



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

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

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Moléculaire et Santé

Thème:

**Contribution à l'étude phytochimique et activité
biologique d'une plante appartenant au genre
Jurinea.**

Présenté et soutenu par :

Le : 21/06/2015

- ZITOUNI Abd el mounaam
- NACERI Oussama

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr. MERGHEM R. (Professeur Université des Frères Mentouri Constantine).

Rapporteur : Mme AYAD R. (M.C.B Université des Frères Mentouri Constantine).

Examineur : Mme BELBACHE H. (M.A.A Université des Frères Mentouri Constantine).

*Année universitaire
2014 - 2015*

remerciement

Avant toute chose, nous remercions Dieu, le Tout Puissant, pour nous avoir donné la force et la patience pour réaliser ce modeste mémoire.

Si nous avons pu réaliser ce travail c'est grâce à notre encadreur Mlle AYAD Radia que nous tenons à remercier en premier, MERCI pour nous avoir accordé votre temps, Merci d'avoir été très patiente avec nous, Merci pour d'avoir mis votre expérience à notre profit.

Nos remerciements s'adressent également à monsieur le Pr. MERGHEM Rachid pour avoir accepté de présider la commission des jurys lors de notre soutenance.

Nous tenons chaleureusement à remercier et exprimer notre profonde reconnaissance à Mme BELBACHE Hanane d'avoir accepté de faire partie de la commission des jurys.

Nous remercions également mademoiselle M.A.A DJAMAI ZOUGHLACHE Soumia pour son encouragement et ses précieux conseils.

Nous souhaitons également exprimer notre reconnaissance à toute personne qui nous a apportée des appuis scientifiques, qu'il s'agisse de conseils ou d'informations, nous pensons notamment à monsieur ARDJANI Amar, monsieur BOUDERSSA Nabil et Madame BIBECHE Zahra.

Enfin, Nous Remercions gracieusement toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

dedicace

JE DÉDIE CE MODESTE TRAVAIL À :

*MES PARENTS QUI L'ONT SUIVI AVEC ATTENTION ET UN
GRAND INTÉRÊT.*

À MES SŒURS ET MON FRÈRE RAOUEF.

À MES AMI(S) CHOUAIBE, MOHAMED.

*À TOUS MES COLLÈGUES DE LA PROMO 2014/2015 BMS
MON BINOME OUSSAMA,
AZIZ, DJEMAL, FAROUK, HAMOU, HOUCINE, IMED,
MOUHAMED B, NABIL, NAIM, YACIN, ZAKI.*

ZITOUNI EL MOUNAM.

Dedicace

Je dédie ce modeste travail à :

La mémoire de mon père

La mémoire de mon grand père

A ma chère maman

Mes sœurs

Mon frère Mohamed amine

Nabil karoum

Aziz benzarnaji

Yazid aïdi

Tous Mes ami (s) sur tous lyess pato, sadik, yakin,.....

Mes collègues de la promo 2014 /2015 BMS

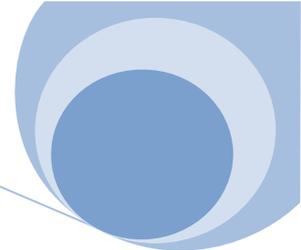
Mon binome zitouni abd el monaam

*Mohamed Ali senoussi, chaoua Djamel, bilami yacin, chibate farouk, guichiri Aziz , Zaghmar Hocin
naaim marouche, boutbakk nabil, ben amara imed, gazoul zakaria, mohamed ben abd rahmen*

Toute ma famille

Ma future femme L.1

Nacéri oussama



Sommaire

Les figures

Les tableaux

Les abréviations

A) Recherches bibliographiques

Introduction	1
Introduction.....	2
Référence bibliographique.....	3

Chapitre I : les astéracées

I.1. Famille des Astéracées : morphologie, date d'introduction et distribution.....	4
I.1.1 Description botanique.....	4
I.1.2 Utilisations et intérêts économiques des Astéracées	6
I.2. Présentation du genre <i>Jurinea</i>	7
I.2.1 Description botanique de l'espèce <i>Jurinea humilis</i> DC.....	7
I.2.2 Répartition géographique de l'espèce <i>Jurinea humilis</i> DC.....	8
I.2.3 Place dans la systématique.....	9
I.3. Travaux antérieurs.....	9
I.3.1 Sur la famille.....	9
I.3.2 Sur le genre.....	11
I.3.3 Sur l'espèce	11
Références bibliographiques.....	12
Références bibliographiques.....	13

Chapitre II : les flavonoïdes

II. Les polyphenols	14
II.1. Les polyphenols : Structure et Classification.....	14
II.1.1. Effets biologiques des polyphénols.....	14
II.2. Les flavonoïdes	15
II.2.1. Définition.....	15
II.2.2. Origine des flavonoïdes	16
II.2.2.1. Biosynthèse.....	16
II.2.2.2. Classification des flavonoïdes	19

II.3. Activités biologiques des flavonoïdes.....	22
II.4. Activité anti-oxydante	22
II.4.1. Propriétés pro-oxydantes.....	23
II.4.2. Relations structure – réactivité.....	23

Références bibliographiques	25
Références bibliographiques	26
Références bibliographiques	27
Références bibliographiques	28

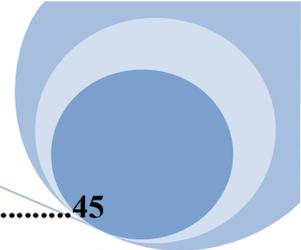
Chapitre III : stress oxydant

III.1. Définition de stress oxydant.....	29
III.2. Qu'est-ce qu'un radical libre ?.....	29
III.3. Qu'est-ce qu'un antioxydant.....	30
III.3.1. Antioxydants enzymatiques.....	30
III.3.2. Antioxydants non enzymatiques (naturels).....	30
III.3.2.1. Acide ascorbique (vitamine C).....	31
III.3.2.2. Tocophérols (dont la vitamine E).....	31
III.3.2.3. Caroténoïdes.....	32
III.3.3. Antioxydants de synthèse.....	33
III.4. Polyphénols naturels comme antioxydants.....	34
Références bibliographiques.....	35
Références bibliographiques.....	36

B) partie expérimental

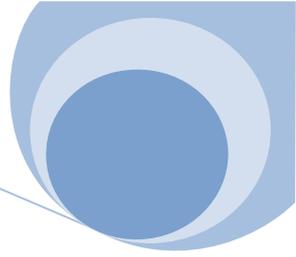
Chapitre IV : matériels et méthodes

IV. Récolte du matériel végétal.....	37
IV.1. Aspect qualitatif : analyse phytochimique.....	37
IV.1.1. Extraction des composés phénoliques.....	37
IV.1.2. Extraction solide-liquide.....	37
IV.1.3. Extraction liquide-liquide.....	37
IV.2. Aspect quantitatif.....	41
IV.2.1. Dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu.....	41
IV.2.2 Dosage des flavonoïdes totaux.....	41
IV.3. Utilisation des techniques d'identification des composés phénoliques.....	42
IV.3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	42

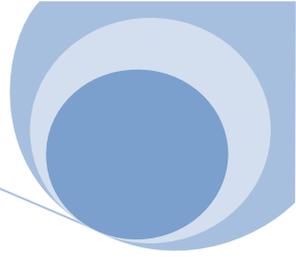


IV.3.2.Etude chimique des flavonoïdes.....	45
IV.3.2.1.Fluorescence sous lumière UV	45
IV.4. Activité biologique	46
IV.4.1.Activité antioxydante.....	46
IV.4.1.1. Mesure du pouvoir réducteur	46
IV.4.1.2.Test au DPPH.....	46
Références bibliographique	49
Chapitre V : résultats et discussions	
V.1. Rendement de l'extraction.....	50
V.2.Dosage des polyphenols.....	51
V.3.Dosage des flavonoïdes.....	51
V.4.Activité antioxydante.....	53
V.4.1.Mesure du pouvoir réducteur	53
V.4.2.Test de DPPH.....	54
V.5.Caractérisation par CCM des différents extraits.....	55
Références bibliographiques.....	57
Références bibliographiques.....	58
Conclusion.....	59
Résumé	

Sommaire



Sommaire



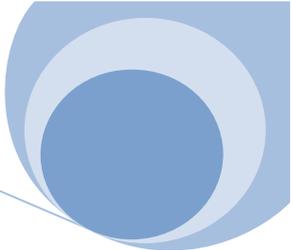
Liste des figures

N de figure	titre	N page
Chapitre I		
Figure I.1	Le capitule des Astéracées.....	5
Figure I.2	Types de fleurs des Astéracées.....	5
Figure I.3	Pappus des Astéracées.....	6
Figure I.4	Photo de la plante : <i>Jurinia humilis</i> DC.....	8
Figure I.5	Répartition géographique de l'espèce <i>Jurinia humilis</i> DC.....	8
Chapitre II		
Figure II.1	Effets biologiques des polyphénols.....	15
Figure II.2	Structure de base des flavonoïdes.....	16
Figure II.3	Les voies métaboliques intervenant dans la biosynthèse des flavonoïdes.....	18
Figure II.4	Représentation des principales classes et sous-groupes des flavonoïdes au niveau de l'hétérocycle C.....	20
Figure II.5	Structure de base d'une Flavones (1) et d'une isoflavone (2).....	24
Chapitre III		
Figure III.1	Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants.....	29
Figure III.2	Structure de l'acide ascorbique.....	31
Figure III.3	Structure de la vitamine E (l'alpha tocopherol).....	31
Figure III.4	Structure des caroténoïdes.....	32
Figure III.5	Structure de BHT.....	33
Figure III.6	Structure de dendromètre de synthèse syringaldehyde.....	33
Chapitre IV		
Figure IV.1	phase dichlorométhane du <i>Jurinea humilis</i>	38
Figure IV.2	phase acétate d'éthyle du <i>Jurinea humilis</i>	38
Figure IV.3	phase n-butanol du <i>Jurinea humilis</i>	39

Figure IV.4	phases récupérées du <i>Jurinea humilis</i>	39
Figure IV.5	protocole d'extraction de la plante <i>Jurinea humilis</i>	40
Figure IV.6	Dépôt et développement de l'échantillon.....	42
Figure IV.7	Cuve de séparation.....	43
Figure IV.8	Calcul de R_f	44
Figure IV.9	Visualisation des plaques sous une lampe UV.....	44
Figure IV.10	Forme libre et réduite du DPPH.....	47

Chapitre V

Figure V.1	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	50
Figure V.2	Courbe d'étalonnage de quercétine.....	52
Figure V.3	Pouvoir réducteur des extraits testés à différentes concentrations.....	53
Figure V.4	Effet scavenger contre le radical DPPH de l'extrait n-butanol du <i>Jurinea Humilis</i>	55
Figure V.5	Chromatogrammes obtenus des trois phases de la plante <i>Jurinea humilis</i> DC.....	56



Liste des tableaux

Chapitre II

Tableau II.1	Molécules impliquées dans la biosynthèse des flavonoïdes.....	18
---------------------	---	----

Chapitre IV

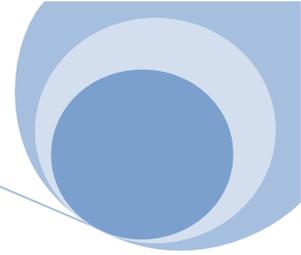
Tableau IV.1	Relation entre la fluorescence du spot et la structure des flavonoïdes...	45
---------------------	---	----

Chapitre V

Tableau V.1	Rendements des extraits.....	50
--------------------	------------------------------	----

Tableau V.2	Teneur en polyphenols.....	51
--------------------	----------------------------	----

Tableau V.3	Teneur en flavonoïdes.....	52
--------------------	----------------------------	----



Les abréviations

% : pourcentage

± : plus ou moins

°C : degré Celsius

Abs Control négatif : Absorbance du control négatif

Abs Echantillon : Absorbance de l'échantillon

AC : absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)

ADN : acide désoxyribose nucléique

AE : absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon-l'extrait)

AlCl₃ : chlorure aluminium

BHT : 3,3', 5,5'-Tétra-t-butyle-biphenyl-4,4'-diol

CCM : Chromatographie sur couche mince

CHI : Chalcone isomerase

CHS : Chalcone synthase

CoA : coenzyme A

DPPH : 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EAG/mg : équivalent acide gallique par milligramme

EQ/mg : équivalent par milligramme

ERO : espèces réactives de l'oxygène

F3H : flavone -3-hydroxylase

Fe⁺⁺(FeCl₂) : chlorure de fer

FeCl₃ : chlorure ferrique

FLS : flavonol synthase

FNSI : Flavones synthase I

FNSII : Flavones synthase II

FS : flavone synthase

g : gramme

H₂O : eau

K₃Fe(CN)₆ : ferricyanure de potassium

LDL : Low Density Lipoprotein

Me OH : Méthanol

Min : minute

Les abréviations

ml : millilitre

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

nm : nanomètre

OH : oxyde hydrogene

R : radical

R_f : facteur de rétention

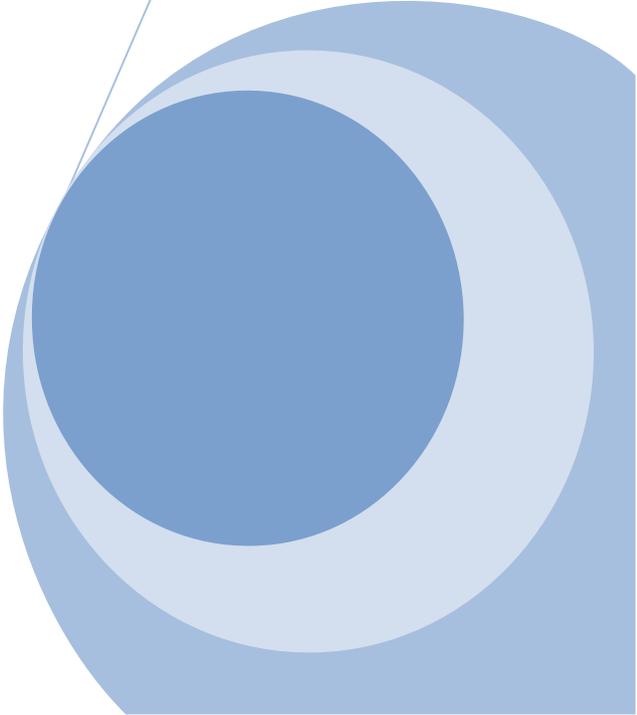
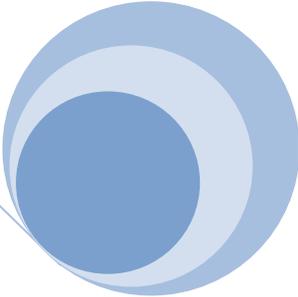
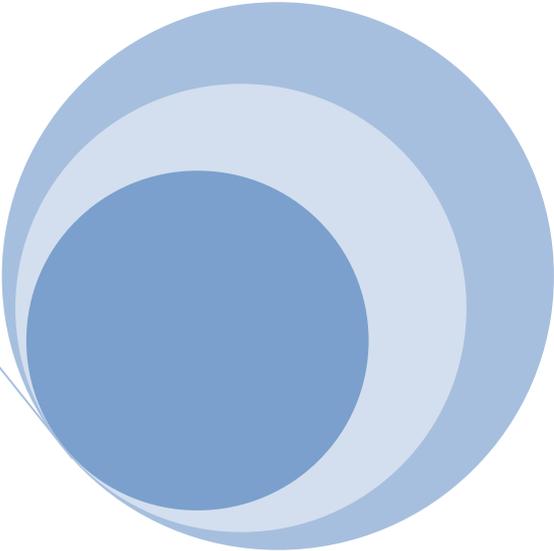
SD : Standard Déviation (l'écart type)

TCA : l'acide trichloracétique

UV : ultra violet

μl : microlitre

INTRODUCTION



Introduction

La connaissance par l'homme de l'utilisation des plantes, qu'il s'agisse de plantes alimentaires, médicinales ou toxiques, est très ancienne (**Sévenet T. *et al.*, 1994**). Alors que se soigner par les plantes est un instinct, qui se retrouve d'ailleurs dans le comportement des animaux. Cette pratique a engendré d'innombrables croyances sur ce qui sauve la vie et sur les forces qui lui sont néfastes. Beaucoup de remèdes phytothérapeutiques sont nés des observations, de l'inspiration et de l'expérience des guérisseurs, devenus des personnages révéérés dans toutes les tribus et chez tous les peuples (**Bremness L., 1998**). Ces notes, observations et applications ont été enregistrées depuis des millénaires dans les diverses parties du monde (**Bernadet M., 2000**).

Les végétaux supérieurs ont la capacité de synthétiser, par des voies métaboliques complexes, de nombreux composés qu'ils utilisent pour diverses fonctions adaptatives notamment en réponse aux stress biotiques et abiotiques qu'ils peuvent subir. Les plantes renferment donc une large variété de molécules chimiques (peptides, terpènes, polyphénols, alcaloïdes...) de propriétés physico-chimiques très différentes et qui présentent une large variété d'activités biologiques (antitumorale, antivirale, antimicrobienne, antioxydante cicatrisante...). Il est par ailleurs aujourd'hui reconnu que les plantes constituent une source importante de molécules bioactives.

Ces dernières années, les substances naturelles connaissent un intérêt croissant dans de nombreux domaines. En effet, avec un public de plus en plus réticent à consommer des produits contenant des molécules issus de la synthèse chimique, un certain nombre de secteurs Industriels (cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire) se tournent de nouveau vers l'incorporation de ces molécules d'origine naturelle, aux caractéristiques chimiques et biologiques originales, dans leurs formulations. La valorisation de ces principes actifs d'origine naturelle représente donc un potentiel économique énorme.

Pour être valorisés, les composés bioactifs doivent d'abord être séparés de leur matrice végétale d'origine. L'obtention de ces molécules nécessite de nombreuses étapes souvent longues et coûteuses, telles que l'extraction, l'isolement par des essais bio-guidés et l'identification freinant encore leur développement industriel (**Michel T., 2011**).

En Algérie il en existe 3000 espèces appartenant à différentes familles botaniques dont la famille des astéracées (composées) constitue l'une des plus grandes familles les plus étudiées. Ainsi, les plantes de cette famille ont fait l'objet de nombreuses recherches phytochimique et pharmacologique durant plusieurs années (**Quezel, P. et Santa S., 1963 ; Medjroubi K. *et al.*, 2005 ; Akkal S. *et al.*, 2007**). C'est dans ce contexte que s'inscrit notre



étude ayant comme objectif l'investigation phytochimique et biologique de l'espèce *Jurinea humilis* DC.

Ce travail est axé sur cinq chapitres essentiels :

Le premier chapitre, consacré à l'étude bibliographique de la famille des astéracées, renferme une brève présentation suivie d'une description botanique de cette famille, et du genre *Jurinea*

Dans le deuxième chapitre, nous aborderons une classe importante des métabolites secondaires, Cette étude inclus une bibliographie sur les polyphenols et les flavonoïdes, permettant ainsi leurs définitions, leurs classifications et éventuellement l'illustration de quelques intérêts thérapeutiques.

Le troisième chapitre concerne le stress oxydant, sa définition ainsi qu'une mise au point sur les radicaux libres et les antioxydants dans la nature.

Dans le quatrième chapitre nous exposerons les matériels et les méthodes relatives à nos travaux, dans cette partie nous nous intéresserons aux dosages des polyphenols totaux, des flavonoïdes totaux, de la caractérisation de ces métabolites par chromatographie. Ainsi qu'une présentation des techniques de l'activité antioxydante étudiée.

