

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI-CONSTANTINE 1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE VEGETALE



MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de MASTER (LMD)

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biologie et Physiologie de la Reproduction

INTITULÉ

**Etude phytochimique et évaluation du potentiel antioxydant
d'une espèce du genre *Linum***

Présenté Par

Melle MERAH KAHINA

Encadrant

Pr. KABOUCHE ZAHIA

Devant le jury :

| | | | |
|---------------------|--------------------|------|-------------------|
| Président du jury : | Mr. CHIBANI Salih | MCA | UFM Constantine 1 |
| Rapporteur : | Mme KABOUCHE Zahia | PROF | UFM Constantine 1 |
| Examineur : | Mme BOUZID Salha | MCB | UFM Constantine 1 |

Année universitaire 2019/2020

Dédicaces

*A toute ma famille
particulièrement ma mère et ma sœur.*

*A tous mes amis : particulièrement ma
meilleure amie Nadjoua.*

*A la mémoire de mon oncle et de ma
grand-mère.*

Remerciements

*Mes remerciements à Dieu, la raison
pour laquelle je me réveille chaque jour.*

*Au professeur Kabouche Fahia, merci
de m'avoir accueillie au sein du laboratoire
d'obtention des substances thérapeutiques
(LST). Merci également pour votre
confiance, votre disponibilité, vos conseils,
et pour votre amabilité, que Dieu vous
Protège.*

*Aux membres du jury, Docteur
Chibani Salih et Docteur Bouxid
Salha, Veuillez accepter mes très sincères
remerciements d'avoir accepté d'examiner
ce travail*

*A Melle Chebchoub Soumia et Mr.
Benmerache Abbes (LPSI) pour
leur aide, leur disponibilité et leur
gentillesse.*

Sommaire

| | |
|---|----|
| Introduction générale | 1 |
| <u>Chapitre 1: Aperçu bibliographique sur le genre <i>Linum</i></u> | |
| 1- Histoire | 2 |
| 2- Classification et distribution..... | 2 |
| 3- Description morphologique et anatomique..... | 5 |
| 4- Les métabolites secondaires du genre <i>Linum</i> | 6 |
| a- Les huiles essentielles | 6 |
| b- Les terpénoïdes..... | 7 |
| c- Les flavonoïdes..... | 8 |
| d- Les lignanes | 10 |
| e- Autres composés..... | 19 |
| 5- Les activités biologiques étudiées chez le genre <i>Linum</i> | 21 |
| a- Activités biologiques des parties aériennes et racinaires | 21 |
| b- Activités biologiques des graines | 22 |
| <u>Chapitre 2 : Dosage des polyphénols et techniques d'évaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i></u> | |
| 1- Détermination du contenu en polyphénols totaux..... | 25 |
| 2- Détermination de l'activité antioxydante | 25 |
| a- Test du DPPH | 25 |
| b- Test de l'ABTS | 26 |
| c- Test du CUPRAC | 26 |
| <u>Chapitre 3: Matériel et méthodes</u> | |
| 1- Matériel utilisé | 28 |
| a- Appareils..... | 28 |
| b- Réactifs | 28 |
| • Réactifs spécifiques | 28 |
| • Solvants | 28 |
| • Réactifs de révélation..... | 28 |
| c- Techniques chromatographiques utilisées..... | 28 |
| • Chromatographie sur couche mince (CCM) | 28 |
| • Colonne | 29 |
| • VLC..... | 29 |
| d- Matériel végétal..... | 29 |

| | |
|---|----|
| 2- Extraction | 30 |
| a- Extraction au Soxhlet..... | 30 |
| b- Macération..... | 30 |
| c- Extractions liquide-liquide..... | 31 |
| 3- Profils chromatographiques sur couche mince analytique | 32 |
| 4- Fractionnement de l'extrait EBL par VLC..... | 33 |
| 5- Tests <i>in vitro</i> | 36 |
| a- Détermination du contenu en polyphénols totaux | 36 |
| b- Détermination de l'activité antioxydante..... | 37 |
| b.1- Test du DPPH..... | 37 |
| b.2- Test de l'ABTS..... | 38 |
| b.3- Test du CUPRAC..... | 39 |
| <u>Chapitre 4: Résultats et discussion</u> | |
| 1- Extraction et séparation | 39 |
| 2- Analyse des profils chromatographiques..... | 40 |
| 3- Fractionnement par VLC..... | 41 |
| 4- Tests <i>in vitro</i> | 44 |
| a- Détermination du contenu en polyphénols totaux | 44 |
| b- Tests de l'activité antioxydante | 45 |
| b.1- Test du DPPH..... | 45 |
| b.2- Test de l'ABTS..... | 46 |
| b.3- Test du CUPRAC..... | 47 |
| Conclusion générale..... | 50 |
| Perspectives..... | 50 |
| Références bibliographiques..... | 51 |

Liste des abréviations

A_{0,5} : Concentration indiquant 0,50 d'absorbance

ABTS : acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique

AcOEt : acétate d'éthyle

BHA : hydroxyanisole butylé

CCM : chromatographie sur couche mince

C-18 : chromatographie en phase inverse

CI₅₀ : Concentration d'antioxydant requise pour une réduction de 50% de la DPPH

CUPRAC : Cupric reducing antioxidant capacity

DPPH : 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyl)

EAG : équivalent d'acide gallique

EAL : extrait acétate d'éthyle de *Linum*

EBL : extrait *n*-butanol de *Linum*

EBL N : extrait *n*-butanol *Linum* migré sur gel de silice normal

ECL : extrait chloroforme de *Linum*

MeOH : méthanol

SDG : secoisolariciresinol_diglycoside

TAC : total antioxidant capacity

TEAC : Trolox equivalent antioxidant capacity

UV : ultra violet

VLC : Vacuum Liquid chromatography

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Classification du genre <i>Linum</i> selon l'Angiosperm Phylogeny Group III (APGIII). ... | 2 |
| Tableau 2 : Espèces de <i>Linum</i> rencontrées en Algérie..... | 4 |
| Tableau 3 : Les trois constituants majeurs isolés de l'huile de <i>L. pubescens</i> | 7 |
| Tableau 4 Les flavonoïdes isolés du genre <i>Linum</i> | 9 |
| Tableau 5 : Les lignanes aryltétralines isolés du genre <i>Linum</i> | 13 |
| Tableau 6 : Les lignanes aryl-naphthalènes isolés du genre <i>Linum</i> | 15 |
| Tableau 7 : Les lignanes aryl-dihydronaphthalènes isolés du genre <i>Linum</i> | 16 |
| Tableau 8 : Les lignanes de type dibenzylbutyrolactone isolé du genre <i>Linum</i> | 17 |
| Tableau 9 : Les glucosides (monolignols et sucres) isolés du genre <i>Linum</i> | 18 |
| Tableau 10 : Les glycosides cyanogènes isolés de <i>L. grandiflorum</i> | 19 |
| Tableau 11 : Les hydrocarbures isolés de <i>L. mucronatum</i> | 20 |
| Tableau 12 : Activités biologiques reconnues du genre <i>Linum</i> | 21 |
| Tableau 13 : Activités biologiques des graines de lin | 23 |
| Tableau 14 : Fractionnement d'1g de l'extrait EBL par VLC sur gel de silice normale. | 34 |
| Tableau 15 Fractionnement d'1g de l'extrait EBL par VLC sur gel de polyamide..... | 35 |
| Tableau 16 Rendements de l'extraction..... | 39 |
| Tableau 17 Teneur en polyphénols des extraits EBL et EAL. | 44 |
| Tableau 18 : Inhibition du DPPH par les extraits EBL et EAL. | 45 |
| Tableau 19 Activité du piégeage de l'ABTS par les extraits EAL et EBL..... | 46 |
| Tableau 20 : Inhibition du CUPRAC par les extraits EAL et EBL. | 47 |
| Tableau 21 : Activité antioxydante des extraits étudiés par les tests DPPH, ABTS, et CUPRAC. | 48 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Phylogénie de quelques espèces du genre <i>Linum</i> | 3 |
| Figure 2 : Distribution du genre <i>Linum</i> dans le monde. | 4 |
| Figure 3 : Fleur, Feuille, Capsule caractéristiques du genre <i>Linum</i> | 6 |
| Figure 4 Structure de l'usitatissimine A..... | 8 |
| Figure 5 : Structure de base des flavonoïdes..... | 8 |
| Figure 6 : Unité de base et principaux types de couplages des lignanes et des néolignanes. 11 | |
| Figure 7 : Corrélation entre les deux groupes infra-spécifiques majeures du <i>Linum</i> et les classes de lignanes. | 12 |
| Figure 8 : Norlignane isolé du genre <i>Linum</i> | 17 |
| Figure 9 : Maléimides isolés de <i>Linum usitatissimum</i> | 20 |
| Figure 10 : Le DPPH – radical libre et forme réduite | 26 |
| Figure 11 : La réaction du CUPRAC..... | 27 |
| Figure 12 Chromatographie sur couche mince..... | 29 |
| Figure 13 Chromatographie sur colonne..... | 29 |
| Figure 14 : Schéma récapitulatif des étapes d'extraction par macération jusqu'à l'obtention de l'extrait sec. | 30 |
| Figure 15 : Schéma récapitulatif de l'étape d'extraction liquide liquide..... | 32 |
| Figure 16 : Objectifs de l'utilisation de la chromatographie sur couche mince. | 33 |
| Figure 17 : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait EBL par VLC. | 34 |
| Figure 18 : Plaques CCM des fractions Fr _A -Fr _H et de l'extrait EBL | 35 |
| Figure 19 Plaques CCM des fractions (Fr ₁ -Fr ₉) récoltées de la VLC sur polyamide et l'extrait EBL..... | 36 |
| Figure 20 Courbe d'étalonnage de l'acide gallique. | 37 |
| Figure 21 : Test DPPH réalisé sur microplaque pour les extraits EBL et EAL..... | 38 |
| Figure 22 : Test ABTS réalisé sur microplaque pour les extraits EBL et EAL..... | 39 |
| Figure 23 Test CUPRAC réalisé sur microplaque pour les extraits EBL et EAL..... | 40 |
| Figure 24: Profils chromatographiques des extraits EAL et EBL..... | 40 |
| Figure 25: Profils chromatographiques des extraits EAL et EBL..... | 41 |
| Figure 26 : profil chromatographique d'extrait EBL sur C18..... | 42 |
| Figure 27 : Plaques CCM des fractions A-H et de l'extrait EBL | 43 |
| Figure 28Plaques CCM des fractions (F1-F9) récoltés de la VLC sur polyamide et l'extrait EBL | 43 |
| Figure 29 : Activité anti-radicalaire du DPPH. | 45 |
| Figure 30: Activité de piégeage de l'ABTS | 46 |
| Figure 31 : Test de la capacité antioxydante pour la réduction cuprique | 47 |
| Figure 32 : Résultats des Cl ₅₀ des tests DPPH et ABTS et A 0,5 du test CUPRAC des extraits EBL et EAL..... | 48 |

Introduction générale

La diversité des climats, en Algérie, a généré une flore riche et variée. De la Méditerranée au Sahara, en passant par les Aurès, s'échelonne une végétation très contrastée. Elle est proche de la végétation sud européenne, au nord de l'Algérie, ainsi, on y voit les pins, sapins et les oliviers. Quant au sud, l'apparition du palmier dattier est une indication de l'arrivée d'un désert, sec et aride.

Par exemple, le bassin méditerranéen a longtemps été reconnu comme un hot spot mondial de la biodiversité en raison de la taille et de la diversité de sa flore; 10% des plantes vasculaires du monde se trouvent sur 1,6% de la surface terrestre. D'autre part, Les récentes révisions taxonomiques, estiment le nombre d'endémies nationales à plus de 300 taxons et le nombre total de taxons de rang élémentaire (espèce ou sous-espèce) à 4 000 (**Yahi et al. 2012**).

Beaucoup de ces espèces végétales sauvages attendent d'être étudiées, et restent encore méconnues par rapport à leurs propriétés phytochimiques et biologiques. Le Lin (*Linum*) est représenté par **13** espèces dans la flore algérienne (**Quezel et Santa, 1963**), il est d'un grand intérêt industriel et thérapeutique.

L'étude d'une espèce du genre *Linum*, sujet de ce travail, est une contribution à l'enrichissement de nos connaissances sur le potentiel phytochimique et thérapeutique que possède la flore sauvage algérienne. C'est la première fois que le laboratoire entame des investigations sur ce genre.

Ce mémoire est divisé en quatre chapitres. Le premier est un aperçu bibliographique, portant sur la présentation du genre étudié, le *Linum*, ainsi que ses principes actifs déjà rapportés dans la littérature. Le deuxième chapitre décrit quelques techniques d'évaluation de l'activité antioxydante, *in vitro*. Le troisième chapitre décrit le matériel végétal et les méthodes utilisées. Le quatrième comprend les résultats obtenus et la discussion. Le mémoire se termine par une conclusion et perspectives.

Chapitre 1

Aperçu bibliographique sur le genre Linum

1-Histoire

Pendant des milliers d'années, Le genre *Linum* L. a joué un rôle important dans le développement économique et social de l'humanité. Ainsi, les premières civilisations du mésolithique ont réalisé la valeur du Lin sauvage, en tant que source de fibres utiles. Il s'agit, peut-être, de l'espèce *Linum bienne* Mill. (= *L. angustifolium* Huds.) (McDill et al. 2009).

Par ailleurs, les plus anciennes graines de lin archéologique, provenant des sites d'excavation en Syrie, datent d'environ 9000 ans avant notre ère. Autour de 8000 ans avant notre ère, le lin était utilisé dans tout le croissant fertile. On pense que sa culture pour ses fibres et pour ses graines a conduit au développement de l'espèce *L. usitatissimum* L., le lin cultivé moderne, une des premières plantes domestiquées (McDill et al. 2009).

Le lin, *L. usitatissimum*, représente alors une espèce importante pour ses multiples usages. En effet, c'est la première plante cultivée pour ses fibres dans l'ancien monde, et elle a été la base des premières industries, basées sur l'exploitation végétale : le tissage. L'huile, extraite de ses graines, a été reconnue par les égyptiens anciens qui l'utilisaient afin d'embaumer les morts, avant de les envelopper dans plusieurs couches de tissu en fibres de lin. Aujourd'hui, les graines de *L. usitatissimum* sont le produit le plus important de l'espèce, utilisé à des fins nutritionnelles, médicinales et comme source d'huile, un composant important de nombreuses peintures, encres, vernis et lubrifiants (McDill et al. 2009).

2-Classification et distribution

Le genre *Linum* est classé dans la famille des Linaceae. Cette famille contient, approximativement, 260 espèces appartenant à deux sous-familles : les Hugonioideae et les Linoideae. Cette dernière est la plus large avec un nombre d'espèces estimé à 210, partagées en 8 genres, incluant le genre *Linum*, qui est le genre type de la famille avec le nombre le plus élevé d'espèces (McDill et Simpson, 2011). En accord avec l'Angiosperm phylogeny group III (APGIII), la classification du *Linum* est représentée dans le **tableau 1**.

Tableau 1 : Classification du genre *Linum* selon l'Angiosperm Phylogeny Group III (APGIII).

| | |
|--------------|----------------------|
| Clade | Angiospermes |
| Clade | Dicotylédones vraies |
| Clade | Rosidaeae |
| Clade | Fabidaeae |
| Ordre | Malpighiales |
| Famille | Linaceae |
| Sous-Famille | Linoideae |
| Genre | <i>Linum</i> |

Selon **Planchon (1847, 1848)** et **Winkler (1931)** in **McDill et al. (2009)**, le *Linum* est divisé en deux grands clades, contenant chacun plusieurs sections. Un grand clade à fleurs, principalement, bleues contient les sections *Dasylinum* et *Linum*, tandis que le clade à fleurs jaunes contient les sections *Cathartolinum*, *Syllinum* et *Linopsis* (**figure 1**).

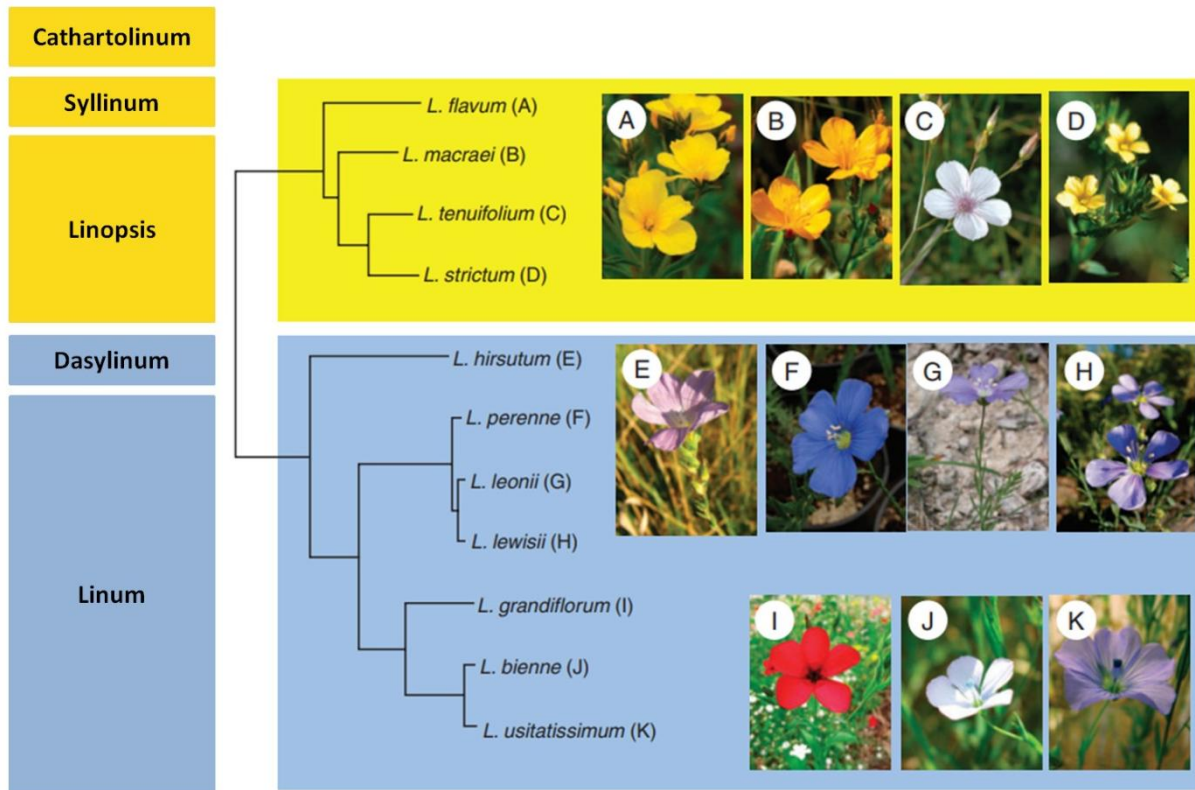


Figure 1 : Phylogénie de quelques espèces du genre *Linum*, deux grands clades peuvent être distingués, en bleu le clade des fleurs bleues, avec les sections *Dasylinum* : *L. hirsutum* et *Linum* : *L. perenne*, *L. leonii*, *L. lewisii*, *L. grandiflorum*, *L. bienne*, *L. usitatissimum*. En jaune, le clade des fleurs jaunes, avec les sections *Cathartolinum*, *Syllinum* : *L. flavum* et *Linopsis* : *L. macraei*, *L. tenuifolium*, *L. strictum*, Selon McDill et al.2009, et Sveinsson et al. 2014.

La phylogénie moléculaire de *Linum* a récemment été largement étudiée par **McDill et al. (2009)**, afin d'évaluer les relations phylogénétiques entre les clades et les sections déjà fixés par la classification classique. Ces auteurs se sont intéressés, également, à l'étude de l'hétérostylie d'un point de vue phylogénétique. Ce caractère, reconnu par Darwin chez *Linum perenne*, est souvent présent dans les fleurs de ce genre.

Approximativement, 180 espèces appartiennent au genre *Linum* et sont réparties dans les régions tempérées et subtropicales du monde (**Figure 2**). En raison de leurs fleurs aux couleurs vives et attrayantes, certaines sont des plantes ornementales de jardin, comme le *L. grandiflorum* aux fleurs rouges, le *L. perenne* aux fleurs bleues et le *L. flavum* aux fleurs jaunes, (**McDill et al. 2009**). Le lin cultivé *L. usitatissimum* est une autre espèce importante de ce genre. C'est la troisième culture de fibres naturelles en importance et l'une des cinq

principales cultures oléagineuses au monde (Nag et al. 2015). La figure 2 montre la distribution du genre *Linum* dans le monde.

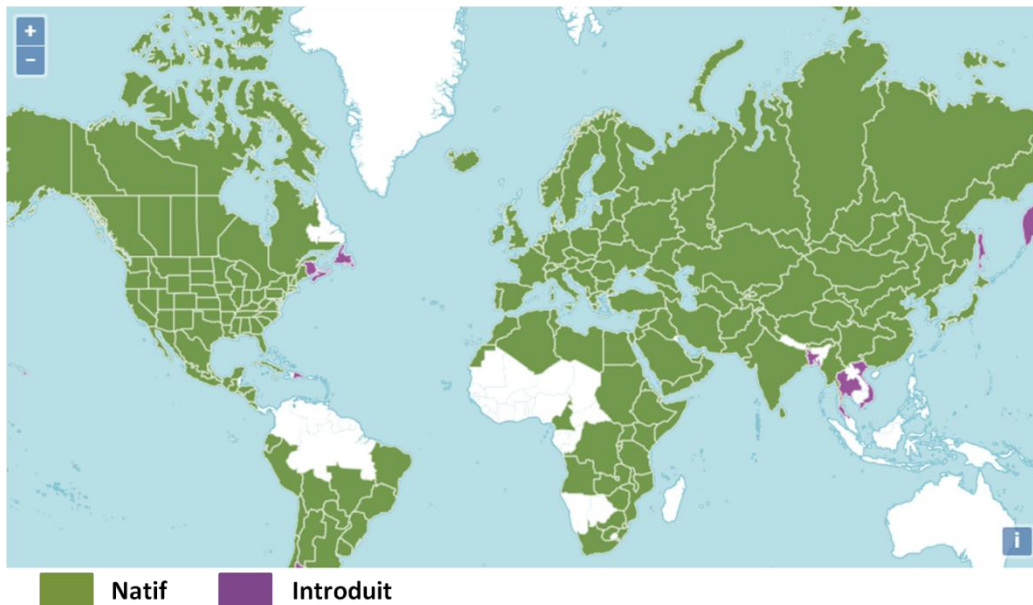


Figure 2 : Distribution du genre *Linum* dans le monde. La couleur verte indique que le genre est natif de la région, la couleur mauve indique que le genre a été introduit, les régions qui apparaissent blanches indiquent une absence du genre. Source : <http://www.plantsoftheworldonline.org>.

