



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire :

Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique

Mémoire

En vue de l'obtention du

Diplôme de Master

En Biologie

Option : Biochimie appliquée

Thème

**Etude phytochimique et évaluation de l'activité antiradicalaire
des extraits de *Fredolia aretioides***

Présenté par : Mr Arous Sofiane

Soutenu le: 12/07/2012

Présidente	Mme Boucherit -Otmani Zahia	MCA	Université de Tlemcen
Examineur	Mr Rahmoun Mohammed Nadjib	MAB	Université de Tlemcen
Promoteur	Mr Boucherit Kebir	Professeur	Centre universitaire de Naâma

————— {Année Universitaire : 2011-2012} —————

Dédicace

Je dédie ce modeste travail, à mes très chers parents.

A ma petite sœur Djihane.

A mes frères Nadire, Marouane et Mustapha.

A toute la famille AROUS.

A mes très chères amis Djamel, Younes, Zaki, Houssine, Nori, Redowane,
Tohami, Salah et Mustapha ...

A mes collègues.

A toute personne qui me connais.

Remerciement

J'exprime d'abord mes profonds remerciements, ma vive reconnaissance et ma sincère gratitude à **Mr Boucherit Kebir.**, professeur au centre universitaire de Nāama pour avoir accepté de m'encadrer et pour ses conseils et ses précieuses orientations qu'il n'a cessé de m'apporter tout au long de ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à **Mme Boucherit -Otmani Zahia.**, maître de conférence de classe A à la faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers, université Abou bakr belkaid de Tlemcen pour avoir accepté de présider le jury.

Je tiens à remercier **Mr Rahmoun Mohammed Nadjib.**, maître de conférences classe B à la faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers, université Abou Bakr Belkaid à Tlemcen, pour avoir accepté de juger ce modeste travail.

Un remerciement particulier va à **Mlle Bentabet Nesrine.**, pour l'aide qu'elle m'a proposé dans les moments difficiles. Je la remercie pour sa bienveillance et ces conseils.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à tous mes amis du laboratoire pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

A toute la promotion de master « **Biochimie appliquée** »,

Enfin je ne remercie énormément toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Table de Matières

La synthèse bibliographique	01
Matériels et méthodes	11
1. Matériel végétal	12
2. Méthodes	12
2.1. Etude phytochimique de <i>Fredolia aretioides</i>	12
2.1.1. Préparation des différents extraits.....	12
2.1.2. Tests phytochimiques	12
2.1.3. dosages des polyphénols totaux	14
2.2. Etude de l'activité antiradicalaire	15
2.2.1. Préparation des différents extraits à partir de feuilles et racines de <i>Fredolia aretioides</i>	15
2.2.2. Réduction du fer (FRAP)	19
2.2.3. Test de piégeage du radical libre DPPH'	20
Résultats et discussion	22
1. Etudes phytochimique	23
1.1. Les tests phytochimiques	23
1.2. Dosage des polyphénols totaux	25
2. Etude de l'activité antiradicalaire	27
2.1. Les rendements en extrait sec	27
2.2. Réduction du fer (FRAP)	29
2.3. Test de piégeage du radical libre DPPH'	34
2.4. Calcul des concentrations inhibitrices à 50%	39
Conclusion et perspectives	42
Références bibliographiques	45

Synthèse

Bibliographique

Synthèse bibliographique

Au cours du métabolisme, l'organisme produit des radicaux libres nécessaires à des mécanismes vitaux. Si ces composés comportant un électron célibataire et très réactif, ne sont pas éliminés, ils peuvent oxyder les composants cellulaires, les protéines, les acides gras polyinsaturés, les acides nucléiques et les hydrocarbures, provoquant un impact négatif sur le métabolisme cellulaire **(Pan et coll., 2008)**.

La formation de radicaux libres dans l'organisme est constante et indissociable de la vie dans une atmosphère oxydante, mais les excès dépendent de facteurs extérieurs tels que le stress, la fatigue, l'exercice physique intensif, la consommation de tabac, d'alcool, les pollutions atmosphérique, ou encore par des rayons ionisants, tels que les rayons X. Parmi les formes de radicaux résultant de ces causes et qui provoquent des troubles on trouve, l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le radical superoxyde O_2^- , les peroxydes alkyles ROOH , les radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$, peroxydes $\text{ROO}\cdot$ et alkoxydes $\text{RO}\cdot$ **[(Binov, 2001) ; (Pan et coll., 2008)]**.

Heureusement, pour lutter contre les effets nocifs de ces radicaux libres, notre organisme possède des systèmes de défense complexe constitués par des composés appelés « les antioxydants ». Ces systèmes sont capables de bloquer la formation des radicaux libres en les neutralisant ou en les désactivant une fois formés, protégeant ainsi les systèmes biologiques contre tout dommage oxydatif **(Heimeur et coll., 2004)**.

Les dommages tissulaires qui résultent d'un déséquilibre entre ces systèmes de défense et la formation des radicaux, connue sous le nom de « stress oxydatif », sont impliqués dans divers pathologies telles que les cancers, l'athérosclérose, le diabète, l'asthme, la cataracte, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, le processus du vieillissement, et beaucoup d'autres maladies **[(Amadou, 2005) ; (Boldyrev, 2005)]**.

Les composés antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus de leurs intérêts dans le traitement de certaines pathologies, ils sont aussi utilisés pour la conservation des denrées comestibles dans l'industrie agroalimentaire **(Cavin, 1999)**.

Bien que le terme « antioxydant » soit fréquemment utilisé, il reste difficilement définissable car il couvre un grand nombre de molécules et de domaines très divers comme l'alimentation, l'industrie chimique, l'industrie pharmaceutique... **(Halliwell et Gutteridge, 1999)**.

Les antioxydants sont des composés puissants qui peuvent neutraliser les radicaux libres impliqués dans la dégradation cellulaire, et nous aide ainsi à garder une vie active et saine. Certains antioxydants sont fabriqués par le corps humain, d'autres tels que les vitamines et les polyphénols, doivent être apportés par notre alimentation **(Pincemail et Defraigne, 2004)**.

Synthèse bibliographique

La classification de tous les antioxydants connus est diverse. Ils sont classés généralement selon leur nature chimique. L'organisme possède dans ses systèmes de défense deux types d'antioxydants, les antioxydants enzymatiques, qui sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les espèces réactives oxygénées (ERO). Ces antioxydants sont constitués principalement de trois enzymes. Il s'agit du superoxyde dismutase (SOD), de la catalase et de la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde (O_2^{\cdot}) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène [(Diplock, 1991) ; (Marfak, 2003)].

Le deuxième type est celui des antioxydants non enzymatiques. Contrairement aux antioxydants enzymatiques, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Ils sont soit d'origine endogène représentée essentiellement par l'albumine, haptoglobine et transferrine..., qui jouent un rôle d'antioxydant par chélation des ions, soit une source exogène d'origine naturel, dont les composants majoritaires sont les vitamines E (molécule liposoluble), la vitamine C (l'acide ascorbique, molécule hydrosoluble), les polyphénols et les oligoéléments tel que (le cuivre, le zinc, le fer ...) qui jouent un rôle de cofacteurs [(Cutray et Robin, 2000) ; (Antwerpen, 2006) ; (Siddhuraju, 2007) ; (Yoo et coll., 2008)].

Ces systèmes de protection peuvent être à la fois membranaire (vitamine A, E), cytosolique et extracellulaire (glutathion, vitamine C...). Au niveau du plasma par exemple, les activités des catalases et GPx sont faibles et la première barrière de défense antiradicalaire serait constituée par la vitamine C, les composés plasmatiques piègeur des ERO et la SOD extracellulaire (Souchard et coll., 2002).

Ces dernières années, l'intérêt porté aux différents antioxydants a augmenté considérablement en relation avec leurs propriétés thérapeutiques. Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA) et butylhydroxytoluène (BHT) sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers. Cependant, leur sécurité est très discutée. Il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques (Yu et coll., 2000). En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substance toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomaux du foie et des organes extra-hépatique (Barlow, 1990).

C'est pourquoi, il a fallu prendre en considération le danger porté par ces antioxydants synthétiques et chercher d'autres solutions portant moins de risque. C'est dans ce contexte que l'intérêt porté aux antioxydants d'origine naturelle dans le but d'augmenter la conservation des

Synthèse bibliographique

aliments ou la lutte contre les pathologies à fort taux de mortalité a été un objectif majeur et une préoccupation permanente pour de nombreux chercheurs (**Sanchez-Moreno, 2002**).

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Elles renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme appelées métabolites secondaires. On distingue ainsi deux groupes de métabolites: les métabolites primaires et les métabolites secondaires (**Marc et coll., 2004**).

Ces métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures [(**Havsteen, 2002**) ; (**Adom et coll., 2003**)]. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante. Les produits du métabolisme secondaire qui sont émis en très faible quantité, sont d'une grande variété structurale (plus de 200000 structures définies). Ces composés marquent de manière originale, une famille, un genre ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique (**Huang et coll., 2005**).

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches. Ils ont des intérêts multiples. Ils sont mis à profit en thérapie comme vasculo-protecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants, anti-radicalaires, antibactériens, anticancéreux, antifongiques, diurétiques ... (**Hartmann, 2007**).

On trouve des métabolites secondaires dans toutes les parties de plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre. Parmi les principaux métabolites secondaires trouvés chez les plantes, on distingue trois classes : les composés azotés dont les alcaloïdes, les composés phénoliques et les terpènes et stéroïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une large gamme d'activité biologique [(**Huang et Ferraw, 1991**) ; (**Ali et coll., 2001**) ; (**Li et coll., 2007**)].

La première classe est celle des composés azotés, représentée par les alcaloïdes et définie comme des molécules organiques hétérocycliques azotées complexes. Chez de nombreuses plantes, ils se localisent dans les pièces florales, les fruits ou les graines (**Krief, 2003**) (**Figure N°1**).

Synthèse bibliographique

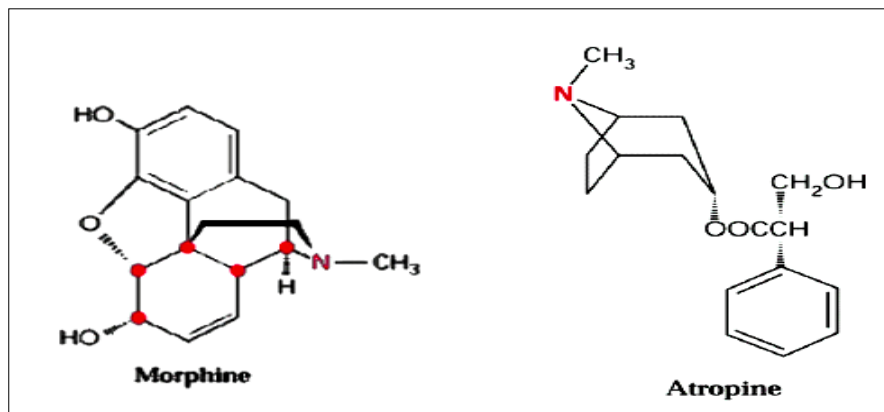


Figure N°1 : structure de quelques classes de la famille des alcaloïdes
(La Morphine et Atropine).

Les propriétés toxiques ou médicamenteuses des alcaloïdes font de ce groupe de métabolites secondaires des produits ayant un intérêt particulier dans des domaines variés comme le système nerveux central (morphine, strychnine..), le système nerveux autonome (atropine, éphédrine), la cancérologie (vinblastine..). Certains jouent le rôle d'anesthésiques locaux (cocaïne) et d'antipaludiques (quinine) (**Kanasole, 2009**).

Depuis une dizaine d'années, la classe des polyphénols suscitent un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs. Une des raisons principales est la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes et ainsi leurs implications probables dans la prévention de diverses pathologies associées au stress oxydant. Un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur de leur implication dans la prévention des maladies dégénératives telles que cancers, maladies cardiovasculaires, ostéoporose ou maladies inflammatoires. Les plus intéressants sont les coumarines, les flavonoïdes, les tannins et les quinones [(**Rock, 2003**) ; (**Boizot et Charpentier, 2006**)].

Les coumarines sont parmi les composés phénoliques les plus connus. À l'exception des algues, ces composés sont les constituants caractéristiques du règne végétal chlorophyllien. Elles se trouvent dans toutes les parties de la plante, notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines. Dans la cellule végétale, elles sont principalement présentes sous forme glycosylée qui est une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques de ces molécules [(**Ford et coll., 2001**) ; (**Hofmann, 2003**)].

Synthèse bibliographique

Le squelette de base des coumarines est constitué de deux cycles accolés avec neuf atomes de carbone. Parmi les coumarines les plus fréquentes, on trouve l'ombelliférone, l'aesculétine et la scopolétine [(Guignard, 1998) ; (Deina *et coll.*, 2003) ; (Booth *et coll.*, 2004)] (Figure N°2).

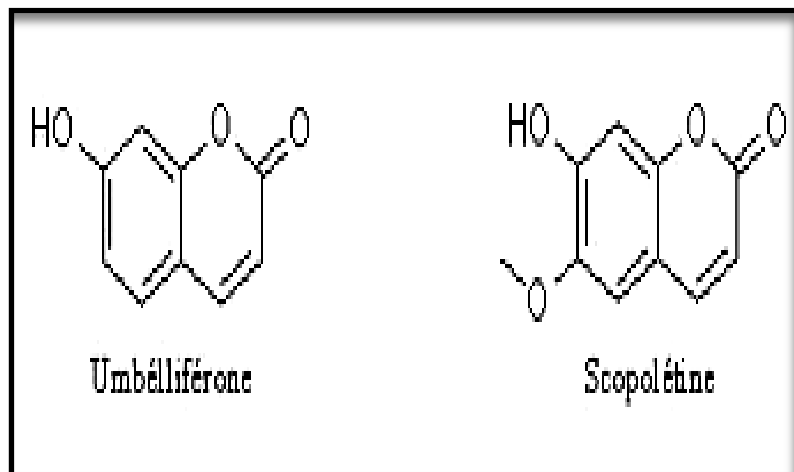


Figure N°2 : Structure chimique de quelques coumarines
(Dean, 1963).

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structures variées, de saveur astringente, ayant la propriété de précipiter les protéines et les métaux lourds. Ils favorisent la régénération des tissus et la régulation de la circulation veineuse, avec la propriété de tanner la peau. (Khanbaba et Ree, 2001).

A la base de leur caractéristique structurale, il est possible de diviser les tanins en deux groupes à savoir, les tanins condensés (proanthocyanidines) qui sont des polymères ou oligomères flavanique, constitués d'unités flavan-3-ols (Bruneton, 1999) (Figure N°3); et les tannins hydrolysables sous forme d'oligo ou des polyesters d'un sucre généralement le glucose, d'un nombre variable d'acide phénolique : l'acide gallique dans le cas des tanins galliques et l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP) et ses dérivés dans le cas des tanins éllagiques (Khanbaba et Ree, 2001) (Figure N°4).

Synthèse bibliographique

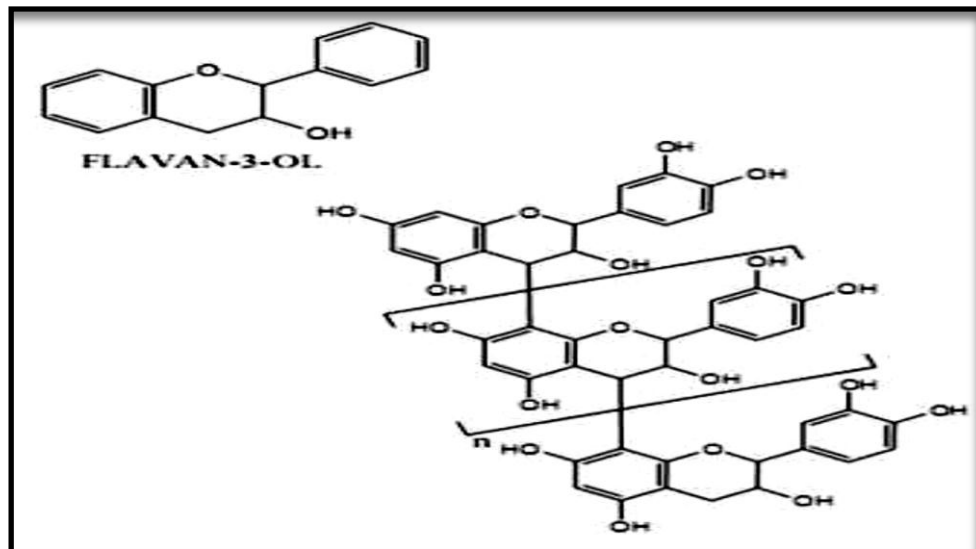


Figure N°3: Structure des tanins condensés et leur monomère (Peronny, 2005).

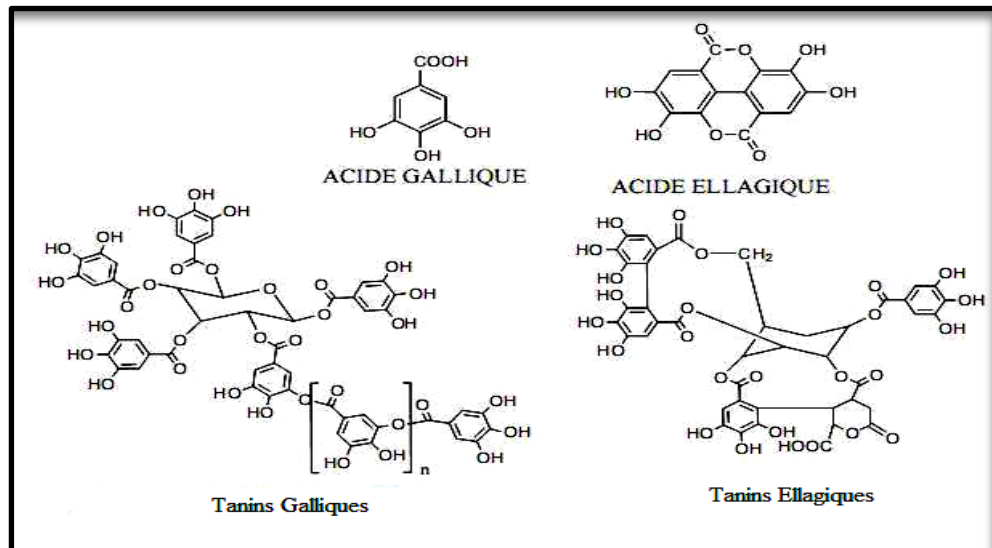


Figure N°4 : Structure des tanins hydrolysables et leurs acides associés (Peronny, 2005).

