



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine 1

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie Appliquée*

Thème

**Investigation phytochimique et potentiel antioxydant d'une
plante algérienne du genre *Tuberaria* (Cistaceae)**

Présenté et soutenu publiquement

Le : 26/06/2018

Par

BENOUDINA Farid & HARIECHE Mohammed

Jury

BENSEGUENI Abderrahmane

Pr. UFM Constantine

Président

BOUTAGHANE Naima

MCA. UFM Constantine

Rapporteur

SEMRA Ilhem

MAA. UFM Constantine

Examineur

Année universitaire

2017– 2018

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions **Allah** le tout puissant, de nous avoir guidé jusqu'à l'achèvement de ce mémoire, et de nous avoir donné la force, le courage et la patience.

Nos remerciements vont tout particulièrement au Maître de conférence **Boutaghane Naima** qui a accepté de nous encadrer durant notre deuxième semestre de fin d'étude. C'est à elle que nous devons notre intégration dans le laboratoire d'obtention de substances thérapeutiques (LOST) et au centre de recherche en biotechnologie (CRBT) en tant que mastériens. C'est elle aussi qui a géré et orienté nos travaux pour que nous puissions développer nos connaissances et notre savoir-faire en phytochimie. C'est ici madame que nous témoignons toutes nos reconnaissances pour le temps que vous avez consacré à la lecture et la correction de ce manuscrit que nous souhaiterions être un guide aux prochaines générations estudiantines.

Toutes nos gratitudes doivent aller également au Professeur **Kabouche Zafia** pour son accueil au sein de son laboratoire et d'avoir mis à notre disposition tout le matériel qui s'y trouve.

Qu'il nous soit ainsi permis de remercier très sincèrement le Professeur **Bensegueni Abderrahmane**, pour avoir spontanément accepté de juger ce travail. Nous sommes très honorés d'avoir pu bénéficier de vos remarques éclairées et nous aimerons témoigner ici l'expression d'une sincère et marquante admiration.

Nous remercions vivement la Maître-assistante, **Semra Ilhem**, d'avoir accepté de juger ce travail. Nous sommes très touchés à l'honneur que vous nous faites d'en être l'examinatrice.

Nous tenons également à remercier la Doctorante **Bendamen Samia** de nous avoir promulgué de précieux conseils et d'être toujours souriante et de bonne humeur depuis l'initiation de notre mémoire ce qui nous a tellement aidé lors de nos manipulations. C'est grâce à son agréable assistance que nous avons pu nous familiariser avec le matériel du laboratoire. Nous tenons à vous adresser toutes nos reconnaissances pour votre présence ainsi que votre disponibilité et de nous avoir incessamment suivi au cours de la réalisation de ce travail.

Nous désirons vivement exprimer notre profonde gratitude et nos remerciements au Maître-assistant **Mokrani Mohcen** pour son aide, sa sincérité et ses profitables conseils.

Sans oublier bien sûr madame **Zerrougui Leïla** du laboratoire d'enzymologie pour son soutien et sa générosité.

Nous remercions aussi tout le personnel rencontré au niveau du LOST et CRBT pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à nos parents, frères et sœur ainsi qu'à toute personne qui a contribué, de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

*Je tiens en tout premier lieu à remercier
le bon dieu Allah*

*Qui m'a guidé tout au long de mon
chemin*

*À mes chers parents Fatima Zohra et
Salim qui m'ont donné un soutien très
précieux*

À mes chers frères

À ma chère sœur

À mes amis proches et collègues d'études

*Enfin je tiens à remercier tous ceux qui
ont contribué de près ou de loin à*

*L'élaboration de ce modeste travail
particulièrement mon encadreur*

Boutaghane Naima

FARID



Dédicaces

*Une chance m'a été offerte
pour dédier ce travail
aux personnes qui
me sont très chers.*

A ma mère;

A mon père;

A mes frères et sœurs;

*Pour leurs soutien et sacrifices
tout au long de ma vie.*

Mohammed

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
------------------------------------	---

1^{ère} Partie : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : ASPECT BOTANIQUE ET ETUDES CHIMIQUES ANTERIEURES

I.1. Famille des Cistaceae	4
I.1.1. Généralités	4
I.1.2. Description botanique de la famille Cistaceae	4
I.1.3. Distribution géographique de la famille Cistaceae	6
I.1.4. Classification	7
I.1.4.1. Classifications anciennes	7
I.1.4.2. Classification actuelle	8
I.1.5. Etudes chimiques et biologiques antérieures	9
I.2. Présentation du genre <i>Tuberaria</i>	10
I.2.1. Description botanique du genre <i>Tuberaria</i> (Dunal) Spach	10
I.2.2. Répartition géographique du genre <i>Tuberaria</i>	11
I.2.3. Les espèces du genre <i>Tuberaria</i>	12
I.2.4. Classification systématique	12
I.2.5. Etudes chimiques antérieures du genre <i>Tuberaria</i>	13
I.2.6. <i>Tuberaria</i> en médecine traditionnelle	15
I.2.6.1. En médecine vétérinaire	15
I.2.6.2. En médecine humaine	16
I.2.7. Activités biologiques	16
I.2.8. Intérêt écologique	17

Chapitre II : COMPOSES PHENOLIQUES

II.1. Généralités sur les polyphénols	19
II.2. Biogénèse des polyphénols	19
II.3. Principaux groupes des polyphénols	20
II.3.1. Phénols simples et acides phénoliques	21
II.3.1.1. Phénols simples	21
II.3.1.2. Acides phénoliques	21
II.3.1.2.1. Acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque	21
II.3.1.2.2. Acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique	22
II.3.2. Coumarines	22
II.3.3. Lignanes	23
II.3.4. Stilbènes	23

II.3.5. Flavonoïdes.....	23
II.3.5.1. Classification des flavonoïdes	24
II.3.6. Tannins	25
II.3.6.1. Tannins hydrolysables	26
II.3.6.2. Tannins condensés ou tannins catéchiques ou proanthocyanidols.....	26
II.4. Intérêts des polyphénols	26
II.4.1. Intérêts des acides phénols et phénols simples	27
II.4.2. Intérêts des coumarines.....	27
II.4.3. Intérêts des lignanes.....	28
II.4.4. Intérêts des stilbènes	28
II.4.5. Intérêts des tannins	28
II.4.6. Intérêts des flavonoïdes	29

Chapitre III : STRESS OXYDANT ET ACTIVITE ANTIOXYDANTE

III.1. Stress oxydant.....	30
III.2. Les radicaux libres.....	30
III.2.1. Origine des radicaux libres.....	31
III.3. Mécanisme de défense contre le stress oxydant	32
III.3.1. Systèmes antioxydants enzymatiques.....	33
III.3.2. Systèmes antioxydants non-enzymatiques	33
III.3.2.1. Antioxydants endogènes.....	33
III.3.2.2. Antioxydants exogènes naturels	34
III.3.2.3. Antioxydants synthétiques.....	35
III.4. Conséquences cellulaires du stress oxydant	35
III.5. Quelques tests de la capacité antioxydante et antiradicalaire	36
III.5.1. Capacité de piégeage du radical libre DPPH [•]	36
III.5.2. Capacité piégeage du radical-cation ABTS ^{•+}	37
III.5.3. Capacité piégeage du radical superoxyde par la méthode de DMSO alcalin	37
III.5.4. Capacité de réduire l'ion ferrique (Pouvoir réducteur)	38
III.5.5. Capacité de réduire l'ion cuprique (CUPRAC).....	38

2^{ème} Partie : MATERIEL ET METHODES

IV.1. Aperçu et but de travail	39
IV.2. Matériel végétale	39
IV.2.1. Description de la zone de récolte	39
IV.2.2. Récolte de la plante du genre <i>Tuberaria</i>	40
IV.3. Méthodes d'analyses phytochimiques.....	40
IV.3.1. Méthodes chromatographiques	40
IV.3.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	40

IV.3.1.2. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)	41
IV.3.1.3. Chromatographie liquide sous vide (VLC)	41
IV.3.1.4. Chromatographie sur colonnes ouverte (CC).....	41
IV.3.2. Méthodes d'analyses physico-chimiques	42
IV.3.2.1. Spectrophotométrie UV-visible.....	42
IV.3.2.2. Spectroscopie de RMN.....	42
IV.4. Etude phytochimique de la plante du genre <i>Tuberaria</i>	42
IV.4.1. Extraction par macération à froid.....	42
IV.4.2. Fractionnement de l'extrait éthanolique brut de la plante	43
IV.5. Evaluation de l'activité antioxydante de l'espèce du genre <i>Tuberaria</i>	46
IV.5.1. Test de piégeage du radical DPPH'	47
IV.5.2. Test de piégeage de l'ABTS ⁺⁺	47
IV.5.3. Test de piégeage du radical superoxyde par méthode DMSO alcalin.....	48
IV.5.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de l'ion cuprique (CUPRAC).....	48
IV.5.5. Test de la capacité antioxydante par réduction du fer (Pouvoir réducteur).....	49
IV.6. Analyse statistique	49

3^{ème} Partie : RESULTATS ET DISCUSSION

V.1. Rendement d'extraction.....	50
V.2. Description des profils chromatographiques par HPLC.....	50
V.3. Séparation et purification	51
V.4. Elucidation structurale des composés isolés.....	52
V.4.1. Structure du Composé Tb2.....	53
V.4.2. Structure du Composé Tb3.....	60
V.5. Evaluation du potentiel antioxydant	64
V.5.1. Test de l'activité scavenger du radical DPPH'	65
V.5.2. Test de l'activité scavenger du radical ABTS ⁺⁺	68
V.5.3. Test de l'activité scavenger du radical O ₂ ⁻ (DMSO alcalin).....	70
V.5.4. Test de l'activité réductrice de l'ion cuprique (CUPRAC)	72
V.5.5. Test de l'activité réductrice de l'ion ferrique (Pouvoir réducteur).....	74
CONCLUSION GENERALE	78
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	79

Liste des figures

1^{ère} Partie

Fig. 1 : Représentation schématique des différents organes de plantes Cistaceae	5
Fig. 2 : Distribution géographique des Cistaceae dans le monde	6
Fig. 3 : Cladogramme simplifié basé sur les séquences rcbL et trnL-trnF plastidique	9
Fig. 4 : Diversité morphologique au sein du genre <i>Tuberaria</i>	10
Fig. 5 : Carte géographique de la répartition continentale du genre <i>Tuberaria</i>	11
Fig. 6 : Association symbiotique entre <i>Tuberaria</i> et les truffes	18
Fig. 7 : Structures de l'acide benzoïque et acide cinnamique	21
Fig. 8 : Squelettes chimiques de quelques phénols simples	21
Fig. 9 : Structure générale des lignanes	23
Fig. 10 : Structure générale des stilbènes	23
Fig. 11 : Structure de base des flavonoïdes	24
Fig. 12 : Différentes classes des flavonoïdes	25
Fig. 13 : Structure chimique des acides gallique et éllagique	26
Fig. 14 : Schéma de la balance entre les ERO et les antioxydants	30
Fig. 15 : Origine des radicaux libres	32
Fig. 16 : Action des antioxydants au cours du métabolisme des ERO	32
Fig. 17 : Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques	33
Fig. 18 : Structure chimique de BHA et BHT	35

2^{ème} Partie

Fig. 19 : Localisation satellite de la zone de récolte de la plante	40
Fig. 20 : Etapes de macération et de filtration des parties aériennes de la plante	42
Fig. 21 : Procédé de concentration des filtrats hydroalcooliques	43
Fig. 22 : Procédé du fractionnement de l'extrait éthanolique par VLC	43
Fig. 23 : CCM récapitulatif des fractions de la VLC de l'extrait éthanolique	44
Fig. 24 : Evolution de la chromatographie sur colonne de gel de silice	45
Fig. 25 : Plaques CCM des composés purs : Tb1, Tb2 et Tb3	45
Fig. 26 : Les fractions sélectionnées pour une évaluation antioxydante	46

3^{ème} Partie

Fig. 27 : Profil HPLC de l'extrait éthanolique à 205 et 254 nm	51
Fig. 28 : les étapes de purification à partir de l'extrait éthanolique	52
Fig. 29 : Série spectrale UV du composé Tb2	54
Fig. 30 : Spectres de RMN ¹³ C du composé Tb2 dans CD3OD	55
Fig. 31 : Spectres de RMN ¹ H du composé Tb2 dans CD3OD	55

Fig. 32 : Spectre HSQC du composé Tb2 dans CD3OD	56
Fig. 33 : Spectre COSY du composé Tb2 dans CD3OD	57
Fig. 34 : Spectre HMBC du composé Tb2 dans CD3OD	57
Fig. 35 : Spectre HMBC du composé Tb2 dans CD3OD	59
Fig. 36 : Série spectrale UV du composé Tb3	61
Fig. 37 : Spectres de RMN ¹ H du composé Tb3 dans CD3OD	62
Fig. 38 : Spectres HMBC du composé Tb3 dans CD3OD.....	63
Fig. 39 : Courbes des pourcentages d'inhibition du radical DPPH'.....	65
Fig. 40 : les CI50 des échantillons testés classées par ordre croissant (DPPH).....	66
Fig. 41 : Photo prises lors du dosage de l'activité antiradicalaire DPPH.....	67
Fig. 42 : Photo prises lors du dosage de l'activité antiradicalaire ABTS.....	68
Fig. 43 : Courbes des pourcentages d'inhibition du radical ABTS*+	69
Fig. 44 : les CI50 des échantillons testés classées par ordre croissant (ABTS).....	69
Fig. 45 : Courbes des pourcentages d'inhibition du radical O ₂ *-	70
Fig. 46 : Photos prises lors du dosage de l'activité Superoxyde DMSO alcalin.....	71
Fig. 47 : les CI50 des échantillons testés classées par ordre croissant (DMSO).....	72
Fig. 48 : Courbes des absorbances en fonction des concentrations (CUPRAC).....	73
Fig. 49 : les A0,5 des échantillons testés classées par ordre croissant (CUPRAC)	73
Fig. 50 : Photos prises lors du dosage de l'activité CUPRAC	74
Fig. 51 : Courbes des absorbances en fonction des concentrations (PR).....	75
Fig. 52 : les A0,5 des échantillons testés classées par ordre croissant (PR)	75
Fig. 53 : Photos prises lors du dosage de l'activité Pouvoir réducteur	76
Fig. 54 : Histogramme de comparaison de la puissance antioxydante.....	77

Liste des tableaux

1^{ère} Partie

Tab. 1 : Distribution géographique des huit taxons des Cistaceae	7
Tab. 2 : Position de la famille dans les systèmes de classification évolutive	8
Tab. 3 : Distribution mondiale et algérienne de quelques espèces du genre <i>Tuberaria</i>	11
Tab. 4 : Applications de <i>Tuberaria lignosa</i> en soins vétérinaires	16
Tab. 5 : Mécanisme d'action de trois activités biologiques de <i>T. lignosa</i>	17

2^{ème} Partie

Tab. 6 : VLC sur C18 de l'extrait éthanolique des parties aériennes de <i>Tuberaria</i>	44
--	----

3^{ème} Partie

Tab. 7 : Données spectrales UV du composé Tb2.....	54
Tab. 8 : Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) du composé Tb2 dans CD ₃ OD.	60
Tab. 9 : Données spectrales UV du composé Tb3.....	62
Tab. 10 : Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) du composé Tb3 dans CD ₃ OD	64

Acronymes, abréviations et symboles

[1], [2] ... : Symboles utilisés pour les composés mentionnés dans la littérature

1D : Monodimensionnelle

2D : Bidimensionnelle

1O₂ : Oxygène singulet

A : Absorbance

A_{0,5} : Concentration à A=0,5

ABTS : 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

AcOEt : Acétate d'éthyle

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP-ribose : Adénosine diphosphate-ribose

AH : Antioxydant donneur d'hydrogène

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

APG : Angiosperm Phylogeny Group

BHA : Butyl-hydroxy-anisole

BHT : Butyl-hydroxy-toluène

CC : Chromatographie sur colonne ouverte

CCM : Chromatographie sur couche mince

CD₃OD : Méthanol deutéré

CHCl₃ : Chloroforme

CJB : Conservatoire et jardin botaniques

COSY : Spectroscopie de Corrélation H-H

CUPRAC : Cupric Reducing Antioxidant Capacity

d : Doublet

dd : Doublet de doublets

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPPH : 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl

e⁻ : Electron

EOR : Espèces oxygénées réactives

t al. : et alii (et autres auteurs)

δ : Déplacement chimique

δ_c : Déplacement chimique du carbone en ppm

δ_H : Déplacement chimique du proton en ppm

g : Gramme

GLc : Glucose

H₂O : Eau

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₃BO₃ : Acide borique

HCT-15 : Human colon adenocarcinoma

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HOCl : Acide hypochlorique

HPLC : High pressure liquid chromatography

HSQC : Heteronuclear Single-Quantum Correlation

HSV-1 : Virus Herpès simplex de type 1

Hz : Hertz

IC₅₀ : Concentration d'inhibition à 50%

INPN : Inventaire national du patrimoine naturel

IPNI : International Plant Names Index

J=Hz : Constante de couplage exprimée en Hertz

LOST : Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutique

m : Multiplet

mg : Milligramme

ml : Millilitre

nm : Nanomètre

µl : Microlitre

MCF-7 : Michigan Cancer Foundation – 7

(Adénocarcinome du sein)

MeOH : Méthanol

NaOAc : Acétate de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

NBT : Nitro bleu tétrazolium

NC : néocuproïne

NCI-H460 : Non-small-cell lung cancer
cell line-H460

NO : Monoxyde d'azote

O₂⁻ : Anion superoxyde

OH[•] : Radical hydroxyle

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONOO⁻ : Ion peroxydinitrite

ppm : parties par million

PR : Pouvoir réducteur

rbcL : Ribulose-1,5-bisphosphate
carboxylase/oxygénase « L »

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RMN ¹H : Résonance Magnétique Nucléaire du
proton

RMN ¹³C : Résonance Magnétique Nucléaire du
carbone

RO : Radical alkoxyde

RO₂ : Radical peroxyde

ROOH : Hydroperoxyde

RP-18 : Reversed phase C₁₈

SOD : Superoxyde dismutase

ssp : Sous espèce

t : Triplet

TMS : Tétraméthylsilane

trnL-trnF : Chloroplast tRNA gene « Leucine »
chloroplast tRNA gene « phenylalanine »

UV : Ultra-violet

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VLC : Chromatographie liquide sous vide

v/v : Volume par Volume

Introduction générale

Les plantes ont toujours été utilisées par les humains pour soulager et guérir de nombreuses maladies (**Ramawat al., 2008**). Selon l’OMS, 80% de la population mondiale utilise les plantes médicinales pour se soigner. La valeur médicinale des plantes est de plus en plus démontrée scientifiquement, ce qui constitue un argument de taille pour leur utilisation en médecine (**Segnou et al., 1992 ; Aighewi et al., 1998**). De nombreux agents pharmaceutiques ont été découverts en criblant des produits naturels à partir de plantes (**Saslis-Lagoudakis et al., 2012**).

De plus, sur les 500 000 espèces végétales recensées, on estime que seules 15% d’entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6% pour leurs activités biologiques (**Verpoorte., 2002**). Déjà environ 170 000 molécules bioactives ont été identifiées à partir de plantes : digitaline, quinine, morphine, colchicine, artémisinine... Pourtant, moins de la moitié des plantes aujourd’hui ont été étudiées pour leurs propriétés thérapeutiques ; ce qui fait des plantes un réservoir de molécules bioactives encore peu exploré (**Akoroda.,1981**).

L’Algérie est caractérisée par sa diversité florale : Méditerranéenne, Saharienne et une flore Paléo Tropicale, estimée à plus de trois milles (3000) espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeable (15%) d’espèces endémiques (**Ozenda., 1977 ; Gaussen et Leroy., 1982**) ; ce qui a donné à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable. Mais plusieurs sont encore méconnues et exploitées de façon artisanale (**Gelfand et al., 1985**).

La recherche de molécules bioactives à partir des plantes peut s’effectuer selon plusieurs stratégies : une approche ethnopharmacologique, chimiotaxonomique, ou encore un criblage systématique des espèces (criblage à haut-débit), ou toute combinaison des précédentes. Le chemin qui mène de la plante à ses constituants purs est très long et nécessite un travail d’équipes pluridisciplinaires (botanistes, chimistes, ethnologues etc...), le travail d’un phytochimiste concerne essentiellement l’isolement, la purification et enfin la détermination structurale du produit isolé (**Berreghioua., 2016**).

Avec de multiples activités biologiques, de nombreuses plantes médicinales ont une activité antioxydante qui attire de plus en plus l’attention de plusieurs équipes de recherche pour son rôle dans la lutte contre plusieurs maladies telles que le cancer, l’athérosclérose, les événements cardiovasculaires et cérébraux, le diabète, l’hypertension et la maladie d’Alzheimer (**Liu et al., 2003, Devasagayam et al., 2004**) grâce à la présence de composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes (**Cabrera, et al., 2006 ; Pinto, 2010**). Ces antioxydants végétaux naturels peuvent donc servir de type de médicaments préventifs. (**Krishnaiah et al., 2011**).

Les plantes de la famille Cistaceae, constituent une ressource végétale qui n'a cessé, depuis des siècles, d'être utilisée par les populations autochtones pour leurs propriétés médicinales, sont très riche en composés polyphénoliques, constitués essentiellement de flavonoïdes de types flavonol, flavanol et flavone. (Laraoui., 2016).

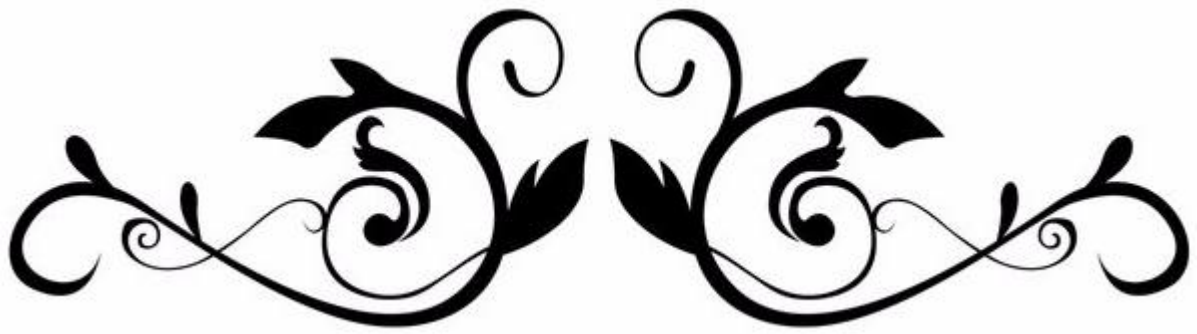
Dans le cadre de la valorisation de la flore du nord algérien, par la recherche de nouveaux composés d'origine végétale à intérêts thérapeutiques, le Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST) a entamé un programme de recherche destiné à l'étude chimique et biologique de cette flore.

L'endémisme et/ou l'utilisation éventuelle en médecine traditionnelle demeurent nos critères principaux de sélection de la plante en vue d'une investigation chimique et biologique.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante de la plante médicinale *Tuberaria* appartenant à la famille des Cistaceae. Cette plante n'a jamais fait l'objet d'étude antérieure offrant ainsi un caractère original à ce travail de recherche.

Notre travail sera présenté comme suit :

- ◆ **La première partie** concerne la recherche bibliographique, réunit en trois chapitres distincts :
 - ✓ **Le 1^{er} chapitre**, consacré aux aspects botaniques et études chimiques antérieures, inclus une présentation de la famille Cistaceae, leurs propriétés biologiques, puis les principaux résultats phytochimiques antérieurs réalisés sur le genre *Tuberaria* ainsi que ses usages en médecine traditionnels.
 - ✓ **Le 2^{ème} chapitre** présentera les composés phénoliques, leur définition, leur classification, leur biosynthèse ainsi que leur intérêt thérapeutique.
 - ✓ **Le 3^{ème} chapitre** s'intéresse au stress oxydant, les différents systèmes antioxydant et une présentation générale de quelques tests de la capacité antioxydante.
- ◆ **La deuxième partie** du manuscrit évoque nos travaux personnels menés en deux volets. D'abord : l'extraction, le fractionnement et la purification des composés isolés ainsi que leur élucidation structurale présentée en détail. Puis, l'évaluation du potentiel antioxydant de la plante du genre *Tuberaria* par la mise au point de cinq différents tests à savoir : DPPH, ABTS, DMSO alcalin, CUPRAC et Pouvoir réducteur.
- ◆ Enfin, L'interprétation et la discussion des résultats personnels obtenus seront exposées dans la troisième partie.



Chapitre I

*Aspect botanique et études
chimiques antérieures*



I.1. Famille des Cistaceae

I .1.1. Généralités

Les Cistaceae constituent une petite famille de plantes dicotylédones halophiles, largement représentée dans les zones arbustives Méditerranéennes (Allen., 2009 ; Arrington et Kubitzki., 2003). Leur nom provient de celui des Cistes (famille des Cistes) donnés à ces plantes par Joseph Pitton de Tournefort du mot grec :« kisthos » signifiant capsule (Achille et al., 1876 ; Baillon, 1872). Elle comprend environ 170 à 200 espèces regroupées en 8 genres (Maarten et al., 2016 ; Bedoya et al., 2009 ; Guzmán et Vargas., 2009 ; Arrington et Kubitzki., 2003 ; Dansereau., 1939 ; Janchen., 1925) : *Cistus*, *Crocanthemum*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum*, *Hudsonia*, *Lechea* et *Tuberaria* [=Xolantha] dont deux principaux, *Helianthemum* et *Cistus*. Certaines de ces plantes sont autochtones, et répandues dans le sud-est de la Péninsule Ibérique, le nord-ouest de l'Afrique, la Grèce et le Portugal (Andrade et al., 2009 ; Teixeira et al., 2007). La plupart des membres de cette famille sont très parfumé et ont une odeur douce faisant de cette flore un élément bien appréciable en industrie des parfums et dans les usages ornementaux. En outre, ces espèces peuvent s'adapter facilement aux incendies, qui détruisent de vastes zones forestières, à cause de la résistance de leurs graines ce qui leur permet d'y repeupler rapidement dans la saison suivante (Ferrandis et al., 1999).

I .1.2. Description botanique de la famille Cistaceae

Les Cistaceae est une famille de plantes plutôt connue pour ses beaux arbustes, recouverts par un tas de fleurs. (Bedoya et al., 2009 ; Quezel et Santa., 1963).

Les espèces de cette famille sont arbustives ou herbacées, pérennes ou annuelles, poilues ou velues, avec un réceptacle en forme de cône surbaissé, portant de bas en haut périlanthe, l'androcée et le gynécée. Elles portent des feuilles (Herrera., 1992 ; Baillon., 1872) souvent opposées, entières, ou ordinairement stipulées ; des fleurs axillaires ou terminales, solitaires, en épis ou arrangées en cymes (inflorescence simple partant du même point) racémiformes ou paniculiformes. Leur calice (enveloppe extérieure de la fleur) est à trois ou cinq divisions très profondes, leur corolle (enveloppe intérieure de la fleur) est à cinq pétales libres très caduques et très délicates, étalées en rose et sessiles, également contournées, mais généralement en sens inverse du calice (Arrington et Kubitzki., 2003 ; Güemes., 1999 ; Raynaud., 1987 ; Brizicky, 1964). Les fleurs sont généralement hermaphrodites = bisexuées (Guzmán et Vargas, 2009 b).

Les étamines sont nombreuses libres et hypogynes, et sont parfois nulles chez *Lechea* et *Hudsonia* (Guzmán et Vargas, 2009 b).

L'ovaire est supère glanduleux, rarement uniloculaire, il est composé de trois (chez *Helianthemum*), cinq (*Cistus*) ou 10 carpelles soudés. Chaque loge renferme deux ou plusieurs ovules orthotropes ; le style est simple à stigmate globuleux ou ramifié (Markova, 1975).

Le fruit est une capsule globuleuse coriace ou ligneuse enveloppée dans un calice persistant offrant une, trois, cinq à douze loges et s'ouvrant en trois comme chez les hélianthèmes, cinq ou dix valves (Fig. 1). Il renferme de nombreuses graines munies d'un albumen poudreux ou cartilagineux, et d'un embryon courbé ou circiné, avec des cotylédons étroits. Leur nombre est de 500 à 1000 graines par capsule (Guzmán et Vargas, 2009 a ; Delgado et al., 2008).

Certaines espèces sont des partenaires symbiotiques avec des espèces de truffes (*Terfez*, Tuber) tandis que d'autres constituent des plantes pionnières importantes dans les endroits perturbés pour la stabilisation des sols (Massicotte et al., 2010).

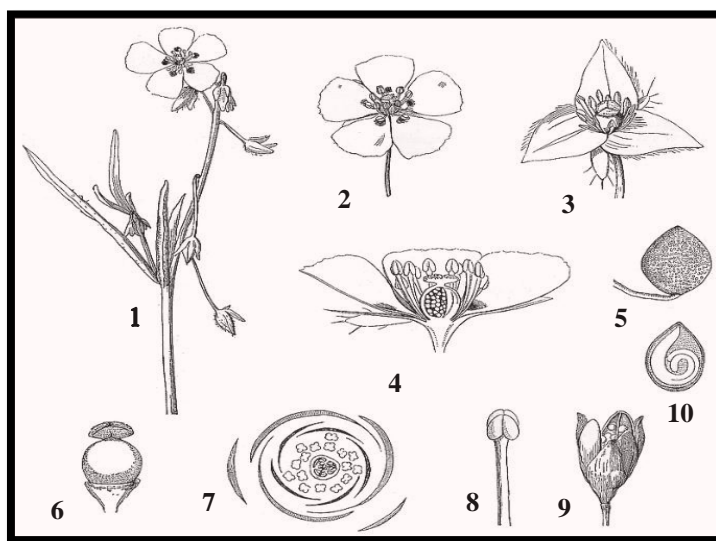


Figure 1 : Représentation schématique des différents organes de plantes Cistaceae (Le Maout et Decaisne., 1873). 1. Partie aérienne (*Tuberaria guttata*). 2-9. [Par ordre] Fleur (2), fleur sans corolle (3), coupe verticale de la fleur (4), graine (5), pistil (6), diagramme florale (7), étamine (8), fruit (9) (*Helianthemum*). 10. Coupe verticale d'une graine (*Cistus ladanum*).

I.1.3. Distribution géographique de la famille Cistaceae

Les Cistacées sont originaires du bassin méditerranéen, d'Asie occidentale, d'Afrique du nord, et secondairement des Amériques (Fig. 2). Ils sont principalement répartis dans les zones tempérées de l'hémisphère nord (Arrington et Kubitzki., 2003) et plus spécifiquement dans l'ouest, dans le tell et le littoral. C'est des plantes qui sont caractéristiques des habitats secs et ensoleillés (Proctor., 1978) où les précipitations sont très variables, les sécheresses sont fréquentes et les incendies sont périodiques (Luna et Chamorro., 2016). Toutes les espèces des genres *Cistus*, *Fumana*, *Halimium* et *Tuberaria* sont distribuées, presque exclusivement dans le bassin méditerranéen (Tab. 1). Presque la moitié des espèces du genre *Helianthemum* sont également trouvées principalement dans la méditerranée (Thanos et al., 1992 ; Quezel et Santa., 1963). Le genre *Cistus* est particulièrement prédominant dans la méditerranée (Talavera et al., 1993). Cet arbuste colonise les zones dégradées et inhibe la croissance d'autres plantes (Dias et Moreira, 2002). Quant aux *Lechea* et *Hudsonia*, elles sont présentes en Amérique du Nord, alors que *Crocyanthemum* est présent aussi bien en Amérique du Nord qu'en Amérique du Sud (tableau 1) (quelques espèces d'*Helianthemum* subg. *Lecheoides* en Chili, Brésil du sud, Uruguay et Argentine) (Brizicky., 1964 ; Civeyrel et al., 2011).

Les plantes de cette famille s'adaptent bien à la sécheresse estivale (Martin-Bolños et Guinea., 1949). Ensemble avec les Lamiaceae et les Fabaceae (tribu Genisteae), les Cistaceae sont des constituants majeurs et typiques des fourrés sclérophylles qui couvrent de vastes zones dans la péninsule ibérique et dans d'autres pays méditerranéens. Elle caractérise souvent la végétation qui se développe après perturbation (généralement par le feu) de forêts sclérophylles sempervirentes (Rivas-Martinez., 1979).

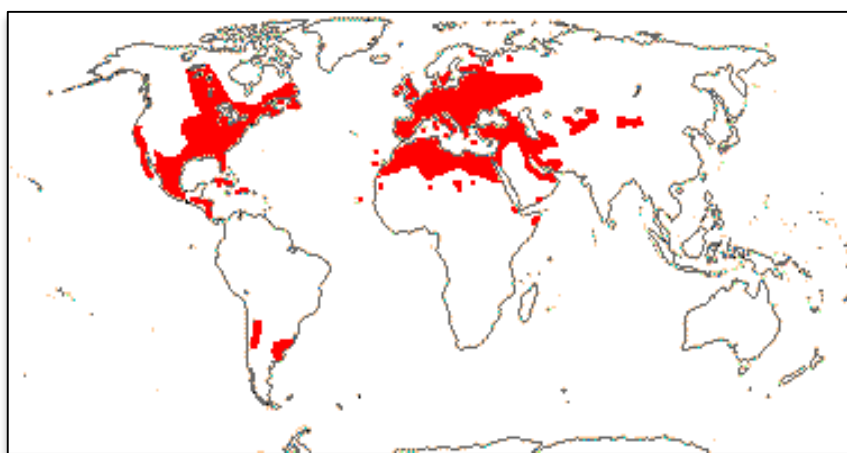


Figure 2 : Distribution géographique des Cistaceae dans le monde (Rivas-Martinez., 1979)

Tableau 1 : Distribution géographique des huit taxons des Cistaceae

Taxon	Nombre d'espèces	Localisation	Références
<i>Helianthemum</i>	~ 110	Europe centrale et méridionale, Russie, Asie centrale, Afrique du Nord (Algérie, Maroc, Tunisie, Lybie, ...), Amérique	(Guzmán et Vargas., 2009 b), (Stevanović et al., 2009), (Sánchez-Gómez et al., 2011), (Quezel et Santa., 1963)
<i>Cistus</i>	~ 21	Régions méditerranéennes, Afrique du Nord.	(Guzmán et Vargas., 2009 b), (Ellul et al., 2002), (Guzmán et Vargas., 2005), (Kamari et al., 2009)
<i>Crocyanthemum</i>	~ 20	Côtes atlantiques d'Amérique (Californie et Mexique).	(Guzmán et Vargas., 2009 b), (Civeyrel et al., 2011)
<i>Lechea</i>	~ 17	Amérique du Nord	(Guzmán et Vargas., 2009 b), (Civeyrel et al., 2011)
<i>Tuberaria</i> [= <i>Xolantha</i>]	~ 12	Régions méditerranéennes occidentales et méridionales du Nord	(Guzmán et Vargas., 2009 b), (Gallego M.J., Aparicio A., 1993), (Castro et al., 2007), (Herrera., 2004)
<i>Fumana</i>	~ 9	Europe méridionale, régions méditerranéennes	(Quezel et Santa., 1963), (Güemes., 1999), (Toth et Révay., 2011)
<i>Halimium</i>	~ 8	Europe méridionale, Afrique du Nord, région méditerranéenne occidentale.	(Guzmán et Vargas., 2009 b), (Zunzunegui et al., 1999), (Zaiter et al., 2010)
<i>Hudsonia</i>	~ 2	Amérique du Nord.	(Guzmán et Vargas., 2009 b), (Civeyrel et al., 2011), (Massicotte et al., 2010)

I .1.4. Classification

I .1.4.1. Classifications anciennes

La famille des Cistaceae a souvent été considérée comme voisine des Violaaceae. De nombreux reclassements ont été réalisés (Tab. 2). D'abord, elle a été incluse dans l'ordre des Bixales puis dans celui des Cistales, en passant par les Violaes et les Malvales, suite à des modifications basées sur des critères morphologiques et anatomiques qui se sont avérés complexes. (Guzmán et Vargas., 2009 b ; Allen et Hiscock, 2008).

Tableau 2 : Position de la famille dans les systèmes de classification évolutive

	Takhtajan (1987)	Cronquist (1988)	Dahlgren (1989)	Thorne (1992)	Takhtajan (1997)
Classe	Magnoliopsida	Magnoliopsida (Dicotylédones)	Magnoliopsida		Magnoliopsida
Sous-Classe	Dilleniidae	Dilleniidae	Magnoliidae	Dicotyledoneae (Annonidae)	Dilleniidae
Super-Ordre	Malvanae		Malvanae	Violanae	Malvanae
Ordre	Bixales	Violales	Malvales	Violales	Cistales
Sous-Ordre				Cistineae	
Famille	Cistaceae				

En 2001, Guignard a positionné les Cistaceae selon cette hiérarchie :

Embranchement	: Spermaphytes
Sous-embranchement	: Angiospermes
Classe	: Eudicots ou Eudicotylédones
Sous-classe	: Rosidées (Eurosidées II)
Ordre	: Malvales
Famille	: Cistaceae

I.1.4.2. Classification actuelle

L'analyse des liens évolutifs des angiospermes (APGIV : James et al.,2016) a confirmé l'inclusion des Cistaceae dans l'ordre des Malvales, en formant un Clade avec deux autres familles (Dipterocarpaceae et Sarcolaenaceae). Ainsi, l'étude de Guzmán et Vargas (2009 b), effectuée sur 47 espèces représentant divers groupes de Cistaceae et en s'appuyant sur des séquences codantes (rbcL) et espaceur (trnL-trnF) de leurs ADN plastidiques et de leurs synapomorphies morphologiques, a pu confirmer la monophylie de cette famille (Fig. 3). Ils ont regroupé les huit taxons de cette famille dans cinq lignées majeurs :

- Clade de base du genre *Fumana*
- Clade du Nouveau Monde de *Lechea*
- Clade s.I. de *Helianthemum* composé de deux groupes apparentés *Crocantemum* et *Hudsonia* du Nouveau Monde, et *Helianthemum* s.s de l'Ancien Monde.
- Clade de *Tuberaria*
- Un complexe soudé d'espèces de *Cistus* et *Halimium*.

