



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



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

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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie et Ecologie Végétale

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie et Physiologie Végétale

Spécialité : Métabolisme secondaire et molécules bioactives

Intitulé :

Contribution à l'étude phytochimique (les polyphénols) de deux espèces *Pimpinella anisum* L. et *Peganum harmala* L.

Présenté par :

IMAMI LOUBNA

TOUIRAT AICHA

Soutenu Le : 13 /06/2016

- Présidente du jury : Mme LABBANI Zelikha Pr-UFM Constantine.
- Rapporteur : Mme BOUZID Salha Maître-assistante UFM Constantine.
- Examineur : Mme BOUCHOUKH Imane Maître-assistante UFM Constantine.

Année universitaire 2015 - 2016

REMERCIEMENTS

Nous remercions tout d'abord ALLAH tout puissant de nous avoir donné la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce mémoire.

*Nous exprimons nos remerciements à notre encadreur **Mme. Bouzid Salha** pour la confiance, les conseils qu'elle nous a accordés tout au long de ce travail. Merci également pour votre encadrement, votre disponibilité et votre gentillesse. Nous vous adressons notre profonde reconnaissance pour vos remarques et conseils en vue d'améliorer ce manuscrit.*

*Nos remerciements vont aussi aux membres de jury : **Pr. Labbani Zelikha,**
Mme .Bouchoukh Imane Recevez nos plus vifs remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.*

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance et courage.

A mon cher père RACHID que dieu ait pitié de son âme

A mes très chères sœurs et mes chers frères pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de la réalisation de ce travail.

A mes chers neveux et nièces

A toute ma famille

A mes meilleures amies que j'aime beaucoup

A toute personne qui me connaît

Imami loubna

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes parents

Pour vos mains qu'ont tant travaillés

Pour votre Sourire que m'a tant réchauffé

Pour vos yeux que furent parfois mouillés

Pour vous qui m'avez tant aimé

A mes soeurs

A mon frère Ghanem

A toute ma famille

A mes amis(e)

Touirat aicha

Resumé

Peganum harmala (le harmal) est une plante de la famille des Zygophyllacées, assez riche en constituants chimiques tels que les Acides aminés, les Flavonoïdes, les pigments et les alcaloïdes

Pimpinella anisum (l'anis vert) est une plante de la famille Apiacées, contient de sesquiterpènes, acides phénoliques, furocoumarines, huile essentielle à base d'anéthol ..., d'où l'intérêt porté à ces deux espèces, pour démontrer leur richesse en polyphénol grâce à une étude phytochimique basée sur l'extraction des composés phénoliques et une identification des flavonoïdes et acide phénoliques par la technique de chromatographie liquide à haute performance, suivi d'un test de DPPH pour étudier l'activité antioxydante qui a démontré un pouvoir antioxydant important chez les deux espèces

L'analyse par HPLC a révélé que les graines de l'anis vert (*Pimpinella anisum*) pourraient contenir les flavonoïdes suivants : l'esculitine, la rutine, la quercétine et l'apigénine, et des acides phénoliques suivants : l'acide salicylique et la coumarine

L'analyse par HPLC a révélé que la partie aérienne de harmal (*Peganum harmala*) pourrait contenir les flavonoïdes suivants : la rutine, et des acides phénoliques suivants : l'acide ascorbique, l'acide vanillique et l'epicatéchine.

L'analyse par HPLC a révélé que les graines de harmal (*Peganum harmala*) pourraient contenir les flavonoïdes suivants : la quercitine, la rhamnitrine et des acides phénoliques suivants : l'acide salicylique et le kaempférol

Mots clés : *Pimpinella anisum* L., *Peganum harmala* L., Composés Phénoliques, Flavonoïdes, HPLC, Activité Antioxydante

Abstract

Peganum harmala (harmel) is a plant of the Zygophyllaceae family, very rich in chemical constituents such as amino acids, flavonoids, pigments and alkaloids.

Pimpinella anisum (anise) is a plant of the Apiaceae family, contains sesquiterpenes, phenolic acids, furocoumarines, anéthol...

The main reason of our interest in these two species, to demonstrate that they are very rich in polyphenol using a phytochemical study based on the extraction of phenolic compounds and identification of flavonoids and phenolic acids by a high performance liquid chromatography, followed by DPPH test to study the antioxidant activity which showed an important antioxidant power for both *Peganum harmala* and *Pimpinella anisum*.

HPLC analysis revealed that the seeds of anise (*Pimpinella anisum*) could contain the following flavonoids: esculetine, rutin, quercetin and apigenin, and the following phenolic acids: salicylic acid and coumarin.

For aerial part of harmel (*Peganum harmala*) HPLC analysis revealed that it could contain the following flavonoids: rutin and the following phenolic acids: ascorbic and vanillic acids and epicatechin.

HPLC analysis revealed that the seeds of harmel (*Peganum harmala*) could contain the following flavonoids: quercetin and rhamnitan, and the following phenolic acids: salicylic acid and kaempferol.

Keywords: *Pimpinella anisum* L., *Peganum harmala* L., Phenolic compound, flavonoids, HPLC, Antioxidant Activity.

الملخص

يعتبر كل من نباتي الحرمل و حبة حلاوة من بين النباتات الطبية العلاجية التي استعملت منذ القدم في الطب التقليدي, حيث عرفنا بخصائصها العلاجية وفي هذا السياق تم اجراء دراسة فيتو كيميائية لاهم المركبات الفينولية للنبتين ودراسة بيولوجية لمعرفة مدى نشاطها المضاد للأكسدة.

قمنا اولا باستخلاص المركبات الفينولية وفصلها في مراحل مختلفة وتقسيم المستخلص (مرحلة ايثيل دو بترول -ايثيل دي أثيليك اسيتات ايثيل)

و دراسة تحليلية للفلافونويدات بواسطة كروماتوغرافيا السائل العالي الاداء HPLC .

بين النشاط المضاد للاكسدة بواسطة DPPH ان هاتين النباتين تتمتعان بنشاط مضاد للاكسدة عالي وهذا النشاط يختلف في نبات الحرمل من البذور الي الساق والاوراق حسب المكونات الفينولية المتواجدة في كل جزء وهذا النشاط المضاد للاكسدة راجع الى غنى هاتين النباتين بالفلافونويدات .

و كشف تحليل HPLC ان بدور حبة الحلاوة (*Pimpinella anisum*) يمكن ان تحتوي على المركبات الفلافونويدية التالية: esculetine, rutine, quercétine و الاحماض الفينولية التالية: حمض salicylique و coumarine.

وان الجزء الهوائي لنبات الحرمل (*Peganum harmala*) يمكن ان تحتوي على المركبات الفلافونويدية التالية: rutine, و الاحماض الفينولية التالية: حمض ascorbique و حمض vanillique و epicatechine.

اما بدور لنبات الحرمل (*Peganum harmala*) يمكن ان تحتوي على المركبات الفلافونويدية التالية: quercitine

و rhamnitrine و الاحماض الفينولية التالية: حمض salicylique و kaempférol .

الكلمات المفتاحية : *Pimpinella anisum* , *Peganum harmala* , المركبات الفينولية , الفلافونويدات , HPLC , النشاط المضاد للاكسدة



Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Les résumés

Abréviation

Liste des figures

Liste des tableaux

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

Chapitre I: Synthèse bibliographique

Sous-Chapitre I : La phytothérapie et les plantes étudiées

I. La Phytothérapie

I.1. Définition de la phytothérapie.....	2
--	---

I.2. Différents types de la Phytothérapie.....	2
--	---

I.3. L'utilisation de la phytothérapie.....	4
---	---

I.4. Les plantes médicinales.....	4
-----------------------------------	---

I.5. Les méthodes de préparation des plantes médicinales.....	5
---	---

II. Les plantes médicinales étudiées

1. Peganum harmala

1.1. Description botanique.....	6
---------------------------------	---

1.2. Répartition géographique.....	7
------------------------------------	---

1.3. Classification botanique.....	8
------------------------------------	---

1.4. Les principes actifs majeurs.....	8
--	---

1.5. Usage traditionnel et courant.....	10
---	----

1.6. La toxicité.....	11
-----------------------	----

2. Pimpinella anisum

2.1 Description botanique.....	12
--------------------------------	----

2.2. Répartition géographique.....	12
------------------------------------	----

2.3. La classification.....	13
-----------------------------	----

2.4. Les principes actifs majeurs.....	13
--	----

2.5. Usage traditionnel et courant.....	13
---	----

2.6. Précautions d'emploi de l'anis vert.....	14
---	----

Sous-Chapitre II : Les composés phénoliques

1. Généralités.....	15
---------------------	----

2. biosynthèse des composés phénoliques.....	15
--	----

2.1. La voie de shikimate.....	15
--------------------------------	----

2.2. La voie de phénylpropanoïde.....	16
2.3. La voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	16
3. Principales classes des composés phénoliques.....	16
3.1. Les acides phénoliques simples.....	16
a. Acides hydroxycinnamiques	16
b. Acides hydroxybenzoïques.....	17
c. Coumarines.....	18
3.2. Les flavonoïdes.....	19
3.2.1. Généralités.....	19
3.2.2. Structure chimique et classification.....	19
3.2.3. Localisation Des Flavonoïdes.....	21
3.2.4. Biodisponibilité des flavonoïdes	21
3.2.5. Quelques propriétés des flavonoïdes.....	22
3.3. Les tannins	22
3.3.1. Généralités	22
3.3.2. Types et structures	22
a. Les tannins hydrolysables	23
b. Les tannins condensés.....	23
3.3.3. Propriétés pharmacologiques des tannins	23
4. Intérêt et Propriétés des flavonoïdes	24
4.1. Intérêts thérapeutiques des flavonoïdes.....	24
4.2. Activité des flavonoïdes contre le cancer.....	24
4.3. Activité antimicrobienne des flavonoïdes	25
4.4. Activité antibactérienne des flavonoïdes	25
4.5. Activité antifongique des flavonoïdes	26
4.6. Activité antivirale des flavonoïdes	27
4.7. Propriétés anti radicalaires.....	27
4.8. Propriétés anti-inflammatoires des flavonoïdes.....	28
Sous- Chapitre III : Chromatographie Liquide à Haute Performance	
1. Définition.....	29
2. Principe.....	29
3. Les organes.....	29
Sous- Chapitre IV : L'activité antioxydante	
1. Activité antioxydant	33

2. Définition d'un antioxydant	33
3. Principaux antioxydants.....	33
3.1. Les antioxydants endogènes.....	33
3.2. Les antioxydants exogènes.....	34
4. Définition d'un radical libre.....	35
5. Les utilisations des antioxydants.....	36
Chapitre II: Matériel et méthodes	
1 : Etude phytochimique	
1.1. Matériel végétal.....	37
1.2 Extraction des flavonoïdes.....	37
1.3. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	44
2. étude biologique	
Activité antioxydante	
-Test antiradicalaire (Test au DPPH)	46
-Préparation d'extrait.....	47
Chapitre III : Résultats et Discussion	
I.L'étude phytochimique	
1. <i>Pimpinella anisum</i>	
Résultats et discussion.....	48
2. <i>Peganum harmala</i>	
2.1. La partie aérienne	
Résultats et discussion	53
2.2. Les graines	
Résultats et discussion	57
II. Activité antioxydante	
Résultats et discussion	63
Conclusion et Perspective	65
Références bibliographique	66



Abréviations

A contrôle : Absorbance du contrôle

A échant : Absorbance des échantillons testés

ADN : Acide désoxyribose nucléique

CAT : Capacité antioxydant totale

C18 : Atome de carbone

DO : Densité optique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EGCG : Epigallacétchingallate

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

GABA : Acide Gamma Amino Butyrique

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

H₂O₂ : Peroxyde D'hydrogène

Me OH : Méthanol

NO. : Monoxyde d'azote

O₂' : Anion superoxyde

RL : Radical libre

SOD : Superoxyde dismutase

TR : Temps de rétention



Liste des Figures

Figure 01 : Arbuste de <i>Peganum harmala</i> L.....	6
Figure 02. Différents parties de l'espèce <i>Peganum harmala</i> L.	7
Figure 03 : Synthèse des β -carbolines de <i>Peganum harmala</i> L. et de la sérotonine à partir du Tryptophane.....	9
Figure 04 : Structure générale des quinazolines de <i>Peganum harmala</i> L.....	10
Figure 05 : Photo de <i>pimpinella anisum</i>	12
Figure 06 : Structure chimique de base des flavonoïdes.....	19
Figure 07 : Système d'HPLC.....	31
Figure 08: Agitation magnétique sur les 02 plantes.....	37
Figure 09: Filtration des extraits.....	38
Figure 10 : Evaporateur rotatif.....	38

Les affrontements de la plante *peganum harmala* (graine)

Figure 11: Phase éther de pétrole	40
Figure 12: Phase éther di éthylique.....	40
Figure13: Phase acétate d'éthyle.....	40

Les affrontements de la plante *pimpinella anisum* (graine)

Figure 14: Phase éther de pétrole	41
Figure 15: Phase éther di éthylique.....	41
Figure 16: Phase acétate d'éthyle.....	41

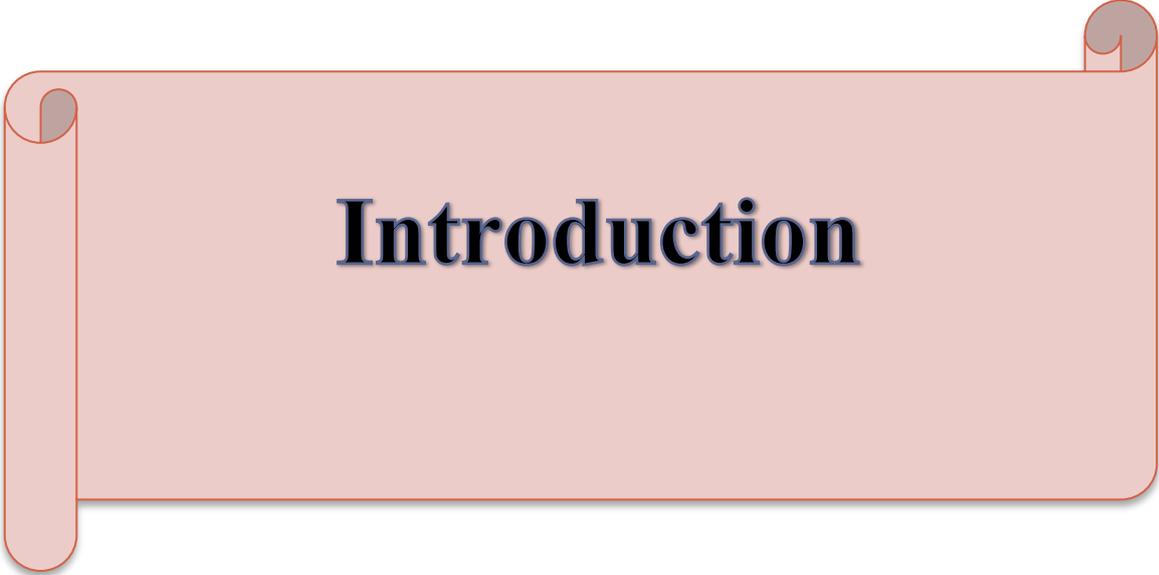
Les affrontements de la plante *Peganum harmala* (feuille)

Figure17: Phase éther de pétrole.....	42
Figure 18: Phase éther di éthylique.....	42
Figure 19: Phase acétate d'éthyle.....	42
Figure 20 : Protocole d'extraction des flavonoïdes.....	43
Figure21 : photo de lyophilisateur.....	45
Figure22 : Récupération des échantillons pour injection.....	45
Figure23 : Forme radicalaire et réduite du DPPH	46
Figure24 : Chromatogramme d'HPLC des graines de <i>Pimpinella anisum</i> enregistré à 280nm.....	50
Figure 25: Chromatogramme d'HPLC des graines de <i>Pimpinella anisum</i> enregistré à 325nm.....	52
Figure26 : Chromatogramme d'HPLC de la partie aérienne de <i>Peganum harmal</i> enregistré à 280nm	54
Figure27 : Chromatogramme d'HPLC de la partie aérienne de <i>Peganum harmala</i> enregistré à 325nm.....	56
Figure28 : Chromatogramme d'HPLC des graines de <i>Peganum harmala</i> (graines) enregistré à 280nm.....	58
Figure29 : Chromatogramme d'HPLC des graines de <i>Peganum harmala</i> (graines) enregistré à 325nm.....	60
Figure30 : l'activité antioxydante des graines et de la partie aérienne de l'espèce <i>Peganum harmala</i> à 1 mg/ml.....	64
Figure31 : l'activité antioxydante des espèces <i>Pimpinella anisum</i> et <i>Peganum harmala</i> à 1mg/ml.....	65



Liste des tableaux

Tableau 01: Principaux acides hydroxycinnamiques.....	17
Tableau 02 : Principaux acides hydroxybenzoïques.....	18
Tableau 03 : Principaux types de coumarines.....	18
Tableau04: Principales classes des flavonoïdes.....	20
Tableau05 : Temps de rétention des acides phénoliques présents dans les extraits des graines de <i>Pimpinella anisum</i> à longueur d'onde 280nm.....	50
Tableau06 : Temps de rétention des flavonoïdes présents dans les extraits des graines de <i>Pimpinella anisum</i> à longueur d'onde 325nm.....	50
Tableau07 : Temps de rétention des acides phénoliques présents dans les extraits de la partie aérienne de <i>Peganum harmala</i> à longueur d'onde 280nm.....	53
Tableau08 : Temps de rétention des flavonoïdes présents dans les extraits de la partie aérienne de <i>Peganum harmala</i> à longueur d'onde 325nm.....	55
Tableau09 : Temps de rétention des acides phénoliques présents dans les extraits des graines de <i>Peganum harmala</i> à longueur d'onde 280nm.....	57
Tableau10 : Temps de rétention des acides phénoliques présents dans les extraits des graines de <i>Peganum harmala</i> à longueur d'onde 325nm.....	59
Tableau 11: Temps de rétention (tr) des acides phénoliques standards (280nm).....	61
Tableau12 : Temps de rétention (tr) des flavonoïdes standards (325nm).....	62
Tableau13 : Résultat des activités antioxydantes des deux espèces.....	63



Introduction

Introduction

L'histoire de la phytothérapie remonte aux origines de l'humanité. Depuis longtemps, les hommes récoltent les plantes, non seulement pour se nourrir, mais aussi pour soulager leurs maux.

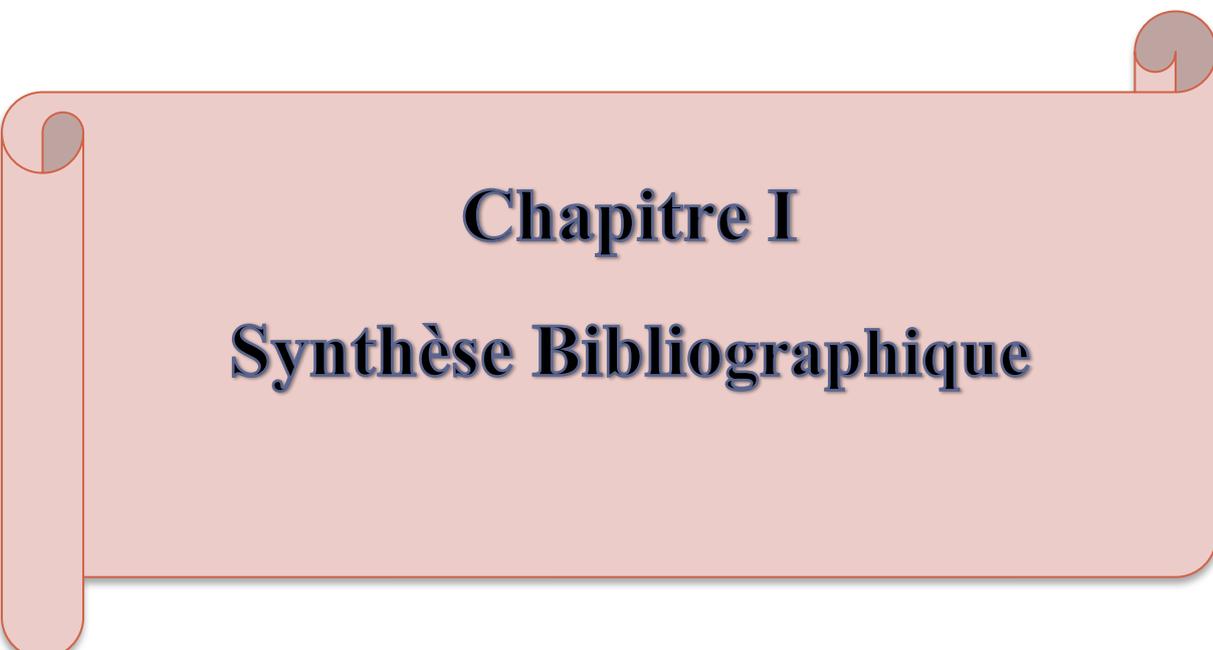
Aujourd'hui, et lorsqu'on commence à prendre conscience de nos corps, on rejette certains médicaments modernes à causes de leurs effets secondaires puissants, et on les remplace par la médecine traditionnelle, qui est répondu partout dans le monde, non seulement chez les populations en développement, mais aussi des pays très développés.