Synthèse bibliographique

L'expression flavonoïde a été introduite en 1952 par **Geissman** et **Hinreiner** pour désigner tous pigment ayant un squelette C6-C3-C6 (**Rajnarayana et coll., 2001**). Tous les flavonoïdes possèdent le même élément structural de base : le noyau flavane qui est un squelette carboné de type diphenyl 1,3-propane constitué de deux noyaux aromatiques (benzéniques) notés A et B et d'un hétérocycle oxygéné central C. [(**Bruneton, 1999**) ; (**Reynaud et Lussignol, 2005**) ; (**Grotewold, 2006**)] (Figure N°5).

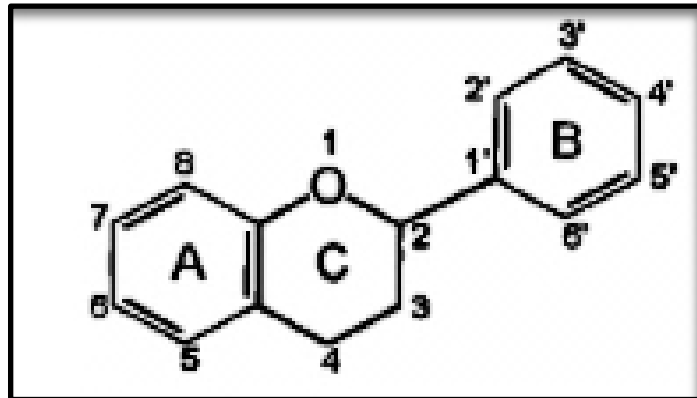


Figure N°5 : structure de base des flavonoïdes
(**Rajnarayana et coll., 2001**).

Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels chez les végétaux vasculaires. Ils sont souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles [(**Havsteen, 2002**) ; (**Fiorucci, 2006**)].

Ils sont connus par leurs différentes propriétés anti-inflammatoires, antiallergiques, hépato protecteurs, antispasmodiques, hypocholestérolémiantes, diurétiques, antibactériennes, antivirales et parfois cytostatiques [(**Kim et coll., 2004**) ; (**Milane, 2004**) ; (**Asres et coll., 2005**) ; (**Cushine et Lamb, 2005**) ; (**Kini et coll., 2008**)].

Les quinones sont de couleur rouge, jaune ou orange et possèdent deux fonctions cétones. On trouve les quinones dans les végétaux, les champignons et les bactéries. Les organismes animaux contiennent également des quinones, comme par exemple la vitamine K, qui est impliquée dans la coagulation du sang. Les quinones sont utilisées dans les colorants, les médicaments et les fongicides (**Kansole, 2009**).

En ce qui concerne la dernière classe des terpénoïdes et des stéroïdes, ils constituent probablement la plus large classe de composés secondaires comme les dérivés des acides gras, les terpènes ont pour origine biosynthétique l'acétyl-CoA ou le malonyl-CoA (**Krief, 2003**).

Synthèse bibliographique

Parmi les grandes sous classe dans cette catégorie, on trouve les saponines, présents chez de nombreux végétaux (salsepareille, saponaire, quinoa..) sous forme d'hétérosides complexes (saponosides). Les saponines peuvent être classées en deux groupes en se basant sur la nature de leur squelette aglycone :

- ✓ Le premier groupe est constitué par des saponines stéroïdiennes, qui se rencontrent presque exclusivement dans les monocotylédones angiospermes.
- ✓ Le second est celui des saponines triterpénoïdes, qui sont les plus communs et on les rencontre chez les dicotylédones angiospermes [(Estrada *et coll.*, 2000) ; (Sparg *et coll.*, 2004) ; (Amzal, 2010)].

Cette classe présente plusieurs propriétés pharmacologiques et sont employées dans la phytothérapie et dans l'industrie cosmétique, et plusieurs d'entre eux possèdent des activités biologiques : antimicrobienne, insecticide, anti-carcinogénique, anti-inflammatoire, anesthésique, antihistaminique et diurétique. On peut citer également les propriétés anti-tumorales, cytotoxiques et antioxydantes des diterpènes [(Velicković *et coll.*, 2003) ; (Murakami *et coll.*, 2004) ; (Han, 2005) ; (Hyun *et coll.*, 2007)].

Ces quelques exemples mettent en évidence l'effet thérapeutique des métabolites secondaires qu'offre la nature. La part de plantes inexplorées à la fois en chimie et en biologie est encore immense. Ceci offre l'espoir de découvrir des traitements pour des maladies encore dévastatrices et de proposer des thérapeutiques offrant des effets secondaires moindres. Les études actuelles portant sur les métabolites secondaires, s'attachent bien évidemment à explorer plus leurs activités pharmacologiques. Les plantes contiennent des molécules de balayage des radicaux libres, comme les vitamines, les terpénoïdes, les acides phénoliques, les lignines, les stilbènes, les tanins, les flavonoïdes, les quinones, les coumarines, les alcaloïdes, les amines et autres métabolites, doués d'activité antioxydante [(Zheng et Wang, 2001) ; (Cai *et coll.*, 2003)].

La flore algérienne regorge de plusieurs espèces de plantes encore peu ou pas étudiées, mais dotées de réelles propriétés pharmacologiques. C'est le cas de *Citrullus colocynthis*, *Juniperus phoenicea*, *Rosmarinus officinalis*, *Peganum harmala*, *Tetraclinis articulata*, *Zizyphus lotus*... qui présentent des propriétés antioxydantes importantes [(Graham *et coll.*, 2000) ; (Bnouham *et coll.*, 2002) ; (Gonzalez-Tejero *et coll.*, 2008)].

La maîtrise totale et parfaite des différentes propriétés de ces plantes passe par la détermination de l'ensemble des groupes physico-chimiques capables d'engendrer un ou plusieurs effets pharmacologiques, est aujourd'hui un objectif qui occupe un ordre de première place (Abdelwahed *et coll.*, 2007).

Synthèse bibliographique

C'est pourquoi, nous nous sommes intéressé à effectuer une étude phytochimique de la plante *Fredolia aretioides* de la région de Béchar et à évaluer l'activité antioxydante de ses extraits.

L'espèce *Fredolia aretioides* appartient à la famille des chénopodiacées, une famille largement répandue dans les habitats salins tempérés, en particulier dans les régions littorales de la mer méditerranée, les steppes arides et les déserts. Ce sont donc des plantes adaptées à la sécheresse due au climat ou à la salinité du sol ce qui explique la richesse de ces plantes en ions alcalins (Na^+ , K^+ ...) (Mulas, 2004).

De point de vue botanique, *Fredolia aretioides* a la forme d'un arbuste vigoureux cylindrique, d' 1 m de hauteur. Les branches sont très compactes avec le sable. Les petites feuilles nombreuses, très serrées et coriaces, sont de couleur bleu-vert et de formes charnues, ne dépassant pas 5 mm. Le fruit est un akène entouré par de petites ailes transparentes du périanthe persistant. Il est comprimé dorsalement. La floraison a lieu en automne. Elle se trouve sur les rochers et plateaux caillouteux (reg et hamada). Elle pousse rarement dans l'oued ou des dépressions argileuses. Sa forme particulière rondes, les petites feuilles charnues et les longues racines qui rampent à travers les crevasses verticales permettent à la plante de s'épanouir dans des conditions climatiques sévères où les précipitations annuelles ne dépassent les 100 mm par an [(Trabut, 1935) ; (Quezel et Santa, 1962) ; (Benhouhou et Saadoun, 1986) ; (Ozenda, 1991) ; (Baba Aissa, 1999)] (Photo N°1 et 2).



Photo N°1: Représentation photographique de *Fredolia aretioides* (Partie racine)



Photo N°2: Représentation photographique de *Fredolia aretioides* (Partie aérienne)

Synthèse bibliographique

Selon **Cosson et Durieu (1885)**, elle est placée dans la systématique comme suite :

Domaine	:	Eucaryote
Règne	:	Plante
Sous règne	:	Viridaeplantae
Embranchement	:	Magnoliophyta
Sous embranchement	:	<i>Euphyllophytina</i>
Classe	:	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe	:	<i>Caryophyllidae</i>
Ordre	:	<i>Caryophyllales</i>
Sous ordre	:	<i>Chenopodiineae</i>
Famille	:	<i>Chenopodiaceae</i>
Genre	:	<i>Fredolia</i>
Espèce	:	<i>aretioides</i> (dur & Coss. ex Bunge)
Nomenclature botanique	:	<i>Fredolia aretioides</i>

Fredolia est une plante endémique d'Algérie et du Maroc commune dans le Sahara au nord-ouest du Tafilalet, Tinghir au Maroc, à travers Béni-Ounif, Ain Sefra et Béchar dans le désert d'Algérie (**Khedache, 1999**).

Cette plante est très utilisée en médecine traditionnelle. Les feuilles sont préparées sous forme d'infusion ou décoction tandis que les racines sous forme de décoction. Elle est utilisée comme antirhumatismal, diurétique, Hypoglycémiant et un antidote au poison. L'écorce de la racine est utilisé comme bois de chauffage [(**Khedache, 1999**) ; (**El Mansouri, 2011**)].

Le présent travail, rentre dans le cadre du programme de recherche du laboratoire Antibiotique Antifongiques : Physicochimique, Synthèse et Activité Biologique, et est destiné à la valorisation de la flore locale afin de développer de nouveaux composés ou principes actifs à intérêts thérapeutiques. Pour cela, nous avons envisagé de réaliser une étude phytochimique qui comporte les tests phytochimiques et dosages des polyphénols totaux et flavonoïdes, ainsi que la préparation de différents extraits (bruts et spécifiques) pour la détermination de l'activité antiradicalaire en utilisant deux méthodes à savoir la technique de DPPH et celle de FRAP

Matériel

et

Méthodes

Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal :

Le matériel végétal est constitué par les feuilles et les racines de *Fredolia aretioides*, récolté de la région d'« **Abadla** », Wilaya de Béchar, située dans le sud-ouest d'Algérie, entre Décembre 2011 et Janvier 2012. La partie aérienne et racine ont été débarrassées du sable collé. Après, les différents organes du matériel végétal ont été séchées à l'ombre et à température ambiante puisqu'il est recommandé pour obtenir une meilleur extraction d'utiliser le matériel végétal sec, congelé ou lyophilisé ; étant donné que certains composés antioxydants (certains flavonoïdes et particulièrement les glycosides) sont instables ou peuvent être dégradés sous l'action des enzymes du matériel végétal frais [(Bruneton, 1999) ; (Suhaj, 2006)].

Après séchage, les deux parties ont été finement broyées à l'aide d'un broyeur mécanique et conservées dans des bocaux hermétiques à sec et à l'abri de l'humidité.

2. Méthodes :

2.1. Etude phytochimique de *Fredolia aretioides*:

2.1.1. Préparation des différents extraits pour les tests phytochimiques:

L'extraction des différentes composantes de nos deux parties de la plante, et dans différents solvants à polarité décroissante (eau, éthanol, éther diéthylique) est réalisée à chaud et sous agitation continue.

- Pour cela, dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, en place 5 g de notre matière végétale séchée et broyée avec 50 ml du solvant utilisé. L'ensemble est porté sous reflux pendant 30 minutes (Trease et Evans, 1987).
- Les extraits sont filtrés et stockés sous forme liquide à 4°C pour les analyses ultérieures (tests phytochimiques).

2.1.2. Tests phytochimiques :

L'examen phytochimique est nécessaire pour identifier les grandes familles de composés existants dans les deux parties de notre plante.

➤ Mise en évidence des saponosides :

Leurs présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse. 1 ml d'eau distillée est ajouté à 2 ml du décocté, bien agiter le tout pendant 2min. Après un repos de 15 min en position verticale, on mesure la hauteur de la mousse persistante en cm (Dohou et coll., 2003).

Matériel et Méthodes

S'il n'y a pas de mousse : test –

Si la hauteur de la mousse est de 1 cm d'épaisseur : test faiblement positif (+)

Si la hauteur de la mousse est de 1 cm à 2 cm d'épaisseur : test positif (++)

Si la hauteur de la mousse est de plus de 2 cm d'épaisseur : test fortement positif (+++)

➤ Mise en évidence des alcaloïdes :

a. Pour l'extrait aqueux :

- 15ml de l'extrait aqueux sont mis dans un bécher auquel sont ajoutés de l'ammoniaque "NH₄OH" à 10% jusqu'à pH=8;
- La solution obtenue est extraite trois (03) fois avec 15ml de chloroforme (extraction liquide/liquide) en utilisant une ampoule à décanter;
- La solution chloroformique est lavée trois (03) fois avec 2ml d'HCl à 10%.

La solution aqueuse de lavage est divisée en trois parties égales. La 1^{ère} partie est considérée comme témoin, la 2^{ème} partie est testée avec le réactif de Mayer et la 3^{ème} avec le réactif de Wagner (**Paris et Moyses, 1969**). L'observation se fait selon la présence de turbidité ou précipitation.

- S'il y'a présence d'une légère opacité le test est dit (+)
- Si on observe une turbidité ou non floculation le test est dit très positif (++)
- S'il y'a une floculation ou un précipité lourd, le test est dit fortement positif (+++)

Le réactif de Mayer et le réactif de Wagner sont préparés comme suite :

- **Réactif de Mayer** : Dissoudre 1.358 g d'HgCl₂ dans 60ml d'eau distillée puis 5g de KI dans 10ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100 ml.
- **Réactif de Wagner** : Dans 75 ml d'eau distillée, dissoudre 2g de KI et 1.27g de I₂. Le volume obtenu est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée.

b. Pour les extraits éthanoïques et éther diéthylique :

A 2.5 ml de chaque extrait, on ajoute 1 ml de HCl (10%) (Solution A) et on met les tubes dans un bain marie jusqu'à ébullition. On sépare ce mélange en 3 tubes, le 1^{er} tube constitue le témoin qui contient 1ml de la solution A, le 2^{ème} tube contient 1ml de la solution A et quelques gouttes du réactif de Mayer, et le 3^{ème} comporte 1ml de la solution A avec quelques gouttes de réactif de Wagner.

Matériel et Méthodes

Si le test est positif, on a l'apparition d'une précipitation blanche dans le 2^{ème} tube et brune dans le 3^{ème} tube (**Paris et Moyses, 1969**).

➤ Mise en évidence des flavonoïdes :

2ml de l'extrait végétal sont traités avec quelques gouttes d'HCl 37%, et avec 0.5g de tournure de magnésium Mg⁺⁺. Le test positif est marqué par une apparition de couleur rose ou rouge qui caractérise les flavonoïdes (**Ciulel, 1982**).

➤ Mise en évidence des composés réducteurs :

On ajoute 1 ml de l'extrait à 1 ml de solution Fehling et l'ensemble est porté à 70°C pendant 5 minutes. Un test positif est indiqué par l'apparition d'une couleur rouge brique (**Trease et Evans, 1987**).

➤ Mise en évidence des coumarines :

5 ml de l'extrait est évaporé au bain marie. Au résidu sec, on ajoute 2 ml d'eau chaude. La solution obtenue est divisée en deux parties égales dont :

- La première représente un témoin ;
- Alors que la deuxième est traitée avec 0.5 ml d'ammoniaque (NH₄OH) à 10%.

L'examen est réalisé sous la lumière ultraviolette et l'apparition d'une fluorescence intense révèle la présence de coumarines (**Benmehdi, 2000**).

➤ Mise en évidence des tannins :

A 2 ml de la solution à tester, on ajoute 2 à 3 gouttes de la solution de FeCl₃ à 1%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire (tannins galliques) ou bleu-verte (tannins cathéchiques) (**Karumi et coll., 2004**).

2.1.3. Dosage des polyphénols totaux :

a- préparation de l'extrait pour le dosage :

L'extrait eau/méthanol (macération 48 heures et évaporation à sec) est solubilisé dans le méthanol à une concentration de 1 g/l pour le dosage des polyphénols totaux.

b- dosage des polyphénols totaux :

❖ Principe :

La méthode utilisée est celle utilisant le réactif de Folin Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite dont l'absorption maximum est comprise

Matériel et Méthodes

entre 725 et 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits végétaux (Boizot et charpentier, 2006).

❖ Mode opératoire :

Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par Vermerius et Nicholson (2006).

- 0.1 ml de l'échantillon est mélangé avec 2 ml d'une solution de carbonate de sodium à 2% ;
- Agitation par vortex ;
- Laisser reposer 5 minutes ;
- Addition de 100 µl de réactif Folin Ciocalteu à 1N ;
- Laisser reposer pendant 30 minutes à la température ambiante ;
- La lecture est faite à 700 nm contre un blanc ;

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1 mg/ml).

2.2. Etude de l'activité antiradicalaire:

2.2.1. Préparation des différents extraits à partir de feuilles et racines de *Fredolia aretioides*:

Pour l'évaluation de l'activité antiradicalaire, on a utilisé deux types d'extraits : bruts (aqueux et eau/MeOH) et spécifiques (des tannins et des alcaloïdes) pour les deux parties de la plante (feuilles et racines).

