

MAST.180-206/102

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

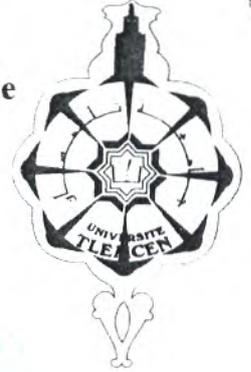
UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID - TLEMCEM

Faculté des Sciences, de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers  
département de biologie



Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme  
de Master en Biologie

Option : Biochimie Appliquée



Thème :

**Contribution à l'étude de l'activité antioxydante de  
l'extrait polyphénolique de *phagnalon saxatile subsp  
eu-saxatile.***

Présenté par :  
M<sup>elle</sup> BOUANANI Nazha

Inscrit Sous le N° 6A33  
Date : 10-06-2011

Jury:

Mme ATIK BEKKARA F.	Professeur	Présidente
Mme BOUCHERIT Z.	Maître de conférences	Examinatrice
Mme CHAUCHE F.	Maitre-assistante A	Promotrice

Année universitaire : 2011/2012



## *Remerciements:*

Ce travail de recherche a été effectué au Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA) de l'Université Abou Bakr BELKAID-TLEMEN, sous la direction de madame **CHAOUACHE Farah**.

Avant tout nous remercions Dieu pour nous avoir aidé à réaliser ce présent travail.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à Mme **CHAOUACHE.F**, Maître- assistante, au département de Biologie moléculaire et cellulaire (BMC), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers (SNV-STU), Université de Tlemcen, pour ses orientations et ses conseils bienveillants, ses encouragements et sa constante aide et disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à madame **ATIK-BEKKARA Fawzia**, Professeur au département de BMC, Faculté des SNV-STU, Université de Tlemcen, et Chef de l'équipe «Etude des composés volatils (huiles essentielles) et des composés phénoliques (flavonoïdes) », au Laboratoire des Produits Naturels de l'Université de Tlemcen Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Mme **Boucherit Z.**, Maître de conférences au département de BMC, Faculté des SNVTU, université de Tlemcen, je vous remercie d'avoir accepté de faire partie des membres du jury.

Mes remerciements vont également à M<sup>r</sup> **Chaouche Tarik.**, pour son aide qui est contribué à ce travail, et à M<sup>elle</sup> Rabiaa et Ourahmane, je remercie ma promotion de master 2012.

Enfin, pour leur soutien sans faille et permanent, je tiens à remercier ma famille et mon fiancé

**BENSRIBA A.** pour leur soutien moral et leur encouragement.

*Merci à tous.*

## Résumé

Notre travail porte sur l'étude de la phytochimie et de l'activité antioxydante d'une plante endémique, *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile* de la famille des Astéracées, largement répandue dans la région du Fallaoucène (Tlemcen). Elle est utilisée dans le traitement de l'inflammation et de la maladie d'Alzheimer.

Deux extraits bruts méthanoliques ont été préparés à partir des deux parties de la plante étudiée. Le rendement est plus important dans fleurs (10%) par rapport aux tiges-feuillées (9%).

Les tests phytochimiques ont permis de détecter les différentes familles de composés chimiques existantes dans les tiges-feuillées et les fleurs de cette plante.

Les teneurs en polyphénols sont plus importantes dans les tiges-feuillées (18,82mg GAE/g Ms) par rapport aux fleurs (4,8 mg GAE/g MS). Les flavonoïdes n'ont été détectés que dans les tiges-feuillée avec une teneur de 13,8 mg CE/g MS.

Par comparaison avec les antioxydants de synthèse utilisés dans l'industrie, l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de réduction de fer (FRAP) et celle du piégeage de radical libre DPPH des extraits méthanolique des deux parties de la plante a montré que nos extraits possèdent un faible pouvoir antioxydant en réduisant le Fer et une activité antiradicalaire intéressante en piégeant le radical DPPH.

L'analyse par chromatographie sur couche mince a permis de révéler la présence de l'acide gallique et de la pyrocatechol dans les tiges-feuillées et de la quercétine dans l'extrait des fleurs.

**Mots clés:** *Phagnalon saxatile*, étude phytochimique, polyphénols, flavonoïdes, Activité antioxydante, DPPH, FRAP, CCM.

## Liste des abréviations :

ADN	: Acide Désoxyribonucléique
BHA	: Butylhydroxyanisol
BHT	: Butylhydroxytoluène
CAT	: Catalase
Cm	: Centimètre
DPPH	: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
ERO	: Espèces Réactives de l'Oxygène
FRAP	: Ferric Reducing Antioxidant Power
FRO	: Formes Réactives de l'Oxygène
GPx	: Glutathion Peroxydase
LPO	: Peroxydation lipidique
MDA	: Malondialdéhydes
nm	: nanomètre
<i>P.</i>	: <i>Phagnalon</i>
SOD	: Superoxyde Dismutase
TBARS	: Thioarbituric Acid Reactive Substances
TBHQ	: Tertbutylhydroquinone
UV	: Ultra Violet
G3P	: Glycéraldéhyde 3 phosphate
Da	: Dalton
Min	: minute
h	: heure
CCM	: Chromatographie sur couche mince
ml	: millilitre
N	: Normalité
μl	: microlitre
Rdt	: le rendement
rpm	: Rotation par minute
M	: Molarité
IC50	: Concentration permettant d'inhiber 50% du radical DPPH
Rf	: Facteur de rétention (CCM)
UV	: ultra violet
λ	: Longueur d'onde
v/v	: volume / volume
CE	: équivalent de la catéchine
GAE	: équivalent d'acide gallique

# Liste des tableaux

<b>Tableau 01:</b> Classification des composées phénoliques.....	09
<b>Tableau 02:</b> Principaux acides hydroxybenzoïques.....	10
<b>Tableau 03 :</b> Principaux acides hydroxycinnamiques.....	10
<b>Tableau 04 :</b> Principaux types de coumarines.....	11
<b>Tableau 05 :</b> Principales classes des flavonoïdes.....	13
<b>Tableau 06:</b> Les différentes classes des terpénoïdes.....	14
<b>Tableau 07:</b> Activités biologiques de quelques métabolites secondaires.....	17
<b>Tableau 08 :</b> Liste des principaux radicaux libres.....	18
<b>Tableau 09 :</b> Principales substances antioxydantes .....	20
<b>Tableau 10:</b> Situation géographique de la station d'étude.....	24
<b>Tableau 11 :</b> Les rendements en extraits sec obtenus à partir des deux parties de la plante.....	34
<b>Tableau 12 :</b> Tests phytochimiques réalisés sur l'extrait méthanolique préparés à partir des fleurs et des tiges-feuillées de <i>phagnalon saxatile subsp eu-saxatile</i> .....	36
<b>Tableau 13:</b> Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations en extraits bruts de <i>Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile</i> .....	41
<b>Tableau 14:</b> Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations en extraits bruts de <i>Phagnalon graecum Boiss</i> .....	42
<b>Tableau 15 :</b> Valeurs des IC <sub>50</sub> trouvées pour les extraits bruts des deux parties de la plante étudiée.....	42
<b>Tableau 16:</b> Valeurs des IC <sub>50</sub> trouvés pour les extraits bruts des deux parties de la plante étudiée.....	46
<b>Tableau 17 :</b> les deux systèmes utilisés en CCM sur gel de silice.....	47
<b>Tableau 18 :</b> Chromatographie sur couche mince de gel de silice.....	47
<b>Tableau 19 :</b> Résultats de la chromatographie sur couche mince des témoins utilisés sur gel de silice avec les deux systèmes d'élution.....	48
<b>Tableau 20:</b> Composées identifiées par CCM.....	49
<b>Tableau 21 :</b> Les coefficients de la corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes et les deux activités antioxydante des tiges feuillées.....	50
<b>Tableau 22 :</b> Les coefficients de la corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes et les deux activités antioxydante des fleurs.....	50

## Liste des figures et des photos

<b>Figure 01:</b> <i>Phagnalon saxatile</i> .....	06
<b>Figure 02 :</b> <i>Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile</i> .....	06
<b>Figure 03 :</b> Unités de base de tanins hydrolysables : (a) acide gallique (b) acide ellagique.....	11
<b>Figure 04 :</b> Structure des tanins condensés.....	12
<b>Figure 05:</b> Squelette de base des flavonoïdes.....	12
<b>Figure 06:</b> La structure chimique d'une unité d'isoprène.....	13
<b>Figure 07 :</b> la structure de quelques alcaloïdes.....	15
<b>Figure 08:</b> Principales voies de biosynthèse des métabolites secondaire.....	16
<b>Figure 09:</b> Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.....	19
<b>Figure 10:</b> Propriétés réductrices des polyphénols .....	21
<b>Figure 11 :</b> Carte de localisation de la station de récolte.....	24
<b>Figure 12 :</b> Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	30
<b>Figure 13 :</b> Les rendements en extraits obtenus à partir des deux parties de la plante.....	34
<b>Figure 14 :</b> Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	37
<b>Figure 15 :</b> Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.....	38
<b>Figure 16 :</b> Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des deux parties de la plante.....	38
<b>Figure 17:</b> Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique.....	39
<b>Figure 18 :</b> Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour le BHA.....	40
<b>Figure 19:</b> Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour le BHT.....	40
<b>Figure 20 :</b> Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits bruts de deux parties de la plante étudiées.....	41
<b>Figure 21 :</b> Histogramme des valeurs des concentrations finales inhibitrices 50 des extraits et des références en µg/ml.....	43
<b>Figure 22:</b> Pouvoirs réducteurs de l'extrait brut (Tiges-Feuillées), et les contrôles.....	45
<b>Figure23:</b> Pouvoirs réducteurs de l'extrait brut des fleurs.....	45
<b>Figure 24 :</b> Pouvoir réducteur de tous les extraits de la plante à différentes concentrations.....	45
<b>Figure 25 :</b> Histogramme des valeurs des concentrations nécessaires pour la réduction de 50 % du fer des différents extraits en µg/ml.....	46
<b>Photo 1 :</b> <i>Pagnalon saxatile subsp eu-saxatile</i> .....	25

# Sommaire

<b>Introduction générale.....</b>	<b>02</b>
<b>Le premier Chapitre : Partie Bibliographique</b>	
<b>1- Etude de la plante <i>Phagnalon saxatile ubsp eu-saxatile</i>.....</b>	<b>05</b>
1-1 Etude botanique.....	05
1-2 Composition chimique, Propriétés biologiques et utilisation de quelque espèce du genre <i>phagnalon</i> .....	07
<b>2 - Métabolites secondaires.....</b>	<b>08</b>
2-1 Définition et fonction.....	08
2 -2 Classification des métabolites secondaires.....	08
2-2-1 Les composées phénoliques.....	08
a) <i>Acides phénoliques</i> .....	09
b) <i>Coumarines</i> .....	10
c) <i>Tanins</i> .....	11
d) <i>Flavonoïdes</i> .....	12
2-2-2 Les isoprénoïdes.....	13
2-2-3 Les composés azotés.....	14
2-3 La biosynthèse des métabolites secondaires.....	15
2-4 Isolation, caractérisation et évaluation des métabolites secondaires.....	16
2-5 Les propriétés thérapeutiques des composés du métabolite secondaire.....	17
<b>3 - Les oxydants et les antioxydants.....</b>	<b>18</b>
3-1 Les oxydants.....	18
3-1-1 Les radicaux libres.....	18
3-1-2 Origines des radicaux.....	19
3-2 Les Antioxydants.....	20
3-2-1 Mécanisme d'action des antioxydants.....	21
3-2-2 Quelques méthodes d'évaluation des propriétés antioxydante in vitro.....	22
<b>Le deuxième Chapitre: Matériel et méthodes</b>	
1- Provenance de la plante étudiée.....	24
2- Préparation des extraits bruts.....	25
3- Tests phytochimiques.....	26
4- Dosage des polyphénols totaux.....	27

5- Dosage des flavonoïdes.....	28
6- Étude de l'activité antioxydante.....	29
6-1 Piégeage du radical libre DPPH.....	29
6-2 Réduction du Fer : FRAP ( <i>Ferric reducing antioxidant power</i> ).....	30
7- Chromatographie sur couche mince (CCM).....	31

### **Le troisième Chapitre: Résultats et discussion**

1- Rendements en extrait sec.....	34
2- Tests phytochimiques.....	35
3- Dosage des polyphénols totaux.....	37
4- Dosage des flavonoïdes.....	37
5- Etude de l'activité antioxydante.....	39
5-1 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).....	39
5-1-1 Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH pour les substances de références	39
5-1-2 Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH pour les extraits testés.....	41
5-1-3 Calcul des IC50.....	42
5-2 Réduction du Fer : FRAP ( <i>Ferric reducing antioxidant power</i> ).....	43
5-2-1 Calcul des IC50.....	46
6- La chromatographie sur couche mince.....	47
7- Relation entre les composés phénoliques, et l'activité antioxydant.....	49
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>52</b>
<b>Les références bibliographiques.....</b>	<b>55</b>

Plusieurs causes rendent l'étude de cette plante intéressante :

- C'est une plante endémique de la méditerranée et spontanée;
- Elle possède plusieurs propriétés thérapeutiques à savoir les propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoire... (**Conforti et al., 2010**).
- Selon la littérature, les espèces de ce genre contiennent les composés phénoliques doués d'une activité antioxydante importante;
- Peu de travaux sur cette espèce sont publiés.

Notre travail se divise en trois chapitres:

- Le premier aborde une étude bibliographique préalable réalisée sur la plante étudiée, les métabolites secondaires, les oxydants et les antioxydants.
- Le second décrit le matériel et les méthodes utilisés dans notre travail.
- Le troisième est consacré aux résultats et discussion.

Notre travail s'achève par une conclusion.

## 1- Etude de la plante: *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile*:

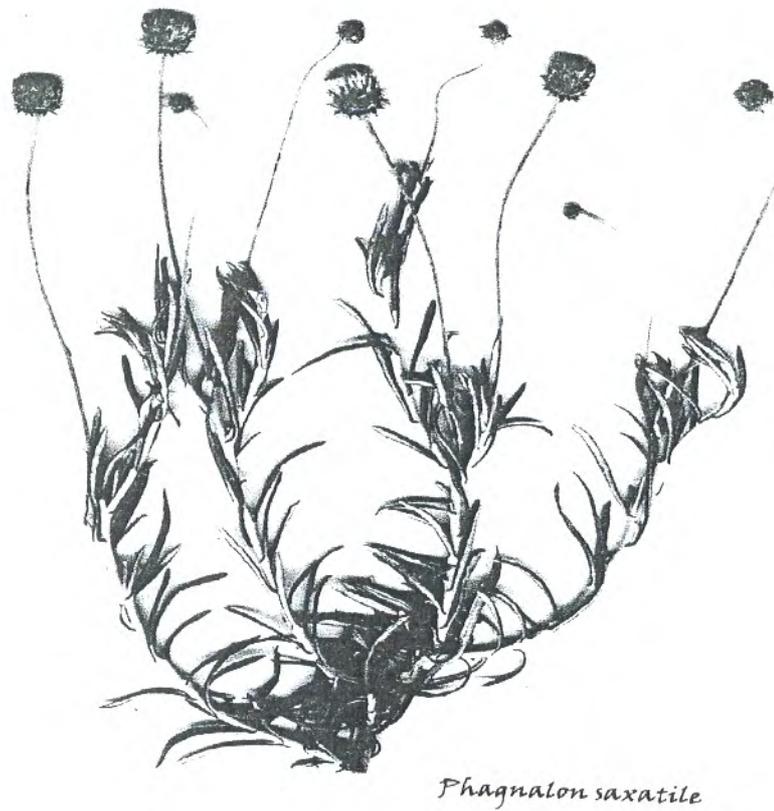
### 1- 1 Etude botanique :

La famille des Astéracées (**Composées**) est une importante famille de plantes dicotylédones qui comprend près de 13 000 espèces réparties en 1 500 genres. Ce sont essentiellement des plantes herbacées même s'il peut exister des arbres, des arbustes ou des lianes dans cette famille. Ils ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies en capitules, c'est-à-dire serrées les unes à côté des autres, sans pédoncules, placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales. Cette structure en forme de coupe ou de collerette est appelé un involucre (**Barreda et al., 2010**).

Le genre *Phagnalon* (Astéracées) est représenté par environ 36 espèces réparties dans le monde entier, dont six sont typiques de la région Méditerranéenne (**Qaiser., Abid., 2003**). C'est une plantes rupestres vivaces, Parmi les immortelles ou Gnaphalieae, les *Phagnalon* Cass «*Foddia*», «*Arfedj*» sont caractérisés par des tiges rameuses et tomenteuses, et des capitules sur des pédoncules longs et grêles, solitaires ou agglomérés 2-6, qui sont soit hétérogames, multiflores et discoïdes, ayant des fleurs du rayon femelles, fertiles ou stériles, sont disposées sur plusieurs rangs et à corolle filiforme; soit celles du centre hermaphrodites et à corolle tubuleuse, elles ont un involucre campanulé à bractées imbriquées sur 3 ou plusieurs rangs, les extérieures plus courtes et à la fin étalées en étoile, les akènes petits, sans côtes, cylindriques et poilus et les aigrette à poils unisériés. (**Quezel et Santa., 1963**).

*Phagnalon saxatile* communément appelée *Phagnalon des rochers* ou *immortelle des pierres*, pousse dans les débarquements et les fissures rocheuses calcaires, des murs et vieilles pierres et dans des endroits rocheux ensoleillés et secs, de préférence acides, de 100 à 1200 m d'altitude (**Rivas Martinez et al., 2001**).

