

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



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID – TLEMCEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Et Science de la Terre et de l'Univers - Département de Biologie.

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



Mémoire de Fin d'Etude pour l'Obtention du Diplôme de Master

Option : Biochimie appliquée

Inscrit Sous le N° 6366
Date le 07/07/2012
Code:

Thème :

Contribution à l'étude phytochimique et activité
antioxydante des feuilles de *Pergularia tomentosa* L.
de la région d'Adrar

Présenté par : Mr BOUHAMDJ Abdelmadjid

Devant le Jury :

Présidente : M^{me} Boucherit. Z Maitre de conférences
Examinatrice : M^{elle} Benariba. N Maitre assistante
Promoteur : Mr Beghdad .C Maitre de conférences



Remerciement

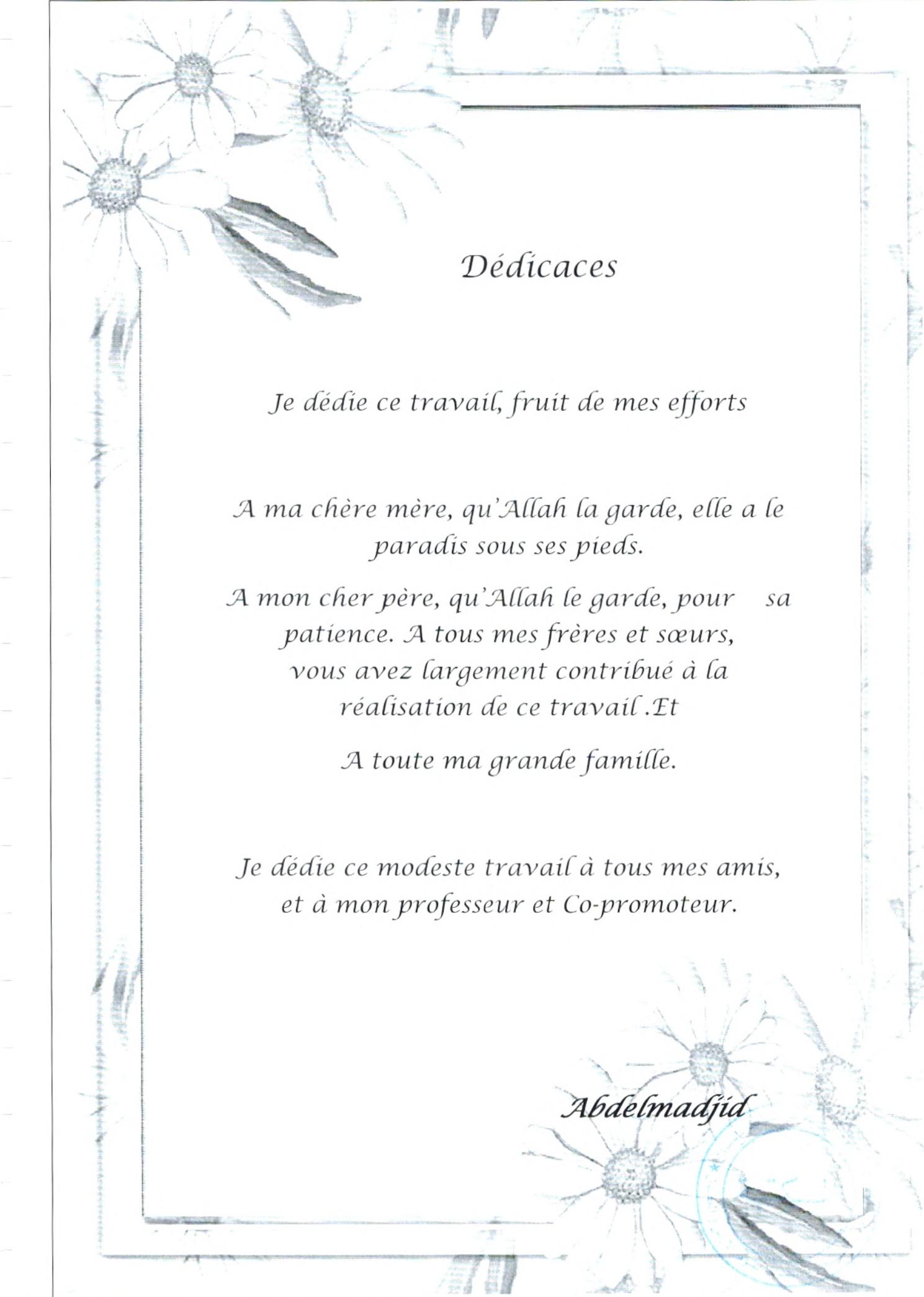
Nous tenons à remercier en premier lieu Dieu
le tout puis de nous avoir aidé et donné le courage et la santé
pour achever ce modeste travail

En premier lieu je ne cesse jamais de remercier mon
encadreur M^r beghdad Mohammed Choukri maître de conférences
au département de biologie faculté des sciences, Université Abou
Bekr Belkaid – Tlemcen, que aide, orienter, conseiller et soutenue
pendant tut la durée de travail.

Je remercier sincèrement, M^m Boucherit. Z Président de jury, et
M^{elle} Benariba. N ; membre de jury qui nous à également fait
l'honneur d'examiner ce travail.

Enfin que tous ceux qui ont apporté leur contribution à la
réalisation du présent travail puissent trouver en cela, l'expression
de mes remerciements les plus sincères.





Dédicaces

Je dédie ce travail, fruit de mes efforts

A ma chère mère, qu'Allah la garde, elle a le paradis sous ses pieds.

A mon cher père, qu'Allah le garde, pour sa patience. A tous mes frères et sœurs, vous avez largement contribué à la réalisation de ce travail .Et

A toute ma grande famille.

Je dédie ce modeste travail à tous mes amis, et à mon professeur et Co-promoteur.

Abdelmadjid

Liste des figures

Photo01 : <i>Pergularia tomentosa</i> L.....	05
Photo 02 : Solution de DPPH après réaction avec l'extrait phénolique.....	37
Photo03 : Solution DPPH avec l'extrait brut des polyphénols totaux.....	44
Figure 01 : Répartition géographique spatiale de <i>Pergularia tomentosa</i> L.....	04
Figure 02 : Principaux composés phénoliques.....	10
Figure 03 : Structure de base des flavonoïdes.....	11
Figure 04 : La biosynthèse des flavonoïdes.....	13
Figure 05 : Principales classes des flavonoïdes.....	14
Figure 06 : Structure chimique de quelques tanins hydrolysables.....	16
Figure 07 : Structure des tanins condensés.....	17
Figure 08 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène	20
Figure 09 : Diagramme des tests phytochimiques réalisés sur la feuille <i>P. tomentosa</i> L.....	28
Figure 10 : Taux de matière sèche de la feuille de <i>Pergularia tomentosa</i> L.	38
Figure 11 : Rendement massique des tanins, des flavonoïdes et des alcaloïdes.....	40
Figure12 : Teneur des composés phénoliques (mg/g), des feuilles de <i>P.tomentosa</i> L.....	41
Figure 13 : Teneur des tanins hydrolysables et condensés de <i>P.tomentosa</i> L.....	43
Figure 14 : Courbe d'étalonnage des phénols totaux.....	57
Figure 15 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.....	58
Figure 16 : Le pouvoir antioxydant des polyphénols totaux.....	60

<i>Figure 17</i> : Le pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique.....	60
<i>Figure 18</i> : Le pouvoir antioxydant les alcaloïdes.....	61
<i>Figure 19</i> : Le pouvoir antioxydant les tanins.....	61
<i>Figure 20</i> : Le pouvoir antioxydant les fractions n-butanol.....	61
<i>Figure 21</i> : Le pouvoir antioxydant les fractions l'éther diéthylique.....	61
<i>Figure 22</i> : Le pouvoir antioxydant les fractions l'acétate d'éthyle.....	62

Liste des tableaux

Tableau 01: Résultats des tests phytochimique de feuille de Pergularia tomentosa L.....	39
Tableau 02 : Les concentrations EC ₅₀ des extraits de <i>P.tomentosa</i> L	45
Tableau 03: Valeur activité antiradicalaire	46

Liste des abréviations

AE : Acétate d'éthyle

AlCl₃: Chlorure d'aluminium

CaCO₃: Carbonate de calcium

°C: Degré Celsius

C : Concentration

DO : Densité optique

DPPH : 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl

EC₅₀ : Concentration efficace réduisant 50% de la concentration du DPPH

EGCG : Epigallocatechingallate

EOR : Espèces oxygénées réactives

FeCl₃: Chlorure de fer

FAO: Food and agricultural organization

g: Gramme

GAE : Acide Gallique Equivalent

H₂SO₄: Acide sulfurique

ha: Hectare

H : heure

HCl : Acide chlorhydrique

HDL: High density lipoprotein

H₂O₂: Eau oxygénée

KOH: Hydroxyde de potassium

ml: Millilitre

m: Mètre

mm: Millimètre

mg: Milligramme

MS : Matière sèche

nm : Nanomètre

MgSO₄: Sulfate de magnésium

NaOH : Hydroxyde de sodium

N : Normalité

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit

NH₄OH : Chlorure de Sodium

OMS : Organisation mondiale de la santé

SOD : Superoxyde dismutase

TCA : Acide trichloracétique

V : Volume

UV : Ultraviolet

μl: Microlitre

μg: Microgramme

%: Pourcentage

Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales, nous nous sommes intéressées à l'étude d'une espèce végétale poussant spontanément dans la région d'Adrar, appelée *Pergularia tomentosa* L. appartenant à la famille Asclépiadacées. L'extraction de composés phénoliques a permis d'obtenir un rendement important de l'ordre de 17,6 %. Le fractionnement de l'extrait méthanolique nous a révélé que la fraction AcOEt (1,63%) et l'éther diéthylique (1,50%) présente un rendement plus élevé, par rapport à la fraction n-buOH (0,33%). Les dosages des polyphénols totaux et des tanins par la méthode de Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes par la méthode d'AlCl₃, ont révélé des teneurs de l'ordre de 131,5 mg / 100g de MS ; 45,1 mg /100 g de MS et 91,7 mg /100g de MS respectivement. L'évaluation de pouvoir antioxydant qui a été réalisée en utilisant la méthode de DPPH, a montré que les fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes (EC₅₀=0.65mg/ml et EC₅₀=0.33mg/ml), ont un pouvoir antioxydant relativement puissant par rapport à celui de l'acide ascorbique.

Mots clés: *Pergularia tomentosa* L, composés phénoliques, flavonoïdes, tanins, activité antioxydante, DPPH.



Abstract

In this work we are interested in the study of a medicinal plant growing wild in the Adrar region, called *Pergularia tomentosa L* Family Asclépiadacées. The extraction of phenolic compounds made it possible to obtain an important yield of about 17,6%. The fractionation of the extract methanolic revealed that the AcOEt fraction (1,63%) and the ether diethyllic (1,50%) presents a higher yield, compared to the n-buOH fraction (0,33%). The quantitative determinations of total polyphenols and tannins by Folin Ciocalcu method and flavonoids by the($AlCl_3$) method of showed levels whose values are in order to 131,5 mg/100g of DM; 45,1 mg /100 G of DM and 91,7 mg /100g of DM respectively. The evaluation of antioxidant power was performed using the method of DPPH, showed that fraction AcOEt, n-buOH of flavonoids ($EC_{50}=0.65\text{mg/ml}$ of $EC_{50}=0.33\text{mg/ml}$) have a relatively a strong antioxidant power than ascorbic acid.

Keywords: *Pergularia tomentosa L*, phenolic compounds, flavonoids, tannins, antioxidant activity, DPPH.

ملخص

في إطار هذا العمل اهتمنا بدراسة نبتة تنمو بشكل عفوي في منطقة أدرار، تسمى *Pergularia tomentosa L* و تنتمي لعائلة Asclépiadacées. سمح استخلاص المركبات الفينولية الحصول على مردود معتبر يقدر ب 17.6%. كما بين فصل المستخلص الميثانولي أن جزء AcOEt (1,63%) و l'éther diéthylique (1,50%) أعطى مردود أكبر من جزء n-buOH (0,33%). بينت المعايير الكمية للفينولات الكلية والطانا باتباع طريقة Folin-Ciocalteu و الفلافونيدات بطريقة $AlCl_3$ أن محتوى الخام الميثانولي منها هو 131,5 مغ/100 غ و 45,1 مغ/100 غ و 91,7 مغ/100 غ على التوالي. تقدير النشاط المضاد للأكسدة باستعمال طريقة DPPH، بين أن الأجزاء AcOEt و n-buOH للفلافونيدات ($EC_{50}=0.65\text{mg/ml}$ و $EC_{50}=0.33\text{mg/ml}$) تملك قدرة مضادة للأكسدة ضعيفة نسبيا بالمقارنة مع حمض الأسكوربيك.

الكلمات المفتاحية: *Pergularia tomentosa L* , المركبات الفينولية، الفلافونيدات، الطانا، النشاط المضاد للأكسدة، DPPH.

Table des matières

Introduction générale.....	01
----------------------------	----

Synthèse bibliographique

Chapitre I. Présentation de plante étudiée

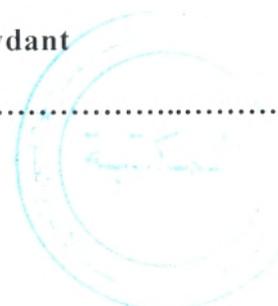
1-Présentation d'asclépiadacée.....	03
2-Présentation de l'espèce <i>Pergularia tomentosa</i> L.....	03
2.1. Description botanique.....	03
2.2. Distribution géographique.....	04
2.3. Systématique.....	05
3-Usage traditionnel.....	06
4-Activités biologiques de <i>Pergularia tomentosa</i> L.....	07

Chapitre II. Métabolites secondaires

1-Introduction.....	08
2-Les métabolites secondaires.....	08
3- Les composés phénoliques.....	08
3.1. Généralités.....	08
3.2. Classification.....	09
4-Les flavonoïdes.....	11
4.1. Structure des flavonoïdes.....	11
4.2. Biosynthèse.....	12
4.3. Classification.....	14
4.4. Propriétés biologiques des flavonoïdes.....	15
5-Les tanins.....	15
5.1. Tanins hydrolysables.....	16
5.2. Tanins condensés.....	16
5.3. Propriétés pharmacologiques.....	17

Chapitre III. Stress oxydant et antioxydant

1-Introduction	18
----------------------	----



2-Stress oxydatif.....	18
2.1. Définition.....	18
2.2. Origine de stress oxydatif.....	18
3-Radicaux libres.....	18
3.1. Définition.....	18
3.2. Origine des radicaux libres.....	20
4-Antioxydant.....	21
4.1. Définition.....	21
4.2. Systèmes antioxydants endogènes.....	21
4.3. Systèmes antioxydants exogènes.....	22
5-Méthodes de détection du pouvoir antioxydant.....	22
5. 1. Méthodes indirectes basées sur le transfert de protons.....	23
5.1.1. ORAC (<i>Oxygene Radical Absorbance Assay</i>).....	23
5.1.2. TRAP (<i>Total Radical-trapping Antioxydant Parameter</i>).....	23
5.2. Méthodes indirectes basées sur le transfert d'électrons.....	23
5.2.1. FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>).....	24
5.2.2. TEAC (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>).....	24
5. 2.3. DPPH (<i>2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>)	24
5. 2.4. Folin-Ciocalteu.....	24
5. 3. Méthode de détection directe-Résonance paramagnétique électronique.....	24

Partie expérimentale

MATERIEL ET METHODES

1-Récolte et Préparation des échantillons	26
2- Détermination du taux d'humidité	26
3-Tests phytochimiques.....	27
4- Extractions sélectives	29
4.2 Extraction des tanins.....	29
4.3 Extraction des flavonoïdes.....	29
4.4 Extraction des alcaloïdes.....	30
5- Dosage des composés phénoliques	31
5.1 Dosage des phénols totaux	31



5.4 Dosage des flavonoïdes	32
5.5 Dosage des tanins totaux	32
5.2 Dosage des tanins condensés.....	33
5.3 Dosage des tanins hydrolysables	34
6-Pouvoir antioxydant : piégeage de radical libre DPPH.....	34
7- Analyse statistique	37

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1-Détermination de la matière sèche.....	38
2-Tests phytochimiques.....	38
3-Extraction sélectives	39
4-Dosage des phénols totaux.....	41
5-Dosage des flavonoïdes.....	42
6-Dosage des tanins totaux.....	42
7-Dosage des tanins condensés et tanins hydrolysables	43
8- Pouvoir antioxydant des extraits des métabolites secondaires des feuilles de <i>P.tomentosa</i> L.	44
Conclusion générale.....	48
Référence bibliographique.....	50
Annexe.....	57

Introduction générale



Environ 35 000 espèces de plantes sont employées dans le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les être humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (Elqaj et al, 2007)

Ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études. Aujourd'hui les principes actifs des plantes sont des composants essentiels d'une grande partie de nos médicaments et produits de soins (Hans, 2007). Malgré les multiples progrès de la médecine moderne, il y a un net regain d'intérêt vis-à-vis de la phytothérapie. Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) plus de 80% de la population mondiale ont recours à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de la santé (Farnsworth et al, 1986).

La recherche des principes actifs extraits des plantes est donc d'intérêt capital puisqu'elle a permis la découverte de nouveaux remèdes thérapeutiques.

C'est dans ce cadre que nous avons opté pour l'étude d'une espèce appartenant à la famille des asclépiadacées, *Pergularia tomentosa* L. récoltée dans la région d'ADRAR. Selon la littérature, aucune étude n'a été réalisée sur l'espèce végétale *Pergularia tomentosa* L.

Ce travail a pour but la valorisation de *Pergularia tomentosa* L et donc pour objectif général d'étudier la phytochimie et l'activité antioxydante des feuilles de cette plante.

En effet notre étude a été réalisée en trois parties :

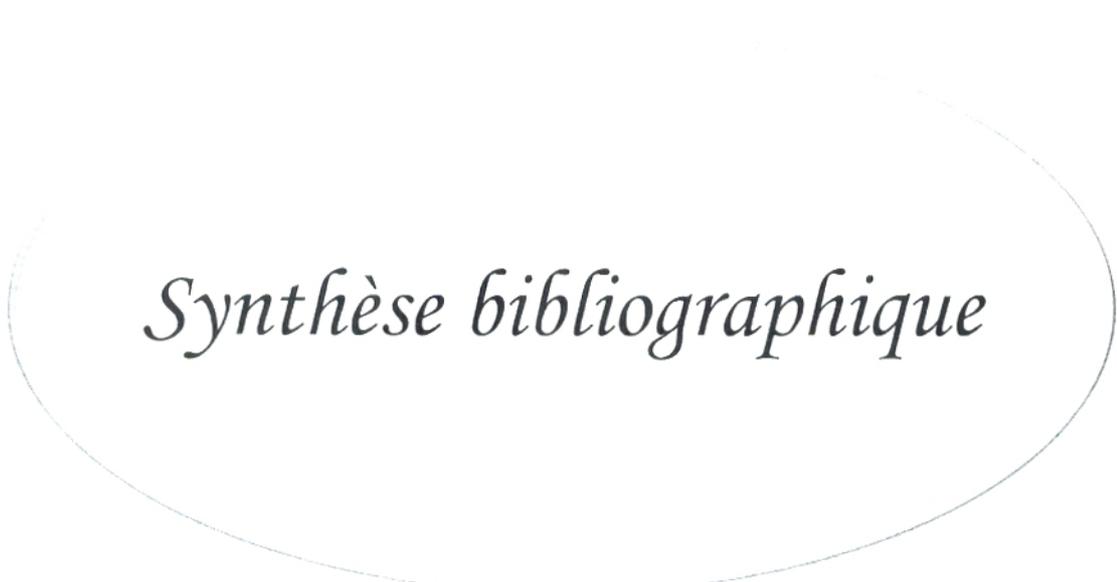
Dans la première partie de ce manuscrit, une étude bibliographique est effectuée sur :

- La description botanique et la répartition géographique de la plante.
- La définition et les propriétés biologiques des grandes familles de métabolites secondaires des plants qui sont doués d'activités pharmacologiques. à savoir : Les flavonoïdes, les tanins.
- La définition et l'origine du stress oxydatif. Ainsi que la présentation des différents types des antioxydants.

