

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

جامعة محمد الصديق بن يحيى جيجل

Faculté des Sciences de la Nature et de la
Vie
Département : Biologie Moléculaire et
Cellulaire



كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم: البيولوجيا الجزيئية و الخلوية

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie

Thème

Screening phytochimique et activité antioxydante de
quelques plantes médicinales

Membres de Jury

Président : M^{me} BENSEGHIER Salima

Examineur : Dr. CHERBAL Asma

Encadreur : Dr. BOUTENNOUN Hanane

Présenté par :

BOUDEHANE Esma

BOUCHEFIFA Farida

DESDOUS Noura

Année Universitaire 2018-2019

Numéro d'ordre (bibliothèque) :

Remerciements

Nous remercions tout d'abord 'Allah' le tout puissant de nous avoir donné la force et la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous sommes très honorées à remercier de la présence à notre jury de mémoire:

Dr. Boutennoun Hanane, d'avoir accepté la direction scientifique de ce travail ainsi que pour ses conseils, son aide précieux et ses encouragements tout au long de ce travail ;

M^{me} Benseghier Salima qui nous a fait l'honneur de présider notre jury ;

Dr. Cherbal Asma, d'avoir accepté de consacrer du temps à examiner et juger ce travail.

Nous tenons à remercier Dr. Boussof Lilia, Dr. Dairi Sofiane et M^{me} Razzagui Abir pour nous avoir aidés à la réalisation de quelques paramètres de l'activité antioxydante. Nous leur adressons notre éternel respect et nos sincères gratitude.

Nous adressons nos sincères remerciements à tous les membres du laboratoire de Biochimie du département de Biologie Moléculaire et Cellulaire à l'université de Jijel pour leur aide, en particulier M^{me} Imane et M^{me} Hayet.

Nous ne serons achevés sans remercier nos chers parents qui nous ont soutenus durant tous ses années d'étude et qui nous ont encouragés sans cesse.

Enfin nous remercions tous ceux qui nous ont aidées, de près ou de loin, à l'achèvement de ce travail Sans oublier l'ensemble des enseignants ayant contribué à notre formation durant notre cycle d'étude.

Merci à Tous...

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 01

Partie bibliographique

Chapitre I : Stress oxydant

I.1. Définition de stress oxydant.....	03
I.2. Qu'est-ce qu'un radical libre?.....	03
I.3. Espèces réactives de l'oxygène	03
I.4. Origines des ERO.....	04
I.5. Principales cibles biologiques des ERO.....	05
I.5.1. L'acide désoxyribonucléique ou ADN.....	05
I.5.2. Les protéines.....	05
I.5.3. Les lipides membranaires.....	05
I.6. Les défenses antioxydantes.....	06
I.6.1. Définition.....	06
I.6.2. Les type des systèmes de défenses antioxydants.....	06
I.6.2.1. Systèmes de défense enzymatique.....	06
A. La superoxyde dismutase (SOD).....	06
B. La catalase.....	06
C. Les glutathion peroxydases et réductases.....	07
I.6.2.2. Systèmes de défense non enzymatique.....	07
A. La vitamine E.....	07
B. La vitamine C.....	07
C. Les caroténoïdes.....	07
D. Le Glutathion.....	08
E. Les polyphénols.....	08
I.7. Mécanisme d'action des antioxydants.....	08
I.7.1. Antioxydants primaires ou piègeurs des radicaux libres.....	08

I.7.2. Antioxydants secondaires ou préventifs.....	08
Chapitre II : Les composés phénoliques	
II.1. Définition et généralités.....	09
II.2. Structures et classifications des composés phénoliques.....	09
II.2.1. Les flavonoïdes.....	09
II.2.2. Les non-flavonoïdes.....	11
II.2.2.1. Les acides phénoliques.....	11
a. Les acides hydroxybenzoïques.....	11
b. Les acides hydroxycinnamiques.....	11
II.2.2.2. Les tanins.....	11
A. Les tanins pyrogalliques (ou hydrolysables).....	11
B. Les tanins condensés (ou non hydrolysables).....	11
II.2.2.3. Coumarines.....	12
II.2.2.4. Les stilbènes.....	12
II.2.2.5. La lignine.....	13
II.3. Biosynthèse des polyphénols.....	13
II.3.1. Voie de l'acide shikimique.....	13
II.3.2. Voie de l'acétate/malonate.....	13
II.4. Rôle antioxydant des polyphénols.....	14
II.4.1. Inhibition enzymatique.....	14
II.4.2. Chélation des ions métalliques.....	14
II.4.3. Piégeage des radicaux libres.....	14
II.5. Les plantes médicinales sélectionnées.....	15
II.5.1. <i>Marrubium vulgare</i>	15
II.5.1.1. Description botanique.....	15
II.5.1.2. Systématique de la plante.....	15
II.5.1.3. Utilisations de la plante.....	15
II.5.2. <i>Salvia verbenaca</i>	16
II.5.2.1. Description botanique.....	16
II.5.2.2. Systématique de la plante.....	16
II.5.2.3. Utilisations de la plante.....	16
II.5.3. <i>Phlomis crinita</i>	17
II.5.3.1. Description botanique.....	17
II.5.3.2. Systématique de la plante.....	17

II.5.3.3. Utilisations de la plante.....	17
--	----

Partie pratique

I. Matériel et méthodes.....	18
I.1. Matériel végétal.....	18
I.2. Préparation des extraits.....	18
I.2.1. Séchage.....	18
I.2.2. Broyage.....	18
I.2.3. Tamisage.....	19
I.2.4. Extraction des composés phénoliques.....	19
I.2.4.1. Macération.....	19
I.2.4.2. Filtration et décantation.....	20
I.2.4.3. Evaporation.....	20
I.2.5. Détermination du rendement d'extraction.....	22
I.3. Analyse phytochimique.....	22
I.3.1. Analyse qualitative.....	22
I.3.1.1. Les flavonoïdes.....	22
I.3.1.2. Les tanins.....	22
I.3.1.3. Les saponines.....	22
I.3.1.4. Les quinones libres.....	23
I.3.1.5. Les terpénoïdes.....	23
I.3.1.6. Les alcaloïdes.....	23
I.3.1.7. Les oses et holosides.....	23
I.3.2. Analyse quantitative.....	23
I.3.2.1. Dosage des polyphénols.....	23
I.3.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	24
I.4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits phénoliques des plantes étudiées.....	25
I.4.1. Pouvoir antiradicalaire (Piégeage du radical libre DPPH).....	25
I.4.1.1. Principe.....	25
I.4.1.2. Mode opératoire.....	26
I.4.1.3. Détermination de la concentration inhibitrice médiane (IC ₅₀).....	27
I.4.2. Pouvoir réducteur.....	27
I.4.2.1. Principe.....	27
I.4.2.2. Mode opératoire.....	27
I.4.3. Test de blanchiment du β -carotène.....	28

I.4.3.1. Principe.....	28
I.4.3.2. Mode opératoire.....	29
I.5. Evaluation statistique.....	30
II. Résultats et interprétation.....	31
II.1. Les rendements des extraits phénoliques.....	31
II.2. Etude phytochimique.....	31
II.2.2. Etude qualitative.....	31
II.2.1. Etude quantitative.....	35
II.3. Résultats de l'activité antioxydante.....	37
II.3.1. Activité antiradicalaire (DPPH).....	37
II.3.2. Pouvoir réducteur du Fer.....	39
II.3.3. Test de blanchiment du β -carotène.....	40
III. Discussion.....	42
Conclusion.....	47
Références bibliographiques.....	48
Annexes	
Résumé	

Liste des abréviations

ADN	: Acide désoxyribonucléique
BHA	: Hydroxyanisol butylé
DPPH	: 2, 2- diphenyl-1- picrylhydrazyl
EAG	: Equivalent en acide gallique
EB	: Extrait brut
EQ	: Equivalent en quercétine
ERO	: Espèces réactives de l'oxygène
GPx	: Glutathion peroxydase
GSH	: Glutathion réduit
GSSG	: Disulfure de glutathion oxydé
IC₅₀	: Half maximal inhibitory concentration
[K₃Fe(CN)₆]	: Ferricyanure de potassium
Na₂CO₃	: Carbonate de sodium
OMS	: Organisation mondiale de la santé
pH	: Potentiel hydrogène
SOD	: Superoxyde dismutase

Liste des figures

Figure 1 :	Définition du stress oxydant.....	03
Figure 2 :	Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.....	04
Figure 3 :	Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.....	05
Figure 4 :	Différentes structures des tanins.....	12
Figure 5 :	Structure des coumarines.....	12
Figure 6 :	Structure de base des stilbènes (tran ou cis).....	12
Figure 7 :	Principaux constituants de la lignine.....	13
Figure 8 :	<i>Marrubium vulgare</i> dans son milieu systématique.....	15
Figure 9 :	<i>Salvia verbenaca</i> dans son milieu systématique.....	16
Figure 10 :	<i>Phlomis crinita</i> dans son milieu systématique.....	17
Figure 11 :	La situation géographique de la station de récolte.....	18
Figure 12 :	Photo de la plante <i>Phlomis crinita</i> fraîche, sèche et tamisée.....	19
Figure 13 :	Macération sous agitation magnétique.....	20
Figure 14 :	La filtration à l'aide du papier Whatman N°3 des extraits.....	20
Figure 15 :	Délipidation et décantation.....	20
Figure 16 :	Evaporation des extraits phénoliques.....	21
Figure 17 :	Schéma général d'extraction des polyphénols.....	21
Figure 18 :	Protocole de dosage des composés phénoliques.....	24
Figure 19 :	Protocole de dosage des flavonoïdes.....	25
Figure 20 :	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	25
Figure 21 :	Protocole d'étude de l'activité antiradicalaire.....	26
Figure 22 :	Protocole d'étude de pouvoir réducteur fer.....	28
Figure 23 :	Protocole du blanchiment du β -carotène.....	30
Figure 24 :	Résultats de screening phytochimique des flavonoïdes chez les trois plantes étudiées.....	33
Figure 25 :	Résultats de screening phytochimique des tanins galliques chez les trois plantes étudiées.....	33
Figure 26 :	Résultats de screening phytochimique des saponines chez les trois plantes étudiées.....	33

Figure 27 :	Résultats de screening phytochimique des quinones libres chez les trois plantes étudiées.....	34
Figure 28 :	Résultats de screening phytochimique des terpénoïdes chez les trois plantes étudiées.....	34
Figure 29 :	Résultats de screening phytochimique des alcaloïdes chez les trois plantes étudiées.....	34
Figure 30 :	Résultats de screening phytochimique des oses et holosides chez les trois plantes étudiées.....	35
Figure 31 :	Teneur en polyphénols des trois plantes.....	36
Figure 32 :	Teneur en flavonoïdes des trois plantes.....	36
Figure 33 :	Pouvoir réducteur DPPH de l'extrait des trois plantes et des standards exprimé en pourcentage.....	37
Figure 34 :	Pouvoir réducteur Fer de l'extrait des trois plantes et des standards.....	39
Figure 35 :	Test de blanchiment du β -carotène des extraits des trois plantes et des contrôles.	41
Figure 36 :	Activité antioxydant relative (AAR) des extraits des trois plantes et des contrôles.....	41

Liste des tableaux

Tableau I	: Les principales espèces réactives de l'oxygène.....	03
Tableau II	: Différentes structures des flavonoïdes.....	10
Tableau III	: Différentes structures des acides phénoliques.....	11
Tableau IV	: Les rendements des extraits méthanoliques des trois plantes exprimés en pourcentage.....	31
Tableau V	: Screening phytochimique des espèces étudiées.....	32
Tableau VI	: Valeurs des IC ₅₀ des extraits étudiées.....	39

Introduction

Introduction

La production excessive des espèces réactives de l'oxygène (ERO) est responsable de dégâts cellulaires importants notamment l'induction de ruptures et de mutations de l'ADN, la modification de structures protéiques et la peroxydation des lipides (**Christen, 2000**). Le déséquilibre résultant d'une production accrue des espèces réactives de l'oxygène et d'une altération des défenses antioxydantes entraîne le stress oxydatif (**Christen, 2000**). Ce stress oxydatif peut être à l'origine de nombreuses pathologies telles que le cancer, les insuffisances respiratoires, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Aviram, 2000**).

Au cours de ces dernières années, un nombre croissant de rapports confirment que beaucoup de fruits et légumes peuvent offrir une protection contre certaines maladies chroniques causées par le stress oxydatif (**Sun et al., 2009 ; Bouchouka, 2016**).

Les composés phénoliques suscitent un intérêt considérable dans le domaine de l'alimentaire, de la chimie et de la médecine en raison de leur potentiel antioxydant prometteur (**Kalia et al., 2008**). Les composés phénoliques ou polyphénols sont largement distribués dans le règne végétal et sont les métabolites secondaires les plus abondants dans les plantes. Ces métabolites comprennent de nombreuses classes de composés allant des acides phénoliques simples aux tanins complexes (**Nawaz et al., 2006**).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), environ 65-80% de la population mondiale dans les pays en développement, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne, dépendent essentiellement des plantes médicinales traditionnelles pour leurs soins de santé primaire (**Libman et al., 2006 ; Tamert, 2016**).

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs (**Ameenah, 2006**). Ces plantes médicinales renferment de nombreux principes actifs où certains sont issus du métabolisme secondaire. Les plantes produisent 70% de nos médicaments, déjà environ 170000 molécules bioactives ont été identifiées à partir de plantes (**Chaabi, 2008**).

Les plantes constituent donc une source intéressante de nouveaux composés dans la recherche de molécules bioactives.

Dans ce contexte, notre choix s'est porté sur trois plantes de la région de Jijel (*Marubium vulgare*, *Salvia verbenaca* et *Phlomis crinita*), pour leurs vertus thérapeutiques dans le but d'évaluer *in vitro* leurs activités antioxydantes.

L'objectif de notre travail vise à démontrer la richesse de ces plantes en principes actifs (polyphénols) et à déterminer leurs propriétés physicochimiques, notamment les propriétés antioxydants.

Notre travail sera réparti en deux parties : une partie relative à l'étude bibliographique du stress oxydatif et la défense antioxydante, des polyphénols et des plantes choisies. Une autre partie réservée à l'étude expérimentale relative à l'analyse phytochimique des trois plantes et l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* de leurs extraits polyphénoliques.

Partie
bibliographique

*Chapitre I: Stress
oxydant*

I.1. Définition de stress oxydant

Le stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers (Figure 1) (Pincemail *et al.*, 1999). Ce déséquilibre provient soit d'une production exagérée d'agents oxydants, soit d'une altération des mécanismes de défense (Morena *et al.*, 2002).

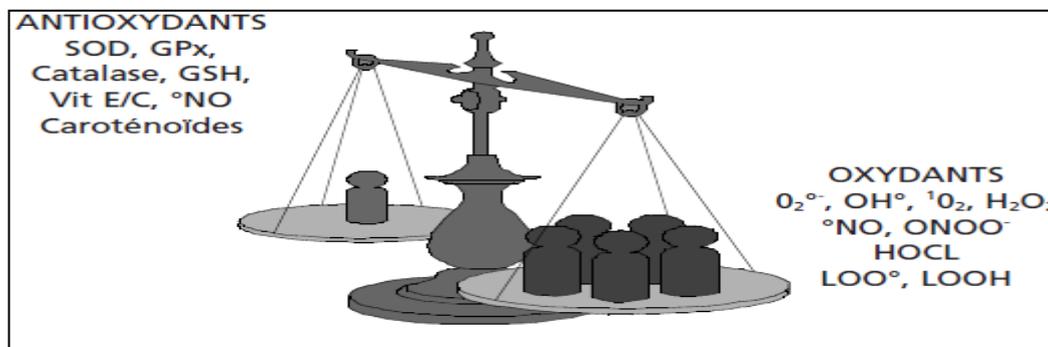


Figure 1 : Définition du stress oxydant (Morena *et al.*, 2002).

I.2. Qu'est-ce qu'un radical libre ?

Un radical libre se définit comme tout atome, groupe d'atome ou molécules possédant un électron non apparié (célibataire) sur leur orbitale. Il s'agit d'espèce chimique très réactive qui cherche dans leur environnement un électron pour s'apparier (c'est-à-dire pour former une liaison chimique) (Jadot, 1994).

I.3. Espèces réactives de l'oxygène

L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé : espèces réactives de l'oxygène (Merouane *et al.*, 2014). Les ERO (Tableau I) sont la conséquence inévitable de la consommation de l'oxygène moléculaire par l'organisme. Leur production est permanente et physiologique (Koechlin et Ramonatxo, 2006).

Tableau I: Les principales espèces réactives de l'oxygène.

Espèces réactives	Propriétés
L'anion superoxyde (O_2°)	L' O_2° constitue la première forme radicalaire capable d'agresser les composantes cellulaires et matricielles (Afonso <i>et al.</i> , 2007). N'est pas très réactif, mais constitue un précurseur d'autres espèces plus réactives. La faible réactivité de ce radical permet d'ailleurs son utilisation par l'organisme comme médiateur régulant des fonctions biologiques (Favier, 2003).

Le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	Non radicale, stable, faiblement toxique, diffusible, antiseptique, peut former OH• (Tessier et Marconnet, 1995).
Le radical hydroxyle (OH•)	Très réactif et peu diffusible (Tessier et Marconnet, 1995). Il peut être produit à partir de l'eau par les radiations ionisantes dans tous les organismes vivants (Goudable et Favier, 1997).
Le monoxyde d'azote (NO•)	Il est notamment synthétisé par les cellules endothéliales via l'action de NO synthétases sur la L-arginine, qui détoxifier l'anion superoxyde et jouer là un rôle antioxydant important (Massion <i>et al.</i> , 2002). Le NO• peut former avec l'anion superoxyde le peroxyde d'azote (ONOO•) (Haleng <i>et al.</i> , 2007).
Le peroxyde d'azote (ONOO•)	Un oxydant puissant et diffusible, capable d'endommager de nombreuses molécules organiques (Haleng <i>et al.</i> , 2007). Très réactif et sans doute responsable de la majorité des effets délétères attribués au NO• (Massion <i>et al.</i> , 2002).

I.4. Origines des ERO

Les ERO peuvent être d'origine exogène telle que les produits des radiations (rayons X et lumière UV), polluants de l'air, solvant organiques, anesthésiques, pesticides, drogues et xénobiotiques. Lorsqu'ils d'origine endogène, ils sont produits, en majorité, au niveau des chaînes respiratoires mitochondriales des cellules des organismes aérobies (Figure 2) (Tessier et Marconnet, 1995).

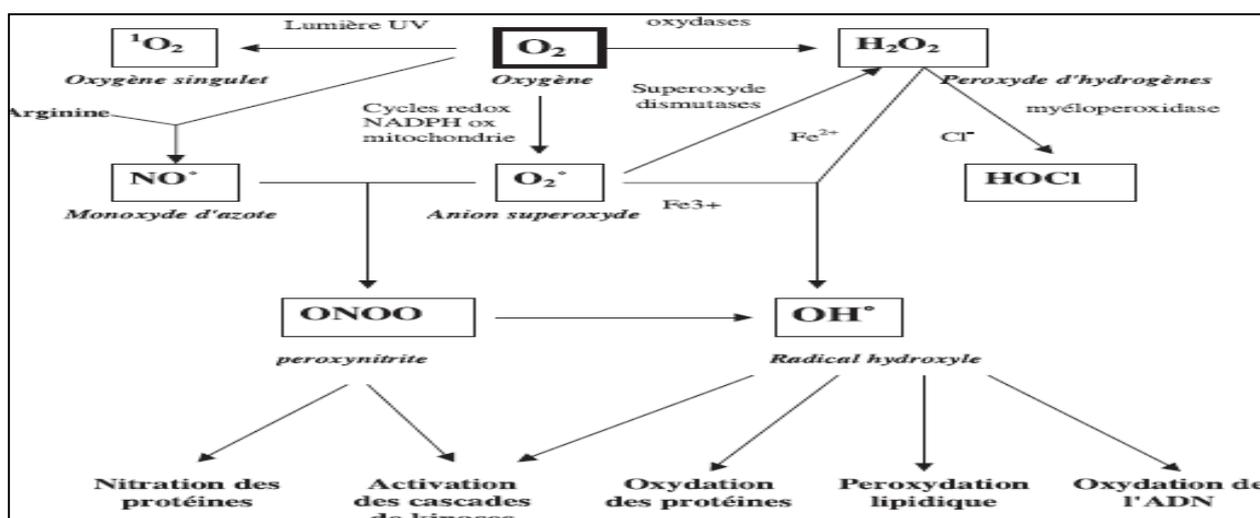


Figure 2 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003).