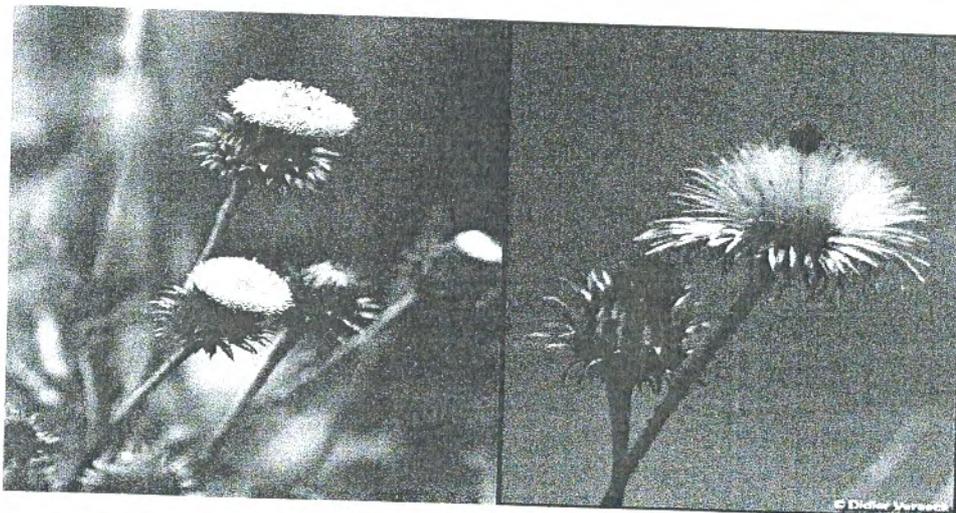
C'est une plante très ramifiée à la base, avec des feuilles ovales étroites et allongées, à bords souvent ondulés, sont très cotonneuses sur leur face inférieure, vert blanchâtre sur la face supérieure (**Coca Perez., 2001**). Les capitules sont le plus souvent solitaires à l'extrémité des pédoncules avec des bractées membraneuses, à pointe brunâtre, et les extérieures entièrement scarieuses, étalées ou réfléchies. Les fleurs sont jaunes (**Figure 01**) (**Quezel et Santa., 1963**), leur floraison débute du Mai à Juin (**Rivas Martinez et al., 2001**).



**Figure 01:** *Phagnalon saxatile*.

*Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile* (**Figure 02**) est un arbuste vivace endémique du pourtour méditerranéen caractérisé par Bractées de l'involucre toutes dressées et appliquées, toutes pourprésées au sommet. (Synonyme = *P. purpurascens*). (Quezel et Santa., 1963).

**Les noms en arabe:** Faddia, Arfedj, Matti, Taam el arneb (Trabut., 2006).



**Figure 02:** *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile*.

**Classification botanique (Dupont., 2007):**

**Embranchement:** Spermatophytes ;  
**Sous embranchement:** Angiospermes;  
**Classe:** Eudicots ;  
**Sous classe:** Euasteridées II ;  
**Ordre:** Asterales ;  
**Famille:** Astéracées ;  
**Genre:** *phagnalon* ;  
**Espèce:** *Phagnalon saxatile(L) Cass* ;  
**Sub-espèce:** *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile*.

**1-2 Composition chimique, propriétés biologiques et utilisation de quelques espèces du genre *Phagnalon* :**

Différents *Phagnalon* sont utilisés dans la médecine populaire et une variété d'extraits ont été examinés (Olmos et al., 2007), essentiellement consacrées à l'étude de *P. rupestre (L.) DC*, ont signalé la présence des terpénoïdes, flavonoïdes (Dolci, Tira., 1982), glycosides hydroquinone, et dérivés caféylquinique (Góngora et al., 2001). Les Bédouins du désert utilisent l'écorce de cette espèce pour induire délibérément les brûlures (Friedman et al., 1986). Tandis que dans la zone palestinienne, la plante entière est utilisée pour traiter l'asthme et maux de tête, et comme un analgésique pour les maux de dents. La phase aqueuse et des extraits éthanoliques de cette plante a montré une activité antimicrobienne contre les bactéries positives et négatives (Ali-Shtayeh et al., 1998).

Une étude montre la présence dans les parties aériennes de *P. saxatile* d'huile essentielle constituée principalement de sesquiterpènes, des acides gras, des cires (Senatore et al., 2005). La purification de son extrait méthanolique a permis l'isolement de composés phénoliques, parmi eux, l'acide caféique, l'acide méthylchlorogénique, la lutéoline et l'acide 3,5-dicafféoylquinique et des flavonoïdes tels que l'apigénine, l'apigénine-7-glucoside. Cet extrait a été testé pour la première fois, in vitro, dans le traitement de l'inflammation et de la maladie d'Alzheimer. Il a montré une activité antioxydante significative et un effet inhibiteur sur la production de NO (Un médiateur inflammatoire) dans les macrophages (Conforti et al., 2010).

## 2- Les métabolites secondaires:

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Parmi ces composés nous retrouvons dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique (**Bahorun., 1996**).

### 2-1 Définition et fonction:

En biologie végétale, les composés produits par les plantes sont subdivisés en deux groupes de molécules. Les métabolites primaires et les métabolites secondaires.

Les molécules du premier groupe (sucre, lipides, protéines, acides aminés) se trouvent dans toutes les cellules végétales, elles sont primaires par leur nécessité à la vie de la plante. Par contre, les molécules du deuxième groupe n'ont qu'une répartition limitée dans la plante et ne font pas partie des matériaux de base de la cellule (**Cirre., 2001**). Ces composés ne se trouvent normalement que dans des tissus ou organes particuliers à des stades précis du développement. Ils sont secondaires parce qu'ils ne semblent pas être essentiels à la croissance végétale mais leur action est déterminante pour l'adaptation de la plante au milieu naturel: agents protecteurs contre les stress physiques, défense contre les agressions extérieures, pigmentation de la plante pour capter l'énergie solaire ou à l'opposé protéger l'organisme contre les effets nocifs induits par les radiations solaire... (**Croteau et al., 2000**).

### 2-2 Classification des métabolites secondaires:

Les métabolites secondaires dépassent actuellement 200000 substances identifiées classés selon leurs structures chimiques (**Vermerris, Nicholson., 2006**). Nous distinguons trois principales classes: les composés phénoliques, les terpénoïdes et les stéroïdes, les alcaloïdes (**Ramawat, Merillon., 2008**).

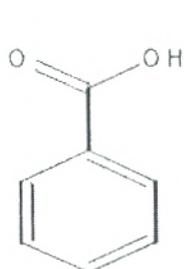
**2-2-1 Les composées phénoliques (dérivés desglucides):** L'appellation " polyphénols" ou composés phénoliques" regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules de structures variées, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun: la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (**Hennebelle et al., 2004; Sarni-Manchado, Cheynier., 2006**).

Les différentes classes des composées phénoliques sont regroupées dans le **Tableau 01**.

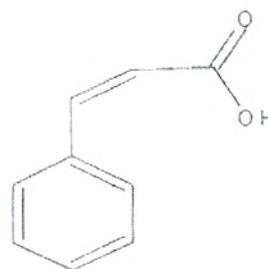
**Tableau 01:** Classification des composées phénoliques (Vermerris, Nicholson., 2006).

Structure	Classe	Structure	Classe
C6	Phénols simples;	C30	Biflavonyls
C6-C1	Acide phénolique;	C6-C1-C6	Benzophenones
C6-C2	Acetophénones,acide phenylacetique;	C6-C2-C6	Xanthones,stiblènes
C6-C3	Acide cinnamique, cinnamyl aldéhydes, cinnamyl alcohol, coumarine, isocoumarine, chromones;	C6, C10, C14	Quinones
C15	Chalcones, auronnes, dihydrochalcones, flavanes, flavones, flavanones, flavanonols, anthocyanidins, anthocyanins.	C18	Betacyanines
		(C6-C3) <sub>2</sub>	Lignanes
		(C6-C3) <sub>n</sub>	Lignine
		(C15) <sub>n</sub>	Tanins

a) *Acides phénoliques simple*: Le terme d'acide- phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques, possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyl phénolique (Bruneton., 1999). Les deux groupes essentiels des acides phénoliques sont les acides hydroxybenzoïques (Tableau 02) et les acides hydroxycinnamiques (Tableau 03). Ces derniers sont des dérivés des molécules non phénoliques qui sont respectivement l'acide benzoïque C6-C1 et l'acide cinnamique C6-C3 (Budic-Leto, Lovric., 2002).

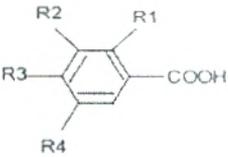


(1) Acide benzoïque

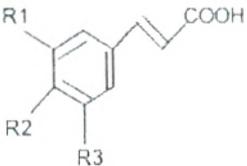


(2) Acide cinnamique

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

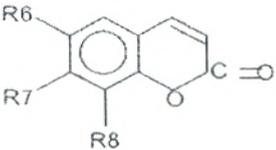
Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

**Tableau 03 :** Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado, Cheynier., 2006).

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

b) *Coumarines* : Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses (Igor Passi., 2002). Ils dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale (Bruneton., 1999) (Tableau 4).

Tableau 04 : Principaux types de coumarines (Macheix et al., 2005).

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

c) **Tanins**: Ce sont des substances naturelles phénoliques qui peuvent précipiter les protéines à partir de leurs solutions aqueuses (Bruneton., 2009). Les tanins sont une famille complexe de principes actifs qu'on trouve dans l'ensemble des végétaux, et dans toutes leurs parties (écorces, racines, feuilles, etc.). Ils ont la capacité de former des complexes avec des macromolécules (les protéines ...) et des liaisons entre les fibres de collagènes, d'où leur viennent la plupart de leurs propriétés. Leur structure chimique est particulièrement variable, mais comporte toujours une partie polyphénolique ; il existe deux catégories de tanins, d'origine biosynthétiques différentes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Paolini et al., 2003).

❖ **Les Tanins hydrolysables**: Ce sont des esters d'oses et d'acides phénols (acide gallique ou ellagique) Figure 03 (Bruneton., 1999).

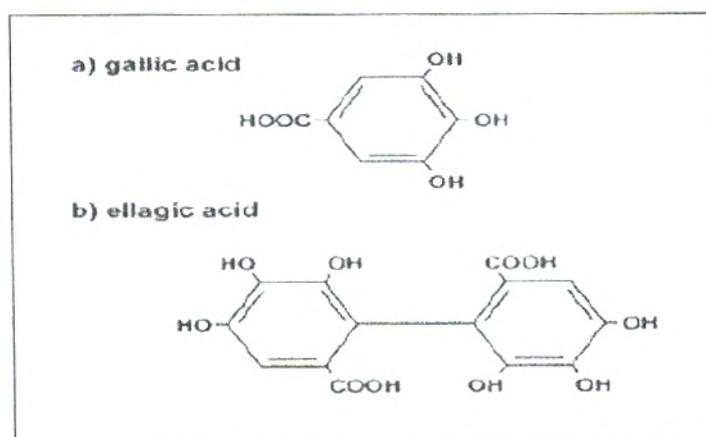


Figure 03 : Unités de base de tanins hydrolysables : (a) acide gallique (b) acide ellagique (Kogel-Knabner., 2002).

❖ **Les Tanins condensés** : appelés également proanthocyanidines (Waghorn., 2003). Ce sont des polymères de polyhydroxy-flavan-3-ol, liés la plupart du temps par des liaisons entre C-4 et C-8 et sporadiquement entre C-4 et C-6. Cette classe de composés est caractérisée par une immense hétérogénéité due à la présence de divers groupes fonctionnels (Figure 04). (Kogel-Knabner., 2002).

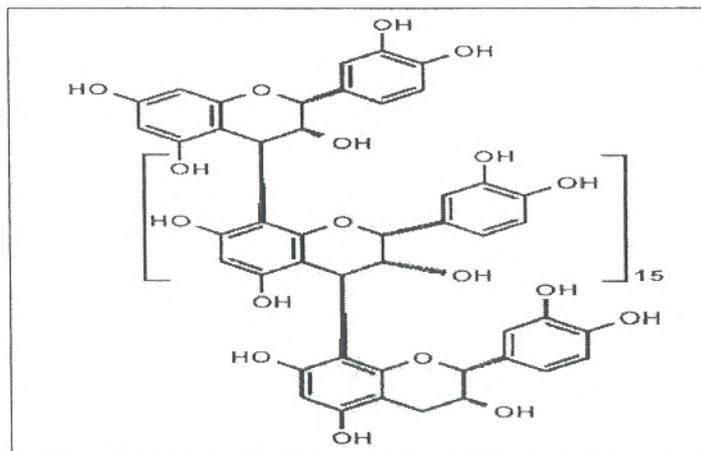


Figure 04 : Structure des tanins condensés (Kogel-Knabner., 2002).

d) **Flavonoïdes (C6-C3-C6)**: Le nom flavonoïde provient du mot Flavus qui signifie « jaune » (Malešev, Kuntić., 2007). Ils ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) (Figure 05) (Erdman et al., 2005). Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3- C6 (Emerenciano et al., 2007) en formant une structure de type diphenyle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule (Malešev, Kuntić., 2007). Les principales classes des flavonoïdes sont regroupées dans le Tableau 05.

Figure 05: Structure de base des flavonoïdes (Dacosta., 2003).

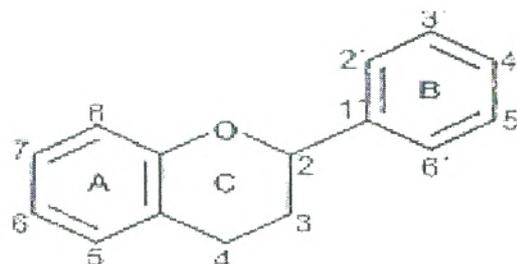


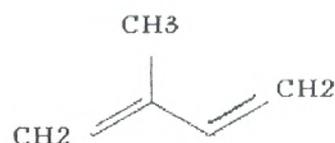
Tableau 05 : Principales classes des flavonoïdes (Erdman et al., 2005).

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

### 2-2-2 Les isoprénoïdes « Stéroïdes et terpénoïdes » (dérivées des lipides) :

Ils constituent le plus vaste ensemble connu des métabolites secondaires des végétaux, notamment au niveau des feuilles. Tous les terpènes et stéroïdes présentent une diversité chimique très importante, ils sont formés par l'assemblage d'un nombre entier d'unités pentacarbonés ramifiés du 2 méthylbuta-1,3-diène (Figure 06) (Bruneton., 1999).

Figure 06: La structure chimique d'une unité d'isoprène (Environnement Canada., 2009).



Les terpènes sont classés en fonction du nombre d'unités d'isoprènes dont ils sont issus (Tableau 06) (Harborne., 1998).

Tableau 06: Les différentes classes des terpénoïdes (Harborne., 1998; Bruneton., 1999).

N° d'unité	N° de carbone	Classes	Différents types	
2	C <sub>10</sub>	Monoterpénoïdes	Ils constituent la majeure partie des huiles essentielles	
3	C <sub>15</sub>	Sesquiterpénoïdes	Sesquiterpènes (constituants des huiles essentielles), Lactones sesquiterpéniques, Abscissines (acide abscissique)	
4	C <sub>20</sub>	Diterpénoïdes	Diterpènes résinoïdes, Diterpènes toxiques, Gibbérellines (acide gibbérellique)	
5	C <sub>25</sub>	Sesterpénoïdes		
6	C <sub>30</sub>	Triterpénoïdes	A l'état libre	Triterpènes Phytostérols
			Sous forme d'hétérosides	<b>Saponines:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ce sont des glycosides de triterpènes et stérols.</li> <li>• Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensioactives et moussantes.</li> <li>• Selon la nature de leurs génines, on distingue deux groupes de saponosides, stéroïdiques et triterpéniques.</li> </ul>
				Glycosides cardiaques
8	C <sub>40</sub>	Tétraterpénoïdes	Caroténoïdes	
n	C <sub>n</sub>	Polyterpénoïdes	Caoutchouc	

Les stéroïdes dérivent de triterpénoïdes, majoritairement le squalène (Gómez – Caravaca., 2006).

### 2-2-3 Les composés azotés « Alcaloïdes » (dérivées des acides aminés):

Les alcaloïdes sont des molécules d'origine naturelle. On les trouve principalement chez les végétaux, mais aussi chez les animaux et chez certains micro-organismes. Leur structure chimique de base est un hétérocycle azoté sauf pour quelques substances dans lesquelles l'azote est extra cyclique (Judd et al., 2002).

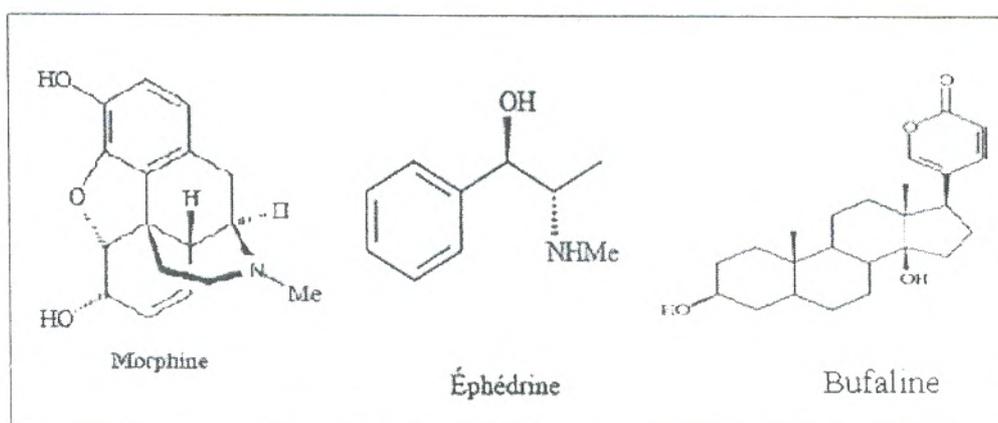
Ce sont des composés relativement stables qui sont stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques, la plupart du temps à partir des acides aminés. Quelques structures sont relativement simples, tandis que d'autres sont tout à fait complexes (Dewick., 2001; Bhat et al., 2005).

Il existe trois grandes classes selon qu'ils possèdent ou non un acide aminé comme précurseur direct, et qu'ils comportent ou non un atome d'azote dans un hétérocycle (**Figure 07**) (**Bruneton., 1999; Aniszewskim., 2007**) :

a) **Les alcaloïdes vrais** dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique. Ce sont des substances douées d'une grande activité biologique, même à faibles doses. Ils apparaissent dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme d'un sel (la morphine).

b) **Les proto-alcaloïdes** sont des amines simples, dont l'azote n'est pas inclus dans un hétérocycle. Ils dérivent aussi d'acides aminés (Ephédrine).