13 Espèces, appartenant au genre *Linum*, poussent en Algérie (Quezel et Santa 1963). Leurs noms respectifs et leurs aires de répartition générale sont récapitulés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Espèces de *Linum* rencontrées en Algérie (Quezel et Santa, 1963).

| N° | Espèce | Sous-espèce | Variété | Aire de répartition générale des espèces en Algérie |
|----|-------------------------|-------------------------|----------------|---|
| 1 | <i>L. maritimum</i> | | | Méditerranée |
| 2 | <i>L. tenue</i> | <i>tenue</i> | | Endémique du nord de l'Afrique |
| | | <i>munbyanum</i> | | |
| 3 | <i>L. strictum</i> | | | Méditerranée |
| 4 | <i>L. gallicum</i> | | | Méditerranée |
| 5 | <i>L. numidicum</i> | | <i>typicum</i> | Endémique du nord de l'Afrique |
| 6 | <i>L. corymbiferum</i> | <i>asperifolium</i> | | Endémique du nord de l'Afrique |
| | | <i>corymbiferum</i> | | |
| 7 | <i>L. suffruticosum</i> | <i>eu-suffruticosum</i> | | Ouest de la méditerranée |
| 8 | <i>L. tenuifolium</i> | | | Est de la méditerranée |
| 9 | <i>L. decumbens</i> | | | Ouest de la méditerranée |
| 10 | <i>L. grandiflorum</i> | | | Endémique |
| 11 | <i>L. narbonense</i> | | | Ouest de la méditerranée |
| 12 | <i>L. austriacum</i> | <i>gaetulum</i> | | Europe-méditerranée |

| | | | | |
|----|-------------------------|----------------------|--|--------------|
| | | <i>collinum</i> | | |
| 13 | <i>L. usitatissimum</i> | <i>angustifolium</i> | | Méditerranée |
| | | <i>usitatissimum</i> | | |

3-Description morphologique et anatomique

Selon **Robson (1963)** et **Smith Doreen (1966)**, la description générale du genre *Linum* est rédigée ainsi :

Aspect général : Herbes vivaces ou annuelles, souvent ligneuses à la base.

Feuilles : sessiles et simples, souvent alternes (mais parfois opposées ou verticillées) entières ou à bord denticulé ou cilié. Stipules glandulaires, persistantes ou absentes.

Fleurs : hermaphrodites, actinomorphes, et pentamères. Inflorescence: cyme terminale monochasiale ou dichasiale, ou rarement fleurs solitaires. Sépales 4–5, entiers ou à bords dentelés capito-glandulaires, libres, persistants. Pétales 4–5, blancs, jaunes, bleus, roses ou rouges, libres ou très rarement unis à la base, à griffes courtes.

Étamines : 4–5, alternant avec des pétales; staminodes parfois présents, 4–5, filiformes et entre les étamines, tous réunis à la base formant un court tube staminal.

Ovaire 4–5-loculaire; chaque *loculus* est divisé en partie par un faux septum et contenant deux ovules. Styles 4–5, libres ou rarement unis à la base; stigmates linéaires, oblongs ou capités.

Fruit: capsule à 4–5 locules, à 8–10 valves.

Graines : lisses et plates, avec peu ou pas d'endosperme présent; testa devenant mucilagineux au mouillage; embryon droit (**figure 3**).

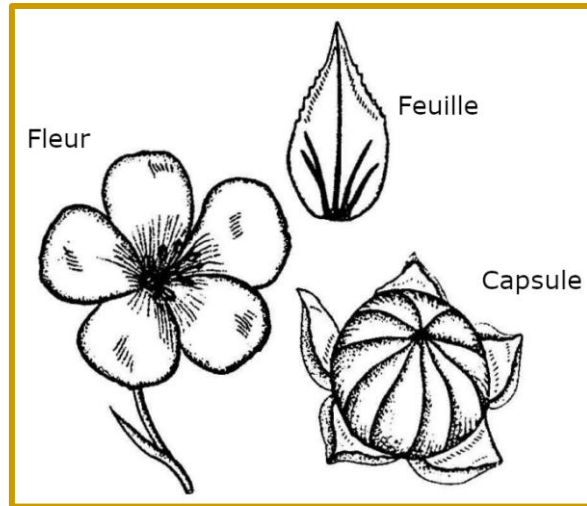


Figure 3 : Fleur, Feuille, Capsule caractéristiques du genre *Linum* (Quezel et Santa, 1963).

4- Les métabolites secondaires du genre *Linum*

Plusieurs études sur la caractérisation des métabolites secondaires du genre *Linum*, dans un but phylogénétique (les lignanes) ou bien phytothérapeutique ont porté sur les parties aériennes et racinaires. En effet, un large éventail de molécules est mis en évidence, appartenant aux groupes des terpènes, des acides phénoliques, des flavonoïdes, et des lignanes, ainsi que d'autres composés, qui n'appartiennent à aucun de ces groupes.

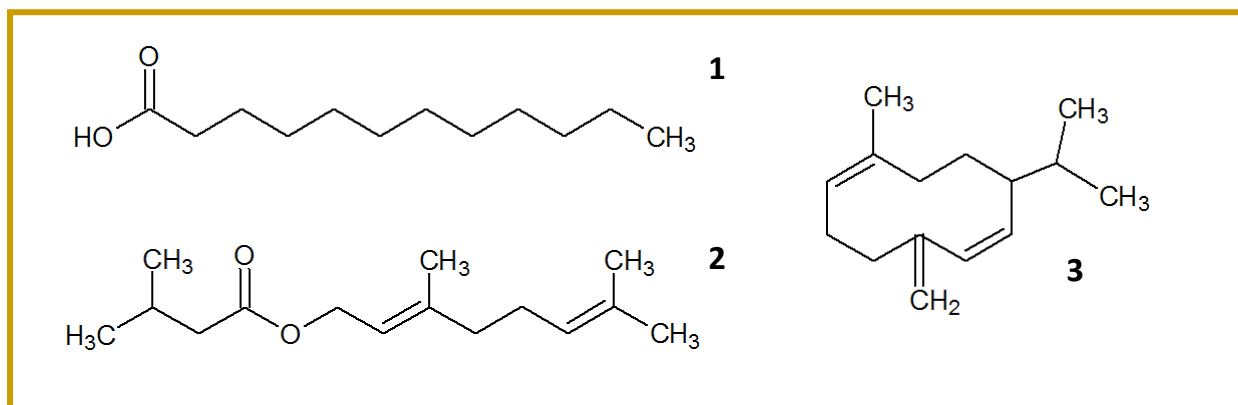
a- Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont largement utilisées dans les industries pharmaceutiques, sanitaires, cosmétiques, agricoles et alimentaires. En raison du mode d'extraction, principalement par distillation à partir de plantes aromatiques, ils contiennent une variété de molécules volatiles, et de faible poids moléculaire. Les terpènes et les terpénoïdes, représentent une grande partie de ces molécules. D'autres composants aromatiques dérivés du phénol et des composants aliphatiques, sont également présents (Bakkali et al. 2008).

Le travail d'Al-Qudah (2013) s'est intéressé à caractériser les huiles essentielles dans les parties aériennes fleuries de l'espèce *L. pubescens*. En utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). L'analyse, GC/MS de l'huile brute, a permis d'identifier 68 composants représentant environ 98,95% de l'huile. Les trois constituants majeurs sont résumés dans le **tableau 3**. Les extraits possèdent un large spectre d'activités, *in vitro*, contre un panel de souches bactériennes responsables des maladies les plus courantes.

Tableau 3 : Les trois constituants majeurs isolés de l'huile de *L. pubescens*.

| Espèce | Nom de la molécule isolée | Groupe | Structure | Références |
|---------------------|---------------------------|-----------------------|-----------|-----------------------|
| <i>L. pubescens</i> | Acides laurique | Acides carboxyliques | 1 | Al-Qudah, 2013 |
| | Geranyl isovalerate | Monoterpènes oxygénés | 2 | |
| | Germacrene D | Sesquiterpènes | 3 | |



b- Les terpénoïdes

Les terpènes forment des classes structurellement et fonctionnellement différentes. Ils sont fabriqués à partir de la combinaison de plusieurs unités à bases de 5 carbones (C5) appelées isoprène. Selon le nombre de ces unités, des grands groupes principaux sont ainsi désignés comme : les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), mais il existe également des hémiterpènes (C5), des diterpènes (C20), des triterpènes (C30) et des tétraterpènes (C40). Par ailleurs, un terpène contenant de l'oxygène est appelé terpénoïde (Bakkali et al. 2008).

Les diterpénoïdes sont des composés terpénoïdes qui représentent une classe importante, diversifiée et unique de produits C20 non volatils. L'étude de Sun et al. (2009) a mis en évidence un diterpénoïde tétracarbo-cyclique isolé des racines de *L. usitatissimum*. Ce nouveau composé comprend un anneau de furane, tétrasubstitué, saturé, supplémentaire et possédant un nouveau type de squelette C et a été nommé usitatissimine A, figure4.

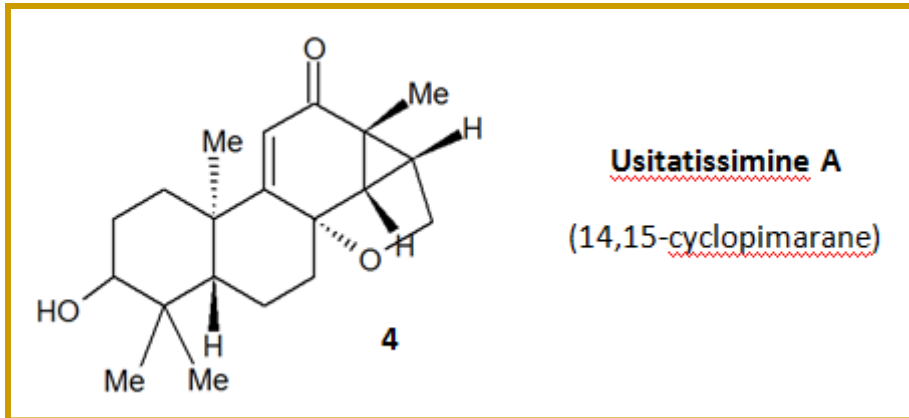


Figure 4 Structure de l'usitatissimine A, (Sun et al. 2009).

c- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes comprennent un grand groupe de composés naturels, et de faible poids moléculaire se trouvant dans toutes les plantes vasculaires. Ils sont présents dans les fruits, les légumes, les noix, les graines, les tiges, les fleurs, l'écorce, et les racines (Middleton, 1996).

Chimiquement, les flavonoïdes sont basés sur un squelette à quinze carbones, composé de deux cycles benzéniques, A et B, liés via un cycle pyrane hétérocyclique C. Ils peuvent être divisés en une variété de classes, telles que les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanonols, les isoflavones et les flavan-3-ols. Leur structure générale est présentée dans la figure 5.

Les différentes classes de flavonoïdes diffèrent par le niveau d'oxydation et le modèle de substitution du cycle C, tandis que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par le modèle de substitution des cycles A et B. Les flavonoïdes se présentent sous forme d'aglycones, de glycosides et de dérivés méthylés (Kumar et Pandey, 2013).

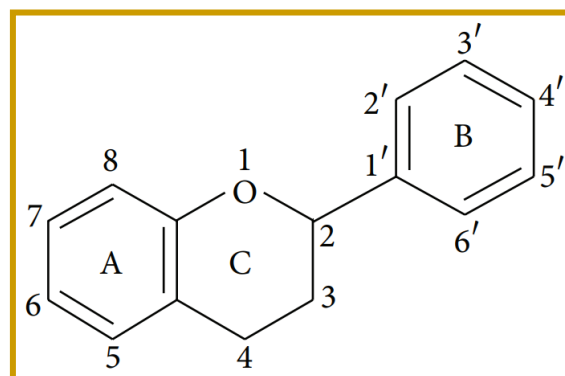


Figure 5 : Structure de base des flavonoïdes

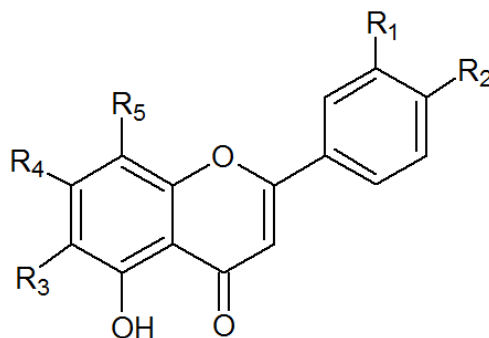
Il a été démontré que les flavonoïdes dans les systèmes expérimentaux, *in vitro* et *in vivo*, depuis plusieurs décennies, possèdent des activités antiallergiques, anti-

inflammatoires, antivirales, anticancéreuses et anticarcinogènes. De plus, certains d'entre eux sont de puissants antioxydants (**Middleton, 1996**).

Le **tableau 4** résume les différents travaux ayant isolé les flavonoïdes, à partir de plusieurs espèces du genre *Linum*. Ils font partie de la classe des flavones.

Tableau 4 : Les flavonoïdes isolés du genre *Linum*.

| Flavonoïdes (flavones) | Structure | Espèce | Référence |
|---|-----------|---------------------------------------|-----------------------------|
| Vicénine 1 | 5 | <i>L. grandiflorum</i> | Mohammed et al. 2009 |
| Vicénine 2 | 6 | | |
| Vicénine 3 | 7 | | |
| Lutéoline-7- <i>O</i> - α -D-(6'''- <i>E</i> -feruloyl)glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (glucoluteolin) | 8 | | |
| Isoorientine (Lutéoline-6- <i>C</i> glucoside) | 9 | <i>L. capitatum</i> Kit | Stosic et al. 1989 |
| Genkwanine-4'- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside | 10 | <i>L. usitatissimum</i> | Sun et al. 2009 |
| 6- <i>C</i> - [β -D-glucuronopyranosyl (1 \rightarrow 6)- <i>O</i> - β -D-glucuronopyranoside] apigénine (Mucronatoside1) | 11 | <i>L. mucronatum subsp. orientale</i> | Zare et al. 2014 |
| 7- <i>O</i> -methyl [-4'- <i>O</i> - β -D-arabinofuranosyl (1 \rightarrow 6) - <i>O</i> - β -D-glucuronopyranoside] apigénine (Mucronatoside 2) | 12 | | |
| Dimethyl-lutéoline | 13 | <i>L. maritimum</i> L | Volk et Sinn, 1968 |
| 5,7,4'-Trihydroxy-flavon-8- <i>C</i> - [6- <i>O</i> - acétyle-(4- <i>O</i> - α -L -rhamnopyranosyl) - α -D-glucopyranoside] | 14 | | |
| 3',4'-Dimethyl-lutéoline-7- <i>O</i> -neohesperidoside | 15 | | |
| 5-Hydroxy-7,3',4'- trimethoxy-flavon-6- <i>C</i> - [6-or-2- <i>O</i> - α -L(<i>O</i> -acetylramno)- β -D-glucopyranosids] | 16 | | |



5 : R₁= H, R₂= OH, R₃= xylosyl, R₄= OH, R₅= glucosyl.

6 : R₁= H, R₂= OH, R₃= glucosyl, R₄= OH, R₅= glucosyl.

7 : R₁= H, R₂= OH, R₃= glucosyl, R₄= OH, R₅= xylosyl.

8 : R₁= OH, R₂= OH, R₃= H, R₄= O-glucosyl, R₅= H.

9 : R₁= OH, R₂= OH, R₃= glucosyl, R₄= OH, R₅= H.

10 : R₁= H, R₂= O-glucosyl, R₃= H, R₄= O-CH₃, R₅= H.

11 : R₁= H, R₂= OH, R₃= C-β-D-glucuronopyranosyl (1→6)-O-β-D-glucuronopyranoside, R₄= OH, R₅= H.

12 : R₁= H, R₂= O-β-Darabinofuranosyl (1→6)-O-β-D-glucuronopyranoside, R₃= H, R₄= 7-O-methyl, R₅= H.

13 : R₁= OMe, R₂= OMe, R₃= OH, R₄= H.

14 : R₁= OMe, R₂= OMe, R₃= Oα-L-Rhamno-pyranosyl, R₄= H.

15 : R₁= OMe, R₂= OMe, R₃= Oβ-Neohesperidosyl, R₄= H.

16 : R₁= OMe, R₂= OMe, R₃= OMe, R₄= (O - Acetyl) -rhamno - glucosyl.

d- Les lignanes

La famille des lignanes regroupe plus de 3000 substances naturelles. Leur distribution botanique est large : plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante-dix familles. Chez les Gymnospermes (*Acrogymnospermae*), ils sont surtout rencontrés dans les bois alors que chez les Angiospermes (*Magnoliophyta*) ils ont été identifiés dans tous les tissus et organes. Les néolignanes semblent avoir une distribution plus restreinte, ils sont spécifiques de certains ordres végétaux (**Bruneton, 2016**).

Le terme lignane a été introduit par Haworth (1936) pour décrire un groupe de dimères phénylpropanoïdes. Le processus de dimérisation des précurseurs C(6) –C(3) donne naissance à trois classes importantes de métabolites secondaires naturels: les lignanes, les néo-lignanes et les nor-lignanes (**Umezawa, 2003**).

La principale différence entre ces trois classes est due aux différents types de jonctions entre les deux unités C(6) C(3). Dans les lignanes, cette jonction se fait, généralement, par une liaison β - β (8-8'), mais d'autres types de jonctions peuvent exister. Dans les néo-lignanes la jonction n'est pas de type β - β . Par conséquent, les lignanes et les néo-lignanes, et leurs différentes sous-classes dérivées, peuvent être identifiés en fonction des squelettes carbonés qu'ils possèdent (**figure 6**). Pour ce qui concerne les nor-lignanes, la structure est plus compliquée. Ces derniers possèdent une caractéristique particulière, par rapport aux lignanes et aux néo-lignanes, qui est la coupe d'un carbone de la chaîne centrale. Cette perte oblige cette chaîne à être disposée différemment des lignanes et des néo-lignanes (**Frezza et al. 2020**).

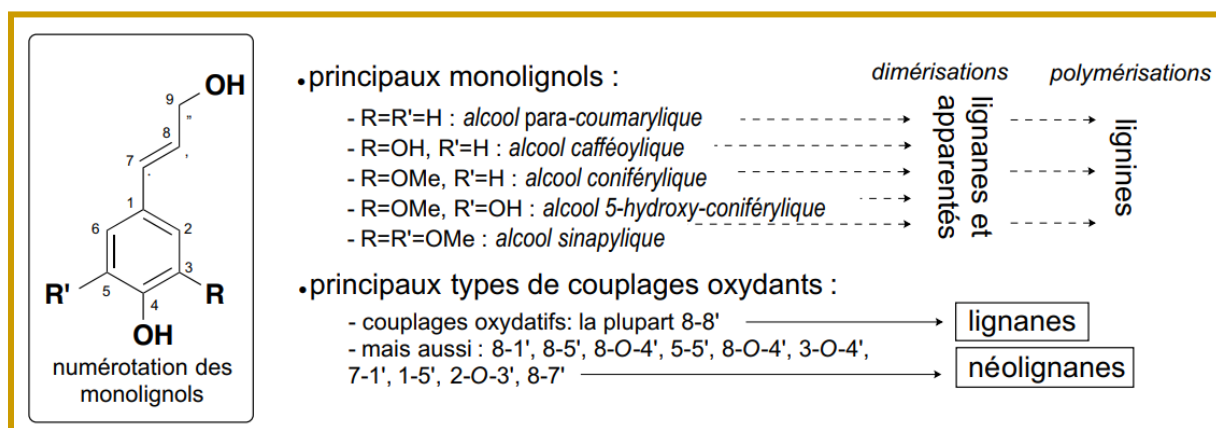


Figure 6 : Unité de base et principaux types de couplages des lignanes et des néolignanes.
Source : Bruneton, 2016.

Depuis la découverte de la podophyllotoxine aux propriétés anti-cancérigènes chez *Linum album*, l'intérêt pour l'investigation des lignanes dans le genre *Linum* est devenu grandissant. D'autres travaux suivirent, aboutissant à la découverte de la justicidine B. Autre molécule phare, trouvée dans les racines de beaucoup d'espèces du genre *Linum* (**Schmidt et al. 2010**).

Ces investigations scientifiques ont permis, entre autre, de faire un lien entre la classification infra-spécifique du genre *Linum* et les différentes classes des lignanes (**figure 7**). En effet, Les travaux de **Schmidt et al. (2010)** montrent que les espèces étudiées du genre *Linum* (**41 espèces**), en accord avec leur profil en lignanes (**64 lignanes différents isolés**), peuvent être divisées en deux groupes : le groupe accumulant majoritairement les lignanes de type Aryltetralines (groupe à fleurs jaunes), il comprend les sections *Syllinum*, *Cathartolinum* et *Linopsis*, et le groupe accumulant majoritairement des aryldihydronaphthalènes/arylnaphthalènes (groupe à fleurs bleus) qui comprends les sections *Linum* et *Dasylinum*. Toutefois, il est intéressant de noter que *Linum usitatissimum*, et *Linum bienne* faisant partie, toutes les deux, de la section *Linum*, dérogent à la règle car ils contiennent, majoritairement, des lignanes non cycliques, de type dibenzylbutyrolactone et de type furofurane, respectivement. Ces résultats sont très fortement corrélés avec la

systematique et la phylogénie moléculaire établie par **McDill et al. (2009)**. Les lignanes sont le seul groupe de métabolites secondaires qui se distingue par son utilisation dans la classification infrasécifique du genre *Linum*.

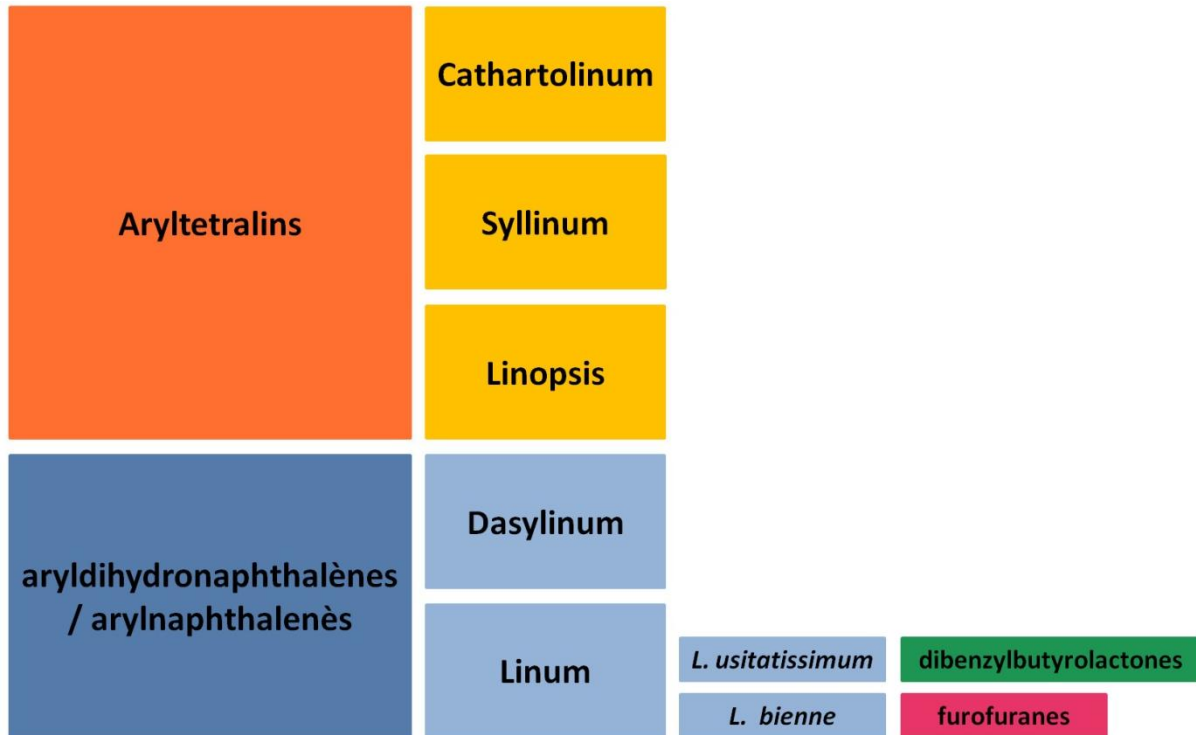
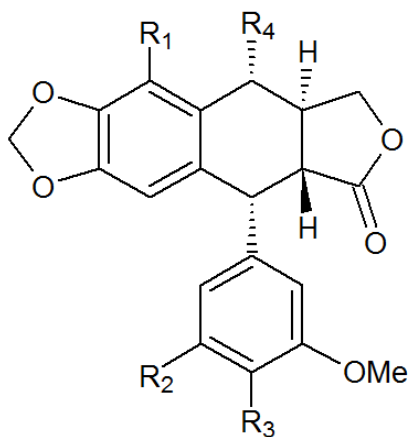


Figure 7 : Corrélation entre les deux groupes infra-spécifiques majeures du genre *Linum* et les différentes classes de lignanes. La couleur jaune indique que les sections *Cathartolinum*, *Syllinum* et *Linopsis* appartiennent au groupe de fleurs de couleur jaune. La couleur bleu clair indique que les sections *Dasylinum* et *Linum* appartiennent au groupe à fleurs bleues.