Dans la deuxième partie expérimentale répartie comme suit :

- Extractions sélectives et analyses :
 - ✓ Extraction des composés phénoliques.
 - ✓ Dosage des phénols totaux.
 - ✓ Dosages des flavonoïdes.
 - ✓ Extraction des flavonoïdes.
 - ✓ Extraction des tanins.
 - ✓ Dosage des tanins.
- Activité biologique : étude de pouvoir antioxydant de l'extrait brut des polyphénols totaux par la méthode du piégeage du radical libre DPPH.

La troisième partie est consacrée à la discussion des résultats obtenus lors cette étude.



Synthèse bibliographique

Chapitre I
Présentation de plante étudiée
« *pergularia tomentosa* L »

1. Présentation des asclépiadacées :

Importante famille tropicale, qui est peu représentée au Sahara septentrional mais compte déjà une dizaine d'espèces dans le Sahara central. Ce sont des plantes vivaces, de port très variable, à feuilles simples généralement opposées, parfois par trois, à tissu sécrétant un latex; les fleurs sont régulières de type 5 mais présentent des particularités de structure curieuses. Les filets des étamines portent du côté externe des appendices de forme variée, le plus souvent en languette, dont l'ensemble est appelée *couronne*; les étamines elles-mêmes sont soudées en partie à la région stigmatique de l'ovaire et l'ensemble forme un organe spécial appelé *gynostège*. Le pollen n'est pas pulvérulent mais aggloméré sous forme de masses correspondant chacune au contenu d'une loge d'anthere et que l'on appelle *pollinies*; il est transporté par les insectes grâce à des dispositifs spéciaux. L'ensemble de ces caractères rappelle beaucoup ce que l'on observe chez les Orchidées (**Ozenda, 1958**).

Le pistil comprend deux carpelles qui sont libres ou presque libres dans leur partie ovarienne et soudés entre eux au niveau du style et du gynostège; ce dernier se termine par un plateau pentagonal situé au centre même de la fleur. Au cours de la maturation, les carpelles se séparent complètement et le fruit comprend un ou deux follicules, suivant que les deux carpelles se développent ou que l'un des deux avorte; les graines sont nombreuses et généralement pourvues d'une aigrette de poils. (**Ozenda, 1958**).

2. Présentation de l'espèce *Pergularia tomentosa* L :

2.1. Description botanique :

Pergularia tomentosa L est une plante herbacée ou semi-ligneuse, à tige grimpante ou volubile. Les feuilles sont simples, pétiolées, ovales, orbiculaires, cordées à la base et apiculées. Elles sont tomenteuses sur les deux faces au stade jeune et glabres au stade adulte. Elles mesurent environ 5 cm de diamètre mais souvent plus petites. Les fleurs sont souvent blanc-pourpre et odoriférantes avec une corolle tubulaire blanche ou pourpre qui mesure 8 mm de long. Les fruits, qui sont des follicules groupés par paire, sont fusiformes, divergents et couverts de rugosités. Ils sont pubescents et crochus à leur sommet. Ils mesurent 7 cm de long et s'ouvrent par une fente longitudinale par où s'échappent les graines. (**AMANI et BARMO , 2010**)

2.2. Distribution géographique :

Pergularia tomentosa L est une plante vivace des pays secs. Elle pousse sur les sols généralement sableux et couvre de vastes régions allant du sud Algérien jusqu'en Afrique du Nord. **Saadou (1990)** a relevé sa présence dans quatre compartiments phytogéographiques qui vont du climat sud-sahélien au climat nord-sahélien. Elle fleurit en saison sèche, sa souche vivace pousse en saison des pluies et donne une plante feuillue.

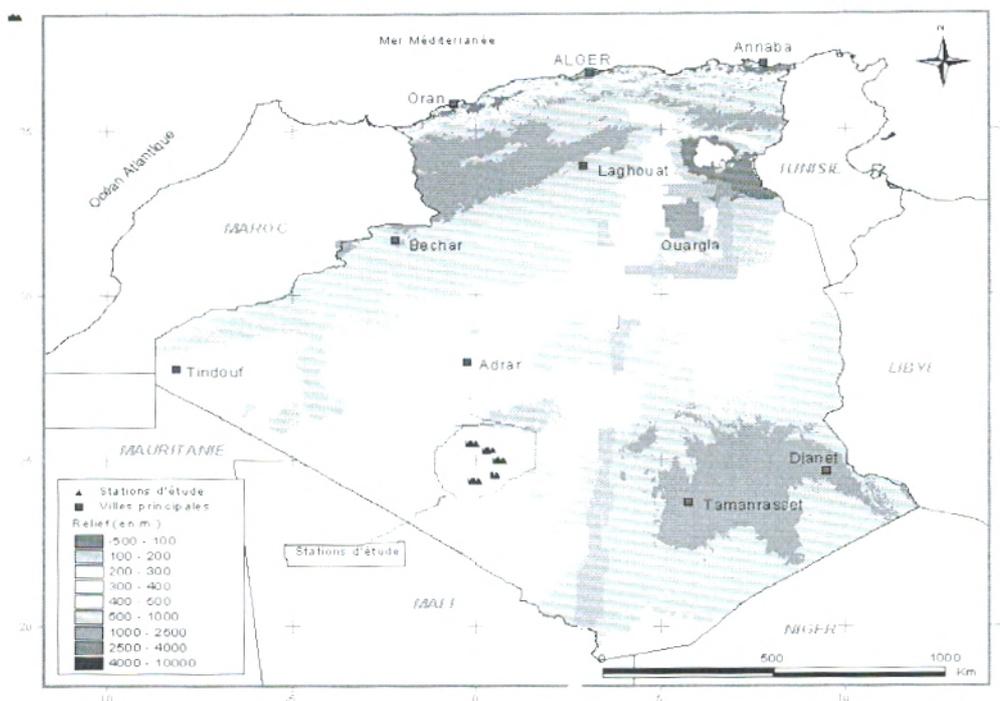


Figure 01: Répartition géographique spatiale de *Pergularia tomentosa* L. (A.N.R.H, 2004)

2.3. Systématique :

Selon **Dupont et Guignard (2007)**, la classification qu'occupe *Pergularia tomentosa* L dans la systématique est la suivante :

Embranchement :	Spermatophyte
Sous- embranchement :	angiosperme
Classe :	dicotylédones
Sous classe :	rosidae
Ordre :	gentianale
Famille :	asclépiadacée
Genre :	pergularia
Espèce :	<i>Pergularia tomentosa</i> L.
Nom Arabe :	sellakha, sellaha



Photo01 : Pergularia tomentosa L.

3. Usage traditionnel :

- Cette plante est utilisée pour le tannage, écrasée et étalée sur la peau. Elle fait tomber les poils rapidement. A cet effet on pile la plante et on étend la pâte ainsi obtenue sur la peau: après quelques heures de contact un simple grattage fait tomber très facilement les poils.
- En application, le lait contenu dans la plante fait ressortir les épines de la peau.
- Plante également utilisée contre les morsures de serpent.
- Cette plante est peu consommée à l'état vert. Parce qu'elle entraîne des intoxications (Maman., 2003).
- D'après Hassan 2007 les morsures vénéneuses sont lavées avec de l'eau dans laquelle on a fait tremper des feuilles et des tiges pilées de *Pergularia tomentosa*.
- L'augmentation de potassium alimentaire diminue la pression artérielle chez l'homme et réduit le risque d'accident vasculaire cérébral. Ainsi, le maintien d'un apport élevé en potassium peut être atteint en consommant les tiges et les racines de *P. tomentosa*. (Hassan et Umar., 2007).
- La plante est aussi utilisée contre les bronchites et les hémoptysies et la tuberculose. a cet effet on récolte la racine et on la conserve fraîche à l'abri de l'air.
- A l'état sec elle est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter les douleurs dentaires et la fatigue générale.
- Elle constitue aussi un palliatif alimentaire pour le bétail pendant les moments difficiles de l'année. En perspective, la valorisation de cette espèce peut se diversifier lorsqu'on envisage son incorporation à une proportion acceptable dans la formulation des aliments pour bétail (Maman., 2003).

4. Activités biologiques de *Pergularia tomentosa* L :

4.1. Activité anti microbiennes :

D'après Hassan et Umar 2007, les extrait de *P.tomentosa* inhibe les champignons comme : *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*, le mécanisme d'action des extraits de *P. tomentosa* contre les pathogènes fongiques peut être due à l'inhibition de la paroi des cellules fongique.

4.2. Activité anti oxydante :

D'après **Talwar, 1989**, les magnésiums sont des micronutriments antioxydants et leur présence pourrait donc stimuler le système immunitaire, et aider à éliminer les carences en magnésium qui pourraient conduire à de graves troubles métaboliques et de compromettre la santé de l'organisme.

4.3. L'activité molluscicide :

Les cardénolides de *Pergularia tomentosa* L trouvés dans ses extrait sont toxiques pour les escargots terrestres (**Hussein et al., 1994**),et aussi pour les mammifères (**Davies et Whyte., 1989; Galey et al., 1996**).

4.4. Activité cytotoxique :

Huit glycosides cardénolides ont été isolés à partir des racines de *Pergularia tomentosa* L pour étudier l'activité potentielle contre les cancers, ces composés testés in vitro ont montré l'inhibition de croissance de cellule de différentes lignées cellulaires cancéreuses humaines, et pour leur capacité à inhiber la $Na^+ / K^+ -ATPase$, (**Piacente., 2009**).

Les résultats obtenus suggèrent que les caractéristiques structurales des cardénolides étudiés ont des propriétés spécifiques cytotoxiques. (**Piacente et Masullo., 2009**).



Chapitre II
*Métabolites
secondaires*

1. Introduction :

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes, depuis XVIII^{ème} siècle, au cours duquel des savants ont commencé à extraire et à isoler les substances chimiques qu'elles contiennent, on considère les plantes et leurs effets en fonction de leurs principes actifs. La recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de médicaments essentiels (Iserin et al, 2001)

2. Les métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires sont des produits à structures chimiques souvent complexes, très dispersés et différents selon les espèces ; ils sont produits en très faibles quantités, ils existent plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leurs apparences chimiques (Fouche et al., 2000).

Trois grandes catégories de métabolites secondaires ont été définies :

- Composés aromatiques : Phénoliques, acide shikimique ou dérivé d'acétate
- Terpénoïdes et Stéroïdes
- Composés azotés ou alcaloïdes

Nous citons à titre d'exemple, les composés phénoliques, plus particulièrement les flavonoïdes et les tanins.

3. Les composés phénoliques :

3.1. Généralités:

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement. ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Urquiaga et Leighton, 2000). La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (Macheix et al. 2005).

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes

(Allélopathie), entre les plantes et les symbioses, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes, ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel (**Macheix et al., 2005**).

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) (**Macheix et al., 2005**).

3.2. Classification :

Les polyphénols naturels regroupent donc un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants. Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques (acide gallique), à des composés hautement polymérisés, de plus de 30 000 Dalton. Comme les tanins (acide tannique). Le (**Figure 02**) résume les principales classes phénoliques.

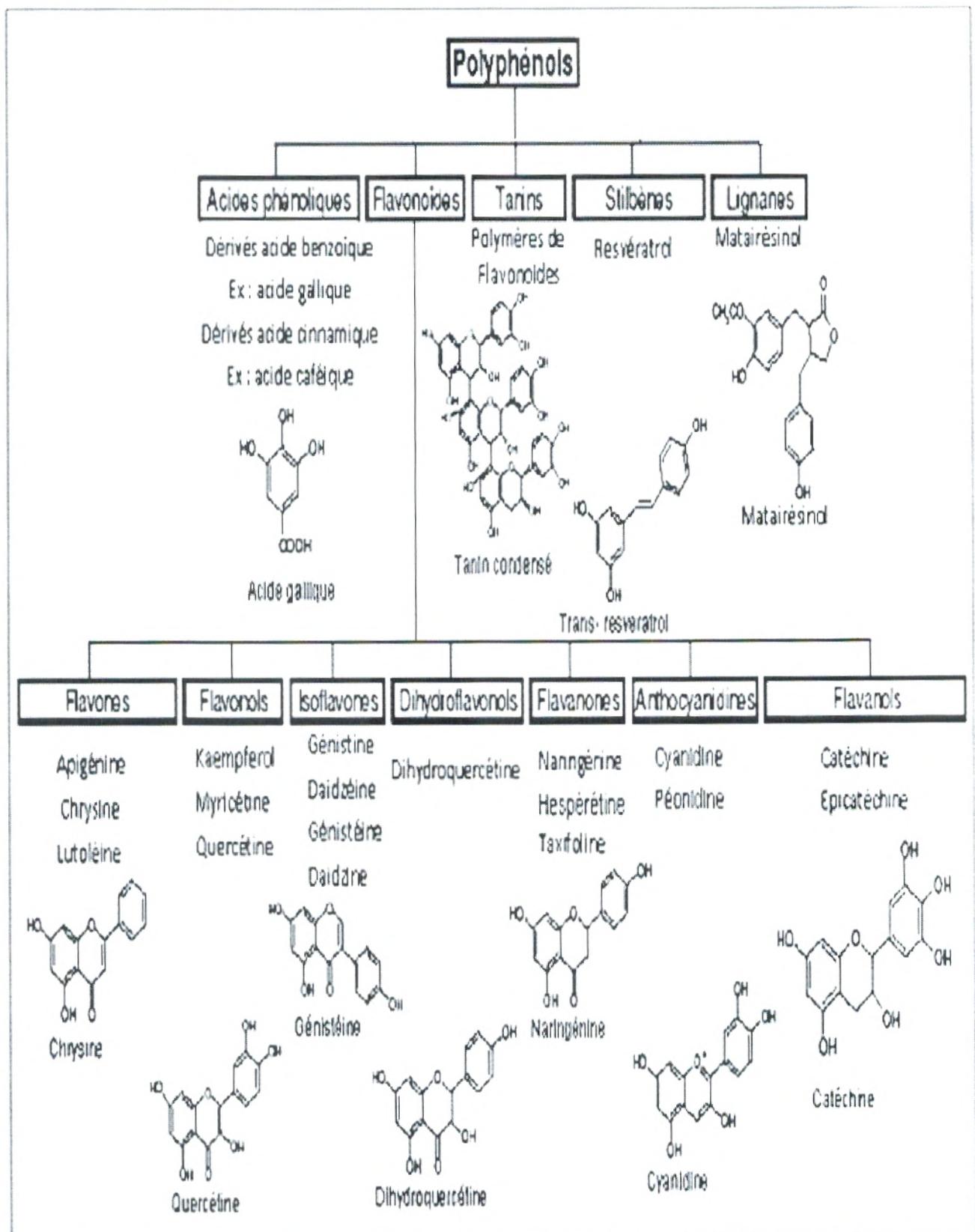


Figure 02 : Principaux composés phénoliques (Macheix et al., 2005).



4. Les flavonoïdes :

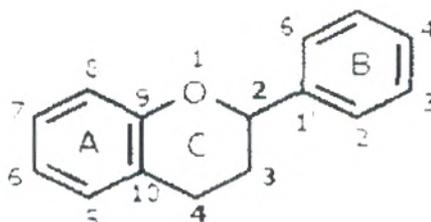
Les flavonoïdes sont des pigments jaunes, généralement polyphénoliques, très répandus chez les végétaux ; ils sont responsables en particulier de la coloration des fleurs, des fruits et même des feuilles. Abondants chez les plantes supérieures, ils sont présents dans tous les organes jeunes, feuilles et boutons floraux (**Roux et Catier, 2007**). Ils sont rencontrés dans les fruits (notamment le genre *Citrus* où ils présentent jusqu'à 1% des fruits frais), les légumes et les boissons telles que le thé, le café et le vin (**Ghedira, 2005**).

Les flavonoïdes sont des composés de faibles poids moléculaire synthétisés dans les chloroplastes par 2 voies : la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate-malonate puis se dissolvent dans les vacuoles (**Bruneton, 1999**).

Le nom flavonoïde proviendrait du terme *flavedo*, désignant la couche externe des écorces d'orange (**Piquemal, 2008**), cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du *flavus* ; (*flavus*=jaune) (**Karaali et al., 2004 ; Malesev et Kuntic, 2007**).

4.1. Structure des flavonoïdes :

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base (figure 03), 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) (**W-Erdman et al., 2007**). 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 (**Marayana, 2001; Malesev et Kuntic, 2007**).



Figures 03 : Structure de base des flavonoïdes (**Bruneton, 1999**).

4.2. Biosynthèse :

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune. Leur biosynthèse se fait à partir d'un précurseur commun l'acétyl CoA. Après une série de réaction, l'acétyl CoA est métabolisée en flavanone. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavon synthase ou la (2S) - flavanone-3-hydroxylase pour permettre la formation de la flavone (apigénine ou dihydroflavonol) : (2R, 3R)-dihydrokaempférol. Les deux enzymes fonctionnent différemment, la première introduit la double liaison entre les carbones C-2 et C-3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du carbone C-3. Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4-réductase, se métabolise en flavonol : kaempférol ou en flavan-3,4-diol : leucoanthocyanidol.

Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3-ols et anthocyanidols. Le pélargonidol , sous l'action de la 3-O glycosyltransférane, se transforme en anthocyanoside : pélargonidol-3-glucoside.les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C-3 intermédiaire.

A l'état naturel, les flavonoïdes sont souvent sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylées (**figure 04**) (**Bruneton, 1999**).