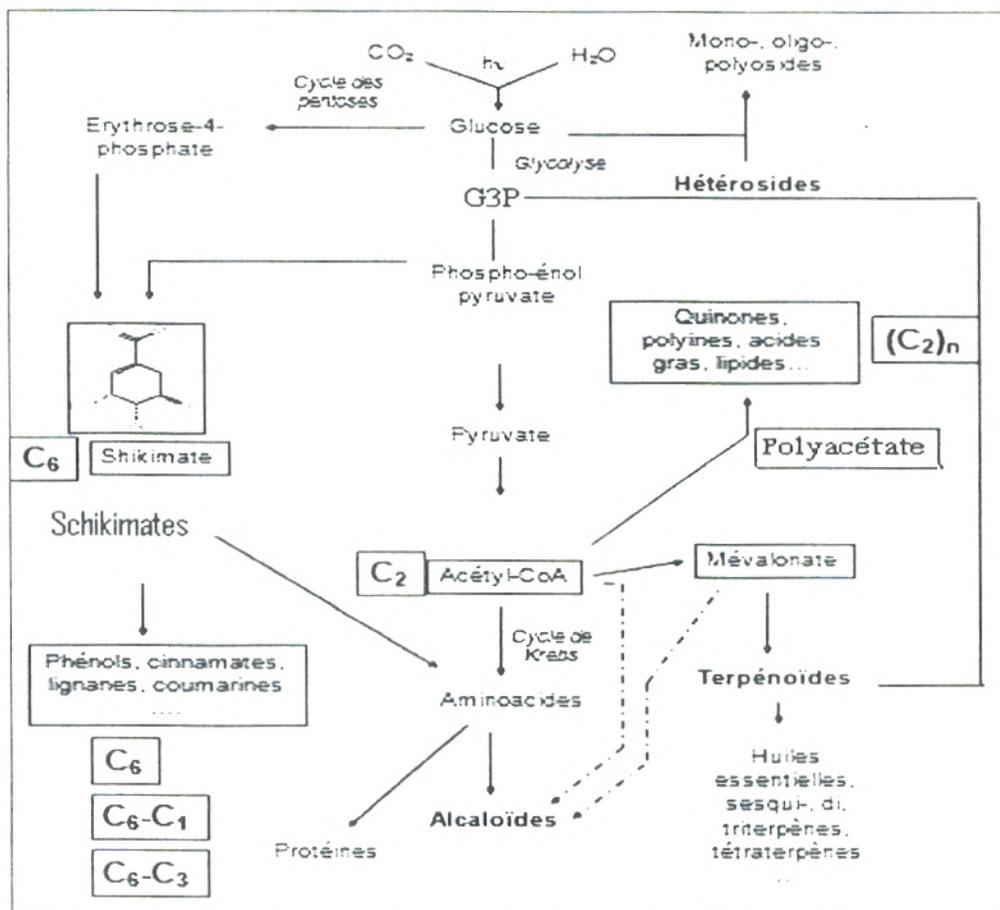
c) **Les pseudo-alcaloïdes** ne sont pas dérivés d'acides aminés. Ils peuvent cependant être indirectement liés à la voie des acides aminés par l'intermédiaire d'un de leurs précurseurs, ou d'un de leurs postcurseurs (dérivés). Ils peuvent aussi résulter d'amination, ou de réaction de transamination dans une voie connectée avec les précurseurs ou les postcurseurs d'acides aminés (Bufaline). Les structures de quelques alcaloïdes sont représentées dans la Figure suivante :



**Figure 07** : la structure de quelques alcaloïdes (**Bruneton., 1999**).

### 2-3 La biosynthèse des métabolites secondaires:

Le métabolisme secondaire des plantes est lié au métabolisme primaire par 5 voies métaboliques principales: la voie de l'acide shikimique, acide malonique, acide mévalonique, acides aminés et du glycéraldéhyde 3 phosphate (**Figure 08**). Les précurseurs principaux de la plupart des métabolites secondaires sont l'acétyl-coenzyme A, Erythrose-4-phosphate, Phosphoenolpyruvate, acides aminés, pyruvate et le 3 Phosphoglycérate (**Contin et al., 1998**).



**Figure 08:** Principales voies de biosynthèse des métabolites secondaire (Buchnan et al., 2000).

## 2-4 Isolation, caractérisation et évaluation des métabolites secondaires:

Une sélection de solvant est choisie et utilisée dans l'extraction des substances actives selon leurs affinités (Siingh., 2002) :

1. Eau et éther de pétrole: extraction des huiles fixes, des huiles essentielles et des stéroles.
2. Chloroforme et éther di-éthylique: extraction des alcaloïdes.
3. Eau et alcools: extraction des glycosides.
4. Alcools et acétate d'éthyle: extraction des composées phénoliques.

Le liquide obtenu est concentré par évaporation pour avoir un extrait liquide ou concentré par séchage pour avoir un extrait solide. La séparation se fait par des méthodes chromatographiques ou par l'électrophorèse, et l'identification se fait par Spectrométrie ultra-violet, infrarouge, spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire (Harborne., 1998).

## 2-5 Les propriétés thérapeutiques des composés du métabolite secondaire:

Les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques et ils possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques (**Tableau 07**) (**Bérubé-Gagnon., 2006**).

**Tableau 07:** Activités biologiques de quelques métabolites secondaires.

Métabolites secondaires	Activités
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes, Antifongiques, Antioxydantes ( <b>Bruneton., 1999 ; Hennebelle., 2006</b> ).
Coumarines	Anticoagulant, antioxydant, protectrice vasculaire et antioedémateuse ( <b>Bruneton., 1999; Hennebelle., 2006</b> ).
Flavonoïdes	Antitumorales, Anticarcinogènes, Anti-inflammatoires, Antioxydantes, Antibactériennes ( <b>Bruneton., 1999; Hennebelle., 2006</b> ).
Tannins galliques et catéchiques	précipiter les protéines (fongiques ou virales) et les métaux lourds, tonifient la peau dans le cas des rides ( <b>Kansole., 2009</b> ).
Alcaloïdes	Dépresseurs ou destimulant au niveau du système nerveux, anesthésique, antitumoraux, antipaludique ( <b>Kansole., 2009</b> ).
Huiles essentielles	Antifongiques, Antioxydante ( <b>Atik Bekkara et al., 2008</b> ), Insecticides ( <b>Nébié et al., 2004</b> ).

### 3- Les oxydants et les antioxydants:

L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies. Mais il peut être également une source d'agression pour ces organismes (**Ekoumou., 2003**), en entraînant un stress oxydant qui contribue aux processus de vieillissement cellulaire accéléré et au développement de pathologies humaines telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers, l'artériosclérose (**Joël et al., 2002**). Pour se protéger des effets toxiques de l'oxygène, l'organisme a développé des systèmes de défense antioxydants composés d'enzymes (la glutathion peroxydase), de vitamines (A, C, E), d'oligo-éléments (le sélénium), de protéines (la ferritine), qui ont la capacité de réguler parfaitement la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (**frédéric., 2004**).

#### 3-1 Les oxydants:

##### 3-1-1 Les radicaux libres:

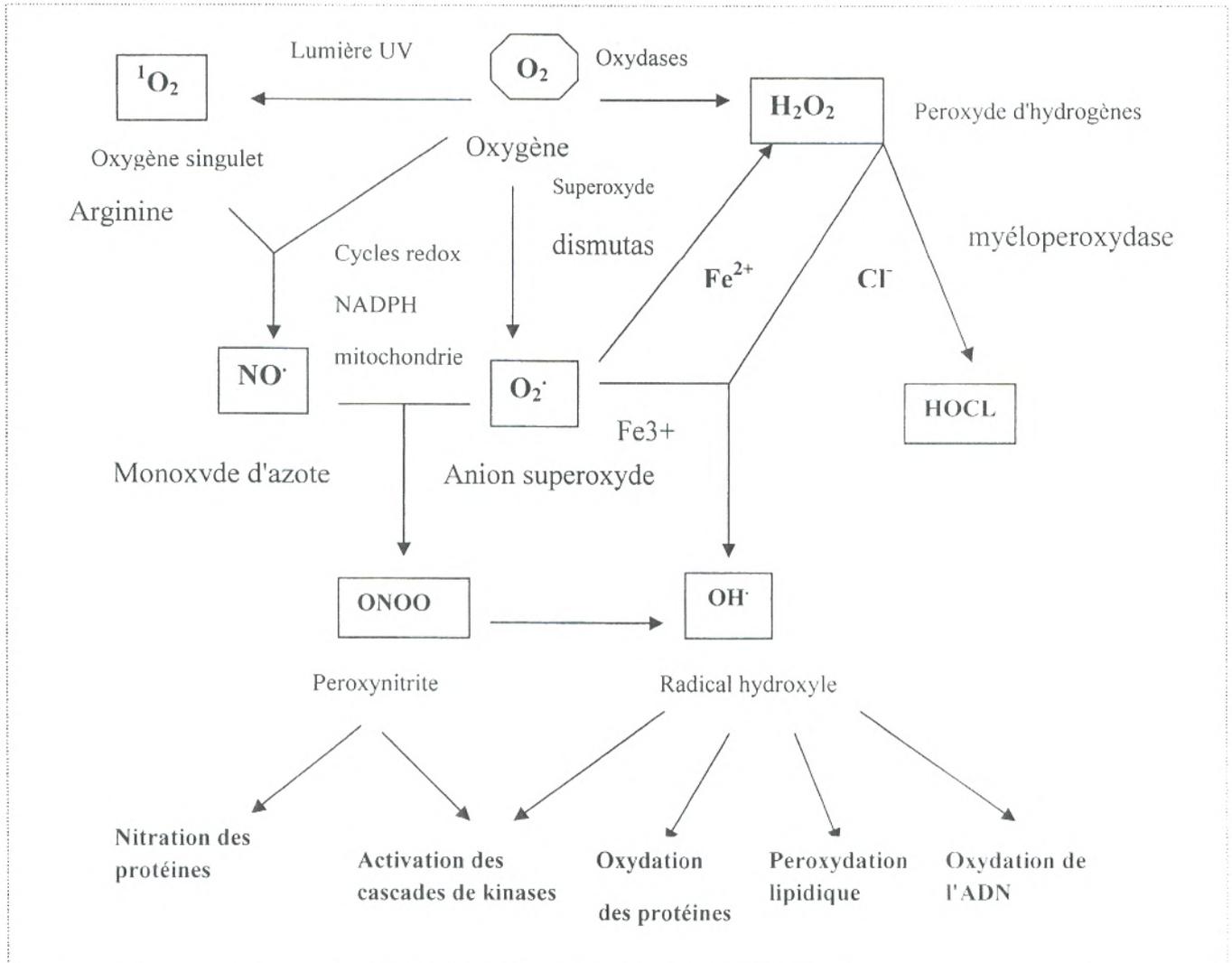
Un radical libre est une molécule possédant un électron célibataire sur l'orbital externe d'un ou de plusieurs de ses atomes (**Tableau 08**). Cette particularité leur confère une grande instabilité et une durée de vie très courte, de l'ordre de la microseconde, mais également une forte capacité à interagir et dégrader la plupart des molécules biologiques : lipides, protéines, acides nucléiques...; (**Pourrut., 2008**). Les radicaux libres sont également désignés sous le nom de FAOs (Formes Aggressives de l'Oxygène), car ils possèdent la plupart du temps un atome d'oxygène activé ( $\cdot\text{O}$ ), donc très réactif. Les radicaux libres non chargés sont moins réactifs et plus stables, mais ils peuvent migrer à travers les parois cellulaires à partir de l'endroit où ils sont formés, et induire la formation d'autres radicaux libres dans d'autres compartiments cellulaires (**Falkowski., 2006**).

**Tableau 08** : Liste des principaux radicaux libres (**Bartoz., 2003**).

Radical	Formule
Anion superoxyde	$\cdot\text{O}_2^-$
Peroxyde d'hydrogène	$\text{H}_2\text{O}_2$
Hydroxyle	$\cdot\text{OH}$
Peroxyle	$\text{ROO}\cdot$
Hydroperoxydes	$\text{ROOH}$
Alcoxyles	$\text{RO}\cdot$
Oxygène singulet	$^1\text{O}_2$
Oxyde nitrique	$\text{NO}\cdot$

### 3-1-2 Origines des radicaux:

Ils sont produits par divers mécanismes physiologiques (**Figure 09**) afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telles la mort cellulaire programmée ou apoptose (**favier., 2003**).



**Figure 09:** Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (**Favier., 2003**).

Au contact entre l'oxygène et certaines protéines du système de la respiratoire, une production d'anions superoxydes se produit lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées. Le monoxyde d'azote, est produit par les systèmes enzymatiques que sont les différentes NO Synthases, à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages (**favier., 2003; Falkowski., 2006**).

De sources importantes des radicaux libres sont les mécanismes de cycles redox que produit dans l'organisme. Les rayonnements sont capables de générer des radicaux libres et les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres (Favier., 2003; Falkowski., 2006; Afonso et al., 2007). L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes, également des antibiotiques, des anticancéreux (Hadi., 2004).

### 3-2 Les Antioxydants:

Un antioxydant est "toute substance qui, présente à faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat" (Laroche et al., 2003). Ce sont des composés très divers qui regroupent des protéines à activité enzymatique et non, enzymatiques et des petites molécules liposolubles ou hydrosolubles (Tableau 09) (Falkowski., 2006):

**Tableau 09 :** Principales substances antioxydantes (Cohen., 2002; Frédéric., 2004; Hadi., 2004; Just et al., 2005; Cabrera et al., 2006).

Antioxydants primaires	Antioxydants secondaires naturelles				Antioxydants de synthèse
	Vitamines	Minéraux	Acides Aminés et protéines	Phytochimiques	
- Glutathion peroxydase (GPX); - Glutathion réductase (GRD); - Glutathion transférase (GRT); - Super oxyde dismutase (SOD); - Catalase.	- Vitamines C; - Vitamines E (Tocophérols); - Vitamines Q (Ubiquinone); - Vitamines A (rétinol, caroténoïdes); - Vitamines B5 (acide pantothénique).	- Sélénium; - Zinc; - Manganèse - Cuivre; - Magnésium - Anhydride sulfureux (ou dioxyde de soufre SO <sub>2</sub> ).	- Cystéine; - Acide lipoïque; - Acide urique; - Bilirubine; - Pigment jaune de la bile); - Glutathion (GSH).	- Indoles; - Terpènes; - Polyphénols; - Colorants; - Conservateur: Acide benzoïque et dérivés (E210-E219).	- <b>BHT</b> (3,5ditertobutyl-4hydroxytoluène); - <b>BHA</b> (3-tertiobutyl-4hydroxyanisole); - <b>TBHQ</b> (tertiobutyl-hydroxyquinone); - PG (gallate de propyle); - le gallate de propyle (E310); - le gallate d'octyle (E311); - le gallate de dodécyle (E312).

### 3-2-1 Mécanisme d'action des antioxydants:

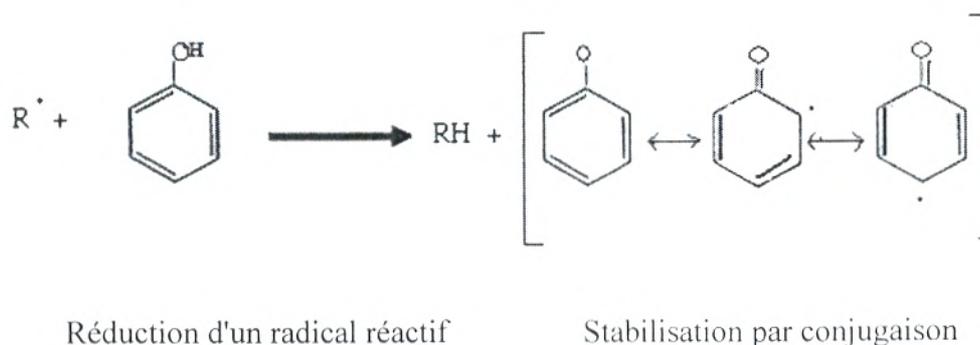
Ils peuvent agir en réduisant ou en dismutant des espèces réactives de l'oxygène, en les piégeant pour former un composé stable. Chaque molécule antioxydante ne peut réagir qu'avec des radicaux libres bien déterminés (**Van Antwerpen., 2006**).

Il existe deux catégories d'antioxydants (**Keita., 2002**) :

1. Certains précipitent un métal ou suppriment sa réactivité en occupant tous les sites de coordination par exemple: le sélénium qui neutralise les métaux toxiques (plomb, mercure) (**Ahamet., 2003**), et les flavonoïdes (**Van acker et al., 1998**).

2. Dans cette deuxième catégorie, ces antioxydants agissent en formant des produits finis non radicaux sous l'effet des enzymes (**Vansant., 2004**) telles que le superoxyde dismutase, la catalase, le glutathion peroxydase.

D'autre en interrompant la réaction en chaine de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras (**Vansan., 2004**), Ce sont principalement des composés phénoliques (tocophérols, tocotriénols, La vitamine C, BHT, BHA, flavonoïdes) (**cillard et al., 2006**). Les polyphénols cèdent formellement un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi par un transfert de proton, pour donner un intermédiaire radical stabilisé par ses structures mésomères conjuguées (**Figure 10**).



**Figure 10:** Propriétés réductrices des polyphénols (**Sherwin., 1976**).

Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur (**Vansan., 2004**), comme par exemple les caroténoïdes (**Buettner., 1999**).

### 3-2-2 Quelques méthodes d'évaluation des propriétés antioxydante in vitro:

La capacité antioxydante des produits naturels contenant des polyphénols constitue un sujet de recherche très étudié. L'intérêt pour les antioxydants naturels, qui a commencé depuis les années 1990, a stimulé le développement de méthodes efficaces et fiables afin de déterminer la capacité antioxydante de ces produits (Roginski, Lissi., 2005). Actuellement une grande diversité des méthodes analytiques pour la détermination de la capacité antioxydante est disponible. Ces techniques différentes entre eux en termes de mécanismes de réaction (Magalhaes et al., 2008). Elles sont classifiées en deux groupes: le premier est d'évaluer la peroxydation lipidique en mesurant le degré d'inhibition de l'oxydation, et le deuxième est mesuré les capacités à piéger un radical libre (Sanchez-Moreno., 2002). Parmi ces méthodes nous citons :

1. **Test de  $\beta$ -carotène :** Le  $\beta$ -carotène est un indicateur d'oxydation. C'est un antioxydant lipophile qui protège les acides gras de l'oxydation, c'est cette protection qui va être mesurée. L'absorbance du  $\beta$ -carotène est mesurée à 470 nm avec et sans antioxydant (Goupy et al., 2003).

2. **Test Rancimat:** Ce test consiste à mesurer la dégradation d'un corps gras face à une auto-oxydation accélérée, dans un appareil automatisé qui chauffe les solutions à 100 °C environ avec un apport d'air constant. Cet appareil détecte les composés volatils libérés qui indiquent indirectement le degré d'oxydation des huiles. (Mendez et al., 1996).