Les tableaux 5, 6, 7, 8, et 9 et la figure 8 récapitulent tous les travaux qui ont isolé et caractérisé les molécules appartenant aux lignanes et apparentés.

Tableau 5 : Les lignanes aryltétralines isolés du genre *Linum*.

| Aryltétralines | Structure | Espèce | Références |
|--|-----------|--|------------------------------|
| Podophyllotoxine | 17 | <i>L. persicum</i> | Mohagheghzadeh et al. 2004 |
| | | | Javidnia et al. 2005 |
| | | <i>L. album</i> | Mohagheghzadeh et al. 2004 |
| | | | Weiss et al, 1975 |
| | | <i>L. mucronatum</i> subsp. <i>orientale</i> | Zare et al. 2014 |
| | | <i>L. cariense</i> | Konuklugil, 2005 |
| 6-Methoxypodophyllotoxine | 18 | <i>L. album</i> | Konuklugil et al. 2007 |
| | | <i>L. flavum</i> | |
| | | <i>L. mucronatum</i> | |
| | | <i>L. nodiflorum</i> | |
| | | <i>L. persicum</i> | |
| | | <i>L. perenne</i> | Jullian-Pawlicki et al. 2015 |
| | | <i>L. cariense</i> | Konuklugil, 2005 |
| | | <i>L. boissieri</i> | Konuklugil et al. 2005 |
| 5'-Demethoxy-6-methoxypodophyllotoxine | 19 | <i>L. flavum</i> | Konuklugil et al. 2007 |
| | | <i>L. cariense</i> | |
| 4'-demethyl-6-methoxypodophyllotoxine | 20 | <i>L. cariense</i> | Konuklugil et al. 2007 |
| 3'-Demethylpodophyllotoxine | 21 | <i>L. album</i> | Weiss et al. 1975 |
| 5-methoxypodophyllotoxine | 22 | <i>L. persicum</i> | Javidnia et al. 2005 |
| | | <i>L. flavum</i> | Oostdam et al. 1993 |
| | | <i>L. flavum compactum</i> | Broomhead et al. 1990 |
| | | <i>Linum capitatum</i> | |
| 5-methoxypodophyllotoxine acetate | 23 | <i>L. persicum</i> | Javidnia et al. 2005 |
| 6-MeO- α - peltatine | 24 | <i>L. mucronatum</i> subsp. <i>orientale</i> | Zare et al. 2014 |
| α -peltatine | 25 | <i>L. cariense</i> | Konuklugil, 2005 |
| β -Peltatine | 26 | <i>L. cariense</i> | Konuklugil, 2005 |
| Polygamaine | 27 | <i>L. meletonis</i> | Koulman et Konuklugil, 2004 |



17 : R₁= H, R₂= OMe, R₃= OMe, R₄= OH

18 : R₁= OMe, R₂= OMe, R₃= OMe, R₄= OH

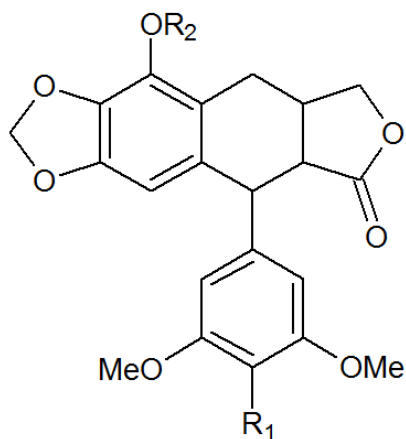
19 : R₁= OMe, R₂= H, R₃= OMe, R₄= OH

20 : R₁= OMe, R₂= OMe, R₃= OH, R₄= OH

21 : R₁= H, R₂= OH, R₃= OMe, R₄= OH

22 : R₁= OMe, R₂= OMe, R₃= OMe

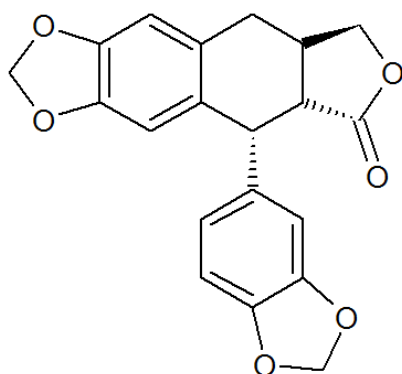
23 : R₁= OMe, R₄= OAc



24 : R₁= OH, R₂= Me

25 : R₁= H, R₂= H

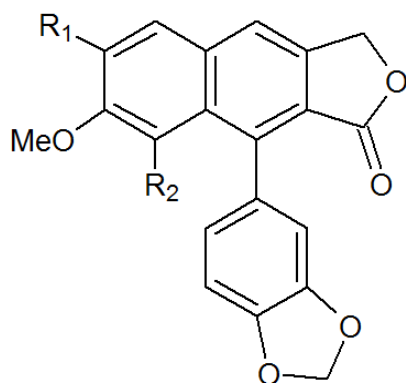
26 : R₁= OMe, R₂= H



27

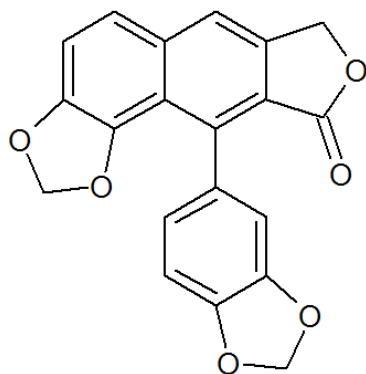
Tableau 6 : Les lignanes arylnaphthalènes isolés du genre *Linum*.

| Arylnaphthalènes | Structure | Espèce | Références |
|-------------------|-----------|-------------------------|---|
| Justicidine B | 28 | <i>L. altaicum</i> | Konuklugil et al. 2007 Schmidt et al. 2007 |
| | | <i>L. lewisii</i> . | |
| | | <i>L. austriacum</i> L | |
| | | <i>L. austriacum</i> | Mohagheghzadeh et al. 2002 |
| | | <i>L. leonii</i> | Schmidt et al. 2007 |
| | | <i>L. perenne</i> | |
| Iso-Justicidine B | 29 | <i>L. austriacum</i> L. | Konuklugil et al. 2007 Schmidt et al. 2007 |
| | | <i>L. austriacum</i> | Mohagheghzadeh et al. 2002 |
| | | <i>L. altaicum</i> | Schmidt et al. 2007 |
| | | <i>L. leonii</i> | |
| | | <i>L. lewisii</i> | |
| | | <i>L. perenne</i> | |
| Retrohelioxanhine | 30 | <i>L. perenne</i> | Schmidt et al. 2007 |



28:R₁= OMe, R₂= H

29:R₁= H, R₂= OMe



30: Retrohelioxanhine

Tableau 7 : Les lignanes aryldihydronaphthalènes isolés du genre *Linum*.

| Aryldihydronaphthalènes | Structure | Espèce | Références |
|---|-----------|-------------------|---------------------|
| Linoxepine 2,8-dihydro-3H-benzo[e]naphtho[1,8-bc]oxepine | 31 | <i>L. perenne</i> | Schmidt et al. 2007 |
| 7,8-Dihydro-isojusticidine B | 32 | <i>L. perenne</i> | Schmidt et al. 2007 |
| 7,8-Dihydro-retroheliioxanthine | 33 | <i>L. perenne</i> | Schmidt et al. 2007 |
| 7,8-Dihydrotaiwanine | 34 | <i>L. perenne</i> | Schmidt et al. 2007 |

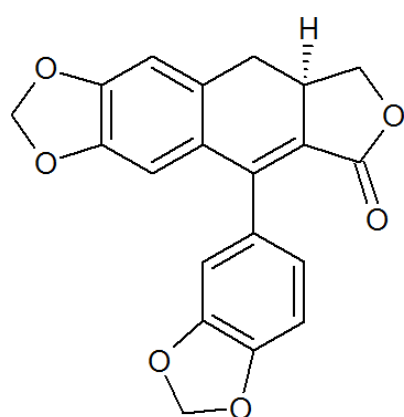
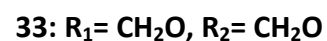
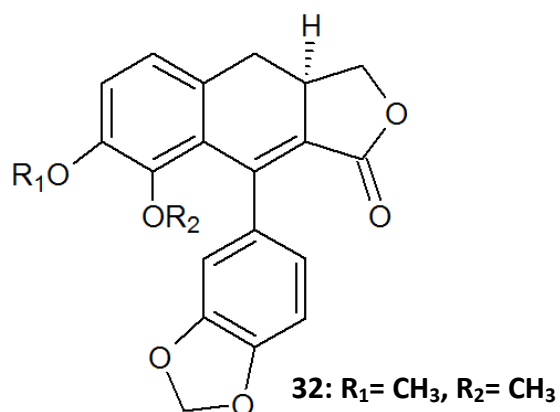
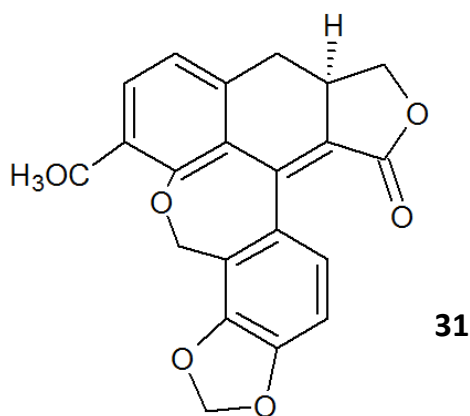


Tableau 8 : Les lignanes de type dibenzylbutyrolactone isolé du genre *Linum*.

| | | | |
|------------|----|------------------------|-----------------------------|
| Hinokinine | 35 | <i>L. meletonis</i> | Koulman et Konuklugil. 2004 |
| | | <i>L. corymbulosum</i> | Mohagheghzadeh et al. 2004 |

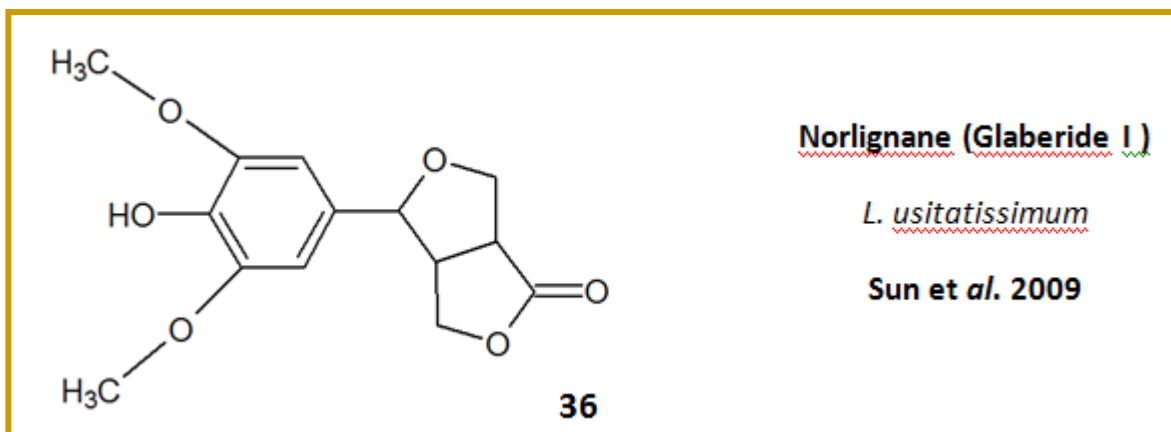
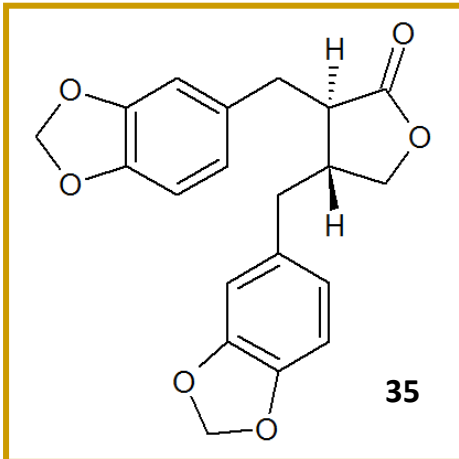
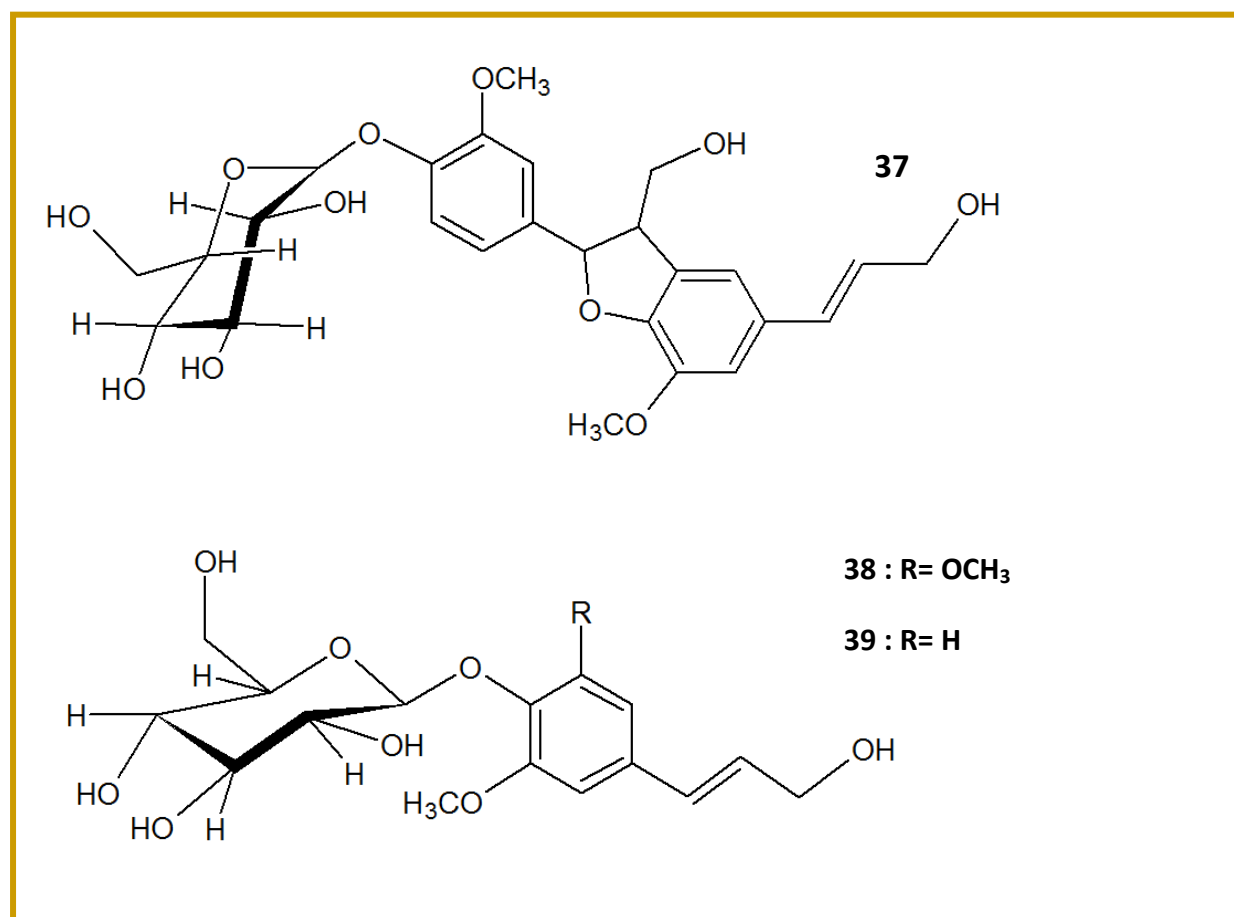


Figure 8 : Norlignane isolé du genre *Linum*.

Tableau 9 : Les glucosides (monolignonls et sucres) isolés du genre *Linum*.

| Lignane | Structure | Espèce | Référence |
|--|-----------|-------------------------|-----------------------------|
| Dihydrodiconiferyl alcohol-4-β-D-glucoside (DCG) | 37 | <i>L. usitatissimum</i> | Attoumbre et al. 2006 |
| Syringine | 38 | <i>L.flavum</i> | Konuklugil et Bahadir, 2004 |
| | | <i>L.capitatum</i> | |
| | | <i>L.olympicum</i> | |
| Coniferine | 39 | <i>L.flavum</i> | Konuklugil et Bahadir, 2004 |
| | | <i>L.capitatum</i> | |
| | | <i>L.olympicum</i> | |

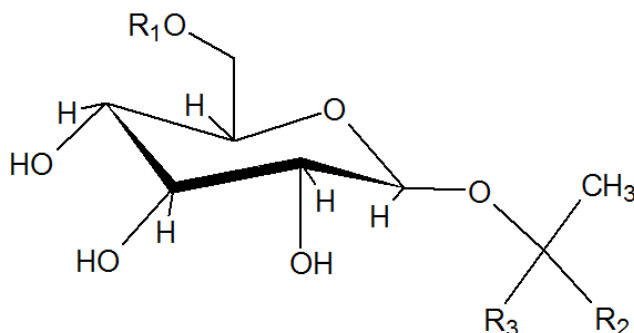


e- Autres composés

D'autres composés ont été isolés des parties aériennes et racinaires, de plusieurs espèces du genre *Linum*, comme les glycosides cyanogènes, les maléimides et les hydrocarbures, **tableaux 10 et 11, figure 9**.

Tableau 10 : Les glycosides cyanogènes isolés de *L. grandiflorum*.

| Glycosides cyanogènes | Structure | Espèce | Référence |
|---|-----------|------------------------|-------------------------|
| Linamarine | 40 | <i>L. grandiflorum</i> | Mohammed et al. 2009 |
| Lotaustraline | 41 | | |
| Néolinustatine | 42 | | |
| 2-[(3'-isopropoxy-O-β-D-glucopyranosyl) oxy] -2-methylbutanenitrile | 43 | | |



40 : R₁= H, R₂= CH₃, R₃= CN

41 : R₁= H, R₂= CH₂CH₃, R₃= CN

42 : R₁= O-β-D-glucopyranosyl,
R₂= CH₂CH₃, R₃= CN

43 : R₁= O-β-D-glucopyranosyl,
R₂= CH₂CH₃H, R₃= H

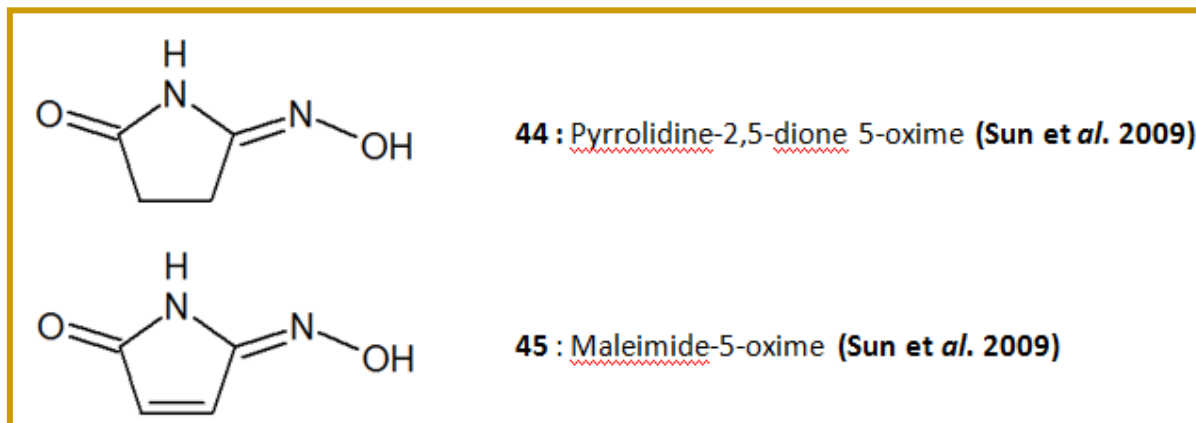
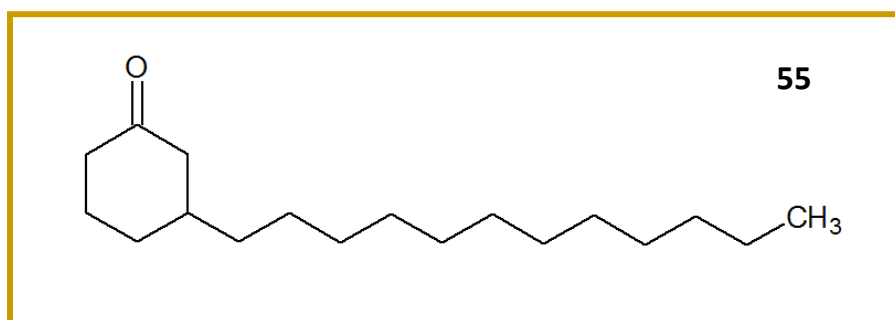


Figure 9 : Maléimides isolés de *Linum usitatissimum*.

Tableau 11 : Les hydrocarbures isolés de *L. mucronatum*.

| Espèce | Composé | Formule | Numéro | Référence |
|----------------------|-----------------------------|--|--------|---------------------|
| <i>L. mucronatum</i> | Dodecane | C ₁₂ H ₂₆ | 46 | Zare et al. 2014 |
| | 9-Dodecen-1-ol acetate | C ₁₄ H ₂₆ O ₂ | 47 | |
| | Z-9- Dodecenylacetat | C ₁₄ H ₂₆ O ₂ | 48 | |
| | Tetradecane | C ₁₄ H ₃₀ | 49 | |
| | n-Octyl-ether | C ₁₆ H ₃₄ O | 50 | |
| | Benzyl alcohol | C ₇ H ₈ O | 51 | |
| | Pentadecane | C ₁₅ H ₃₂ | 52 | |
| | 10, 12-Octadecadiyonic acid | C ₁₈ H ₂₈ O ₂ | 53 | |
| | Octadecanal | C ₁₈ H ₃₆ O | 54 | |
| | Dodecylcyclohexanone | C ₁₈ H ₃₄ O | 55 | |



5- Les activités biologiques étudiées chez le genre *Linum*

a- Activités biologiques des parties aériennes et racinaires

La principale activité étudiée des parties aériennes et racinaires, au sein du genre *Linum*, est l'activité anticancéreuse. La podophyllotoxine et la justicidine B sont particulièrement testées. En effet, beaucoup d'études s'intéressent à les faire produire, par culture *in vitro* des racines. Les espèces étudiées, ainsi que leurs références sont résumées dans le **tableau 12**.