⊕ L'extrait brut aqueux

10 g de la matière végétale sont mises en contact avec 50 ml d'eau distillée froide. L'ensemble est laissé macérer durant 24 h sous agitation continue. L'opération est répétée 2 fois avec renouvellement du solvant toutes les 24 heures. Les trois fractions sont réunies et filtrées puis évaporées à sec dans une étuve à une température de 45°C. Le produit est récupéré sous forme de solide de couleur marron.

Matériel et Méthodes

☒ L'extrait brute eau/Méthanol :

Selon la méthode de **Upson et coll. (1999)** ; 1 g de la matière végétale séchée est placée dans un récipient en verre couvert de 20 ml de méthanol aqueux 70% ; le tout est chauffé à 70°C pendant 5 minutes (ce procédé tue le tissu végétal et empêche l'oxydation ou l'hydrolyse enzymatique) ; L'échantillon est laissé macérer durant une nuit, et l'opération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant.

Après, filtration des fractions sur du papier filtre, elles sont réunies et évaporées à sec en utilisant un rotavapeur à température 45-50°C (**Figure N°6**).

50g des feuilles et des racines / 250 ml du
solvant (eau/MeOH : 75/175 ml)

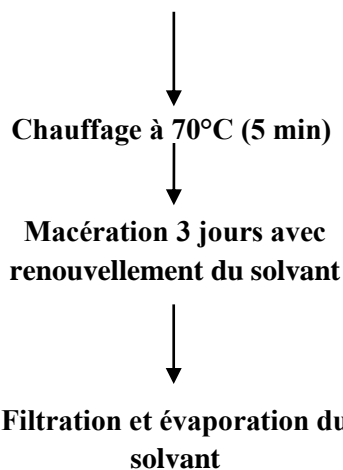


Figure N°6: Schéma de l'extraction eau/méthanol des parties aériennes et racines de *Fredolia aretioides*

☒ L'extrait des tannins :

L'extraction des tannins des feuilles et racines de la plante *Fredolia aretioides*, est réalisé selon la méthode de **Zhang et coll., 2008**. Les broyats de la matière végétal (2.5 g) ont été extraites par 50 ml du mélange acétone/ED (35/15 : V/V) durant trois jours à une T° ambiante. La solution obtenue est filtrée et évaporée à 40°C par un rotavapeur type bouché R-200 pour éliminer l'acétone, puis la phase aqueuse est lavée par le dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides. Après élimination de la phase organique, la phase aqueuse a été traitée trois fois avec l'acétate d'éthyle (V/V). Les 3 phases organiques obtenues sont réunies et évaporées à sec à 40°C par un rotavapeur. La phase aqueuse restante est traitée trois fois par le n-butanol. Les phases n-butanol sont évaporées à sec, afin de récupérer l'extrait sous forme de poudre (**Figure N°7**).

Matériel et Méthodes

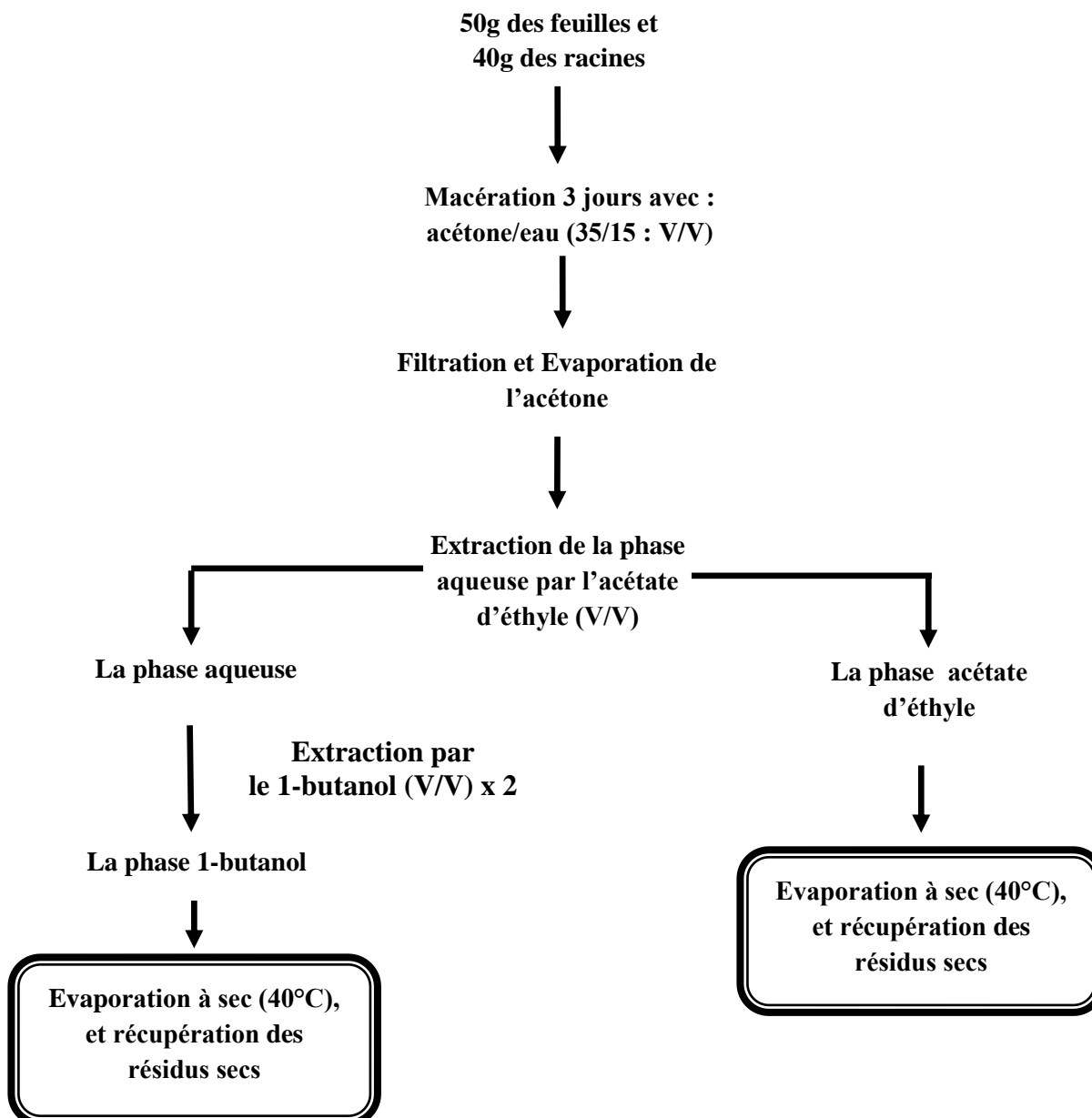


Figure N°7: Schéma de l'extraction des tanins des parties aériennes et racines de *Fredolia aretioides*

☒ L'extrait des Alcaloïdes :

L'extrait des alcaloïdes est obtenu par une extraction acide-basique comme celui décrit par **Longoni et coll., 1980** en apportant des modifications mineurs (**Hughes et coll., 2005**).

Les feuilles et les racines séchées et broyées sont immergées avec le méthanol pendant 5h dans un soxhlet. L'extrait méthanolique est concentré dans un rotavapeur à 40°C et le résidu sec obtenu est solubilisé dans 0.2N d'HCl et laissé sous agitation continue durant 16H suivie d'une filtration.

Matériel et Méthodes

La solution obtenue est mélangée avec le chloroforme pour enlever les lipides et les pigments. Ensuite, la phase aqueuse est basifiée avec l'hydroxyde d'ammonium jusqu'à pH = 11 et puis traitée avec du chloroforme. La phase chloroformique est évaporée à sec et on récupère la poudre. C'est l'extrait des alcaloïdes (**Figure N°8**).

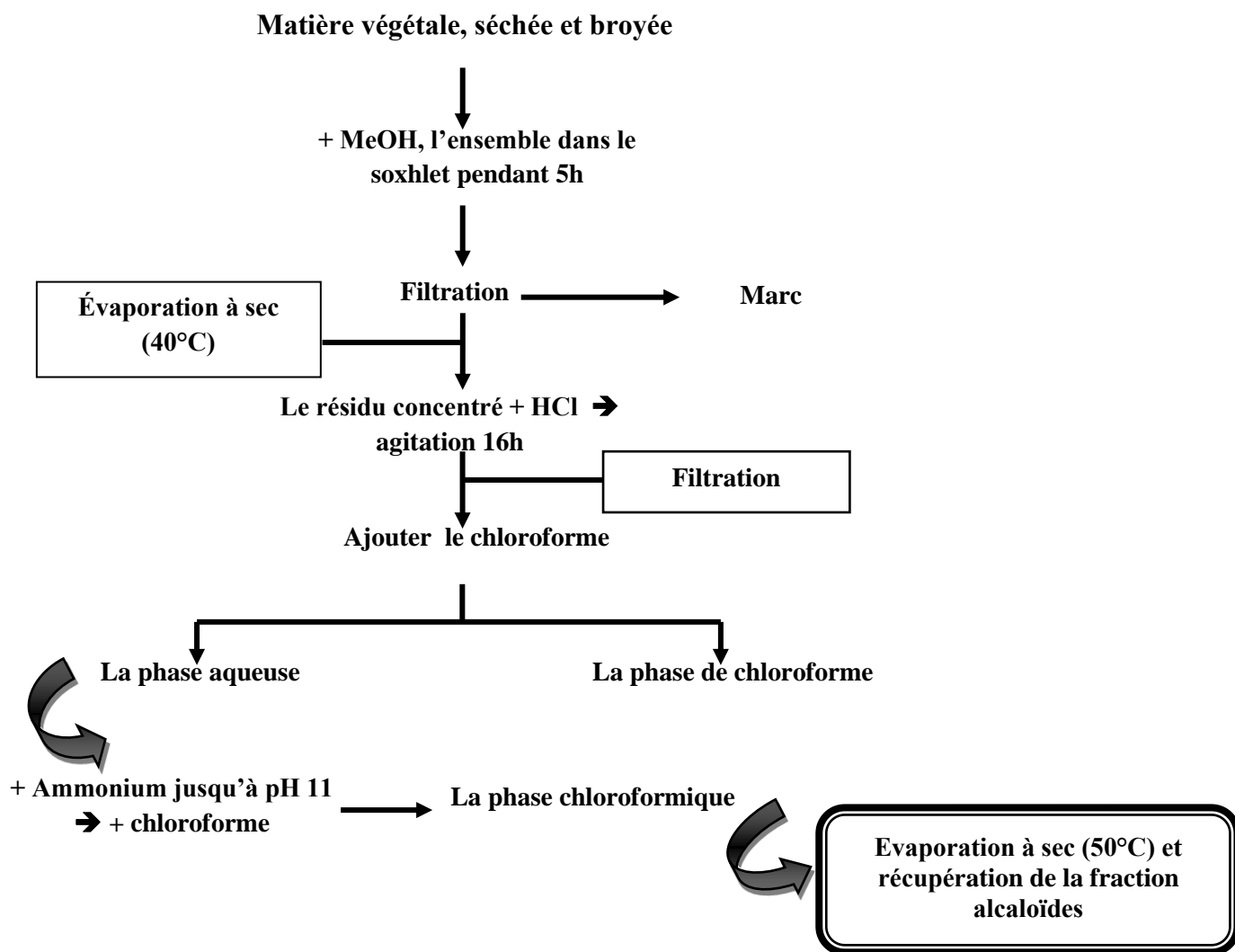


Figure N°8: Schéma de l'extraction des alcaloïdes des parties aériennes et racines de *Fredolia aretioides*

☒ Le rendement des extraits secs :

Nous pouvons déterminer le rendement en extrait sec, en calculant le rapport entre le poids de l'extrait sec (poudre) en gramme, et le poids du matériel végétal utilisé pour l'extraction en gramme ; selon l'équation suivante:

$$\text{Rdt (\%)} = [(P1 - P2) / P3] \times 100$$

Matériel et Méthodes

P1 : poids du ballon après évaporation ;

P2 : poids du ballon avant évaporation ;

P3 : poids de la matière végétale initial.

2.2.2. Réduction du fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*) :

❖ Principe:

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antiradicalaire. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm (**Oyaizu, 1986**). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Hubert, 2006**).

❖ Mise en œuvre pratique:

Le protocole expérimental suivi est celui de **Karagözler et coll., 2008**.

1ml de l'échantillon à différentes concentrations (0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5 et 3 mg/ml) dilué dans l'eau distillée est mélangé avec 2.5 ml d'une solution tampon phosphate (0.2M ; pH 6.6) et 2.5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%, puis on incube les tubes à 50°C pendant 20 minutes.

- après refroidissement des tubes à température ambiante, on ajoute 2.5ml d'acide trichloracétique (TCA) à 10% pour stopper la réaction.
- Les tubes sont centrifugés à 3000 tours/min pendant 10 minutes.
- prélever 2.5ml du surnageant et ajouter 2.5ml d'eau distillée.
- on ajoute au mélange 500µl d'une solution de chlorure de fer ($\text{FeCl}_3, 6 \text{H}_2\text{O}$) à 0.1% fraîchement préparée. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positive dans cette expérience dans les mêmes conditions.

❖ Expression des résultats:

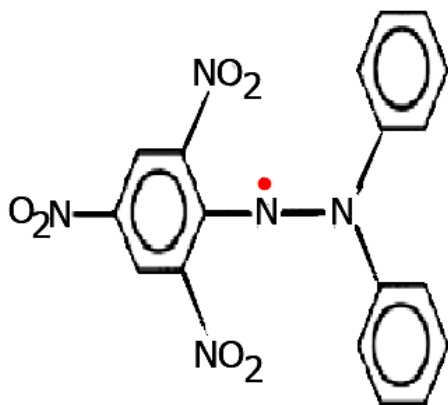
Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonctions des différentes concentrations utilisées pour les différentes fractions des deux parties de la plante étudiée. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées.

Matériel et Méthodes

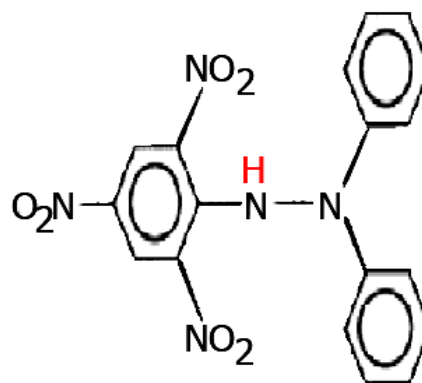
2.2.3. Test de piégeage du radical libre DPPH[•] (2,2-diphényl 1-1picrylhydrazyl) :

❖ Principe:

Le DPPH (2,2-Diphényl-1-1picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés antiradicalaires, le radical DPPH[•] est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH[•], qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (**figure N°9**) (**Parejo et coll., 2003**).



**DiPhenyl1PicrylHydrazyle
(radical libre)**



**DiPhenyl1PicrylHydrazyle (non
radical)**

**Figure N°9: Forme libre et réduit de DPPH[•]
(Molyneux, 2004).**

❖ Mise en œuvre pratique:

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par **Sanchez-Moreno et coll., 1998**.

Un volume de 50 µl de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH (0.025g/l) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1,95 ml d'une solution méthanolique de DPPH.

Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à température ambiante la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc pour chaque concentration qui contient 50 µl de chaque concentration de l'extrait et 1,95 ml du méthanol.

Matériel et Méthodes

❖ **Expression des résultats:**

▪ ***Calcul des pourcentages d'inhibitions :***

Nous déterminons ainsi les pourcentages d'inhibition grâce à la formule suivante :

$$I\% = [(Ac - At)/Ac] \times 100$$

Ac : Absorbance du contrôle

At : Absorbance du test effectué

▪ ***Calcul des concentrations 50 " IC₅₀ " :***

IC₅₀ (aussi appelée EC₅₀ pour *Efficient concentration 50*), permet de calculer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% des radicaux DPPH. Elle est calculée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions utilisées en utilisant le logiciel Sigma-plot. [(Bertoncelj *et coll.*, 2007) ; (Marxen *et coll.*, 2007) ; (Scherer et Godoy, 2009) ; (Fabri *et coll.*, 2009)].

Résultats

et

Discussion

Résultats et discussion

1. Etude phytochimique :

1.1. Les tests phytochimiques :

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

Les résultats des tests phytochimiques effectués sur les deux parties (feuilles et racines) de la plante étudiée "*Fredolia aretioides*" épuisées par l'eau, l'éthanol ou l'éther diéthylique sont regroupés dans le **tableau 1**.

Dans les feuilles et les racines de cette plante, la recherche des alcaloïdes, des tannins, des composés réducteurs et des saponosides s'est montrée positive.

L'extrait polaire aqueux des racines montre une présence des flavonoïdes plus importante que les extraits apolaires, ceci peut être attribué à la différence du degré de polarité des flavonoïdes dont les flavonoïdes polaires représentent la fraction la plus élevée.

Les tannins sont présents avec une intensité importante dans les deux extraits : aqueux et éthanolique. Leur présence est confirmée par une réaction positive avec la solution de chlorure de fer (FeCl_3) en donnant une coloration bleu noire dans les feuilles et les racines. Il s'agit donc des tannins galliques.

Les saponosides sont fortement présents, dans chaque partie de la plante avec une formation de mousse dans les tubes dépassant les 3cm de hauteur.

L'apparition d'une fluorescence sous une lumière UV indique la présence des coumarines uniquement dans les racines de *Fredolia aretioides* mais à une faible intensité.

La présence des alcaloïdes a été plus importante dans les racines par rapport aux feuilles. Elle a été confirmée par une précipitation brune au contact avec le réactif de Wagner.

On remarque aussi la présence des composés réducteurs avec une faible intensité dans les deux parties de *Fredolia aretioides*.

L'utilisation de différents solvants à polarité différente permet de séparer des composés selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. Cette méthode d'extraction menée sous agitation continue et à courte durée, permet d'extraire le maximum des composants bioactifs et de prévenir leur dénaturation ou modification probable (**Hagermann et coll., 2000**).