3. **Test FRAP (Ferric reducing ability power):** C'est une réaction chimique de réduction du fer (III) présent dans le complexe K<sub>3</sub>Fe en Fe (II). L'absorbance est déterminé à 700nm (Benwie, Strain., 1996).

4. **Test de réduction du radical stable, le DPPH° :** Le corps à doser est ajouté à une solution de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH°) qui est un radical stable et coloré. Le maximum de son absorption dans le visible se situe vers 515-517 nm dans le méthanol et l'éthanol. La réduction du radical par un donneur d'atome H (AH) conduit à la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine (DPPH-H) et au radical (A°) (Brand-Williams et al., 1995) :  $DPPH^{\circ} + AH \rightarrow DPPH-H + A^{\circ}$

5. **Dosage des TBARS:** Ce test dose les TBARS, "thiobarbituric acid reactive substances". Il permet de quantifier la peroxydation lipidique, dans le plasma, dans les aliments, en mesurant la libération du malondialdéhyde (MDA), un des produits majeurs de dégradation des lipides (Botsoglou et al., 1994).

# **Le deuxième Chapitre: Matériel et méthodes**

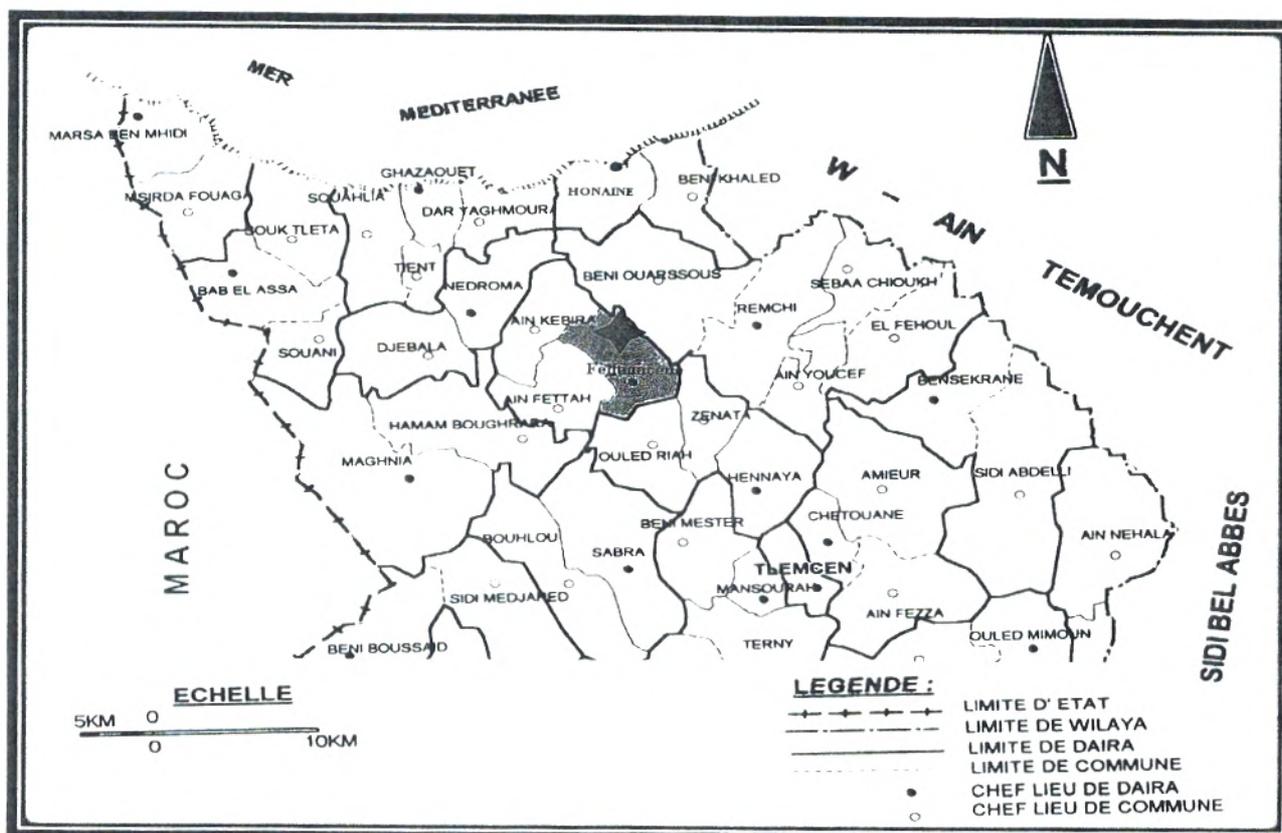
## 1- Provenance de la plante étudiée :

La plante a été récoltée dans son habitat naturel dans la région de Fellaoucène environ 31 km au nord-ouest de Tlemcen (**figure 11**), et ce pendant le mois de Mars 2012. Les paramètres géographiques de cette région sont représentés dans le **tableau 10**.

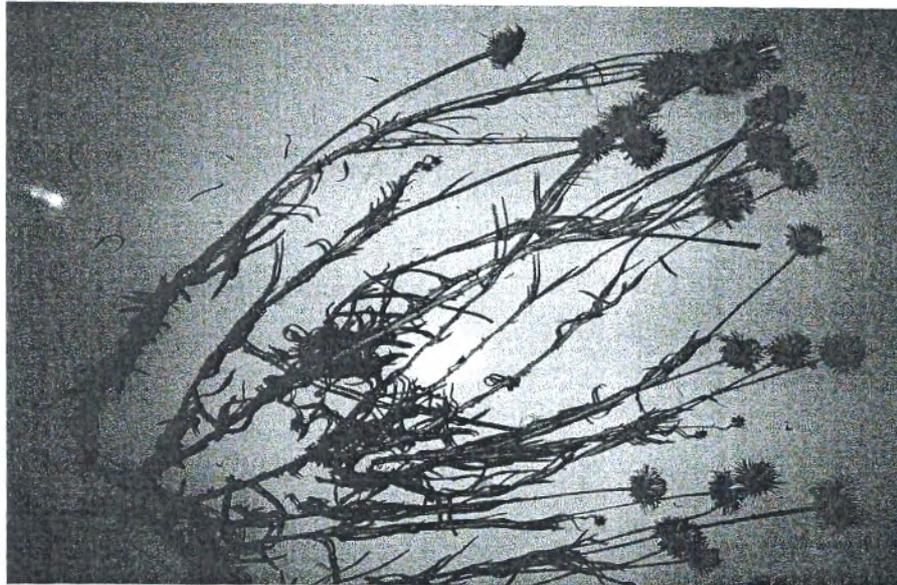
**Tableau 10:** Situation géographique de la station d'étude.

Station	Longitudes Ouest	Latitudes Nord	Altitudes (mètres)
Fellaoucène	1° 42'	35° 58'	1113m

Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, les fleurs et les tiges feuillées de l'espèce étudiée ont été séparés et broyés dans un moulin électrique.



**Figure 11 :** Carte de localisation de la station de récolte.



**Photo1:** *Pagnalon saxatile subsp eu-saxatile.*

## 2- Préparation des extraits bruts :

Les extraits bruts ont été préparés à partir des fleurs et des tiges feuillées des deux plantes étudiées.

Les extraits des fleurs sont obtenus par une macération de 18h, de cinq grammes (5g) à température ambiante, dans 100 ml du méthanol à 80%. Cette macération a été précédée par des vibrations en Ultrasonic pendant 20 min.

Les tiges feuillées (5g) subissent d'abord un dégraissage par 100 ml de l'hexane pour éliminer le maximum de composés apolaires (matière grasse, cires, chlorophylle, caroténoïdes.....) (**Bonnaillie et al., 2012**). Après filtration, le marc est ensuite soumis à une macération dans les mêmes conditions citées dans la préparation des extraits des fleurs. Les filtrats ont été évaporés à sec et à une température de 60°C, à l'aide d'un rotavapor type HAHNVAPOR.

Pour les tests phytochimique, les dosages, la CCM et l'évaluation de l'activité antioxydante les extraits secs ont été repris dans quelques millilitres de méthanol. Les extraits ont été conservés à 4°C.

### ❖ Calcul des rendements en extraits secs :

Les rendements en extrait sec ont été déterminés par la formule suivant :

$$Rdt (\%) = \frac{m}{M} \times 100$$

**m** : poids de l'extrait après évaporation ;

**M** : Poids de la matière végétale de départ.

### 3- Tests phytochimiques :

L'examen phytochimique permet de détecter la présence ou l'absence de quelques familles des composés co- existantes. Ils consistent en une réaction de précipitation de turbidité ou une coloration par des réactifs spécifiques (Dohou et al., 2003 ; Karumi et al., 2004 ; Edeoga et al., 2005).

#### 3.1 Flavonoïdes :

Traiter 2 ml de l'extrait alcoolique avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré et quelques mg de tournures de magnésium. Une coloration rose ou rouge apparaît en présence des flavonoïdes après trois minutes.

#### 3.2 Tanins :

A 1 ml de la solution alcoolique, ajouter 2 ml d'eau distillée et 2 à 3 gouttes de  $FeCl_3$ . Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu- noire ou verte et un précipité, qui confirme la présence des tanins galliques ou catéchiqes.

#### 3.3 Alcaloïdes :

Traiter 2 ml de l'extrait méthanolique par 0,5 ml de <sup>Hcl</sup>~~HCl~~ à 2%. La solution est divisée en trois parties égales. Tester les échantillons avec les réactifs de **Mayer** et de **Wagner**. Le troisième tube est considéré comme témoin. La présence d'une turbidité ou d'un précipité, après 15 minutes indique la présence d'alcaloïdes.

#### ♦ Réactif de Mayer:

Dissoudre 1,358 g de  $HgCl_2$  dans 60 ml d'eau distillée. Dissoudre 5 g de KI dans 10 ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 ml d'eau distillée. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un trouble plus un précipité blanc.

♦ **Réactif de Wagner:**

Dissoudre 2 g de KI et 1,27 g d'I<sub>2</sub> dans 75 ml d'eau distillée. Ajuster le volume total à 100 ml d'eau distillée. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité brun.

### 3.4 Saponosides :

Ajouter à 2 ml de la solution aqueuse ou alcoolique un peu d'eau et ensuite agiter d'une manière forte. Une écume persistante confirme la présence des saponosides. Abandonner le mélange pendant 20 min et classer la teneur en saponosides :

- Pas de mousse = Test négatif (-);
- Mousse moins de 1 cm = Test faiblement positif (+) ;
- Mousse de 1- 2 cm = Test positif (++);
- Mousse plus de 2cm = test très positif (+++).

### 3.5 Stéroles et triterpènes « réaction de Liebermann burchard » :

Mélanger 2 ml de solution à tester avec 0,5 ml d'anhydride acétique, 0,5 ml de chloroforme et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter et laisser la solution reposée 30 min à 21 °C. Cette réaction donne avec les hétérosides stéroïdiques et triterpéniques respectivement des colorations verte- bleu et verte- violette.

## 4- Dosage des polyphénols totaux:

Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par **Vermerris et al., 2006** en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>). 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 entre 725 et 750 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits végétaux (**Boizot et al., 2006**).

Un volume de 0,1 ml de l'extrait brut méthanolique est mélangé avec 2 ml d'une solution de carbonate de sodium à 2% fraîchement préparée, le tout est agité par un vortex. Après 5 min, 100 µl du réactif de Folin-Ciocalteu (1N) sont ajoutés au mélange, le tout est laissé pendant 30 min à la température ambiante et l'obscurité. La lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 750 nm.

Une courbe d'étalonnage ( $y = ax+b$ ) a été réalisée en parallèle par l'acide gallique à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons.

Les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme du poids sec de la plante en poudre en appliquant la formule suivante :

$$C (\text{polyphénols}) = [c (\text{A.gallique}) / c (\text{initiale})] \times \text{Rdt}$$

**C (polyphénols)** : La teneur en polyphénols totaux

**c (A.gallique)** : La concentration de l'acide gallique établie à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

**c (initiale)** : la concentration initiale de l'extrait méthanolique.

**Rdt** : le rendement de la plante en extrait sec (%).

## 5- Dosage des flavonoïdes:

La quantification des flavonoïdes de nos extraits est réalisée par la méthode colorimétrique décrite par **Ardestani et Yazdanparast., 2007**.

Un volume de 500µl de l'extrait brut est mélangé avec 2 ml d'eau distillée suivi de 150µl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) à 15%. Après 6 minutes, 150µl de chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>. 6H<sub>2</sub>O) à 10% sont ajoutés au mélange, le tout est laissé pendant 6 minutes, ensuite, 2ml d'hydroxyde de sodium à 4% sont ajoutés aux tubes et le volume final est complété immédiatement à 5ml par de l'eau distillée.

Après 15 minutes, la lecture est faite à 510 nm contre un blanc au spectrophotomètre. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif et à différentes concentrations.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de matière végétale sèche, en appliquant la même formule cité dans le dosage des polyphénols:

$$C (\text{flavonoïdes}) = [c (\text{catéchine}) / c (\text{initiale})] \times \text{Rdt}$$

**C (flavonoïdes)** : La teneur en flavonoïdes

**c (catéchine)** : La concentration de la catéchine établie à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

**c (initiale)** : la concentration initiale de l'extrait méthanolique.

**Rdt** : le rendement de la plante en extrait sec (%).

## 6- Étude de l'activité antioxydante:

### 6-1 Piégeage du radical libre DPPH:

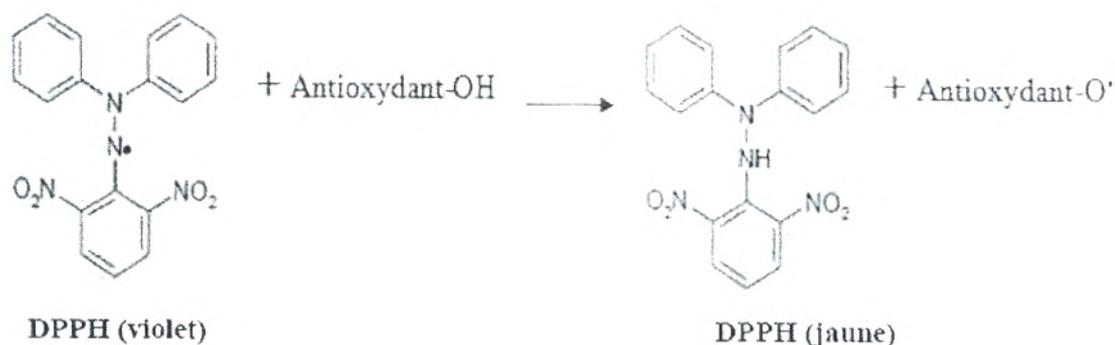
Le DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse. Il absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm (Bozin et al., 2008).

La méthode de DPPH présente plusieurs avantages du fait qu'elle soit indépendante, simple et rapide. Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette), en présence des molécules dites « antioxydantes » afin de mesurer leur capacité à réduire le radical DPPH.

La forme réduite (de couleur jaune) n'absorbe plus, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde. Le protocole expérimental suivi pour étudier l'activité du piégeage du radical libre DPPH, est celui de Le protocole expérimental suivi pour étudier l'activité du piégeage du radical libre DPPH, est celui de **Atoui et al., 2005; Benhammou et al., 2007** :

À différentes concentrations, 50 µl de chaque extrait méthanolique, sont ajoutés à 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH à  $6,34 \cdot 10^{-5}$  M (0.0025g dans 100ml méthanol). Pour chaque concentration un blanc est préparé. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé, en parallèle, en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée.

Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante. La réduction du DPPH s'accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune de la solution (**figure 12**). La lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.



**Figure 12 :** Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Parejo et al., 2002).

☐ **Calcul des pourcentages d'inhibition:**

Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante:

$$I\% = [(AC - AT) / AC] * 100$$

*AC* : Absorbance du contrôle ;

*AT* : Absorbance du test effectué.

☐ **Calcul des IC50:**

IC50 (concentration inhibitrice de 50 %), aussi appelée EC50 (*Efficient concentration 50*), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH. Les IC50 sont calculées graphiquement par la formule de la régression des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testées.

**6-2 Réduction du Fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*) :**

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par **Pan et al., 2008**, basée sur la réaction chimique de réduction du Fe<sup>3+</sup> présent dans le complexe K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> en Fe<sup>2+</sup>. Cette capacité réductrice peut servir comme un indicateur significatif de l'activité antioxydante potentielle d'un composé. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm.

Un volume de 1 ml de l'échantillon à différentes concentrations, est mélangé avec 2.5 ml d'une solution tampon phosphate 0.2 M (pH 6.6) et 2.5 ml d'une solution de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> à 1%.

Le tout est incubé à 50°C pendant 20 min, puis refroidis à la température ambiante. 2.5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. 2.5 ml du surnageant sont ajoutés à 2.5 ml d'eau distillée et 500 µl d'une solution de (FeCl<sub>3</sub>, 6H<sub>2</sub>O) à 0.1% sont ajoutés au mélange.

La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'acide ascorbique, le Butylhydroxytoluène (BHT) et le butylhydroxyanisole (BHA) sont utilisés comme contrôles positifs dans cette expérience, aux mêmes concentrations choisies et dans les mêmes conditions expérimentales.

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 fonction des différentes concentrations utilisées. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées.

#### 6-2-1 Calcul d'IC50:

L'IC50 est la concentration de l'extrait à laquelle la densité optique est égale à 0.5 de fer réduit est calculée à partir du graphe: Absorbances à 700 nm en fonction des concentrations (Trabelsi et al., 2010).

### 7- Chromatographie sur couche mince (CCM) :

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant en entraînant les composants de l'échantillon (Antonot et Marchal., 1998).

Dans notre travail, nous avons utilisé Une plaque CCM en gel de silice (20×20 cm) a été utilisée dans deux systèmes de migration :

- **Système 1** : Butanol/ Acide acétique (4:1) (Onyilagha et al., 2003).
- **Système 2** : Acétate d'éthyle/ Acide formique/ Eau distillée (65:15:20) (Males et Medic-Saric., 2001).

5 µl de chaque extrait et témoin ont été déposés, le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Les substances migreront à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

Après développement, les plaques ont été séchées, puis visualisées séparément par une lampe UV à 366 nm.

Les rapports frontaux des spots issus de la séparation ont été calculés et comparés à ceux des témoins permettant ainsi l'identification des constituants de différents extraits.

