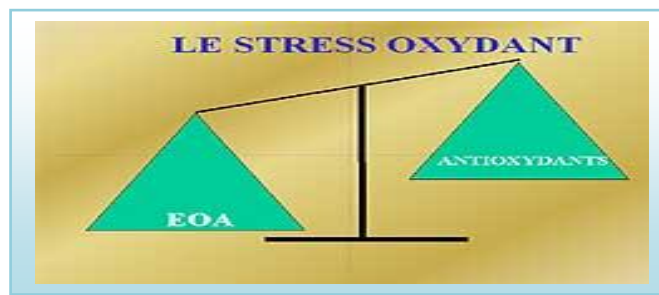


Figure 16: Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants.

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telle que l'exposition aux radiations ionisantes (exposition importante au soleil, radioactivité artificielle ou naturelle), la pollution, le contact avec certains pesticides et solvants, la consommation de tabac et d'alcool, la prise de certains médicaments, la pratique du sport intensif et tout processus susceptible de surcharger les réactions de détoxification hépatique, notamment une perte de poids importante [21].

❖ Définition d'un radical libre

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié [22], cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre [6].

3.2.3. Réaction de l'organisme vis à vis des radicaux libres

Notre organisme a besoin d'énergie pour fonctionner correctement. Les cellules transforment les nutriments apportés par l'alimentation en énergie et en eau. Cette transformation génère environ 2% de molécules d'oxygène. L'oxygène peut s'avérer délétère en raison de son caractère oxydant, il est à l'origine de la formation de dérivés plus réactifs appelés espèces réactives de l'oxygène [21].

- **Radical superoxyde ($O_2^{\cdot -}$)**

Dans l'organisme une partie de l'oxygène moléculaire peut capter de manière univalente et séquentielle un électron conduisant alors la formation du chef de file des espèces oxygénées réactives : l'anion superoxyde ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot -}$).

- **Peroxyde d'hydrogène H_2O_2**

Le Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui n'est pas un radical libre peut être formé secondairement à la dismutation de ($O_2^{\cdot -}$) par la superoxyde-dismutase ou produit par le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) est également un agent oxydant très réactif ; c'est pour cela qu'on l'utilise souvent comme désinfectant et comme agent de blanchiment. S'il n'est pas rapidement détruit, il peut se décomposer et produire des radicaux hydroxyles qui s'attaquent aux macromolécules de la cellule.

- **Radical hydroxyle**

Il est produit principalement à partir de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène en présence d'ions ferriques, au cours de la réaction d'Haber-Weiss.

- **D'autres espèces réactives de l'oxygène**

Les espèces réactives de l'oxygène comprennent non seulement les radicaux libres oxygénés mais aussi les radicaux libres dérivant d'autres espèces que l'oxygène par exemple : L'acide hypochloreux ($HClO$), le monoxyde d'azote NO^{\cdot} qui se combine aisément avec le $O_2^{\cdot -}$ pour former le peroxyde d'azote ($ONOO^-$), agent non radicalaire à la fois oxydant et Nitrosant [21].

3.2.4. Les antioxydants

Les antioxydants sont des composés très divers qui regroupent des protéines à activité enzymatique (superoxyde-dismutase, glutathion peroxydase, catalase) et non enzymatique (Séquestrant des métaux) et des petites molécules liposolubles (vitamine E, β -carotène) ou hydrosolubles (vitamine C, acide urique) [27].

Il est défini par antioxydant donnée par B. Halliwell est « toute substance qui, présente à faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat » [29].

3.2.5. Mécanisme d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition [30]. En tant qu'additif alimentaire, un antioxydant est une molécule qui protège les aliments contre les réactions d'oxydations qui accélèrent leur vieillissement [6.]

Selon leur mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories : [31]

- **un système de défense primaire** : composé d'enzymes et de substances Antioxydants.
 - le superoxydedismutase (SOD) : diminue la durée de vie de l'anion superoxyde O⁻²
 - la catalyse : transforme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en simple d'eau.
 - la glutathion peroxydase (GPx) : détruit le peroxyde d'hydrogène et les peroxydeslipidiques.
 - les molécules piègeurs : le glutathion (GSH), l'acide urique, les protéines à groupement thiols, ubiquinone,etc.
- **un système de défense secondaire** : composé d'enzymes protéolytiques, des phospholipides, des ADN endonuclease et ligase, des macroxyprotéinases [6].

3.2.6. Les sources des antioxydants

En plus des substances propres à l'organisme, les médicaments, l'alimentation et les plantes peuvent être également des sources d'antioxydants [30].

a) Médicaments

Ils constituent une source importante d'antioxydants. Actuellement, les classes thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les antihyperlipoprotéïnémiques, les bêta-bloquants et autres antihypertenseurs ont été évalués pour leurs propriétés antioxydants [30].

b) Source naturelles

Certaines substances ingérées sont utilisées par l'organisme comme antioxydants. Ce sont principalement : la vitamine C, la vitamine E, le sélénium et le β-carotène [30].

❖ La vitamine C ou acide ascorbique

L'acide L-ascorbique ou vitamine C est considéré comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires [6]. Elle est une vitamine hydrosoluble, sensible à la chaleur, aux ultraviolets et à l'oxygène. Après ingestion, elle passe rapidement dans le sang puis diffuse de façon variable dans tous les tissus [21]. Elle joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E [32].

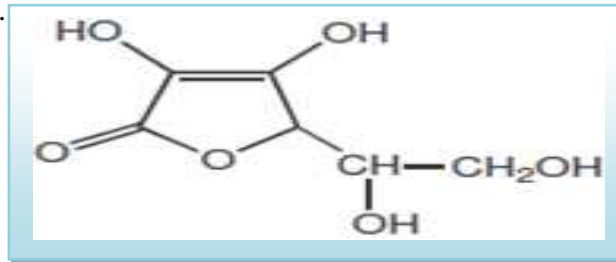


Figure 17: Acide Ascorbique (vitamine C).

❖ La vitamine E ou tocophérol

La vitamine E est un antioxydant majeur liposoluble. C'est un composé amphiphile capable de s'insérer dans les membranes cellulaires : globules rouges, cellules endothéliales, cellules musculaires, neurones (c'est le seul antioxydant du système nerveux central) [29].

Prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux Peroxy. Elle est présente dans les huiles végétales, les noix, les amandes, les graines, le Lait, les œufs et les légumes à feuilles vertes [30].

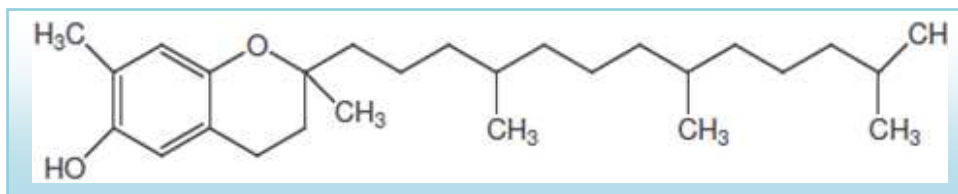


Figure 18: n-tocophérol.

❖ Le sélénium

C'est l'oligo-élément le plus « à la mode » pour ses propriétés anti oxydantes avérées [32]. Il neutralise les métaux toxiques en particulier le plomb et le mercure. Il aurait aussi une action préventive sur certains cancers [31].

❖ Les caroténoïdes

Sont des pigments végétaux lipophiles formant une famille de plus de 600 molécules notamment le lycopène et le 2-carotène, précurseurs de la vitamine A. Les caroténoïdes

réagissent avec l'oxygène singlet, les radicaux peroxy et alkyles en capturant les radicaux libres [27].

Le rôle biologique des caroténoïdes est, entre autres, complémentaire de celui de la vitamine E, elle-même régénérée par la vitamine C, d'où l'intérêt de consommer une alimentation équilibrée, riche en fruits et légumes variés pour bénéficier des nombreux effets de synergie entre micronutriments [31].

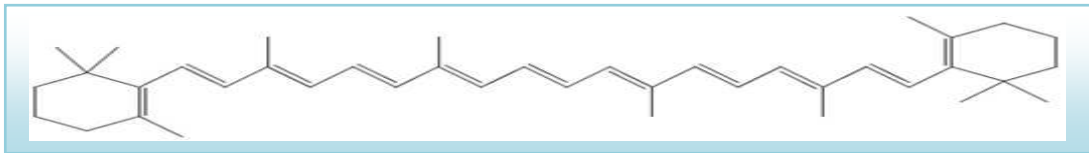


Figure 19 : β -carotène.

❖ Les composées phénoliques

Les polyphénols végétaux entre autres les flavonoïdes, les tanins,... On trouve parmi leurs nombreux intérêts potentiels. De plus, une synergie peut être observée entre leur action et celle de la vitamine C [27].

➤ Les flavonoïdes

Présentes dans la plupart des plantes, les flavonoïdes sont des pigments polyphénoliques qui sont responsables dans la plupart des colorations des fleurs et des fruits. Ils possèdent de nombreuses vertus thérapeutiques. Ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation. Certains ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et anti-virales, d'autres ont des effets protecteurs sur le foie.

Des flavonoïdes comme l'hésperidine et la rutine, présentes dans plusieurs plantes, dont le Sarrasin et le Citronnier, renforcent les parois capillaires et préviennent l'infiltration dans les tissus voisins.

Les relations structurelles activités antioxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité antioxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation [30].

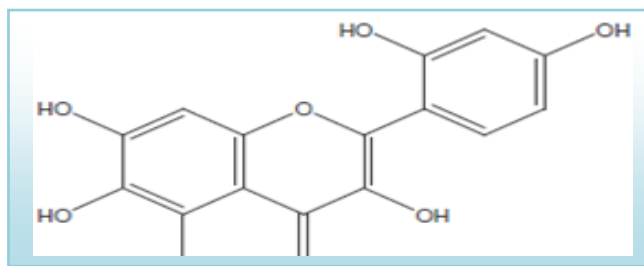


Figure 20 :Morine.

➤ **Les tanins**

Les tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides [31].

➤ **Les coumarines**

Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses [30].

Les coumarines sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Les conditions structurales requises pour l'activité antioxydante des coumarines sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes [27].

➤ **Les xanthones**

Les propriétés pharmacologiques reconnues des xanthones sont essentiellement: leur activité antimicrobienne, leur cytotoxicité et surtout l'inhibition de la monoamine-oxydase [27].

La manguiférine est une xanthone qui possède la propriété d'inhibition envers la peroxydation des lipides, ainsi que des propriétés de capteurs de radicaux libres contre les anions superoxydes [30].

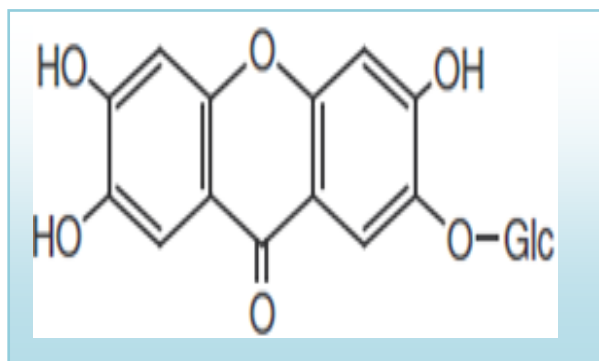


Figure 21: Manguiférine.

➤ Les phénols

Il existe une très grande variété de phénols, de composés simples comme l'acide salicylique, molécule donnant par synthèse l'aspirine, à des substances plus complexes comme les composés phénoliques auxquels sont rattachés les glucosides. Les phénols sont anti-inflammatoires et antiseptiques. On suppose que les plantes, en les produisant, cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes phytophages. Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales.

Parmi les dérivés phénoliques, le resvératrol est le composé qui est le plus étudié. En effet, ce stilbène, isolé du raisin possède de fortes propriétés anti oxydantes [30].