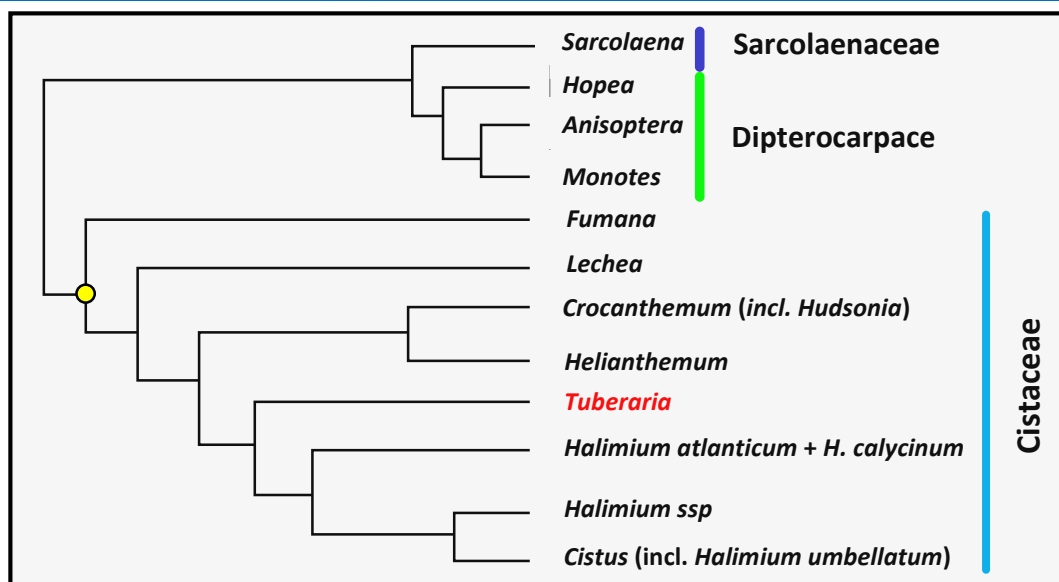


Figure 3 : Cladogramme simplifié basé sur les séquences *rbclL* et *trnL-trnF* plastidique. La taxonomie suit Demoly and Montserrat (1993) pour *Cistus*, Nogueira et al. (1993) pour *Halimium*, Willkomm (1856) pour *Tuberaria*, López (1993) et Grosser (1903) pour *Helianthemum*, Arrington et Kubitzki (2003) et Calderón de Rzedowski (1992) pour *Crocanthemum*, Güemes and Molero (1993) pour *Fumana*.

I.1.5. Etudes chimiques et biologiques antérieures

La recherche bibliographique exhaustive réalisée sur les espèces de la famille Cistaceae, montre qu'elles ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques. Celles-ci ont permis d'isoler et identifier un grand nombre de métabolites secondaires. Les substances dominantes sont les terpènes et phénols, plus précisément les dérivés diterpéniques (Kalpoutzakis et al., 2003 ; Angelopoulou et al., 2002 ; Robles et Garzino., 2000) et flavonoïdiques (Barros et al., 2013 ; Lorente et al., 1992 ; Proksch et Gulz., 1984). Néanmoins, seulement deux genres (*Cistus* et *Halimium*) sont les biens exploités sur le plan phytochimique (Ben Abdelaziz., 2015). D'autre part, les dérivés de flavonol et des ellagitannins ont été retrouvé antérieurement dans quelques genres de la famille des Cistaceae tels que : *Cistus* et *Tuberaria* (Bedoya et al., 2010 ; Santagati et al., 2008 ; Sarracini et al., 2005 ; Enomoto et al., 2004).

Les Cistaceae possèdent des activités biologiques intéressantes, entre autres, l'activité antioxydante, antimicrobienne, antiproliférative, antivirale, anti-inflammatoire, antinociceptive, ainsi que des propriétés vasodilatatrices et inhibitrice du transport du calcium dans les muscles squelettiques (Benjemia et al., 2013 ; Catalan et al., 2010 ; Bedoya et al., 2009 ; Andrade et al., 2009 ; Kupeli et Yesilada., 2007 ; Ehrhardt et al., 2007 ; Droebner et al., 2007 ; Barbosa et al., 2006 ; Sosa et al., 2004 ; Calzada et al., 1998 ; Abad et al., 1997 ; Meckes et al., 1997 ; Somoza et al., 1996), ... etc.

I.2. Présentation du genre *Tuberaria*

Le genre *Tuberaria* (Dunal) Spach (connu également sous le nom de *Xolantha* Raf., Cistaceae) comprend des plantes vivaces à cycle court et des plantes annuelles, avec une distribution méditerranéenne. Il est originaire d'Europe de l'ouest et du sud. **Gallego (1993)** a reconnu neuf espèces dans la péninsule ibérique, dont *Tuberaria guttata* (L.) Fourr. est la plus répandue. (**Trindade et al., 2012 ; López., 2001 ; Muñoz et Navarro., 1993**). Ce genre habite des sites secs, caillouteux et souvent proche de la mer (**Bedoya et al., 2009**).

I.2.1. Description botanique du genre *Tuberaria* (Dunal) Spach

Le genre *Tuberaria* forme un groupe d'environ 12 espèces, qui se caractérisent par un calice à 5 sépales persistants dont les deux extérieurs (épicalice) sont souvent plus petits que les intérieurs et sans nervures proéminentes. Leurs Pétales, de couleur jaune, sont au nombre de 5 (très rarement absents), entiers ou irrégulièrement dentelés. Les étamines sont généralement nombreuses et bien érigées, inégales et fertiles. Alors que les anthères ont une forme allongée, globuleuse ou apiculée. L'ovaire est constitué de 3 loges incomplètes avec un style redressé, court ou presque nul. Les feuilles basilaires de ce genre sont opposées, parfois lignifiées, en rosette, non stipulées, fréquemment tri-nerviées ou quintupli-nerviées et parfois marcescentes ou caduques à l'anthèse. Les fleurs sont chasmogames, parfois réduites et cleistogames (Fig. 4). Elles ont des funicules incurvés, robustes et gonflés au centre. Les capsules sont plus courtes que le calice, ovoïde, déhiscente en 3 coquilles. Les semences sont ovoïdes, brunes, généralement avec des papilles blanchâtres disposées en rangées ; l'embryon, en général sous-périphérique, doublé par l'hypocotyle ; les cotylédons sont à peine courbés à genouillés (**Castroviejo et al., 2005 ; Arrington et Kubitzki., 2003 ; Quezel et santa., 1963**).

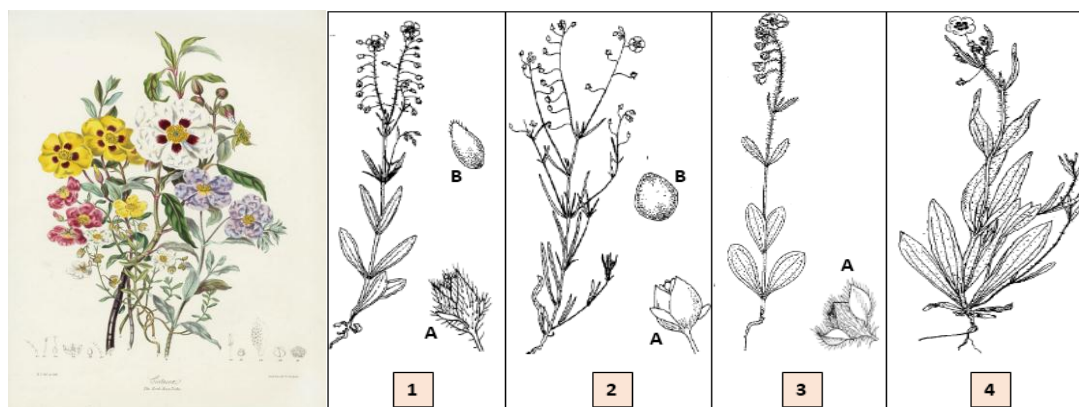


Figure 4 : Diversité morphologique au sein du genre *Tuberaria* (**Gallego et Aparicio, 1993**)
1-*T. inconspicua* (A- Fleur, B- Capsule) ; **2-***T. commutata* (A- Fleur, B- Capsule) ; **3-***T. macrosepala* (A-Fleur) ; **4-***T. guttata*

I.2.2. Répartition géographique du genre *Tuberaria*

Le genre *Tuberaria* est réparti en Europe occidentale et méridionale du Nord, principalement dans les régions méditerranéennes (Fig. 5). Dans le sud-ouest de l'Espagne, le genre est représenté par *T. lignosa* et six taxons annuels de la sect. Scorpioides : *T. inconspicua* et *T. guttata*, qui sont distribués dans tout le bassin méditerranéen et avec la dernière extension dans la Macaronésie et la Grande-Bretagne, tandis que les quatre autres espèces, *T. commutata*, *T. brevipes*, *T. macrosepala* et *T. echioides* sont endémiques au centre-ouest et sud de la péninsule ibérique et l'Afrique du Nord (Tab. 3). (Guzmán et Vargas., 2009 b ; Castro et al., 2007 ; Herrera., 2004 ; Gallego et Aparicio., 1993).

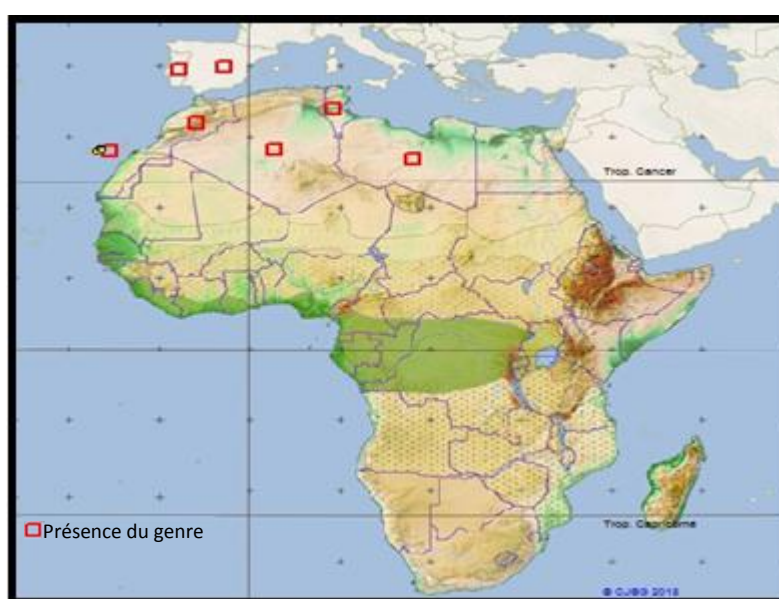


Figure 5 : Carte géographique de la répartition continentale du genre *Tuberaria* (Dunal) Spach (Base de données des plantes d'Afrique CJB)

Tableau 3 : Distribution mondiale et algérienne de quelques espèces du genre *Tuberaria*

Espèce	Localisation	Références
<i>T. commutata</i>	Espagne, Portugal	IPNI, CJB
<i>T. guttata</i>	Algérie : <i>Tlemcen</i>	(Medjahdi, B., 2010), (Sekkat, F.Z., 2006), (Letreuch-belarouci, A et al., 2009).
	<i>El-Tarf</i>	(Dafri et Beddiar., 2017), (Boutabia et al., 2011)
	Espagne France	(Lacaze, B., Joffre, R., 1987). (Guittet et Paul., 1975), (Souèges., 1937), (Georges et al., 2014), (Buchet et al., 2015)
	Maroc	(Valdés, B., 2013)

<i>T. guttata</i>	Suisse, Palestine, Bulgarie, Pays-Bas, Grande-Bretagne, Italie	(Gallego et Aparicio, 1993)
<i>T. glomerata</i>	Algérie	INPI
<i>T. lignosa</i>	Algérie : Péninsule d'Edough France Péninsule Ibérique (O) Maroc Canaries Espagne	(Hamel et al., 2013) (Hebrard et Triat, H., 1971) (Carvalho, 2010 ; Castroviejo et al, 2005) (Valdés., 2013) (Fennane., 2018) (Martín-Aragón et al., 1994)
<i>T. macrosepala</i>	Algérie, Tunisie Maroc Péninsule Ibérique (SO) Espagne	(Fennane., 2018) (Valdés, B., 2013) (Chaneze et al, 2010) (Gallego., 1993)
<i>T. major</i>	Portugal (endémique de Algarve)	(Osório et al., 2013), (Trindade et al., 2012)
<i>Tuberaria inconspicua</i>	Algérie Tell	(Quezel et Santa., 1963)
<i>Tuberaria echioides</i>	Algérie, Maroc, Espagne	CJB

I.2.3. Les espèces du genre *Tuberaria*

D'après **Quezel et Santa (1963)**, en Algérie, le genre *Tuberaria* compte une douzaine d'espèces qui sont :

- 1) *T. vulgaris* Willk.
- 2) *T. guttata* (L.) Fourreau .
- 3) *T. echioides* (Lamk.) Willk.
- 4) ssp. *inconspicua* (Thib.) Comb. nov.
- 5) ssp. *lipopetalum* (Murb.) Comb. nov.
- 6) ssp. *villosissima* (Pomel) Comb. nov.
- 7) ssp. *variabilis* (Willk.) R. Lit.
- 8) ssp. *bupleurifolia* (Lamk.) Comb.nov.
- 9) ssp. *acuminata* (Viv.) Comb. nov.
- 10) ssp. *macrosepala* (Dunal) Comb.nov.
- 11) ssp. *praecox* (Salzm.) Comb. nov.
- 12) ssp. *discolor* (Pomel) Comb. nov.

I.2.4. Classification systématique

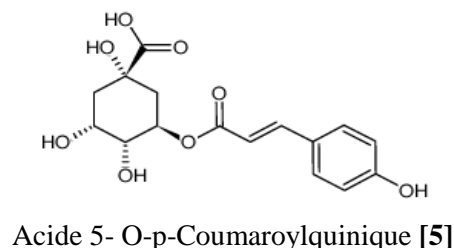
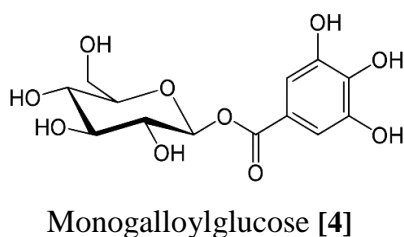
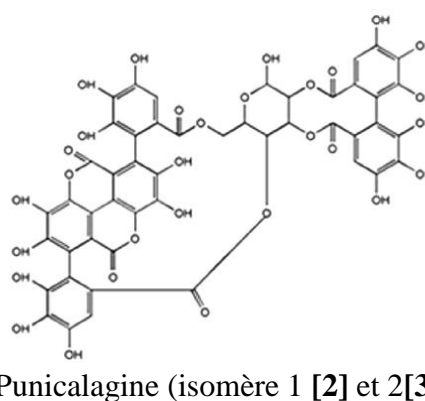
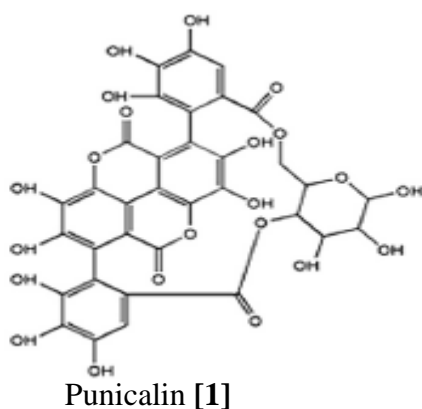
Selon la classification de l'APGIII (**James et Mark., 2011 ; Birgitta et al., 2009**) et l'inventaire national du patrimoine naturel (INPN), construite à la base de deux gènes chloroplastiques et un gène nucléaire de ribosome, le taxon *Tuberaria* (Dunal) Spach est classé de la manière suivante :

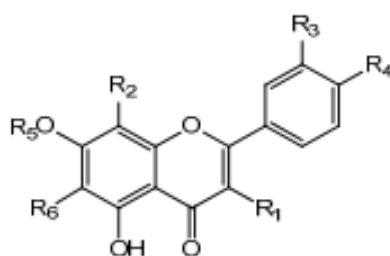
Domaine	Biota
Règne	Plantae Haeckel, 1866
Sous-Règne	Viridaeplantae
Infra-Règne	Streptophyta John, Williamson & Guiry, 2011
Classe	Equisetopsida C. Agardh, 1825
Cladus	Tracheophyta Sinnott es Cavalier-Smith, 1998
Cladus	Spermatophyta
Sous-Classe	Magnoliidae Novák ex Takht., 1967
Super-Ordre	Rosanae Takht., 1967
Ordre	Malvales Juss. Ex Bercht. & J. Presl, 1820
Famille	Cistaceae Juss., 1789
Genre	<i>Tuberaria</i> (Dunal) Spach, 1836

I.2.5. Etudes chimiques antérieures du genre *Tuberaria* :

Les études phytochimiques sur le genre *Tuberaria* restent encore limitées ciblant exclusivement l'espèce *Tuberaria lignosa*.

L'investigation phytochimique de la plante *T. lignosa* (Pinela et al., 2015 ; 2012) a conduit à l'isolement et à la caractérisation de 18 composés phénoliques :





[6] *Apigenine-6- C-glucoside (Isovitexine)*

[7] *Apigenine-8- C-glucoside (Vitexine)*

[8] *Apigenin-6-C-glucose-8-C-glucose*

[9] *Luteoline-6- C-glucoside*

[10] *Luteoline-8- C-glucoside (Orientine)*

[11] *Luteoline-6- C-glucose-8- C-glucose*

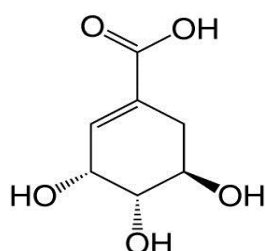
[12] *Kaempferol-3- O-rutinoside*

[13] *Quercétine-3- O-rutinoside (Rutine)*

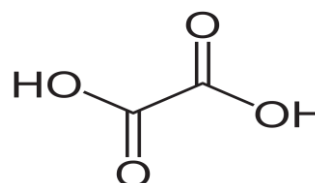
<i>R</i> ₁	<i>R</i> ₂	<i>R</i> ₃	<i>R</i> ₄	<i>R</i> ₅	<i>R</i> ₆
H	H	H	OH	H	Glc
H	Glc	H	OH	H	H
H	Glc	H	OH	H	Glc
H	H	OH	OH	H	Glc
H	Glc	OH	OH	H	H
H	Glc	OH	OH	H	Glc
O-Rut	H	H	OH	H	H
O-Rut	H	OH	OH	H	H

Punicalagine gallate isomère 1 [14] et 2 [15], Kaempferol-O-rhamnoside-O-rutinoside [16], Kaempferol-p-coumaroylglucoside-glutarate [17], Kaempferol-p-coumaroylglucoside [18].

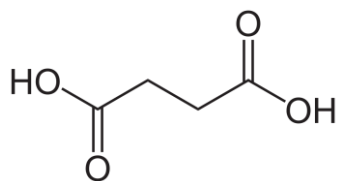
Les résultats récents de **Pinela et al (2017)** issus d'une étude effectuée sur la même espèce et qui avait pour objectif de quantifier les acides organiques et les composés phénoliques ont noté la présence des acides organiques suivants : acide shikimique [19] en étant le plus abondant, l'acide oxalique [20], l'acide succinique [21] et l'acide quinique [22]. Par ailleurs, les dérivés des ellagitannins (punicalin [1], les isomères de punicalagine [2] [3] et de punicalagine gallate [14] [15]) ont représenté approximativement 90% de la fraction phénolique totale dont le punicalagine (isomère 2) [3] était la molécule la plus abondante.



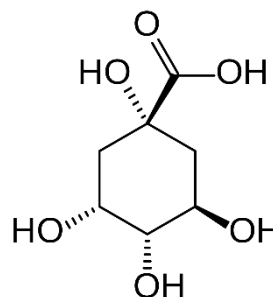
Acide shikimique [19]



Acide oxalique [20]



Acide succinique [21]



Acide quinique [22]

I.2.6. *Tuberaria* en médecine traditionnelle

I.2.6.1. En médecine vétérinaire :

Les espèces de *Tuberaria* sont utilisées comme des plantes alimentaires pour nourrir les larves de certaines espèces de lépidoptères (**Bedoya et al., 2009**).

De plus, *Tuberaria lignosa* [= *Xolantha tuberaria*] a été utilisé par la population portugaise dans le but de soigner les animaux. Une enquête éthnovétérinaire, menée en 2011 jusqu'au début de 2012 dans le sud du Portugal, plus précisément au sein d'une région nommée Alentejo, a révélé que ce taxon fut parmi les plantes médicinales citées pour le traitement des traumatismes et des affections du tractus gastro-intestinales chez les équidés (cheval, âne et mule).

En effet, ce genre a sa place dans les applications équines pour le traitement des blessures et entorses, en particulier dans les sous-régions centrales et le littoral de Alentejo (**Farinha et al., 2012**). Cette propriété médicinale a été principalement attribuée à la présence de l'anéthol (ou paraméthoxyphénylpropène), un phénylpropène très documenté pour ces usages pharmacologique en tant que : antibiotiques et antifongique (**Kubo et Fujita., 2001**). Les informateurs de cette investigation ont cité l'usage des parties aériennes de *Tuberaria lignosa* pour les soins des chevaux et autres bétail. En fin, le tableau (4) fait relief aux quelques travaux de recherche menés dans la zone ibérique, et qui ont montré l'intérêt de *Tuberaria lignosa* pour le soin des traumatismes équines, y compris l'enquête évoquée plus haut.

Tableau 4 : Applications de *Tuberaria lignosa* (partie aérienne) en soins vétérinaires

Auteur de l'étude	(Farinha et al., 20012)	(Pieroni et al., 2006)	(Carvalho.,2005)	(Camejo-Rodrigues., 2006)
Région	Alentejo, sud du Portugal	Espagne	Nord du Portugal	Sud du Portugal
Application médicinale	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Blessures ➤ entorses 	<p>(Décoction)</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Blessures : chevaux, ruminants et chiens 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Prévention des infections ➤ Blessures ➤ Piqures d'insectes ➤ Soins des yeux et des pis ➤ Sabot 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Blessures ➤ gonflement

I.2.6.2. En médecine humaine :

En médecine populaire traditionnelle, les différentes parties de la plante *Tuberaria lignosa* (Sweet) Sampaio (racines et parties aériennes) sont utilisées pour traiter diverses maladies et affections, comme les troubles gastro-intestinaux, les brûlures d'estomac, les plaies, la grippe, des infections de la peau et les verrues, grâce à leurs propriétés vulnérable, antiseptique, cicatrisante, anti-inflammatoire et anti-infectieuse (Carvalho., 2010 ; Bedoya et al., 2010 ; Novais et al., 2004 ; Martín-Aragón et al., 1994).

I.2.7. Activités biologiques

Le genre *Tuberaria* a fait l'objet d'un nombre restreint d'études biologiques pour déterminer les différentes activités pharmacologiques susceptibles d'être exploitées dans le domaine de la thérapeutique. Elles concernent principalement : l'activité antivirale (anti-VIH), antioxydante, antibactérienne, antitumorale (antiapoptotique), anti-inflammatoire et antiulcérogène (Tab. 5) ...etc. (Pereira et al., 2016 ; Pinela et al., 2015 ; Bedoya et al., 2010 ; 2001 ; Abad et al., 1997 ; Martín-Aragón et al., 1994).

Les études qui ont signalés une activité antimicrobiale chez *Tuberaria* restent encore restreintes, et elles concernent principalement l'espèce *Tuberaria lignosa* (Bedoya et al., 2009). Certains rapports issus des programmes de dépistage mondiale pour les antiviraux végétaux, lancé par divers groupes de recherche, ont signalé que l'extrait éthanolique (parties aériennes) et aqueux de l'espèce *T. lignosa* inhibent la réplication du HSV-1 et VIH, respectivement (Bedoya et al., 2001 ; Abad et al., 1997). Bien que l'extrait aqueux à activité anti-VIH n'a pas encore été

analysé du point de vue chimique, les composants actifs semblent être principalement des substances polaires solubles dans l'eau (**Bedoya et al., 2009**).

L'activité anti-inflammatoire des extraits organiques de *T. lignosa* a été examinée dans une étude antérieure en utilisant le test de l'œdème de la patte de rat de carraghénine (**Alvarez., 1990**).

Tableau 5 : Mécanisme d'action de trois activités biologiques de *T. lignosa*

Activité	Mécanisme d'action	Réf
Anti-HIV	Induction d'une régulation à la baisse de l'expression de CD4 (récepteur principale du VIH) par les ellagitannins.	Bedoya et al., 2010
Antitumorale	L'infusion et la décoction de <i>T. lignosa</i> provoque une diminution de la croissance de trois lignées cellulaires tumorales humaines : MCF-7, NCI-H460 et HCT-15 due à l'altération du profil du cycle cellulaire (augmentation du nombre des cellules en phase G0/G1 et diminution des cellules en phase S) et l'induction de la voie apoptotique intrinsèque (diminution du niveau de poly (ADP-ribose) polymérase total et à l'activation de procaspase-3.	(Pereira et al., 2016)
antiulcérogène	Suggère un effet anti-sécrétoire plutôt qu'un mécanisme cytoprotecteur produit par l'infusion de l'extrait lyophilisé de <i>T. lignosa</i>	Martín-Aragón et al., 1994

I.2.8. Intérêt écologique

Les truffes du désert sont connues pour former des associations mycorhiziennes avec *Tuberaria* (Dunal) Spach en régions semi-arides et arides du bassin méditerranéen, de l'Afrique du Nord et du Moyen-Orient (Fig. 6). Il s'agit notamment des genres *Terfezia*, *Tirmania*, *Picoa* et *Delastria* (**Kovács et Trappe., 2014 ; Loizides et al., 2012 ; Trappe et al., 2008 ; Montecchi et Sarasini., 2000 ; Trappe., 1979**). Malgré l'allusion faite par le nom générique du genre *Tuberaria*, Javier **Herrera (2004)** avait cité qu'aucune structure fongique n'avait été associée aux racine de l'espèce *Tuberaria guttata* (L.) Fourr., 1868. Mais des études actuelles (**Michael., 2016**), notamment celle menée au nord-est de l'Algérie (**Dafri et Beddiar., 2017**), ont prouvé une association ectomycorhizienne avec le genre *Tuberaria*, en particulier les sous-espèces de *Tuberaria guttata*. En effet, les truffes qui ont été examinés par Dafri et Beddiar (*Terfezia*

arenaria (Moris) Trappe) vivent dans un sol sablo-limoneux acide qui se caractérise par une forte distribution de *Tuberaria guttata*, où elle est nommée E'zahoo, et dans d'autre région du pays : Qessis E'terfess, Oom E'terfess (Quezel et santa., 1963), E'rgeeg.....etc.

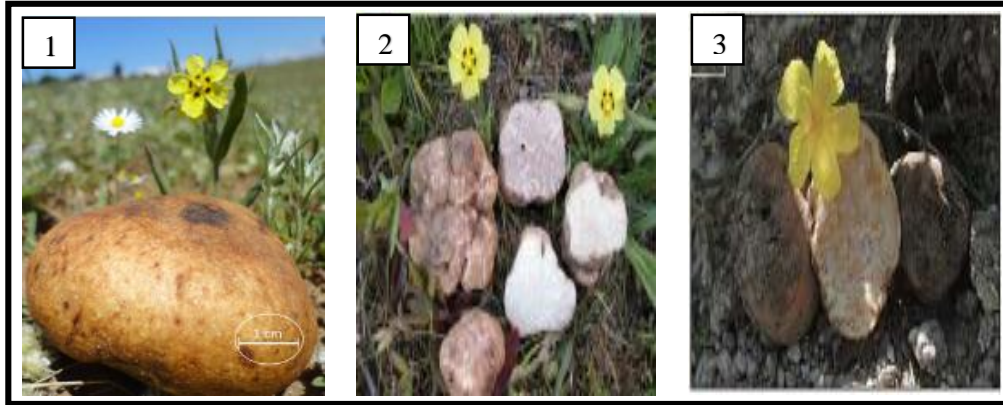
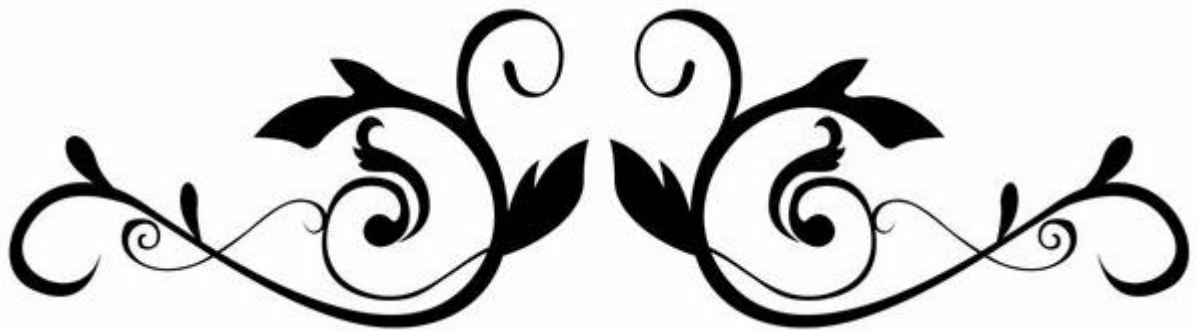


Figure 6 : Association symbiotique entre *Tuberaria* et les truffes : **1-** *Terfezia arenaria* (Dafri et Beddiar., 2017). **2-** *Terfezia gennadii* (Bellahouel., 2012). **3-** *Terfezia claveryi* (Michael., 2016)



Chapitre II

Composés phénoliques



II.1. Généralités sur les polyphénols

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement (**Bruneton., 1993**). A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolés et identifiés. Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH). Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 (**Harbone., 1993**).

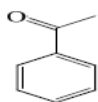
Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. Les fruits et légumes contribuent environ pour moitié à notre apport en polyphénols, les boissons telles que jus de fruits et surtout café, thé apportant le reste (**Middleton et al., 2000**).

II. 2. Biogénèse des polyphénols

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagnèse (**Bruneton., 2009**) :

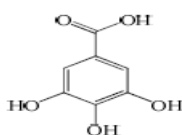
- **Voie shikimate** : La voie la plus courante est celle via le shikimate (l'acide shikimique). Elle transforme les oses aux aminoacides aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs dérivés : acétophénones, acides phénols, coumarines, lignanes, lignines etc. (**Ellis., 2009 ; Roberts., 1996**).

Acétophénone



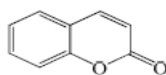
Phényléthanone

Acide phénol



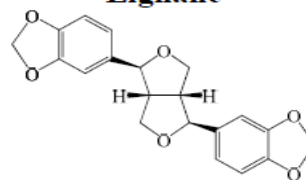
Acide gallique

Coumarine



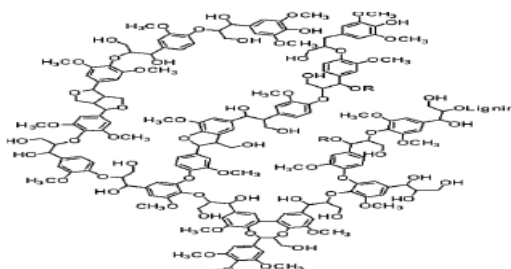
Coumarine

Lignane

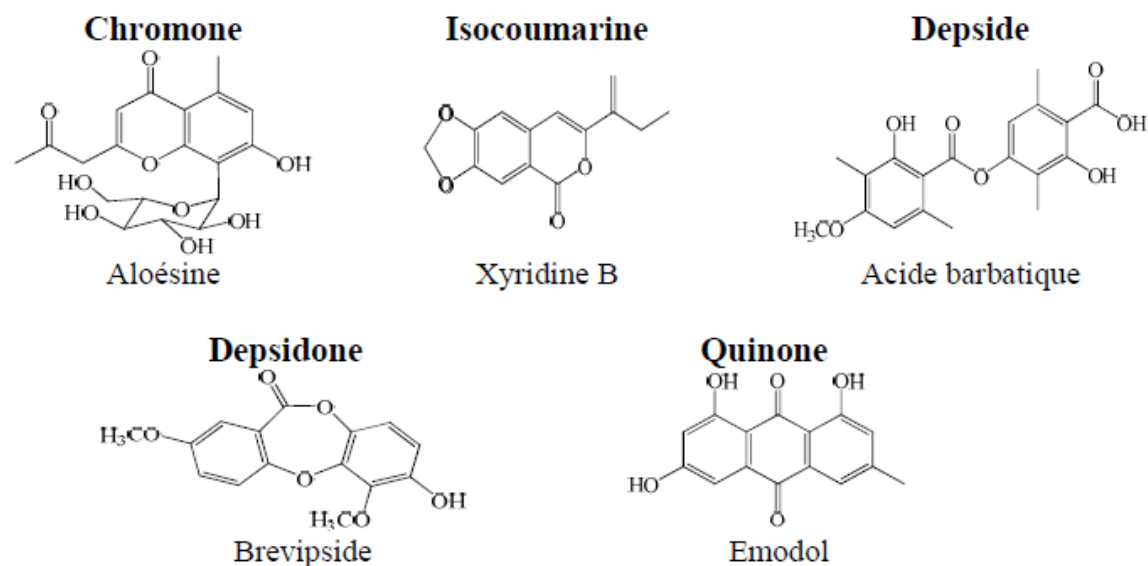


(+)-Sesamine

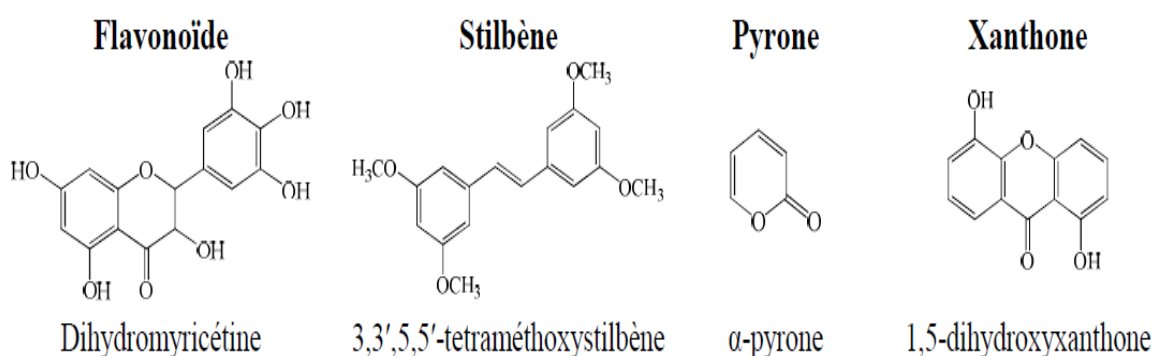
Lignine



- **Voie acétate** : conduit à des poly- β -cétatesters de longueurs variables (polyacétates) qui engendrent par cyclisation (réaction de Claisen ou condensation aldolique), des composés souvent polycycliques : chromones, isocoumarines, depsides, depsidones, quinones.... etc. (Javillier., 1969 ; Paech., 1963).



La pluralité structurale des composés phénoliques est due à cette double origine biosynthétique, et encore accrue par la possibilité très fréquente d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composés d'origine mixte : flavonoïdes, stilbènes, pyrones, xanthones... etc. (Hemingway., 1992 ; Geissamn., 1972).



II. 3. Principaux groupes des polyphénols

La structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux sont les caractères dominants de la classification des polyphénols dont on peut distinguer les principaux groupes suivants (Ross., 2014) :

II. 3.1. Phénols simples et les acides phénoliques

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïques et cinnamiques (Fig. 7).

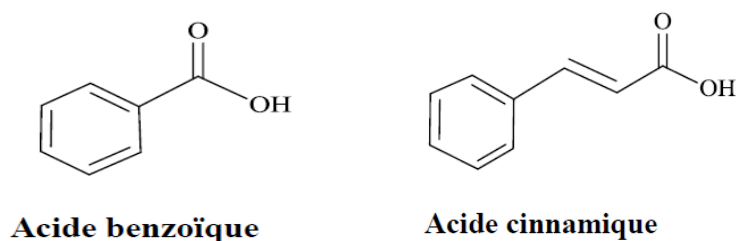


Figure 7 : Structures de l'acide benzoïque et acide cinnamique

II. 3. 1. 1. Phénols simples

Les phénols simples tels que le catéchol, guaiacol, phloroglucinol... (Fig. 8) sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae...). Les deux phénols hydroxylés, le catéchol avec deux groupes OH et le pyrogallol avec trois, ont été montré pour sa toxicité vis-à-vis des microorganismes (Cowan., 1999).