Tableau 12 : Activités biologiques reconnues du genre *Linum*

| Espèce | Activité | Référence |
|-------------------------|---|--|
| <i>L. usitatissimum</i> | Anticancéreuse Pro-apoptotique | Czemplik et al. 2016 |
| | Anticancéreuse (sein, colon, poumon) | Safarpour et al. 2017 |
| | Anticancéreuse (sein) | Engel et al. 2015 |
| | Anticancéreuse | Szewczyk et al. 2014 |
| | Anti-ulcéreuse | Dugani et al. 2008 |
| | Anti-inflammatoire | Singh et al. 2008 |
| | Anti-oxydante | Kameyama et al. 2001 |
| | Antibactérienne | Rajasha et al. 2010 Mahmood et al. 2019 |
| | Antifongique | Xu et al. 2008 |
| | Hépatoprotectrice | Sun et al. 2009 |
| | Anti-urolithiatique | Prathyusha et al. 2017 |
| | Antidiabétique | Kapuriya et al. 2018 |
| | Anticancéreuse | Li et al. 2008 |
| | Immunorégulatrice | Ge et al. 2009 |
| | Antitussive | Saadat et al. 2018 |
| | Analgésique | Rafieian-Kopae et al. 2017 |
| <i>L.usitatissimum</i> | Anticancéreuse | Karimzadeh et al. 2019 |
| <i>L. persicum</i> | Anticancéreuse Pro-apoptotique | Esfandiari et al. 2017 |
| <i>L. leonii</i> | Cytotoxique Pro-apoptotique (leucémie aigüe myéloïde) | Momekov et al. 2014 |
| | Cytotoxique | Vasilev et al. 2006 |

| | | |
|-------------------------|---|-------------------------------|
| <i>L. narbonense</i> | Cytotoxique Pro-apoptotique (leucémie myéloïde et cancer du sein) | Ionkova et al. 2013 |
| | Anticancéreuse | Ionkova et al. 2003 |
| <i>L. lineraifolium</i> | Inhibition cellules malignes | Ionkova et al. 2010 |
| <i>L. flavum</i> | Cytotoxique | Berlin et al. 1988 |
| | Anticancéreuse | Marques et al. 2010 |
| <i>L. tauricum</i> | Cytotoxique | Vasilev et al. 2005 |
| <i>L. persicum</i> | Cytotoxique | Javidnia et al. 2005 |
| <i>L. album</i> | Anticancéreuse | Yousefzadi et al. 2011 |

b- Activités biologiques des graines

Les études qui se sont intéressées au grain, ont porté sur une seule espèce : *Linum usitatissimum*. En effet, ses graines sont le produit le plus important du genre, et elles sont très utilisées à des fins nutritionnelles, médicinales et comme source d'huile.

Il existe deux principaux types de lignanes dans les graines de lin, le **SDG (secoisolariciresinol_diglycoside)** et le **matairesinol**. Ils sont principalement contenus dans le tégument de la graine (**Al-Jumaily et al. 2013a**). Le SDG a été trouvé comme le constituant le plus abondant dans l'extrait des lignanes et dans tous les cultivars des graines de lin (**Gaafar et al. 2013**). En effet, son taux est de 60 à 700 fois plus haut en comparaison à d'autres parties comestibles de la plante (**Al-Jumaily et al. 2013a**). Il est, par conséquent, très étudié.

Les activités biologiques des extraits ou bien des molécules purifiées des graines de lin sont résumées dans le **tableau 13**.

Tableau 13 : Activités biologiques des graines de lin

| Espèces | Partie de la graine | Métabolites secondaires | Activités | Références |
|----------------------------|----------------------|--|---|-----------------------------|
| <i>Linum usitatissimum</i> | L'huile de la graine | Extrait phénolique | Cytotoxique Pro_oxidante (cellules humaines cancer du sein type MCF7) | Sorice et al. 2016 |
| | Graine | Lignanes : secoisolariciresinol anhydrosecoisolariciresinol secoisolariciresinol diglucoside | Modulation croissance (cellules humaines cancer du sein type MCF7 et MDA-MB-231) | Lehraiki et al. 2010 |
| | Graine | Lignane : Secoisolariciresinol diglucoside | Antioxydante : - DPPH | Al-Jumaily, AL-Azawi, 2013a |
| | Graine | Extraits de lignanes pures et partiellement pures | hépato-néphroprotectrice contre la toxicité induite par le paracétamol chez le lapin | Al-Jumaily, AL-Azawi, 2013b |
| | Graine | Extrait méthanolique de graines de lin dégraissées | Antioxydante : - DPPH - Chélation des métaux | Salama et al. 2012 |
| | Coques de graines | Extrait brut (ou fraction) de Coques de graines de lin | Antioxydante : - DPPH | Hao et Beta, 2012 |
| | Graine | Extrait de lignanes des graines de lin | Antioxydante : - DPPH - activité chélatante Fe ²⁺ Antimicrobienne | Gaafar et al. 2013 |
| | Graine | Lignanes : Secoisolariciresinol diglucoside | Antihyperlipidémique | Zanwar et al. 2014 |
| | Graine | Lignanes et acides phénoliques | Antioxydante : - DPPH - la méthode Rancimat Antimicrobienne | Kyselka et al. 2017 |
| | Graine | Lignanes : Secoisolariciresinol diglucoside | Prévention de l'inflammation péritonéale aiguë induite par l'amiante | Pietrofesa et al. 2016 |
| | Graine | Différentes fractions brutes : - Méthanol - Alcool dénaturé - Hexane | Antibactérienne Antifongique | Shad et al. 2016 |
| | Graine | Extrait concentré en lignanes | Antioxydante Antihypertensive | Sawant et Bodhankar, 2016 |

| | | | | |
|--|------------------------------------|--|---|------------------------------|
| | | | | |
| | Graine | Extrait riche en seclésolaricirésinol diglucoside | Chimioopréventive dans le cancer du côlon associé au diabète type 2 | Shah et Patel, 2016 |
| | Graine | Secoisolariciresinol diglucoside | Peut soulager la colite induite chez le rat Complément prometteur pour l'amélioration de la maladie inflammatoire de l'intestin | Xu et al. 2016 |
| | Graine | Lignanes : Secoisolariciresinol diglucoside | Atténue l'obésité induite par un régime riche en graisses chez la souris. | Fukumitsu et al. 2008 |
| | Graine | Complexe de Lignanes : Secoisolariciresinol diglucoside (SDG) Cinnamic acid glucoside Hydroxymethylglutaric acid (HMGA) | Antioxydante Réduction de l'hypercholestérolémie, l'athérosclérose et les facteurs de risque de la maladie coronarienne induite chez les lapins. | Prasad, 2005 |
| | Tourteau de graine de lin (huile) | Cyanogenic glycosides : Linustatin Neolinustatin | protectrice contre la toxicité du sélénium induite chez le rat | Palmer et al. 1980 |
| | Tourteau de graine de lin dégréssé | Lignanes : Secoisolariciresinol diglucoside | Effets réno-protecteurs | Clark et al. 2000 |
| | Graine | Lignanes : Secoisolariciresinol diglucoside | propriétés agonistes ou antagonistes des œstrogènes | Tou et al. 1998 |

Chapitre 2

*Dosage des polyphénols et
techniques d'évaluation de
l'activité antioxydante in vitro*

1-Détermination du contenu en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (FCR) (**Singleton et Rossi, 1965**). Le réactif FCR, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximum aux environs de **750 -765 nm** (**Boizot et Charpentier, 2006**).

2-Détermination de l'activité antioxydante

La détermination de la capacité antioxydante totale (total antioxidant capacity : TAC) est d'une importance vitale pour la communauté scientifique. Au cours des quinze dernières années, de nombreuses méthodes basées sur le piégeage des radicaux libres ont été développées pour déterminer le potentiel antioxydant (**Ozyurek et al. 2011a**).

Naturellement, aucun test unique n'est suffisant pour une détermination fiable de l'activité / capacité antioxydante, et généralement plusieurs tests sont nécessaires pour évaluer de manière réaliste le potentiel antioxydant d'un échantillon complexe (**Ozyurek et al. 2011a**).

Il existe des dizaines de techniques permettant de déterminer le potentiel antioxydant mais nous ne citerons que celles que nous avons testées au laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (DPPH, ABTS, CUPRAC).

a- Test du DPPH

C'est un test très populaire basé sur l'utilisation d'un radical libre, le DPPH : 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl). Il a été mis au point par Marsden Blois, en 1958. La méthode originale de Blois (**Blois, 1958**) a été suivie par plusieurs travaux récents, et la méthode de Brand-Williams et ses collègues (**Brand-Williams et al. 1995**) a été utilisée comme point de référence par plusieurs groupes de chercheurs (**Molyneux et al. 2004**).

Le DPPH sous sa forme de radical libre (**forme 1** dans la **figure 10**) donne naissance à la couleur violet foncé, caractérisée par une bande d'absorption dans une solution d'éthanol centrée à **517 nm**. Lorsqu'une solution de DPPH est mélangée à celle d'une substance qui peut donner un atome d'hydrogène, cela donne lieu à la forme réduite (**forme 2** dans la **figure 10**) avec la perte de cette couleur violette (bien que l'on s'attende à ce qu'il y ait une couleur jaune pâle résiduelle du groupe picryl toujours présent) (**Molyneux et al. 2004**).

Il a été rapporté que cette méthode, bien que plus simple et moins coûteuse, elle a été fortement influencée par la lumière, l'oxygène de l'air, le pH et le type de solvant. Puisque le DPPH est essentiellement soluble dans les milieux de solvants organiques, il apporte une limitation importante à la détermination des antioxydants hydrophiles. Les flavonoïdes et autres phénols complexes présentent généralement une réaction modérée à lente avec le DPPH (**Ozyurek et al. 2011b**).

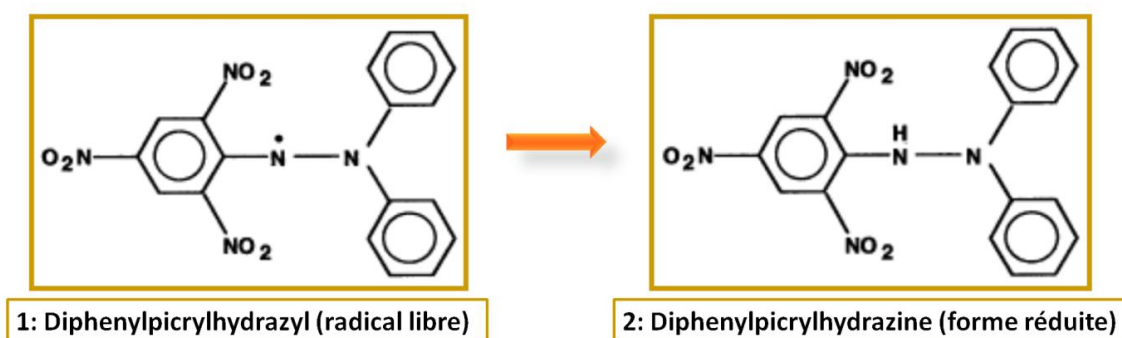


Figure 1 : Le DPPH – radical libre et forme réduite (Molyneux et al. 2004).

b- Test de l'ABTS

Le test est basé sur la capacité des antioxydants à décolorer le cation radicalaire (ABTS^{•+}) de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS), qui est bleu en solution et a une absorbance maximale de **734 nm**. L'ABTS^{•+} est généré par la réaction de l'ABTS avec une espèce oxydante. L'espèce oxydante d'origine utilisée était la metmyoglobine. Plus tard, il a été découvert que le persulfate de sodium, qui est moins cher et plus facile à travailler, fonctionne aussi bien. La plupart des chercheurs utilisent aujourd'hui cette modification, que l'on appelle le test TEAC amélioré (**Walker et Everette, 2009**).

c- Test du CUPRAC

Le CUPRAC (Cupric reducing antioxidant capacity) est un test de capacité antioxydante (TAC) récemment découvert en 2004 (**Apak et al. 2004**), et utilisé pour la quantification globale de toutes sortes d'antioxydants. Il est basé sur le transfert d'électrons et mesure la capacité d'un oxydant chromogène (sonde), qui change de couleur lorsqu'il est réduit. Le degré de changement de couleur (soit une augmentation ou une diminution de l'absorbance à une longueur d'onde donnée) est corrélé avec la concentration d'antioxydants dans l'échantillon (**Ozyurek et al. 2011a**).

Le réactif chromogène redox utilisé pour le test CUPRAC est le chélate de cuivre (II) bis (néocuproïne). Ce réactif est utile à pH=7 et l'absorbance du chélate de Cu (I) formé à la suite de la réaction d'oxydoréduction avec des polyphénols réducteurs est mesurée à **450**

nm (figure 11) (Ozyurek et al. 2011b). Ce test est simple et polyvalent et capable de répondre à tous les types d'antioxydants biologiquement importants (par exemple, l'acide ascorbique, l' α -tocophérol, le β -carotène, le glutathion réduit, l'acide urique et la bilirubine) et tous les types des antioxydants alimentaires (par exemple, les flavonoïdes, les acides phénoliques et hydroxycinnamiques simples), quel que soit le type chimique ou l'hydrophilie (Ozyurek et al. 2011b).

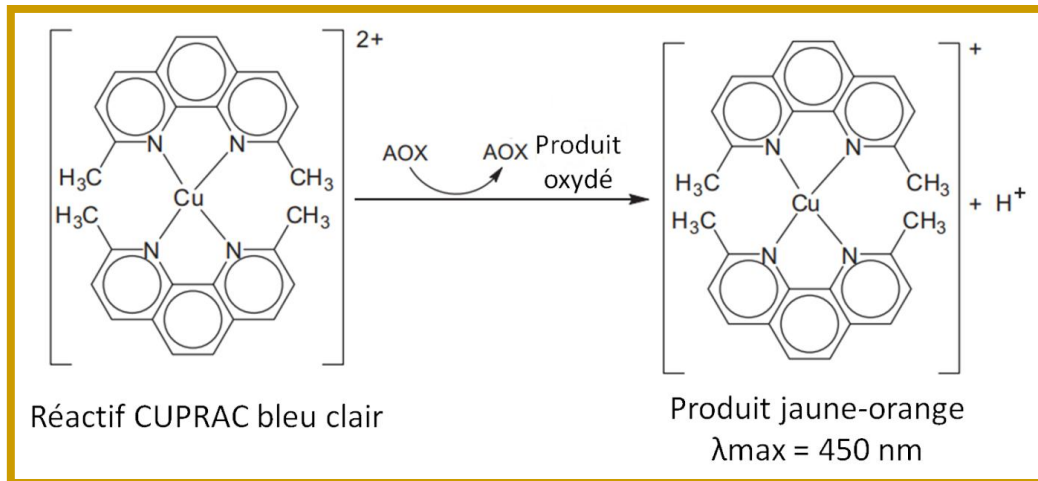


Figure 2 : La réaction du CUPRAC (Ozyurek et al. 2011b).

Chapitre 3
Matériel et méthodes

1-Matériel utilisé

a- Appareils

Evaporateur rotatif Büchi R-215, pompes à vide Büchi V-700 et V710, étuve Memmert 300L, balance de précision KERN PFB -2000, balance METTLER PJ300, balance Sartorius BP 210 S, bain à Ultrasons Selecta H-D, spectrophotomètre Thermo évolution 100, lecteur de microplaque BioTek ELX. 808, micropipette Scilogex, lampe UV Camag (365nm-245nm), HPLC SHIMADZU -LC8.

b- Réactifs

- Réactifs spécifiques

Folin-Ciocalteu (FCR), carbonate de sodium (Na_2CO_3), acide gallique, DPPH \cdot (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), persulfate de potassium ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), ABTS $^{+}$ (acide 2,2'-azino-bis 3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique), Chlorure cuivrique ($\text{CuCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$), acétate d'ammonium (AcNH_4), Neocuprine (2,9-diméthyl-1,10-phenanthroline), BHA (butylhydroxyanisole).

- Solvants

Méthanol, éthanol, toluène, chloroforme, acétate d'éthyle, *n*-butanol. Acétone, dichlorométhane.

- Réactifs de révélation

Solution de révélation: 80 mL acide acétique, 16 mL H_2SO_4 , 4 mL H_2O .

Tous les réactifs et solvants utilisés dans ce travail sont de la marque Sigma- Aldrich.

c- Techniques chromatographiques utilisées

- Chromatographie sur couche mince (CCM)

C'est une technique d'analyse qui permet de séparer les constituants d'un mélange ; les molécules à séparer sont entraînées par un fluide (éluant) appelé phase mobile. Elles interagissent ou bien au contraire n'interagissent pas avec un support fixe que l'on appelle phase stationnaire (silice, alumine, polyamide). Le rapport frontal R_f est calculé en divisant la hauteur de migration de la tâche (**h**) par la hauteur de migration de l'éluant (**H**) (**figure12**).

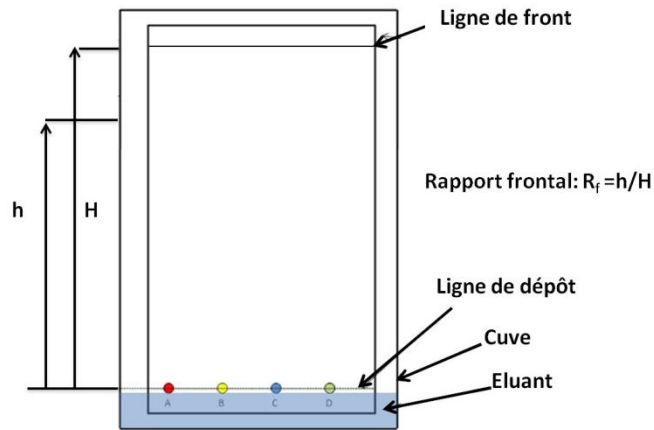


Figure 12 Chromatographie sur couche mince.

- **Colonne**

La chromatographie sur colonne est basée sur le même principe que la chromatographie sur couche mince, sauf que la silice (phase stationnaire) ne se trouve pas sur une plaque mais dans une colonne. Cette technique est très utilisée dans la purification en chimie organique. La séparation des composés est provoquée par l'écoulement continu d'un éluant passant dans la colonne par gravité ou sous l'effet d'une faible pression (**figure13**).

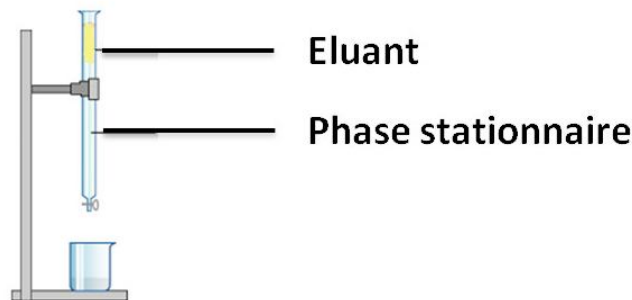


Figure 13 Chromatographie sur colonne.

- **VLC**

La VLC, abréviation de l'anglais Vacuum Liquid chromatography. Elle est utilisée afin de séparer grossièrement les molécules, elle est rapide et moins coûteuse par rapport à la séparation sur colonne classique.

d- Matériel végétal

La plante étudiée appartient au genre *Linum*, elle provient de la région de Constantine. Elle a été récoltée au stade de floraison en Juin-Juillet 2019, puis mise à sécher à l'air libre, à l'abri des rayons solaires. Une fois séchée, elle a été conservée à température

ambiante jusqu'à l'étape d'extraction. Dans cette étude, les parties aériennes et racinaires sont utilisées.

2- Extraction

a- Extraction au Soxhlet

Le matériel végétal (**≈825g**), a subi une extraction au Soxhlet en utilisant le chloroforme. La solution récupérée a été évaporée à sec. Le but de cette étape est l'extraction des composés apolaires. En revanche, elle ne sera pas détaillée dans ce mémoire.

b- Macération

La matière végétale restante dans la cartouche est séchée puis mise à macérer dans une solution hydro-méthanolique (Méthanol/Eau, 70/30, V/V), pendant 72h (3x24h), et à température ambiante. Le macérât liquide est ensuite filtré, récupéré et évaporé à sec, sous pression, à l'aide d'un évaporateur rotatif de type Büchi R215 (**figure 14**).



Figure 14 : Schéma récapitulatif des étapes d'extraction par macération jusqu'à l'obtention de l'extrait sec.

c- Extractions liquide-liquide

Cette étape permet de séparer un ensemble de composés selon leur gradient de polarité. Plusieurs solvants sont ainsi testés. Les deux solvants utilisés dans cette étude sont : **l'acétate d'éthyle** (extraction des composés moyennement polaires) et le ***n*-butanol** (extraction des composés polaires) (**figure 15**).

Donc, à l'extrait sec obtenu, précédemment, de l'eau distillée est rajoutée jusqu'à 1 litre, afin d'obtenir une solution non visqueuse, c'est notre **phase aqueuse**. La solution est laissée toute la nuit, afin que tous les composés hydrophobes de type résine se séparent, ainsi que les restes de chlorophylle, non retirés avec le Soxhlet. Le lendemain, le tout est filtré avec du coton, qui va garder toutes ces impuretés, puis l'acétate d'éthyle (300 mLx1) est rajouté à cette phase aqueuse. Le tout est agité, vigoureusement, puis laissé pour que les deux phases se séparent. **La phase acétate d'éthyle** récupérée est mise à évaporer jusqu'à obtention d'un **extrait sec (EAL)** de masse égale à : **2,69 g**. S'en suit une deuxième étape d'extraction par le *n*-butanol, (300 mLx3) est rajouté à la phase aqueuse, récupérée de l'étape précédente, le tout est de nouveau agité vigoureusement (la phase aqueuse et le *n*-butanol). **La phase butanolique** est ensuite récupérée, et est également mise à évaporer pour obtenir un extrait sec (**EBL**) de masse égale à : **12 g**.

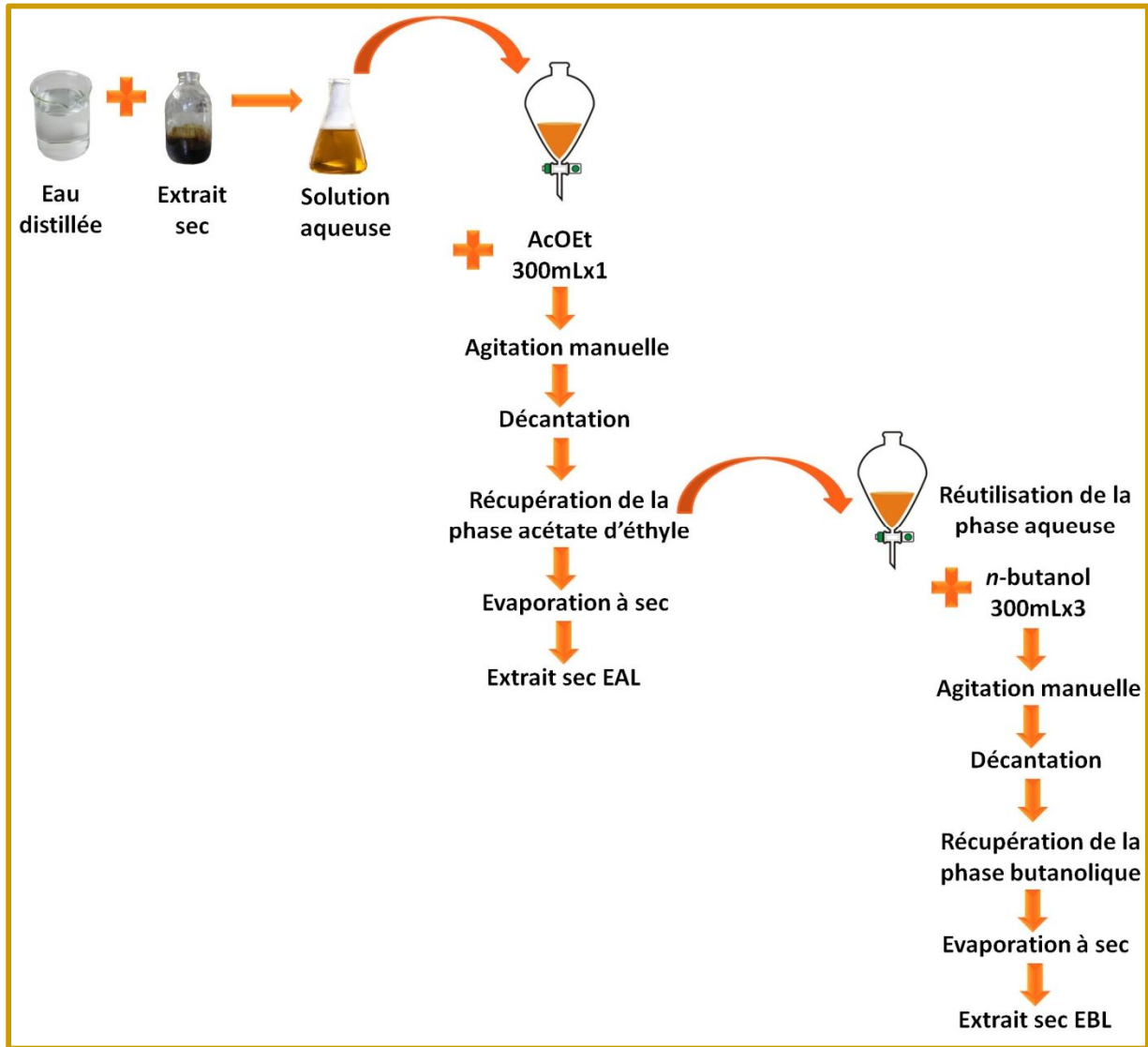


Figure 15 : Schéma récapitulatif de l'étape d'extraction liquide-liquide.