I.5. Principales cibles biologiques des ERO

I.5.1. L'acide désoxyribonucléique ou ADN

L'ADN est une cible privilégiée pour les ERO (Figure 3). La guanine, par exemple, peut réagir avec le $\text{OH}\cdot$ pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (Haleng *et al.*, 2007).

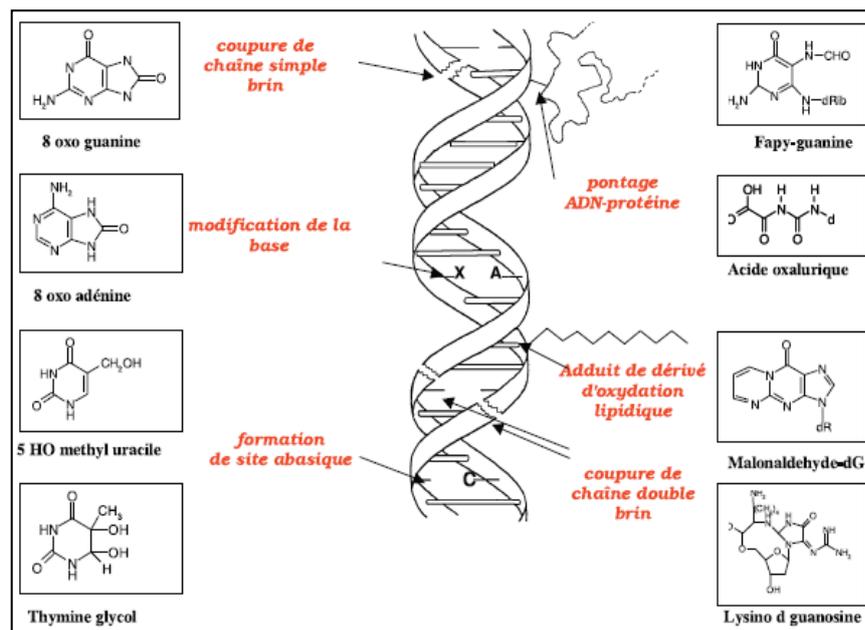


Figure 3: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003).

I.5.2. Les protéines

Les protéines sont elles aussi sensibles à l'action du radical $\text{OH}\cdot$, celui-ci peut, en effet, réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines. Les plus sensibles à son action sont les acides aminés aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine, ou celui ayant un noyau imidazole comme l'histidine, sur lesquels le radical $\text{OH}\cdot$ s'additionne et provoque un changement de conformation de la molécule de protéine (Pasquier, 1995).

I.5.3. Les lipides membranaires

Les ERO réagissent avec les acides gras insaturés, conduisant à la formation d'hydroperoxydes (Barouki, 2006).

I.6. Les défenses antioxydantes

I.6.1. Définition

Le terme d'antioxydant désigne « toutes substances présentes à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, qui possèdent des propriétés allant bien au-delà de leur capacité à piéger les ERO (Pincemail *et al.*, 2002) et retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat » (Delosière *et al.*, 2013).

I.6.2. Les type des systèmes de défenses antioxydantes

L'organisme possède des systèmes de défense très efficaces de deux types : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques (Goudable et Favier, 1997).

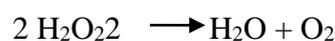
I.6.2.1. Systèmes de défense enzymatiques

A. La superoxyde dismutase (SOD)

Ont mis en évidence l'activité de dismutation du SOD sur les radicaux superoxydes. Cette enzyme est capable de neutraliser 80% des molécules d'oxygène (O_2) fournis par la mitochondrie. La fraction restante (20%) échappe à l'action de la SOD et apparait dans le cytoplasme. La SOD, bien qu'ayant une activité antioxydant sur les O_2° , peut être considérée comme source d'espèces oxygénées actives puisqu'elle fournit H_2O_2 (Tessier et Marconnet, 1995).

B. La catalase

Dans son mode dit catalasique, la catalase catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau (H_2O) et oxygène moléculaire selon la réaction :



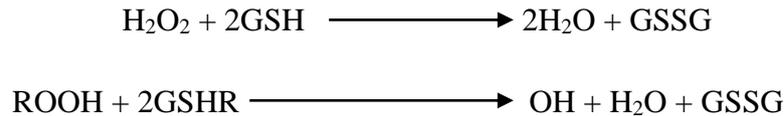
La catalase peut, à concentrations basses en peroxyde d'hydrogène, aussi travailler selon le mode dit peroxydasique en catalysant la réaction suivante :



Où : RH_2 représente un substrat (alcool ou phénol) pouvant être oxydé par la catalase (Vamecq *et al.*, 2004).

C. Les glutathion peroxydases et réductases

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. Le rôle de la glutathion peroxydase (GPx) est de réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools. Lors de cette réaction, qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celles-ci se transforment en glutathion-disulfure (GSSG) (**Marfak, 2003**).



I.6.2.2. Systèmes de défense non enzymatiques

A. La vitamine E

La vitamine E (α -tocophérol) réagit avec les radicaux d'origine lipidique pour empêcher le processus de peroxydation lipidique de se développer. Si le flux de radicaux libres formé est trop important, le radical tocophéryl peut toutefois devenir prooxydant et contribuer ainsi à augmenter la peroxydation lipidique et jouer un rôle dans le développement de l'athérosclérose (**Pincemail et al., 2002**).

B. La vitamine C

Cette vitamine est capable de réagir directement avec les radicaux superoxydes, hydroxyles et l'oxygène singulet : elle est un excellent piègeur de ces ERO. Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques (**Tessier et Marconnet, 1995 ; Haleng et al., 2007**).

C. Les caroténoïdes

Plus de 600 caroténoïdes différents ont été isolés à partir de sources naturelles. De façon formelle, tous les caroténoïdes dérivent d'une structure linéaire ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}$) avec de nombreuses doubles liaisons. Le chef de file des caroténoïdes est cependant le β -carotène, également appelé provitamine A car, après hydrolyse hépatique, il donne naissance à deux molécules de vitamine A (**Haleng et al., 2007**). Le β -carotène capte l'oxygène singulet sous faible pression d'oxygène (**Goudable et Favier, 1997**).

D. Le Glutathion

Le glutathion est un antioxydant impliqué dans de nombreux processus. Son rôle dans la détoxification des xénobiotiques et d'ERO a été bien établi. Par ailleurs, c'est un coenzyme de plusieurs enzymes telles que la glutathion peroxydase, qui joue un rôle protecteur essentiel contre le stress oxydant (**Durand et Beaudoux, 2011**).

E. Les polyphénols

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits (**Boizot et Charpentier, 2006**).

I.7. Mécanisme d'action des antioxydants

I.7.1. Antioxydants primaires ou piègeurs des radicaux libres

Ce genre d'antioxydants peut inhiber la réaction d'initiation et la propagation de l'oxydation en participant au processus d'oxydation et en convertissant les radicaux libres vers leurs formes inactives.

Les antioxydants primaires sont généralement des composés phénoliques capables de donner un atome d'hydrogène au radical libre et le convertir en un composé stable non radicalaire (**Frankel et Meyer, 2000**).

I.7.2. Antioxydants secondaires ou préventifs

Ils englobent une large gamme de différentes substances chimiques qui inhibent l'oxydation des lipides par différents mécanismes. Les antioxydants secondaires sont généralement reliés à l'inhibition de facteurs initiant l'oxydation. Ce sont des substances décomposant les hydroperoxydes en alcool, comme thiols (glutathion, acides aminés soufrés) ou les disulfures, des protecteurs vis-à-vis des UV, comme les carotènes, les chélatants des métaux pro-oxydatifs type fer et cuivre, comme l'acide citrique ou enfin de séquestrant d'oxygène comme l'acide ascorbique (**Rolland, 2004**).

*Chapitre II: Les
composés phénoliques*

II.1. Définition et généralités

Les « polyphénols » ou « composés phénoliques » sont les antioxydants les plus présents dans la nature (Menat, 2006). Ils sont des molécules synthétisées par les végétaux, qui appartiennent à leur métabolite secondaire et participent à leur défense contre les agressions environnementales (Edeas, 2007). Ce sont les métabolites secondaires les plus largement représentés dans le règne végétal (Ba *et al.*, 2010) et sont généralement des pigments responsables des couleurs des fleurs et fruits (jaune, orange, rouge) (Edeas, 2007).

Les polyphénols naturels regroupent un vaste ensemble de substances chimiques (Chira *et al.*, 2008) : plus de 8 000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle *et al.*, 2004).

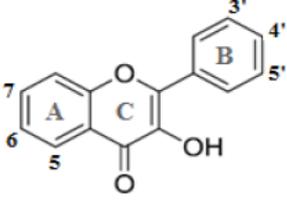
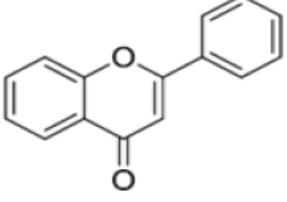
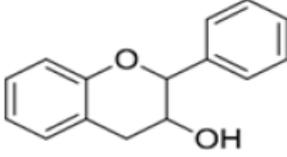
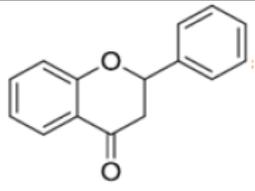
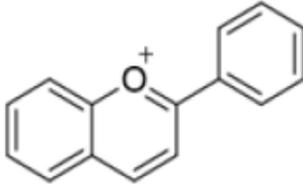
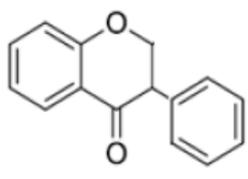
II.2. Structures et classifications des composés phénoliques

La structure des composés phénoliques va du simple noyau aromatique de faible poids moléculaire jusqu'aux tanins complexes de très haut poids moléculaire. Ils peuvent être classés par le nombre et l'arrangement des atomes de carbone les composant, en fonction de la nature de leur squelette carboné et en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique. Les composés phénoliques sont capables de se conjuguer à des oses ou à des acides organiques. De ce fait, on peut les retrouver très souvent présents sous ces formes (Chira *et al.*, 2008). Les composés phénoliques peuvent être répartis en deux grands groupes : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes (Pincemail *et al.*, 2007).

II.2.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques comprenant 15 atomes de carbone formant une structure C₆-C₃-C₆, soit deux noyaux aromatiques reliés par un pont de 3 carbones. Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Il existe plusieurs groupes de flavonoïdes, dont les principaux sont les flavonols, les flavones, les flavan-3-ols, les flavanones, les anthocyanidines et les isoflavones (Tableau II) (Chira *et al.*, 2008 ; Collin *et Crouzet*, 2011).

Tableau II : Différentes structures des flavonoïdes (Bruneton, 2009).

Classes	Structures chimiques	3'	4'	5'	Exemples
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH ₃	H	Diosmétine
Flavan-3-ols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		5	7	4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidézeine

II.2.2. Les non-flavonoïdes

II.2.2.1. Les acides phénoliques

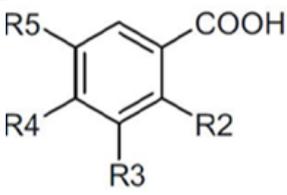
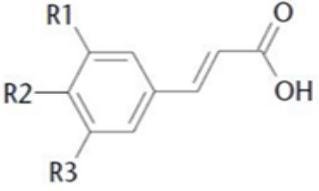
a. Les acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques présentent une structure en C6-C1, (Tableau III) composée d'un noyau benzénique sur lequel vient s'attacher une chaîne aliphatique à un carbone (**Chira et al., 2008**).

b. Les acides hydroxycinnamiques

Leur squelette de base est un noyau benzénique (Tableau III) avec une chaîne aliphatique à 3 carbones (C6-C3), avec un ou plusieurs groupements hydroxyles (**Chira et al., 2008**).

Tableau III : Différentes structures des acides phénoliques (**Laguerre et al., 2007**).

Classes	Structures chimiques	R2	R3	R4	Exemples
Acides hydroxybenzoïques		OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
		H	H	H	Acide salicylique
		H	H	OH	Acide gentisique
Acides hydroxycinnamiques		R1	R2	R3	
		OH	OH	H	Acide caféique
		OCH ₃	OH	H	Acide férulique
		OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique

II.2.2.2. Les tanins

Les tanins sont des polyphénols ayant des poids moléculaires compris entre 500 et 3000. Les tanins peuvent se diviser en deux classes (**Doat, 1978**) :

A. Les tanins pyrogalliques(ou hydrolysables)

Ils donnent après hydrolyse à chaud à l'aide de solutions acides, une fraction glucidique (glucose) et une fraction polyphénolique (Figure 4) (**Doat, 1978**).

B. Les tanins condensés (ou non hydrolysables)

Sous l'action des acides dilués, au lieu de conduire à des produits plus simples, donne au contraire des composés encore plus condensés (Figure 4) (**Doat, 1978**).

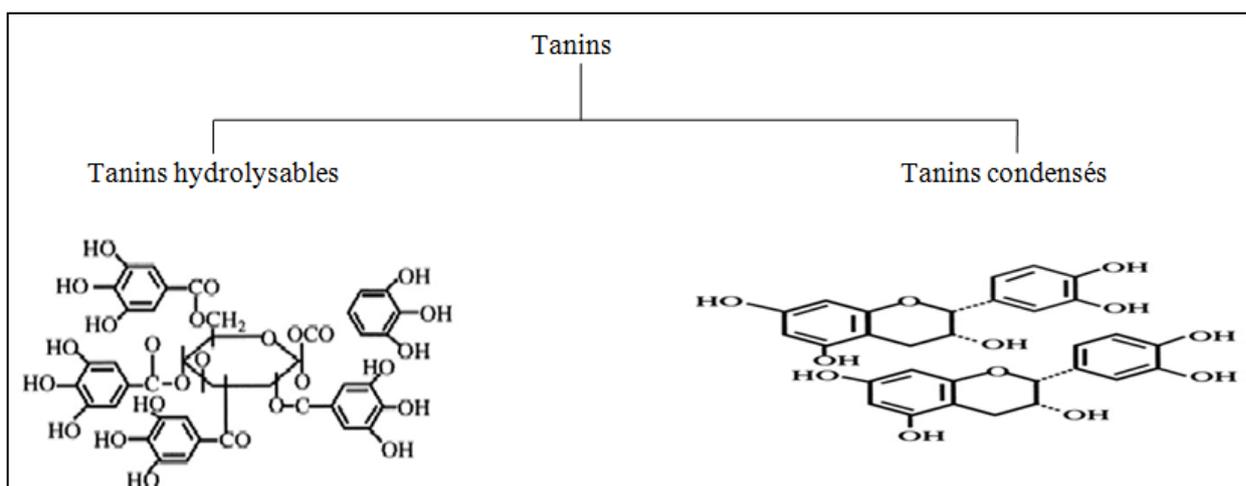


Figure 4 : Différentes structures des tanins (Cowan, 1999).

II.2.2.3. Coumarines

Ils ont une structure de base C6-C3 (Figure 5). Ces composés sont connus pour leurs propriétés anticoagulantes (Collin et Crouzet, 2011).

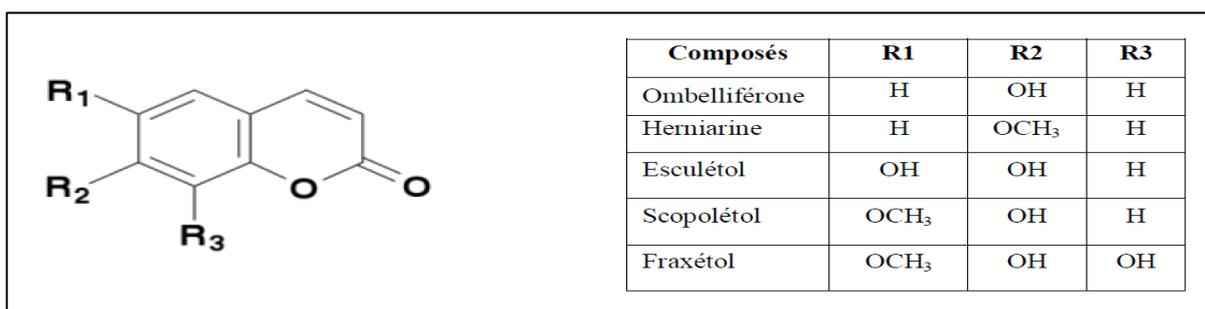


Figure 5: Structure des coumarines (Bruneton, 2009).

II.2.2.4. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés polyphénoliques qui ont une structure C6-C2-C6 (Figure 6) avec deux noyaux benzéniques reliés par un pont méthylène (Chira *et al.*, 2008).

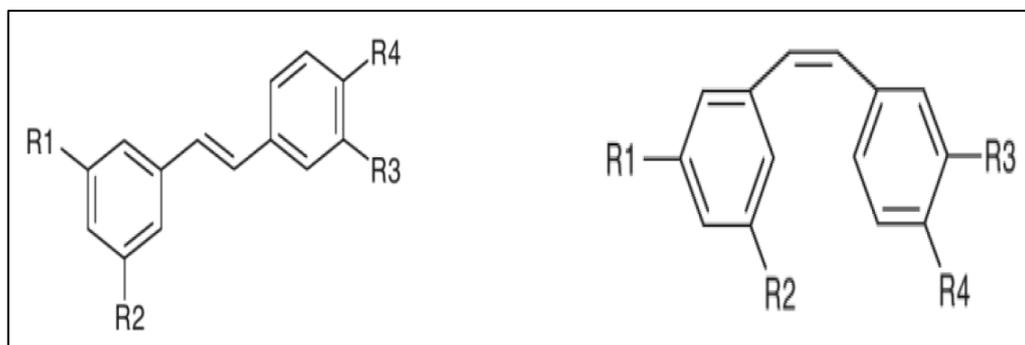


Figure 6 : Structure de base des stilbènes (trans ou cis) (Collin et Crouzet, 2011).

II.2.2.5. La lignine

La lignine est un polymère fortement ramifié, formés par trois alcools phénoliques simples (Figure 7). La lignine est localisée dans les parois cellulaires et plus spécialement dans les parois secondaires des éléments conducteurs, contribuant à la résistance mécanique et à la rigidité des tiges lignifiées (**Hopkins, 2003**).

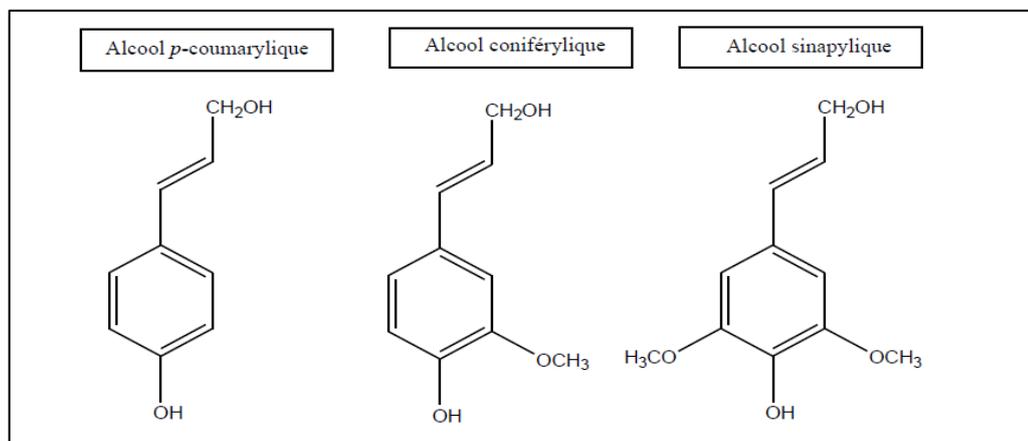


Figure 7 : Principaux constituants de la lignine (**Hopkins, 2003**).