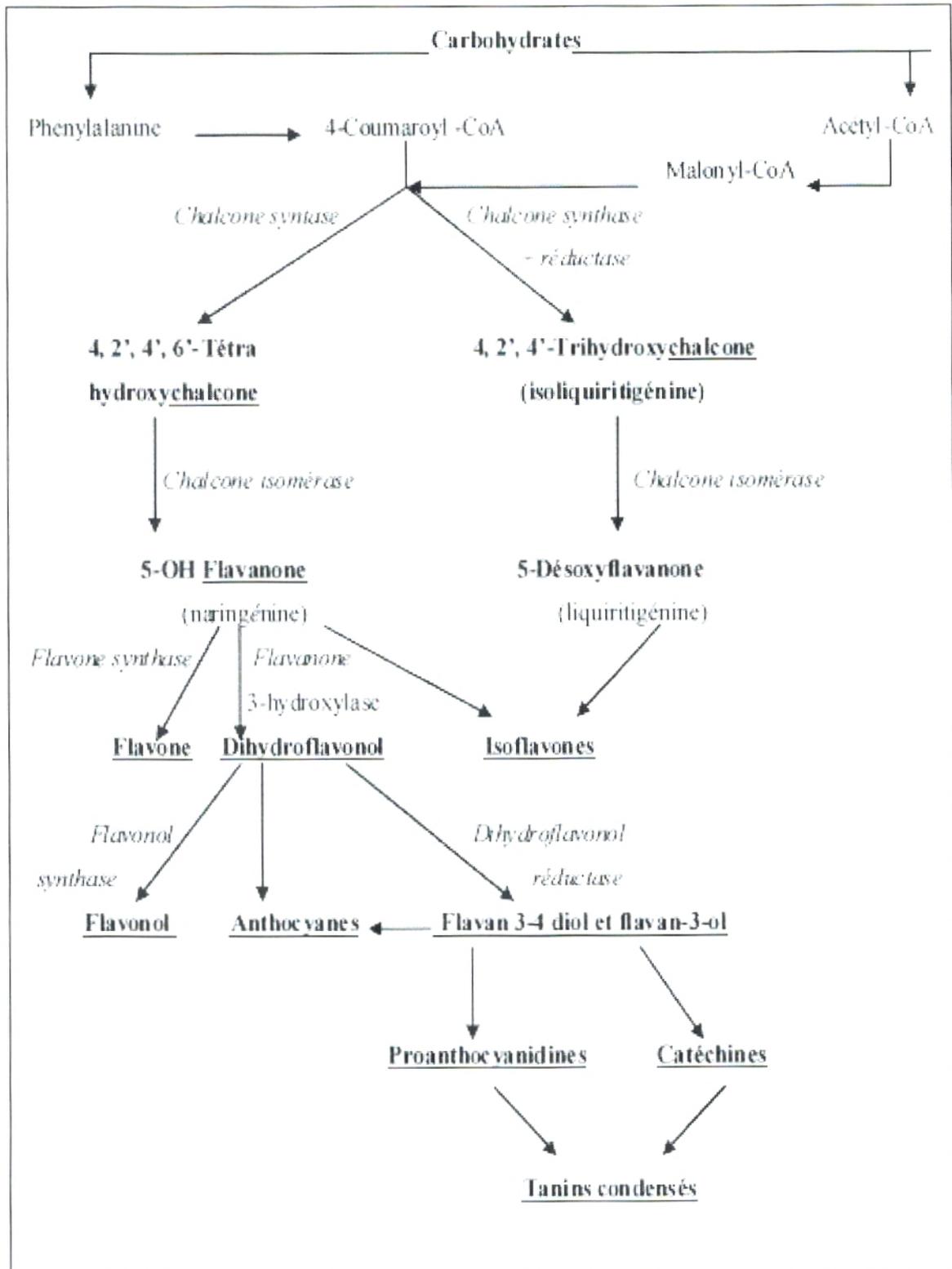


Figure 04 : La biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

4.3. Classification :

Tous les flavonoïde ont une origine biosynthétique commune et de ce fait possèdent le même élément structural de base. Ils peuvent être regroupés en différentes classe selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, le noyau B relié à l'hétérocycle C dans les position 2,3 (Figure05).

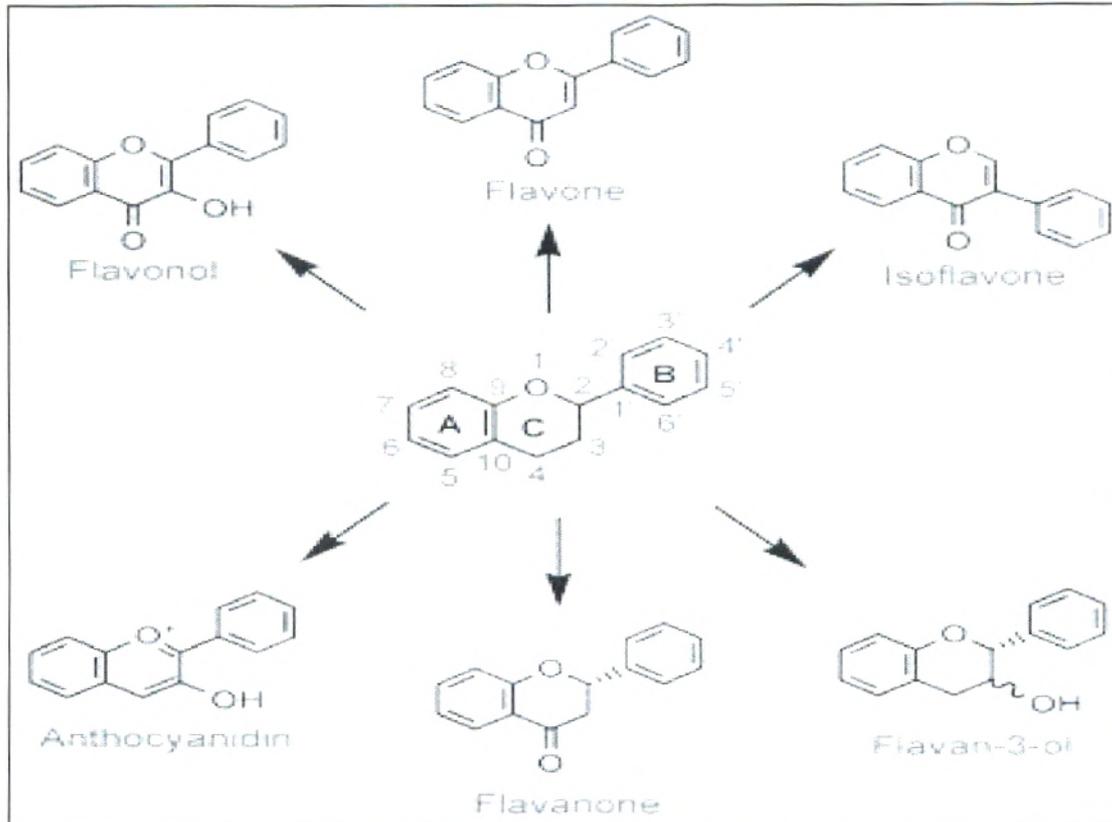


Figure 05 : principales classes des flavonoïdes (Narayana et al. , 2001)

4. 4. Propriétés biologiques des flavonoïdes :

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

A / Propriétés anti radicalaires :

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donner d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle (Amie et al, 2003).

B / Propriétés chélatrices des ions métalliques :

Les ions métalliques sont nécessaires pour le fonctionnement des processus biochimiques et physiologiques cellulaires, mais dans certains cas et lorsque leur mécanisme d'action n'est pas bien contrôlé ces mêmes ions peuvent être à l'origine d'une peroxydation lipidique, un stress oxydatif, ou une blessure des tissus, à titre d'exemple Cu^{+2} est un stimulateur de la peroxydation des LDL (Tiqwari, 2001).

C / Propriétés antibactériennes :

Les flavonoïdes sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolases (les protéases et les carbohydrolases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

D / Propriétés anticancéreuses :

Depuis longtemps, on associe le cancer et le type d'alimentation. De nombreux chercheurs ont étudié le rôle des nutriments dans le développement des cancers. Plus récemment des recherches expérimentales suggèrent que les flavonoïdes sont parmi les substances susceptibles de retarder voire d'empêcher l'apparition de certains cancers, tout en réduisant d'une manière spécifique les risques d'en avoir chez les sujets humains (Decloitre, 1993).

5. Les tanins :

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structures variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant. Très répandus dans le règne végétal ils peuvent exister dans divers organes, mais on note une accumulation plus particulièrement dans les tissus âgés ou d'origine pathologique. Ils sont localisés dans les vacuoles, quelque fois combinés aux protéines et aux alcaloïdes. (Roux et Catier, 2007).

Ils se distinguent clairement des autres composés phénoliques secondaires dans leur réactivité chimique et des activités biologiques (Hagerman, 2002).

Il est classique de distinguer deux grands groupes de tanins différents : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Maeheix et al, 2005).

5.1. Tanins hydrolysables :

Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (alcaline ou acide) ou enzymatique. Ils libèrent alors une partie phénolique qui peut être :

- Soit de l'acide gallique (cas des gallotanins comme le tanin de Chine, quelquefois appelé "acide tannique");
- Soit un dimère de ce même acide, l'acide ellagique (cas des tanins ellagiques comme ceux du châtaignier), et une partie non phénolique (souvent du glucose).

Une forme simple de ce type de tanins est le pentagalloylglucose, molécule très réactive qui est à l'origine de la plupart des formes complexes, par exemple la castalagine chez le châtaignier ou le chêne (**figure 06**) (Macheix *et al.*, 2005).

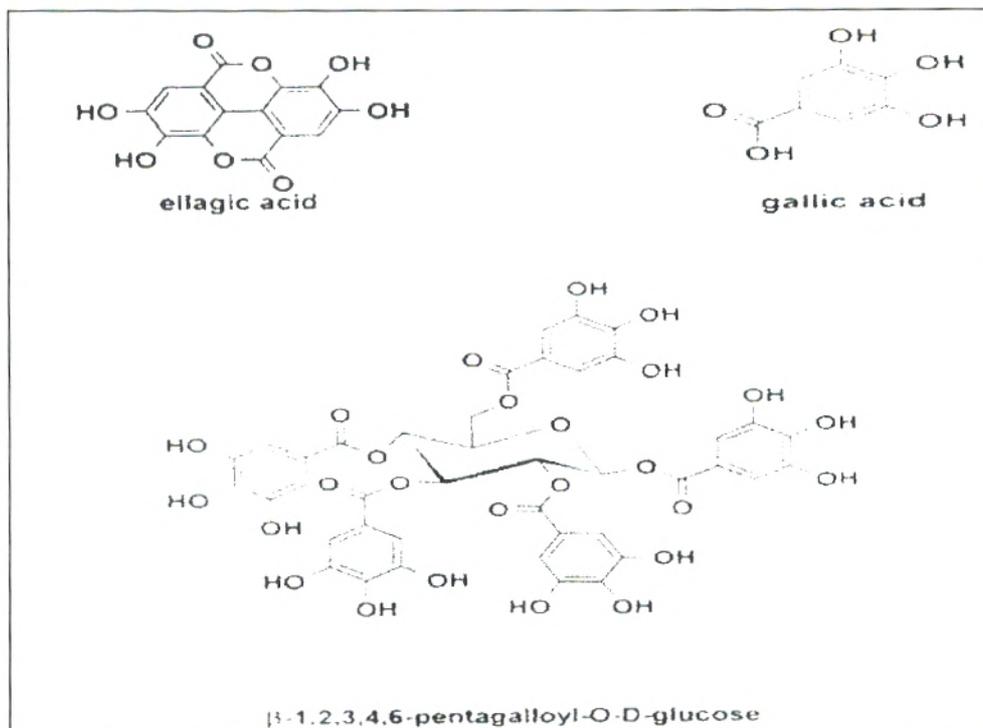


Figure 06: Structure chimique de quelques tanins hydrolysables (Hagerman, 2010)

5.2. Tanins condensés:

Les tanins condensés sont des oligomères ou des polymères de flavan-3-ols (éventuellement de flavan-3,4-diols) dérivés de la (+)-catéchine ou de ses nombreux isomères et constituent la classe des tanins catéchiques (**Figure 04**). (Macheix *et al.*, 2005).

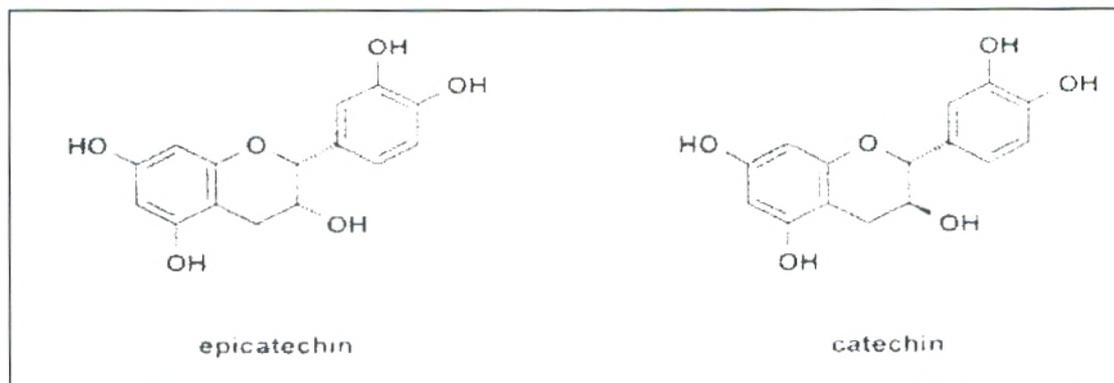


Figure 07 : Structure des tanins condensés (Hagerman , 2010)

5.3. Propriétés pharmacologiques :

Les applications des drogues à tannins sont restreintes, et sont dues à leur affinité pour les molécules protéiques. Par voie interne, ils ont un effet antidiarrhétique.

Par usage externe, ils imperméabilisent les couches les plus externes de la peau et des muqueuses, protégeant ainsi les sous-jacentes et en empêchant les agressions externes. Les tanins favorisent la régénération des tissus en cas de blessures superficielles ou de brûlures. Ils ont un effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels.

Quelles que soit la voie d'administration l'effet antiseptique, antibactérien et antifongique, est intéressant notamment pour les diarrhées infectieuses et les dermatoses.

D'une façon générale, se sont des inhibiteurs enzymatiques. Certains tanins, aux structures voisines de celles des flavonoïdes, ont des propriétés vitaminiques P (protecteur capillaire) et veinotoniques (Roux et Catier, 2007).

Chapitre III

Stress oxydant et antioxydant

1. Introduction :

Le stress oxydant cause des dommages sur les molécules biologiques (ADN, lipides, protéines...). L'accumulation de ces dégâts est à l'origine de pathologies telles les maladies cardiovasculaires, le vieillissement, le cancer, l'inflammation, les maladies neurodégénératives. L'organisme dispose de divers moyens de défense contre le stress oxydant. L'une des voies de lutte contre le stress oxydant est la consommation adéquate d'aliments riches en antioxydants. Les meilleurs antioxydants exogènes sont la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes et les polyphénols. De ce fait, les chercheurs se sont intéressés ces dernières années, à des antioxydants naturels, notamment ceux issus des plantes. (N'Guessan *et al.*, 2009).

2. Stress oxydatif :

2.1. Définition:

Le stress oxydatif est l'agression chimique de notre organisme par les radicaux libres. Il représente l'incapacité pour l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées réactives (EOR), en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défense des antioxydants (Kœchlin-Ramonatxo, 2006).

2.2. Origine du stress oxydatif:

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants /prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant » (Favier, 2003).

3. Radicaux libres :

3.1. Définition :

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. Dans les phénomènes de stress oxydant, les radicaux libres qui interviennent ont une propriété caractéristique commune, celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène ceci lui confère la dénomination de radicaux libres «centrés» sur l'oxygène, les

Oxyradicaux ou espèces radicalaire dérivées de l'oxygène peuvent avoir différentes structures (Delattre *et al.*, 2005).

Les principaux radicaux libres sont l'anion superoxyde O_2^- , le radical hydroxyle OH^\cdot et le monoxyde d'azote NO (Yoshikawa et al., 2000). D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet $\frac{1}{2} O_2$, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux (Favier, 2003).

3.2. Origine des radicaux libres :

C'est au cours de la combustion des aliments absorbés par l'organisme que sont produits un certain type de déchets d'oxygène : les radicaux libres. Ceux-ci sont donc parfaitement naturels. Ils participent d'ailleurs à la réponse immunitaire de l'organisme en aidant à tuer les bactéries pathogènes, les virus et les cellules défaillantes ou vieillissantes. Mais ils peuvent également être nocifs. En effet, l'organisme vieillissant, les radicaux libres entraînent un stress oxydatif caractérisé par des électrons célibataires très réactifs. De plus, à ce phénomène interne s'ajoutent des facteurs extérieurs aggravants, comme la pollution, la fumée de cigarettes et les UV (Loïn, 2008).

La **figure 08** résume l'origine des différents radicaux libres oxygénés et des espèces réactives de l'oxygène impliqué dans le stress oxydant (Delattre et al, 2005).

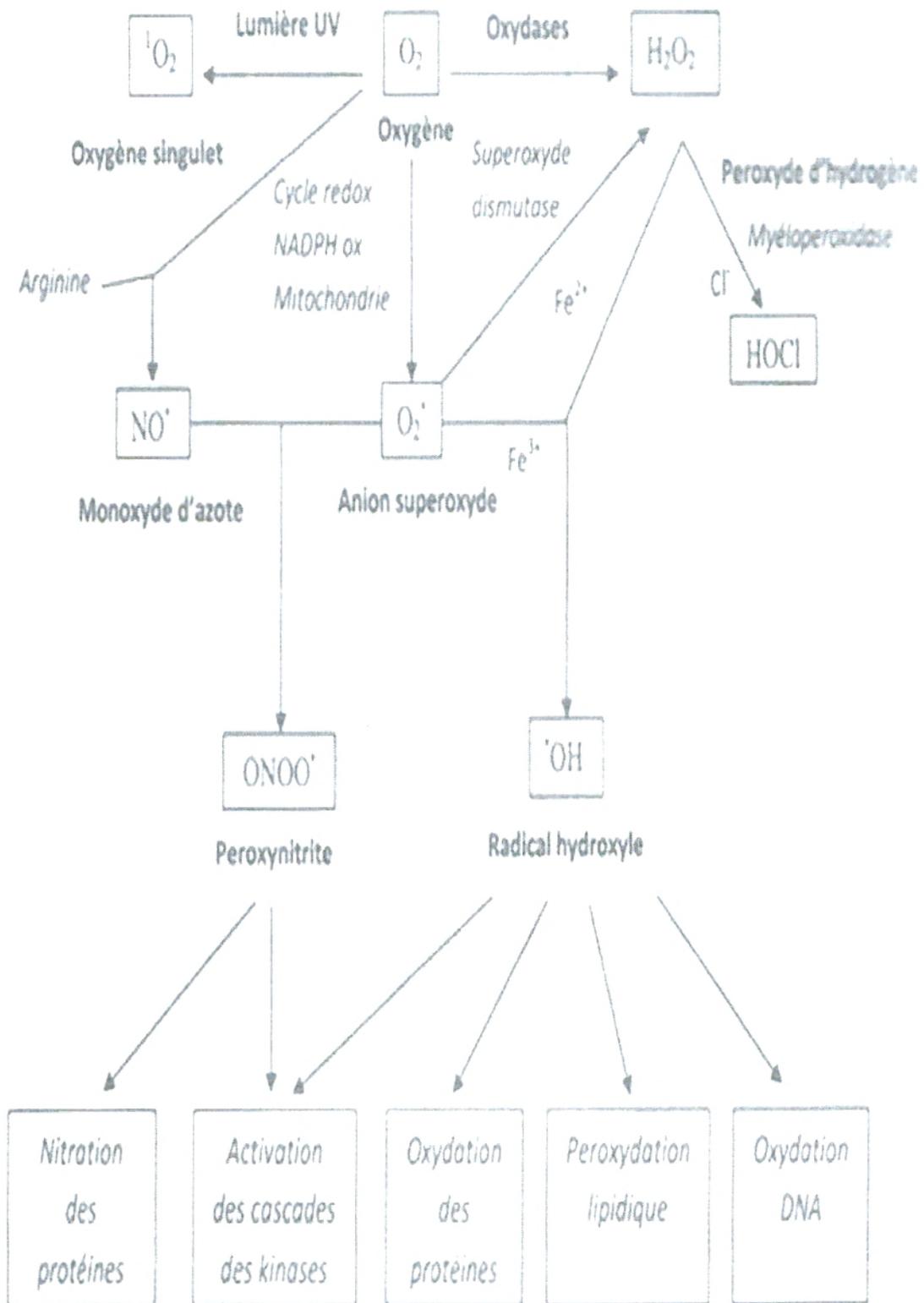


Figure 08: Origine des différents radicaux libres oxygénés et des espèces réactives de l'oxygène (Delattre et al., 2005).

