

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de La Recherche Scientifique

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

BENATTIA Rokaia et BELFADEL Khadija

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : Biotechnologie et valorisation des plantes

THÈME

**Etude phytochimique et activité antioxydante des
fractions d'extraits issus des feuilles et fleurs de**

***Thymelaea hirsuta* L.**

DEVANT LE JURY

Président Badaoui Mahdjouba Ikram Grade MCB

U. Mostaganem

Encadreur Bouzouina Mohammed Grade MCA

U. Mostaganem

Examineur OuldKaddour Asma Souad Grade MCB

U. Mostaganem

Année universitaire 2020/2021

Thème réalisé au laboratoire de protection des végétaux, Université de Mostaganem (LPV)



Remerciement

*Je remercie tout d'abord "**Allah**" le tout puissant de m'avoir donné la santé*

La patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.

*Nous remercions **NOS CHERS PARENTS** Qui nous ont aidés à être ce que nous sommes et Qui nous ont entourés avec tant d'amour et d'affection.*

Nous tenons à adresser nos très sincères remerciements à notre directeur de mémoire monsieur

***BOUZOUINA Mohammed** Qui nous a guidé dans notre travail,*

Merci pour nous avoir accordé votre temps.

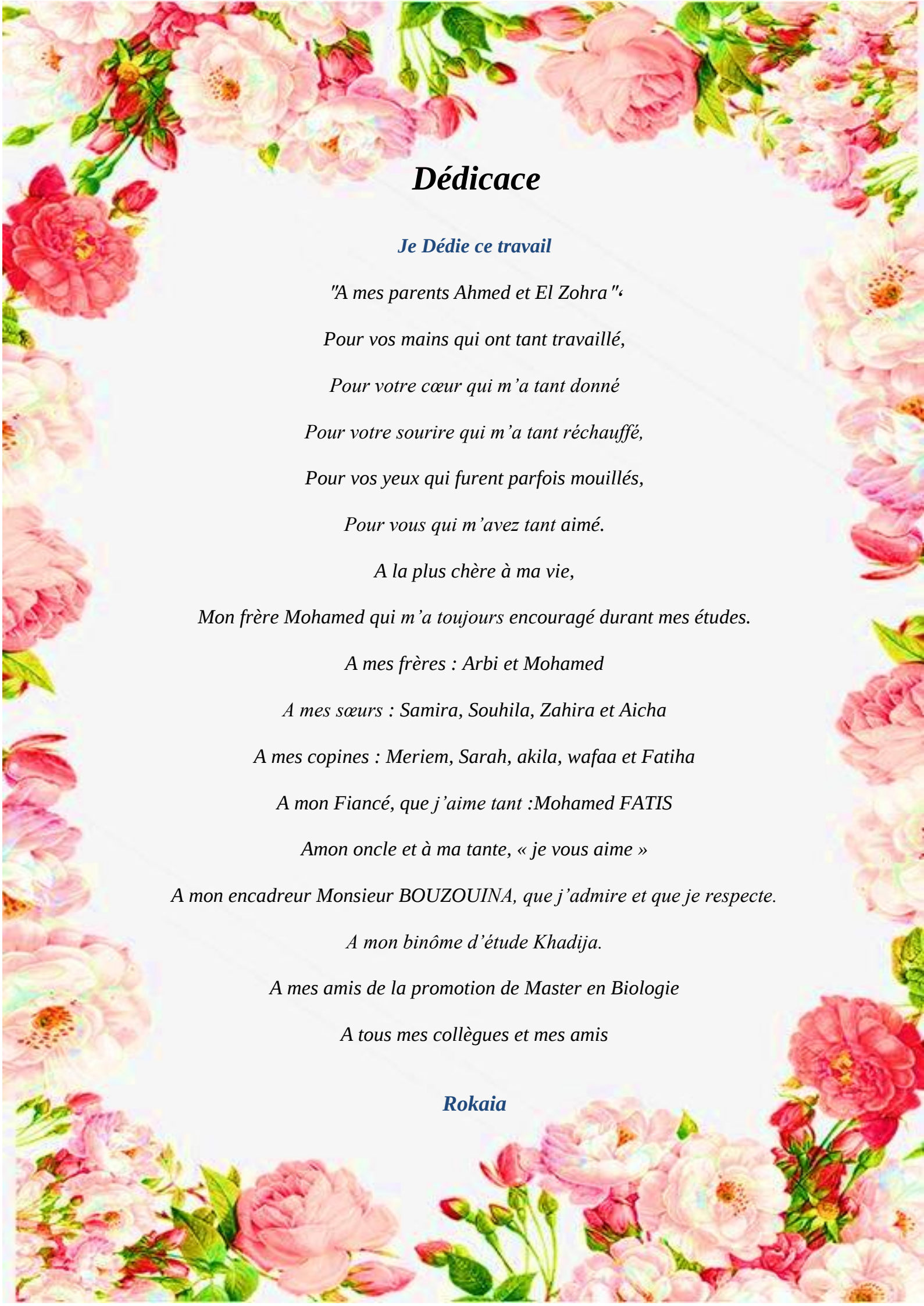
Nous remercions les membres du jury madame badaoui mahdjoba ikram , ould kaddour asma

souad d'avoir accepté de juger notre modeste travail :

Nous remercions également tous les membres des laboratoires

*del'**université de Mostaganem « ITA »** Qui nous ont beaucoup aidé à réaliser*

ce travail dans de bonnes conditions.



Dédicace

Je Dédie ce travail

"A mes parents Ahmed et El Zohra"

Pour vos mains qui ont tant travaillé,

Pour votre cœur qui m'a tant donné

Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé,

Pour vos yeux qui furent parfois mouillés,

Pour vous qui m'avez tant aimé.

A la plus chère à ma vie,

Mon frère Mohamed qui m'a toujours encouragé durant mes études.

A mes frères : Arbi et Mohamed

A mes sœurs : Samira, Souhila, Zahira et Aicha

A mes copines : Meriem, Sarah, akila, wafaa et Fatiha

A mon Fiancé, que j'aime tant : Mohamed FATIS

A mon oncle et à ma tante, « je vous aime »

A mon encadreur Monsieur BOUZOUINA, que j'admire et que je respecte.

A mon binôme d'étude Khadija.

A mes amis de la promotion de Master en Biologie

A tous mes collègues et mes amis

Rokaia



Dédicace

Mon histoire est courte.

Je suis tombée amoureuse d'un homme plus que moi.

Une nuit, j'ai été terrifiée par la nouvelle de sa mort.

Le temps ne m'a pas satisfait.

***Mon père**, qui est parti longtemps pour la patrie des dormeurs, et tout est resté différent après son départ, mon père, si ce n'était de ton âme qui planait sur moi.*

Je n'aurais pas continué mon chemin.

Ton rôle dans ta vie et dans ta mort était un.

Ma vie s'illumine et mon père l'éteint.

Aujourd'hui j'ai tant souhaité que tu me voyer porter haut mon chapeau et voir ton sourire qui me remplit de joie.

***Mon père**, tu es la vie, il n'y a pas de vie après Dieu.*

*Je dédie le fruit de ma remise de diplôme à **mon cher père**,*

que Dieu ait pitié de lui, à moi,

*Je dédie ma remise de diplôme à **ma chère mère**,*

qui a versé ses larmes pour en arriver là.

Puis aussi je dédie mon diplôme à mon mari et mes chers frères et mes sœurs et à mon encadrant et ma famille

Je remercie mes amis et copines qui m'ont accompagné pendant ces années.

Nous sommes entrés comme des étrangers et sommes partis amis et frères

Khadija

Résumé

L'Algérie, par sa position géographique, abrite une biodiversité exceptionnelle occupée par d'importantes plantes médicinales. *Thymelaeahirsuta*, espèce endémique, est une plante médicinale utilisée dans la pharmacopée traditionnelle algérienne pour le traitement de diverses maladies. Le présent travail a porté sur l'étude phytochimique des fractions d'extraits éthanoliques issues des fleurs et feuilles *Thymelaeahirsuta* et l'évaluation, *in vitro*, de leurs activités antioxydantes par la méthode du piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Les résultats phytochimiques montrent des quantités importantes de composés phénoliques et de flavonoïdes, plus précisément dans les fractions n-butanol et d'acétate d'éthyle des fleurs et des feuilles. Ces mêmes fractions constituent une source potentielle antioxydante avec des IC_{50} oscillant entre $1\,738 \pm 0\,052$ et $2\,015 \pm 0\,044$ mg/ml de lyophilisat. Cette étude confirme l'usage traditionnel de cette plante et révèle son intérêt dans le cadre d'une exploitation industrielle pharmaceutique.

Mots clés : *Thymelaeahirsuta*, Phytochimie, Fractions, composés phénoliques totaux, Flavonoïdes, Activité antioxydante.

Abstract:

Algeria, by its geographical position, shelters an exceptional biodiversity including important medicinal plants. *Thymelaeahirsuta*, endemic species, is a medicinal plant used in traditional Algerian pharmacopoeia for various diseases treatment. This work focused on phytochemical study of ethanolic extract fractions obtained from *Thymelaeahirsuta* flowers and leaves, and evaluation, *in vitro*, of their antioxidant activities using the scavenging the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method (DPPH). Results show significant amounts of phenolics and flavonoids, specifically in n-butanol and ethyl acetate fractions. These same fractions constitute a potential antioxidant source with IC_{50} ranging between $1,738 \pm 0,052$ and $2,015 \pm 0,044$ mg/ml of lyophilisate. This study confirms the traditional use of this plant and reveals its interest in the perspective of industrial pharmaceutical exploitation.

Keywords: *Thymelaeahirsuta*, Phytochemistry, Fractions, Total phenolic compound, Flavonoïdes, Antioxidant activity.