L'objectif de notre travail vise à démontrer la richesse de nos plantes *Pimpinella anisum* et *Peganum harmala* en flavonoïdes grâce à une étude phytochimique basée principalement sur l'extraction des composés phénoliques et une identification des flavonoïdes et acide phénoliques contenus dans ces deux plantes par la technique de chromatographie liquide à haute performance.

Le premier chapitre est consacré à la synthèse bibliographique, cette synthèse rappelle les définitions de la phytothérapie et plantes médicinales étudiées et leur utilisation ainsi que la technique utilisée dans cette étude

Le deuxième chapitre parle du matériel utilisé et des méthode pratiquées et explique la partie expérimentale par une présentation de l'extraction et de la chromatographie réalisées afin de pouvoir déterminer les polyphénols qui pourraient exister chez les espèces *Pimpinella anisum* et *Peganum harmala*, ainsi qu'un test de DPPH de l'activité antioxydant.

Le troisième chapitre présente les résultats obtenus qui seront suivis d'une discussion et d'une conclusion générale.



Chapitre I
Synthèse Bibliographique

Sous-Chapitre I: la phytothérapie et plantes étudiées

I. La phytothérapie

1. Définition de la phytothérapie

La phytothérapie du mot grec « phyto » : plantes ; « thérapie » : traitement qui signifie traitement par les plantes. Elle repose sur l'utilisation des plantes médicinales.

En générale la plupart des médicaments sont issus des plantes par l'extraction de la partie utilisée (racine, feuille, écorce, fruit...) et contenant le ou les principes actifs.

L'extrait est ensuite purifié par plusieurs techniques et protocoles pour obtenir un principe actif isolé. (Sabin, 2012).

La phytothérapie utilise sur les plantes par leur constituant chimiques y compris les oligoéléments, vitamines (par exemple : la prêle qui est très riche en silice, le chou qui est très riche en soufre et en vitamines C). (Moattir *et al.*, 1983).

La phytothérapie requiert une connaissance parfaite des composants chimiques contenus dans un organe végétale et une bonne connaissance des modes d'emploi par exemple : l'infusion décoction...

Selon quelques savants la phytothérapie est considérée comme une médecine douce, parce qu'elle a une toxicité très réduite. (Anonyme1).

2. Différents types de phytothérapie

De nos jours, dans les pays occidentaux, il existe plusieurs spécialités, éventuellement combinées entre elles, qui utilisent les plantes à des fins médicales.

- **L'aromathérapie** : est une thérapeutique qui utilise les essences des plantes, ou huiles essentielles, substances aromatiques sécrétées par de nombreuses familles de plantes telles que, les astéracées, les lamiacées ou les opiacées, et extraites par distillation. Ces huiles sont des produits complexes à utiliser avec précaution et en respectant les doses prescrites, car ils ne sont pas totalement sans danger.

- **La gemmothérapie** : est fondé sur l'utilisation d'extraits alcooliques et glycerinés de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les racelles appartenant à environ 60 plantes différentes. Les préparations sont présentées diluées au dixième. Chaque extrait est réputé d'avoir une affinité pour un organe ou une fonction.
- **L'herboristerie** : correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. Après être tombée en désuétude, elle est de nos jours reprise en considération. L'herboristerie se sert de la plante fraîche ou séchée ; elle utilise soit la plante entière, soit une partie de celle-ci (écorce, fleur, fruit, racine). La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération. Ces préparations sont bues ou inhalées, appliquées sur la peau ou ajoutées à l'eau d'un bain. Elles existent aussi sous forme plus moderne de gélules de poudre de plantes sèches, que le sujet avale. Cette présentation a l'avantage de préserver les principes actifs, qui sont fragiles. Pour que le traitement soit efficace en profondeur, les prises doivent s'étaler sur une période allant de 3 semaines à 3 mois.
- **L'homéopathie** : a recours aux plantes d'une façon prépondérante, mais non exclusive : les trois quarts des souches sont d'origine végétale, le reste étant d'origine animale et minérale. Les plantes sont utilisées fraîches en macération alcoolique. Ces alcoolats sont appelés teintures mères : c'est à partir de ces alcoolats que sont préparées les dilutions qui servent à imprégner les grains de saccharose et de lactose que sont les granules et les globules.
- **La phytothérapie chinoise** : fait partie d'un ensemble appelé « médecine traditionnelle chinoise » qui inclut l'acupuncture et la diététique chinoise. Cette phytothérapie vise à modifier les quantités de différentes énergies ou le circuit de ces énergies dans l'organisme.
- **La phytothérapie pharmaceutique** : utilise des produits d'origine végétale obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présentés comme toute autre spécialité pharmaceutique sous forme de sirop, de gouttes, de suppositoires, de gélules, de lyophilisats, de nébulisats (extraits de

Plantes desséchées par la chaleur), etc. Les concentrations sont assez élevées et la non-toxicité de ces médicaments est parfois relative. (Strang, 2006).

3. Utilisation de la phytothérapie

La phytothérapie se donne un champ d'action sur de nombreux troubles, à titre préventif et curatif. Elle traite la cause du mal et non pas seulement ses symptômes. Son emploi s'appuie sur les connaissances traditionnelles, sur l'analyse des principes actifs des plantes et la compréhension de leur mode d'action, ainsi que sur les résultats constatés par les malades. Cependant, la phytothérapie n'a pas les mêmes bases scientifiques que la médecine moderne officielle, et il est impossible de la recommander pour des affections graves ni quand il existe un traitement moderne plus efficace. (Iserin *et al.*, 2001)

4. Les plantes médicinales

Une plante médicinale est une plante utilisée pour ses propriétés thérapeutiques. Cela signifie qu'au moins une de ses parties (feuille, tige, racine etc.) peut être employée dans le but de se soigner. Leur efficacité relève de leurs composés, très nombreux et très variés en fonction des espèces, qui sont autant de principes actifs différents.

En France, Il existe une définition officielle des plantes médicinales : celles inscrites à la Pharmacopée. Selon le Code de la santé publique, la pharmacopée est la nomenclature des drogues, des médicaments simples et composés, des articles officinaux... Il existe une pharmacopée dans chaque pays et aussi au niveau européen. Les plantes médicinales inscrites à la pharmacopée sont considérées comme des médicaments. Leur vente est exclusivement réservée aux pharmaciens et aux herboristes, et qui correspondent souvent aux plantes aromatiques utilisées dans les préparations culinaires.

La phytothérapie est le traitement (médecine parallèle ou traditionnelle) par les plantes, c'est-à-dire par la consommation ou l'utilisation en voie externe, de produits préparés à partir de plantes, sans passer par une étape de sélection des molécules ; on ne consomme donc pas que le principe actif, mais tout ce que contient la plante. Remarque : à ne pas confondre avec la phytopharmacie qui désigne l'ensemble des substances utilisées pour traiter les plantes : pesticides, fongicides, herbicides, insecticides... (Axel *et al.*, 2000)

5. Les méthodes de préparation des plantes médicinales

Pour préparer des tisanes, il faut avoir une connaissance des propriétés des plants et son utilisation médicale (phytothérapie de la plante, les molécules actives, les maladies) (Thurzova, 1978).

➤ **Décoction :**

Méthode de préparation de tisane consistant à faire bouillir la plante dans l'eau pendant 5 à 15 minutes, puis à filtrer le liquide obtenu (le décocté).

Cette technique est adaptée aux parties dures et compactes (bois, écorces, tiges, racines) qui ne délivrent leurs principes actifs que sous l'action prolongée de la chaleur.

Les décoctions sont bues ou quelque fois utilisées en usage local (gargarismes, collyres). (Algo vision, 1997).

➤ **Infusion :**

Méthode de préparation de tisane consistant à verser de l'eau bouillante sur les plantes ; après 5 à 10 minutes dans un récipient couvert, l'ensemble est filtré pour donner l'infusée.

L'infusion est adaptée aux parties des plantes délicates : feuilles, fleurs, sommités fleuries. Les infusions sont bues ou quelque fois utilisées en usage local (gargarismes, collyres) ou en usage externe (bains, lotions). (Algo vision, 1997).

➤ **Macération :**

Solution obtenue en traitement pendant un temps plus ou moins long, une plante par l'eau froide, du vin, de l'alcool, pour en obtenir les principes solubles (selon les cas, de quelques heures à plusieurs jours par fois plusieurs semaines). (Valnet, 1983).

➤ **Broyage :**

Les préparations galéniques sont souvent administrées sous formes de poudre (utiliser lorsqu'on est en voyage).

II. Les plantes médicinales étudiées

1. *Peganum harmala*

1.1. Description botanique

Peganum harmala est une plante de la famille des *Zygophyllacées*, appelé en arabe (الحرمل)

Le Harmal est une plante vivace, glabre, buissonnante de 30 à 90 cm de hauteur à rhizome épais, à odeur forte, désagréable qui rappelle celle de la rue. Les tiges dressées, très rameuses disparaissent l'hiver; elles portent des feuilles alternes, découpées en lanières étroites. Les fleurs solitaires, assez grandes (25 à 30 mm), d'un blanc-jaunâtre veinées de vert sont formées de: cinq sépales verts, linéaires, persistants qui dépassent la corolle, cinq pétales elliptiques, dix à quinze étamines à filet très élargi dans leur partie inférieure, l'ovaire, globuleux, repose sur un disque charnu et aboutit à un fruit qui est une capsule sphérique, à trois loges, de 6 à 8 mm déprimée au sommet, entourée de sépales persistants et s'ouvrant par 3 ou 4 valves pour libérer les graines.

Les graines: nombreuses, petites, anguleuses, subtriangulaires, de couleur marron foncé, dont le tégument externe est réticulé, ont une saveur amère; on les récolte en été (Chopra et al, 1960; Quezel& Santa, 1963; Ozenda, 1977).



Figure 1 : Arbuste de *Peganum harmala* L. (Anonyme2)

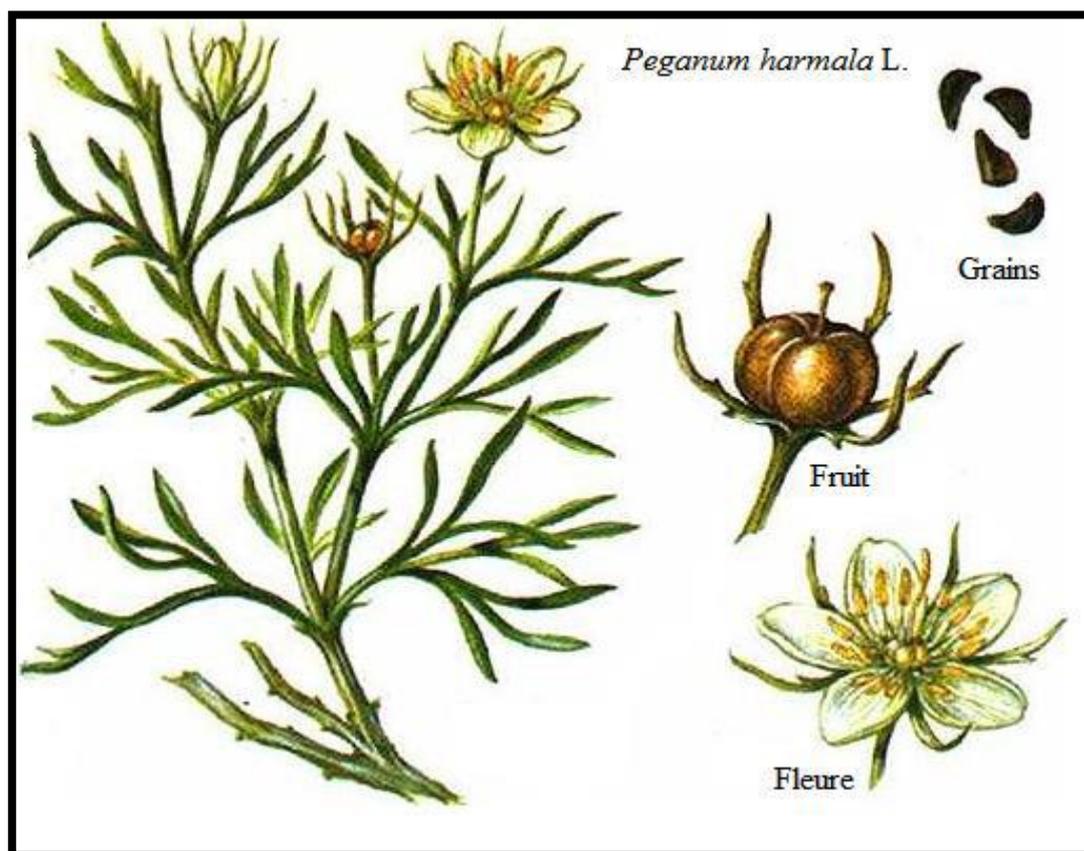


Figure 2. Différents parties de l'espèce *Peganum harmala* L. (Anonyme3).

1.2. Répartition géographique

Espèce cosmopolite très commune sur les sols sableux et un peu nitrés, elle pousse en Europe australe et austro-orientale, Asie mineure, Tibet, Iran, Turkestan, Syrie, Arabie, Egypte et en Afrique du Nord. (Yousefi et *al*, 2009).

En Algérie, *P. harmala* L. est commune aux hauts plateaux, au Sahara septentrional et méridional, et aux montagnes du Sahara central. Il est réputé pour les terrains sableux, dans les lits d'oued et à l'intérieur des agglomérations (Maire, 1933; Chopra et *al*. 1960 et Ozenda, 1991).

En Afrique, particulièrement répandue dans les zones arides méditerranéennes (Maroc oriental, Sahara septentrional et hauts plateaux Algériens, Tunisie, steppes de la Lybie, déserts

D’Egypte).

En Europe , très commune dans les zones sèches (Espagne, steppes de la Russie méridionale, Hongrie); Asie: répandue dans les steppes de l’Iran, du Pakistan, du Turkestan jusqu’au Tibet et en Sibérie (Chopra et *al.*, 1960; Paris & Dilleman, 1960; Quezel & Santa, 1963; Ozenda, 1977; Bézanger-Beauquesne et *al.*, 1980)

1.3. Classification botanique

Selon Moghadam *et al.*, (2010), la classification de cette espèce est comme suit :

Règne	<i>Plantes</i>
Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Sous embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	Eudicots
Sous classe	Malvides
Ordre	Sapindales
Famille	<i>zygophyllacées</i>
Genre	<i>Peganum</i>
Espèce	<i>Peganum harmala</i> L.

1. 4. Les principes actifs majeurs

Les constituants chimiques de la plante sont les suivants :

- **Acides aminés** : phénylalanine, valine, proline, thréonine, histidine, acides glutamique et carbo-hydrates.
- **Flavonoïdes** : coumarines, bases volatiles, tanins, stérols.
- **Pigment** : le tégument externe de la graine renferme un pigment rouge dit « Turkey Red » et un composé fluorescent.
- **Des alcaloïdes** qui ont un noyau indole: harmane, harmine, harmaline, harmalol (harmol) qui représentent les principales toxines. Le taux d'alcaloïdes est beaucoup plus élevé dans la graine que la racine, la tige, et la feuille, cette teneur s'élève en été durant la maturité du fruit. (Kartal *et al.*, 2003)

➤ Les alcaloïdes de *Peganum harmala* L.

L'espèce *Peganum harmala* est très riche en alcaloïdes indoliques (dérivés de l'acide aminé Tryptophane) de type β -carboliniques (**Figure 3**). Les plus importants sont l'Harmaline, l'Harmane, l'Harmine et le Tetrahydroharmine (THH) (Kartal *et al.*, 2003).

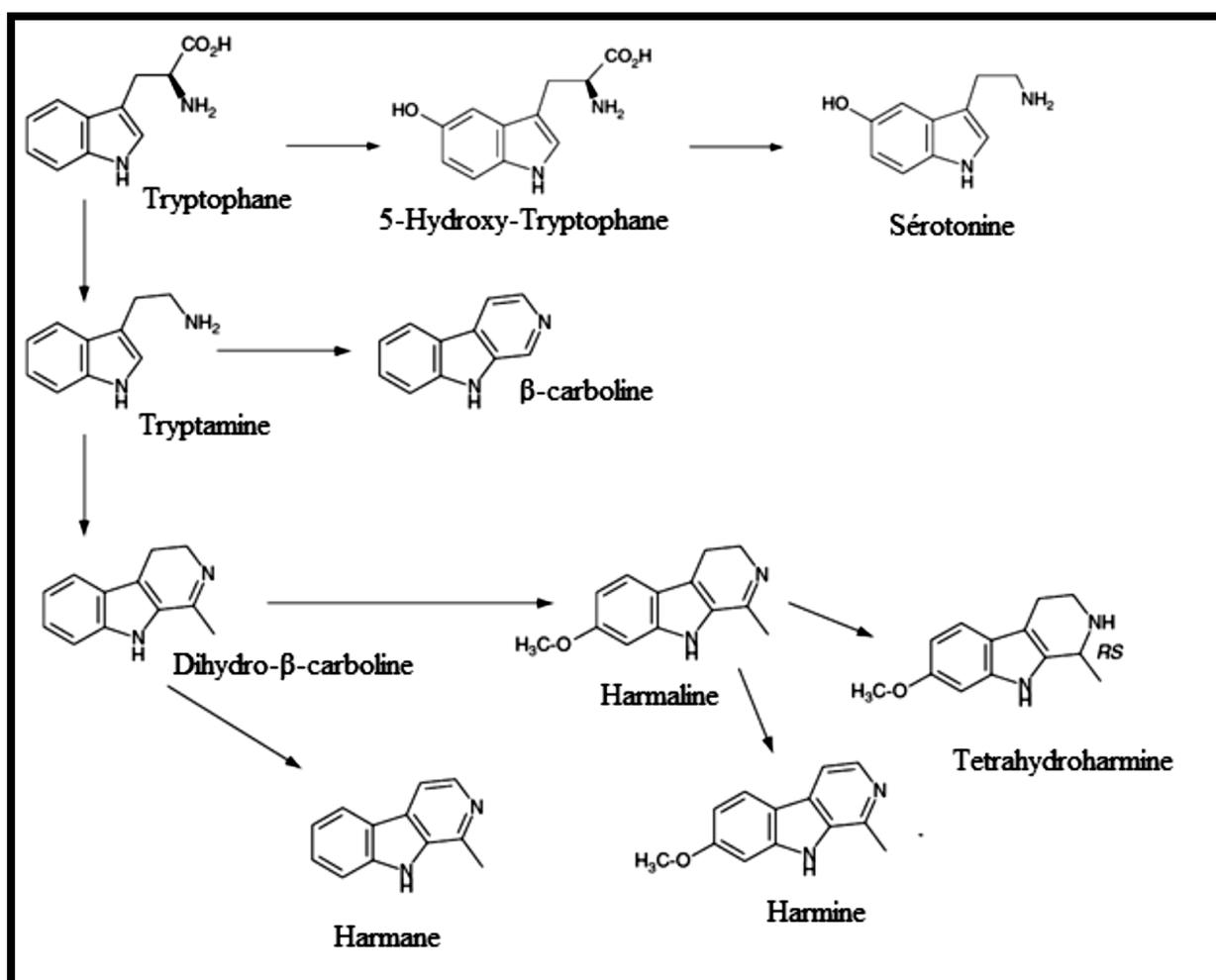


Figure3 : Synthèse des β -carboline de *Peganum harmala* L. et de la sérotonine à partir du Tryptophane. (Aniszewski, 2007).

Les graines de *Peganum harmala* contiennent également une autre classe d'alcaloïdes, les quinazolines, dont le précurseur est l'acide anthranilique et qui sont représentés par la Péganine, le Vasicinone (**Figure4**), et la Desoxypéganine (Khashimov *et al.*, 1969 ; Zharekeev *et al.*, 1974).