3- Profils chromatographiques sur couche mince analytique

Une pré-analyse par chromatographie sur couche mince (une fine couche de gel de silice montée sur une plaque d'aluminium) est réalisée au fur et à mesure de l'étape macération/évaporation, pour voir la richesse de l'extrait sec, en cours d'obtention.

Elle est également réalisée sur chaque extrait obtenu dans l'étape : extraction liquide-liquide. Le but est de comparer les profils chromatographiques issus des deux extraits EAL et EBL et de tester le meilleur éluant permettant de faire migrer et de séparer le maximum de molécules (**figure 16**).

La révélation des métabolites secondaires mis à migrer sur la plaque de chromatographie sur couche mince est faite à l'aide de 2 méthodes : la première est une

observation directe avec une lampe de Wood à ultra-violet, à **254 nm** et à **365 nm**. La deuxième est la révélation par immersion de la plaque CCM dans une solution de révélation dont la composition est : 80 mL acide acétique, 16 mL H₂SO₄, 4 mL H₂O, suivie d'un séchage au séchoir afin de faire apparaître les bandes migrées.

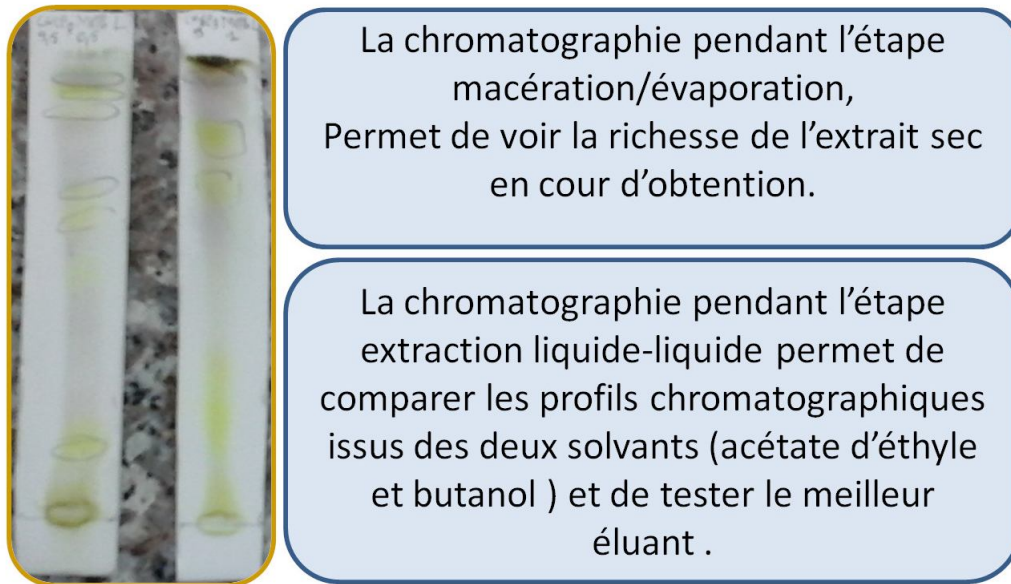


Figure 16 : Objectifs de l'utilisation de la chromatographie sur couche mince.

4-Fractionnement de l'extrait EBL par VLC

La VLC, abréviation de l'anglais Vacuum Liquid chromatography. Elle est utilisée afin de séparer grossièrement les molécules, elle est rapide et moins coûteuse par rapport à la séparation sur colonne classique.

Afin de continuer le fractionnement des molécules contenues dans nos deux extraits EAL et EBL, on a utilisé la VLC. Pour commencer, on a testé, en premier, la migration et la séparation de l'extrait EBL sur des plaques CCM avec gel de silice normale et en phase inverse (C-18).

Le gel de silice normale a été sélectionné pour effectuer la VLC sur l'extrait EBL selon la **figure 17**. En effet, 1g de l'extrait EBL est dissous dans le méthanol puis mélangé à quelques grammes de gel de silice. L'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. La poudre a été soumise à une chromatographie liquide sous vide (VLC) de gel de silice préparée dans le chloroforme.

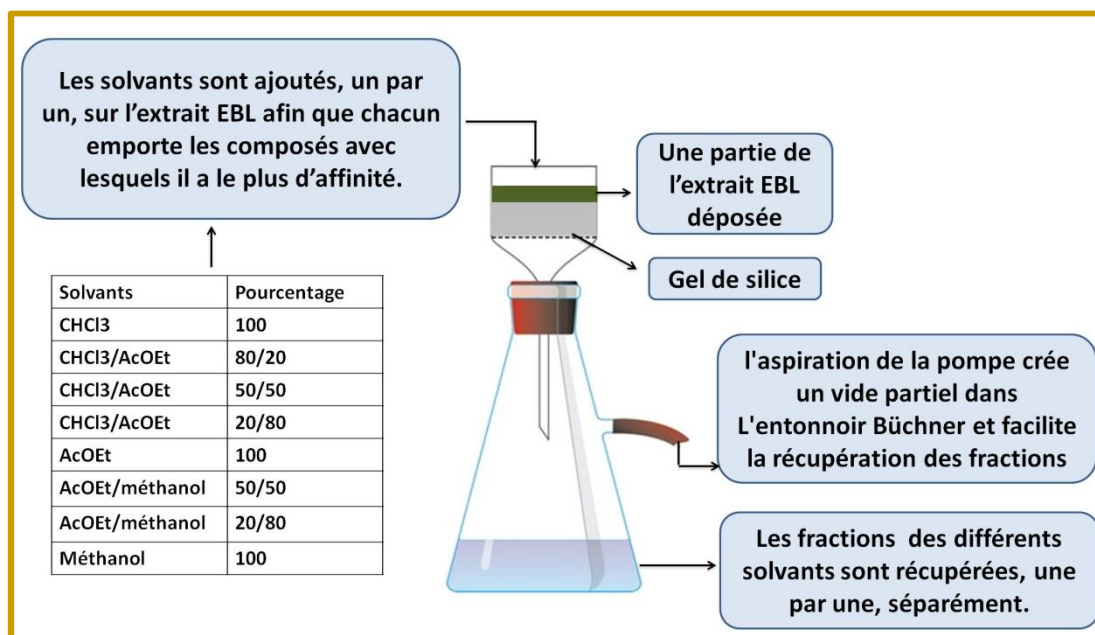


Figure 17 : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait EBL par VLC.

Les types d'éluants utilisés ainsi que leurs pourcentages respectifs sont détaillés dans le **tableau 14**.

Tableau 14 : Fractionnement d'1g de l'extrait EBL par VLC sur gel de silice normale.

| Eluant | Pourcentage % | Quantité (mL) | Nom de la fraction |
|---------------------------|---------------|---------------|--------------------|
| CHCl ₃ | 100 | 100 | Fraction A |
| CHCl ₃ /AcOEt | 80/20 | 100 | Fraction B |
| CHCl ₃ /AcOEt | 50/50 | 100 | Fraction C |
| CHCl ₃ / AcOEt | 20/80 | 100 | Fraction D |
| AcOEt | 100 | 100 | Fraction E |
| AcOEt /méthanol | 50/50 | 100 | Fraction F |
| AcOEt /méthanol | 20/80 | 100 | Fraction G |
| Méthanol | 100 | 100 | Fraction H |

Les fractions **A-H**, obtenues après évaporation à sec, sont pesées puis testées sur plaques CCM pour voir leur richesse par le système d'éluion (**CHCl₃/MeOH/H₂O : 8/2/0,2**), **figure 18**.

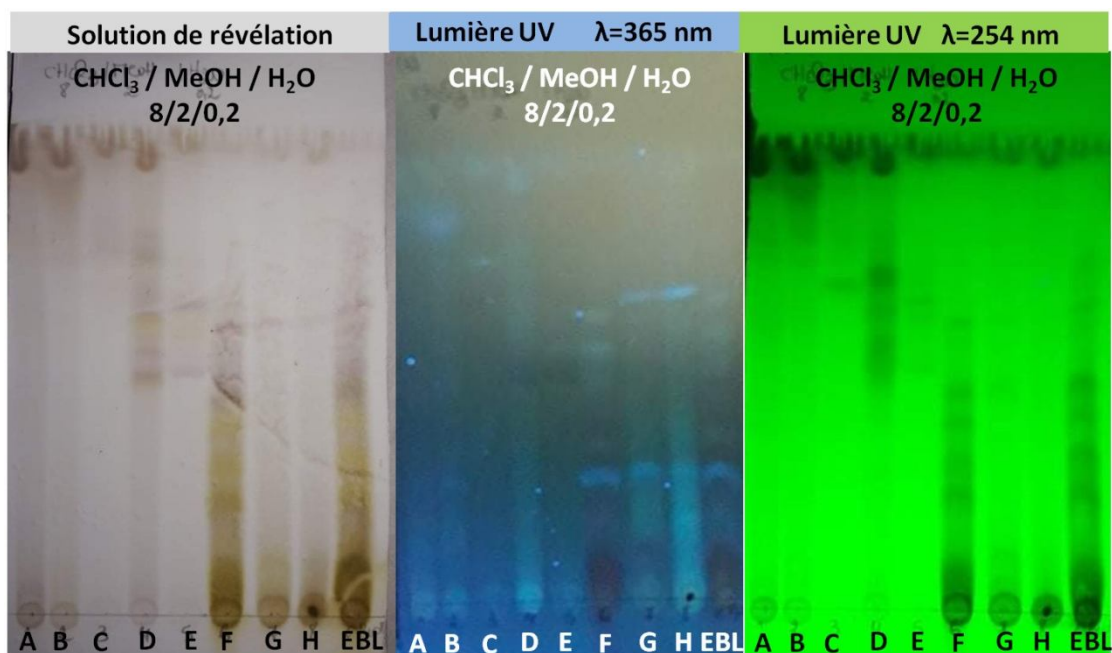


Figure 18 : Plaques CCM des fractions Fr_A-Fr_H et de l'extrait EBL, révélées avec solution de révélation (80 mL d'acide acétique, 16 mL d'H₂SO₄, 4 mL d'H₂O) et sous UV ($\lambda=365$ nm et $\lambda=254$ nm). L'éluant de migration : CHCl₃ / MeOH / H₂O : 8/2/0,2.

Une deuxième VLC est réalisée, avec l'extrait EBL. Le type de gel utilisé est le polyamide. Le **tableau 15** résume les systèmes d'éluion utilisés et les fractions récoltées.

Tableau 15 : Fractionnement d'1g de l'extrait EBL par VLC sur gel de polyamide.

| N° lot | Fraction | Système d'éluion | | Quantité (mL) | N° lot | Fraction | Système d'éluion | | Quantité (mL) |
|--------|----------|------------------|-------|---------------|--------|----------|------------------|-------|---------------|
| | | Toluène% | MeOH% | | | | Toluène% | MeOH% | |
| 1-2 | F1 | 90 | 10 | 100 | 11-12 | F6 | 40 | 60 | 100 |
| 3-4 | F2 | 80 | 20 | 100 | 13-14 | F7 | 30 | 70 | 100 |
| 5-6 | F3 | 70 | 30 | 100 | 15-16 | F8 | 10 | 90 | 100 |
| 7-8 | F4 | 60 | 40 | 100 | 17 | F9 | 0 | 100 | 100 |
| 9-10 | F5 | 50 | 50 | 100 | | | | | |

Les fractions obtenues, ainsi que l'extrait EBL, ont été analysées par chromatographie sur couche mince (CCM) par le système d'éluion (AcOEt/MeOH/H₂O : 10/1/0,5), figure 19.

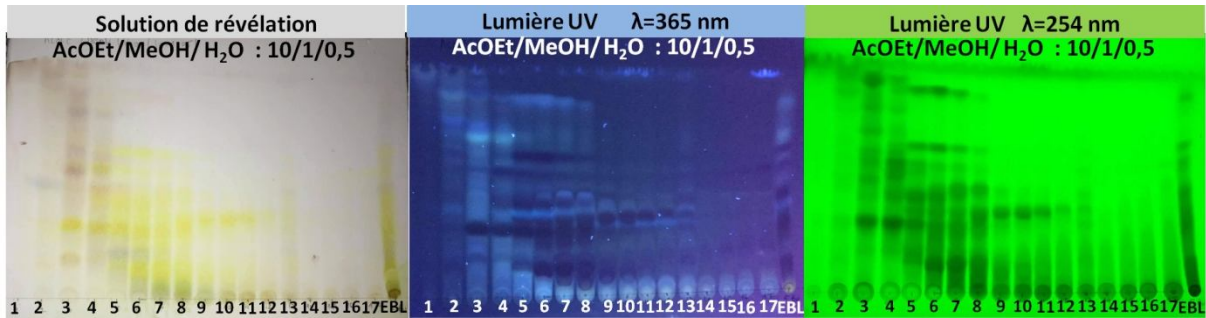


Figure 19 : Plaques CCM des fractions (Fr₁-Fr₉) récoltées de la VLC sur polyamide et l'extrait EBL, révélés avec solution de révélation (80 mL d'acide acétique, 16 mL d'H₂SO₄, 4 mL d'H₂O) et sous UV ($\lambda=365$ nm et $\lambda=254$ nm). L'éluant de migration : AcOEt / MeOH / H₂O : 10/1/0,5.

5- Tests *in vitro*

a- Détermination du contenu en polyphénols totaux

Une solution de Folin-Ciocalteu (FCR) concentré à 2M, ainsi qu'une solution de sodium carbonate (Na₂CO₃) à 7,5% sont préparées en utilisant l'eau distillée. Par ailleurs, une gamme étalon de l'acide gallique est préparée aux concentrations suivantes : **25µg/mL, 50µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL, 125 µg/mL, 150 µg/mL, 175 µg/mL, 200 µg/ mL**, en utilisant le méthanol, chaque dilution est répétée 2 fois. Egalement, 1 mg d'extrait (EAL et EBL) sont dissous, chacun à part, dans un volume de 1 mL de Méthanol, trois répétitions sont préparées pour chaque extrait. Enfin, à chaque 400 µL de chacune des dilutions préparées précédemment (acide gallique, extrait butanol, et extrait acétate d'éthyle) sont ajoutées 2mL de la solution FCR et 1,5 mL de la solution Na₂CO₃. Les tubes sont mis à incubation pendant 2h, ensuite, la lecture est faite à **760 nm** avec un spectrophotomètre Thermo Electron Nicolet evolution 100e.

Concernant l'acide gallique, une droite de régression est établie. Les données x : concentrations de la suite de dilutions de l'acide gallique, et les données y : absorbances correspondantes des dilutions de l'acide gallique, sont connus (**figure 20**). A partir de cette droite, les concentrations, inconnues, de nos extraits (EAL et EBL) sont calculées, en faisant des projections avec cette droite, à partir des absorbances, connues, de nos extraits.

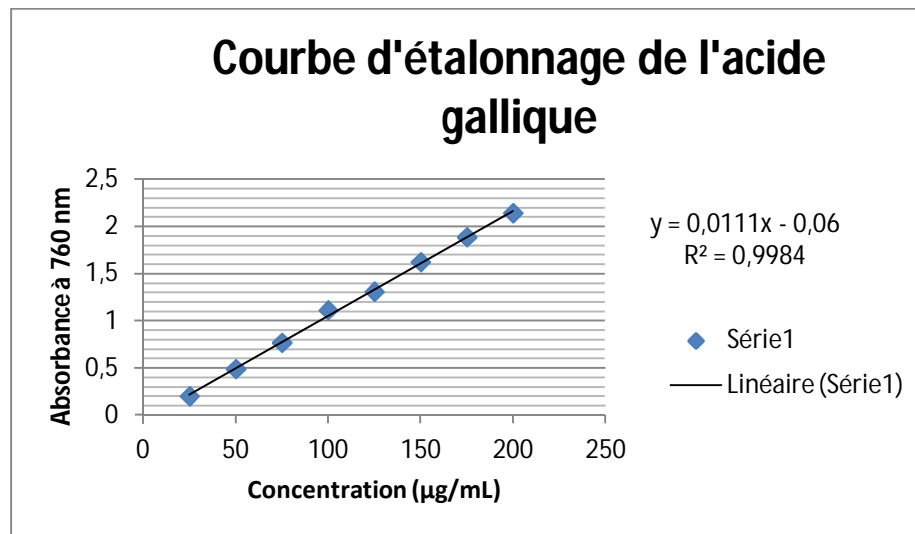


Figure 20 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

b- Détermination de l'activité antioxydante

b.1- Test du DPPH

Ce test est effectué en préparant, en premier, une série de dilutions, à partir de l'extrait EBL et de l'extrait EAL, respectivement. Les dilutions ont les concentrations suivantes : **1mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,0625 mg/mL, 0,03125 mg/mL, 0,015625 mg/mL**. Ces dilutions seront utilisées, également, pour le test ABTS et le test CUPRAC. Par ailleurs, une solution de DPPH est préparée, en faisant dissoudre 6 mg de DPPH dans 100mL de méthanol. Enfin, 40µL de chacune des séries de dilutions, pour chaque extrait (EBL et EAL,) sont déposés dans chaque puits de la microplaque (96 puits). 160 µL de solution de DPPH est ajouté dans chaque puit. Les concentrations finales de chaque extrait, et pour chaque dilution sont les suivantes : **200µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,125 µg/ mL**. L'échantillon à blanc a été utilisé en déposant 40µL de méthanol pur et 160 µL de solution de DPPH. La microplaque est laissée pendant 60 minutes dans le noir et la lecture est faite à **490 nm** avec un lecteur de microplaque de type Biotek EL x 808. La même procédure a été suivie pour le **contrôle positif : l'hydroxyanisole butylé (BHA)**.

L'expérience a été réalisée en triple, pour chaque extrait (EBL, EAL, contrôle positif: BHA), et l'absorbance moyenne a été notée pour chaque mesure, **figure 21**.

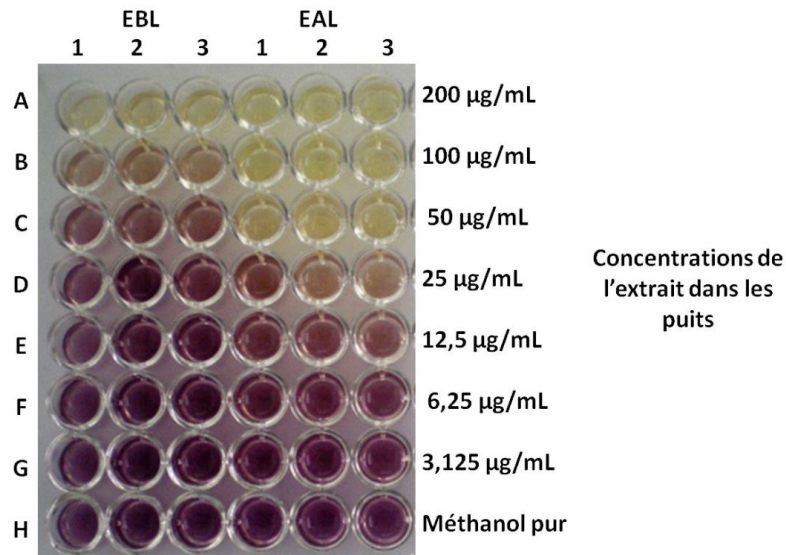


Figure 21 : Test DPPH réalisé sur microplaque pour les extraits EBL et EAL

Les mesures de l'absorbance sont, ensuite, converties en **pourcentage de piégeage des radicaux DPPH**, qui est calculé à l'aide de l'équation suivante:

$$\% \text{ DPPH de piégeage des radicaux libres} = [(A_0 - A_t) / A_0] \times 100.$$

A0 : Absorbance de l'échantillon blanc, sans l'extrait;

At : Absorbance de la solution échantillon, qui contient l'extrait testée au temps t.

L'activité de piégeage des radicaux libres est, généralement, exprimée en pourcentage d'inhibition de la DPPH mais également par la concentration d'antioxydant requise pour une réduction de 50% de la DPPH (CI_{50}). Donc, **plus la valeur du CI_{50} est faible, plus l'activité anti-oxydante d'un produit est élevée.**

b.2- Test de l'ABTS

L'activité ABTS est déterminée par la méthode de **Re et al. (1999)**. L'ABTS (19,2 mg : 7 mM ABTS + 5 mL H₂O) et le persulfate de potassium K₂S₂O₈ (3,3 mg : 2,45 mM K₂S₂O₈ + 5 mL H₂O) sont mélangés et mis à l'abri de la lumière pendant 12- 16H ; l'absorbance de la solution ABTS ainsi obtenue est ajustée par (Ethanol ou H₂O) à 0.700 ± 0.020 à **630 nm** avant l'usage.

Par ailleurs, dans une microplaque (96 puits), 40µL de chacune des séries de dilutions, pour chaque extrait (EBL et EAL) (**voir le détail de leur préparation dans le paragraphe consacré au test du DPPH**) sont déposés dans chaque puits de la microplaque. Ensuite, 160µL de solution ABTS est ajoutée, dans chaque puits. La microplaque est laissée pendant 10 minutes dans le noir et la lecture est faite à **630 nm** avec un lecteur de plaque de type Biotek EL x 808. La même procédure a été suivie pour le **contrôle positif : l'hydroxyanisole butylé (BHA)**.

L'expérience a été réalisée en triple, pour chaque extrait (EBL, EAL, contrôle positif: BHA), et l'absorbance moyenne a été notée pour chaque mesure, **figure 22**.