Contenu	Page
Remerciement	
Dédicace	
Résumé	
Abstract	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Glossaire	
Introduction	1
<i>Etude bibliographique</i>	
<i>Chapitre 01 ThymelaeahirsutaEndel</i>	
1. Le nom vernaculaire	4
2. Systématique	4
3. Caractéristique du taxon	5
• Ecologie	5
• Morphologie	5
4. Habitat	5
5. Distribution géographique	6
6. Propriétés et usage thérapeutique	6
7. Toxicité de ThymelaeahirstutaEndel	6
<i>Chapitre 02 les composés phénoliques</i>	
1. Généralités	8
2. Les principales classes de composés phénoliques	8
2,1. Acide hydroxy cinnamiques et dérivés	11
2,2. Les stilbènes	12
2,3. Flavonoïdes	12
2,3,1 Structure chimique et classification des flavonoïdes	12
A. Les flavanols	13
B. Flavones	14
C. Les flavanones	15
D. les flavanos	15
E. Les isoflavones	16
F. Profil des acides gras dans les différentes parties de thymelaeahirsuta	18
2,3,2. Activités biologiques des flavonoïdes	19
2,3,2,1. Activité anti-inflammatoire des flavonoïdes	19

Sommaire

Chapitre 03 Stress oxydant-antioxydant	
1. Oxydation et radicaux libres	21
1,1 Généralités	21
1,2 Le stress oxydant	22
1,3 Les radicaux libres	23
1,4 Origine des radicaux libres	23
1,5 Antioxydants	24
1,5,1 Définition	24
1,5,2 Les antioxydants endogènes	24
1,5,3 Les antioxydants exogènes	24
1,5,4 Utilisation des antioxydants	26
1,5,5 Classification des antioxydants	26
1,5,6 Conséquence du stress oxydatif	26
1,5,7 Les maladies liées au stress oxydatif	26
Etude expérimentale	
Chapitre 04 Matériels et méthodes	
1,1. Site d'échantillonnage	30
1,2. Matériel végétal	30
1,2,1. Echantillonnage	30
1,2,2. Séchage	30
1,2,3. Pulvérisation	30
1,3 Extraction des composés bioactifs	30
1,4. Appareillages	31
1,5. Produits chimiques	32
2. Analyse phytochimique	34
2,1. Analyse quantitative	34
2,2. Tests antioxydants (Test du piégeage du radical libre DPPH)	34
3. Analyse statistique	35
Chapitre 05 Résultats et discussions	
1. Les composés phénoliques totaux	37
2. Les flavonoïdes	37
3. DPPH	39
4. Acide ascorbique	40
5. IC50	40
Conclusion	42
Liste des références	44
Annexes	48

Liste des figures

Titre de figure	Page
1. Vue générale d'un arbrisseau de <i>Thymelaeahirsuta</i> (L.) Endel.	4
2. les organes d'une <i>Thymelaeahirsuta</i> (L) Endel	5
3. Squelette de base des flavonoïdes	13
4. Structure moléculaire du squelette des flavanols avec des nombres	13
5. Structure moléculaire du squelette des flavones avec des nombres	14
6. Structure moléculaire du squelette des flavanones avec des nombres	15
7. Structure moléculaire du squelette des flavanols	15
8. Structure moléculaire du squelette des isoflavones.	16
9. Les radicaux libres ou stress oxydatif	22
10. Le stress oxydatif	23
11. Les maladies liées au stress oxydatif	27
12. Protocole d'extraction	33
13. Courbe d'étalonnage d'acide gallique	37
14. Courbe d'étalonnage de la quercétine.	38
15. Courbe d'étalonnage d'alpha tocophérol par DPPH à 515 nm	40
16. La concentration inhibitrice médiane IC ₅₀ = 76 93	41

Titre de tableau	Page
1. Les principales classes de composés phénoliques	9
2. Principaux acides hydroxy cinnamiques	11
3. Profil des acides gras dans les différentes parties de thymelaeahirsuta	17
4. Les principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associés	25
5. Contenu des phénols totaux et flavonoïdes totaux, des fractions (chloroformique, Acétate d'éthyle, N-butanol, Aqueuse, résiduelle), dans les différents organes (feuille, fleurs) de thymelaeahirsuta L.	38
6. Résultats des taux d'inhibition de DPPH en% par les fractions de T. Hirsuta	39
7. La concentration inhibitrice médiane IC50 des organes (feuilles, fleurs) de thymelaeahirsuta.	41

Introduction

Depuis l'antiquité, les humains connaissent les plantes. Il a été décidé de les utiliser pour répondre à leurs besoins en tant que nourriture, abri, vêtements et même pour se soigner, car la plupart des plantes ont des propriétés curatives extraordinaires du fait qu'elles contiennent des produits chimiques qui agissent directement sur le corps.

De plus, ces produits chimiques qui diffusent leur effet directement sur le corps sont des antioxydants isolés de ces plantes, appelés polyphénols. Dans cette famille de plantes, une classe de métabolites secondaires reconnus comme responsables de nombreuses activités biologiques a été retrouvée. En effet, les flavonoïdes sont des anti-antioxydants, anti-inflammatoires, antiallergiques et anti-cancérigènes (**Bruneton, 2014**).

En Algérie, plus précisément dans les régions paysannes de l'ouest algérien, *Thymelaeahirsuta* est traditionnellement utilisée dans le traitement des infections cutanées et elle s'avère efficace.

L'objectif principal de ce travail vise à quantifier les contenus des composés phénoliques et à étudier l'activité antioxydante des différentes fractions de l'extrait éthanolique brut issu des feuilles et fleurs de *Thymelaeahirsuta*. Pour se faire, deux aspects ont été étudiés. Le premier a été basé principalement sur l'extraction et la quantification des composés phénoliques et les flavonoïdes. Le second a été consacré à l'évaluation de l'activité antioxydante vis-à-vis du radical libre DPPH, afin de déterminer l'efficacité de chacune des fractions.

Etude bibliographique

Chapitre I

***Thymelaea hirsuta* L.**

***Thymelaeahirsuta* Endel**

Généralités

Thymelaeahirsuta Endel est un arbrisseau (Fig. 1) aux rameaux garnis de petites feuilles imbriquées de 1,5 à 8 mm, ovales à lancéolées, charnues ou coriaces, brillant dont la face inférieure est blanche-tomenteuse. La plante porte sur des pieds différents soit des fleurs unisexuées soit des fleurs hermaphrodites. Ces fleurs sont rassemblées par 2 à 5 en glomérules. Les fruits sont des baies glabres, consommées par les animaux (dispersion zoophore). La floraison va d'octobre à avril ; c'est une plante entomogame (Brooks, 1990)



Figure 1 : Vue générale d'un arbrisseau de *Thymelaeahirsuta* Endel (Fanny Veinante).

1. Clé des genres *Thymelaea*

Plantes annuelles ou sous – arbrisseau à fleurs polygames ou dioïques. Péricarpe à 4-5 division en général persistante, verdâtre ou jaunâtre. Etamines 8-10 sur 2 rangs. Ovaire uniloculaire à 1 style. Fruit sec ou charnu, monosperme. Fruit sec. Fleurs petites, en général inodores, à tube ± renflé – urcéolé (Quezel et santa, 1993).

***Thymelaeahirsuta* Endel**

1.1. Noms vernaculaires

Nom français : passerine hérissée, passerine hirsute, Thymélées hirsute.

Nom anglais : Hairy *Thymelaea*

Nom arabe : Mitnan, Metenan, Methnane, Matnan el akhdar

1,2. Systématique

- Règne : végétale
- Sous règne : Tracheorbionta
- Embranchement : Phanérogames ou Magnoliophyta
- Sous Embranchement : Angiospermes
- Classe : Eudicots ou Dicotylédones
- Sous classe : Rosidae
- Ordre : Malvales
- Famille : Thymelaeaceae
- Genre : Thymelaea

Nom Latin : *Thymelaeahirsuta* Endel.

1,3 Caractéristique du taxon

Ecologie

Comportement saisonnier : présence maximum d'octobre à mai.

Morphologie

Feuille : vert brillante.

Fleur : Glabre extérieurement, jaunâtre, et groupées en petits bouquets de 2 à 5 Fleurs.

Tige : Duveteuse, jusqu'à 1m de hauteur.

1,4 Habitat

C'est une espèce spontanée très répandue dans les régions arides et semi-arides, elle se développe sur les terrains incultes rocaillieux.

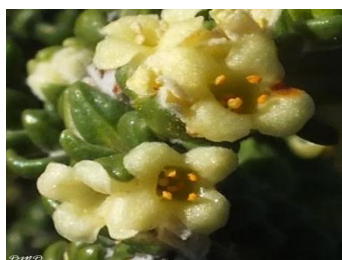


Figure 2: Les organes d'une *Thymelaeahirsuta* Endel**1,5 Distribution géographique**

Le genre *Thymelaea* comprend 20 espèces que l'on trouve autour de la Méditerranée, et jusqu'en Asie centrale et Pakistan. Son aire de distribution est essentiellement circumméditerranéenne (sud de l'Europe, sud-ouest de l'Asie, Afrique du Nord). Elle s'étend, cependant, à l'ouest au littoral atlantique du sud de l'Espagne, du sud du Portugal et du Maroc nord-occidental. En Afrique du Nord, la limite sud de son aire coïncide à peu près exactement avec la bordure du Sahara.

1,6 Propriétés et usage thérapeutiques

Suite à une étude ethnobotanique de *Thymelaeeaceae* menée auprès des populations locales d'El-Mechria et Naâma. La plante *Thymelaeahirsuta* a été utilisée contre certaines infections microbiennes. D'autres espèces appartiennent à cette famille sont largement employées pour leurs propriétés diurétiques, hypotensives et anti-inflammatoires (**Djeridane et al., 2006**).

Thymelaeahirsuta est utilisé comme purgatif pour les maladies de la peau ; une pâte est faite à partir des cendres mélangées avec l'eau et appliquées localement aux secteurs affectés du derme (**Polunin et Huxley, 1971 ; Saïd et al., 2002**). En plus de la peau, l'espèce est utilisée dans le traitement de la toux et des problèmes respiratoires (**Azaïzeh et al., 2006**).

Des études scientifiques au Maroc ont montrées que *T. hirsuta* a une double activité :

Hypoglycémique et antidiabétique. Ces résultats ont été obtenus à partir de multiples administrations de l'extrait de la plante chez des sujets normo glycémiques et des souris STZ diabétiques (**El Amrani et al., 2009**).

1,7 Toxicité de *Thymelaeahirsuta* Endel

La plante contient des diterpènes très toxiques. Un simple contact avec la peau ou les muqueuses peut provoquer une réaction inflammatoire intense. Ce sont de plus des agents potentiellement carcinogènes.

Il a été isolé cinq 12-hydroxy-daphnanes diterpènes des feuilles et des branches (gnidicine, gniditrine, genkwadaphnine etc.) (**Brooks et al., 1990**).

Chapitre II
Les composés phénoliques

I. les composés phénoliques

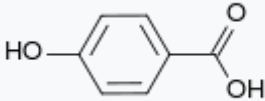
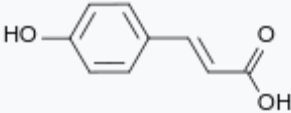
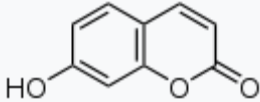
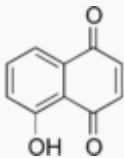
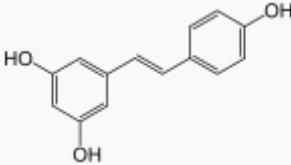
1. Généralités

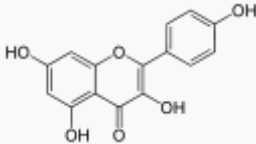
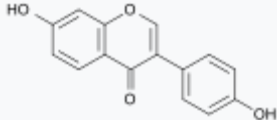
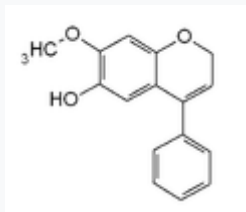
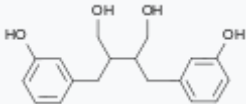
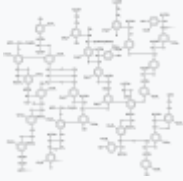
Le terme « polyphénols » a été introduit en 1980, en remplacement de l'ancien terme de « tanin végétal ». L'expression « composés phénoliques » est aussi employée avec la même valeur. « Ils ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. » La désignation « polyphénols » est consacrée par l'usage et, alors qu'elle ne devrait concerner que les molécules portant plusieurs fonctions hydroxyles phénoliques, elle est habituellement utilisée pour l'ensemble de ces composés. Le terme « bio phénol » fut inventé par Romeo et Uccello en 1996 pour désigner les phénols bioactifs dans les olives en remplacement du terme « polyphénols » plus commun mais plus vague d'un point de vue chimique. Utilisé au départ uniquement dans la chimie des olives, le terme a gagné en popularité et est actuellement utilisé par les chercheurs faisant référence aux phénols végétaux en général. Il s'ajoute à cette définition le fait qu'ils possèdent un pouvoir antioxydant élevé.