**d** : Distance parcourue par le constituant :

**D** : Distance parcourue par le front de l'éluant.

$$R_f = \frac{d}{D}$$

# **Le troisième Chapitre: Résultats et discussion**

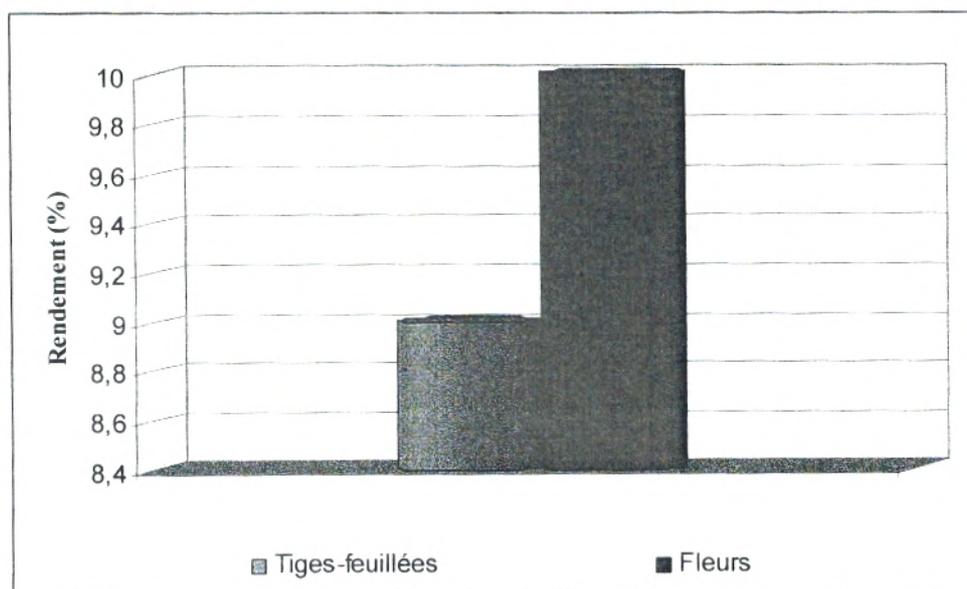


### 1- Rendements en extrait sec:

Les extraits bruts méthanoliques sont préparés à partir des deux parties de la plante selon la méthode décrite dans la partie expérimentale pour la réalisation des testes phytochimiques, les dosages des polyphénols et les flavonoïdes et enfin l'évaluation de l'activité antioxydante. Les différents rendements obtenus, sont représentés dans le **tableau 11** et la **figure 13**

**Tableau 11** : Les rendements obtenus à partir des deux parties de la plante.

Extrait brut	Solvants	Rendement %	Références
Tiges- feuillées	Méthanol/Eau (80/20, v/v)	9	Nous mêmes
Fleurs		10	
<i>Phagnalon saxatile (L)</i> <i>Cass</i> (Partie aérienne)	Méthanol précédé par plusieurs solvants de polarité différente	3.5	(Conforti et al; 2010)
<i>Phagnalon graecum</i> <i>Boiss</i> (Partie aérienne).	Méthanol	8.37	(Erdogan Orhan et al; 2012)



**Figure 13** : Les rendements en extraits sec obtenus à partir des deux parties de la plante.



Les résultats obtenus montrent que le rendement en extrait méthanolique est légèrement supérieur dans les fleurs (10 %) par rapport à celui des tiges-feuillées (9%). Cela est probablement dû au fait que nous avons soumis les tiges feuillées dans l'hexane pour éliminer les composés apolaires (cires, huiles, stérols, chlorophylle...) avant de passer à l'extraction par le méthanol/ eau.

D'autre part, le rendement en extrait brut méthanolique de la partie aérienne de *Phagnalon saxatile* (L) Cass d'Italie étudiée par Conforti et al., en 2010 est faible (3,5%) par rapport à nos rendements. Cette différence peut être due au fait que cette plante a subi plusieurs extractions successives par d'autres solvants moins polaire que le méthanol.

L'extrait brut de la partie aérienne de *Phagnalon graecum* Boiss de Turquie a un rendement (Erdogan Orhan I. et al., 2012) de 8,37%. Ce rendement est proche de ceux des deux parties de notre plante extraites séparément.

## 2- Tests phytochimiques:

Pour les plantes dont la composition chimique n'est pas connue, et pour avoir une idée sur leurs activités, nous devons rechercher certains principes actifs.

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur l'extrait méthanolique préparés à partir des fleurs, et des tiges- feuillées de *Phagnalon saxatiles subsp eu-saxatile* séchés et broyés, en utilisant des réactifs spécifiques de révélation.

Les résultats expérimentaux mentionnés dans le **tableau 12**, nous a permis de mettre en évidence la présence ou l'absence de quelques métabolites secondaires dans notre plante. Ils montrent la présence des flavonoïdes et des tanins dans les tiges- feuillées et les fleurs avec des intensités variables.

Les tanins sont présents avec une intensité importante dans les tiges-feuillées par rapport aux fleurs. Sa présence est confirmée par une réaction positive avec la solution de chlorure ferrique en donnant une coloration bleue foncée, il s'agit donc des tanins galliques dans les tiges-feuillées. Alors que les tanins de l'extrait des fleurs donnent une coloration verte foncée, il s'agit donc des tanins catéchiques.

Nous avons pu détecter la présence des flavonoïdes à une très faible intensité dans les fleurs et à une forte intensité dans les tiges-feuillées.

Enfin, nous remarquons la présence des hétérosides stéroïdiques seulement dans les tiges-feuillées, et l'absence totale des alcaloïdes et des saponosides dans les deux parties de la plante.

**Tableau 12** : Tests phytochimiques réalisés sur l'extraits méthanolique préparés à partir des fleurs et des tiges-feuillées de *phagnalon saxatile subsp eu-saxatile*.

Recherche de		Réactifs et résultats positifs	Résultats	
			Fleurs	Tiges-feuillées
Composés phénoliques	Flavonoïdes	- <b>Magnésium</b> : coloration orange à rouge	± traces	+++
	Tanins	<b>FeCl3</b> : couleur bleue foncée (tanins galliques), verte (catéchiques) ou noir (ellagiques)	++ Tanins cathéchiques	+++ Tanins galliques
Composés azotés	Alcaloïdes	<b>Mayer et Wagner</b> : précipité ou turbidité.	-	-
Stéroïdes et terpénoïdes	Saponosides	<b>Eau distillée</b> : Une écume persistante.	-	-
	Stéroïls et triterpènes	<b>Liebermann burchardt</b> (anhydride acétique- <b>H2SO4</b> ): coloration violette ou rouge brun	-	+++ Hétérosides stéroïdique

Des études phytochimiques récentes sur la partie aérienne de cette espèce montre que l'extrait méthanolique contient des composées phénoliques (**chiang et al, 2004**) et des flavonoïdes (**Bae et al, 2007**). Ces données sont en accord avec nos résultats.

D'autres travaux consacrées à l'étude de *P. rupestre* signalent la présence des terpénoïdes (**Bicchi et al; 1979**), des flavonoïdes (**Dolci, Tira., 1982**), des hydroquinones glycosidiques et des dérivés caféylquinique (**Gngora et al; 2001**).

### 3- Dosage des polyphénols totaux:

La teneur en polyphénols a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols des plantes médicinales et de la nourriture (Abdel-Hameed, 2009). Ces teneurs obtenues sont exprimées en mg équivalent acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg GAE/g MS), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage (figure 14).

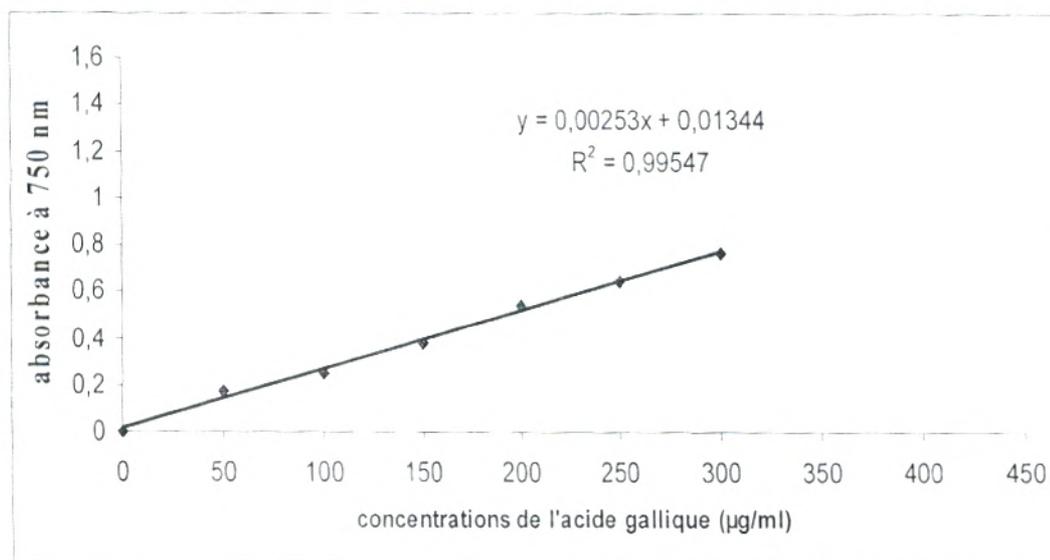


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 16. Nous avons pu constater que la teneur en polyphénols totaux dans les tiges-feuillées est la plus élevée avec une concentration de 18,82 mg GAE/g MS (209,13 mg GAE/g d'extrait). Pour les fleurs, elle est de 4,8 mg GAE/g MS (48 mg GAE/g d'extrait).

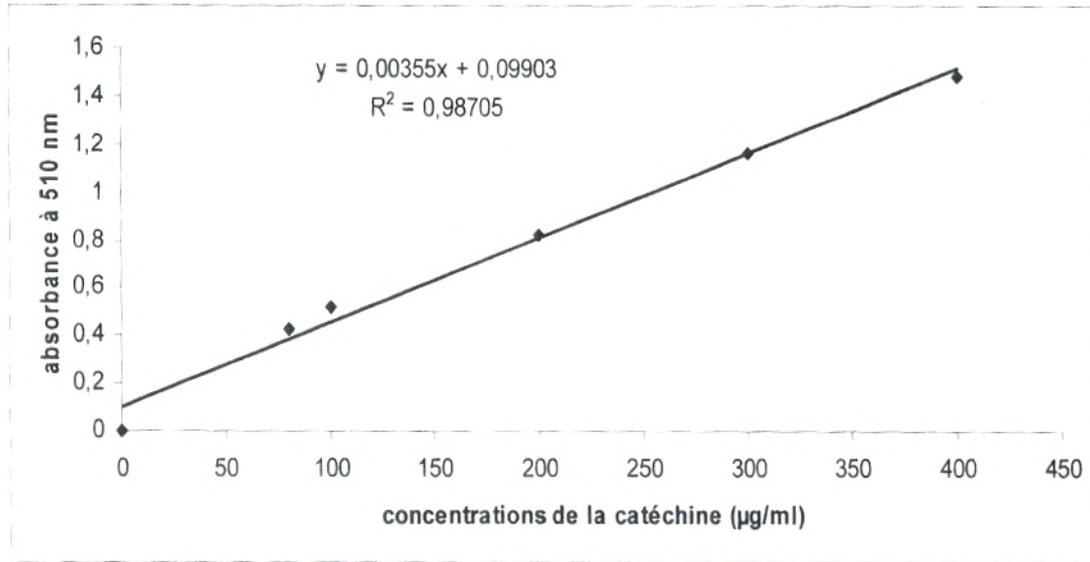
Ces résultats sont comparés avec ceux d'une étude faite par Erdogan Orhan et al en 2012, qui montre que *Phagnalon graecum Boiss* présente une teneur en polyphénols totaux de  $150.74 \pm 4.95$  mg GAE/g d'extrait. Cette teneur est inférieure à celle de l'extrait des tiges feuillées.

### 4- Dosage des flavonoïdes:

La raison principale pour la quelle nous avons choisi cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (Gomez-Caravaca et al., 2006).

Des dosages spectrophotométriques ont été effectués à partir des extraits bruts méthanoliques des deux parties de la plante afin de déterminer la teneur totale des flavonoïdes.

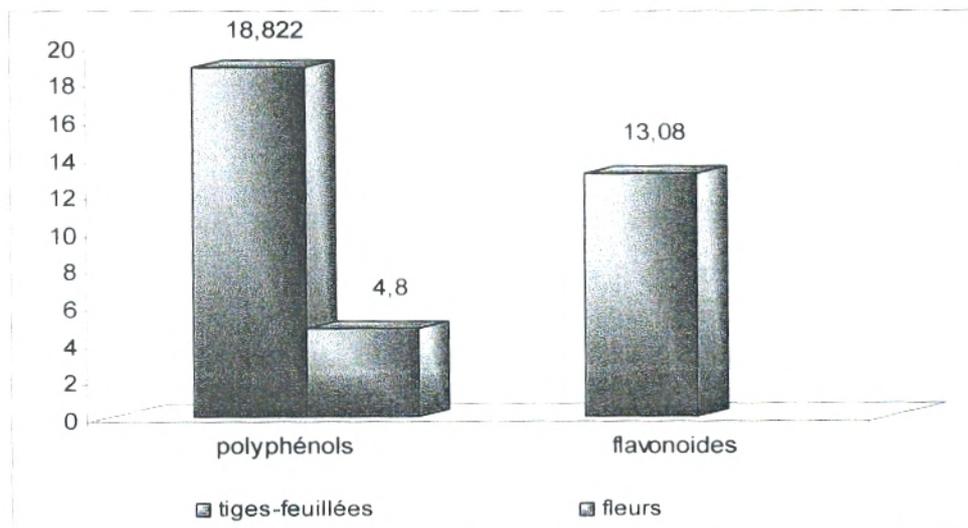
Une courbe d'étalonnage (**figure 15**) a été réalisée à partir d'un extrait de la catéchine. Les teneurs obtenues en flavonoïdes sont exprimées en mg équivalent de la catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg CE/g MS).



**Figure 15 :** Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

D'après l'équation de la régression linéaire (**figure 15**), nous avons déduit que la teneur en flavonoïdes dans les tiges-feuillées est de **13,08 mg CE/g MS** (48 mg CE/g d'extrait), et elle est nulle dans les fleurs.

Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes sont regroupées dans l'histogramme suivant:



**Figure 16 :** Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des deux parties de la plante.



## 5- Etude de l'activité antioxydante :

### 5-1 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl):

Dans notre travail, nous avons opté pour tester les extraits bruts des deux parties de la plante étudiée afin de localiser la partie la plus active

Par des dilutions en cascade, nous obtenons une gamme de concentrations allant de 3 à 0.015 mg/ml. Cette gamme est appliquée pour les extraits et les contrôles positifs (l'acide ascorbique, le BHA et le BHT). Pour chaque concentration, nous mesurons les densités optiques à 517nm.

Les valeurs obtenues ont permis de déterminer les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations et de tracer des courbes ont une allure linéaire ou logarithmique en cas ou la réduction du DPPH en sa forme non radicalaire est presque totale (phase stationnaire).

Des courbes sont tracées à partir des substances de références (A ascorbique, BHA, BHT) afin de comparer l'activité antioxydante de nos extraits.

#### 5-1-1 Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH pour les substances de référence:

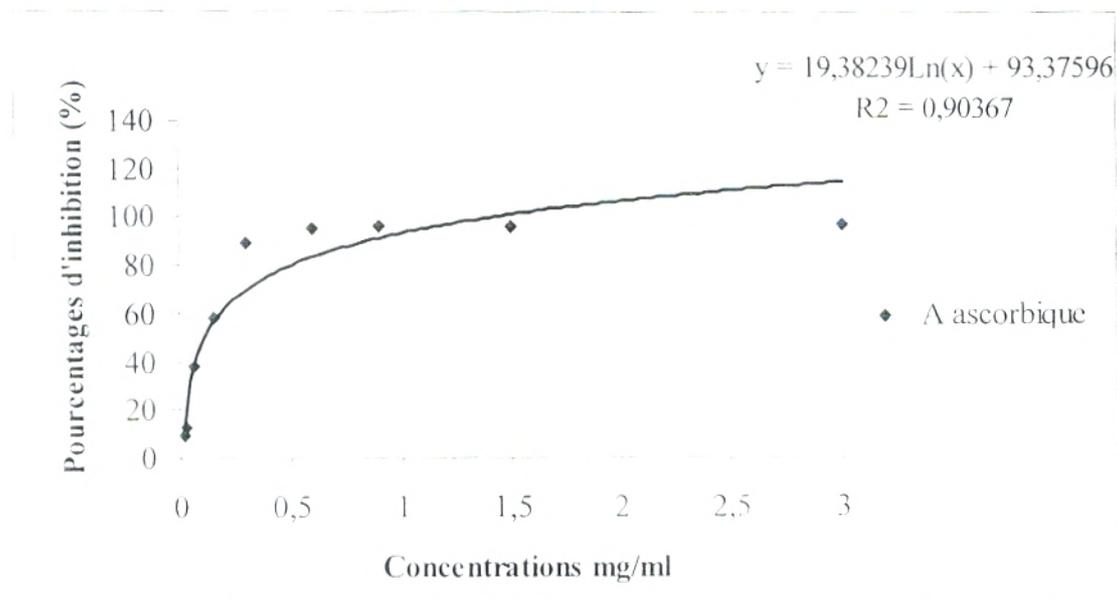
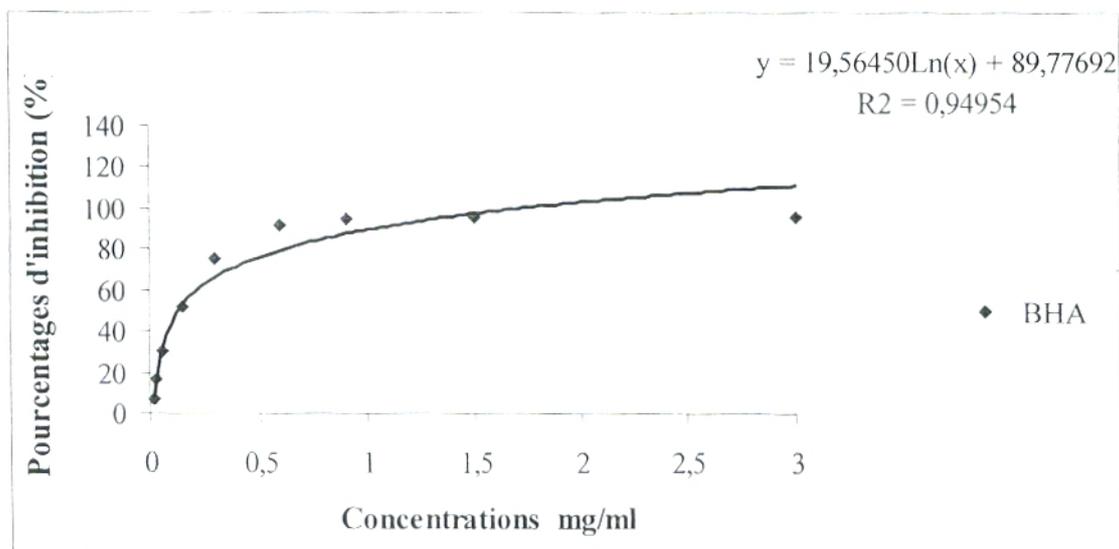
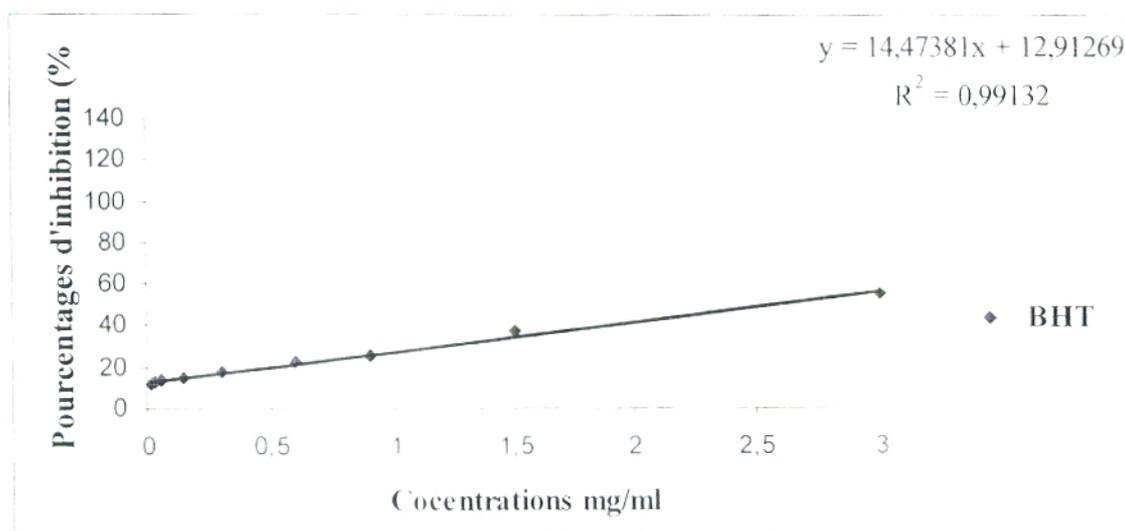


Figure 17: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique.