II.3. Biosynthèse des polyphénols

Les composés phénoliques sont principalement synthétisés à partir des hydrates de carbone via la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate (**Chira et al., 2008**).

II.3.1. Voie de l'acide shikimique

C'est la voie la plus importante pour la biosynthèse des composés aromatiques dans les plantes et les micro-organismes, y compris les acides aminés aromatiques : la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Ces derniers sont des métabolites primaires qui servent de précurseurs pour de nombreux métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques et les alcaloïdes (**Ghasemzadeh et Ghasemzadeh, 2011**). Elle conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples (**Knaggs, 2003**).

II.3.2. Voie de l'acétate/malonate

C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (**Richter 1993; Ghasemzadeh et Ghasemzadeh, 2011**).

II.4. Rôle antioxydant des polyphénols

Les polyphénols possèdent des propriétés antioxydantes et sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement tels que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle et l'oxygène singulet. Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans nos régimes alimentaires. Ils renforcent nos défenses naturelles contre le stress oxydant et préviendraient ainsi diverses maladies chroniques, telles que les cancers et maladies cardio-vasculaires (**Edeas, 2007**). Les polyphénols peuvent agir selon divers mécanismes :

II.4.1. Inhibition enzymatique

L'inhibition de la production des ERO par les polyphénols, particulièrement les flavonoïdes, peut procéder directement par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage directe des ERO. Cette double action est bien illustrée par le cas de la xanthine oxydase, cet enzyme est considéré comme une source biologique importante de radical superoxyde (**Hanasaki *et al.*, 1994**).

II.4.2. Chélation des ions métalliques

La chélation des métaux tels que le fer ou le cuivre sert à empêcher la réaction de Fenton dans les milieux biologiques (**Bouguerne, 2012**). Les flavonoïdes abondants dans les plantes et dans l'alimentation sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques (**Malešev et Kuntić, 2007**).

II.4.3. Piégeage des radicaux libres

Les composés phénoliques ont des propriétés antioxydantes en raison de leur capacité à piéger les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (**Sökmenetal.,2012**). Ils interfèrent avec l'oxydation des lipides et d'autres molécules par la donation rapide d'un atome d'hydrogène aux radicaux libres selon un mécanisme proposé dès 1976 par Sherwin : l'antioxydant cède formellement un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un radical intermédiaire. Il est stabilisé par ses structures mésomères conjuguées (**Portes, 2008**). Les radicaux intermédiaires sont relativement stables en raison de la résonance et donc une nouvelle réaction en chaîne n'est pas facile à initier (**Dai et Mumper, 2010**).

Les composés phénoliques possèdent une structure chimique idéale pour le piégeage des radicaux libres, parce qu'ils possèdent:

- Des groupes phénoliques hydroxyles qui sont susceptibles de donner un atome d'hydrogène ou un électron au radical libre,
- Un système aromatique stabilisé par la résonance (**Dai et Mumper, 2010**).

II.5. Les plantes médicinales sélectionnées

II.5.1. *Marrubium vulgare*

II.5.1.1. Description botanique

Le marrube est une plante herbacée, couverte d'un duvet blanc, à tiges dressées, de 40 à 60 cm de long. Les feuilles sont ovales, arrondies, souvent un peu cordées à la base. Il possède de petites fleurs blanches de 12 à 15 mm de long, une corolle à deux lèvres dont l'inférieure est trilobée et la supérieure est dilobée ainsi qu'un calice à 10 dents courtes et crochues (**Quezel et Santa, 1963**). Ressemblant légèrement à la menthe (Figure 8), à odeur forte pénétrante légèrement musquée et qui possède une saveur à la fois chaude et amère (**Aouadhi, 2010**).



Figure 8 : *Marrubium vulgare* dans son milieu systématique (Ouled Rabah, Jijel).

II.5.1.2. Systématique de la plante

La systématique de *Marrubium vulgare* est la suivante (**Judd et al., 2002 ; Quezel et Santa, 1963**).

Règne	: Plantae
Sous-règne	: Tracheobionta
Division	: Magnoliophyta
Embranchement	: Spermatophyta
Classe	: Magnoliopsida
Sous-classe	: Asteridae
Ordre	: Lamiales
Famille	: Lamiaceae
Genre	: <i>Marrubium</i>
Espèce	: <i>Marrubium vulgare</i>

Nom vernaculaire algérien : Meriwet ; **Français :** Marrube blanc.

II.5.1.3. Utilisations de la plante

Le marrube blanc est très utilisé en médecine traditionnelle comme expectorant, antispasmodique, antidiabétique, diurétique et en cas d'infections respiratoires. Il est aussi employé pour combattre la cellulite et l'obésité (**Ghedadba, 2014**).

II.5.2. *Salvia verbenaca*

II.5.2.1. Description botanique

S. verbenaca est une plante herbacée, de 10-80 cm de hauteur. Les feuilles sont simples, vertes, avec un limbe ovale ou ovale allongé dont les bords sont fortement crénelés ou découpés en lobes ou encore profondément divisés (Camarasa *et al.*, 1982). La tige est pubescente, quadrangulaire, bien feuillée. Les fleurs sont bilabiées en épi de faux verticilles (verticillastres) de 5-10 fleurs et leur taille ne dépasse pas 15 mm (Pottier, 1981). Le calice est bilabié, variable, à lèvre supérieure tridentée, avec des dents courtes et réfléchies ; l'inférieure bidentée. La corolle est bilabiée (Figure 9) (Quézel et Santa, 1963).



Figure 9 : *Salvia verbenaca* dans son milieu systématique (Ouled Rabah, Jijel).

II.5.2.2. Systématique de la plante

La systématique de *Salvia verbenaca* est la suivante (Judd *et al.*, 2002 ; Quézel et Santa, 1963).

Règne	: Plantae
Sous-règne	: Tracheobionta
Embranchement	: Spermatophyta
Division	: Magnoliophyta
Classe	: Magnoliopsida
Sous-classe	: Asteridae
Ordre	: Lamiales
Famille	: Lamiaceae
Genre	: <i>Salvia</i>
Espèce	: <i>Salvia verbenaca</i>

Nom vernaculaire algérien : Mou Lemdhamed; **Français** : sauge-verveine.

II.5.2.3. Utilisations de la plante

Salvia verbenaca est utilisée avec d'autres herbes médicinales pour traiter le rhume. Les feuilles et les sommités fleuries sont stomachiques et stimulantes. Cette espèce sert à faire des infusions toniques et stimulantes. Les feuilles fraîches hachées sont appliquées aussi en cataplasme, sur les plaies et les abcès vidés pour faciliter leur cicatrisation (Nassar, 2017).

II.5.3. *Phlomis crinita*

II.5.3.1. Description botanique

C'est un sous-arbrisseau à feuilles basales lancéolées cordiformes, pétiolées, denticulées et tomenteuses. Les florales sont sessiles oblongues à triangulaire. Les tiges sont rameuses de 50-100 cm de hauteur. Il possède une corolle jaune intensément d'or et un calice à dents linéaires (Figure 10) (Tamert, 2016).



Figure 10 : *Phlomis crinita* dans son milieu systématique (Ouled Rabah, Jijel).

II.5.3.2. Systématique de la plante

La systématique de *Phlomis crinita* est la suivante (Judd *et al.*, 2002 ; Quezel et Santa, 1963).

Règne	: Plantae
Sous-règne	: Tracheobionta
Embranchement	: Spermatophyta
Division	: Magnoliophyta
Classe	: Magnoliopsida
Sous-classe	: Asteridae
Ordre	: Lamiales
Famille	: Lamiaceae
Genre	: <i>Phlomis</i>
Espèce	: <i>Phlomis crinita</i>

Nom vernaculaire algérien : El Khayatta djarah.

II.5.3.3. Utilisations de la plante

Phlomis crinita est utilisée comme bandage ou plâtre pour traiter les brûlures, les lésions et les infections de la peau et ses allergies. Elle est utilisée en Espagne, en Tunisie et en Algérie pour guérir les lésions et les brûlures en préparant un plâtre à partir de feuilles hachées en Espagne ou sous forme de poudre de feuilles séchées en Tunisie et en Algérie (Amour *et al.*, 2009 ; Tamert, 2016).

Partie pratique

I. Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal

Trois plantes médicinales à savoir : *Marubium vulgare*, *Salvia verbenaca* et *Phlomis crinita*, font l'objet de notre étude. Leur sélection s'est faite sur la base de leur très grande présence et leur très large utilisation traditionnelle dans les régions méditerranéennes et plus particulièrement en Algérie (Beloued, 1998 ; Ernest, 2000 ; Damien *et al.*, 2003). La récolte de ces plantes a été effectuée au niveau de la Wilaya de Jijel en mois d'avril dans la région d'Ouled Rabah (Figure 11).



Figure 11 : La situation géographique de la station de récolte (Google earth).

I.2. Préparation des extraits

I.2.1. Séchage

Après avoir été bien nettoyés et débarrassés des particules et de la poussière, les feuilles des trois plantes étudiées ont été séchées dans une étuve de type Memmert, à une température de 40°C pendant une semaine dans le but d'enlever l'eau qu'elle renferme et d'empêcher la contamination par les insectes ou le développement des champignons à cause du taux d'humidité élevé.

Le séchage a une importance majeure pour l'extraction des composés phénoliques, car les cellules végétatives contiennent des enzymes susceptibles de provoquer des modifications dans la composition phénolique de la plante. Cet inconvénient peut être éliminé par un séchage rapide du matériel végétal, aussitôt après sa récolte (Ribéreau-Gayon, 1968).

I.2.2. Broyage

Les échantillons séchés ont été broyés à l'aide d'un broyeur électrique de type Sub permettant d'obtenir des poudres très fines. Plus le diamètre de la poudre est petit, plus la surface d'échange entre celle-ci et le solvant d'extraction est grand ; donc le rendement d'extraction est meilleur (Diallo, 2004).

I.2.3. Tamisage

Une fois broyées, les poudres obtenues ont été tamisées à l'aide d'un tamis de type AFNOR-ASTM dont le diamètre des pores est de 100 μm . Les poudres ainsi obtenues ont été conservées dans des flacons en verre, bien hermétique, à l'abri de la lumière jusqu'au jour de la préparation des extraits (Figure 12) (Ribéreau-Gayon, 1968).



Figure 12 : Photo de la plante *Phlomis crinita* fraîche, sèche et tamisée.

I.2.4. Extraction des composés phénoliques

Plusieurs solvants organiques peuvent être utilisés pour l'extraction des composés phénoliques. Le méthanol s'avère le meilleur solvant, car il permet d'obtenir un meilleur rendement d'extraction et il possède l'avantage d'être plus facile à éliminer (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Owen et Johns, 1999).

D'après Owen et Johns, (1999) le procédé général d'extraction a été réalisé selon les étapes suivantes :

I.2.4.1. Macération

50 g de la poudre de chacun des trois échantillons ont été ajustés à 500 ml avec du méthanol 80%. Les mélanges ainsi obtenus sont soumis à une agitation, à l'aide d'un agitateur magnétique de type Heidolph (Figure 13) pendant 48h à une température ambiante et à l'abri de la lumière afin d'éviter les phénomènes d'oxydation.

L'agitation permet le maintien des particules en suspension et l'homogénéité des milieux.



Figure 13 : Macération sous agitation magnétique.

I.2.4.2. Filtration et décantation

Après macération, les trois solutions des trois plantes ont été filtrées à l'aide de papier Whatman N°3 (Figure 14). Chaque filtrat obtenu a été ajusté avec 100 ml d'hexane. Les mélanges ont été par la suite décantés (Figure 15) pour recueillir les phases méthanoliques.



Figure 14 : La filtration à l'aide du papier Whatman N°3 des extraits.



Figure 15 : Délipidation et décantation.

I.2.4.3. Evaporation

Les phases méthanoliques des échantillons ont été évaporées à l'aide d'un rotavapeur de type Heidolph (Figure 16) puis, ont été séchées à l'étuve à 40°C jusqu'à ce que le solvant soit totalement évaporé. Chaque extrait a par la suite été repris avec la concentration désirée.

Les extraits secs ainsi constitués sont conservés au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation pour les différents tests.

Le protocole général d'extraction des polyphénols est schématisé dans la figure (17).



Figure 16 : Evaporation des extraits phénoliques.

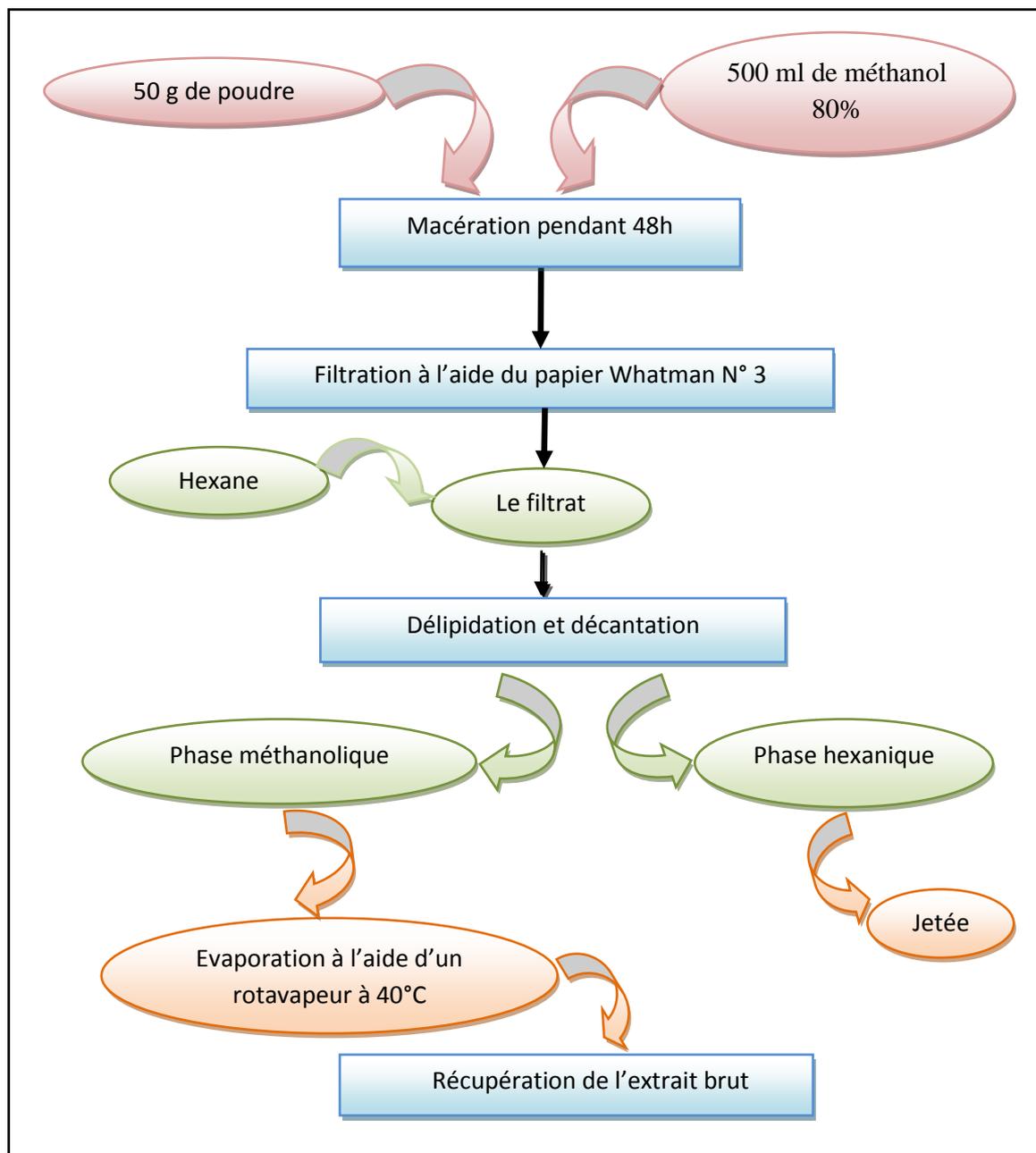


Figure 17 : Schéma général d'extraction des polyphénols.

I.2.5. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement des extraits méthanoliques est le rapport entre le poids de l'extrait sec et le poids de la plante en poudre utilisée (**Owen et Johns, 1999**). Il est exprimé en pourcentage selon la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \text{Ps} / \text{Pp} \times 100$$

Où :

P_s : Poids de l'extrait sec en gramme (g).

P_p : Poids de la poudre en gramme (g).

I.3. Analyse phytochimique

I.3.1. Analyse qualitative

Les extraits méthanoliques ont été soumis à divers tests phytochimiques en vue de mettre en évidence les grands groupes chimiques contenus dans ces extraits méthanoliques, en utilisant la méthode standard basée sur des réactions de coloration et de précipitation. A cet effet, plusieurs types de réactifs ont été utilisés (**Houmènou et al., 2018**).

I.3.1.1. Les flavonoïdes

À 1 ml de chaque extrait on ajoute quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl) concentré et quelques milligrammes de magnésium (Mg). La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition de la couleur rouge ou orange (**Karumi et al., 2004**).

I.3.1.2. Les tanins

Pour détecter la présence des tanins, on ajoute à 2 ml de chaque extrait quelques gouttes de FeCl₃ à 1%. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au bleu verdâtre en présence de tanins catéchiques (tanins condensés) (**Karumi et al., 2004**).

I.3.1.3. Les saponines

À 5ml de chaque extrait on ajoute 10 ml de l'eau distillée, le tout est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Puis, le mélange est laissé au repos pendant 15 min. La persistance de la mousse d'au moins 1 cm pendant 15 min indique la présence des saponines (**N'Guessan et al., 2009**).

I.3.1.4. Les quinones libres

Sur un volume de chaque extrait quelques gouttes de NaOH à 1% sont ajoutées. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres (**Oloyede, 2005**).

I.3.1.5. Les terpénoïdes

À 5 ml de chaque extrait on ajoute 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré, la formation de deux phases et un couleur marron à l'interphase indique la présence de terpénoïdes (**Edeoga et al., 2005**).

I.3.1.6. Les alcaloïdes

Pour chaque extrait on réalise la procédure suivante : on ajoute 5 ml d'HCl 1% à 1ml de chaque extrait, le tout est chauffé au bain marie, puis on divise chaque extrait en deux volumes égaux. Un volume est traité par le réactif de Mayer, l'autre par le réactif de Wagner. La formation d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes (**Majob et al., 2003**).

Les réactifs de Mayer et de Wagner sont préparés comme suite :

* **Réactif de Mayer** : Dissoudre 1.358 g d' HgCl_2 dans 60ml d'eau distillée puis 5g de KI dans 10ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100 ml.

* **Réactif de Wagner** : Dans 75 ml d'eau distillée, dissoudre 2g de KI et 1.27g de I_2 . Le volume obtenu est ajusté à 100ml avec l'eau distillée.

I.3.1.7. Les oses et holosides

1 ml de chaque extrait et 5 ml d'éthanol donnent un aspect floconneux en présence des mucilages (**Bruneton, 1999**).

I.3.2. Analyse quantitative

I.3.2.1. Dosage des polyphénols

Les polyphénols ont été déterminés spectrophotométriquement par la méthode de Folin-Ciocalteu (**Heilerova et al., 2003**).