2. les principales classes de composés phénoliques

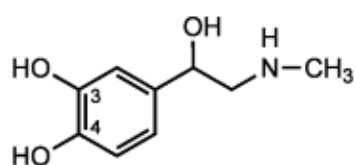
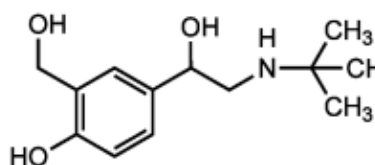
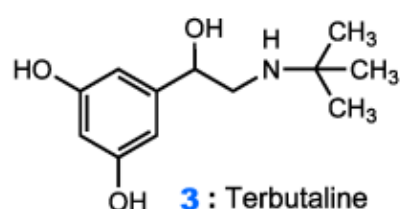
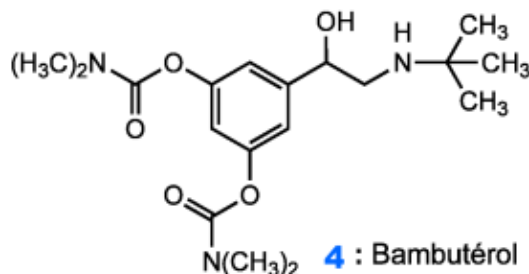
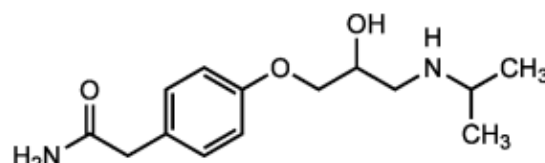
Les polyphénols naturels regroupent donc un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants. Il y a quatre principales familles de composés phénoliques : les acides phénoliques¹² (catéchol, acide gallique, acide protocatéchique), les flavones, l'acide chlorogénique et les quinones. Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés, de plus de trente mille daltons, comme les tanins (acide tannique). Les polyphénols sont communément subdivisés en phénols simples, acides phénoliques et coumarines, en naphtoquinones, en stilbénoides (deux cycles en C6 liés par deux atomes de carbone), en flavonoïdes, iso flavonoïdes et anthocyanes, et en formes polymérisées : lignanes, lignines, tanins condensés. Ces squelettes carbonés de base sont issus du métabolisme secondaire des plantes, élaborés par la voie Shikimate. En se basant sur la structure carbonée de base, on peut dégager les principales classes de composée suivantes (**Tab. 01**):

Tableau 01 : Principales classes de composés phénoliques (Harborne, 1980 ; Macheix et *al.*, 1990)

Composés phénoliques				
Squelette carboné	Classe	Exemple	Structure	Origine
C ₆	Phénols simples	Hydroquinone		Busserole
C ₆ -C ₁	Acides hydroxy benzoïques	Acide parahydroxy benzoïque		Épices, fraises
C ₆ -C ₃	Acides hydroxy cinnamiques	Acide paracoumarique		Tomates, ail
	Coumarines	Ombelliférone		Carottes, coriandre
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglon		Noix de Grenoble
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbénoides	Trans-resvératrol		Raisin

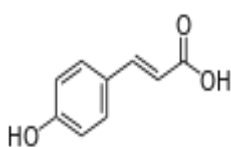
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes lato sensu	Kaempférol		Fraises
	Iso flavonoïdes	diazépine		Graines de soja
	Anthocyanes	Dalchiniol		Dalbergiasissoo, petits fruits rouges
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Entérodinol		Bactéries intestinales, lin
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines			Bois, fruits à noyau
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés	Procyanidine		Raisins, kaki

Pour tenir compte de leurs propriétés particulières, Jean Bruneton regroupe dans la classe des flavonoïdes stricto sensu les flavones, flavonols, dihydroflavonols, flavanones, auronnes, chalcones et dihydrochalcones (et leurs hétérosides). Les flavonoïdes au sens large comportent en outre : les flavanols, flavanediols, anthocyanidines (et leurs hétérosides les anthocyanes).

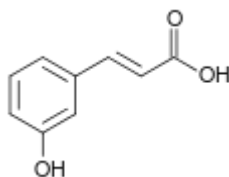
**1** : Adrénaline**2** : Salbutamol**3** : Terbutaline**4** : Bambutéról**5** : Aténolol

2,1,2. Acidehydroxycinnamique et dérivés :

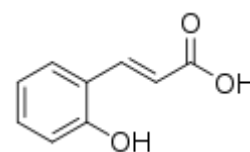
L'acide coumarique ou acide hydroxy cinnamique est un composé phytochimique dérivé de l'acide cinnamique. Il existe trois isomères de cet acide, correspondant aux trois positionnements possibles du groupe hydroxyle sur le noyau benzénique :



1_ acide paracoumarique



2_ acide métacoumarique



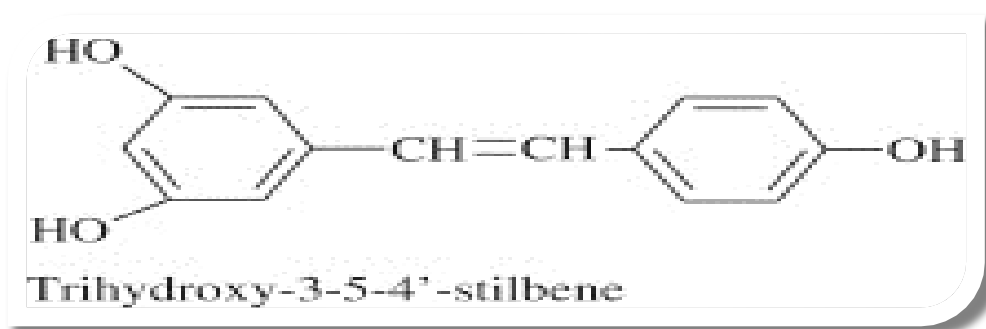
3_ acide orthocoumarique

Tableau 02 : principaux acides hydroxy cinnamiques (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

2,2. Les stilbènes

Les stilbènes contiennent deux cycles d'essence associés à une molécule d'éthanol ou d'éthylène. Parmi ces composés, le sulfratrol isomère est produit par le chrome en réponse à une infection fongique. Il est principalement concentré dans la peau du raisin et est donc extrait principalement lors de la production de vin rouge ; Les stilbènes ne contribuent pas de manière significative à la couleur ou à d'autres propriétés sensorielles du vin, mais ils semblent protéger contre les maladies cardiovasculaires.



2,3. Flavonoïdes

Les flavonoïdes (ou bioflavonoïdes) sont des métabolites secondaires des plantes vasculaires, partageant tous une même structure de base formée par deux cycles aromatiques reliés par trois carbones : C6-C3-C6, chaîne souvent fermée en un hétérocycle oxygéné hexa- ou pentagonal. Certains auteurs, comme Bruneton¹, préfèrent séparer, pour tenir compte de leurs propriétés particulières, les dérivés flavaniques, les anthocyanosides et les isoflavonoïdes, et conserver l'appellation de flavonoïdes stricto sensu pour les autres .

2,3,1. Structure chimique et classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone, fait de deux cycles benzéniques C6 reliés par une chaîne en C3. Le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle pyrone.

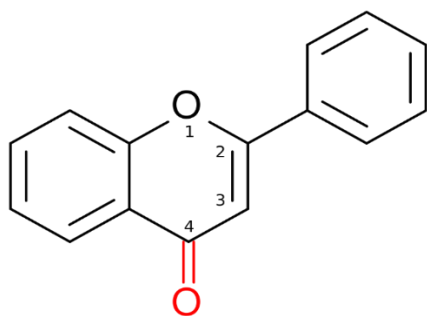


Figure 03 : Squelette de base des flavonoïdes (Girotti-chano, 2006)

La distinction des sous-classes se fait en fonction de la conformation de cette structure centrale C.

Flavones et Flavonols

Tous les types de flavonoïdes dérivent de la 4, 2', 4', 6' -tétrahydroxychalcone et par conséquent, possèdent tous au moins trois hydroxyles phénoliques en C-5, C-7 et C-4', cela étant, l'un d'entre eux peut être absent.

a. Les flavonols

Sont un sous-groupe de flavonoïdes dérivés de la 3-hydroxyflavone (3-hydroxy-2-phénylchromén-4-one en nomenclature IUPAC) ou flavonol, c'est-à-dire des flavonoïdes possédant un hydroxyle phénolique en C3 et une fonction carbonyle C=O en C4 sur l'hétérocycle central du squelette de base des flavonoïdes. Ce sont des pigments végétaux de couleur jaune plus ou moins clair. Ils diffèrent par le nombre et la position d'hydroxyle phénolique –OH, parfois méthylés (groupes méthoxy).

Les flavonols ne doivent pas être confondus avec les flavanols qui ne comportent pas en position 4 de fonction carbonyle C=O

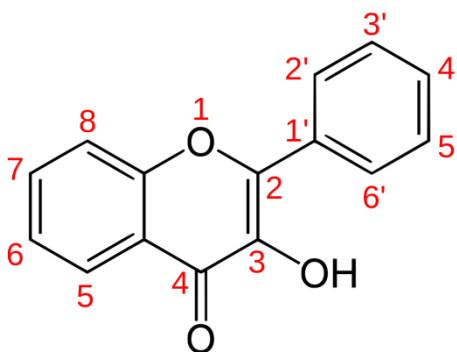


Figure 04 : structure moléculaire du squelette des flavanols avec des nombres

b- Flavones

(du latin flavus "jaune") sont une classe de flavonoïdes basée sur le squelette de la 2-phénylchromène-4-one (2-phényl-1- benzopyrane -4-one) (comme le montre la première image de cet article) .

Les flavones sont courantes dans les aliments, principalement dans les épices et dans certains fruits et légumes jaunes ou oranges. Les flavones courantes comprennent l' apigénine (4',5 7-trihydroxyflavone), la lutéoline (3',4',5 7-tétrahydroxyflavone), la tangeritine (4',5 6 7 8-pentaméthoxyflavone), la chrysine (5 7-dihydroxyflavone) et 6-hydroxyflavon

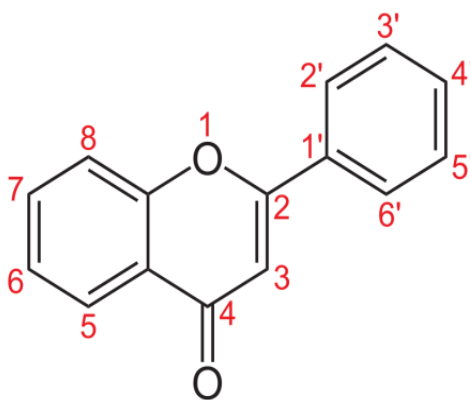


Figure 05 : structure moléculaire du squelette des flavones avec des nombres

c- Les flavanones

Sont un sous-groupe de flavonoïdes, dérivés 2 3-dihydrogénés des flavones. Elles sont généralement glycosylées par un disaccharide en position 7 pour donner des hétérosides deflavanones.