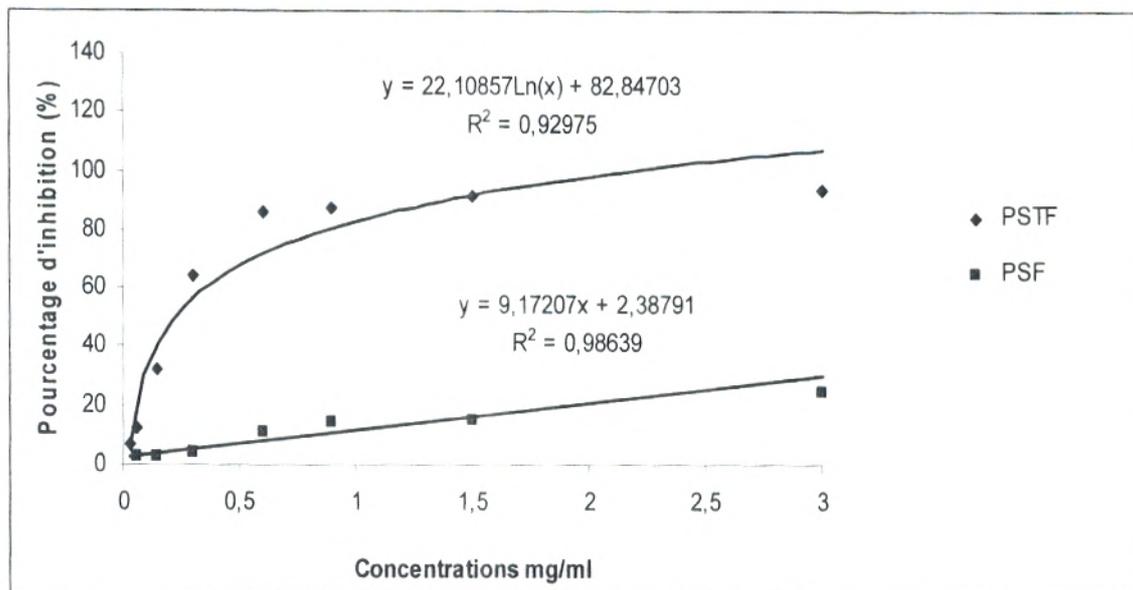


**Figure 18 :** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour le BHA.



**Figure 19:** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour le BHT.

5-1-2 Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH pour les extraits testés:



**Figure 20 :** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits bruts de deux parties de la plante étudiées de *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile*.

Les pourcentages d'inhibition sont proportionnels à la concentration de l'extrait. L'extrait brut des fleurs a montré un pouvoir de piégeage du DPPH plus faible par rapport à celui de l'extrait brut des tiges-feuillées. Ce dernier présente un pouvoir de piégeage du DPPH important même à des concentrations inférieures à 3 mg/ml. A cette concentration, le pourcentage d'inhibition pour l'extrait brut des tiges-feuillées est de l'ordre de 93,31 % dont la réduction du DPPH est presque totale (la phase stationnaire). Il est de 24,5 % pour les fleurs à la même concentration (**Tableau 13**).

**Tableau 13:** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations en extraits bruts de *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile*.

Concentrations (mg/ml)	Pourcentages d'inhibition (%)					
	0,15	0,3	0,6	0,9	1,5	3
PSTF	32.27	63.95	86.21	87.45	91.28	93.31
PSF	2.92	4	11.17	14.26	15.34	24.5



**Tableau 14:** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations en extraits bruts de *Phagnalon graecum* Boiss. (Erdogan Orhan et al; 2012),

Concentrations (mg/ml)	Pourcentages d'inhibition (%)				
	0.125	0.250	0.5	1	2
<i>Phagnalon graecum</i> (partie aérienne)	22.07	33.94	55.20	80.91	83.81

Les résultats obtenus par Erdogan Orhan et al en 2012 (Tableau 14) révèlent un pouvoir de piégeage du DPPH important. La réduction du DPPH est presque totale à partir de 2 mg/ml avec un pourcentage d'inhibition de **83,81%**.

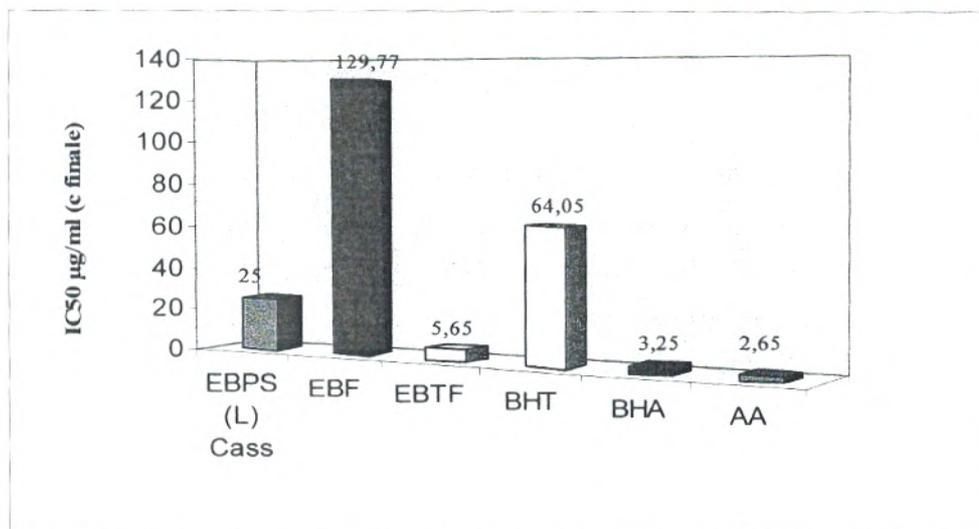
### 5-1-3 Calcul des IC50 :

La capacité anti-oxydante de nos différents extraits a été déterminée à partir des IC50. C'est la concentration en produit nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. Plus la valeur de l'IC50 est petite, plus l'activité antioxydante de l'extrait testé est grande (Pokorny et al., 2001).

Pour chaque extrait, y compris les références, l'IC50 peut être calculée en faisant une projection directe sur les courbes. L'utilisation de l'équation logarithmique ou linéaire donne des valeurs plus précises. Les valeurs des IC50, trouvées pour tous les extraits et les contrôles positifs, sont représentées dans le **tableau 15** et dans la **figure 21**, dont les valeurs sont exprimées en concentrations finales en µg/ml.

**Tableau 15 :** Valeurs des IC50 trouvées pour les extraits bruts des deux parties de la plante étudiée.

	Les contrôles			<i>Pagnalon saxatile</i> <i>subsp eu-saxatile</i>		<i>Phagnalon saxatile</i> (L)Cass (Confortil F. et al. 2010)	<i>Phagnalon graecum</i> Boiss (Erdogan Orhan I. et al; 2012).
	A ascorbique	BHA	BHT	Tiges-feuillées	Fleurs	EB (partie aérienne).	EB (partie aérienne).
IC50 µg/ml [Ci] (C initiale)	106	130	2562	226	5190	-	405
IC50 µg/ml [Cf] (C finales)	2.65	3.25	64.05	5.65	129.77	25	-



EBTF : extrait brut des tiges feuillées  
 EBF : extrait brut des fleurs  
 EBPS (L) Cass: extrait brut de phagnalon saxatile (L) Cass  
 AA : acide ascorbique  
 BHT: Butylhydroxytoluène  
 BHA: Butylhydroxyanisole

**Figure 21** : Histogramme des valeurs des concentrations finales inhibitrices 50 des extraits et des références en µg/ml.

D'après cet histogramme (**figure 21**), nous pouvons classer les extraits par ordre de réactivité décroissante :

**Acide ascorbique > BHA > Extrait brut des tiges-feuillées > BHT > Extrait brut des fleurs.**

Nous remarquons que l'acide ascorbique et le BHA ont un pouvoir antioxydant plus élevé avec des valeurs d'IC50 de **2,65 µg/ml** et **3,25 µg/ml** en concentration finale respectivement.

L'extrait méthanolique des tiges-feuillées (**5,65µg/ml**) a une activité plus importante à celle du BHT (**64,05µg/ml**). Il a une valeur d'IC50 inférieur à celles de l'extrait brut de *Phagnalon saxatile (L) Cass* (**Confortil F. et al. 2010**) et a celle de *phagnalon graecum Boiss* (**Erdogan Orhan et al; 2012**). Il a donc une activité antiradicalaire modérément importante.

L'extrait méthanolique des fleurs à un pouvoir antioxydant faible par rapport aux contrôles, à l'extrait des tiges-feuillées avec IC50 de **129,77µg/ml** et aux extraits bruts de *phagnalon saxatile (L) Cass* et de *Phagnalon graecum Boiss* (**Tableau 15**).

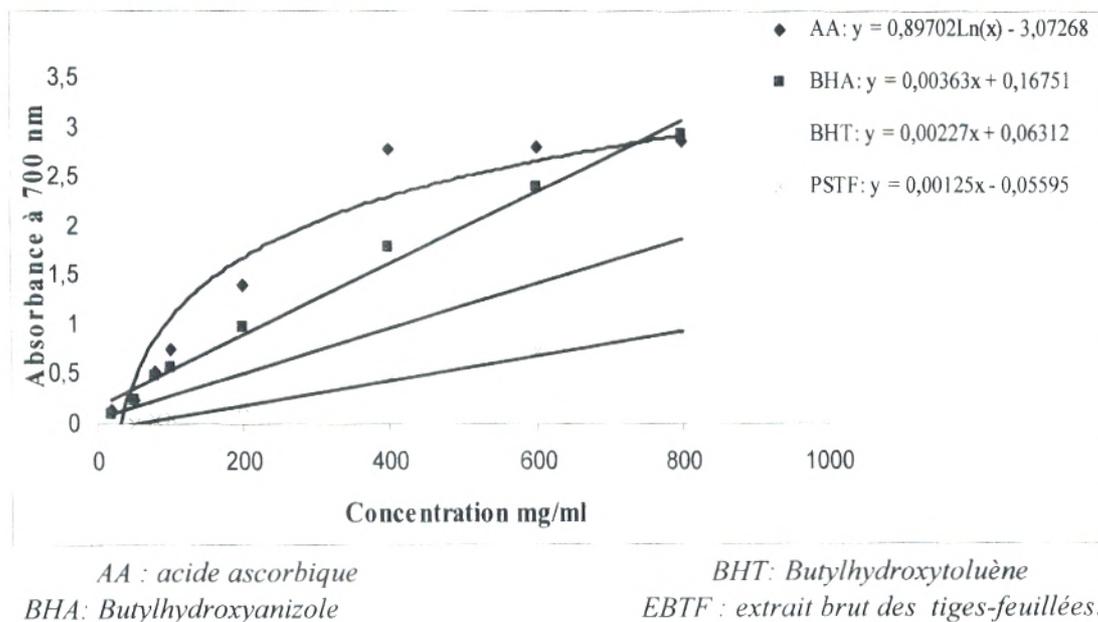
### 5-2 Réduction du Fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*) :

L'activité antioxydante des extraits des plantes étudiées a été évaluée par la méthode de FRAP, qui est une méthode simple, rapide et reproductible. Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe<sup>3+</sup> en fer ferreux Fe<sup>2+</sup>. La puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants (**Karagozler et al., 2008**).

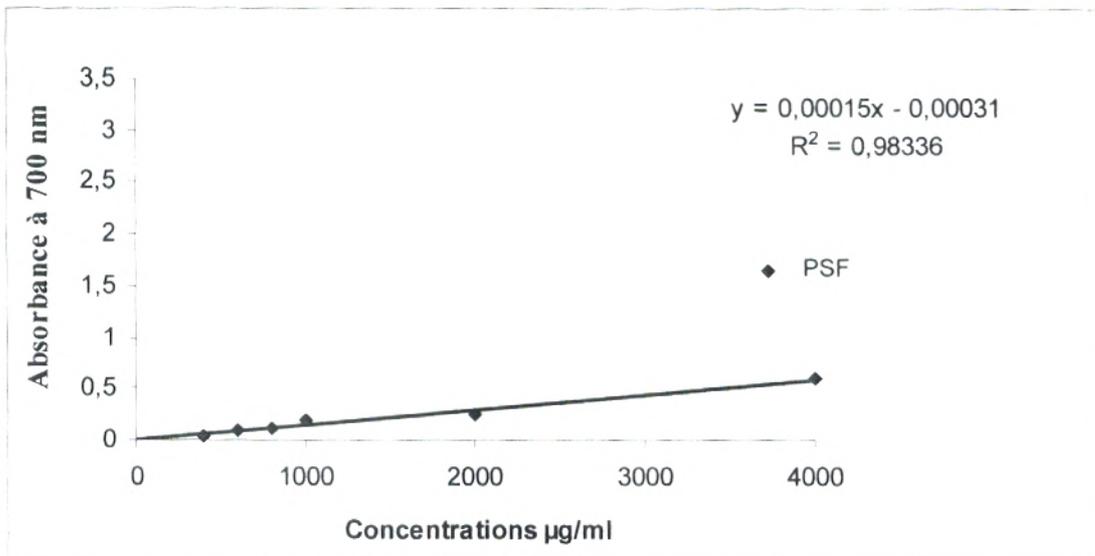
Par des dilutions en cascade des différents composés à tester, ainsi que des substances de référence, l'acide ascorbique, BHA et le BHT, nous obtenons une gamme de concentrations allant de 0,02 à 0,8 mg/ml. Pour chaque concentration, nous mesurons les densités optiques à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance signifie une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Liu et al., 2009).

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Les résultats obtenus nous a permis de déduire que pour tous les extraits testés une augmentation de la réduction du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées.

Les **figures 22** et **23** représentent le pouvoir réducteur des extraits des deux parties de la plante étudiées, l'acide ascorbique, le BHA et le BHT à différentes concentrations. Pour l'extrait des fleurs, les concentrations utilisées sont comprises entre 0,02 et 4 mg/ml pour atteindre l'IC50.

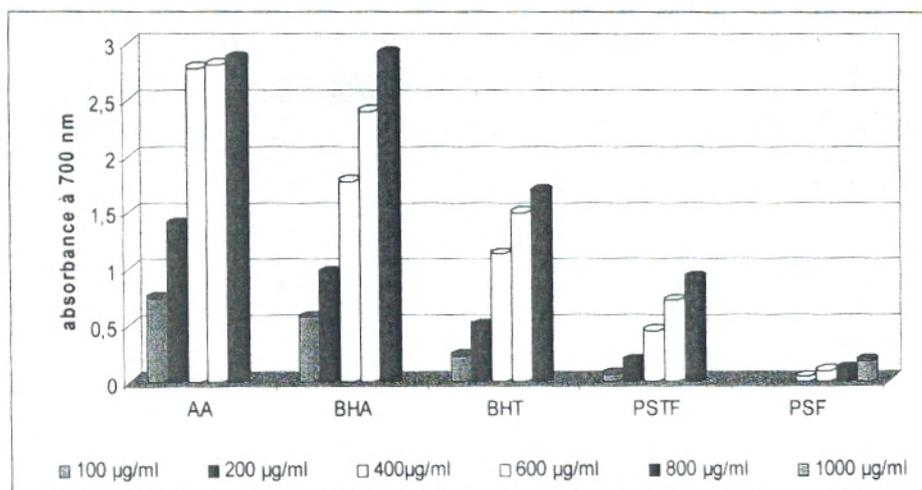


**Figure 22:** Pouvoirs réducteurs de l'extrait brut (Tiges-Feuillées), d'acide ascorbique, de BHA et de BHT.



**Figure23:** Pouvoirs réducteurs de l'extrait brut des fleurs.

Les résultats montrent que la capacité à réduire le fer pour les deux extraits méthanoliques de la plante étudiée est largement inférieure à celle de l'acide ascorbique, de BHA et de BHT. Pour les fleurs, nous remarquons que même à une concentration de 1 mg/ml elles n'atteignent pas l'IC50. Pour cette raison nous avons augmenté la concentration jusqu'à 4 mg/ml.