Résultats et discussion

Tableau N°1 : Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans les différents extraits de *Fredolia aretioides* :

Classes recherchées	L'extrait aqueux		L'extrait éthanolique		L'extrait éther diéthylique	
	Feuilles	Racines	Feuilles	Racines	Feuilles	Racines
Alcaloïdes	-	-	++	++	-	++
Flavonoïdes	-	+	-	-	-	-
Tannins	++	++	++	++	+	+
Coumarines	-	-	+	-	+	-
Saponosides	+++	+++	-	-	-	-
Composés réducteurs	+	+	-	-	-	-

Réaction fortement positive : +++

Réaction faiblement positive : +

Réaction moyennement positive : ++

Réaction négative : -

Résultats et discussion

1.2. Dosage des polyphénols totaux :

L'estimation quantitative des polyphénols totaux a été réalisée en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu et l'acide gallique a été utilisé comme standard (**Li et coll., 2007**).

En se basant sur les valeurs d'absorbance des deux solutions d'extraits, ayant réagis avec le réactif de Folin Ciocalteu et comparées à la solution étalon en équivalence d'acide gallique, les résultats de l'analyse colorimétrique des composés phénoliques totaux sont représentés sur la figure N° 10 et 11.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par 100 grammes de la matière végétale sèche (mg GAE/g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique.

Dans les deux parties de la plante étudiée, nous avons remarqué une variabilité des teneurs en polyphénols, la partie avec la teneur la plus haute est celle des racines de l'ordre de $971,05 \pm 0,83$ mg GAE/g suivi par les feuilles avec une teneur de $764,54 \pm 0,55$ mg GAE/g.

Ces résultats reflètent les données représentées dans la figure N°20 où nous avons enregistré des rendements plutôt élevés des extraits bruts ce qui prouve la richesse de chaque partie de la plante en polyphénols à savoir les tanins.

Une étude faite par **Rached et coll., (2010)** montre que la teneur des phénols totaux dans les racines de *Fredolia aretioides* est de l'ordre de $110,92 \pm 6,34$ mg GAE/g avec une teneur négative dans les feuilles. Ce taux est nettement inférieur à nos résultats qui sont très élevés dans les deux parties de la plante. Ceci peut être due à la période de récolte qui a été faite pendant le mois de Juin pour les études de **Rached** et son équipe (**2010**), et qui est différente de la période de récolte de notre plante (décembre 2011).

Le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement d'une plante à une autre, cela peut être attribué à plusieurs facteurs :

- Facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies...etc. (**Ebrahimi et coll., 2008**).
- Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante (**Miliauskas et coll., 2004**).
- La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux (**Lee et coll., 2003**).

Résultats et discussion

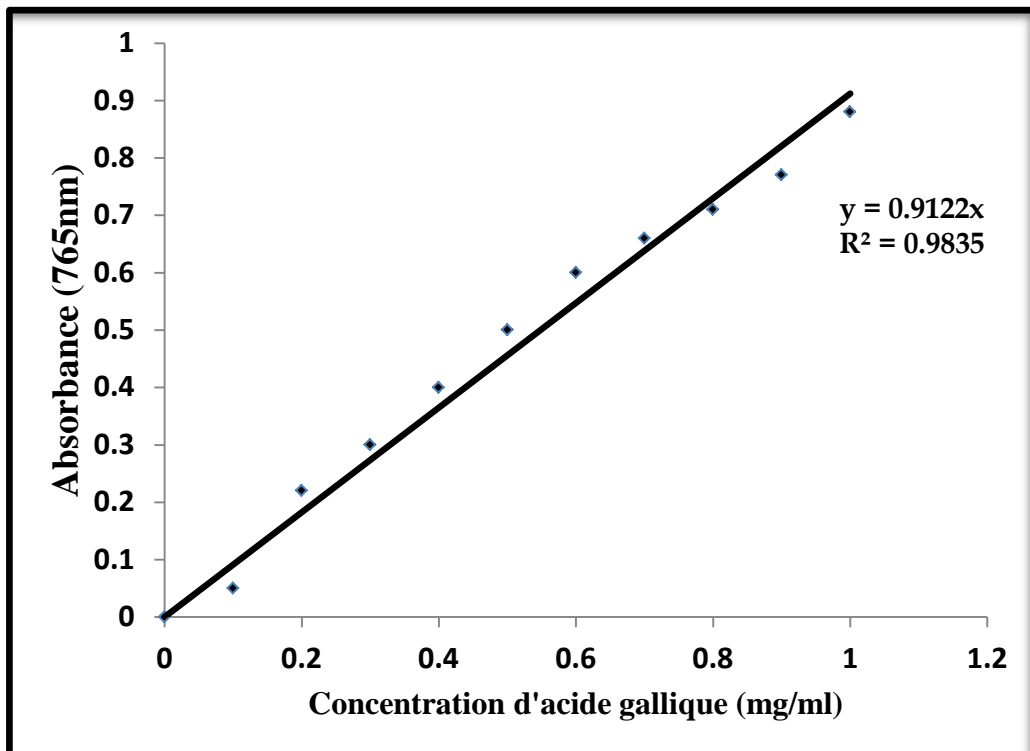


Figure N°10 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

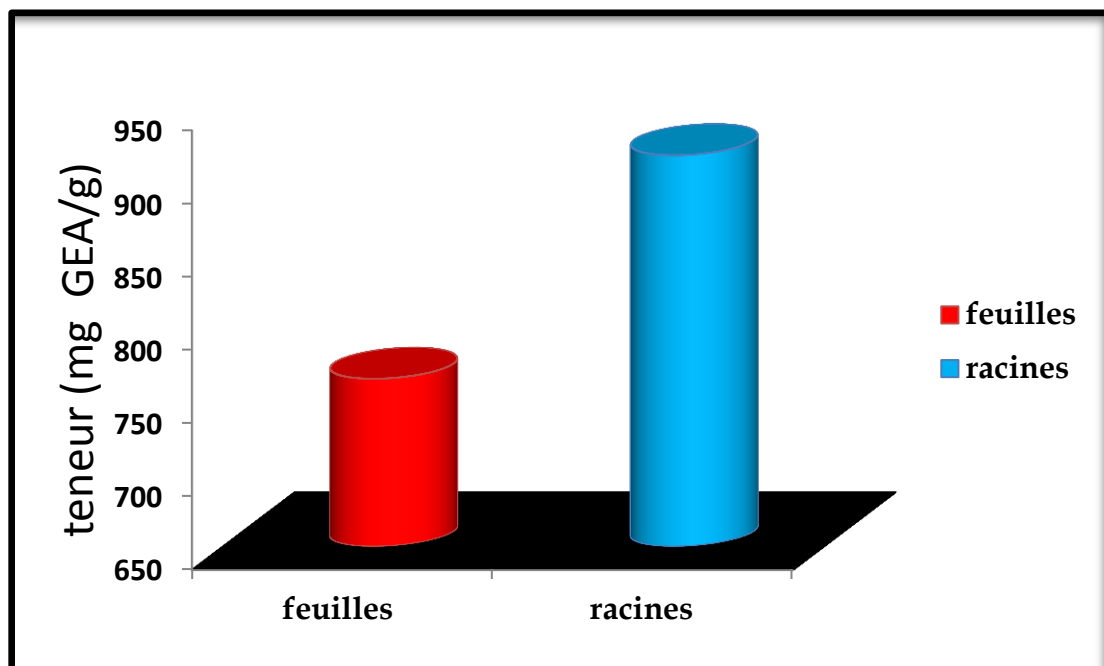


Figure N°11 : Teneurs en polyphénols totaux pour les deux parties de la plante étudiée.

Résultats et discussion

2. Etude de l'activité antioxydante :

2.1. Les rendements en extraits secs :

Les extractions des différents composés les plus abondants dans notre plante nous ont permis de calculer le rendement de chaque extrait notamment les extraits bruts aqueux, eau/méthanol, tannins (fraction acétate d'éthyle et 1-butanol) et les alcaloïdes. Le rendement, qui a été déterminé par rapport à 100 g de matière végétale sèche et broyée est exprimé en pourcentage. Les résultats obtenus sont montrés dans le **tableau N°2**.

Les résultats obtenus pour les extraits bruts, montrent que le rendement le plus élevé a été obtenu dans l'extrait brut aqueux des racines de *Fredolia aretioides* (38.87%) suivi de l'extrait brut eau/méthanol de la même partie (13.70%), extrait aqueux feuilles (8.31%) et l'extrait eau/méthanol des feuilles (7.53%). On peut déduire que la partie racines est plus riche en composés chimiques (tanins, alcaloïdes,...) que la partie aérienne.

Nous avons observé aussi que le rendement trouvé dans l'extraction des alcaloïdes est important dans les racines (2.39%) suivi des feuilles (1.63%).

De même, la fraction 1-butanol des racines dans l'extraction des tannins a donné un meilleur rendement par rapport à l'autre partie de la plante. Les résultats obtenus de chaque partie sont donnés par ordre décroissant suivant : racine > feuille qui sont de l'ordre de 5.09 et 2.27 % respectivement dans la fraction acétate d'éthyle, et 10.30 ; 2.38 % respectivement dans la fraction 1-butanol.

Les différents rendements illustrés dans la **figure N°12** viennent confirmer les intensités des résultats des tests phytochimiques et nous pouvons dire que l'extrait brut des racines est essentiellement constitué en polyphénols.

Résultats et discussion

Tableau N°2 : Les rendements en extraits obtenus pour les deux parties de la plante

Les extraits	Les solvants utilisés	Les rendements (%)	
		Feuilles	Racines
Extrait brut	Eau	8.316	38.875
Extrait brut	Eau/Méthanol	7.536	13.70
Tannin : fraction acétate d'éthyle	Acétate d'éthyle	2.2736	5.096
Tannin : fraction 1-butanol	1-butanol	2.3832	10.30625
Alcaloïdes	Chloroforme	1.6304	2.395

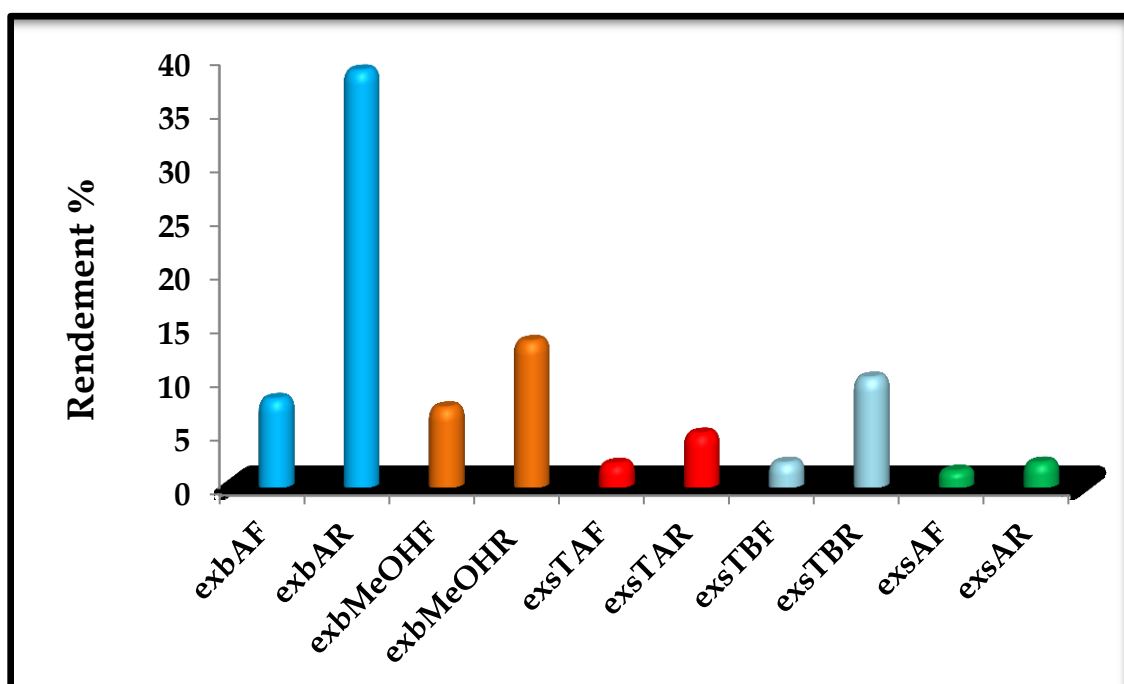


Figure N°12 : Rendements en extraits obtenus à partir des deux parties de la plante.

exbAF : extrait brut aqueux feuille

exbAR : extrait brut aqueux racine

exbMeOHF : extrait brut eau/MeOH feuille

exbMeOHR : extrait brut eau/MeOH racine

exsTBF : fraction butanolique feuille

exsTBR : fraction butanolique racine

exsAF : alcaloïde feuille

exsTAF : fraction acétate d'éthyle feuille

exsTAR : fraction acétate d'éthyle racine

exsAR : alcaloïde racine

Résultats et discussion

2.2. Réduction du fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*) :

C'est une méthode de mesure de la capacité des substances de nos extraits à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . C'est une technique rapide, facile et reproductible (Karagozler *et coll.*, 2008).

La capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Yang *et coll.*, 2008).

Des travaux antérieurs ont indiqué qu'il y a une relation directe entre les activités antioxydantes et la puissance de réduction des composants de quelques plantes (Yildirim *et coll.*, 2001).

Dans notre travail, nous avons testé par la méthode de FRAP différents extraits de chaque partie de la plante (feuilles et racines), et les résultats obtenus nous ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. On remarque que la capacité de réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons [(Ozturk *et coll.*, 2007) ; (Su *et coll.*, 2008) ; (Liuk *et coll.*, 2009)].

Tous nos extraits des deux parties de la plante présentent des activités antioxydantes nettement inférieures que celles de la référence (acide ascorbique), pour ce dernier la réduction est presque totale à partir d'une concentration de 0.75 mg/ml.

☒ L'extrait brut aqueux :

Nous remarquons que la partie racine d'extrait brut aqueux a présenté une grande activité pour réduire le fer avec une densité optique maximale de 1.18 à une concentration de 3 mg/ml par rapport aux feuilles qui ont présentés une DO de l'ordre de 0.32 pour la même concentration. Mais l'activité des deux parties est nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique qui présente une DO de 3.58 à la concentration de 0.75 mg/ml (Figure N°13).

☒ L'extrait brut eau/méthanol:

Les résultats regroupés sur la figure N°14, montrent que les deux parties de la plante étudiée ont des DO plus ou moins proches, avec une activité légèrement supérieure pour les feuilles qui présentent une DO de 0.64 par rapport aux racines qui ont une DO de 0.24 pour la même concentration de 3 mg/ml.

Résultats et discussion

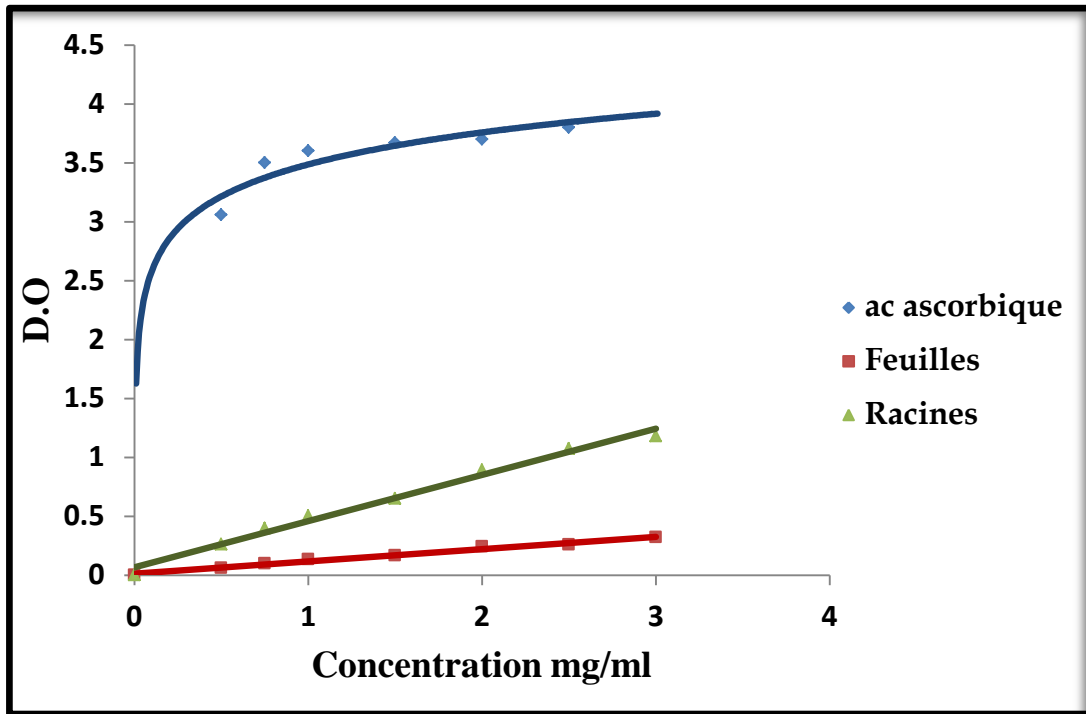


Figure N°13 : Pouvoir réducteur de l'extrait brut aqueux et de l'acide ascorbique par la méthode de FRAP.