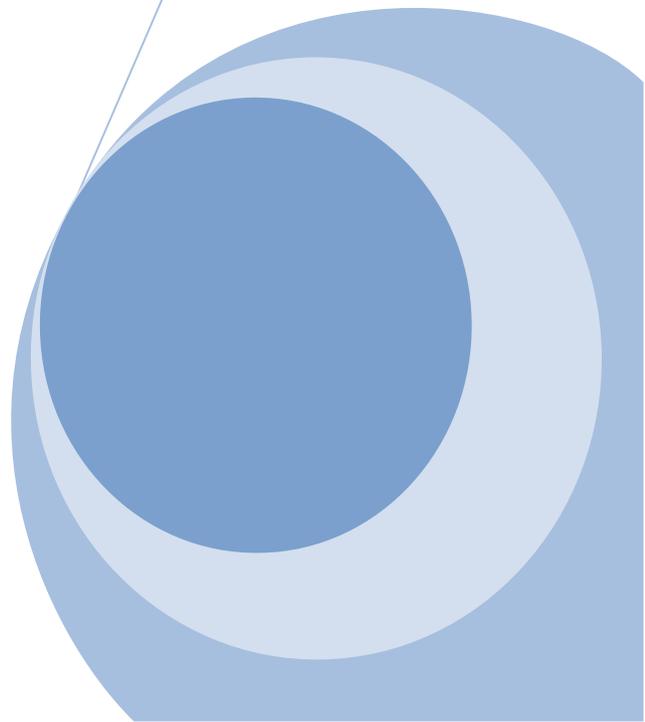
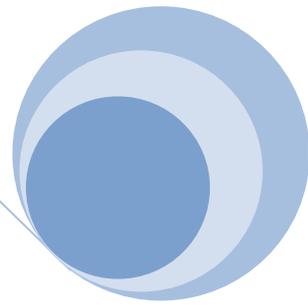
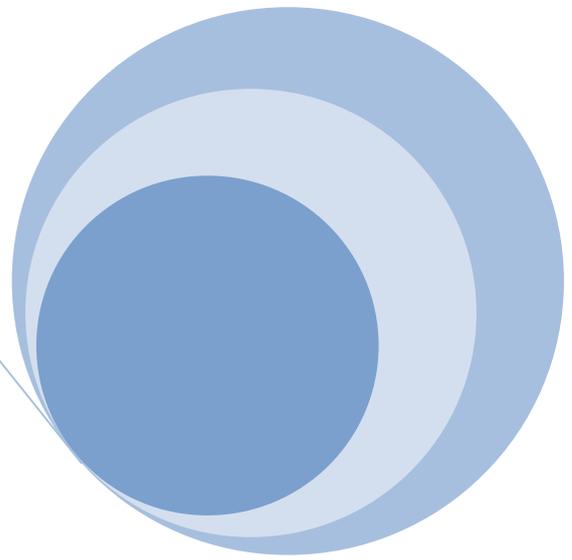
Enfin, le dernier chapitre, sera réservé aux résultats obtenus, aux discussions et interprétations concernant la teneur en composés ciblés et l'activité étudiée. Suivis par une conclusion générale.

Introduction

Références bibliographiques

- Akkal, S., Benayache, F., Medjroubi, K. and Tillequin, F., 2007.** Flavonol glycosides from *Centaurea furfuracea* antiplasmodial and cytotoxic activities. *Chemistry of Natural Compounds* 43(3), 319-320.
- Bernadet, M., 2000.** Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles, *Editions Dangles*.
- Bremness, L., 1998.** Les plantes aromatiques et Médicinales. *Bordas Editions*.
- Medjroubi, K., Benayache, F., Bermejo, J., 2005.** Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*. Antiplasmodial and cytotoxic activities. *Fitoterapia* 76, 744-746.
- Michel, T., 2011.** Thèse de Doctorat, université d'orleans.
- Quezel, P. and Santa, S., 1963.** *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome I et II, C.N.R.S. Paris.
- Sévenet, T., Tortora C., 1994.** Plantes, molécules et médicaments. Nathan, *CNRS Editions.Paris*.

LES ASTERACEES



I.1. Famille des Astéracées : morphologie, date d'introduction et distribution.

La famille des Astéracées (Composées) est la plus vaste famille de la division des spermatophytes, avec plus de 900 genres et au moins 12 000 espèces répandues sur toute la planète. Les composées sont relativement moins abondantes dans l'ancien monde que dans l'Amérique du Nord où elles forment environ un huitième de la flore vasculaire. Elles sont probablement apparues à la fin du Cétacé ou au début de l'Eocène, et le point d'origine paraît être la région andine de l'Amérique du Sud où elles constituent aujourd'hui un quart de la flore vasculaire. Les traits saillants de la distribution géographique de cette immense famille ont une grande portée biologique.

Les tribus des Astérées et des séneçonées sont toutes cosmopolites ou à peu près. Les Cichoriées, les Cynarées et les Anthémidées appartiennent surtout à l'hémisphère nord. Les Calendulées et les Arctotidées sont africaines. Les Vernoniées, les Eupatoriées, les Hélianthées, les Hélieniées et les Mutisiées sont essentiellement américaines. La grande tribu des Inulées appartient surtout à l'ancien monde. Les espèces extra-tropicales communes aux deux hémisphères ne sont guère plus d'une quarantaine (**Moreau F., 1960**).

L'Afrique, l'Australie et l'Amérique occidentale paraissent posséder les représentants les plus anciens du groupe. L'Afrique offre la plus grande variété de témoins isolés des types éteints. L'Amérique andine possède quelques espèces qui se rapprochent du type que l'on peut considérer comme le type primitif de la famille entière.

La majorité des plantes médiévales que nous avons choisies est répartie surtout en Europe, Asie et l'Amérique du Nord. Une distribution géographique sauvage importante de cette famille existe aussi en Turquie, Canada, Inde, Iran et les pays Baltes (**Ivancheva S. et al., 2003**). En Algérie, il en existe 109 genres et 408 espèces (**Quezel F. et Santa S., 1963**).

I.1.1 Description botanique

Le mot « Aster » du grec signifie étoile, en relation avec la forme de la fleur (**Crète P., 1965**). Les Astéracées ont la caractéristique commune d'avoir une inflorescence en capitule, c'est-à-dire une multitude de fleurs sans pédoncule regroupées sur un réceptacle et entourées de bractées florales. Cette structure en forme de coupe ou de collerette est appelé un involucre (**Barkely T.M. et al., 2006**).

Ainsi, contrairement à l'opinion populaire, ce qu'on appelle une « fleur » de tournesol, de marguerite, de pissenlit, ... n'est en réalité pas une fleur mais un capitule de fleurs entouré de bractées blanches ou jaunes.

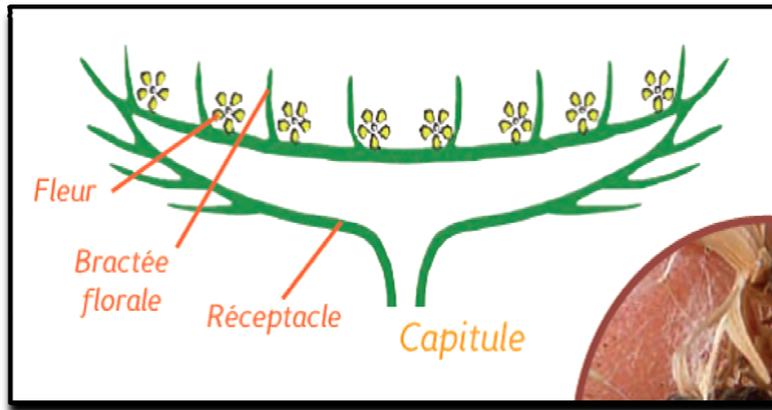


Figure I.1 : Le capitule des Astéracées.

La fleur des Astéracées est très particulière : les étamines sont soudées par leurs anthères déhiscentes vers l'intérieur. Sous les stigmates sont situées des "brosses à pollen".

L'inflorescence est ordinairement un compact de fleurs sessiles tubulées et/ou ligulées soustendu par un involucre de bractées disposées sur un à plusieurs rangs (**figure I.2**). Les bractées peuvent être herbacées, scarieuses ou épineuses. Sur le réceptacle, les bractéoles, si elles sont présentes, peuvent prendre la forme d'écailles, de soies ou de paillettes. Le capitule est entouré à la base généralement par 1 à 6 séries de bractées dont l'ensemble forme l'involucre.

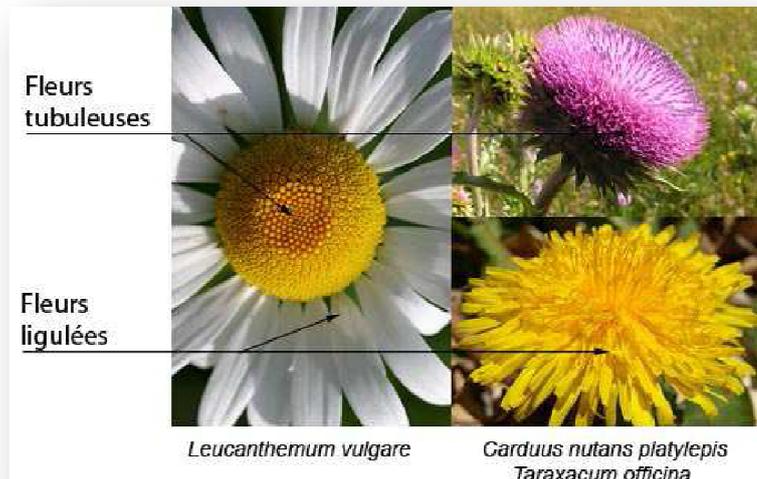


Figure I.2 : Types de fleurs des Astéracées.

Les fruits sont des akènes, souvent couronnés d'une aigrette de soies appelée Pappus (**figure I.3**) qui favorise la dispersion des graines par le vent (Usher G., 1966).

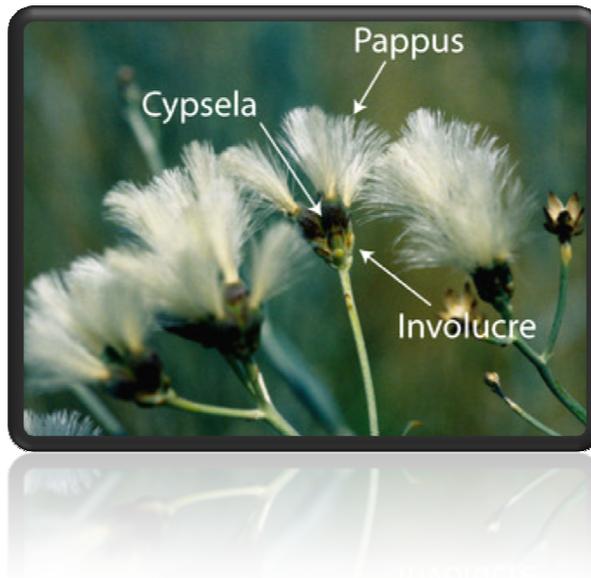


Figure I.3 : Pappus des Astéracées.

Les feuilles sont le plus souvent alternes. Elles peuvent aussi être opposées ou réunies en rosette principale (Pâquerette) (Usher., 1966 ; Gaussen H. *et al.*, 1982).

Pour déterminer la plupart des plantes de cette famille, il est nécessaire de récolter des capitules défleuris, portant des fruits mûrs ou au moins déjà bien formés. L'observation des bractées de l'involucre est également très importante (Boutaghane N., 2013).

I.1.2 Utilisations et intérêts économiques des Astéracées :

De nombreux taxons sont importants économiquement pour l'alimentation: *Cichorium intybus* (la chicorée, le chicon : witloof), *Cynara scolymus* (l'artichaut), *Lactuca* (les laitues), *Scorzonera* et *Tragopogon* (les scorzonères et salsifis)...D'autres le sont comme plantes oléagineuses : *Helianthus annuus*, *Carthamus tinctorius*. De nombreuses espèces des genres *Calendula*, *Aster*, *Chrysanthemum* (s.l.), *Cosmos*, *Echinacea*, *Helianthus*, *Liatris*, *Rudbeckia*, *Tagetes*, ...; sont utilisées à but ornemental.

Notons aussi la présence de certaines substances répulsives chez *Anthemis*, *Chrysanthemum*, *Matricaria*, etc. (pyréthrines, qui ont servi de base à la synthèse d'insecticides non toxiques pour les homéothermes), et de l'inuline (polymère de fructose), utilisée notamment dans l'agro-alimentaire et en médecine, extraite de *Cichorium intybus* ou d'*Helianthus tuberosus*.

Certaines espèces sont très envahissantes en dehors de leur aire naturelle, ce qui entraîne des impacts économiques et écologiques importants dans de nombreuses régions du

monde. On peut citer quelques exotiques envahissantes importantes en Europe : *Ambrosia artemisiifolia* (plante très allergisante, d'origine nord-américaine, très présente dans le couloir rhodanien mais atteignant aujourd'hui la Lorraine), *Helianthus tuberosus* (le topinambour, le long des rivières), *Senecio inaequidens*, (le séneçon du Cap, d'origine sud-africaine et omniprésent en Europe occidentale) (Suzanne A., 2002).

I.2.Présentation du genre *Jurinea*

Le genre *Jurinea* Cass (dédié au naturaliste suisse André Jurine, de Genève, 1780-1804), tribu Cynareae, famille Asteraceae, compte environ 250 espèces de cette famille, ce dernier est très répandu aussi bien sur territoire européen qu'en sud ou est de l'Asie, son central et le bassin méditerranéen (Danin A. et Davis P.H., 1975). En Algérie, il existe une seule espèce dont le nom *Jurinea humilis* DC. (Quezel F. et Santa S., 1963).

Ce genre est caractérisé de la manière suivante : L'involucre, plus long que large, est formé de nombreuses bractées étroites, allongées, aiguës, sans appendice à leur sommet. Chaque anthère porte à la base deux étroits prolongements qui sont fendus chacun à leur extrémité inférieure, Les fruits figurent à peu près un cône renversé ; ils sont à 4 angles bien marqués.

I.2.1 Description botanique de l'espèce *Jurinea humilis* DC.

Jurinea humilis ; Plante vivace à souche courte, ligneuse, acaule ou à tige très courte, feuilles verdâtres en dessus, blanches-tomenteuses en dessous, pennatifides à segments étroits, roulés en dessous par les bords.

Le capitule assez gros, solitaire au centre de la rosette de feuilles, l'involucre subglobuleux à folioles extérieures tomenteuses étroitement lancéolées, courbées en dehors au sommet ou appliquées, les intérieures glabres, scarieuses, acuminées.

Les akènes fortement rugueux, papilleux au sommet, à aigrette blanchâtre 4-5 fois plus longue avec des fleurs purpurines (Quezel F. et Santa S., 1963).



Figure I.4 : Photo de la plante : *Jurinea humilis* DC.
(<http://www.tela-botanica.org>)

I.2.2 Répartition géographique de l'espèce *Jurinea humilis* DC.

Elle est présente beaucoup plus dans l'Algérie, l'Espagne, la France et le Maroc

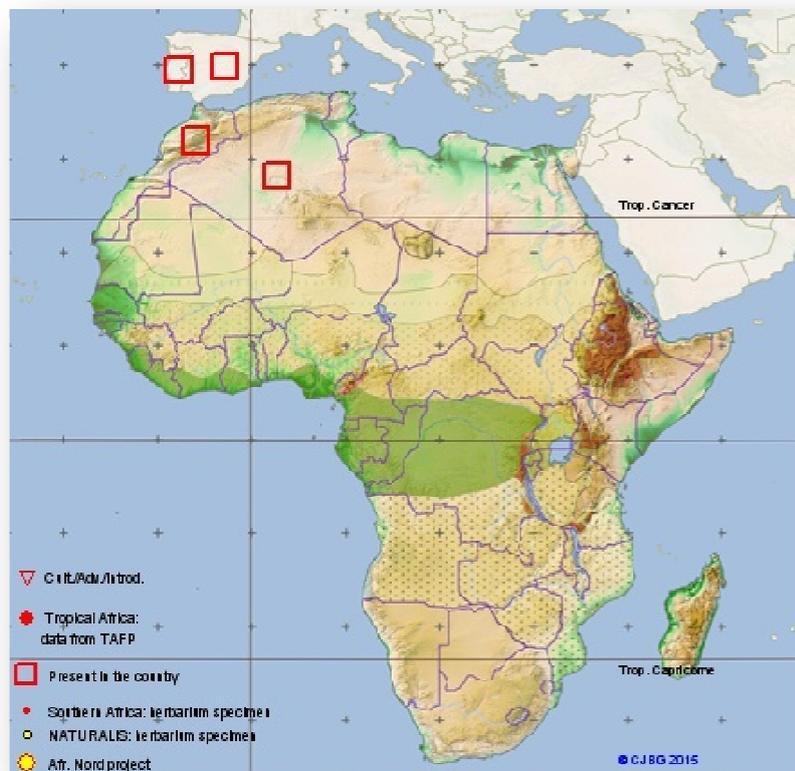


Figure I.5 : Répartition géographique de l'espèce *Jurinea humilis* DC.
(<http://www.tela-botanica.org>)

I.2.3 Place dans la systématique

Règne : Plante

Embranchement : Spermatophytae

Classe : Dicotyledoneae

Ordre : Asterales

Famille : Asteraceae

Genre : *Jurinea*

Espèce : *Jurinea humilis* DC.

I.3.Travaux antérieurs

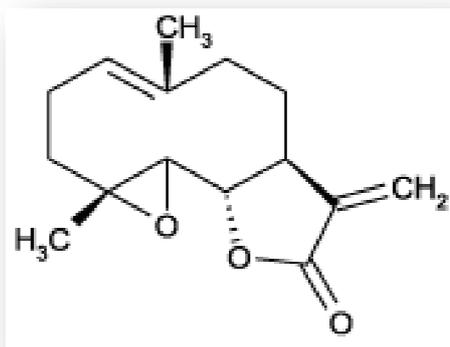
I.3.1 Sur la famille

Dernièrement, un grand intérêt était orienté vers les études chimio systématiques et chimio taxonomiques basées sur les métabolites secondaires présents dans les plantes supérieures; parmi ces études on compte plusieurs renfermant la famille des Astéracées.

En se basant sur les investigations phytochimiques ; différentes espèces appartenant à cette famille, biosynthétisent une variété de substances naturelles (les stéroïdes, les anthocyanes, les alcaloïdes, les flavonoïdes et les sesquiterpènes ...). Mais les sesquiterpènes lactones (STLs), occupent la classe la plus étudiée parmi ces métabolites, et sont considérées comme des marqueurs chimio taxonomiques dans la famille des composées suivie des flavonoïdes (Ayad R., 2013).

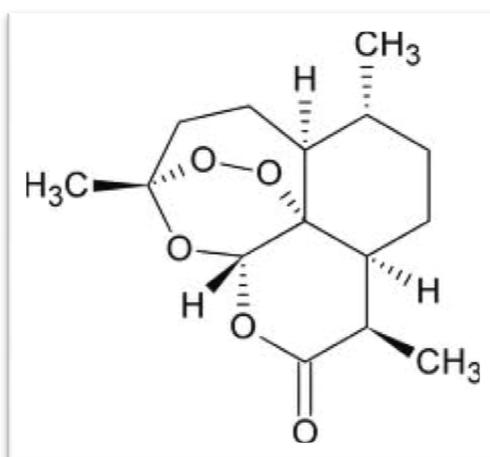
Durant la recherche consacrée aux composés anti-tumoraux isolés des plantes, les lactones sesquiterpéniques prennent une importance croissante notamment grâce à leurs activités sur différents types d'organismes et systèmes. En effet, elles forment un des plus large groupes des composés cytotoxiques et anti-tumoraux d'origine végétale, dont la majorité a été isolé de la famille des « Astéracées ».

à titre d'exemple : le parthénolide (**Structure 1**), une molécule antileishmanienne ; isolée de *Tanacetum parthenium* (L) Schultz-Bip, (ou grande camomille) appartenant à la famille des astéracées, ce principe actif a été décrit comme un inhibiteur de la transcription du facteur NF-Kb (facteur impliqué dans l'activation du processus inflammatoire) qui inactive l'oxyde nitrique synthétase (iNOS). Il peut aussi inhiber la formation d'œdème sur des rats et des souris en inhibant la réponse inflammatoire et montre une propriété antidouleurs (Calixto J. B. et al., 2001 ; Kwok B. H. et al., 2001).



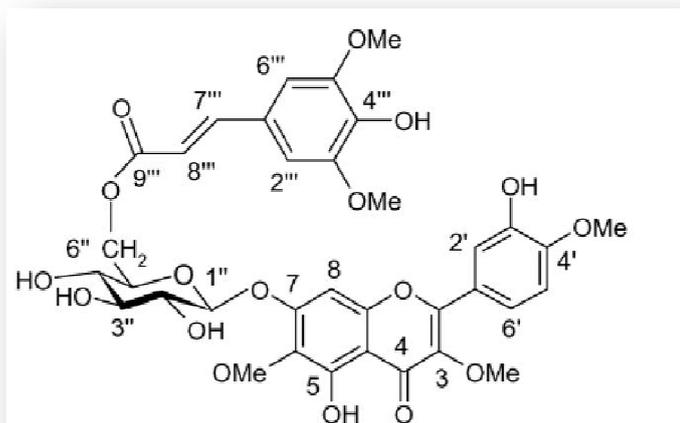
Structure 1

Dans l'autre coté, on trouve l'artémisinine (**Structure 2**), un excellent anti malarique, le principe actif a été isolé d'*Artemisia annua* (Armoise annuelle) appartenant à la même famille (Astéracées) par les scientifiques chinois en 1972, l'artémisinine, une sesquiterpène lactone renfermant un motif d'un peroxyde endo dans leur structure (**Heinrich M. et al., 2004**).



Structure 2

L'algerianine (**Structure 3**), récemment isolé du *Centaurea africana*, toujours de la même famille des astéracées, exerce une activité cytotoxique très importante (**Seghiri R. et al., 2009**).