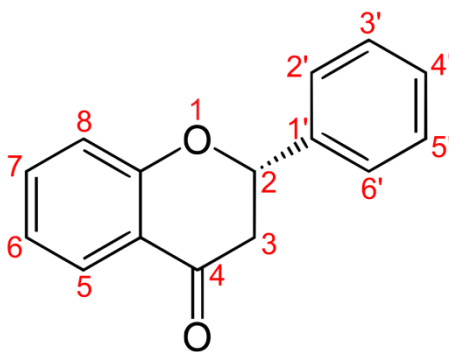
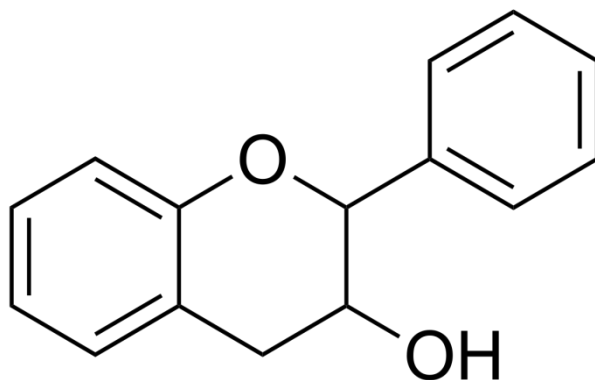
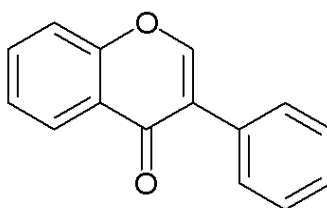


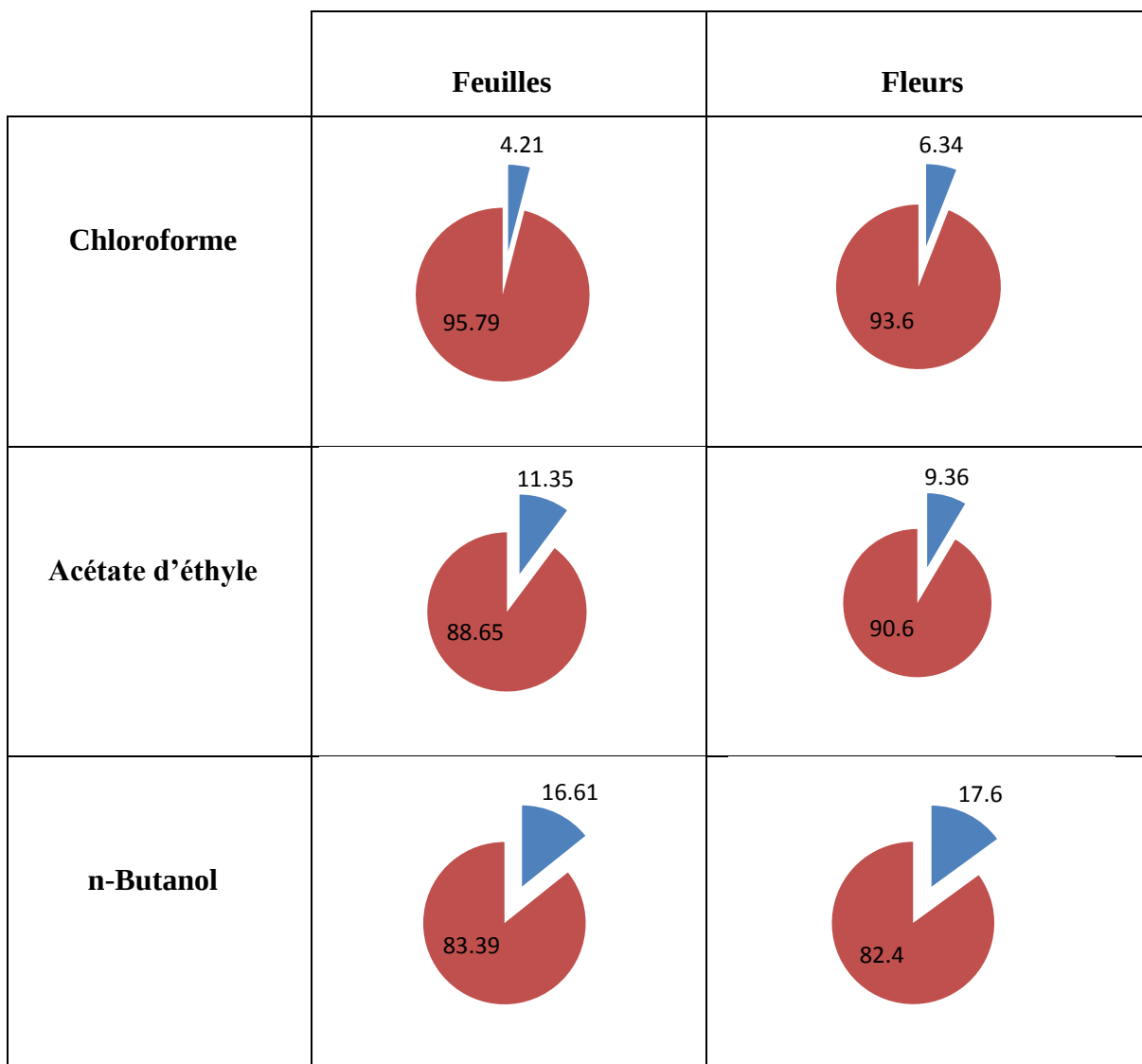
Figure 06 : structure moléculaire du squelette des flavanones avec des nombres**d-les flavanols**

- Les flavan-3-ols ou flavanols ou catéchines sont une sous-famille de flavonoïdes dont la structure est basée sur le 2-phényl-3-chromanol.
- Les flavanols ne doivent pas être confondus avec les flavonols qui comportent en outre en position 4 une fonction carbonyle C=O.
- Les structures oligomères et polymères des flavanols constituent la classe des proanthocyanidols ou tanins condensés.

**Figure 07 : Structure moléculaire du squelette des flavanols****e- Les isoflavones**

Les isoflavones sont une sous-famille des flavonoïdes très étudiée pour leurs propriétés pseudo-œstrogéniques. Ce sont les isomères de flavones, avec une structure quasi identique, la seule différence étant la position du groupe phényle, lié au carbone 3 au lieu du carbone 2 pour les flavones.

**Figure 08 : structure moléculaire du squelette des isoflavones.**

F - Profil des acides gras dans les différentes parties de *thymelaeahirsuta*

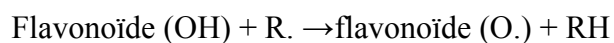
■ 1 Flavonols
■ 2 Flavonoïdes

Tableau 03 : Pourcentage des flavonols dans les flavonoïdes

Fractions/Organes	Flavonoïdes (mg ER/g. Lyo.)	Flavonols (mg ER/g. Lyo.)	(%)
Chl. Feuilles	573 67	24 16	4 21
Ch. Fleurs	397 67	25 21	6 34
AE. Feuilles	803 00	91 13	11 35
AE. Fleurs	704 00	65 92	9 36
n-But. Feuilles	326 83	54 29	16 61
n-But.Fleurs	316 83	55 75	17 60

2,3,2.Activités biologiques des flavonoïdes

La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres : radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$), anions superoxydes ($\text{O}_2\cdot^-$) . et radicaux peroxylipidiques, selon la réaction suivante :



Chapitre III

Stress oxydant-antioxydant

Stress oxydant-antioxydant

1. Oxydation et radicaux libres

1,1. Généralités

Le stress oxydant se définit comme l'incapacité de l'organisme de se défendre contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) en raison de la perturbation d'équilibre endogène entre ces derniers et les agents oxydants (AO). Ce déséquilibre conduit potentiellement à des dégâts structuraux et fonctionnels. Les ERO sont des espèces chimiques oxygénées tels que les radicaux libres, ions oxygénés, peroxydes, rendues chimiquement très réactives par la présence d'électrons de valence non appariés dans l'orbitale la plus externe. L'équilibre est rétabli soit par oxydation (perte de cet électron libre) ou par réduction (gain d'un autre électron). Le caractère radicalaire de la molécule ne disparaît pas, l'électron libre peut passer sur d'autres molécules ; c'est le phénomène d'oxydation en chaîne. Plusieurs facteurs influencent le stress oxydatif, certains augmentant la production des ERO comme la consommation élevée d'O₂ au cours d'une activité sportive intense avec dépenses énergétiques, d'autres réduisent les capacités antioxydantes tels que le déficit enzymatique congénital en G6PD.

Étude des espèces réactives produites lors du stress oxydatif Propriétés Les ERO sont des espèces électrophiles de courte durée de vie (quelques nanosecondes), elles font partie des systèmes ubiquitaires ayant une réactivité chimique délétère à l'égard des biomolécules, cette réactivité est inversement proportionnelle au pouvoir oxydant ($\text{OH}^\bullet > \text{RO}^\bullet > \text{HOO}^\bullet > \text{ROO}^\bullet$). « Françoise Marc. André Davin ».

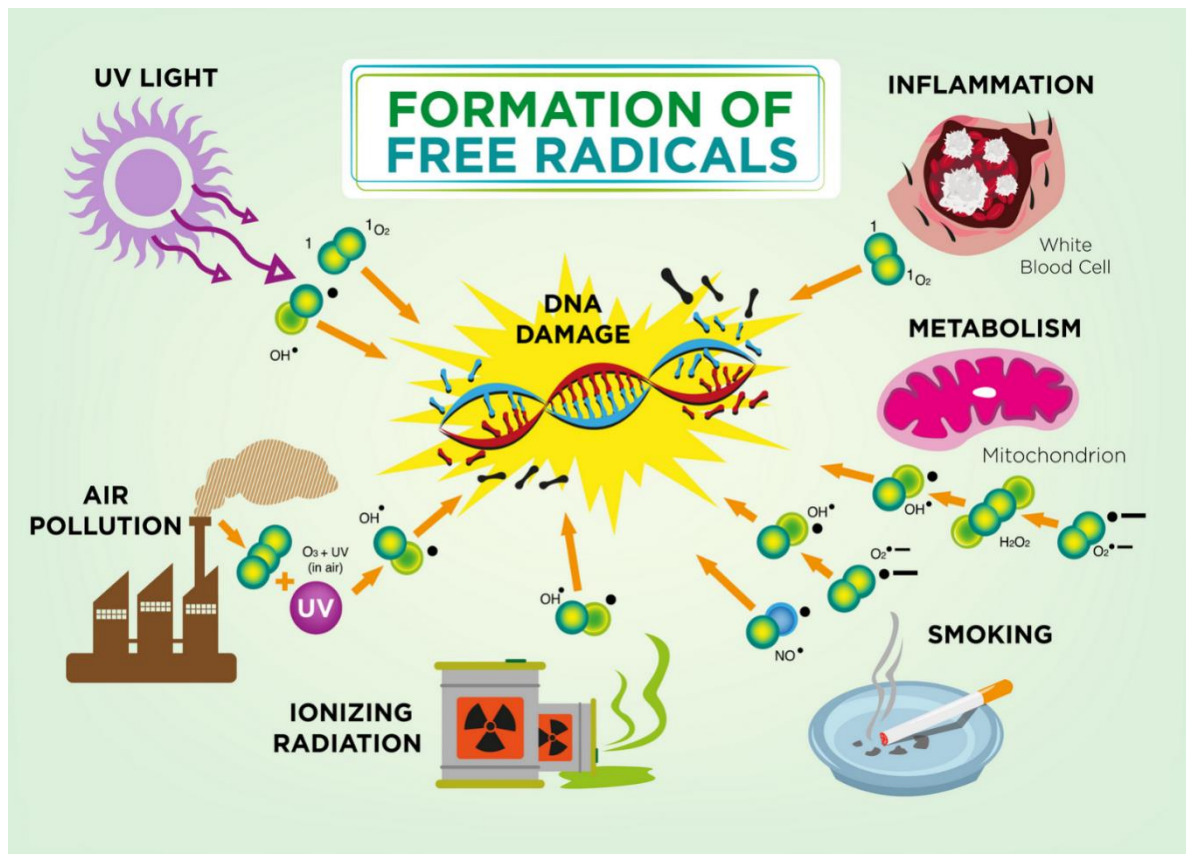


Figure 9 : les radicaux libres ou stress oxydatif

1,2. Le stress oxydant

Définition

Le stress oxydant (Fig. 10) est le déséquilibre entre la génération des espèces réactives d'oxygène et la capacité des corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatif (**Halmi, 2015**). Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la destruction par des systèmes de défenses antioxydantes donc c'est un déséquilibre de la balance antioxydants/pro-oxydant (**Aliouat et Boulkelia, 2012**).