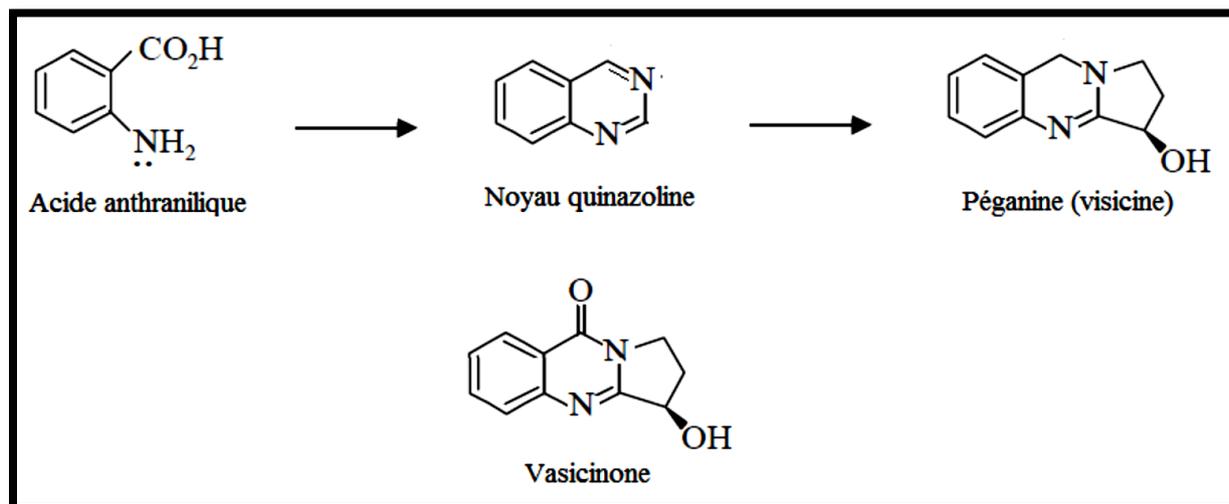


Figure4 : Structure générale des quinazolines de *Peganum harmala* L. (Aniszewski, 2007).

1.5. Usage traditionnel et courant

Le Harmal est emménagogues, abortives, hypnotiques, antalgiques, antiseptiques, hypnotique, antipyrétique, antalgique, antitussif, antiseptique et cicatrisant possède une action contre: coliques, troubles digestifs, stérilité féminine, dermatoses et brûlures, conjonctivites

a) Usage externe : La plante fraîche est employée en cataplasme, soit après extraction du suc pour la composition d'un liniment à base de graisse de mouton, plante sèche ou graines sous forme de fumigations.

L'huile de graines est obtenue par décoction de graines dans l'huile d'olive. Les préparations en usage externe sont préconisées surtout pour le traitement de rhumatisme. (Aouadhi, 2010)

b) Usage interne : pour l'hypertension et le diabète : Une cuillère à café de graines, soit environ 2.5 g, avalés telles quelles avec un verre d'eau ou mélangées au miel ou pilées avec de l'huile d'olive, est recommandé en cas d'anurie, de dysurie, d'hypertension ou de diabète.

La plante fraîche hachée et bouillie dans l'huile et les feuilles sèches en décoction sont signalées pour leurs propriétés antipyrétiques et sont efficaces pour traiter le rhume et la carie dentaire. La plante sèche pulvérisée et tamisée est utilisée contre la conjonctivite purulente, la blépharite et dans le traitement de l'eczéma. (Aouadhi, 2010)

1.6. La toxicité

Les doses élevées peuvent provoquer la paralysie. Les graines de harmal renferment en moyenne de 3 à 4% d'alcaloïdes avec une brusque élévation de ce taux à la phase de mûrissement du fruit. Ces alcaloïdes sont au nombre de quatre : Harmane, Harmine, Harmaline et Harmalol ou Harmol. Leur structure chimique, parfaitement connue, associe un noyau indole à un noyau pyridine. Elle conditionnerait l'effet stimulant du système nerveux central des quatre alcaloïdes. La spécificité de l'action d'un alcaloïde par rapport à l'autre serait, par contre, en rapport avec la variation des radicaux et du nombre de doubles liaisons portées par le cycle commun. C'est cette variation qui expliquerait les nuances constatées au niveau des mécanismes d'action : Les Harmane, Harmine et Harmaline exerceraient :

- soit un blocage direct des récepteurs cérébraux GABAergiques (Acide Gamma Amino Butyrique) et donc de leur médiation inhibitrice, produisant un effet stimulant qui serait responsable de l'élévation du tonus musculaire et au maximum de convulsions,
- soit une facilitation de l'accès aux récepteurs GABAergiques d'une substance endogène qui serait du thromboxane A₂, dérivée des prostaglandines, et qui pourrait jouer un rôle important dans la régulation des mouvements calciques neuronaux et donc de l'excitabilité neuronale, Quoiqu'il en soit ces alcaloïdes prédisposeraient aux modifications des conductances membranaires sodiques et/ou calciques.

La Harmine et la Harmaline exerceraient une action anti-cholinergique centrale pouvant expliquer la crise d'agitation et les manifestations digestives observées.

La Harmane et Harmaline exerceraient une action inhibitrice du système Dopaminergique central induisant une sédation et des perturbations du sommeil paradoxal. (Aouadhi, 2010)

2. *Pimpinella anisum*

2.1 Description botanique

Pimpinella anisum est une plante de la famille *Apiacées*, appelé en arabe حبة حلاوة et en français L'anis vert c'est une plante herbacée, annuelle ou bisannuelle. Elle mesure entre 50 et 80 cm de hauteur, à tiges dressées creuses. Les feuilles sont vertes, alternes, longuement pétiolées et composées de trois folioles. Les fleurs sont petites et blanches, groupées en ombelles. Les fruits sont des graines très parfumées, de couleur gris verdâtre. (Chehema, 2006).



(a)



(b)

Figure 5 : Photo de *Pimpinella anisum* (a): (Anonyme 5) et (b): (Imami et Tourirat, 2016)

2.2. Répartition géographique

L'anis vert (*Pimpinella anisum* L.) est une plante originaire du Moyen-Orient et elle est connue depuis l'Égypte ancienne (Arslan, 2004). Elle pousse dans la Turquie, l'Iran, l'Inde, l'Égypte et d'autres nombreuses régions chaudes du monde. (Gülçin, 2003).

2.3. La classification

La classification de la plante de *Pimpinella anisum* (Boukri, 2014).

Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Apiales</i>
Famille	<i>Apiaceae</i>
Genre	<i>Pimpinella</i>
Espèce	<i>Pimpinella anisum</i>

2.4. Les principes actifs majeurs

Le rendement de l'anis peut sensiblement varier selon les conditions écologiques telles que la température, les précipitations et la fertilité des sols. Des études antérieures ont montré quels effets de l'espacement de ligne, l'approvisionnement en eau, la fertilisation, l'époque des semis, la densité de semis sur le rendement des graines d'anis et de leurs qualités. (Ullah et al ,2014).

Les graines de *Pimpinella anisum* contiennent :

Sesquiterpènes, acides phénoliques, furocoumarines, huile essentielle à base d'anéthol, sucres, amidon, flavonoïdes, résine, acide malique. (Cengiz ,2008).

2.5. Usage traditionnel et courant

En tisane, laisser infuser 3 g de graines séchées dans 150 ml d'eau chaude. Boire 1 tasse, trois fois par jour. En cas de troubles digestifs, boire 1 tasse, trente minutes avant les repas.

Graines séchées : prendre une cuillère de graines après le repas, pour favoriser la digestion et diminuer les troubles digestifs.

Huile essentielle en inhalation, diluer quelques gouttes d'huile essentielle dans un bol d'eau bouillante et en inhaler les vapeurs, en traitement du rhume et des bronchites. (Hallard, 1988)

2.6 .Précautions d'emploi de l'anis vert

Certaines personnes peuvent être allergiques à l'anis vert ou à l'anéthol.

L'anis vert est contre-indiqué aux femmes enceintes et aux personnes asthmatiques. L'anéthol peut passer dans le lait, c'est pourquoi les femmes qui allaitent devront demander conseil à leur médecin. L'anis vert est également déconseillé chez les enfants de moins de douze ans.

L'anis vert peut entraîner des réactions allergiques, cutanées ou respiratoires. Un surdosage d'huile essentielle peut causer des nausées, des vomissements, des convulsions, voire un oedème du poumon. (Aouadhi ,2010).

Sous-Chapitre II: Les composés phénoliques

1. Généralités

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement.

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules.

Les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (Urquiaga et Leighton, 2000).

Les composés phénoliques peuvent constituer des signaux de reconnaissance entre les plantes, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel. D'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales (Macheix *et al.*, 2005).

2. Biosynthèse des composés phénoliques

2.1. La voie de Shikimate

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde (Yao *et al.*, 1995).

2.2. La voie des phénylpropanoïdes

La voie de phénylpropanoïde commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose.

2.3. La voie de biosynthèse des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, ils possèdent le même élément structural de base. L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation, catalysée par la chalconesynthase, d'une unité phényle propanoïde avec trois unités malonyl-CoA. Cette chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la synthèse des divers flavonoïdes (Bruneton, 1999).

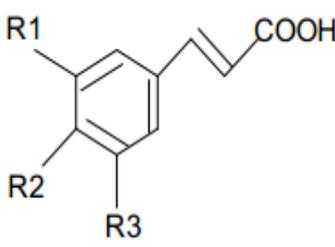
3. Principales classes des composés phénoliques

3.1. Les acides phénoliques simples

a. Acides hydroxycinnamiques

Ils dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C6-C3). Ils existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent une réactivité chimique importante de ces molécules (**Tableau I**).

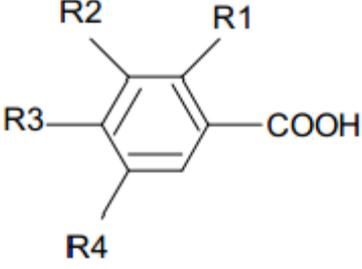
Tableau 01: Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

b. Acides hydroxybenzoïques

Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C6--C1). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides. Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans le **Tableau II**

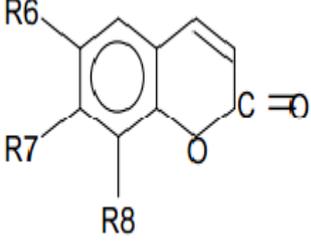
Tableau 02 : Principaux acides hydroxybenzoïques(Sarni-Manchado et Cheynier,2006)

Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy Benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide Protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

c. Coumarines

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique (**Tableau III**).

Tableau 03 : Principaux types de coumarines (Macheix *et al*, 2005)

Structure	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH3	OH	H	Scopolétole
	OCH3	OH	OH	Fraxétole
	H	OH	OH	Daphnétole

3.2. Les flavonoïdes

3.2.1. Généralités

Le nom flavonoïde proviendrait du terme *flavedo*, désignant la couche externe des écorces d'orange (Piquemal, 2008), cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du *flavus* ; (*flavus* = jaune) (Male_Év et Kunti_ç., 2007).

Les flavonoïdes ont été désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes (Nijveldt *et al.*, 2001).

3.2.2. Structure chimique et classification

La structure de base des flavonoïdes est le noyau du flavone (2-phenyl-benzo- γ -pyrane) mais de point de vue classification, le groupe des flavonoïdes peut être divisé en plusieurs catégories. Cette division dépend de l'hydroxylation du noyau du flavonoïde aussi bien que du sucre lié.

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, et de ce fait, possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement phenyl-2chromane. Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation de noyau pyranique central (Krishna *et al.* 2001).

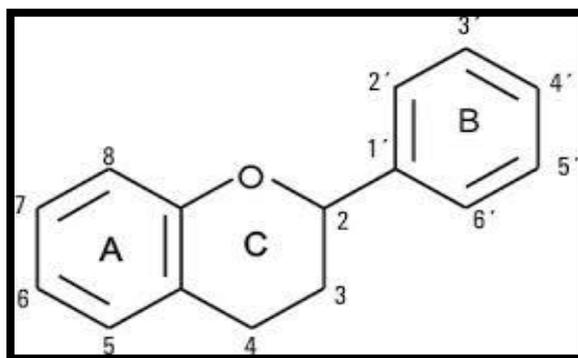
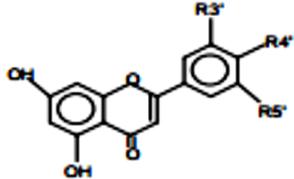
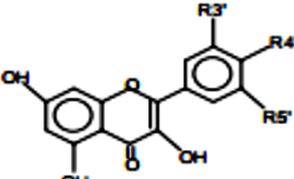
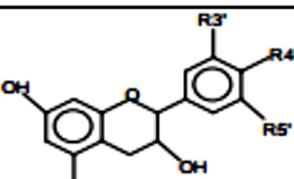
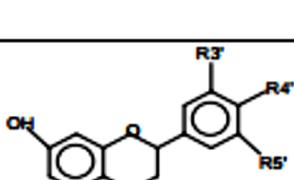
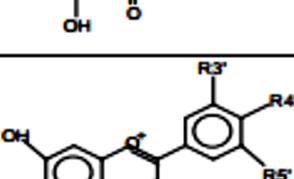
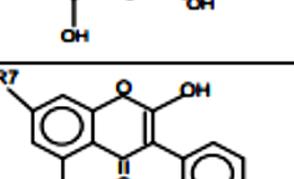


Figure6 : Structure chimique de base des flavonoïdes (Krishna *et al.*, 2001).

Tableau04: Principales classes des flavonoïdes (Narayana *et al.*, 2001; W- Erdman *et al.*, 2007)

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidezine

3.2.3. Localisation Des Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. On signale environ 2% de la proportion du carbone photosynthétique global incorporé dans la biosynthèse flavonique. Ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs. De plus, leur localisation au sein de la plante est caractéristique. En effet, les flavonoïdes sont omniprésents dans les organes aériens jeunes où ils sont localisés dans les tissus superficiels (Remsy *et al.*, 1996).

Au niveau cellulaire, on a observé que les flavonoïdes, sous forme d'hétérosides, sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux. Lorsque les flavonoïdes sont présents dans la cuticule foliaire, il s'agit presque toujours de génines libres dont la lipophilie est accrue par la méthylation partielle ou totale des groupes hydroxyles (Bruneton., 1993).

Ils sont largement abondants dans les légumes feuillés (salade, choux, épinards, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits. On les trouve principalement dans les agrumes : citrons, orange, pamplemousses et dans une moindre mesure : abricots, cerises, mûres, raisins, papayes, tomates et sarrasin. On en trouve également en quantité importante dans nombreuses plantes médicinales et très spécifiquement dans les herbes aromatiques comme le thym, le persil, le romarin et le céleri (Bronner et Beecher, 1995).

3.2.4. Biodisponibilité des flavonoïdes

Les effets des flavonoïdes sur la santé ne dépendent pas seulement de leurs niveaux de consommation mais aussi de leur biodisponibilité. Peu d'études systématiques ont été menées sur la pharmacocinétique des flavonoïdes chez l'homme. Toutefois, d'après des expériences menées sur des flavonoïdes provenant de l'alimentation, il apparaît que seuls les flavonoïdes sous forme de génines (ou aglycones) sont susceptibles d'être absorbés. L'hydrolyse des liaisons hétérosidiques (reliant la génine à la chaîne sucrée) n'intervient que dans le côlon où les micro-organismes dégradent simultanément les flavonoïdes d'origine alimentaire. Le foie est largement impliqué dans le métabolisme des flavonoïdes absorbés, Une meilleure connaissance de la biodisponibilité des flavonoïdes est indispensable pour expliquer leurs effets protecteurs sur la santé (Walle, 2004).

3.2.5. Quelques propriétés des flavonoïdes

Les flavonoïdes protègent les plantes contre les radiations UV, elles sont également impliquées dans les processus de défense de la plante contre les infections bactériennes et virales. Agissent comme des pigments ou des co-pigments. Ils peuvent moduler la distribution d'auxine, et fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire. Ils sont à l'origine des goûts amers et astringents afin de repousser les animaux herbivores (Subramanian *et al.*, 2007).

3.3. Les tannins

3.3.1. Généralités

Les tannins sont des composés phénoliques très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes (tannins condensés) et les dicotylédones (tannins hydrolysables). Ces composés ont la capacité de se combiner et de précipiter les protéines. Ces combinaisons varient d'une protéine à une autre selon les degrés d'affinités. (Harborne., 1997).

Le terme tannin vient de la source de tannins utilisée pour le tannage des peaux d'animaux en cuir. Dans ce processus, les molécules de tannins se lient aux protéines par des liaisons résistantes aux attaques fongiques et bactériennes. Le poids moléculaire des tannins varie entre 500 et 2000 K Da (3000 pour les structures les plus complexes) (Hagerman et Butler., 1981).

Dans notre alimentation, l'astringence est la qualité organoleptique qui indique la présence des tannins. Elle a un rôle important dans le choix des aliments (corrélation inverse entre les espèces végétales choisies et leur teneur en tannins) (Larwence et *al.*, 1984).

3.3.2. Types et structures

Selon la structure, on a deux types de tannins : les tannins hydrolysables et les tannins condensés, dits aussi : proanthocyanidines.

a. Les tannins hydrolysables

Sont formés par liaison de plusieurs acides galliques à un carbohydrate (généralement le glucose). On parle de gallotannins. Aussi des unités galloyles peuvent être ajoutées par liaisons esters, généralement en position C3 de l'acide gallique. Et les unités d'acide gallique voisines s'accouplent formant les esters d'acide hexahydroxydiphénique, dits : ellagitannins. Ces deux groupes, les gallotannins et les ellagitannins sont appelés tannins hydrolysables. Comme leur nom l'indique, ces composés peuvent être dégradés en fragments simples (acides phénols et sucres). L'acide gallique provient de la β -oxydation des composés C6-C3, comme l'acide coumarique ou les acides oxygénés correspondants. Mais, l'acide shikimique est considéré comme le meilleur précurseur (Seigler., 1998).

b. Les tannins condensés

Ce sont des proanthocyanidines, composés phénoliques hétérogènes : dimères, oligomères ou polymères du flavanes, flavan-3-ols, 5-flavanols, 5-deoxy-3-flavanols et flavan-3,4-diols (Sarni-Manchado et Cheynier., 2006).

Les deux groupes majeurs des proanthocyanidines sont les procyanidines et les prodelphinidines. Les monomères constitutifs des procyanidines sont la catéchine et l'épicatéchine qui peuvent être substituées par l'acide gallique ou des sucres, généralement en position 3 ou plus rarement en position 7. Ces monomères de prodelphinidines sont la gallocatéchine et l'épigallocatéchine, mais on distingue également des monomères de quercétine et de myricétine (Andersen et Markham., 2006).

En s'hydrolysant, les tannins condensés ne donnent pas de composés simples comme le glucose ou les acides phénols comme c'est le cas pour les tannins hydrolysables, mais plutôt des anthocyanidines (Andersen et Markham, 2006).

3.3.3. Propriétés pharmacologiques des tannins

Plusieurs observations, chez les humains comme chez les animaux des laboratoires suggèrent que les tannins exhibent un large spectre de propriétés pharmaceutiques, thérapeutiques et chimioprotectrices dues à leur propriété antiradicalaire (Tohge *et al.*, 2005).

En effet, les tannins protègent contre les toxicités induites par différents agents (hydrogène peroxyde, acétaminophène, extraits contenus dans la fumée du tabac...), contre

l'hypercholestérolémie et les changements de la formule sanguine. Ils jouent aussi un rôle dans la prévention contre les deux formes de mort cellulaire connues, apoptose et nécrose, diminuant ainsi les dommages causés dans l'ADN lors de ces deux dernières. L'action cytoprotectrice des proanthocyanidines est supérieure à celle des vitamines C, B et bêta-carotène (Ray *et al.*, 2000).

4. Intérêt et Propriétés des flavonoïdes

4.1. Intérêts thérapeutiques des flavonoïdes

Les composés phénoliques et les antioxydants généralement exercent des effets favorables sur la santé des personnes telle que la protection contre la maladie cardio vasculaire, l'activité anti-inflammatoire et les effets anticancéreux. (Spigno *et al.*, 2008).