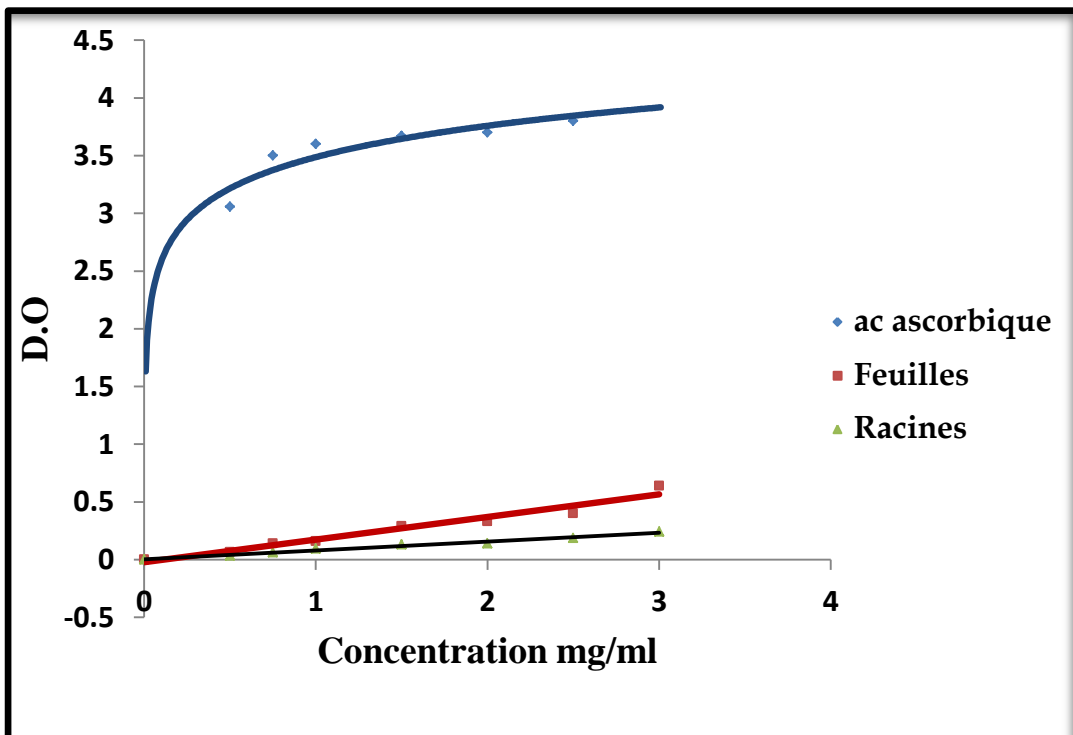


Figure N°14 : Pouvoir réducteur de l'extrait brut eau/méthanol et de l'acide ascorbique par la méthode de FRAP.

Résultats et discussion

☒ L'extrait des alcaloïdes :

Les résultats de l'activité antioxydante de l'extrait des alcaloïdes illustrés sur la **figure N°15**, montrent que les alcaloïdes de la partie racine ont une capacité à réduire le fer nettement supérieure à celle des feuilles, avec une DO de 1.18 pour la racine à une concentration de 3 mg/ml par rapport aux feuilles qui ont une très faible activité avec une DO de 0.10 pour la même concentration.

☒ L'extrait des tannins : la fraction acétate d'éthyle :

Les résultats représentés sur la **figure N°16**, montrent que la fraction acétate d'éthyle des feuilles est plus importante que les racines qui ont une DO de 1.20 pour une concentration de 3 mg/ml de l'échantillon à l'inverse des racines qui présentant une faible DO pour la même concentration.

☒ L'extrait des tannins : la fraction 1-butanol :

Nous remarquons que les DO de l'extrait des tannins dans la fraction 1-butanol, de chaque partie de *Fredolia aretioides* sont inférieurs à celles de l'acide ascorbique qui a une DO de 4.05 à une concentration de 3 mg/ml. On constate que les extraits des tanins des feuilles et des racines ont des capacités à réduire le fer presque similaire et augmentent avec la même allure (**Figure N°17**).

Afin de comparer l'activité antioxydante des extraits des deux parties de la plante par cette méthode, nous avons choisi la concentration de 2 mg/ml de chaque échantillon. Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'histogrammes dans la **figure 18**.

Résultats et discussion

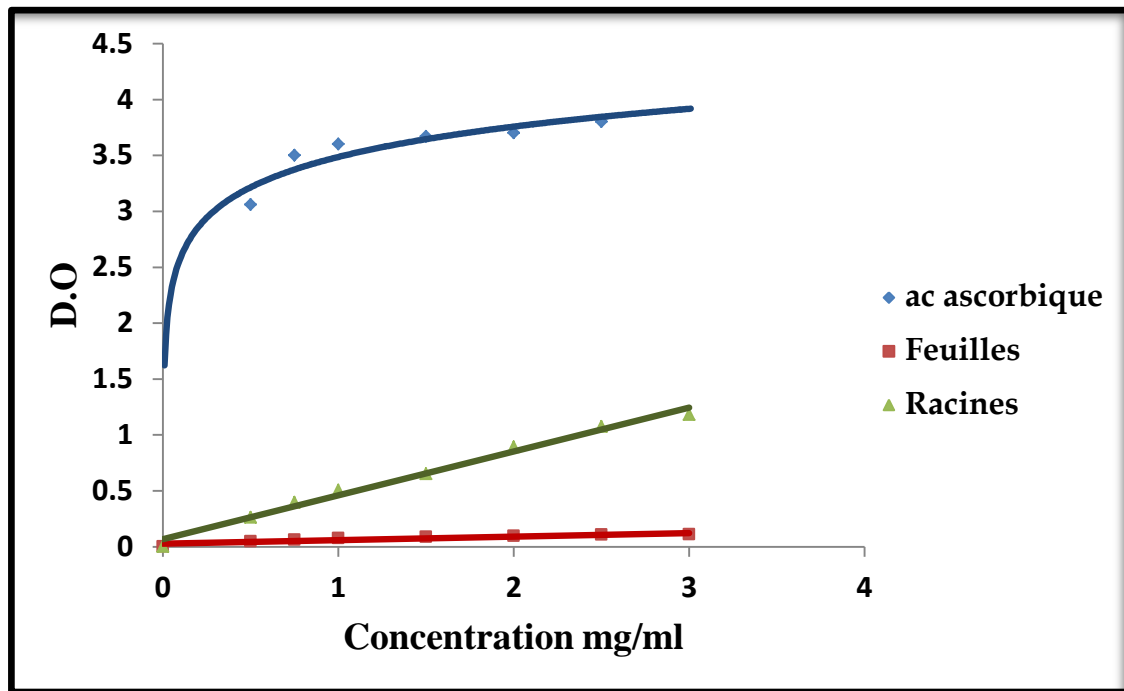


Figure N°15 : Pouvoir réducteur de l'extrait des alcaloïdes et de l'acide ascorbique par la méthode de FRAP.

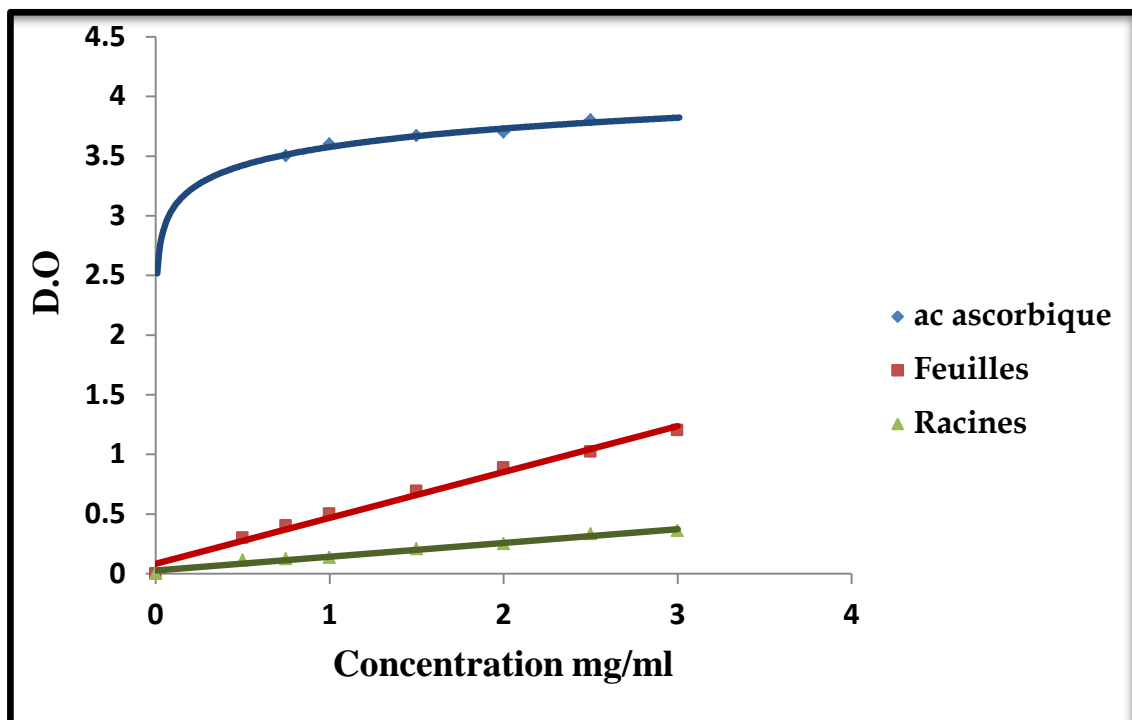


Figure N°16 : Pouvoir réducteur de l'extrait des tannins dans la fraction acétate d'éthyle et de l'acide ascorbique par la méthode de FRAP.

Résultats et discussion

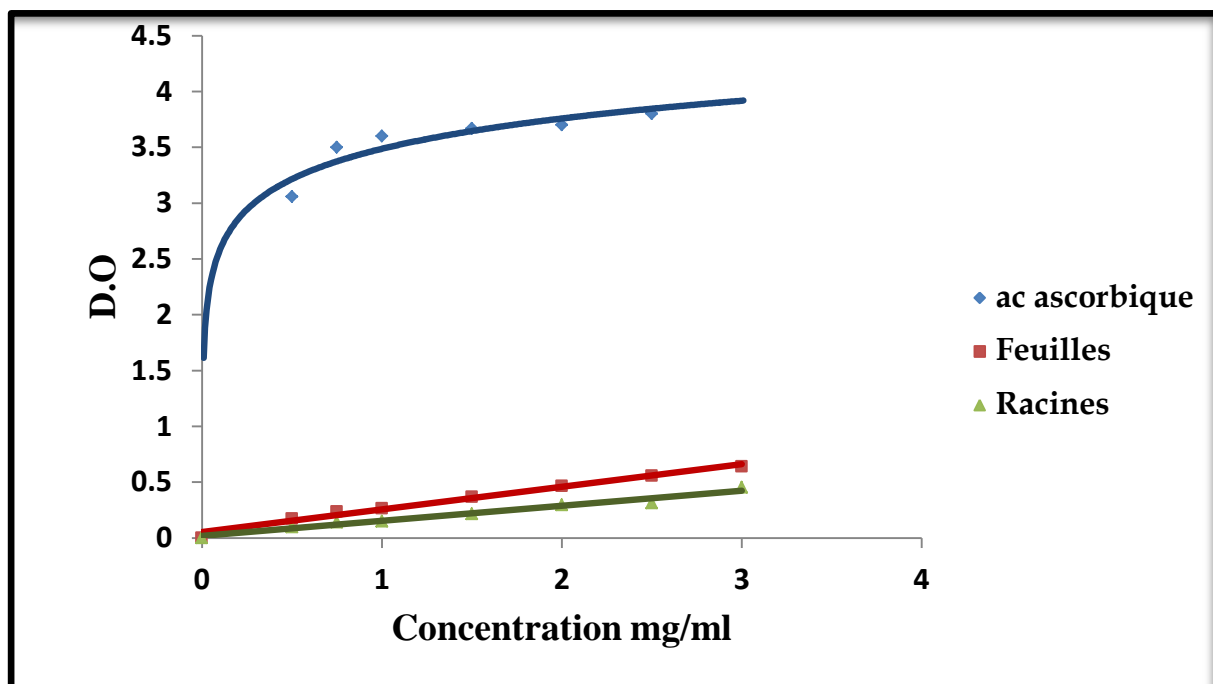


Figure N°17 : Pouvoir réducteur de l'extrait des tannins dans la fraction 1-butanol et de l'acide ascorbique par la méthode de FRAP

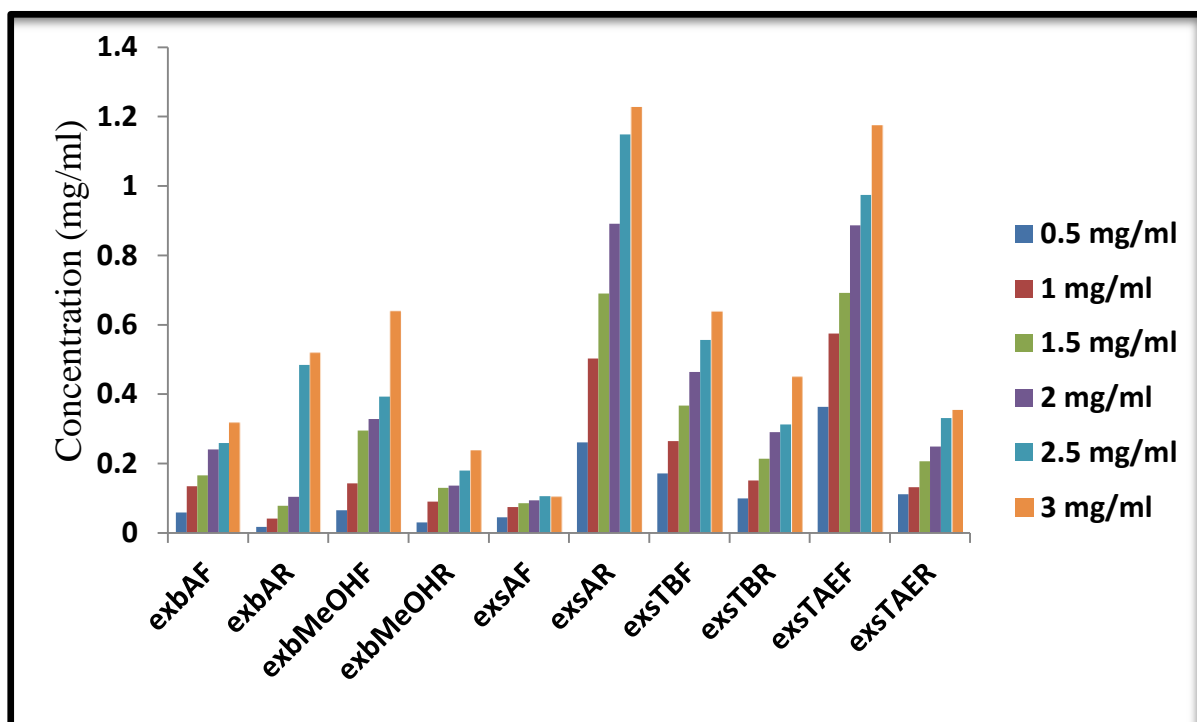


Figure N°18 : Histogramme des DO des extraits étudiés par FRAP en fonction de différentes concentrations.

Résultats et discussion

Les résultats obtenus montrent que la capacité de notre extrait à réduire le fer inférieure à celle de l'acide ascorbique pour les deux parties, mais elle est variable entre les deux parties de la plante étudiée. Cette réduction est beaucoup plus importante dans l'extrait des alcaloïdes de la racine (DO= 0.892) qui est largement supérieure à l'extrait des feuilles, mais presque égale à celle de l'extrait brut aqueux des racines (DO= 0.891) et à celle de l'extrait des tannins dans la fraction acétate d'éthyle des feuilles (DO= 0.887). Nous pouvons déduire que tous les extraits de *Fredolia aretioides* ont la capacité à réduire le fer mais elle reste toujours inférieure à celle de l'acide ascorbique (DO= 3.700).

Si on classe nos extraits selon la puissance de réduction de fer par rapport à l'acide ascorbique, on obtiendra l'ordre suivant: l'acide ascorbique > alcaloïdes –racines > aqueux –racines > tannins –fraction acétate d'éthyle –feuilles > tannins –fraction 1-butanol –feuilles > brut méthanol –feuilles > tannins –fraction 1-butanol –racines > tannins –fraction acétate d'éthyle –racines > brut aqueux –feuilles > brut méthanol –racines > alcaloïdes –feuilles.

2.3. Piégeage du radical libre DPPH' (2,2-diphényl 1-1picrylhydrazyl):

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation (**Rice-Evans et coll., 1995**). De nombreuses méthodes sont utilisées actuellement pour évaluer cette activité. Le radical DPPH' a été largement utilisé pour l'étude de l'activité antiradicalaire des différents extraits végétaux (**Sanchez-Moreno, 2002**).

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques [(**Blois, 1958**) ; (**Brand-Williams et coll., 1995**)]. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. La réduction de ce radical s'accompagne par son passage de la couleur violette caractéristique de la solution de DPPH' à la couleur jaune mesurable par spectrophotométrie à 514-518 nm (**Figure N°27**).

La mesure de l'absorbance (ou densité optique DO) a été effectuée par spectrophotométrie à 514 nm. A partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition en utilisant la formule donnée dans la partie matériel et méthodes. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes représentées dans les Figures [28-33], qui représentent la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de nos extraits. Nous avons déterminé graphiquement la concentration correspondante à 50 % d'inhibition (IC50).

Résultats et discussion

☒ L'extrait brut aqueux :

L'extrait brut aqueux des feuilles a montré une capacité de piégeage du radical libre DPPH très importante par rapport à l'extrait brut aqueux des racines. Ceci est montré par l'allure des graphes qui correspond à une courbe exponentielle avec la présence d'une phase stationnaire qui définit la réduction presque totale du radical DPPH en sa forme non radicalaire. Cet extrait a présenté à une très faible concentration des pourcentages d'inhibition importants. À une concentration de 1 mg/ml le pourcentage d'inhibition est de l'ordre de 64.34 % par rapport à l'extrait brut des racines qui est de l'ordre de 34.04 % (**Figure N°19**).

☒ L'extrait brut eau/méthanol :

L'extrait brut eau/méthanol des racines a montré une activité antiradicalaire plus importante que l'extrait eau/méthanol des feuilles, qui est de l'ordre de 87.24 % à une concentration de 2 mg/ml tandis que celle des racines à donner une inhibition de l'ordre de 69.45% pour la même concentration, mais ces données restent toujours inférieures à celles de l'acide ascorbique (**Figure N°20**).