4. Antioxydants :

4.1. Définition:

L'organisme a développé des systèmes de défense très efficaces contre la production des radicaux libres dérivés de l'oxygène. Les molécules contrôlant cette production sont désignées par le terme d'antioxydant et désignent « toutes substances qui présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable retardent ou inhibent significativement l'oxydation de substrat » (Halliwell et Gutteridge, 1990).

4.2. Systèmes antioxydants endogènes :

Parmi les systèmes antioxydants endogènes, les systèmes de défense enzymatiques sont reconnus comme étant les plus performants.

4.2.1. Systèmes antioxydants enzymatiques :

4.2.1.1. Superoxydes dismutases :

Les superoxydes dismutases SOD sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation d'ions superoxydes en molécules de peroxyde d'hydrogène et d'oxygène. Ces enzymes sont présentes chez pratiquement tous les organismes vivants et procurent un système de défense essentiel à leur survie en milieu aérobie (Delattre et al., 2005).

La dismutation de l' O_2^- dioxygène et H_2O_2 est effectuée selon la réaction suivante :



(Johnson et Gialivi, 2005)

4.2.1.2. Catalase:

La catalase est une enzyme héminique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes. Son nom a été donné par Loew en 1901 à cause de la capacité de cette protéine à décomposer le peroxyde de l'hydrogène (Delattre et al, 2005).

4.2.1.3. Glutathion peroxydases GPx :

L'activité GPx fut découverte par Mills en 1957. Ces enzymes sont capables de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur. Dans le cas de la GPx, le substrat est le

glutathion mais d'autres peroxydases existent utilisant le cytochrome C (cyto C peroxydase), le NADH (NADH peroxydase) (Delattre et al, 2005).

On distingue 5 iso-enzymes de la GPx chez les eucaryotes : La GPx1 cytoplasmique et mitochondriale, la GPx2 gastro-intestinale, la GPx3 plasmique, la GPx4 ou PH-GPx localisée à l'interface de la membrane interne et du cytoplasme et la GPx5 épидидymaire. La plus abondante est la GPx1 et elle est exprimée dans la plupart des cellules (ursini et al, 1995).

4.2.1.4. Les thiorédoxines :

La thiorédoxine est une protéine possédant une activité oxydoréductase caractérisée par un site active hautement conservé (Arnér et Holmgren, 2000).

Les protéines dans le milieu extracellulaire ou à la surface des membranes sont riches en ponts disulfures traduisant des conditions oxydantes en revanche le milieu intracellulaire est plutôt réducteur et les protéines contiennent des groupements thiols libres et les ponts sont rares.

L'antioxydant majeur ubiquitaire responsable du maintien des protéines à l'état réduit est la thiorédoxine (Trx(SH)) qui est réduite à son tour par le NADH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR) (Delattre et al., 2005).

4.2.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques :

Les principaux systèmes antioxydants non enzymatiques présents dans l'organisme humain comprennent, la bilirubine, les hormones sexuelles (œstrogènes), l'acide urique, le coenzyme Q, la mélanine, la mélatonine et l'acide lipoïque (Delattre et al, 2005).

4.3. Systèmes antioxydants exogènes :

La prévention nutritionnelle du stress oxydant et de ces conséquences implique l'optimisation des apports en antioxydants par l'alimentation. Ainsi, une alimentation riche en antioxydants, en micronutriments (vitamine C, E, caroténoïdes, sélénium, zinc) et d'autres microconstituants comme les flavonoïdes, les sulfures d'allyle diminue le risque de survenue de cancers (Riboli et Norat, 2003) de maladies cardiovasculaires (Hu, 2003), et de maladies dégénératives (Desport et Couratier, 2002).

5. Méthodes de détection du pouvoir antioxydant :

On distingue deux grandes catégories de méthodes de mesure du potentiel antioxydant : des méthodes indirectes, où l'action d'un antioxydant sur les radicaux libres est révélée par l'intermédiaire d'une sonde (souvent fluorescente) ; et des méthodes directes, où l'activité des

radicaux libres est mesurée sans intermédiaire. Le test sera sélectionné en fonction de la nature de l'antioxydant. Il n'existe malheureusement pas de test universel permettant de mesurer le potentiel antioxydant sous toutes conditions possibles (Ives Desjardins , 2008).

5. 1. Méthodes indirectes basées sur le transfert de protons :

Ces méthodes font appel à une source de radicaux libres synthétiques, à des sondes moléculaires oxydables (UV ou fluorescente), et à une source d'antioxydants. Lors de la compétition, l'antioxydant entre en compétition avec la sonde moléculaire pour les radicaux libres et, de ce fait, inhibe son oxydation. Les méthodes les plus souvent utilisées ORAC (Oxygene Radical Absorbance Assay) et TRAP (Total Radical-trapping Antioxydant Parameter) mesurent la capacité d'un antioxydant à piéger un radical libre en donnant un proton et sont donc représentatives des réactions d'oxydation en chaîne des lipides (Brand-Williams *et al.*, 1995).

5.1.1. ORAC (Oxygene Radical Absorbance Assay) :

Le test ORAC mesure la capacité d'un antioxydant à prévenir l'oxydation d'un radical libre (radical peroxy), et reflète assez fidèlement les réactions retrouvées dans les systèmes biologiques. Dans le test ORAC de base, une source de radicaux peroxy réagit avec une sonde fluorescente pour former un produit de réaction non fluorescent quantifié à l'aide d'un fluorimètre qui mesure la perte de fluorescence dans le temps. Le teste, qui se déroule sur une période d'au moins 30 minutes, compare l'intégrale de l'aire entre la courbe de perte de fluorescence d'un échantillon témoin et celle engendrée par l'ajout d'un antioxydant (Brand-Williams *et al.*, 1995).

5.1.2. TRAP (Total Radical-trapping Antioxydant Parameter) :

Cette méthode mesure la capacité d'un antioxydant à inhiber l'action des radicaux peroxy générés par une sonde fluorescente le 2,2'-azobis (2-amidi-norpopane) dihydrochloride (AAPH). Elle mesure la durée de l'inhibition comparativement à celle du TROLOX, une molécule antioxydante possédant une structure similaire à celle de la vitamine E (Brand-Williams *et al.*, 1995).

5.2. Méthodes indirectes basées sur le transfert d'électrons :

De manière générale, ces méthodes mesurent la capacité d'un antioxydant à transférer un électron pour réduire des radicaux libres (oxydant) qui agissent aussi comme sonde moléculaire. Le changement de couleur de la sonde est habituellement proportionnel à la concentration d'antioxydant (Rize-Evans,1993).

5.2.1. FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*):

Cette méthode d'évaluation du potentiel antioxydant repose sur une mesure colorimétrique du transfert d'électrons d'un antioxydant vers un accepteur d'électron, le 2, 4, 6-tripyridyl,5-triazine ferrique (TPTZ), une molécule, incolore lorsqu'oxydée, devient d'un bleu intense une fois réduite, ce qui permet de le quantifier par spectrophotométrie (**Rize-Evans,1993**).

5.2.2. TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*):

La méthode TEAC est également une mesure colorimétrique du transfert d'électrons d'un antioxydant vers un accepteur d'électrons le sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azabis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sul-phonique (ABTS⁺). Cette activité est standardisée en la comparant à un antioxydant de référence, le TROLOX. Cette méthode se rapproche de celle du FRAP. Elle s'effectue à pH neutre alors que le FRAP s'effectue à pH acide (pH=3.6) (**Rize-Evans, 1993**).

5. 2.3. DPPH (*2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) :

Le 2,2diphényl-picrylhydrazyle(DPPH) est un radical stable et présente une absorption spécifique à 517nm qui lui confère une couleur violette .lorsque le DPPH est réduit par un capteur de radicaux, sa couleur jaune. Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogéné (**Sanchez, 2002**). L'activité antiradicalaire est déterminée par la mesure de l'absorbance à 515nm. Les résultats sont exprimés en pourcentages d'inhibition du DPPH.

5. 2.4. Folin-Ciocalteu :

La méthode de Folin-Ciocalteu, habituellement employée pour mesurer les phénols totaux d'un échantillon, est en réalité une mesure de la capacité réductrice d'un échantillon, donc elle est représentative de son activité antioxydante. Il s'agit d'une réaction colorimétrique d'oxydation par un réactif à base d'un sel de molybdène et de tungstène (**Rize-Evans , 1993**).

5.3. Méthode de détection directe-Résonance paramagnétique électronique :

La seule méthode directe pour mesurer les radicaux libres est la résonance paramagnétique électronique. Cette méthode utilise la propriété paramagnétique du radicale libre, ce qui signifie qu'elle détecte le magnétisme émis par l'électron célibataire du radicale libre. La résonance paramagnétique peut être utilisée pour mesurer le potentiel antioxydant d'un composé dans un milieu non biologique ou sur des échantillons plasmatiques ou tissulaires. Encore plus intéressante,

elle permet également de mesurer le potentiel antioxydant plasmatique in vivo en injectant des piègeurs d'électrons célibataires. Ces molécules vont se lier avec une très forte affinité à certains types de radicaux libres pour donner un produit radicalaire stable qui peut ensuite être décelé par spectroscopie (**Ives Desjardins , 2008**).

Matériel et méthodes

1. Récolte et préparation des échantillons :

Notre plante *Pergularia tomentosa* L à été récoltée pendant le mois de mars dans la région d'Adrar.

Au laboratoire, les feuilles de *Pergularia tomentosa* L sont séchées, broyées et conservées dans des flacons en verre à l'abri de la lumière. La poudre sera utilisée dans les différentes analyses ultérieures.

2. Détermination du taux d'humidité: (Audigie *et al.*, 1980)

- **Principe:**

On procède à une dessiccation de l'échantillon à analyser dans une étuve à la température de 100°C à 105°C et sous la pression atmosphérique jusqu'à l'obtention d'une masse pratiquement constante. Pour éviter toute reprise d'humidité, il convient d'opérer dans des vases émeris, placés dans un dessiccateur. Le taux d'humidité est défini comme étant la perte de poids subit lors de la dessiccation

- **Mode opératoire:**

-Sécher à l'étuve, les vases émeris pendant 30 minutes à 100°C avec couvercles inclinés ;

-Laisser refroidir dans un dessiccateur durant 20 à 30 min, puis peser les vases de tare avec les couvercles, c'est **P1**;

-Mettre dans chaque vase 2 g d'échantillon broyé, fermer les couvercles et peser, c'est **P2** ;

-Placer les vases qui contiennent l'échantillon dans l'étuve pendant 3h à 105°C avec couvercle incliné. Après, mettre rapidement les couvercles et laisser refroidir au dessiccateur pendant 15 min et peser, c'est **P3**;

-Remettre les vases à couvercles inclinés dans l'étuve durant 1 heure et peser comme précédemment.

La différence entre deux pesées doit être inférieure à 2 mg, si non l'opération est renouvelée jusqu'à poids constant.

- **Expression des résultats:**

Le taux d'humidité (%) d'un échantillon de matériel végétal est donné par la formule suivante:

$$\text{Taux d'humidité \%} = [(P_3 - P_2) / (P_1 - P_2)] \times 100$$

Dont :

P_1 : masse en g de la vase de tare vide.

P_2 : masse en g de la prise d'essai avant séchage.

P_3 : masse en g de la prise d'essai après séchage.

Nous avons déterminé la moyenne des pourcentages d'eau de 3 essais dans les mêmes conditions. A partir de la teneur en humidité on peut déterminer le taux de matière sèche qui est donné par la formule suivante:

$$\text{Taux de matière sèche \%} = 100 - \text{Taux d'humidité \%}$$

3. Tests phytochimiques :

L'examen phytochimique permet de détecter la présence ou l'absence des constituants chimiques essentiellement les composés phénoliques comme les tanins et les flavonoïdes, les hétérosides à savoir les saponosides et les composés azotés en particulier les alcaloïdes.

- **Principe :**

La mise en évidence s'effectue par des testes phytochimiques réalisés généralement sur des extraits déjà préparés (par épuisement à chaud ou par macération à froid) ou directement sur la poudre d'échantillon à analyser.

Ils sont basés sur :

-des essais de solubilité des constituants de la plante vis-à-vis des solvants organiques de polarité différente : l'eau, l'éthanol, et l'éther diéthylique.

-des réactions de coloration et de précipitation.

- **Mode opératoire ;**

-L'épuisement est réalisé dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, contenant 50g de poudre de matériel végétal et en présence des solvants suivants: eau et éthanol.

-L'ensemble a été porté à reflux pendant une heure pour chaque solvant. Les extraits ont été filtrés, concentrés, à l'aide d'un rotavapeur, et stockés à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, puis soumis aux différents tests (Voir diagramme des tests phytochimiques).

Tests phytochimiques

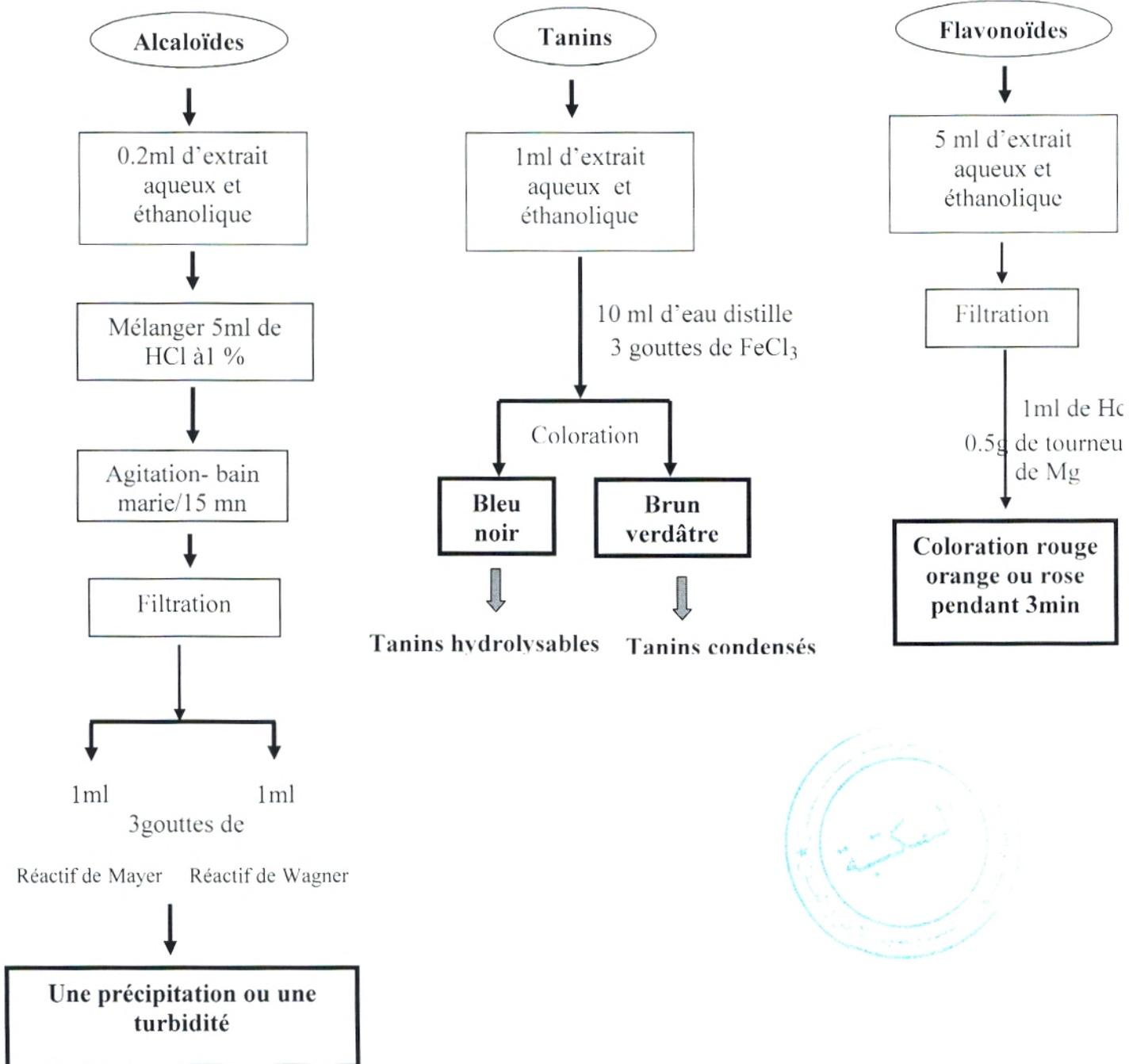


Figure 09 : Diagramme des tests phytochimiques réalisés sur la feuille *P. tomentosa* L.

(Trease et Evans, 1987)

4. Extraction sélectives :

4.1 Extraction des tanins :(Bruneton, 1999) :

- 10g de matériel végétal broyé en présence de 180 ml d'eau distillé et 100 ml d'acétone : l'ensemble est porté à macération à froid (4 C°) pendant 4 jours.
- Filtrer et extraire la solution deux fois avec 50 ml de dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides.
- Décantier et extraire la phase aqueuse quatre fois avec 50 ml d'acétate d'éthyle (AcOEt).
- Sécher la phase organique avec MgSO₄ ensuite faire évaporer le solvant à sec.
- Récupérer le résidu sec obtenu avec 3 ml de méthanol

- **Expression de résultats**

Le rendement après extraction des tannins est exprimé selon la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{P_2 - P_1}{M}$$

Rdt : rendement (% MS)

P₁ : poids en g du ballon vide.

P₂ : poids en g de du ballon après séchage.

M : la masse en g d'échantillon

4.2 Extraction des flavonoïdes :(Dauguet et Faucher, 1982).

20g de matériel végétal sont placés dans 200 ml de méthanol bouillant en présence de 10g de CaCO₃. L'ébullition est maintenue sous réfrigérant à reflux pendant 1 h. Après filtration, le dépôt est traité de nouveau pendant 1 h à l'ébullition dans la même quantité d'alcool.

Les deux solutions alcooliques sont réunies, elles sont éliminées par distillation sous pression réduite et le résidu sirupeux est repris par 100 ml d'eau distillée bouillante.

La solution aqueuse est filtrée à chaud et le filtrat épuisé successivement par l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle (AcOEt), et le n-butanol (BuOH). Tous les composés flavoniques se retrouvent dans l'extrait.

- **Expression de résultats**

Le rendement après extraction des tannins est exprimé selon la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{P_2 - P_1}{M}$$

Rdt : rendement (% MS)

P₁ : poids en g du ballon vide.

P₂ : poids en g de du ballon après séchage.

M : la masse en g d'échantillon

4.3 Extraction des alcaloïdes :(Bruneton, 1999) :

On mélange 10g de matériel végétal avec 250 ml d'HCl à 2% et 110 ml d'acétate d'éthyle (AcOEt). L'ensemble est porté à une macération à froid (4C°) pendant 10h. Filtrer le mélange et basifier la phase aqueuse acide avec NH₄OH. La phase aqueuse basique est ensuite extraite deux fois avec l'AcOEt, jusqu'à ce que la phase aqueuse ne contienne plus d'alcaloïdes.

Le solvant organique contenant les alcaloïdes est décanté, débarrassé des traces d'eau qu'il peut renfermer par déshydratation avec MgSO₄. Faire évaporer le solvant et reste alors un résidu sec des alcaloïdes totaux.