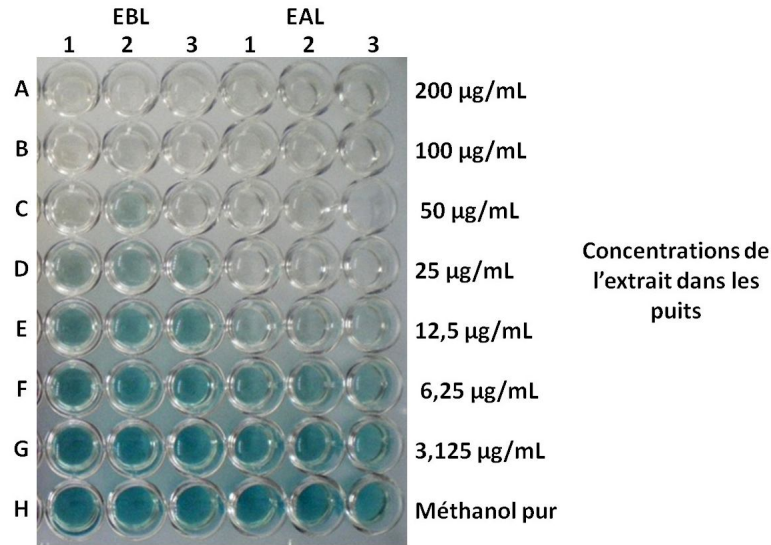


Figure 22 : Test ABTS réalisé sur microplaque pour les extraits EBL et EAL

Les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour chaque concentration par rapport à une absorbance à blanc de méthanol. La capacité de piégeage de L'ABTS^{•+} a été calculée en utilisant l'équation suivante:

$$\text{ABTS}^{\bullet+} \% \text{ d'Inhibition} = \left[\frac{A \text{ contrôle} - A \text{ échantillon}}{A \text{ contrôle}} \right] \times 100$$

Où : **A contrôle** : est l'absorbance de la réaction ne contenant que les réactifs.

A échantillon: est l'absorbance de la réaction contenant les réactifs et l'extrait.

A partir de ces résultats (ABTS^{•+} % d'Inhibition et concentrations), une valeur du **CI₅₀** est calculée comme pour le test du DPPH.

b.3- Test du CUPRAC

Ce test est déterminé selon **Apak et al. (2004)**. Trois solutions sont préparées, une solution (**S1**) d'acétate d'ammonium (**ACNH₄**) au pH=7 (0,7708 g d'**ACNH₄** dissout dans 10 mL d'**H₂O**), une solution (**S2**) de (**CuCl₂, 2H₂O**) à une concentration de 10⁻² M (0,01705 g de **CuCl₂, 2H₂O** dissout dans 10 mL d'**H₂O**), et une solution (**S3**) de Neocuproïne (**Nc**) à une concentration de 7,5 × 10⁻³ M (0,0156 g de Neocuproïne dissout dans 10 mL de méthanol).

Par ailleurs, dans une microplaque (96 puits), 40µL de chacune des séries de dilutions, pour chaque extrait (EBL et EAL) (**voir le détail de leur préparation dans le paragraphe consacré au test DPPH**) sont déposés dans chaque puits de la microplaque. Ensuite, les solutions **S1**, **S2**, et **S3** sont ajoutées, dans chaque puits, aux volumes respectifs

suivants : 60 μL , 50 μL , et 50 μL . La microplaque est laissée pendant 60 minutes dans le noir et la lecture de l'absorbance est faite à **450 nm**, avec un lecteur microplaque de type Biotek EL x 808. La même procédure a été suivie pour le **contrôle positif: l'hydroxyanisole butylé (BHA)**.

L'expérience a été réalisée en triple, pour chaque extrait (EBL, EAL, contrôle positif: BHA), et l'absorbance moyenne a été notée pour chaque mesure, **figure 23**.

Les résultats ont été calculés à titre de A 0.5 ($\mu\text{g} / \text{mL}$) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

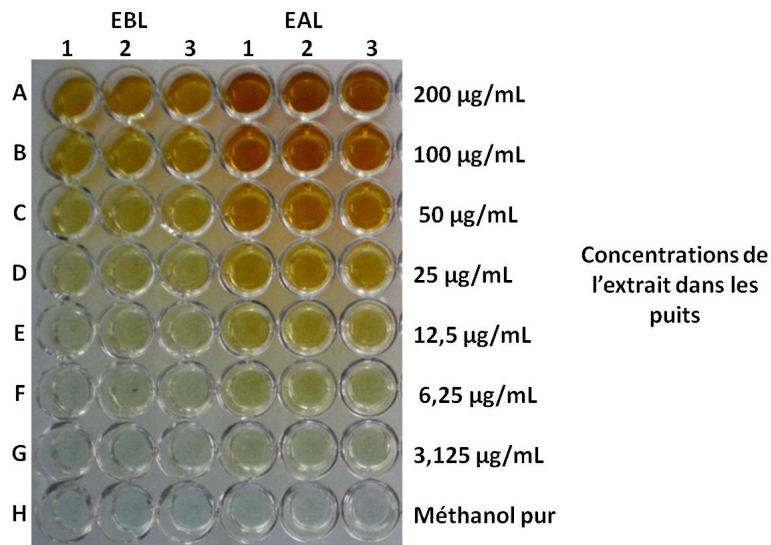


Figure 23 : Test CUPRAC réalisé sur microplaque pour les extraits EBL et EAL.

A partir de ces résultats (absorbances et concentrations), La valeur **A 0,5** est calculée.

Chapitre 4
Résultats et discussion

1-Extraction et séparation

Rappelons que le matériel végétal (**825 g**) a subi une extraction sur Soxhlet en utilisant le chloroforme. Le résidu de plante restant a été séché puis macéré dans une solution hydro-méthanolique : Méthanol/Eau : 70/30 (V/V). Le choix de ce type de système solvant permet l'extraction du maximum de métabolites secondaires, contenus dans notre plante.

Après filtration et évaporation à sec, on a obtenu un extrait de couleur vert très foncé, sans odeur et d'un aspect fluide et gluant. Cet aspect gluant indique la présence de sucres liés aux métabolites secondaires de notre extrait. Par ailleurs, la couleur verte, montre la présence de la chlorophylle.

Pour avoir une idée sur la diversité des métabolites secondaires présents dans l'extrait, une chromatographie sur couche mince est réalisée et, après observations sous UV, à 254 nm et à 365 nm, ainsi qu'après immersion dans la solution de révélation (80 mL acide acétique, 16 mL H₂SO₄, 4 mL H₂O), on a remarqué une grande richesse et une condensation concernant les bandes de migration.

Un premier fractionnement, par extraction liquide-liquide, est effectué afin de séparer les composés chimiques de notre extrait selon leur degré de polarité. Deux solvants sont utilisés pour l'extraction, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol, suivie d'une évaporation à sec conduisant aux extraits secs correspondants (EAL et EBL).

Le **tableau 16** résume les masses des différents extraits : chloroforme (étape d'extraction au Soxhlet non détaillée dans ce travail), EAL et EBL. Le rendement est exprimé en pourcentage de la masse d'extrait par rapport à la masse de la plante sèche. Le rendement le plus élevé a été observé avec l'extrait **EBL (1,51%)**, suivi par l'extrait **ECL (1,43%)**, et enfin l'extrait **EAL** possède le plus faible rendement avec (**0,32%**).

Tableau 16 : Rendements de l'extraction

| Extrait | Masse (g) | Rendement % |
|---------------------------------|--------------|-------------|
| Extrait chloroformique (ECL) | 11,83 | 1,43 |
| Extrait acétate d'éthyle (EAL) | 2,69 | 0,32 |
| Extrait <i>n</i> -butanol (EBL) | 12 | 1,51 |

2- Analyse des profils chromatographiques

On a réalisé des chromatogrammes à partir des deux extraits secs (EAL et EBL). La détection des taches développées s'effectue selon les principes de visualisation des chromatogrammes. Tout d'abord, les chromatogrammes sont observés sous lampe UV sur 2 longueurs d'ondes standards, 254 nm et 365 nm. L'extrait EAL montre une très grande diversité de bandes de migration (métabolites secondaires). En revanche, la quantité obtenue, après évaporation, n'est pas très grande (**2,69 g**). Par ailleurs, l'extrait EBL affiche une faible diversité de bandes de migration, mais la quantité obtenue est grande (**12 g**), (**figure 24**). Donc, pour la suite des analyses, il a été décidé de fusionner les deux extraits : EBL et EAL. En effet, compte tenu de la faible quantité de ce dernier, on ne peut pas le fractionner au risque de perdre les métabolites secondaires qui sont en très faible quantité.

L'analyse chromatographique montre, également, une intensification de la fluorescence lorsque la polarité du solvant d'extraction augmente, à partir du *n*-butanol jusqu'à l'acétate d'éthyle. On remarque, aussi, qu'il existe une différence concernant le nombre et la couleur des bandes, entre les différents solvants d'extraction (*n*-butanol et acétate d'éthyle). Ces dissemblances sont aussi remarquées pour les éluants testés pour chaque extrait. En effet, le meilleur éluant, pour chaque extrait est AcOEt/MeOH : 9/1, car on y remarque une meilleure diversité de taches, quant à leur nombre, leurs couleurs et leurs intensités (**figure 24**).

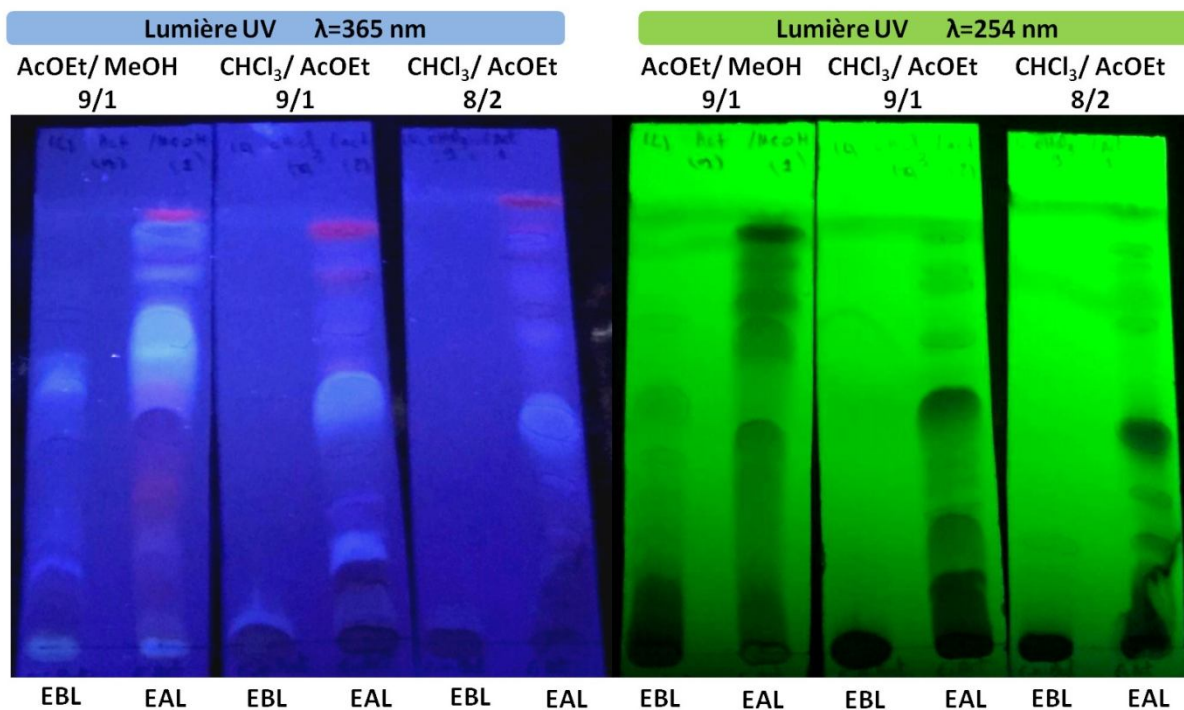


Figure 24 : Profils chromatographiques des extraits EAL et EBL, obtenus après migration avec plusieurs éluants : AcOEt/MeOH : 9/1, CHCl₃/AcOEt : 9/1 et 8/2. Les profils sont observés sous lumière UV, $\lambda=365$ nm et $\lambda=254$ nm.

Afin d'approfondir l'investigation du meilleur éluant, un quatrième système de solvants est testé : AcOEt/MeOH/H₂O : 10/1/0,5. L'observation après immersion dans la solution de révélation (80 mL acide acétique, 16 mL H₂SO₄, 4mL H₂O) et après chauffage montre une meilleure migration pour les deux extraits (EAL et EBL). AcOEt/MeOH/eau : 10/1/0,5 a produit la meilleure séparation des taches (**figure 25**). On peut voir quelques bandes violettes caractéristiques des lignanes. En effet, Les lignanes produisent des taches violettes avec le réactif H₂SO₄ après chauffage à 120 ° C pendant 5 min (**Zare et al. 2014**).

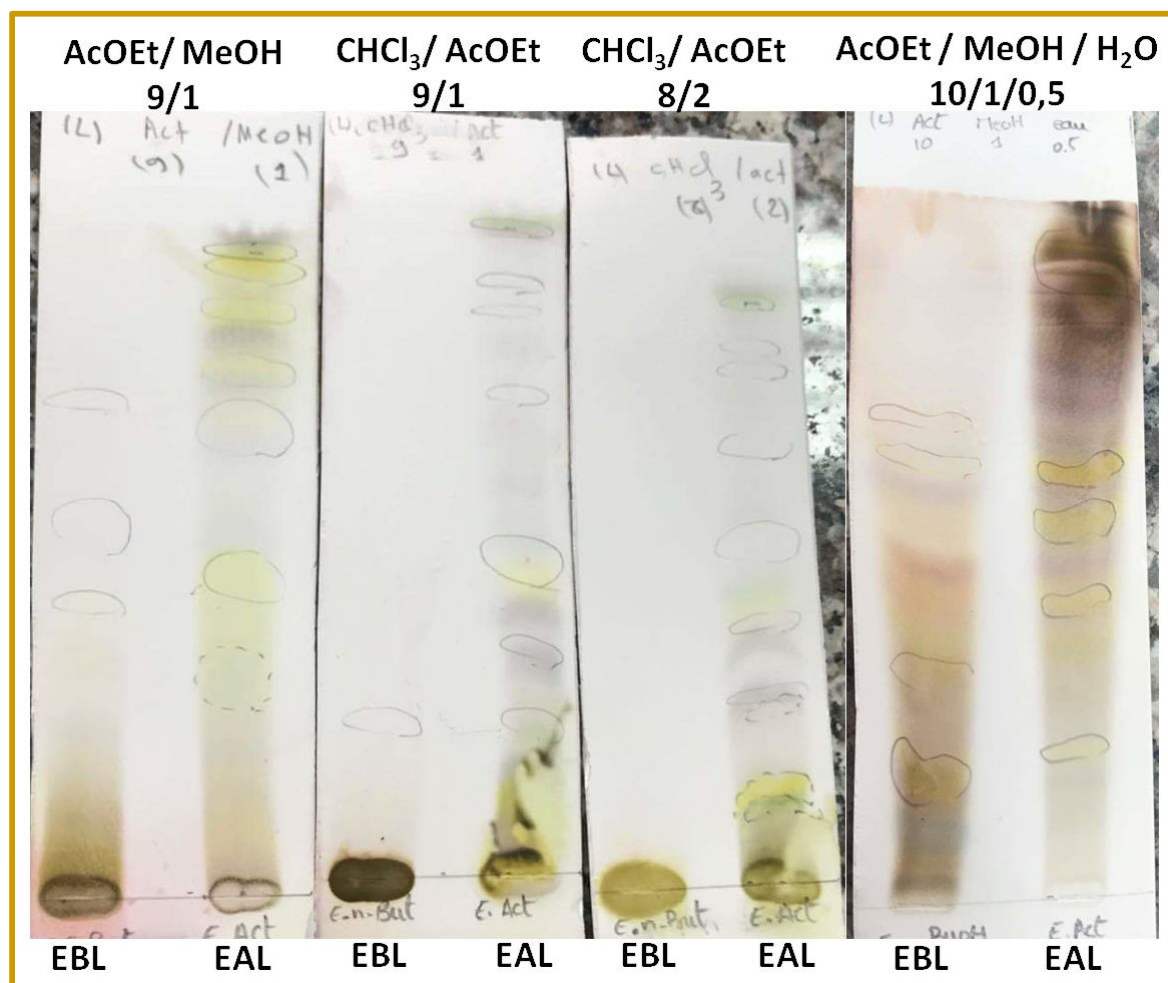


Figure 25 : Profils chromatographiques des extraits EAL et EBL, obtenus après migration avec plusieurs éluants : AcOEt/MeOH : 9/1, CHCl₃/AcOEt : 9/1 et 8/2, AcOEt/MeOH/H₂O : 10/1/0,5. Les profils sont observés après immersion dans la solution de révélation (80 mL acide acétique, 16 mL H₂SO₄, 4mL H₂O).

3- Fractionnement par VLC

Avant de procéder au fractionnement sur VLC, nous avons effectué des tests, en utilisant la fraction EBL, sur plaques CCM sur gel de silice normale et sur gel de silice en phase inversée (C-18). Après révélation des plaques, il s'est avéré que la silice normale sépare mieux que la silice greffée (C-18) (**figure 26**). Ces tests sont effectués uniquement sur l'extrait EBL, parce qu'il est disponible en plus grande quantité que l'extrait acétate d'éthyle.

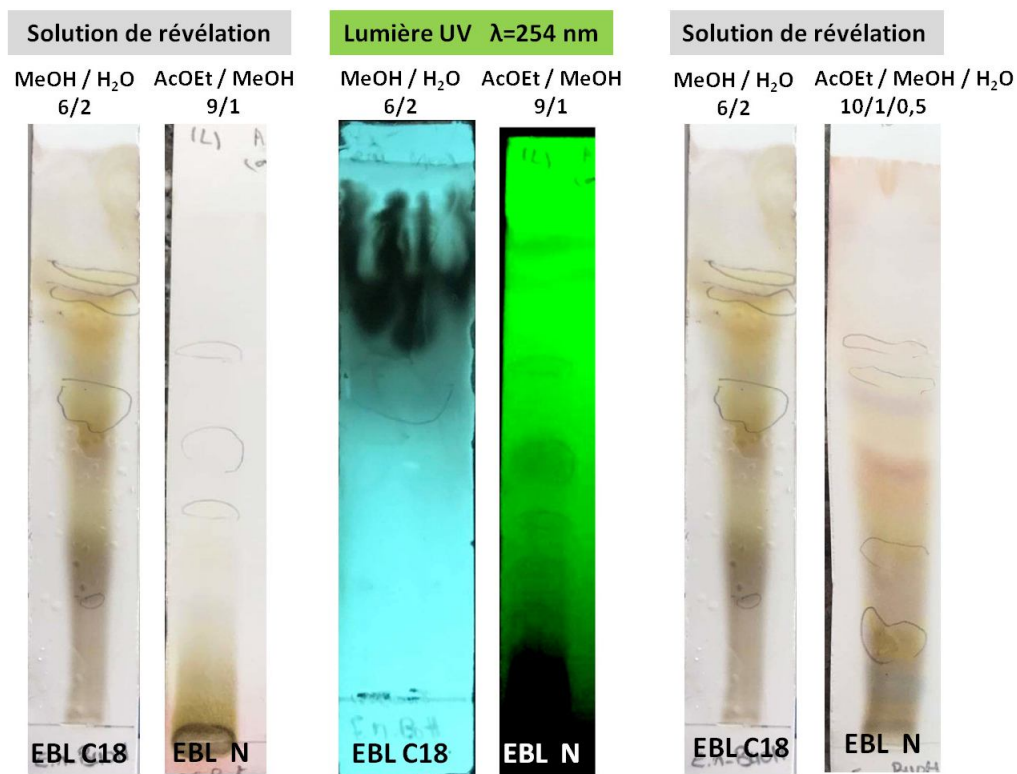


Figure 26 : profil chromatographique d'extrait EBL sur C-18 comparé à deux profils chromatographiques d'extraits EBL N sur gel de silice normale (avec deux types d'éluants testés : AcOEt /MeOH :9/1, et AcOEt /MeOH / H₂O : 10/1/0,5. La solution de révélation est composée de : 80 mL d'acide acétique, 16 mL d'H₂SO₄, 4 mL d'H₂O.

Par conséquent nous avons effectué une VLC de 1 gramme de l'extrait EBL sur de la silice normale en utilisant plusieurs éluants (CHCl₃, CHCl₃/AcOEt, AcOEt, AcOEt /méthanol, Méthanol). Huit fractions (F_A-F_H) ont été obtenues (figure27).

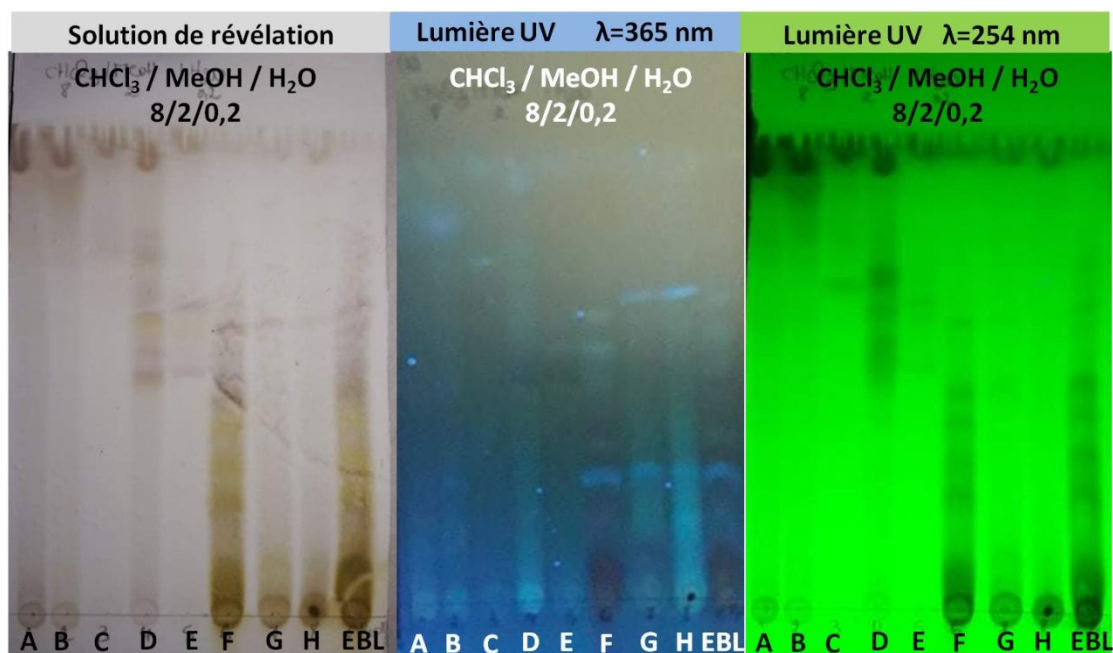


Figure 27 : Plaques CCM des fractions A-H et de l'extrait EBL, révélés avec solution de révélation (80 mL d'acide acétique, 16 mL d' H_2SO_4 , 4 mL d' H_2O) et sous UV ($\lambda=365$ nm et $\lambda=254$ nm). L'éluant de migration : $CHCl_3$ / MeOH / H_2O : 8/2/0,2.

Les fractions F_{D-F} semblent être riches en métabolites secondaires mais la séparation n'est pas bonne. Nous avons donc testé une VLC d'1 gramme de l'extrait EBL sur du gel de polyamide, en utilisant plusieurs gradients d'éluant **Toluène/MeOH (90/10, 80/20, 70/30, 50/50, 40/60, 30/70, 20/80, 0/100)**. 10 Fractions ont été obtenues (figure 28).