Les intérêts thérapeutiques des flavonoïdes ont maintes fois été démontrés. Pour citer quelques exemples, nous pouvons dire que :

Des expériences menées sur des souris ont montré que la quercétine et la quercétrine avaient une activité anti diarrhéique très importante. Le mécanisme de ces composés consistait à augmenter l'absorption des électrolytes et de l'eau par la muqueuse intestinale (Galvez *et al.*, 1993a, Galvez *et al.*, 1993b). Aussi d'autres flavonoïdes, comme l'apigénine, ont été décrits comme des composés bactéricides et bactériostatiques très efficaces (Basile *et al.*, 1999, Cushnie *et al.*, 2003, Martini *et al.*, 2004). De même les flavonoïdes ont déjà été utilisés pour le traitement des cataractes d'origine diabétique du fait qu'ils inhibent l'aldose réductase (Goodarzi *et al.*, 2006, Ouali *et al.*, 2007).

Mais pour confirmer et mettre le point sur les différentes activités biologiques des flavonoïdes qui nous ont d'ailleurs poussés à aborder ce travail, nous nous devons de présenter ce qui suit

4.2. Activité des flavonoïdes contre le cancer

Parmi les flavonoïdes les plus actifs sur les cellules tumorales, nous citons la quercétine et la catéchine qui sont très abondantes dans les aliments. La quercétine prévient la cancérogenèse, surtout le cancer de la peau et du colon. La présence de 20 % de quercétine dans l'alimentation chez les animaux diminue le cancer du côlon et y prévient l'apparition des cryptes anormales. Le mécanisme suggéré est que la quercétine joue le rôle d'un antagoniste des topoisomérases I et II produites par les cellules tumorales.

La catéchine, quant à elle, est un inhibiteur de certaines réactions d'oxydation donnant un ADN anormal, elle inhibe surtout la formation du 8-hydroxydesoxyguanosine (8-OHDG), un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN. La catéchine a été démontrée comme étant plus active que la vitamine E sur les radicaux libres. Elle est très abondante dans le thé sous forme d'épigallocatechingallate (EGCG) (Pietta 2000, Tomofuji *et al.*, 2009).

4.3. Activité antimicrobienne des flavonoïdes

L'activité antimicrobienne et donc anti-infectieuse des flavonoïdes a été démontrée par de nombreuses études. Cette activité est due principalement à la capacité de ces molécules à inhiber l'expression de l'ADN et la synthèse de certaines enzymes et protéines membranaires des microorganismes (Ulanowska *et al.*, 2006).

4.4. Activité antibactérienne des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont une activité antibactérienne très vaste et très diversifiée. En effet, ils s'attaquent à un grand nombre de bactéries avec une intensité différente selon le microorganisme et l'écosystème dans lequel il se trouve : les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries : *Staphylococcus aureus* (Babayi *et al.*, 2004), *Escherichia coli* (Ulanowska *et al.*, 2006), *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Heliotropium sinuatum*, *Proteus mirabilis* ... etc. (Didrak 1999, Modak 2001, Okigbo *et al.*, 2005).

Chaque composé agit spécifiquement sur un ou plusieurs germes. Exemple : sur plusieurs bactéries testées l'apigénine n'a montré une faible activité que contre *Staphylococcus aureus*, toutes les autres ont été fort sensibles à ce flavonoïde. Au contraire, la galangine n'a donné une activité que sur *Staphylococcus aureus* ; les autres microorganismes se sont avérés résistants contre cette molécule (Basile *et al.*, 1999, Cushnie *et al.*, 2003, Martini *et al.*, 2004). Aussi dans certains travaux, il a été cité que les flavonoïdes extraits avec du méthanol 95 % étaient actifs sur certaines bactéries, alors que ceux extraits avec du méthanol 60 % de la même plante ne l'étaient pas, comme c'était le cas des flavonoïdes de *Linum capitatum* contre *Staphylococcus aureus* (Slavica *et al.*, 2004).

La diffusion radiale souvent demeure utilisée pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne *in vitro*, même si la mesure par le biais de cette méthode est parfois difficile à cause des zones de diffusion elles (Ilic *et al.*, 2004).

Bien que le mécanisme d'action des flavonoïdes sur les microorganismes demeure encore imprécis, certaines études ont commencé à donner un début d'explication de leur activité antibactérienne en citant des exemples bien explicites ; comme celui de la quercétine censée agir sur l'ADN gyrase d'*Escherichia coli* (Dadi *et al.*, 2009).

En effet, selon les travaux de Dadi et ses collaborateurs, la quercétine serait capable d'inhiber la gyrase bactérienne par deux mécanismes :

Elle se fixe sur l'ADN au niveau des sites d'insertion de l'enzyme bloquant ainsi son activité. Elle bloque le site de fixation de l'ATP se trouvant sur l'ADN gyrase.

Dans les deux cas l'action du flavonoïde se manifeste par le clivage de l'ADN bactérien, désormais incapable de subir les modifications topologiques nécessaires à son bon fonctionnement.

4.5. Activité antifongique des flavonoïdes

Aussi, comme la majorité des polyphénols, les flavonoïdes ont une activité antifongique très puissante. L'une des études les plus importantes sur cette activité était celle d'Ortuno et ses collaborateurs (2006), qui ont démontré l'activité des flavanones glycosides et des polyméthoxyflavones extraites de *Cirtus parasidi* et de *Cirtus sinensis* sur *Penicillium digitatum*. En effet, la naringinine, l'héspéridine, la nobilétine, la simensetine et la tangerétine extraites de ces deux espèces de *Cirtus* servent à protéger ces dernières contre les attaques de *Penicillium digitatum* (Ortuno *et al.*, 2006). Batawita et ses collaborateurs (2002), dans leur étude sur les flavonoïdes de *Conyza aegyptica L.*, ont aussi démontré que ces molécules avaient une action fongicide et fongistatique sur différents agents de mycoses : *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Candida zeylanoïdes*. D'autres flavonoïdes extraits de *Tibouchina grandifolia* ont montré une forte activité antifongique contre différents types de moisissures (Kuster *et al.*, 2009).

Néanmoins, les études portées sur l'activité antifongique des flavonoïdes restent encore insuffisantes du fait de la grande hétérogénéité des moisissures et des levures.

4.6. Activité antivirale des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont aussi connus pour leur activité antivirale, principalement contre le rétrovirus HIV responsable du symptôme d'immunodéficience acquise (SIDA), le virus d'influenza, le virus de l'herpes (HV), l'adénovirus (ADV) et le virus de la grippe A (A/WS/33) (Spedding *et al.*, 1989, Choi *et al.*, 2009).

Certains chercheurs (Spedding *et al.*, 1989) ont d'abord suggéré que ces polyphénols agissaient comme inhibiteurs de la transcriptase et/ou la transcriptase reverse de l'agent viral et de l'ADN et l'ARN polymérase de la cellule hôte ; bloquant ainsi tout le processus infectieux. D'autres travaux plus récents ont ensuite démontré que les flavonoïdes inhibaient plus exactement la synthèse de l'ARNm viral (Choi *et al.*, 2009). Ceci, impliquait que les flavonoïdes n'intervenaient pas dans l'absorption des agents viraux, mais plutôt à un stade plus avancé impliqué dans la réplication virale.

4.7. Propriétés anti radicalaires

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle selon la réaction représentée

Ci-dessous :



Cette réaction de piégeage donne une molécule stable (RH) et un radical flavoxyle (FLO•) ce dernier va subir un changement de structure par résonance ; redistribution des électrons impaires sur le noyau aromatique pour donner des molécules de faible réactivité par rapport aux R•; en outre les radicaux flavoxyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs.



(Amić *et al.*, 2003)

La propriété anti radicalaire des flavonoïdes est étroitement liée à leur structure, en particulier au phénomène de résonance électronique stabilisant exercé par les noyaux aromatiques, cette activité nécessite :

- Structure ortho-dihydroxyphénolique du cycle B (3',4' dihydroxystructure), cette Structure est importante pour l'activité anti radicalaire des flavonoïdes possédant un Hétérocycle saturé.
- La double liaison C2-C3 conjuguée avec la fonction 4 oxo qui est responsable de la Délocalisation des électrons, en améliorant ainsi la capacité anti radicalaire.
- Les groupements hydroxyles libres en C3 et C5 (Amić *et al.*, 2003).

4.8. Propriété anti-inflammatoires des flavonoïdes

Une inflammation par définition est une réaction de défense immunitaire stéréotypée du corps à une agression (infection, brûlure, allergie...) qui se manifeste par une rougeur, un gonflement, une sensation de chaleur, une douleur qui semble pulser ... (Anonyme4, 2008)

Au cours de l'inflammation, des produits bactériens déclenchent la production d'une grande quantité d'oxyde nitrique (NO) dans les macrophages et d'autres cellules sous l'action d'oxyde nitrique synthase inducteur (iNOS) (Hämäläinen *et al.*, 2007), bien que la libération de (NO) est très importante pour maintenir la dilatation des vaisseaux sanguins (vasodilatation) mais des fortes concentrations peuvent conduire aux dommages oxydatifs (Nijveldt *et al.*, 2001), car une fois que le NO est formé il se peut qu'il va réagir avec l'anion super oxyde conduisant à la formation de peroxy-nitrite qui provoque l'endommagement des macromolécules cellulaires. Cependant une production en excès de NO durant une inflammation chronique résulte au développement du cancer (Tsai, 2004).

De nombreuses études semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation atherosclerotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (González-Gallego *et al.*, 2007), d'autres sont capables d'inhiber l'histamine (Kim *et al.*, 2004).

Les flavones et les flavonols sous forme glycosylée ou libre comme la quercétine, kaempferol, myricétine ont une activité inhibitrice de COX (Cyclooxygenase) (Tapas *et al.*, 2008)

Sous- Chapitre III : Chromatographie Liquide à Haute Performance

1. Définition

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC, High performance liquid chromatography), est une technique de séparation analytique et/ou préparatrice de molécules présentes dans un mélange. Cela permet d'adapter les méthodes chromatographiques usuelles (voir Colonne) sur un montage haute pression.

La phase mobile est liquide percole à haut pression à travers une phase stationnaire de granulométrie très fine ce que permet de séparer plus efficacement les composés donc d'utiliser des colonnes plus petites avec une économie de support, de solvant et de produit à analyser (Fabien,2009).

2. Principe

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

Les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

3. Les éléments

a) Un réservoir de solvant (éluant) : qui contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluant (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables)

à l'aide de la pompe doseuse avec une extrémité filtrante en téflon. S'il est nécessaire le dégazage peut se faire par agitation puis conservation du solvant sous atmosphère d'hélium.

b) La pompe : elle est muni d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler:

- **en mode isocratique** : c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- **en mode gradient** : c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants.

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μl à plusieurs ml/min.

c) Vanne d'injection : c'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes, nous utiliserons une boucle de 20 μl . Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.

d) La colonne

Une colonne est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. Au-delà, les importantes pertes de charges exigeraient des pressions de liquide beaucoup trop élevées.

e) Le détecteur

Placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme. En effet, il dirige sur un enregistreur un signal constant appelé ligne de base en présence du fluide porteur seul ; au passage de chaque soluté séparé il conduit dans le temps à l'enregistrement d'un pic.

f) La phase stationnaire

❖ **La phase normale:**

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaire qui sortent en tête.

L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.

❖ **La phase inverse :**

La phase inverse est majoritairement composée de silice **greffée par des chaînes** linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (ACN, Me OH, H₂O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier.

Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

❖ **La phase mobile :** L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale ou à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés. La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe :

- si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en phase normale.
- si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse. En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention k des composés.

Les silices greffées conduisent en général à une perte importante de polarité. Avec une phase greffée, l'ordre d'élution est opposé à celui auquel on est habitué avec les phases normales. Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus. On réalise des gradients d'élution en diminuant au cours de la séparation la polarité de l'éluant (ex : mélange eau /acétonitrile dont la concentration en acétonitrile va en croissant au cours de l'élution). (Fabien, 2009).

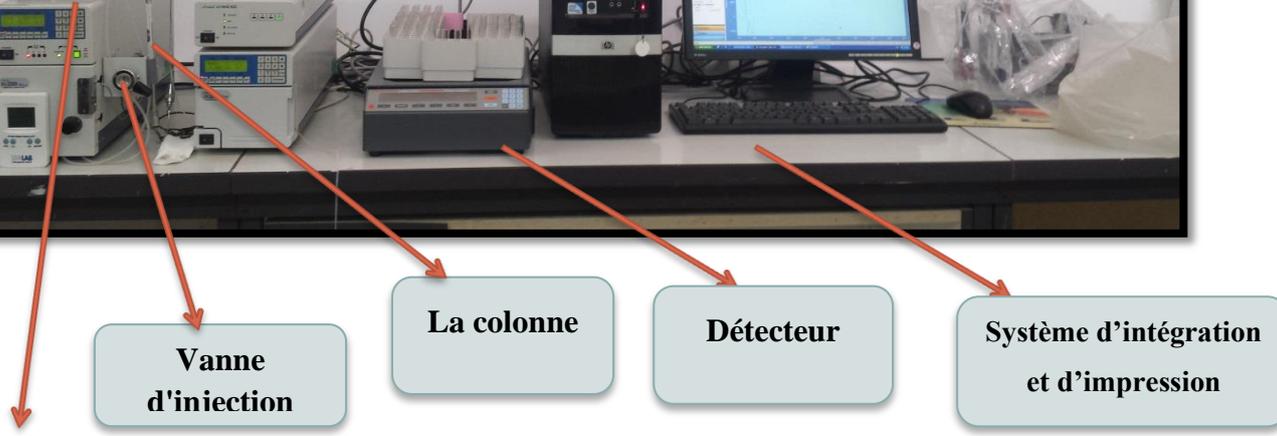


Figure7 : Système d'HPLC

Sous- Chapitre IV : L'activité antioxydant

1. Activité antioxydante

Les antioxydants naturels sont présents dans l'alimentation ; pour la plupart se sont des composés phénoliques qui possèdent au moins un noyau aromatique, contenant un ou plusieurs substituants, en effet cette propriété antioxydante est en relation directe avec la structure de ces molécules (Cosio *et al.*, 2006). La surproduction des radicaux libres dans l'organisme et le déficit du système de défense endogène peuvent engendrer de diverses pathologies ; cancer, vieillissement...etc

Actuellement, la recherche vise à renforcer ces défenses endogènes par des substances naturelles issues des plantes, qui sont douées des propriétés antiradicalaires. Le radical DPPH a permis l'estimation de l'activité antioxydante des composés isolés et identifiés, dont le DPPH est un radical synthétique de couleur violette qui vire vers le jaune quand il est capté par les produits flavoniques testés. L'intensité de la couleur jaune reflète la capacité antiradicalaire de la molécule, et dépend de la nature, la concentration et la puissance de cette molécule (Madi., 2010).

2. Définition d'un antioxydant

On désigne par antioxydant toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat (Diallo, 2005).

3. Principaux antioxydants

3.1. Les antioxydants endogènes

La production physiologique d'ERO, est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes (SOD, CAT, hème oxygénase, peroxyrédoxine...), de molécules antioxydantes de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine, ubiquinone, ...) et de protéines (transferrine, ferritine, ...).

Enfin, un système secondaire de défense composé de phospholipases, d'ADN endonucléases, de ligases et de macroxyprotéinases empêche l'accumulation dans la cellule de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques (Pincemail, 2002).

3.2.Les antioxydants exogènes

Toutes ces défenses peuvent être renforcées par des apports exogènes en :

✓ **Médicaments :**

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

✓ **La vitamine C ou acide ascorbique :**

C'est un puissant réducteur. Il joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E.

✓ **La vitamine E ou tocophérol :**

Prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux peroxydes.

✓ **Le sélénium :**

Les effets bénéfiques de cet oligo-élément sur l'organisme ne sont connus que depuis un quart de siècle. Il neutralise les métaux toxiques (plomb, mercure). Il aurait aussi une action préventive sur certains cancers.

✓ **Le β -carotène :**

Outre l'activité pro vitaminique A, possède la capacité de capter l'oxygène singulet.

✓ **Les flavonoïdes :**

Les relations structure-activités anti-oxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité anti-oxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation.

✓ **Les tanins :**

Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation.

✓ **Les coumarines :**

Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes.

✓ **Les phénols :**

Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales (Diallo, 2005). Plus toxiques comme les peroxydites.

4. Définition d'un radical libre

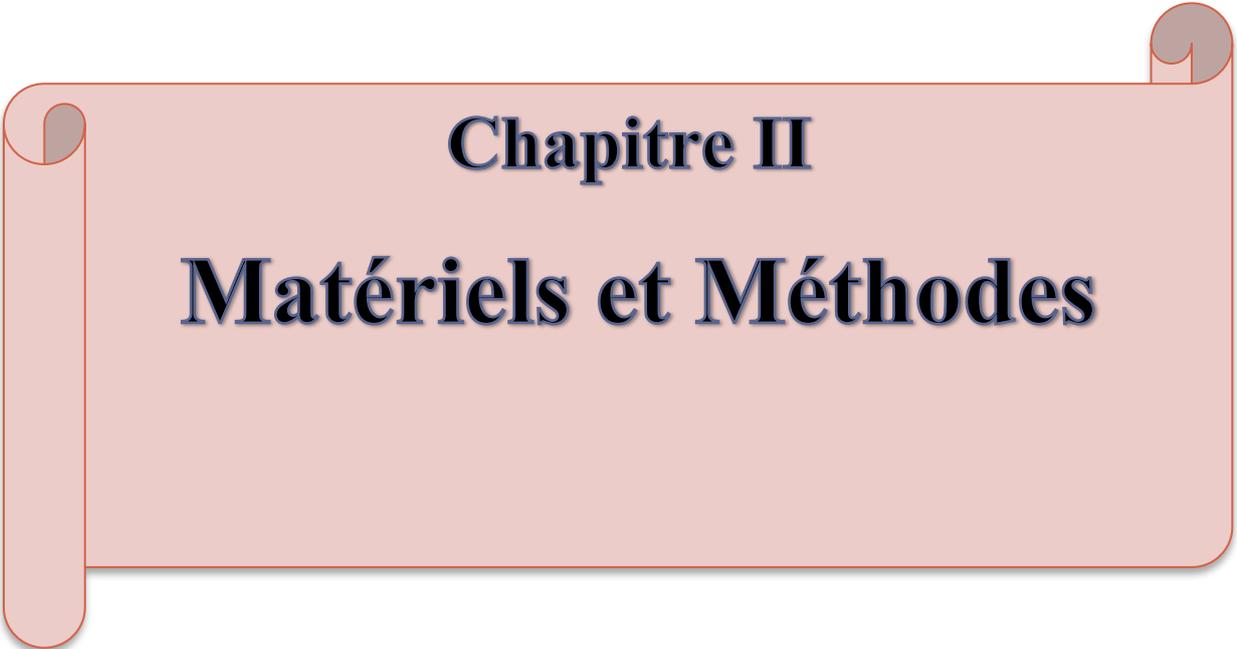
On définit comme radical libre (RL), n'importe quelle molécule indépendante contenant un ou plusieurs électron(s) non apparié(s) (Christopher *et al.*, 1995). Les radicaux libres (RLs) sont très instables et réagissent rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir de la stabilité. Une « réaction en chaîne » débute lorsqu'un RL attaque la molécule stable la plus proche en lui « volant » son électron, et la « molécule attaquée » devient alors elle-même un RL (Martinez-Cayuela, 1995). Bien que le terme de radical libre ait souvent été assimilé à une espèce réactive ou un oxydant, il est important de signaler que tous les radicaux libres ne sont pas forcément des oxydants. De même que tous les oxydants ne sont pas des radicaux libres (Anderson *et al.*, 1996 ; Fosting, 2004).

Présent dans l'air pour environ une partie sur cinq, l'oxygène est indispensable à la vie de la plupart des êtres vivants, Il possède deux électrons non appariés, Ceci explique sa grande réactivité ; cependant, la plupart des réactions oxydatives qu'il est susceptible de provoquer spontanément dans un organisme humain sont extrêmement lentes, Il est donc peu toxique par lui-même (Dacosta, 2003). Mais sous l'action des radiations ionisantes, de rayon UV, de métaux de transition « fer, cuivre...etc. » ou au cours de certaines réactions enzymatiques, des formes hautement réactives de l'oxygène apparaissent, on les désigne souvent comme espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou reactive oxygen species (ROS) selon la terminologie anglaise. Cette appellation inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit (Le radical superoxyde ; hydroxyle ; l'oxyde nitrique) mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires (peroxyde d'hydrogène ; l'oxygène singulet ; l'anion hypochlorite ; le peroxydite) dont la toxicité est importante (Novelli, 1997 ; Bartosikova *et al.*, 2003).