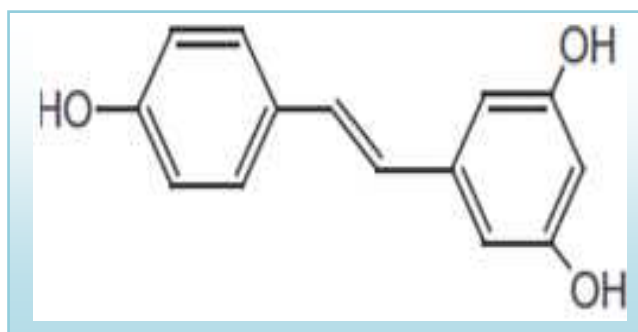


Figure 22: Resvératrol.

Tableau4:Exemples d'antioxydants retrouvés dans les aliments [31].

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

Chapitre 2 :
Matériel et méthodes

1. Extraction des substances actives

1.1. Matériel végétal

La plante étudiée (*Foeniculum vulgare*) a été récolté de la ville de Tamanrasset en Janvier 2014. Cette plante a été identifiée par le Professeur Kaabouche, Université de Sétif. Elle a été séchée à l'abri des rayons solaires puis broyée.

1.2. Screening phytochimique

Ce terme screening, correspond à une technique de « criblage » c'est-à-dire la recherche systématique des produits naturels contenus dans les plantes récoltées en faisant de nombreux tests ou essais.

En effet, la prospection sur le terrain n'est pas ciblée vers une espèce ou une famille botanique précise. Pour cela la recherche de substances utiles dans les végétaux demande un criblage pharmacologique très important [32].

Il s'agit d'une étude qualitative visant la recherche des principaux groupes chimiques (Alcaloïdes, polyphénols, flavonoïdes, tanins, saponosides, les terpènes,...) [33].

1.2.1. Préparation de l'infusé

Nous avons broyé 5g de la plante étudiée (feuilles et tiges). Dans un bécher, nous avons introduit le broyat dans 100ml d'eau distillée puis agité vigoureusement. L'extrait a été introduit dans un bain marie à 90°C pendant 15 min. La suspension a été filtrée afin d'obtenir un infusé concentré à 5% [34].

1.2.2 Protocole expérimentale des composés phénoliques

a) Criblage des flavonoïdes

❖ Réaction à la cyanidine

Nous avons introduit dans un tube à essai 5 ml de l'infusé, ajouter 5 ml d'alcool chlorhydrique (alcool à 50%); 1 ml d'alcool iso amylique puis quelques copeaux de magnésium. Il se produit une réaction de précipitation pendant quelques minutes.

L'apparition d'une coloration rose orangée (flavones) ou rose- violacée (flavanones) ou rouge (flavonones, flavanonols).

La réaction à la cyanidine sans ajouter de copeaux de magnésium est chauffée pendant 15 mn au bain-marie. En présence de leucoanthocyane, il se développe une coloration rouge cerise ou violacée ; les catéchols donnent une teinte brun-rouge [34].

b) Mise en évidence des polyphénols

❖ Test au Chlorure Ferrique

Un volume de 2.5 ml de l'infusé et 0.5 ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 concentré à 1 % sont mélangés. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée fut le signe de la présence de polyphénols [35].

c) Mise en évidence des tanins condensés

❖ Révélation par le réactif de stiasny

La présence des tanins condensés est mise en évidence par l'utilisation du réactif de stiasny (10ml de formaldéhyde et 5 ml d'acide chlorhydrique concentré) dont le principe est le suivant :

A 10 ml de l'extrait nous avons ajouté 5ml du réactif de stiasny le mélange a été agité pendant 15 min.

En présence des tanins on aura un précipité de couleur rouge.

d) Criblage des tanins catéchiques

2,5 g de matériel végétal sec sont placés dans 10 ml de MeOH. le mélange a été agité pendant 15 min. À 2.5 ml d'extrait brut sont additionnées 1 ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 1%.

Le développement d'une teinte verdâtre est caractéristique de la présence des tanins catéchique [35].

e) Criblage des triterpènes

❖ Réaction de Lieberan-Burchard

Le criblage des triterpènes est fondé sur la réaction de Lieberan-Burchard. Elle se fait sur une macération de 24h dans l'éther (1g de poudre de l'échantillon dans 20ml d'Ether éthylique). Nous avons additionné 10 ml du macérat évaporé dans 1ml de CHCl_3 . Déposer au fond du tube, contenant l'extrait, de l'acide sulfurique.

En cas de réaction positive il se forme un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides, le surnageant étant verte ou violette [35].

f) Mise en évidence des saponosides

Après broyage d'1 g de la plante, le broyat est introduit dans un Erlen contenant 100 ml d'eau distillée. Le mélange est placé au bain marie à 90°C pendant 30min. le décocté obtenu est filtré à l'aide d'un papier filtre.

❖ Indice de mousse (Im):

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse, degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées.

Dans une série de 11 tubes à essais sont introduites successivement les mêmes quantités selon le tableau :

Tableau 5: gamme de dilution décroissante du décocté pour la mesure de l'indice de mousse.

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Décocté(ml)	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
Eau (ml)	10	9.5	9	8.5	8	7.5	7	6.5	6	5.5	5

Chacun des tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 10 min en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en cm.

La hauteur de la mousse permet de calculer l'indice de mousse (Im) :

$$Im = \text{inverse } C \times D$$

C : concentration initiale de l'extrait.

D : dilution dans le tube ou la mousse >1

g) Mise en évidence des alcaloïdes

❖ La révélation par le réactif de Mayer

La présence d'alcaloïdes est établie par la précipitation de sels et la révélation à l'aide du réactif de mayer (solution de tétra-iodomercure de potassium).

La poudre végétale (200 mg) dans un tube à essai et 10 ml d'acide sulfurique (10%). Agitation et macération pendant 24 heures. Le macérât obtenu est filtré puis introduit dans un

tube à essai, par la suite, nous avons ajouté quelques gouttes du réactif de Mayer (5g de iodure de potassium et 1.36g de chlorure de mercure et 100ml l'eau distillée).

La formation d'un précipité blanc ou blanc-jaune indique la présence des alcaloïdes [35].

1.3. Préparation de l'extrait brut par macération

La macération est une opération qui consiste à laisser séjourner un corps solide dans un liquide ou dans un milieu humide, pour extraire certains principes actifs de ce corps [36].

Les parties aériennes de la plante, tiges et fleurs sont séchées puis finement broyées. 50 g de la poudre obtenue a subit une macération dans un mélange hydroalcoolique (méthanol/ eau (80/20 ; v/v)).

Cette opération est répétée 02 fois avec filtration du macérât sur un papier wathman (n°1) et renouvellement du solvant chaque 24h [37].

Les filtrats obtenus durant les 3 jours sont mélangés puis évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif "BÜCHI" à une température comprise entre 35 à 40 °C [22].

1.4. Extraction liquide-liquide

Les méthodes d'extraction liquide-liquide ont pour but de séparer divers corps purs formant un mélange, pouvant être un composé organique ou une substance naturelle, et cela en assurant un transfert de ce corps appelé encore soluté, initialement contenu dans une phase liquide, vers une autre phase non miscible en premier milieu [38].

➤ Mode opératoire

la phase aqueuse obtenue (l'extrait sec) à subit une série d'extraction liquide-liquide en utilisant une ampoule à décanter et des solvants à polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole puis le chloroforme qui extrait les produits peu polaires, puis l'acétate d'éthyle qui extrait les produits moyennement polaires et en dernier le n-butanol qui entraine les composés polaires et la majorité des hétérosides [37].

Le processus d'extraction est résumé dans l'organigramme suivant (figure 23)

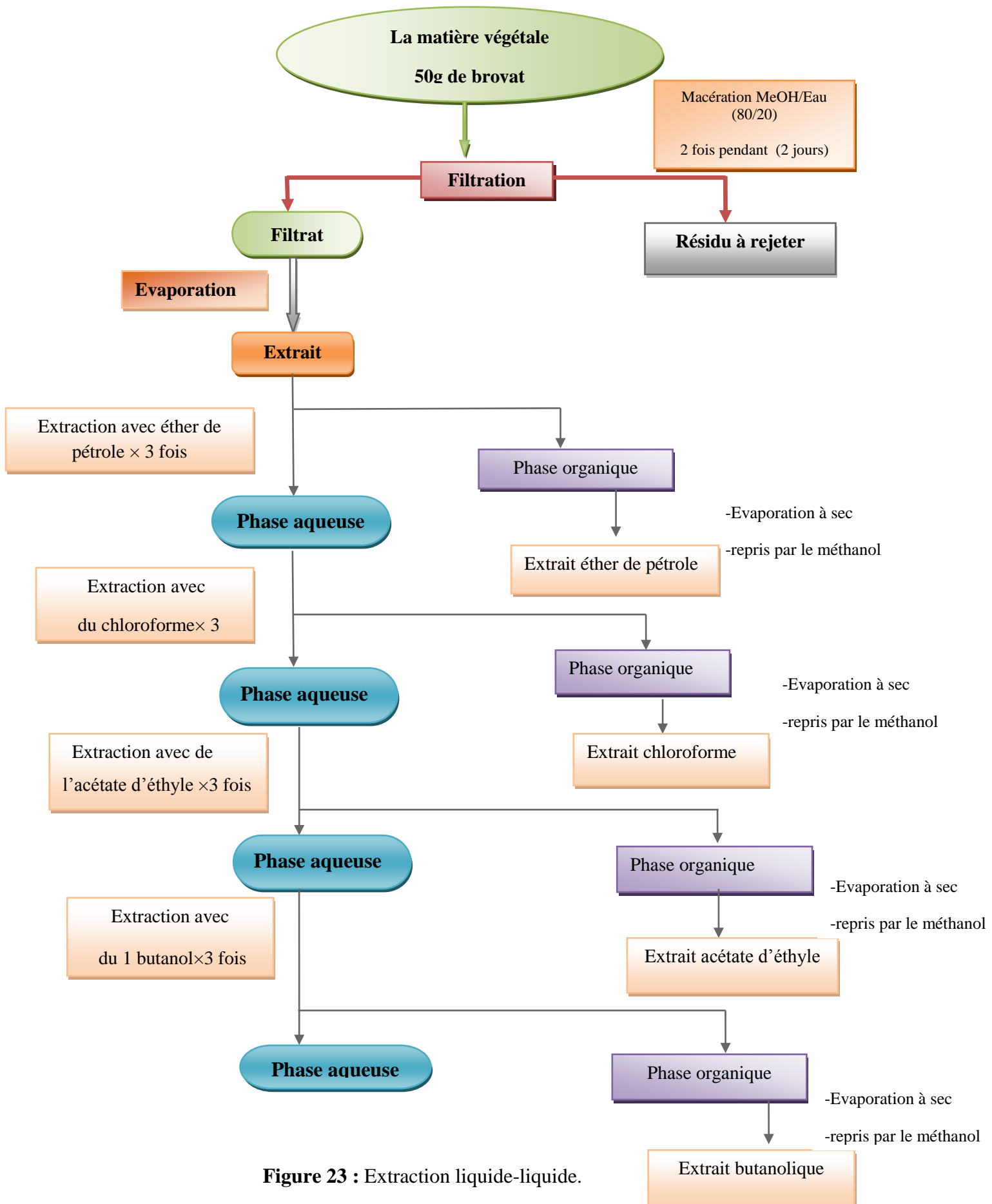


Figure 23 : Extraction liquide-liquide.

les quatre phases organiques ainsi obtenues (éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol) sont évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif "BÜCHI" à une température de 35-40 °C, pesées, puis les extraits de ces 4 phases sont repris avec 5 ml du méthanol enfin ils ont été évaporés à sec à l'aide de l'évaporateur rotatif [39].

❖ Détermination du rendement

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction.

$$R\% = \frac{\text{masse d'extrait sec}}{\text{masse de la matière végétale}} \times 100$$

2. Analyses quantitatives des extraits

Des déterminations quantitatives des principaux groupes de métabolites secondaires ont été effectuées sur les extraits de notre plante.

2.1. Dosage des polyphénols totaux

❖ Principe

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu. Ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés [6].

Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 760 nm.

❖ Réactifs et extraits utilisés

- Un polyphénol témoins : l'acide gallique pour la réalisation de la gamme d'étalonnage en milieu aqueux.
- Réactif de Folin-Ciocalteu : à 10 ml du réactif Folin Ciocalteu on a ajouté 90 ml d'eau distillée.
- Bicarbonate de sodium à 7.5 % : 15g de bicarbonate de sodium ont été dissous dans 200 ml d'eau distillée.
- les extrais butanol et l'acétate d'éthyle.

❖ Mode opératoire

a- Préparation de la gamme d'étalonnage de l'acide gallique

Une gamme de 9 concentrations d'acide gallique allant de 0 à 0.17 mg /ml a été préparée à partir d'une solution mère de 0.2 mg/ml de concentration.

Tableau 6: préparation de la gamme d'étalonnage de l'acide gallique.

N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Volume ajouté d'eau distillée (en ml)	2	1.9	1.8	1.5	1.2	1	0.7	0.5	0.3
Concentration finale de l'acide gallique en mg/ml	0	0.01	0.02	0.05	0.08	0.10	0.13	0.15	0.17

b- Analyse du standard et des extraits

- Introduction de 300 µl de la solution de l'acide gallique.
- Ajout de 1500 µl du réactif Folin Ciocalteu puis de 1200 µl de la solution de bicarbonate de sodium dans chaque tube.
- Agitation puis incubation à l'obscurité pendant 1 heure.
- Lecture des absorbances à 760 nm.

Le blanc est représenté donc par 300 µl le méthanol, additionnée de 1.5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu et 1.2 ml de carbonate de sodium à 7.5 %.

c- Expression des résultats

La concentration en composés phénoliques extractibles totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Une courbe d'étalonnage ($y = ax + b$) a été réalisée en parallèle par l'acide gallique à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons.

Les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme.

2.2. Dosage des flavonoïdes

❖ Principe

La coloration jaunâtre donnée dans cette méthode est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes.

❖ Réactifs et extraits utilisés

- 2g de Chlorure d'aluminium (AlCl₃) dissous dans 100 ml de méthanol.
- Solution mère du standard : 0.4 mg de quercétine dissous dans 100 ml de méthanol.
- Les extraits de butanol et l'acétate d'éthyle.

❖ Mode opératoire

a- Préparation de la gamme d'étalonnage

Une gamme de 9 concentrations de quercétine allant de 2.5 à 40 µg /ml a été préparée à partir d'une solution mère de 40 µg /ml de concentration (400 µg de quercétine dissous dans 10 ml de méthanol).

Tableau7 : préparation de la gamme d'étalonnage de quercétine

N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Volume ajouté de méthanol (en ml)	2.8	2.6	2.2	1.9	1.5	1.2	0.7	0.4	0.0
Concentration finale de quercétine (en µg/ ml)	2.5	5.0	10	15	20	25	30	35	40

b- Analyse du standard

- Des aliquotes de 0.2 à 3.0 ml de la solution mère de quercétine ont été introduites dans une série de tubes à essai, le volume finale dans chaque tube a été complété à 3 ml par addition du méthanol absolu ;
- 1 ml a été prélevé de chaque tube et transféré à un autre. ;
- 1 ml de la solution méthanolique du chlorure d'aluminium à 2 % y a été ajouté ;
- Après 10 mn, l'absorbance est lue à 430 nm.

c- Analyse des extraits

- Deux tubes à essai ont été préparées ;
- 1 ml de chaque extrais (butanol , acétate d'éthyle).
- 1 ml de la solution méthanolique du chlorure d'aluminium à 2 % a été additionné à chacun des tubes
- 1 ml de méthanol a été ajouté à chacun des tubes
- Après 10 mn, l'absorbance est lue à 430 nm.

d- Expression des résultats

La concentration en flavonoïdes est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard.

La teneur en flavonoïdes a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage ($y= ax+b$) réalisée par la quercétine à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de quercétine par gramme de la plante [28].

2.3. Chromatographie sur couche mince CCM

Chromatographie sur couches minces (CCM) est un outil de base pour l'analyse phytochimiques de routine d'extraits bruts, de fractions, ainsi que de produits purs isolés [40]. L'appareillage utilisé pour la chromatographie sur couche mince est relativement simple. Il est composé d'une plaque et d'une cuve rectangulaire pour l'élution. Cette dernière dépend du choix des phases stationnaire et mobile (éluant). Les phases stationnaires les plus utilisées en chromatographie sur couche mince sont le gel de silice, l'alumine et la cellulose en poudre [3]. De ce fait nous avons opté pour cette technique dans le but de caractériser les différents constituants des extraits des parties aériennes de (*foeniculum vulgare*). Nous rapportons dans ce qui suit le protocole effectué pour les extraits de notre plante.

❖ Protocole expérimentale

Sur une plaque de gel de silice de 7×6 cm, on trace au crayon un trait horizontal à une distance de 1 cm du bord inférieur et à 0,9 cm du bord supérieur. On dilue les 4 extraits dans le méthanol et on dépose une goutte de chaque extrait sur le trait du bord inférieur. La plaque est alors introduite dans une cuve contenant l'éluant : butanol, acide formique et eau distillée, (16,5:4,25:4,25, V/V/V) à une hauteur de 0.5 cm. Lorsque l'éluant atteint le front de la plaque, cette dernière est retirée de la cuve et puis séchée. Les taches apparaissant à l'aide d'un révélateur et ils sont caractérisées par un facteur de rétention (R_f) qui est défini comme étant le rapport entre la distance parcourue par la substance (X) sur la distance parcourue par le front de l'éluant (Y)
 $R_f = X/Y$ [3].

3. Etude des activités biologiques des substances actives

3.1. Activité antibactérienne

C'est une méthode de mesure *in-vitro* du pouvoir antibactérien des composées, la technique utilisée est la technique de contact direct qui compte deux méthodes, la méthode des puits et la méthode de diffusion, nous avons adopté la dernière, qui est une vieille méthode, mais toujours d'actualité puisqu'elle est encore utilisée fréquemment dans les laboratoires de bactériologie pour la mesure du pouvoir antibactérien des antibiotiques de synthèse [27].

3.1.1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont des bactéries pathogènes provenant du laboratoire de microbiologie à l'université Frère Mentouri. Il s'agit d'une bactérie à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et deux bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) ces souches ont été conservées dans un bouillon nutritif.

3.1.2. Test de l'activité inhibitrice

➤ Préparation des disques

Cette préparation se fait à partir du papier wathman n°1 qui est découpé en disques de 06 mm de diamètre [27].

➤ Milieux de culture

Cette étape consiste à faire couler le milieu chaud Mueller Hinton dans des boîtes de pétries, l'épaisseur de la gélose doit être de 4mm [27].

➤ Stérilisation du matériel

L'eau distillée, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes [22].

➤ Ajustement de la turbidité

Les colonies bien isolées ont été transférées dans les tubes contenant de l'eau distillée stérile afin d'avoir des suspensions microbiennes ayant une turbidité voisine à 0.5 Mc Farland [9].

➤ Préparation de l'inoculum

À partir d'une préculture âgée de 24hensemencée sur une gélose nutritive, on prélève 3 à 4 colonies bien isolées avec une anse et les émulsionner dans un tube contenant 10mL de bouillon nutritif [3].

➤ Ensemencement

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de

haut en bas en stries serrées. L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois.

L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétrie avec la même souche [22].

➤ **Application des disques**

Les disques stériles imprégnés par une concentration (50mg/ml) d'extrait à tester à raison de 10 µl par disque sont déposés à l'aide d'une pince à la surface du milieu gélosés, préalablement ensemencé à 15 Mm du bord de la boîte de pétri. Ils doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement en appuyant légèrement sur la surface de la gélose [27]. Nous avons également réalisé pour certains extraits des dilutions 1/10 à partir de la solution mère.

Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées à l'étuve pendant 18 à 24 heures à 37°C [22].

➤ **La lecture**

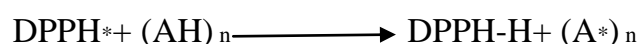
La lecture s'effectue en mesurant sur chaque disque le diamètre d'inhibition du principe actif. Cette distance millimétrique est ensuite reportée sur l'échelle de concordance afin que la souche soit interprétée en sensible, intermédiaire ou résistante vis-à-vis de principe actif étudié [27].

3.2. Test de l'activité antioxydante

3.2.1. Effet scavenger du radical DPPH

Pour étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH (diphényl picryl-hydrayl) comme un radical libre stable (violet en solution), il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons.

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation:



Où: (AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picryl hydrazine (jaune) [6].

❖ Mode opératoire

Pour cela, 25µl de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations ou de standard (quercétine) sont ajoutés à 975µl de la solution méthanolique du DPPH (0,024g/l). En parallèle, un contrôle négatif (le blanc) est préparé en mélangeant 25µl de méthanol avec 975 µl de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre le blanc à 517nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard la Quersitine dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Le pourcentage de réduction du radical libre DPPH est exprimé par la formule suivante [41].

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = \frac{[\text{Abs}_{517} \text{ contrôle} - \text{Abs échantillon}_{517}]}{\text{Abs}_{517} \text{ controle}} \times 100$$

▪ Calcul des IC50

Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur IC50 qui est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les IC50 sont calculées à partir de l'équation des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées et les standards [42].

Chapitre 3 :
Résultats et discussion

1. Résultat de l'étude phytochimique de *Foeniculum vulgare*

1.2. Etude qualitative

Le screening phytochimique consiste à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques. Ces dernières permettent de définir la présence ou non de métabolites secondaires : alcaloïdes, triterpènes, flavonoïdes, saponosides, tanins.

Les résultats de screening phytochimique effectués sur la partie aérienne de la plante étudiée "*Foeniculum vulgare*" sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 8: résultats du criblage phytochimique de la partie aérienne de *Foeniculum vulgare*

Familles chimiques		Présence dans le matériel végétal
Flavonoïde	Flavones	+
	leucoanthocyane	–
Polyphénols		+
Tanins	condensés	–
	catéchiques	+
Triterpènes		–
Saponosides		+
Alcaloïdes		–

• (+) : test positif.

• (–) : test négatif.

Ce tableau montre que la partie aérienne de *Foeniculum vulgare* renferme des flavonoïdes de type flavones, des polyphénols, des tanins catéchiques et des saponosides. Cette plante est toutefois dépourvue de tanins condensés, des triterpènes et d'alcaloïdes.

1.2. Détermination du rendement

Les rendements d'extraction ont été déterminés par la formule suivante :

$$R\% = \frac{\text{masse de résidu extrait}}{\text{masse de la matière végétale}} \times 100$$

Pour chaque échantillon, nous avons calculé le rendement de l'extraction, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 9 : tableau récapitulatif regroupant les rendements des différents extraits.