**Figure 24 :** Pouvoir réducteur de tous les extraits de la plante à différentes concentrations.

Le pouvoir réducteur de tous les extraits de la plante est présenté sous forme d'histogramme (figure 24). Il montre que le profil de réduction du fer change pour les deux parties de la plante étudiée, avec une capacité plus importante pour les extraits des tiges- feuillées par rapport à celle des fleurs.

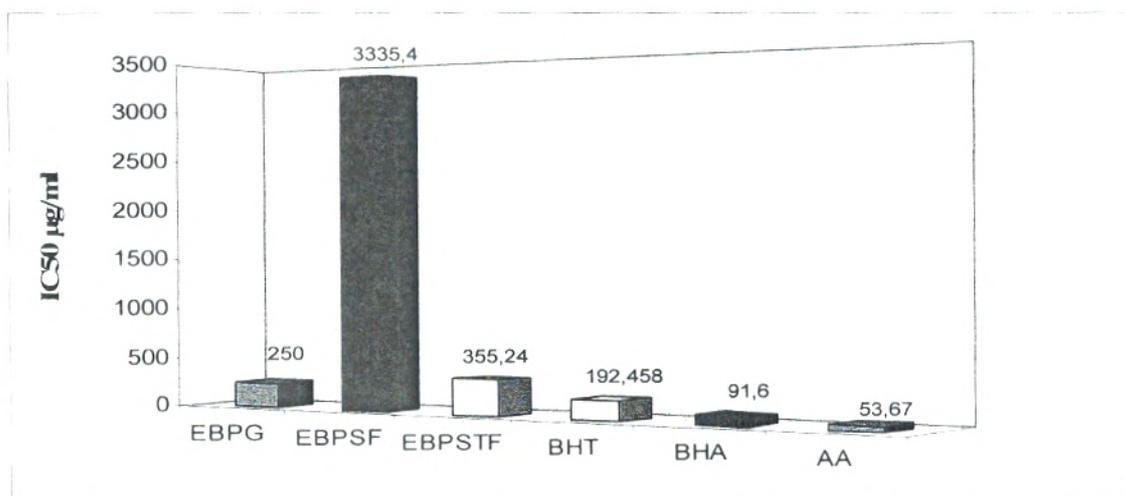
5-2-1 Calcul des IC<sub>50</sub>:

Afin de comparer l'activité antioxydante des extraits des deux parties de la plante par cette méthode, nous avons calculé IC<sub>50</sub> qui est défini comme la concentration nécessaire pour réduire 50 % du fer. Elle correspond à la concentration ayant une absorbance de 0,5 (Trabelsi et al., 2010).

Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 16** et illustrés sous forme d'histogramme (**figure 25**).

**Tableau 16:** Valeurs des IC<sub>50</sub> trouvés pour les extraits bruts des deux parties de la plante étudiée et des contrôles positif.

	Les contrôles			Pagnalon saxatile subsp eu-saxatile		<i>Phagnalon graecum Boiss</i>
	A ascorbique	BHA	BHT	Tiges-feuillées	Fleurs	EB (partie aérienne).
IC <sub>50</sub> µg/ml (C initiale)	53,67	91,6	192,458	355,24	3335,4	250
IC 50 µg/ml [C finales]	2,87	4,9	10,29	19	178,3	-



EBPG: Extrait brut de *phagnalon graecum Boiss*  
 EBPSF: Extrait brut de *phagnalon saxatile subsp eu-saxatile fleurs*  
 EBPSTF: Extrait brut de *phagnalon saxatile subsp eu-saxatil etiges-feuillées*

**Figure 25 :** Histogramme des valeurs des concentrations nécessaires pour la réduction de 50 % du fer des différents extraits en µg/ml.

D'après cet histogramme, nous pouvons classer les extraits par ordre de réactivité décroissante :

**Acide ascorbique > BHA > BHT > Extrait brut des tiges-feuillées > Extrait brut des fleurs.**

Nous remarquons que les extraits méthanoliques des tiges-feuillées (19µg/ml) et des fleurs (178,3µg/ml) présentent un pouvoir antioxydant plus faible par rapport à ceux de l'acide ascorbique, du BHA et du BHT qui ont des valeurs d'IC50 de 2,87µg/ml, 4,9µg/ml et 10,29 µg/ml

Ainsi, l'extrait brut de *phagnalon graecum Boiss* (Erdogan Orhan et al; 2012) a un pouvoir antioxydant important par rapport à celui a nos extraits bruts.

## 6- La chromatographie sur couche mince :

Pour la séparation des composés des extraits bruts, nous avons réalisé une chromatographie sur couche mince de gel de silice en utilisant deux différents systèmes d'élution sur gel de silice (tableau 17)

**Tableau 17** : les deux systèmes utilisés en CCM sur gel de silice.

<i>Systèmes</i>	Phase mobile	Phase stationnaire
<i>Système 01</i>	Butanol/ Acide acétique (4:1)	Gel de silice
<i>Système 02</i>	Acétate d'éthyle/ Acide formique/ Eau distillée (65:15:20)	

Par le biais de ces systèmes, nous avons pu mettre en évidence chez *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile* :

Dans la phase butanol/ acide acétique, un (1) composé pour la partie fleurs et trois (3) composés pour la partie tiges feuillées.

Dans la phase acétate d'éthyle/ acide formique/ eau distillée. un (1) composés pour la partie fleurs et deux (2) composés pour la partie tiges feuillées (tableau 18).

**Tableau 18 :** Chromatographie sur couche mince des extraits bruts sur gel de silice avec les deux systèmes d'élution..

Partie étudiée	Système 01		Système 02	
	R <sub>f</sub>	Couleurs des spots (UV à 366 nm)	R <sub>f</sub>	Couleurs des spots (UV à 366 nm)
Fleurs	0.9	Orange	0.89	Jaune foncé
Tiges feuillées	0.87	Violet	0.94	violet
	0.91	Jaune	0.94	Bleu claire
	0.96	Rose claire	-	-

Pour l'essai d'identification des composés par CCM, nous avons utilisé cinq témoins, sur les deux systèmes d'élution. Les résultats obtenus sont rapportés dans le **tableau 19**.

**Tableau 19 :** Résultats de la chromatographie sur couche mince des témoins utilisés sur gel de silice avec les deux systèmes d'élution.

Témoins	Butanol/ Acide acétique		Acétate d'éthyle/ Acide formique/ Eau distillée	
	R <sub>f</sub>	Révélation sous UV 366 nm	R <sub>f</sub>	Révélation sous UV 366 nm
Acide gallique- Acide phénol	0.91	jaune	0.85	Violet
Pyrocatechol - Phénol simple	0.93	Jaune	0.91	Violet
Catéchine - Flavanol	0.88	Vert jaunâtre	0.85	Marron
Quercétine - Flavonol	0.92	Orange	0.89	jaune foncé
Rutine - Flavonol	0.87	Jaune	0.82	Violet foncé

**Tableau 20:** Composées identifiées par CCM.

Partie étudiée	Système 01		Système 02	
	Composée	Rf	Composée	Rf
<b>Fleurs</b>	Quercétine	0.9	Quercétine	0,89
<b>Tiges-feuillées</b>	Acide gallique	0.91	Pyrocatechol	0,94

L'étude de l'identification des composés polyphénoliques de notre plante et à l'aide de quelques témoins utilisés, nous a permis de mettre en évidence dans le premier système la présence de l'acide gallique qui est un acide phénol de couleur jaune avec un Rf de 0,91 dans la partie des tiges-feuillées de la plante, et de la quercétine qui est un flavonol (0,9) de couleur orange dans l'extrait des fleurs (**tableau 20**).

Concernant le deuxième système nous avons pu identifier de la quercétine (jaune foncé) qui est de la classe des flavonols dans les fleurs avec un Rf de 0,89. Ainsi nous avons pu mettre en évidence la présence d'une tache de couleur violet correspond à la pyrocatechol (phénol simple) dans les tiges-feuillées (0,94).

Les autres taches présentes dans les deux extraits de la plante étudiée dans les deux systèmes utilisée correspondent à d'autres composés non utilisés comme témoins.

Le premier système nous a permis de séparer plus de taches, donc nous pouvons déduire qu'il est fiable pour l'identification des composées par rapport au deuxième système.

Un travail réalisé par **Erdogan Orhan et al; (2012)** sur la détermination des acides phénoliques de l'extrait brut méthanolique de *phagnalon graecum Boiss* par HPLC, utilisant le système méthanol/ acide formique/eau distillée (10: 2: 88, v/v/v) et plusieurs standard d'acides phénoliques (acide gallique, acide protocatéchique, acide férulique, acide o-coumarique, acide transcinnamique, acide syringique, acide cafféique, acide p-hydroxybenzoïque et le propylparabene), montre la présence seulement d'acide férulique, acide o-coumarique et le propylparabene.

#### **7- Relation entre les composés phénoliques, et l'activité antioxydant :**

Dans cette partie nous avons cherché à établir une relation entre la présence et la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes, FRAP, DPPH en calculant l'inverse des valeurs des IC50.

Tous les dosages et les activités réalisés au cours de ce travail ont été répétés trois fois pour chaque extrait et ce pour faire une analyse de corrélation sur Excel.

Selon **François Mouanda et al., 2010**, une très bonne corrélation est établie lorsque les facteurs de corrélation varient entre 0,80-0,99.

**Tableau 21** : Les coefficients de la corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes et les deux activités antioxydantes des tiges feuillées.

	PPT	FV	FRAP	DPPH
PPT	1			
FV	0,99	1		
FRAP	0,91	0,93	1	
DPPH	0,99	0,99	0,89	1

*PPT : Polyphénols totaux (mg GAE/g MS)      FRAP : 1/ IC50 (µg/ml) [C finale]*  
*FV : Flavonoïdes (mg CE/ g MS)              DPPH : 1/ IC50 (µg/ml) [C finale]*

**Tableau 22** : Les coefficients de la corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les deux activités antioxydantes des fleurs.

	PPT	FRAP	DPPH
PPT	1		
FRAP	0,99	1	
DPPH	0,84	0,84	1

Les coefficients de corrélations pour les tiges-feuillées montrent une très bonne corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux (PPT), les flavonoïdes (FV), l'activité antiradicalaire (DPPH) et la réduction du fer (FRAP) avec des facteurs de corrélations compris entre 0.89 et 0.99 (**tableau 21**).

Pour les fleurs, il y a une très bonne corrélation entre la teneur en PPT et FRAP ( $R^2 = 0.99$ ) et une corrélation considérable entre la teneur en PPT et DPPH ( $R^2 = 0.84$ ) et même entre les deux activités réalisées ( $R^2 = 0.84$ ) (**tableau 22**).

# Conclusion générale



Etant donné la toxicité et/ou les effets secondaires indésirables des molécules de synthèse face aux médicaments existants, l'utilisation des plantes qui contiennent des composés bioactifs est en progression constante. En effet, compte tenu de leur meilleure biocompatibilité nous observons une demande croissante des produits d'origine naturelle.

L'objet de notre travail est de caractériser une espèce végétale par des tests et des dosages phytochimiques et d'étudier l'activité antioxydante de ses extraits. Il s'agit de *phagnalon saxatile subsp eu-saxatile* de la famille des Astéracées, qui pousse spontanément dans la région de Tlemcen (Fellaoucène).

Les études bibliographiques réalisées sur cette espèce montrent qu'elle possède plusieurs propriétés pour le traitement de plusieurs pathologies en particulier l'inflammation et de la maladie d'Alzheimer. En revanche, peu d'informations de nature chimique et/ou biologique sont connues. Pour mieux connaître cette espèce, des extraits bruts des tiges-feuillées et des fleurs, ont été évalués par des méthodes chimiques.

Les tests phytochimiques réalisés par des réactions de caractérisation ont permis de mettre en évidence la présence des flavonoïdes, des tanins, dans les deux parties de la plante et des l'hétérosides stéroïdique dans les fleurs.

Les rendements en extraits bruts méthanoliques des fleurs et des tiges feuillées sont de 10% et 9% respectivement.

Des dosages effectués ont permis de déterminer la teneur en polyphénols totaux des tiges-feuillées qui est de 18,82 mg GAE/g de matière végétale sèche. Il est plus élevé par rapport à celui des fleurs (4,8mg GAE/g MS). Ces dernières possèdent des traces en flavonoïdes que nous n'arrivons pas à les quantifier par une méthode de dosage appropriée. Les tiges-feuillées révèlent une teneur en flavonoïdes de 13,08 mg CE/g de matière végétale sèche.

L'activité antioxydante déterminée par deux méthodes chimiques, le piégeage de radical DPPH et la réduction de fer, nous a permis de localiser la partie de la plante la plus active, et de comparer cette activité avec des contrôles positifs, acide ascorbique, BHA, BHT.

Par la méthode FRAP, tous les extraits ont une capacité à réduire le fer qui augmente en fonction de la concentration. L'extrait des tiges-feuillée a une activité importante par rapport à celle des fleurs, mais elles restent largement plus faibles par rapport à celle des contrôles.



Par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, nous avons pu constater une activité antioxydante très importante de la partie des tiges-feuillées ( $IC_{50} = 5,65 \mu\text{g/ml}$ ) comparée à celle de BHT ( $IC_{50} = 64,05 \mu\text{g/ml}$ ), cela est dû à sa richesse en composés phénoliques.

De ses résultats, nous pouvons constater que ces extraits présentent une meilleure activité antioxydante par la méthode de DPPH comparée à celle de FRAP dont le principe est différent.

La chromatographie sur couche mince de ces extraits bruts méthanoliques avec deux systèmes du développement différents, montre la présence dans le premier système de l'acide gallique (acide phénol) dans la partie des tiges-feuillées et de la quercétine (un flavonol) dans l'extrait des fleurs. Cependant, dans le deuxième système nous révélons la présence de la quercétine (flavonols) dans les fleurs et de la pyrocatechol (phénol simple) dans les tiges-feuillées.

Les résultats des dosages en polyphénols totaux, en flavonoïdes et les deux activités antioxydantes utilisées ont montré une bonne corrélation avec des facteurs compris entre 0.84 et 0.99.

Au-delà des résultats obtenus, il est souhaitable de compléter et d'approfondir ce travail par une étude phytochimique avancée afin de fractionner, isoler et identifier les différentes molécules en particulier les composés phénoliques par diverses techniques chromatographiques et spectrophotométriques.

Il serait aussi intéressant de tester les différentes molécules isolées *in vivo* sur différents modèles biologiques, afin de trouver une application thérapeutique des molécules actives isolées.

# **Références bibliographiques**

1. **Abdel-Hameed E.S., 2009.** Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chem.* 114:1271-1277.
2. **Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A., 2007.** Reactive oxygen species and superoxide dismutase; rôle in joint diseases, *Revue du Rhumatisme*, 74: 636-643.
3. **Ahamet S., 2003.** Etude phytochimique des activités biologiques de *Balanites aegyptiaca* L.(Balanitaceae). Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en pharmacie. Faculté de médecine et de pharmacie et d'Odonto-Stomatologie du Bamako. Mali.
4. **Albayrak S., Aksoy A., Sagdic O. et Hamzaoglu E., 2010.** Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum*(Asteraceae) species collected from Turkey.*Food Chemistry* ;119: 114- 22.
5. **Ali-Shtayeh M.S., Yaghmour M.R., Faidi Y.R., Salem K., Al-Nuri M.A.,1998.** Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *J Ethnopharmacol* 60:265–71.
6. **Aniszewskim T., 2007.** Alkaloids - Secrets of Life, Alkaloid Chemistry, Biological significance, Applications and Ecological Role, Elsevier.
7. **Antonot, E; Marchal, R. (1998).** Chromatographie. Stage MAPEN, p 5.
8. **Ardestani A., Yazdanparast R., 2007.** Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycoxydation, *Food and Chemical Toxicology*, 45, 2402–2411.
9. **Atik Bekkara F., Benhammou N. et Kadifkova Panovska T., 2008.** Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* Vol. 2(2) . pp. 022-028.
10. **Atik Bekkara F., Benhammou N., Kadifkova Panovska T., 2007.** Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf, *Advances in Food Sciences*, 29 (3): 155-161.
11. **Atoui A.K., Mansouri A., Boskou G., Kefalas P., 2005.** Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89(1), 27–36.
12. **Bae K., Jin W.Y., Thuong T.P., Min B.S, Na M.K, Lee M.Y., et al., 2007.** A new flavonoid glycoside from the leaf of *Cephalotaxus koreana*. *Fitoterapia* ; 78: 409–13.
13. **Bahorun T., 1996.** Substance naturelles actives: La flore Mauricienne, Une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice.
14. **Barreda V.D., Palazzesi L., Tellería M.C., 2010.** Eocene Patagonia fossils of the daisy family, *Science*, 329:1621.
15. **Bartoz G., 2003.** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on toxicology*, 9:5-21.
16. **Benwie F.F., Strain J.J., 1996.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70- 76.
17. **Bérubé-Gagnon J., 2006.** Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables. Québec.
18. **Bhat S.V; Nagasampagi B.A; Sivakumar M., 2005.** *Chemistry of Natural Products*. Narosa, New Delhi, India. Ch. 4, 237.
19. **Bicchi C., Frattini C., Nano G.M., Tira S., 1979.** Hexahydrofarnesylacetone from Phagnalon rupestre. *Relata Technica*;11:64.
20. **Blois M. S., 1958.** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181,1199-1200.
21. **Boizot N., Charpentier J.P., 2006.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier, INRA - Amélioration. Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques, Le Cahier des Techniques de l'Inra, 79-82.
22. **Bonnaillie C., Salacs M., Vassiliova E. et Saykova I., 2012.** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). *Revue de génie industriel* ;7:35- 45.
23. **Bonnaillie C., Salacs M., Vassiliova E. et Saykova I., 2012.** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). *Revue de génie industriel* ; 7 : 35- 45.