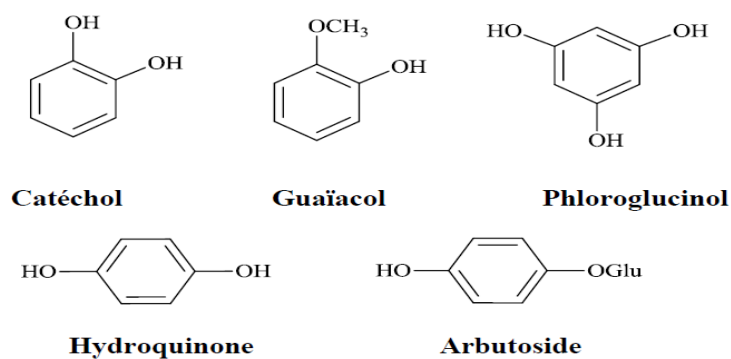
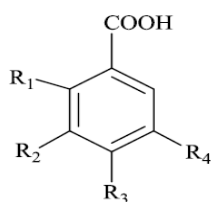


Figure 8 : Squelettes chimiques de quelques phénols simples

II. 3. 1. 2. Acides phénoliques

II. 3. 1. 2. 1. Acide phénols dérivés de l'acide benzoïque

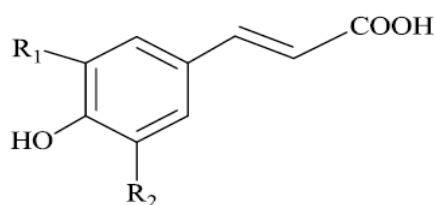
Les acides phénoliques en C₆-C₁, dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside (Bruneton., 1993). Ces composés sont issus de la dégradation de la chaîne latérale des composés cinnamiques.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Acide <i>p</i> -hydroxy benzoïque	H	H	OH	H
Acide protocatéchique	H	OH	OH	H
Acide vanillique	H	OH	OH	OCH ₃
Acide gallique	H	OH	OH	OH
Acide syringique	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Acide salicylique	OH	H	H	H
Acide gentisique	OH	H	H	OH

II. 3. 1. 2. 2. Acide phénols dérivés de l'acide cinnamique

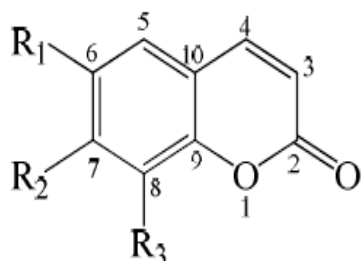
Les acides hydroxycinnamiques sont principalement composés des acides *p*-coumarique, caféique, férulique et sinapique (Beta et al., 2005). On les trouve à l'état libre ou combiné (esters, amide, glucosides).



	R ₁	R ₂
Acide <i>p</i> -coumarique	H	H
Acide caféique	H	OH
Acide férulique	H	OCH ₃
Acide sinapique	OCH ₃	OCH ₃

II. 3. 2. Coumarines

Les coumarines sont aussi les dérivés de C₆-C₃, appartiennent au groupe des composés 2*H*-1-benzopyran-2-ones que l'on peut considérer initialement comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-*Z*-cinnamiques-pyrone. Plus d'un millier de coumarines ont été décrites et les plus simples d'entre elles sont largement distribuées dans le règne végétal. Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin (Cowan., 1999).



	R ₁	R ₂	R ₃
Ombelliférone	H	OH	H
Esculétol	OH	OH	H
Scopolétol	OCH ₃	OH	H
Herniarine	H	OCH ₃	H
Fraxétol	OCH ₃	OH	OH
Esculine	O-Glu	OH	H
Cichorine	OH	O-Glu	H
Fraxoside	OCH ₃	O-Glu	OH

II. 3. 3. Lignanes

Ce sont des composés dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbones β des chaînes latérales (liaison 8-8') de deux unités dérivant de 1-phénylpropane (Fig. 9). Leur distribution botanique est large, plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante-dix familles (Ayres et Loike., 1990).

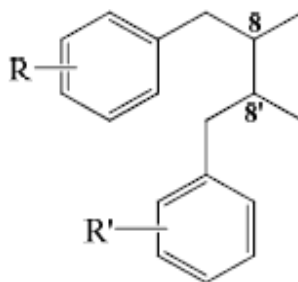


Figure 9 : Structure générale des lignanes

II. 3. 4. Stilbènes

Les membres de cette famille possèdent la structure C₆-C₂-C₆ comme les flavonoïdes (deux noyaux benzéniques séparés par un pont éthane ou éthène où il peut y avoir deux formes *cis* et *trans*) (Fig. 10), ce sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux. Les sources principales des stilbènes sont les raisins, les vins, le soja et les arachides (Crozier et al., 2006).

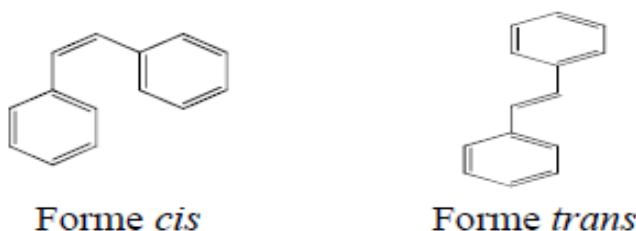


Figure 10 : Structure générale des stilbènes

II. 3. 5. Flavonoïdes

Le terme « flavonoïde » désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. La classe des flavonoïdes est l'une des plus abondantes, et à ce jour, plus de 6500 structures naturelles ont été isolées et caractérisées, répartie en 12 squelettes de base. Ce groupe de composés est défini par une structure générale en C₁₅ caractérisée par un enchaînement C₆-C₃-C₆ (1,3-diphénylpropane) ; les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C (Bruneton., 1999). (Fig. 11).

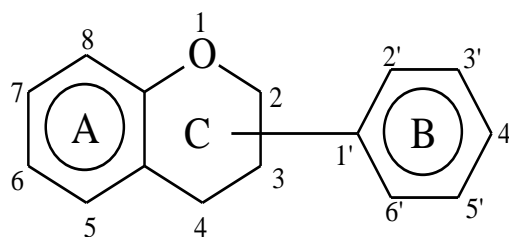


Figure 11 : Structure de base des flavonoïdes

C'est chez les Angiospermes que la diversité structurale des flavonoïdes est maximale. Ils sont de façon très générale localisés dans les feuilles (dans l'épiderme ou entre l'épiderme et le mésophylle), dans les fleurs (cellules épidermiques) ou encore dans les fruits (tégument externe) (**Bruneton., 1999**).

II. 3. 5. 1. Classification des flavonoïdes

Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C alors que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par la substitution des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes présentées (Fig. 12), nous citerons les principales : anthocyanes, flavanols, flavones, flavanones, isoflavones et proanthocyanidols.

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme C- ou O-glycosylés ; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les O-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les C-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C-6 et/ou C-8. En effet, la formation de la (ou des) liaison(s) hétérosidique(s) est sous la dépendance de transférases très spécifiques quant au substrat et à la position d'osylation (**Bruneton., 1993**).

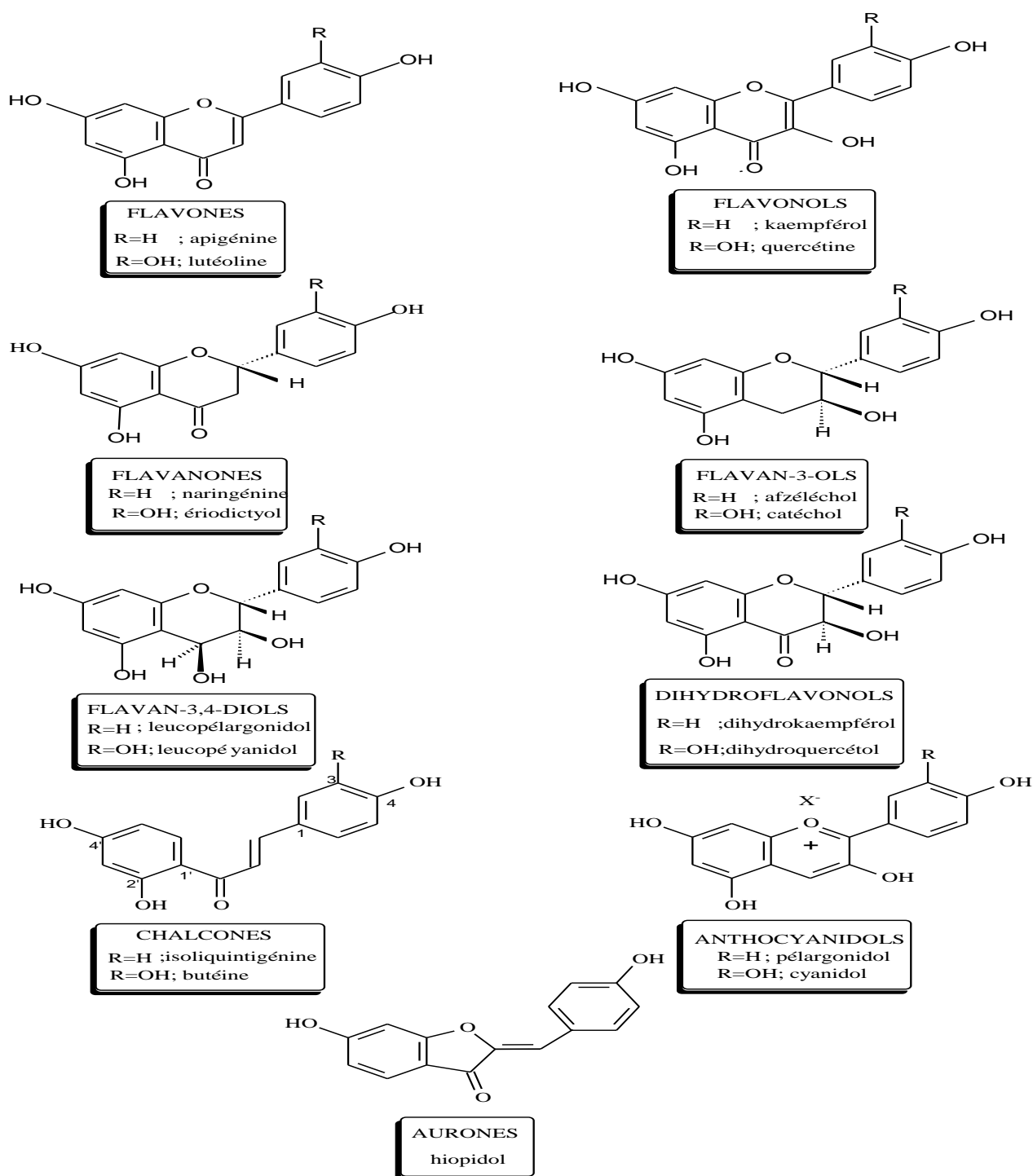


Figure 12 : Différentes classes des flavonoïdes

II. 3. 6. Tannins

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Cowan., 1999 ; Haslam., 1996). Les tannins sont caractérisés par une saveur

astringente et sont trouvés dans toute les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (Scalbert., 1991). On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique :

II. 3. 6. 1. Tannins hydrolysables

Qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins (Fig. 13) (Cowan., 1999 ; Bruneton., 1993).

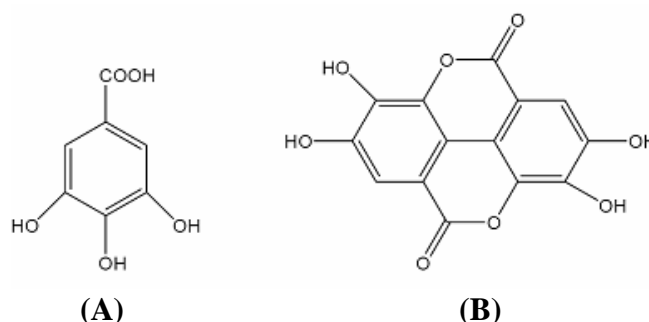


Figure 13 : Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B).

II. 3. 6. 2. Tannins condensés ou tannins catéchiques ou proanthocyanidols

Qui se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, Gymnospermes et Fougères (Bruneton., 1999).

II. 4. Intérêts des polyphénols

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques comme les activités anti-allergique, anti-athérogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire (Ksouri et al., 2007 ; Middleton et al., 2000). Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle

important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (Nijveldt *et al.*, 2001).

Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (Leong et Shui, 2002). D'après les études multiples attestant de l'impact positif de la consommation de polyphénols sur la santé et la prévention des maladies, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou des suppléments alimentaires. De plus, leur activité antioxydante assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique. Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes pour la santé et la beauté de la peau. En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes (les propriétés vasculoprotectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres coumarines), chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques (Hennebelle *et al.*, 2004).

II. 4. 1. Intérêts des acides phénols et phénols simples

Ils sont considérés comme responsables de l'activité cholérétique de l'artichaut et les propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires des dérivés salicylés (Hennebelle *et al.*, 2004). Les composés possédant les activités antioxydantes et antiradicalaires sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique (Bossokpi, 2002). Pour l'acide caféique, il se montre très efficace contre les virus, bactéries et champignons (Cowan, 1999). Alors, l'acide gallique a pour pouvoir de réduire la viabilité des cellules cancéreuse du poumon chez les souris *in vitro* et que la combinaison de cet acide avec les médicaments anticancéreux tels la cisplatine peut être un traitement efficace pour ce type de cancer. Il peut aussi prévenir les dommages oxydatifs d'ADN cellulaire à une faible concentration et exerce une forte activité antiproliférative tels que la quercétine sur les cellules humaines cancéreuses du colon et les cellules épithéliales du foie chez les rats normaux (Lee *et al.*, 2005).

II. 4. 2. Intérêts des coumarines

L'intérêt pharmacologique des plantes à coumarines est limité par rapport aux autres classes de polyphénols dont les propriétés les plus communes sont les activités antioxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes et anti-adhérences (Witaicenis *et al.*, 2013 ; Trykowska *et al.*, 2011) Certains composés sont présentés comme veinotoniques, vasculoprotecteurs et

utilisés comme médicaments symptomatologiques de l'insuffisance veinolymphatique. Ainsi quelques composés furanocoumarines sont des photosensibilisants et utilisés dans le traitement du psoriasis. Les pyranocoumarines sont commercialisées pour leurs propriétés vasodilatatrices coronariennes et présentées comme ayant des actions favorables sur les troubles de la sénescence cérébrale (Bruneton., 2009).

II. 4. 3. Intérêts des lignanes

Chez les plantes, les lignanes jouent sans doute un rôle important pour leur défense dont des propriétés antibactériennes, antifongiques et antinutritives ont été décrites pour de nombreuses molécules de ce groupe (Ayres et Loike., 1990). Concernant l'intérêt thérapeutique de ces composés, un grand nombre d'entre eux possèdent des propriétés cytostatiques ou antitumorales établies *in vitro* ou *in vivo*, ainsi offrent des potentialités intéressantes dans divers domaines : inhibition d'enzymes et activités anti-agrégant plaquettaire, antagoniste calcique, antihypertensive, antivirale, antifongique, antiprotozoaire ...etc. (Donaldson., 2004 ; Gertsch et al., 2003 ; Ayres et Loike., 1990).

II. 4. 4. Intérêts des stilbènes

Les stilbènes, qui sont parfois des phytoalexines, peuvent dans certains cas être des régulateurs de croissance. Ils possèdent des propriétés antifongiques, antipaludiques, anti-parkinson, antihistaminiques, antidiabétiques, antibactériennes...etc. Ils montrent aussi un pouvoir remarquable anticarcinogène des picéides (Bruneton., 2009 ; Krisa et al., 1997). Ainsi, ils sont considérés comme des agents importants de défenses passives. Leurs différents effets sont rapportés dans la littérature où les plus intéressants sont l'effet dissuasif sur les herbivores et l'effet insecticide (Stuart et Robb., 2013). Par ailleurs, certains composés sont utilisés dans l'industrie cosmétique pour leurs qualités antioxydantes, anti-âge et antitaches (Keskin et Kunter., 2009).

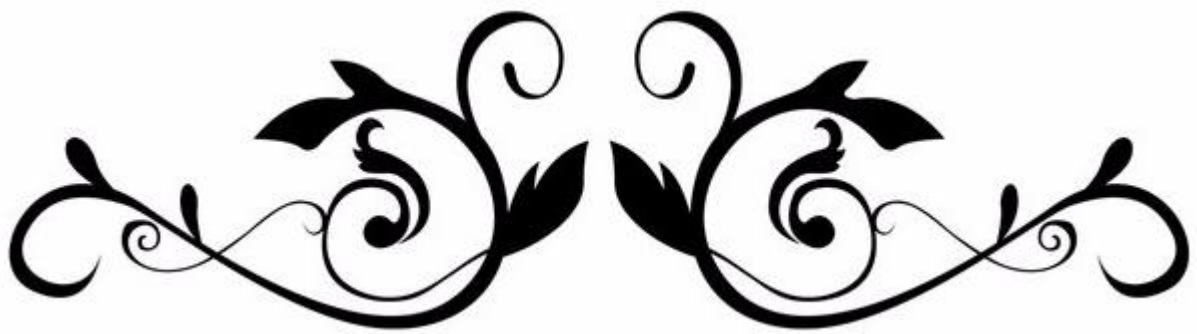
II. 4. 5. Intérêts des tanins

Les tanins sont considérés comme des anti-nutriments grâce aux divers effets nuisibles à savoir la digestion réduite des aliments, la faible biodisponibilité des micronutriments et les dommages du foie (Chung et al., 1998). Ils sont dotés d'un certain pouvoir astringent, par lequel on explique leurs propriétés vasculoprotectrices, cicatrisantes et anti-diarrhéiques. Les proanthocyanidines dimères de l'aubépine seraient de bons sédatifs cardiaques (Hennebelle et

al., 2004). Concernant le pouvoir antioxydant des tannins, cette propriété est très remarquable due à leurs noyaux phénols et la présence des groupes di- ou trihydroxyles sur le cycle B et les groupes méta 5, 7 dihydroxyles sur le cycle A. Les tannins catéchiques du thé vert : gallate d'épicatéchine, gallate d'épigallocatechine et l'épicatéchine sont des puissants extracteurs des radicaux libres (**Rahman et al.**, 2006), ils inhibent les ions Cu^{2+} qui catalysent l'oxydation des lipoprotéines dans les macrophages *in vitro* (**Yoshida et al.**, 1999).

II. 4. 6. Intérêts des flavonoïdes

En ce qui concerne les flavonoïdes, ces composés peuvent empêchés les dommages oxydatifs par différents mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxyles et peroxydes (**Hodek et al.**, 2002) ; soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (**Benavente-Garcia et al.**, 1997 ; **Van Acker et al.**, 1996). Ils jouent un rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibant la Lipooxygénase, la phospholipase et la cyclooxygénase), des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension (quercétine), des thromboses (flavonols), des allergies et des affections bactériennes et viraux (anti-HIV) (**Yao et al.**, 2004 ; **Cowan.**, 1999 ; **Anderson et al.**, 1996). Mais, on attribue également aux flavonoïdes des propriétés neurosédatives, antispasmodiques, diurétiques, anti-œstrogènes (isoflavones), contre la sénescence cérébrale et ses conséquences telle l'altération de la mémoire et la confusion. D'autres part, les citroflavonoïdes (flavonoïdes provenant de divers Citrus) et le fragilité capillaire (insuffisance veinolympatique, crise hémorroïdaire) (**Hennebelle et al.**, 2004).



Chapitre III

Stress Oxydant et Activité

Antioxydante



III.1. Stress Oxydant

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers (Fig. 14), ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles. La réduction univalente de l'oxygène résulte dans la formation d'espèces oxygénées réactives (EOR) dont font partie les radicaux libres (anion superoxyde, radical hydroxyle, le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet). Toutes ces espèces sont potentiellement toxiques pour l'organisme. En situation normale, les EOR sont produites en permanence par notre organisme (rôle physiologique) mais un système efficace de défenses antioxydantes (vitamines, enzymes, oligoéléments) permet de réguler cette production afin de prévenir tout dégât cellulaire excessif. Dans certaines conditions, une surproduction d'EOR due à l'activation de divers mécanismes biochimiques peut submerger rapidement les défenses antioxydantes : c'est le stress oxydatif. Celui-ci est de plus en plus impliqué pour expliquer les dégâts cellulaires observés dans les états inflammatoires aigus, le vieillissement, le cancer, le diabète et les maladies cardiovasculaires (**Pincemail., 1999**).

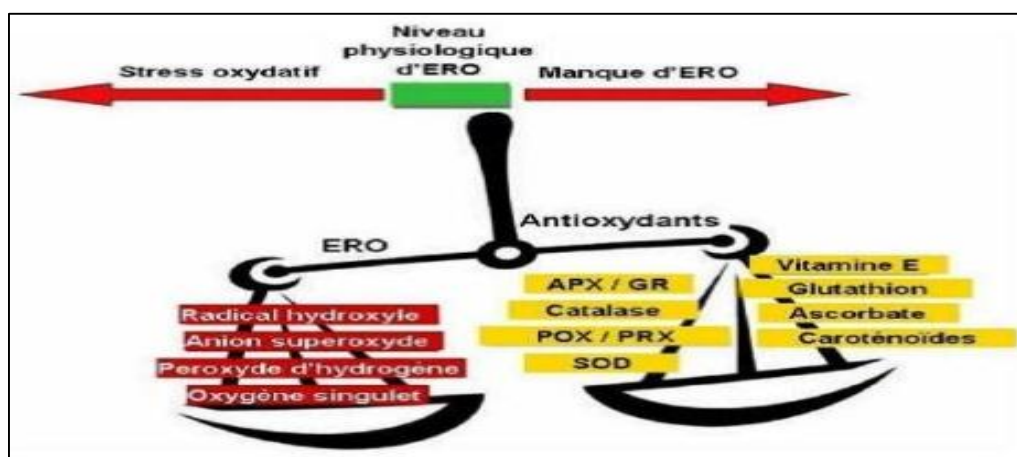


Figure 14 : Schéma de la balance entre les espèces réactives oxygénées et les antioxydants (**Pourrut et al., 2008**).

III.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules ou atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe. Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique (**Asmus et Bonifacic., 2000**). Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente (fission homolytique) pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'électrons à partir d'un composé non radical (Fig. 15 A). Du fait de leur instabilité énergétique, les radicaux libres ont tendance à revenir immédiatement à un état stable en donnant un électron ou en prenant une à une autre

molécule : ils peuvent donc être réducteurs ou oxydants. En jouant le rôle d'accepteur ou donneur d'électrons, les radicaux libres ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs vis-à-vis des autres molécules, possédant un temps de demi-vie extrêmement court (de la nano- à la milli seconde) (**Koechlin-Ramonatxo., 2006.**).

III.2.1. Origine des radicaux libres

Par sa configuration électronique, l'oxygène moléculaire est un radical libre. Il possède en effet deux électrons non appariés (Fig. 15 A). Heureusement, un blocage cinétique limite sa réactivité : les spins de ces deux électrons célibataires sont parallèles lui attribuant une stabilité relativement grande (**Asmus et Bonifacic., 2000**). Cependant, dans l'organisme une partie de cet 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 ($O_2 + 1e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$). C'est ainsi que dans la mitochondrie, à l'état physiologique, il existe lors du transport électronique le long de la chaîne respiratoire, une fuite d'électrons au niveau du complexe I et III, à l'origine de la production de l' $O_2^{\cdot-}$. La poussée respiratoire des polynucléaires neutrophiles (respiratory burst) et les oxydases (xanthine oxydase, NO synthase, eicosanoïdes) constituent également des sources cellulaires de la production d'anion superoxyde (**Ji., 2001**).

Ce radical superoxyde va alors conduire au cours de véritable chaîne d'oxydoréductions à la formation de nombreuses espèces très réactives (Fig. 15 B). Les EOR regroupent non seulement des radicaux libres telles que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) ou le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) mais également des dérivés non radicalaires telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou les hydroperoxydes (ROOH) (**Haliwell et Gutteridge., 1989**).

Les espèces oxygénées réactives sont donc la conséquence inévitable de la consommation de l'oxygène moléculaire par l'organisme. Leur production est permanente et physiologique (**Koechlin-Ramonatxo., 2006**).

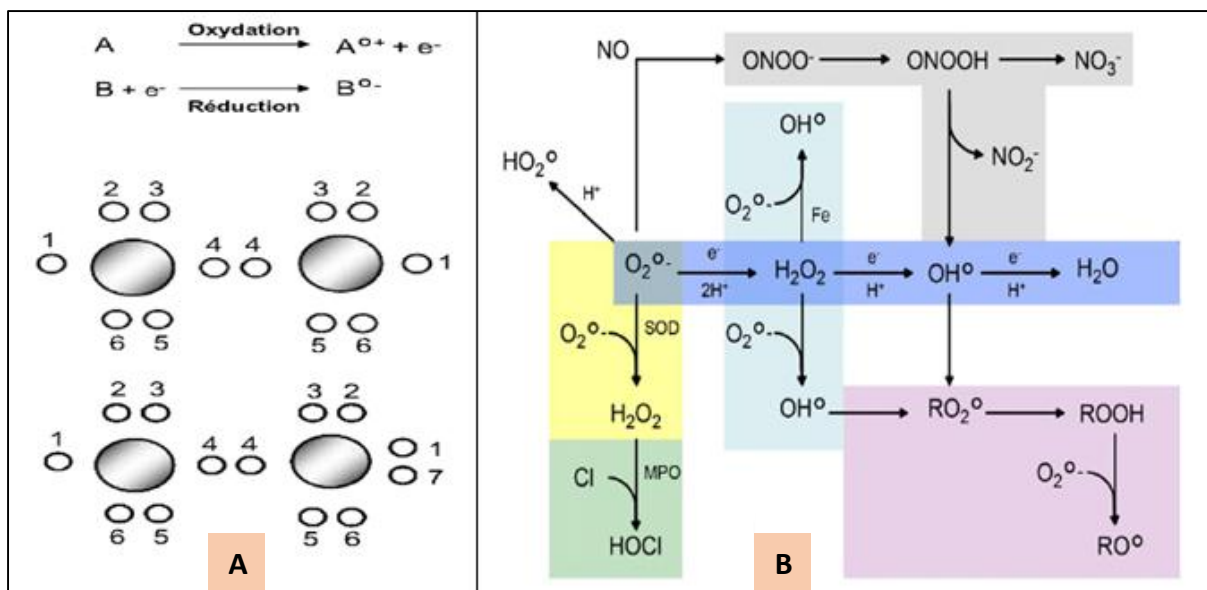


Figure 15 : L'O₂ à l'origine des radicaux libres (A) ; Formation en cascade des différentes espèces oxygénées réactives à partir du radical superoxyde (B) (Koechlin-Ramonatxo., 2006).

III.3. Mécanismes de défense contre le stress oxydant

Les types de radicaux produits ainsi que leurs lieux de production et de propagation étant variés, la riposte antiradicalaire est polymorphe, à la fois préventive et curative (Fig. 16). Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi des molécules antiradicalaires « scavengers », qui piègent les radicaux libres (vitamines antioxydantes A, C, E), thiols et β-carotène) (Cano et al., 2007).

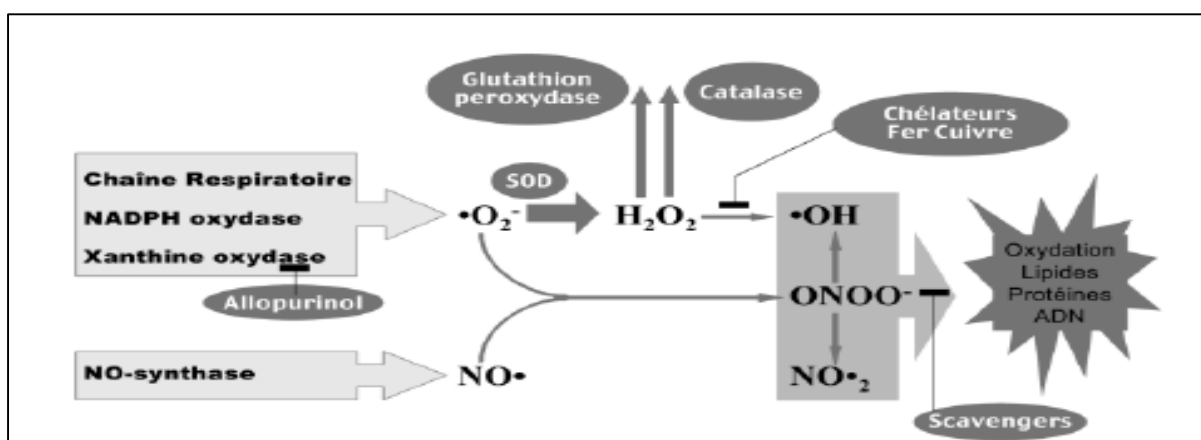


Figure 16 : Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène (Cano et al., 2007).

III.3.1. Système antioxydants enzymatique

Les antioxydants enzymatiques (la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les EOR (**Garait., 2006**).

Une enzyme, la superoxyde dismutase (SOD), est chargée de réduire l'anion superoxyde. Son centre actif est un atome de manganèse, ou une association de cuivre et de zinc, en fonction du lieu où œuvrent ces enzymes (mitochondrie, plasma...) (**Cardey., 2007**).

Le rôle déterminant de la superoxyde dismutase (SOD) dans les systèmes de défenses antioxydantes de l'organisme est connu depuis 1968. On sait que l'ion superoxyde (O_2^-) est le point de départ de la chaîne de production des radicaux libres. Or, dès ce stade précoce, la superoxyde dismutase inactive l'ion superoxyde en le transformant en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Celui-ci est ensuite rapidement catabolisé par la catalase et les peroxydases en dioxygène (O_2) et en molécules d'eau (H_2O) (Fig. 17). Ainsi, différentes études ont confirmé que la production de H_2O_2 sous l'action de la SOD était bien le facteur déclenchant des mécanismes naturels de défenses antioxydantes. La SOD apparaît donc comme l'enzyme clé de la défense naturelle contre les radicaux libres (**Menvielle-Bourg., 2005**).

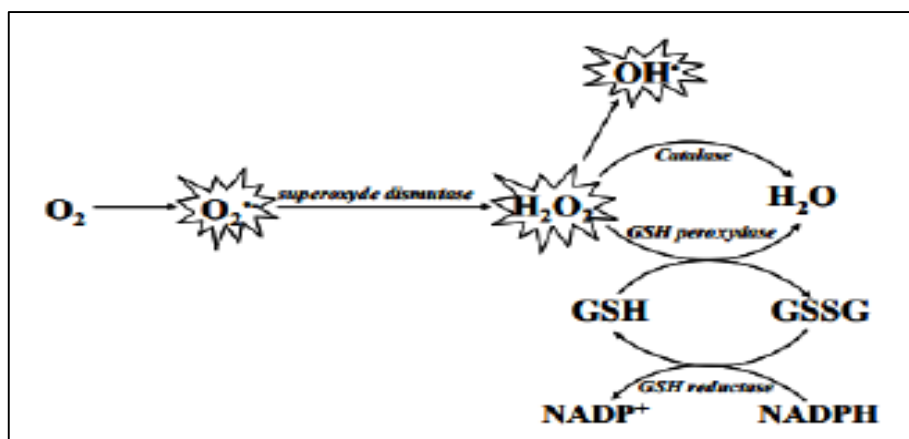


Figure 17 : Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques (**Garait., 2006**)

III.3.2. Systèmes antioxydants non-enzymatiques

III.3.2.1. Antioxydants endogènes

- **Le glutathion** : Largement présent sous forme réduite, le glutathion est capable de réagir *in vitro*, avec les radicaux HO^\bullet , RO_2^\bullet , RO^\bullet , $1O_2$, $ONOO^-$ (**Delattre et al., 2005**).

- **L'acide lipoïque** : Les deux formes, oxydée et réduite, de l'acide lipoïque présentent des propriétés antioxydantes in vitro (en piégeant les HO[•], RO₂[•], l'HOCl et l'¹O₂) en se liant à des métaux comme le fer et le cuivre (**Smith et al., 2004**).
- **L'acide urique** : présent sous forme urate à pH physiologique, il possède des propriétés antioxydantes in vitro contre les HO[•] et RO₂[•] (**Delattre et al., 2005**).

III.3.2.2. Antioxydants exogènes naturels

Ils sont majoritairement représentés par les vitamines C et E, les caroténoïdes et les composés phénoliques :

- **La vitamine C** est connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire (**Retsky et al., 1999**).
- **La vitamine E** joue également un rôle protecteur des structures membranaires et des lipoprotéines. Elle prévient l'apparition d'hydroperoxydes (**Yoshida et al., 1993 ; Kaiser et al., 1990**).
- **Les caroténoïdes**, sont des pigments (carotènes et xanthophylles) issus des plantes et des microorganismes. L'activité antioxydante de ceux-ci est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de neutraliser les radicaux ROO[•], HO[•], O₂⁻ (**Valko et al., 2006**).
- **Les composés phénoliques** :
 - Les **flavonoïdes** sont caractérisés par une structure commune de type 2-phénylbenzopyrane. Leur capacité antioxydante réside dans leur faculté à terminer les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons, et à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique (**Leopoldini et al., 2011 ; Schroeter et al., 2002**). De façon générale, l'activité biologique des flavonoïdes est fortement dépendante de la nature et de la position des substituants, ainsi que du nombre de groupements hydroxyles (**Schroeter et al., 2002**).
 - Quant aux **Tanins**, ce 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 (**Cavin., 1999**).
 - 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 antiperoxydante des coumarines sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes (Igor., 2002).

- Parmi les dérivés d'acides phénols, le resvératrol est le composé le plus étudié. En effet, ce stilbène, isolé du raisin possède de fortes propriétés antioxydantes (Igor., 2002).

III.3.2.3. Antioxydants synthétiques

Les antioxydants phénoliques synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA) et butylhydroxytoluène (BHT) sont fréquemment utilisés en tant que additifs pour prévenir le rancissement oxydatif des aliments, des produits pharmaceutiques et commerciaux (Heloizy et al., 2010) parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels (Fig. 18). Cependant, L'innocuité de ces antioxydants a récemment été remise en question en raison de leur toxicité (Sun et Fukuhara., 1997). En outre, BHA et BHT ont été suspectés d'être responsables de lésions hépatiques et de la carcinogénèse (Sherwin., 1990 ; Wichi., 1988). Par ailleurs, les tests de cancérogénicité ont montré que l'ajout de l'antioxydant BHA au régime alimentaire des rats induit une incidence élevée de papillome et de carcinome épidermoïde de l'estomac chez les deux sexes. Alors que le BHT pourrait être un promoteur de la carcinogénèse thyroïdienne (Ito et al., 1985). Par conséquent, on s'intéresse de plus en plus aux antioxydants naturels et plus sûrs (Gülçin., 2006 ; Oktay et al., 2003 ; Moure et al., 2001).

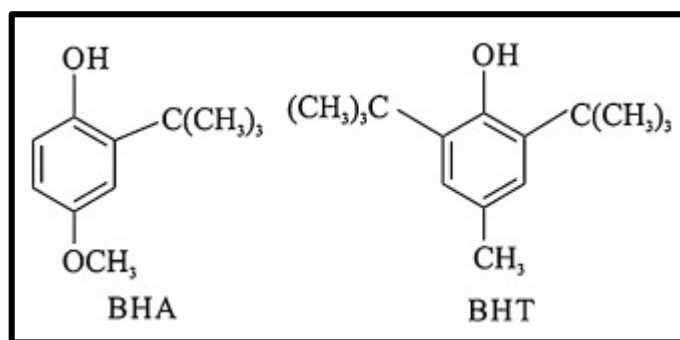


Figure 18 : Structure chimique de BHA et BHT (Heloizy et al., 2010).

III.4. Conséquences cellulaires du stress oxydant

Les conséquences du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane entraînant des lyses immédiates. D'autres perturbations biologiques sont observées à la suite d'un stress oxydant : baisse de la fluidité des membranes, anomalies de récepteurs, diminution de la sensibilité à l'insuline, perturbation de l'immunité cellulaire, fibrose, dépôts de lipides, affaiblissement musculaire,

voire mort neuronale ou apparition de mutations. De nombreuses anomalies pathologiques sont également induites par le stress oxydant : mutations, carcinogénèse, malformations des fœtus, dépôts de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôts de lipides oxydés, immunosuppression... (Favier *et al.*, 1995).

III.5. Quelques tests de la capacité antioxydante et antiradicalaire

Certaines méthodes pratiques ont été développées pour une quantification rapide, simple et fiable de la capacité antioxydante *in vitro* et *in vivo*. En général, les méthodes pour déterminer la capacité antioxydante totale ont été divisées en deux groupes principaux : les tests basés sur une réaction de transfert d'un seul électron et les tests basés sur un transfert d'atome d'hydrogène (Huang *et al.*, 2005 ; Prior *et al.*, 2005).

Le terme 'capacité' désigne les résultats obtenus par les différents essais examinant l'activité antioxydante des échantillons. Les termes spécifiques tels que "capacité de piégeage des radicaux peroxydes", "capacité de piégeage des superoxydes", "capacité de réduction des ions ferriques" seraient plus appropriés pour décrire les résultats de ces tests que les termes vaguement définis "capacité antioxydante totale" (Huang *et al.*, 2005).

III.5.1. Capacité de piégeage du radical libre DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH[•]) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Osman., 2011 ; Floegel *et al.*, 2011 ; Villaño *et al.*, 2007). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères. Le radical DPPH[•] reste ainsi dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire (Popovici *et al.*, 2009). La délocalisation provoque aussi la coloration violette bien caractéristique de la solution de DPPH[•]. Ce test a été utilisé par Blois en 1958. Il consiste en la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire DPPH[•] en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non radicalaire DPPH-H. En effet, la présence des radicaux DPPH[•] donne une coloration violette à la solution et qui absorbe fortement à 517 nm.