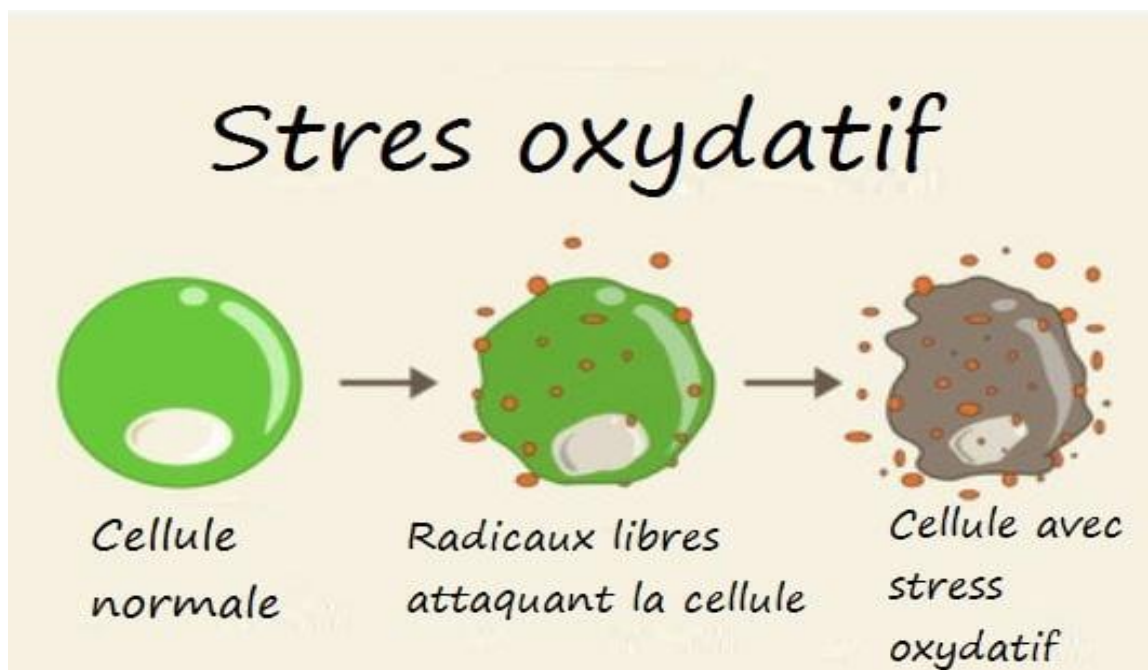


Figure 10: le stress oxydatif

1,3. Les radicaux libres

Un radical libre (RL) est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié, extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron, il peut arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en cédant un électron (agissant alors comme un réducteur) (**Djadouri et Ben Dahra, 2014**). Plusieurs éléments peuvent être à l'origine de radicaux libres. Les sources des radicaux libres sont nombreuses (**Bouhadjra, 2011**).

1,4. Origine des radicaux libres

Les radicaux libres sont produits continuellement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule eucaryote par divers mécanismes. On parle donc de deux sources exogènes et endogènes :

Sources exogènes : Les sources exogènes peuvent être représentées par des facteurs environnementaux, pollutions diverses, produits chimiques ainsi que des contaminations par des métaux lourds ou certaines carences nutritionnelles (**Haïoun et Hamoudi, 2015**).

Sources endogènes : Les enzymes pro-oxydantes, incluant la NADPH-oxydase, la NO-synthase ou la chaîne du cytochrome P450 peuvent générer des RLO, lors du transport des électrons dans la chaîne respiratoire des cellules aérobies, une réduction incomplète de l' O_2 peut apparaître pour 1 à 2% de l'oxygène moléculaire conduisant à la formation de RLO, surtout l'anion $O_2^{\bullet}$.

(Chaabi, 2008).

1,5. Antioxydants

1,5,1. Définition

Définit les antioxydants comme substances capables de neutraliser et de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire. Ils permettent le maintien de la qualité et d'augmenter la durée de conservation du produit. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques, endogènes ou exogènes. En outre, l'antioxydant alimentaire idéal, doit être soluble dans les graisses, efficace à faible dose, et non toxique, n'entraîne ni coloration, ni d'odeur, ni saveur indésirable, résistant aux processus technologiques, il est stable dans le produit final (Hellal, 2011).

1,5,2. Les antioxydants endogènes

Les antioxydants endogènes se retrouvent sous forme d'enzymes produites par l'organisme. L'organisme a également la capacité de synthétiser quelques antioxydants aussi retrouvés dans l'alimentation. On en compte trois principales : le superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase, toutes trois présentes dans le cytoplasme, le milieu extracellulaire et la mitochondrie. (Marfak, 2003).

1,5,3. Les antioxydants exogènes

De nombreuses molécules issues de notre alimentation : vitamines, nutriments, composés naturels, sont considérés comme des antioxydants exogènes.

Tableau 04: les principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associés (Landrum et al., 1997)

Principaux nutriments antioxydants	Source alimentaire
Vitamine C	Agrume, melon, brocoli, fraise,
Vitamine E	Huile de tournesol, de soja, de maïs
B-Carotène	Légumes et fruits
Sélénium	Poisson, œufs, viandes, céréales
Zinc	Produits laitiers, légumes verts, viande
Flavonoïdes	Thé vert, fruits, légumes
Acides phénolique	Cerises, baies, céréales complètes
Tannins	Lentilles, thé, raisins

1,5,4. Utilisation des antioxydants

- Dans l'industrie chimique : pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie pour protéger les métaux de l'oxydation.
- Dans l'industrie agro-alimentaire : pour éviter le rancissement des corps gras.
- Dans l'industrie teinturerie : pour éviter l'oxydation des colorants au soufre ou des colorants de cuve lors de la teinture (**Bouhadjra, 2011**).

1,5,5. Classification des antioxydants

Les antioxydants sont classés dans trois catégories différentes :

- Les antioxydants d'origine végétale.
- Les substances synergiques.
- Les antioxydants synthétiques.

1,5,6. Conséquence du stress oxydatif

Le principal danger des radicaux libres vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'ADN (**Hadj Salem, 2009**). Les lipides (peroxydation), les protéines (**Jacob, 2007**). Cette oxydation provoque des dommages sur tout l'organisme, accélérant le vieillissement (maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives, cancer, diabète...) (**Pincemail et Defraigne, 2003**), et la dégradation des cellules et des tissus (**Bonnet et al., 2010**)

1,5,7. Les maladies liées au stress oxydatif

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, Le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses pathologies, incluant l'obésité, le diabète, l'athérosclérose, le vieillissement, cancer, cataracte, sclérose latérale, alzheimer, amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux. (**Atwood, 2005 ; Georgettiet al., 2003**).

Quelles sont les maladies liées au stress oxydatif? (*)

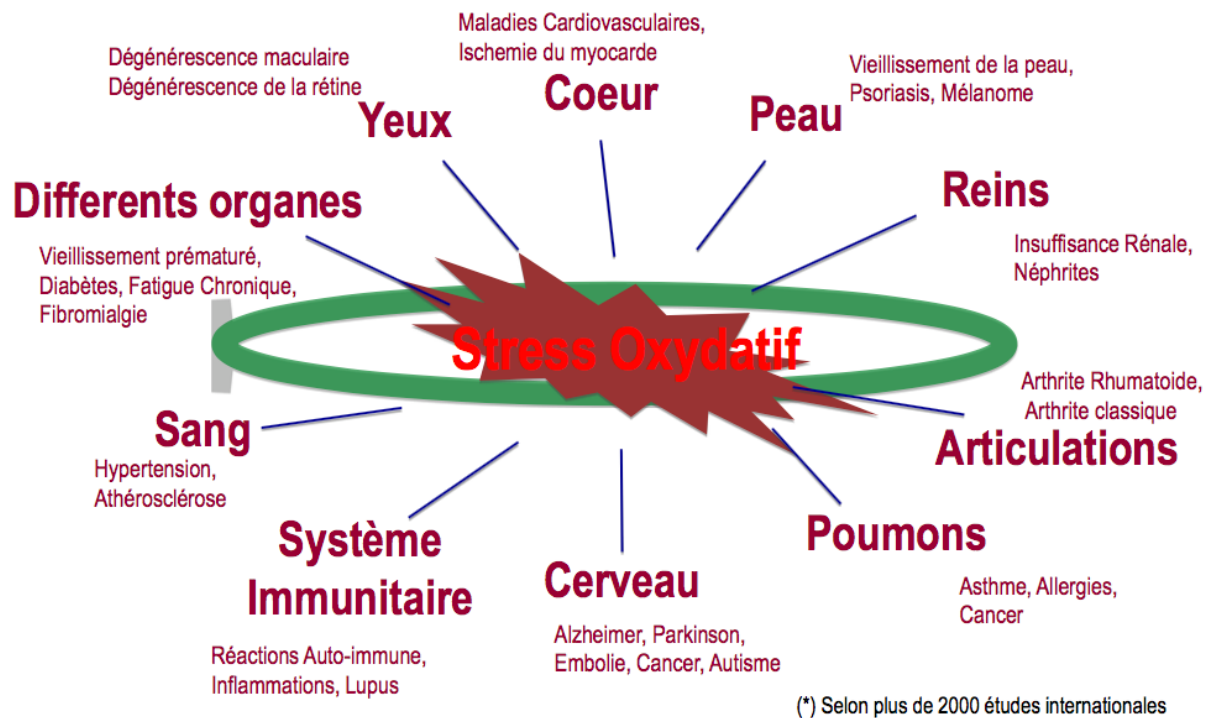


Figure 11 : les maladies liées au stress oxydatif

Etude expérimentale

Chapitre IV
Matériels et méthodes

I. Matériels et méthodes

1. Matériels

1,1. Site d'échantillonnage

Le présent travail a été réalisé sur une plante dite *Thymelaeahirsuta*. Cette plante a été prélevée dans la période de sa floraison, en Avril 2017, dans une zone localisée dans la commune de « Djdiouia ». Cette dernière est distante de 35Km à l'est du Chef –lieu de la wilaya de Relizane (Algérie) et située à 83m d'altitude, 35°55'33''N d'attitude et 0°49'23''E de longitude. Les échantillons, prélevés d'une manière aléatoires, ont été transportés dans des sacs en plastique noirs jusqu'au laboratoire.