Structure 3

I.3.2 Sur le genre

Concernant le genre *Jurinea* les études phytochimiques et biologiques sont très limités, ces études révèlent la présence des huiles essentielles, les lactones sesquiterpéniques, les triterpènes pentacycliques, les acides phénoliques et les flavonoïdes (Hülya Ö. *et al.*, 2011).

En dehors de la composition chimique des espèces de ce genre, Pas de recherches pharmacologiques et biologiques sur les espèces *Jurinea* ont été précédemment effectuée, à l'exception de l'activité antimicrobienne de *Jurinea de Bornm.* , l'activité anti oxydante, anti bactérienne et anticholinestérase de *Jurinea consanguinea* DC. (Kirbag S. *et al.*, 2009).

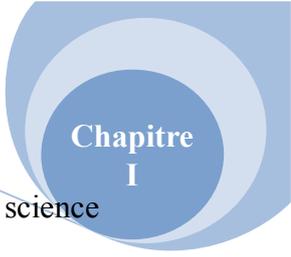
I.3.3 Sur l'espèce

Selon nos connaissances et nos recherches bibliographiques, aucune publication sur la plante *Jurinea humilis* DC.

Références bibliographiques

- Ayad, R., 2013.** Thèse de doctorat. Université de Constantine 1.
- Barkely, T.M., Brouillet, L., Strother, J.L., 2006.** Flora of North America- Asteraceae. 19, 3-69.
- Boutaghane, N., 2013.** These de doctorat. Université de Constantine 1.
- Calixto, J. B., Scheidt, C., Otuki, M., Santos, A. R. S., 2001.** Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. *Expert Opinion on Emerging Drugs* 6, 261-279.
- Crete P.,1965.***Précis de botanique.* Masson, Paris, édition 2, P 429.
- Danin, A. and Davis, P.H., 1975.** Jurinea Cass. In Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.5, Davis PH (ed), University Press: Edinburgh, 439-440 and 442-443.
- Gausson, H., Leroy, F., 1982.** Précis de botanique (Végétaux supérieurs), 2ème édition, 424-426.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E.M., 2004.** *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy.* Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Hülya Ö., Ufuk K., Ciler M., 2011.** Antioxidant, Anticholinesterase and Antibacterial Activities of Jurinea consanguinea DC. *Rec. Nat. Prod.* 43-51.
- Ivancheva, S., Tsvetkova, R., 2003.** "Distribution of flavonoid aglycones in tribe Anthemideae (Asteraceae)." *Advances in Phytochemistry:* 85-95.
- Kirbag, S., Zengin, F., Kursat, M., 2009.** Antimicrobial activities of extracts of some plants, *Pak. J. Bot.* 41, 2067-2070.
- Kwok, B.H., Koh, B., Ndubuisi, M.I., El ofsson, M., Crews, C.M., 2001.** The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb feverfew directly binds to and inhibits IB kinase. *Chem. Biol.* 8, 759-766.
- Moreau, F., 1960.**"Botanique : Procaryotes (cyanophites et bactéries). Eucaryotes (algues, champignons et végétaux supérieurs). La plante dans ses rapports avec le milieu." *Ed. Paris, Gallimard.*
- Quezel, F., Santa, S., 1962-1963.** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol. 1-2. Ed. CNRS, Paris France.
- Seghiri, R., Mekkiou, R., Boumaza O., Benayache, S., Mosset, P., Quintana, J., Estévez, F., León, F., Bermejo, J., Benayache, F., 2009.** A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea Africana*. *Phytochem. Lett.* 2, 114-118.
- Suzanne, A., 2002.** Seed to Seed: Seed Saving and Growing Techniques for Vegetable Gardeners.

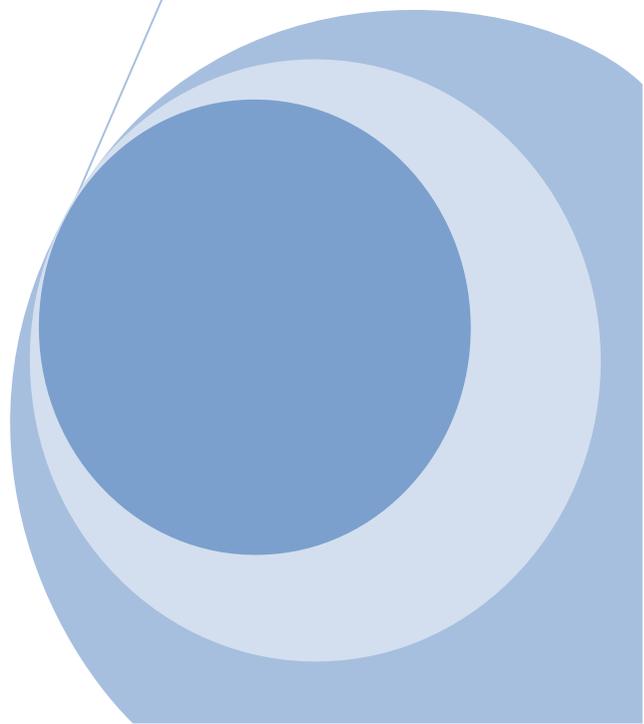
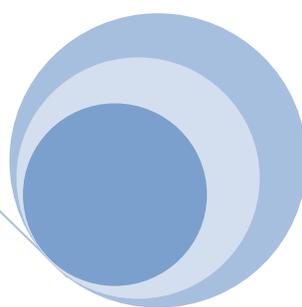
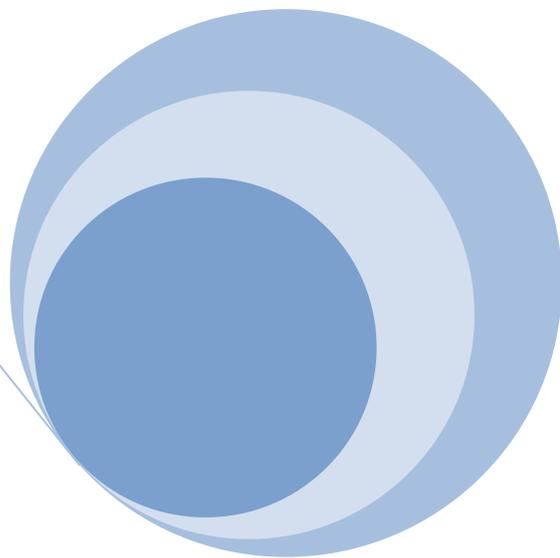
Chapitre I : Les astéracées



Chapitre
I

Usher, G., 1966. A dictionary of botany, including terms used in biochemistry, soil science and statistics constable& Co Ltd, London.

LES FLAVONOÏDES



II. Les polyphénols

II.1. Structure et Classification

Les polyphénols sont quantitativement les plus importants métabolites secondaires des plantes. Ils possèdent une grande variété de structures allant de composés contenant un simple noyau phénolique (acide phénoliques) à des composés polymériques complexes comme les tanins (polymères de catéchine et épicatechine présentant plusieurs dizaines d'unités).

Les polyphénols constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales. Ils sont synthétisés par l'ensemble des végétaux et ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences). Les polyphénols contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) (**Visioli F. *et al.*, 2000**).

Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (**Visioli F. *et al.*, 2000**).

Les polyphénols peuvent se regrouper en deux grands groupes : **Les non flavonoïdes** dont les principaux composés sont : les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les lignines et les coumarines (**Hoffmann D., 2003**). et **les flavonoïdes**, dont on caractérise principalement : les flavones, flavanones, flavonols, iso flavonones, anthocyanines, proanthocyanidines et flavanols (**Pincemail J. *et al.*, 2007**).

II.1.1. Effets biologiques des polyphénols

Ils ont la capacité de moduler l'activité d'un grand nombre d'enzymes et de certains récepteurs cellulaires. En outre, *in vitro*, un grand nombre de polyphénols sont reconnus pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antifongiques, antivirales et anticancéreuses.

Plus de deux cents études ont été réalisées sur l'impact de la consommation de végétaux sur la santé. La plupart ont mis en évidence une baisse du facteur de risque pour de nombreuses affections (infarctus, cancers du poumon, du côlon, de l'estomac, du rein...)

Les polyphénols présentant une activité antioxydante sont de plus en plus étudiés. En effet, l'oxydation est un phénomène largement répandu aussi bien dans le domaine alimentaire (oxydation des lipides) que physiologique (stress oxydant). L'ingestion de polyphénols par l'intermédiaire des fruits et des légumes pourrait permettre à notre organisme de renforcer ses moyens de défense contre les processus d'oxydation qui menacent

quotidiennement nos cellules, même si les mécanismes mis en jeu dépassent sans doute largement la réduction directe des espèces oxygénées réactives par les polyphénols (Muhammad K., 2010).

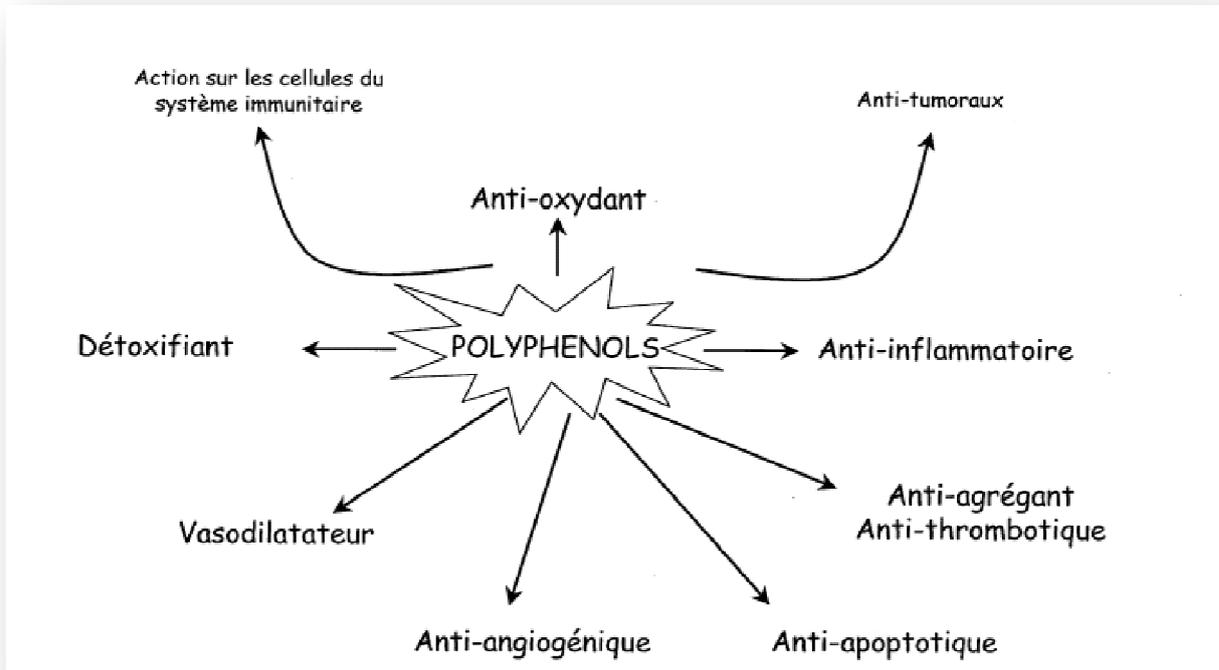


Figure II.1: Effets biologiques des polyphénols (Martin S. et Andriantsitohaina R., 2002).

II.2. Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde provenant du latin « flavus », signifiant « jaune », désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Les flavonoïdes sont à l'origine des tintes brunes, rouge et bleus des fleurs et des fruits. Certaines plantes sont réputées pour leur richesse en flavonoïde : par exemple : le thé, le raisin, les origines, les pommes, le cacao, la grenade, le cassis et les myrtilles ou encore le café). (Seghiri R., 2009).

II.2.1. Définition

L'appellation « flavonoïde » rassemble une très large gamme de composés polyphénoliques formés par un squelette de base à 15 atomes de carbones ces composés

représente le groupe de composé phénolique le plus répandus : plus de 9000 structures naturelles ont été isolées et caractérisées (**Harborne J. B. et Baxter H., 1999**).

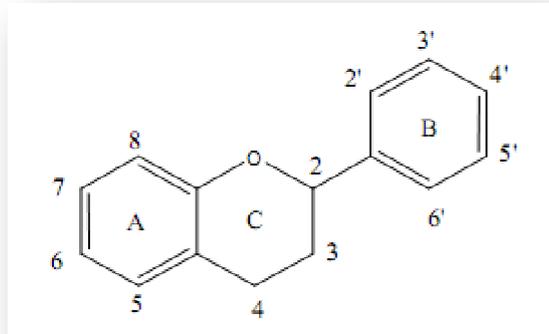


Figure II.2 : Structure de base des flavonoïdes

Ces composés sont réputés pour leur caractère antioxydant, neutralisant les radicaux libres et limitant ainsi certains dommages oxydatifs responsables de maladies. Ils sont donc à l'origine d'effets physiologiques bénéfiques pour l'organisme humain et méritent l'intérêt croissant que la recherche leur porte (**Raskin I. et Ribnicky D., 2002**).

II.2.2. Origine des flavonoïdes

II.2.2.1. Biosynthèse

Les flavonoïdes sont synthétisés au niveau des chloroplastes à partir de cinnamoyl-CoA (provenant du réticulum endoplasmique). Certaines molécules flavoniques quittent les chloroplastes et s'accumulent dans les vacuoles (anthocyanes).

Selon le degré d'oxydation de l'hétérocycle formé en général par condensation avec OH phénolique du noyau A et la chaîne latérale de l'acide cinnamique, on distingue un grand nombre de variétés de flavonoïdes (**Merghem R., 2009**).

Les composé de départ sont la molonyl-CoA et les dérivés -CoA de l'acide cinnamique (cinnamoyl-CoA) : ces derniers se forment avec l'intervention de cinnamoyl-CoA ligase. C'est l'acetyl-CoA carboxylase qui prépare le malonyl- CoA ou trois molécules de cette dernière et la cinnamoyl-CoA produisent à l'aide de la chalcone synthase, la structure de base en C-15, sous forme d'une chalcone soit la 4,2',4',6' tetrahydroxychalcone (**Richter G.,**

1933). Cette chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la biosynthèse des divers flavonoïdes. Elle est en équilibre avec les flavonoïdes.

La chalcone est métabolisée sous l'action de la chalcone isomérase en flavanone : Naringénine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthase ou la (2S)-flavanone-3-hydroxylase pour donner les flavones : apigénine, dihydroflavonol et (2R-3R)-dihydrokaempferol respectivement. Les deux enzymes citées fonctionnent différemment : la première introduit la double liaison entre les carbones 2 et 3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du C3.

Le dihydroflavonol en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4-réductase, se métabolise en flavonol, kaempferol ou en flavan-3,4-diol et leucoantholyanidol respectivement (**Ono E. *et al.*, 2006**).

Les aurones dérivent directement des chalcones;

L'oxydation des flavanones suivi de réarrangement, c'est-à-dire le déplacement d'un groupement aryle de C-2 à C-3 en présence d'enzyme Isoflavone synthase conduit à la formation d'isoflavone ; elle est considérée comme une réaction spécifique pour la biogenèse des isoflavonoïdes (**Kochs G. et Grisebach H., 1986**) où le composé 2-hydroxy isoflavone est considéré comme un intermédiaire (**Stotz G. *et al.*, 1984**).

L'introduction d'une double liaison entre C-2 et C-3 dans les flavanones conduit à la formation des flavones cette réaction est catalysée par deux types d'enzymes différentes:

La flavone synthase I et la flavone synthase II (FNSI et FNSII);

L'hydroxylation des flavanones en position 3 conduit aux dihydroflavonols, cette réaction est catalysée par l'enzyme flavanone 3-hydroxylase;

Le dihydroflavonol est considéré comme un intermédiaire direct pour la synthèse des flavonols et des flavan-3,4-diols. Ce dernier est un intermédiaire biosynthétique dans la formation des proanthocyanidines des anthocyanidines et catéchines (flavanols);

Les flavonols sont formés par l'introduction d'une double liaison entre C-2 et C-3 dans les dihydroflavonols en présence d'enzyme flavonol synthase.

Toutes les étapes de la biosynthèse des flavonoïdes ne sont pas encore clairement élucidées, mais elle constitue l'une des plus élaborées en rapport avec les métabolites secondaires (**Heller W. et Forkmann G., 1986 ; Macheix J. J., 2005**).

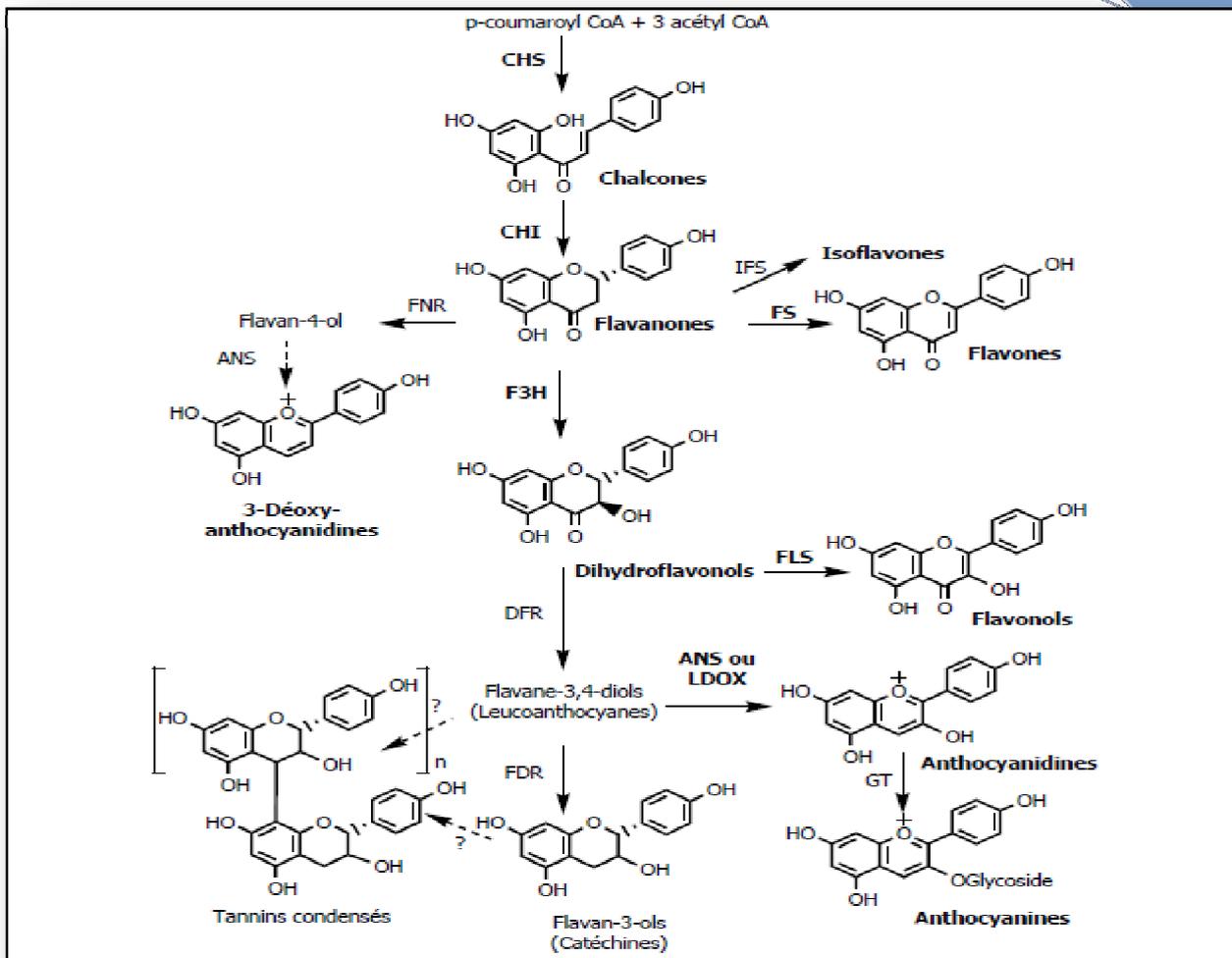


Figure II.3 : Les voies métaboliques intervenant dans la biosynthèse des flavonoïdes.

Tableau II.1 : Molécules impliquées dans la biosynthèse des flavonoïdes

	Enzymes	Intermédiaires synthétisés
2.1	CHS (Chalcone synthase)	Chalcone
2.2	CHI (Chalcone Isomérase)	Flavanone
2.3	FS (Flavone Synthase)	Flavone
2.4	F3H (Flavanone-3-Hydroxylase)	Dihydroflavonol
2.5	FLS (Flavonol Synthase)	Flavonol
2.6	Chaîne enzymatique (FNR, ANS, GT)	Dérivés anthocyaniques

A l'état naturel, les flavonoïdes se trouvent souvent sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycolyses. La partie du flavonoïde autre que le sucre est dite : aglycone.