Les réactions ont lieu à température ambiante et en milieu généralement méthanolique, qui permet une bonne solubilisation de la plupart des antioxydants. Ce test est très utilisé, car il est techniquement simple, rapide, facile et non coûteux (Hadbaoui., 2012), mais certains inconvénients limitent ses applications. Ce radical azoté, à longue durée de vie, ne présente

aucune similitude avec les radicaux peroxydes hautement réactifs et transitoires impliqués dans la peroxydation lipidique. De nombreux antioxydants qui réagissent rapidement avec les radicaux peroxydes peuvent réagir lentement ou peuvent même être inertes avec le DPPH. La cinétique de la réaction entre DPPH et les antioxydants n'est pas linéaire aux concentrations de DPPH. Il est donc plutôt arbitraire d'exprimer la capacité antioxydante en utilisant EC50 (Huang *et al.*, 2005).

III.5.2. Capacité de piégeage du radical-cation ABTS^{•+}

Ce radical organique est couramment utilisé pour évaluer l'efficacité antioxydante des composés purs et des mélanges complexes. Il pourrait être généré par voies enzymatiques, chimiques et électrochimiques (Roberta *et al.*, 1999 ; Rice-Evans et Miller., 1999 ; Bourbonnais *et al.*, 1998 ; Campos *et al.*, 1996 ; Miller *et al.*, 1993 ; Childs et Badsky., 1975). Dans une communication, nous avons signalé que, en présence des polyphénols, la (+) - catéchine, (-) -épicatéchine, et phloroglucinol, les radicaux ABTS subissent des réactions de dégradation (Osman *et al.*, 2006). L'ampleur et la rapidité avec laquelle les polyphénols éteignent les chromophores du cation radical ABTS sont des critères utilisés pour évaluer leur capacité antioxydante relative avec un antioxydant standard (Roginsky et Lissi., 2005).

III.5.3. Capacité de piégeage du radical superoxyde par la méthode de DMSO alcalin

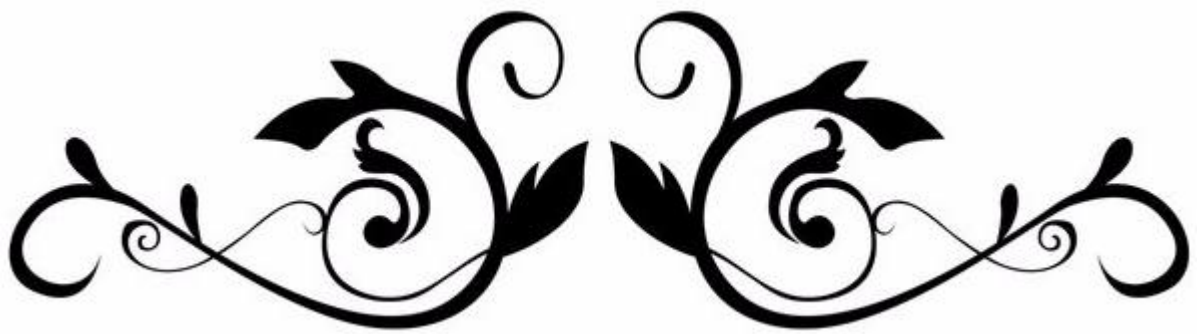
Dans la méthode DMSO alcalin, un radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est généré par l'addition d'hydroxyde de sodium à l'air saturé DMSO. Le superoxyde généré reste stable dans la solution, qui réduit le nitro bleu tétrazolium (NBT) de couleur jaune en formazan de couleur pourpre qui absorbe à 560 nm à température ambiante (Kunchandy *et al.*, 1990). Ainsi, un composé antioxydant capable de capturer l'anion superoxyde empêchera la formation du bleu de formazan et la solution restera jaune. Cependant, cette méthode ne convient pas aux réactions avec des constantes de vitesse lente et nécessite la présence d'un équipement approprié (Patel., 2014 ; Babu *et al.*, 2001). L'intérêt pour la capacité de piégeage de l'anion superoxyde est largement dû à son rôle dans la production du radical hydroxyle hautement réactif en présence d'ions métalliques. Cependant, ce n'est pas le seul mécanisme d'oxydation des lipides, et la capacité à piéger l'anion superoxyde n'est pas nécessairement efficace pour empêcher l'oxydation des lipides (Boligon *et al.*, 2014).

III.5.4. Capacité de réduire l'ion ferrique (Pouvoir réducteur)

Il n'y a pas beaucoup de différence entre le test ABTS et le pouvoir réducteur (PR), sauf que l'ABTS est effectué à pH neutre alors que le PR est réalisé dans des conditions acides (**Huang et al., 2005**). Cette méthode est basée sur le principe d'augmentation de l'absorbance des mélanges réactionnels. Une telle augmentation indique un accroissement de l'activité antioxydante et du pouvoir réducteur (**Jayaprakash et al., 2001**). L'absorbance du complexe est mesurée à 700 nm.

III.5.4. Capacité de réduire l'ion cuprique (CUPRAC)

Cette méthode de mesure de la capacité antioxydante, introduite à la littérature mondiale par le laboratoire de chimie analytique de l'Université d'Istanbul (**Apak et al., 2004**), est basé sur l'évolution des caractéristiques d'absorption du complexe néocuproïne (NC) /cuivre (II) lorsqu'il est réduit par un antioxydant (**Apak et al., 2011**). Le potentiel de réduction de l'échantillon ou du standard convertit efficacement Cu^{+2} en Cu^{+1} , cela modifie l'absorbance maximale. Il y a peu d'informations publiées sur ce test. Toutefois, un laboratoire industriel l'utilise comme mesure du potentiel antioxydant total (**Oxiresearch., 2002**).



Matériels et Méthodes



IV.1. Aperçu et but de travail

Afin d'augmenter les chances d'isoler de nouvelles molécules, il est plus judicieux de choisir des espèces qui ont été peu ou pas étudiées jusque-là. De ce fait, le nombre très restreint des études phytochimiques et de dépistage d'activité antioxydante portant sur le genre *Tuberaria* a beaucoup retenu notre attention d'où la sélection de l'une de ses espèces.

Dans cette optique, une recherche bibliographique à la fois botanique et phytochimique de ce taxon ainsi que de sa famille a été présentée au début de ce travail. Cela nous a permis de constater l'intérêt immense de l'espèce choisie dans l'usage traditionnel en région méditerranéenne, dont le nord algérien constitue l'une de ces pièces de puzzle. Par ailleurs, les connaissances recueillies sur le pouvoir thérapeutique du genre *Tuberaria*, nous a motivés à soumettre cette plante à de différents processus d'extraction et purification dans le but général de valoriser la flore algérienne qui reste jusqu'à présent très mystérieuse.

Après l'extraction des parties aériennes de la plante, l'extrait brut a été fractionné en utilisant la technique de chromatographie liquide sous vide (VLC). Ce fractionnement, suivi de plusieurs étapes de séparation et purification chromatographiques, nous a conduit à l'isolement et l'identification de 3 composés naturels purs.

Notre étude a porté aussi sur l'évaluation de l'activité antioxydante par 5 méthodes (DPPH[•], ABTS⁺, DMSO alcalin, CUPRAC et Pouvoir réducteur) de l'extrait brut éthanolique ainsi que des fractions chromatographiques provenant de cet extrait.

IV.2. Matériel végétale

IV.2.1. Description de la zone de la récolte

La région de Djebel Ouahch constitue une unité géographique importante, située au nord-est de la ville de Constantine (Fig. 19). Ses forêts couvrent une superficie de 15.207,67 ha, (23% du territoire de la région) avec une diversité floristique inestimable (Gana., 2014).



Figure 19 : Localisation satellite de la zone de récolte de la plante du genre *Tuberaria* (Google Earth., 2018).

IV.2.2. Récolte de la plante du genre *Tuberaria*

Les parties aériennes de la plante du genre *Tuberaria* originaire de la zone de Djebel El Ouahch ont été soigneusement récoltées au mois de Mai 2017 (stade de la floraison), de manière à ne pas détériorer les éléments organiques et minéraux présents. Son identification botanique a été faite par Mr KABOUCHE Kamel.

Après l'avoir séché dans un endroit sec, le matériel végétal est ensuite réduit en poudre fine à l'aide d'un moulin électrique.

IV.3. Méthodes d'analyses phytochimiques

IV.3.1. Méthodes chromatographiques

IV.3.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Utilisés à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications, les chromatogrammes sur couche mince permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis.

Nous avons utilisé essentiellement des plaques prêtes à l'emploi à support en aluminium (Merck) : en phase normale, Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck, 250 µm.

Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée.

L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm), avant la révélation par un révélateur à base de la vanilline sulfurique (0.5 g de la vanilline, dissous dans 100 ml du méthanol, plus 1 ml d'acide sulfurique).

IV.3.1.2. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

L'analyse de la richesse de l'extrait éthanolique est réalisée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) analytique à l'aide d'un appareil de type Shimadzu LC8 muni d'un détecteur UV-Visible à longueur d'onde variable et équipé d'une colonne de type phase inverse (silice greffée C₁₈), avec un diamètre de 2,1cm et 50 cm de longueur. A température ambiante, 10µl de l'extrait brut, préalablement filtrés sur une membrane de 0,45 µm sont injectée afin d'avoir une idée sur la nature et le nombre de molécules à isoler.

IV.3.1.3. Chromatographie liquide sous vide (VLC)

Cette technique est utilisée pour obtenir un fractionnement grossi de l'extrait brut. Elle est rapide, facile à mettre en œuvre et elle a l'avantage de consommer moins de solvants que les méthodes chromatographiques classiques.

La rapidité de cette méthode évite les phénomènes d'isomérisations observées souvent dans le cas de la chromatographie sur colonne. La silice greffée Lichroprep RP-18 Merck (63-200 µm), est mise dans une colonne en forme d'entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté n° 3 (porosité), au bas duquel est appliquée une pression pour accélérer le débit d'élution.

La silice conditionnée dans l'entonnoir cylindrique doit avoir un poids 30 fois supérieur de celui de l'extrait à déposer à la surface de la phase stationnaire (pour 1g d'échantillon on utilise 30 g de silice).

IV.3.1.4. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

Pour les chromatographies sur colonnes ouvertes, deux types de phases stationnaires ont été mises en œuvre. La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée.

Les phases stationnaires utilisées sont :

- Une silice Kieselgel Merck (70-230 mesh). La quantité de silice utilisée est généralement 40 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée.
- Sur polyamide SC6.

IV.3.2. Méthodes d'analyses physico-chimiques

IV.3.2.1. Spectrophotométrie UV-visible

Les spectres UV-visible des composés isolés sont enregistrés dans le MeOH sur un spectrophotomètre (NICOLET evolution 100). Grâce à son monochromateur, le lecteur offre une grande sensibilité aux essais.

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, un lecteur de microplaque de type Perkin Elmer (EnSpire Alpha Plate Reader) multimode, des microplaques en plastique de 96 puits et des micropipettes réglables ont été utilisés au cours de l'exploration de l'activité antioxydante.

IV.3.2.2. Spectroscopie de RMN

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone (RMN-¹H et ¹³C) ont été enregistrés à 500 et 125 MHz sur un appareil BRUKER AVANCE DRX-500 ou à 600 et 150 MHz sur un appareil BRUKER AVANCE DRX-600 équipé d'une cryoplateforme. Les microprogrammes BRUKER et le logiciel de traitement des données Topspin 2.1 sont appliqués.

Les échantillons ont été solubilisés dans le méthanol deutéré CD₃OD dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre.

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS), les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

IV.4. Etude phytochimique de la plante du genre *Tuberaria*

IV.4.1. Extraction par macération à froid

La matière végétale, séchée et broyée (1000 g) a été macérée dans un mélange hydroalcoolique : Ethanol/Eau (80 : 20 ; (v/v)) pendant 48 heures à température ambiante. La solution extractive obtenue est concentrée par évaporation pour donner 135,623 g d'extrait brut. Le protocole suivi figure dans les photos ci-dessous (Fig. 20 ; 21).



Figure 20 : Etapes de macération et de filtration des parties aériennes de la plante



Figure 21 : Procédé de concentration des filtrats hydroalcooliques

IV.4.2. Fractionnement de l'extrait éthanolique brut de la plante du Genre *Tuberaria* :

26 g de l'extrait éthanolique des parties aériennes de *Tuberaria* ont été fractionnés par VLC en phase inverse C₁₈ (Fig. 22) avec l'éluant H₂O-MeOH (70/30, 60/40, 40/60, 20/80, 0/100 : v/v). Des fractions de 150 ml (×3) sont recueillies pour chaque mélange.

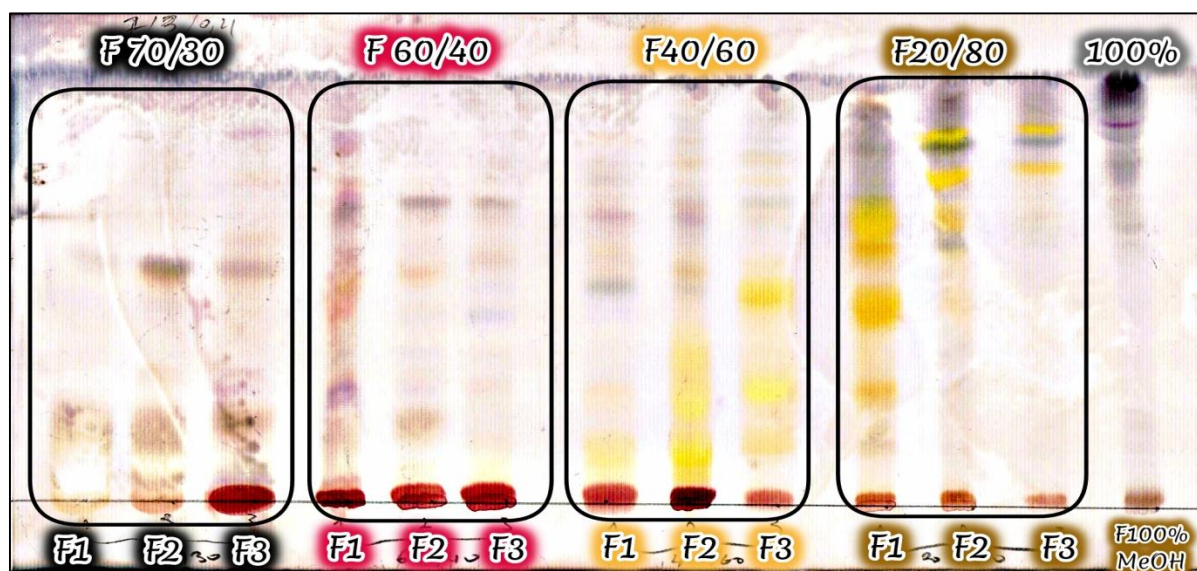


Figure 22 : Procédé du fractionnement de l'extrait éthanolique par VLC

Avant d'entamer la séparation chromatographique, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice normale avec les systèmes 80 :20 (CHCl₃ : MeOH) et 70 : 30 : 4 (CHCl₃ : MeOH : H₂O). Les CCM ont été examinées à la lumière UV et révélées à la vanilline sulfurique à 1% puis chauffées à 100 °C. 13 fractions (Fig. 23) ont été recueillies (Tab. 6).

Tableau 6 : VLC sur C₁₈ de l'extrait éthanolique des parties aériennes de *Tuberaria*

Eluant	Fractions regroupées	Masse (g)
Eau/MeOH (70/30)	F70/30 [1]	7.0713
	F70/30 [2]	6.7771
	F70/30 [3]	1.4415
Eau/MeOH (60/40)	F60/40 [1]	0.5234
	F60/40 [2]	1.2996
	F60/40 [3]	1.2409
Eau/MeOH (40/60)	F40/60 [1]	0.5365
	F40/60 [2]	1.3568
	F40/60 [3]	0.6069
Eau/MeOH (20/80)	F20/80 [1]	0.189
	F20/80 [2]	0.2873
	F20/80 [3]	0.1053
MeOH pur (100%)	F [100MeOH]	0.372

**Figure 23** : CCM récapitulatif des fractions de la VLC de l'extrait éthanolique (Système d'élution : CHCl₃ : MeOH : H₂O (70 :30 :4))

Une grande similitude observée entre le profil CCM des fractions F40/60 [3] et F20/80 [1] et celui des fractions F20/80 [2] et [3] nous a permis de les réunir en deux fractions :

- ◆ Fraction **F (a)** : L'ensemble des fractions F20/80 [2] et [3].
- ◆ Fraction **F (b)** : L'ensemble des fractions F40/60 [3] et F20/80 [1].

Nous avons choisi à étudier ces deux fractions car le profil CCM a montré une richesse en polyphénols.

- **La fraction F(a) :**

La fraction **F(a)** est chromatographiée sur une colonne de gel de silice en phase normale éluée avec un gradient de $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ [100:0- 50:50] (Fig. 24). Des fractions de 50 ml ont été recueillies et réunies selon leur profil CCM en phase normale réalisée dans le $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ [80:20] pour donner les composés **Tb1** et **Tb2**.



Figure 24 : Evolution de la chromatographie sur colonne de gel de silice.

- **La fraction F(b) :**

Le composé **Tb3** est issu, après une purification successive, de la fraction **F(b)** (0,7187g) par une CC de polyamide éluée par un mélange à différents gradients de toluène/méthanol (100:0 – 70:30), suivie d'une CC de gel de silice en phase normale éluée par un mélange isocratique $\text{AcOEt}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (100:10 :5).

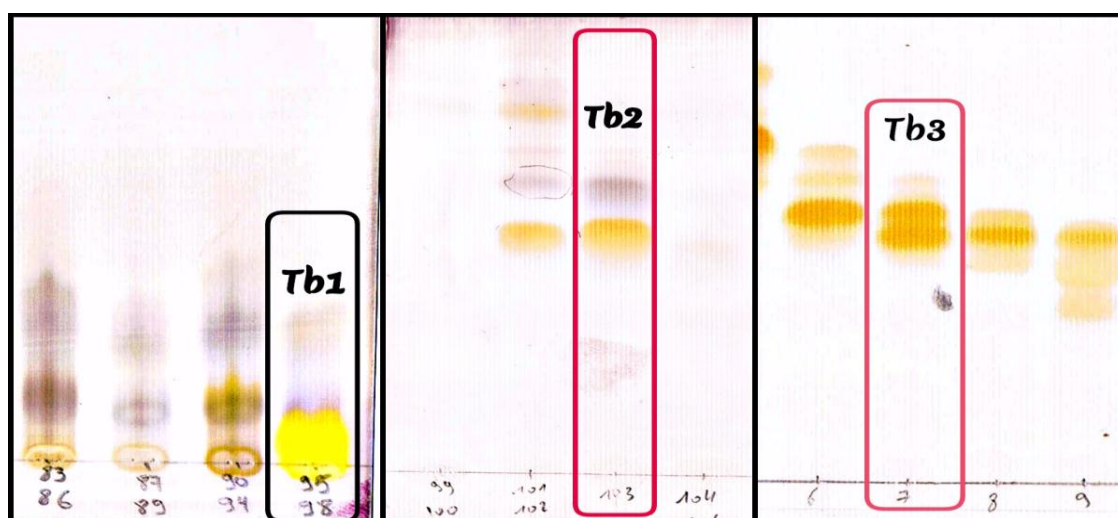


Figure 25 : Plaques CCM des composés purs : **Tb1**, **Tb2** et **Tb3**

IV.5. Evaluation de l'activité antioxydante de l'espèce du genre *Tuberaria*

Au cours de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à la purification des flavonoïdes. Ceux-ci sont connus pour être de bons composés antioxydants, en ce sens, il nous a paru intéressant d'estimer le potentiel antioxydant de l'extrait brut éthanolique ainsi que des cinq fractions issues de celui-ci : F60/40 [2] et [3], F40/60 [2] et [3] et F20/80 [1]. (Fig. 26). Quant aux fractions 20/80 [2] et [3] qui n'ont pas été sélectionnées malgré leur teneur considérable en flavonoïdes est expliqué par leur épuisement lors d'un processus de purification sur une colonne de gel de silice.

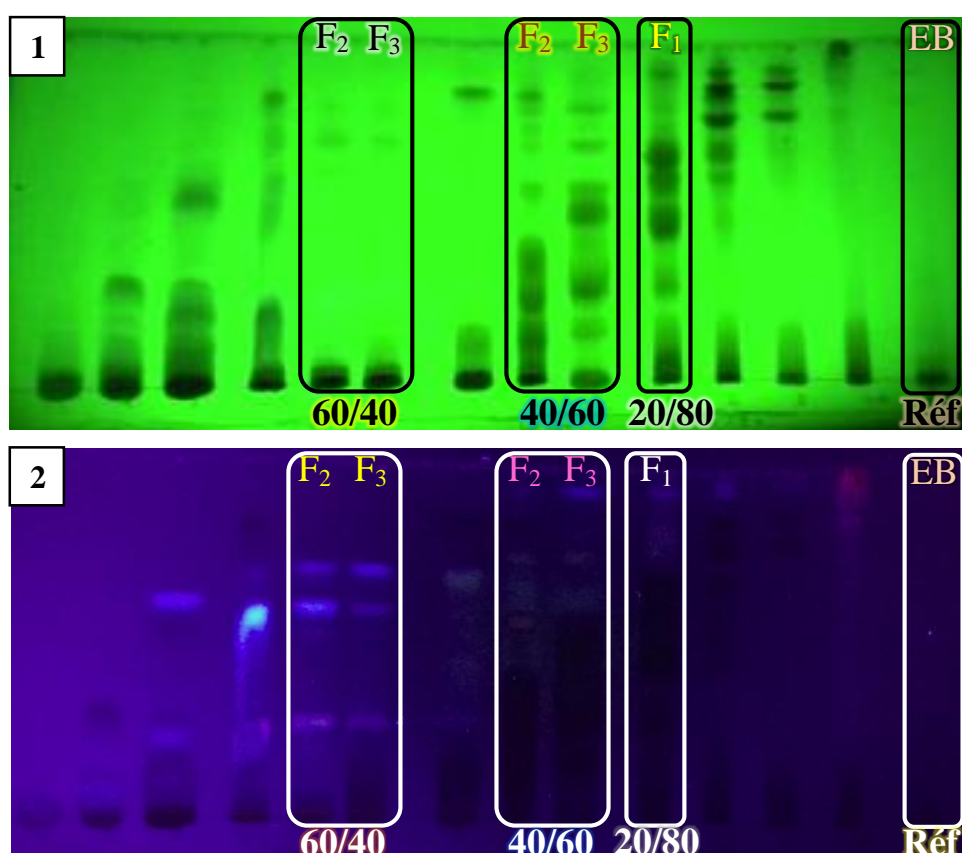


Figure 26 : les fractions sélectionnées pour une évaluation antioxydante à partir du CCM récapitulatif observé sous 254 nm (1) et sous 365 nm (2).

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* de l'extrait éthanolique et des cinq fractions a été réalisée par cinq essais complémentaires à savoir :

- L'activité antiradicalaire pour le radical libre DPPH[•]
- L'activité antiradicalaire pour le radical-cation ABTS^{•+}
- L'activité antiradicalaire pour le radicale superoxyde O₂^{•-} par la méthode DMSO alcalin
- Le pouvoir réducteur de cuivre CUPRAC

➤ Le pouvoir réducteur de fer Reducing Power

Les résultats, sauf pour le dosage CUPRAC et Pouvoir réducteur, ont été enregistrés à la concentration 50% d'inhibition (IC₅₀). L'activité antioxydante des extraits testés a été comparée à celles des standards (le BHA et le BHT).

L'indice IC₅₀ se définit comme étant la concentration nécessaire de l'antioxydant pour piéger 50% de radicaux DPPH[•]/ABTS^{•+}/O₂^{•-} alors que A_{0,5} correspond à la concentration de l'antioxydant pour laquelle l'absorbance vaut 0,5. Ces deux indices sont donnés en µg/ml de milieu réactionnel, du coup la capacité antioxydante d'un échantillon est d'autant plus élevée que son IC₅₀ ou A_{0,5} est petit.

IV.5.1. Test de piégeage du radical 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)

L'activité du balayage du radical DPPH[•] a été mesurée par spectrophotométrie selon le protocole décrit par (Blois., 1958) avec une légère modification (Öztürk *et al.*, 2011). Ainsi, 40 µl de chaque échantillon à des concentrations décroissantes, y compris le BHA et le BHT, ont été additionnés à 160 µl d'une solution méthanolique de DPPH (0,1mM) préalablement déposée dans chacun des puits d'une microplaque. Un témoin négatif est préparé en parallèle en remplaçant les 40 µl d'échantillon par du méthanol. Suite à une incubation à température ambiante et à l'obscurité pendant une trentaine de minutes, l'absorbance est mesurée à 517 nm. On note que chaque dépôt faisait l'objet de trois répétitions.

L'activité de piégeage du radical est calculée en tant que pourcentage de décoloration de DPPH selon cette équation :

$$\text{APR (\%)} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Extrait}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

Où A_{DPPH} est l'absorbance de la solution DPPH, et A_{Extrait} est l'absorbance de l'échantillon à une concentration donnée.

IV.5.2. Test de piégeage de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS^{•+})

Le protocole suivi pour cette activité est celui décrit par (Re *et al.*, 1999) avec des volumes ajustés pour une manipulation sur microplaque de 96 puits. Pour cela, 40 µl d'échantillon de chaque concentration sont introduits dans 3 puits alignées sur les quelles 160 µl de solution

ABTS fraîchement préparée sont ajoutés. Cette opération est aussi valable pour les deux standards employés. Un blanc est parallèlement préparé suivant les mêmes volumes tout en mettant du méthanol à la place de l'échantillon testé. L'absorbance est ensuite mesurée à 734 nm après 10 minutes d'incubation.

Le pourcentage de l'activité antiradicalaire est calculé suivant cette formule :

$$AA (\%) = [1 - (A_{\text{Extrait}} / A_{\text{blanc}})] \times 100$$

IV.5.3. Test de piégeage du radical superoxyde O₂^{•-} par la méthode DMSO alcalin

L'activité Superoxyde DMSO alcalin est déterminée par la méthode établie par (Rao et Kunchandy., 1990). Brièvement, 40 µl de chaque échantillon et de standard sont mixés à 130 µl de DMSO alcalin puis à 30 µl de NBT dans chacun des puits de la microplaque. Après avoir soumis les mélanges réactionnels à une agitation, l'absorbance est mesurée à 560 nm. Il faut noter que chaque dépôt est triplé aussi bien pour les extraits que pour le blanc.

Le pourcentage de l'activité antiradicalaire est calculé selon la formule suivante :

$$AA (\%) = [(A_{\text{Extrait}} - A_{\text{Contrôle}}) / A_{\text{Extrait}}] \times 100$$

IV.5.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de l'ion cuprique (CUPRAC)

L'activité antioxydante par réduction cuprique des extraits a été déterminée par la méthode CUPRAC (Apak *et al.*, 2004). Dans les plaques de 96 unités, des solutions ont été ajoutées : 50 µl de Cu(II) (10 mM), 50 µl de néocuproïne (7.5 mM), 60 µl de tampon NH₄Ac (1 M, pH = 7), et 40 µl de l'extrait à différentes concentrations. Après une heure du temps et à l'aide d'un lecteur de microplaques, l'absorbance a été enregistrée à 450 nm. Les résultats ont été calculés à titre de A_{0.5} (µg/ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

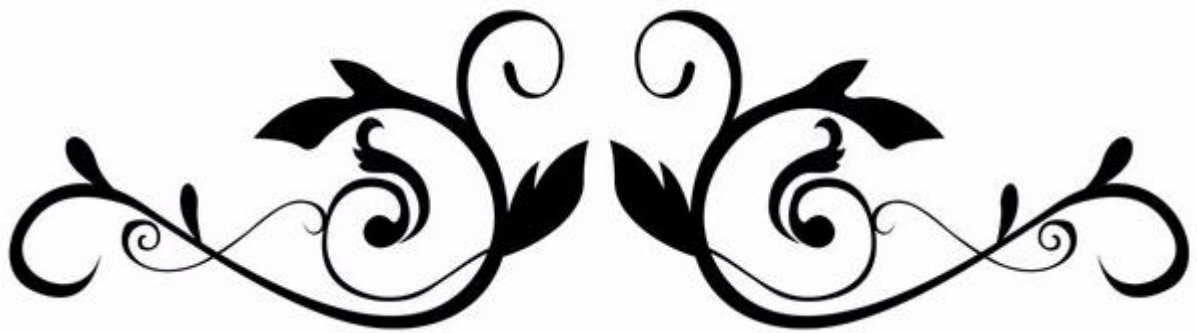
IV.5.5. Test de la capacité antioxydante par réduction de fer (Pouvoir réducteur)

L'activité de réduction de l'ion ferrique est déterminée par la méthode de (Oyaizu.,1986) avec une légère modification. Elle consiste à déposer 10 µl des échantillons à concentrations décroissantes dans des puits d'une microplaque en veillant à ce que l'opération soit reproduite de façon triple. Par la suite, chaque puit reçoit 40 µl de tampon phosphate puis 50 µl de $K_3Fe(CN)_6$. Les mélanges sont ensuite destinés à une incubation à l'étuve à 50°C pendant une vingtaine de minute. Au bout de l'incubation, 50 µl de TCA, 40 µl de H_2O et 10 µl de $FeCl_3$ sont rajoutés au milieu réactionnel l'un après l'autre.

Un blanc sans échantillon est préparé dans les mêmes conditions. L'enregistrement des absorbances est effectué à une longueur d'onde de 700 nm. L'activité réductrice est ensuite calculée à $A = 0,5$.

IV.6. Analyse statistique

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyennes \pm déviation standard (SD). Les valeurs de $IC_{50}/A_{0,5}$ ainsi que les représentations graphiques ont été réalisées par le logiciel OriginePro 8. Plus elles sont petites, plus l'activité antioxydante des extraits est grande.



Résultats et Discussion



V.1. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction correspond au pourcentage des principes actifs dissouts dans un solvant organique et/ou aqueux utilisé pour l'extraction. Il est déterminé à partir du poids de l'extrait sec par rapport au poids de la matière végétale sèche réduit en poudre. (Abe et al., 2010). Le rendement est exprimé en pourcentage massique par rapport à la quantité de matière sèche selon la formule :

$$R (\%) = [M1 / M0] \times 100$$

R % : Rendement en extraits exprimée en g /100g de matière sèche,

M1 : quantité de l'extrait récupérée exprimée en g,

M0 : quantité de la poudre végétale utilisée pour l'extraction exprimée en g,

Le processus de macération nous a permis d'extraire à partir de 1000 g (M0) des parties aériennes de la plante du genre *Tuberaria* une masse (M1) de 135,623 g de couleur marron foncée très visqueuse, qui donne un rendement à l'ordre de **13,5623%**.

La valeur du rendement dépend de plusieurs facteurs tels que : structure et pH du sol, salinité du lieu de récolte, température, air, altitude...etc. Comme elle peut être liée aux conditions expérimentales. En effet, la présence d'eau (20% en ce qui concerne notre cas) dans le solvant d'extraction déstabilise les parois cellulaires grâce à son moment dipolaire plus fort que celui des alcools. Par conséquent, en pénétrant plus profondément dans la matrice végétale, le solvant peut entrer au contact avec une quantité plus grande de solutés, favorisant ainsi l'extraction (Penchev et al., 2010).

V.2. Description des profils chromatographiques par HPLC

Une fois le totum brut est obtenu, une analyse chromatographique par HPLC a été faite en 2 longueurs d'onde (205nm/254 nm) avec gradient (H₂O /Acétonitrile) allant de (95 :5 ; v : v) à (20 : 80 ; v : v) pendant 60min.

L'observation des profils chromatographiques de l'extrait éthanolique brut des parties aériennes de l'espèce du genre *Tuberaria* par HPLC, montre bien la richesse de ce dernier en métabolites secondaires notamment les composés phénoliques qui ont une bonne absorption à 205 et 254 nm (Fig. 27), d'où l'intérêt de le soumettre à une investigation phytochimique. Le chromatogramme montre également 2 séries de composés :

- Les composés polaires qui arrivent en premier lieu de 1 à 24 min.
- Les composés apolaires qui sortent en dernier de 32 à 58 min.

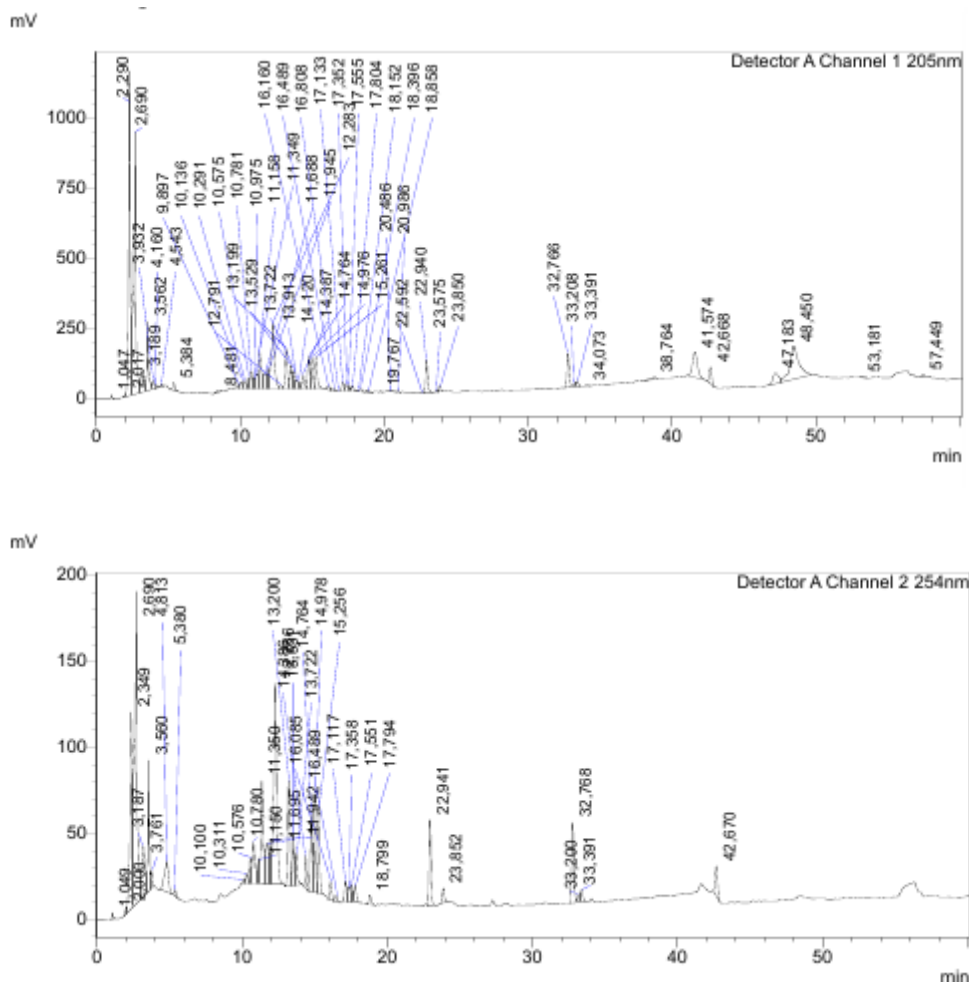


Figure 27 : Profil HPLC de l'extrait éthanolique à 205 et 254 nm.

V.3. Séparation et Purification

26 g d'extrait brut ont été initialement fractionnés par une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice greffée RP-18. L'élution effectuée dans un mélange eau-méthanol à différents gradients (70/30 à 0/100) nous a permis de récolter treize fractions.

Trois fractions (F[1], F[2] et F[3]) éluées dans un gradient 20/80 et une fraction (F[3]) élue dans un gradient 40/60 sont jugées riches en composés flavoniques grâce à un profil CCM observé sous lampe UV à deux longueurs d'onde 254 et 365 montrant des taches noires et mauves sombres respectivement, d'où notre choix de les soumettre à un fractionnement par une chromatographie sur colonne ouverte (CC) sur gel de silice et sur gel de polyamide, en vue de purifier et d'identifier leurs métabolites (Fig. 28).

La mise en œuvre de différents procédés de séparation et de purification par l'emploi des techniques chromatographiques et la précipitation, a permis d'isoler **3** composés purs.