Extrait	Rendement%
Ether de pétrole	1
Chloroforme	6,2
Acétate d'éthyle	6
1 butanol	9

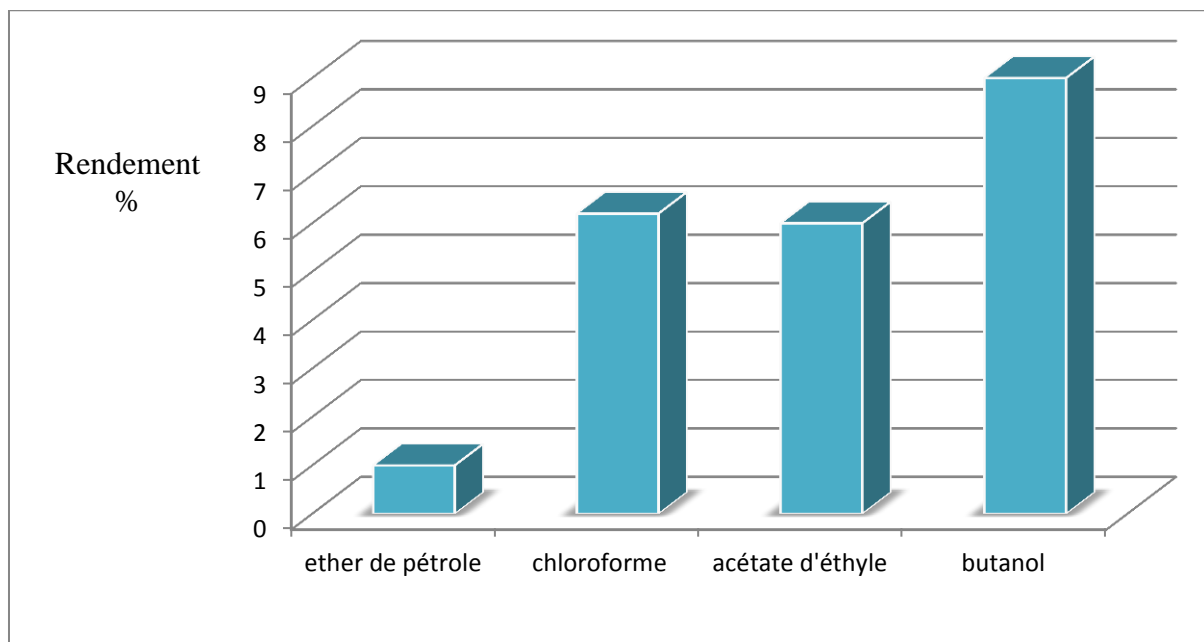


Figure 24: histogramme du rendement de l'extraction.

Les résultats obtenus montrent que parmi les différents extraits, l'extrait butanolique représente le rendement le plus élevé (9%), suivi par le chloroforme (6.2%) puis l'acétate d'éthyle (6%) et finalement l'éther de pétrole (1%) qui est le plus faible rendement.

2. Résultats d'étude quantitative

2.1. Dosage des composés phénoliques totaux

La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax+b$) réalisé par une solution étalon (l'acide gallique) à différentes concentration. (On a utilisé une courbe de référence)

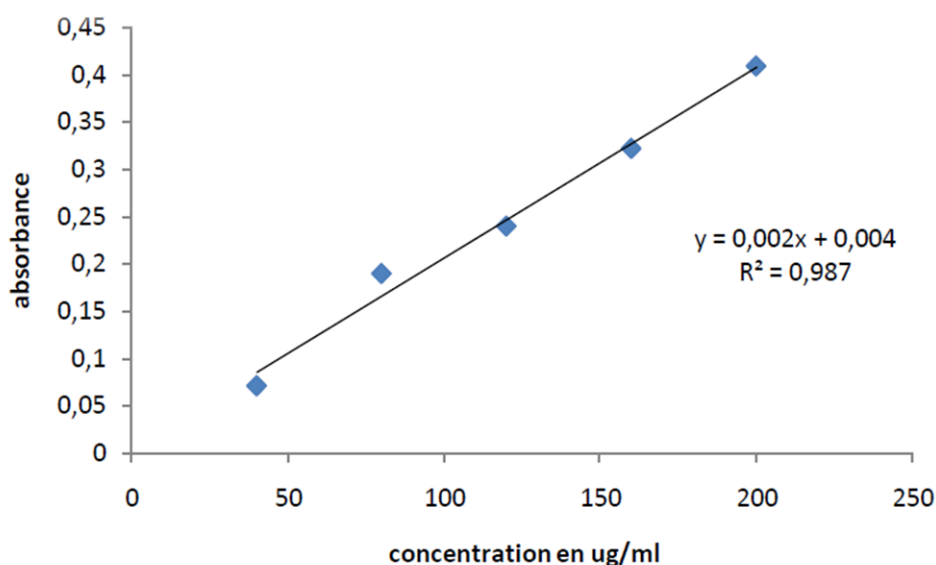


Figure 25: Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols [43].

Les quantités des polyphénols correspondantes de chaque extrait ont été rapportées en équivalent gramme d'acide gallique et déterminé par l'équation de type : $y= 0.002x+0.004$

Sachant que $R^2=0.987$. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par un gramme de l'extrait. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau10 : Teneurs en phénols totaux dans les extraits Butanol et Acétate d'éthyle.

Phase	Teneurs en phénols totaux (mg d'acide gallique/ g)
Butanol	89
Acétate d'éthyle	71.5

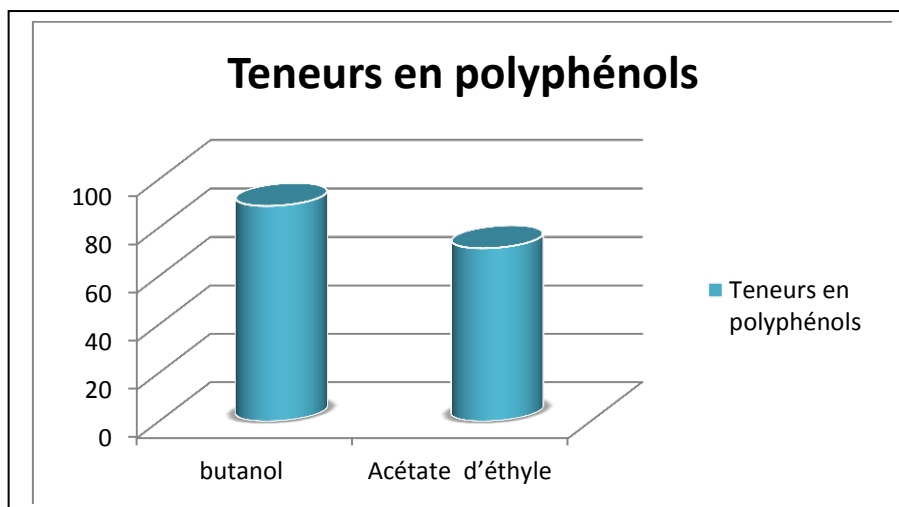


Figure 26 : histogramme de dosage des polyphénols.

Les résultats du tableau ci-dessus indiquent que la quantité des composés phénoliques varie entre 89 et 71.5 mg d'acide gallique/g. Le taux des composés phénoliques le plus élevé ont été détecté dans l'extrait butanolique.

La teneur en polyphénols obtenu est relativement grande dans nos deux extraits. Ceci peut résulter du fait que le dosage par le réactif *Folin-Ciocalteu* n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec ce réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé [44].

2.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et l'étalon été la quercétine. L'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 430 nm.

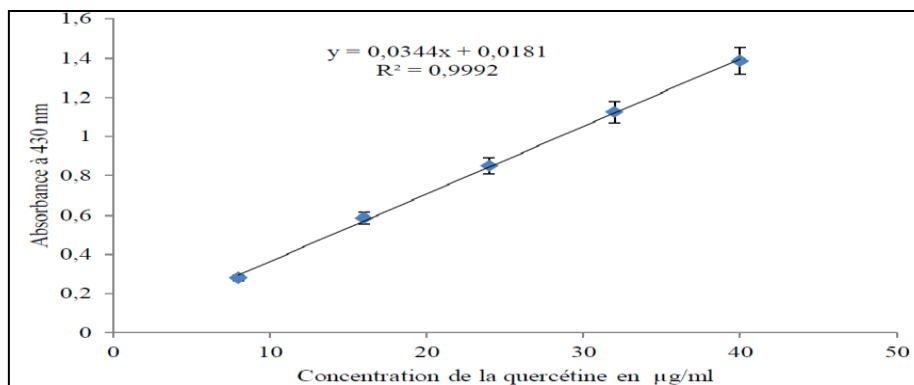


Figure27: Courbe d'étalonnage du Quercitine [22].

La teneur en flavonoïdes de chaque extrait a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage qui suit une équation de type $y=0.0344x+0.0181$ sachant que $R^2 =0.9992$ et exprimée en milligrammes équivalent en Quercitine par gramme de la matière sèche. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 11: Teneurs en flavonoïde dans les extraits Butanol et Acétate d'éthyle.

Phase	Teneurs en flavonoïde (mg de quercetine/ g)
Butanol	7.35
Acétate d'éthyle	6.48

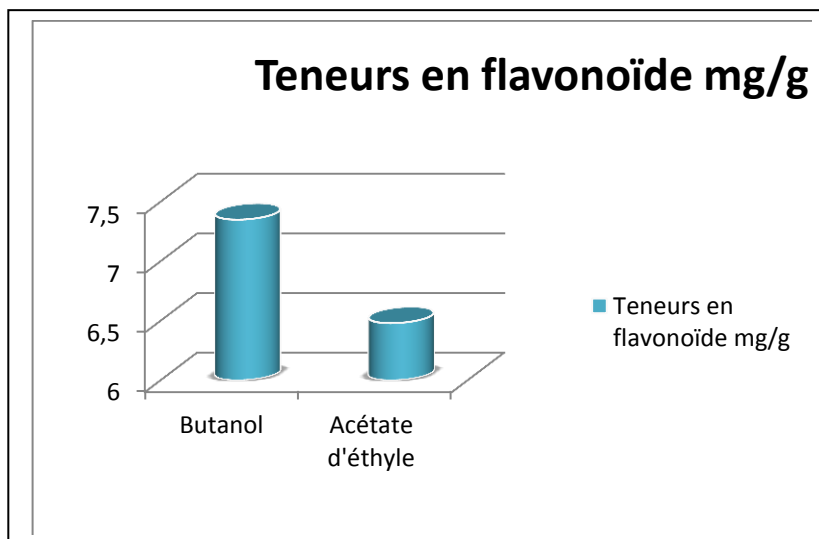


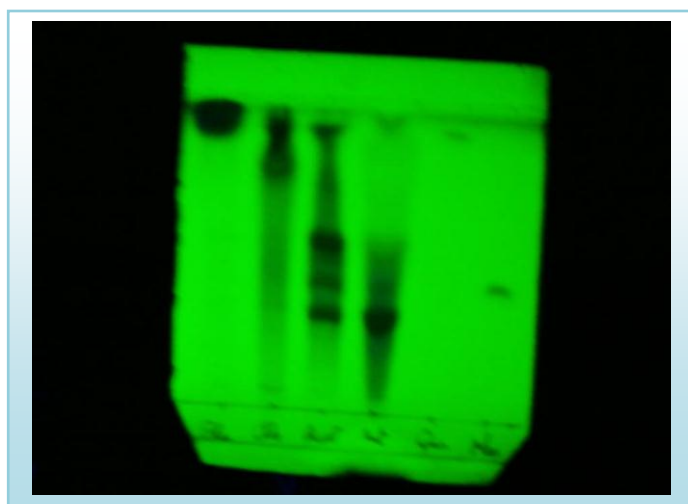
Figure28 : histogramme de dosage de flavonoïdes.

Les résultats du tableau ci-dessus montrent que la quantité de flavonoïdes varie entre 6.48 et 7.35 mg de quercetine/g. Le taux de flavonoïdes le plus élevé a été détecté dans l'extrait butanolique.

L'extrait le plus polaire (butanol) montre une présence des flavonoïdes plus importante que l'extrait apolaires, ceci peut être attribué à la différence du degré de polarité des flavonoïdes, dont les flavonoïdes polaires représentent la fraction la plus élevée

2.3. La chromatographie sur couche mince

Le système de migration constitué de butanol, acide formique et eau distillée, (16,5:4,25:4,25, V/V/V), a permis d'avoir une bonne séparation chromatographique et une visibilité acceptable des spots. La révélation est réalisée par la méthode d'observation sous lumière ultraviolette (à 254 nm) figure 29.



- 1 : Ether de pétrole
- 2 : chloroforme
- 3 : Acétate d'éthyle
- 4 : Butanol
- 5 : Quercétine
- 6 : Naringine

1 2 3 4 5 6

Figure 29 : Chromatographie sur couche mince des extraits de *foeniculum vulgare*.

Les facteurs de rétention (Rf), le nombre et la couleur des spots des différents échantillons et témoins utilisés sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 12: Regroupement des résultats de la CCM.