- **Expression de résultats**

Le rendement après extraction des tannins est exprimé selon la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{P_2 - P_1}{M}$$

Rdt : rendement (% MS)

P₁ : poids en g du ballon vide.

P₂ : poids en g de du ballon après séchage.

M : la masse en g d'échantillon

5. Dosage des composés phénoliques

- **Extraction : (Blahova *et al.*, 2004)**

L'extraction de polyphénols consiste à macérer à froid 2g de matériel végétal dans une solution d'un mélange acétone/eau (70/30, v/v), pendant 24 heures à 4°C. L'acétone aqueuse est généralement le plus efficace par rapport aux solvants les plus utilisés pour l'extraction des polyphénols.

5.1 Dosage des phénols totaux : (Blahova *et al.*, 2004)

- **Principe :**

Ce dosage repose sur la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphomolybdique et d'acide phosphotungstique. L'oxydation des phénols réduit ce réactif en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composé phénolique oxydés.

- **Mode opératoire :**

- 10µl d'extrait ont été ajoutés à 1.7 ml de l'eau distillée ensuite à 300µl de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 1/10
- 2.5 ml de NaCO₃ à 20% ajouts à la solution après 3min.
- La solution est incubée à l'obscurité pendant 30 min.
- Les observations sont mesurées à 760 nm par rapport au témoin.

- **Expression des résultats :**

La concentration des polyphénols totaux, est déterminée à partir d'une équation de la régression linéaire déduite de la courbe d'étalonnage (Voir annexe)

Les teneurs en polyphénols totaux sont exprimées en milligramme équivalent d'acide gallique par 100g de matière sèche en appliquant la formule suivante:

$$T = \frac{CxVxD}{Ps}$$

T : teneur en polyphénols totaux

C : concentration des polyphénols en équivalent de l'acide gallique déduite de la courbe

V : volume de l'extrait total

D : facteur de dilution

Ps : poids de l'échantillon



5.2 Dosage des flavonoïdes : (Djeridane *et al.*, 2006)

- **Mode opératoire :**

1 ml de l'extrait brut (acétone/eau) (70/30) est mélangé avec 1 ml d'AlCl₃ à 2%, après incubation pendant 15 min à t° ambiante, l'absorbance de l'échantillon est mesurée à 430 nm.

- **Expression des résultats :**

La concentration des flavonoïdes, est déterminée à partir d'une équation de la régression linéaire déduite de la courbe d'étalonnage (Voir annexe).

Les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en milligramme équivalent de catéchine par 100g de matière sèche en appliquant la formule suivante :

$$T = \frac{CxVxD}{Ps}$$

T : teneur en flavonoïdes.

C : concentration des flavonoïdes en équivalent de catéchine déduite de la courbe.

V : volume de l'extrait total.

D : facteur de dilution.

PS : poids de l'échantillon

5.3 Dosage des tanins totaux

1. Extraction des tanins par le polyvinyle polypyrotidine (PVPP)

- **Principe**

Il consiste à extraire les polyphénols totaux de l'échantillon par l'acétone/ eau, à utiliser une matrice insoluble, le polyvinyle (PVPP), substance capable de se complexer avec des tanins (phénols de haut poids moléculaire) puis au dosage des phénols libres par la méthode de Folin- Ciocalteu (FAO/IAEA, 2000).

- **Mode opératoire**

- ✓ Une prise d'essai de 2g de matériel végétal est additionnée à 100ml d'acétone/eau à 70%.
- ✓ Après macération de 24 heures, filtration sous vide et le filtrat est évaporé à sec à 40°C.
- ✓ Le résidu obtenu est solubilisé dans 5ml d'eau distillée (extrait qui contient des tanins).
- ✓ Vortex le mélange (100mg de PVPP avec 1ml d'eau distillée et 1ml de l'extrait) et le laisser à 40°C pendant 15min.

- ✓ Centrifuger à 3000 tours/10min.
- ✓ Collecter le surnageant.
- ✓ Ce surnageant représente seulement les phénols simples puisque les tanins se sont précipités ou retenus par le PVPP. On peut les doser (les phénols simples) par la méthode de Folin-Ciocalteu (Makkar *et al.*, 1993).

2. Dosage indirect des tanins par la méthode de Folin Ciocalteu

Puisque on a dosé les polyphénols totaux dans le premier extrait polyphénolique brut et dans le deuxième traité par le PVPP, en conséquence la teneur en tanins totaux est :

$$T = X - Y \text{ (FAO/IAEA, 2000)}$$

T : Teneur des tanins totaux

X : Teneur des polyphénols totaux

Y : Teneur des polyphénols simples

5.4 Dosage des tanins condensés (test de la vanilline avec H₂SO₄) : (Swain et Hillis, 1959).

- **Principe :**

Ce test est basé sur la condensation des composés polyphénoliques avec la vanilline en milieu acide. Il est spécifique des flavones3-ols.

- **Mode opératoire :**

Solution A : extrait de l'échantillon.

Solution B : vanilline à 1% avec acide sulfurique à 70%.

Prendre 2 ml de la solution B et 1 ml de la solution A. Mettre les tubes au bain marie pendant 15 min à 20C°. Lire l'absorbance à 500nm.

- **Expression des résultats :**

$$T(\%) = 5.2 \times 10^{-2} \times \frac{DO \times V}{P}$$

5.2×10^{-2} : constante exprimée en équivalent de cyanidines.

DO : densité optique.

V : volume d'extrait utilisé.

P : poids de l'échantillon.

T% : pourcentage du taux des tanins condensés.

5.5 Dosage des tanins hydrolysables au chlorure ferrique : (Mole et Waterman, 1987)

- **Principe :**

Cette méthode est basée sur une réaction avec le chlorure ferrique. Le mélange de l'extrait tannique avec le réactif chlorure ferrique provoque la coloration rouge violet du complexe, d'où la formation, des ions Fe^{3+} .

- **Mode opératoire :**

-Préparer le réactif C ($FeCl_3$ à 0.01M dans HCl à 0.001M).

-Prendre 1 ml de l'extrait de l'échantillon et on ajoute dans chaque tube 3.5 ml de réactif C

-Lire l'absorbance à 660 nm, 15 secondes après l'addition du réactif C.

- **Expression des résultats :**

$$T(\%) = DO \times \frac{M \times V}{E \text{ mole } P}$$

DO : densité optique.

Emole : 2169 de l'acide gallique.

M : 300.

V : volume d'extrait utilisé.

P : poids de l'échantillon.

T% : pourcentage des tanins hydrolysables.

6. Pouvoir antioxydant : piégeage de radical libre DPPH

- **Introduction**

De nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques purs ou des extraits. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel (Djeridane *et al.*, 2006).

Les extraits sont utilisés pour évaluer leur pouvoir antioxydant par la méthode de piégeage du radical DPPH.

• **Principe**

Le DPPH (diphénylpicrylhydrazine) est pratiquement le radical libre le plus stable, en solution (méthanol ou éthanol), le DPPH est caractérisé par une couleur violette dont l'intensité est mesurée à 515 nm. En présence d'un donneur d'hydrogène, le DPPH est réduit à la forme non radicalaire de couleur jaune pâle (forme d'hydrazine) (**Photo 02**). Ce passage de la première forme à la deuxième, est accompagné d'une diminution de l'absorbance (DO) qui peut s'exprimer par le pourcentage de réduction de DPPH. Conventionnellement une grande capacité de piégeage (réduction) des radicaux libres est considérée comme une grande activité antioxydant (**Lee et al., 2004**).



Figure 17 : Structure du DPPH (**Wong et al., 2006**).

• **Préparation de la solution DPPH**

Une solution méthanoliques de DPPH à 0,1 Mm a été préparée (**Voir annexe**).

• **Préparation des dilutions**

Des dilutions dans du méthanol ont été préparées à partir de l'extrait pour différentes concentrations et cela par la formule suivante :

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

C₁ : Concentration de l'extrait dans 1ml ;

C₂ : Concentration voulu dans la dilution ;

V₁ : Volume rechercher ;

V₂ : Volume final.

Une fois le volume rechercher (**V₁**) est calculé, le reste du volume est complété pour atteindre le volume final.



• **Mode opératoire**

- ✓ Un volume de 50 µl de différentes concentrations de l'extrait exprimées en mg/ml est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH (0.025g/l) fraîchement préparée.
- ✓ Le tube control contient à la place de l'extrait 50 µl de méthanol et 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH (0.025g/l) fraîchement préparée.
- ✓ Les tubes blancs contiennent 50 µl de différentes concentrations de l'extrait exprimées en mg/ml et 1,950 ml de méthanol.

Après préparation des extraits, les tubes doivent être placés dans l'obscurité à la température ambiante pendant 30 minutes. Une mesure de l'absorbance est effectuée à 515 nm.

• **Expression des résultats**

Le pourcentage d'inhibition (%) de réduction du radical libre DPPH est exprimé par la formule suivante.

$$\%R \text{ du DPPH} = (DO_c - DO_e / DO_c) \times 100$$

DO_c : absorbance mesuré du control.

DO_e : absorbance mesuré de l'échantillon test.

Nos résultats ont été exprimés en tenant compte de la moyenne des trois mesures obtenues. Pour chaque extrait, nous avons déterminé la valeur EC_{50} qui est la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH (Samarth, 2008).

Les résultats peuvent être aussi exprimés en puissance anti radicalaire (ARP).

$$ARP = 1 / EC_{50}.$$

ARP : puissance antiradicalaire.

EC_{50} : concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50% la concentration initial du radical DPPH.

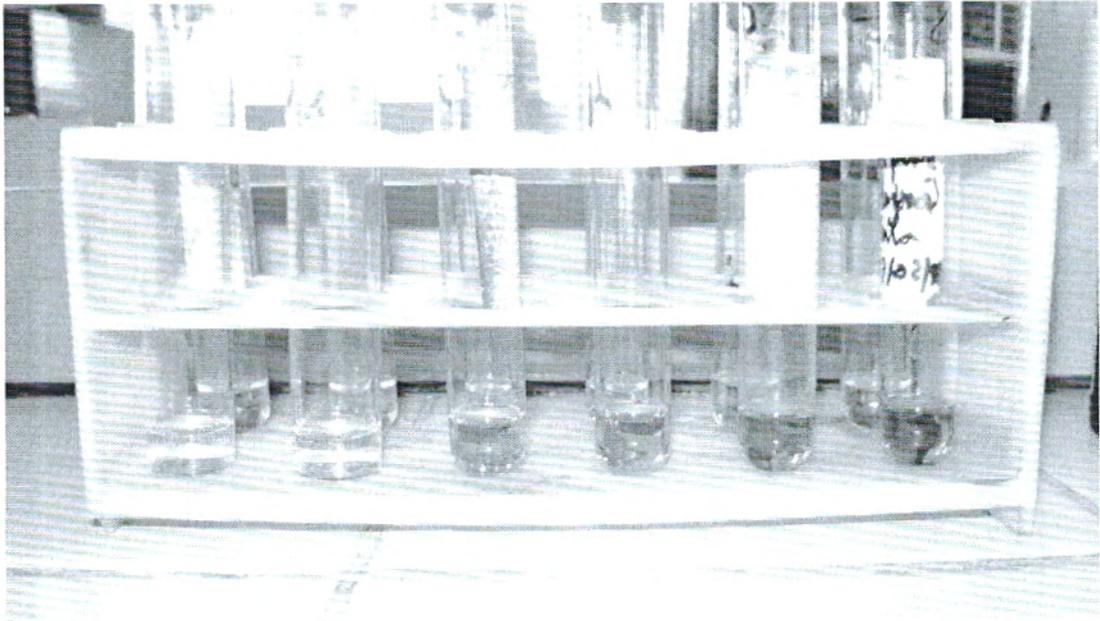


Photo 02 : Solution de DPPH après réaction avec l'extrait phénolique.

7. Analyse statistique

Dans toutes les expériences du dosage et d'évaluation de l'activité antioxydante, les données expérimentales obtenues ont été exprimées en tant que la moyenne \pm l'écart-type. Le coefficient de corrélation (R^2) de l'activité antioxydante a été déterminé en utilisant les programmes Excel 2007 et Origin 50.



Résultats et discussion

1. Détermination de la matière sèche :

L'appréciation de la teneur en eau et la matière sèche repose sur la détermination du taux d'humidité contenu dans l'échantillon à analyser.

L'analyse de la matière sèche (MS) au niveau de la feuille de *P. tomentosa* L. à montre une très faible proportion estimée à 17.66 %. A partir de cette valeur on a pu déterminer le pourcentage de teneur en eau qui s'est révélé importante **82.34** %.(Figure 10).

Ce résultat est en accord avec celui trouvé par **Chhema. (2004)** estimée à 81-82% pour les feuilles de *Zygodphyllum album*. Cette faible quantité en matière sèche généralement attribuée au facteur de variétal, au période de récolte et aussi aux conditions de stockage.

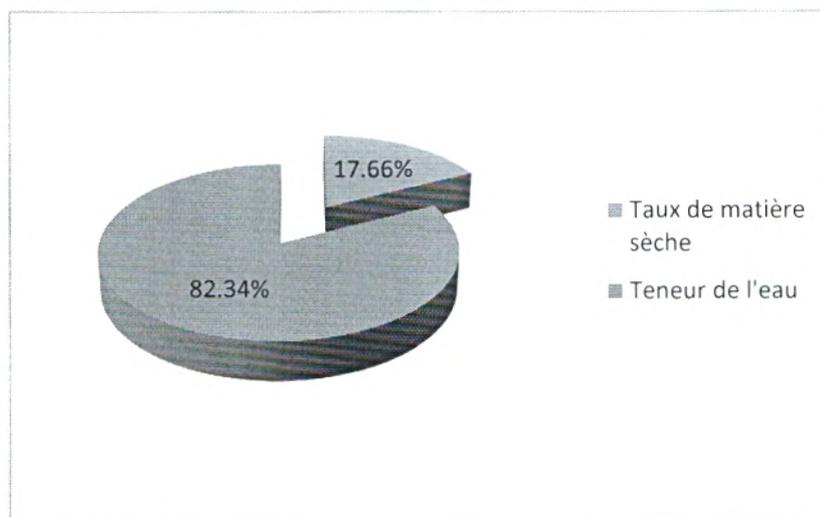


Figure 10 : Taux de matière sèche et teneur en eau de la feuille de *Pergularia tomentosa* L.

2. Tests phytochimiques :

Avant d'entamer le dosage des métabolites secondaires et afin de détecter les différentes familles des composés chimiques présent dans notre plante, nous avons utilisé des tests phytochimiques simples, utilisant des solvants de polarité différente. C'est l'apparition d'une coloration, d'une précipitation ou encore d'une floculation par l'intermédiaire de certains réactifs spécifiques qui va affirmer la présence et / ou l'absence des différentes familles de métabolites secondaire existant dans nos échantillons.

Le tableau 01 montre les résultats des tests phytochimiques obtenus pour les tanins, les flavonoïdes et les alcaloïdes de la feuille de *Pergularia tomentosa* L.

Tableau 01: Résultats des tests phytochimique de feuille de *Pergularia tomentosa* L..

Groupe	Eau	Ethanol
Tanin	++	++
Flavonoïde	+++	+++
alcaloïde	ND	+

La mise en évidence de la présence des tanins, des flavonoïdes et des alcaloïdes dans notre échantillon a montré des proportions variables.

De même, nous avons observé que l'extrait éthanolique et l'extrait aqueux renferment une teneur moyenne en tanins, forte quantité des flavonoïdes et des alcaloïdes sont présents eu faibles quantités.

3. Extractions sélectives :

Les extraits bruts méthanoliques récupérés après évaporation à sec ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant. Cet extrait renferme des composés phénoliques (flavonoïdes, acides phénols et tanins) et des alcaloïdes. Le rendement à été déterminé par rapport au matériel végétal sec et broyé ; subissant l'extraction à la macération à froid. Les résultats ont été exprimés en pourcentage massique (p/p) (**Figure11**).

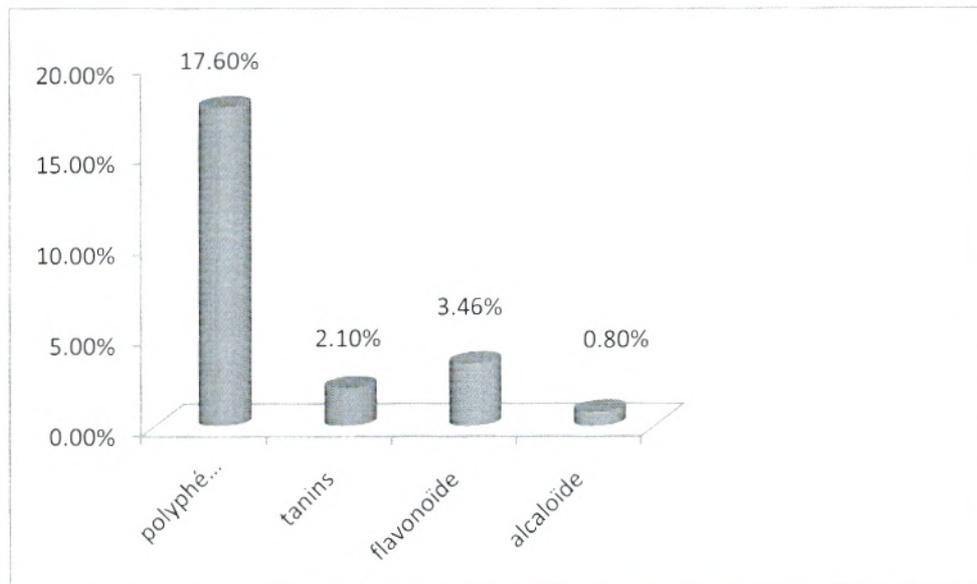


Figure 11: Rendement massique des tanins, des flavonoïdes et des alcaloïdes.

A la lumière de ces résultats nous pouvons constater que le rendement le plus élevé des feuilles de *Pergularia tomentosa* L. se situe au niveau des polyphénols totaux avec une valeur de **17.6 %** suivi des flavonoïdes (**3.46 %**). Un rendement moyen des tanins (**2.1 %**), alors que les alcaloïdes présentent le rendement le plus faible (**0.8%**). Ce qui explique que la plante présente un grand intérêt thérapeutique et biologique.

Nous avons comparé nos rendements avec une autre plante du Sahara étudiée par **Benabdelkader (2011)** sur des feuilles d'*Anabasis articulata*. Cet auteur a montré que les rendements des alcaloïdes et des polyphénols totaux sont de l'ordre de 0.04 et 5.47% respectivement, qui sont largement inférieurs à nos résultats obtenus dans les feuilles de *P.tomentosa* L. Même les rendements des tannins d'*Anabasis articulata* (0.96%) sont inférieurs à ceux trouvés dans notre échantillon (2.10%).

Ces variations dans la répartition des métabolites secondaires peuvent être partiellement dues aux facteurs génotypes qui commandent l'accumulation de ces composés dans la plante. Ce qui indique la propriété de l'espèce et par conséquent du genre (**El-Waziry, 2007**). En plus, d'autres facteurs peuvent être mis en jeu, nous citons l'état végétatif de la plante (étape de croissance), les facteurs édaphiques et climatiques, les conditions stressantes en sel et en eau et la durée et les conditions de conservation (**Ozenda, 1991**).