II.2.2.2. Classification des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et de ce fait possèdent le même élément structural de base. Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, le noyau B relié à l'hétérocycle C dans les positions 2, 3 (**Figure II.4**).

- Dans la position 2 : le flavonoïde est appelé Flavane.
- Si la position 4 de la flavane porte un groupement carbonyle la flavane est appelé Flavanone.
- Si la liaison C2-C3 dans le squelette de la flavanone est insaturée le composé est nommé Flavone.
- Si le squelette est substitué en position 3 par un groupement hydroxyle il est désigné par le nom de Flavonol.
- Dans la position 3 : le flavonoïde est désigné par le terme Isoflavane (**Bouakaz I., 2006**).

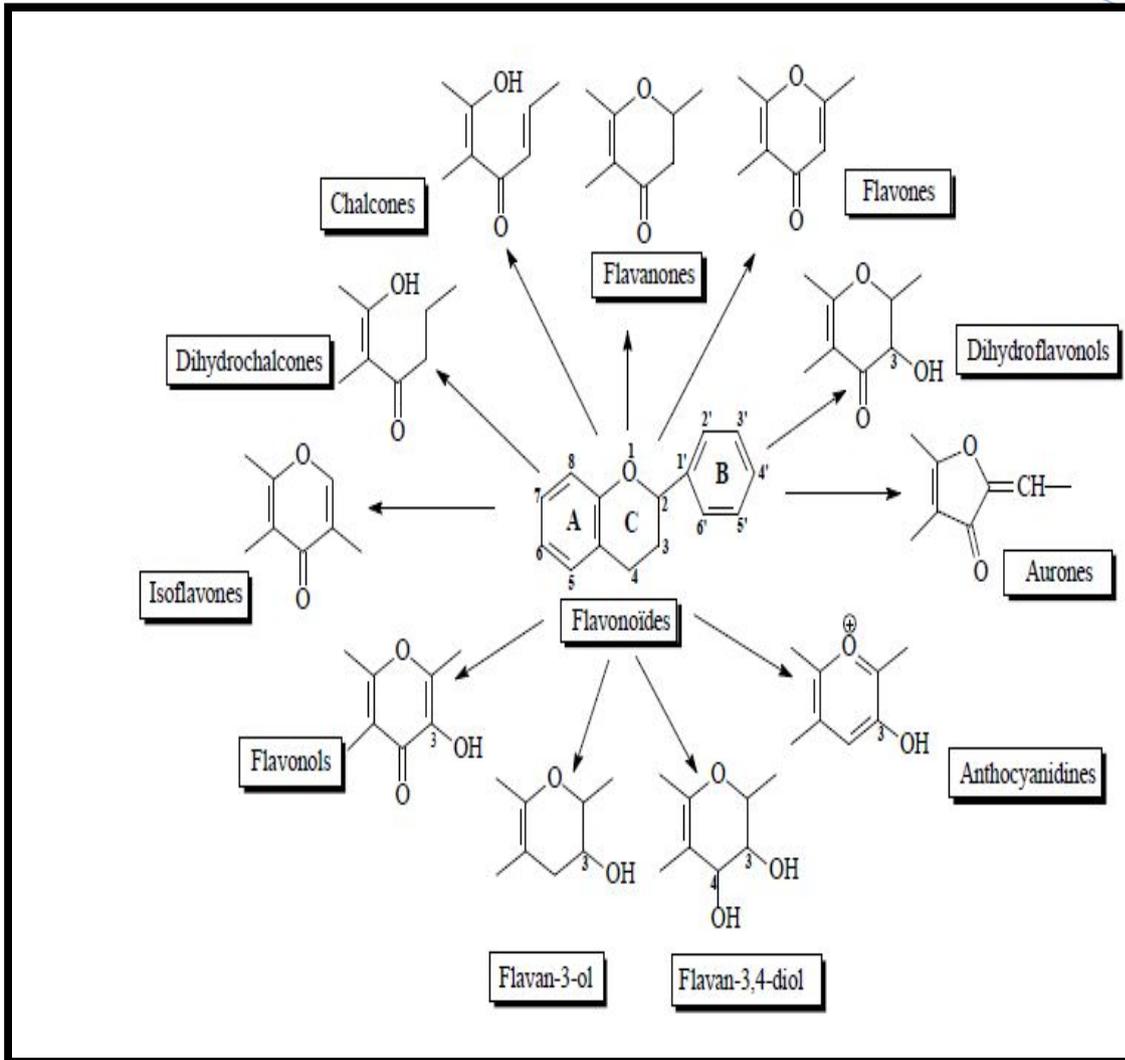
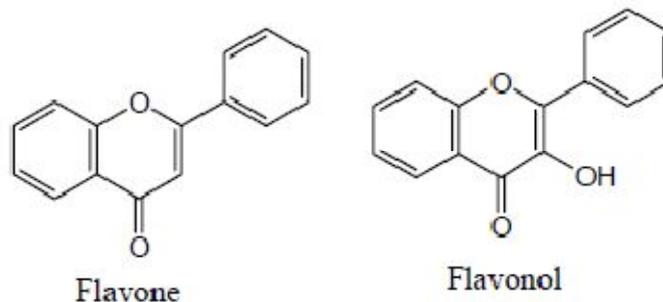


Figure II.4 : Représentation des principales classes et sous-groupes des flavonoïdes au niveau de l'hétérocycle C.

Flavone et flavonols

Le cycle A de ces deux types de molécules est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C5 et en C7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou estérifiés. D'autre part, le cycle B est substitué en C4' ou di-substitué en C3' et C4' par des groupements OH ou méthoxyles OCH₃.

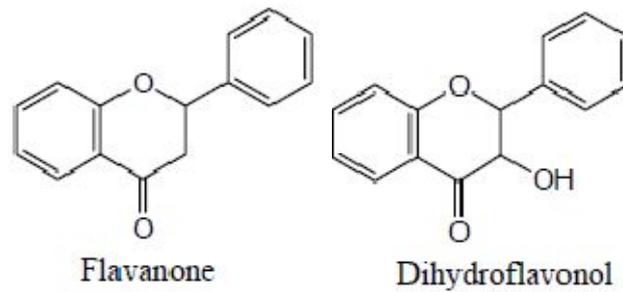
Les flavonols se distinguent des flavones par un OH en C3 (**Morreel K. et al., 2006**).



✚ Flavanones et hydroflavonols

Les flavanones et les dihydroflavonols sont caractérisés par l'absence de la double liaison C2 -C3 et par la présence de centres d'asymétrie. Les variations structurales sont ici de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols.

Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C3 (**Ono E. et al., 2006**).

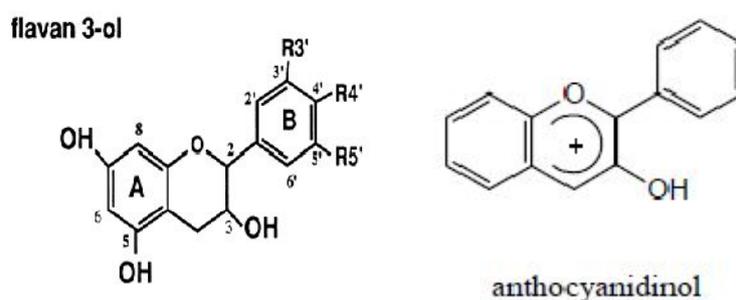


✚ Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols et anthocyanidols

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C4. Cette position peut être libre (flavan-3-ols et anthocyanidols) ou hydroxylée (flavan-3,4-diols).

Les anthocyanosides sont caractérisées par l'engagement de l'OH en C3 dans une liaison hétérosidique. On trouve parmi ces composés, le palargonidol-3,4-O-glucoside et le cyanidol-3-O-rutinoside ou keracyanine (**Bruneton J., 1999**).

Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés (**Bruneton J., 1999**).

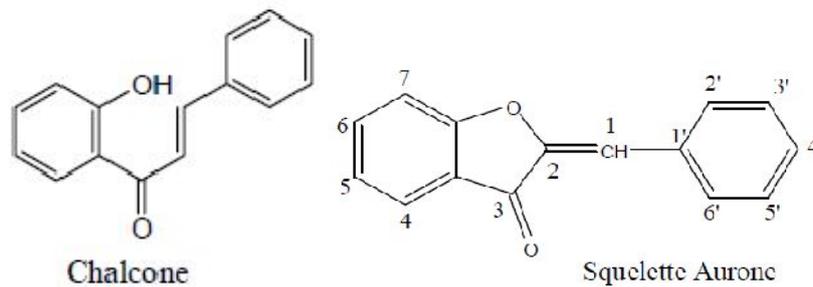


✚ Chalcones et aurones

Les chalcones sont différents des autres types de flavonoïdes cités au-dessus :

Les chalcones ont leur noyau pyranique central ouvert et sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique et insaturée. Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes. Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumarone (**Bruneton J., 1999 ; Ono E. et al., 2006**).

Néanmoins, selon d'autres auteurs que la classification des flavonoïdes inclue aussi le groupe des anthocyanes. Ceci en raison de la grande similitude structurale de ces derniers avec les flavonoïdes ; et plus précisément avec les anthocyanidols (**Sarni-Manchado P. et Cheynier V., 2006**).



II.3. Activités biologiques des flavonoïdes

De nos jours, les propriétés thérapeutiques des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités biologiques et pharmaceutiques.

Ils sont notamment : anti-allergiques, anti-inflammatoires, antihypertenseurs, anti-influenzas, antifongiques, antivirales, anti-ulcéreux, antiradicalaires, et on leur reconnaît également une activité anti-malaria.

Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase. Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques (**Seghiri R., 2009**).

II.4. Activité anti-oxydante

Dans les années 30 Les flavonoïdes ont été découverts par Albert Szent-Györgyi, lauréat prix Nobel, en tant que des composés avec l'activité anti-oxydante prononcée (**Hodek P. et al., 2002**).

Les flavonoïdes expriment les propriétés anti-oxydantes par : Le piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (ERO), La suppression de la formation des ERO par

l'inhibition de quelques enzymes ou par chélation des ions métalliques, impliqués dans leur production, La protection des systèmes de défense antioxydants de l'organisme (**Boudiaf K., 2006**).

II.4.1. Propriétés pro-oxydantes

Certains flavonoïdes pourraient accélérer la survenue de l'atteinte oxydative de l'ADN, des protéines et des glucides in vitro. Alors, le potentiel pro-oxydant de ces composés ne doit pas être négligé dans le mécanisme d'action des flavonoïdes (**Athamena S., 2009**).

II.4.2. Relations structure – réactivité

La preuve des effets protecteurs des anti-oxydants est fondée sur diverses études. Il a été montré que les flavonoïdes agissent comme des fixateurs de plusieurs espèces oxydantes telque l'anion peroxyde (O_2^-), le radical hydroxyle ou les radicaux peroxydes.

Les données de la littérature montrent une mise en évidence de certaines relations entre la structure chimique du flavonoïde et l'activité antioxydante :

- ❖ La présence du groupe hydroxyle 3-OH lié à la double liaison C2=C3, et son emplacement adjacent au groupement carbonyle de l'hétérocycle (C) en position C4 est exigé pour la grande efficacité de l'activité antioxydante (**Cook N. C. et Samman S., 1996**). Cette activité atteint son maximum quand le noyau B est substitué par un système orthodiphénolique.
- ❖ La O-méthylation des substituants hydroxyles du squelette flavonique réduit l'activité antioxydante des flavonoïdes (**Yokozawa T. et al., 1998 ; Cao G. et al., 1997**).
- ❖ Les groupements hydroxyles en position 3, 5, 7, 3', 4' participent dans l'inhibition de la peroxydation lipidique (**Shahidi F. et Wanasundara P. K., 1996**).
- ❖ La capacité antioxydante des flavonoïdes revient à leur aptitude à former des chélates métal-ion, par l'ensemble (3-hydroxy, 4-oxo) ou (5-hydroxy, 4-oxo) (**Kitta K. et al., 1992**).
- ❖ Les groupes hydroxyles 5-OH, 7-OH, et la double liaison C2=C3 qui sont des sites potentiels de réactivité, sont essentiels pour l'activité inhibitrice des flavonoïdes de l'enzyme Xanthine oxydase et du radical peroxyde produit par cette dernière (**Cos P. et al., 1998**).

Un type particulier de flavonoïdes, les isoflavones (2), suscite beaucoup l'intérêt des chercheurs :

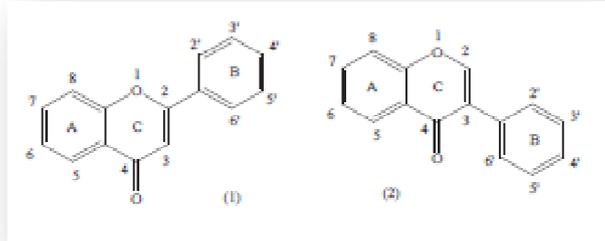


Figure II.5 : Structure de base d'une flavone (1) et d'une isoflavone (2).

En effet, les activités biologiques diverses de la génistéine (4', 5, 7- trihydroxyisoflavone) ont fait l'objet de nombreuses études publiées durant les dix dernières années.

La majorité de ces études ont porté sur les activités pharmacologiques de la génistéine comme inhibiteur de tyrosine kinase, sur ses activités chimiopréventives contre le cancer et les maladies cardiovasculaires et essentiellement sur son activité phytoestrogénique (**Gordon H. M., 1998**).

Les recherches ont prouvés que l'augmentation du nombre de groupements hydroxyles (-OH) sur le noyau A ou B provoque une augmentation dans l'activité anticancéreuse, la double liaison C2-C3 est nécessaire pour activer cette effet (**Harborn J. B., 1998**).

Références bibliographiques

- Athamena, S., 2009.** Mémoire de magister. Universités El-Hadjar Lakhdar-Batna.
- Bouakaz, I., 2006.** Mémoire de magister. Université El Hadj Lakhdar de Batna.
- Boudiaf, K., 2006.** Etude des effets anti-xanthine oxydoreductase et anti-radicalaires des extraits des graines de *Nigella sativa*. Mémoire de magister .Sétif.
- Bruneton, J., 1999.** Les tanins. Ed. Editions médicales internationales, Paris, 369-404.
- Bruneton, J., 1999.** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. *Edition Technique et documentation*, p233.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., 1997.** *Free Radic. Biol. Med.*, Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, (22), 749-760.
- Chaudhry, P.S., Cabrera, J., Juliani, H.R., Varma, S.D., 1983.** Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem Pharmacol.*, 32, 1995-1998.
- Colette, N., Bernier, J.L., Henichart, J.P., Catteau, J.P., Gaydou, E.M., Wallt, J.C., 1992.** Scavenger and antioxydant properties of ten synthetic Flavones. *Free Radical Biology and Medicine*. 13, pp. 211-219.
- Cook, N.C., Samman, S., J. 1996.** *Nutr. Biochem.*, Flavonoids-chemistry, Metabolism, cardioprotectives effects and dietary sources, (7), 66-76.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Poel, B.V., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Berphe, D.V., J. Nat. Prod., 1998.** Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide scavengers, (61), 71-76.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capasso, F., 1999.** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Review. Life Sci.*, 65: 337-53.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capasso, F., 1999.** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Review. Life Sci.*, 65: 337-53.
- Eibi, G., Wagner, H., 1991.** A new method for the in *Vivo* Screening of inhibitors of Angiotensin converting Enzyme (ACE), Using the chromophore Labeled Substrate Dansyltriglycine, *Planta Medica*. 57, pp. 137-141.
- Elsohly, H.N., Joshi, A.S., Nimrod, A.C., Walker, L.A., Clark, A.M., 2001.** Antifungal Chalcones from *Maclura tinctoria*, *Planta Med.*, 67, 87-89.
- Emin, J.A., Oliveira, A.B., Lapa, A.J., 1994.** Pharmacological Evaluation of the anti-Inflammatory activity of Citrus Bioflavonoids, Hesperidin, and the isoflavonoids, Durtin and Claussequinone in rats and mice, *J. Pharm. Pharmacol.*, 46, pp. 118-122.

González, A.G., Rodriguez., Pérez, E. M., Padrôn, C. H., and Bermejo, J., 1997. Phytochemical Investigation of Canary Island lichens. *Virtual activity, and Pharmacology*, : 49-60.

Gordon, H.M., 1996 *Nat. Prod.Rep.*, Dietary Antioxydants in Disease Prevention, (13) 265-273.

Gordon, H.M., 1996. Dietary Antioxydants in Disease Prevention. *Natural Product Reports*, pp. 265-273.

Gutteridg, J.M.L., Halliwell, B., 1994. Antioxidants in nutrition, Health and Disease. Oxford University Press. Oxford. Hall, London.

Harborn, J. B., 1988. *The flavonoïds: advances in research since 1980*, Chapman and Hall, London.

Harborne, J. B., 1994. The flavonoids. Advances in research since 1986 ; Chapman & Hall : London, Harborne, J. B. ; The flavonoids. Advances in research since 1980 ; Chapman & Hall : London, 1988. Harborne, J. B. ; Mabry T. J. ; Advances in flavonoid research, 1975-1980 ; Chapman & Hall : London, 1982.

Harborne, J. B., Baxter, H., 1999. The handbook of natural flavonoids, John Wiley & Sons : Chichester.

Harborne, J. B., Mabry, T. J., 1975. The flavonoids ; Chapman & Hall : London.

Heller, W., Forkmann, G.,1994. The flavonoids. Advances in research since 1986 ; Chapman & Hall : London, Harborne, J. B. ; Secondary Plant Products. Encyclopedia of plant physiology, Springer-Verlag : Berlin, 1980, pp 329-402.

Heller,W., Forkmann,G., 1993. The flavonoids. Advances in research since 1986. In Harborne JB.Secondary Plant Products. Encyclopedia of plant physiology. Ed. Chapman & Hall, London, 399-425.

Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M., 2002. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biol Intera*, 139: 1-7.

Hoffmann, D., 2003. Medical Herbalism : The Science and Practice of Herbal Medicine. *Edition Inner Traditions / Bear & Co.*, p 90.

Kim, H.K., Jeon, W.K., Ko, B.S., 2001. Flavanone Gglycoside from *Citrus junos* and their Anti-influenza Virus Activity, *Planta Med.*, 67, 548-549.

Kitta, K., Hagiwara, Y., Shilamoto, T., 1992. *Agric. Food.Chem.*, Antioxidative Activity of an Isoflavonoid, 2''-O-Glycosylisovitexin Isolated from Green barley leaves, (40), 1843-1845.

Kochs, G., Grisebach, H., 1986. *Eur. J. Biochem.*, 155, 311.

- Macheix, J. J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux ; Presses polytechniques et universitaires romandes : Lausanne; pp 39-54.
- Martin, S., Andriantsitohaina, R., 2002.** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. **51**: 304-315.
- Merghem, R. 2009.** Eléments de Biochimie Végétale, P.118.
- Morreel, K., Goeminne, G., Storme, V., Sterck, L., Ralph, J., Coppieters, W., Breyne, P., Steenackers, M., Georges, M., Messens, E., Boerjan, W., 2006.** Genetical metabolomics of flavonoid biosynthesis in *Populus*: a case study. *Plant J.* 2006, **47**: 224-37.
- Muhammad K. K., 2010.** Polyphénols d'Agrumes (flavanones) : extraction de glycosides de la peau d'orange, synthèse de métabolites chez l'homme (glucuronides) et étude physico-chimique de leur interaction avec le sérum albumine, these de doctorat, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. Académie d'Aix-Marseille.
- Murakami, N., Mostaqul, H.M., Tamura, S., Itagak, S., Horii, T., 2001.** A New anti-malarial flavonol glycoside from *Hydrangeae dulcis Folium (Hydrangea macrophylla)* *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 2445-2447.
- Nakujima, T., Manishi, M.I., Yamamoto, K., Cyong, J.C., Hirai, K., 2001.** Inhibitory effects of Baicalein, A Flavonoid in *Scutellaria* Root, On Eotaxin Production by human Dermal Fibroblasts, *Planta Med.*, **67**, pp. 132-135.
- Ong, K.C., Khoo, H.E., 2000.** Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life SCI.*, **67**, 1695-1705.
- Ong, K.C., Khoo, H.E., Biological Effects of Myricetin. General Pharmacol. 1997.** **29**, 121-126.
- Ono, E., Hatayama, M., Isono, Y, Sato, T., Watanabe, R., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-MizutanOi, M., Tanaka, Y., Kusumi, T., Nishino, T., Nakayama, T., 2006.** Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *Plant J.* 2006, **45**: 133-43.
- Ono, E., Hatayama, M., Isono, Y., Sato, T., Watanabe, R., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, M., Tanaka, Y., Kusumi, T., Nishino, T., Nakayama, T., 2006.** Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *Plant J.* **45**: 133-43.
- Pincemail, J., Degruene, F., Voussure, S., Malherbe, C., Paquot, N., Defraigne, J.O., 2007.** Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme* **21**, 66–75.