1,2. Matériel végétal

1,2,1. Echantillonnage

La partie aérienne de la plante étudiée a été prélevée le matin, d'une manière aléatoire, puis transportée dans des sacs en plastique noir.

1,2,2. Séchage

Au laboratoire, les rameaux de la plante ont été étalés à l'air libre et à l'abri de la lumière. Cette étape est pour objet de conserver le maximum d'intégrité des molécules. Sa durée dépend de la teneur en eau dans le végétale ainsi que la température ambiante. Après quelque jour de séchage, les différents organes (feuilles, fleurs et brindilles) ont été séparés avec précaution. Ensuite, ils ont été mis à sécher quelques jours à l'étuve à une température de $\leq 40^{\circ}\text{C}$, (en pesant le poids chaque 24 heures) jusqu'à l'obtention d'un poids stable.

1,2,3. Pulvérisation

La matière sèche a été, ensuite, finement broyées à l'aide d'un mortier en porcelaine afin d'augmenter la surface de contact entre la matière végétale et le solvant utilisé. Après broyage, le produit mis dans des boîtes couvertes d'aluminium a été fermé hermétiquement et conservé à l'obscurité.

1,3 Extraction des composés bioactifs

L'extraction est basée sur le degré de la solubilité des composés phénoliques dans les solvants organiques.

a) Macération

Le matériel végétal finement broyé (100g) a été soumis à une extraction par macération

dans le mélange éthanol/eau (70/30 : v/v). Celle-ci a été réalisée pendant trois jours successifs et à une température ambiante avec une filtration à l'aide d'un papier Whatman #1, avec renouvellement du solvant chaque 24 heures. Elle avait pour but une meilleure extraction des composés phénoliques.

b) Fractionnement

L'extrait brut (EEB) a été repris avec 200ml d'eau distillée bouillante, laissé décanter pendant quelques heures, puis filtré sur papier-filtre Whatman 1. La phase aqueuse limpide récupérée a été placée dans une ampoule à décanter de 1L afin de subir un lavage avec l'éther de pétrole (v/v) (opération répétée 2fois). L'importance de cette étape est de se débarrasser des lipides et de la chlorophylle. Après, la phase aqueuse restante a été mise, ensuite, dans une ampoule à décanter afin de subir des affrontements successifs par trois différents solvants organiques. Une extraction par des solvants de polarité croissante tels le chloroforme qui permet l'extraction des aglycones méthoxylés et peu hydroxylés, l'acétate d'éthyle pour extraire les aglycones poly hydroxylés, le n- butanol qui accède aux hétérosides polyglycosylés et aussi les hétérosides de type c-glycosyl(**Ribereau-Gayon, 1968**). La phase aqueuse finale contient surtout les flavonoïdes glycosylés plus polaires.

Les affrontements ont été opérés dans des ampoules à décanter, la phase aqueuse et le solvant (v/v) sont mélangés énergétiquement en laissant sortir chaque fois les gaz produits. Après un repos d'une trentaine de minutes, la phase eau et la phase organique chargée de ces moléculaires spécifiques ont été récupérées. Les trois solutions récoltées ont été concentrées par évaporation de leurs solvants sous pression réduite à sec à 65° C (chloroforme), 65° C (acétate d'éthyle) et 70° C (n-butanol), en utilisant l'évaporateur rotatif ; l'extrait résultant a été considéré comme étant la fraction.

c) Lyophilisation

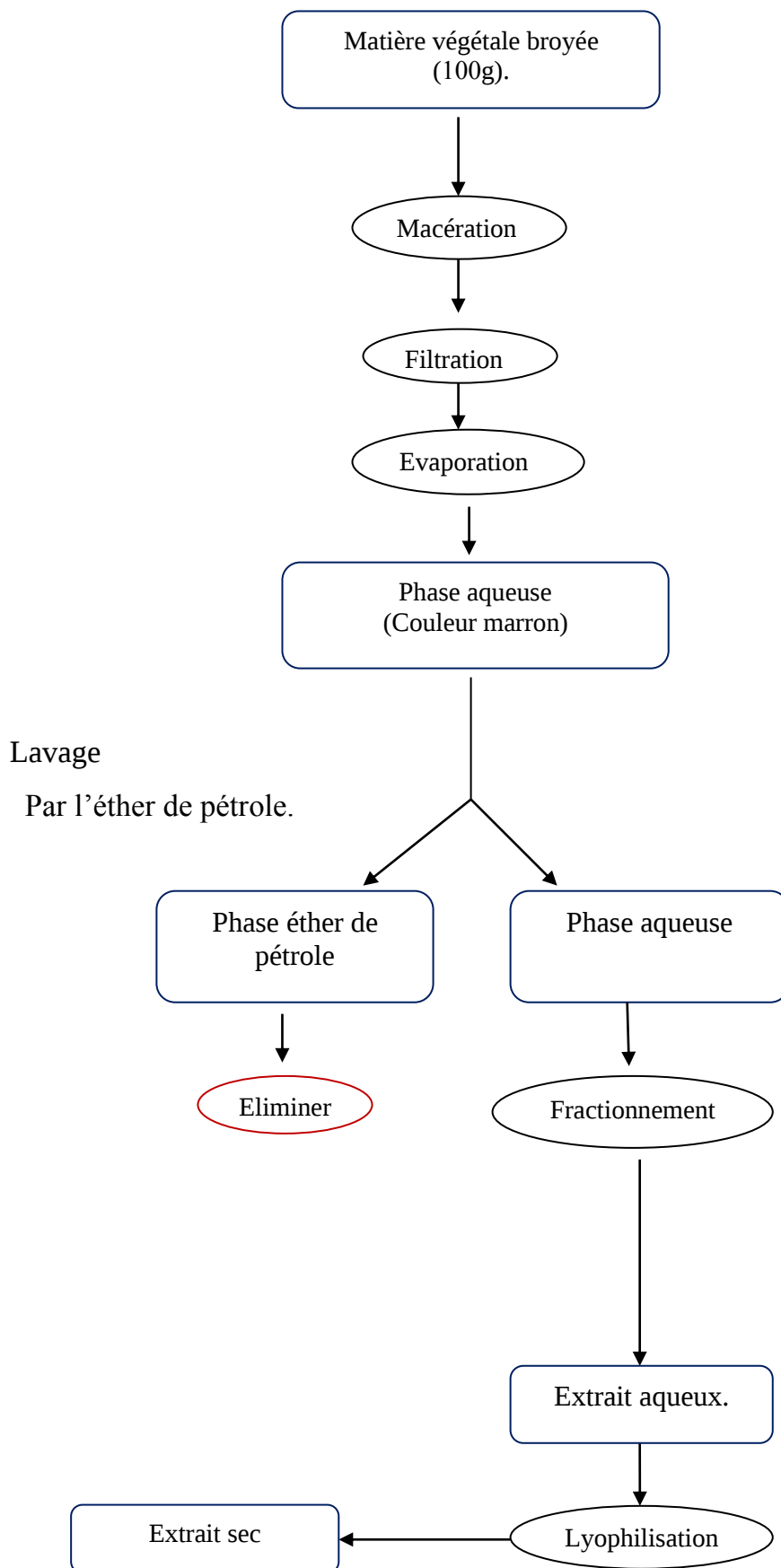
Est une méthode pour obtenir à la fin des extraits secs : chloroformique (Chl), d'acétate d'éthyle (AE), du n-butanol (n-B) et finalement le raffinat qui en résulte représente la phase aqueuse résiduelle (Aq). Les lyophilisats ont été pesés pour calculer le rendement de l'extraction, exprimé en gramme de lyophilisat par 100g de matière sèche.

1,4. Appareillages

Les différents appareils utilisés sont : Balance de précision (KERN AES 200-4N), Etuve (Mettler), Rotavapor (Büchi), Spectrophotomètre UV- visible (Jenway), Vortex (Nahita), Lyophilisateur (Martin-Christ).

1,5. Produits chimiques

Les produits chimiques et les réactifs utilisés sont : Ethanol absolu 99 8% (Sigma-Aldrich), Méthanol 99 6% (Sigma-Aldrich), Ether de pétrole $\geq 94\%$ (Sigma-Aldrich), Chloroforme 99 4% (Sigma-Aldrich), Acétate d'éthyle 99 5% (Sigma-Aldrich), n-Butanol 99 5% (Sigma-Aldrich), Trichlorure d'aluminium (Sigma-Aldrich), Carbonate de sodium (Biochem.), Acétate de sodium (Merck), FolinCiocalteu (Sigma), DPPH (2 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Aldrich), Acide gallique (Merck), Acide ascorbique 99% (Sigma-Aldrich) et Quercetine (Sigma).

**Figure 12 : Protocole d'extraction**

- Affrontement au chloroforme.
- Affrontement à l'acétate d'éthyle.
- Affrontement au n-butanol.

II. Analyse phytochimique

Les fractions résultantes ont été soumises à divers tests phytochimiques, en vue de quantifier les composés phénoliques disponibles dans chacun des 3 organes de *Thymelaeahirsuta*, séparément. Ces essais ont été menés selon des techniques spécifiques.

II.1. Analyse quantitative

1. Dosage des composés phénoliques totaux

Le dosage des composés phénoliques totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique deFolin-Ciocalteu selon la méthode de **Miliauskas et al. (2004)**. Un volume de 1ml de l'échantillon à doser (fraction ou substance de référence) a été mélangé avec un volume de 5ml de FolinCiocalteu (2M dilué 10 fois dans l'eau distillée) et un volume de 4ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à concentration de 75g/l. Après une incubation de 60mn à la température ambiante, l'absorbance du mélange a été lue avec un blanc fait à partir d'eau distillée à une longueur d'onde de 765nm, à l'aide d'un spectrophotomètre Jenway 6715 UV-Visible.

La teneur des composés phénoliques totaux, exprimée en équivalent acide gallique (GAE)/gramme de lyophilisat, a été déterminée en se basant sur une courbe d'étalon obtenue à partir d'une série de dilution d'acide gallique, allant de 10 à 100µg/ml.

2. Dosage des flavonoïdes

La teneur des flavonoïdes totaux contenus dans les fractions de feuilles, fleurs et brindilles de *Thymelaeahirsuta* a été déterminée en appliquant la méthode décrite par **Chang et al. (2002)**.

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5, susceptible de donner avec le groupement CO un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Ils forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (Fer et Aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (**Ribéreau-Gayon et al., 1972**).

Un volume de 0.75ml d' AlCl_3 (2%) a été mélangé à un volume égal de la fraction (2mg/ml). Les densités optiques ont été lues à 430nm après 10 minutes d'incubation à l'aide du spectrophotomètre, contre une courbe d'étalonnage préalablement tracée avec la rutine comme substance de référence (100-1000µg/ml). Les expressions des résultats ont été obtenues à partir de l'équivalence du standard par gramme de lyophilisat (mg ER/g. Lyo).

Les teneurs en flavonols ont été exprimées en milligramme équivalent standard (Rutine) par gramme de lyophilisat (mg ER/g. Lyo.).