☒ L'extrait des alcaloïdes:

L'extrait de la famille des alcaloïdes des racines a donné des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH très importants par rapport à ceux des feuilles, qui ont montré des faibles pourcentages de neutralisation du radical DPPH (55.76 % pour 2mg/ml). Par contre, les racines ont donné un pourcentage d'inhibition élevé pour la même concentration (92.93 % pour 2 mg/ml) (**Figure N°21**).

☒ L'extrait des tannins: fraction acétate d'éthyle:

Pour les fractions acétate d'éthyle des tannins, le meilleur résultat obtenu est celui des extraits de feuilles, qui ont donné un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 83.25 % à une concentration de 1.49 mg/ml et qui reste inférieure à l'acide ascorbique. Ceci est montré par l'allure du graphe qui trace une courbe exponentielle avec la présence d'une phase stationnaire, qui définit la réduction presque totale du radical DPPH[•]. En ce qui concerne les fractions acétate d'éthyle des racines nous constatons une faible activité qui est largement inférieure à la fraction des feuilles et de l'acide ascorbique (**Figure N°22**).

☒ L'extrait des tannins : fraction 1-butanol :

Pour la fraction 1-butanol, les extraits des deux parties ont donné une activité presque similaire. Nous remarquons que pour une concentration de 2 mg/ml, le pourcentage d'inhibition est de l'ordre de 57.74 % et 52.74 % pour les tannins des feuilles et racines respectivement. Ce qui montre que les tannins dans la fraction 1-butanol de notre plante étudiée ont une zone de concentrations avec un piégeage total du radical libre au-delà de la concentration de 2mg/ml de l'extrait (**Figure N°23**).

Résultats et discussion

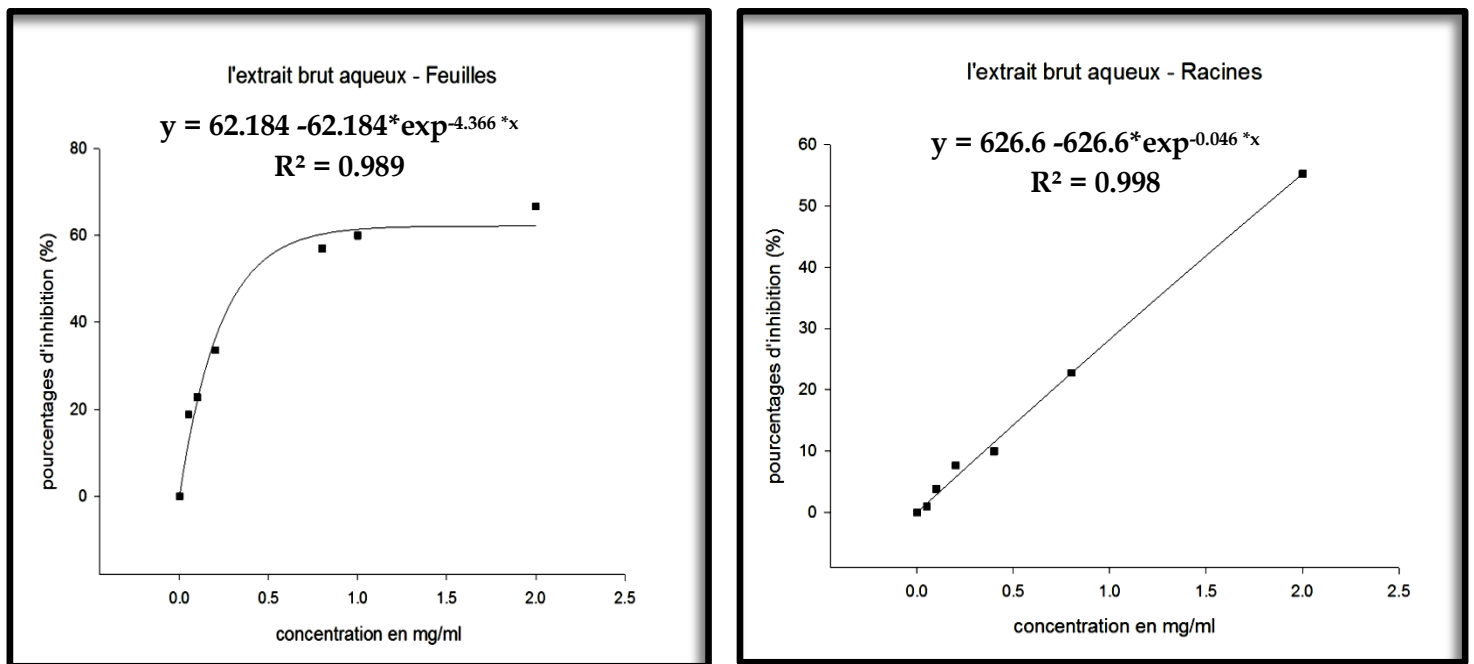


Figure N°19 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH[•] en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits brut aqueux des deux parties étudiées de *Fredolia aretioides*.

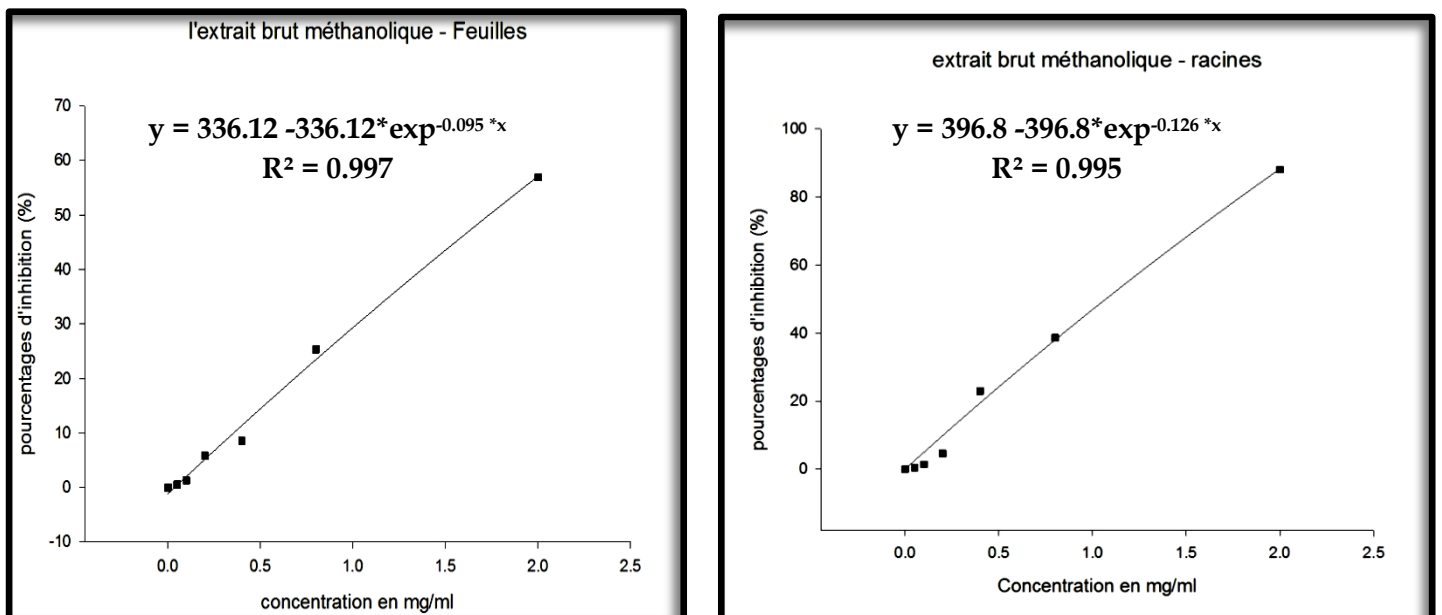


Figure N°20 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH[•] en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits brut eau/méthanol de deux parties étudiées de *Fredolia aretioides*.

Résultats et discussion

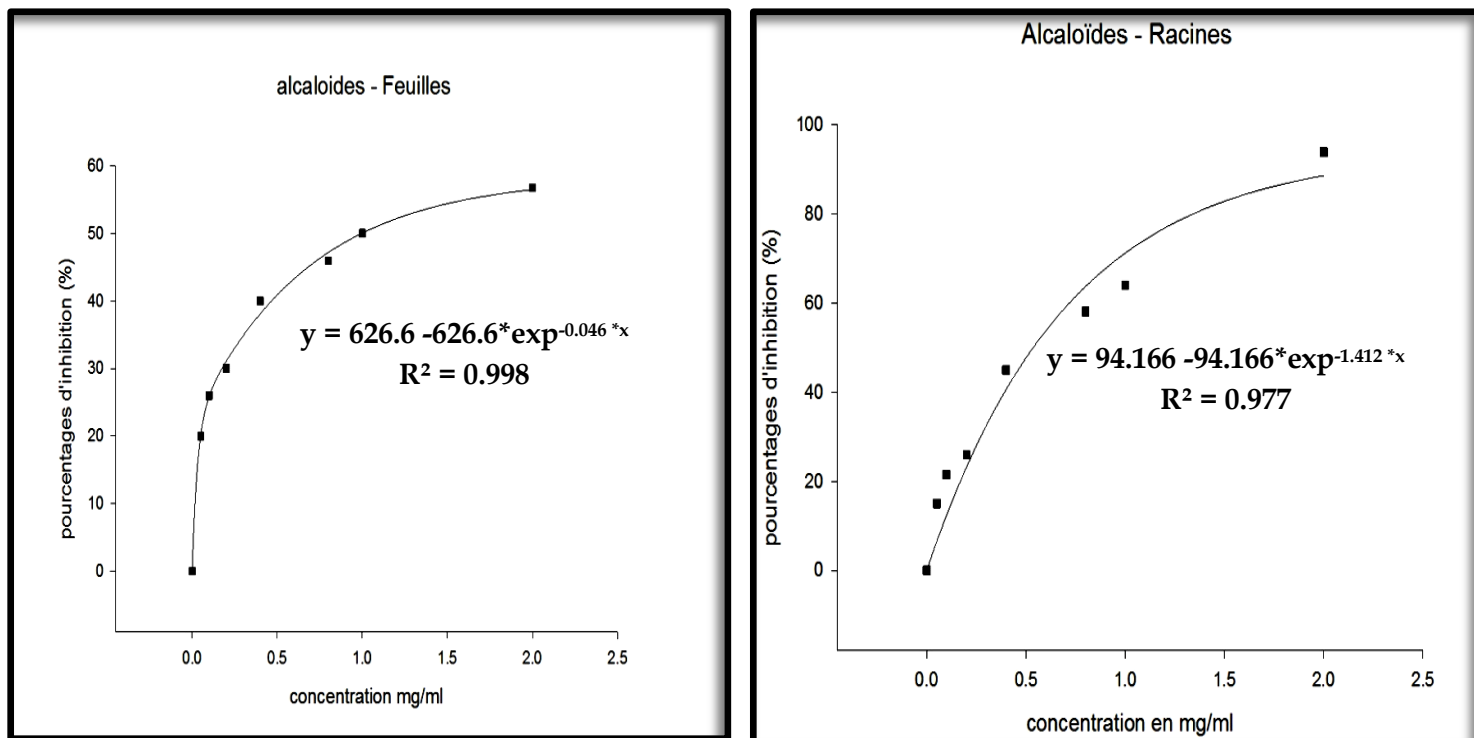


Figure N°21 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH^{*} en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits des alcaloïdes des deux parties étudiées de *Fredolia aretioides*.

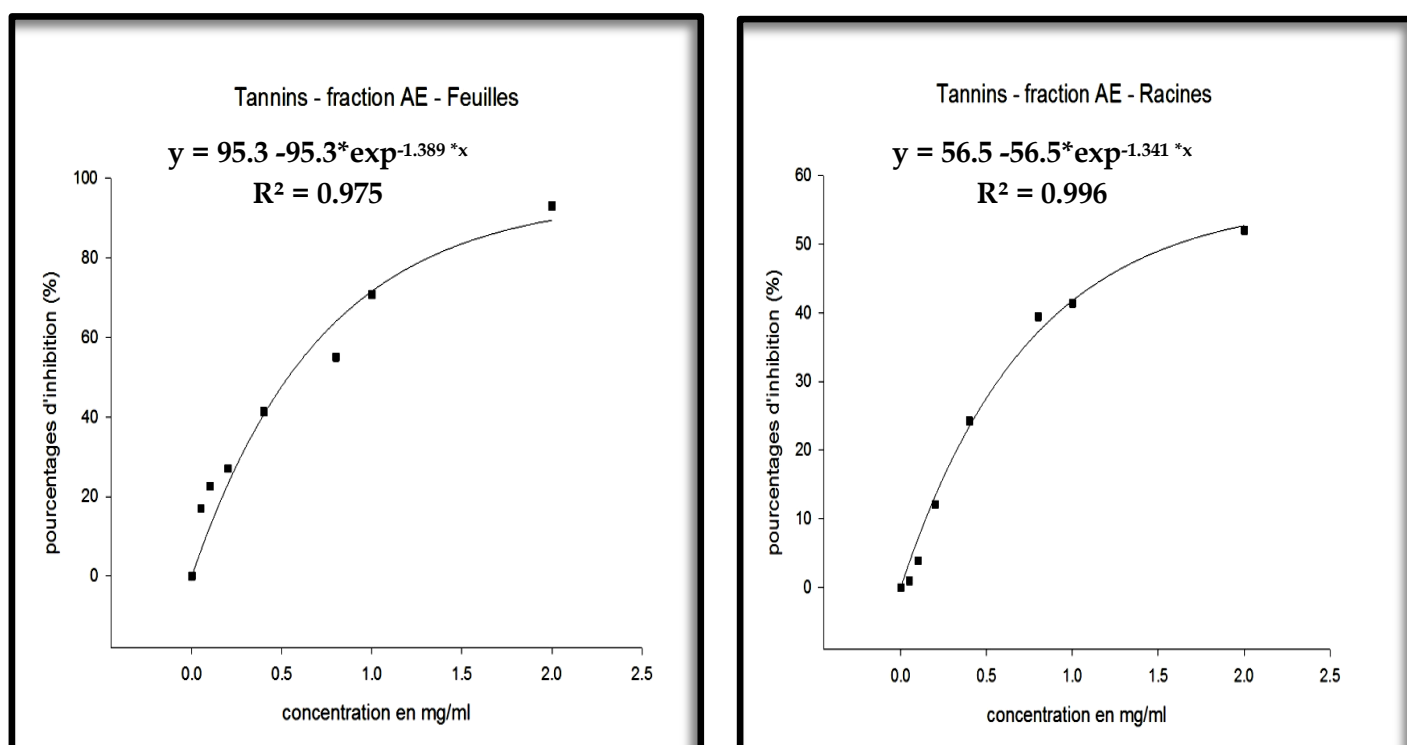


Figure N°22 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH^{*} en fonction des différentes concentration utilisées pour la fraction acétate d'éthyle de deux parties étudiées de *Fredolia aretioides*.

Résultats et discussion

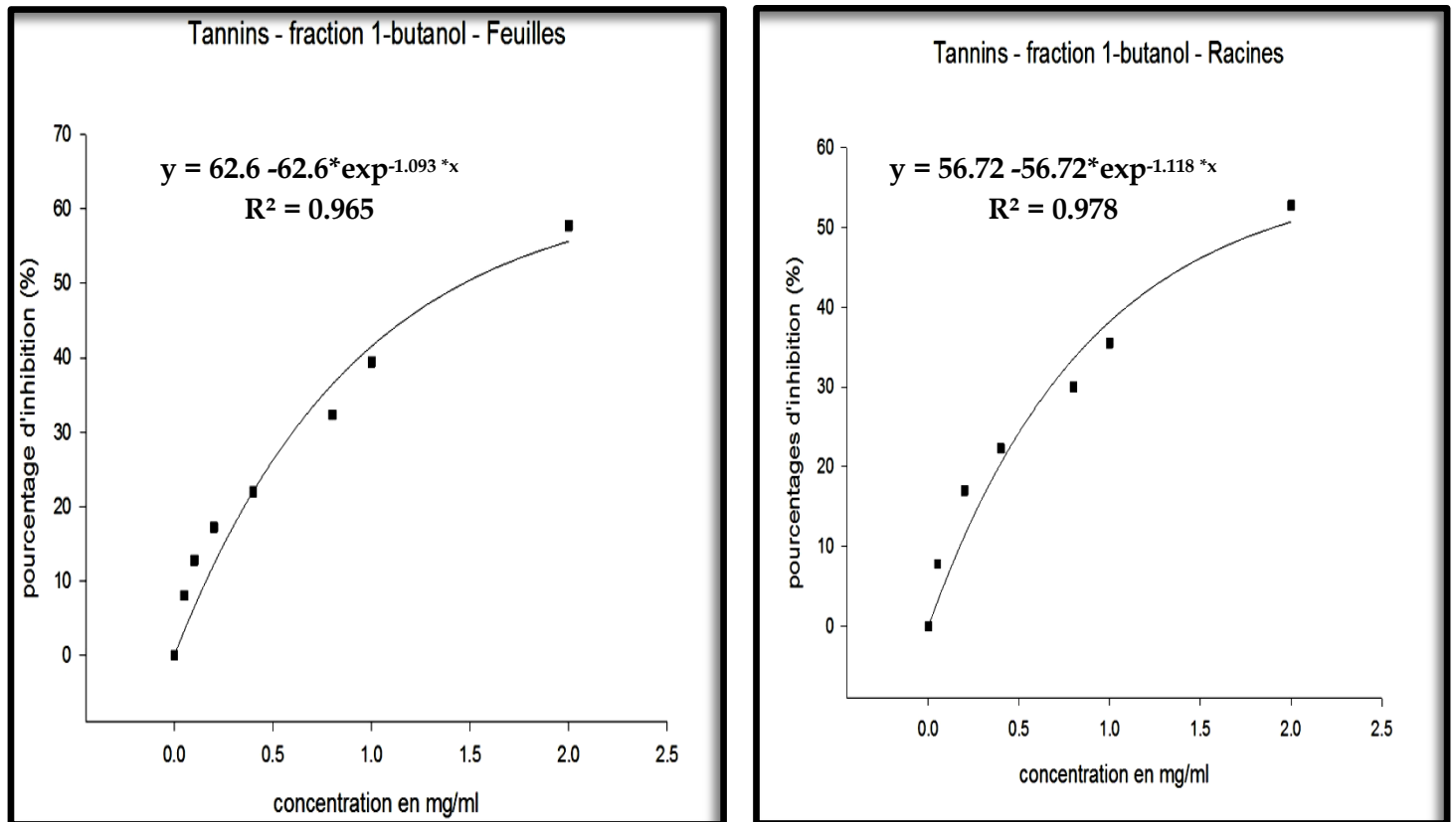


Figure N°23 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• en fonction des différentes concentrations utilisées pour la fraction 1-butanol des deux parties étudiées de *Fredolia aretioides*.