0,2 ml de l'extrait méthanolique dilué (250 $\mu\text{g/ml}$) ont été additionnés avec 1,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (1/10). Le mélange est laissé reposer 5 minutes à l'obscurité. Par la suite, 1,5 ml de la solution Na_2CO_3 (7,5%) a été ajouté à l'ensemble. Après 90 minutes d'incubation à 23°C, l'absorbance a été mesurée à 750 nm contre un blanc sans extrait.

La quantification des polyphénols a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($Y = aX + b$) réalisée par un extrait étalon, l'acide gallique, à différentes concentrations dans les mêmes conditions que l'échantillon (Annexe 1). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait brute (mg EAG/g EB).

Le mode opératoire pour le dosage des polyphénols totaux est schématisé dans la figure (18).

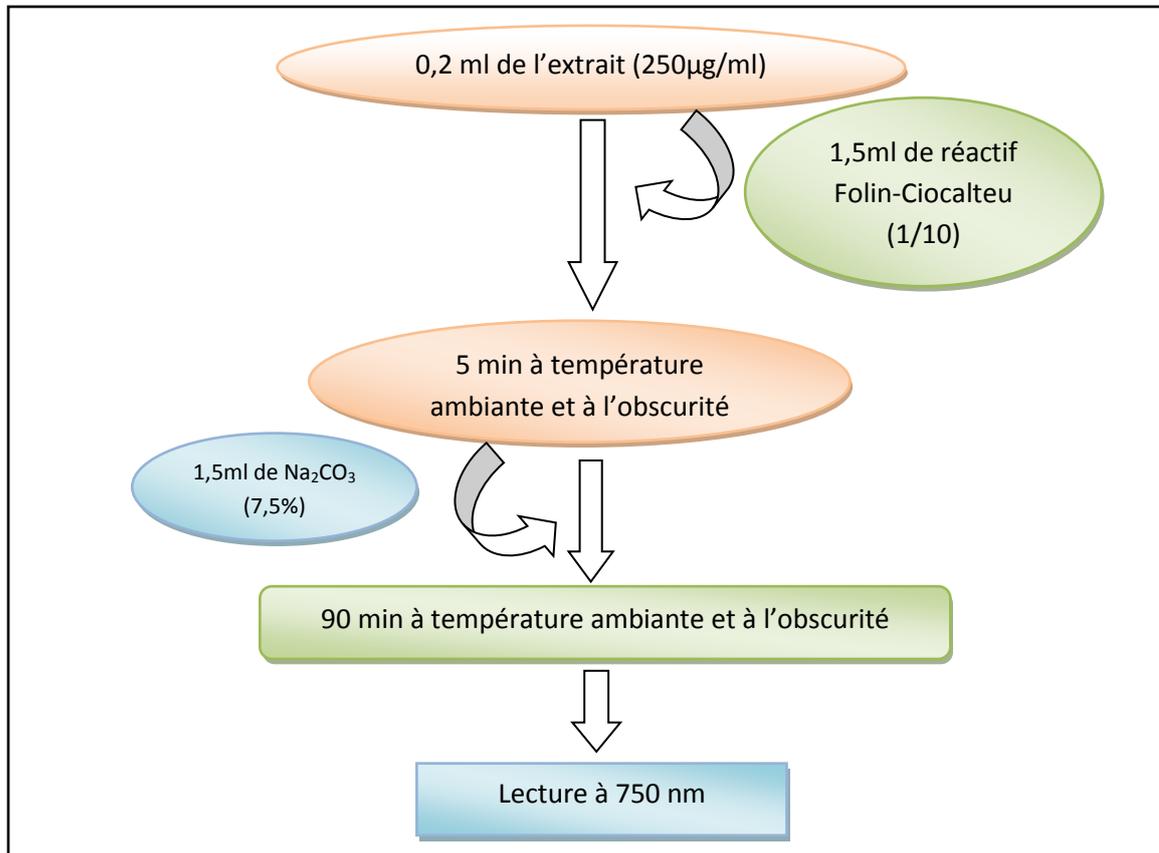


Figure 18: Protocole de dosage des composés phénoliques.

I.3.2.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode au AlCl₃ a été employée pour la détermination de la teneur des extraits en flavonoïdes (Huang *et al.*, 2004).

Un millilitre et demi (1,5ml) de l'extrait phénolique (2mg/ml) ont été ajoutés à un volume égal d'une solution de 2% AlCl₃. Le mélange a été vigoureusement agité, et l'absorbance a été lue à 430 nm, après 30 minutes d'incubation à température ambiante.

Une courbe d'étalonnage ($Y = aX + b$) réalisée par la quercétine à différentes concentrations pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons a servi pour la quantification des flavonoïdes (Annexe 2). La teneur en flavonoïdes a été exprimée en milligramme équivalent quercétine par gramme d'extrait brute (mg EQ/g EB).

Le protocole de dosage des flavonoïdes est présenté dans la figure (19).

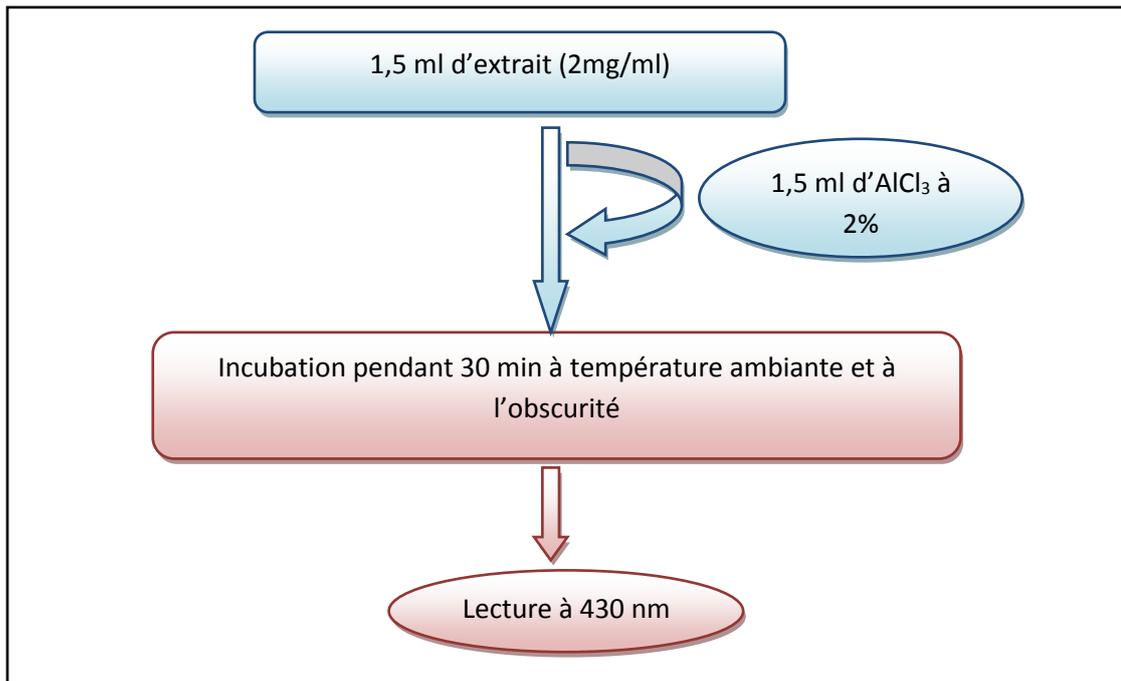


Figure 19: Protocole de dosage des flavonoïdes.

I.4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits phénoliques des plantes étudiées

I.4.1. Pouvoir antiradicalaire (Piégeage du radical libre DPPH)

I.4.1.1. Principe

Le DPPH est un radical libre stable violet en solution. Il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm. Sa couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl-hydrazine (jaune) par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration (Figure 20). L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002).

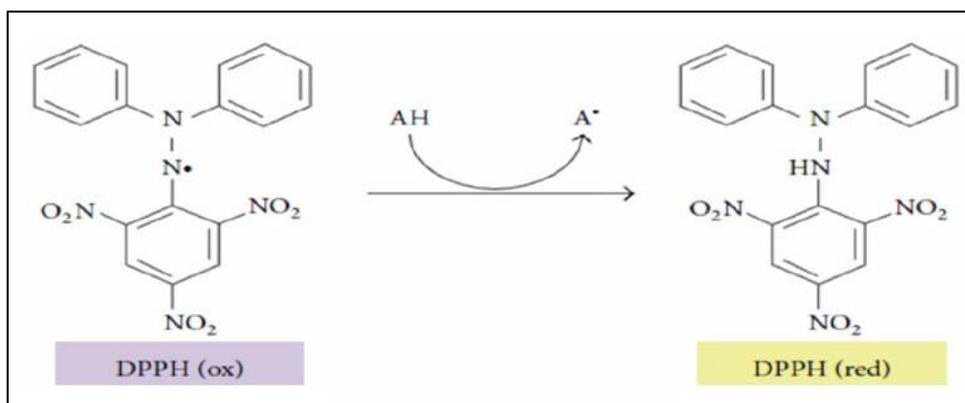


Figure 20 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Teixeira *et al.*, 2013).

I.4.1.2. Mode opératoire

Pour réaliser l'analyse, 2,9 ml de la solution méthanolique de DPPH (0,025 g/l) est ajouté à 100 µl de la solution de chaque extrait à différentes concentrations (25, 50, 100 et 200 µg/ml). Le mélange est vigoureusement agité, puis les tubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes. La longueur d'onde d'absorption maximale a été préalablement déterminée. Toutes les lectures sont effectuées à 515 nm.

Les échantillons, les antioxydants de référence (l'acide ascorbique et l'acide gallique) et le témoin sont préparés dans les mêmes conditions opératoires.

Le protocole d'évaluation du pouvoir antiradicalaire est illustré par la figure (21).

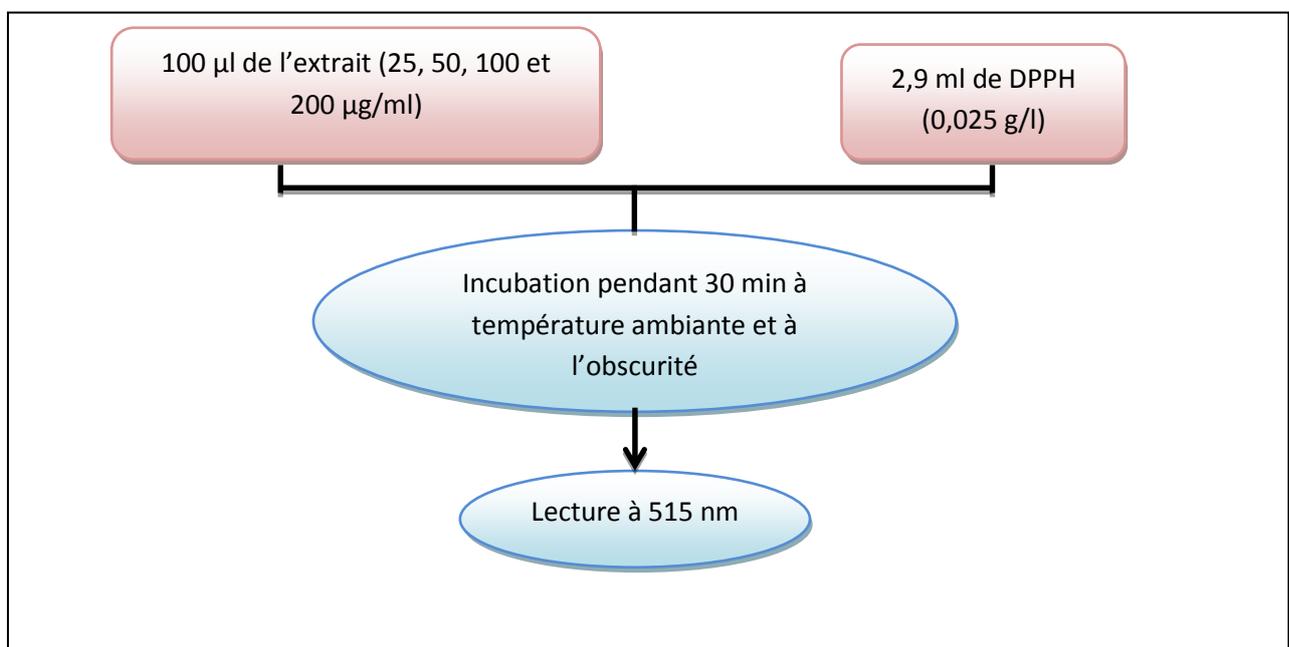


Figure 21: Protocole d'étude de l'activité antiradicalaire.

L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = (A_T - A_E / A_T) \times 100$$

Où :

A_T : Absorbance du témoin après 30 min d'incubation.

A_E : Absorbance de l'échantillon après 30 min d'incubation.

I.4.1.3. Détermination de la concentration inhibitrice médiane (IC₅₀)

L'IC₅₀ est définie comme étant la quantité ou la concentration d'antioxydants (extrait ou toute autre substance antioxydante) nécessaire pour inhiber ou faire disparaître 50% des radicaux. Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des extraits testés. Pour chaque extrait ou antioxydant de référence, une courbe de régression linéaire ($Y = aX + b$) est établie afin de calculer l'IC₅₀ qui permettra la caractérisation du pouvoir antioxydant des extraits. Une faible valeur de l'IC₅₀ indique une forte activité antioxydante (Molyneux, 2004).

I.4.2. Pouvoir réducteur

I.4.2.1. Principe

Le pouvoir réducteur se base sur la réaction d'oxydoréduction, dont la réduction du chlorure ferrique (FeCl₃) en chlorure ferreux (FeCl₂) en présence d'un agent chromogène : le ferricyanure de potassium [K₃Fe (CN)₆] en milieu acidifié par l'acide trichloracétique (Ribeiro *et al.*, 2008). La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (Balasundram *et al.*, 2005).

I.4.2.2. Mode opératoire

La détermination du pouvoir réducteur a été réalisée selon la méthode d'Oyaizu (1986) décrite par Hseu et ses collaborateurs (2008) avec une légère modification. Un volume de 1ml de chaque extrait, à différentes concentrations (25, 50, 100 et 200 µg/ml), est ajouté à 2 ml de tampon phosphate (0,2 M ; pH = 6,6) et à 1ml de ferricyanure de potassium [K₃Fe (CN)₆] à 1 %. Après agitation, le mélange est incubé à 50 °C pendant 20 min à l'abri de la lumière. 1ml de trichloracétique à 10 % est additionné au mélange. Après centrifugation à 3000 tours/minutes pendant 10 min, un volume de 1,5 ml de surnagent est ajouté à 1,5 ml d'eau distillée et 150 µl de chlorure ferrique (0,1 %). Le mélange homogénéisé préalablement, est incubé pendant 10 min à température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance est lue à 700 nm.

L'acide ascorbique et l'acide gallique sont utilisés comme des standards, dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

Le protocole d'évaluation du pouvoir réducteur des différents extraits ainsi que celui des standards est illustré par la figure (22).

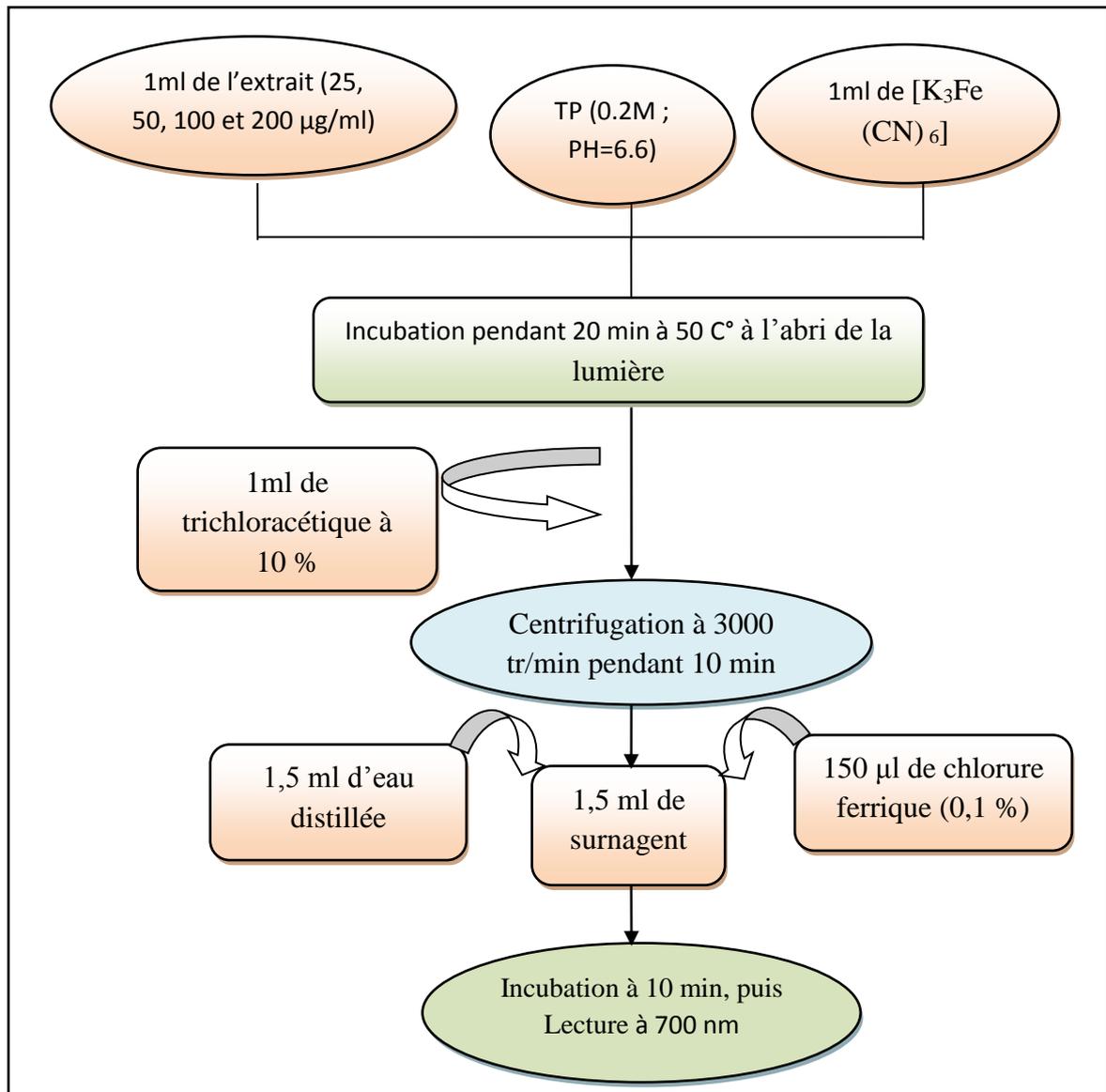


Figure 22: Protocole d'étude de pouvoir réducteur fer.

I.4.3. Test de blanchiment du β -carotène

I.4.3.1. Principe

L'acide linoléique dans un système d'émulsion aqueuse génère des radicaux peroxydes qui vont par la suite oxyder le β -carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge. La présence des antioxydants réduit l'intensité de la destruction du β -carotène en neutralisant les radicaux libres dérivés et permet donc de prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène (Unten *et al.*, 1997).

I.4.3.2. Mode opératoire

Le protocole est réalisé suivant la méthode de Tepe *et al.* (2006). Une émulsion de β -carotène/acide linoléique a été préparée par la solubilisation de 0,5 mg de β -carotène dans 1 ml de chloroforme. 25 μ l d'acide linoléique et 200 mg de tween 40 ont été ajoutés. Le chloroforme a été complètement évaporé dans le rotavapeur à 40 C°. Ensuite 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène pendant 30 minutes ont été ajoutés, l'émulsion en résultant a été agitée vigoureusement. Le mélange réactionnel a été par la suite aliquote (2.5 ml) dans des tubes à essai, et 350 μ l de chacun des extraits préparés des trois plantes (2 mg/ml, dans le méthanol) ont été ajoutés. La même procédure a été répétée avec le BHA (2 mg/ml) comme un contrôle positif et avec le méthanol et l'eau distillée comme des contrôles négatifs. Les absorbances ont été lues à 490 nm, après 2h, 4h, 6h, 24h et 48h d'incubation à température ambiante à l'obscurité.