4. Dosage des phénols totaux.

Dans le but de déterminer la teneur totale des phénols de notre plante, un dosage a été effectué au niveau des extraits bruts des composés phénoliques. Une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique (**Voir annexe**), a été tracée pour cet objectif. Les résultats obtenus (**figure 12**) sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de la matière sèche, en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage ($y= 3.1803x-0.0301$).

Le protocole dérivé de la méthode de Folin et Denis qui est retenu : L'ion phénolate (formé par l'ajout de carbonate de sodium) est oxydé par un mélange d'acide phosphotungstique et phosphomolybdique qui, simultanément est réduit en donnant une solution colorée bleue dont on détermine l'absorbance. En effet, une courbe d'étalonnage réalisée par l'acide gallique a été tracée (**Voir annexe**).

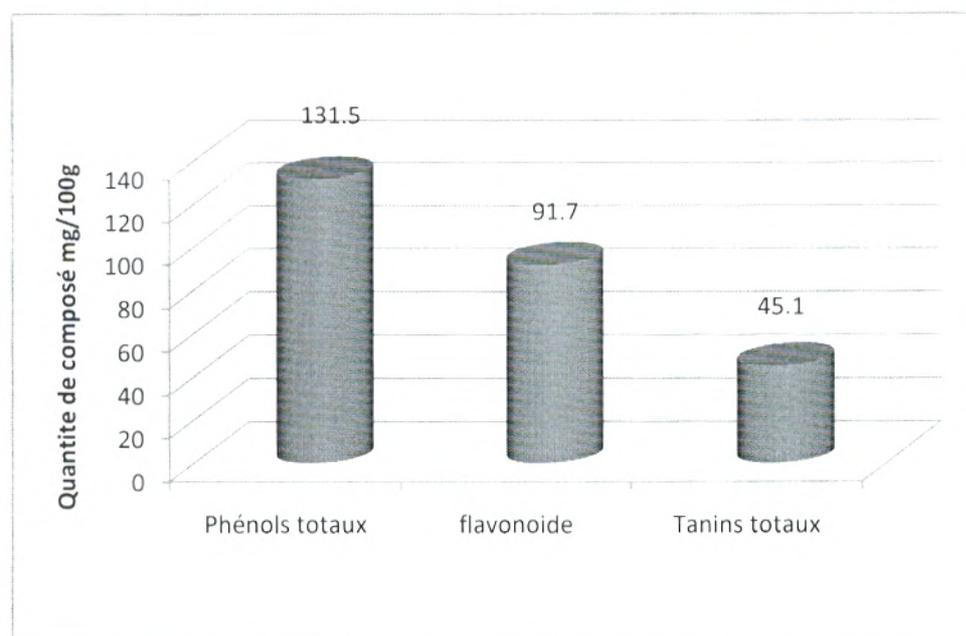


Figure12 : Teneur des composés phénoliques (mg/100g), des feuilles de *P.tomentosa* L.

Après extrapolation des résultats de la D.O. sur la courbe d'étalonnage, la teneur en composés phénoliques totaux de notre échantillon est estimée à **131,5 mg/100g** du poids sec.

Si l'on compare nos résultats avec d'autres plantes étudiées par **Kabran et al., (2011)** sur les feuilles *Monodora myristica* (300.76 mg AG /100 g MS), *Anthocleista djalonsensis* (390.93mg AG / 100g MS) et *Piper guineense*(387.78 mg AG / 100g MS) sont particulièrement très riches en substances phénoliques.

Macheix et al., 1990 signalent que la concentration en polyphénols est très variable d'une espèce à une autre, et même d'une variété à une autre et diminue régulièrement durant la maturation et le stockage par différentes voies du brunissement. C'est ainsi que l'étude réalisée par Liu et al. (2008) sur la teneur en phénols totaux de quelques plantes médicinales a donné un intervalle de 0.57 à 280.46 mg équivalent d'acide gallique/g du matériel végétal sec, et nous remarquons que la teneur de notre échantillon est dans cet intervalle.

5. Dosage des flavonoïdes :

La détermination de la teneur des flavonoïdes a été effectuée au moyen d'un dosage spectrophotométrique au niveau de l'extrait brut de composés phénoliques. Une courbe d'étalonnage réalisée par la catéchine (Voir annexe) a été tracée pour cet objectif. Les résultats obtenus sont reportés dans l'histogramme (Figure 12).

D'après les résultats expérimentaux obtenus lors du dosage des flavonoïdes, on constate que *Pergularia tomentosa* L. présente une teneur en flavonoïdes qui est de l'ordre de **91,74mg/100g**. Cette quantité est inférieure à celle de la plante d'*Anabasis articulata* (308.1mg /100g MS) (Benabdelkader ,2011).

D'une manière générale, la teneur en flavonoïdes de *P.tomentosa* L est légèrement supérieure à celle de quelques autres plantes données par Kabran et al., (2011) : 88.36 et 63.58 mg/100g du poids sec de la *Combretum paniculatum* et *Anthocleista djalonensis* respectivement.

6. Dosage des tanins totaux :

La teneur en composés phénoliques est alors mesurée avant et après la fixation des tanins par l'adsorbant (PVPP).

D'après ces résultats on remarque que *Pergularia tomentosa* L présente une teneur en tanins de l'ordre de **45,1 mg/100g**. Cette quantité est largement inférieure à celle de la plante d'*Anabasis articulata* (403.1 mg /100g MS) (Benabdelkader ,2011).

De plus, la teneur en tanins totaux dans les feuilles de *P.tomentosa* L. est inférieure à celle de quelques autres plantes données par Sereme et al, (2008) : 53, 67 et 57 mg/100g de MS du poids sec de l'*Ozoroa insignis*, *Cassia sieberiana* et *Tamarindus indica* respectivement.

Il est à noter également que la teneur en tanins diminue légèrement dans la plante grâce à leur oxydation par voie non enzymatique en polymère coloré, par la formation de complexe métal-polyphénols et la conversion des leuco-anthocyanes en anthocyanes (Mathe et Parpia, 1971).

7. Dosage des tanins condensés et tanins hydrolysables :

La confirmation de la présence des tanins par les tests phytochimiques nous a conduit à faire le dosage de deux groupes de tanins ; tanins condensés et tanins hydrolysables, les résultats sont présentés dans la figure 13.

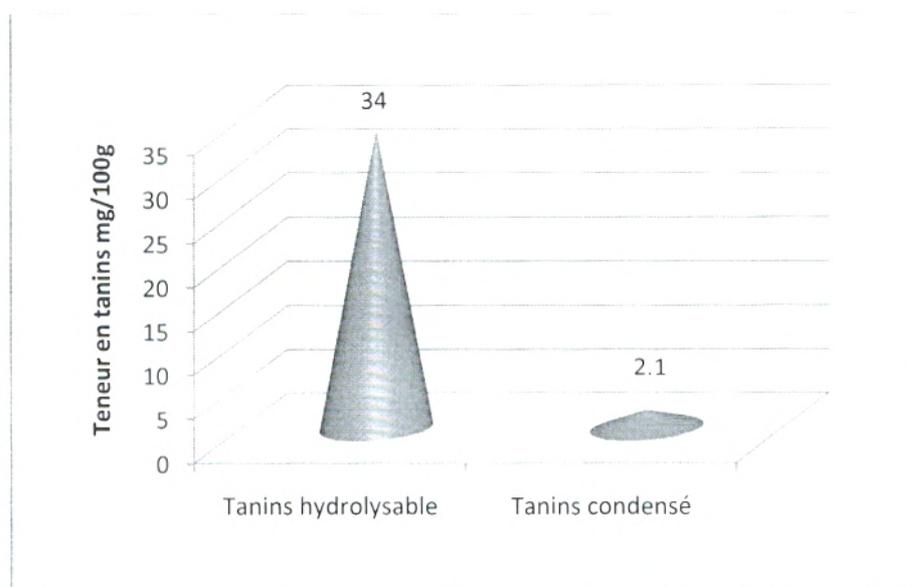


Figure 13 : Teneur des tanins hydrolysables et condensés de *P.tomentosa* L.

A la lumière de ces résultats nous pouvons constater que la teneur la plus élevée des feuilles de *P.tomentosa* L, situe au niveau des tanins hydrolysables de valeur **34mg/100g** par contre la teneur des tanins condensés (**2.1 mg/100g**) est très faible. Ces derniers viennent de confirmer les résultats obtenus des tests phytochimiques. Il est connu depuis longtemps que les feuilles sont utilisées comme antihémorragique en raison de leur richesse en tanins (Vigneau, 1985).

8. Pouvoir antioxydant des extraits des métabolites secondaires des feuilles de *P.tomentosa* L. :

L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres. Pour nos extraits, nous avons utilisé la méthode de DPPH. Ce dernier est un radical libre stable possède une couleur violette en solution méthanolique et virant au jaune lorsqu'il est réduit par un antioxydant (Photo 03).



Photo03 : Solution DPPH avec l'extrait brut des polyphénols totaux.

Le virage de cette couleur et l'intensité de changement de la couleur de la forme libre en solution dépend de la nature, de la concentration et de la puissance de la substance antiradicalaire.

A partir de la variation du pourcentage de réduction d'inhibition du DPPH, en fonction de la concentration de l'extrait, nous pouvons déterminer graphiquement l' EC_{50} qui est comme étant la concentration de l'extrait des métabolites secondaires nécessaire pour la réduction de 50% de DPPH (Voir annexe).

Les valeurs de l' EC_{50} des différents extraits de notre échantillon sont présentées dans le tableau n°2. L'acide ascorbique, connu pour son puissant pouvoir antioxydant, est donc utilisé comme control positif.



Tableau 02 : Les concentrations EC₅₀ des extraits de *P. tomentosa* L.

Extraits		EC50 (mg/ml)
Extrait brut des polyphénols totaux		23.45
Tanins		3.34
Alcaloïdes		1.782
Flavonoïdes	Fraction d'éther diéthylique	3.21
	Fraction d'acétate d'éthyle	0.65
	Fraction n-butanol	0.33
Acide ascorbique		0.06

En comparant l'EC₅₀ des polyphénols totaux (23,45mg/ml) avec celle de l'acide ascorbique (0,06mg/ml), nous remarquons qu'elle est très faible et donc l'extrait des polyphénols totaux présente une faible activité antioxydante.

Suite à la comparaison entre les concentrations EC₅₀ des flavonoïdes avec celle du control, nous constatons que la fraction d'acétate d'éthyle (0,65mg/ml) et surtout la fraction de n-butanol (0,33mg/ml) possèdent une puissante activité antioxydante, c'est-à-dire une très facile affinité à libérer le proton H⁺ qui neutralise le radical DPPH.

En plus, nous remarquons que les concentrations EC₅₀ des alcaloïdes (1,782mg/ml) sont deux fois plus faibles que celles des tanins (3,34mg/ml) et de la fraction d'éther diéthylique des flavonoïdes (3,21mg/ml). Ces derniers sont connus dans la littérature être des puissants antioxydants, ce qui explique le rôle que peuvent jouer aussi les alcaloïdes dans ce domaine de santé publique.

Lorsqu'on analyse le pouvoir antioxydant des trois fractions des flavonoïdes à savoir la fraction acétate d'éthyle, n-butanol et éther diéthylique, on remarque une différence significative entre d'une part les fractions acétate d'éthyle et n-butanol (flavonoïdes polaires) et celle d'éther diéthylique (flavonoïdes apolaires). D'où on peut tirer une conclusion, à savoir, que ce sont les flavonoïdes polaires des feuilles de *P. tomentosa* L. qui leur confèrent un puissant pouvoir antioxydant.

Un autre paramètre exprimant la puissance antiradicalaire (A.R.P.) a été calculé (Tableau n°3).

Tableau 03: Valeur activité antiradicalaire .

Extraits		ARP (mg/ml)
Extrait brut des polyphénols totaux		0.04
Tanins		0.3
Alcaloïdes		0.56
Flavonoïdes	Fraction d'éther diéthylique	0.31
	Fraction d'acétate d'éthyle	1.53
	Fraction n-butanol	3.03
Acide ascorbique		16.66

D'après les résultats obtenus nous pouvons affirmer les mêmes constatations que pour les résultats d'EC₅₀, à savoir, que les fractions n-butanol (3,03) et acétate d'éthyle (1,53) des flavonoïdes présentent les plus grandes capacités à piéger les radicaux libres. Aussi, à un degré moindre l'extrait des alcaloïdes (0,56) montre un bon potentiel antioxydant. Alors que les autres extraits présentent une puissance antiradicalaire plus ou moins faible dans l'ensemble.

Nous n'avons pas trouvés des travaux portant sur l'activité antioxydante de *P. tomentosa* L. donc nous avons jugé utile de comparer nos résultats avec des travaux portés sur les feuilles d'autres espèces végétales sahariennes. **Naimi et al.(2010)** ont montré que les EC₅₀ de l'extrait des flavonoïdes des feuilles de *Solenanatus lanatus* (1,182 mg/ml) présentent un pouvoir antioxydant inférieur à celui de notre étude. De même que **Ksouri et al. (2008)** ont trouvés des concentrations d'EC₅₀ d'extrait des flavonoïdes des feuilles de *Salsola kali* égale à 10,33mg/ml très largement inférieures à celles de notre échantillon.

En analysant nos résultats, nous avons constaté qu'il existe une relation activité antioxydante-teneur-structure des polyphénols. En effet, nous avons remarqué que la teneur des polyphénols totaux est la plus élevée mais présentant le pouvoir antioxydant le plus faible. De cette affirmation nous pouvons tirer deux principales conclusions :

- Le pouvoir antioxydant des métabolites secondaires n'est pas lié ni à leurs teneurs ni à leurs structures.

- Il n'y a pas de phénomène de synergie entre les composés phénoliques dans nos extraits. Puisque les tanins et les flavonoïdes des feuilles de *P. tomentosa* L. présentent un meilleur pouvoir antioxydant ($EC_{50}= 3,34\text{mg/ml}$ et $EC_{50}=0,33\text{mg/ml}$ respectivement) lorsqu'ils sont isolés que lorsqu'ils sont ensemble dans nos extraits ($EC_{50}=23,45\text{mg/ml}$).

Conclusion générale



Bien qu'une grande partie du XXème siècle ait été consacrée à la mise au point de composés antioxydants de synthèse, la recherche de nouveaux antioxydants naturels via le screening de sources végétales et surtout de plantes médicinales a résulté dans la découverte d'un grand nombre de ses composés utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines et aussi un rôle dans l'industrie alimentaire.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressées à l'étude de l'activité antioxydante d'une plante médicinale poussant spontanément dans la région d'Adrar. Après l'extraction à chaud des polyphénols de *Pergularia tomentosa L.*, on peut conclure que l'extrait brut de cette plante présente un rendement très important en polyphénols, de l'ordre de 17.6%.

L'extraction des flavonoïdes a permis d'obtenir trois phases une phase éther diéthylique, une phase acétate d'éthyle et une phase butanolique. Nous avons constaté que la phase acétate d'éthyle (1.63%) présentent un rendement important par rapport à celui de la phase n-butanol (0.33%).

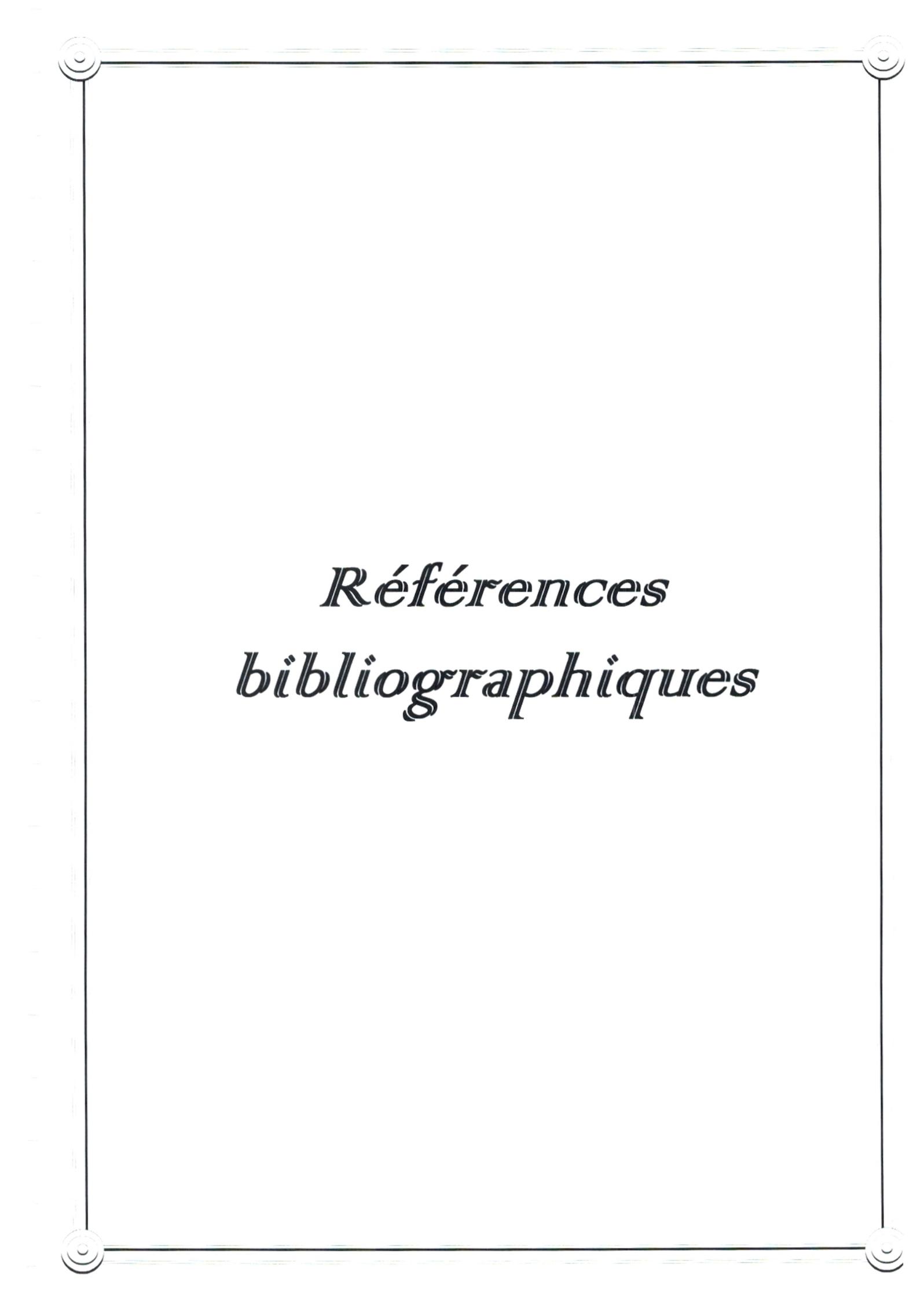
Cette espèce végétale présente également un rendement en tanins de l'ordre de 2.1%, et un rendement en alcaloïdes de l'ordre de 0,8%.

Les dosages des phénols totaux, des tanins et des flavonoïdes ont été effectués à partir des extraits bruts méthanoliques, dont les teneurs ont été déterminées à l'aide des courbes d'étalonnages de l'acide gallique et de la catéchine respectivement. En effet, l'analyse quantitative de cette plante révèle des teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes, de l'ordre de 131,5mg/100g, 91,7mg/100g. Concernant les tanins totaux ils présentent un taux de 45,1mg/100g avec les tanins hydrolysables (34mg/100g) et les tanins condensés (2.1mg/100g).