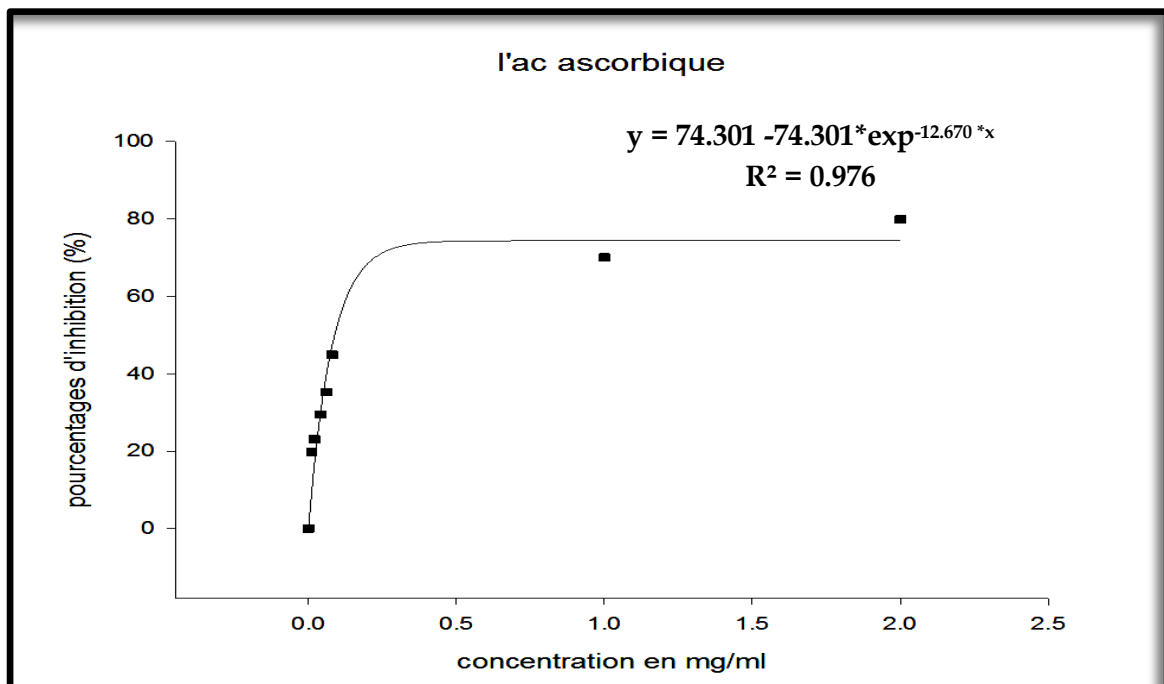


Figure N°24 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• en fonction des différentes concentrations utilisées de l'acide ascorbique.

Résultats et discussion

2.4. Calcul des concentrations inhibitrices à 50% :

La capacité antioxydante de nos différents extraits a été déterminée à partir des IC50. C'est la concentration en extrait nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. L'IC50 et l'activité antioxydante de l'extrait testé sont inversement proportionnels (**Prakash et coll., 2007**).

Les valeurs des IC50 trouvées pour tous les extraits testés sont représentées dans le **tableau N°3** et dans la **figure N°25** sous forme d'histogrammes.

La valeur d'IC50 de l'acide ascorbique que nous avons trouvé (0.08 mg/ml) est proche de celle trouvée par **Rached et coll., (2010)** qui est de l'ordre de 0.07mg/ml.

En comparant les IC50 des différents extraits testés des deux parties de *Fredolia aretioides* par rapport à celle de l'acide ascorbique, nous remarquons que l'activité antiradicalaire de tous nos extraits est inférieure à la capacité du piégeage du radical DPPH[•] de la substance de référence. Cette capacité est plus importante dans l'extrait brut aqueux des feuilles (0.37± 0.388), comme elle en est de même pour les alcaloïdes des racines et la fraction acétate d'éthyle des feuilles qui représentent une activité antioxydante presque similaire, et intéressante par rapport au contrôle positif. On remarque aussi, pour le reste des extraits des deux parties étudiées, une activité similaire entre elles avec un IC50 toujours supérieur ou égale à 1.

Il est évident que la forte activité des extraits aqueux est attribuée à sa richesse aux composés phénoliques, qui possède la plus forte teneur en molécules dosées (polyphénols, flavonoïdes et tannins). Une étude faite par **Kang et Coll. (2003)** a suggéré que les molécules polaires présentes dans les extraits végétaux contribuent à l'augmentation de l'activité antiradicalaire

Résultats et discussion

Tableau N°3 : Valeurs des IC50 trouvées pour les extraits des deux parties de la plante.

L'extrait / IC50	Feuilles (mg/ml)	(Racines mg/ml)
Aqueux	0.37 ± 0.388	1.81 ± 0.841
Eau/MeOH	1.69 ± 0.490	1.06 ± 0.839
Alcaloïdes	0.99 ± 0.159	0.54 ± 0.794
Tannins – 1-Butanol	1.46 ± 0.968	1.90 ± 0.978
Tannins –acétate d'éthyle	0.53 ± 0.749	1.61 ± 0.577
Ac ascorbique	0.08 ± 0.839	

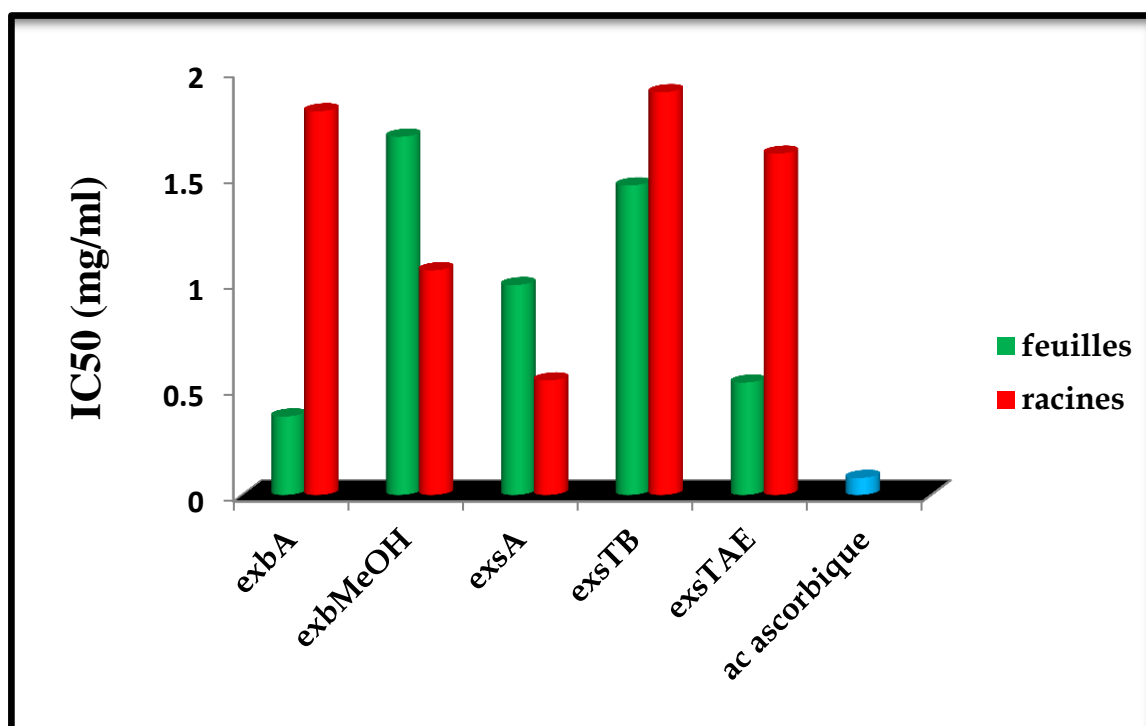


Figure N°25 : Histogramme des valeurs des concentrations inhibitrices 50 des différents extraits en mg/ml

exbA : Extrait brut aqueux

exsTB : extrait des tannins- fraction 1-butanol

exbMeOH : Extrait brut eau/méthanol

exsTAE : extrait des tannins- fraction acétate d'éthyle

exsA : Extrait des alcaloïdes

Résultats et discussion

D'après l'histogramme illustré dans la figure 34, nous pouvons classer les extraits par ordre de réactivité décroissante : l'acide ascorbique > extrait brut aqueux- feuilles > tannins-fraction acétate d'éthyle- feuilles > extrait des alcaloïdes- racines > extrait des alcaloïdes- feuilles > extrait brut eau/méthanol- racines > tanins- fraction 1-butanol- feuilles > tanins- fraction acétate d'éthyle- racines > extrait brut eau/méthanol- feuilles > extrait brut aqueux- racines > tannins- 1-butanol- racines.

Le classement des extraits selon la méthode du piégeage du radical DPPH• est différent du classement obtenu par la méthode de réduction du fer.

En général, les activités de nos extraits présentent des résultats intéressants, sauf l'extrait brut aqueux des feuilles qui présente une grande activité, ceci suggère que cette partie de notre plante est riche en composants phénoliques qui sont responsables de l'activité antioxydant selon de nombreuses études [(Virgili *et coll.*, 2001) ; (Khady *et coll.*, 2009)]. Les autres extraits, présentent une activité inférieure à l'extrait aqueux, malgré que le contenu en composés phénoliques est important, cela est due généralement à la synergie entre les différents composés antioxydants existants (Attou, 2011).

En comparant nos résultats avec ceux d'une autre espèce de la même famille des chénopodiacées : *Atriplex halimus* (une espèce majeure de cette famille, aussi trouvée dans le Sahara algérien) on trouve que l'IC50 de l'extrait méthanolique des feuilles est de l'ordre de 4.55 ± 0.79 mg/ml et celui des racines est de 3.24 ± 0.23 mg/ml, qui sont des valeurs supérieures à nos extraits et qui présentent donc une faible activité par rapport aux nôtres.

L'extrait des alcaloïdes des deux parties d' *Atriplex halimus* a montré une faible capacité de piégeage du radical libre DPPH• par rapport à nos extraits d'alcaloïdes. Ceci est montré par les IC50 de cette plante qui sont 6.71 ± 0.44 mg/ml et 9.06 ± 0.45 mg/ml des feuilles et des racines respectivement, par contre les IC50 de *Fredolia aretioides* de l'extrait des alcaloïdes est de l'ordre de 0.99 ± 0.159 mg/ml pour les feuilles et 0.54 ± 0.794 mg/ml pour les racines (Benhammou *et coll.*, 2009).

Conclusion

et

Perspectives

Conclusion et perspectives

Dans l'industrie pharmaceutique, sachant que les antioxydants contribuent de manière significative à la prévention des maladies, le développement de nouvelles méthodologies de synthèse et la préparation de molécules à usage thérapeutique constituent un objectif majeur et une préoccupation permanente pour de nombreux chercheurs.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et à l'évaluation du pouvoir antiradicalaire de différents extraits de *Fredolia aretioides* récoltée de la région de Béchar.

Le screening phytochimique réalisé par des réactions de caractérisation, a révélé la richesse de notre plante en alcaloïdes, tanins et saponines dans les deux parties, avec une faible présence des autres composés secondaires tels que les coumarines, les flavonoïdes et les composés réducteurs.

Les extractions des différents composés secondaires les plus abondants dans notre plante, nous ont permis de calculer le rendement de chaque extrait notamment les extraits bruts aqueux et eau/méthanolique, les tannins (fraction acétate d'éthyle et 1-butanol) et les alcaloïdes des feuilles et des racines. Au cours des extractions, le rendement le plus important a été obtenu avec l'extrait brut aqueux des racines (38.87%).

L'analyse quantitative des extraits de *Fredolia aretioides* est représentée par un dosage spectral des phénols totaux qui varie dans les deux parties de la plante. La teneur la plus élevée en polyphénols est retrouvée dans les racines (971.05 ± 0.83 mg GAE/g) suivie par les feuilles avec une teneur de 764.54 ± 0.55 mg GAE/g.

Ces résultats importants mettent en évidence la richesse de chaque partie de la plante en métabolites secondaires.

Concernant l'activité antiradicalaire, nous avons étudié le pouvoir antiradicalaire de tous les extraits des différentes parties de la plante en utilisant la technique de piégeage de radical DPPH• et la réduction de fer, afin de localiser la fraction qui représente l'activité la plus élevée. L'étude de l'activité antiradicalaire varie d'un extrait à un autre, avec des IC50 inférieures à 2 mg/ml.

L'évaluation de l'activité antiradicalaire par la méthode de FRAP a montré que tous les extraits de la plante étudiée ont la capacité de réduire le fer. La meilleure activité antiradicalaire est obtenue pour l'extrait des alcaloïdes et l'extrait brut aqueux des racines. Cette activité reste nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique.

Par ailleurs, pour le piégeage du radical libre DPPH•, les IC50 des différents extraits testés de *Fredolia aretioides* sont tous inférieurs à celles de l'acide ascorbique (IC50 = 0,08 mg/ml). En effet, une activité antiradicalaire très intéressante est obtenue pour

Conclusion et perspectives

l'extrait brut aqueux des feuilles ($IC_{50} = 0,37$ mg/ml), l'extrait des tannins de la fraction acétate d'éthyle des feuilles ainsi que les alcaloïdes des racines et des feuilles. L'évaluation du pouvoir antiradicalaire par la méthode de DPPH• a confirmé les propriétés puissantes que possèdent les polyphénols à piéger les radicaux libres.

Il ressort de cette étude que les résultats obtenus *in-vitro* constituent une première étape dans la recherche de substances naturelles biologiquement actives. Il serait toutefois intéressant d'approfondir les investigations phytochimiques et biologiques de cette plante afin d'isoler les molécules responsables des activités observées, ce qui permettra d'élargir l'arsenal thérapeutique des médicaments à base de plantes. Ces produits ont l'avantage d'avoir un faible coût pour des populations à faible pouvoir économique et qui, de surcroît, sont très sensible à la valorisation de sa médecine traditionnelle.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Abdelwahed A., Bouhlel I., Skandrani I., Valenti K., Kadri M., et coll., (2007)** Study of antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus* Confirmation by microarray expression profiling. *Chemico-Biol. Interact*, 165: 1-13.
2. **Adom K.K., Liu R.H. (2002)** Antioxidant activity of grains. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50: 6182–6187.
3. **Ali N.A., Julish W.D., Kusunick C., Lindesquist U. (2001)** Screening of yamani medicinal plant for antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of ethnopharmacology*, 74:173-179.
4. **Amadou B.S. (2005)** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Combretum glutinosum* Perr. Ex DC (COMBRETACEAE). Thèse de doctorat de l'université de Bamako, 124p.
5. **Amzal H. (2010)** Étude de l'activité antioxydante des saponines du tourteau de l'arganier. Thèse de Doctorat de l'université de MOHAMMED V AGDAL, pp: 9-22.
6. **Antwerpen P.V. (2006)** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique : Ciblage du système myelo peroxydase /peroxyde d'hydrogène /chlorure. Thèse de doctorat. Université libre de Bruxelles, 122p.
7. **Asres K., Seyoum A., Veereshan C., Bucar F., Gibbons S. (2005)** Naturally derived anti HIV agents. *Phytother. Res*, 19:557-581.
8. **Attou A. (2011)** Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent. Thèse de magister de l'université de Tlemcen, pp : 65-66.
9. **Baba Aissa F. (1999)** Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Edition Edas. 368 p.
10. **Barlow S.M. (1990)** Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. Ed. Hudson, B.J.F, *Food Antioxidants*: 253-307.
11. **Benhammou N., Atik Bekkara F., Kadifkova Panovska T. (2009)** Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *C. R. Chimie*, 12: 1259-1266.
12. **Benhouhou S.S., Saadoun N. (1986)** Contribution à l'étude de la flore de la région de Béni- Abbès. Thèse de graduation. Université d'Alger. 241p.
13. **Benmahdi H. (2000)** Synthèse des molécules à double activité anti-PAF et anti-HIV. Thèse de Doctorat à l'université de Béchar.