L'activité antioxydante relative (AAR %) est calculée selon la formule :

$$\text{AAR \%} = [\text{Abs (test)/Abs (contrôle)}] \times 100$$

Où :

Abs Contrôle : Absorbance du contrôle positif (BHA).

Abs test : Absorbance de l'extrait.

Le protocole d'évaluation du blanchiment du β -carotène est illustré par la figure (23).

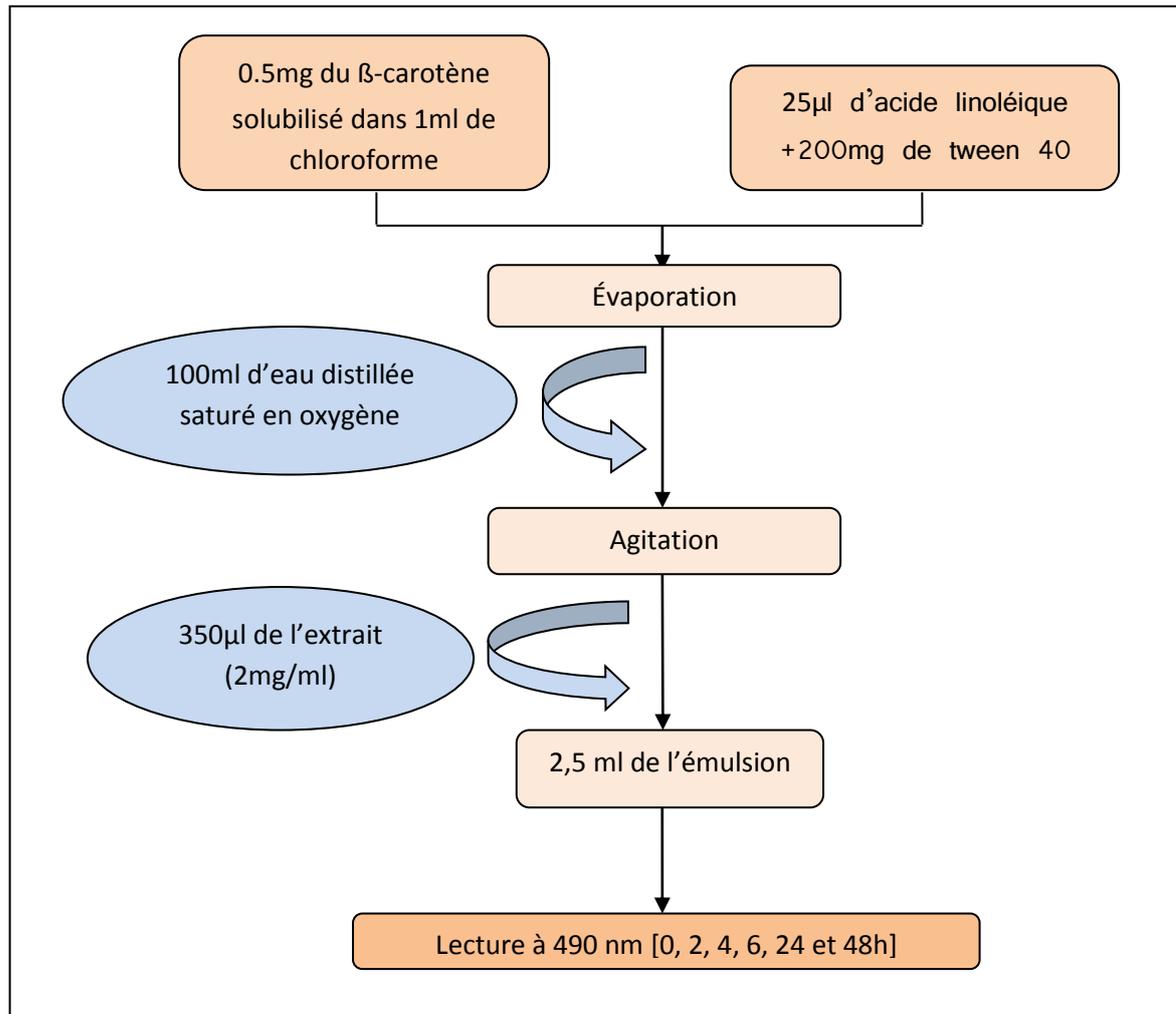


Figure 23 : Protocole du blanchiment du β -carotène.

I.5. Evaluation statistique

Les résultats des différentes évaluations effectuées *in vitro* sont donnés sous forme de moyenne \pm écart-types. L'évaluation statistique est effectuée en utilisant le test Tukey-Kramer HSD (Logiciel JMP, Version 7.0) avec un niveau de signification de 0.05.

II. Résultats et interprétation

II. Résultats et interprétation

II.1. Les rendements des extraits phénoliques

Le tableau (IV) résume les résultats de rendement des extraits des plantes étudiées, obtenus par l'extraction des composés phénoliques par le méthanol exprimés en pourcentage (%) ; par rapport au poids sec de la poudre végétale.

Tableau IV : Les rendements des extraits méthanoliques des trois plantes exprimés en pourcentage.

Les extraits	<i>M. vulgare</i>	<i>S. verbenaca</i>	<i>P. crinita</i>
Rendement (%)	17,97	14,52	15,34

Nous constatons que les rendements des extraits méthanoliques varient d'une plante à une autre. Les pourcentages enregistrés sont compris entre 14,52 et 17,97 %. *M. vulgare* a donné le meilleur rendement (17,97 %) suivie par *P. crinita* (15,34 %) et *S. verbenaca* (14,52%).

II.2. Etude phytochimique

II.2.1. Etude qualitative

La phytochimie qualitative est basée sur des réactions colorées ou de précipitation par des réactifs chimiques spécifiques réalisée sur les extraits des trois plantes étudiées.

Le criblage phytochimique a permis de caractériser quelques groupes chimiques existants dans les feuilles de *M. vulgare*, *S. verbenaca* et *P. crinita*.

La présence ou l'absence des différents groupes chimiques sont présentées dans le Tableau (V).

Les tests du screening phytochimiques illustrés par le tableau (V) et représentés par les figures (24, 25, 26, 27, 28, 29 et 30) font ressortir les résultats suivants :

- ✓ La présence des flavonoïdes, des tanins galliques et des terpénoïdes chez toutes les espèces étudiées.
- ✓ L'absence des tanins cathéchiques dans toutes les plantes.
- ✓ La présence des saponines chez *M. vulgare* et *P. crinita*, leur absence chez *S. verbenaca*.

- ✓ Une réaction positive pour les alcaloïdes et les quinones libres chez *M. vulgare* et *S. verbenaca*, et une réaction négative pour l'espèce *P. crinita*.
- ✓ La présence des oses et holosides chez *M. vulgare*, leur absence chez *S. verbenaca* et *P. crinita*.

Tableau V : Screening phytochimique des espèces étudiées.

Groupes chimiques		<i>M. vulgare</i>	<i>S. verbenaca</i>	<i>P. crinita</i>
Flavonoïdes		++	++	+++
Tanins	cathéchiques	-	-	-
	galliques	+++	+++	+++
Saponines		+	-	+
Quinones libres		+++	++	-
Terpénoïdes		+	+	+
Alcaloïdes	Mayer	+	+	-
	Wagner	-	-	-
Les oses et holosides		+	-	-
(-) : Absence, (+) : Présence en faible quantité, (++) : Présence en quantité moyenne, (+++) : Présence en quantité importante.				

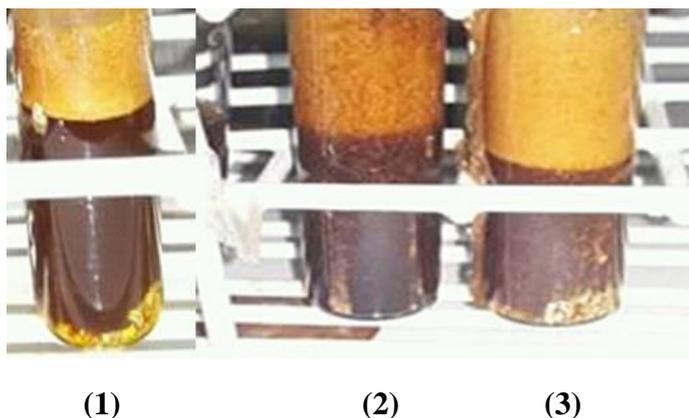


Figure 24 : Résultats de screening phytochimique des flavonoïdes chez les trois plantes étudiées.
(1) : *M. vulgare*, (2) : *P. crinita*, (3) : *S. verbenaca*.

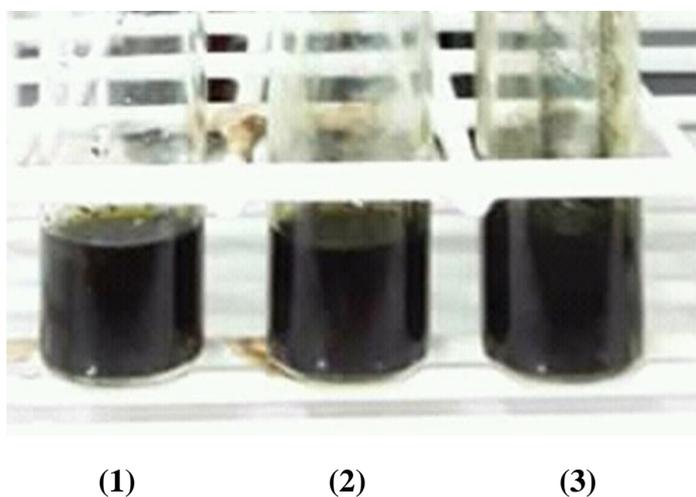


Figure 25 : Résultats de screening phytochimique des tanins galliques chez les trois plantes étudiées. (1) : *M. vulgare*, (2) : *P. crinita*, (3) : *S. verbenaca*.

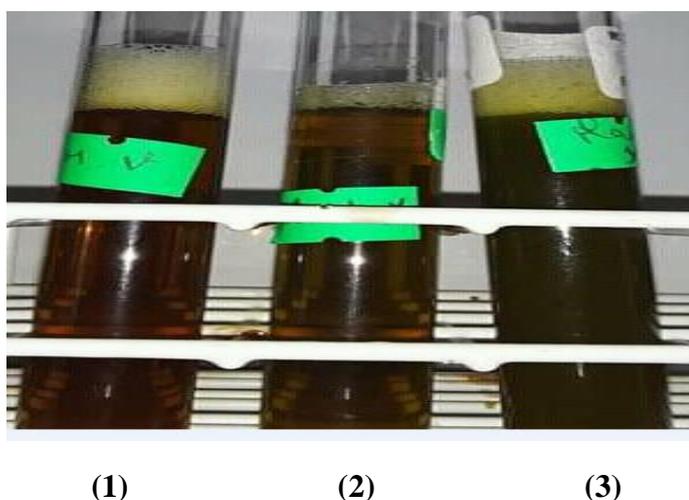
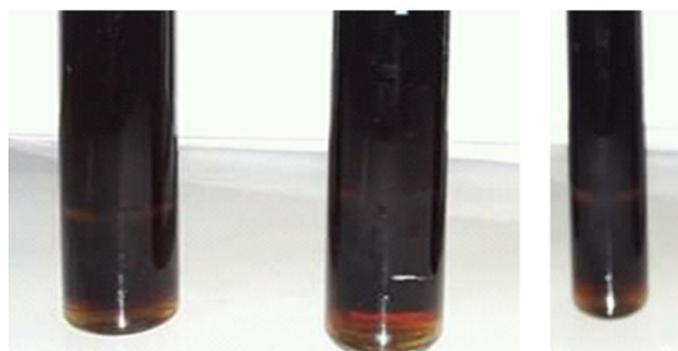


Figure 26 : Résultats de screening phytochimique des saponines chez les trois plantes étudiées.
(1) : *M. vulgare*, (2) : *S. verbenaca*, (3) : *P. crinita*.



(1) (2) (3)

Figure 27 : Résultats de screening phytochimique des quinones libres chez les trois plantes étudiées. (1) : *P. crinita*, (2) : *S. verbenaca*, (3) : *M. vulgare*.



(1) (2) (3)

Figure 28 : Résultats de screening phytochimique des terpénoïdes chez les trois plantes étudiées. (1) : *P. crinita*, (2) : *M. vulgare*, (3) : *S. verbenaca*.



(1) (2) (3)

Figure 29 : Résultats de screening phytochimique des alcaloïdes chez les trois plantes étudiées. (1) : *M. vulgare*, (2) : *P. crinita*, (3) : *S. verbenaca* (tubes blancs : réactif de Mayer, tubes marron : réactif de Wagner).

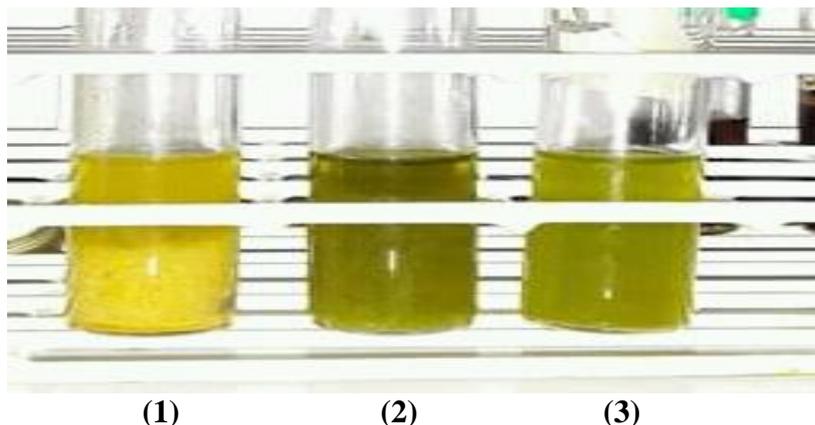


Figure 30 : Résultats de screening phytochimique des oses et holosides chez les trois plantes étudiées. (1) : *M. vulgare*, (2) : *P. crinita*, (3) : *S. verbenaca*.

II.2.2. Etude quantitative

➤ Teneurs en composés phénoliques des différents extraits

L'étude quantitative des extraits phénoliques au moyen des dosages spectrophotométriques, avait pour objectif de déterminer la teneur totale des polyphénols et des flavonoïdes. Pour cet objectif, deux courbes d'étalonnages (Annexes 1 et 2) ont été tracées ; une réalisée avec l'acide gallique à différentes concentrations (dosage des polyphénols) et l'autre avec la quercétine (dosage des flavonoïdes). Des mesures de densité pour chaque extrait sont réalisées à 750 nm et 430 nm pour les polyphénols et les flavonoïdes respectivement.

Les quantités des composés phénoliques ont été rapportées en mg équivalent de l'étalon utilisé par gramme d'extrait brut et sont déterminées par l'équation de type : $Y = a X + b$.

Les résultats obtenus pour évaluer la teneur en polyphénols et en flavonoïdes sont présentés dans les figures (31) et (32).

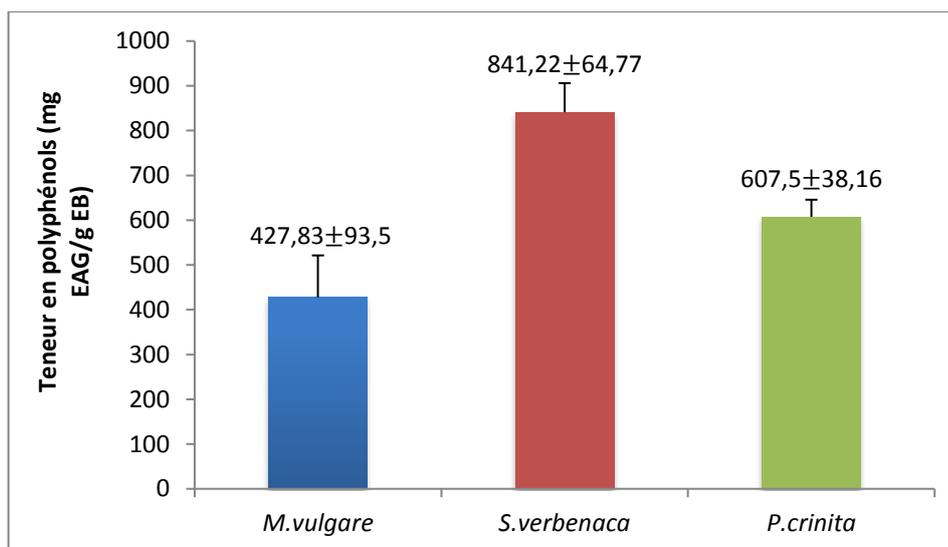


Figure 31 : Teneur en polyphénols des trois plantes (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm écart-types).

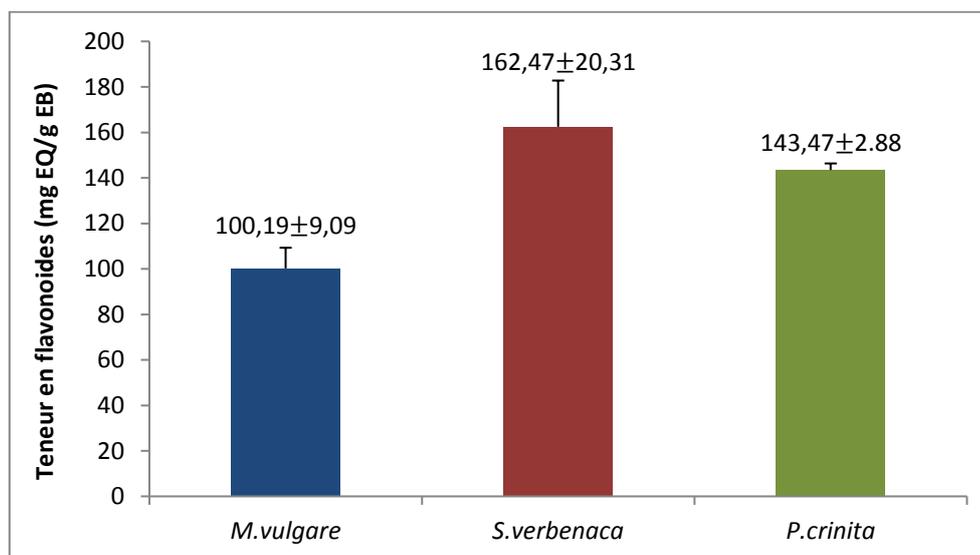


Figure 32 : Teneur en flavonoïdes des trois plantes (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm écart-types).

Ces résultats montrent que l'extrait méthanolique de *S. verbenaca* est le plus riche en polyphénols avec une teneur de $841,22 \pm 64,77$ mg EAG/g EB, suivi par *P. crinita* avec une concentration de $607,5 \pm 38,16$ mg EAG/g EB. La teneur la plus basse a été obtenue avec *M. vulgare* ($427,83 \pm 93,5$ mg EAG/g EB).

En ce qui concerne la teneur en flavonoïdes, l'extrait de *S. verbenaca* est aussi le plus riche avec une teneur de $162,47 \pm 20,31$ mg EQ/g EB, suivi de *P. crinita* avec $143,47 \pm 2,88$ mg EQ/g EB. *M. vulgare* représente la teneur la plus faible ($100,19 \pm 9,09$ mg EQ/g EB).

II.3. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits méthanoliques des trois plantes étudiées a été évaluée *in vitro* par trois méthodes différentes, le piégeage du radical libre DPPH, la chélation des ions métalliques du fer et le test de blanchiment du β -carotène.