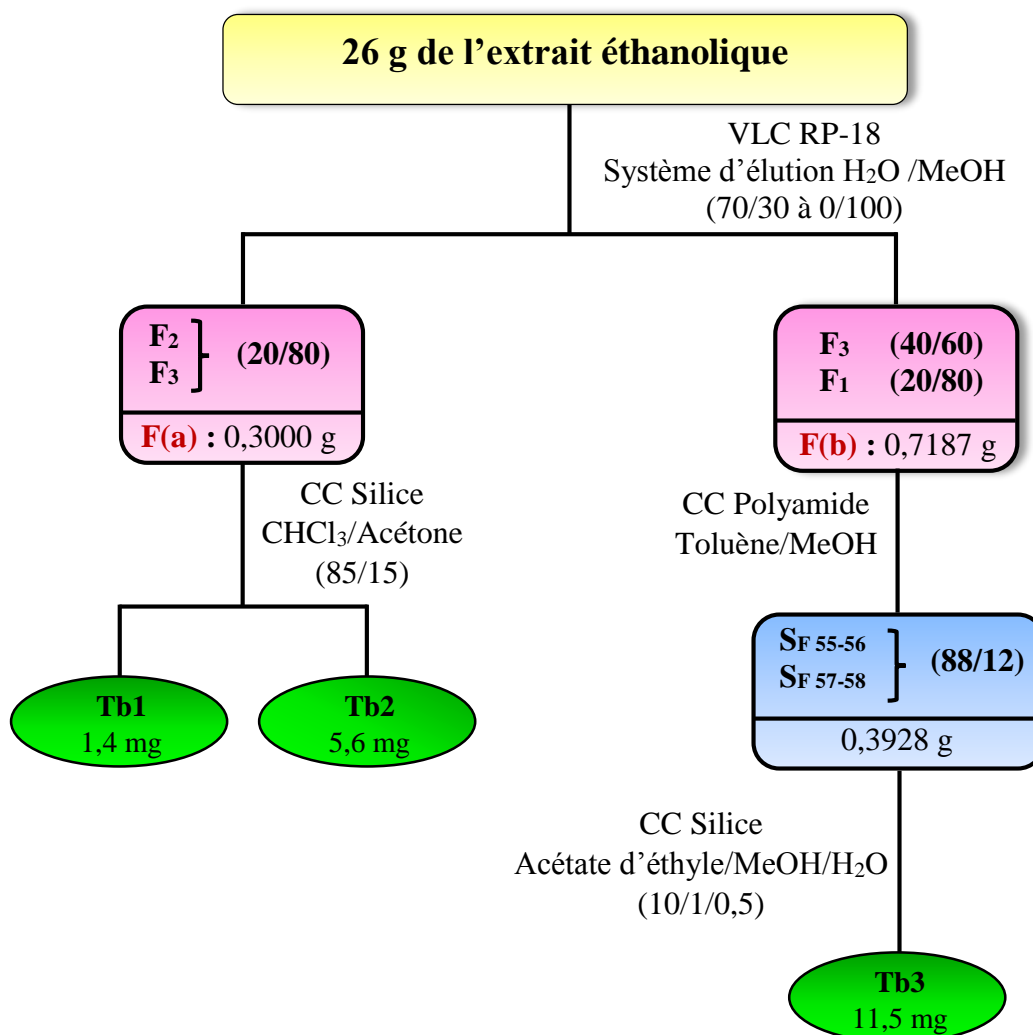


Figure 28 : les étapes de purification à partir de l'extrait éthanologique.

V.4. Elucidation structurale des composés isolés

Les structures des produits isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton ^1H et du carbone ^{13}C à une dimension, et à séquences multi-impulsionnelles à deux dimensions homonucléaires ^1H - ^1H COSY, et hétéronucléaires ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, aussi par spectrométrie UV-Visible rotatoire et par comparaison avec les données de la littérature.

L'interprétation des spectres UV enregistrés dans le méthanol et/ou en présence de réactifs spécifiques s'appuie sur des règles très connues pour les flavonoïdes ; règles décrites par

(Jurd *et al.*1962) reprises par (Mabry *et al.*1970) et complétées par (Voirin., 1983).

V.4.1. Structure du composé Tb2

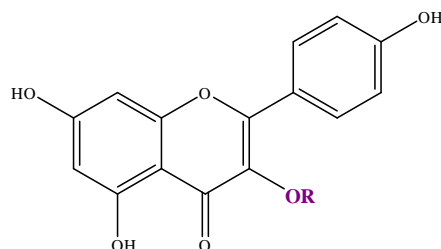
Le composé **Tb2** se présente sous forme d'une poudre jaune se révèle en jaune après révélation par une solution acide et chauffage à 100 °C. Sa fluorescence noire violette sous lampe UV à 365 nm est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol substitué en 3 (3-OR)

Cette hypothèse structurale est confirmée sur le spectre UV (Fig. 29) enregistré dans le méthanol, par la présence de deux bandes d'absorption maximale à 314 nm (bande I) et 269 nm (bande II).

L'ajout du NaOH montre un effet bathochrome ($\Delta\lambda = +52$ nm) de la bande I (Tab. 7), indiquant la présence d'un OH libre en position C4'. L'apparition d'une nouvelle bande à 311 nm dans le même spectre indique la présence d'un OH libre en position 7 (Mabry *et al.*, 1970). L'addition de NaOAc provoque un déplacement bathochromique de la bande II de 8 nm par rapport au spectre MeOH confirmant ainsi la présence d'un OH libre en position 7.

Le déplacement bathochrome de la bande I de 85 nm, observé après addition de $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ comparativement à celui enregistré dans le méthanol confirme la présence d'un OH libre en 5. Pas de déplacement hypsochrome de la bande I, en comparant les spectres $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ et AlCl_3 , ce qui prévoit l'absence de système orthodihydroxyle sur le noyau B.

Ces données sont en accord avec celles rapportées dans la littérature pour le kaempférol substitué en position 3 (Mabry *et al.*, 1970).



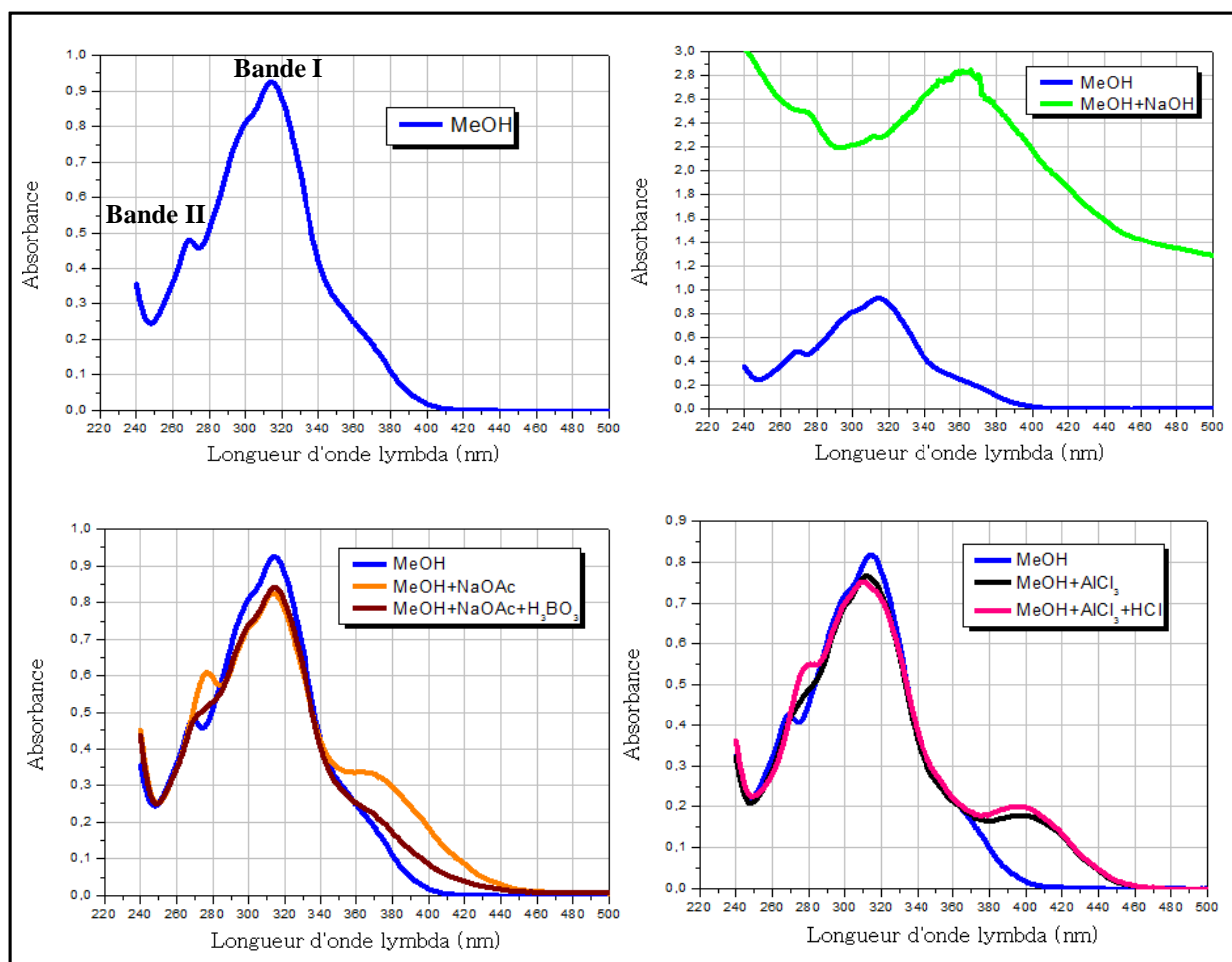


Figure 29 : Série spectrale UV du composé **Tb2**.

Les données relatives à la série spectrale UV sont rassemblées dans le tableau 7

Tableau 7 : données spectrales UV du composé **Tb2**.

Réactifs	λ_{\max}		
	Bande I (nm) cycle B	Bande II (nm) cycle A	Autres bandes
MeOH	314	269	–
NaOH	366	275	311
NaOAc	313	277	366
NaOAc+H ₃ BO ₃	315	271	–
AlCl ₃	312	272	400
AlCl ₃ +HCl	310	278	399

La nature de ce composé est mise en évidence une fois de plus par l'analyse du spectre RMN ^{13}C (Fig. 30) qui révèle l'existence d'un nombre important de signaux entre 93 et 178 ppm attribués aux carbones aromatiques de ce flavonoïde.

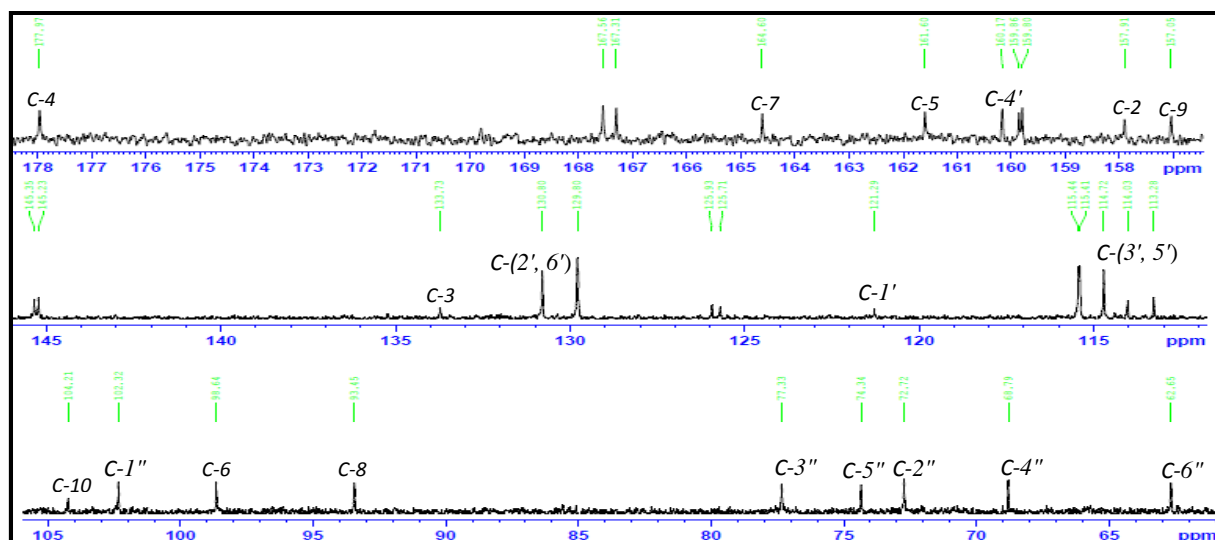


Figure 30 : Spectres de RMN ^{13}C du composé **Tb2** dans CD_3OD .

L'analyse du spectre de RMN ^1H (Fig. 31) du composé **Tb2** montre la présence de quatre signaux pour six protons aromatiques caractéristiques de la génine kaempférol :

- Un doublet à 8,82 ppm d'intégration 2H ($J= 8,7$ Hz) caractéristique des protons en couplage ortho H-2' et H-6'.
- Un doublet à 6,88 ppm d'intégration 2H ($J= 8,7$ Hz) caractéristique des protons en couplage ortho H-3' et H-5'
- UN doublet à 6,16 et un singulet à 6,34 ppm d'intégration 1H chacune, correspondent respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A.

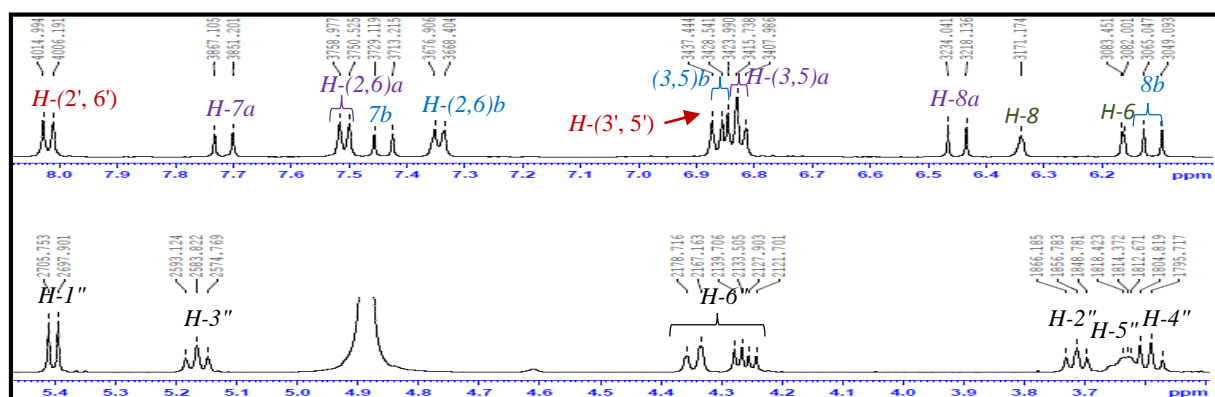


Figure 31 : Spectres de RMN ^1H du composé **Tb2** dans CD_3OD .

A partir des protons cités précédemment, l'expérience HSQC (Fig. 32) permet d'identifier les carbones C-2' (δ_c 130,8), C-5' (δ_c 114,7), C-6 (δ_c 98,6) et C-8 (δ_c 93,4).

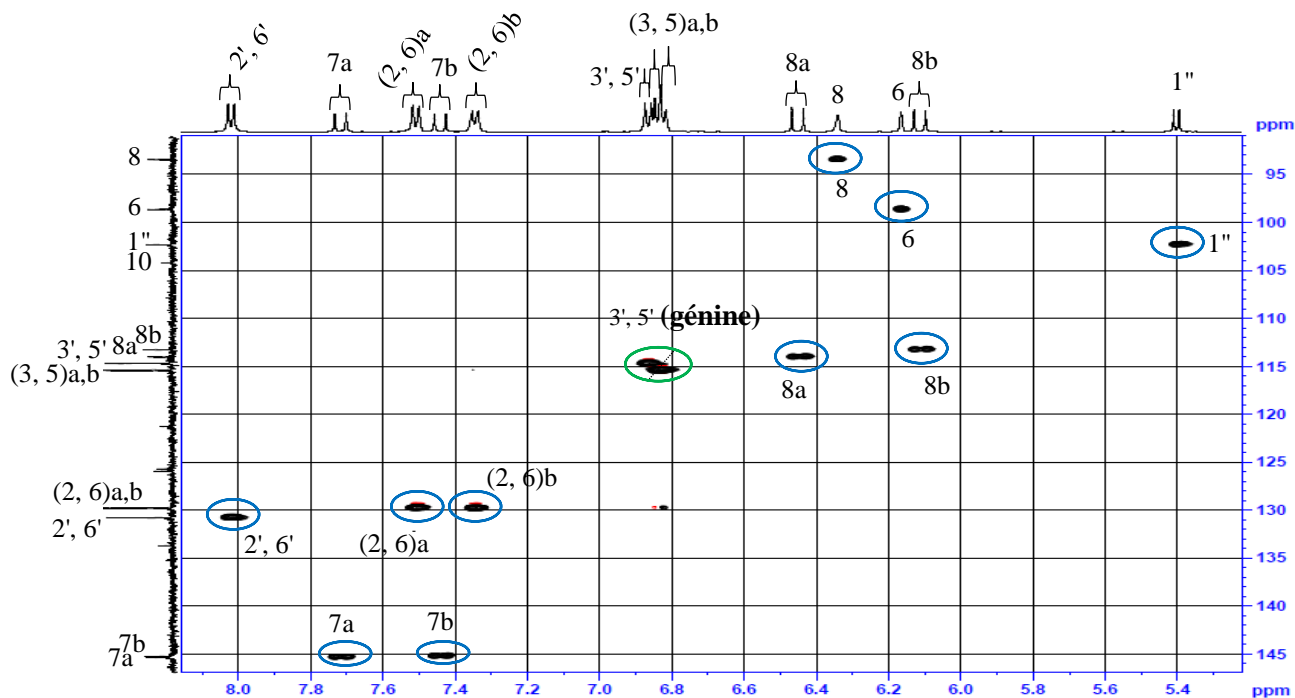


Figure 32 : Spectre HSQC (zone génine) du composé **Tb2** dans CD_3OD

En dehors des signaux correspondants à la génine, l'analyse du spectre de RMN 1H permet de repérer un proton anomérique résonnant à 5,40 (d, $J = 7,8$ Hz). Ces données suggèrent la présence d'une seule unité osidique.

A partir du proton anomérique à 5,40 ppm (d, $J = 7,8$ Hz), l'expérience COSY (Fig. 33) permet de mettre en évidence la présence de sept protons d'un hexose. Les constantes de couplage vicinales, mesurées à partir du spectre de RMN 1H , entre les protons H-1' et H-2' ($J=7,8$ Hz), H-2' et H-3' ($J = 8,0$ Hz), H-3' et H-4' ($J = 9,1$ Hz) et H-4' et H-5' ($J = 9,1$ Hz) sont toutes supérieures à 7 Hz, ce qui indique qu'ils sont tous trans-diaxiaux. Ceci est caractéristique d'un β -D-glucopyranose.

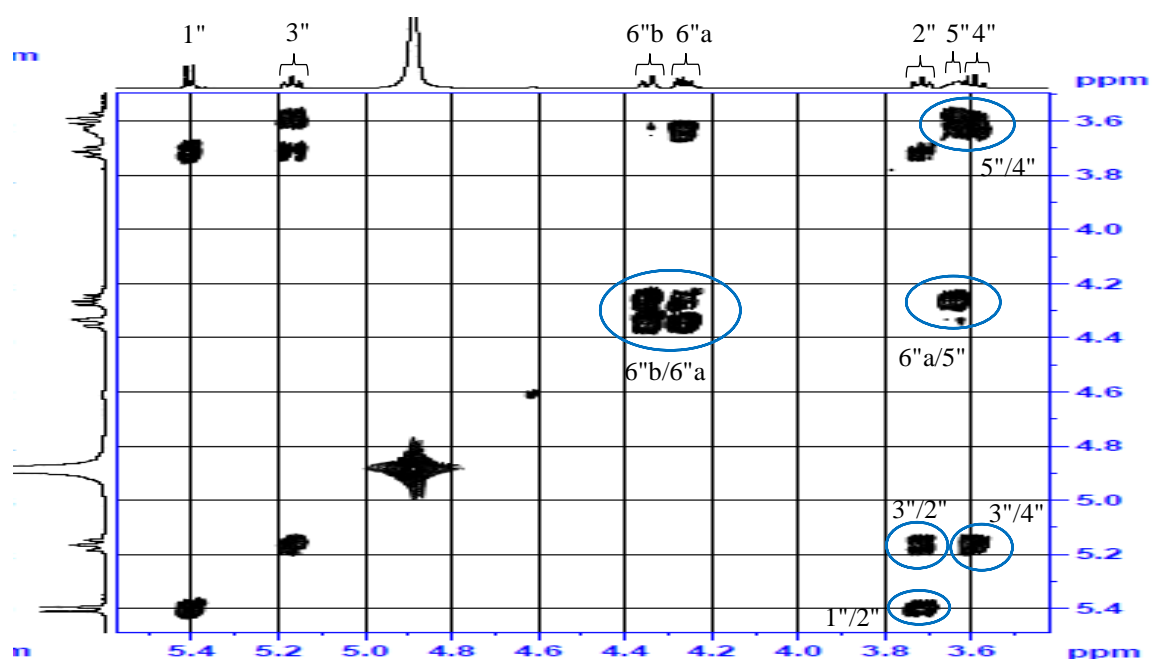


Figure 33 : Spectre COSY du composé **Tb2** dans CD_3OD

Le glucose est fixé sur la génine kaempférol en position 3 comme l'atteste la corrélation HMBC (Fig. 34) entre le carbone C-3 et le proton anomérique H-1'' du glucose.

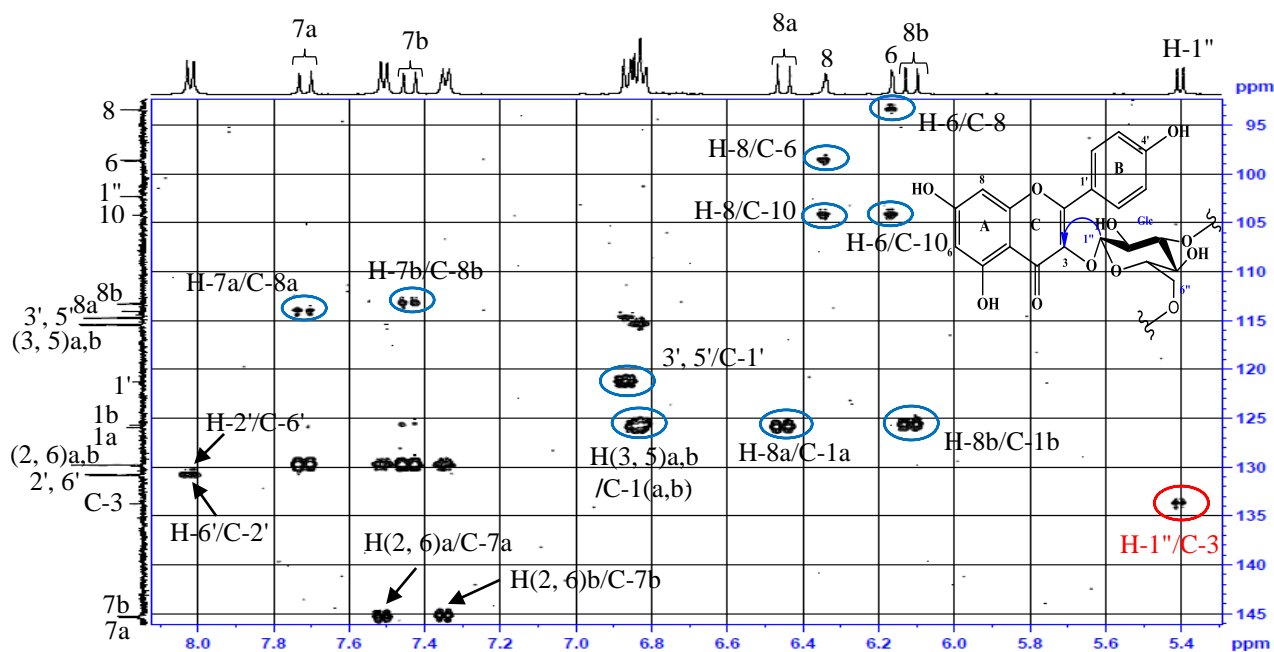
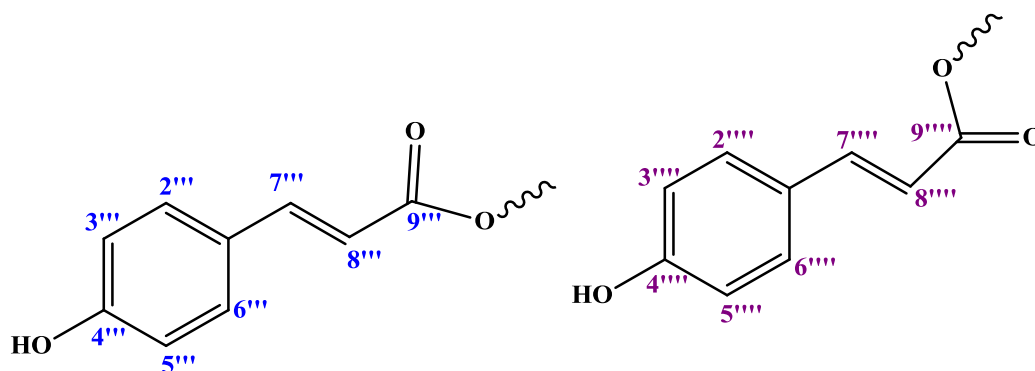


Figure 34 : Spectre HMBC du composé **Tb2** dans CD_3OD

Le spectre RMN- 1H montre également, à part les signaux des protons kaempférol glycosylé en position 3 :

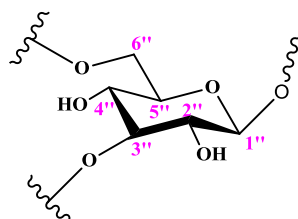
Des signaux aromatiques à δ_H 7,34 (2H, *d*, $J = 8,1$ Hz) δ_H 7,51 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz), δ_H 6,82 (2H, *d*, $J = 8,3$ Hz), et δ_H 6,84 (2H, *d*, $J = 8,3$ Hz), caractéristiques de deux noyaux aromatiques para-substitués, correspondant aux protons H-2'''/H-6''', H-2'''/H-6''', H-3'''/H-5''' et H-3'''/H-5''' respectivement.

- Des signaux des protons oléfiniques à δ_H 6.11 (H-8'''), δ_H 6.45 (H-8''') et δ_H 7.44 (H-7''') et δ_H 7.72 (H-7''') sont visualisés aussi sur le spectre RMN 1H , de plus la constante de couplage entre leurs doublets ($J = 16.0$ Hz) indiquent une géométrie *trans* d'une liaison β . Ces données attestent de la présence de deux groupements *p*-coumaroyl.



Deux groupements *p*-coumaroyl

Le déblindage des protons H-3'' (δ_H 5.16) et H-2-6'' [H-6''a (δ_H 4.26), H-6''b (δ_H 4.35)] du β -D-glucopyranoside [δ_H 4,32 (*dl*, $J = 11,2$ Hz), H-6''a, 4,21 (*dd*, $J = 11,2 ; 6$ Hz), H-6''b] indique que les carbones C-3'' et C-6'' sont acylés par les groupements coumaroyl.



La corrélation en HMBC entre H-2-6'' et C-9''' indique que le carbone C-6'' est acylé par le groupement coumaroyl. De même, un carbonyle résonnant à δ_C 167.5 ppm corréle avec les protons le proton H-3'' du glucose confirme l'attachement du deuxième groupement coumaroyl en C-3'' du glucose (Fig. 35).

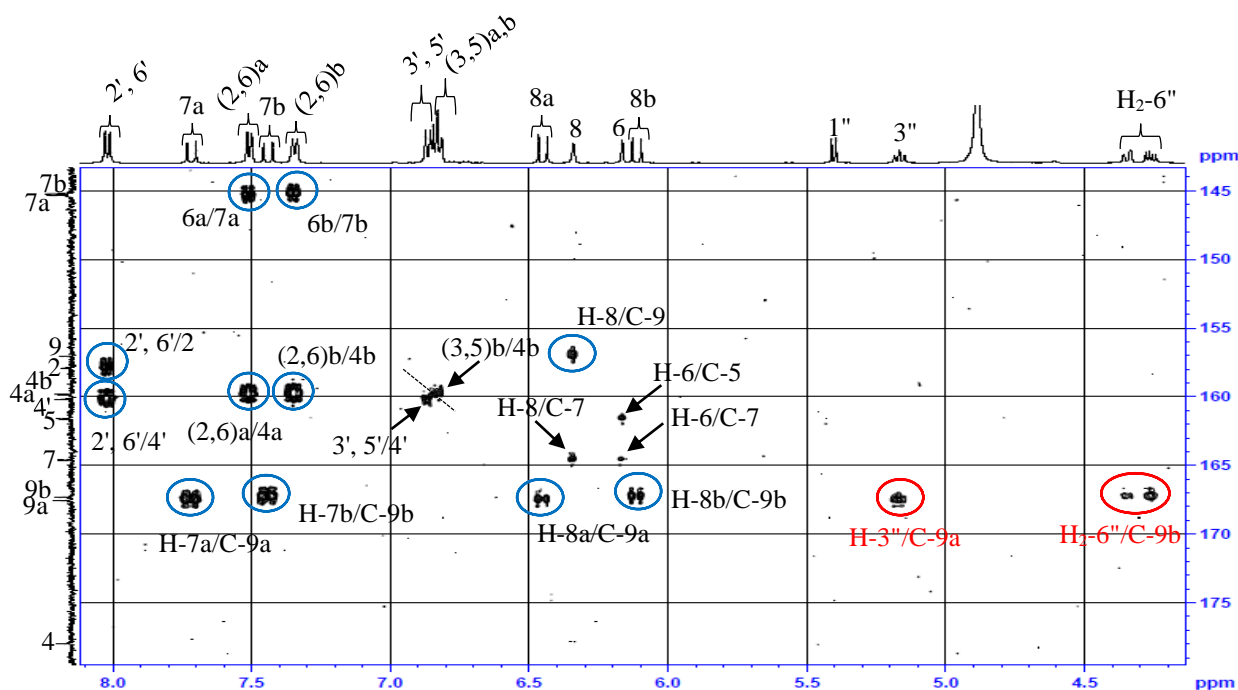
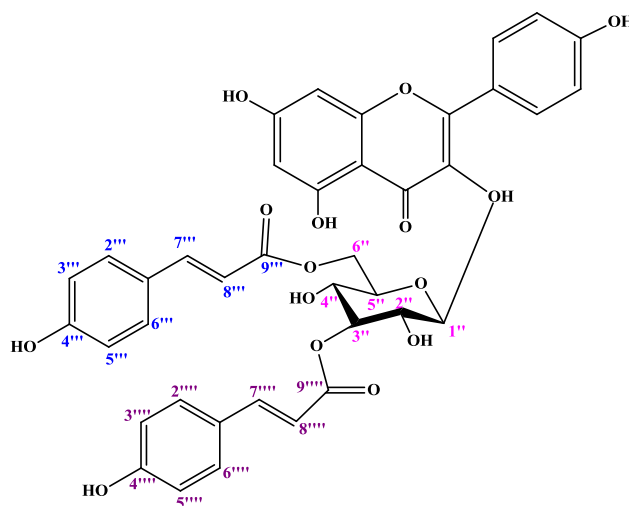


Figure 35 : Spectre HMBC du composé **Tb2** dans CD₃OD

L'ensemble de ces données spectrales ainsi que la comparaison avec les données trouvées dans la littérature, nous permettent de déterminer la structure du composé **Tb2** comme étant le kaempférol 3-*O*-(3'',6''-di-*O*-*E*-*p*-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside.

Ce composé est isolé pour la première fois de l'espèce *Stenochlaena palustris* (Burm.) (Pteridaceae) (Chear *et al.*, 2016) puis d'*Halimium halimifolium* (L.) Wilk (Cistaceae) (Kerbab., 2017) mais il a été identifié pour la première fois dans le genre *Tuberaria*.



Kaempférol 3-*O*-(3'',6''-di-*O*-*E*-*p*-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside (**Tb2**)

Tableau 8 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) du composé **Tb2** dans CD₃OD.

Position	δ _C	δ _H (m, J= Hz)		δ _H (m, J= Hz)	δ _C		δ _H (m, J= Hz)	δ _C		δ _H (m, J= Hz)	δ _C
2	157,9	-	3-O-B-D-Glc			3''-O-(E)-p-coumaroyl			6''-O-(E)-p-coumaroyl		
3	133,7	-	1''	5,40 (d, 7,8)	102,3	1a	-	125,9	1b	-	125,7
4	177,9	-	2''	3,71 (t, 8,0)	72,7	2a	7,51 (d, 8,5)	129,8	2b	7,34 (d, 8,5)	129,8
5	161,6	-	3''	5,16 (t, 9,9)	77,3	3a	6,84 (d, 8,3)	115,4	3b	6,82 (d, 8,3)	115,4
6	98,6	6,16 (d, 2,0)	4''	3,58 (t, 9,1)	68,8	4a	-	159,8 6	4b	-	159,8
7	164,6	-	5''	3,63 m	74,3	5a	6,84 (d, 8,3)	115,4	5b	6,82 (d, 8,3)	115,4
8	93,4	6,34 (s, large)	6''	4,26 (dd, 11,2- 6,2)	62,6	6a	7,51 (d, 8,5)	129,8	6b	7,34 (d large, 8,5)	129,8
				4,35 (d large, 11,7)							
9	157,0	-				7a	7,72 (d, 16,0)	145,3	7b	7,44 (d, 16,0)	145,2
10	104,2	-				8a	6,45 (d, 16,0)	114,0	8b	6,11 (d, 16,0)	113,1
1'	121,3	-				9a	-	167,5	9b	-	167,2
2'	130,8	8,82 (d, 8,7)									
3'	114,7	6,88 (d, 8,7)									
4'	160,2	-									
5'	114,7	6,88 (d, 8,7)									
6'	130,8	8,82 (d, 8,7)									

V.4.2. Structure du composé **Tb3**

Ce composé est obtenu sous forme d'une poudre jaune visible en UV à 254 et 366 nm, il se colore en jaune par pulvérisation de l'acide sulfurique et chauffage. La fluorescence violette sombre du composé **Tb3** sous la lampe UV à 365 nm suggère qu'il s'agit d'une flavone ou flavonol substitué en 3 (3- OR) (**Mabry et al., 1970**).

Le spectre UV de **Tb3** dans le méthanol présente deux bandes d'absorbance maximales : la bande I à 360 nm et la bande II à 257 nm (Fig. 36), attestant de la présence d'un squelette flavonol-3-OR

L'ajout du NaOH induit un déplacement bathochromique de 46 nm pour la bande I avec augmentation de son intensité lumineuse indiquant la présence d'un OH libre en position C4'. L'apparition d'une nouvelle bande à 324 nm dans le même spectre est expliquée par la présence d'un groupement OH libre en position C7.

L'addition de NaOAc provoque un déplacement bathochromique de la bande II de 16 nm par rapport au spectre MeOH confirmant ainsi la présence d'un OH libre en position C7.

La présence du système orthodihydroxy sur le noyau B est expliquée par le déplacement hypsochrome de la bande I (9 nm) en comparant les deux spectres AlCl₃ et AlCl₃+ HCl et par le déplacement bathochrome (21 nm) de la bande I dans le spectre NaOAc + H₃BO₃ par rapport au spectre MeOH.

Le spectre UV enregistré dans le chlorure d'aluminium acidifié (AlCl_3+HCl) est caractérisé par un déplacement bathochromique de 42 nm de la bande I comparativement au spectre enregistré dans le MeOH neutre (Tab. 8), ce qui attribue un autre groupe OH libre à la position C5. Ces données spectrales UV concordent avec celles rapportées dans la littérature pour la quercétine substituée en position C3 (Mabry *et al.*, 1970).