Raskin, I., Ribnicky, D., Komarnytsky, S. ., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., Moreno, D., Ripoll, C., Yaboki, N., O'Neal, J., Cornwell, T., Pastor, I., Fridlender, B., 2002. Trends Biotechnol., 20, pp 522-531.

Richter, G., 1933. Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie, P.333.

Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire, Ed. Lavoisier (Tec &Doc), Paris, 300-398.

Seghiri, R., 2009. Thèse de doctorat. Université de Constantine 1.

Shahat, A.A., Cos, P., Bruyne, T.D., Apers, S., Hammouda, F.M., Ismail, S.I., Azzam, S., Claeys, M., Goovaerts, E., Pieters, L., Berghe, D.V., Vlietinck, A.J., 2002. Antiviral and Antioxidant activity of Flavonoids and Proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*, *Planta Med.*, 68, 539-541.

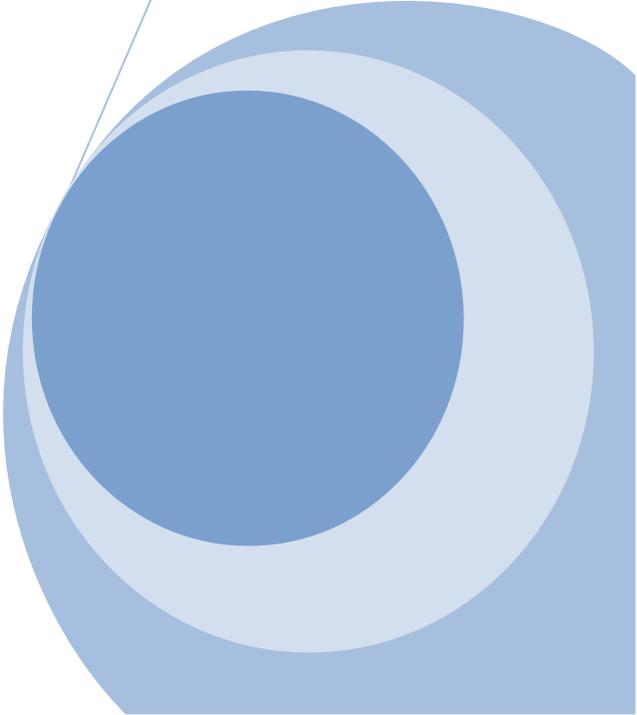
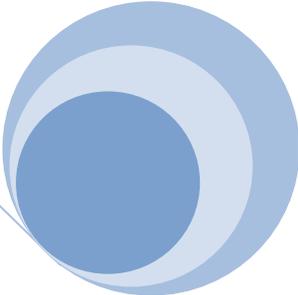
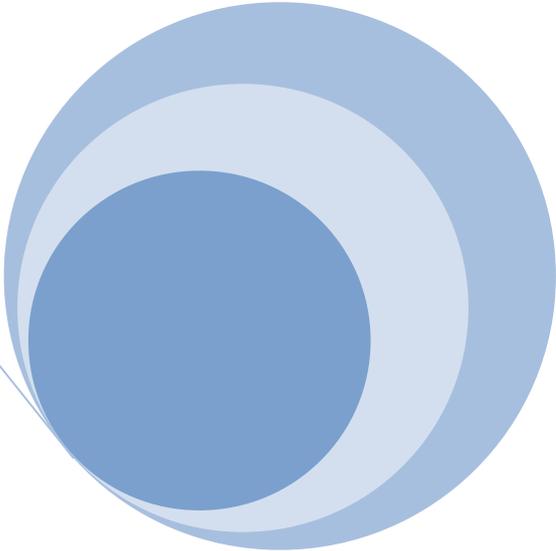
Shahidi, F., Wanasundara, P.K., 1992. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, Phenolic antioxidants, (32), 67-103.

Stotz, G., Spribille, R., Forkmann, G.J. 1984. *Plant Physiol.*, 116, 173.

Visioli, F., Borsani, L., Galli, C., 2000. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of Phytochemicals. *Cardiovascular Research* 47, 419–425.

Yokozawa, T., Chen, C.P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.I., Nishioka, I., Biochem. 1998. *Pharmacol.* Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, (56), 213-222.

STRESS OXYDANT



III.1. Définition de stress oxydant

Des molécules prooxydantes appelées radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites quotidiennement dans l'organisme. Ces dernières sont cependant contrôlées par les antioxydants. Un stress oxydatif survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres (**figure III.1**). Toute fois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant/antioxydant (**Christophe P. *et al.*, 2011 ; PapazianL., 2008**).

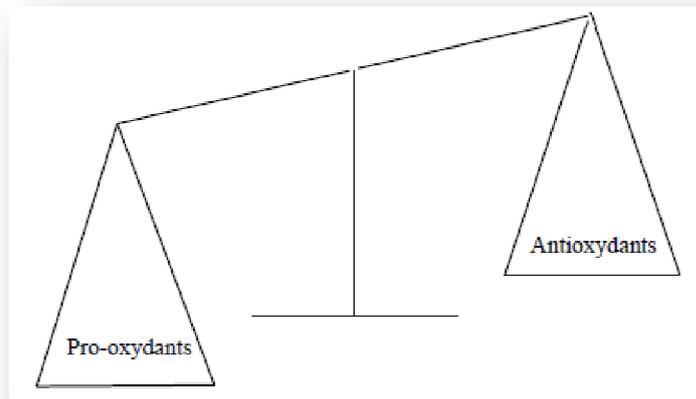


Figure III.1 : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants.

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telle que l'exposition aux radiations ionisantes (exposition importante au soleil, radioactivité artificielle ou naturelle), la pollution, le contact avec certains pesticides et solvants, la consommation de tabac et d'alcool, la prise de certains médicaments, la pratique du sport intensif et tout processus susceptible de surcharger les réactions de détoxication hépatique, notamment une perte de poids importante (**Poirier J., 2004 ; Massy Z., 2006 ; Chatard J., 2003 ; Médart J., 2009**).

III.2. Qu'est-ce qu'un radical libre ?

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réappairer, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne.

Ils sont produits dans notre organisme sous l'action de radiations ionisantes, de rayons UV, ou au cours des réactions enzymatiques. Ce mécanisme peut mener à un désordre dans les structures moléculaires, en oxydant les lipides membranaires, les protéines cellulaires, les

acides nucléiques, provoquant ainsi la mort cellulaire avant d'être neutralisés (**Marfak A., 2003**).

III.3. Qu'est-ce qu'un antioxydant

Les antioxydants sont des molécules qui, lorsqu'elles sont présentes à faible concentration par rapport au substrat oxydable, retardent ou stoppent le processus d'oxydation, et ainsi régulent l'équilibre redox cellulaire (**Aruoma O. L., 1996**).

Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles. Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires (**Cano N. et al., 2006**).

III.3.1. Antioxydants enzymatiques

Pour faire face à ces attaques, les organismes ont développé des systèmes d'action antioxydante qui visent :

- A éliminer les espèces réactives de l'oxygène et les catalyseurs de leur formation.
- A induire la synthèse des antioxydants.
- A augmenter l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées.

III.3.2. Antioxydants non enzymatiques (naturels)

Ce sont des antioxydants naturels capables de prévenir les dommages oxydatifs. Ils peuvent se comporter comme des piègeurs des radicaux libres par les interventions directes sur les molécules prooxydantes ou indirectement, en chélatant les métaux de transition, empêchant ainsi la réaction de Fenton. Ce type d'antioxydants regroupe un grand nombre de substances hydrophiles ou lipophiles et ils sont en partie produits par l'organisme au cours de processus biosynthétiques. Néanmoins le nombre d'antioxydants produits *in vivo* est très limité ; on peut citer parmi les plus actifs : le glutathion (**Piquet M. A. et al., 2007**), le NADPH, les dipeptides (**Boldyrev A., 1993**), l'acide urique (**Ames B. N. et al., 1993**), l'acide lipoïque (**Packer L. et al., 2001**) ou la bilirubine (**Stocker R. et al., 1987**).

Le taux de ce système de défense dans l'organisme est essentiellement assuré par un apport alimentaire. Parmi les antioxydants naturels de faible poids moléculaire, on peut citer les plus connus et les plus importants ci-dessous :

III.3.2.1. Acide ascorbique (vitamine C)

La vitamine C est nécessaire pour de nombreuses fonctions physiologiques de la biologie humaine. La plupart des plantes et des animaux peuvent synthétiser l'acide ascorbique sauf les singes et les humains en raison du manque de l'enzyme gulonolactone oxydase (Naidu K. A., 2003).

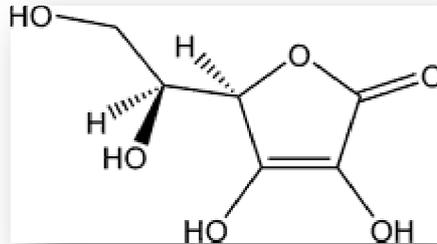


Figure III.2 : Structure de l'acide ascorbique

Après ingestion, elle passe rapidement dans le sang puis diffuse de façon variable dans tous les tissus. Un apport quotidien minimal d'origine alimentaire est donc nécessaire, celui-ci provient essentiellement des fruits et légumes frais (Fain O., 2004).

III.3.2.2. Tocophérols (dont la vitamine E)

Les tocophérols sont des composés liposoluble, ils regroupent quatre substance dont l'alpha-tocophérol aussi appelé Vitamine E est l'antioxydant majeur, la plus active biologiquement (Wang X. *et al.*, 2006).

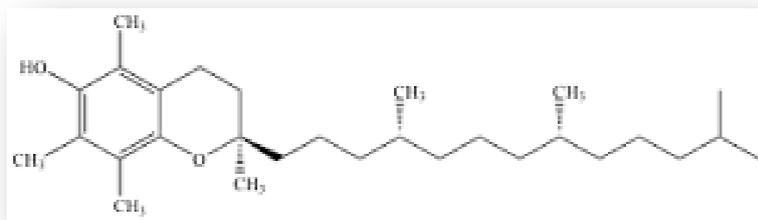


Figure III.3 : Structure de la vitamine E (l'alpha tocophérol).

L' α -tocophérol a été largement étudiée comme complément alimentaire potentiellement préventive dans les maladies cardiovasculaires. Il joue un rôle dans l'atténuation du stress oxydatif, dans les symptômes des maladies neurodégénératives, et en particulier dans la maladie d'Alzheimer qui a récemment reçu un grand intérêt. En

conséquence, il entrave l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales, l'agrégation des plaquettes et la formation consécutive des plaques d'athérome (Annhazi A. *et al.*, 2007).

III.3.2.3. Caroténoïdes

Les caroténoïdes, sont des pigments fabriqués par les végétaux. Les plus importants sont le bêta-carotène, l'alpha-carotène, la lutéine, la zéaxanthine et le lycopène. Ce sont eux qui donnent aux fruits et légumes des couleurs orange, rouge et jaune. Leur fonction essentielle est de protéger les plantes. La plupart des caroténoïdes ont une propriété antioxydante (Causse C., 2005).

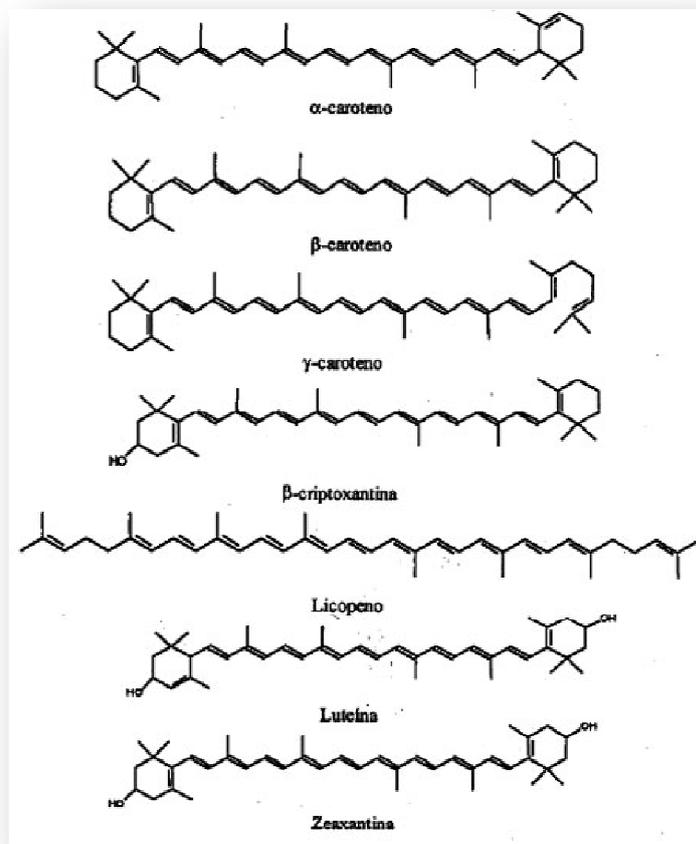


Figure III.4 : Structure des caroténoïdes.

Comme ils le font pour les plantes, ils ont des effets bénéfiques sur notre santé (Rodriguez B., 2004). Ce sont d'excellents piègeurs d'espèces radicalaires particulièrement vis-à-vis de la lipoperoxydation des phospholipides membranaires grâce à leurs structures (Packer E. *et al.*, 1981).

III.3.3. Antioxydants de synthèse

Il existe de nombreux antioxydants synthétiques dont les squelettes sont souvent dérivés des antioxydants naturels (Lee et al., 2009). Parmi les polyphénols de synthèse, on peut citer à titre d'exemple : la 3,3', 5,5'-Tetra-*t*-butyl-biphenyl-4,4'-diol (BHT) qui a montré un effet protecteur des cellules neuronales (Duong H. *et al.*, 2008).

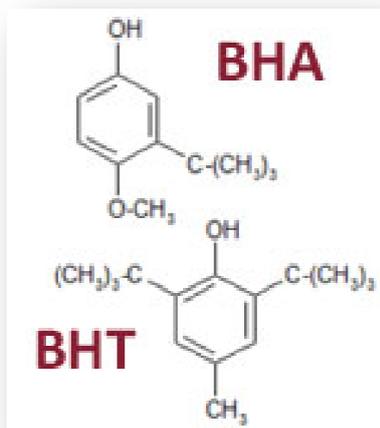


Figure III.5 : Structure de BHT.

Et le polyphénol dendrimère de synthèse syringaldehyde qui a montré une activité antioxydante puissante selon le test du DPPH qui a été respectivement deux fois et 10 fois plus fort que la quercétine et trolox. Ce polyphénol de synthèse a montré aussi un effet protecteur des LDL humain contre les attaques des radicaux libres (Lee Y. *et al.*, 2009).

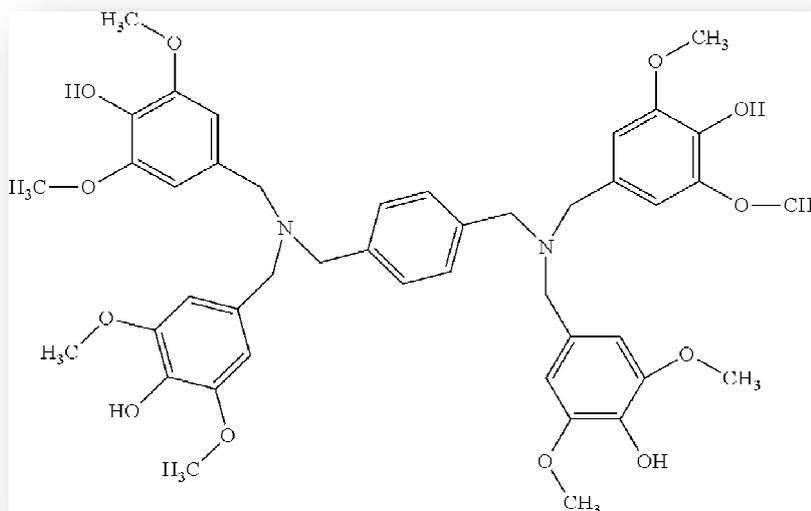


Figure III.6 : Structure de dendrimère de synthèse syringaldehyde.

III.4. Polyphénols naturels comme antioxydants

Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. Leurs structures leur confèrent une activité antioxydante aussi importante. Les groupes hydroxyle des polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogènes ; ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactifs de l'azote, enfin de réaction, le cycle de génération de nouveaux radicaux est interrompu. Suite à l'interaction avec les espèces réactives initiales, la forme radicalaire de l'antioxydant est produite, ayant une plus grande stabilité chimique que le radical initial. L'interaction des groupes hydroxyle de composés phénoliques avec les électrons π du noyau benzénique donne aux molécules des propriétés particulières, le plus notamment la capacité à générer des radicaux libres, où le radical est stabilisé par la délocalisation. Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est également attribué à leur capacité à chélater les métaux ioniques impliqués dans la production de radicaux libres. Cependant, les composés phénoliques peuvent agir comme des prooxydants (**Laughton M. J. *et al.*, 1989 ; Halliwell B., 2008**).

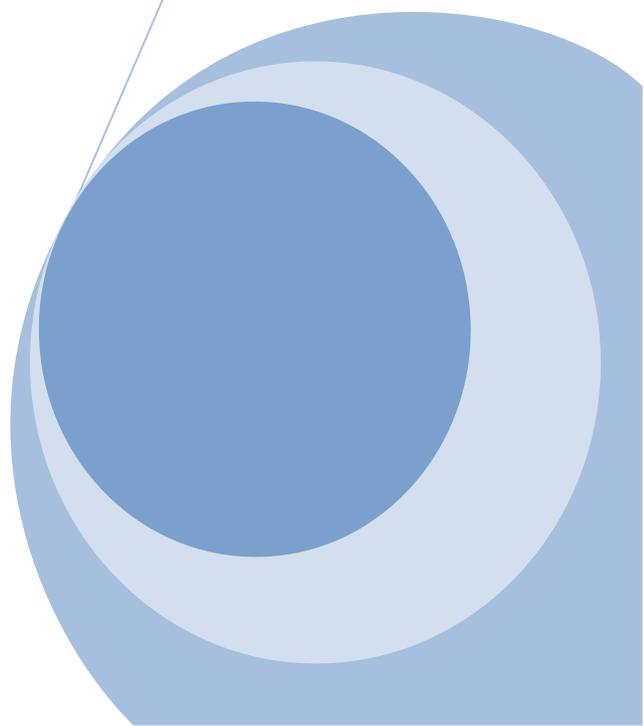
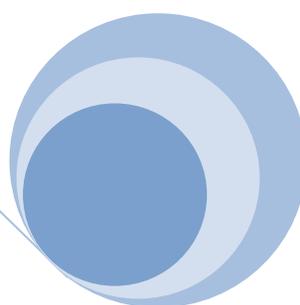
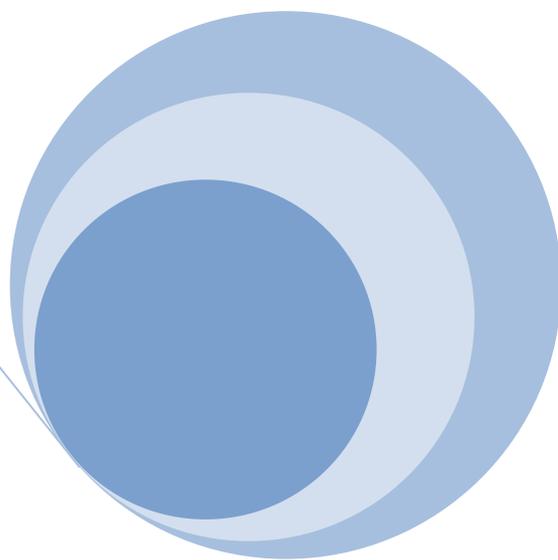
- Les polyphénols peuvent agir selon divers mécanismes (**Handique G. et Baruah B., 2002 ; Rolo A. *et al.*, 2009 ; Chebil L., 2006**) :
- Inhibition enzymatique ;
- Chélation des ions métalliques;
- Piégeage des radicaux libres

Références bibliographiques

- Ames, B. N., Shigenaga, K. & Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7915-7922.
- Annaházi, A., Mracskó, E., Süle, Z., Karg, E., Penke, B., Bari, F. & Farkas, E. 2007. Pre-treatment and post-treatment with α -tocopherol attenuates hippocampal neuronal damage in experimental cerebral hypoperfusion. *European Journal of Pharmacology* **571**, 120–128.
- Aruoma, O.L. 1996. Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions.
- Boldyrev, A. A. 1993. Does carnosine possess direct antioxidant activity? *Int. J. Biochem.* **25**(8), 1101-1107.
- Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S. M., Vasson, M.-P., Hasselmann, M. & Leverve, X. 2006. *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. Edition Springer, p 255.
- Causse, C. 2000. *Les secrets de santé des antioxydants : C'est naturel, c'est ma santé*. Alpen éditions s.a.m., p 30.
- Chatard, J.-C. 2003. *Biologie et médecine du sport : Lutter contre le dopage en gérant la récupération physique*. Edition Université de Saint-Etienne, p 157.
- Chrebil, L. 2006. *Acylation des flavonoïdes par les lipases de Candida antarctica et de Pseudomonas cepacia : études cinétique, structurale et conformationnelle*. Thèse de Doctorat : Institut national polytechnique de LORRAINE.
- Christophe, P. & Christophe S. 2011. *Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain*. Edition Springer, p 84.
- Duong, T. T. H., Antao, S., Ellis, N. A., Myers, S. J. & Witting, P. K. 2008. Supplementation with a synthetic polyphenol limits oxidative stress and enhances neuronal cell viability in response to hypoxia–re-oxygenation injury. *Brain Research* **1219**, 8-18.
- Fain, O. 2004. Mise au point : Carences en vitamine C. *La revue de médecine interne* **25**, 872–880.
- Halliwell, B. 2008. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics* **476**, 107–112.
- Handique, J. G. & Baruah, J. B. 2002. Polyphenolic compounds : an overview. *Reactive & Functional Polymers* **52**, 163–188. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **73**, 1617-1625.
- Laughton, M. J., Halliwell, B., Evans, P. J., Robin, J. & Hault, S. 1989. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochemical Pharmacology* **38** (17), 2859-2865.