II.3.1. Activité antiradicalaire (DPPH)

L'activité antiradicalaire des extraits de *M. vulgare*, *S. verbenaca* et *P. crinita* ainsi que les standards (acide gallique et acide ascorbique) a été déterminée par la méthode de DPPH. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure (33).

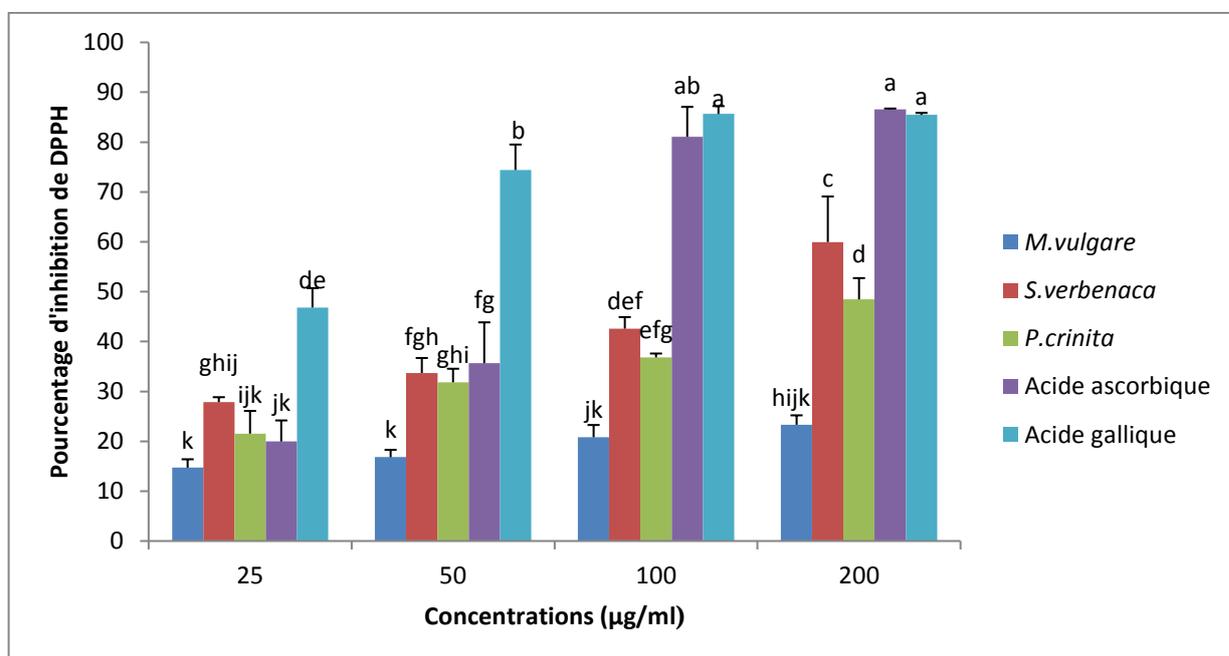


Figure 33 : Pouvoir réducteur DPPH de l'extrait des trois plantes et des standards exprimé en pourcentage (chaque valeur représente la moyenne de quatre essais \pm écart-types). Les moyennes suivies d'une lettre différente sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH des extraits phénoliques des trois plantes étudiées varient entre 14,70% \pm 1,68 et 23,31% \pm 1,88 pour *M. vulgare*, 27,86% \pm 0,97 et 59,95% \pm 9,13 pour *S. verbenaca* et 21,53% \pm 4,55 et 48,45% \pm 4,26 pour *P. crinita*.

D'après la figure (33), on remarque que les pourcentages d'inhibition du radical DPPH augmentent au fur et à mesure que la concentration des trois extraits et des standards augmente. Cette augmentation d'inhibition du radical DPPH est significative en fonction de la concentration.

Les résultats obtenus montrent que les extraits de *S. verbenaca* et de *P. crinita* révèlent une activité anti radicalaire de 27,86% \pm 0,97 et 21,53% \pm 4,55 respectivement à la concentration 25 μ g/ml qui est meilleur à celle montrée par l'acide ascorbique (19,96% \pm 4,21).

A la concentration 50 μ g/ml, l'activité de ces deux extraits révèlent une activité antiradicalaire de 33,70% \pm 3,00et 31,83% \pm 2,70 respectivement, qui est proche de celle montrée par l'acide ascorbique (35,67% \pm 8,18).

La capacité à piéger le radical DPPH en fonction de concentration est significative pour *S. verbenaca* et *P. crinita*, alors que *M. vulgare* exerce un pouvoir similaire statistiquement. Les trois plantes présentent une différence significative.

➤ Détermination de l'IC₅₀

IC₅₀ est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car elle exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée (Pokorny *et al.*, 2001). La concentration de l'échantillon essentiel pour inhiber 50% du DPPH radicalaire a été calculée par la régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculés en fonction des différentes concentrations d'extraits préparés (Annexes 3, 4, 5, 6 et 7).

Les valeurs d'IC₅₀ trouvées pour les extraits étudiés sont représentées dans le tableau(VI) :

Tableau VI : Valeurs des IC₅₀ des extraits étudiés.

Les extraits	<i>M. vulgare</i>	<i>S. verbenaca</i>	<i>P. crinita</i>	Acide ascorbique	Acide gallique
IC ₅₀ (µg/ml)	742,69±3,87	143,37±13,99	203,65±11,18	78,32±33,03	38,35±18,27

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus montrent que les trois extraits testés possèdent une activité anti radicalaire avec un IC₅₀ de l'ordre de 742,69 µg/ml ±3,87, 143,37 µg/ml ±13,99 et 203,65 µg/ml ±11,18 pour *M. vulgare*, *S. verbenaca* et *P. crinita* respectivement. En comparaison avec les antioxydants standards (l'acide ascorbique et l'acide gallique) qui ont démontré un IC₅₀ de 78,32 µg/ml ±33,03 pour l'acide ascorbique et 38,35 µg/ml ±18,27 pour l'acide gallique, nous constatons que les trois extraits sont moins actifs par rapport aux standards et que les extraits de *S. verbenaca* et *P. crinita* possèdent une activité antioxydante supérieure en comparaison avec l'extrait de *M. vulgare* qui a une activité antioxydante un peu basse.

II.3.2. Pouvoir réducteur du Fer

Les résultats obtenus ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait (Figure 34).

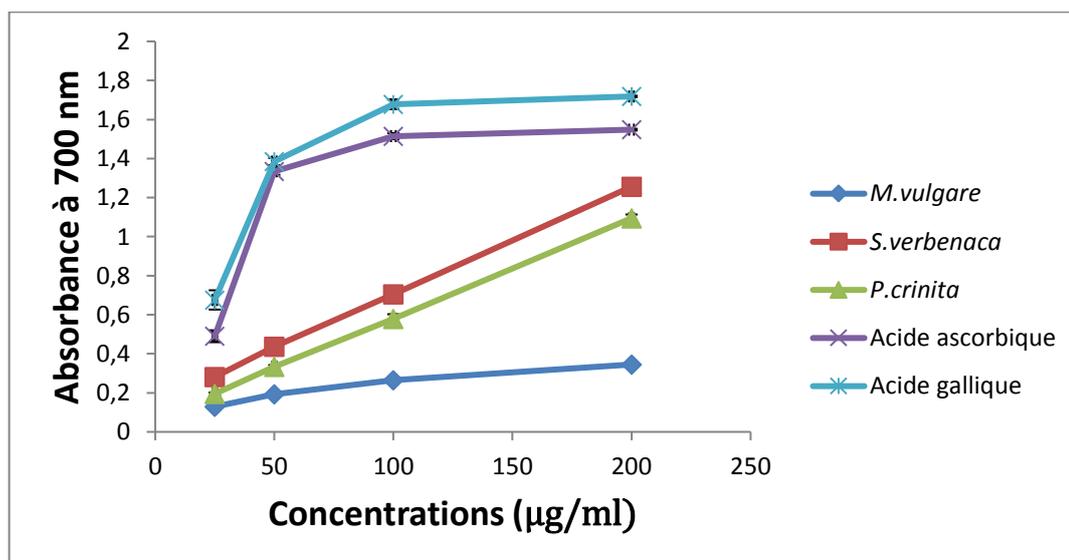


Figure 34 : Pouvoir réducteur Fer de l'extrait des trois plantes et des standards (chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± écart-types).

L'activité antioxydante des trois extraits par le test de potentielle réducteur du fer a révélé que ces dernières exercent une importante activité dose dépendante sauf l'extrait de *M. vulgare* qui exerce une activité moyenne.

D'après les résultats représentés dans la figure (34), on constate une augmentation de l'absorbance correspondante à une augmentation du pouvoir réducteur des trois extraits. La réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation de l'absorbance et de la concentration (**Balasundram et al., 2005**).

Les extraits de *S. verbenaca* et de *P. crinita* présentent une activité de réduction du fer similaire et plus élevée que celle de l'extrait de *M. vulgare*, ce qui traduit un pouvoir réducteur de *S. verbenaca* et de *P. crinita* plus élevé que celui de *M. vulgare*. Néanmoins, tous les extraits présentent des activités antioxydants nettement inférieurs à celle des antioxydants de référence, l'acide ascorbique et l'acide gallique.

L'analyse statistique de pouvoir réducteur Fer des trois plantes révèle une différence significative.

II.3.3. Test de blanchiment du β -carotène

La propriété de décoloration du β -carotène est employée dans l'évaluation de l'activité antioxydant du standard (BHA) et des extraits testés. D'après les résultats, nous constatons que ces derniers inhibent d'une manière significative l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène par rapport au contrôle négatif (eau et méthanol) (Figure 35). Tous les extraits ont des activités antioxydants significativement différentes. L'extrait de *S. verbenaca* montre la plus grande activité inhibitrice avec une AAR de $42,60 \% \pm 5,93$, mais qui est significativement inférieure à celle du contrôle positif (BHA) qui représente 100% d'activité inhibitrice (Figure 36). Les extraits de *P. crinita* et *M. vulgare* possèdent une AAR similaire de $32,95\% \pm 3,74$ et $29,03\% \pm 0,76$ respectivement.

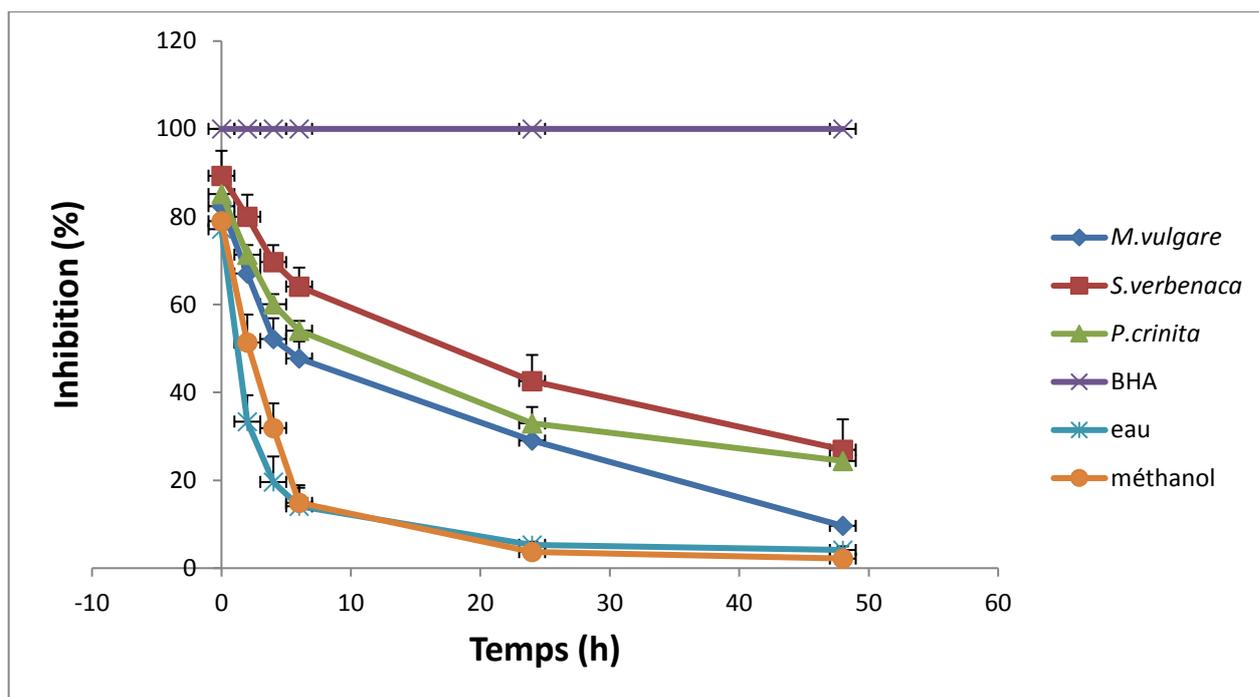


Figure 35 : Test de blanchiment du β -carotène des extraits des trois plantes et des contrôles (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm écart-types).

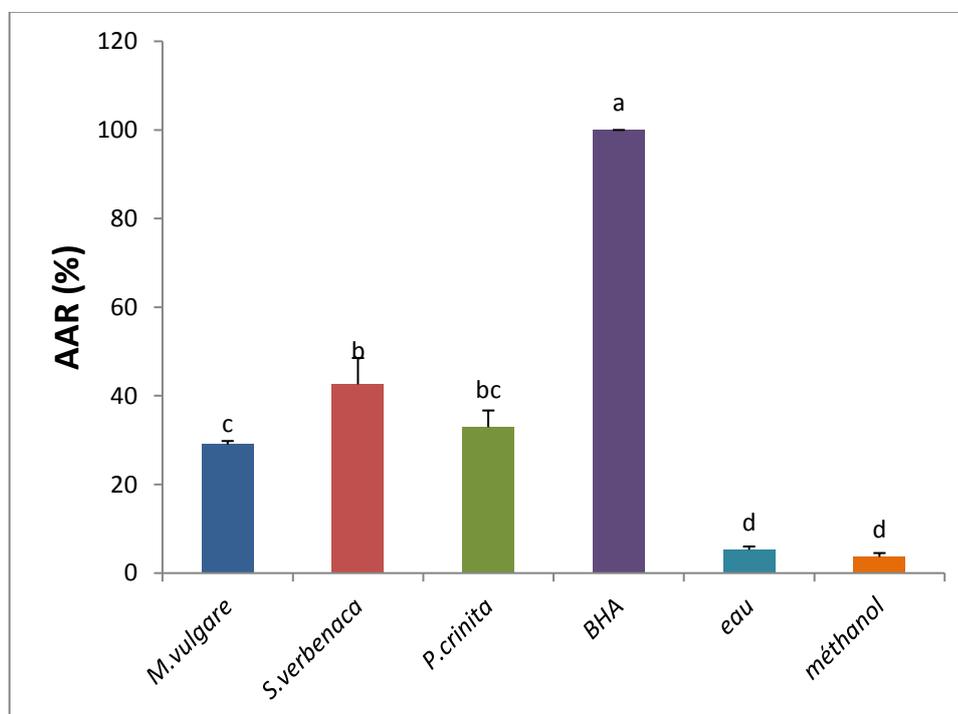


Figure 36 : Activité antioxydant relative (AAR) de l'extrait des trois plantes et des contrôles (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm écart-types).

III. Discussion

III. Discussion

Ce travail est fondé sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydantes des extraits hydro-méthanolique des feuilles de trois plantes médicinales algériennes à savoir : *Marrbium vulgare*, *Salvia verbenaca* et *Phlomis crinita*. Ces plantes sont très utilisées dans la région de Jijel en médecine traditionnelle. Pour valoriser cette utilisation traditionnelle nous avons effectué l'extraction des polyphénols à partir des poudres des feuilles de chacune des plantes par macération dans le méthanol aqueux.

Nous avons évalué l'activité antioxydante de nos extraits en utilisant la méthode de tests au DPPH, le pouvoir réducteur du fer et le blanchissement de la β -carotène, qui sont largement utilisées par plusieurs auteurs.

L'extraction est la principale étape de la récupération de composés phytochimiques à partir de matières végétales. L'efficacité de l'extraction dépend de la nature chimique des composés phytochimiques, de la méthode d'extraction utilisée, de la taille des particules dans l'échantillon et du solvant utilisé.

Différents solvants sont utilisés dans les extractions des polyphénols (**Turkmen et al., 2007**). Le méthanol est le plus recommandé et le plus fréquemment employé pour l'extraction des composés phénoliques (**Falleh et al., 2008**).

Le calcul des rendements par rapport au poids sec des poudres végétales a montré que l'extrait de *M. vulgare* présente le rendement le plus élevé (17,97%). En effet, le rendement n'est pas relatif ; il dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. D'autre part, la méthode d'extraction affecte également le contenu total en phénol et flavonoïdes.

Les analyses phytochimiques effectuées sur les extraits des végétaux sont une étape préliminaire et d'une grande importance puisqu'elle révèle la présence des constituants connus par leurs activités physiologiques et leurs vertus médicinales.

Nos résultats montrent que *M. vulgare* contient des flavonoïdes, tanins galliques, saponines, quinones libres, terpénoïdes, alcaloïdes et les oses et holosides. Ces résultats sont en accord avec ceux rapporter dans la littérature par les travaux d'Azzi et ses collaborateurs(2014), qui confirme la présence des flavonoïdes, des alcaloïdes et des saponines.

Les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins galliques, les quinones libres et les terpénoïdes sont présents dans les extraits de *S. verbenaca*. Ces résultats ont été remarqués aussi chez une espèce de même genre par Tehami (2017).

D'après les résultats des essais de caractérisation, différents groupes se présentant dans les feuilles de *P. crinita* ont été identifiés tels que les flavonoïdes, les saponines, et les terpénoïdes. Tamert (2016) confirme la présence des flavonoïdes.

Les tests phytochimiques réalisés sur les extraits méthanolique des trois plantes ont confirmé la présence de plusieurs familles de composés. La richesse de ces extraits en composés chimiques actifs pourrait expliquer leur utilisation traditionnelle pour soigner de nombreuses maladies.

Les composés phénoliques forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes. Et comme la majorité des effets pharmacologiques des plantes sont dus à ces substances, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes des extraits a été effectué pour en estimer les teneurs.

En effet, les teneurs en phénols totaux ne sont pas stables et diffère d'une plante a une autre (Tamert, 2016), ce qui est vérifié par la comparaison entre les résultats obtenus chez les espèces étudiées : *Marrbium vulgare*, *Salvia verbenaca* et *Phlomis crinita*.

Les concentrations moyennes les plus élevées sont enregistrées dans les extraits des feuilles de *S. verbenaca* et de *P. crinita* ($841,22 \pm 64,77$ mg EAG/g EB et $607,5 \pm 38,16$ mg EAG/g EB respectivement) en comparaison avec l'extrait de *M. vulgare* ($427,83 \pm 93,5$ mg EAG/g EB).

Belkhiri et ses collaborateurs (2017) ont trouvé une teneur en polyphénols plus faible ($177,56 \pm 2,51$ mg EAG/g EB) à partir des feuilles de *S. verbenaca*.

Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques : études ont montré que les facteurs extrinsèques tels que les facteurs géographiques, climatiques et environnementaux (Ebrahimi *et al.*, 2008 ; Falleh *et al.*, 2008), le degré de maturation de la plante et la période de récolte ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (Miliauskas *et al.*, 2004 ; Podsedek, 2007 ; Falleh *et al.*, 2008).

Les feuilles de *Salvia verbenaca* et de *Phlomis crinita* sont les plus riches en flavonoïdes avec des concentrations moyennes respectivement de $162,47 \pm 20,31$ mg EQ/g EB et $143,47 \pm 2,88$ mg EQ/g EB ; suivie par les feuilles de *M. vulgare* ($100,19 \pm 9,09$ mg EQ/g EB). Des études réalisées par Belkhiri (2018) sur l'espèce *S. verbenaca*, Tamert (2016) sur l'espèce *P. crinita* et Benhammou (2012) sur l'espèce *M. vulgare* ont montré des teneurs plus faibles que nos résultats.