Ces données permettent de suggérer partiellement au composé 3, la structure ci-dessous :

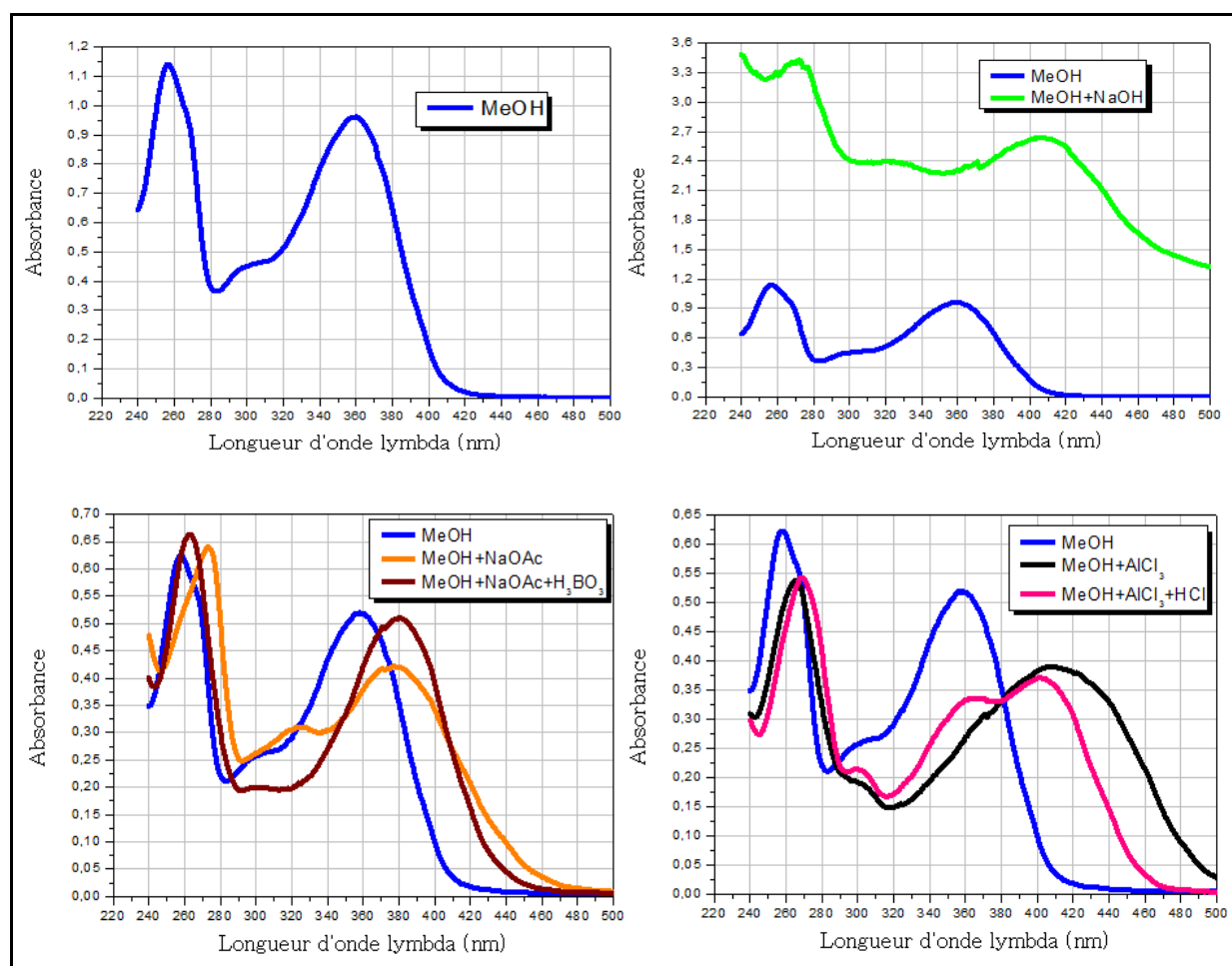
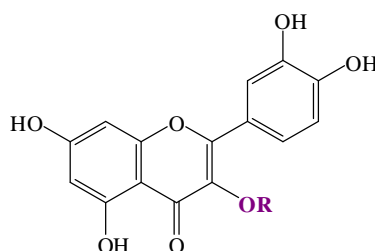


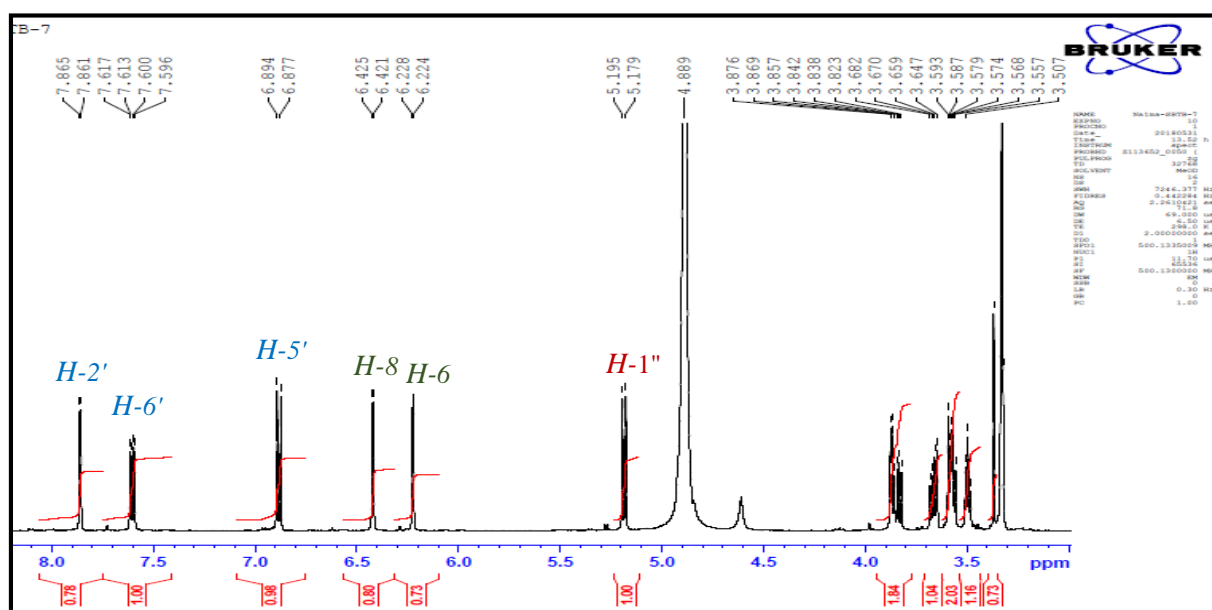
Figure 36 : Série spectrale UV du composé Tb3

Tableau 9 : données spectrales UV du composé **Tb3**

Réactifs	λ_{max}		
	Bande I (nm) cycle B	Bande II (nm) cycle A	Autres bandes
MeOH	360	257	–
NaOH	406	272	324
NaOAc	380	273	–
NaOAc+H ₃ BO ₃	381	263	–
AlCl ₃	411	265	–
AlCl ₃ +HCl	402	269	368

Le spectre de RMN ¹H (Fig. 37) du composé **Tb3** montre cinq protons aromatiques caractéristiques de la quercétine :

- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à δ_{H} 6,22 ($J = 2,0\text{Hz}$), le second à δ_{H} 6,42 ($J = 2,0\text{Hz}$) attribuables à H-6 et H-8, respectivement, pour le cycle A. En outre, le cycle B est présenté par des signaux d'un système ABX à δ_{H} 6,88, 7,61 et 7,86, caractéristiques respectivement des protons H-5' ($d, J = 8,5\text{ Hz}$), H-6' ($dd, J = 8,5 - 2,1\text{ Hz}$) et H-2' ($d, J = 2,1\text{ Hz}$). En plus des signaux de la quercétine, un signal d'un proton anomérique a δ_{H} 5,18 ppm ($d, J = 7,8\text{ Hz}$).

**Figure 37** : Spectres de RMN ¹H du composé **Tb3** dans CD₃OD.

L'analyse combinée des spectres de RMN COSY, HSQC et HMBC du composé **Tb3** permet de retrouver les mêmes signaux osidiques décrits pour la partie osidique du flavonoïde **Tb2**, il s'agit donc d'un β -D-glucopyranose.

La corrélation observée sur le spectre HMBC (Fig. 38) entre le proton anomérique et le carbone C-3 confirme bien la substitution du carbone C-3 par le glucose.

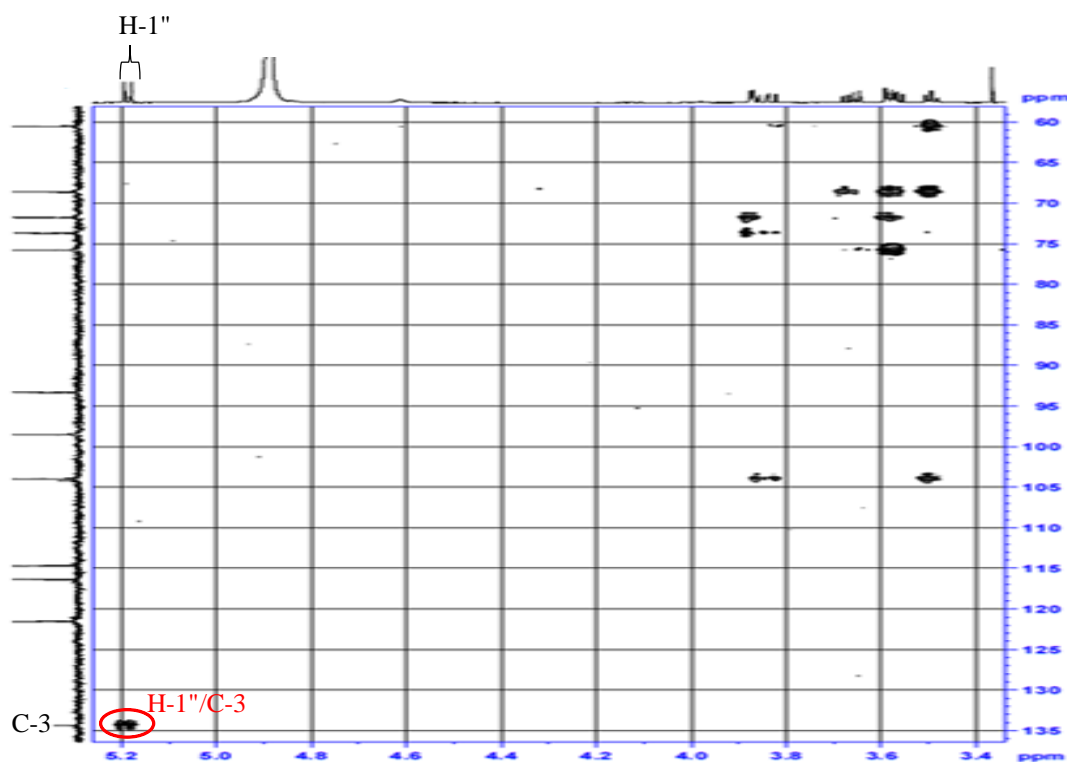
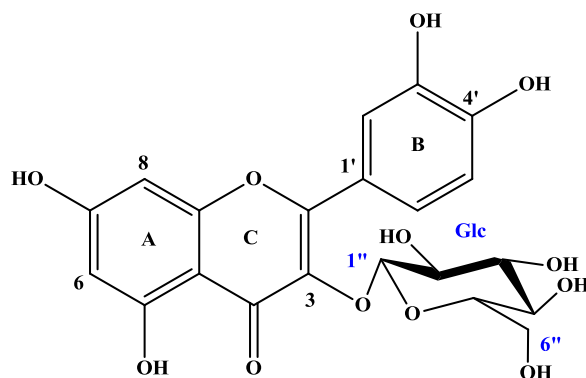


Figure 38 : Spectres HMBC du composé Tb3 dans CD₃OD.

Cette structure s'est avérée identique à celle de la quercétine-3-*O*- β -D-glucopyranoside. Ce composé appelé Isoquercitrine (Isoquercétrine) a été isolé antérieurement des espèces appartenant à la famille Cistaceae comme *Helianthemum glomeratum* (Calzada et Alanis., 2007), *Helianthemum sessiliflorum* (Benabdelaziz et al., 2015), *Cistus ladanifer* (Lorente et al., 1992), *Cistus incanus* (Riehle et al., 2013) et *Tuberaria lignosa* (Pinela et al., 2012).



Quercétine-3-O-β-D-glucopyranoside (Tb3)

Tableau 10 : Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) du composé Tb3 dans CD₃OD.

Position	δ _C	δ _H (m, J= Hz)	Position	δ _C	δ _H (m, J= Hz)
2	157,4	-	Glc en C-3		
3	134,4	-	1''	104,0	5,18 (d, 7,8)
4	178,1	-	2''	71,7	3,84 (dd, 9,3-7,7)
5	161,6	-	3''	73,7	3,59 (dd, 9,0-2,8)
6	98,5	6,22 (d, 2,0)	4''	68,6	3,88 (dl, 2,9)
7	164,8	-	5''	75,8	3,50 (dd, 6,1)
8	93,3	6,42 (d, 2,0)	6''	60,5	3,58 (dd, 11,4-6,3)
9	157,1	-			3,67 (dd, 11,3-5,9)
10	104,2	-			
1'	121,5	-			
2'	116,4	7,86 (d, 2,1)			
3'	144,4	-			
4'	148,6	-			
5'	114,7	6,88 (d, 8,5)			
6'	121,5	7,61 (dd, 8,5-2,1)			

V.5. Evaluation du potentiel antioxydant

Selon la recherche bibliographique et compte tenu de la complexité des mécanismes d'oxydation (Huang et al., 2005 ; Prior et al., 2005), il est bien claire qu'une seule méthode n'est pas suffisante pour caractériser le potentiel antioxydant d'un échantillon. Il nous a fallu donc une combinaison de cinq méthodes complémentaires basées sur deux mécanismes d'action ; un effet scavenger (DPPH, ABTS, DMSO Superoxyde) et une activité réductrice du fer (pouvoir réducteur) et du cuivre (CUPRAC). Ces tests ont montré visiblement un

changement de couleur qui a été analysé par spectrophotométrie à des longueurs d'onde spécifiques. Les antioxydants de référence utilisés sont bien le BHA et le BHT.

Nous présentons ci-dessous, les résultats des différentes activités antioxydantes de l'extrait brut ainsi que des cinq fractions choisies à partir de la VLC.

V.5.1. Test de l'activité scavenger du radical DPPH^{*}

Ce test a pour objectif d'évaluer l'activité inhibitrice des échantillons sur un radical stable DPPH^{*} dissous dans une solution méthanolique. En effets, les résultats de l'absorbance des huit échantillons testés, y compris le BHA et le BHT, sont obtenus après une lecture à 517nm. Ceux-ci ont permis de tracer les courbes de pourcentage d'inhibition de chaque échantillon en fonction de leurs concentrations (Fig. 39).

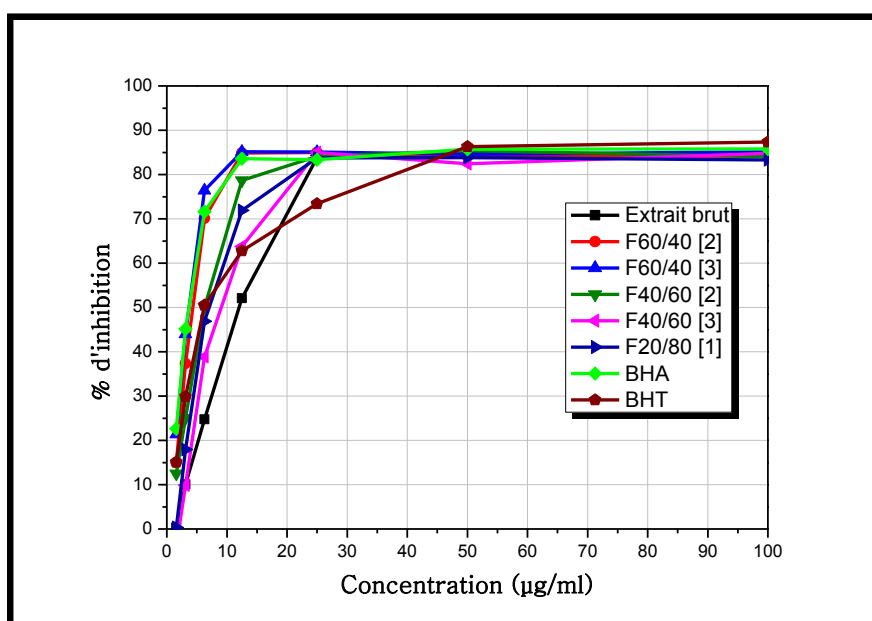


Figure 39 : Courbes des pourcentages d'inhibition du radical DPPH^{*}

Cette figure révèle que tous les échantillons testés ont une activité antiradicalaire dose dépendante vis-à-vis du DPPH^{*}, jusqu'à ce qu'ils atteignent la région asymptotique de la courbe qui se caractérise par une inhibition presque totale des radicaux DPPH^{*}. Cette zone est précoce pour le BHA, F60/40 [2] et F60/40 [3] (~12 µg/ml). Elle est un peu tardive pour les autres échantillons (~25 µg/ml) et plus tardive pour le BHT qui montre une activité dose indépendante à partir de 50 µg/ml.

Les résultats obtenus ont été également utilisés pour la détermination de la valeur de IC_{50} , ce qui permettra par la suite une évaluation de l'activité des échantillons par rapport à celles des deux standards.

✧ Détermination des IC_{50}

Les valeurs de IC_{50} exprimées en $\mu\text{g/ml}$ sont déterminées graphiquement à l'aide d'un logiciel statistique (OriginePro 8) permettant une analyse de la droite de régression non linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction du logarithme décimal des différentes concentrations préparées (Fig. 40). Plus la valeur de IC_{50} est faible plus l'activité antioxydante de l'échantillon est forte.

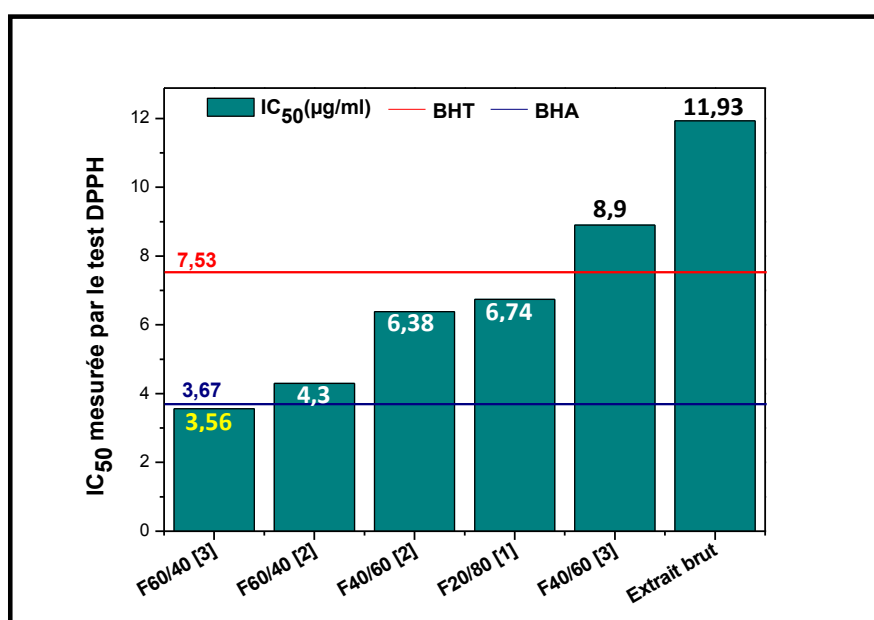


Figure 40 : les IC_{50} des échantillons testés classés par ordre croissant (DPPH).

Les résultats d' IC_{50} , inversement proportionnelles à l'activité antiradicalaire, sont compatibles avec le niveau de décoloration de la solution DPPH (Fig. 41)

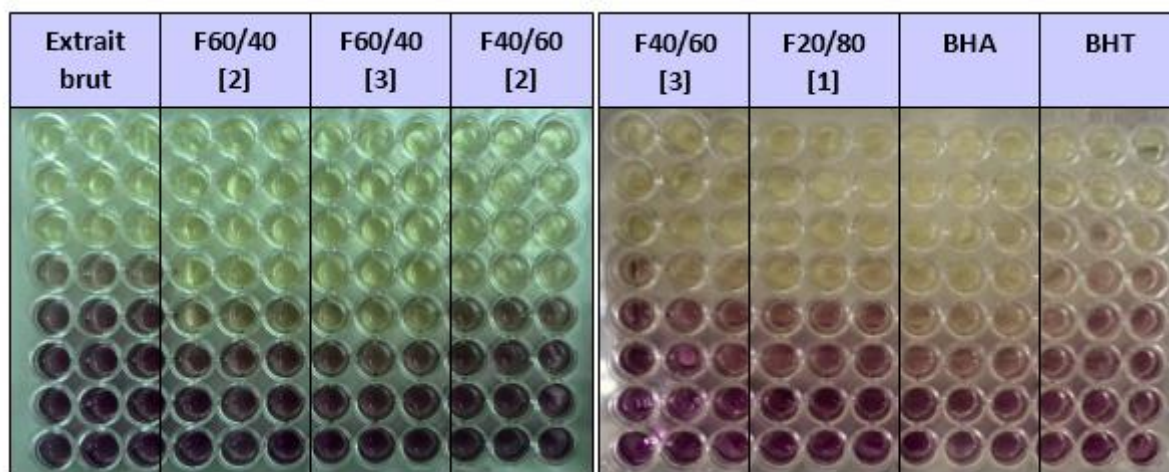


Figure 41 : Photo prises lors du dosage de l'activité antiradicalaire DPPH

A partir des valeurs d' IC_{50} , on constate que tous les échantillons testés possèdent un potentiel antioxydant intéressant vis-à-vis du DPPH^{*} qui peut même dépasser celui des standards. C'est le cas par exemple de la F60/40 [3] qui a une concentration d'inhibition de l'ordre de $3,56 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$, comparable à celle du BHA ($=3,67 \pm 0,18 \mu\text{g/ml}$), et deux fois moins élevée à celle du BHT ($= 7,53 \pm 1,26 \mu\text{g/ml}$). Concernant la F60/40 [2], son pouvoir antioxydant s'est traduit par une valeur d' IC_{50} ($= 4,3 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$) assez proche du standard BHA. Alors que les F40/60 [2], F20/80 [1] et F40/60 [3] ont montré une activité proche du BHT.

D'autre part, l'extrait brut éthanolique s'est avéré moins actif par rapport aux autres fractions avec une $IC_{50} = 11,93 \pm 0,38 \mu\text{g/ml}$, 3 fois moins importante à celle du BHA. Ceci peut s'expliquer par les interactions antagonistes entre les différents composés de la plante.

En comparant ces résultats du test DPPH à ceux de (José et al., 2012), qui rapportent des valeurs d' $IC_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$ pour l'espèce *Tuberaria lignosa* testé sous forme d'extrait aqueux (décoction et infusion), il est bien évident que notre espèce détient un fort potentiel antioxydant attribuable à sa richesse en polyphénols, plus particulièrement en composés flavoniques.

Par ailleurs, l'activité antioxydante de notre extrait brut est significativement supérieure à celles des extraits aqueux et méthanolique des feuilles de 11 espèces du genre *Helianthemum* (Cistaceae) obtenues par les travaux de (Rubio-Moraga et al., 2013) avec des IC_{50} comprises entre 25,3 et 66,2 $\mu\text{g/ml}$.

Il est à signaler que l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique des parties aériennes de l'espèce *Helianthemum confertum* s'est manifestée très active comparativement à notre espèce avec une valeur d' IC_{50} de 0,0031 $\mu\text{g/ml}$ (Palici., 2016).

Selon (Turkmen et al., 2007) les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale.

V.5.2. Test de l'activité scavenger du radical l'ABTS^{•+}

L'activité scavenger des échantillons a été également étudiée en utilisant l'ABTS^{•+}. Ce dernier doit être généré avant l'ajout des échantillons afin d'éviter l'interférence des composés dans la formation du radical ce qui conduit à une surestimation de la capacité antioxydante (Katalinic et al., 2006) Après avoir additionné les extraits et les standards, une décoloration de la solution ABTS s'est produite (Fig. 42), ce qui indique l'existence d'une activité scavenger des échantillons testés.

Afin de calculer les concentrations inhibitrices de chaque échantillon à 734 nm, un traitement des résultats de pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations est réalisé par OriginePro 8 (Fig. 43 ; 44).

A cause des contraintes liés à la forte sensibilité du radical cationique ABTS^{•+} aux substances antioxydantes, nous étions obligés d'établir une gamme de dilution beaucoup plus étendue que celle du test précédent.

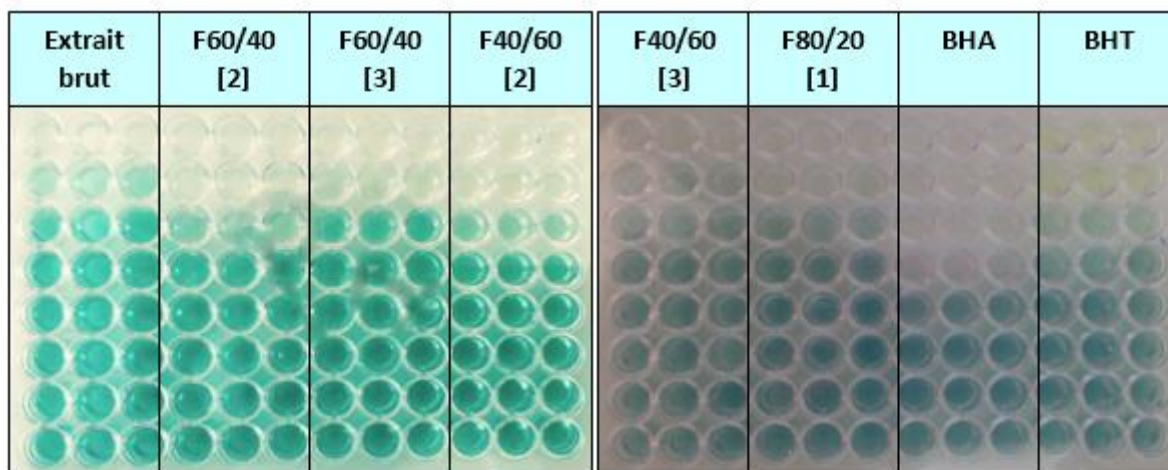


Figure 42 : Photo prises lors du dosage de l'activité antiradicalaire ABTS

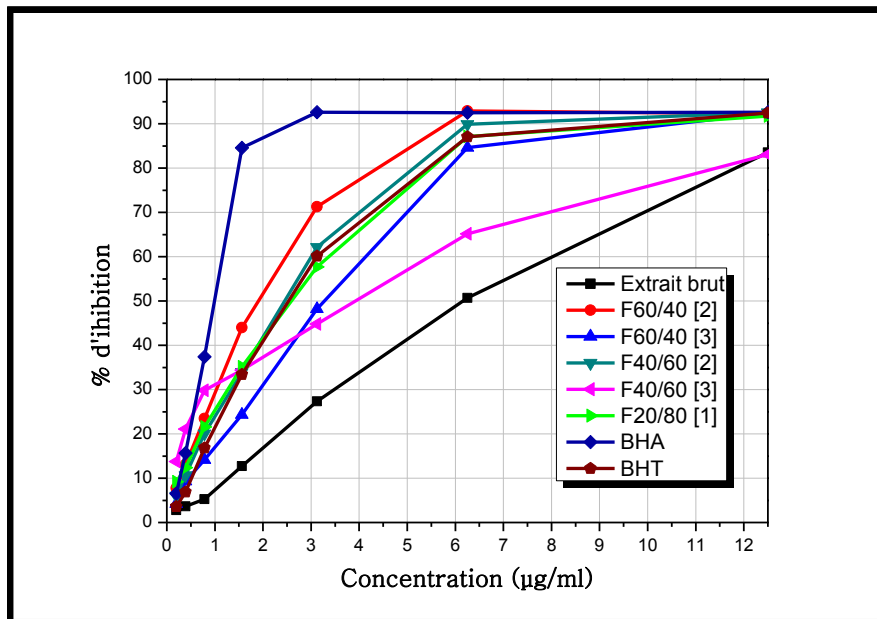


Figure 43 : Courbes des pourcentages d'inhibition du radical ABTS*+

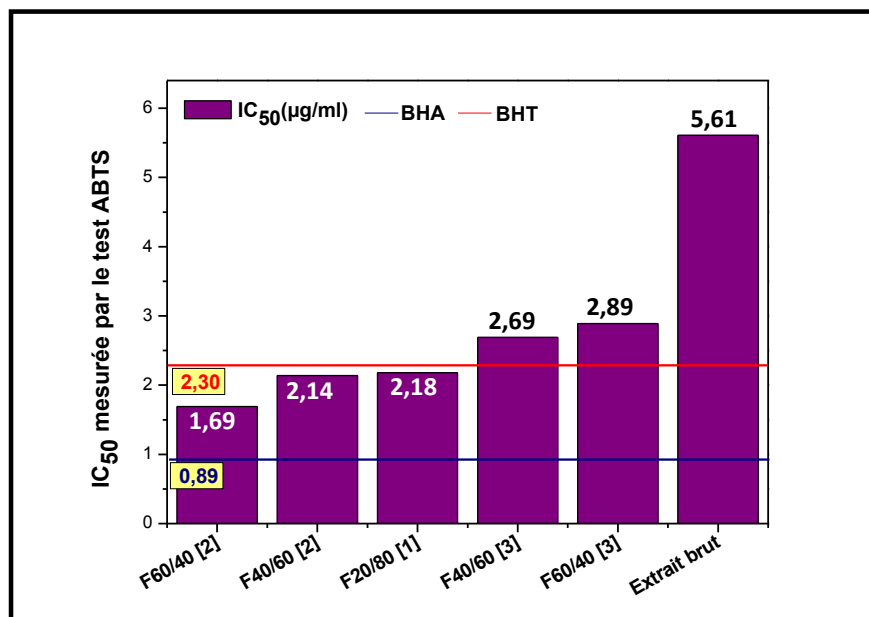


Figure 44 : les IC₅₀ des échantillons testés classés par ordre croissant (ABTS).

Le test a montré que les différentes fractions testées possèdent un pouvoir antioxydant assez important. Ce pouvoir est confirmé par des valeurs d'IC₅₀ faibles et des pourcentages d'inhibition importants. Alors, on constate que la F60/40 [2] représente la fraction la plus active avec une IC₅₀ de l'ordre de 1,69±0,04 supérieure à celle du BHA (0,89±0,04 µg/ml) et inférieure à celle du BHT (2,30±0,21 µg/ml). Pour ce qui est des fractions F60/40 [2] et F20/80 [1], elles exhibent des IC₅₀ similaires de l'ordre de 2,14±0,07 et 2,18±0,10 µg/ml, s'approchant ainsi à celle du

BHT. Cet rapprochement est également manifesté par les F40/60 [3] et F60/40 [3] mais avec des valeurs d'IC₅₀ un peu plus élevées.

Notre extrait brut éthanolique a révélé une activité antioxydante presque 2 et 2,5 fois supérieure à celle trouvée pour l'extrait éthanolique des feuilles et des fleurs d'*Halimium halimifolium* (Cistaceae) respectivement (**Rebaya et al., 2014**). Ce même extrait a également montré une activité antiradicalaire nettement supérieure à celles des extraits aqueux et méthanolique obtenues par (**Rubio-Moraga et al., 2013**) pour leur étude portant sur 11 espèces d'*Helianthemum* (Cistaceae) avec des IC₅₀ oscillant entre 6,15 et 108,65 µg/ml.

V.5.3. Test de l'activité scavenger du radical O₂^{•-} (Méthode DMSO alcalin)

Contrairement aux tests précédents (ABTS, DPPH), le pourcentage d'inhibition du radical superoxyde est calculé selon cette formule :

$$AA (\%) = [(A_{\text{Extrait}} - A_{\text{Contrôle}}) / A_{\text{Extrait}}] \times 100$$

La représentation graphique (Fig. 45) montre que les pourcentages d'inhibition du radical superoxyde sont proportionnel à la concentration des fractions, d'extrait brut et des standards.

A 560 nm, nous avons constaté une diminution des absorbances due à la non réduction du NBT²⁺ par l'antioxydant qui s'est engagé au phénomène de piégeage du radical superoxyde.

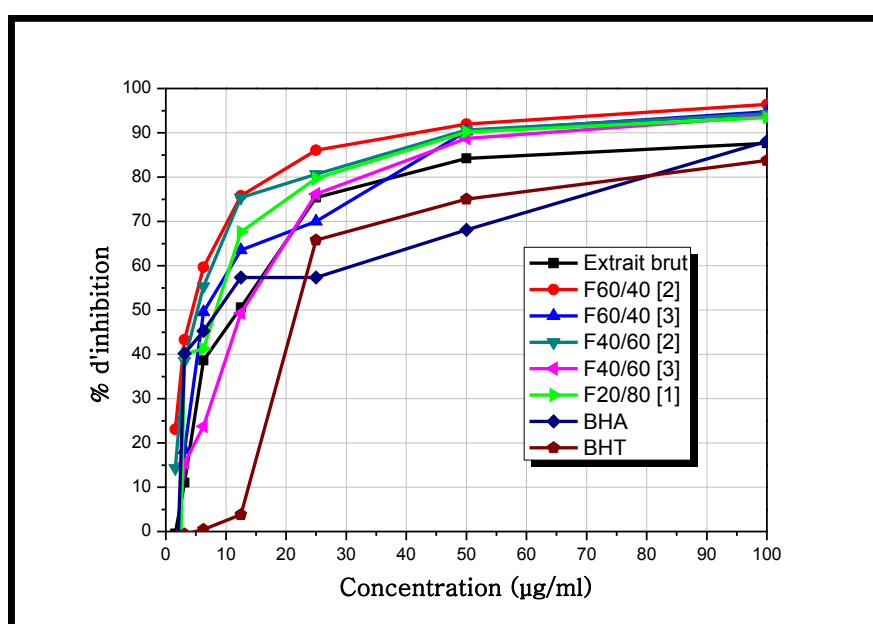


Figure 45 : Courbes des pourcentages d'inhibition du radical O₂^{•-}

Les résultats obtenus sont parfaitement cohérents au virage colorimétrique observé au moment où l'on avait déposé les échantillons (Fig. 46).

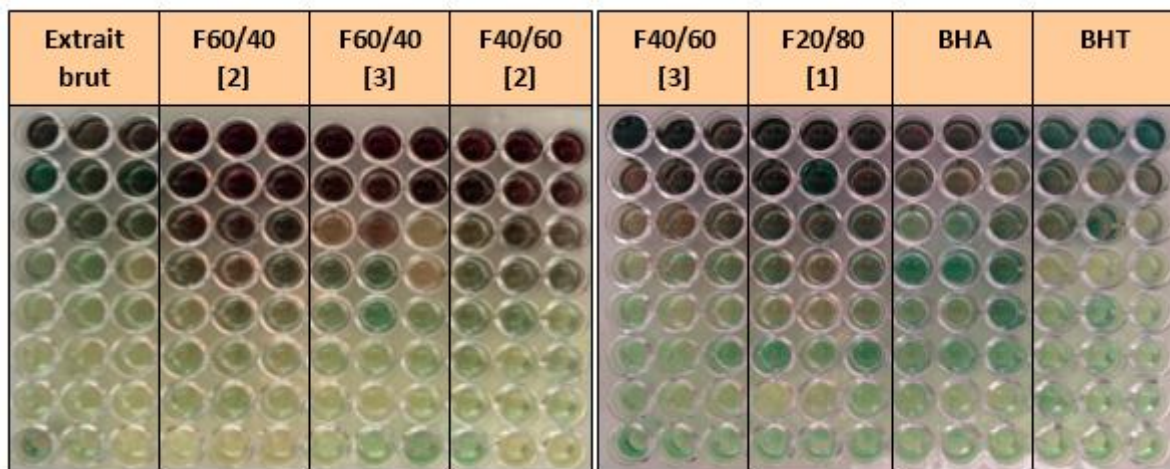


Figure 46 : Photos prises lors du dosage de l'activité Superoxyde DMSO alcalin

Les résultats d' IC_{50} montrent clairement que tous les échantillons testés possèdent une propriété antioxydante excellente qui excède largement celle du standard BHT (Fig. 47). C'est le cas par exemple de la F60/40 [2] qui détient le potentiel le plus actif avec une IC_{50} environ 5,5 fois inférieure à celle du BHT et 2,5 fois inférieure à celle du BHA. Les 3 fractions 40/60 [2], 20/80 [1], et 60/40 [3] ont également présenté une activité antiradicalaire significativement élevée en les comparant avec le contrôle positif BHA. Tandis que l'extrait brut a montré une activité d'inhibition du radical superoxyde proche de celle du BHA. Seule la F40/60 [3] a manifesté une activité inhibitrice légèrement inférieure à celle du BHA avec une ΔIC_{50} de 1,8 $\mu\text{g/ml}$.

Ces résultats confirment encore une fois le pouvoir antioxydant majeur de notre espèce mettant en évidence sa richesse en composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes.

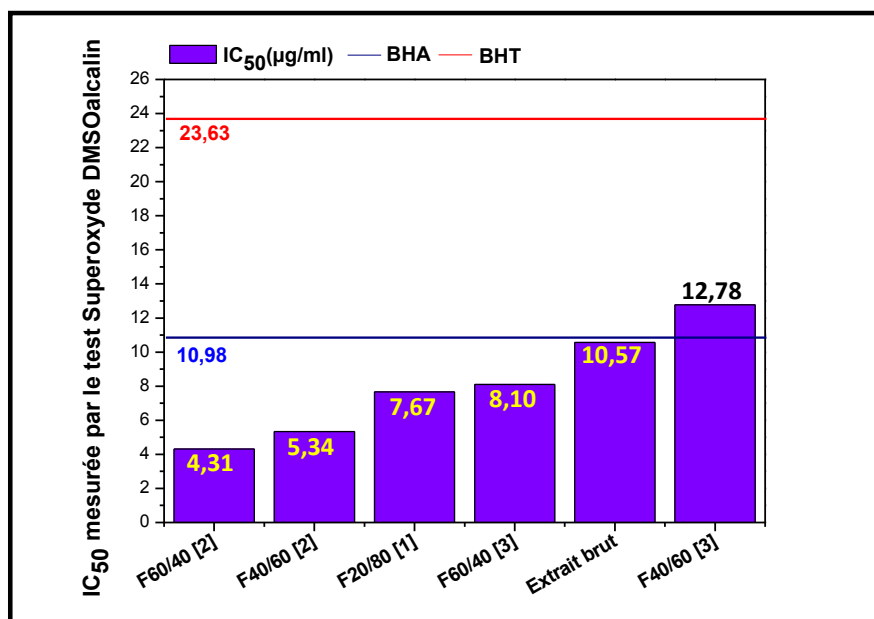


Figure 47 : les CI₅₀ des échantillons testés classés par ordre croissant (DMSO).

V.5.4. Test de l'activité réductrice de l'ion cuprique (CUPRAC)

L'activité réductrice a été étudiée par une méthode impliquant un réactif beaucoup plus stable et facilement accessible (le complexe $[Cu^{2+}-Nc]$) que les réactifs radicalaires chromogènes ABTS et DPPH. En mesurant la capacité de réduction cuprique d'un échantillon à 450 nm, ce test peut indirectement mais efficacement refléter le pouvoir antioxydant total de l'échantillon même si aucune espèce radicalaire n'est impliquée dans le test (Apak *et al.*, 2013).

Les $A_{0,5}$ sont déterminées graphiquement à partir des droites de régression linéaire des absorbances en fonction des concentrations, tracées par le logiciel OriginPro 8 (Fig. 48). Ces résultats sont représentés par ordre croissant sous forme d'un histogramme (Fig. 49).