- Lee, C. Y., Sharma, A., Cheong, J. E. & Nelson, J. L. 2009.** Synthesis and antioxidant properties of dendritic polyphenols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **19**, 6326–6330.
- Marfak, A., 2003.** Thèse de doctorat, Université de Limoges.
- Massy, Z. 2006.** Le cholestérol : le suivi du patient à l'officine. *Wolters Kluwer France Edition*, p 66.
- Médart, J. 2009.** Manuel pratique de nutrition: L'alimentation préventive et curative. *Editions De Boeck Supérieur*, p 49.
- Naidu, K. A. 2003.** Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An Overview. *Nutrition Journal* **2** (7), 1-10.
- Packer, J. E., Mahood, J. S., Mora-Arellano, V. O., Slater, T. F., Willson, R. L. & Wolfenden, B. S. 1981.** Free radicals and singlet oxygen scavengers: reaction of a peroxy-radical with beta-carotene, diphenyl furan and 1, 4-diazobicyclo (2,2,2)-octane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **98**, 901-906.
- Packer, L., Kraemer, K. & Rimbach, G. 2001.** Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* **17**(10), 888-895.
- Papazian, L. & Roch, A. 2008.** Le syndrome de détresse respiratoire aiguë, *Edition Springer*, p 153.
- Piquet, M.-A. & Hébuterne, X. 2007.** Nutrition en pathologie digestive. *Edition Wolters Kluwer France*, p 93.
- Poirier, J. 2004.** L'indispensable pour vivre en santé, *Edition Merlin*, p 72.
- Rodriguez-Amaya, D. B. & Kimura, M. 2004.** Harvestplus handbook for carotenoid analysis. Technical Monograph Series, p 3.
- Rolo-Naranjo, A., Rebolledo-Rios, R., Melchor-Rodriguez, K., Codorniu-Hernández, E. 2009.** Pseudo-phase portrait applied to pattern recognition in flavonoid–protein interactions. *Applied Mathematics and Computation* **215**, 156–167.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glazer, A. N. & Ames, B. N. 1987.** Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* **235** (4792), 1043-1046.
- Wang, X. & Quinn, P. J. 2006.** The structure and phase behaviour of α -tocopherol-rich domains in 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamine. *Biochimie* **88**, 1883-1888.

**MATERIELS ET
METHODES**



IV. Récolte du matériel végétal

La matière végétale a été récoltée durant le mois de juin 2014 des environs de la ville de Boussaâda, nous avons pris en considération toutes les parties de la plante (aériennes, tiges et racines).

L'opération de séchage est effectuée dans l'ombre, et loin de l'humidité, la masse de la plante était de 275g.

IV.1. Aspect qualitatif : analyse phytochimique

IV.1.1. Extraction des composés phénoliques

IV.1.2. Extraction solide-liquide

Après le broyage de la plante (275 g), la matière végétale obtenue est mise à une macération dans une solution (Eau : Méthanol) chaude jusqu'à ébullition ($H_2O:MeOH$; 30/70), cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant, elle dure dans chaque fois 24 heures.

Les solutions obtenues sont alors filtrées et évaporées sous vide à (35-50) °C à l'aide d'un évaporateur rotatif, l'extrait hydroalcoolique obtenu est dilué avec 300 ml d'eau distillée (à raison de 1 litre pour 1 kg de matière sèche), la solution est laissée une nuit puis filtrée. Cette filtration permettant d'éliminer les graisses, les résines, la chlorophylle dégradée et les impuretés.

IV.1.3. Extraction liquide-liquide

Après filtration, la solution devenue brune a subi des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le dichlorométhane, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le n-butanol.

- **Le dichlorométhane** : solvant préférentiel pour l'extraction des composés apolaires tel que les terpènes et les acides gras.



Figure IV.1 : phase dichlorométhane de *Jurinea humilis*

- **L'acétate d'éthyle** : utilisé pour extraire les composés moyennement polaires tel que les acides phénoliques, flavonoïdes aglycones et monoglucosides



Figure IV.2 : phase acétate d'éthyle de *Jurinea humilis*

- **Le n-butanol** : cette extraction entraîne le reste des composés polaires tel que les flavonoïdes di-o-glycosides, tri-o-glycosides et les c-glycosides

Ces affrontements se font dans des ampoules à décanter. La phase aqueuse et le solvant sont mélangés vigoureusement en dégageant à chaque fois les gaz formés. La première décantation reste une nuit pour extraire le maximum des produits, les deux autres reposent à chaque fois une heure.



Figure IV.3 : phase n-butanol du *Jurinea humilis*

Les phases récupérées, sont évaporées à sec à basse température pour les deux phases : dichlorométhane et acétate d'éthyle (40 °C). La phase n-butanol est concentrée à 60 °C.

Les phases finales sont toutes reprises dans le méthanol, pour voir leurs profils chromatographiques.



Figure IV.4 : phases récupérées du *Jurinea humilis*

Le schéma suivant résume les différentes étapes de l'extraction

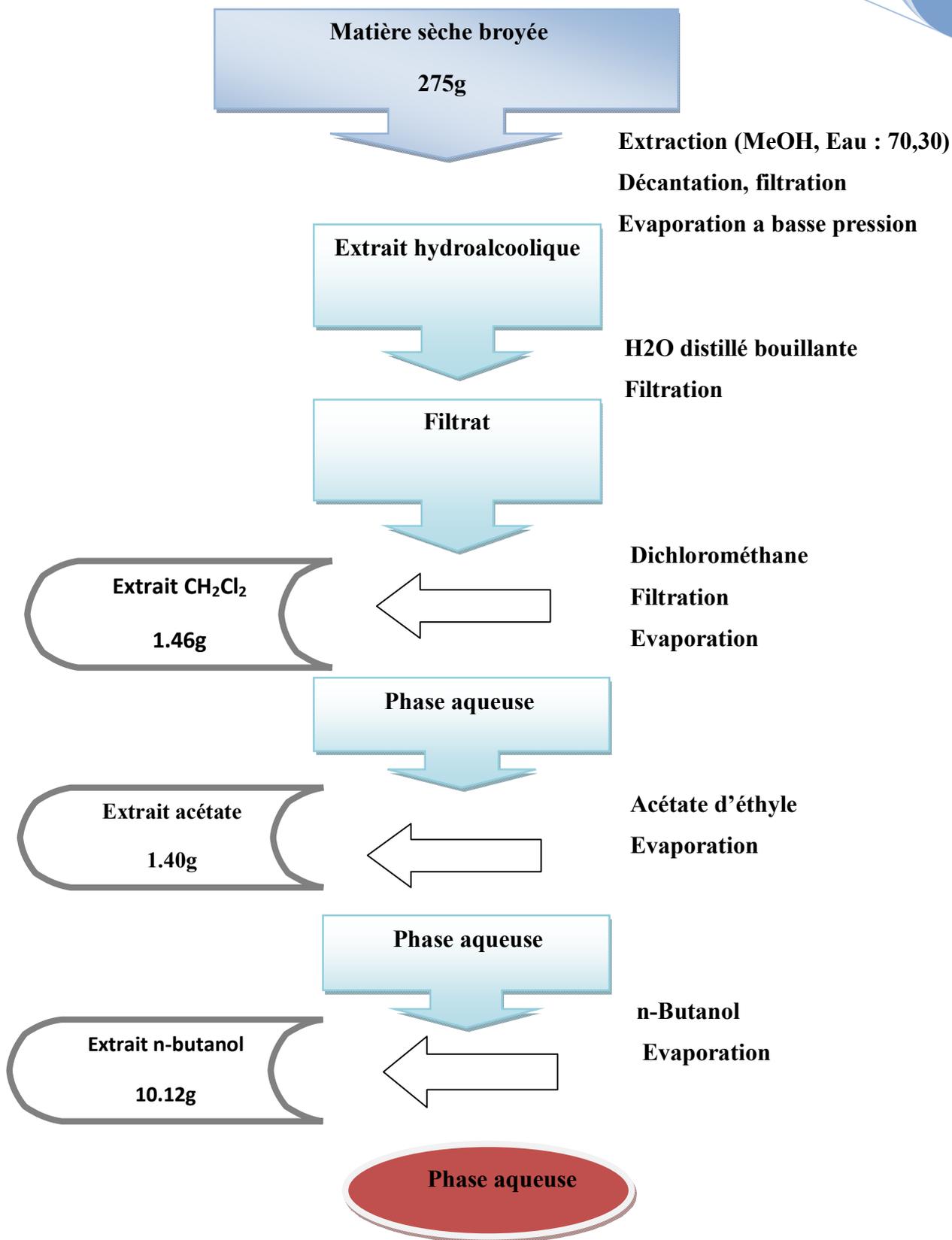


Figure IV.5 : Protocole d'extraction de la plante *Jurinia humilis*.

IV.2. Aspect quantitatif

IV.2.1. Dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu

Le réactif de Folin Ciocalteu, mélange des acides phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phospho-molybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), est réduit en présence de polyphénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (**Ribereau-Gayon P., 1968 ; Tanguy J., 1971**).

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis en utilisant l'essai de Folin- Ciocalteu.

Brièvement 300µl de chaque extrait (dissous dans le méthanol) ont été ajoutés à 1500µl de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué. Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 4 minutes.

Après l'incubation 1200 µl de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (7.5%) a été ajoutée. Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 2 heures dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance de tous les extraits a été mesurée par un spectrophotomètre à 765 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (0-200 µg/ml) et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg).

IV.2.2 Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes dans un extrait peut être mis en évidence par le dosage colorimétrique selon la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) cité par (**Djeridane I., et al., 2006 ; Boudiaf K. 2006**).

Pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits ; 1 ml de chaque extrait et du standard (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables a été ajouté à un volume égal d'une solution d' $AlCl_3$ (2% dans le méthanol).

Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation.

La quantification des flavonoïdes à été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = a x + b$) réalisé par un standard étalon "la quercétine" à différentes concentrations (1.75-40 µg/ml) dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg).

IV.3. Utilisation des techniques d'identification des composés phénoliques

IV.3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Tout d'abord cette technique permet de façon générale l'analyse des fractions en ayant une idée de la polarité des différents composés en fonction de l'affinité avec les solvants de migration, donc elle est employée pour la recherche du système de solvant avant d'entreprendre une étape de séparation. Elle est également utilisée à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications, les chromatogrammes sur couche mince permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis.

Pour une meilleure séparation sur couche mince, nous décrirons ici les étapes importantes de sa réalisation:

- préparation de l'échantillon
- dépôt de l'échantillon
- développement du chromatogramme, techniques de séparation

➤ Préparation de l'échantillon

La préparation de l'échantillon est en général moins exigeante que dans le cas des autres méthodes de chromatographie, généralement les échantillons sont dissous dans le méthanol.

➤ Dépôt de l'échantillon

La technique de dépôt de l'échantillon sur la plaque dépend du but de la séparation chromatographique. La méthode la plus commode est l'application point par point avec une pipette capillaire en verre. Pour obtenir de meilleurs résultats, particulièrement dans un but préparatif, il vaut mieux appliquer l'échantillon de façon linéaire (bandes concentrées et linéaires).

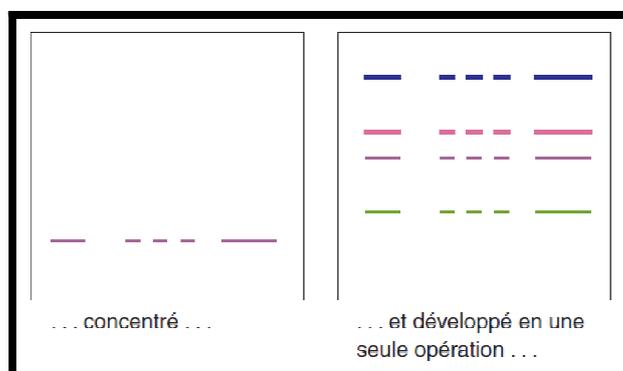


Figure IV.6 : Dépôt et développement de l'échantillon

➤ **Développement d'un chromatogramme – techniques de séparation**

La méthode la plus courante est l'élution ascendante effectuée dans une cuve de développement (méthode standard, résolution linéaire). On réalise généralement un développement simple. Mais un développement multiple avec changement éventuel de solvant (technique du gradient), permet d'obtenir des séparations plus efficaces. Dans le cas d'une séparation bi-dimensionnelle, on effectue le dépôt de l'échantillon dans un coin de la plaque. Après un premier développement chromatographique, on sèche la plaque et on la tourne de 90°, elle est alors développée avec un autre éluant. Cette technique de chromatographie bi-dimensionnelle est surtout utilisée pour des mélanges complexes, car elle permet d'utiliser les caractéristiques spécifiques de séparation de deux solvants.

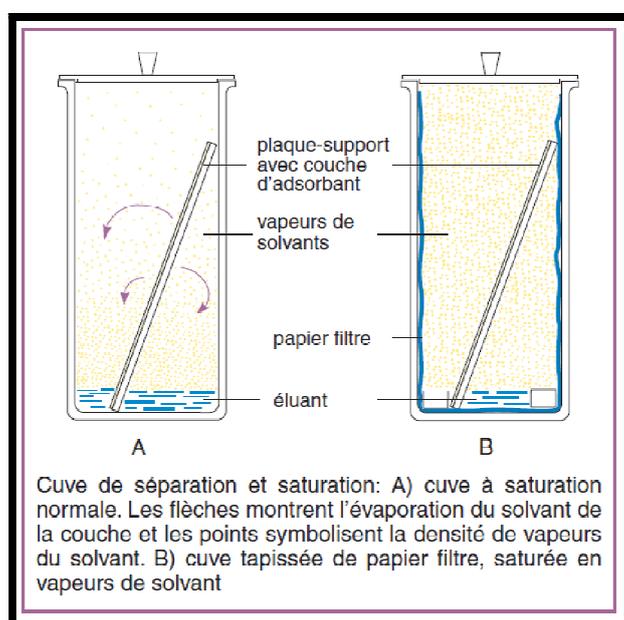


Figure IV.7 : Cuve de séparation

➤ **Interprétation du chromatogramme**

L'exploitation se fait en fonction du but de l'analyse. Pour une évaluation qualitative, la visualisation et la localisation des substances séparées suffisent généralement. On opère simplement par analogie avec des substances de référence chromatographiées en même temps que l'échantillon.

Pour l'évaluation qualitative, le paramètre le plus utilisé est le facteur de rétention R_f ou encore sa valeur multipliée par 100, notée hR_f . La valeur de R_f est définie par la relation:

$$R_f = \text{Distance parcourue par la substance} / \text{Distance parcourue par le front de solvant} = b/a$$

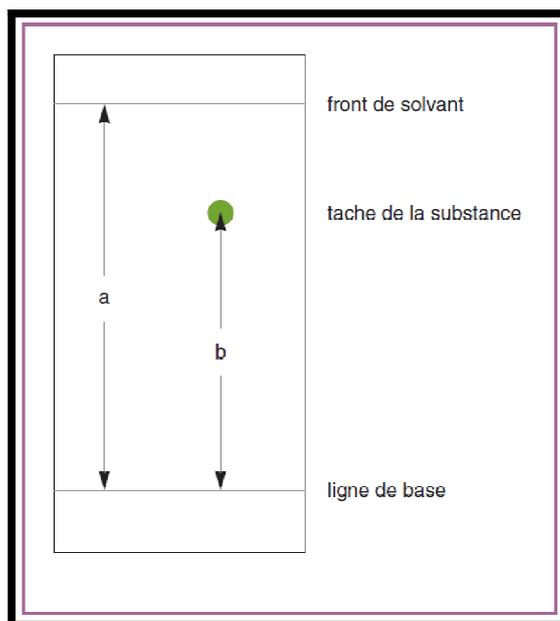


Figure IV.8 : Calcul de R_f

Les valeurs de R_f sont donc comprises entre 0 et 1 et de préférence entre 0,1 et 0,8 (hR_f entre 10 et 80). Pour obtenir des R_f reproductibles, il est nécessaire d'opérer dans des conditions identiques: cuve saturée, composition identique de l'éluant, température constante, etc.

Pour une visualisation non spécifique, de placer la plaque sous une lampe UV. De nombreuses substances possèdent une bande d'absorption dans l'UV.

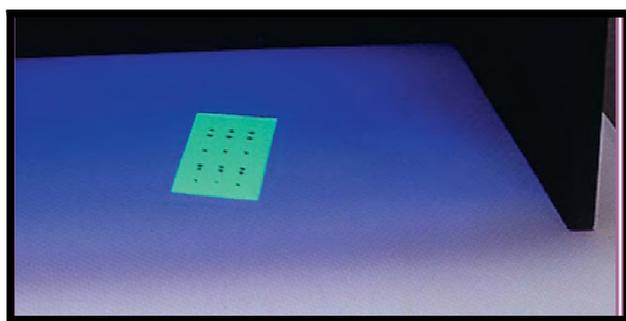


Figure IV.9 : Visualisation des plaques sous une lampe UV

L'identification des substances séparées se fait par comparaison avec le R_f du produit de départ, qu'on élue souvent sur la même plaque.

Concernant notre travail les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium recouvertes d'un gel de silice Silicagel 60 F254 (Merck). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant

approprié. Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée.

L'observation des CCM s'effectue sous UV (254 et 366 nm) et, dans certains cas, révélation par les réactifs appropriés.

IV.3.2. Etude chimique des flavonoïdes

IV.3.2.1. Fluorescence sous lumière UV : en effet, il existe une relation étroite entre la fluorescence du composé, sa nature et son mode de substitution. Le tableau ci-dessous résume la relation entre les couleurs des spots des flavonoïdes et leurs structures.

Tableau IV.1 : Relation entre la fluorescence du spot et la structure des flavonoïdes (Iahouel., 2005).

Couleur de spot des flavonoïdes	Type de flavonoïdes
Noire	Flavonols 5.6.7 tri-OH libre
	Flavonols 5.7.8 tri-OH libres
Brun noir	3-OH absent ou 3-OH substitué
Violet	Flavones 5-OH et 4'-OH
	Flavones 3-OH et 5-OH, 4'-OH
	Flavones ou flavonols 5-OH avec 4'-OH ABSENT ou substitué en 3
	Flavones 6- ou 8-OH Chalcone, isoflanones, dihydroflavonols, flavonones
Bleu clair	Flavones sans 5-OH libres
	Flavonols sans 5-OH libres avec 3-OH substitué
Jaune terne, jaune orangé	Flavonols 3-OH libre avec ou sans 5-OH substitué
Jaune vert brillant	5-OH libre ou sans 5-OH substitué
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3-OH libre
Jaune pale	Dihydroflavonols

IV.4. Activité biologique

IV.4.1. Activité antioxydante

IV.4.1.1. Mesure du pouvoir réducteur

✚ Principe

Le pouvoir réducteur est déterminé par la méthode **d'Oyaisu *et al.*, 1986**). in **Amaroweiz R. *et al.*, 2004**). Ce test est basé sur la capacité de l'antioxydant présent dans l'extrait à réduire le fer ferrique Fe^{+++} ($FeCl_3$) en fer ferreux Fe^{++} ($FeCl_2$) en présence d'un agent chromogène le ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$. L'intensité du complexe de couleur bleu, avec un maximum d'absorbance à 700nm, est proportionnelle à la concentration en antioxydant.

Pour cela, dans des tubes on introduit 1ml de chaque extrait dichlorométhane, acétate d'éthyle et n-butanol (à différentes concentrations), on ajoute 1ml du tampon phosphate (0,2M, PH= 6,6), et 1ml d'une solution du ferricyanure de potassium (1%). Après agitation, les tubes sont incubés à 50°C pendant 20min.