Extrait	Nombre de spots	Rf (cm)	La Couleur a l'œil nu
Ether de pétrole	1	0,94	Marron
Chloroforme	2	0,82	Marron
		0,94	Marron
Acétate d'éthyle	4	0,32	Jaune
		0,44	Jaune-beige
		0,58	Jaune
		0,92	Marron
Butanol	3	0,32	Jaune
		0,44	Beige
		0,58	Jaune
Quercétine	1	0,92	Marron
Naringine	1	0,44	Jaune

Suite à l'observation sous la lampe UV (254 nm) et les résultats mentionnés dans ce tableau on remarque que l'extrait acétate d'éthyle est le plus concentré par rapport aux autres extraits parce qu'il présente le plus grand nombre de composés actifs avec quatre taches jaunes et marrons (Rf : 0,32 ; 0,44 ; 0,58 ; 0,92), suivi par l'extrait butanolique qui présente trois taches de composés actifs (Rf : 0,32 ; 0,44 ; 0,58) puis l'extrait chloroformique qui présente deux spots (Rf : 0,82 ; 0,94), alors que l'extrait éther de pétrole présente un seul spot.

La comparaison des Rf des spots issus de la séparation des extraits avec ceux des témoins utilisés permet d'avoir une idée approximative des composés présents dans la partie aérienne de *foeniculum vulgare*. La Quercétine (Rf : 0,92) est probablement présente dans l'extrait acétate d'éthyle ; le Naringine (Rf : 0,44) pourrait être présent dans l'extrait acétate d'éthyle et butanolique. Cependant l'extrait chloroformique possède deux spots qui ne correspondent à aucun Rf des témoins utilisés.

3. Résultats des tests biologiques

3.1. Test de l'activité antibactérienne

La méthode de diffusion des disques (antibiogramme) nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien des extraits (acétate d'éthyle, chloroforme et

butanol) du fenouil vis-à-vis des trois bactéries utilisées. Les moyennes des zones d'inhibition de chaque extrait sont indiquées dans les tableaux suivants :

➤ **Extrait acétate d'éthyle**

Tableau 13 : Diamètres en mm des zones d'inhibition de l'extrait acétate d'éthyle.

Souche bactérienne	Solution mère	Solution diluée
<i>E.coli</i>	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	8,5	3,75

Les valeurs sont en moyenne de 4 essais

Ces résultats montrent que l'extrait acétate d'éthyle du fenouil a agi positivement sur la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* mais de façon faible de ce fait, nous constatons que cet extrait possède une faible activité antibactérienne et que *Staphylococcus* est une souche limite (intermédiaire). Par contre, *E .coli* ne présente aucune zone d'inhibition, ce qui nous permet de déduire que cette souche est résistante à l'égard de l'extrait acétate d'éthyle.

Cette différence de résultat peut être expliquée par le fait que *Staphylococcus aureus* (gram positive) est la bactérie la plus susceptible par comparaison avec l'autre souche (gram négative) ; ceci peut être attribué à la différence de structure entre les bactéries gram positives et les bactéries gram négatives. En effet, La paroi cellulaire des bactéries gram positives est constituée par une seule couche alors que la paroi cellulaire des grams négatifs a une structure multicouche liée par une membrane cellulaire externe [45].

➤ **Extrait Chloroforme**

Tableau 14 : Diamètres des zones d'inhibition de l'extrait chloroforme.

Souche bactérienne	Solution mère
<i>E.coli</i>	9,75
<i>Staphylococcus aureus</i>	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,75

Les valeurs sont en moyenne de 4 essais

Le tableau ci-dessus indique que l'extrait chloroforme a agi positivement sur l'ensemble des souches bactériennes. L'inhibition la plus élevée est observée avec *Staphylococcus aureus*, ce qui nous permet de constater que cet extrait possède une activité

antibactérienne à l'égard des germes testés et que *Staphylococcus aureus*, *E.coli* et *Pseudomonas aeruginosa* sont des souches limites.

➤ **Extrait butanolique**

Tableau 15 : Diamètres en mm des zones d'inhibition de l'extrait butanolique.

Souche bactérienne	Solution mère	Solution diluée
<i>E.coli</i>	6,5	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,75	8,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,25	5,75

Les valeurs sont en moyenne de 4 essais

Ces résultats démontrent que l'extrait butanolique a agi positivement sur l'ensemble des souches bactériennes testées et les diamètres des zones d'inhibitions obtenues nous permettent de déduire que cet extrait possède une activité antibactérienne et que *Staphylococcus aureus*, *E.coli* et *Pseudomonas aeruginosa* sont des souches limites.

Selon la littérature scientifique, les souches bactériennes répondent ou pas aux extraits en fonction de l'existence ou non de zones d'inhibition, trois réponses sont possibles :

- ✓ Souche sensible : La dimension du diamètre de la zone d'inhibition est égale ou supérieure à 10mm
- ✓ Souche limite (intermédiaire) : La dimension du diamètre de la zone d'inhibition inférieure à 10mm
- ✓ Souche résistante : Absence de zone d'inhibition [3].

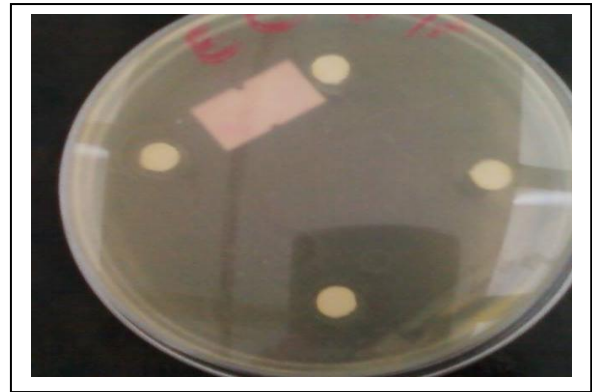
Les résultats obtenus indiquent que l'extrait chloroforme du fenouil sauvage présente une meilleure activité antibactérienne par rapport aux deux autres extraits (acétate d'éthyle et butanol). La différence d'activité entre ces extraits pourrait s'expliquer par la nature des molécules contenues dans chacune d'elles. En effet, il existe des différences de capacité de solubilisation et d'extraction des solvants, à l'égard des phytomolécules. Selon COWAN (1999), au cours de l'extraction liquide-liquide, les phytomolécules sont réparties entre les solvants en fonction de leur polarité et leur solubilité. On pourrait en déduire que les substances antibactériennes contenues dans *foeniculum vulgare* sont probablement plus solubles dans le chloroforme que dans les autres solvants utilisés. Le chloroforme concentrerait alors mieux le principe actif [46].

Les figures de l'activité antibactérienne des différents extraits

1) L'extrait butanolique

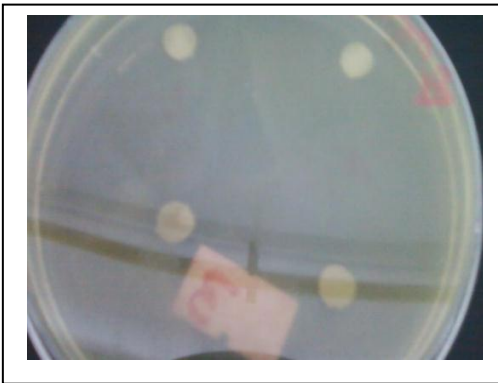


A) solution mère

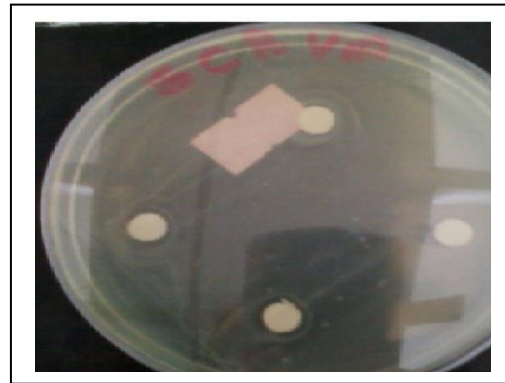


B) solution diluée

Figure 30 : Les zones d'inhibition d'*E. Coli*



A) solution mère

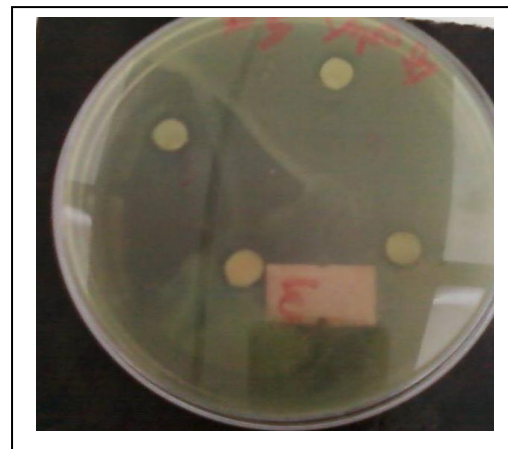


B) solution diluée

Figure 31 : Les zones d'inhibition de *staphylococcus aureus*



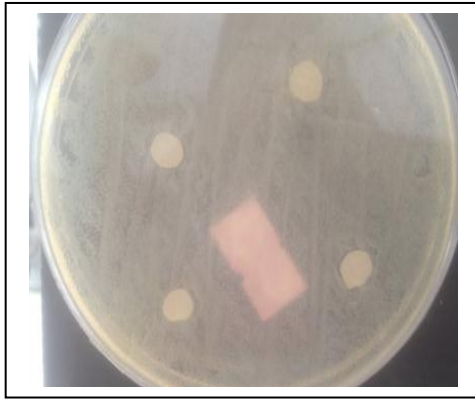
A) solution mère



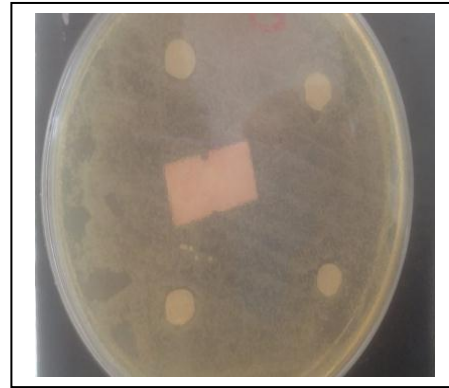
B) solution diluée

Figure 32 : Les zones d'inhibition de *pseudomonas aeruginosa*.