5. Les utilisations des antioxydants

L'activité éventuelle de molécules médicamenteuses déjà connues, qui présentent les avantages d'une biodisponibilité et de paramètres pharmacocinétiques et toxicologiques déjà bien connus.

- Sont concernées par l'utilisation ont dans l'industrie alimentaire.
- L'industrie de lubrifiants : elle produit notamment les huiles pour moteurs et transmissions automobiles.
- L'industrie des matières plastiques : des additifs sont utilisées pour protéger les polymères de l'oxygène de l'air.
- L'industrie cosmétique : les molécules utilisées sont plus ou moins les même que dans l'industrie alimentaire (Hennebelle, 2006).



Chapitre II

Matériels et Méthodes

Introduction

Dans cette partie nous avons essayé de séparer les composés phénoliques que pourraient contenir deux espèces végétales *Pimpinella anisum* et *Peganum harmala* connues pour leur utilisation en phytothérapie, nous avons d'abord procéder à une extraction puis à une analyse qualitative de ces extraits, ensuite nous avons essayé de tester une activité biologique antioxydante sur ces extraits.

1. Etude phytochimique

1. 1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes de *Peganum harmala et Pimpinella anisum*. Les feuilles du Harmal ont été cueillies en janvier 2016 de la région de M'sila tandis que Les graines du anis vert et Harmal ont été achetées à partir d'un herboriste à khroub, wilaya de Constantine au mois de janvier 2016, et a été vérifié par la flore d'Algérie.

Après séchage à une température ambiante et à l'abri de la lumière solaire, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, le matériel végétal de chacune des deux espèces est broyé grossièrement dans un moulin électrique.

1.2. Extraction des flavonoïdes

Suivant le protocole d'extraction décrit par (Merghem *et al.*, 1995), le matériel végétal broyé (100 g) est soumis à une extraction par macération dans le mélange méthanol / eau (30/70 : v/v) pendant 72 heures avec renouvellement de solvant chaque 24 heures et agitation de temps en temps.



Figure 8: Agitation magnétique des deux plantes

Les macéras sont réunis puis ils sont filtrés sur un papier filtre. Les filtrats sont évaporés presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif. Le résidu sec est repris dans 100 ml d'eau distillée bouillante (l'intérêt de l'utilisation de l'eau distillée bouillante c'est pour assurer la récupération des composés restés accolés à la paroi du ballon d'évaporation).

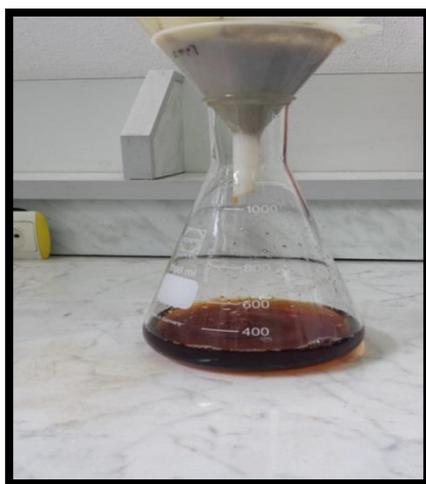


Figure 9: Filtration des extraits



Figure 10 : Evaporateur rotatif

Après une décantation de toute une nuit on récupère la phase limpide qui va subir des affrontements par des solvants de polarité croissante :

- Affrontement par. **Ether de pétrole**
- Affrontement par **Ether diéthylique**
- Affrontement par **Acétate d'éthyle**.

La phase aqueuse et le solvant sont agités énergiquement puis laissés au repos pendant 30 minutes, la phase aqueuse (qui est au fond de l'ampoule) et la phase chargée de molécules spécifiques sont récupérées séparément. Les différentes phases sont évaporées à sec puis reprises par le même volume du méthanol, les extraits obtenus sont ensuite stockés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

a) Ether de pétrole

Après l'ajout de l'Ether de pétrole à l'extrait végétal, le mélange (v/v) repose pendant 24 h afin de permettre ce solvant à éliminer le maximum des graisses et des pigments. La décantation conduit à avoir deux différentes phases:

- ✓ La phase d'éther en haut est riche en composés non phénoliques: caroténoïdes, chlorophylles a et b et les graisses végétales.
- ✓ La phase aqueuse en bas contient les composés phénoliques et le reste des flavonoïdes (phase récupérée).

b) Ether diéthylique

Le même volume de la phase aqueuse issue est affronté avec le même volume d'éther diéthylique. Après une agitation énergétique. La solution obtenue est laissée reposer deux heures, ce qui permet à l'obtention de deux phases :

- ✓ La phase d'éther diéthylique en haut contient éther et polyphénols simples (phase récupérée).
- ✓ La phase aqueuse en bas contient les flavonoïdes (phase récupérée).

c) Acétate d'éthyle :

Le même procédé est suivi. Ce solvant sert à extraire les mono-o-glucosides et partiellement les di-o-glucosides. Les deux phases sont récupérées (phase acétate d'éthyle et phase aqueuse)



Figure 11: Phase éther de pétrole



Figure 12: Phase éther diéthylique



Figure13: Phase acétate d'éthyle

Les affrontements de la plante *peganum harmala* (graine)



Figure 14: Phase éther de pétrole



Figure 15: Phase éther diéthylique



Figure 16: Phase acétate d'éthyle

Les affrontements de la plante *pimpinella anisum* (graine)



Figure 17: Phase éther de pétrole



Figure 18: Phase éther diéthylique



Figure 19: Phase acétate d'éthyle

Les affrontements de la plante *peganum harmala* (feuille)

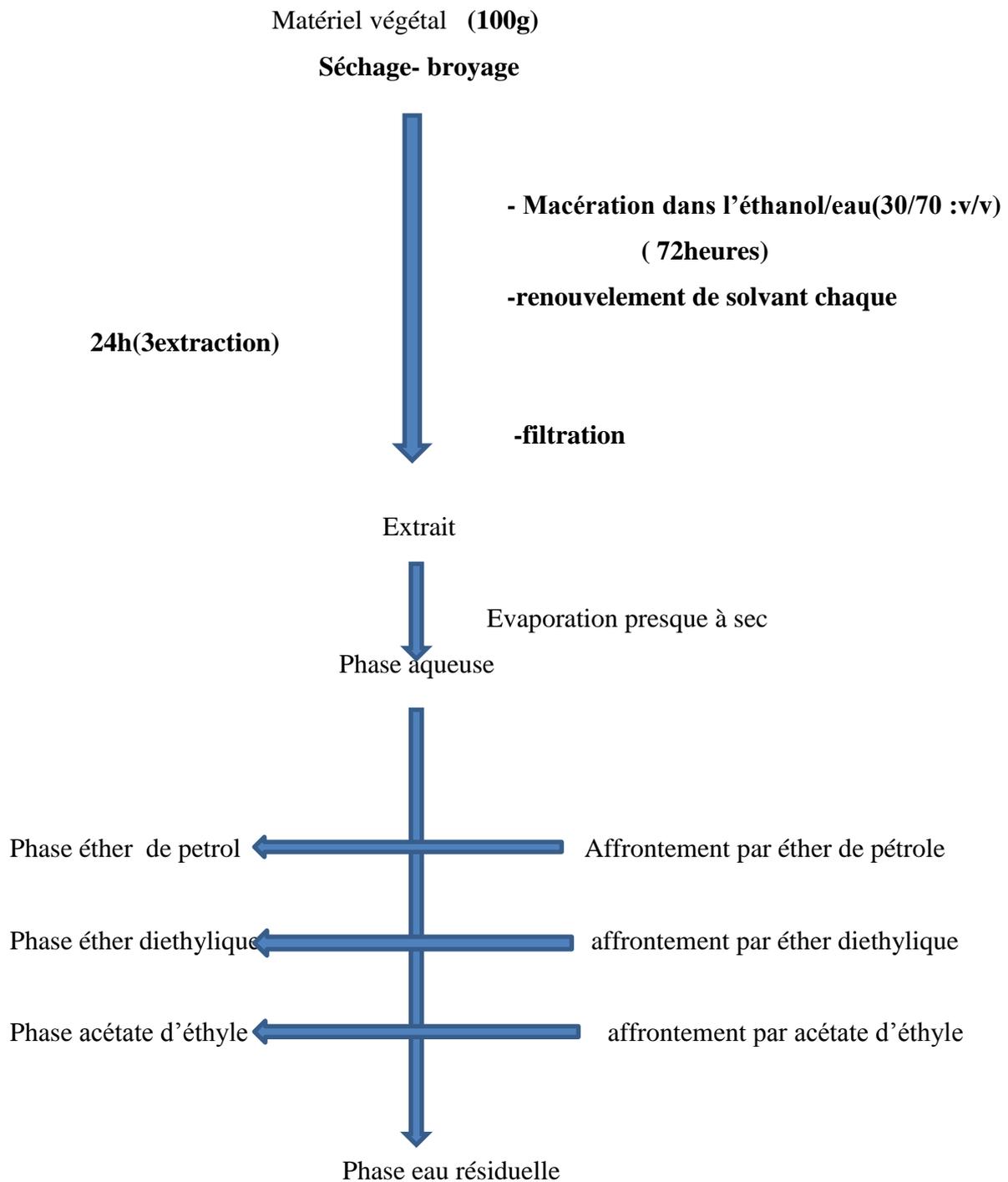


Figure 20 : Protocole d'extraction des flavonoïdes

1.3. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Principe

Analyse des composés phénoliques par HPLC : les acides phénoliques et les flavonoïdes de la fraction d'acétate d'éthyle sont mis en évidence par le système d'analyse HPLC (Jasco pu,2089) selon la méthode décrite par (Cha et al., 2013) ; une colonne C18 (25cm*4,6mm), a été utilisé à 25°C ,la séparation des acides phénoliques et flavonoïdes a été réalisée à deux longueurs d'onde (280 nm et 325nm) avec un détecteur à photodiode (UV-2075 UV-visible). Les acides phénoliques ont été détectés à 280nm et les flavonoïdes à 325nm, la phase mobile constituée 0,1% de l'acide formique dans 10% d'acétonitrile (solvant A) et 0,1% de l'acide formique dans 90% acétonitrile (solvant B) (Cha et al, 2013).

Analyse qualitative par HPLC

L'analyse est réalisée par un HPLC (JASCO PU.2089) au niveau du laboratoire de la faculté de sciences de la nature et de la vie, Université des frères Mentouri, Constantine1.

Le besoin de savoir les profils et d'identifier les composés individuels dans les Échantillons exige le remplacement des méthodes traditionnelles par des techniques séparatives. L'HPLC est sans doute la technique analytique la plus utile pour caractériser les composés polyphénoliques (Gomez-Caravaca *et al*, 2006).

Principe :

20 µl de chaque extrait ont été injectés sur une colonne de type phase inverse C18, de dimensions égales à 125 x 4.6 mm La phase mobile est constituée de trois éluants : l'eau distillée, méthanol, acide acétique (50 : 47 : 2.5) (V /V /V). Le gradient d'élution appliqué est de type isocratique étalé sur 10 min. Le débit est de 1 ml / min (Amarowicz *et al.*, 2005).

La détection a été effectuée par un détecteur UV-Vis à deux longueurs d'onde égale 280 et325 nm.

La technique

1ere étape : La lyophilisation

La lyophilisation consiste à ôter l'eau d'un produit liquide, pâteux ou solide, à l'aide de la surgélation puis une évaporation sous vide de la glace sans la faire fondre. Le principe de base est que lorsqu'on réchauffe de l'eau à l'état solide à très basse pression, l'eau se sublime,

c'est-à-dire qu'elle passe directement de l'état solide à l'état gazeux. La vapeur d'eau (ou de tout autre solvant) quitte le produit et on la capture par congélation à l'aide d'un condenseur, ou piège froid. Cette technique permet de conserver à la fois le volume, l'aspect et les propriétés du produit traité. Elle peut avoir lieu naturellement (séchage en montagne), ou, plus rapidement, dans un lyophilisateur.

On distingue trois phases majeures dans un cycle de lyophilisation :

- la congélation, où les produits sont réfrigérés à des températures de l'ordre de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; l'eau se transforme alors en glace.
- la dessiccation primaire, sous vide, qui consiste à sublimer la glace libre (interstitielle), donc sans effet d'ébullition (pas d'eau en phase liquide).
- la dessiccation secondaire, qui permet d'extraire par désorption les molécules d'eau piégées à la surface des produits séchés.

À la fin du cycle, le produit ne contient plus que 1 % à 5 % d'eau, ce qui est extrêmement faible



Figure21 : Photo de lyophilisateur (Laboratoire de faculté SNV)

2eme étape

Récupéré l'échantillon avec du méthanol (méthanol spécial HPLC) avec des concentrations précises (2mg/ml).



Figure22 : Récupération des échantillons pour injection (Imami et Touiret, 2016)

3eme étape

L''analyse des échantillons par HPLC

On a obtenue pour chaque échantillon un chromatogramme qui contient plusieurs pics, chaque pic représente une molécule à identifier par rapport à des standards en comparant leur temps de rétention.

2. Activité antioxydante

Test anti radicalaire (Test au DPPH)

Principe

Pour évaluer l'activité anti- radicalaire des différents extraits, nous avons choisi la méthode du piégeage du radicale libre DPPH• ; qui utilise le DPPH comme un radical libre relativement stable.

Dans ce test, les antioxydants réduisent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ayant une couleur violette en un composé jaune, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine, (**fig.23**) dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002; Maataoui *et al.*, 2006).

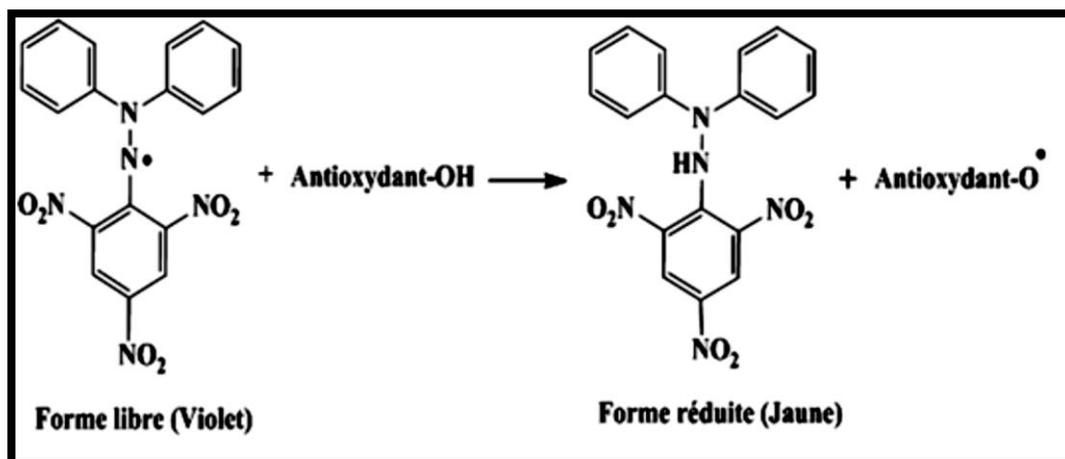


Figure23 : Forme radicalaire et réduite du DPPH (Sanchez-Moreno, 2002).

➤ Préparation d'extrait

Pour tous les extraits on prépare des solutions dans du méthanol absolu. Ces solutions dites solutions mères, subiront ensuite des dilutions pour en avoir différentes concentrations de mg par ml à savoir 1mg/ml et 5mg/ml.

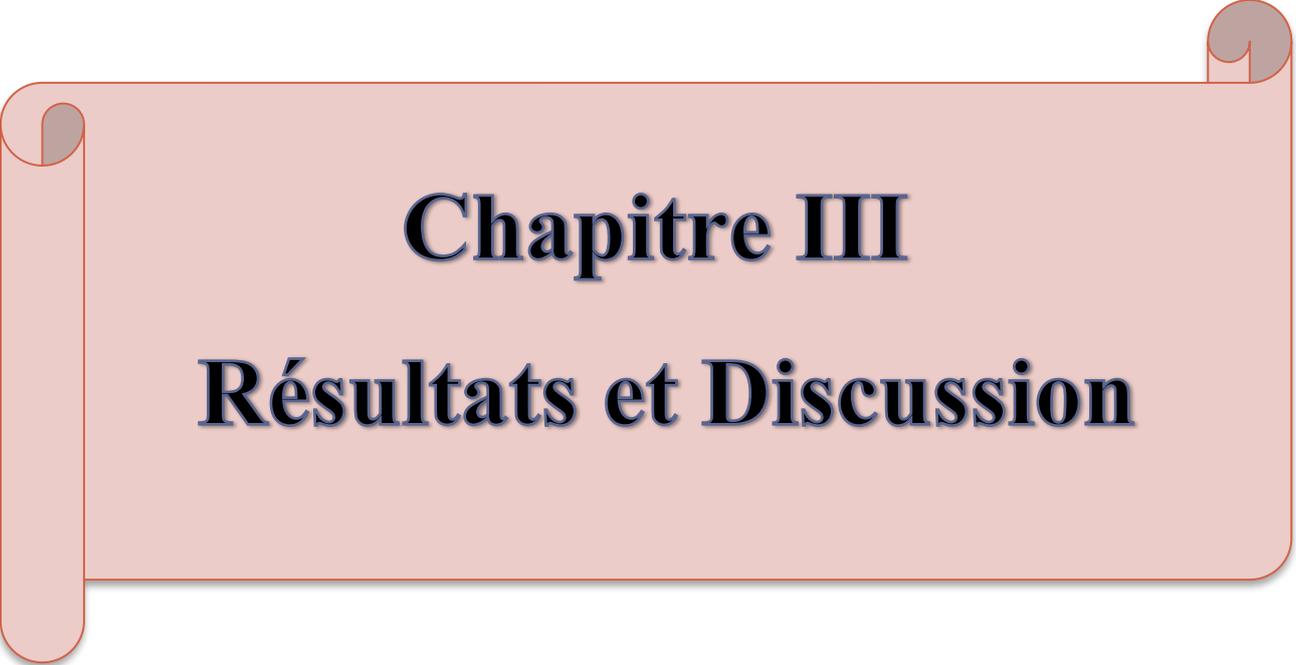
L'activité antiradicalaire de ces extraits est mesurée selon la méthode décrite par (ES –Safi *et al.*, 2007) avec modification

- ✓ 1ml de l'extrait à tester
- ✓ 1ml d'une solution méthanolique de DPPH (0.004%)
- ✓ La densité optique DO est mesurée par le spectrophotomètre SHIMADZU à 517 nm, Après 30 minutes d'incubation à une température ambiante et à l'obscurité, la décroissance de l'absorbance est convertie en pourcentage d'activité Scavenger selon l'équation suivante :

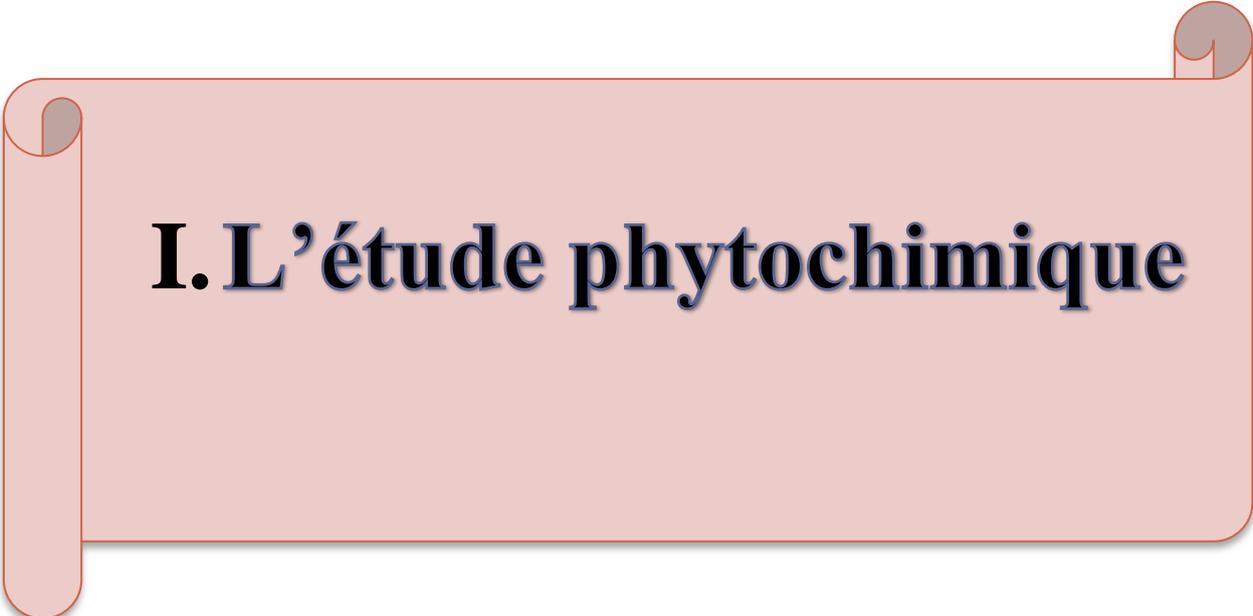
$$\text{Activité Scavenger (\%)} = (A \text{ contrôle} - A \text{ échant} / A \text{ contrôle}) \times 100$$

A contrôle : Absorbance du contrôle (1ml méthanol et 1ml d'une solution méthanolique de DPPH)

A échant : Absorbance des échantillons testés



Chapitre III
Résultats et Discussion



I. L'étude phytochimique

1. L'étude phytochimique

1. *Pimpinella anisum*

Après une comparaison aux temps de retentions (tr) des acides phénolique et flavonoïdes standards avec nos résultats obtenus dans les chromatogrammes, on pourrait dire que les graines de cette espèce pourraient contenir :

- Acide salicylique qui correspond au pic 19 avec un tr de 15,025 qui est proche de la valeur de 15, 092 (standart) à un longueur d'onde de 280 nm
- Esculitine qui correspond au pic 3 avec un tr de 9,158 qui est proche de la valeur de 9,092 (standart) à un longueur d'onde de 325 nm.
- Rutine qui correspond au pic 9 avec un tr de 12,992 qui est proche de la valeur de 12,933 (standart) à un longueur d'onde de 325 nm.