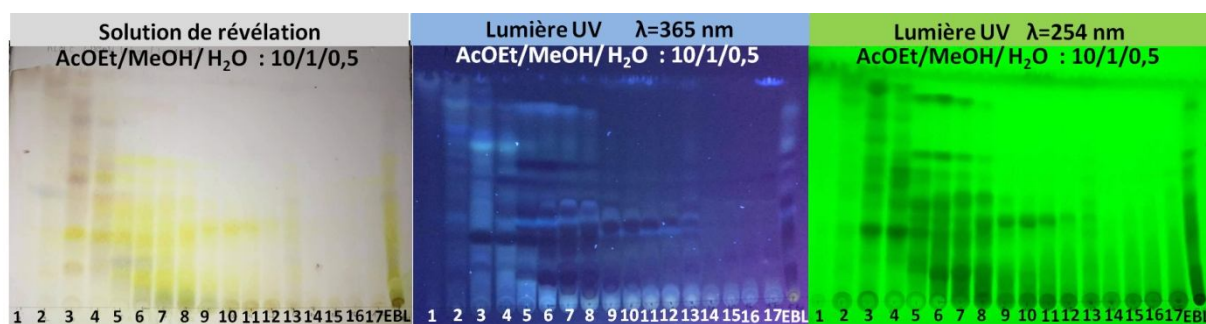


Figure 28 : Plaques CCM des fractions (F1-F9) récoltés de la VLC sur polyamide et l'extrait EBL, révélés avec solution de révélation (80 mL d'acide acétique, 16 mL d' H_2SO_4 , 4 mL d' H_2O) et sous UV ($\lambda=365$ nm et $\lambda=254$ nm). L'éluant de migration : AcOEt / MeOH / H_2O : 10/1/0,5.

Les fractions **F2(3,4)**, **F3(5,6)** et **F4(7,8)** semblent être plus riches en métabolites secondaires. Compte tenu de la faible quantité de l'extrait EAL, nous l'avons combiné avec l'extrait EBL pour un fractionnement du mélange sur du gel de polyamide (le plus

performant pour la séparation des métabolites secondaires), élué avec un gradient de Toluène/MeOH.

4- Tests *in vitro*

Afin de déterminer la teneur en polyphénols et le potentiel antioxydant des deux extraits (EAL et EBL), nous avons effectué des tests basés sur la méthode de **Folin-Ciocalteu** pour le dosage des polyphénols totaux et les tests du **CUPRAC**, du **DPPH** et de **l'ABTS** pour évaluer leur activité antioxydante. Ces deux dernières étant considérées comme la frontière entre les tests basés sur le transfert d'électrons (**ET**) et le transfert d'atomes d'hydrogène (**HAT**). Contrairement aux deux premières méthodes utilisant une augmentation de l'absorbance, les deux dernières méthodes mesurent la décoloration des réactifs radicalaires (activité anti-radicalaire ou effet de piégeage de radicaux) à la suite d'une réduction avec des antioxydants pendant une période de temps fixe (**Ozyurek et al. 2011a**).

a- Détermination du contenu en polyphénols totaux

La détermination de la teneur en polyphénols totaux, de nos deux extraits (EAL et EBL), par la méthode **Folin-Ciocalteu**, donne les résultats détaillés dans le **tableau 17**. Ils sont exprimés en **µg équivalent d'acide gallique/mg d'extrait**.

Tableau 17 : Teneur en polyphénols des extraits EBL et EAL.

| Extraits | Teneur en polyphénols totaux µg EAG/mg d'extrait |
|----------------------------------|---|
| EBL | 164,44 ± 0,12 |
| EAL | 308,04 ± 0,09 |
| Extrait méthanolique de Thé vert | 313,3±1,41 |
| Extrait méthanolique de Thé noir | 161,8±0,73 |

La teneur en polyphénols enregistrée en équivalent d'acide gallique, est plus importante dans l'extrait EAL (308,04 ± 0,09 µg EAG/mg d'extrait) que dans l'extrait EBL (164,44 ± 0,12 µg EAG/mg d'extrait).

Ces résultats sont en accord avec les observations des profils chromatographiques (un plus grand nombre et une plus grande diversité des bandes de migration de l'extrait EAL comparé à l'extrait EBL).

D'autre part, la comparaison de nos valeurs avec une étude faite sur trois types de thé (blanc, vert, noir) (**Orak et al. 2013**) montre que l'extrait EBL a la même valeur en

polyphénols totaux que le thé noir, et la moitié par rapport au thé vert. Quant à l'extrait EAL, il présente une valeur en polyphénols totaux presque égale à celle du thé vert, et deux fois supérieurs à celle du thé noir.

b- Tests de l'activité antioxydante

La mesure de l'activité antioxydante est faite avec les trois tests complémentaires, le DPPH (radical scavenging activity), le CUPRAC (Cupric reducing antioxidant capacity), et l'ABTS. Les résultats de ces activités sont comparés à un antioxydant synthétique, le BHA (hydroxyanisole butylé). Ce dernier est utilisé comme un antioxydant de référence.

b.1- Test du DPPH

Les résultats de l'activité antiradicalaire au DPPH sont représentés par les pourcentages d'inhibition des différentes concentrations de chacun des extraits testés. Les valeurs des CI50 exprimées en µg/mL calculées graphiquement à partir des régressions linéaires obtenues, représentent les pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de chacun des extraits testés (tableau 18, figure 29).

Tableau 18 : Inhibition du DPPH par les extraits EAL et EBL

| | | % d'inhibition | | | | | | |
|------------|-----|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| [C](µg/mL) | | 3,125 | 6,25 | 12,5 | 25 | 50 | 100 | 200 |
| Extraits | | | | | | | | |
| | EBL | 1,18±2,93 | 3,48±0,58 | 9,78±0,77 | 21,59±1,38 | 38,76±0,46 | 55,05±0,08 | 78,79±0,41 |
| | EAL | 7,74±0,87 | 17,15±0,34 | 29,35±1,92 | 54,69±0,38 | 74,75±1,00 | 81,58±1,13 | 80,65±0,28 |

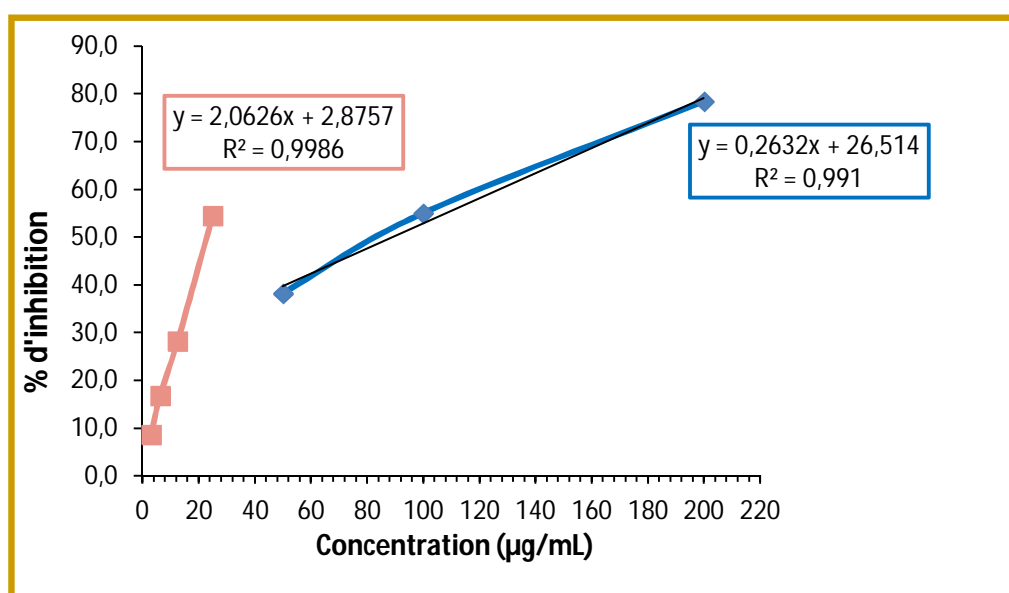


Figure 29 : Activité anti-radicalaire du DPPH, la ligne rose indique le % d'inhibition de l'extrait EAL. La ligne bleue indique le % d'inhibition de l'extrait EBL.

b.2- Test de l'ABTS

Les résultats de l'activité du piégeage de l'ABTS sont représentés par les pourcentages d'inhibition des différentes concentrations de chacun des extraits testés. Les valeurs des CI50 exprimés en µg/mL calculées graphiquement à partir des régressions linéaires obtenues, représentent les pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de chacun des extraits testés (**tableau 19, figure 30**).

Tableau 19 : Activité du piégeage de l'ABTS par les extraits EAL et EBL.

| | | % d'inhibition | | | | | | |
|------------|-----|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| [C](µg/mL) | | 3,125 | 6,25 | 12,5 | 25 | 50 | 100 | 200 |
| Extraits | | | | | | | | |
| | EBL | 13,78±0,92 | 23,70±1,03 | 36,65±0,89 | 55,51±1,14 | 80,38±0,00 | 91,84±0,09 | 91,57±1,40 |
| | EAL | 24,70±0,37 | 47,30±0,56 | 69,24±0,19 | 90,70±0,57 | 91,57±0,58 | 91,84±0,19 | 89,35±1,30 |

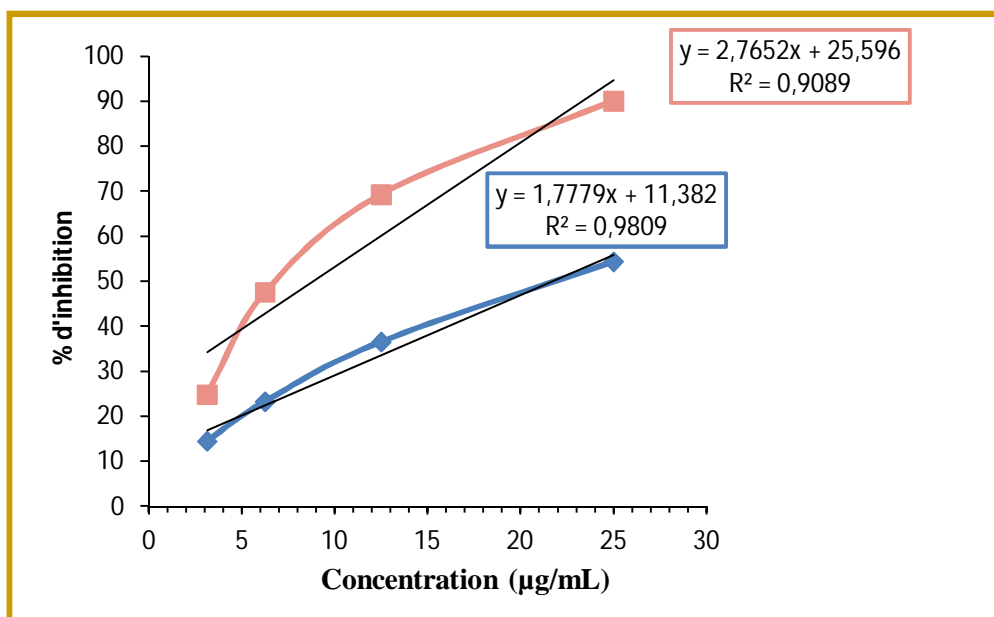


Figure 30 : Activité de piégeage de l'ABTS la ligne rose indique le % d'inhibition de l'extrait EAL. La ligne bleue indique le % d'inhibition de l'extrait EBL.

b.3- Test du CUPRAC

Les résultats de l'activité inhibitrice du CUPRAC sont représentés par les absorbances des différentes concentrations de chacun des extraits testés. Les valeurs des $A_{0,5}$ exprimées en $\mu\text{g/mL}$ calculées graphiquement à partir des régressions linéaires obtenues, représentent les absorbances en fonction des différentes concentrations de chacun des extraits testés (tableau 20, figure 31).

Tableau 20 : Inhibition du CUPRAC par les extraits EAL et EBL

| | | $A_{0,50}$ | | | | | | |
|-------------------------|-----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| [C]($\mu\text{g/mL}$) | | 3,125 | 6,25 | 12,5 | 25 | 50 | 100 | 200 |
| Extraits | EBL | 0,14 \pm 0,01 | 0,18 \pm 0,01 | 0,23 \pm 0,01 | 0,33 \pm 0,00 | 0,53 \pm 0,00 | 0,91 \pm 0,00 | 1,66 \pm 0,06 |
| | EAL | 0,19 \pm 0,00 | 0,28 \pm 0,01 | 0,44 \pm 0,01 | 0,74 \pm 0,02 | 1,33 \pm 0,01 | 2,11 \pm 0,01 | 3,12 \pm 0,02 |

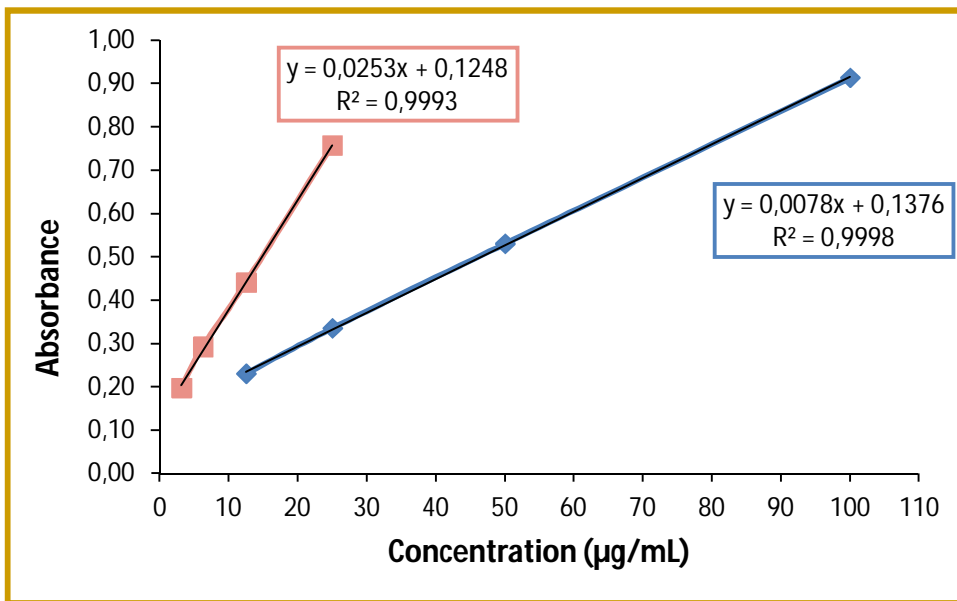


Figure 31 : Test de la capacité antioxydante pour la réduction cuprique, la ligne rose indique le $A_{0,5}$ de l'extrait EAL. La ligne bleue indique le $A_{0,5}$ de l'extrait EBL.

Le **tableau 21**, résume les résultats des trois tests antioxydants. **CI₅₀** (**DPPH** et **ABTS**) et **A_{0,5}** (**CUPRAC**). Ces résultats sont présentés sous forme d'un diagramme à colonnes (**figure 32**).

Tableau 21 : Activité antioxydante comparative des extraits étudiés par les tests DPPH, ABTS, et CUPRAC.

| Extraits | DPPH CI ₅₀ (µg/mL) | ABTS ⁺ CI ₅₀ (µg/mL) | CUPRAC A _{0,5} (µg/mL) |
|----------------------------|----------------------------------|---|------------------------------------|
| EBL | 87,99±1,10 | 21,30±0,37 | 46,52±0,61 |
| EAL | 22,57±0,40 | 8,87±0,04 | 15,24±0,38 |
| BHA ^{a, b} | 5,02±0,19 [*] | 5,00±0,36 ^{**} | 6,46±0,22 ^{***} |

^a: Standard, ^b: ButylHydroxyAnisole.

^{*}, ^{**} et ^{***} sont des valeurs correspondant respectivement aux longueurs d'ondes 490 nm, 625 nm et 450 nm.

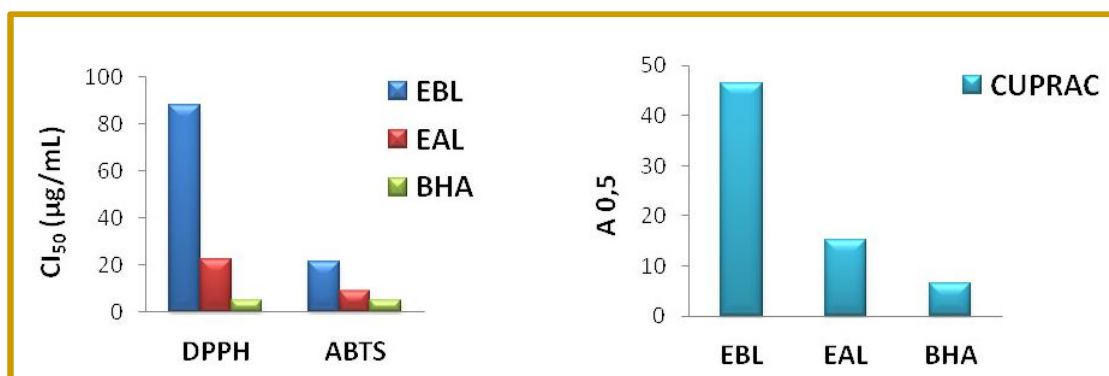


Figure 32 : Résultats des CI₅₀ des tests DPPH et ABTS et A_{0,5} du test CUPRAC des extraits EBL et EAL.

De ces résultats d'étude de l'activité antioxydante, par les trois méthodes complémentaires, il apparaît que :

Avec le DPPH[•] : l'extrait EAL montre une excellente activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH (**CI₅₀= 22,57±0,40 µg/mL**), elle est 4 fois meilleure que celle de l'extrait EBL (**CI₅₀= 87,99±1,10 µg/ml**) mais 5 fois inférieure à celle du standard BHA (**CI₅₀= 5,02±0,19 µg/mL**) (**tableau 21, figure 32**). L'excellente activité antiradicalaire du DPPH de l'extrait EAL peut être expliquée par sa grande richesse en polyphénols (meilleur que le thé vert).

Avec le test de l'ABTS^{•+} : l'extrait EAL a manifesté une excellente activité inhibitrice de l'ABTS^{•+} (**CI₅₀= 8,87±0,04µg/mL**) presque égale à celle du standard BHA (**CI₅₀= 5,00±0,36 µg/mL**), tandis que l'extrait EBL a montré une bonne activité antioxydante (**CI₅₀= 21,30±0,37 µg/mL**) qui est 4 fois plus faible que celle du BHA (**tableau 21, figure 32**).

Avec la méthode du CUPRAC : l'extrait EAL ($A_{0,5} = 15,24 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$) a montré une meilleure activité par rapport à l'extrait EBL ($A_{0,5} = 46,52 \pm 0,61 \mu\text{g/mL}$) mais elle est 3 fois inférieure à celle du standard ($A_{0,5} = 6,46 \pm 0,22 \mu\text{g/ml}$). Il n'en demeure pas moins que les 2 extraits possèdent une bonne activité antioxydante vis-à-vis du CUPRAC (**tableau 21, figure 32**).

Les résultats de l'activité antioxydante sont cohérents avec ceux du dosage en polyphénols totaux et l'observation des profils chromatographiques. En effet, l'extrait EAL affiche la plus forte activité antioxydante, comparé à l'extrait EBL et c'est, par ailleurs, l'extrait le plus riche en polyphénols totaux (**$308,04 \pm 0,09 \mu\text{g EAG/mg d'extrait}$**) par rapport à l'extrait EBL (**$164,44 \pm 0,12 \mu\text{g EAG/mg d'extrait}$**).

Conclusion générale

L'extraction des métabolites secondaires des parties aériennes et racinaires d'une espèce du genre *Linum* est faite, en premier, par le Soxhlet dans le chloroforme. Ensuite, la matière végétale récupérée a été séchée puis macérée dans une solution hydro-méthanolique (70/30). Des extractions liquide-liquide en utilisant deux solvants : l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol ont permis d'obtenir deux extraits, appelés respectivement EAL et EBL. L'extrait EBL, disponible en plus grande quantité, a été utilisé dans le fractionnement par VLC, dans laquelle plusieurs gels de séparation ont été testés (silice normale, C18, et polyamide). Le gel de polyamide s'est révélé être le meilleur pour bien séparer les métabolites secondaires.

L'extrait EAL affiche la plus forte activité antioxydante, comparé à l'extrait EBL et c'est, par ailleurs, l'extrait le plus concentré en polyphénols totaux (**308,04 ± 0,09 µg EAG/mg d'extrait**) par rapport à l'extrait EBL (**164,44 ± 0,12 µg EAG/mg d'extrait**) et, également, l'extrait qui présente les profils chromatographiques les plus riches. On peut, donc, conclure que la richesse de l'extrait EAL en polyphénols totaux lui attribue une forte activité anti-oxydante.

Pour les travaux ultérieurs, il est nécessaire de fusionner les deux extraits EAL et EBL, compte tenu de la faible quantité de l'extrait EAL. Le fractionnement du mélange sera fait sur le gel de polyamide, élué avec un gradient de Toluène/MeOH, puisqu'il s'est avéré être le plus performant pour la séparation des métabolites secondaires.

Perspectives

Des travaux supplémentaires de séparations et purifications chromatographiques (colonne, CCM, HPLC prep) seront nécessaires pour isoler les métabolites secondaires. Des analyses spectroscopiques (UV, RMN, masse haute résolution) seront indispensables pour identifier les molécules pures isolées.

Des tests de l'activité anti-oxydante, antimicrobienne, et d'inhibition d'enzymes sont aussi importants à faire, sur les molécules pures, isolées. L'objectif sera de déterminer de nouvelles molécules à potentialité thérapeutiques, mais aussi, afin de comprendre leur rôle dans l'interaction de la plante avec son environnement.

Références bibliographiques

Al-Jumaily, E. F., Al-Azawi, A. H. 2013a. Isolation and purification of secoisolariciresinol diglucoside oligomers (Lignan) from Flax seed and its evaluation of antioxidant activity. *Journal of Applied Chemistry*. 5(6), 17-24.

Al-Jumaily, E. F., Al-Azawi, A. H. 2013b. Hepatoprotective activity of lignan compound from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) against acetaminopheninduced hepatotoxicity in rabbits. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3(1), 56–72.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols, vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 7970-7981.

Attoumbre, J., Hano, C., Mesnard, F., Lamblin, F., Bensaddek, L., Raynaud-Le Grandic, S., Baltora-Rosset, S. 2006. Identification by NMR and accumulation of a neolignnan, the dehydrodiconiferyl alcohol-4- β -d-glucoside, in *Linum usitatissimum* cell cultures. *Comptes Rendu Chimie*. 9(3-4), 420-425.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils: a review. *Food and Chemical Toxicology*. 46, 446–475.

Berlin, J., Bedorf, N., Mollenschott, C., Wray, V., Sasse, F., Hoefle, G. 1988. On the podophyllotoxins of root cultures of *Linum flavum*. *Planta Medica*. 54(3), 204-6.

Blois, M-S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 4617(181), 1119-1200.

Boizot, N. et Charpentier, J-P. 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de INRA*. N°. special. 79-82.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie/Food Science and Technology*. 28, 25-30.

Broomhead, A. J and Dewick, P. M. 1990. Aryltetralin lignans from *Linum flavum* and *Linum capitatum*. *Phytochemistry*. 29(12), 3839-3844.

Bruneton, J. 2016. Lignanes, néolignanes et composés apparentés in *Farmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Edition Lavoisier. France. 389-403.

Chan, E. W. C., Lim, Y. Y., Chew, Y. L. 2007. Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. *Food Chemistry*. 102, 1214–1222.

Clark, W. F., Muir, A. D., Westcott, N. D., Parbtani, A. 2000. A novel treatment for *Lupus nephritis*: lignan precursor derived from flax. *Lupus*. 9, 429–436.

Czemplik, M., Mierziak, J., Szopa, J., Kulma, A. 2016. Flavonoid C-glucosides derived from flax straw extracts reduce human breast cancer cell growth in vitro and induce apoptosis. *Frontiers in Pharmacology*. 7(282).