1) L'extrait acétate d'éthyle

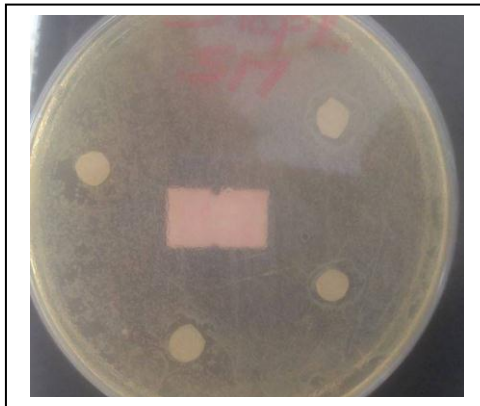


A) solution mère

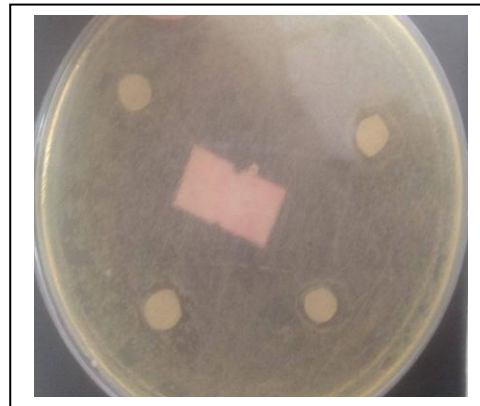


B) solution diluée

Figure 33 : Les zones d'inhibition d'*E.Coli*



A) solution mère



B) solution diluée

Figure 34 : Les zones d'inhibition de *staphylococcus aureus*

1) L'extrait chloroforme

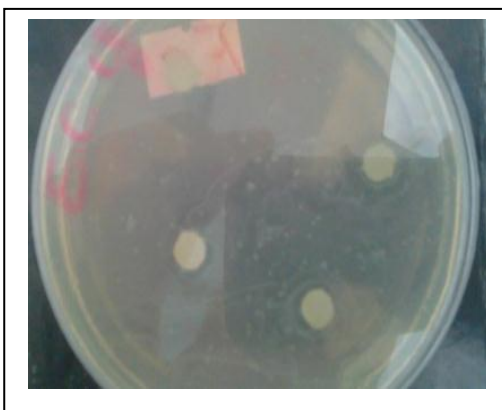


Figure 35 : Les zones d'inhibition d'*E.Coli*

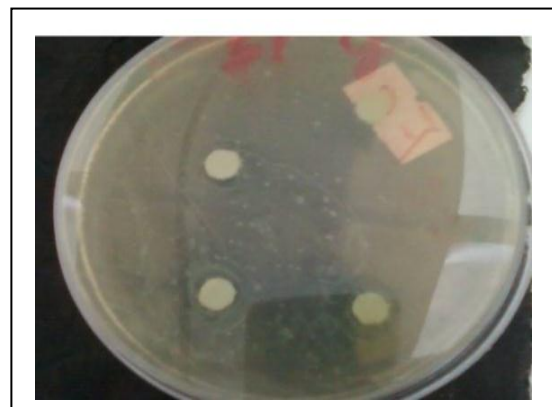


Figure 36 : Les zones d'inhibition de *staphylococcus*

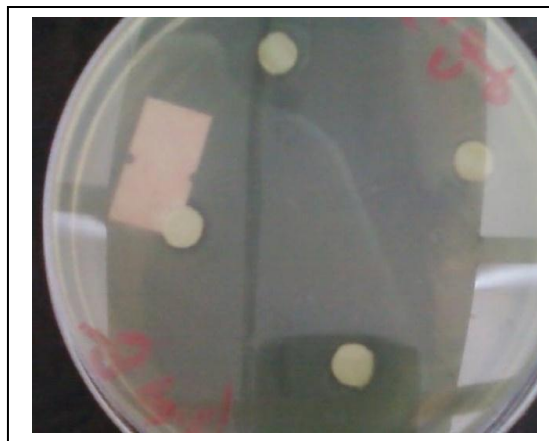


Figure 37 : Les zones d'inhibition de *pseudomonas aeruginosa*.

3.2. Résultats du pouvoir antioxydant

❖ Test au DPPH

L'activité antioxydante des différents extraits de la plante vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune, mesurable à 517nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaires [47].

A partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition en utilisant la formule donnée dans la partie matériels et méthodes. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes représentées dans les Figures [38-39], qui représentent la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des extraits et de la Quercétine .

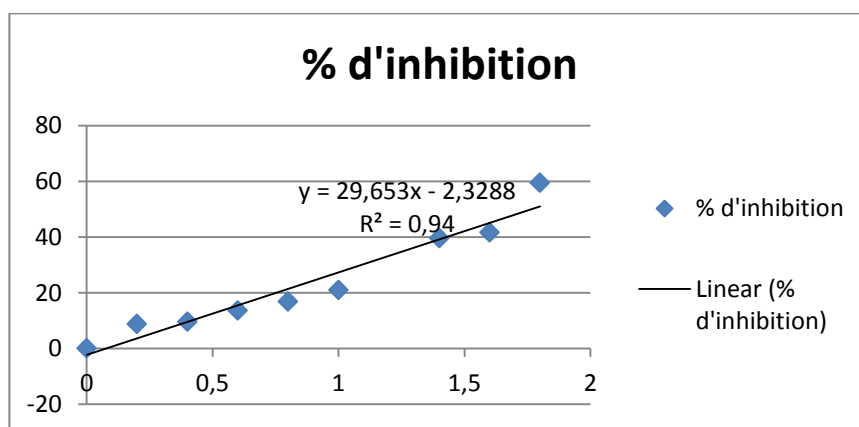


Figure 38 : Pourcentage d inhibition du radical libre DPPH en fonction des Concentrations de la Quercétine.

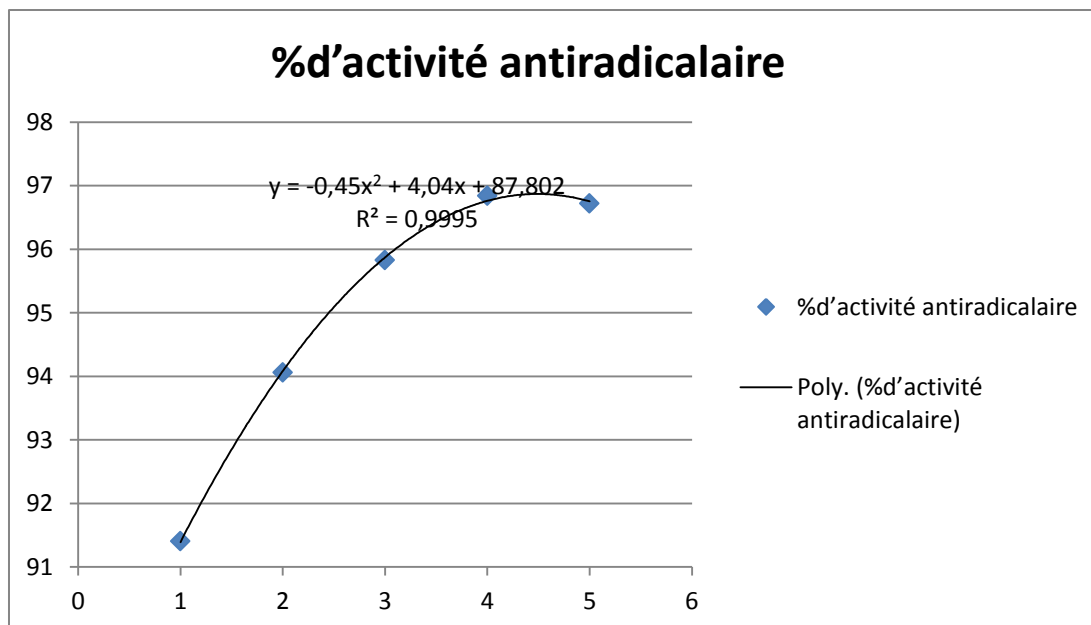


Figure 39 : Pourcentage d'inhibitions du radical libre DPPH en fonction des Concentrations de l'extrait acétate d'éthyle .

L'équation de l'extrait butanolique (la figure I dans l'annexe)

$$Y = -0.054x^2 + 0.426x + 95.37$$

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, nous avons introduit le paramètre IC50.

➤ **Le Calcul des IC50**

Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur IC50 qui est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées et les standards [42].

Les valeurs des IC50 trouvées pour les deux extraits testés sont représentées dans le tableau N°1 et dans la figure N°16 sous forme d'histogrammes.

Tableau16: les valeurs d'IC50 des extraits étudiés.

Extraits	IC50 (mg/ml)
Acétate d'éthyle	14.73
Butanol	33.19

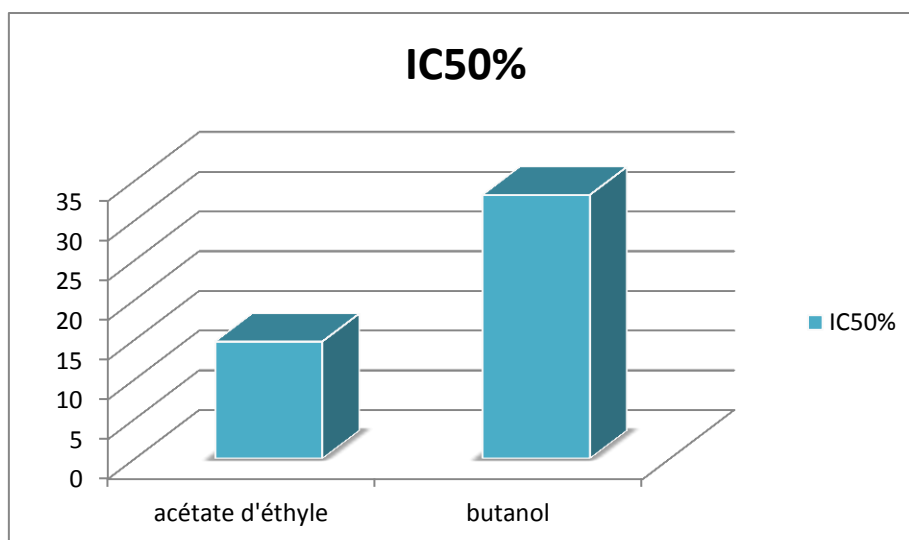


Figure 40: histogramme représentant le pouvoir d'inhibition des différents extraits.

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus de l'activité antiradicalaire des extraits de la partie aérienne de *foeniculum vulgare*, montrent que parmi les deux extraits testés l'extrait acétate d'éthyle représente l'extrait le plus actif avec un IC50% de l'ordre de 14.73mg/ml suivi par l'extrait butanolique avec un IC50%=33.19mg/ml. En comparaison avec l'antioxydant standard (la Quercétine) qui démontre un IC50%=1.76mg/ml, nous constatons que nos extraits sont moins actifs par rapport à la Quercetine.

Cette activité antiradicalaire du fenouil peut être attribuée à la présence d'une grande proportion de composés phénoliques. Il est rapporté que les composés phénoliques peuvent donner un atome d'hydrogène aux radicaux libres arrêtant de ce fait la réaction en chaîne de propagation pendant le processus d'oxydation des lipides [48]. Les composés phénoliques réagissent selon un mécanisme proposé par Sherwin E.R(1976) [49], l'antioxydant cède un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de protons, pour donner un intermédiaire radical stabilisé de par ses structures mésomères conjuguées.

Ces résultats sont en accord avec les travaux réalisés antérieurement sur les huiles essentielles du fenouil sauvage. En effet, Selon Muckenstrum *et al.* (1997) [50] cette activité antioxydante pourrait être due au composé majeur tel que l'anéthole, un monoterpène oxygéné connu pour son activité antioxydante, ces observations ont été confirmés par Freire *et al.* (2005), Lu et Foo (1995) [51][52] ont déjà rapporté que les composés antioxydants fonctionnent synergiquement les uns avec les autres pour produire une large gamme d'activités antioxydantes qui crée un système de défense efficace contre l'attaque du radical libre [48].

Conclusion

Conclusion

Les plantes possèdent des milliers de substances actives à l'intérieur de leurs organes et peuvent, selon des techniques chimiques, permettre l'isolation du principe actif pour l'utiliser en pharmacie. Ces remèdes naturels sont bien souvent très efficaces avec moins d'effets secondaires reconnus que beaucoup de médicaments de synthèse. Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude de ces molécules thérapeutiques d'origine naturelle.

Dans le présent travail on a effectué l'extraction et l'évaluation phytochimique des métabolites secondaires et l'étude de l'activité antioxydante et antibactérienne du Fenouil sauvage (*Foeniculum vulgare*) qui est une grande plante herbacée, vivace et aromatique appartenant à la famille des *Apiaceae*, largement utilisée en médecine traditionnelle. Elle est originaire de la région méditerranéenne.

L'estimation quantitative des métabolites secondaires par le screening phytochimique a mis en évidence la présence des composés suivants ; flavonoïdes, tanins catéchiques, saponosides et polyphénols.

L'extraction méthanolique des parties aériennes de cette plante par macération a permis l'obtention d'un extrait brut, cet extrait a subi une série d'extraction liquide-liquide en utilisant quatre solvants à polarité croissantes : éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et butanol ; les rendements respectifs sont (1%, 6,2%, 6% et 9%); le rendement le plus important a été obtenu avec l'extrait butanolique (9%).