Selon Gomez- Caravaca *et al.* (2006), les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante. D'après Rawel *et al.* (2005), les méthodes de conservation et d'exposition à

la lumière des plantes peuvent affecter la teneur en flavonoïdes. En effet, ceux-ci sont sensibles à l'oxydation et ont tendance à former des polymères donnant ainsi des tanins condensés (**Manach et al., 2004**) ce qui pourrait expliquer ces différences de concentrations.

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée par les tests au DPPH, Fe et β -carotène, qui sont souvent utilisés pour la rapidité des résultats (**yi et al., 2008**).

La méthode de piégeage du radical libre (DPPH) a été retenue pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de nos plantes car elle est reconnue comme étant simple, rapide et efficace en raison de la grande stabilité du radical DPPH (**Huang et al., 2005 ; Bozin et al., 2008**).

L'activité antioxydante des espèces étudiées est exprimée en pourcentages d'inhibition et en concentrations inhibitrices 50 (IC_{50}). Ces deux paramètres ont été employés dans plusieurs recherches pour présenter l'activité antioxydante de différents métabolites secondaires de diverses plantes (**Atoui et al., 2005 ; Canadanovic-Brunet et al., 2005 ; Bertoneclj et al., 2007 ; Kumaran et Joel Karunakaran, 2007**).

Les études sur les extraits des différentes espèces végétales montrent que la famille des Lamiaceae possède les activités antioxydantes les plus fortes (**Lamaison et Petitjeanfreytet, 1996 ; Zheng et Wang, 2001 ; Shan et al., 2005**).

Nos résultats montrent que l'extrait de *M. vulgare* présente un pouvoir antioxydant modéré, tandis que les extraits de *S. verbenaca* et *P. crinita* proposent les pouvoirs antioxydants les plus élevés.

L'acide gallique enregistre une faible concentration inhibitrice 50 (IC_{50}) ($38,35 \pm 18,27 \mu\text{g/ml}$). En comparant entre les IC_{50} enregistrées par les extraits, nous remarquons que l'extrait de *S. verbenaca* avec une IC_{50} de $143,37 \pm 13,99 \mu\text{g/ml}$ est le plus puissant suivi par l'extrait de *P. crinita* avec une IC_{50} de $203,65 \pm 11,18 \mu\text{g/ml}$. Notre extrait de *P. crinita* a donné une très grande activité antioxydante par rapport à celle retrouvée par Tamert (2016).

Le pouvoir antiradicalaire non négligeable des extraits peut être expliqué par la présence des composés phénoliques notamment les flavonoïdes, qui sont connus comme substances antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène. Il faut aussi mentionner que plusieurs études ont montré que l'activité antioxydante des flavonoïdes n'était pas liée à leur quantité dans les extraits mais plutôt à leur « qualité ». En effet Amic et al. (2003) ont montré que les flavonoïdes les plus efficaces sont ceux qui

renferment des groupements 3',4'-dihydroxyl sur le cycle B et/ou un groupement 3-OH sur le cycle C.

Le pouvoir réducteur de nos extraits a été mesuré selon la méthode d'Oyaizu (1986), et déterminé par la mesure de l'absorbance à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur (**Ozsoy et al., 2008 ; Ribeiro et al., 2008**). Les résultats obtenus montrent que tous les extraits présentent un pouvoir réducteur du fer de manière dose-dépendante.

Elle existe une bonne corrélation entre le pouvoir réducteur des extraits de *S. verbenaca* et *P. Crinita* et leurs teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes. Donc, le pouvoir réducteur de ces extraits pourrait être lié à la présence de composés phénoliques et de flavonoïdes qui ont la capacité de donner des électrons. Les résultats de cette activité sont en accord avec d'autres études (**Tehami, 2017 ; Belkhiri, 2018**).

Kumarappan *et al.* (2012), ont signalé que les donneurs d'électrons pourraient réagir avec les radicaux libres pour les transformer en produits plus stables, c'est ce qu'on appelle pouvoir réducteur.

Le test de β -carotène/acide linoléique est très utile comme modèle mimétique de la peroxydation lipidique dans les membranes biologiques (**Ferreira et al., 2006**). Il a été rapporté que l'échantillon qui inhibe ou retarde le blanchissement du β -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme antioxydant primaire (**Liyana-Pathirana et Shahidi, 2006**). Les résultats enregistrés par *S. verbenaca* et *P. crinita* concernant l'inhibition d'oxydation du β - carotène présentent une activité antioxydante significativement plus puissante comparaison à *M. vulgare*.

Ces résultats sont en accord avec les résultats de plusieurs publications, qui ont rapporté une corrélation positive entre tout le contenu phénolique et l'activité antioxydante (**Kadri et al., 2011 ; Ghedadba et al., 2014**).

Selon la bibliographie les métabolites secondaires en particulier les polyphénols sont connus par leur effet antioxydant en neutralisant les radicaux libres, d'après les résultats des tests phytochimiques et le dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux on peut déduire que cette activité est attribuable sans doute à la présence de ces composés dans les extraits.

Ces composés sont dotés d'activité antioxydante en libérant un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle ou bien par leurs propriétés chélatrices des ions métalliques (**Pastre *et al.*, 2005**).

Conclusion

Conclusion

La diversité des plantes en propriétés biologiques est attribuée à une gamme de molécules bioactives synthétisées par les plantes comme des agents médicaux tels que les polyphénols. Ces molécules naturelles sont très recherchées vue les effets indésirables des médicaments chimiques.

Dans ce contexte, notre étude menée sur trois plantes médicinales à savoir : *Marrubium vulgare*, *Salvia verbenaca* et *Phlomis crinita* a permis le criblage phytochimique de quelques groupes chimiques, la quantification des composés phénoliques et l'évaluation de l'activité antioxydante de ses extraits méthanoliques.

Le screening phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de caractériser les flavonoïdes, les tanins galliques, les saponines, les terpénoïde, les quinones libres, les alcaloïdes et les oses et holosides. Les résultats obtenus dans ces différents tests révèlent la diversité et la richesse de ces plantes en substances actives ce qui confirme leurs valeurs phytochimiques et qui en plus, aussi souligne la justification de leur valorisation.

Le dosage quantitatif des polyphénols a révélé que *S. verbenaca* et *P. crinita* sont plus riches en polyphénols par rapport à *M. vulgare* qui présente une teneur moyenne.

L'activité antioxydante a été évaluée par trois techniques : le piégeage du radical libre DPPH, la réduction du fer et le blanchissement du β -carotène. Pour la première technique, les résultats révèlent que *S. verbenaca* présente l'activité la plus élevée avec une IC_{50} de 143,37 μ g/ml. Concernant la technique de réduction du fer, les résultats montrent que tous les extraits ont une capacité à réduire le fer qui augmente en fonction de la concentration dont on remarque que *S. verbenaca* a une activité plus élevée par rapport à *P. crinita* et *M. vulgare*. Pour le blanchissement du β -carotène, l'inhibition la plus élevée a été enregistrée pour *S. verbenaca* avec un AAR de 42,60 %.

Le contenu élevé des composés phénoliques et la relation entre les valeurs de la concentration des composés phénoliques et l'activité antioxydante à l'exception de *M. vulgare* ont indiqué que ces composés contribuent à l'activité antioxydante.

Les résultats obtenus constituent une justification scientifique de l'usage traditionnel des plantes étudiées. Nos résultats restent préliminaires et des études plus approfondies *in vivo* seraient nécessaires pour mieux comprendre le mécanisme d'action des molécules bioactives, leur dose thérapeutique ainsi que leur site d'action au niveau de la cellule. Cela permettrait de préparer des produits pharmaceutiques de grand intérêt thérapeutique.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. (2007).** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du rhumatisme*, 74(7), 636-643.
- Ameenah G. F. (2006).** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine*, 27(1), 1-93.
- Amic, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., & Trinajstić, N. (2003).** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica chemica acta*, 76(1), 55-61.
- Amor, I. L. B., Boubaker, J., Sgaier, M. B., Skandrani, I., Bhourri, W., Neffati, A., & Chekir-Ghedira, L. (2009).** Phytochemistry and biological activities of *Phlomis* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(2), 183-202.
- Aouadhi, S. (2010).** Atlas de risques de la phytothérapie traditionnelle à l'étude de 57 plantes recommandées par les herboristes. *Faculté de médecine de Tunis-Master spécialisé en toxicologie*.
- Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., & Kefalas, P. (2005).** Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food chemistry*, 89(1), 27-36.
- Aviram, M. (2000).** Review of human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular diseases. *Free Radical Research*, 33, 85-97.
- Azzi, R., Lahfa, F., & Djaziri, R. (2014).** Phytochemical, antihyperglycemic and antihyperlipidemic study of crude hydroalcoholic extract of aerial parts of *Marrubium vulgare* L. in normal and streptozotocin induced-diabetic Wistar rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(5), 2006.
- Ba, K., Tine, E., Destain, J., Cissé, N., & Thonart, P. (2010).** Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 14(1), 131-139.
- Balasundram, N., Tan, Y. A., Sambanthamurthi, R., Sundram, K., & Samman, S. (2005).** Antioxidant properties of palm fruit extracts. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 14(4), 319.
- Barouki, R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/sciences*, 22(3), 266-272.
- Belkhiri, F. (2018).** Activité antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales : *salvia verbenaca* et *Lepidium sativum* (thèse de doctorat, l'université Ferhat Abbas Sétif 1).
- Belkhiri, L., Mouni, L., Narany, T. S., & Tiri, A. (2017).** Evaluation of potential health risk of heavy metals in groundwater using the integration of indicator kriging and multivariate statistical methods. *Groundwater for Sustainable Development*, 4, 12-22.
- Beloued, A. (1998).** Plantes médicinales d'Algérie OPU, Alger.

- Benhammou, N. (2012).** *Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien* (thèse de doctorat. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen).
- Bertoncelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M., & Golob, T. (2007).** Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 105(2), 822-828.
- Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA*, In : Numéro spécial, p. 79-82.
- Bouchouka, E. (2016).** *Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes sahariennes* (thèse de doctorat, Université badji mokhtar-annaba).
- Bouguerne, B. (2012).** *Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et études de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose)* (thèse de doctorat, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., & Igc, R. (2008).** Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food chemistry*, 111(4), 925-929.
- Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales. 3ème édition, *Lavoisier Techniques & Documentation, Paris*, p.1120.
- Bruneton, J. (2009).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales, 4 e éd. *Tec & Doc/Lavoisier, Paris*, p. 279-281.
- Camarasa, J., Canigueral, S., Iglesias, J., & Marin, E. (1982).** Sur les aglycones flavoniques des feuilles de *Salvia verbenaca* L. : hydroxy-5 diméthoxy-7, 4'flavone, flavonoïde nouveau pour le genre *Salvia* L. *Plantes medicinales et phytothérapie*, 16, 192-196.
- Canadanovic-Brunet, J. M., Djilas, S. M., Cetkovic, G. S., & Tumbas, V. T. (2005).** Free-radical scavenging activity of wormwood (*Artemisia absinthium* L) extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(2), 265-272.
- Chaabi, M. (2008).** Étude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : *Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae), *Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae) (*Doctoral dissertation, Strasbourg 1*).
- Chira, K., Suh, J. H., Saucier, C., & Teissèdre, P. L. (2008).** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6(2), 75-82.
- Christen, Y. (2000).** Oxidative stress and Alzheimer disease. *The American journal of clinical nutrition*, 71(2), 621-629.
- Collin, S., & Crouzet, J. (2011).** *Polyphénols et procédés : transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire*. Lavoisier.

- Cowan, M. M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010).** Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Delosière, M., Damon, M., & Durand, D. (2013).** Oxidative stress in farm animals: general aspects. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 48(5), 218-224.
- Diallo, A.M. (2004).** Etude des plantes médicinales de Niofunke (Région Tombouctou). Phytochimie et pharmacologie de *Maerua Crassifolia* Forsk (Capporidacée) (*Doctoral dissertation, Université de Bamako. Mali*).
- Doat, J. (1978).** Les tanins dans les bois tropicaux. *BOIS & FORETS DES TROPIQUES*, 182(182), 37-54.
- Durand, G., & Beaudeau, J. L. (2011).** *Biochimie médicale : Marqueurs actuels et perspectives*. Lavoisier
- Ebrahimi, S. N., Hadian, J., Mirjalili, M. H., Sonboli, A., & Yousefzadi, M. (2008).** Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry*, 110(4), 927-931.
- Edeas, M. (2007).** Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*, 5(5), 264-270.
- Edeoga, H. O., Okwu, D. E., & Mbaebie, B. O. (2005).** Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African journal of biotechnology*, 4(7), 685-688.
- Ernest, P. (2000).** Why teach mathematics. *Why learn maths*, p.1-14.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.
- Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108.
- Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. L. M., & Araujo, M. E. M. (2006).** The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*, 108(1), 31-37.
- Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000).** The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925-1941.
- Ghasemzadeh, A., & Ghasemzadeh, N. (2011).** Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of medicinal plants research*, 5(31), 6697-6703.
- Ghedadba, N., Bousselela, H., Hambaba, L., Benbia, S., & Mouloud, Y. (2014).** Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie*, 12(1), 15-24.

- Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2006).** Advances in the analysis of phenolic compound in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4), 1220-1234.
- Goudable, J., & Favier, A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11(2), 115-120.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007).** Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., & Fukui, S. (1994).** The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(6), 845-850.
- Heilerova, I., buckova, m., tarapci, p., silhar, s., & labuda, j. (2003).** Comparison of antioxidative activity data for aqueous extracts of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), oregano (*Origanum vulgare* L.), thyme (*Thymus vulgaris* L.), and agrimony (*Agrimonia eupatoria* L.) obtained by conventional methods and the DNA-based biosensor. *Czech journal of food sciences*, 21(2), 78-84.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3-6.
- Hopkins, W. G. (2003).** *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur, p. 280.
- Houmènou, V., Adjatin, A., Assogba, F., Gbénou, J., & Akoègninou, A. (2018).** Étude Phytochimique Et De Cytotoxicité De Quelques Plantes Utilisées Dans Le Traitement De La Stérilité Féminine Au Sud-Bénin. *European Scientific Journal*, 14(6), 156-171.
- Hseu, Y. C., Chang, W. H., Chen, C. S., Liao, J. W., Huang, C. J., Lu, F. J., ... & Yang, H. L. (2008).** Antioxidant activities of *Toona sinensis* leaves extracts using different antioxidant models. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 105-114.
- Huang, D. J., Chun-Der, L. I. N., Hsien-Jung, C. H. E. N., & Yaw-Huei, L. I. N. (2004).** Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] LamTainong 57') constituents. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 45.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Jadot, G. (1994).** *Antioxydants et vieillissement*. John Libbey Eurotext.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., & Stevens, P. (2002).** Botanique systématique-Une perspective phylogénétique, p. 467. *De Boeck Université, Paris & Bruxelles*.
- Kadri, A., Zarai, Z., Békir, A., Gharsallah, N., Damak, M., & Gdoura, R. (2011).** Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *African journal of biotechnology*, 10(19), 3908-3914.

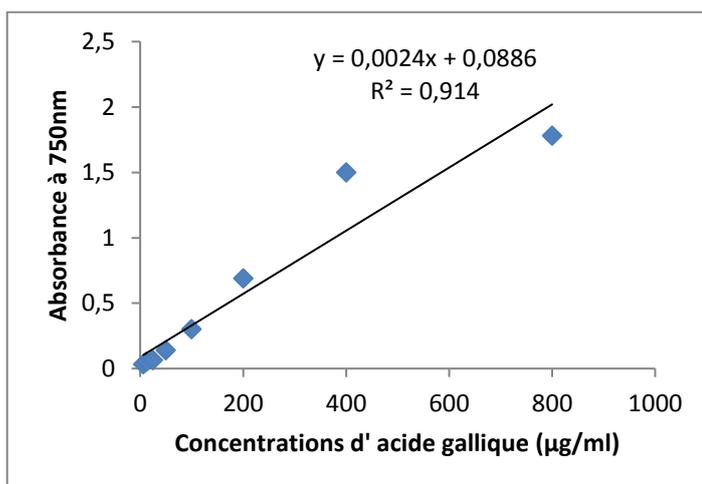
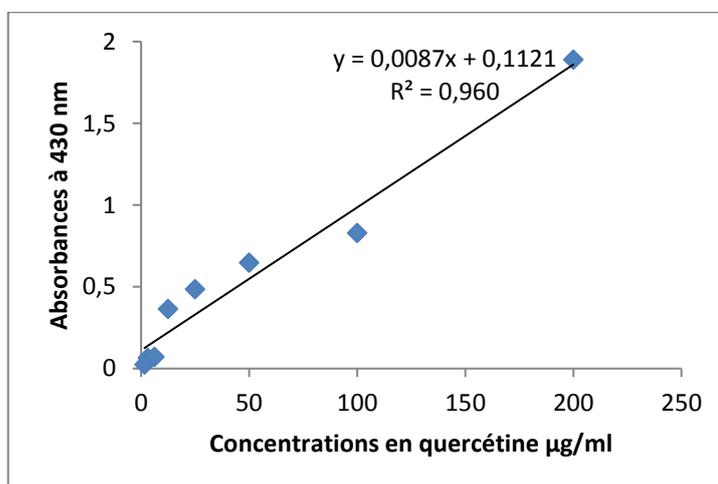
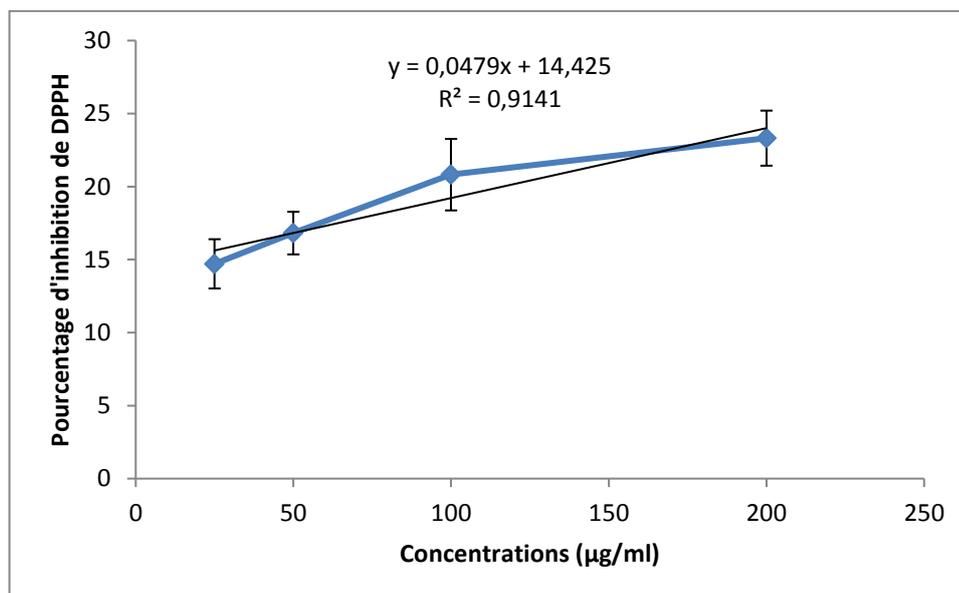
- Kalia, K., Sharma, K., Singh, H. P., & Singh, B. (2008).** Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10129-10134.
- Karumi, Y. O. V. O., Onyeyili, P. A., & Ogugbuaja, V. O. (2004).** Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. *J Med Sci*, 4(3), 179-182.
- Knaggs, A. R. (2003).** The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural product reports*, 20(1), 119-136.
- Koehlin-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(4), 165-177.
- Kumaran, A., & Karunakaran, R. J. (2007).** In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT-Food Science and Technology*, 40(2), 344-352.
- Kumarappan, C. T., Thilagam, E., & Mandal, S. C. (2012).** Antioxidant activity of polyphenolic extracts of *Ichnocarpus frutescens*. *Saudi journal of biological sciences*, 19(3), 349-355.
- Laguerre, M., Lopez Giraldo, L. J., Lecomte, J., Pina, M., & Villeneuve, P. (2007).** Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *OCL. Oléagineux Corps gras Lipides*, 14(5), 278-292.
- Lamaison J. L., et Petitjeanfreytet C. (1996).** Medicinal Lamiaceae with antioxidant activity, potential sources of rosmarinic acid. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 66, 185–188.
- Libman, A., Bouamanivong, S., Southavong, B., Sydara, K., & Soejarto, D. D. (2006).** Medicinal plants: an important asset to health care in a region of Central Laos. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3), 303-311.
- Liyana-Pathirana, C. M., & Shahidi, F. (2006).** Antioxidant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(3), 477-485.
- Majob, F., Kamalinejab, M., Ghaderi, N., & Vahidipour, H. R. (2003).** Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranian J Pharma Res*, 2, 77-82.
- Malesev, D., & Kuntic, V. (2007).** Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *JOURNAL-SERBIAN CHEMICAL SOCIETY*, 72(10), 921.
- Marfak, A. (2003).** *Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides* (Doctoral dissertation, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges).