24. **Botsoglou N.A., Fletouris D.J., Papageorgiou G.E., Vassilopoulos G.E., 1994.** Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissues, food and feedstuff samples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 42: 1931- 1937.
25. **Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Goran A., Igc R., 2008.** Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae), *Food Chemistry*, 111: 925–929.
26. **Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft and thechnologie*, 28: 25- 30.
27. **Bruneton J., 1999.** *Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales*, 3<sup>e</sup> édition, Paris, Tec & Doc – Lavoisier. Paris, p:1120.
28. **Bruneton J., 2009.** *Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales*, 4<sup>e</sup> éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, 1288 p.
29. **Buchnan B et al ,Ed., 2000.** American society of plant physiologists.
30. **Budic-Leto T., Lovric J., 2002.** *Food Technol. and Biotechnol.*; 40 (3), 221–225.
31. **Buettner G., 1999.** Singlet oxygen toxicity is cell line-dependant: a study of lipid peroxydation in nine leukemia cell lines. *Photochem Photobiol*; 70:858-67.
32. **Cabrera C; Artacho R., Gimenez., 2006.** Beneficial effects of green tea. A review. *Journal of American college of nutrition*, 25, 79-99.
33. **Chiang Y.M., Chuang D.Y., Wang S.Y., Kuo Y.H., Tsai P.W., Shyur L.F., 2004.** Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa*. *J Ethnopharmacol*; 95: 409–19.
34. **Cillard J., cillard P., 2006.** Mécanismes de la peroxydation lipidiques et des anti-oxydations OCL- Oleagineux-Corps gras- Lipides, Vol 13, N°1 P 24-30.
35. **Cirre L., 2001.** *Les plantes et les médicaments ; L'origine végétale de nos médicaments.* Edition Delachaux et Niestlé SA, Paris.
36. **Coca Perez M., 2001.** *Arbres, arbustes et buissons Alcornocales Parc Naturel (Cádiz-Málaga).* Jerez: Ornitur. ISBN 84-607-3404-3.
37. **Cohen M., 2002.** Stress oxydant, glycation protéique, vieillissement et maladies liés à l'âge. *La phytothérapie Européenne*, 6:18-26.
38. **Conforti F., Filomena C., Daniela R. et al., 2010.** Metabolite profile and in vitro activities of *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. Relevant to treatment of Alzheimer's disease. *Informa healthcare. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*; 25(1): 97–104.
39. **Contain A., Van der heijden., Lefeber A.W.M., Verpoorte R., 1998.** The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/ pyruvate pthway in *catharanthus roseu* cell culture. *FEBS Letters*, 434:413-41.
40. **Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G., 2000.** Natural products (Secondary metabolites). *Biochimistry and molecular biology of plants*, 24: 1250-1251.
41. **Dacosta E., 2003.** *Les phytonutriments bioactifs.* Yves Dacosta (Ed). Paris, 317p.
42. **Dewick P.M., 2001.** *Medicinal Natural Products.* Wiley. Ch. 6, 291.
43. **Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., Idrissi Hassani L.M., Badoc A. et Gmira N., 2003.** Screening phytochimique d'une endémique Ibero- marocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bull. Soc.Pharm. Bordeaux*, 142, 61- 78.
44. **Dolci M., Tira S., 1982.** Flavonoids of Gnaphalieae: *Phagnalon* species. *Atti dell'Accademia delle Scienze di Torino, Classe Sci Fis Mater Nat* 116:315–18.
45. **Dugas A.J., Castaneda-Acosta J., Bonin G.C., Price K.L., Ficher N.H., 2000.** Evaluation of the total peroxy radical scavenging capacity of flavonoids: structure activity relation ship. *Journal Nat Prod* 63, 31.372.
46. **Dupont F., Guignard J.L., 2007.** *Botanique: systematique moléculaire.* 14 ed. Masson, Paris, France, 248.
47. **Duraffourd C., Lapraz J.C., Chemli R., 1997.** La plante medicinale de la tradition à la science Ière congrès intercontinental. Tunis. ED. Granche. Paris, 222.
48. **Edeoga H.O., Okwu D.E., Mbaebie B.O., 2005.** Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African journal of biotechnology* Vol 4(7), pp 685- 688 ISSN 1684 5315.

49. **Ekoumou C., 2003.** Etudes phytochimiques et pharmacologiques de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse pharmacie, Bamako, 145 p.
50. **El-Rhaffari L., Zaid A., 2004.** Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. Origine des pharmacopées traditionnelles et élaboration des pharmacopées savantes, 293- 318.
51. **Emerenciano V.P., Barbosa K.O., Scotti M.T., Ferriro M.J.P., 2007.** Self organising maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae: a classification of tribes using flavonoid data. *Journal of brazilian chemical society*, 18(5): 891-899.
52. **EnvironnementCanada., 2009.** Approche de gestion des risques proposée pour l'isoprène. Numéro de registre du Chemical Abstracts Service (CAS): 78-79-5.
53. **Erdman J., Balentine J.D., Arab L., Beecher G., Dwyer J.T., Folts J., Harnly., 2005.** Flavonoids and heart health: Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, Washington. *Journal of Nutrition*, 137 (3 supp 1): 718 s-737 s.
54. **Erdogan Orhan I., Sezer Senol F., Demirci B., Ozturk N., Husnu Can Baser K., Sener B., 2012.** Phytochemical Characterization of Phagnalon graecum Boiss. by HPLC and GC-MS with its Enzyme Inhibitory and Antioxidant Activity Profiling by Spectrophotometric. Springer, Methods, Food Anal. Methods. DOI 10.1007/s12161-012-9386-6.
55. **Falkowski M., 2006.** Activités antioxydantes des fruits et des légumes frais; Université de Bourgogne – Dijon UFR des Sciences de la Vie, 21000 Dijon; stage réalisé au sein de l'asbl CEDEVIT.
56. **Favier A., 2003.** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 108- 115.
57. **François Muanda N., Dicko A., Soulimani R., 2010.** Chemical composition and biological activities of *Ficus capensis* leaves extracts. *Journal of natural products*. Vol 3: 147-160. ISSN 0974-5211.
58. **frédéric C., 2004.** Les antioxydants, la révolution du XXI<sup>e</sup> siècle, 2<sup>ème</sup> édition; ISBN 2-7640-0888.
59. **Friedman J., Yaniv Z., Dafni A., Palewitch D., 1986.** A preliminary classification of the healing potential of medicinal plants, based on a rational analysis of an ethnopharmacological field survey among Bedouins in the Negev desert, Israel. *J Ethnopharmacol* 16:275–87.
60. **Góngora L., Giner R.M., Recio M.D.C., 2001.** New prenylhydroquinone glycosides from *Phagnalon rupestre*. *J Nat Prod*;64:1111–13.
61. **Gómez - Caravaca A.M., Gómez - Romero M., Segura-Carretero A., 2006.** Advances in the analysis of phenolic compound in products derived from bees. *Journal of Pharmacology and Biomedicine Analysis* 41: 1220 - 34.
62. **Góngora L., Giner R.M., Máñez S., Recio M.D.C., Ríos J.L., 2001.** New prenylhydroquinone glycosides from *Phagnalon rupestre*. *J Nat Prod* 64:1111–13.
63. **Goupy P., Dufour C., Loonis M., Dangles O., 2003.** Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphénols to the DPPH radical. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51: 615- 622.
64. **Hadi M., 2004.** La quercétine et ces dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse en vue d'obtention du grade de docteur en sciences. Université Louis Pasteur. Strasbourg.
65. **Harborne J.B., 1998.** phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition. ISBN 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB).
66. **Hennebelle T. ; 2006.** Investigation chimique et chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants. *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota Pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbenacées). Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat Chimie Organique et Macromoléculaire. Université des Sciences et Technologique de Lille, Lille 1. Ecole Doctorale Sciences de la Matière du rayonnement et de l'Environnement. France.
67. **Hennebelle T.S., Sahpa Z., Bailleul F., 2004.** Phytothérapie. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Volume 2, Number 1, 3-6. DOI: 10.1007/s10298-004-0003-8.
68. **Igor Passi L.B., 2002.** Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxyloides* Lam. (*Rutaceae*). Thèse Pharmacie, Bamako ; 133 P.

69. Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F., 2002. Botanique systématique. Une perspective phylogénétique. 1ère Edition De Boeck Université. Paris, 383.
70. Just N., Nyunga M., Lelong J., allaert B., 2005. Allergie immédiate aux glucocorticoïdes de synthèse oraux. *La Revue de Médecine Interne*, 26: 331- 334.
71. Kansole, M.M.R., 2009. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita vahl* et *Orthosiphon pallidus royle ex benth*. Mémoire pour obtenir un diplôme Diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.
72. Karagozler A., Erdag B., Calmaz Emek Y., 2008. Antioxydant activity and praline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*, *Food Chemistry*, 111: 400-407.
73. Karumi Y., Onyeyili P.A., Ogugbuaja V.O., 2004. Identification of active principals of M Balsamina (Balsma Apple) leaf extract. *J Med Sci*, 4(3): 179- 182 – Nigeria ISSN 1682- 4474.
74. Keïta R., 2002. Etude de l'activité antifongique et antioxydante de 14 plantes utilisées dans le traitement traditionnel des infections sexuellement transmissibles. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en pharmacie. Faculté de médecine et de pharmacie Bamako. Mali.
75. Kogel-Knabner I., 2002. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 139-162.
76. Laroche M., Anton P.M., Garcia-Villar R., 2003. Protective effect of dietary nitrate on experimental gastritis in rats. 89:777- 86.
77. Liu L., Sun Y., Laura T., Liang X., Ye H., Zeng X., 2009. Determination of polyphenolic content and antioxydant activity of Kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng, *Food Chemistry*, 112: 35-4.
78. Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.
79. Magalhaes L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J., 2008. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613: 01-19.
80. Males Z. et Medic-Saric M., 2001. Optimization of TLC analysis of flavonoids and phenolic acids of *Helleborus atrorubens*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 24: 353- 9.
81. Malešev D., Kuntić V., 2007. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbianchemical society*, 72(10): 921-939.
82. Mendez E., Sanhueza J., Speisky H., Valenwuela A., 1996. Validation of the Rancimat test for the assessment of the relative stability of fish oil. *Journal of American oil Chemical Society*, 73: 1033-1037.
83. Michelline M.R.K., 2009. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiacée du Burkina Faso: Cas de *leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita vahl* et *orthosiphon pallidus royle ex benth*.
84. Nébié R.H.C., Rigobert T.Y., André B., 2004. Composition chimique des huiles essentielles d'*Agregatum conyzoides* du Burkina Faso. *C. R.Chimie*, 7: 1019-1022.
85. Olmos A., Manez S., Giner R.M., Recio M.D.C., Rios J.L., 2007. Protein tyrosine nitration induced by heme/hydrogen peroxide: inhibitory effect of conjugates. *Planta Med* 73:20–6.
86. Onyilagha J., Bala A., Hallett R., Gruber M. et Sorok J., 2003. Neil Westcott Leaf flavonoids of the cruciferous species, *Camelina sativa*, *Crambe* spp., *Thlaspi arvense* and several other genera of the family. *Brassicaceae Biochemical Systematics and Ecology*: 31: 1309- 22.
87. 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.
88. Paolini V., Dorchies Ph., Hoste H., 2003. Effet des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre. *Alter. Agri.*, 17-19.
89. Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Rosas-Romero A., Flerlage N., Burillo J., Codina C., 2002. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem*; 50: 6882- 90.

90. **Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., 2001.** Antioxidants in food, Practical applications. Woodhead Publishing Limited. ISBN 1 85573 463 X.
91. **Pourrut B., 2008.** Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat à l'Institut National Polytechnique de l'Université de Toulouse spécialité : Ecotoxicologie. France.
92. **Qaiser M., Abid R., 2003.** *Phagnalon Cass.* Flora of Pakistan, vol. 210, Asteraceae (II): Inuleae, Plucheeae et Gnaphalieae.
93. **Quezel P et Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale Tome II édition. CNRS. Paris.
94. **Ramawat K.J., Merillon J.M., 2008.** Bioactives molecules and medicinal plant. Edition Springer Verlag Berlin Héidelberg.
95. **Rivas Martinez S., Fernández Gonzalez F., Loidi J., Lousa M., Penas A., 2001.** Sintaxonomical checklist of vascular plant communities of Spain and Portugal to association level. *Itinera geobotánica*.
96. **Roginski V., Lissi E., 2005.** Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92 :235 -254.
97. **Sanchez-Moreno C., 2002.** Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8 (3):121-137.
98. **Sarni-Manchado P., Cheynier V., 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier, Editions Tec & Doc, 398 p.
99. **Senatore F., Formisano C., Grassia A., Rigano D., Bellone G., Bruno M., 2005.** Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. (Asteraceae) growing wild in Southern Italy. *J Essent Oil Bearing Plants* 8:258-63.
100. **Sherwin E.R., 1976.** Antioxydants for vegetable oils. *Journal of American Oil Chemical Society*, 53: 430- 436.
101. **Siingh A.P., 2002.** A treatise on phytochemistry. B.Sc, B.A.M.S, M.D (Alternative medicine). Edition. Emedia science Ltd.
102. **Trabelsi N., Megdiche W., Ksouri R., Falleh H., Oueslati S., Soumaya B., Hajlaoui H. et Abdelly C., 2010.** Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT - Food Science and Technology*; 43: 632- 9.
103. **Trabut L., 2006.** Noms indigènes des plantes d'Afrique du nord. IBIS, Press.ISBN:978-2-910.728; 59-5.P 127.
104. **Van acker S., Bast A., Van der vijgh W., 1998.** Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. In: Rice-Evans C, Packer L, eds. *Flavonoid in health and disease*. Marcel Decker New York, 1998: 221- 51.
105. **Van Antwerpen P., 2006.** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myeloperoxydase/ peroxyde d'hydrogène/ chlorure. Thèse de doctorat en sciences pharmaceutiques, Académie universitaire Wallonie-Bruxelles.
106. **Vansan G., 2004.** Radicaux libres et antioxydants, principe de base. Symposium "Antioxydants et alimentation". Institut Danone.
107. **Vermerris W., Nicholson R., 2006.** Phenolic Compound Biochemistry, Springer, Dordrecht. ISBN-10 1 -4020-5163-8 (HB).
108. **Waghorn G.C., McNabb W.C., 2003.** Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proceeding of the nutrition society*. 62, 383-392.

## Résumé

Notre travail porte sur l'étude de la phytochimie et de l'activité antioxydante d'une plante endémique, *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile* de la famille des Astéracées, largement répandue dans la région du Fallaoucène (Tlemcen). Elle est utilisée dans le traitement de l'inflammation et de la maladie d'Alzheimer.

Deux extraits bruts méthanoliques ont été préparés à partir des deux parties de la plante étudiée. Le rendement est plus important dans fleurs (10%) par rapport aux tiges-feuillées (9%).

Les tests phytochimiques ont permis de détecter les différentes familles de composés chimiques existantes dans les tiges-feuillées et les fleurs de cette plante.

Les teneurs en polyphénols sont plus importantes dans les tiges-feuillées (18,82mg GAE/g Ms) par rapport aux fleurs (4,8 mg GAE/g MS). Les flavonoïdes n'ont été détectés que dans les tiges-feuillée avec une teneur de 13,8 mg CE/g MS.

Par comparaison avec les antioxydants de synthèse utilisés dans l'industrie, l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de réduction de fer (FRAP) et celle du piégeage de radical libre DPPH des extraits méthanolique des deux parties de la plante a montré que nos extraits possèdent un faible pouvoir antioxydant en réduisant le Fer et une activité antiradicalaire intéressante en piégeant le radical DPPH.

L'analyse par chromatographie sur couche mince a permis de révéler la présence de l'acide gallique et de la pyrocatechol dans les tiges-feuillées et de la quercétine dans l'extrait des fleurs.

**Mots clés:** *Phagnalon saxatile*, étude phytochimique, polyphénols, flavonoïdes, Activité antioxydante, DPPH, FRAP, CCM.

## Summary

Our work focuses on studying the phytochemical and antioxidant activity of an endemic plant, *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile* of the Asteraceae family, widespread in the region of Fellaoucène (Tlemcen). It is used in the treatment of inflammation and Alzheimer's disease.

Two dry methanolic crude extracts were prepared from two parts of the plant studied. Yields are higher in flowers (10%) compared to stems-foilage (9%).

Phytochemical tests have detected the different families of chemical compounds existing in-leafy stems and flowers of this plant.

The polyphenol contents are higher in stems, with leaves (18.82 mg GAE / g MS) compared to flowers (4.8 mg GAE / g DM). Flavonoids have been detected in the stems-leaves with a content of 13.8 mg CE/MS.

By comparison with synthetic antioxidants used in industry, evaluation of antioxidant activity by the method of reduction of iron (FRAP) and the trapping of free radical DPPH metabolic extracts of both parts of the plant showed our extracts have low antioxidant by reducing the Iron and interesting antiradical activity by scavenging DPPH radical.

Analysis by thin layer chromatography (TLC) revealed the presence of gallic acid and the pyrocatechol in the stems-foilage and the quercetin in the flowers.

**Keywords:** *Phagnalon saxatile*, phytochemical study, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, DPPH, FRAP, CCM.

## ملخص

عملنا يركز على دراسة ونشاط مضادات الأكسدة النباتية من النباتات المتوطنة، *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile* من عائلة Asteraceae على نطاق واسع في منطقة فلاوسن (تلمسان) فهي تستخدم في علاج الالتهابات ومرض الزهايمر. أعد مقتطفان من النفط الخام الميثيلي المستخرج من جزأين من النبات. العوائد أعلى في الزهور (10%) مقارنة مع السيقان المورقة (9%).

وقد كشفت الاختبارات النباتية للعائلات مختلف المركبات الكيميائية الموجودة في الأزهارو السيقان المورقة من هذا النبات. محتويات البوليفينول هي أعلى في السيقان المورقة مقارنة مع الزهور. تم اكتشاف مركبات الفلافونويد في السيقان المورقة التي تحتوي على ( 13,8 مغ بالمقارنة مع كاتشين في الوزن الجاف) بالمقارنة مع المواد المضادة للاكسدة الاصطناعية المستخدمة في الصناعة من خلال طريقة للحد من الحديد ومحاصرة من الجذور الحرة وأظهرت مقتطفات الميثيلي كل من أجزاء النبات، لدينا المضادة للاكسدة منخفضة عن طريق الحد من الحديد والنشاط الجذري مثيرة للاهتمام.

وكشف تحليل بواسطة جهاز الكروماتوجرافي طبقة رقيقة وجود حمض الغال. و كاتيول في السيقان المورقة ، وكشف عن وجود كيرسيتين في زهور النبتة التي شملتها الدراسة.

الكلمات المفتاحية

*Phagnalon saxatile*، دراسة النباتية، البوليفينول، الفلافونويد، النشاط المضادة للاكسدة، DPPH، FRAP، CCM