L'analyse quantitative des extraits de *foeniculum vulgare* est représentée par un dosage spectral des polyphénols et des flavonoïdes déterminée par le réactif du *Folin-Ciocalcu* et par le trichlorure d'aluminium respectivement qui varie dans les différents extraits testés. La teneur la plus élevée en polyphénols est retrouvée dans l'extrait butanolique (89 mg d'acide gallique/g) suivie par l'extrait acétate d'éthyle avec une teneur de (71.5 mg d'acide gallique/g). Pour les flavonoïdes la teneur la plus élevée est trouvée dans l'extrait butanolique (7.35 mg de Quercetine/g) suivie par l'acétate d'éthyle (6.48mg de Quercetine/g). L'analyse de ces extraits par CCM en utilisant le système solvant (butanol, acide formique et eau distillée) a permis la séparation des composants de chaque extrait et a révélé la richesse de l'extrait acétate d'éthyle en composés actifs par rapport aux autres extraits.

Quant à l'activité antioxydante, nous avons étudié le pouvoir antiradicalaire des extraits acétate d'éthyle et butanolique en utilisant la technique de piégeage du radical libre DPPH. L'étude de l'activité antiradicalaire a donné une bonne efficacité antioxydante des

Conclusion

extraits butanolique et acétate d'éthyle avec un (IC50%= 33.19mg/ml et 14.73mg/ml) respectivement mais moins efficace que celle enregistré pour la Quercétine (IC50 = 1.76mg/ml). Cette méthode a confirmé les propriétés puissantes que possèdent les polyphénols à piéger les radicaux libres.

L'évaluation de l'activité antibactérienne selon la méthode de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme) vis-à-vis des 3 bactéries pathogènes utilisées pour tester les extraits acétate d'éthyle, chloroforme et butanolique a montré que ces extraits possèdent une faible activité antibactérienne.

En perspectives, on peut prévoir l'étude de plusieurs aspects complémentaires à nos résultats:

Dans un premier temps, de faire un fractionnement de ces extraits et d'identifier les molécules responsables du pouvoir antioxydant en utilisant des techniques de purification et d'identification plus performantes.

Dans un deuxième temps, il serait intéressant d'évaluer l'activité antioxydante par d'autres méthodes et de faire des tests in vivo afin de déterminer de nouveaux agents thérapeutiques.

***Références
bibliographiques***

-
- [1] BOUTAGHANE N. Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales Algériennes *Genista ulicina Spach (Fabaceae)* et *Chrysanthemum macrocarpum (Sch. Bip.) Coss. & Kralik ex Batt (Asteraceae)*. These Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat en sciences. Université De Constantine 1.2013. Page 11_58
- [2] BENHAMMOU N. Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse présenté Pour l'obtention d'un Doctorat en Biologie. Université aboubakr belkaïd-tlemcen.2012.page 2.
- [3] CHENNI M. Contribution à l'étude chimique et biologique de la racine d'une plante médicinale : *Bryonia dioica Jacq.* Mémoire présenté Pour l'obtention du Diplôme de Magister. Université D'oran Es-Senia.2010.page 2_50
- [4] KHADHRI A., ELMOKNI R., SMITI S. Composés Phénoliques Et Activités Antioxydantes De Deux Extraits De Chardon A Glu: *Atractylis gummifera*. *Soc. Sci. Nat.* 2013 ; 39 : 44-52.
- [5] BENMILOUD K. Criblage phytochimique , activités antioxydantes et anticandidose des extraits de *Nepeta amethystina (Gouzeia)*. Memoire Présenté pour l'obtention du Diplôme de Master en Chimie. Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen.2014.page 1.
- [6] BOUDJOUREF M. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris L.* Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Magister En Biochimie. Université Ferhat Abbas, Setif. 2011.9_28
- [7] MESSAI L. Etude phytochimique d'une plante medicinale de l'est algerien (*ARTEMISIA HERBA ALBA*). Thèse Pour l'obtention de Doctorat des sciences. Université Mentouri Constantine.2011. Page 2.
- [8] Belaoura A., Meghazzi A. Etude phytochimique d'une plante médicinale appartenant à la famille des Liliacées (Liliaceae). mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de Master. université de constantine 1.2013.page 2.
- [9] BOUGUERRA M. A. Étude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare Mill.* En vue de son utilisation comme conservateur alimentaire. Memoire Présenté Pour L'obtention Du Diplôme De Magister. Université Mentouri Constantine.2012.page 27.

- [10] Guide illustré de la flore algérienne .Wilaya d'Alger. N° ISBN : 978-2-7466-4242-3.2012.
- [11] OKTAY M et al .Determination of in vitro antioxidant activity of fennel(*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 2003. 36: 263–271.
- [12] Rather M et al. *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phyto-chemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry*. 2012 .page3_4.
- [13] MUCKENSTURM b et al .Phytochemical and Chemotaxonomic Studies of *Foeniculum vulgare*. *Biochemical Systematics and Ecology*.1997; 25:353-358.
- [14] SHAMKANT B., BADGUJAR et al. *Foeniculum vulgare Mill* : A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Contemporary Application, and Toxicology. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*. 2014; Article ID 842674, 32.
- [15] Zoubiri S et al. Chemical composition and larvicidal activity of Algerian *Foeniculum vulgare* seed essential oil. *Arabian Journal Of Chemistry* .2014; 7:480-485.
- [16] RAHIMI R., ARDEKANI MR. Medicinal properties of *Foeniculum vulgare Mill*. in traditional Iranian medicine and modern phytotherapy. *Chin J Integr Med*. 2013;19(1):73-9.
- [17] SENATORE F et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of anethole-rich oil from leaves of selected varieties of fennel [*Foeniculum vulgare Mill. ssp. vulgare var. azoricum (Mill.) Thell*]. *Fitoterapia*.2013; 90: 214-219.
- [18] Paloma F. Les plantes de la famille des Apiacees dans les troubles digestifs. *Pharmaceuticalsciences*. 2012 ;00740660 : 63.
- [19] BOUDJERDA Z. Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires de *Achillea ligustica* (Anthemideae) , et *Ranunculus cortusifolius* (Ranunculaceae) . Diplôme de Doctorat d'Etat En Chimie Organique Option: Phytochimie .Université Mentouri-Constantine. page 40_41
- [20] LAMARTI A., BADOUC A., DEFFIEUX G., Carde J.-P. Biogénèse Des Monoterpènes Li La Chaîne Isoprénique. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*.1994 ;133 : 79 - 99
- [21] BOUBEKRI C. Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de Doctorat en sciences Spécialité Chimie. Université Mohamed Khider – Biskra .2014.page 29_51

- [22] HARRAR A. Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Diplôme de Magister Biochimie et physiologie expérimentale. Université Ferhat Abbas-Sétif. 2012.8_31
- [23] Chapitre 8 Les Tanins Pharmacognosie. Faculté De Pharmacie De Monastir - DCEP 1. 2014.
- [24] chapitre 4 drogues à saponosides pharmacognosie. Faculté de pharmacie de Monastir - DCEP 1 . 2014.
- [25] BENZEGGOUTA N. Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments. Diplôme de Magister en Pharmacochimie. Université Mentouri de Constantine. 2005 .pages 18
- [26] ELODIE G. Molecules antibacteriennes issues d'huiles essentielles: separation, identification et mode d'action. Thèse Présentée Pour L'obtention Du Grade De Docteur . Life Sciences. Université de Corse. French. 2010. p5
- [27] DJEMOUI D. contribution à l'étude de l'activité antioxydante et antibactérienne de quelques coumarines synthétisées. Mémoire Master Académique. Université Kasdi Merbah Ouargla.2012.page 17
- [28] DAAS AMIOUR S. Etude Quantitative Des Composés Phénoliques Des Extraits De Trois Variétés De Dattes (*Phoenix Dactylifera* L.) Et Evaluation *In Vitro* De Leur Activité Biologique. diplôme de Magister en Biologie Option : Biochimie appliquée. Université El-Hadj Lakhdar – Batna. 2009.26_42.
- [29] BOUHADJRA k. Etude de l'effet de l'antioxydant Naturel et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge. Soutenance de magister en chimie de l'environnement. Université Mouloude Mammeri Tizi-Ouzou.2011.page 15_16.
- [30] BOUTINE D. Évaluation De L'activité Antioxydante Et Antibactérienne D'une Plante Endémique Algérienne *Ampelodesma Mauritanica*. Diplôme de Magister Spécialité : CHIMIE ORGANIQUE. Université Badji Mokhtar-Annaba. 2011.page 19_25
- [31] BOUGANDOURA N. Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Satureja calamintha* (nabta) et *Ajugaiva* L. (chendgoura) de l'ouest d'Algérie. Diplôme de magister en Biologie Option Substances naturelles : activités biologiques et synthèse. Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen.2011.page 27.
- [32] NOUIOUA W. Biodiversité Et Ressources Phytogénétiques D'un Ecosystème Forestier « *Paeonia mascula* (L.) Mill. ». Diplôme de MAGISTER Option : Biodiversité et gestion des écosystèmes. Université Ferhat Abbas -Setif. 2012. page 20.

- [33] Bammou et al. Valorisation du lentisque « *Pistacia lentiscus L.* » : Étude ethnobotanique, Screening phytochimique et pouvoir antibactérien. *Journal of Applied Biosciences* 86:7966–7975 :2015
- [34] ATTOU A. contribution à l'étude phytochimique et activités biologique des extrait de la plante *Ruta chalepensis (fidjel)* de la région d'ain témouchent .Diplome De Magister En Biologie Option : Activités biologiques et synthèses. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.2011.p40_41
- [35] BADIAGA M.Etude ethnobotanique phytochimique et activités biologique de *nauclea la tifolai smith* une plante médicinale africaine récoltée au mali .These de docteur d'université : chimie organique. Université De Bamako.2011.page 73_75
- [36]Central Naturel de Ressources Textuelles et Lexicales [En ligne].[http://www.corttl.fr/definition /mac%A9ration](http://www.corttl.fr/definition/mac%A9ration). Consulté le: 10/06/2015
- [37] BENAÏSSA O. Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées genres *Chrysanthemum et Rhantherium* Activité Biologique. Thèse de Doctorat en Sciences : Chimie organique Option Phytochimie. Université Mentouri Constantine.2011.
- [38] HADJ SEYD A. Simulation du rendement et du coefficient de distribution dans une extraction liquide-liquide.Mémoire Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER.2007.page 41_42
- [39] Belguidoum M . Une approche phytochimique pour différencier deux espèces de genre *Zygophyllum*. Mémoire Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER.2012. Page21
- [40] MEZITI A.Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa.L* Étude in vitro et in vivo. Memoire Pour L'obtention Du Diplôme De Magister. Université El -Haj Lakhdar Batna. 2009. page 35
- [41] BENMILOUD K.Criblage phytochimique, activités antioxydantes et anticandidose des extraits de *Nepeta amethystina (Gouzeia)*. Memoire Présenté pour l'obtention du Diplôme de Master en Chimie. Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen.2014.page 27.
- [42] BOURAS F., HOUCHI A.Etude De L'activité Antioxydante De La Plantes *Rumex Vesicarius L.* Mémoire MASTER ACADEMIQUE.2013.page 28.

- [43] BEN ABBES F. Etude de quelques propriétés chimiques et biologiques d'extraits de dattes *Phoenix dactylifera* L. Diplôme De Magister Option : Génie Des Procédés Pharmaceutiques. Université Ferhat Abbas-Setif.2011.p47.
- [44]TAWAHA K., ALALI F Q., GHARAIBEH M., MOHAMMAD M., EL-ELIMAT T. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.*,(in press). 2007.
- [45] SHTAYEH S., YAGHMOUR R M-R ., FAIDI Y-R ., SALEM K ., AL NURI M-a. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethno Pharmacology*. 1998 ; 60:265-271.
- [46]BOLOUG E K et al. Évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. Sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium* ». *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. 2011 ; 8 : 772 – 790.
- [47] KANOUN KH. Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus Communis* (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). mémoire magister en biologie.2011. Page 69.
- [48] SÁNCHEZ MORENO C., LARRAURI J A., SAURA CALIXTO F.A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric*. 1998; 76: 270-276.
- [49]SHERWIN E.R. Antioxidants for vegetable oils. *Journal of American Oil Chemical Society*. 1976; 53: 430-436.
- [50]MUCKENSTRUM B., FOECHTERLEN D., REDURON J.P., DANTON P., HILDENBRAND M. Phytochemical and chemotaxonomic studies of *Foeniculum vulgare*, *Biochem. Syst. Ecol*. 1997; 25: 353-358.
- [51]FREIRE R S., MORAIS S M., Catunda-Junior F.E.A., Pinheiro D.C.S.N., *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 4353-4358 (2005) In Conforti F., STATTI G., Uzunov D. and Menichini F. 2006. Comparative chemical composition and antioxidant activities of wild and cultivated *Laurus nobilis* L. Leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* (Ucria) Coutinho Seeds. *Biol. Pharm. Bull.* 29 (10) pp. 2056-2064.
- [52] LU F., FOO LY. Phenolic antioxidant component of evening primrose. In Ong A.S.H., Niki E. & Packer L. (Eds.), Nutrition, lipids, health and disease. Champaign: *American Oil Chemists Society Press*.1995.