Après l'incubation, on ajoute à chaque tube 1ml d'une solution de TCA (10%) et 1,5 de l'eau distillée. Enfin on prend 1,5ml du surnageant de chaque tube et on ajoute 0,3 ml d'une solution de $FeCl_3$ (0,1%). La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 700 nm.

Le blanc est préparé de la même façon sauf que l'extrait est remplacé par le solvant.

IV.4.1.2. Test au DPPH

L'activité du balayage des radicaux libres a été mesurée en employant le radical libre stable DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) qui est l'un des essais principaux employés pour explorer l'utilisation des extraits d'herbes comme antioxydants (**Markowicz Bastos *et al.*, 2007**).

✚ Principe

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 diphényl 1 picryl hydrazine de couleur jaune. (**Maataoui *et al.*, 2006**).

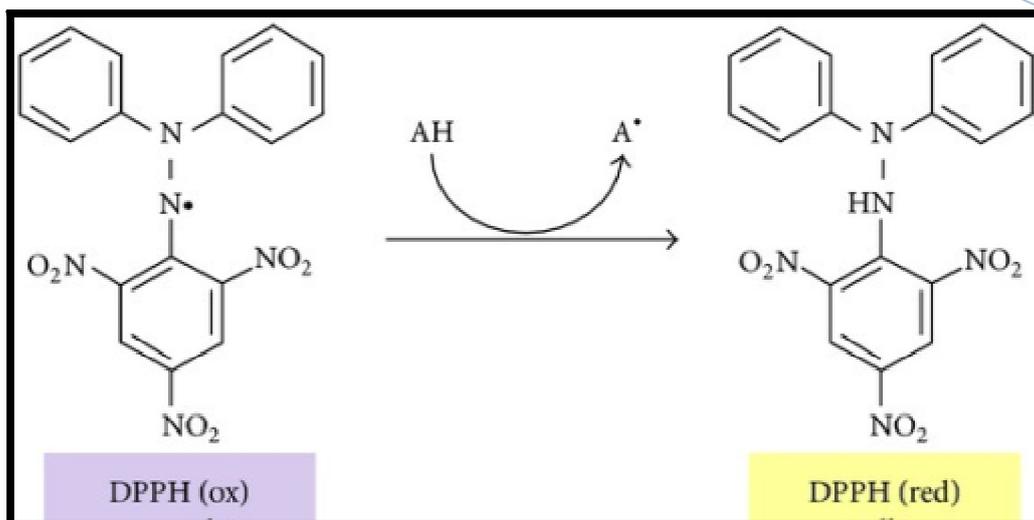


Figure IV.10 : Forme libre et réduite du DPPH

Ce radical est un oxydant qui peut être réduit par l'antioxydant (AH) selon la réaction suivante



✚ Protocole utilisé pour le test DPPH

L'Activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par (Takao, T., 1994):

Le DPPH est solubilisé dans le méthanol pour avoir une solution de 0,4 M. Dans des tubes on introduit 50µl de l'extrait n-butanol (à différentes concentrations) et on ajoute 950 µl de la solution méthanolique au DPPH. Après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

Le contrôle négatif est composé de 950µl de la solution méthanolique au DPPH et de 50µl de méthanol. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard la quercétine.

✚ L'expression des résultats

En présence d'un antioxydant la force d'absorption est diminuée et la décoloration résultante est stoechiométrique en ce qui concerne le nombre d'électrons captés (Markowicz Bastos *et al.*, 2007).

Les résultats peuvent être exprimés en tant que l'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

$$\% = [1 - (\text{Abs Echantillon} / \text{Abs Control négatif})] \times 100$$

Où

% : Pourcentage de l'activité anti-radicalaire ;

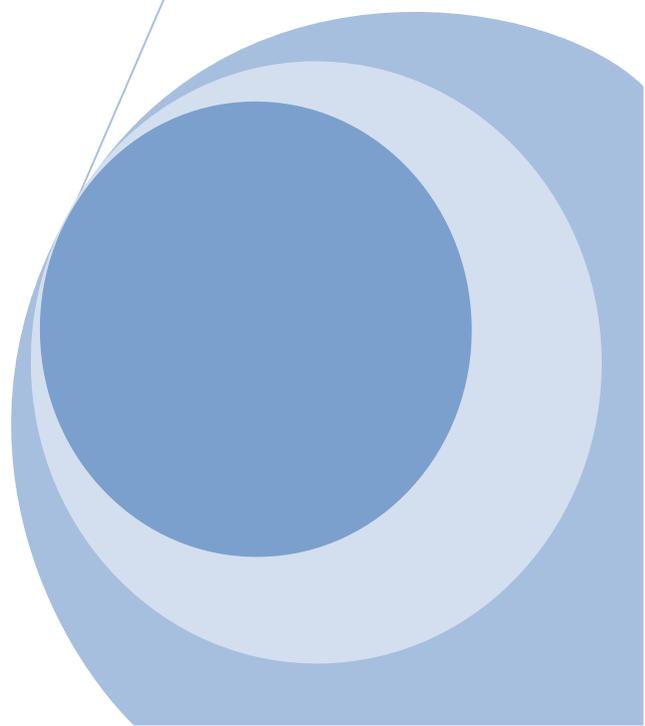
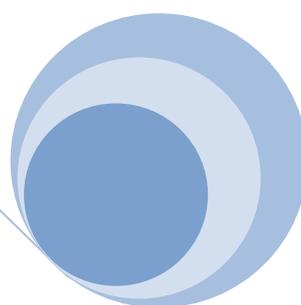
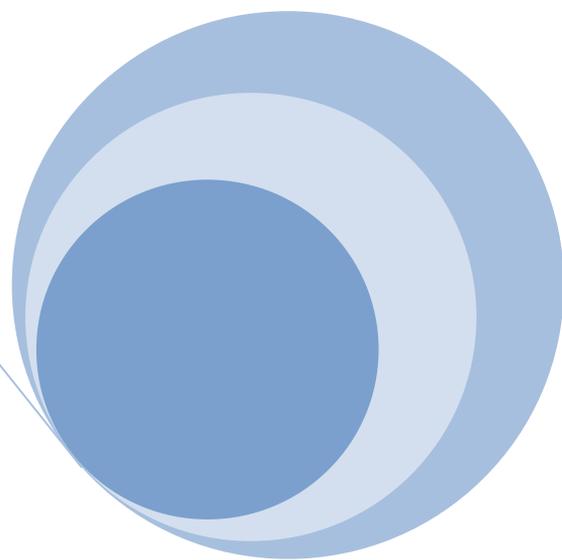
Abs Echantillon : Absorbance de l'échantillon ;

Abs Control négatif : Absorbance du control négatif ;

Références bibliographiques

- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Pahimi-Moghaddme, P., Barl, B., Weil, J.A., 2004.** Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food chemistry*. (84).p: 551-562.
- Boudiaf, K., 2006.** Etude des effets anti-xanthine oxydoreductase et anti-radicalaires des extraits des graines de *Nigella sativa*. Mémoire de magister .Setif.
- Celiktas, O.Y, Bedir, E., Vardar Sukan, F., 2007.** In vitro antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. *Food Chem*. 101: 1457-1464.
- Djeridane, A., Yous, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006.** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*. 97: 654-660.
- Lahoual, M., 2005.** Interaction flavonoïdes mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. These de doctorat d'état de l'université de constantine.
- Maataoui, B.S., Hmyene, A., Hilali, S., 2006.** Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*. 7: 3-8.
- Markowicz Bastos, D.H., Saldanha, L.A., Catharino, R.R., Sawaya, A.C.H.F., Cunha, I B S., Carvalho, P.O. Eberlin, M.N., 2007.** Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules*. 12: 423-432.
- Ribereau-Gayon, P., 1968.** Notion générales sur les composés phénoliques .In «Les composés phénoliques des végétaux ». Ed : Dunod. 1-27.
- Takao, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A., Sakata, K., 1994.** A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 58. 1780-1783.
- Tanguy, J., 1971.** Quelques aspects du métabolisme des composés phénoliques chez les *Nicotina hypersensibile* au virus de la mosaïque du tabac souche commune (V.M.T). *Physiol.vég* 9 (2).169-187.

**RESULTATS ET
DISCUSSIONS**



V.1. Rendement de l'extraction

Les trois phases organiques ainsi obtenus (dichlorométhane, acétate d'éthyle, n-butanol) sont concentrées à sec sous pression réduite, pesées et les rendements sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau V.1 : Rendements des extraits

Matière sèche	Extrait	Masse	Rendement
275g	Dichlorométhane (DCM)	1,46	0.53%
	Acetate d'éthyle (Ac)	1,40	0.50%
	n-butanol (But)	10,12	3.68%

V.2. Dosage des polyphénols

La teneur en polyphénols a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols, des plantes médicinales et les nourritures (Abdel-Hameed S., 2009).

L'acide gallique est le standard (Figure V.1) le plus souvent employé dans la méthode de Folin-Ciocalteu (Maisuthisakul P. et al., 2008).

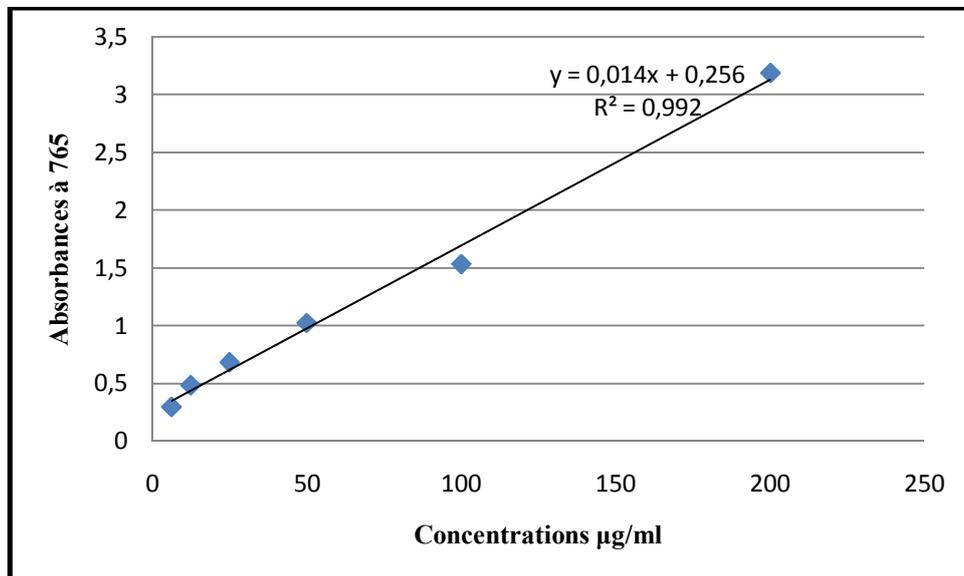


Figure V.1: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne ± SD de trois mesures).

Les teneurs en polyphénols montrent que l'extrait dichlorométhane contient la faible quantité : $29,52 \pm 4,63$ µg EAG/mg, et que les deux autres extraits présentent une quantité assez proche : une teneur de $77,03 \pm 1,34$ µg EAG/mg pour l'extrait d'acétate d'éthyle et une

teneur de $84,57 \pm 3,61$ μg EAG/mg pour l'extrait n-butanol. Ces résultats sont largement inférieurs à ceux trouvés par **Naseer Ali Shah et al., 2014** pour l'espèce *Jurinea dolomiaea*.

Tableau VI.2 : Teneur en polyphénols

Extrait	Teneur en polyphénols ^(a)
Dichlorométhane (DCM)	29,52±4,63
Acétate d'éthyle (AC)	77,03±1,34
n-butanol (But)	84,57±3,61

(a) μg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.
Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures \pm SD.

La teneur de l'extrait dichlorométhane du *Jurinea humilis* est si proche à celle de **Öztük et al., 2011** : $38,13 \pm 1,98$ μg EAG/mg pour l'espèce *Jurinea consanguinea*.

La distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante. Ceci peut être lié aux conditions climatiques dures (la température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols (**Falleh H. et al., 2008**).

En effet, la teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (conditions climatiques, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (**Falleh H. et al., 2008 ; Podsedek A., 2007**).

V.3. Dosage des flavonoïdes

La raison principale pour la quelle on a choisi cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 2000 publications annuelles contenant « flavonoïdes » comme mot clé (**Havsteen B., 2002 ; Middleton Jr., 2000**).

Selon la polarité des solvants ; l'acétate d'éthyle est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes aglycones ou flavonoïdes mono O- glycosides et partiellement di-O-glycosides, tandis que le n-butanol est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes di-O-glycosides et tri-glycosides et C-glycosides. Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode d' AlCl_3 en utilisant comme standard la quercétine (Figure V.2), les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en μg EQ/mg d'extrait.

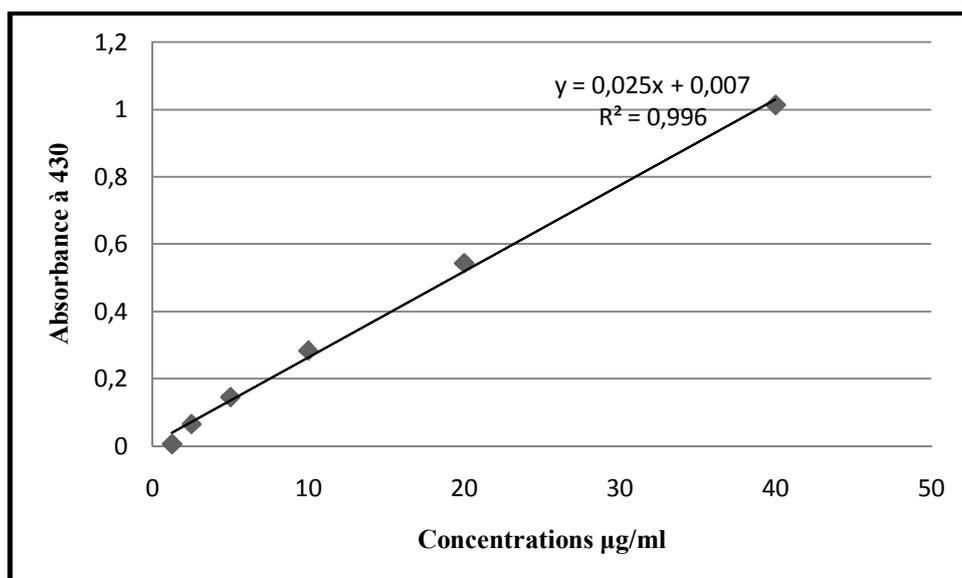


Figure V.2 : Courbe d'étalonnage de quercétine (moyenne ± SD de trois mesures).

Les résultats du dosage quantitatif des flavonoïdes (Tableau VI.3) révèlent que l'extrait Acétate d'éthyle est le plus riche en flavonoïdes $326,20 \pm 6,50 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait, suivi par le n-butanol $171,00 \pm 1,97 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait, et dernièrement l'extrait dichlorométhane avec une teneur de $11,00 \pm 1,41 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait.

Tableau V.3 : Teneur en flavonoïdes

Extrait	Teneur en flavonoïdes ^(b)
Dichlorométhane (DCM)	$11,00 \pm 1,41$
Acétate d'éthyle (AC)	$326,20 \pm 6,50$
n-butanol (But)	$171,00 \pm 1,97$

(b) μg d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait.
Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ± SD.

La teneur des flavonoïdes de l'extrait dichlorométhane ($11,00 \pm 1,41 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait) est très proche de celle trouvée par Öztük *et al.*, 2011 pour *Jurinea consanguinea* qui est $15,53 \pm 1,52 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait.

Les teneurs rapportées par Naseer Ali Shah *et al.*, 2014 pour l'espèce *Jurinea dolomiaea* sont très élevées par rapport à nos résultats, Mais l'extrait Acetate d'éthyle du genre *Jurinea* reste toujours le plus riche en flavonoïdes.

Nous pouvons dire que nos résultats viennent corroborer ceux de Öztük *et al.*, 2011.

En tenant compte, de la sélectivité de chaque solvant utilisé pour le fractionnement on admet que *Jurinea Humilis* DC. est riche en flavonoïdes moyennement polaires (aglycones et mono-glycosylés).

D'après nos résultats, les deux extraits Acétate d'éthyle et n-butanol du *Jurinea humilis* DC. sont riches en flavonoïdes (**Tableau V.3**) et pauvres en polyphénols (**Tableau V.2**), tandis que l'extrait dichlorométhane présente la faible quantité en teneur pour les deux métabolites secondaires.

V.4. Activité antioxydante

V.4.1. Mesure du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est un indicateur significatif du potentiel antioxydant d'une substance (**Wang H. et al., 2008**). Les résultats du pouvoir réducteur de nos extraits présentent un profil comparable à celui des teneurs en substances actives.

La figure V.3 montre que les deux extraits acétate d'éthyle (AC) et n-butanol (But) de notre plante exerce une bonne activité réductrice ; par rapport à l'extrait dichlorométhane (DCM). Mais inférieures à celle du standard (l'acide ascorbique).

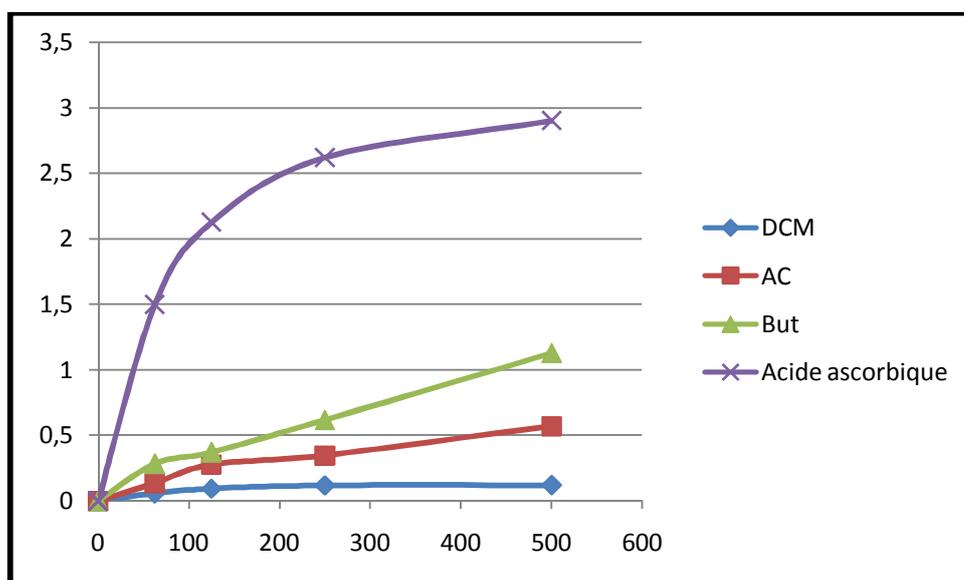


Figure V.3 : Pouvoir réducteur des extraits et de l'acide ascorbique testés à différentes concentrations.

La présence des composés réducteurs dans les extraits de notre plante induit la réduction du complexe Fe^{3+} ferricyanure en ions ferreux (Fe^{2+}) qui réagissent comme donneurs d'électrons. L'absorbance reflétant la quantité des composés antioxydants présents dans l'échantillon testé, cette mesure permet une évaluation semi-qualitative des composés

participant à la réaction réductrice (Yang J. *et al.*, 2008 ; Choi Y. *et al.*, 2007 ; Lee Y *et al.*, 2004 ; Ara *et Nur*, 2009 ; Ozsoy N. *et al.*, 2008).

Le pouvoir réducteur des extraits de la plante est dose dépendante (concentration dépendante). L'extrait n-butanol à une concentration de 500µg /ml, exerce la meilleure activité réductrice avec une absorbance de 1,126, suivi de l'extrait acétate d'éthyle avec 0,570 et puis l'extrait dichlorométhane avec une absorbance de 0,121.

Des résultats similaires ont été rapportés par plusieurs auteurs dont les travaux d'Odabasoglu *et al.*, 2004) qui ont observé un coefficient de corrélation linéaire, entre la teneur en composés phénoliques et le pouvoir réducteur de plusieurs plantes médicinales, compris entre 0,85 et 0,96, autrement dit 85% à 96% de la capacité réductrice de ces plantes est due au composés phénoliques.

L'acide ascorbique à une concentration de à 0,5 mg/ml présente une meilleure activité réductrice avec une absorbance de 2,90.

La nature et la concentration des antioxydants contrôlent l'intensité du pouvoir réducteur. La position et le nombre d'hydroxylations interviennent dans cette propriété. Selon Mc Donald S. *et al.*, 2001. La présence de composés *O*-diphénols (acide gallique, acide caféique) augmente la capacité antioxydant en améliorant la stabilité du radical phenoxy.