Dugani, A., Auzzi, A., Naas, F., Megwez, S. 2008. Effects of the oil and mucilage from flaxseed (*Linum usitatissimum*) on gastric lesions induced by ethanol in rats. *Libyan Journal of Medicine*. 3(4), 166-9.

Engel, N., Kraft, K., Müller, P., Duske, K., Kühn, J., Oppermann, C., Nebe, B. 2015. Actin cytoskeleton reconstitution in MCF-7 breast cancer cells initiated by a native flax root extract. *Advancement in Medicinal Plant Research*. 3(3), 92-105.

Esfandiari, M., Sharifi, M., Mohamadyar-Toupkanlou, F., Ahwaz, H., Yousefzadi, M., Jafari, A., Hosseinzadeh, S., Soleimani, M. 2017. Optimization of cell/tissue culture of *Linum persicum* for production of lignans derivatives including Podophyllotoxin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 133, 51–61.

Frezza, C., Venditti, A., Toniolo, C., De Vita, D., Franceschin, M., Ventrone, A., Tomassini, L., Foddai, S., Guiso, M., Nicoletti, M., Serafini M., Bianco A. 2020. Nor-Lignans: Occurrence in Plants and Biological Activities—A Review. *Molecules*. 25, 197.

Fukumitsu, S., Aida, K., Ueno, N., Ozawa, S., Takahashi, Y., Kobori, M. 2008. Flaxseed lignan attenuates high-fat diet-induced fat accumulation and induces adiponectin expression in mice. *British Journal of Nutrition*. 100(03), 669–676.

Gaafar, A. A., Salama, Z. A., Askar, M. S., El-Hariri D. M., Bakry B. A. 2013. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of Lignan flax seed extract (*Linum usitatissimum* L.). *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 47, 291–297.

Ge, J., Wang, F., Zhang, Z., Liang, S., Deng, F. 2009. Quick preparation method of flaxseed polysaccharide with viral resistance and immunoregulatory activity. *Faming Zhuanli Shenqing, CN 108359021 A 20180803*.

Hao, M., Beta, T. 2012. Qualitative and quantitative analysis of the major phenolic compounds as antioxidants in barley and flaxseed hulls using HPLC/MS/MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92(10), 2062-2068.

Ionkova, I., Antonova, I., Momekov, G., Fuss, E. 2010. Production of podophyllotoxin in *Linum linearifolium* in vitro cultures. *Pharmacognosy Magazine*. 6(23), 180.

Ionkova, I., Sasheva, P., Ionkov, T., Momekov, G. 2013. *Linum narbonense*: A new valuable tool for biotechnological production of a potent anticancer lignan Justicidine B. *Pharmacognosy Magazine*. 9, 39-44.

Ionkova, I., Vasilev, N., Konstantinov, S., Ninov, St., Tsvetanova, V. 2003. Callus and suspension cultures in vitro of *Linum* species and their pharmacological activity. *Farmatsiya (Sofia, Bulgaria)*. 50(1-2), 14-18.

Javidnia, K., Miri, R., Rezai, H., Jafari, A., Azarmehr, A., Amirghofran, Z. 2005. Biological Activity and Aryltetraline Lignans of *Linum persicum*. *Pharmaceutical Biology*. 43(6), 547-550.

Jullian-Pawilicki, N., Lequart-Pillon, M., Huynh-Cong, L., Lesur, D., Cailleu, D., Mesnard, F. 2015. Arylnaphthalene and aryltetralin-type lignans in hairy root cultures of *Linum perenne*, and

the stereochemistry of 6-methoxy podophyllotoxin and one diastereoisomer by HPLC-MS and NMR spectroscopy. *Phytochemical analysis*. 26 (5), 310–319.

Kameyama, K., Aramoto, Y., Sakata, O., Kuno, N., Shinohara, T. 2001. Skin-beautifying compositions containing *Linum* seed extracts and other active agents. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 2001261570 A 20010926.

Kapuriya, P. B., Sadariya, K. A., Bhavsar, S. K., Thaker, A. M. 2018. Antidiabetic activity of aqueous extracts of *Linum usitatissimum* in streptozotocin induced diabetic rats. *Pharma Innovation*. 7(7-C), 1-6.

Karimzadeh, F., Haddad, R., Garoosi, G., Khademian, R. 2019. Effects of Nanoparticles on Activity of Lignan Biosynthesis Enzymes in Cell Suspension Culture of *Linum usitatissimum* L. *Russian Journal of Plant Physiology*. 66(5), 756-762.

Konuklugil, B. 2005. Aryltetralin Lignans from *Linum cariense*. *Chemistry of Natural Compounds*. 41(3), 306-307.

Konuklugil, B., Ionkova, I., Vasilev, N., Schmidt, T. J., Windhovel, J., Fuss, E., Alfermann, A. W. 2007. Lignans from *Linum* species of sections *Syllinum* and *Linum*. *Natural Product Research*. 21(1), 1-6.

Konuklugil, B., Bahadir, O. 2004. Phenylpropanoid glycosides from *Linum olympocum* (Linaceae). *Turkish Journal of Chemistry*. 28(6), 741-744.

Koulman, A., Konuklugil, B. 2004. Lignan profile of *Linum meletonis*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 32(1), 91-93.

Kumar, S., Pandey, A. K. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*. 2013, 162750.

Kyselka, J., Rabiej, D., Dragoun, M., Kreps, F., Burčová, Z., Němečková, I., Smolová, J., Bjelková, M., Szydłowska-Czerniak, A., Schmidt, Š., Šarman, L., Filip, V. 2017. Antioxidant and antimicrobial activity of linseed lignans and phenolic acids. *European Food Research and Technology*. 243(9), 1633–1644.

Lehraiki, A., Attoumbre, J., Bienaimé, C., Matifat, F., Bensaddek, L., Nava-Saucedo, E., Fliniaux, M. A., Ouadid-Ahidouch, H., Baltora-Rosset, S. 2010. Extraction of lignans from flaxseed and evaluation of their biological effects on breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. *Journal of Medicinal Food*. 13(4):834-841.

Li, Z., Yang, Y., Zhang, L., La, X., Li, H. 2008. Extraction method and antitumor application of flax polyphenol. *Faming Zhuanli Shenqing*, CN 108324757 A 20180727.

Mahmood, N., Nazir, R., Khan, M., Iqbal, R., Adnan, M., Ullah, M., Yang, H. 2019. Phytochemical screening, antibacterial activity and heavy metal analysis of ethnomedicinal recipes and their sources used against infectious diseases. *Plants (Basel, Switzerland)*. 8(11), 454.

Marques, J., Costa, M., Lee, Ch., Davin, L., May, G., Lewis, N., Kim, K., John, C. 2010. Transcriptome and metabolome profiling of *Podophyllum*, *Linum*, *Camptotheca* and *Larrea* medicinal plants. Joint 65th Northwest and 22nd Rocky Mountain Regional Meeting of the American Chemical Society, Pullman, WA, United States, 20-23, NWRM-212.

McDill, J., Reppinger, M., Simpson, B. B., Kadereit, J. W. 2009. The Phylogeny of *Linum* and Linaceae Subfamily Linoideae, with Implications for Their Systematics, Biogeography, and Evolution of Heterostyly. *Systematic Botany*. 34(2), 386–405.

McDill, J. R., Simpson, B. B. 2011. Molecular phylogenetics of Linaceae with complete generic sampling and data from two plastid genes. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 165, 64-83.

Middleton, E. 1996. Biological properties of plant flavonoids: an overview. *International Journal of Pharmacognosy*. 34, 344 – 348.

Mohagheghzdeh, A., Schmidt, T. J., Bayindir, U., Fuss, E., Mehregan, I., Alfermann, A. W. 2006. Diarylbutyrolactone from *Linum corymbulosum* *in vitro* cultures. *Planta medica*, 72(12), 1165-1167.

Mohagheghzadeh, A., Schmidt, T. J., Alfermann, A. W. 2002. Arylnaphthalene Lignans from *in vitro* Cultures of *Linum austriacum*. *Journal of Natural Products*, 65(1), 69-71.

Mohammed, M. M., Christensen, L. P., Ibrahim, N. A., Awad, N.E., Zeid, I. F., & Pedersen, E. B. 2009. New acylated flavone and cyanogenic glycosides from *Linum grandiflorum*. *Natural product research*, 23(5), 489-497.

Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 26 (2), 211-219.

Momekov, G., Yossifov, D., Guenova, M., Michova, A., Stoyanov, N., Konstantinov, S., Ionkov, T., Sacheva, P., Ionkova, I. 2014. Apoptotic mechanisms of the biotechnologically produced arylnaphtalene lignan justicidin B in the acute myeloid leukemia-derived cell line HL-60. *Pharmacological Reports*. 66, 1073-1076.

Nag, S., Mitra, J., Karmakar, P. G. 2015. An Overview on Flax (*Linum usitatissimum* L.) and its Genetic Diversity. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*. 8(4), 805-817.

Oostdam, A., Mol, J. N., Van der Plas, L. H. 1993. Establishment of hairy root cultures of *Linum flavum* producing the lignan 5-methoxy-podophyllotoxin. *Plant cell reports*, 12(7-8), 474-477.

Orak, H-H., Yagar, H., Isbilir, S-S., Demirci, A-S., Gumus, T. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of white, green and black tea extracts. *Acta Alimentaria*. 42 (3), 379-389.

Ozyurek, M., Guçlu, K., Tutem, E., Baskan, K. S., Erçag Erol, Celik, S. E., Baki, S., Yıldız, L., Karaman Seyda, Apak, R. 2011a. A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Critical Review. Analytical methods*. 3, 2439-2453.

Ozyurek, M., Guçlu, K., Apak R. 2011b. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *Trends in Analytical Chemistry*. 30 (4), 652-664.

Palmer, I. S., Olson, O. E., Halverson, A.W., Miller, R., Smith, C. 1980. Isolation of factors in linseed oil meal protective against chronic selenosis in rats. *Journal of Nutrition*. 110, 145-150.

Pietrofesa, R.A., Velalopoulou, A., Arguiri, E., Menges, C.W., Testa, J.R., Hwang, W.T., Albelda, S.M., Christofidou-Solomidou, M. 2016. Flaxseed lignans enriched in secoisolariciresinol diglucoside prevent acute asbestos-induced peritoneal inflammation in mice. *Carcinogenesis*. 37(2), 177–187.

Prasad, K. 2005. Hypocholesterolemic and antiatherosclerotic effect of flax lignan complex isolated from flaxseed. *Atherosclerosis*. 179, 269–275.

Prathyusha, K., Manasa, R. J., Himabindhu, J., Ramanjaneyulu, K. 2017. Evaluation of *in vitro* antiurolithiatic activity of *Linum usitatissimum*. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 8(1), 1286-1293.

Quezel, P., Santa, S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 2. Edition CNRS. Paris.

Rafieian -Kopaei, M., Shakiba, A., Sedighi, M., Bahmani, M. 2017. The analgesic and anti-inflammatory activity of *Linum usitatissimum* in Balb/c mice. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*. 22(4), 892-896.

Rajेशha, J., Rao, A., Madhusudhan, B., Karanakumar, M. 2010. Antibacterial properties of secoisolariciresinol diglucoside isolated from Indian flaxseed cultivars. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 4(1), 551-560.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26, 1231–1237.

Robson, N. K. B. 1963. Linaceae. *Flora Zambesiaca* 2:1.

Saadat, S., Shakeri, F., Boskabady, M. H. 2018. Comparative Antitussive Effects of Medicinal Plants and Their Constituents. *Alternative Therapies in Health and Medicine*. 24(4).

Safarpour, M., Ghaedi, M., Yousefinejad, M., Javadian, H., Asfaram, A., Ghasemi, Z., Jaberi, H., Rahimi, D. 2017. Podophyllotoxin extraction from *Linum usitatissimum* plant and its anticancer activity against HT-29, A-549 and MDA-MB-231 cell lines with and without the presence of gold nanoparticles. *Applied Organometallic Chemistry*. 32(2).

Salama, Z. A., Gaafar, A. A., El-Hariri, D. M. 2012. Free radical quenching activity of polyphenols (lignans) in three cultivars of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Natural Fibers*. 9, 277-289.

Sawant, S. H., Bodhankar, S. L. 2016. Flax lignan concentrate attenuate hypertension and abnormal left ventricular contractility via modulation of endogenous biomarkers in two-kidney-one-clip (2K1C) hypertensive rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 26 (5), 601–610.

Schmidt, T. J., Hemmati, S., Klaes, M., Konuklugil, B., Mohagheghzadeh, A., Ionkova, I., Fuss, E., Alfermann, A. W. 2010. Lignans in flowering aerial parts of *Linum* species – Chemodiversity in the light of systematics and phylogeny. *Phytochemistry*. 71, 1714-1728.

Schmidt, T. J., Vöðing, S., Klaes, M., Grimme, S. 2007. An aryldihydronaphtyallene lignan with a Novel Type of Ring System and Further New Lignans from *Linum perenne* L. *Planta Medica*, 73(15), 1574- 1580.

Shad, A. A., Asmat, S., Bakht, J., Jan, S., Khan, M. A. 2016. Antimicrobial potentials and phytochemical analysis of desert cotton (*A. javanica*) and flax (*L. usitatissimum*). *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 29 (3), 861–868.

Shah, N. R., Patel, B. M. 2016. Secoisolariciresinol diglucoside rich extract of *L. usitatissimum* prevents diabetic colon cancer through inhibition of CDK4. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 83, 733–739.

Singh, S., Nair, V., Jain, S., Gupta, Y. K. 2008. Evaluation of anti-inflammatory activity of plant lipids containing alpha-linolenic acid. *Indian journal of experimental biology*. 46(6), 453-6.

Singleton, V.L., Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enology and Viticulture*. 16, 144-158.

Smith Doreen, L. 1966. *Linaceae*. Flora of Tropical East Africa.

Sorice, A., Guerriero, E., Volpe, M.G., Capone, F., La Cara, F., Ciliberto, G., Colonna, G., Costantini, S. 2016. Differential response of two human breast cancer cell lines to the phenolic extract from flaxseed oil. *Molecules*. 21(3), 319.

Sun, J. L., Deng, A. J., Li, Y., Li, Z. H., Chen, H., & Qin, H. L. 2009. First Example of Diterpenoids from 14, 15-Cyclopimarane in the Roots of *Linum usitatissimum*. *Helvetica Chimica Acta*, 92(12), 2746-2753.

Sveinsson, S., McDill, J., Wong, G. K. S., Li, J., Li, X., Deyholos, M. K., Cronk, Q. C. B. 2014. Phylogenetic pinpointing of a paleopolyploidy event within the flax genus (*Linum*) using transcriptomics. *Annals of Botany*. 113, 753–761.

Szewczyk, M., Abarzua, S., Schlichting, A., Nebe, B., Piechulla, B., Briese, V., Richter, D. U. 2014. Effects of extracts from *Linum usitatissimum* on cell vitality, proliferation and cytotoxicity in human breast cancer cell lines. *Journal of Medicinal Plants Research*. 8(5), 237-245.

Tou, J. C., Chen, J., Thompson, L. U. 1998. Flaxseed and its lignan precursor, secoisolariciresinol diglycoside, affect pregnancy outcome and reproductive development in rats. *Journal of Nutrition*. 128, 1861–1868.

Umezawa, T. 2003. Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*. 2, 371–390.

Vasilev, N., Bos, R., Kayser, O., Momekov, G., Konstantinov, S., Ionkova, I. 2006. Production of justicidin B, a cytotoxic aryl-naphthalene lignan from genetically transformed root cultures of *Linum leonii*. *Journal of Natural Products*. 69(7), 1014-1017.

Vasilev, N., Momekov, G., Zaharieva, M., Konstantinov, S., Bremner, P., Heinrich, M., Ionkova, I. 2005. Cytotoxic activity of a podophyllotoxin-like lignan from *Linum tauricum* Willd. Neoplasma. 52(5), 425-429.

Volk, O. H., Sinn, M. 1968. Linoside, a new flavone from *Linum maritimum*. Zeitschrift fuer Naturforschung, Teil B: Anorganische Chemie, Biochemie, Biophysik, Biologie, 23(7), 1017.

Walker, R.B., Everette, J.D. 2009. Comparative reaction rates of various antioxidants with ABTS radical cation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57, 1156–1161.

Weiss, S. G., Tin-Wa, M., Perdue, Jr. R. E., Farnsworth, N. R. 1975. Potential Anticancer Agents 11: Antitumor and Cytotoxic Lignans from *Linum album* (Linaceae). Journal of Pharmaceutical Sciences, 64(1), 95-98.

Xu, J., Tian, G., Ma, C., Gao, H., Chen, C., Yang, W., Deng, Q., Huang, Q., Ma, Z., Huang, F. 2016. Flaxseed lignan secoisolariciresinol diglucoside ameliorates experimental colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. Journal of Functional Foods. 26, 187–195.

Xu, Y., Hall, C., Wolf-Hall, C. 2008. Antifungal activity stability of flaxseed protein extract using response surface methodology. Journal of Food Science. 73(1), 9-14.

Yahi, N., Véla, E., Benhouhou, S., de Bélair, G., Gharzouli, R. 2012. Identifying important plants areas (key biodiversity areas for plants) in northern Algeria. Journal of Threatened. Taxa 4: 2453-2765.

Yousefzadi, M., Sharifi, M., Chashmi, N., Behmanesh, M., Ghasempour, A. 2011. Optimization of podophyllotoxin extraction method from *Linum album* cell cultures. Pharmaceutical Biology (London, United Kingdom). 48(12), 1421-1425.

Zanwar, A. A., Hegde, M. V., Rojatkar, S. R., Sonawane, K. B., Rajamohanan, P. R., Bodhankar S. L. 2014. Isolation, characterization and antihyperlipidemic activity of secoisolariciresinol diglucoside in poloxamer-407-induced experimental hyperlipidemia. Pharmaceutical Biology. 52(9), 1094–1103.

Zare, K., Movafeghi, A., Mohammadi, S. A., Asnaashari, S., & Nazemiyeh, H. 2014. New Phenolics from *Linum mucronatum subsp. orientale*. BiImpacts: BI, 4(3), 117.

<http://www.plantsoftheworldonline.org>

Résumé :

Dans ce travail, les parties aériennes séchées d'une espèce *Linum*, récoltée à Djebel El-Ouach (Constantine), ont été préalablement extraites au Soxhlet dans le chloroforme puis, la matière végétale récupérée a été séchée puis macérée dans une solution hydro-méthanolique (70/30). Des extractions liquide-liquide, effectuées en utilisant deux solvants, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol ont conduit aux extraits correspondants, après évaporation à sec (**EBL** et **EAL**). Le fractionnement de l'extrait EBL, par VLC, sur gel de silice normale, gel de silice C-18 et sur gel de polyamide a montré que ce dernier est plus efficace pour séparer les métabolites secondaires. Le dosage des polyphénols totaux a montré que l'extrait EAL (**308,04 ± 0,09 µg EAG/mg d'extrait**) est plus riche que l'extrait EBL (**164,44 ± 0,12 µg EAG/mg d'extrait**). L'extrait EAL a manifesté une meilleure activité antioxydante vis à vis du DPPH, de l'ABTS et du CUPRAC.

Mots clés : *Linum*, extraction, macération ; polyphénols totaux, activité antioxydante

Summary:

In this work, in order to identify the secondary metabolites, dried aerial parts of a *Linum* species, collected from Djebel El-Ouahch (Constantine), were first extracted with chloroform in a Soxhlet. Then, the recovered plant material was macerated in a hydromethanol solution (70/30). Liquid-liquid extractions using two solvents (ethyl acetate and *n*-butanol) led to the corresponding extracts (AEL and BEL), after evaporation to dryness. The BEL extract was subjected to VLC using regular silica gel, C18 silica gel and polyamide. The latter was the most efficient in the separation of the secondary metabolites. The AEL extract revealed a higher polyphenol content (**308,04 ± 0,09 µg AGE/mg of extract**) than the BEL extract (**164,44 ± 0,12 µg AGE/mg of extract**). The AEL extract exhibited the highest antioxidant activity towards DPPH[·], ABTS^{·+} and CUPRAC.

Keywords : *Linum*, extraction, maceration ; total polyphenols, antioxidant activity

ملخص:

في هذا العمل ، تم استخلاص المواد الإستقلابية لنبتة مجففة من جنس *Linum* ، والتي تم جمعها في جبل الوحش (قسنطينة) ، أولاً باستخدام Soxhlet في الكلوروفورم ، ثم تم تجفيف المواد النباتية المسترجعة ثم نقعها في محلول مائي ميثانولي 70/30. أظهرت تجزئة مستخلص EBL ، بواسطة VLC ، على السيليكا العادي و C 18 و البولياميد أن الأخير أكثر فعالية . أظهر تحديد قيمة البوليفينول أن مستخلص EAL أكثر تركيز من مستخلص EBL . أظهرت تحاليل النشاط المضاد للأكسدة (DPPH ، ABTS ، CUPRAC) أن مستخلص EAL أكثر فعالية من مستخلص EBL

الكلمات المفتاحية: *Linum* ، استخلاص ، نقع ؛ مجموع البوليفينول ، النشاط المضاد للأكسدة

Etude phytochimique et évaluation du potentiel antioxydant d'une espèce du genre *Linum*

Résumé :

Dans ce travail, les parties aériennes séchées d'une espèce *Linum*, récoltée à Djebel El-Ouach (Constantine), ont été préalablement extraites au Soxhlet dans le chloroforme puis, la matière végétale récupérée a été séchée puis macérée dans une solution hydro-méthanolique (70/30). Des extractions liquide-liquide, effectuées en utilisant deux solvants, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol ont conduit aux extraits correspondants, après évaporation à sec (**EBL** et **EAL**). Le fractionnement de l'extrait EBL, par VLC, sur gel de silice normale, gel de silice C-18 et sur gel de polyamide a montré que ce dernier est plus efficace pour séparer les métabolites secondaires. Le dosage des polyphénols totaux a montré que l'extrait EAL (**308,04 ± 0,09 µg EAG/mg d'extrait**) est plus riche que l'extrait EBL (**164,44 ± 0,12 µg EAG/mg d'extrait**). L'extrait EAL a manifesté une meilleure activité antioxydante vis à vis du DPPH, de l'ABTS et du CUPRAC.

Mots clés : *Linum*, extraction, macération ; polyphénols totaux, activité antioxydante

Summary:

In this work, in order to identify the secondary metabolites, dried aerial parts of a *Linum* species, collected from Djebel El-Ouahch (Constantine), were first extracted with chloroform in a Soxhlet. Then, the recovered plant material was macerated in a hydromethanol solution (70/30). Liquid-liquid extractions using two solvents (ethyl acetate and *n*-butanol) led to the corresponding extracts (AEL and BEL), after evaporation to dryness. The BEL extract was subjected to VLC using regular silica gel, C18 silica gel and polyamide. The latter was the most efficient in the separation of the secondary metabolites. The AEL extract revealed a higher polyphenol content (**308,04 ± 0,09 µg AGE/mg of extract**) than the BEL extract (**164,44 ± 0,12 µg AGE/mg of extract**). The AEL extract exhibited the highest antioxidant activity towards DPPH[•], ABTS^{•+} and CUPRAC.

Keywords : *Linum*, extraction, maceration ; total polyphenols, antioxidant activity

Laboratoires : Laboratoire d'obtention des substances thérapeutiques (LOST).

Jury d'évaluation :

| | | |
|-----------------------------------|-------|-------------------|
| Président du jury : CHIBANI Salih | MCA. | UFM Constantine 1 |
| Rapporteur : KABOUCHE Zahia | PROF. | UFM Constantine 1 |
| Examineur : BOUZID Salha | MCB. | UFM Constantine 1 |

Année universitaire : 2019/2020