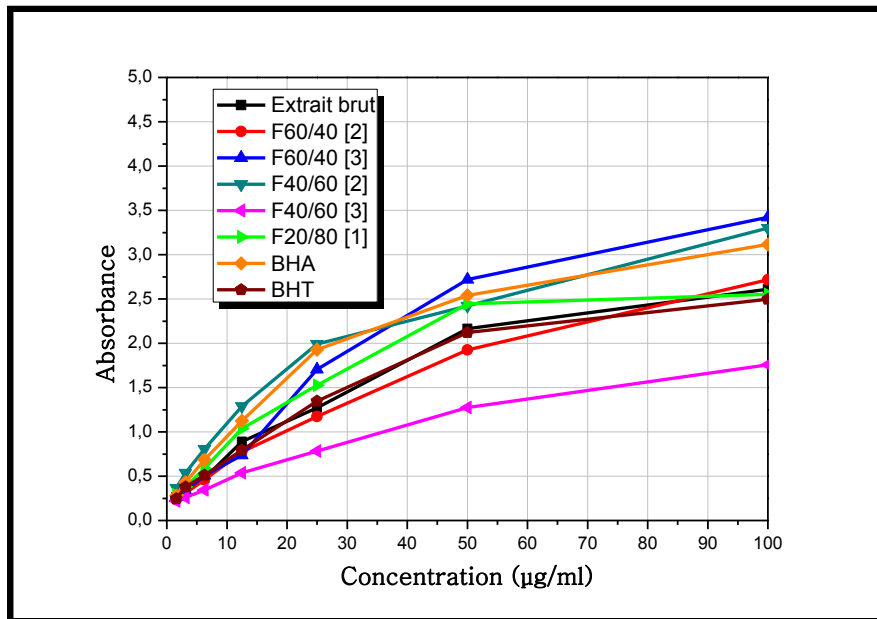


Figure 48 : Courbes des absorbances en fonction des concentrations (CUPRAC)

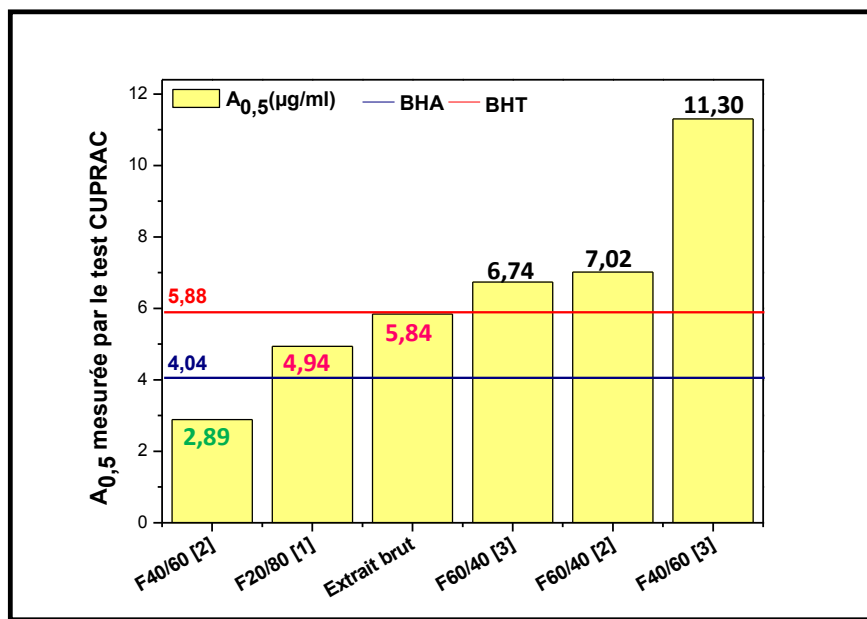


Figure 49 : les $A_{0,5}$ des échantillons testés classés par ordre croissant (CUPRAC).

L'activité CUPRAC indique une relation inverse entre les $A_{0,5}$ et la capacité antioxydante des échantillons testés. La figure ci-dessous illustre le virage de la couleur par rapport au blanc confirmant ainsi les résultats du test.

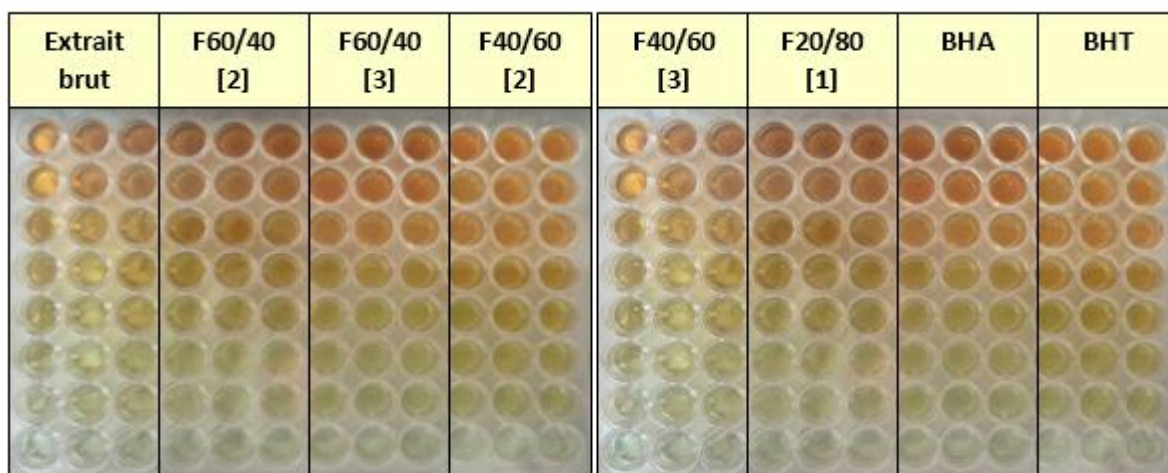


Figure 50 : Photos prises lors du dosage de l'activité CUPRAC.

Il ressort de ces résultats, que la F40/60 [2] soit l'échantillon le plus actif avec une $A_{0,5}$ ($= 2,89 \pm 0,05$ $\mu\text{g/ml}$) inférieure à celle du BHA (1,4 fois) et du BHT (2 fois), suivie par la F20/80 [1] avec une $A_{0,5}$ égale à $4,94 \pm 0,42$ $\mu\text{g/ml}$, intermédiaire entre les deux standards, puis l'extrait brut qui possède une activité équivalente à celle du BHT avec des $A_{0,5}$ estimées à $5,84 \pm 0,33$ et $5,88 \pm 0,75$ respectivement. Quant aux F60/40 [2] et [3], elles ont une activité presque similaire et plus proche de BHT. Néanmoins, la fraction 40/60 [3] a montré une activité réductrice inférieure à celle des deux standards.

En partant de ces résultats, on peut déduire que les variations de la capacité antioxydante des différents échantillons testés comparativement à celles des témoins (BHA et BHT) pourrait être principalement due à la présence et à la teneur de composés phénoliques notamment dans la F40/60 [2], d'où l'intérêt de la soumettre à une purification.

V.5.5. Test de l'activité réductrice de l'ion ferrique (Pouvoir réducteur)

La capacité réductrice des échantillons a été également étudiée à partir de la transformation du Fe^{3+} en Fe^{2+} . Cette méthode est souvent utilisée comme un indicateur de l'activité donneuse d'électrons, qui est un mécanisme important de l'action antioxydante phénolique et peut être fortement corrélée avec d'autres propriétés antioxydantes (**Dorman et al., 2003**).

L'analyse statistique des résultats manifestent une proportionnalité entre les absorbances des échantillons et leurs concentrations respectives (Fig. 51). Plus l'absorbance est élevée, plus le pouvoir réducteur est important.

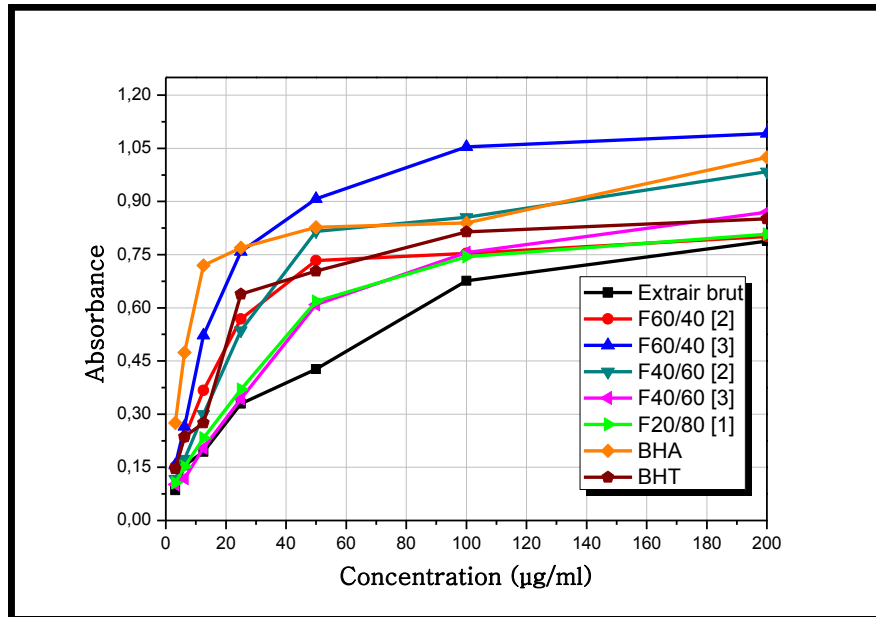


Figure 51 : Courbes des absorbances en fonction des concentrations (PR).

Les résultats des concentrations réductrices des ions Fe^{3+} à 0,5 d'absorbance sont calculés graphiquement, puis représentés par un histogramme affichant la décroissance du potentiel antioxydant (Fig. 52).

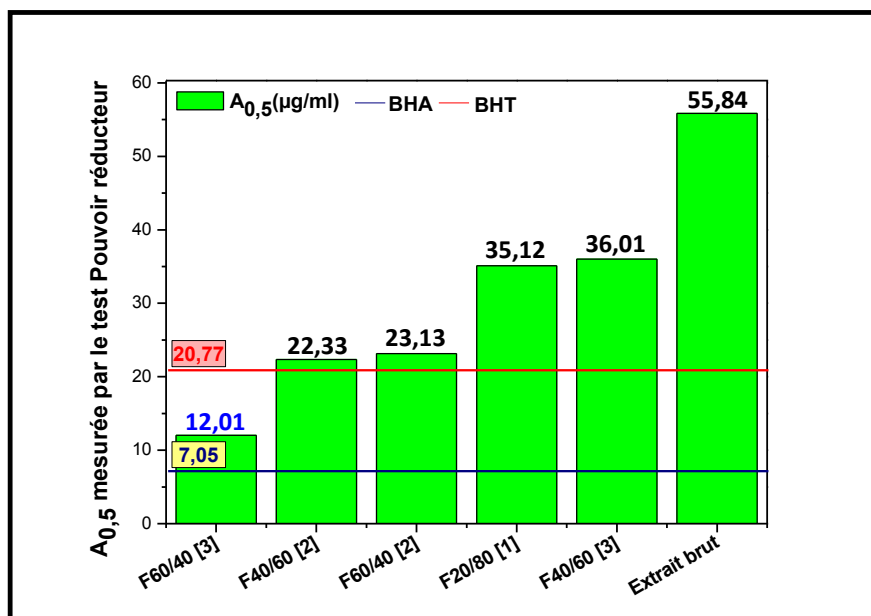


Figure 52 : les $A_{0,5}$ des échantillons testés classés par ordre croissant (PR).

Les $A_{0,5}$ obtenus sont inversement proportionnels aux réactions colorimétriques enregistrées (Fig. 53). Plus le $A_{0,5}$ est petit, plus la réaction est intense, plus l'échantillon est actif vis-à-vis de l'oxydation.

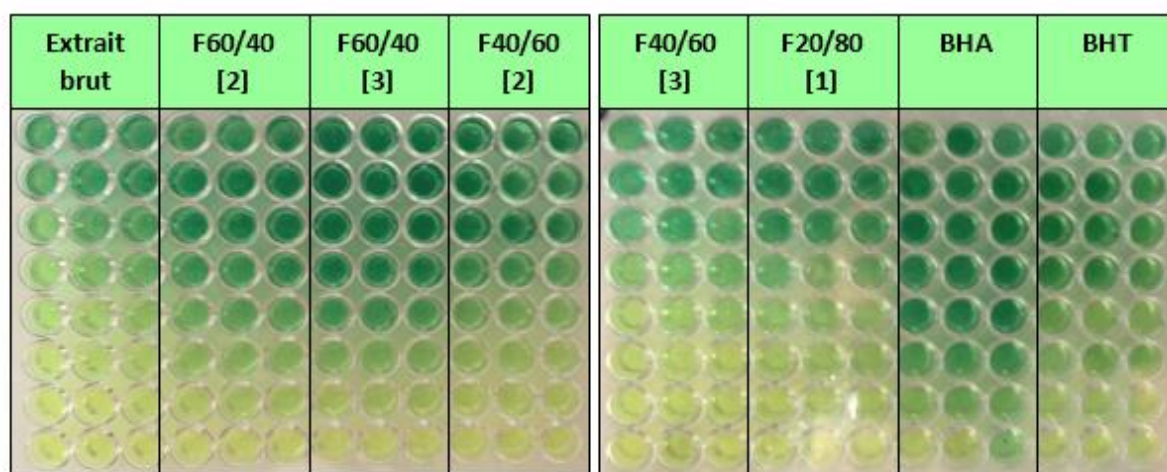


Figure 53 : Photos prises lors du dosage de l'activité Pouvoir réducteur

Les résultats d'évaluation de l'activité antioxydante par le test PR indique que le standard BHA est le plus actif parmi tous les échantillons avec une valeur de $A_{0,5}$ atteignant $7,05 \pm 0,39 \mu\text{g/ml}$. Or, l'extrait brut est l'échantillon le plus faible en matière de réduction de l'ion Fe^{3+} , donnant une valeur de $A_{0,5} = 55,84 \pm 4,73 \mu\text{g/ml}$. Comparativement aux standards, la F60/40 [3] a exhibé un très bon potentiel antioxydant avec une valeur de $A_{0,5} = 12,01 \pm 0,42 \mu\text{g/ml}$, plus proche à celui de BHA qu'à celui de BHT. D'un autre côté, les données enregistrées avec les fractions F60/40 [2] et F40/60 [2] ont mis en évidence des valeurs de $A_{0,5}$ très proches de celle du BHT estimées à $23,13 \pm 2,41$, $22,33 \pm 0,36$ et $20,77 \pm 2,45 \mu\text{g/ml}$ respectivement. Tandis que les fractions 40/60 [2] et 20/80 [1] ont manifesté une activité réductrice similaire mais significativement inférieure à celle du BHT.

Notre résultat pour la F60/40 [3] ($A_{0,5} = 12,01 \pm 0,42 \mu\text{g/ml}$) s'avère plus intéressant que celui obtenu pour l'infusé aqueux de l'espèce *Tuberaria lignosa* ($A_{0,5} = 21.3 \pm 0.16 \mu\text{g/ml}$) (José et al., 2012). Ce pouvoir antioxydant est probablement lié à la richesse de cette fraction en composés réducteurs tel que les sucres libres.

En résumé, la comparaison de la puissance antioxydante (Fig. 54) des différents échantillons, testés par les 5 activités (DPPH, ABTS, DMSO alcalin, CUPRAC et PR), a pu montrer que les fractions F40/60 [2], F 60/40 [2], et la F20/80 [1] étaient les fractions les plus actives, suivies par les fractions F60/40 [3] et F40/60 [3]. Par contre, l'extrait brut n'a manifesté qu'une activité antioxydante modérée par rapport aux BHA et BHT. Cela reviendrait peut-être aux interactions intermoléculaires des différentes fractions susceptibles de réduire l'effet antioxydant total.

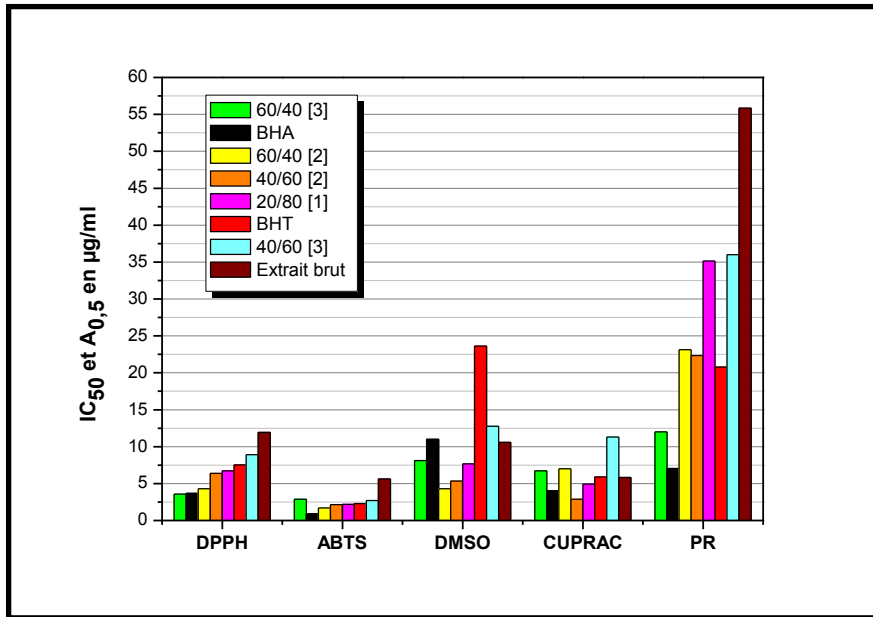


Figure 54 : Histogramme de comparaison de la puissance antioxydantes

Conclusion générale

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et l'activité antioxydante d'une plante algérienne du genre *Tuberaria* appartenant à la famille des Cistaceae. Celle-ci est particulièrement connue par sa richesse en divers métabolites secondaires, comme les flavonoïdes, les diterpènes, les huiles essentielles...etc. Elles possèdent aussi, des activités biologiques intéressantes, à savoir antioxydante, antimicrobienne, antiproliférative, anti-infection, anti-inflammatoire, antinociceptive...etc.

L'étude chimique de l'extrait éthanolique des parties aériennes de *Tuberaria* a conduit à l'isolement de trois flavonoïdes **Tb1**, **Tb2** et **Tb3** dont deux seulement ont été identifiés (Kaempférol 3-*O*-(3",6"-di-*O-E-p*-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside : **Tb2**) et (Quercétine-3-*O*- β -D-glucopyranoside : **Tb3**)

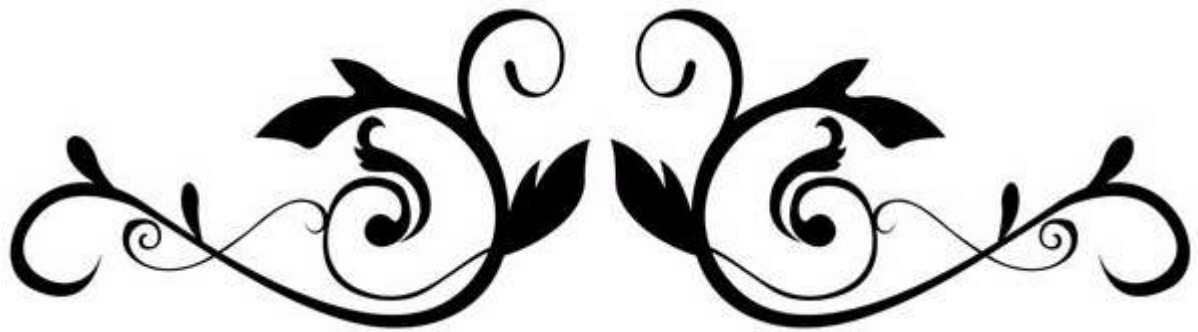
L'isolement de ces flavonoïdes est rendu possible grâce à l'utilisation conjointe des techniques chromatographiques de séparation et de purification des substances naturelles, à savoir la Chromatographie Liquide sous Vide sur silice greffée RP-18 (VLC), la chromatographie sur colonne de gel de silice normale (SiO₂ 60H) et sur polyamide (D₆), et la CCM.

Les structures des produits isolés ont été établies par les méthodes d'analyse spectroscopiques RMN 1D ¹H et ¹³C, RMN 2D (COSY H-H, HSQC et HMBC), UV et par la comparaison avec les données de la littérature.

L'activité antioxydante de l'extrait éthanolique des parties aériennes de notre espèce a été évaluée *in vitro* à différents échèles par l'application de plusieurs tests : DPPH, ABTS, CUPRAC, DMSO alcalin et le test de pouvoir réducteur. Cette activité est liée en grande partie à la composition de l'extrait et des fractions en composés phénoliques, particulièrement flavoniques.

Au terme de ce travail de recherche, l'étude de l'évaluation antioxydante a montré que cette espèce avait un très fort effet scavenging vis-à-vis des radicaux DPPH, ABTS et Superoxyde ainsi qu'un très bon pouvoir réducteur face aux ions cuprique et ferrique, ces effets se sont avérés meilleurs que celui des standards utilisés.

Enfin l'ensemble de ces résultats obtenus ouvre des perspectives d'utilisation de cette plante pour différents usage et ne constitue qu'un début dans le domaine de la recherche des substances naturelles biologiquement actives. Des essais complémentaires seront nécessaires afin de pouvoir confirmer les activités mises en évidence.



Références

Bibliographiques



-A-

- Abad, M.J., Bermejo, P., Villar, A., Sanchez, S., Carrasco, L., 1997. Antiviral activity of medicinal plant extracts. *Phytotherapy Research.*, 11, pp 198-202. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199705\)11:3<198::AID-PTR78>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199705)11:3<198::AID-PTR78>3.0.CO;2-L).
- Abe, E., Delye, S.G., Alvarez, J.C., 2010. Liquid-liquid extraction : theory, applications and difficulties. *Annales de Toxicologie Analytique.*, 22 (2), pp 51-59.
- Achille, R., 1876. Nouveaux éléments de botanique. Onzième Ed., Librairie F. Savy, Paris. p 712.
- Aighewi, B.A., Akoroda, M., Asiedu, R., 1998. Preliminary studies of seed yam production from minisettts with different thicknesses of cortex parenchyma in white yam (*Dioscorea rotundata*), 6th Symposium of the ISTRC-AB, Lilongwe (Malawi), pp 22-28.
- Akoroda, M., 1981. Studies of the genetics and floral biology of yam (*Dioscorea rotundata* and *D. cayanensis*). Department of agronomy. University of Ibadan, p 298.
- Allen, A.M., Hiscock, S.J., 2008. Evolution and Phylogeny of Self-Incompatibility Systems in Angiosperms. In Franklin-Tong V.E. (ed.) Self-Incompatibility in Flowering Plants Evolution, Diversity, and Mechanisms, Chapter 4, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg.*, pp 73-101.
- Allen, H., 2009. Vegetation and ecosystem dynamics. in Woodward, J.C. (Ed.) The physical geography of the Mediterranean. Oxford, *Oxford University Press.*, pp 203–227.
- Alvarez, P., Benedí, J., Coma, I., Iglesias, I., Rebuelta, M., Villar, A. 1990. PI. *Medecine et Phytotherapie.*, 24, pp 92-97.
- Anderson, C.M., Hallberg, A., Hogberg, T., 1996. Advances in development of pharmaceutical antioxidants. *Advances in Drug Research.*, 28, pp 65-180.
- Andrade, D., Gil, C., Breitenfeld, L., Domingues, F., Duarte, A.P., 2009. Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo*. *Industrial Crops and Products.*, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.1001.1009>.
- Angelopoulou, D., Demetzos, C., Perdetzoglou, D., 2002. Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* Leaves. *Biochemical Systematic and Ecology.*, 30, pp 189-203.
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K.M., Özyürek, M., Güçlü, K., 2013. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry.*, 85(5), pp 957-998. <http://dx.doi.org/10.1351/PAC-REP 12-07-15>.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.*, 52, pp 70-79.
- Apak, R., Guculu, K., Ozyurek, M., Karademir., 2011. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine : CUPRAC Method. *Journal of agricultur and food chemistry.* 2004, 52, pp 7970-7981.
- b. Ozyurek, M. ; Guculu, K. ; Apak, R. The Main and Modified CUPRAC Methods of Antioxidant Measurement. *Trends in Analytical Chemistry.*, 30, pp 644-652.

Arrington, JM., Kubitzki, K., 2003. Cistaceae. In : Kubitzki K, Bayer C (eds) The families and genera of vascular plants. Malvales, Capparales and non-betalain Caryophyllales, *Springer Berlin.*, 5, p 68. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-07255-4>

Asmus, KD., Bonifacic, M., 2000. Free radical chemistry. In : Sen CK, Packer L, Hanninen O, editors. Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise. Amsterdam, *Elsevier.*, p 3-53.

Ayres, D.C., Loike., J.D., 1990. Lignans : Chemical, biological and clinical properties. *Cambridge University Press, England.*

-B-

Babu, BH., Shylesh, BS., Padikkala, J., 2001. Antioxidant and hepatoprotective effect of *Acanthus ilicifolius*. *Fitoterapia.*, 72, pp 272-277.

Baillon, H., 1872. Histoire des plantes, Monographie des Bixacées : Cistacées et Violacées. *Librairie Hachette, Paris.*, p 356.

Barbosa, E., Calzada, F., Campos, R., 2006. Antigiardial activity of methanolic extracts from *Helianthemum glomeratum* Lag. and *Rubus coriifolius* Focke in suckling mice CD-1. *Journal of Ethnopharmacology.*, 108, pp 395-7.

Barros, L., Duenas, M., Alves, C.T., Silva, S., Henriques, M., Buelga, C.S., Ferreira, I. C. F. R., 2013. Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. *Industrial Crops and Products.*, 41, pp 41-45.

Bedoya, L.M., Abad, M.J., Sánchez-Palomino, S., Alcami, J., Bermejo, P., 2010. Ellagitannins from *Tuberaria lignosa* as entry inhibitors of HIV Ellagitannins from *Tuberaria lignosa* as entry inhibitors of HIV. *Phytomedicine.*, 17, pp 69–74.

Bedoya, L.M., Bermejo, P., Abad, M.J., 2009. Anti-Infectious Activity in the Cistaceae Family in the Iberian Peninsula. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.*, 9, pp 519-525.

Bedoya, L.M., Sanchez, S., Abad, M.J., Bermejo, P., Alcami, J., 2001. Anti-HIV activity of medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology.*, 77, pp 113-6.

Bellahouel, S., 2012. Etude du pouvoir antimicrobien et mycorhizien de deux espèces de Terfez : *Tirmania pinoyi* (Maire) Malençon et *Terfezia leptoderma* Tul. Thèse de doctorat. Université d'Oran ; p 16.

Ben Abdelaziz, I., 2015. Etude chimique des espèces *Helianthemum sessiliflorum* et *Euphorbia pterococca*, thèse de doctorat en sciences, chimie organique. Université Hadj Lakhdar Batna, p 11.

Ben Abdelaziz, I., Haba, H., Lavaud, C., Harakat, D., Benkhaled., M., 2015. Lignans and Other Constituents from *Helianthemum sessiliflorum* Pers. *Records of Natural Products.*, 9 (3), pp 342-348.

Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F.R., Ortuno, A., Del Rio, J.A., 1997. Uses and properties of Citrus flavonoids. *Journal of Agricultur ans Food Chemistry.*, 45, pp 4505-4515.

Benjemia, M., Kchouk, M.E., Senator, F., Autore, G., Marzocco, S., Defeo, V., Bruno, M., 2013. Antiproliferative activity of hexane extract from Tunisian *Cistus libanotis*, *Cistus monspeliensis* and *Cistus villosus*. *Chemistry Central Journal.*, 7, pp 47-53.

Berregioua, A., 2016. Investigation phytochimique sur des extraits bioactifs de deux Brassicaceae médicinales du sud algérien : *Moricandia arvensis* et *Zilla macroptera*. Thèse Doctorat, Département de Chimie, Université Abou Bakr Belkaid, Tlemcen.

Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E., Sapirstein, H.D., 2005. Phenolic Content and antioxidant activity of Pearled Wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal Chemistry*, 82(4), pp 390-393.

Birgitta, B., et son groupe de chercheurs., An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants : APG III., 2009. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, pp 105–121. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x>

Blois M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*, 4617 (181), pp 1119-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>.

Boligon, AA., Machado, MM., Athayde, ML., 2014. Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, pp 4-7. <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000188>.

Bossokpi, I.P.L., 2002. Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloïdes* LAM (Rutaceae). Thèse de pharmacie, Bamako., p 133.

Bourbonnais, R., Leech, D., Paice, G.M., 1998. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compound. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1379, pp 381–390.

Bourgou, S., Serairi beji, R., Medini, F., Ksouri, R., 2016. Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of New Sciences*, 28(12), pp 1649- 1655.

Boutabia, L., Telailia, S., Cheloufi, R., Chefrou, A., 2011. La flore médicinale du massif forestier d'Oum Ali (Zitouna-wilaya d'El Tarf-Algérie) : inventaire et étude ethnobotanique. *Annales de l'INRGREF*, 15, pp 201-213.

Brizicky, G.K., 1964. The genera of Cistaceae in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum*, 45, pp 346-357.

Bruneton, J., 1993. Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 2ème Ed. Lavoisier, Paris.

Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. (3). Paris.

Bruneton, J., 2009. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4^{ème} édition, Lavoisier, Paris, France.

Buchet, J., Housset, P., Dardillac, A., Buchet, J., 2015. Flore des terrasses alluviales. Conservatoire botanique national de Bailleul en partenariat avec le Conservatoire d'espaces naturels de Haute-Normandie, Tome II, p86.

-C-

Cabrera, C., Artacho, R., Giménez, R., 2006. Beneficial effects of green tea. A review, *Journal of the American College of Nutrition*, 25, pp 79-99.

Calderón de Rzedowski, G., 1992. Cistaceae. In : Rzedowski, J., Calderón de Rzedowski, G. (Eds.), Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes, Vol. 2. Instituto de Ecología, A.C., Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán, México.

Calzada, F., Alanis, A.D., 2007. Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. *Phytotherapy research.*, 21, pp 78-80.

Calzada, F., Alanis, A.D., Meckes, M., Tapia, A., Cedillo, R., 1998. In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to some medicinal plants used by the people of Southern Mexico. *Phytotherapy Research.*, 12, pp 70-2.

Camejo-Rodrigues, J.S., 2006 Recolha dos 'Saber-Fazer' Tradicionais das Plantas aromáticas e Mediciniais. Concelhos de Aljezur, logos e Vila do Bispo, AFLOSUL, Bordeira. P 253.

Campos, A.M., Escobar, J., Lissi, E.A., 1996. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguayensis* extracts and red wine. *Journal of the Brazilian Chemical Society.*, 7, pp 43-49.

Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S., Vasson, M.P., Hasselmann, M., Leverve, X., 2007. Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Paris : Springer-Verlag.

Cardey, B., 2007. Étude théorique des mécanismes d'oxydation de thiols en milieu d'intérêt biologique. Thèse de Doctorat. Besançon : Université de Franche-Comté.

Carvalho, A. M. P., 2005. Etnobotánica del Parque Natural de Montesinho, Plantas, Tradición Y Saber Popular en un Territorio del Nordeste de Portugal, Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, p468.

Carvalho, A.M., 2010. Plantas y sabiduría popular del Parque Natural de Montesinho. Un estudio etnobotánico en Portugal. Biblioteca de Ciencias nº 35. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid

Castro, M., Fraga, P., Torres, N., Rossello, J.A., 2007. Cytotaxonomical observations on flowering plants from the Balearic Islands. *Annales Botanici Fennici.*, 44, pp 409-415.

Castroviejo, S., Aedo, C., Cirujano, S., Laínz, M., Montserrat, P., Morales, R., Muños Catalan, B., Arroyo, S. F., Saura, D., Guillén, E., Fernandez, A., Carretero, A. S., Micol, V., 2010. Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology.*, 48, pp 2273-2282.

Cavin, A., 1999. Investigation phytochimique de trois plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydante et antiradicalaire : *Tinospora crispa* (Ménispermacées), *Merremia emarginata* (Convolvulacées) et *Oropea enneandra* (annonacées). Thèse de Doctorat, Lausanne, p 241.

Chaneze, A.Z., Elena, G.B., Félix, P.G., 2010. Morphological and physiological seed heterogeneity in the Mediterranean annual plant *Tuberaria macrosepala* (Cistaceae). *Plant Species Biology.*, 25, pp 149-157. [https://doi.org/ 10.1111/j.1442-1984.2010.00279.x](https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2010.00279.x).

Chear, N.J.Y., Khaw, K.Y., Murugaiyah, V., Lai, C.S., 2016. Cholinesterase inhibitory activity and chemical constituents of *Stenochlaena palustris* fronds at two different stages of maturity. *Journal of food and drug analysis.*, 299, pp 1-9.

Childs, R.E., Badsky, W.G., 1975. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,20-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid as chromogen. *Biochemistry Journal.*, 145, pp 93-103.

Chung, K., Wong, T.Y., Wei, C., Huang, Y., Lin, Y., 1998. Tannins and human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.*, 38, pp 421-464.

Civeyrel, L., Leclercq, J., Demoly, J.P., Agnan, Y., Quèbre, N., Pélissier, C., Otto, T., 2011. Molecular systematics, character evolution, and pollen morphology of *Cistus* and *Halimium* (Cistaceae). *Plant Systematics and Evolution.*, 295, pp 23-54 <https://doi.org/10.1007/S00606-011-0458-7>.

Cowan, M.M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), pp 564- 582.

Cronquist, A., 1988. The evolution and classification of flowering plants. New York Botanical Garden, Bronx, NY.

Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H., 2006. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd.

-D-

Dafri, A., Beddiar, A., 2017. Desert truffles from northeastern algerian coastal dunes : Ecology, Identification and Symbiosis. *Journal of Fundamental and Applied Sciences.*, 9(1), pp 153-169 <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v9i1.11>.

Dahlgren, G., 1989. The last Dahlgrenogram : system of classification of the Dicotyledons. In : Tan, K., Mill, R.R., Elias, T.S. (Eds.), Plant Taxonomy, Phytogeography and Related Subjects. Edinburgh University, Edinburgh., pp 249–260

Dansereau, P., 1939. Monographie du genre *Cistus*. *Boissiera.*, 4, pp 1-90.

Delattre, J., Beaudeau, J.L., Bonnefont- Rousselot, D., 2005. Radicaux libres et stress oxydant, Aspects biologiques et pathologiques. pp 87-108.

Delgado, J.A., Serrano, J.M., Lopez, F., Acosta, F.J., 2008. Seed size and seed germination in the Mediterranean fire-prone shrub *Cistus ladanifer*. *Plant Ecology.*, 197, pp 269-276.

Demoly, J.P., Montserrat, P., 1993. *Cistus*. In : Castroviejo, S., Aedo, C., Cirujano, S., Laínz, M., Montserrat, P., Morales, R., Muñoz-Garmendía, F., Navarro, C., Paiva, J., Soriano, C. (Eds.), Flora Ibérica. Consejo de Investigaciones Científicas, Madrid, pp. 319-337.

Devasagayam, TA., Tilak, J.C., Bloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., Lele, RD., 2004. Free radicals and antioxidants in human health : current status and future prospects. *Journal Association Physician India.*, 52, pp 794-804.

Dias, L.S., Moreira, I., 2002. Interaction between water soluble and volatile compounds of *Cistus ladanifer* . *Chemoecology.*, 12, pp 77–82.

Donaldson, M.S., 2004. Nutrition and cancer : A review of the evidence for an anticancer diet. *Nutrition Journal*, 3, pp1-21.

Dorman, HJD., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, M.J., 2003. Characterization of the antioxidant properties of deodorized aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry.*,83, pp 255-262.

Droebner, K., Ehrhardt, C., Poetter, A., Ludwig, S., Planz, O., 2007. CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice. *Antiviral Research.*, 76, pp 1–10.

-E-

Ehrhardt, C., Hrinčius, E.R., Korte, V., Mazur, I., Droebner, K., Poetter, A., Dreschers, S., Schmolke, M., Planz, O., Ludwig, S., 2007. A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Research.*, 76, pp 38-47.

Ellis, G.P., 2009. The chemistry of heterocyclic compounds, chromenes, chromanones, and chromones. John Wiley & Sons, USA.

Ellul, P., Boscaiu, M., Vicente, O., Moreno, V., Rosselló, J.A., 2002. Intra- and interspecific variation in DNA content in *Cistus* (Cistaceae). *Annals of Botany.*, 90, pp 345–351.

Enomoto, S., Okada, Y., Guvenc, A., Erdurak, C.S., Coskun, M., Okuyama, T., 2004. Inhibitory effect of traditional Turkish folk medicines on aldose reductase (AR) and hematological activity, and on AR inhibitory activity of quercetin-3-O- methyl ether isolated from *Cistus laurifolius* L. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.*, 27, pp 1140-1143.

-F-

Farinha, N., Póvoa, O., and Santos, R., 2012. Ethnoveterinary applied to Equidae in the Alentejo, south Portugal. *Forages and Grazing in horse Nutrition.*, 132, pp 401-412.

Favier, A., Cadet, J., Kalaryanaman, R., Fontecave, M., Pierre, J.L., 1995. Analysis of Free Radicals in Biological Systems. New-York : Birkhauser.

Fennane, M., 2018. Eléments pour un Livre rouge de la flore vasculaire du Maroc. Fasc. 5. Cactaceae - Euphorbiaceae, Citation. Edit. Tela-Botanica. Licence CC-BY NC ND.

Ferrandis, P., Herrantz, J.M., Martínez-Sánchez, J.J., 1999. Effect of fire on hard-coated Cistaceae seed banks and its influence on techniques for quantifying seed banks. *Plant Ecology.*, 144, pp 103-114.

Floegel, A., Kim, D.-O., Chung, S.-J., Koo, S. I., Chun, O. K., 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis.*, 24, pp 1043–1048.