Tableau05 : Temps de rétention des acides phénoliques présents dans les extraits des graines de *Pimpinella anisum* à longueur d'onde 280nm

Nom de pic	tr
1Unknown	0,683
2Unknown	2,392
3Unknown	2,600
4Unknown	2,733
5Unknown	3,292
6Unknown	3,550
7Unknown	5,250
8Unknown	5,625
9Unknown	6,350
10Unknown	6,875
11Unknown	7,542
12Unknown	8,908
13Unknown	10,250
14Unknown	11,108
15Unknown	11,825
16Unknown	12,217
17Unknown	12,850

18Unknown	13,917
19Unknown	15,025
20Unknown	16,433
21Unknown	17,783
22Unknown	18,775
23Unknown	19,867
24Unknown	21,383
25Unknown	22,142
26Unknown	22,817
27Unknown	23,500
28Unknown	23,792
29Unknown	24,175
30Unknown	24,808
31Unknown	25,150
32Unknown	25,717
33Unknown	26,408
34Unknown	27,133
35Unknown	27,817
36Unknown	28,283
37Unknown	29,308
38Unknown	29,775
39Unknown	30,167
40Unknown	32,308
41Unknown	32,942
42Unknown	33,567

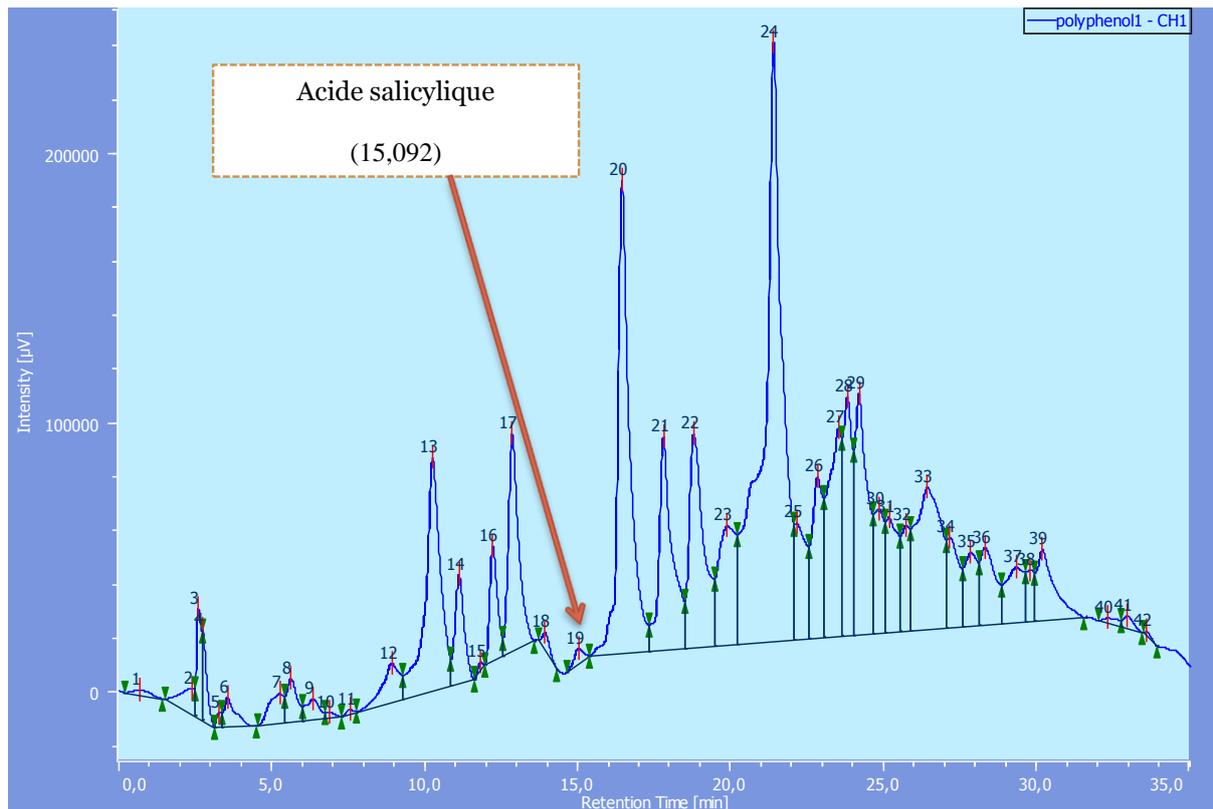


Figure24 : Chromatogramme d’HPLC des graines de *Pimpinella anisum* enregistré à 280nm

Tableau06 : Temps de rétention des flavonoïdes présents dans les extraits des graines de *Pimpinella anisum* à longueur d’onde 325nm

Nom de pic	tr
1Unknown	5,317
2Unknown	8,575
3Unknown	9,158
4Unknown	10,050
5Unknown	10,508
6Unknown	10,808
7Unknown	11,817
8Unknown	12,167
9Unknown	12,992

10Unknown	13,300
11Unknown	13,667
12Unknown	14,067
13Unknown	14,267
14Unknown	14,617
15Unknown	15,275
16Unknown	15,667
17Unknown	15,883
18Unknown	16,225
19Unknown	16,475
20Unknown	17,442
21Unknown	18,275
22Unknown	18,442
23Unknown	18,700
24Unknown	19,200
25Unknown	19,475
26Unknown	20,133
27Unknown	20,417
28Unknown	21,383
29Unknown	22,300
30Unknown	22,650
31Unknown	22,950
32Unknown	23,508
33Unknown	24,058
34Unknown	25,017
35Unknown	26,692
36Unknown	32,092
37Unknown	35,833

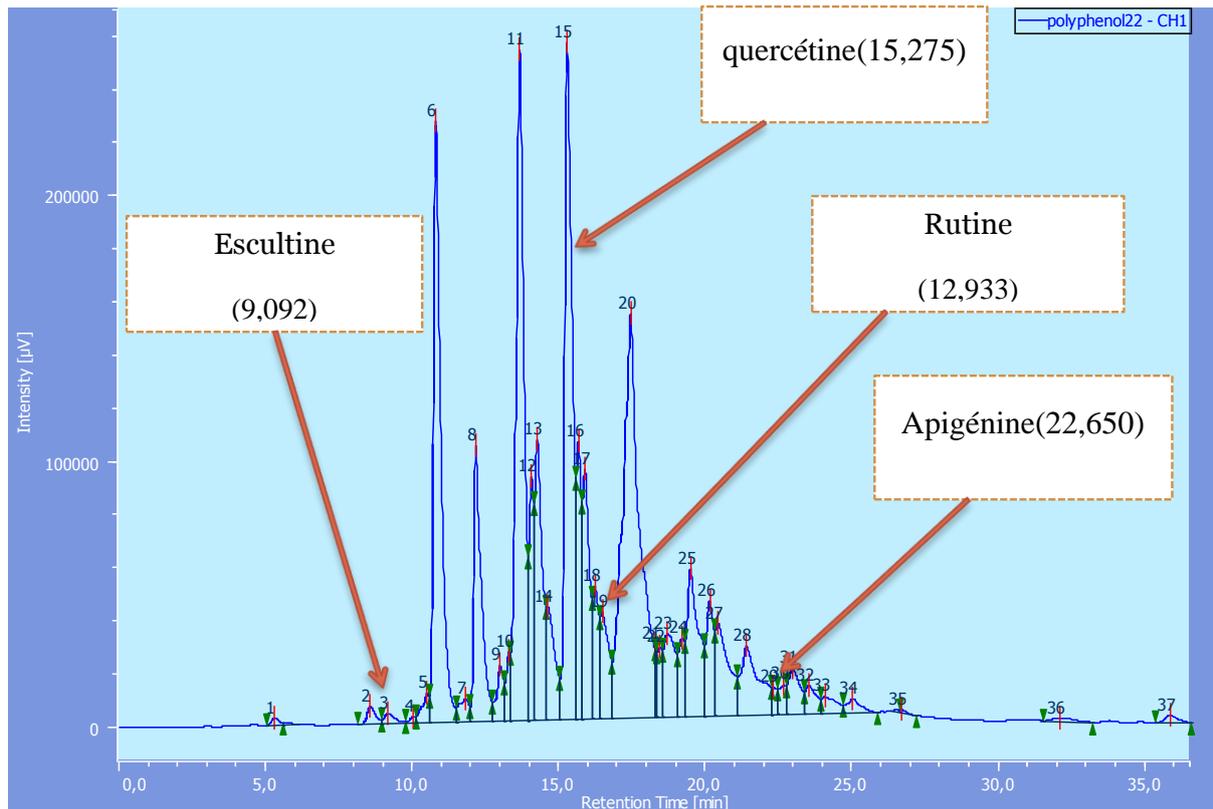


Figure 25: Chromatogramme d'HPLC des graines de *Pimpinella anisum* enregistré à 325nm

Une étude a démontré la présence de l'eugenol *trans*-anethole, methylchavicol, anisaldehyde, estragole, coumarine, scopoletine, umbelliferone, estrols, terpène hydrocarbure, polyènes, et polyacétylènes comme les principaux composants de l'huile essentielle de graines d'anis vert (Shojaii and Abdollahi, 2012), donc on pourrait dire que le pic 36 avec un tr de 28,283, de la graine de l'anis vert pourrait correspondre à la coumarine (280nm) qui a un temps de rétention plus proche 28,908

Le pic 15 pourrait correspondre à la quercétine chez Anis vert graine à 325nm avec un tr de 15,275 (quercétine standard (15,242))

Le pic 30 pourrait correspondre à l'apigénine dans la graine de l'anis à 325nm avec un tr de 22,650 (apigénine standard (22,517))

2. *Peganum harmala*

2.1. La partie aérienne

Après une comparaison aux temps de retentions (tr) des acides phénolique et flavonoïdes standards avec nos résultats obtenus dans les chromatogrammes, on pourrait dire que les feuilles de cette espèce contiendraient :

- Acide ascorbique qui correspond au pic 3 avec un tr de 3,367 qui est proche de la valeur de 3,358(standard) à une longueur d'onde de 280 nm.
- Acide vanillique qui correspond au pic 12 avec un tr de 12,400 qui est proche de la valeur de 12,475(standard) à une longueur d'onde de 280 nm
- Le pic le plus dominant dans ce chromatogramme à la longueur d'onde 280nm est bien le pic 11 avec un tr de 10,658 ce qui pourrait correspondre à l'epicatéchine selon les standards (10,808).

Tableau07 : Temps de rétention des acides phénoliques présents dans les extraits de la partie aérienne de *Peganum harmala* à longueur d'onde 280nm

Nom de pic	tr
1Unknown	2,450
2Unknown	3,050
3Unknown	3,367
4Unknown	4,375
5Unknown	5,200
6Unknown	5,975
7Unknown	6,992
8Unknown	8,517
9Unknown	9,308
10Unknown	10,183
11Unknown	10,658
12Unknown	12,400
13Unknown	13,408
14Unknown	13,567
15Unknown	13,892
16Unknown	14,192

17Unknown	14,325
18Unknown	15,400
19Unknown	15,650
20Unknown	16,325
21Unknown	17,133
22Unknown	17,408
23Unknown	17,950
24Unknown	18,392
25Unknown	18,967
26Unknown	20,167
27Unknown	20,900
28Unknown	22,008
29Unknown	23,325

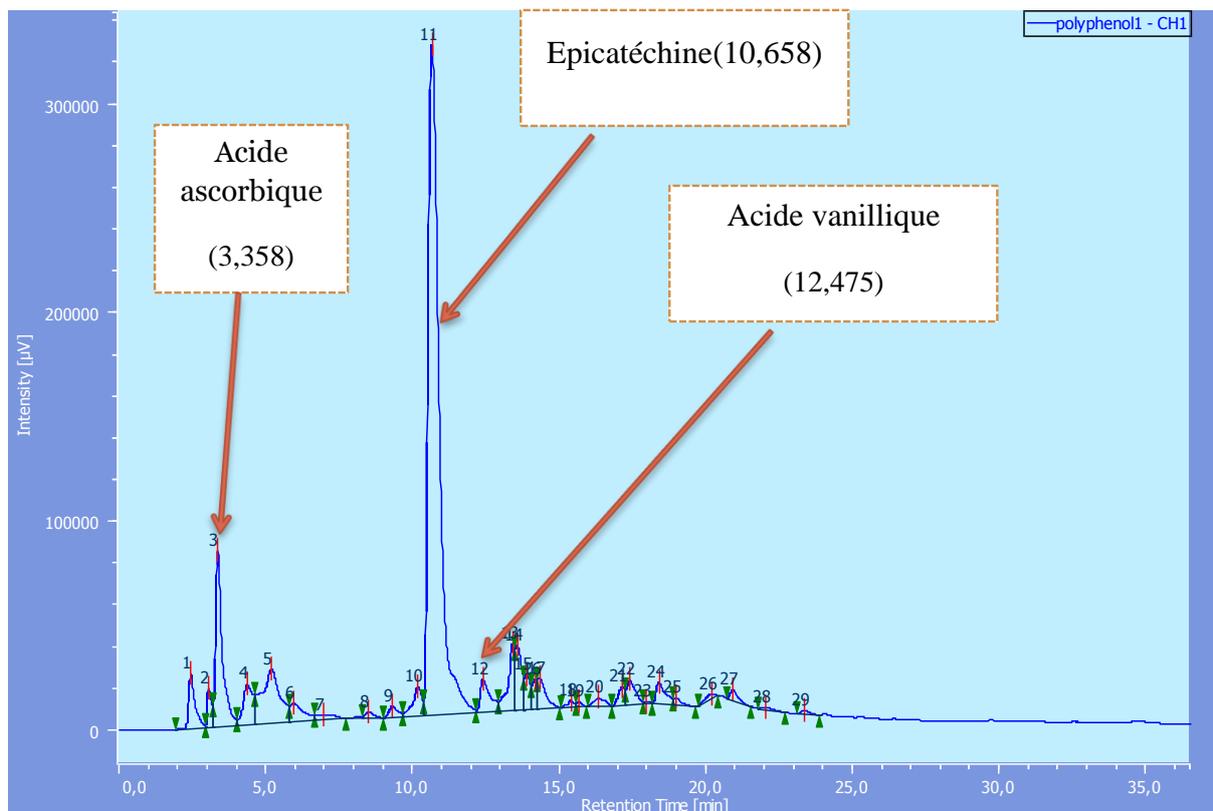


Figure26 : Chromatogramme d'HPLC de la partie aérienne de *Peganum harmal* enregistré à 280nm

- Rutine qui correspond au pic 7 avec un tr de 12,900 qui est proche de la valeur de 12,933(standard) à une longueur d'onde de 325 nm

Tableau08 : Temps de rétention des flavonoïdes présents dans les extraits de la partie aérienne de *Peganum harmala* à longueur d'onde 325nm

Nom de pic	tr
1Unknown	2,342
2Unknown	2,958
3Unknown	3,442
4Unknown	3,700
5Unknown	10,692
6Unknown	11,933
7Unknown	12,900
8Unknown	13,742
9Unknown	15,958
10Unknown	16,467
11Unknown	17,858
12Unknown	19,258
13Unknown	26,225
14Unknown	29,142

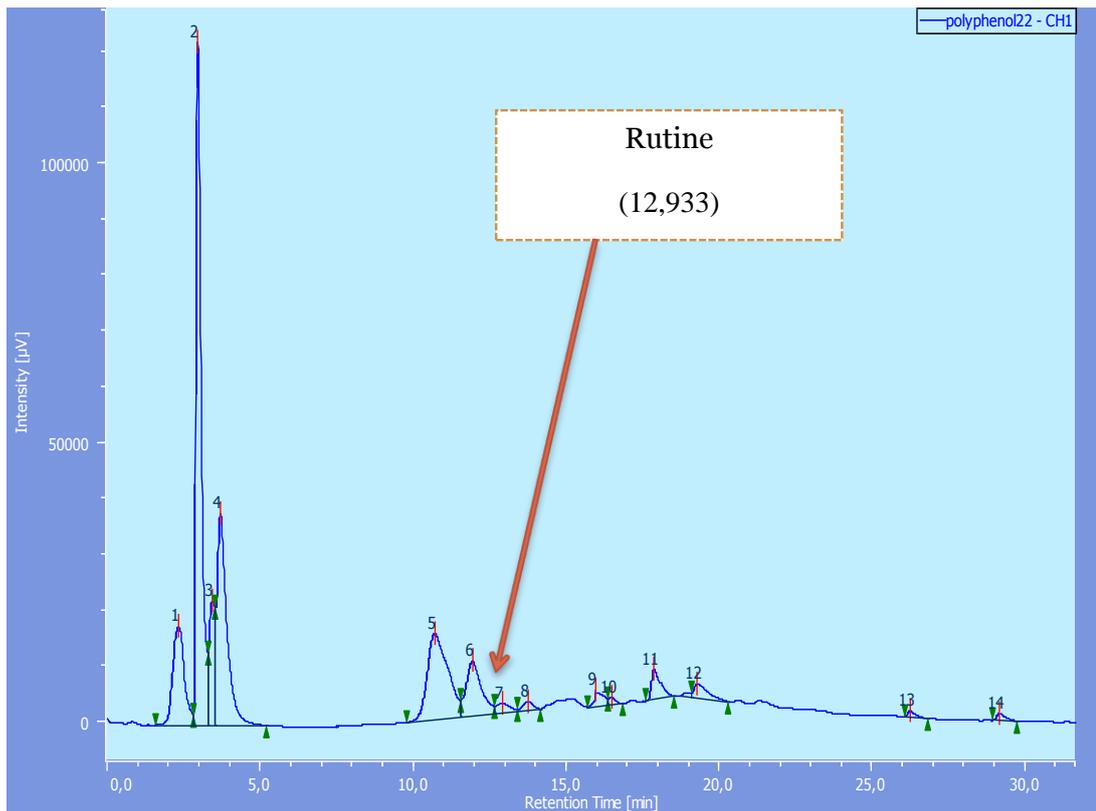


Figure27 : Chromatogramme d’HPLC de la partie aérienne de *Peganum harmala* enregistré à 325nm

2.2 Les graines

Après une comparaison aux temps de retentions (t_r) des acides phénolique et flavonoïdes standards avec nos résultats obtenus dans les chromatogrammes, on pourrait dire que les graines de cette espèce contiendraient :

- Acide salicylique qui correspond au pic 19 avec un t_r de 15,050 qui est proche de la valeur de 15,092(standard) à une longueur d'onde de 280 nm

Tableau 09: Temps de rétention des acides phénoliques présents dans les extraits des graines de *Peganum harmala* à longueur d'onde 280nm

Nom de pic	t_r
1Unknown	2,625
2Unknown	3,117
3Unknown	3,275
4Unknown	3,442
5Unknown	3,692
6Unknown	4,033
7Unknown	4,500
8Unknown	8,325
9Unknown	9,442
10Unknown	9,967
11Unknown	10,917
12Unknown	11,683
13Unknown	12,125
14Unknown	12,583
15Unknown	12,958
16Unknown	13,200
17Unknown	13,942
18Unknown	14,217
19Unknown	15,050
20Unknown	15,258
21Unknown	15,925
22Unknown	17,058