En ce qui concerne l'activité antioxydante déterminée par la méthode de piégeage de radical libre DPPH. Nous avons constaté que les extraits de la fraction d'acétate d'éthyle ($EC_{50}=0.65$ mg/ml) et de fraction n-butanol ($EC_{50}=0.33$ mg/ml) et manifestent la plus grande capacité. Aussi, l'extrait les alcaloïdes ($EC_{50}=1.782$ mg/ml) montre un bon potentiel antioxydant. Les autres extraits tanins ($EC_{50}=3.34$ mg/ml), fraction d'éther diéthylique ($EC_{50}=3.21$ mg/ml) et extrait brut des polyphénols totaux ($EC_{50}=23.45$ mg/ml), présentent une activité plus ou moins faible .

Ces résultats ne constituent qu'une première étape de valorisation de cette espèce végétale. Il serait également intéressant de compléter ce travail par la purification et l'identification de diverses molécules

isolées en utilisant la chromatographie liquide à haute performance. Par conséquent, il est suggéré qu'un travail postérieur doit permettre l'isolation et l'identification du contenu en antioxydants pour cette plante. En outre, l'activité antioxydante *in vivo* avec des différents mécanismes doit nécessairement être investie dans la perspective future de notre travail. L'étude des autres activités biologiques des extraits et plus particulièrement l'activité antifongique. D'exploiter ces molécules en biotechnologie, en particulier en industrie agro-alimentaire en remplaçant les antioxydants synthétiques qui sont néfastes pour la santé humaine.



*Références
bibliographiques*

- **Amani A et Barmo S. (2010).** Contribution à l'état des connaissances de quelques plantes envahissantes au Niger. *république du Niger* .40p, 19-21.
- **Amie D., Davidović-Amic D., Beslo D. et Trinajstić N. (2003).** Structure-radical scavenging active relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta ccacaa.*,76 (1): 55-61.
- **Arnér E.S. et Holmgren A. (2000).** Physiologic functions of thioredoxin reductase. *Eur JBiochem.*, 267, 6102-6109,
- **Audigie C.I. et Dupont G. (1982).** Principe des méthodes d'analyses biochimiques. pp 566-567.
- **A.N.R.H. (2004).** L'atlas pratique de l'Algérie. *Edition populaire de l'armée (EPA)*, pp. 116.
- **Brand-Williams M., Cuvelier M.E., Berset C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss U-Technol.*, 28, 25-30.
- **Bekhechi C., Atik Bekkara F., et Abdelwahid D.E. (2007).** Composition and antibacterial activity of the essential oil of *thymus fontanesii* from Algeria. *J. Essent. Oil Res.*, 19, 594-596.
- **Bekhechi C., Atik Bekkara F. et Abdelwahid D.E. (2008).** Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles *l'origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*, 6, 153-159.
- **Benabdelkader S. (2011).** Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante d'*Anabasis articulata*. *Mémoire pour l'obtention de diplôme d'Ingénieur. option : Contrôle de Qualité et Analyse. Université de Tlemcen*, 45, 26-29.
- **Blahova B., Brands Teterova E. et Fabulova A. (2004).** Isolation and détermination of phénolique.27 (1), pp31.48.
- **Borekc C. (2001).** Antioxidant health effect of aged garlic extract. *J. nutr.*, 131,1010-1015.
- **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plante médicinales. 2^{ème} édition, Paris : éditions médicales internationales. *Tec & Doc Lavoisier*, 1120.
- **Brusselmans K., Vrolix R., Verhoeven G. et Swinnen J. V. (2005).** Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (7), 5636-5645.
- **Burkrf R.F. (2002).** Selenium, an antioxidant nutrient. *Nutr. Clin. Care*, 5, 4-9.

- **Chehma A. (2004).** Étude floristique et nutritive des parcours camelins du Sahara septentrional algérien cas des régions d'Ouargla et Ghardaïa. *Thèse pour l'obtention de diplôme de Doctorat, option : Biologie Appliquée. Université d'Annaba*, 198,18-19.
- **Chen Z. et Chan P.T. (1996).** Antioxydative activity of green tea catechins in canola oil. *Chemistry and Physics of Lipids*, 82, 163-172.
- **Cooke J.P. (1998).** Nutraceuticals for cardiovascular health. *Am. J. Cardiol.*, 82(10), 43-46.
- **Cowan M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12 (4), 564-570.
- **Dauguet J.C. et Foucher J.P. (1982).** Les flavonoïdes de *Arbutus unedo* L. (Ericacées). *Plants Médicinales et Phytothérapie*, 16 (3), 185-191.
- **Decloitre F. (1993).** Impact des facteurs alimentaires sur les mécanismes de la cancérogénèse: bases d'une prévention des cancers par l'alimentation. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 28 (2), 85-95.
- **Delattre J. Beaudoux J.L. et Bonnefont-Rousselot D. (2005).** Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. *Edition Tec & Dec. Edition Médicales Internationales. Lavoisier*, Paris.
- **Davies R.L. et Whyte P.D. (1989).** Adonis microcarpa (pheasant's eye) toxicity in pigs fed field pea screenings. *Australian Veterinary Journal*, 66:1.
- **Desport J.C. et Couratier P. (2002).** Stress oxydant et maladies neurodégénératives. *Nutr. Clin. Metab.*, 27, 485-491.
- **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P. et Vidal N. (2006).** Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654-660.
- **Dupont F. et Guignard J.X. (2007).** Botanique : Systématique moléculaire. 14^{ème}* édition *Masson*.
- **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.
- **El-Waziry A.M. (2007).** Nutritive value assessment of ensiling or mixing *acacia* and *Atriplex* using in vitro gas production technique. *Res. J. Agric. Biol. Sci.*, 3,605-614.
- **Elqaj M., Ahami A. et Belghyti D. (2007).** La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. *Journée scientifique « ressources naturelles et antibiotiques »*, Maroc, 64(2) ,19-22.

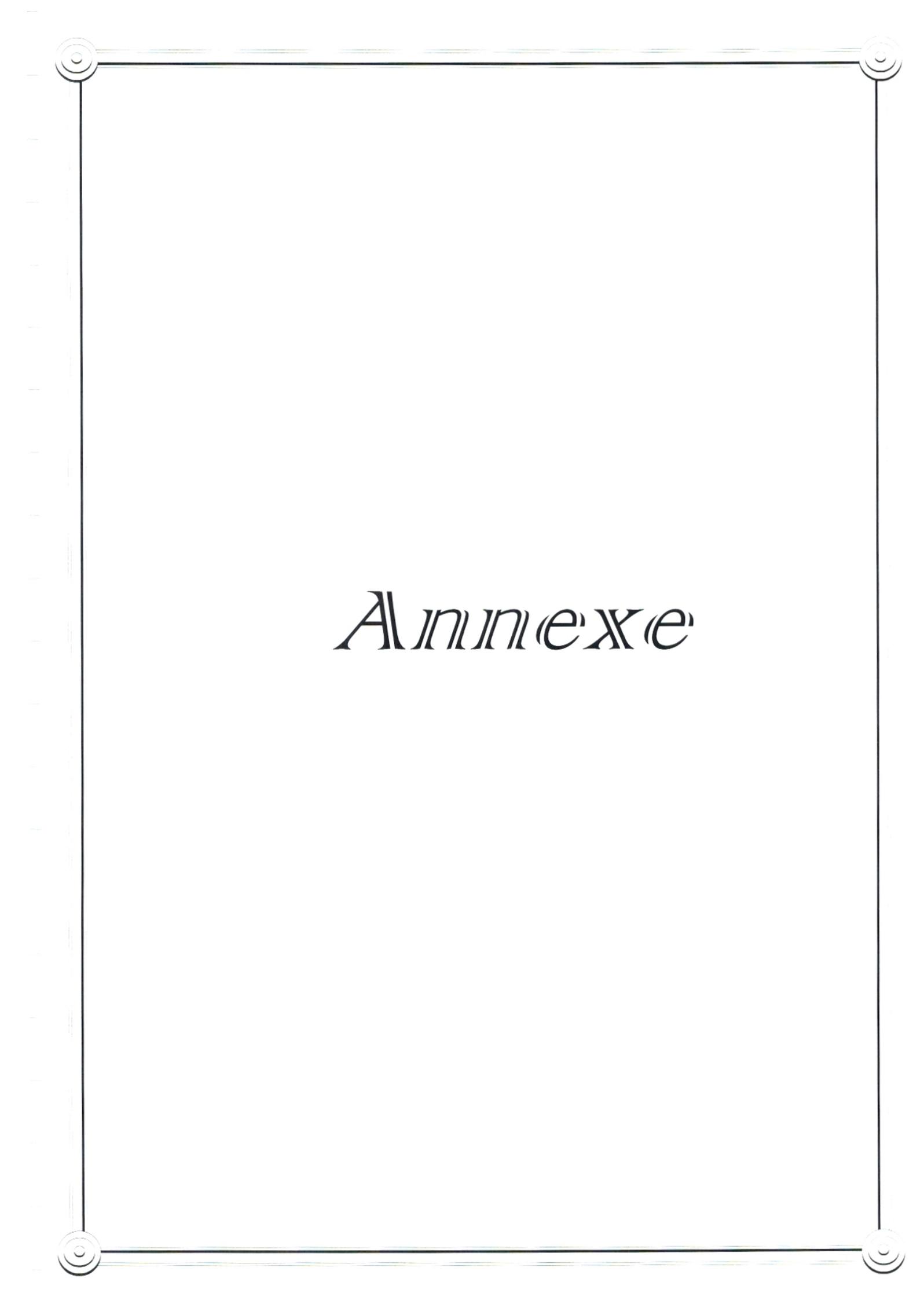
- **Farnsworth N., Akerele O., Bingel A.S. et Guo Z. (1986).** Place des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé*, 64(2), 159-164.
- **FAO/IAEA D.(2000).** The phenolics of ciders : oligomeric and polymeric procyanidins. *J. Sci. Food and Agr*, 471-479.
- **Ghedira K. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie*, 3(4), 162-167.
- **Hagerman A.E.(28 Mars 2002).** Chemistry Condensed tannin accumulation and composition in skin of shiraz and cabernet sauvignon grapes during berry development *American Journal of Enology and Viticulture*, 60 (1), 13-23.
- **Hagerman A.E. (2010).** Chemistry Condensed tannin accumulation and composition in skin of shiraz and cabernet sauvignon grapes during berry development. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45 (1), 09-18.
- **Haic A.L. (2003).** Screening potato genotypes for antioxidant activity, identification of the responsible compounds and differentiating russet norkotah strains using alfa an microsatellite marker analysis. *Office of graduate studies of Texas*, 260.
- **Halliwell B. et Gutteridge J.M.C. (1990).** Role of free radical and catalytic metal ion in human disease, An overview. *In Methods in Enzymology*. Academic Press, San Diego, 186, 1-85.
- **Hans W. K. (2007).** 1000 plantes aromatiques et médicinales. *Terre édition*, 6-1.
- **Hassan R.A. et Umar R.A.(2007):** Nutritive value, phytochemical and antifungal properties of *Pergularia tomentosa L.* *Journal of pharmacology*, 3(4):334-340.
- **Hertog M.G.L., Hollman P.C.H., Katan M.B. et Kromhoft D. (1993).** Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutrition and Cancer*, 20 (1), 21-29.
- **Hu F.B. (2003).** Plant-based food and prevention of cardiovascular diseases. *Am. J. Clin. Nutr.*, 78, 544-552.
- **HUSSEIN H.I. et KAMEL A. (1994).** Uscharin, the most potent molluscicidal compound tested against land snails. *Journal of chemical Ecology*, 20:135-140.
- **Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., De Laage de Meux A., Moalard F., Zha E., De la Roque K., De la Roque O., Vican P., Delesalle -Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J. et Botrel A. (2001);** Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. *Ed. Larousse*, 10-12.

- **Ives Desjardins D. (2008).** Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemical. *Res.J.Agric.Biol.Sci*, 3,610-614.
- **Johnson F. et Gialivi C. (2005).** Superoxide dismutase and their impact upon health. *Mot. Aspects Med.*, 26, 340-352.
- **Kabran G.R., Ambeu N. C., Mamyrbékova-Békro J. A., Békro Y. A. (2011).** CCM des extraits sélectifs de 10 plantes utilisées dans le traitement traditionnel du cancer du sein en Côte d'Ivoire. *European Journal of Scientific Research* 63(4): 592-603.
- **Karaali A., Boyacioğlu D., Güneş G. et Özçelik B. (2004).** Flavonoids in fruit and vegetables. Their impact on food quality, nutrition and health-STREp or CA. European commission's the 6th framework programme for research. Istanbul technical University.Turkey.
- **Kocchlin-Ramonatxo C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20,165-177.
- **Ksouri R.,Falleh H.,Chaieb K.,Karray Bouroui N.(2008).**Phénolic composition of *Cynara cardunculus* Lorgans and their biological activities.*C.R.Biologie*,331,372-379.
- **Leake D.S. (1998).** Effects of flavonoids on the oxidation of low-density lipoproteins, in *Flavonoids in Health and Diseases.* (Rice-Evans C. and Packer L Eds.)Marcel Dekker, New York, 213-276.
- **Le Bon A.M. et Siess M.H. (2000).** Organosulfur compounds from Allium and the chemoprevention of cancer. *Drug Metabolism and Drug Interaction*, 17, 51-79.
- **Lee J. H., Koo N. S et Min, D. B.(2004).** Reactive oxygen species, aging, and antioxydative nutraceuticals. *Comprehensive review in food Science and food Safety*, 3, 20-33.
- **Leong L.P. et Shui G. (2002).** Antinvestigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Chemistry*, 76, 69-75.
- **Liu H.,Qiu N.,Ding H et Tao R.(2008).** Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 chinese herbals suitable for medical or foods uses. *Food Research International*, 12(12), 52-59.
- **Loin J-B. (2008).** Guide des plantes et des compléments alimentaires. Encyclo-book du www.reponsesbio.com.
- **Macheix J.J., Fleuriet A. et Billot J. (1990).** Fruit phenolics. CRC Press. Inc.; Boca. Raton, Florida, 378.

- **Macheix J J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Ed. Presses Polytechnologiques et Universitaires Romandes*, 4-5.
- **Makkar M., Vasta V., Harinder P. S. Mele A. et Priolo E. (2009).** Ruminant biohydrogenation as affected by tannins in vitro. *The British Journal of Nutrition*. 102(1), 82-92.
- **MAMAN S. (2003).** Contribution à l'étude de l'écologie de *Pergularia tomentosa* et son impact sur les ressources sylvo pastorales au niveau du massif forestier de Daddaria (Mainé Soroa). Mémoire d'ingénieur IPR/IFA de katibougou(Mali).61,19-21.
- **Mak S., Egri Z., Tanna G. et Newton G.E. (2002).** Vitamin C prevents hyperoxia mediated vasoconstriction and impairment of endothelium dependant vasodilatation. *American Journal Physiol.*, 282, 21-414.
- **Malesev D. et Kuntić V. (2007).** Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72 (10), 921-939.
- **Mathe A G. et Parpia H.(1971).** Food browning as polyphenol reaction advances. *Food research* (U.S.A), 12(4),52-59.
- **McCord J-M. et Edeas M-A. (2005).** SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed. Pharmacol.*, 59, 42-139.
- **Mole S. et Waterman P.G. (1987).** Tonic acid proteolic enzymes: enzyme inhibition substrat derivation. *Photochemistry*, 26, 99-102.
- **Naimi T et Djelloul A.S.(2010).** Contribution à l'étude de l'activité antioxydante de *Solenanthus lanatus* D.C. récoltée dans la région de Tlemcen. *Mémoire pour l'obtention de diplôme E, S, option : biochimie. Université de Tlemcen*, 72,54-57.
- **Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R. (2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*, 33, 2-16.
- **Nève J. (1997).** Selenium in nutrition and therapeutics. *in: Bittar E, Bittar N, Editors. Principals of Medical biology*, New York JII Press Inc, 985-994.
- **N'Guessan J-D., Boni A-R, Zirihi G-N et Djaman A-J. (2009).** Relation entre les activités antioxydantes et les teneurs en polyphénols de six plantes de la pharmacopée ivoirienne. *Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique, UFR Bioscience Université de Cocody-Abidjan, Abidjan, Côte d'Ivoire*

- **Ozenda P. (1958).** Flore du Sahara. 1^{ème} Ed., CNRS, Paris, France.
- **Piacente S. et Masullo M. (2009).** Cardenolides from *Pergularia tomentosa* display cytotoxic activity resulting from their potent inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase. *J.Nat.prod.*, 72, 1087-1091.
- **Piquemal G. (2008).** Les flavonoïdes (en ligne) : <http://www.detoursante.com/index.php>.
- **Powell S.R. (2000).** The antioxidant properties of zinc. *J.Nutr.*, 130, 1447-54.
- **Puppo A. (1992).** Effect of flavonoids on hydroxyl radical formation by Fenton-Type Reactions; Influence of the Iron Chelator. *Photochemistry*, 31(1), 85-88.
- **Rayman M.P. (2002).** The argument for increasing selenium intake. *Proc. Nutr. Soc.*, 61, 203-215.
- **Riboli E. et Norat T. (2003).** Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr.*, 78, 559-570.
- **Rize-Evans F. (1993).** Phytochemistry. Vol.8, p 10.
- **Roux D. et Catier O. (2007).** Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. Collection du « cahier du préparateur en pharmacie », 141-146.
- **Saadou M. (1990).** La végétation des milieux drainés nigériens à l'est du fleuve niger. Thèse d'état Es-sciences Naturelles. *Université de Niamey*, 395p.
- **Samarth H.(2008).**Antioxydant power phytochemicals from psidium gvajava leaf. *Journal of the the jiang university science*, 5(6); pp: 676-683.
- **Sanchez D. (2002).** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Sci. Tech. Int.*, 8(3), 121-137
- **Sarni-Manchado P. et Cheynier V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. *Ed. Lavoisier*, 2- 10.
- **Scalbert A. et Williamson G. (2000).** Dietary intakes and bioavailability of polyphenols. *J.Nutr.*, 130, 2073-2085.
- **Sereme A., Millogo-rasolodimbyJ. , Guinko S., Nacro M.(2008).** Propriétés thérapeutiques des plantes à tanins du burkina faso. *Pharmacopée et Médecine traditionnelle Africaines*, 2008 ; 15 : 41-49.
- **Stoclet J.C. (2010).** Flavonoïdes alimentaires et santé humaine, particulièrement dans le domaine cardiovasculaire, Académie nationale de pharmacie. *Fondée le 3 août 1803 sous le nom de Société de Pharmacie de Paris Reconnue d'utilité publique le 5 octobre 1877.*

- **Swain T. et Hillis W.E. (1959).** The phenolics constituents of *Prunus domestica*-1-the quantitative analysis of phenolics constituent. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 10, 13.
- **Talwar G.P. (1989).** Textbook of biochemistry and human Biology. 2nd Edn., Prentice Hall of India Pvt. Ltd., India.
- **Tiwari A. K. (2001).** Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. *Current Science*, 81(9), 1179-1181.
- **Trease E et Evans W.C. (1987).** Pharmacognosy. *Billiare. Tindall. Londone 13th Edn.*, 61-62.
- **Urquiaga I. et Leigtaton F. (2000).** Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*, 33(2), 55-64.
- **Ursini F. Maiorino M. Brigelius-Floche R. Aumann K.D. Riveri A. Schomburg D. et Flohe L. (1995).** Diversity of glutathione peroxidases. *In: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego*, 252, 38-53.
- **Vigneau Ch. (1985).** Plante médicinale thérapeutique, Toxicité Ed Alexandre la cassagne 162 avenue la cassagne 69003 Lyon C Masson, Paris N129.
- **W-Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly D., Hollman J. P., L-Keen C., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita X, Williamson G. et Burrowes J. (2007).** Flavonoids and heart health: Proceeding of the ILSI North America flavonoids. *Journal of Nutrition*, 137, 718-737.
- **Wong S.P., Leang L.P. et Koh J.H.W. (2006).** Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*, 99, 775-783.
- **Yangte S.W., Malone S., Werkhoven M. C. M., Wisse J.H., Shu Y.Z., Vyas D.M. et Kingston D.G.I. (1999).** Synthesis and biological evaluation analogues of cryptolepine, an alkaloid isolated from the Surinam rainforest. *J. Nat. Prod.*, 62, 976-983.
- **Yoshikawa T., Yamamoto Y., Naito Y. et Toyokuni S. (2000).** Free radicals in chemistry. *Biology and Medicine*. Ed. Oica International, Londres, 44.