- Massion, P., Preise, R. J. C., & Balligand, J. L. (2002).** Les espèces réactives de l'azote : bénéfiques ou délétères. Reactive nitrogen species: deleterious or not. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16, 248-252.
- Menat, É. (2006).** Les polyphénols de thé, du vin et du cacao. *Phytothérapie*, 4(1), 40-45.
- Merouane, A., Noui, A., Ali, K. N. B., & Saadi, A. (2014).** Activité antioxydante des composés phénoliques d'huile d'olive extraite par méthode traditionnelle. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 8(4), 1865-1870.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., & Van Beek, T. A. (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chemistry*, 85(2), 231-237.
- Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26(2), 211-219.
- Morena, M., Martin-Mateo, M., Cristol, J. P., & Canaud, B. (2002).** Stress oxydant, hémocompatibilité et complications de la dialyse au long cours. *Néphrologie*, 23(5), 201-208.
- N'Guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G., Traoré, D., & Aké-Assi, L. (2009).** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 6(1).
- Nassar ép Boulahneche, M., & Zerizer, S. (2017).** *Activités biologiques des molécules bioactives extraites de quelques plantes médicinales* (Doctoral dissertation, Université des Frères Mentouri).
- Nawaz, H., Shi, J., Mittal, G. S., & Kakuda, Y. (2006).** Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, 48(2), 176-181.
- Oloyede, O. I. (2005).** Chemical profile of unripe pulp of Carica papaya. *Pakistan journal of nutrition*, 4(6), 379-381.
- Owen, P. L., & Johns, T. (1999).** Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of ethnopharmacology*, 64(2), 149-160.
- Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reaction. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315.
- Ozsoy, N., Can, A., Yanardag, R., & Akev, N. (2008).** Antioxidant activity of Smilax excelsa L. leaf extracts. *Food Chemistry*, 110(3), 571-583.
- Pasquier, C. (1995).** Stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires*, 1995(276), 87-92.
- Pastre, J., Pastre, O., & Pastre, C. (2005).** *Interêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse).
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J. O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4), 233-239.

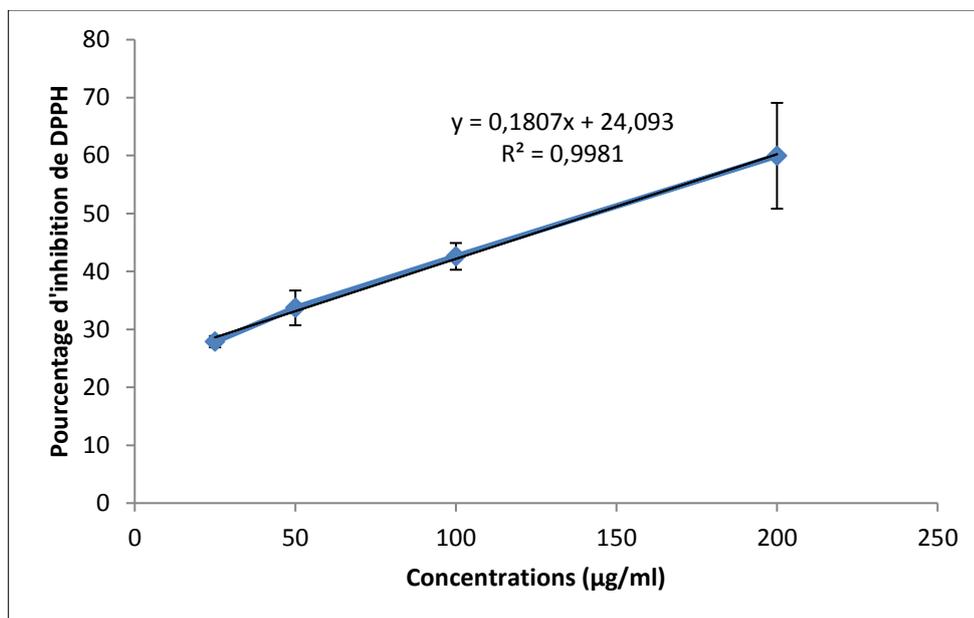
- Pincemail, J., Degrune, F., Voussure, S., Malherbe, C., Paquot, N., & Defraigne, J. O. (2007).** Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme*, 21(2), 66-75.
- Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., & Defraigne, J. O. (1999).** Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme : importance en matière de prévention. *Cancérologie*, 95, 1-4.
- Podsędek, A. (2007).** Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 40(1), 1-11.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. H. (Eds.). (2001).** *Antioxidants in food: practical applications*. CRC press.
- Portes, E. (2008).** *Synthèse et études de tétrahydrocurcuminoïdes: propriétés photochimiques et antioxydantes: applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle* (Doctoral dissertation, Bordeaux 1).
- Pottier-Alapetite, G. (1981).** *Flore de la Tunisie : angiospermes-dicotylédones. Gamopétales*. Impr. Office de la République Tunisienne.
- Quezel, P., & Santa, S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (*New Flora of Algeria and the Southern Desert Regions*). (Editions CNRS: Paris.).
- Rawel, H. M., Meidtner, K., & Kroll, J. (2005).** Binding of selected phenolic compound to proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4228-4235.
- Ribeiro, S. M. R., Barbosa, L. C. A., Queiroz, J. H., Knödler, M., & Schieber, A. (2008).** Phenolic compound and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food chemistry*, 110(3), 620-626.
- Ribéreau-Gayon, P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. *Ed. Dunod. Paris*. p. 317-436.
- Richter, G. (1993).** Métabolisme des végétaux. Physiologie et Biochimie. *Ed. Presses Polytechniques et Universitaire Romandes*, p. 526.
- Rolland, Y. (2004).** Antioxydants naturels végétaux. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 11(6), 419-424.
- Sánchez-Moreno, C. (2002).** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*, 8(3), 121-137.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M., & Corke, H. (2005).** Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(20), 7749-7759.
- Sherwin, H. W., & Farrant, J. M. (1996).** Differences in rehydration of three desiccation-tolerant angiosperm species. *Annals of Botany*, 78(6), 703-710.

- Sökmen, B., Aydın, S., & Kınahoğlu, K. (2012).** Antioxidant and antibacterial properties of a lichen species *Diploschistes scruposus* (Schreb.) Norman. *European Journal of Biology*, 71(1), 43-51.
- Sun, J., Yao, J., Huang, S., Long, X., Wang, J., & García-García, E. (2009).** Antioxidant activity of polyphenol and anthocyanin extracts from fruits of *Kadsura coccinea* (Lem.) AC Smith. *Food Chemistry*, 117(2), 276-281.
- Tamert, A. (2016).** *Labiées des monts de Tessala (wilaya de Sidi Bel abbès) : histologie et phytochimie* (Doctoral dissertation, Université djillali liabes de sidi bel abbes).
- Tehami, W. (2017).** *Caractérisation phytochimique et évaluation du potentiel antioxydant, antimicrobien et anti-inflammatoire de Salvia argentea* (Doctoral dissertation, Université djillali liabes de sidi bel abbes).
- Teixeira, E. I., Fischer, G., Van Velthuisen, H., Walter, C., & Ewert, F. (2013).** Global hot-spots of heat stress on agricultural crops due to climate change. *Agricultural and Forest Meteorology*, 170, 206-215.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A., & Sokmen, A. (2006).** Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chemistry*, 95(2), 200-204.
- Tessier, F., & Marconnet, P. (1995).** Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & sports*, 10(1), 1-13.
- Turkmen, N., Velioglu, Y., Sari, F., & Polat, G. (2007).** Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12(3), 484-496.
- Unten, L., Koketsu, M., & Kim, M. (1997).** Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on β -carotene. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(6), 2009-2012.
- Vamecq, J., Vallée, L., Storme, L., Gelé, P., & Bordet, R. (2004).** Les acteurs immédiats du stress oxydatif. *La lettre du pharmacologue*, 18, 16-23.
- Yi, Z., Yu, Y., Liang, Y., & Zeng, B. (2008).** In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT-Food Science and Technology*, 41(4), 597-603.
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001).** Antioxidant activity and phenolic compound in selected herbs. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(11), 5165-5170.

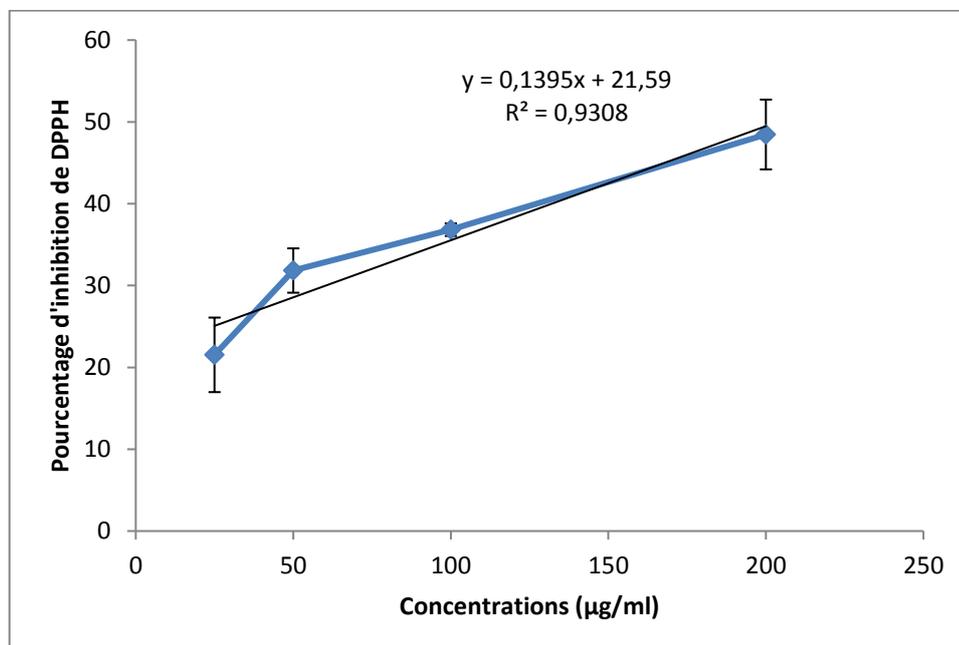
Annexes

Annexe 1 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux.**Annexe 2 :** Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux.**Annexe 3 :** Pourcentage d'inhibition du radicale libre en fonction des concentrations de *M. vulgare*.

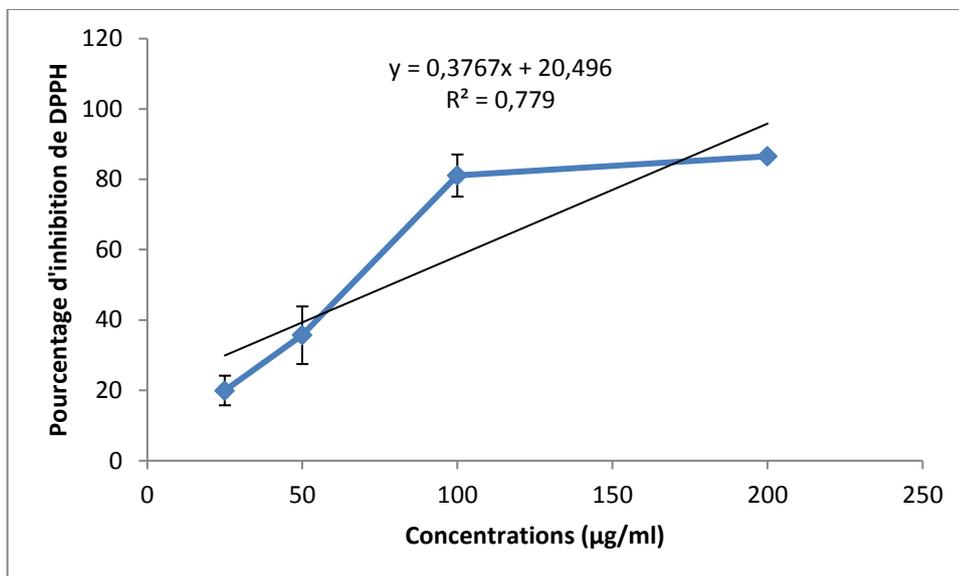
Annexe 4 : Pourcentage d'inhibition du radicale libre en fonction des concentrations de *S. verbenaca*.



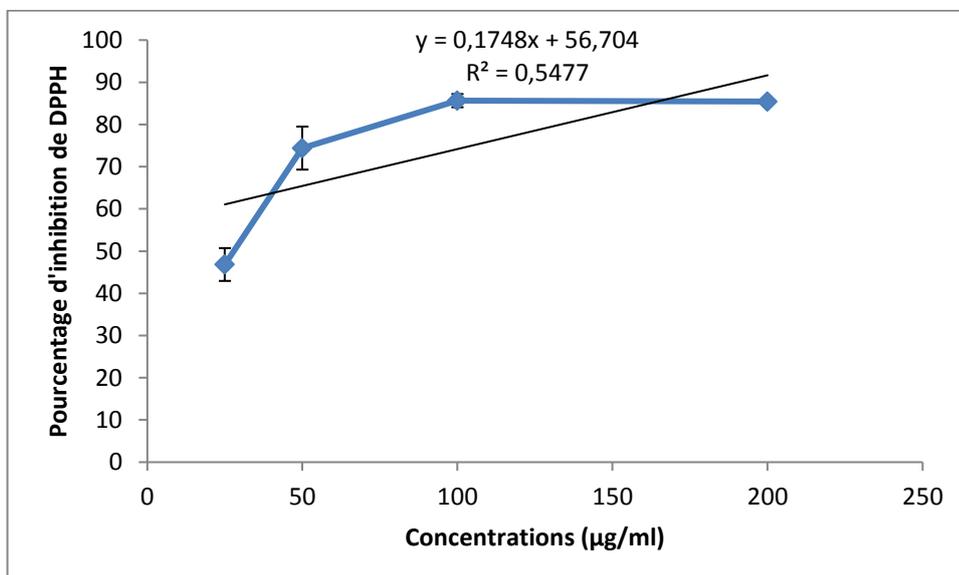
Annexe 5 : pourcentage d'inhibition du radicale libre en fonction des concentrations de *P. crinita*.



Annexe 6 : Pourcentage d'inhibition du radicale libre en fonction des concentrations de l'acide ascorbique.



Annexe 7 : Pourcentage d'inhibition du radicale libre en fonction des concentrations de l'acide gallique.



Réalisé par : BOUDEHANE Esma BOUCHEFIFA Farida DESDOUS Noura	Jury : Présidente : M ^{me} BENSEGHIER Salima. Examinatrice : Dr. CHERBAL Asma. Encadreur : Dr. BOUTENNOUN Hanane. Date de soutenance : 21/07/2019
--	--

Thème

Screening phytochimique et activité antioxydante de quelques plantes médicinales

Résumé

Les végétaux constituent une source importante de métabolites actifs avec un important potentiel thérapeutique. Notre travail vise à étudier le pouvoir antioxydant des extraits de feuilles de *Marrubium vulgare*, *Salvia verbenaca* et *Phlomis crinita*, trois Lamiacées récoltés de la région de Jijel. L'étape d'extraction des polyphénols a été complétée par un screening chimique partiel suivie par le dosage des polyphénols et des flavonoïdes. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant les tests du DPPH, le pouvoir réducteur et le blanchissement de β -carotène. Le criblage phytochimique a permis de mettre en évidence la présence de substances ayant de grandes valeurs thérapeutiques (flavonoïdes, tanins, alcaloïdes ... etc). La quantification des polyphénols totaux et des flavonoïdes a donné des valeurs plus élevées avec *S. verbenaca* ($841,22 \pm 64,77$ mg EAG/g EB et $162,47 \pm 20,31$ mg EQ/g EB respectivement). L'étude de l'activité antioxydante en utilisant les tests DPPH, Fe et β -carotène a montré que ces extraits ont une activité antioxydante très intéressante sauf l'extrait de *M. vulgare* qui présente une activité antioxydante moyenne.

Mots clés: Lamiacées, Polyphénols, Criblage phytochimique, Activité antioxydante.

Abstract

Plants are an important source of active metabolites with significant therapeutic potential. Our work aims to study the antioxidant power of leaf extracts of *Marrubium vulgare*, *Salvia verbenaca* and *Phlomis crinita*, three Lamiaceae harvested from Jijel region. Polyphenols extraction step was completed by a partial chemical screening followed by polyphenols and flavonoids content determination. Antioxidant activity was evaluated using DPPH test, reducing power assay and the β -carotene test. Phytochemical screening revealed the presence of substances with high therapeutic values (flavonoids, tannins, alkaloids... etc.). Total polyphenols and flavonoids quantification gave higher values with *S. verbenaca* (841.22 ± 64.77 mg EAG/g EB and 162.47 ± 20.31 mg EQ/g EB respectively). The study of the antioxidant activity using the DPPH, Fe and β -carotene tests showed that these extracts have a very interesting antioxidant activity except the extract of *M. vulgare* which has a medium antioxidant activity.

Key words : Lamiaceae, Polyphenols, Phytochemical screening, Antioxidant activity.

الملخص

تشكل النباتات مصدر مهم لمواد الأيض النشطة ذات القيمة العلاجية الكبيرة. يهدف هذا العمل إلى دراسة مدى قوة مضادات الأكسدة الموجودة في مستخلصات أوراق كل من *Marrubium vulgare*، *salvia verbenaca* و *phlomis crinita* و هي ثلاثة نباتات من اللامشيا تم جمعها من منطقة جيجل. تم إكمال خطوة استخلاص متعددات الفينول بفحص كيميائي جزئي اتبعه تحديد تركيز كل من البوليفينولات والفلافونويدات. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام اختبارات DPPH، قدرة ارجاع الحديد واختبار β -carotène. كشف الفحص الكيميائي النباتي عن وجود مواد ذات قيمة علاجية عالية (الفلافونويدات، العفص، القلويدات....). أعطى التقدير الكمي للفينولات الكلية والفلافونويدات قيماً أعلى مع نبتة *S.verbenaca* (841.22 ± 64.77 ملغ EAG/غرام من المستخلص و 162.47 ± 20.31 ملغ EQ/غرام من المستخلص على التوالي). أظهرت دراسة النشاط المضاد للأكسدة باستخدام الاختبارات الثلاث أن هذه المستخلصات لها نشاط مضاد للأكسدة هام جداً باستثناء خلاصة *M. Vulgare* التي لها نشاط مضاد للأكسدة متوسط.

الكلمات لمفتاحية: اللامشيا، متعددات الفينول، الفحص الكيميائي النباتي، النشاط المضاد للأكسدة.