23Unknown	18,708
24Unknown	19,258
25Unknown	19,992
26Unknown	22,950
27Unknown	23,633
28Unknown	24,333

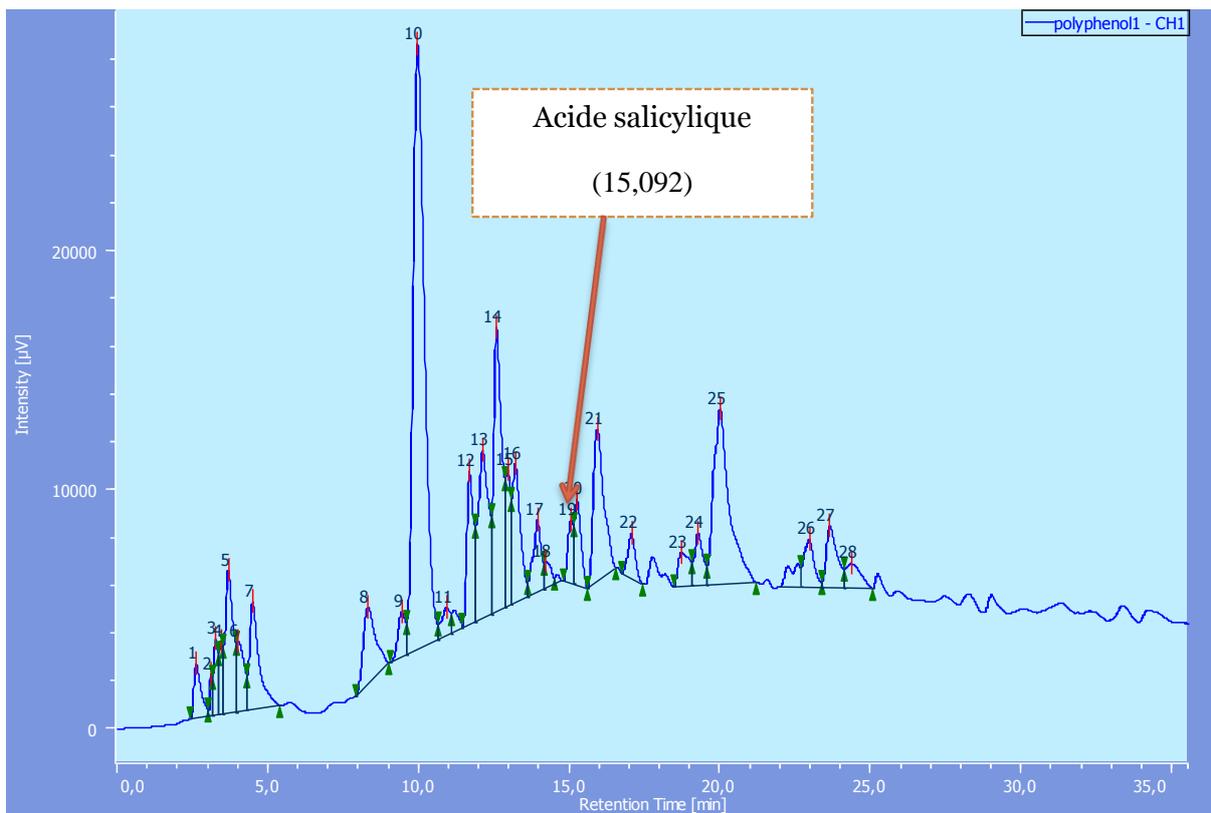


Figure28 : Chromatogramme d'HPLC des graines de *Peganum harmala* enregistré à 280nm

Tableau10 : Temps de rétention des acides phénoliques présents dans les extraits des graines de *Peganum harmala* à longueur d'onde 325nm

Nom de pic	tr
1Unknown	2,658
2Unknown	2,817
3Unknown	3,508
4Unknown	4,042
5Unknown	5,100
6Unknown	10,358
7Unknown	13,058
8Unknown	13,325
9Unknown	14,075
10Unknown	14,858
11Unknown	16,375
12Unknown	16,975
13Unknown	17,433
14Unknown	17,800
15Unknown	18,375
16Unknown	19,525
17Unknown	19,983
18Unknown	20,617
19Unknown	24,250
20Unknown	25,758
21Unknown	31,100

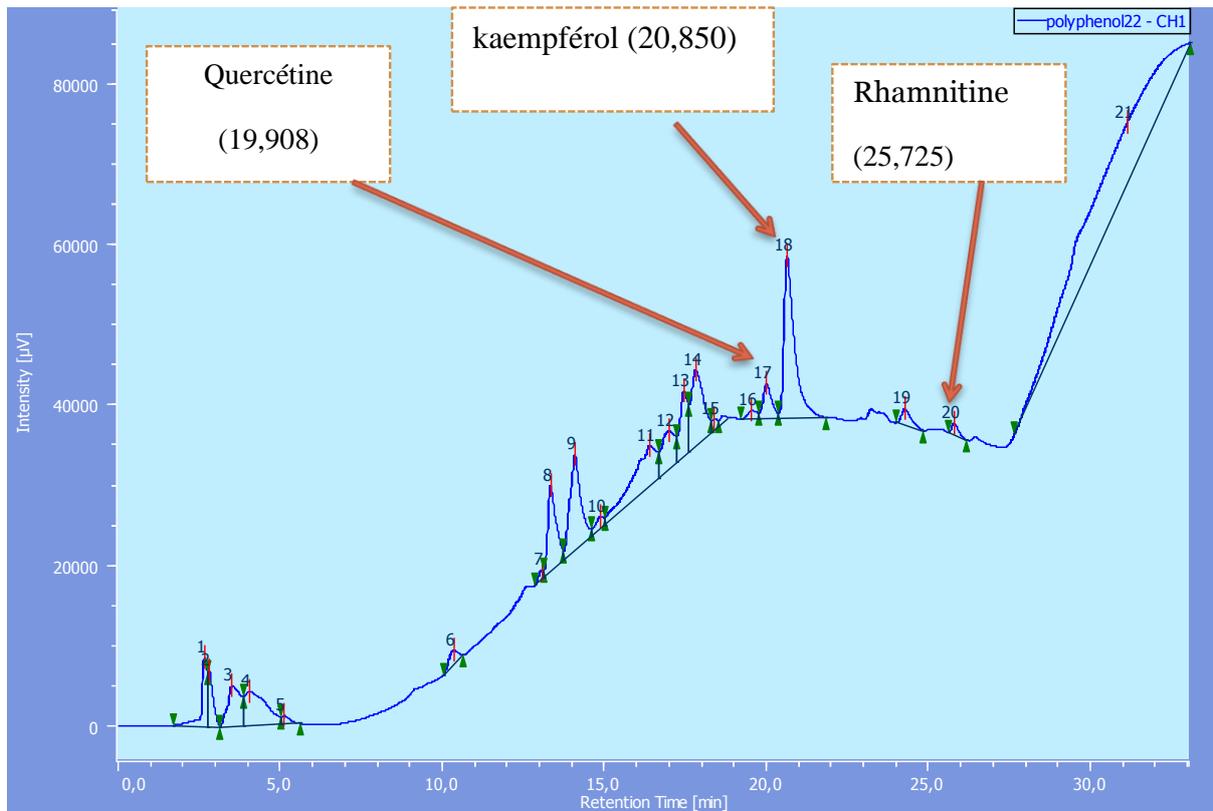


Figure29 : Chromatogramme d’HPLC des graines de *Peganum harmala* (graines) enregistré à 325nm

- Quercétine qui correspond au pic 17 avec un tr de 19,983 qui est proche de la valeur de 19,908(standard) à une longueur d’onde de 325 nm
- Rhamnitrine qui correspond au pic 20 avec un tr de 25,758 qui est proche de la valeur de 25,725(standard) à une longueur d’onde de 325 nm
- On remarque sur ce chromatogramme que le pic 18 est le plus prononcé avec un tr de 20,617 qui pourrait correspondre au kaempférol (20,850)

Dans une étude précédente sur les graines de *Peganum harmala* indique leur richesse en composés phénoliques avec une teneur importante en flavonoïdes, qui sont dotées d’un pouvoir antioxydant remarquable. (Rezzagui, 2012), ce qui correspond à nos résultats.

On remarque que *Peganum harmala* et *Pimpinella anisum* possèdent de nombreux polyphénols dont l’acide salicylique, la quercétrine et la rutine en commun, et dans la suite de notre études nous avons testé l’activité antioxydante de nos deux espèces vue leur richesse en acides phénoliques et flavonoïdes.

Tableau11 : Temps de rétention (tr) des acides phénoliques standards (280nm)

Les standards	tr
Catéchine	8,050
Epicatchine	10,808
Chlorogenique	9,092
Acide caféique	4,600
Acide Vanillique	12,475
acide coumarique	28,908
Methoxycinnamique	14,033
acide salicylique	15,092
Acide tannique	2,317
Acide ascorbique	3,358
Acide gallique	3,925

Tableau12 : Temps de rétention (tr) des flavonoïdes standards (325nm)

Les standards	tr
Esculitine	9,092
Rhamnetine	25,725
Apigénine	22,517
Quercétine	15,242
Kaempferol	20,850
Naringénine	15,100
Rutine	12,933
Quercétine	19,908

2. Activité antioxydante

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer l'activité antioxydante des plantes (krishnaiah et al, 2010 ; Baghiani *et al.*, 2012)

Le DPPH est un radical libre synthétique de couleur violée foncée .c'est le radical le plus utiliser dans l'analyse de l'activité anti-radicalaire des substances bioactives contenus dans les extraits des plants médicinales (Kubola et Siriormpun ,2008) pour :

Leur absorbance maximale à 517 nm, ce qui permet donc l'évaluer l'activité anti radicalaire, par spectrophotométrie, en mesurant toute diminution d'absorbance de DPPH.

Tableau13 : Résultat des activités antioxydantes des deux espèces

Les espèces	concentration	Activité Scavenger %
<i>Peganum harmala</i> (graine)	1mg/ml	75.11%
	5mg/ml	32.39%
<i>Peganum harmala</i> (partie aérienne)	1mg/ml	40.37%
<i>Pimpinella anisum</i> (graine)	1mg/ml	73.23%

Les résultats du test antioxydant des graines *Peganum harmala* a montré que la phase d'acétate d'éthyle montrait une activité plus importante pour la concentration 1mg/ml, par contre pour la concentration 5mg/ml L'espèce.

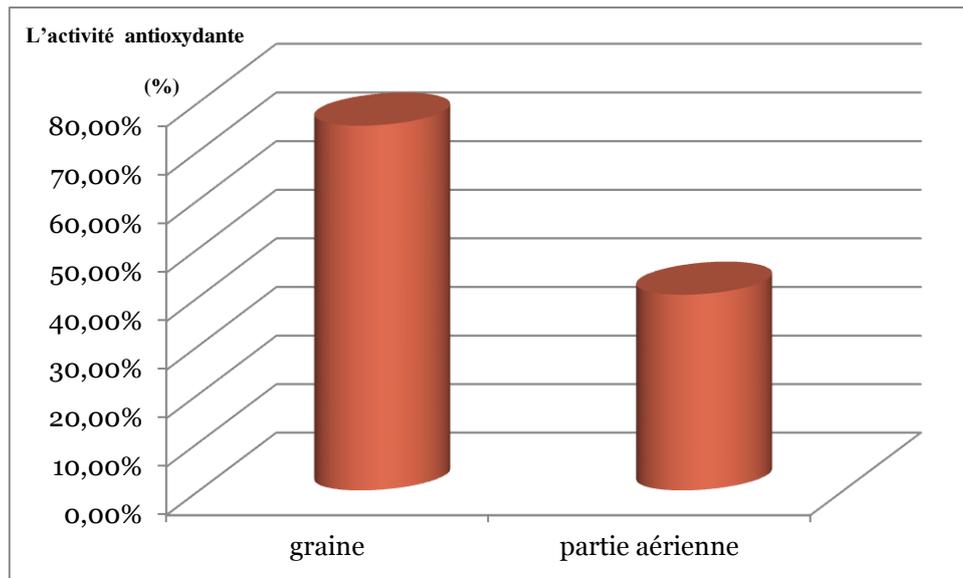


Figure30 : L'activité antioxydante des graines et de la partie aérienne de l'espèce *Peganum harmala* à 1 mg/ml

On remarque que l'activité antioxydante de l'espèce *Peganum harmala* à la concentration de 1 mg/ml est nettement plus élevée dans la graine plutôt que dans la partie aérienne cela pourrait être dû à la richesse de la graine en flavonoïdes et acides phénoliques notamment l'acide salicylique, quercétine et la rhamnétine et bien d'autres polyphénols que nous n'avons pas pu déterminer (pic14, pic 10 et pic 25)

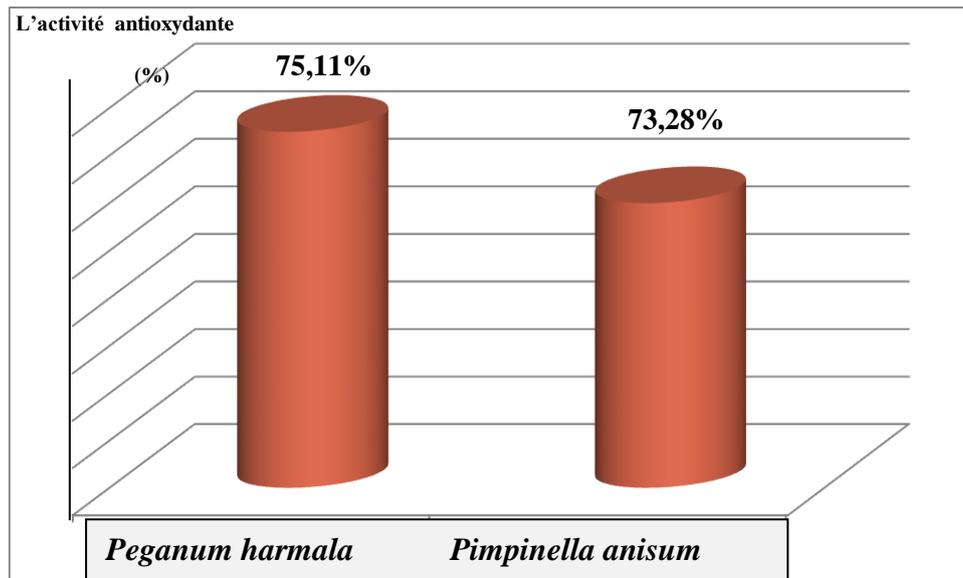
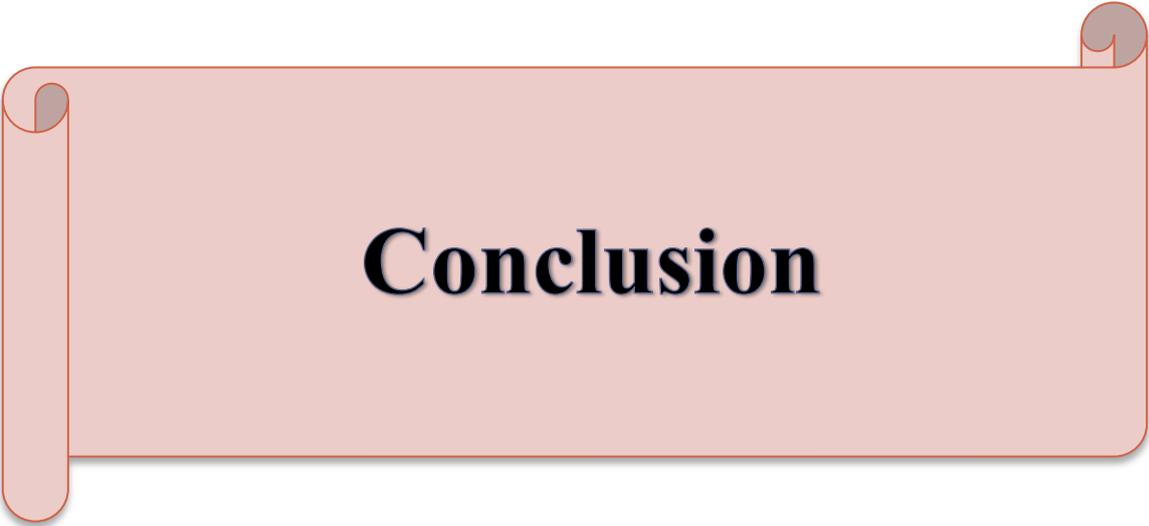


Figure31 : l'activité antioxydante des espèces *Pimpinella anisum* et *Peganum harmala* à 1mg/ml

Les graines de l'espèce *Peganum harmala* présente une activité antioxydante plus importante par rapport aux graines de l'espèce *Pimpinella anisum* quoiqu'elle reste proche.

Des travaux précédents sur d'autres espèces soumises au même test de DPPH pour mesurer leur activité antioxydante (*Ajuga iva* avec 10,63% et *Marrubium vulgare* avec 10,04%) (Hassin boukal, 2015) montre que nos deux espèces étudiées ont un pouvoir antioxydant très important et plus élevé.



Conclusion

Peganum harmala (le harmal) et *Pimpinella anisum* (l'anis vert) sont deux plantes utilisées en phytothérapie.

D'après notre étude, ces deux espèces ont montré une richesse importante en composés polyphénols et un pouvoir antioxydant élevé.

L'analyse par HPLC a révélé que les graines de l'anis vert (*Pimpinella anisum*) pourraient contenir les flavonoïdes suivants : l'esculitine, la rutine, la quercétine et l'apigénine, et des acides phénoliques suivants : l'acide salicylique et la coumarine

Pour la partie aérienne de harmal (*Peganum harmala*), l'analyse par HPLC a révélé qu'elle pourrait contenir les flavonoïdes suivants : la rutine, et des acides phénoliques suivants : l'acide ascorbique, l'acide vanillique et l'epicatéchine.

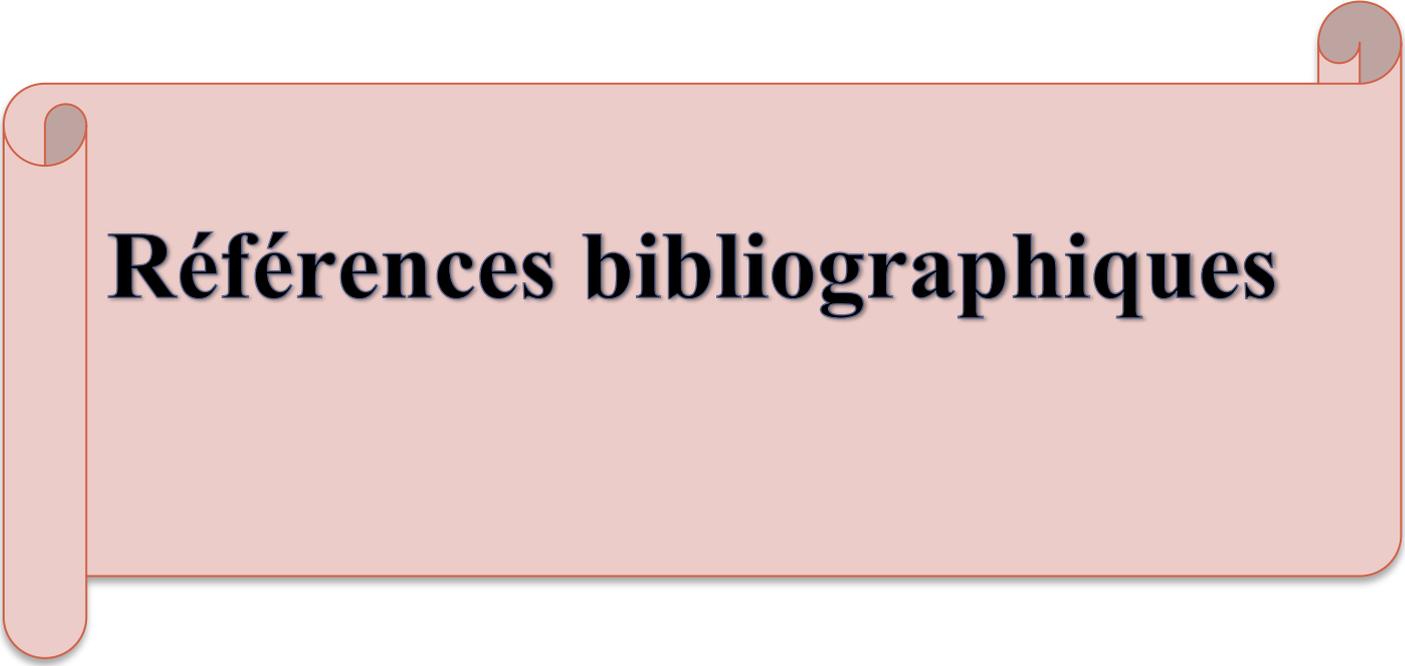
L'analyse par HPLC a révélé que les graines de harmal (*Peganum harmala*) pourraient contenir les flavonoïdes suivants : la quercitine, la rhamnitrine et des acides phénoliques suivants : l'acide salicylique et le kaempférol

L'étude du pouvoir antioxydant par la méthode de réduction de radical libre DPPH a révélé que les graines de harmal (*Peganum harmala*) qui a donné le pouvoir antioxydant pour la concentration 1mg/ml de (75.11%) et le pouvoir antioxydant de (40.37%) pour La partie aérienne de harmal (*Peganum harmala*), et de (73.23%) pour les graines de l'anis vert (*Pimpinella anisum*).