Annexe

➤ **La gamme d'étalon des phénols totaux à partir de l'acide gallique :**

La concentration d'un composé phénolique, l'acide gallique, sera déterminée grâce à une gamme étalon, pour cela :

A partir une solution mère de l'acide gallique de 2mg/ml, on prépare des dilutions a différentes concentrations, ensuite on prélève 5 μ l de chaque dilutions ;

- ✓ Ajouter a ce volume 1.7ml d'eau distillée.
- ✓ Ensuite, ajouter 300ul de réactif Folin Ciocalteu.
- ✓ Après 3min additionner 0.5ml de Na₂CO₃.
- ✓ Incubation pendant 30min à l'abri de la lumière.
- ✓ Lire la DO a 760nm.
- ✓ Réaliser la courbe d'étalonnage.

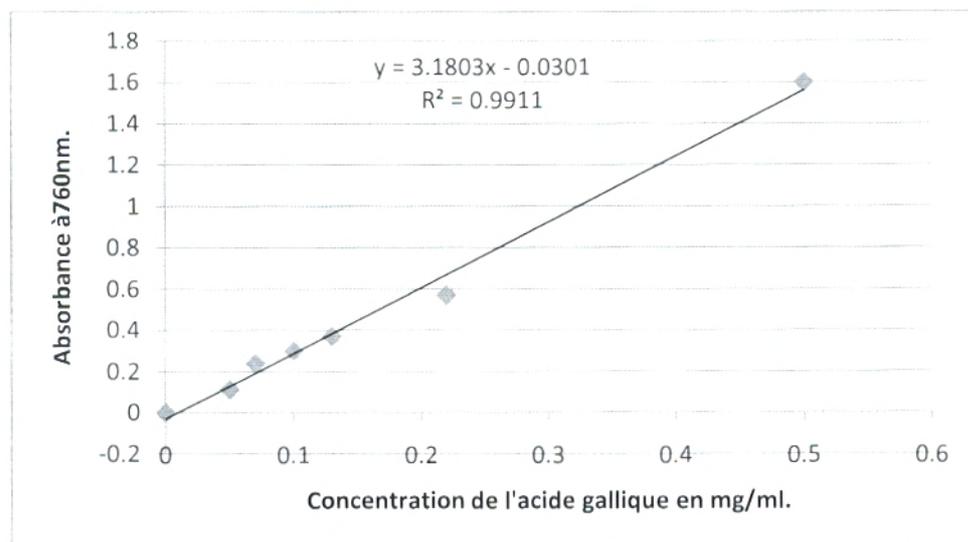


Figure14 : Courbe d'étalonnage des phénols totaux.



➤ **La gamme d'étalon des flavonoïdes à partir de la catéchine :**

A partir d'une solution mère de catéchine 2mg/ml on prépare des dilutions a différentes concentrations ensuite on prélève 1ml de chaque dilution :

- ✓ On ajoute 1ml d' AlCl_3 à 2% puis on mélange au vortex.
- ✓ Après incubation de 15min, on lit l'absorbance à 430nm.
- ✓ Réalisation de la courbe d'étalonnage.

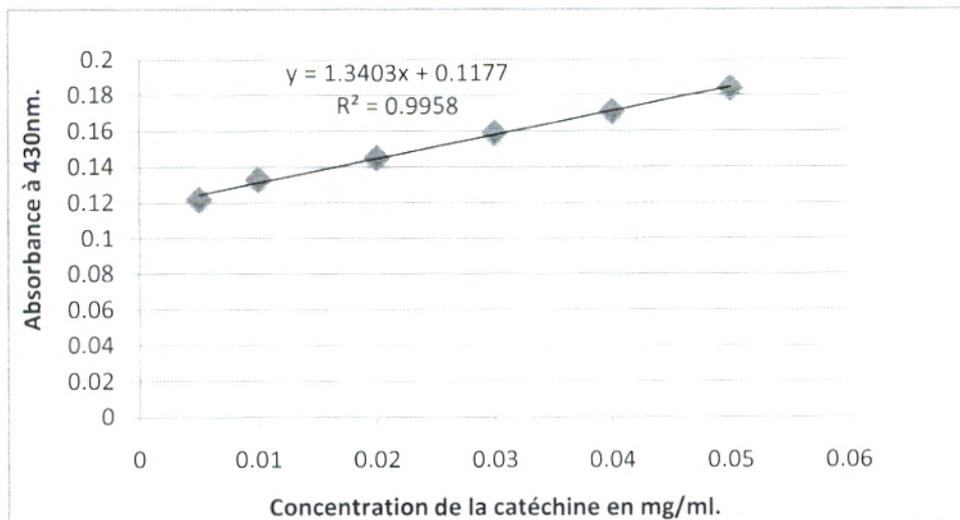


Figure 15 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.

➤ **Réactif C:**

Mélanger FeCl_3 0.01M avec une solution d' HCl 0.001M (V/V).

➤ **Réactif de MAYER :**

Iodure potassium.....25
 Chlorure mercurique.....6, 77 g
 Eau distillée qsp.....50 ml

➤ **Réactif de DRAGENDORFF :**

Nitrate de bismuth pulvérisé.....20,80 g
 Iode.....38,10 g
 Iodure de sodium anhydre.....200 g
 Eau distillée q s p.....1000 ml
 Agiter pendant 30 mn

➤ **Réactif de Wagner :**

Dissoudre 2g de KI et 1.27g de I₂ dans 75ml d'eau. Ajuster le volume total à 100ml avec de l'eau distillée.

➤ **Tableaux représentatifs des résultats des dosages :**

Dosages	Phénols totaux	flavonoïdes	Tanins totaux	Tanins hydrolysables	Tanins condensés
Do (absorbance)	1.3649	2.16795	1.0690	4.9224	0.4113
Concentration mg/g	1.315	0.917	0.4510	0.34%	0.021%

➤ **Tableaux représentatifs des résultats des Pouvoirs antioxydants**

Pouvoir antioxydant des phénols totaux de la feuille <i>P.tomentosa</i> L		Pouvoir antioxydant des tanins de la feuille <i>P.tomentosa</i> L		Pouvoir antioxydant acide ascorbique	
Concentration (mg/ml)	% d'inhibition DPPH	Concentration (mg/ml)	% d'inhibition DPPH	Concentration (mg/ml)	% d'inhibition DPPH
10	12.75	2	10.47	0.24	92.28
15	18.63	2.5	11.16	0.22	92.01
20	25.41	3	13.50	0.19	72.53
25	61.06	3.5	40.6	0.14	52.24
30	72.45	3.75	70.5	0.12	56.37
35	73.95	4	86.6	0.062	56.62
40	76.83	5	97.85		
45	82.24				

Pouvoir antioxydant des alcaloïdes de la feuille <i>P.tomentosa</i> L		Pouvoir antioxydant de la fraction acétate d'éthyle des feuilles du <i>P.tomentosa</i> L		Pouvoir antioxydant de la fraction n-butanol des feuilles du <i>P.tomentosa</i> L	
Concentration (mg/ml)	% d'inhibition DPPH	Concentration (mg/ml)	% d'inhibition DPPH	Concentration (mg/ml)	% d'inhibition DPPH
0.5	4.2	0.5	47.7	0.2	37.01
1	11.8	1	56.03	0.4	55.13
1.5	39.35	1.5	62.06	0.6	63.19
2	57.8	2	79.09	0.8	74.47
2.5	70	2.5	88	1	78.65
		3	89.87		
		3.5	90.73		
		4	92.87		

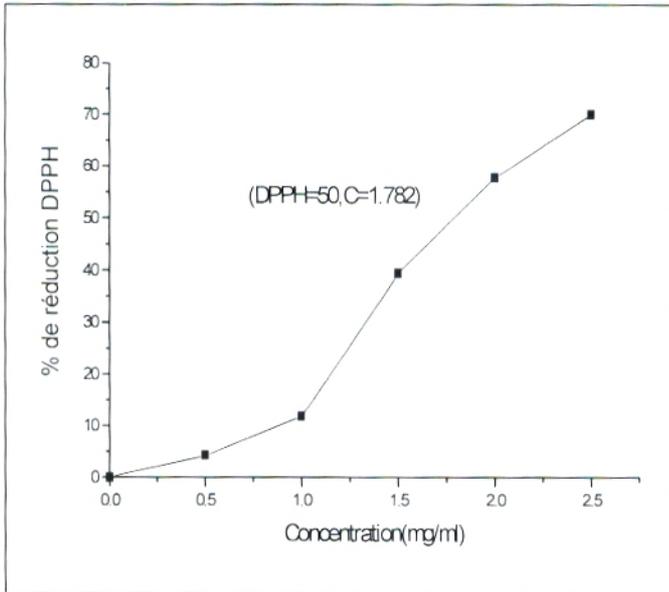


Figure 18: Le pouvoir antioxydant les alcaloïdes.

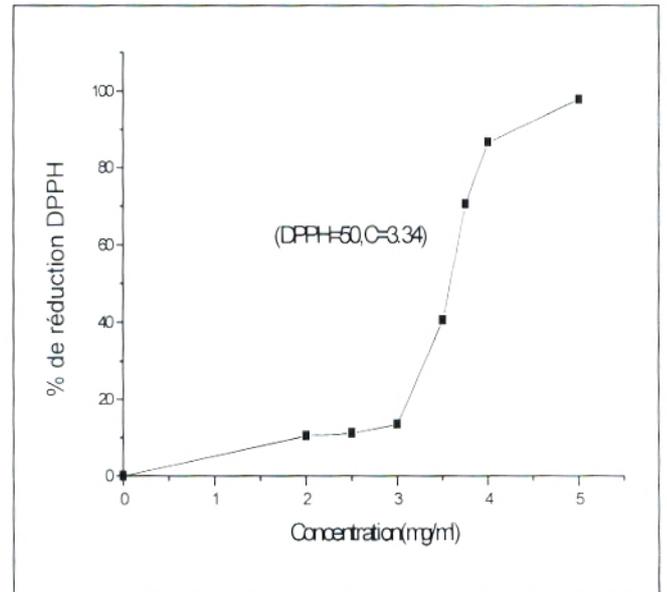


Figure 19: Le pouvoir antioxydant les tanins.

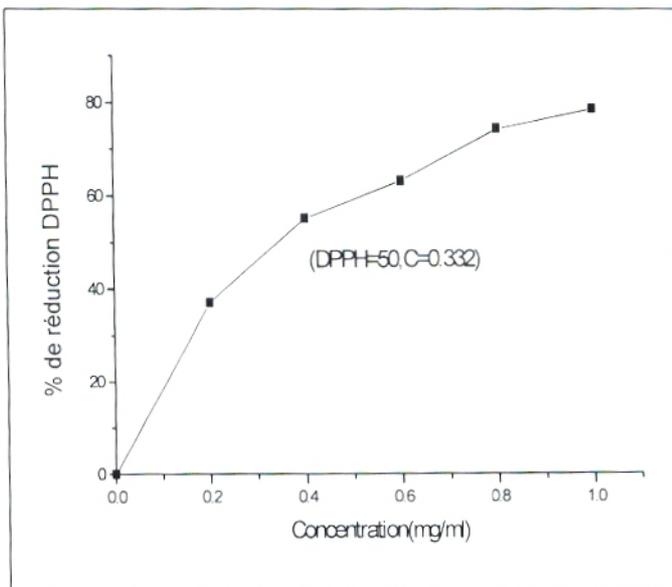


Figure 20: Le pouvoir antioxydant les fractions n-butanol.

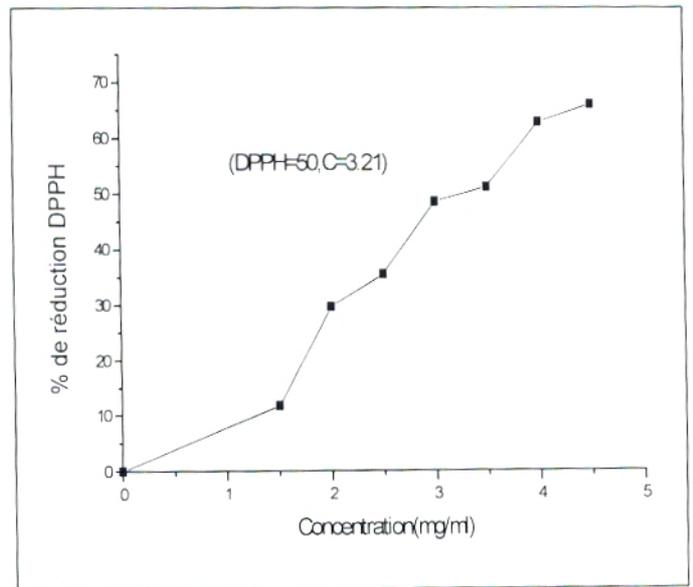


Figure 21: Le pouvoir antioxydant les fractions L'éther diéthylique

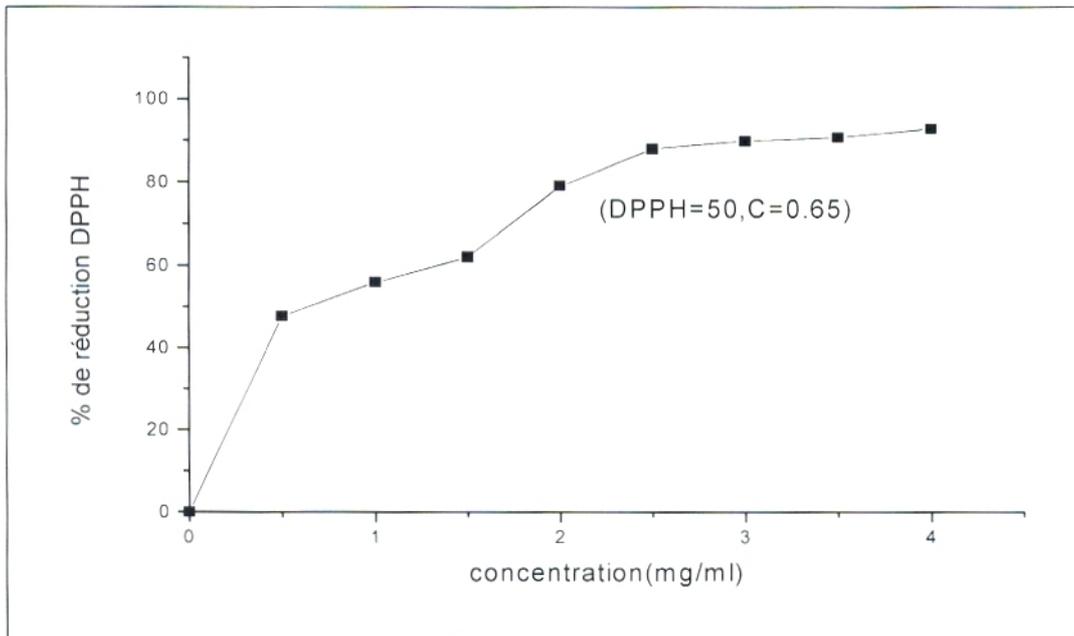


Figure 22: Le pouvoir antioxydant les fractions l'acétate d'éthyle.

Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales, nous nous sommes intéressées à l'étude d'une espèce végétale poussant spontanément dans la région d'Adrar, appelée *Pergularia tomentosa* L. appartenant à la famille Asclépiadacées. L'extraction de composés phénoliques a permis d'obtenir un rendement important de l'ordre de 17,6 %. Le fractionnement de l'extrait méthanolique nous a révélé que la fraction AcOEt (1,63%) et l'éther diéthylique (1,50%) présente un rendement plus élevé, par rapport à la fraction n-buOH (0,33%). Les dosages des polyphénols totaux et des tanins par la méthode de Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes par la méthode d'AlCl₃, ont révélé des teneurs de l'ordre de 131,5 mg / 100g de MS ; 45,1 mg /100 g de MS et 91,7 mg /100g de MS respectivement. L'évaluation de pouvoir antioxydant qui a été réalisée en utilisant la méthode de DPPH, a montré que les fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes (EC₅₀=0.65mg/ml et EC₅₀=0.33mg/ml), ont un pouvoir antioxydant relativement puissant par rapport à celui de l'acide ascorbique.

Mots clés: *Pergularia tomentosa* L, composées phénoliques, flavonoïdes, tanins, activité antioxydante, DPPH.

Abstract

In this work we are interested in the study of a medicinal plant growing wild in the Adrar region, called *Pergularia tomentosa* L. Family Asclépiadacées. The extraction of phenolic compounds made it possible to obtain an important yield of about 17.6%. The fractionation of the extract methanolic revealed that the AcOEt fraction (1, 63%) and the ether diethyl (1.50%) presents a higher yield, compared to the n-buOH fraction (0.33%). The quantitative determinations of total polyphenols and tannins by Folin Ciocalteu method and flavonoids by the (AlCl₃) method of showed levels whose values are in order to 131.5 mg/100g of DM; 45.1 mg /100 G of DM and 91.7 mg /100g of DM respectively. The evaluation of antioxidant power was performed using the method of DPPH, showed that fraction AcOEt, n-buOH of flavonoids (EC₅₀=0.65mg/ml of EC₅₀=0.33mg/ml) have a relatively a strong antioxidant power than ascorbic acid.

Keywords: *Pergularia tomentosa* L, phenolic compounds, flavonoids, tannins, antioxidant activity, DPPH.

ملخص

في إطار هذا العمل اهتمنا بدراسة نبتة تنمو بشكل عفوي في منطقة أدرار، تسمى *Pergularia tomentosa* L و تنتمي لعائلة Asclépiadacées. سمح استخلاص المركبات الفينولية الحصول على مردود معتبر يقدر ب 17.6%. كما بين فصل المستخلص الميثانولي أن جزء AcOEt (1,63%) و l'éther (1,50%) diéthylique أعطى مردود أكبر من جزء n-buOH (0,33%). بينت المعايير الكمية للفينولات الكلية والطانا باتباع طريقة Folin-Ciocalteu و الفلافونيدات بطريقة AlCl₃ أن محتوى الخام الميثانولي منها هو 131,5مغ/100غ و 45,1مغ/100غ و 91,7مغ/100غ على التوالي. تقدير النشاط المضاد للأكسدة باستعمال طريقة DPPH، بين أن الأجزاء AcOEt و n-buOH للفلافونيدات (EC₅₀=0.33mg/ml و EC₅₀=0.65mg/ml) تملك قدرة مضادة للأكسدة ضعيفة نسبيا بالمقارنة مع حمض الأسكوربيك.

الكلمات المفتاحية: *Pergularia tomentosa* L, المركبات الفينولية، الفلافونيدات، الطانا، النشاط المضاد للأكسدة، DPPH.