Annexe

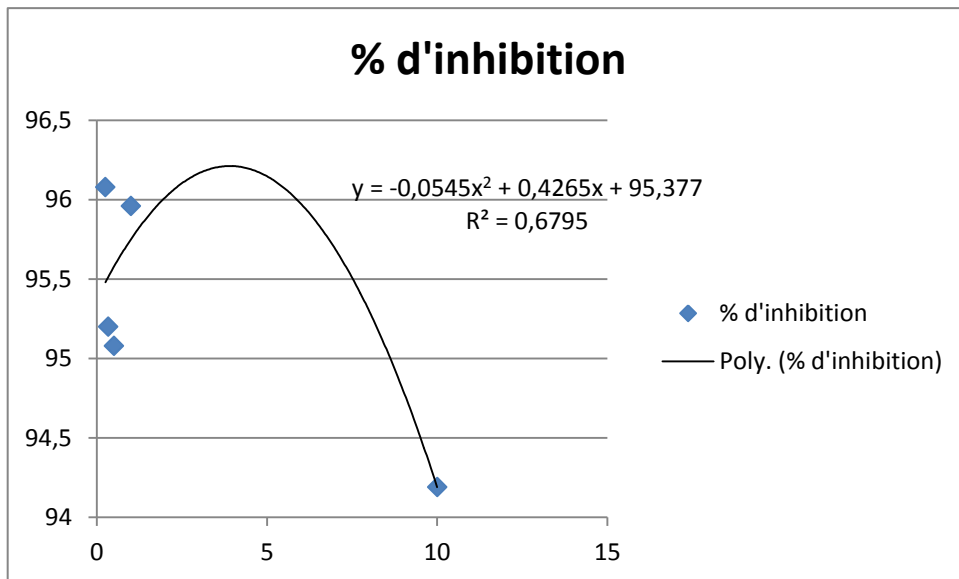


Figure I : Pourcentage d'inhibitions du radical libre DPPH en fonction des Concentrations de l'extrait butanolique

Résumés

Résumé

Notre travail vise à réaliser une étude phytochimique et à évaluer les activités biologiques des extraits de la partie aérienne de *foeniculumvulgare*. L'estimation qualitative des métabolites secondaires est réalisé par le screening phytochimique.une extraction méthanolique a été réalisé par macération puis cet extrait a subit une séries d'extraction liquide –liquide en utilisant 4 solvants,ce qui a permis l'obtention des différents extraits. L'étude quantitative des polyphénols et des flavonoïdes est déterminée par le réactif du *Folin-Ciocalcu* et par le trichlorure d'aluminium respectivement. L'évaluation de l'activité antibactérienne a été déterminée selon la méthode de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme) vis-à-vis des 3 bactéries pathogènes utilisées pour tester les différents extraits. Concernant l'activité antioxydanteelle est étudiée suite à la méthode de piégeage du radical libre DPPH.

Les résultats du screening phytochimique a mis en évidence la présence des flavonoïdes, taninscatéchiques, saponosides et des polyphénols. Cette richesse est confirmée par ces rendements (1%, 6,2%, 6% et 9%) successivement pour l'éther de pétrole,chloroforme, acétate d'éthyle et butanolique.La teneur en polyphénols est de (71.5mgd'acide gallique/g et 89mg d'acide gallique/g)dans les extraits acétate d'éthyle et butanolique respectivement et celle des flavonoïdes est de (6.48mg de Quercetine/get7.35 mg de Quercetine/g) dans les extraits acétate d'éthyle et butanolique. Les résultats de l'évaluation du pouvoir antioxydant ont donné une bonne efficacité antioxydante des extraits butanoliqueet acétate d'éthyle avec une valeur ($IC_{50}\%$ = 33.19mg/ml et 14.73mg/ml) respectivement mais moins efficace que celle enregistré pour la Quercétine (IC_{50} = 1.76mg/ml). L'évaluation de l'activité antibactérienne a montré une faible activité des extraits acétate d'éthyle, chloroforme et butanolique.

Mots clés :*foeniculum vulgaire* ;étudephytochimique ; métabolites secondaires ; activité antioxydante ; activité antibactérienne.

الملخص

يهدف عملنا لإجراء الدراسة الفيتو كيميائية وتقييم الأنشطة البيولوجية للمستخلصات الجزء الهوائي لنبتة *foeniculum vulgare* التقدير النوعي للمركبات الثانوية تم من خلال الفرز الفيتو كيميائي وتم الحصول على المستخلص الميثانولي عن طريق النقع ثم هذا المستخلص خضع لسلسلة من الإستخلاص السائل- سائل باستخدام 4 مذيبات، والذي سمح بالحصول على مختلف المستخلصات. الدراسة الكمية لمادتي الفينول الكلية والفلافونويدات قدرت بإستعمال متفاعل *Folin-ciocaleu* و $AlCl_3$ على الترتيب، وتم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا باستخدام طريقة انتشار الأقراص على 3 سلالات بكتيريا و التي تم استخدامها لاختبار المستخلصات المختلفة. وفيما يتعلق بالنشاط المضاد للأكسدة فقد تمت دراسته وفقا لطريقة القدرة على تثبيط الجذر الحر DPPH.

أظهرت نتائج الفحص الفيتو كيميائي وجود مركبات الفلافونويد، كاتشين العفص، السابونين وعديدات الفينول الكلية. ويؤكد هذا الثراء من خلال هذه العوائد (1%، 6.2%، 6%، و 9%) على التوالي لكل من مستخلصان الفينول والكلوروفورم، خلاص الإيثيل وبيوتانول. محتوى عديدات الفينول الكلية هو (71.5 ملغ مكافئ لحمض الغاليك/غ و 89 ملغ مكافئ لحمض الغاليك/غ) في مستخلصات خلاص الإيثيل وبيوتانول على الترتيب وفيما يخص الفلافونويدات فكانت قيمته (6.48 ملغ مكافئ الكرسيتين/غ و 7.35 ملغ مكافئ الكرسيتين/غ) في كل من مستخلص خلاص الإيثيل وبيوتانول على الترتيب. نتائج تقييم قدرة مضادات الأكسدة أعطت فعالية جيدة للمستخلصات حيث قدر ال IC_{50} ب : 14.3 ملغ / مل و 33.19 ملغ / مل) بالنسبة لمستخلصات كل من خلاص الإيثيل وبيوتانول لكنها تبقى صغيرة مقارنة بقيمة الشاهد الموجب (كيرسيتين) ($IC_{50}=1.76$ ملغ / مل). وأظهر تقييم النشاط المضاد للبكتيريا انخفاض النشاط بالنسبة لمستخلصات خلاص الإيثيل، والكلوروفورم وبيوتانول.

كلمات البحث: *vulgarefoeniculum*. دراسة الفيتو كيميائية. المركبات الثانوية. النشاط المضاد للأكسدة. النشاط المضاد للبكتيريا.

Abstract

Our work aim isto make a phytochemical study and evaluate the biological activities of extracts of the aerial part of *foeniculu mvulgare*. Qualitative estimate of secondary metabolites is carried out by screening phytochimique.themethanolic extraction was carried out by maceration then this extract undergoes series of liquid-liquid extraction using 4 solvents, which allowed obtaining different extracts. The quantitative study of polyphenols and flavonoids is determined by the *Folin-Ciocaleu* reagent and aluminum trichloride $AlCl_3$ respectively. The evaluation of antibacterial activity was determined using the medium agar diffusion method (sensitivity) towards three bacterial pathogenic strains used to test the different extracts. Regarding the antioxidant activity is studied following the trapping method of DPPH free radical.

The results of phytochemical screening showed the presence of flavonoids, catechin tannins, saponins and polyphenols. This richness is confirmed by these yields (1%, 6.2%, 6% and 9%) successively to the petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and butanol. The polyphenol content is (71.5mgEAG/g, 89 mgEAG/g) in ethyl acetate and butanol extracts respectively.and about the flavonoids that is (6.48mg EQ/g, 7.35mg EQ/g) in the ethyl acetate and butanol extracts. The results of the evaluation of the antioxidant activity gave a good antioxidant efficacy of the extracts ethyl acetate and butanol ($IC_{50}=14.73\text{mg/ml}$, 33.19 mg/ml) but less efficaciously than those recorded Quercetin ($IC_{50}=1.76\text{ mg / ml}$). The evaluation of antibacterial activity showed low activity of the extracts ethyl acetate,

Keywords:*foeniculum vulgar*; phytochemical study; secondary metabolites; antioxidant activity; antibacterial activity.

Date de soutenance : 17/06/2015

Soutenu par

KISSOUM AMINA

KHALFAOUI KHADIDJA

Thème

**Evaluation phytochimique et étude des activités biologiques d'une plante médicinale
Algérienne *foeniculumvulgare***

Résumé

Notre travail vise à réaliser une étude phytochimique et à évaluer les activités biologiques des extraits de la partie aérienne de *foeniculum vulgare*. L'estimation qualitative des métabolites secondaires est réalisé par le screening phytochimique.une extraction méthanolique a été réalisé par la macération puis cet extrait a subit une séries d'extraction liquide –liquide en utilisant 4 solvants,ce qui a permis l'obtention des différents extraits. L'étude quantitative des polyphénols et des flavonoïdes est déterminée par le réactif du *Folin-Ciocaleu* et par le trichlorure d'aluminium respectivement. L'évaluation de l'activité antibactérienne a été déterminée selon la méthode de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme) vis-à-vis des 3 bactéries pathogènes utilisées pour tester les différents extraits. Concernant l'activité antioxydante elle est étudiée suite à la méthode de piégeage du radical libre DPPH.

Les résultats du screening phytochimique a mis en évidence la présence des flavonoïdes, taninscatéchiques, saponosides et des polyphénols. Cette richesse est confirmée par ces rendements (1%, 6,2%, 6% et 9%) successivement pour l'éther de pétrole,chloroforme, acétate d'éthyle et butanolique.La teneur en polyphénols est de (71.5mg d'acide gallique/g et 89mg d'acide gallique/g) dans les extraits acétate d'éthyle et butanolique respectivement.et celle des flavonoïdes est de(6.48mg de quercetine/get7.35 mg de quercetine/g)dans les extraits acétate d'éthyle et butanolique..Les résultats de l'évaluation du pouvoir antioxydant ont donné une bonne efficacité antioxydante des extraits butanoliqueet acétate d'éthyle avec une (IC50%= 33.19mg/ml et 14.73mg/ml) respectivement mais moins efficace que celle enregistré pour la Quercétine (IC50 = 1.76mg/ml).L'évaluation de l'activité antibactérienne a montré une faible activité des extraits acétate d'éthyle, chloroforme et butanolique.

Mots clés : *foeniculum vulgaire* ;etudephytochimique ; métabolites secondaires ; activité antioxydante ; activité antibactérienne.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de biochimie

Jury d'évaluation :

Président de jury : MOUKRANI El hassen

Maitre assistant A.UFM

Rapporteur : DEMMAK Rym Gouta

Maitre assistant A.UC3

Examineur : MOSBAH Asma

Maitre assistant A.UFM