V.4.2. Test de DPPH

L'activité antiradicalaire a été évaluée, *in vitro*, par le test de DPPH. Cette méthode spectrophotométrique utilise le radical DPPH^{*} (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle) de couleur violette comme réactif, qui vire au jaune, en présence de capteurs de radicaux libres, et se réduit en 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazine. Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm.

Les figures ci-dessous montrent, respectivement l'activité anti-radicalaire (effet scavenger) du standart (la quercétine) et l'extrait n-butanol contre le radical DPPH à différentes concentrations. Une relation proportionnelle est observée entre la concentration en anti-oxydant (l'extrait et le standart) et le pourcentage d'inhibition du radical DPPH (Kumaran A *et al.*, 2006).

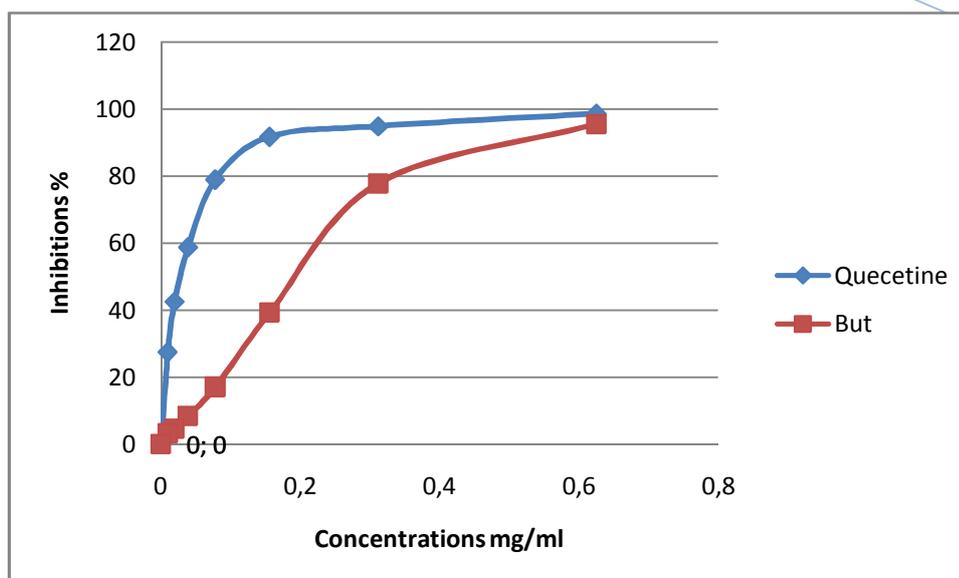


Figure V.4: Effet scavenger contre le radical DPPH de l'extrait n-butanol du *Jurinea humilis* et du standard étudié (la quercétine).

L'activité anti-radicalaire augmente avec la concentration de l'extrait n-butanol de notre plante, dans la gamme allant de 0-0,625 mg/ml, avec un pourcentage d'inhibition variant de 3,29% jusqu'à 95,5% à différentes concentrations.

L'extrait n-butanol de *Jurinea humilis*, présente sa plus forte activité anti-radicalaire (95,5 %) à une concentration de 0,625mg/ml.

Malgré la faible quantité des flavonoïdes par rapport à l'extrait acétate d'éthyle L'importance de l'activité antioxydante de l'extrait pourrait être attribuée au produit majoritaire présent dans ce dernier.

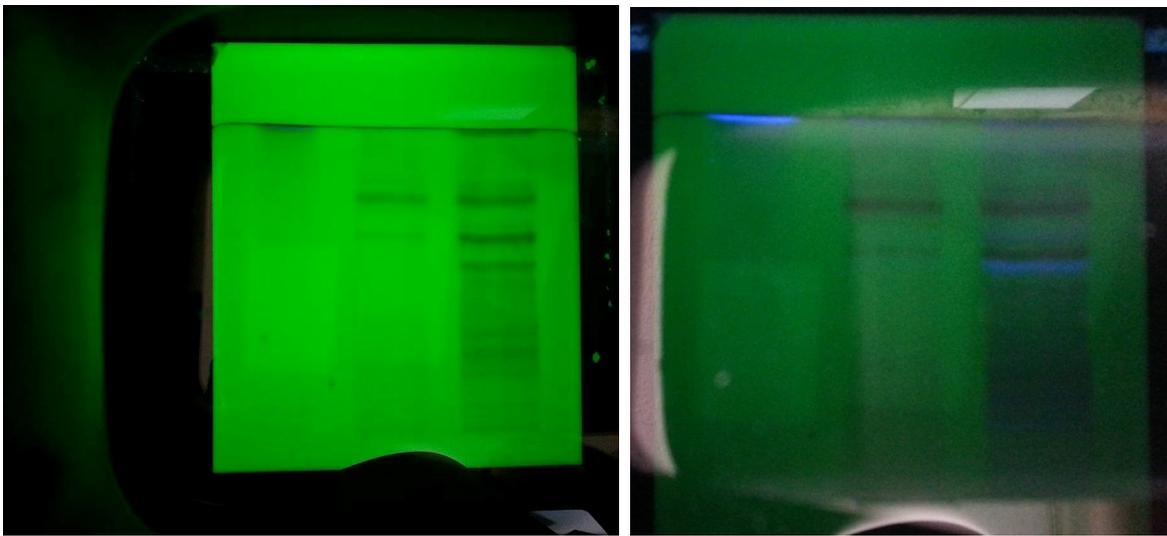
V.5.Caractérisation par CCM des différents extraits

Les différentes phases ont été testées par chromatographie sur couche mince de gel de silice 60 F₂₅₄ (Figure V.7 : A ; B) avec le mélange (Acétate d'éthyle ; MeOH ; Eau / 30 ; 4 ; 3) comme éluant, et de polyamide DC6 (Figure V.7 : C) avec le mélange (Toluène ; MeOH ; Eau/4 ; 3 ; 3).

L'examen de ces plaques montre la cohérence entre les résultats de dosage et le profil chromatographique des trois phases (Figure V.7) :

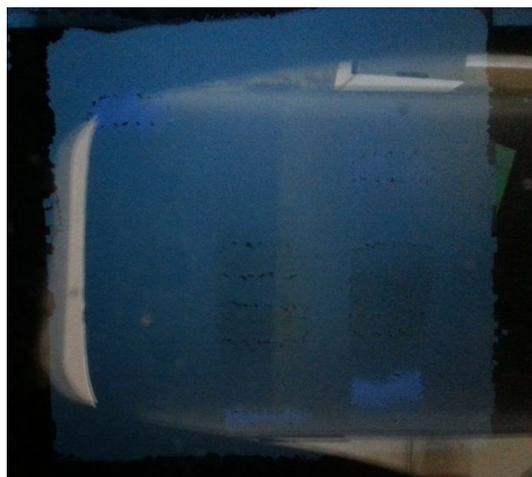
- ✓ **Phase dichlorométhane** : est apolaire, pauvre en métabolites secondaires.ainsi et vu la coloration des taches visualisées sous lumière UV (noire à 254nm et mauve fluorescent à 366nm), nous les avons identifiées comme des acides phénoliques.

- ✓ **Phase acétate d'éthyle:** le suivi de son profil effectué par chromatographie sur couche mince de polyamide, montre des taches noire caractéristiques des flavonoides. La présence des polyphenols (acides phénoliques) a été remarquée (taches mauve fluorescent).
- ✓ **Phase n-butanol :** est plus riche par rapport aux deux phases dichlorométhane et acétate d'éthyle, soit en composés phénolique ou composés de type flavonoïde. Ainsi et vu la visualisation sous lumière UV (à 366nm) des plaques de polyamides, ces deux dernier extraits présente une similtude de composition en polyphenols (Acides phénoliques).



A : visualisation sous lumière UV à 254nm

B : visualisation sous lumière UV à 366nm



C : visualisation sous lumière UV à 366nm (polyamide DC6)

Figure V.5 : Chromatogrammes obtenus des trois phases de la plante *Jurinea humilis* DC.

(De gauche à droite : Phase dichlorométhane ; phase acetate d'éthyle ; phase n-butanol)

Références bibliographiques

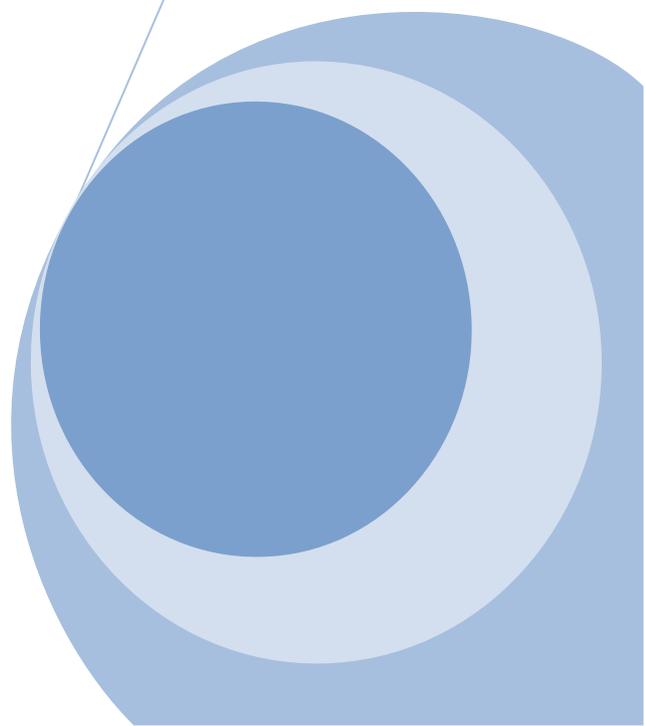
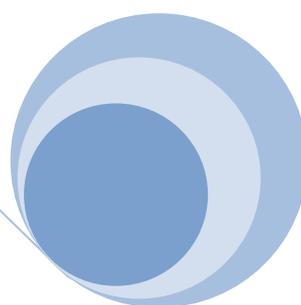
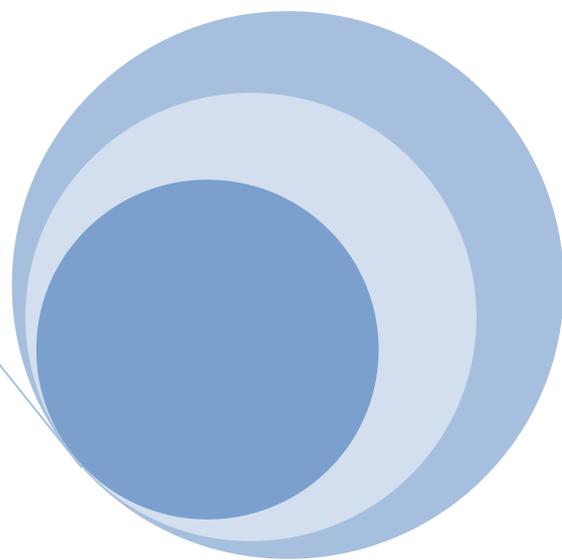
- Abdel-Hameed, E.S., 2009.** Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chem.* 114:1271-1277.
- Choi, Y., Jeong, H., Lee, J., 2007.** Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. *Food chemistry.* (103). 130-138.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdely, C., 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies.* 331: 372-379.
- Havsteen, B.H., 2002.** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* 96, 67-202.
- Öztük, H., Ufuk K., Ciler M., 2011.** Antioxidant, Anticholinesterase and Antibacterial Activities of *Jurinea consanguinea* DC. *Rec. Nat. Prod.* 43-51.
- Kumaran, A., Joel Karunakaran, R., 2006.** Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food chemistry.* (97). 109-114.
- Lee, Y., Hwang, W., Lin, S., 2004.** Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from *platycodon grandiflorum* A De condolle roots. *journal of Ethnopharmacology*, 93.409-415.
- Maisuthisakul, P., Pasuk, S., Ritthiruangdej, P., 2008.** Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *J Food Composition and Analysis.* 21: 229-240.
- McDonald, S., Prenzler, P.D., Antolovich, M et Robards, K., 2001.** Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food chem.*(73).p: 73-84.
- Middleton, J.E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000.** The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacological Reviews* 52, 673-751.
- Naseer Ali, S., Muhammad, R.K., Kiran, N., Mubarak, A., K., 2014.** Antioxidant potential, DNA protection, and HPLC-DAD Analysis of neglected medicinal *Jurinea dolomiaea* Roots. *BioMedResearch International*, 1155. 1-10.
- Ozsoy, N., Can, A., Yanardag, R. Akev, N., 2008.** Antioxidant activity of *Snilax exelsa* L. leaf extracts. *Food chemistry.* (110).571-583.
- Podsdek, A., 2007.** Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT.* 40:1-11.

Takao, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A., Sakata, K., 1994. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 58. 1780-1783.

Wang, H., Zhoo, M., Yang, B., Jiang, Y., Rao, G., 2008. Identification of polyphenols in *Labacco* leaf and their antioxidant and antimicrobial activities. *Food chemistry*. 107.1399-1406.

Yang, J., Guo, J., Yuan, J., 2008. In vitro antioxidant properties of Rutin. *LWT*. 41.1060-1066.

CONCLUSION



Conclusion

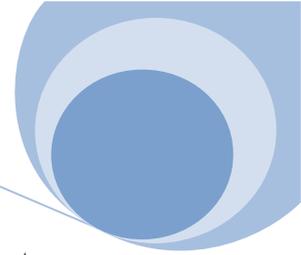
Ce travail de mémoire a pour objectif d'étudier la composition chimique de la plante Algérienne *Jurinea humilis* DC. Et d'évaluer in vitro l'activité antioxydante de ses extraits par deux méthodes : la mesure du pouvoir réducteur et le test DPPH.

Les résultats obtenus pour l'analyse quantitative de la composition phénolique des différents extraits (dichlorométhane, acétate d'éthyle et n-butanol) en utilisant le test colorimétrique de Folin Ciocalteu, confirment que cette espèce est pauvre en polyphénols.

Les teneurs en polyphénols montrent que l'extrait dichlorométhane contient la faible quantité : $29,52 \pm 4,63$ μg EAG/mg, et que les deux autres extraits présentent une quantité assez proche : une teneur de $77,03 \pm 1,34$ μg EAG/mg pour l'extrait d'acétate d'éthyle et une teneur de $84,57 \pm 3,61$ μg EAG/mg pour l'extrait n-butanol.

D'autre part, la teneur en flavonoïdes mesurée par la méthode colorimétrique d' AlCl_3 révèle que l'extrait Acétate d'éthyle est le plus riche en flavonoïdes $326,20 \pm 6,50$ μg EQ/mg d'extrait, suivit du n-butanol $171,00 \pm 1,97$ μg EQ/mg d'extrait, et dernièrement l'extrait dichlorométhane avec une teneur de $11,00 \pm 1,41$ μg EQ/mg d'extrait.

L'étude phytochimique par CCM de ces extraits, mis en évidence la cohérence entre l'investigation phytochimique et les résultats des activités biologiques.



Résumé

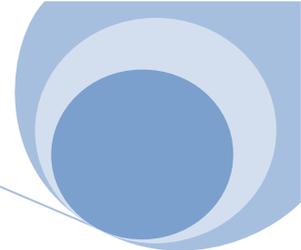
Ce travail est une contribution à l'étude phytochimique et biologique d'une plante algérienne appartenant à la famille des asteraceae, dans la partie phytochimique nous sommes intéressés à l'extraction, la caractérisation et la quantification des composés phénoliques de l'espèce étudiée.

Trois extraits (dichlorométhane, acétate d'éthyle et n-butanol) ont été ciblés pour une étude de la teneur en polyphénols totaux, de la teneur en flavonoïdes totaux et de l'activité antioxydante, Les méthodes utilisées sont :

- ❖ Le test de Folin-Ciocalteu pour quantifier les polyphénols totaux
- ❖ La méthode colorimétrique d' $AlCl_3$ pour quantifier les flavonoïdes totaux
- ❖ La méthode de mesure du pouvoir réducteur de fer et le test DPPH pour la mesure de l'activité antioxydante

Les résultats obtenus ont été très significatifs. La corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques (polyphénols et flavonoïdes totaux) a été également claire. Les résultats montrent que l'extrait n-butanol présente une propriété antioxydante très élevée par rapport aux extraits acétate d'éthyle et dichlorométhane.

Mots clés : Asteraceae ; polyphénols totaux ; flavonoïdes totaux ; test DPPH ; pouvoir réducteur



Summary

This work is a contribution to the phytochemical and biological study of an Algerian plant belonging to the family Asteraceae, in the phytochemical part we are interested in the extraction, characterization and quantification of the phenolic compounds of the species studied.

Three extracts (dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol) were targeted for study of total polyphenol content, the content of total flavonoids and antioxidant activity, the methods used are:

- ❖ The Folin-Ciocalteu assay to quantify the total phenolics;
- ❖ The colorimetric method of $AlCl_3$ to quantify the total flavonoids;
- ❖ The measurement method of reducing power of iron and the DPPH test for measuring the antioxidant activity;

The results have been very significant. The correlation between the antioxidant activity and phenolic content (polyphenols and total flavonoids) was also clear. The results show that the n-butanol extract has an antioxidant property very high compared to the extracts of ethyl acetate and dichloromethane.

Key words: Asteraceae; total phenolics; total flavonoids; DPPH test; reducing power

الملخص

هذا العمل هو مساهمة لدراسة كيميائية و بيولوجية لنبتة جزائرية تابعة لعائلة النجميات، في الدراسة الفيتو كيميائية ركزنا اهتمامنا علي الاستخلاص و الوصف و التقدير الكمي للمركبات الفينولية للنوع المدروس حيث قمنا بدراسة ثلاثة مستخلصات (ثنائي كلورو ميثان، استات الإيثيل و n-بيوتانول) من أجل معرفة محتواها من حيث المركبات الفينولية الإجمالية، المركبات الفلافونيدية الإجمالية و تقدير الفعالية المضادة للأكسدة . حيث كانت الطرق المستخدمة من أجل ذلك هي : اختبار Folin-Ciocalteu من أجل تقدير كمية المركبات الفينولية الإجمالية. طريقة اللونية لل $AlCl_3$ أجل تقدير كمية الفلافونويدات الإجمالية. طريقة قياس القدرة المرجعة للحديد و اختبار DPPH من أجل قياس الفاعلية المضادة للأكسدة. النتائج المتحصل عليها كانت معتبرة. العلاقة بين الفعالية المضادة للأكسدة و محتوى المركبات الفينولية (الفينولات و الفلافونويدات الإجمالية كانت واضحة جدا. النتائج توضح أن مستخلص n-بيوتانول يبين خاصية مضادة للأكسدة عالية جدا مقارنة مع مستخلصات استات الإيثيل و ثنائي كلورو ميثان.

الكلمات المفتاحية

النجميات; المركبات الفينولية الإجمالية; الفلافونويدات الإجمالية; اختبار DPPH ; القدرة المرجعة للحديد.

<p>Nom et prénom :</p> <p>ZITOUNI Abd el mounaam NACERI Oussama</p>	<p>Soutenu Le : 21/06/2015</p>
<p>Thème :</p> <p>Contribution à l'étude phytochimique et activité biologique d'une plante appartenant au genre <i>Jurinea</i>.</p>	
<p>Ce travail est une contribution à l'étude phytochimique et biologique d'une plante algérienne appartenant à la famille des asteraceae, dans la partie phytochimique nous nous sommes intéressés à l'extraction, la caractérisation et la quantification des composés phénoliques de l'espèce étudiée.</p> <p>Trois extraits (dichlorométhane, acétate d'éthyle et n-butanol) ont été ciblés pour une étude de la teneur en polyphénols totaux, de la teneur en flavonoïdes totaux et de l'activité antioxydante, Les méthodes utilisées sont :</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Le test de Folin-Ciocalteu pour quantifier les polyphénols totaux. ❖ La méthode colorométrique d'AlCl₃ pour quantifier les flavonoïdes totaux. ❖ La méthode de mesure du pouvoir réducteur de fer et le test DPPH pour la mesure de l'activité antioxydante. <p>Les résultats obtenus ont été très significatifs. La corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques (polyphenols et flavonoïdes totaux) a été également claire. Les résultats montrent que l'extrait n-butanol présente une propriété antioxydante très élevée par rapport aux extraits acétate d'éthyle et dichlorométhane.</p>	
<p>Mots clés : Asteraceae ; polyphenols totaux ; flavonoïdes totaux ; test DPPH ; pouvoir réducteur</p>	
<p style="text-align: center;">Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master.</p> <p style="text-align: center;">Spécialité : Biochimie Moléculaire et Santé.</p>	
<p>Devant le jury :</p> <p>Président du jury : Mr. MERGHEM R. (Professeur Université des Frères Mentouri Constantine).</p> <p>Rapporteur : Mme AYAD R. (M.C.B Université des Frères Mentouri Constantine).</p> <p>Examineur : Mme BELBACHE H. (M.A.A Université des Frères Mentouri Constantine).</p> <p style="text-align: center;"><i>Année universitaire</i> <i>2014 - 2015</i></p>	