Notre modeste étude met en valeur l'importance de ses espèces utilisées en phytothérapie ainsi que leur richesse en polyphénols, mais cette étude doit être approfondie pour identifier les autres pics qui sont assez importants et que nous n'avons pas pu identifier.

Utiliser d'autres techniques plus sophistiquées comme la spectroscopie de masse afin de mettre en évidence d'autres composés et métabolites.

Tester d'autres activités antimicrobiennes, antibactériennes et antifongiques.....



Références bibliographiques

- **Amić D., Davidović-Amić D., Bešlo D. et Trinajstić N.(2003).** Structure–Radical scavenging activity relationships of flavonoids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA.*, **76** (1) : 55-61.
- **Andersen YM and Markham KR .(2006).** Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications. Ed. CRC, Taylor & Francis, Boca Raton, FL, p. 553-616.
- **Aniszewski T. (2007).** Definition, Typology and Occurrence of Alkaloids. **In:** Alkaloids - Secrets of Life. *Elsevier* (Amsterdam), 1-59.
- **Anonyme 1 ;** Symposium international sur les plantes médicinales et la phytothérapie. Ed .O.P.U .Constantine Algérie (2007) .pp.113.
- **Anonyme2 ;** 129. [http://faculty.ksu.edu.sa/Al-Rowaily/ Pictures%20Library/Rangeland%20Flora%20d9%86%d8%a8%d8%a7%d8%aa%d8%a7%d8%aa%20%d8%a7%d9%84%d9%85%d8%b1%d8%a7%d8%b9%d9%8a/Peganum%20harmala.bmp](http://faculty.ksu.edu.sa/Al-Rowaily/Pictures%20Library/Rangeland%20Flora%20d9%86%d8%a8%d8%a7%d8%aa%d8%a7%d8%aa%20%d8%a7%d9%84%d9%85%d8%b1%d8%a7%d8%b9%d9%8a/Peganum%20harmala.bmp)
- **Anonyme 3;**http://healthyhomegardening.com/images/gardengeek/syrian_rue.jpg
- **Anonyme 4.** L'encyclopédie libre (en ligne) : <http://www.wikipédia.com>.
- **Aouadhi S .(2010).** Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle. à l'étude de 57 plantes recommandées par les herboristes. Faculté de médecine de Tunis - Master,104-106. 15-166p
- **Arslan N., B. Gürbüz, E. O. Sarihan, A. Bayrak, and A. Gümüşçü.(2004).** “Variation in essential oil content and composition in Turkish anise (*Pimpinella anisum* L.) populations,” *Turkish J. Agric. For.*, vol. 28, no. 3, pp. 173–177
- **Asie Shojaii and Mehri Abdollahi Fard. (2012).** Review of Pharmacological Properties and Chemical Constituents of *Pimpinella anisum*. *ISRN Pharm.* 8p
- **Axel Ghestem – Elisabeth Seguin –Michel paris, Anne_ Marie Orecchioni .(2000).** Préparateur en pharmacie (dossier 2) botanique_ pharmacognosie phytothérapie Homéopathie; Edition: Tec&doc paris 2000. cité in SALHI, FAATIT et KAROU, 2011 ; l'étude phytochimique et biologique du thapsia garganica.
- **Babayi H, Kolo I, Okogum JI.(2004)** The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. *Biochemistri* .16 (2): 102-5.
- **Baghiani A, Djarmouni M, Boumerfeg S, Trabsa H, Charef N, Khennouf S, & Arrar L (2012).** Xanthine Oxidase Inhibition and Antioxidant Effects of *Peganum harmala* Seed Extracts. *European Journal of Medicinal Plants*, **1**: 42-56.

- **Bartosikova L., necas J., Suchy V., Kubinova R.(2003)**. Antioxydative effects of morine in ischemia, reperfusion of kidney in the laboratory .*Drug and Chemical Toxicology*, **72**:87-94.
- **Basile A, Giordano S, Lopez Saez JA, Cobianchi BC.(1999)** Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochem.* 2 (8): 1419-82.
- **Batawita K, Kokon K, Akpagona K, Koumaglo K, Bouchet P.(2002)** Fungicide activity of a threatened species from togo flora: *Conyza aegyptiaca (L.) Ait. var. lineariloba (DC.) O. Hoffm.* (Asteraceae)). *Acta Bot. Gal.* 149 (1): 41-8.
- **Bayer R.F.(1986)**. Modern experimental biochemistry, Addison-Wesley Publishing co, Reading (Mass., USA) p.49-51.
- **Boukri. N. E. H (2014)** “Contribution à l’étude phytochimique des extraits bruts des épices contenus dans le mélange Ras-el-hanout,” université Kasdi Merbah Ouargla, Algérie. mémoire de master
- **Bronner W. E. and Beecher G. R .(1995)**. Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. *J. Chromatog. A*; 705: 247-256.
- **Bruneton J. (1999)**. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Médicales Internationales Editions Technique & Documentation, Cachan, [S.l.], p. 647-673.
- **Bruneton J. (1993)**. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Ed. Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- **Cengiz N.(2008)**. “Hepatoprotective Effects of Pimpinella anisum Seed Extract in Rats,” *pharmacologyonline*, pp. 870–874.
- **Cha M N ,Jun H H, Lee W J ,Kim M J, Kim M K, Kim Y S(2013)**. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Korean Cactus (*Opuntia humifusa*) Fruit. *Food.Sci.Biotechnol.* 22(2):523-529
- **Chehma A. (2006)**. Catalogue des plantes spontanées du Sahara Septentrional Algérien, Edition Dar El Houda , P 87-106
- **Choi HJ, Song JH, Park KS.(2009)** Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. *Eur. J. Pharm. Sci.* 37 (3-4): 329-33.
- **Christopher T.A., Lopez B.L., Yue T.L., Feuerstein G.Z., Ruffolo R.R. Ma X.L.(1995)**. Carvedilol, a new beta-adrenoreceptor blocker, vasodilator and free-

- radical scavenger, exerts an anti-shock and endothelial protective effect in rat splanchnic ischemia and reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther*, **273**: 64-71.
- **Cushnie TP, Hamilthoh VES, Lamb AJ.(2003)** Assessment of the antimicrobial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol. Res.* 158(4): 281-9.
 - **Dacosta Y. (2003).** Les phytonutriments bioactifs. Yves DACOSTA (Ed). Paris, 317p.
 - **Dadi PK, Ahmad M, Ahmad Z.(2009)** Inhibition of ATPase activity of *Escherichia coli* ATP synthase by polyphenols. *Int. J. Biol. Macromol.* 2009, 45 (1): 72-9.
 - **Diallo A. (2005).** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd. (*MYRTACEAE*). Thèse de Doctorat. Mali.
 - **Didrak M.(1999)** Antimicrobial activities of the extracts of various plants (Valex, Mimosa bark, Gallnut powders, *Salvia sp* and *Phlomis sp*). *J. Biol.* 23: 241-8.
 - **Es-Safi N.E.,Kollmann I.,Khlifi S.et Ducrot P.H.(2007).**Antioxydants effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L Structure-activity relationship. *LWT Foodscience and technology.*,**40**:1246-1252.
 - **Fabien Cézard.(2009).** Biotéchnologie 26 fiches. Dunod. Paris. 1^{ère} édition. P :110-111-113.
 - **Fernandez-Gutierrez, A. (2006).** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis.***41**: 1220-1234.
 - **Fosting S.(2004).** Etude phytochimique et des activités biologiques de *Maerua angensis* (Capridaceae). Thèse de doctorat. Bamako, 149p.
 - **Galvez J, Crespo J, Jimenez J, Suarez A, Zarzuelo A.(1993).** Antidiarrhoeic activity of quercetin in mice and rats. *J. Pharmacol. a*, 45: 157-9.
 - **Galvez J, Zarzuelo A, Crespo J, Lorente MD, Acete MA, Jimenez J.(1993)** Antidiarrhoeic activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid constituent. *Planta Med.* b, 59: 333-6.
 - **Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., González-Gallego J., Sánchez-Campos S. et Tuñón M. J. (2007).** Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición hospitalaria*, **22** (3) : 287-293.
 - **Goodarzi MT, Zal F, Malakooti M, Safari MR, Sadeghian S.(2006)** Inhibitory activity of flavonoids on the lens aldose reductase of healthy and diabetic rats. *Acta Med. Iran.* , 44(1): 41-5.

- **Gülçin I., M. Oktay, E. Kireççi, and Ö. I. Küfrevioğlu.(2003).**“Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts,” *Food Chem.*, vol. 83, no. 3, pp. 371–382.
- **Hagerman A. E. and Butler L. G . (1981).** The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 1981; 256: 4494-4497.
- **Hallard F. (1988).**Phytothérapie Paris Milan Barcelone Mexico.17, 54, 88, 93,107, 142, 154p.
- **Hämäläinen M., Nieminen R., Vuorela P., Heinonen M. et Moilanen E.(2007).** Antiinflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of inflammation.* **2007** (1) : 1-10.
- **Harborne J. B. (1997).** Recent advances in chemical ecology. *Nat Prod Rep* 1997; 14: 83-98.
- **Hassin boukal, C.(2015).**Etude biologique et phytochimique de quelques extraits actifs de deux espèces de la famille des labiées *Ajuva iva L.-Marrubium vulgareL.*memoire master.Univ.Mentouri constantine.P :89.
- **Hennebelle T. (2006).** « Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de lamiales productrices d’antioxydants : *Marrubium peregrinum* *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus* (lamiacées) et *Lippia alba* (verbénacées), Thèse Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat (Université de Lille-lille1), P14,22,27,29.Hool. L.C., 2006. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 33, p : 146-151.
- **Ilic SB, Konstrantinovic SS, Todorovic ZB.(2004)** Antimicrobial activity of bioactive component from flower of *Linum capitatum* Kit. *Physics Chem. Technol.* 3 (1): 73-7.
- **Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., De Laage de Meux A., Moulard F., Zha E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deesalle –Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J. et Botrel A.(2001).** Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Ed Larousse. p10-12.
- **Kartal M, Altun ML, & Kurucu S. (2003).** HPLC method for the analysis of harmol, harmalol, harmine and harmaline in the seeds of *Peganum harmala* L. *Journal of Pharmacological and Biomedical Analysis*, **31**: 263-269.

- **Khashimov K, Telezhenetskaya M, & Yunusov S. (1969).** Desoxypeganine: A new alkaloid from *Peganum harmala*. *Chemistry of Natural Compounds*, **5**: 381-382.
- **Kim H. P., Son K. H., Chang H. W. et Kang S. S. (2004).** Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences.*, **96** (3) : 229-245.
- **Krishna D., Chaluvadi M., Raj N. and Sripal R .(2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.*;
- **Krishnaiah D, Sarbatly R, & Nithyanandam R (2010).** A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing* (In press).
- **Kubola J & Siriamornpum S (2008).** Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts *in vitro*. *Food Chemistry*, **110**: 881-890.
- **Kuster RM, Arnold N, Wessjohann L.(2009)** Anti-fungal flavonoids from *Tibouchina grandifolia*. *Biochem. Syst. Ecol.* 37 (1): 63-5.
- **Larwence A., Hammoud F., Salah A., Abada S. and Oucha__ N. Ñ .(1984).** Valeur alimentaire des marcs de raisin. III. - Rôle des tanins condensés dans la faible valeur nutritive des marcs de raisin chez le mouton : effet d'une addition de polyéthylène glycol 4000. *Ann. Zootech.*; 33: 533-543.
- **Leeuwen P. A. M.(2001).** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American journal of clinical nutrition.*, **74** : 418-425.
- **Macheix JJ, Fleuriet A and Jay-Allemand C .(2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 2005, p. 4-5.
- **Male_Év D. É. and Kunti_ç V .(2007).** Investigation of metal--flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal--flavonoid complexing reactions. *J. Serb.Chem. Soc.*; 72: 921-939.
- **Martínez-Cayuela M.(1995).** Oxygen free radicals and human disease. *Biochem*, **77**: 147-161
- **Martini A, Katerere DR, Eloff JN.(2004)** Seven flavonoids with antibacterial activity isolated from *Combretum erythrophyllum*. *J. Ethnopharmacol.* 93 (2-3): 207-12.

- **Moattir.R.,Fauron.R,et Donadieny.(1983).**Thérapeutique différante.Eddition de LIBRAIRIE MALOINES ,Paris,243p.
- **Modak B.(2001)** Actividad antibacteriana de flavonoïdes aïslados des exudado resinod de *Heliotropium sinnuatum*. Efecto del tipo de estructura. Bol. Soc. Quin. 47 (1): 366-421.
- **Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R.(2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal pharmacology.*, **33** : 2-16.
- **Nijveldt R. J., van Nood E., van Hoorn D. E., Boelens P. G., van Norren K .(2001).** and van Leeuwen P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American J. Clinic. Nutr.*; 74: 418-425.
- **Novelli G.P.(1997).** Role of free radicals in septic shock *.Journal of Physiol Pharmacol.* **48**:517-527.
- **Okigbo RN, Mbajinka CS, Njoku CO.(2005)** Antimicrobial potentials of (UDA) *Xylopiæ aethopica* and *Occinum gratissimum L.* some pathogenous of man. *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci.* 1 (4): 392-7.
- **Ortuno A, Baidez A, Gomez P, Arcas MC, Porrás I, Garcia-Lidon A, Del Rio JA.(2006)** *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chem.* 98 (2): 351-8.
- **Ouali K, Trea F, Toumi L, Bairi A, Maurel D, Guellati MA.(2007)** L'héspéridine, un antioxydant flavonoïde qui diminue le stress oxydatif et prévient les malformations foetales au cours du diabète gestationnel expérimental. *Phytothér.* 5 (4): 204-9.
- **Pietta PG.(2000)** Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63 (7), 1035-42.
- **Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O. (2002)** Mécanismes physiologiques de la défense anti-oxydante *Physiological action of antioxidant defences. Nutrition clinique et métabolisme.* **16**: 233-239.
- **Ray S. D., Wong V., Rinkovsky A., Bagchi M., Raje R. R. and Bagchi D.(2000).** Unique organoprotective properties of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cadmium chloride-induced nephrotoxicity, dimethylnitrosamine (DMN)-induced splenotoxicity and mocap-induced neurotoxicity in mice. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol*107: 105-128.

- **Rezzagui A.(2012).** Evaluation de l'effet toxique de l'extrait brut et de l'activité antioxydante des différents extraits des graines de *Peganum harmala* L. Mémoire de magistère. Université Sétif. Algérie. P 77.
- **Ringuet J., Bloth J. et Botrel A.(2001).** Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Ed Larousse. p10-12.
- **Sabin Mohamed,Boudali Mohamed.(2012).**La phytothérapie entre la confiance et mefiance .thèse doctorat université baji mokhtare.annaba
- **Sanchez-Moreno, C. (2002).** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems.*International Journal of Food Science and Technology.* **8**: 121- 375.
- **Sarni-Manchado P and Cheynier V .(2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec & Doc, Paris, p. 2-10. 33: 2-16.
- **Seigler DS .(1998).** Plant secondary metabolism. Ed. Kluwer Academic, Boston, p. 193- 205.
- **Slavica B, Ilic SSK, B. Zoran BT.(2004)** Flavonoids from flower of *Linum capitatum* kit. Phys. Chem. Technol. 3: 67-71.
- **Spedding G, Ratty A, Middleton E.(1989)** Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. Antiviral Res. 12 (2): 99-110.
- **Strang C.(2006).** Larousse medical. Ed Larousse.
- **Subramanian S., Stacey G. and Yu O .(2007).** Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends Plant Sci.*; 12: 282-285.
- **Tapas A. R., Sakarkar D. M. et Kakde R. B.(2008).** Flavonoids as nutraceuticals. *Topical journal of pharmaceutical research.*, **7** (3) : 1089-1099.
- **Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Endo Y, Tamaki N, Sanbe T, Murakami J, Yamamoto T, Morita M.(2009)** Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. J. Periodontol. 2009, 80 (11): 1799-808.
- **Tsai T. H., Tsai P. G. et Ho S. C.(2004).** Antioxidant and anti-inflammatory activities of several commonly used species. *Journal of food science.*, **70** (1) : C93-C97.
- **Ulanowska K, Traczyk A, Konopa G, Wegrzym G.(2006)** Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. Arch. Microbiol. 184 (5): 271-8.

- **Ullah H., A. Mahmood, and B. Honermeier.(2014).** “essential oil and composition of anise (*pimpinella anisum* l .) with varying seed rates and row spacing,” *Pac. J. Bot*, vol. 46, no. 5, pp. 1859–1864.
- **Urquiaga I. N. E. S. and Leighton F. E. D .(2000).** E. Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol. Res.*; 33: 55-64.
- **Walle T .(2004).** Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biol. Med.*;
- 36: 829-837.
- **Yamamoto T, Morita M.(2009)** Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. *J. Periodontol.* 2009, 80 (11): 1799-808.
- **Yao K., De Luca V. and Brisson N .(1995).** Creation of a Metabolic Sink for Tryptophan Alters the Phenylpropanoid Pathway and the Susceptibility of Potato to *Phytophthora infestans*. *Plant, Cell.*; 7: 1787
- **Yousefi R, Ghaffarifar F, & Dalimi AA. (2009).** The Effect of *Alkanna tinctoria* and *Peganum harmala* Extracts on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) in vitro. *Iranian Journal of Parasitology*, 4: 40-47.

IMAMI LOUBNA

TOUIRAT AICHA

Soutenu le : 13 /06 /2016

Contribution à l'étude phytochimique (les polyphénols) de deux espèces *Pimpinella anisum* L. et *Peganum harmala* L.

Résumé :

Peganum harmala est une plante de la famille des Zygophyllacées, assez riche en constituants chimiques tels que les Acides aminés, les Flavonoïdes, les pigments et les alcaloïdes.

Pimpinella anisum est une plante de la famille Apiacées, se compose de sesquiterpènes, acides phénoliques, furocoumarines, huile essentielle à base d'anéthol ..., d'où l'intérêt porté à ces deux espèces, pour démontrer leur richesse en polyphénol grâce à une étude phytochimique basée sur l'extraction des composés phénoliques et une identification des flavonoïdes et acide phénoliques par la technique de chromatographie liquide à haute performance, suivi d'un test de DPPH pour étudier l'activité antioxydante qui a démontré un pouvoir antioxydant important chez les deux espèces.

L'analyse par HPLC a révélé que les graines de l'anis vert (*Pimpinella anisum*) pourraient contenir les flavonoïdes suivants : l'esculitine, la rutine, la quercétine et l'apigénine, et des acides phénoliques suivants : Acide salicylique et la coumarine.

L'analyse par HPLC a révélé que la partie aérienne de Harmel (*Peganum harmala*) pourrait contenir les flavonoïdes suivants : la rutine, et des acides phénoliques suivants : Acide ascorbique, Acide vanillique et l'epicatéchine.

L'analyse par HPLC a révélé que les graines de harmel (*Peganum harmala*) pourraient contenir les flavonoïdes suivants : la quercétine, la Rhamnitine et des acides phénoliques suivants : Acide salicylique. Kaempférol.

Mots clés : *Pimpinella anisum*, *Peganum harmala*, Composés Phénoliques, Flavonoïdes, HPLC, Activité Antioxydante

Devant le jury :

Président(e) : Labbani Zelikha
Encadreur : Bouzid Salha
Examineur : Bouchoukh Imane

Pr-UFM Constantine
MAA-UFM Constantine
MAA-UFM Constantine

Année universitaire : 2015/2016