II.2. Tests antioxydants (Test du piégeage du radical libre DPPH)

L'activité antioxydant des différents lyophilisats a été mesurée par la méthode du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl). Pour l'échantillon végétal et pour l'antioxydant de référence, 50 µl de chaque concentration dans du méthanol a été additionné à 5 ml DPPH solution dans du méthanol (0,004%). L'absorbance a été mesurée au spectrophotomètre après 30 min à la longueur d'onde de 517 nm. Le pourcentage de décoloration du DPPH a été déterminé par la formule:

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{blanc}}] \times 100$$

Où : A blanc : Absorbance du blanc (absorbance de la solution en absence de molécules testées).

A échantillon : Absorbance de la solution en présence de molécules testées où le contrôle négatif est constitué par la solution DPPH sans extrait.

III. Analyse statistique

Chaque expérience a été répétée trois fois, les valeurs sont représentées par la moyenne $\pm$ écart type. Les résultats ont été analysés par le test ANOVA et la valeur $p < 0,05$ est considérée significative. Les tests de corrélations entre variables ont été effectués à l'aide du Microsoft Excel 2007.

Chapitre V

Résultats et discussion

1. Les composés phénoliques totaux

La détermination de la teneur en polyphénols totaux des différentes fractions a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de folin-ciocalteu. La courbe de régression linéaire entre l'absorbance et les concentrations d'acide gallique est du type $y = 0,2583x$ avec $R^2 = 1$ (Fig. 13). Les quantités de polyphénols correspondantes à chaque fraction ont été exprimées en mg équivalent acide gallique par gramme de lyophilisat (Tableau. 06).

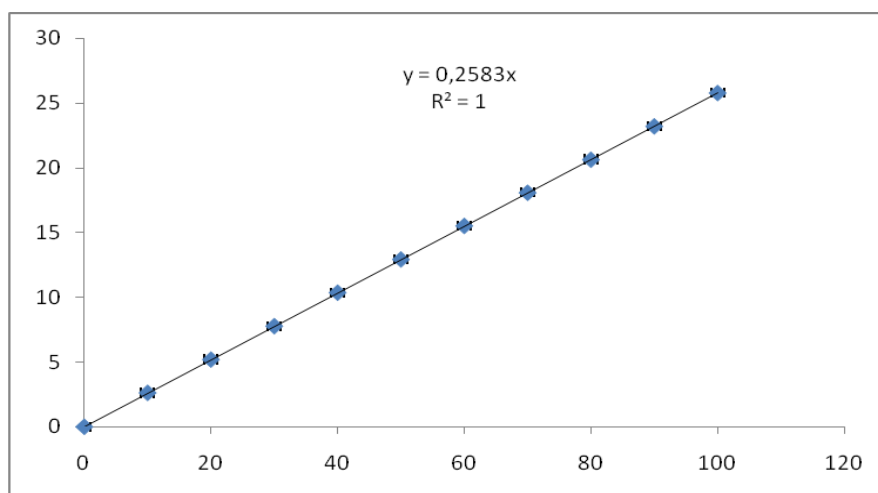


Figure 13 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique

2. Les flavonoïdes totaux

Les taux de flavonoïdes des deux fractions ont été obtenus à partir de la courbe d'étalonnage qui suit une équation de type : $y = 0,0366X$, sachant que $R^2 = 0,9958$ (fig. 14)

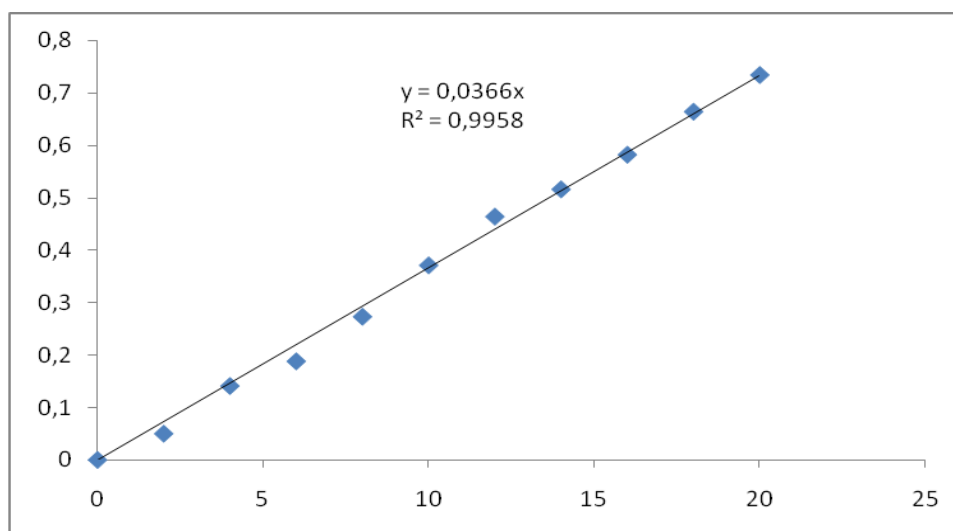


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Quantification

C'est une étape qui permet d'avoir une estimation sur la teneur en phénol totaux et en Flavonoïdes de l'échantillon

Tableau 05 : Contenu des phénols totaux et flavonoïdes totaux, des fractions (chloroformique, Acétate d'éthyle, N-butanol, Aqueuse, résiduelle), dans les différents organes (feuille, fleurs) de *Thymelaeahirsuta* L.

Fraction	Phénols totaux (Mg EAG/g)Lyo		Flavonoïdes totaux(Mg EQ/g)Lyo	
	Feuilles	Fleurs	Feuilles	Fleurs
Chloroformique	258 42±5 85c	350 11±13 89c	66 85±3 87d	52 28±2 61d
Acétate d'éthyle	430 12±17 31b	450 7±9 68b	340 80±5 02a	289 62±3 06a
N-butanol	488 45±0 72a	516 71±1 44a	239 80±0 71 b	272 04±3 96 b
Aqueuse résiduelle	36 04±0 69d	27 56±0 63d	78 14±1 60c	82 09±2 95c

Selon le tableau06, les contenus en composés phénoliques totaux des 2 organes de *T. hirsuta* montrent une différence significative ($F_{2,2} = 394.993$; $P=0$). En effet, les fleurs enregistrent une teneur de 350.11 ± 13.89 mg EAG/g. lyo, suivie de celle des feuilles 258.42 ± 5.85 mg EAG/g. lyo).

On s'est intéressé aux flavonoïdes cette classe de polyphénols parce que les flavonoïdes constituent une classe poly phénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits [5]. Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), à partir de la courbe d'étalonnage de la quercitrine. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 430 nm. Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme par gramme.

Activité antioxydante

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits de la plante de *thymelaeahirsuta* a été réalisée par une technique (le piégeage du radical libre DPPH).

3. DPPH

Le DPPH (1,1-Diphényl 2-picryl hydrazil) est un radical libre stable de couleur violette intense. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant (capacité à fixer des radicaux libres, donc arrêter la propagation de la réaction en chaîne). (Rolland, 2004).

En particulier l'utilisation du paramètre CE50 (concentration efficace de substrat pour produire 50 % de réduction du DPPH) (Molyneux, 2004), se fait en mesurant la diminution de la coloration Violette, à 515nm - 517nm, due à une recombinaison des radicaux DPPH.

Lorsqu'une solution de DPPH est mélangée avec une substance qui peut donner un hydrogène, alors cette réaction donne lieu à la forme réduite avec perte de la couleur violette (avec une couleur jaune résiduelle du groupement picrylencore présent).

Tableau 06 : Résultats des taux d'inhibition de DPPH en% par les fractions de T. Hirsuta

Conc. (mg/ml)	Feuilles				Fleurs			
	Fr. chlor	Fr. Ac d'éth	Fr. n-but	Fr. aquirésid	Fr. chlor	Fr. Ac d'éth	Fr. n-but	Fr. aquirésid
1	25 166±1 513	29 917±0 883	29 308±0 993	18 061±1 354	20 018±2 135	24 689±1 932	28 950±0 949	12 275±0 293
2	42 243±1 071	55 900±2 228	57 304±0 280	29 697±1 529	35 629±0 926	51 795±1 412	52 633±1 496	22 482±0 868
3	54 553±1 574	76 708±1 156	80 461±1 112	38 343±1 822	45 669±1 315	69 744±0 397	63 167±1 111	33 639±0 458
4	61 078±0 638	91 408±1 622	92 537±0 796	49 737±0 313	50 872±2 304	83 626±0 17	77 527±0 488	43 710±1 255

Les résultats présentés dans le tableau précédent montrent que la capacité de réduction du radical est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des fractions. Ceci a pu être confirmé par beaucoup d'autres auteurs (**Amari et al. 2014**). D'autres études montrent que l'augmentation de l'activité dépend de l'augmentation de la polarité des solvants (**Ardestani, 2007 ; Matanjun et al. 2008 ; Atmani, 2009 ; Li et al. 2009**).

Le maximum d'inhibition a été marqué avec Fr. chlor des fleurs à raison de 2,3mg/ml, avec 50,872 %.

Cette valeur est légèrement supérieure à celle des feuilles obtenue avec l'acétate d'éthyle (55 900±2 228). Il est à noter que la première est riche en flavonoïdes (803±4 78 mg ER/g. Lyo.) Cette constatation a été vérifiée par (**Gursoy et al. 2009**), supposant que la majorité des flavonoïdes sont non antioxydants.

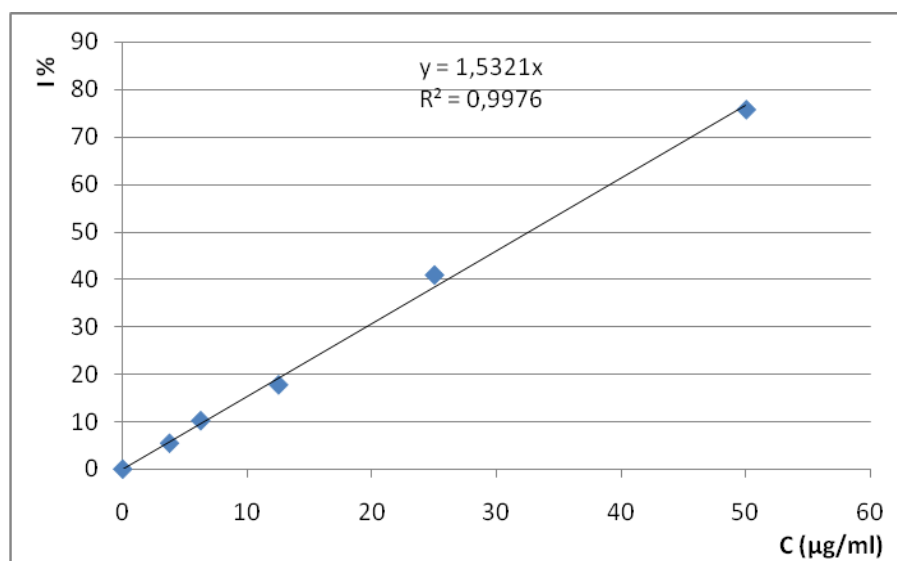


Figure 15 : Courbe d'étalonnage d'alpha tocophérol par DPPH à 515 nm

4. Acide ascorbique

L'acide ascorbique, ou acide oxo-3-gulofuranolactone (forme éolique), est un acide organique ayant des propriétés antioxydantes. Il est présent sous une forme énantiomérique ment pure (acide L'ascorbique ou vitamine C) dans les citrons, les jus des fruits et légumes Frais. Le nom « ascorbique » vient du préfixe grec a (privatif) et de scorbut, signifiant littéralement « anti scorbut », qui est une maladie due à une déficience en vitamine C (**Atomicweights of the elements 2007**).