-G-

Gallego, M.J., 1993. 3. *Xolantha* Raf. In : Castroviejo, S., Aedo, C., Cirujano, S., Lainz, M., Montserrat, P., Morales, R., Muñoz Garmendia, F., Navarro, C., Paiva, J., Soriano, C. (Eds.), Flora Iberica, vol. III. Real Jardín Botánico, Madrid, Spain, pp 351–365

Gallego, M.J., Aparicio, A., 1993. Karyological study in the genus *Tuberaria* sect. *Scorpioides* (Cistaceae) : taxonomic and evolutionary inferences. *Plants Systematics and Evolution.*, 184, pp11-25.

Gana, M., 2014. Réalisation de la carte d'occupation du sol de la région de Djebel Ouahch. Mémoire de master, Université Constantine, p 1-37.

Garait, B., 2006. Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin. Thèse de Doctorat. Grenoble : Université Joseph-Fourier I.

- Garmendia, F., Navarro, C., Paiva, J., Soriano, C., 2005. Flora ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol. III. Real Jardín Botánico, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, p : 351-365., Madrid.
- Gaussen, H., Leroy, H.F., 1982. Précis de botanique, végétaux supérieurs, 2eme Ed., 426.
- Geissamn, T.A., 1972. Biosynthesis. *Royal Society of Chemistry*, England.
- Gelfand, M., Mavi, S., Drummond, R.B., Ndemera, B., 1985. The Traditional Medical Practitioner in Zimbabwe. *Mambo Press, Gweru.*, pp 191-192, pp 268-269 et p 304.
- Georges, N., De La Perche, N., Kessler, F., 2014. Au sujet de quelques taxons intéressants observés dans le Tarn-et-Garonne, *Isatis.*, 14, pp 222-232.
- Gertsch, J., Tobler, R.T., Brun, R., Sticher, O., Heilmann, J., 2003. Antifungal, antiparazitozal, cytotoxic and piscicidal properties of justicidin B and a new aryl-naphthalide lignan from *Phyllanthus piscatorum*. *Pharmacology*, 69, pp 420-424.
- Grosser, W., 1903. Cistaceae. In : Engler, A. (Ed.), *Das Pflanzenreich*. Breitkopf & Härtel, Berlin, p 161.
- Güemes, J., 1999. A new species of Fumana (Cistaceae) from Rif Morocco. *Folia Geobotanica.*, 34, pp 363-372.
- Güemes, J., Molero, J., 1993. Fumana. In : Castroviejo, S., Aedo, C., Cirujano, S., Laínz, M., Montserrat, P., Morales, R., Muñoz-Garmendia, F., Navarro, C., Paiva, J., Soriano, C. (Eds.), *Flora Ibérica*. Consejo de Investigaciones Científicas, Madrid, pp 422–436.
- Guignard, J.L., 2001. Botanique. Systématique moléculaire. Ed. Masson (12ème édition), Paris, 290 p
- Guittet, J., Paul, P., 1975. La végétation des pelouses xérophiles de Fontainebleau et ses relations avec quelques facteurs édaphiques. *Végétation.*, 2(2), pp 75-88.
- Guzmán, B., Vargas, P., 2005. Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (Cistaceae) based on ITS, trnL-trnF, and matK sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution.*, 37, pp 644–660.
- Guzmán, B., Vargas, P., 2009 a. Long-distance colonization of the Western Mediterranean by *Cistus ladanifer* (Cistaceae) despite the absence of special dispersal mechanisms. *Journal of Biogeography.*, 36, pp 954-968.
- Gülçin, I., 2006. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology.*, 217, p 213.
- Guzmán, B., Vargas, P., 2009 b. Historical biogeography and character evolution of Cistaceae (Malvales) based on analysis of plastid rbcL and trnL-trnF sequences. *Organisms Diversity & Evolution.*, 9, pp 83–99. <https://doi.org/10.1016/j.ode.2009.01.001>

Hadbaoui, Z., 2012. Evaluation de l'activité antioxydante des fractions lipidiques, protéiques et phénoliques de sorgho et de mil locaux. Thèse de Doctorat : Université de Kasdi Merbah OUARGLA-ALGERIE.

Haliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989. Biology and Medicine. *Oxford : Free Radicals in Claenton Prep*, p 543.

Hamel, T., Seridi, R., De Belair, G., Slimani, A., Babali, B., 2013. Flore vasculaire rare et endémique de la péninsule de l'Edough (Nord-Est algérien), *Reviews of Science and Technology.*, 26, pp 65 - 74

Harbone, J.B., 1993. Introduction to ecological biochemistry. 4ème édition, Academic Press, London, England.

Haslam, E., 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products.*, 59, pp 205 215.

Hebrard, J.P., Triat, H., 1971. Etude bryologique et palynologique de l'association à *Sphagnum plumulosum* Röhl et *Polytrichum commune* Hedw. du Plan Pinet (Estérel, France). *Bulletin de la Société Botanique de France.*, 118(9), pp 701-710. <http://dx.doi.org/10.1080/00378941.1971.10838936>.

Heloizy, K., Freitas, G., Fatibello-Filho, O., 2010. Simultaneous determination of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) in food samples using a carbon composite electrode modified with Cu₃(PO₄)₂ immobilized in polyester resin. *Talanta.*, 81, pp 1102-1108. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.02.004>.

Hemingway, R.W., Laks., P.E., Branham., S.J., 1992. Plant polyphenols : Synthesis, properties, sinificance. Springer Science & Busines Media, Germany.

Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F., 2004. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie.*, 1, pp 3-6.

Herrera, J., 1992. Flower variation and breeding systems in the Cistaceae. P1. *Syst. Evol.*, 179 : 245-255. Herrera J., 2004. Lifetime fecundity and floral variation in *Tuberaria guttata* (Cistaceae), a Mediterranean annual. *Plant Ecology.*, 172, pp 219–225.

Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M., 2002. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions.*, 139, pp 1-21.

Huang, D., Ou, B., Prior, R L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultur and Food Chemistry.*, 53, pp 1841-1856.

-I-

Igor, Passi., L.B., 2002. Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxyloïdes* Lam. (Rutaceae). Thèse Pharmacie, Bamako, p 133.

Ito, N., Fukushima, S., Tsuda, H., 1985. Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, and other antioxidants. *Critical Reviews in Toxicology.*, 15(2), pp 109-150.

-J-

James, L.R., Mark, W.C., 2011. APG III : Bibliographical Information and Synonymy of Magnoliidae. *Phytotaxa.*, 19, pp 71-134 <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.19.1.4>.

James, W. Byng., et son groupe de chercheurs., 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society.*, 181, pp 1-20. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x>

Janchen, E., 1925. Cistaceae. In : Engler A, Prantl K (eds) Die Naturlichen Pflanzenfamilien, 2nd edn., Bd. 21 :289-313. W Engelmann, Leipzig.

Javillier, M., 1969. Traité de biochimie générale. *Volume 3, partie 2, Masson, France.*

Jayaprakash, G.K., Singh, R.P., Sakariah, K.K., 2001. Antioxidant activity of grape seed extracts on peroxidation models in vitro. *Journal of Agricultur and Food Chemistry.*, 55, pp 1018-1022.

Ji, LL., 2001. Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress *Annals of the New York Academy of Sciences.*, 928, pp 236–47.

Jurd, L., Horowrit, R., 1962. Spectral properties of flavonoid compounds, in the chemistry of flavonoid compounds, edited by T.A. Geissman, Pergamon Press, New York, pp 107-155.

-K-

Kaiser, S., Di Mascio, P., Murphy, M.E., Sies, H., 1990. Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, 277(1), pp 101-108.

Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Skaltsounis, A. L., Mitakou, S., 2003. Cis-clerodane type diterpenes from *Cistus monspeliensis*. *Journal of Natural Products.*, 66, pp 316-319.

Kamari, G., Blanché, C., Siljak-Yakovlev, S., 2009. Mediterranean chromosome number reports 19. *Flora Mediterranea.*, 19, pp 313-336.

Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M., 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry.*, 94, pp 550–557.

Kerbab, K., 2017. Validation scientifique de l'utilisation traditionnelle des plantes médicinales algériennes : *Halimium halimifolium* (L.) Wilk et *Thymeleae microphylla* Coss. et Dur., composition chimique et activité biologique. Thèse de Doctorat, Départ Chimie, Université des Frères Mentouri de Constantine.

Keskin, N., Kunter, B., 2009. The effects of callus age, UV irradiation and incubation time on *trans*-resveratrol production in grapevine callus culture. *Trim Bilimleri Dergisi.*, 15, pp 9-13.

Koehlin-Ramonatxo, C., 2006. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme.*, 20, pp 165–177. <https://doi.org/10.1016/j.nupar.2006.10.178>.

Kovács, G., Trappe, J., 2014. Nomenclatural history and genealogies of desert truffles. Kagan-Zur V, Roth-Bejerano N, Sitrit Y, Morte A (eds). Desert truffles — phylogeny, physiology, distribution and domestication. Heidelberg : Springer. pp 21–37.

Krisa, S., Teguo, P.W., Decendit, A., Deffieux, G., Huguet, F., Fauconneau, B., Mérillon J.M., 1997. Production, purification et activité biologique des picidés (stilbènes) extraits de cultures cellulaires de *Vitis vinifera* L. *Bulletin-Société de Pharmacie de Bordeaux*, 136, pp 7-18.

Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R., 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing.*, 89, pp 217-233.

Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly. C., 2007. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry.*, 45, pp 244-249.

Kubo, I., Fujita, K., 2001., Naturally occurring anti-Salmonella agents. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.*, 49 (12), pp 5750- 5754. <http://doi:10.1021/jf010728e>.

Kunchandy, E., Rao, MNA., 1990. Oxygen radical scavenging activity of *Curcumin*. *International journal of Pharmacology.*, 58, 237-240.

Kupeli, E., Yesilada, E., 2007. Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guides procedures. *Journal of Ethnopharmacology.*, 112, pp 524-530.

-L-

Lacaze, B., Joffre, R., 1987. Caractérisation de formations végétales méditerranéennes à partir de données 'Thematic Mapper' Une étude de cas en Andalousie (Espagne). *International Journal of Remote Sensing.*, 8(9), pp 1319-1333. <http://dx.doi.org/10.1080/01431168708954777>.

Laraoui, H., 2016. Métabolites secondaires de *Fumana montana* et *Fumana thymifolia* (Cistaceae). Thèse de Doctorat en sciences, Départ. Chimie. Université Hadj Lakhdar, Batna-1.

Le Maout, E., Decaisne, J., 1873. A general system of botany, descriptive and analytical. Part II., Description and illustrations of the orders.

Lee, K.W., Hur, H.J., Lee, C.Y., 2005. Antiproliferative effects of dietary phenolic substances and hydrogen peroxide. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.*, 53, pp 1990-1995.

Leong, L.P., Shui, G., 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry.*, 76, pp 69-75.

Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M., 2011. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry.*, 125(2), pp 288-306.

Letreuch-belarouci, A., Medjahdi1, B., Letreuch-belarouci, N., Benabdeli, K., 2009. Diversité floristique des subéraies du parc national de Tlemcen (Algérie). *Botanica Malacitana.*, 34, pp 77-89

Liu, RH., 2003. Health, benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition.*, 78(3), pp 517-520.

Loizides, M., Hobart, C., Konstandinides, G., Yiangou, Y., 2012. Desert Truffles : The mysterious jewels of antiquity. *Field Mycology.*, 13 (1), pp 17–21.

López, G., 1993. Helianthemum. In : Castroviejo, S., Aedo, C., Cirujano, S., Laínz, M., Montserrat, P., Morales, R., Muñoz-Garmendia, F., Navarro, C., Paiva, J., Soriano, C. (Eds.), Flora Ibérica. Consejo de Investigaciones Científicas, Madrid, pp 365–421.

López, G., 2001. Los Árboles y Arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares, Ed. Mundi Prensas : Madrid.

Lorente, F.T., Garcia-Grau, M.M., Nieto, J.L., Barberan, F.A.T., 1992. Flavonoids from *Cistus ladanifer* bee pollen. *Phytochemistry.*, 31, pp 2027-2029.

Luna, B., Chamorro, D., 2016. Germination sensitivity to water stress of eight Cistaceae species from the Western Mediterranean. *Seed. Science Research.*, pp 1-10 <http://doi.org/10.1017/S096025851600009X>.

-M-

Maarten, J.M., Christenhusz., James., W.B., 2016. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa.*, 261(3), pp 201–217. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.261.3.1>.

Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970. The systematic identification of flavonoids. *Archive of Pharmacy.*, 304(9), pp 715-715., <https://doi.org/10.1002/ardp.19713040918>.

Machlin, L.J., Bendich, A., 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB journal.*, 1(6), pp 441-445. <https://doi.org/10.1096/fasebj.1.6.3315807>.

Markova, M.S., 1975. Haryosystematische Untersuchungen an den Cistaceae Bulgariens. *Plant Systematics Evolution.*, 123, pp 283-315.

Martín Bolaños, M., Guinea, E., 1949. Jarales y Jaras (Cistografia Hispanica). *Institution of Forestal Investigations. Exper.*, Direcc. Gen. Montes, Caza Pesca Fluvial, Ministerio de Agricultura, Madrid.

Martín-Aragón, S., Benedí, J., & Villar, A., 1994. Studies on the anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Tuberaria lignosa* extracts in experimental animals. *International Journal of Pharmacognosy.*, 32, pp 27-32. <https://doi.org/10.3109/13880209409082968>.

Massicotte, H.B., Peterson, R.L., Melville, L.H., Tackaberry, L.E., 2010. *Hudsonia ericoides* and *Hudsonia tomentosa* : Anatomy of mycorrhizas of two members in the Cistaceae from Eastern Canada. *Botany.*, 88, pp 607- 616. <https://doi.org/10.1139/B10-035>.

Meckes, M., Torres, J., Calzada, F., Rivera, J., Camorlinga, M., Lemus, H., Rodriguez, G., 1997. Antibacterial properties of *Helianthemum glomeratum*, a plant used in Maya traditional medicine to treat diarrhoea. *Phytotherapy Research.*, 11, pp 128-31.

Medjahdi, B., 2010. Réponse de la végétation du littoral oranais aux perturbations : cas des monts des trara (nord-ouest de l'algerie)., Thèse de doctorat en foresterie, Univ Aboubekr Belkaid-Tlemcen., p52.

Mena, S., Ortega, A., J.M., Estrela., 2009. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.*, 674(1-2), pp 36-44. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.017>.

Menvielle-Bourg, F.J., 2005. La superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale. *Phytothérapie.*, 3, pp 118-121. <https://doi.org/10.1007/s10298-005-0087-9>.

Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacology Revolution.*, 52(4), pp 673-751.

Miller, N.J., Rice-Evans, C.A., Michael, J.D., Vimala, G., Anthony, M., 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clinical Science.*, 84, pp 407–412.

Montecchi, A., Sarasini, M., 2000. Fungi Ipogei D'Europa. Centro Studi Micologici, Associazione Micologica Bresadola, Trento. pp 714.

Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, J.M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nuñez, M.J., Parajo, J.C., 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry.*, 72, p 145.

Muñoz, F., Navarro, C., 1993. Flora Ibérica, Real Jardín Botánico CSIC : Madrid.

-N-

Nandi, O.I., 1998. Floral development and systematics of Cistaceae. *Plant Systematics Evolution.*, 212, pp 107–134. <https://doi.org/10.1007/BF00985224>.

Nenadis, N., Wang, L., Tsimidou, M., Zhang, H., 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.*, 52, pp 4669-4674. <https://doi.org/10.1021/jf0400056>.

Nijveldt, R. J., Nood, E., Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Norren, K., Leeuwen, P., 2001. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition.*, 74, pp 418–425. <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.418>.

Nogueira, I., Muñoz Garmendia, F., Navarro, C., 1993. Halimium. In : Castroviejo, S., Aedo, C., Cirujano, S., Laínz, M., Montserrat, P., Morales, R., Muñoz-Garmendia, F., Navarro, C., Paiva, J., Soriano, C. (Eds.), *Flora Ibérica*. Consejo de Investigaciones Científicas, Madrid, pp 337–351.

Novais, M.H., Santos, I., Mendes, S., & Pinto-Gomes, C., 2004. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology.*, 93, pp 183-195. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.015>.

-O-

Oktay, M., Gülçin, I., Küfrevioğlu, Ö.I., 2003. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensmittel Wissenschaft und-Technology.*, 36, p263. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(02\)00226-8](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(02)00226-8).

Osman, A.M., 2011. Multiple pathways of the reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH•) with (+) –catechin : Evidence for the formation of a covalent adduct between DPPH• and the oxidized form of the polyphenol. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 412, pp 473–478. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.123>.

Osman, A.M., Wong, K.K.Y., Hill, S.J., Fernyhough, A., 2006. Isolation and the characterization of the degradation products of the mediator ABTS-derived radicals formed upon reaction with polyphenols, *Biochemistry and Biophysical Research Communications* ., 340, pp 597–603.

Osório, M.L., Osório, J., Romano., A. 2013. Photosynthesis, energy partitioning, and metabolic adjustments of the endangered Cistaceae species *Tuberaria major* under high temperature and drought. *Photosynthetica.*, 51 (1), pp 75-84. <https://doi.org/10.1007/s11099-012-0080-0>.

Oxiresearch, Inc., 2002. Colorimetric, quantitative assay for total antioxidant potential (aqueous samples).

Ozenda, P., 1977. Flore du Sahara, Ed. CNRS., Paris, France, pp 250-259.

-P-

Paech, K., 1963. Modern methods of plant analysis. Volume 6, Springer-Verlag, Germany.

Palici., 2016. Valorisation des Activités biologiques de certaines espèces végétales sahariennes Nord-africaines., Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques, Biotechnologies Agroalimentaires., Université de Bordeaux.

Patel, RM., 2014. Comparative antioxidant activity evaluation and hptlc phyto-chemical fingerprinting of some indian medicinal plant extracts. *Cibtech Journal of Bio-Protocols.*, 3, pp 19-34.

Penchev, P., Angelov, G., Condoret, J.S., 2010. Extraction des agents antioxydants (acide rosmarinique) à partir de la mélisse (*Melissa officinalis* L.). *Revue de Génie Industriel*, 5, pp 115- 123.

Peng, J., Jones, G.L., Watson, K., 2000. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress : effects of antioxidant supplements. *Free Radical Biology & Medicine.*, 28(11), pp 1598-1606. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00276-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00276-8).

Pereira, J.M., Lopes-Rodrigues, V., Xavier, C. P. R., Lima, M.J., Lima, R.T., Ferreira, I. C. F. R., Vasconcelos, M.H., 2016. An Aqueous Extract of *Tuberaria lignosa* Inhibits Cell Growth, Alters the Cell Cycle Profile, and Induces Apoptosis of NCI-H460 Tumor Cells. *Molecules.*, 21, p 595. <https://doi.org/10.3390/molecules21050595>.

Pironi, A., Giusti, M.E., De Pesquale, Lenzarini, C., Censorii E., Gonzales-Tejero, M.R., Sanches-Rojas, C.P., Della, A., Paraskeva-Hadjichambis, D., Hadjichambis, A.C.H., Skoula, M., Johnson, C.H., Sarpaki, A., El-Demerdash, M., El-Zayat, M., Hmamouchi, M., 2006. *Circum* Mediterranean cultural heritage and medicinal plant uses in traditional animal health care in eight selected areas within the RUBIA project. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* ., 2, p 16.

Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., Defraigne, J.O., 1999. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*, 4(5), pp 45-48.

Pinela, J., Antonio, A.L., Barros, L., Barreira, J.C.M., Carvalho, A.M., Oliveira, M.B.P.P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., 2015. Combined effects of gamma-irradiation and preparation method on antioxidant activity and phenolic composition of *Tuberaria lignosa*. *RSC Advances.*, 5, pp 14756–14767. <https://doi.org/10.1039/C4RA14944K>.

Pinela, J., Barros, L., Duenas, M., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R, 2012. Antioxidant activity, ascorbic acid, phenolic compounds and sugars of wild and commercial *Tuberaria lignosa* samples : Effects of drying and oral preparation methods. *Food Chemistry.*, 135, pp 1028–1035. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.038>.

Pinela, J., Prieto, M.A., Antonio, A.L., Carvalho, A.M., Oliveira, M.B P.P., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., 2017. Ellagitannin-rich bioactive extracts of *Tuberaria lignosa* : Insights into the 2radiation-induced effects in the recovery of high added-value compound, *Food and Function* ., *Royal society of chemistry.*,8, p 175. <https://doi.org/10.1039/C7FO00500H>.

Pinto, J.F., 2010. Nutracêuticos e alimentos funcionais. Lidel – edições técnicas, lda. Lisboa – Porto.

Popovici, C., Saykova, I., et al., 2009. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel.*, 4, pp 25-39.

Pourrut, B., Perchet, G., Silvestre, J., Cecchi, M., Guisresse, M., Pinelli, E., 2008. Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots. *J Plant Physiology.*, 165(6), pp 571–579. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.07.016>.

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.*, 53, p 4290. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>.

Proctor, M.C.F., 1978. *Cistaceae, Flowering plants of the world* : Heywood, V.H. Oxford University Press, Oxford, pp108-109.

Proksch, P., Gulz, P.G., 1984. Methylated flavonoids from *Cistus ladanifer* and *Cistus palhinhae* and their taxonomic implications. *Phytochemistry.*, 23, pp 470-471. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80359-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80359-3).

-Q-

Quezel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. C.N.R.S. Paris. Tome II, pp 700-702.

-R-

Rahman, I., Biswas, S.K., Kirkham, P.A., 2006. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemistry and Pharmacology.*, 72, pp 1439-1452. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.07.004>.

Ramawat, K.G., Merillon, J.M., 2008. *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*. Springer, Berlin Heidelberg, New York.

Raynaud, C., 1987. *Atlanthemum* Raynaud, un nouveau genre pour la famille des Cistaceae. *Annales Jard. Bot. Madrid.*, 44 (2), pp 309-317.

Rebaya, A., Igueld-Belghith, S., Baghdikian, B., Mahiou-Leddet, V., Mabrouki, F., Olivier, E., Cherif, J.K., Trabelsi-Ayadi, M., 2014. Total Phenolic, Total Flavonoid, Tannin Content, and Antioxidant Capacity of *Halimium halimifolium* (Cistaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science.*, 5 (01), pp 052-057. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50110>.

Retsky, K.L., Chen, K., Zeind, J., Frei, B., 1999. Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. *Free Radical Biology and Medicine.*, 26(1-2), pp 90-98.

Rice-Evans et Miller., 1999. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine.*, 20(7), pp 56-933.

Riehle, P., Vollmer, M., Rohn, S., 2013. Phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal infusions, antioxidant capacity and thermal stability during the brewing process. *Food Research International.*, 53, pp 891-899.

Rivas-Martinez, S., 1979. Brezales y jarales de Europa occidental. - Lazaroa. 1, pp 5-1.

Roberta, R.E., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C.A., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine.*, 26, pp 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).

- Roberts, J.C., 1996. The chemistry of paper. Royal Society of Chemistry, England.
- Robles, C., Garzino, S., 2000. Intraspecific variability in the essential oil composition of *Cistus monspeliensis* leaves. *Phytochemistry.*, 53, pp 71-75. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00460-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00460-4).
- Roginsky, V., Lissi, E.A., 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food, *Food Chemistry.*, 92, pp 235–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.004>.
- Ross, R., 2014. Polyphenols in plants: Isolation, purification and extract preparation. Academic Press, USA.
- Rubio-Moraga, A., Argandoña, J., Mota, B., Pérez, J., Verdea, A., Fajardo, J., Gómez-Navarro, J., Castillo-López, R., Ahrazem, O., Gómez-Gómez, L., 2013. Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum taxa* (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain., *Journal of Ethnopharmacology.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.04.028>.

-S-

- Sánchez-Gómez, P., Jiménez, J.F., Vera., J.B., 2011. *Helianthemum motae* (Cistaceae), a new species from southeastern Spain. *Annals of Botany Fennici.*, 48, pp 49-56. <https://doi.org/10.5735/085.048.0107>.
- Santagati, N.A., Salerno, L., Attaguile, G., Savoca, F., Ronsisvalle, G., 2008. Simultaneous determination of catechins, rutin, and gallic acid in *Cistus* species extracts by HPLC with diode array detection. *Journal of Chromatographic Science.*, 46, pp 150–156.
- Saracini, E., Tattini, M., Traversi, M.L., Vincieri, F.F., Pinelli, P., 2005. Simultaneous LC-DAD and LC-MS determination of ellagitannins, flavonoid glycosides, and acyl-glycosyl flavonoids in *Cistus salvifolius* L. Leaves. *Chromatographia.*, 62, pp 245–249.
- Saslis-Lagoudakis, C.H., Savolainen, V., Williamson, E.M., Forest, F., Wagstaff, S.J., Baral, S.R., Watson, M.F., Pendry, C.A., Hawkins, J.A., 2012. Phylogenies reveal predictive power of traditional medicine in bioprospecting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, pp 15835-15840.
- Scalbert., A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry.*, 30, pp 3875-3883. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L).
- Schroeter, H., Boyd, C., Spencer, J.P.E., Williams, R.J., Cadenas, E., Rice-Evans, C., 2002. MAPK signaling in neurodegeneration: Influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiology of Aging.*, 23(5), pp 861-880.
- Segnou, F.C.A., Akoroda, M., Hahn, S., 1992. Studies on the reproductive biology of white yam (*Dioscorea rotundata*). *Euphytica.*, 64 (3), p 197.
- Sekkat, F.Z., 2006. Essai de caractérisation phytoécologique des pelouses dans les monts des traras (Tlemcen)., diplôme de magister en biologie option : écologie végétale, p 116.

Sherwin, E.R., 1990. In : Branen, A.L., Davidson, P.M., Salminen, S. (Eds.), Food Additives. Marcel Dekker Inc., New York, p 139.

Smith, A.R., Shenvi, S.V., Widlansky, M., Suh, J.H., Hagen, T.M., 2004. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* ., 11(9), pp 1135-1146.

Somoza, B., Sanchez De Rojas, V.R., Ortega, T., Villar, A.M., 1996. Vasodilator effects of the extract of the leaves of *Cistus populifolius* on rat thoracic aorta. *Phytotherapy Research*., 10, pp 304–308. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199606\)10:4<304::AID-PTR848>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199606)10:4<304::AID-PTR848>3.0.CO;2-B).

Sosa, T., Chaves, N., Alias, J.C., Escudero, J.C., Henao, F., Gutiérrez-Merino, C., 2004. Inhibition of mouth skeletal muscle relaxation by flavonoids of *Cistus ladanifer* L : a plant defense mechanism against herbivores. *Journal of Chemical Ecology*., 30, pp 1087–1101.

Souèges, R., 1937. Développement de l'embryon chez *l'Helianthemum guttatum* Mill. Bulletin de la *Société Botanique de France*, 84 (4), pp 400-407, <https://doi.org/10.1080/00378941.1937.10837399>.

Stevanović, V., Matevski, V., Tan, K., 2009. *Helianthemum marmoreum* (Cistaceae), a new species from the Central Balkans. *Botanica Serbica*., 33, pp 13-19.

Stuart, J.A., Robb, E.L., 2013. Bioactive polyphenols from wine grapes. Springer Science & Business Media, Germany.

Sun, B., Fukuhara, M., 1997. Effects of co-administration of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole and flavonoids on the activation of mutagens and drug metabolizing enzymes in mice. *Toxicology*., 122, p 61.

-T-

Takhtajan, A.L., 1987. Systema Magnoliophytorum. Nauka, Leningrad.

Takhtajan, A.L., 1997. Diversity and Classification of Flowering Plants. *Columbia University Press*, New York, p 663.

Talavera, S., Gibbs, P.E., Herrera, J., 1993. Reproductive biology of *Cistus ladaniferus* (Cistaceae). *Plant Systematics and Evolution*., 186(3-4), pp 123-134.

Thanos, C.A., Georghiou, K., Kadis, C., Pantazi, C., 1992. Cistaceae : A Plant Family With Hard Seeds. *Israel Journal of Botany*., 41(4-6), pp 251-263.

Thorne, R.F., 1992. An updated phylogenetic classification of the flowering plants. *Aliso*., 13, pp 365–389.

Toth, S., Révay, A., 2011. *Oncopodium lidiae* sp. nov. (Hyphomycetes) on *Fumana procumbens* from Hungary. *Mycologia Balcanica*., 8, pp 89-91.

Trappe, J., 1979. The orders, families and genera of *Hypogeous Ascomycotina* (truffles and their relatives). *Mycotaxon* ., 9, pp 297–340.

Trappe, J., Claridge, A., Arora, Smit, A., 2008. Desert Truffles of the African Kalahari : Ecology, Ethnomycology and Taxonomy. *Economic Botany*., 62 (3) , pp 521–529.

Trindade, H., Sena, I., Gonçalves, S, Romano, A., 2012. Genetic diversity of wild populations of *Tuberaria major* (Cistaceae), an endangered species endemic to the Algarve region (Portugal), using

ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology.*, 45, pp 49–56, <https://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2012.06.028>.

Trykowska, J.K., Hejchman, E., Kruszewska, H., Wolska, I., Maciejewska, D., 2011. Synthesis and pharmacological activity of O-aminoalkyl derivatives of 7-hydroxycoumarin. *European Journal of Medicinal Chemistry.*, 46, pp 2252-2263.

Turkmen, N., Velioglu, Y.S., Sari, F., Polat, G., 2007. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules.*, 12, pp 484-496.

-V-

Valdés, B., 2013. Checklist of the vascular plants collected during the fifth “Iter Mediterraneum” in Morocco. *Bocconea.*, 26, pp13-132. <http://doi.org/10.7320/Bocc26.013>.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic., M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions.*, 160(1), pp 1-40.

Van Acker, S., van Balen, G.P., van den Berg, D.J., van der Vijgh, W.J.F., 1996. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemistry and Pharmacology.*, 56, pp 935– 943.

Verpoorte, R., 2002. La pharmacognosie du nouveau millénaire : pistes et biotechnologies. Des sources du savoir aux médicaments du futur, 4^{ème} congrès européen d'ethnopharmacologie. *IRD Edition*, Paris, p 274.

Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M., García-Parrilla, M. C., 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta.*, 71, pp 230–235.

Voirin, B., 1983. UV spectral differentiation of 5-hydroxy- and 5-hydroxy-3methoxyflavones with mono-(4'), di-(3',4') or tri-(3',4',5')-substituted B rings. *Phytochemistry.*, 22(10), pp 2107-2145.

-W-

Wichi, H.P., 1988. Enhanced tumour development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food and Chemical Toxicology.*, 26, p 717.

Willkomm, M., 1856. *Cistinearum Orbis Veteris Descriptio Monographica. Icones et Descriptiones Plantarum.* A.H. Payne, Leipzig.

Witaicenis, A., Seito, L.N., Da-Silveira, A.C., De-Almeida, L.D., Luchini, A.C., Orsi, P.R., Cestari, S.H., Di-Stasi, L.C., 2013. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. *Phytomedicine*, 21, pp 240-246.

-Y-

Yao, L.H., Jiang, Y.M., SHI, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S., 2004. Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition .*, 59, pp 113-122.

Yoshida, H., Ishikawa, T., Hosoi, H., Suzukawa, M., Ayaori, M., Hisada, T., et al., 1999. Inhibitory effect of tea flavonoids on the ability of cells to oxidize low density lipoprotein. *Biochemistry and Pharmacology.*, 58, pp 1695–703.

Yoshida, H., Kajimoto, G., Emura, S., 1993. Antioxidant effects of d-tocopherols at different concentrations in oils during microwave heating. *Journal of the American Oil Chemists' Society.*, 70(10), pp 989-995.

-Z-

Zaiter, L., Bouheroum, M., Hammoud, L., Sarri, D., Benayache, S., Leon, F., Brouard, I., Bermejo, J., Benayache., 2010. Phytochemical study of *Halimium halimifolium*. *Chemistry of Natural Compounds.*, 47, pp 1023-1024.

Zunzunegui, M., Baco, F.L., Diaz Barradas, M.C., Novo, F.G., 1999. Seasonal changes in phytochemical efficiency in leaves of *Halimium halimifolium*, a mediterranean semideciduous shrub. *Photosynthetica.*, 37 (1), pp 17-31.

Michael., L., 2016. Macromycetes within Cistaceae-dominated ecosystems in Cyprus. *Mycotaxon.*, 131, pp 255–256.

Sites-Web consultés

<http://www.ipni.org/>. Consulté le: 05/04/2018.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Consulté le : 15/04/2018.

<https://inpn.mnhn.fr> : INPI. Consulté le : 22/04/2018.

<https://www.ville-ge.ch> : Base de données des plantes d'Afrique CJB : Consulté le : 26/04/2018.

<http://www.mobot.org>. Consulté le : 10/05/2018.

<https://earth.google.com/web/> Maps data© 2018 Google : Consulté le : 20/05/2018.

Abstract

This research work is a contribution to the evaluation of the phytochemical composition and the antioxidant activity of the ethanolic extract of the aerial parts of an algerian plant belonging to the genus *Tuberaria* of the Cistaceae family.

This study led to the isolation of **3** secondary flavonoid metabolites **Tb1**, **Tb2** and **Tb3** using different chromatographic methods (VLC, TLC and CC). These pure products have been the subject of various 1D and 2D NMR spectroscopic analyzes (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC) and UV-Vis. The object plant showed an excellent antioxidant potential by the methods of DPPH, ABTS, CUPRAC, DMSO alkaline and Reducing Power. The results obtained are very promising and open ways for the use of this plant in the field of therapeutics.

Key words: Cistaceae, *Tuberaria*, Flavonoids, Chromatography, UV-Vis, 1D and 2D NMR, Antioxidant activity, CUPRAC, DMSO.

ملخص

يشكل هذا البحث مساهمة في تقييم التركيب الكيميائي والنشاط المضاد للأكسدة في المستخلص الإيثانولي للأجزاء الهوائية في مصنع جزائري ينتمي إلى جنس *Tuberaria* من من الفصيلة Cistaceae.

أدت هذه الدراسة إلى عزل 3 مركبات ثانوية فلافونويدية **Tb3** و **Tb2**, **Tb1** باستخدام طرق كروماتوغرافية مختلفة (VLC، TLC و CC). كانت هذه المنتجات النقية موضوعاً للتحليلات الطيفية المختلفة الرنين المغناطيسي النووي (ر.م.ن) D1 و D2 (H^1 ، C^{13} ، COZY، HSQC و HMBC) و UV-V. أظهرت النتيجة الخاضعة للدراسة فعالية ممتازة مضادة للأكسدة من خلال تحاليل DPPH، ABTS، CUPRAC، DMSO والقدرة الإرجاعية. النتائج التي تم الحصول عليها هي طرق واعدة جداً تفتح آفاق مستقبلية لاستخدام هذا النبات في مجال العلاجات.

الكلمات المفتاحية: *Tuberaria*، Cistaceae، الفلافونيدات، كروماتوغرافية، UV-V، ر.م.ن D1 و D2، نشاط مضاد للأكسدة، CUPRAC، DMSO.

Résumé

Ce travail de recherche constitue une contribution à l'évaluation de la composition phytochimique et de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique des parties aériennes d'une plante algérienne appartenant au genre *Tuberaria* de la famille Cistaceae.

Cette étude a conduit à l'isolement de 3 métabolites secondaires de nature flavonoïdiques **Tb1**, **Tb2** et **Tb3** en utilisant des méthodes chromatographiques différentes (VLC, CCM et CC). Ces produits purs ont fait l'objet de diverses analyses spectroscopiques RMN 1D et 2D (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC) et UV-Vis. La plante objet a manifesté un excellent potentiel antioxydant par les méthodes de DPPH, ABTS, CUPRAC, DMSO alcalin et pouvoir réducteur. Les résultats obtenus sont très prometteurs et ouvre des voies pour l'utilisation de cette plante dans le domaine de la thérapeutique.

Mots clés : Cistaceae, *Tuberaria*, Chromatographie, Flavonoïdes, RMN 1D et 2D, UV-Vis, Activité antioxydante, CUPRAC, DMSO.

Année
universitaire :
2017/2018

Présenté par :
HARIECHE MOHAMMED & BENOUDINA FARID

Investigation phytochimique et potentiel antioxydant d'une plante algérienne du genre *Tuberaria* (Cistaceae)

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du Diplôme de Master en Biochimie Appliquée

Résumé

Ce travail de recherche constitue une contribution à l'évaluation de la composition phytochimique et de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique des parties aériennes d'une plante algérienne appartenant au genre *Tuberaria* de la famille Cistaceae.

Cette étude a conduit à l'isolement de 3 métabolites secondaires de nature flavonoïdiques Tb1, Tb2 et Tb3 en utilisant des méthodes chromatographiques différentes (VLC, CCM et CC). Ces produits purs ont fait l'objet de diverses analyses spectroscopiques RMN 1D et 2D (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC) et UV-Vis. La plante objet a manifesté un excellent potentiel antioxydant par les méthodes de DPPH, ABTS, CUPRAC, DMSO alcalin et pouvoir réducteur. Les résultats obtenus sont très prometteurs et ouvre des voies pour l'utilisation de cette plante dans le domaine de la thérapeutique.

Mots clés : Cistaceae, *Tuberaria*, Chromatographie, Flavonoïdes, RMN 1D et 2D, UV-Vis, Activité antioxydante, CUPRAC, DMSO.

Laboratoire de recherche : Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques.

Jury d'évaluation

Président du jury : BENSEGUENI Abderrahmane

Pr. UFM Constantine.

Rapporteur : BOUTAGHANE Naima

MCA. UFM Constantine.

Examineur : SEMRA Ilhem

MAA. UFM Constantine.

Date de soutenance : 26/06/2018