Références bibliographiques

14. **Bertoncelj J., Dobersek U., Jamnik M., Golob T. (2007)** Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 105 :822-828.
15. **Blois M.S. (1958)** Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181, 1199:1200.
16. **Bnouham M., Mekhfi H., Legssyer A., Ziyat. (2002)** Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int. J. Diabetes Metab*, 10: 33-50.
17. **Boizot N., Charpentier J. (2006)** Méthode rapid d'évaluation du contenu en composés phénoliques des oranges d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, *INRA*, 79-82.
18. **Boldyrev A.A. (2005)** Protection of proteins from oxidative stress: a new illusion or a novel strategy. *Ann.N.Y. Acad. Sci*, 1057:193-205.
19. **Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995)** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28, 25-30.
20. **Brmbak., Sies H. (1994)** Non enzymatic Antioxydant Defense Systems. In "Natural Antioxydants in Human Health and Disease. FREI B. Academic Press. Boston (Massachusetts), 107-128.
21. **Bruneton J. (1999)** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales, 2ème édition. Paris, Lavoisier Tech. & Doc, 915p.
22. **Buettner G. R. (1993)** The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *ArchBiochemBiophys*, 300:535-543.
23. **Cai YZ., Sun M., Corke H. (2003)** Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *J Agric Food Chem*, 51(8): 2288-2294.
24. **Cavin A. (1999)** Investigations phytochimiques des trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires. *Tinospora crisp* (Menispermaceae), *Merremia emarginata* (Convolvulaceae) et *Orophea enneandra* (Annonaceae). Thèse de doctorat, Lausanne, 243 p.
25. **Ciulel I. (1982)** .Methodology for analysis of vegetable drugs. Ed I.P.A.C.Romania.67p.
26. **Cosson E., Durieu M. C. (1885)** Notes sur nouvelles espèces d'Algérie. *Bull. Soc. Bot. France*, 2: 305.

Références bibliographiques

27. **Curtay J.P., Robin J.M. (2000)** Intérêt des complexes antioxydants. *Nutrithérapie Info*, 4p.
28. **Cushine T.P.T., Lamb A.J. (2005)** Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agent*, 26:343-356.
29. **Das H.C., Wang J.H., Lien E. (1994)** Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoides: a structure system-activity relation shipanalysis. *Journal of Food Engineering*, 69:133-136.
30. **Deiana M., Rosa A., Casu V., Cottiglia F., Bonsignore L., Dessi M.A. (2003)** Chemical composition and antioxydant activity of extracts from *Daphne gnidium* L. *Journal of the Oil Chemistry's Society*, 80(1) : 65-70.
31. **Diplok A.T. (1991)** Antioxydant nutriments and disease prevention : an Overview. *Am J Clin Nutr* : 53(suppl) :189S :93S.
32. **Ebrahimi N.S., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A., Yousefzadi M. (2008)** Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry.*, **110** : 927-931.
33. **El Mansouri L., Ennabilli A., Bousta D. (2011)** Socioeconomic interest and valorization of medicinal plants from the Rissani oasis (SE of Morocco). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, vol 1, pp. 30-45.
34. **Epifano F., Genovese S., Menghini L., Curini M. (2007)** Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*, 68:939 - 953.
35. **Estrada A., Katselis G. S., Laarveld B., Barl B. (2000)** Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 23:27-43.
36. **Fabri R.L., Nogueira M.S., Braga F.G., Coimbra E.S., Scio E. (2009)** *Mitracapus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects. *Bioresource Technology*, 100: 428-433.
37. **Formica J.V., Regelson W. (1995)** Review of the biology of quercetine and related bioflavonoids. *Food ChemToxicol*, 33:1061-1080.
38. **Fiorucci S. (2006)** Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat de l'université de Nice Sophia Antipolis. 211p.

Références bibliographiques

39. **Gonzalez-Tejero M.R., Casares-Porcel M., Sanchez-Rojas C.P., Ramiro-Gutierrez J.M., Molero-Mesa J., et coll., (2008)** Medicinal plants in the Mediterranean area: Synthesis of the results of the project Rubia. *J. Ethnopharmacol*, 116: 341-357.
40. **Graham J.G., Quinn M.L., Fabricant D.S., Farnsworth N.R. (2000)** Plants used against cancer extension of the work of Jonathan Hartwell. *J. Ethnopharmacol*, 73: 347-377.
41. **Griffin S.G., Wyllie S.G., Markham J.L., Leach D.N. (1999)** The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and fragrance journal*, 14:322-332.
42. **Groditzky J.A., Coats J.R. (2002)** QSAR evaluation of mono terpenoids insecticidal activity. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 50: 4576-4580.
43. **Groot H. (1998)** Une sagesse ancienne remise au bout du jour. *Tabula*, 3:4-9.
44. **Growtewold E. (2006)** The science of Flavonoids. Springer Science Edition, ISBN-10:0-387-28821-X.
45. **Hagerman A-E ., Muller-Harvey I ., Makkar H-P-S. (2000)** Quantification of tannins in tree foliage. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Vienna 26 P.
46. **Halliwell B., Gutteridge J. M. (1999)** The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med*, 18:125-126.
47. **Han Y. (2005)** Ginkgo terpene component has an anti-inflammatory effect on candida albicans-caused arthritic inflammation. *International Immunopharmacology*, 5: 1049-1056.
48. **Hartmann T. (2007)** From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68: 2831 - 2846.
49. **Havsteen B.H. (2002)** The biochemistry and medical signification of the flavonoids. *Pharmacology Therapiae*, 96(2) : 67-202.
50. **Heimeur N., Idrissi H., Seghini M. (2004)** Les polyphenols de *Pyrus mamorensis* (Rustaceae). *Reviews in biology and biotechnology*. Vol 3 N°1, p 37-42.
51. **Hsiou Y.D., Yang W., Hang L. (2000)** *Journal of the chinese chemical society*, 47, pp.561-566.
52. **Huang D., Prior R.L. (2005)** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 : 1841-1856.
53. **Huang M.T., Ferraw T. (1991)** Phenolic coumpoud in food and cancer prevention. *Phenolic coumpounds in food and their effects on health*, 3 : 83.

Références bibliographiques

54. **Hubert A.J.** (2006) Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de Soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, école doctoral des sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bioingénieries, spécialité : qualité et sécurité des aliments, p 174.
55. **Hughes J.B., Sousa J.S., Barreto R.A., Silva A.R., Souza C.S., Silva V.D., Silva B.M., Freitas S.R., Costa M.F., El-Bacha R.S., Batatinha M.J., Tardy M., Velozo E.S., Costa S.L.** (2005) Cytotoxic effects of an extract containing alkaloids obtained from *Prosopis juliflora* Sw. D.C. (Algaroba) pods on glioblastoma cells. *Rev. Bras. Saúde Prod. Ann.* 6: 31-41.
56. **Hyun J., Hyun J.K., Hyang S.C.** (2007) Quantitative structure-activity relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids. *Life sciences*, 80 : 835-841.
57. **Kansole .M.R.** (2009) Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso : cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia oppossta vahl* et *Orthosiphon pallidus royle ex benth*. Mémoire pour obtenir un diplôme d'étude approfondie (D.E.A) en sciences Biologiques appliquées, Burkina Faso.
58. **John W., Hilton Ph.D.** (1989) Revue: Les antioxydants roles, types et necessites dans les ailments pour animaux de compagnie. *Can Vet J*, Volume 30, 835p.
59. **Kang D-G., Yun C-K ., Lee H-S.** (2003) Screening and comparison of antioxidant activity of extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacology*, 87:231-236.
60. **Karagözler A., Erdag C.S., Çalmaz Emek Y.** (2008). Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chemistry*, 111 :400-407.
61. **Khady B., Emmanuel T., Jacqueline D., Ndiaga C., Philippe T.** (2009) Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14(1): 131-139.
62. **Khanbaba K., Ree T.R.** (2001) Tannins: Classification and Defenition. *Journal of Royal Society of Chemistry*, 18: 641-649.

Références bibliographiques

63. **Karumi Y., Onyeyili P.A., Oyugbuaaja V.O.** (2004) Identification of active principals of M.
64. Balsamia (Balsam Apple) leaf extract. *J.Med.Sci*, 4 (3) : 179 -182.
65. **Khedache Z.** (1999) Etude écologique et fonctionnelle de quatre populations de *Fredolia aretioides* sur le transect Béchar-Béni-Abbès. Contribution à l'analyse architecturale de *Fredolia aretioides* Coss et Moq. Thèse magister USTHB, Alger. 122p.
66. **Kim H.P., Son K.H., Chang H.W., kong S.S.** (2004) Antiinflammatory plant flavonoids and cellular action macanism. *J.Pharmacol.Sci*, 96 : 229-254.
67. **Kini F., Saba A.; Tits M., Angelot L., Guisson P.I.** (2008) Analyse par chromatographie et par spectrométrie électronique des extraits de feuilles de *Odontonemstrictum* (Acanthaceae). Mise en évidence de flavonoïdes du type flavone. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim*, 25 : 117-121.
68. **Krief S.** (2003) Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observation de l'alimentation de chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de Docteur du muséum national d'histoire naturelle, 343p.
69. **Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., Lee C.Y.** (2003) Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chemistry.*, 51 : 7292-7295.
70. **Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., chen F., Tian Y.** (2007) Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102 : 771-776.
71. **Lisu W., Jui-Hung Y., Hsiao-Ling L., Ming-Jiuan W.** (2003) Antioxydant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifeca* Gertn). *Journal of food and drug analysis*, 11(1) : 35-4.
72. **Marc Fr., Davin A., Deglene-Benbrahim L., Ferrand C.** (2004) Methodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Erudit, M/S : médecine sciences*, 20(4) : 458-463.
73. **Marfak A.** (2003) Radiolyse gamma des flavonoïdes, étude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcools : Formation de depsides. Thèse pour obtenir le garde de docteur de l'université de Limoges.

Références bibliographiques

74. **Maisuthisakul P., Suttajit M., Pongsawatmmit R.** (2007) Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some thai indigenous plants. *Food Chemistry*, 100 : 1409-1418.
75. **Marxen K., Vanselow K.H, Lippermeir S., Hintze R., Ruser A., Hansen U.P.** (2007) Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal Species by Linear regression analysis of spectrophotometric measurements. *Sensors*, 7 : 2080-2095.
76. **Milane H. (2004)** La quercétine et ses dérivés : molécule à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, étude et applications thérapeutique. Thèse de doctorat. Paris, 155p.
77. **Miliauskas. G., Venskutonis P.R., Van Beek T.A.** (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry.*, 85 : 231-237.
78. **Molyneux P.** (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26(2) : 211-219.
79. **Mulas M. (2004)** Potentialité d'utilisation stratégique des plantes des genres *Atriplex* et *Opuntia* dans la lutte contre la désertification. Short and Medium, Term Priority Environmental Action Programme (SMAP) Février, 91p.
80. **Murakami A., Tanaka T., Lee J.-Y., Surch Y.-J., Kim H.W., Kawabata K., Nakamura Y., Jiwajinda S., Ohigashi H. (2004)** Zerumbone, Asesquiterpene en subtropical ginger, suppresses skin tumor initiation and promotion stages in ICR mice. *International journal of cancer*, 110 : 481-490.
81. **Oyaizu M.** (1986) Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of nutrition*, 44 : 307-315.
82. **Ozenda P. (1991)** Flore et végétation du Sahara. Ed CNRS, Paris, 662p.
83. **Pan Y., Wang K., Huang S., Wang H., Mu X., He C., Ji X., Zhang J., Huang F. (2008)** Antioxydant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel. *Food Chemistry*, 106 : 1264-1270.
84. **Paris R., Moyse H.** (1969) Précis de matière médicinale. Paris : Masson.
85. **Parejo I., Viladomat F., Bastida J ; et al.** (2003). Investigation of bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sci*, 73 :1667-81.

Références bibliographiques

86. **Pincemail J., Defraigne J.D. (2004)** Les antioxydants un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène. Service de Chirurgie Cardio-vasculaire, Pro biox SA. Sart Tilman 4000 Liège, Belgique.
87. **Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (2001)** Antioxydants in food, Practical applications. Woolhead Publishing Limited. ISBN: 185573-463X.
88. **Quézel P., Santa S. (1962-1963)** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris, 2ème vol. 1170p.
89. **Rached W., Benamar H., Bennaceur M., Marouf A. (2010)** Screening of the Antioxidant Potential of Some Algerian Indigenous Plants. *Journal of Biological Sciences*, 10: 316-324.
90. **Raj narayana K.M., Sripalreddy M.R., Chaluvadi D.R., Krishna J. (2001)** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian of Pharmacology*. 33 : 2-16.
91. **Reynaud J., Lussignol M. (2005)** The flavonoids of Lotus Corniculatus. *Lotus Newsletter*, 35 : 75-82.
92. **Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B. (1995)** The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 22, 375 383.
93. **Rock E. (2003)** Stress oxydant, micronutriments et santé. Inra – CRNH, unité des maladies métaboliques et micronutriments 63122 St Genès Champanelle. Université d'été de nutrition- Clermont- Fenand, 37-42.
94. **Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F. (1998)** *Sci Food. Agr.* 76 : 270.
95. **Sanchez-Moreno C. (2002)** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Technol. Int.*, 8, 121-137.
96. **Sanchez-Moreno C. (2002)** Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3) : 121-137.
97. **Scherer R., Goboy H.T. (2009)** antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112 :654-658.
98. **Siddhuraju P. (2007)** Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated Tamarindus indica seed coat . *LWT - Food Science and Technology*, 40 : 982-990.

Références bibliographiques

99. **Soucharde J.P., Arnal J.F., Rochette L. (2002)** Les radicaux libres et le stress Oxydatif Radicalaire. Techniques permettant la mise en évidence d'un stress oxydatif en biologie, In : ‘‘ Biologie et Pathologie du cœur et des Vaisseaux’’ (Pinet F et al., eds) p245, *Médecine- Science Flammarion*.
100. **Sparg S.G., Light M.E., Staden J. (2004)** Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol*, 94(2-3) : 219-243.
101. **Suhaj M. (2006)** Spice antioxidants isolation and their antiradical activity : a review. *Jornal of food Composition and analysis*, 19 : (6-7), 531-537.
102. **Tahrouch S., Audary C., Rapior S., Moudolot L., Gargadenneca., Fruchner A. (2000)** Polyphenol investigation of *Argania spinosa* (Sapotaceae) endemic tree from Morocco. *Acta Bot. Gallica*, 147(3) : 225-232.
103. **Tijburg L.B.M., Mallerm T., Foltsj D., Weisberger U.M., Katau M.B. (1997)** Tea flavonoids and cardiovascular diseases. *Crit, Rev. Food Sci*, 37 : 771-785.

الملخص

جزء كبير من البحوث المهمة حاليا تعمل على دراسة الجزئيات الطبيعية المضادة للأكسدة.

يهدف عملنا هذا إلى الدراسة الفيتو كيميائية و النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات جزئين من الأوراق مع السيقان و جذور *Fredolia aretioides*. الفحص الفيتو كيميائي المحقق سمح لنا بإظهار الالكالويدات، تانا، سابونين في جزئين للنبتة و بوجود الفلافونويدات في السيقان فقط والكومارين في الاوراق فقط. كمية الفينولات متنوعة بين جزئي النبات، مستخلص الجذور يمثل الكمية المرتفعة التي تقدر ب 971.05 مغ مع معادل حمض الغاليك/غ اما بالنسبة للساق والاوراق فتمثل 764.54 مغ مع معادل حمض الغاليك/غ.

تمت دراسة النشاط المضاد للأكسدة لمختلف المستخلصات بواسطة طريقتين، إرجاع الحديد والقدرة على تثبيط الجذر الحر DPPH. مستخلص الالكالويدات للسيقان اعطى قدرة معتبرة على إرجاع الحديد ولكنها تبقى صغيرة على قدرة إرجاع حمض الاسكوربيك للحديد.

القدرة على تثبيط الجذر الحر DPPH كانت عالية في مستخلص الماء للاوراق مع $IC_{50} = 0.37 \text{ mg/ml}$

ولكنها تبقى اصغر من حمض الاسكوربيك ($IC_{50} = 0.08 \text{ mg/ml}$)

الكلمات المفتاحية: دراسة فيتوكيميائية , الالكالويدات , تانا، سابونين ، النشاط المضاد للأكسدة *Fredolia aretioides* , FRAP و DPPH .

Résumé

Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antiradicalaires d'origine naturelle.

Notre travail vise à faire une étude phytochimique et à évaluer l'activité antiradicalaire des extraits des deux parties de *Fredolia aretioides* Feuilles-tiges et fruits.

Les tests phytochimiques réalisés ont permis de mettre en évidence des alcaloïdes, des tanins et des saponines dans les deux parties de la plante avec une faible présence des flavonoïdes dans les racines et les coumarines dans les feuilles.

La teneur en phénols totaux est variable entre les deux parties. L'extrait brut des racines a présenté la teneur la plus élevée avec 971.05 mg GAE/g.

L'activité antiradicalaire des différents extraits a été évaluée par deux méthodes ; la réduction du fer et le piégeage du radical libre DPPH.

La capacité de réduction de fer est remarquable dans l'extrait des alcaloïdes des feuilles mais elle reste inférieure à la capacité de l'acide ascorbique.

La capacité de piégeage du radical libre DPPH était importante dans l'extrait brut aqueux des feuilles ($IC_{50} = 0.37 \text{ mg/ml}$) et qui est supérieure à la capacité du piégeage du radical DPPH- de l'acide ascorbique dont $IC_{50} = 0.12 \text{ mg/ml}$.

Mosts clés : *Fredolia aretioides*, étude phytochimique, alcaloïdes, tanins, saponines, activité antiradicalaire, FRAP et DPPH.

Abstract

Most of interest of current research relates to study the natural antioxidant molecules.

Our work aim is to study a phytochemical and antiradical activity of *Fredolia aretioides* Leaves-stems and routes.

The phytochemical tests realized can be to highlight the alkaloids, tannins, saponins in the two parts of the plant as well as the presence of the flavonoids just in the routes and the coumarins just in the leaves.

The total phenol content was varied inter the two part of the plant. Routes extract presented higher total phenol contents with 971.05 mg GAE/g than leaves with 764.54 mg GAE/g.

The antiradical's activities were evaluated using different extracts including: reducing power and free radical scavenging activity. The capacity of reducing power was important in alkaloids of routes but it's under the ascorbic acid power.

Aqua extract of leaves presented an interesting antiradical activity ($IC_{50} = 0.37 \text{ mg/ml}$) which was lower than the capacity of DPPH free radical scavenging of ascorbic acid ($IC_{50} = 0.08 \text{ mg/ml}$).

Key words : *Fredolia aretioides*, phytochemical study, alkaloids, tannins,

Saponins, antioxidant activity, FRAP and DPPH.