5. IC50

La concentration inhibitrice médiane (**CI₅₀**, ou **IC₅₀** en anglais) est une mesure de l'efficacité d'un composé donné pour inhiber une fonction biologique ou biochimique spécifique. Souvent, le composé en question est un éventuel médicament. Cette mesure quantitative indique quelle quantité d'un médicament ou d'une autre substance (inhibiteur) est nécessaire pour inhiber à moitié un processus biologique donné (ou un élément d'un processus, par exemple une enzyme, un paramètre cellulaire, un récepteur cellulaire ou un microorganisme. En d'autres termes, c'est la demi (50 %) concentration inhibitrice (IC) d'une substance (CI à 50 %, ou **CI₅₀**). Elle est couramment utilisée en tant que mesure de l'efficacité d'un médicament antagoniste en recherche pharmacologique. Selon la FDA, la **CI₅₀** représente la concentration d'un médicament qui est requise pour une inhibition à 50 % in vitro¹. Elle est comparable à la **ic₅₀** pour les médicaments agonistes. La **ic₅₀** représente aussi la concentration plasmatique nécessaire pour obtenir 50 % d'un effet maximal in vivo.

Tableau 07 : La concentration inhibitrice médiane IC₅₀ des organes (feuilles, fleurs) de *thymelaeahirsuta*.

Organe/Fraction	Fraction chloroformique	Fraction Acétate d'éthyle	Fraction n-butanol	Fraction aqueuse résiduelle
Feuilles	2 520±0 126c	1 755±0 030b	1 738±0 052a	ND
Fleurs	3 776±0 103c	2 015±0 044b	1 914±0 052a	ND

ND = Non déterminée dans la gamme de concentrations comprise entre 1 et 4mg/ml

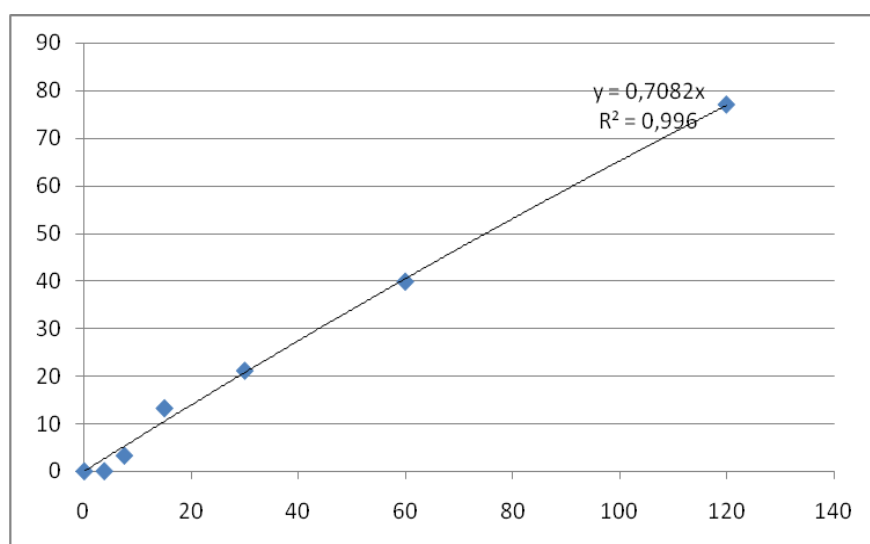


Figure 16 : La concentration inhibitrice médiane IC₅₀ = 76 93

Conclusion

La majorité des médicaments actuels sont des copies concentrées de remèdes végétaux. Notre pays est doté d'une biodiversité végétale immense, qui reste à découvrir et une grande partie de cette flore est constitué par des espèces médicinales. Ce document à portée dans un premier temps à la quantification des groupes phytochimiques, qui caractérisent les fractions de l'extrait des deux organes de la plante étudiée. Dans un deuxième temps, la recherche d'activité antioxydante pouvant être montrée par ces fractions.

Les composés phénoliques totaux et les flavonoïdes sont très observés dans les fractions de n-butanol et acétate d'éthyle. Parallèlement, l'étude de l'activité antioxydante évaluée par le test DPPH, testée sur les mêmes fractions ayant montrées des quantités importantes de composés phénoliques et des flavonoïdes, exhibe une activité intéressante. Ceci confirme une corrélation positive entre la concentration des molécules bioactives et l'activité antioxydante.

Liste des références

Liste des références

Bruneton, 2014 Pharmacognosie - Phytochimie, Plantes Médicinales. 3ème Édition botanique. *Pharmacognosie phytothérapie*. Groupe liaisons. ...**1**

Brooks, 1990 Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. 2ème édition. Lavoisier ...**4,6**

Quezel et santa, 1993 Stress induced phenylpropanoid metabolism. Plant cell ...**4**

Djeridane , 2006 Isolation of the crystalline principale, thymelol, from leaves of *Thymelaea hirsute*.-U. Arab Rep. J. Pharm. Sci ...**6**

Polunin et huxley, 1971 Antioxidant activity of *Coleus blunei*, *Orthosiphon stamineus*, *Ocimum basilicum* and *Mentha arvensis* from Lamiaceae family, ...**6**

Said, 2002 Antioxidant activity of *Coleus blunei*, *Orthosiphon stamineus*, *Ocimum basilicum* and *Mentha arvensis* from Lamiaceae family, ... **6**

Azaïzeh , 2006 Etude du pouvoir antioxydant de quelques plantes de la région de Tlemcen, Thèse de magistère, l'université-Abou Bakr Belkaid-Telemcen., ...**6**

El Amrani, 2009 ... **6**

Harborne , 1980 Antiapoptotic and Antioxidant Properties of *Orthosiphon stamineus* Benth (Cat's Whiskers): Intervention in the Bcl-2-Mediated Apoptotic Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, ... **9**

Macheix, 1990 ...**9**

Sarni- manchado et cheynier , 2006 Les cultures médicinales canadiennes. Presses scientifiques du CNRC, Ottawa (Ontario), Canada. 281., ... **11**

Girotti – chano , 2006 Encyclopedia of medicinal plants (2nd Edition Ed). (T.D.F. Edith ybert, Ed., & P, Vican, Trans) Larousse – Bordas ... **13,14,15,16**

Halmi, 2015 Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother Res* , ...**22**

Aliouat et Boulkelia ,2012 Etude Phytochimique et Activité Antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *euciliatus* . Thèse de Doctorat en Biologie. Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, ...**22**

Djadouri et Ben dahra , 2014 Evaluation de potentiel antioxydant de plantes médicinales et analyse phytochimique. Mémoire de Magister., Univ .Es-Sénia Oran. ...**23**

Bouhadjra ,2011 Systématique et morphologie botanique. Algérie : office des publications...**23 , 26**

Haïoun et Hamoudi , 2015Alkaloids and a flavonoid from aerial parts of *Hammada articulata* ssp. *scoparia*. *Ann Pharm* , ...**23**

Chaabi ,20082008Diversité floristique en Tunisie .In conservation des ressources végétales.Publication de Actes Editions ...**23**

Hellal 2011General view about diversity and conservation of flora of Egypt. *AssuteJournal for Ecological studies*, ...**24**

Marfak , 2003 ...24

Landrum ,1997Métabolites secondaires de plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de Chimpanzés (*pan troglodytes schweinfurthii*) en France, ...**25**

Hadj salem ,2009 Com positionchimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie et Santé* ...**26**

Jacob,2007 Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygiumguineense* WILLD. (Myrtaceae). Thèse, Pharmacie, Université de Lille (France). ...**26**

Pincemal et Defraigne , 2003Taxon, Vol.34, No, 4.international association for plant taxonomy (IAPT),**26**

Bonnet ,2010 Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. 2ème édition. Lavoisier Technique & Documentation. Paris ... **26**

Georgettiet , 2003 ,Atwood , 2005 coumarin from Edgewothia chrysantha, phytochemisstry ... 26

Ribereau- Gayon,1968 Review methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems .Food Science and Technology International ...**31 , 33**

Miliauska ,2004Activitébiologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de doctorat. .Muséum nationald’histoirenaturelle. France ...**33**

Chang, 2002Phytochemical investigation of *Thymelaeahirsuta*.III.Coumarins.actachim. Acad .Sci .Hang. ...**33**

Rolland, 2004Contribution à l’étude des polyphénols de la plante de tabac (Seita, ed). Ann de la direction des études et de l’équipement, France, 3 :15. ... **38**

Molyneux,2004... 38

Amari,2014 Variation of chemical composition, antioxidant andtotal phenols of essential from thyme (*Origanumsyriacum*L.) grown under open field conditions andprotectedsoilless condition. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture ... **39**

Ardestani, 2007 Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*...**39**

Matanjun , Atmani et Li ,2009 Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology* ...**39**

Gursoy ,2009*Thymelaeahirsuta*(L.) end. Thymelaeaceae. A guide to medecinal plant innorthafrica .publié par *ilucn international Malaga*, Spain. ...**39**

Atmoicweights of the element, 2007 Enthoppharmacologic and phytochemical studies of the*Thymelaeaceae*. J. *Enthopharmacol.* ...**39**

Annexes

Annexes

Acide GALLIQUE

Conc µg/ml	DO1	DO2	DO3	MOY	SD
0	0 000	0 000	0 000	0	0
10	0 180	0 160	0 163	2 626	0 010
20	0 267	0 257	0 262	5 197	0 004
30	0 370	0 369	0 371	7 778	0 001
40	0 493	0 490	0 476	10 365	0 008
50	0 584	0 577	0 585	12 937	0 004
60	0 686	0 752	0 689	15 532	0 033
70	0 796	0 778	0 785	18 090	0 008
80	0 836	0 890	0 868	20 649	0 024
90	0 964	0 978	0 962	23 226	0 008
100	1 050	1 050	1 098	25 800	0 025

Courbe étalon

Quercétine	concentration 20microg/ml
µg/ml	DO
0	0
2	0 05
4	0 141
6	0 188
8	0 273
10	0 371
12	0 464
14	0 516
16	0 582
18	0 664
20	0 734

Courbe d'étalonnage d'alpha tocophérol par DPPH à 515 nm

C(µg/ml)	DO1	DO2	DO3	DO moy
3 75	1 04	1 0402	1 0406	1 04026667
6 25	0 988	0 9883	0 9882	0 98816667
12 5	0 906	0 908	0 902	0 90533333
25	0 648	0 655	0 648	0 65033333
50	0 269	0 27	0 2665	0 2685

C(µg/ml)	DO moy	I %	
0	0	0	
3 75	1 04026667	5 4363	
6 25	0 98816667	10 1727	
12 5	0 90533333	17 7272	
25	0 65033333	40 8454	
50	0 2685	75 6363	IC50 = 32 635 µg/ml

Acide ascorbique

Concentration	R1	R2	R3	MOY	SD	I%
0	0	0	0	0	0	0
3 75	1 021	1 25	1 028	1 09966667	0 13023952	0 03030303
7 5	1 087	1 081	1 024	1 064	0 03477068	3 27272727
15	0 953	0 954	0 957	0 95466667	0 00208167	13 2121212
30	0 866	0 868	0 87	0 868	0 002	21 0909091
60	0 671	0 657	0 659	0 66233333	0 00757188	39 7878788
120	0 266	0 272	0 223	0 25366667	0 02672702	76 9393939