



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارض والكون

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

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème

**Etude de l'activité antioxydante des extraits
aqueux et organiques des tubercules de
Bunium incrassatum.**

Présenté par :

- BEN ABBAS Sonia

- DJOUDI Zouina

Devant le jury :

Président : M^{me} FATMI Wided MCB (Univ. Bordj Bou Arreridj)

Encadrant : M^{lle} DEHIMI Khadidja MAB (Univ. Bordj Bou Arreridj)

Examineur : M^{me} BENOUADAH Zohra MAA (Univ. Bordj Bou Arreridj)

Année universitaire : 2017/2018

Remerciements

Avant tout, nous remercions *''Allah''* le tout puissant de nous avoir donné la santé, la force, le courage, la patience, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre encadreur *M^{lle} Dehimi Khadidja*, pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'elle a consenti durant la réalisation de ce mémoire. Qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.

Nous exprimons nos profonds remerciements aux membres de jury qui ont accepté d'examiner ce travail.

Nous offrons nos plus sincères remerciements à toute l'équipe de laboratoire de Biochimie où nous avons réalisé la partie pratique de ce travail.

Nous souhaiterons également remercier nos professeurs de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers pendant les cinq années de notre parcours.

Merci

À ceux et celles qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans notre travail, nous les remercions du fond du cœur.

ملخص

Bunium incrassatum هو نبات طبي ينتمي إلى الفصيلة الخيمية، وهو منتشر على نطاق واسع في الشرق الجزائري و يسمى محليا "تالغودة". تستعمل درنات هذا النبات تقليديا كمضاد للإسهال ولتنظيم الإفراز الغدي خاصة في الغدة الدرقية؛ كما تعتبر جد مغذية وتستعمل بالتالي للأكل. تم هذا العمل لتحديد بعض المركبات الكيميائية النباتية و تقييم النشاطية المضادة للأكسدة للمستخلصات المحضرة من درنات النبات لأول مرة. تم تحضير المستخلصات باستخدام تقنية النقع باستعمال أربع مذيبات ذات قطبية مختلفة؛ قدر مردود المستخلص المائي بـ 24.48% و مستخلص الهكسان بـ 11.28% ، في حين أن مردود مستخلص الميثانول والأسيتون كان أقل (3.36% و 0.52%، على التوالي). وجدت أكبر كمية من عديدات الفينول في مستخلص الأسيتون (47.10 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك / مغ مستخلص). أظهرت مستخلصات الهكسان والأسيتون أعلى مستويات من الفلافونويدات (32.84 و 27.60 ميكروغرام مكافئ كيرسيتين / مغ مستخلص، على التوالي) وكذلك من الدباغ (32.06 و 22.50 ميكروغرام مكافئ حمض التانيك/مغ مستخلص، على التوالي). بين تقييم القدرة الإزاحية للمستخلصات ضد DPPH أن مستخلص الميثانول يمتلك النشاطية الأعلى (IC50 = 21.11 مغ/مل). بين مستخلص الأسيتون أعلى قدرة على إرجاع الحديد وقد أظهر نشاطية متزايدة مع التركيز بقيمة امتصاص قصوى قدرت بـ 0.74 عند تركيز 6 مغ/مل. أظهر اختبار بيتا كاروتين / حمض اللينوليك أن المستخلص المائي يمتلك نشاطية أعلى من المستخلصات العضوية بنسبة تثبيط تعادل 88.63%.

الكلمات المفتاحية : *Bunium incrassatum* ، مستخلص مائي ، مستخلصات عضوية ، نشاطية مضادة للأكسدة ، عديدات الفينول ، DPPH ، FRAP ، بيتا كاروتين .

Résumé

Bunium incrassatum est une plante médicinale appartenant à la famille des *Apiaceae* ; elle est largement distribuée dans l'est Algérien et appelée localement "Talghouda". Les tubercules de cette plante sont utilisés traditionnellement comme anti-diarrhéique et pour régler la sécrétion glandulaire surtout de la glande thyroïdienne ; ce sont aussi très nutritifs et utilisés ainsi dans l'alimentation. On a fait ce travail dans le but d'identifier certains composés phytochimiques et d'évaluer l'activité antioxydante des extraits préparés à partir des tubercules de la plante pour la première fois. Les extraits sont préparés en utilisant la technique de macération par quatre solvants de polarités différentes ; le rendement de l'extraction est de 24.48% pour l'extrait aqueux et 11.28% pour l'extrait d'hexane, tandis que celui des extraits de méthanol et d'acétone est plus faible (3.36 % et 0.52 %, respectivement). Le taux le plus élevé de polyphénols est trouvé dans l'extrait acétonique (47,10 μg équivalent d'acide gallique/mg d'extrait). Les extraits d'hexane et d'acétone ont montré les teneurs les plus élevées en flavonoïdes (32,84 et 27,60 μg équivalent quercétine/mg d'extrait, respectivement) et aussi en tannins (32,06 et 22,50 μg équivalent acide tannique/mg d'extrait, respectivement). L'évaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits contre le DPPH a montré que l'extrait méthanolique possède l'activité la plus élevée ($\text{IC}_{50} = 21,11 \text{ mg/ml}$). La meilleure capacité à réduire le fer est représenté par l'extrait acétonique qui a montré une activité dose-dépendante avec une valeur maximale d'absorbance de 0.74 à une concentration de 6 mg/ml. Le test de β -carotène/acide linoléique a montré que l'extrait aqueux possède une activité plus importante que les extraits organiques avec un pourcentage d'inhibition égale à 88,63%.

Mots clés: *Bunium incrassatum*, extrait aqueux, extraits organiques, activité antioxydante, polyphénols, DPPH, FRAP, β carotène.

Abstract

Bunium incrassatum is a medicinal plant belonging to the *Apiaceae* family; it is widely distributed in Algerian east and locally called "Talghouda". The tubers of this plant are traditionally used as antidiarrheal and to regulate glandular secretion especially in the thyroid gland; they are also very nutritious and thus used as food. This work was done to identify certain phytochemicals and to evaluate the antioxidant activity of extracts prepared from tubers of the plant for the first time. The extracts are prepared using maceration technique with four solvents of different polarities; the extraction yield is 24.48% for aqueous extract and 11.28% for hexane extract, while for methanol and acetone extracts it was lower (3.36% and 0.52%, respectively). The highest amount of polyphenols is found in acetone extract (47.10 μg gallic acid equivalent / mg extract). Hexane and acetone extracts showed the highest levels of flavonoids (32.84 and 27.60 μg quercetin equivalent / mg extract, respectively) and also of tannins (32.06 and 22.50 μg tannic acid equivalent / mg extract, respectively). Evaluation of extracts antiradical power against DPPH showed that methanolic extract possesses the highest activity ($\text{IC}_{50} = 21.11 \text{ mg/ml}$). The best capacity to reduce iron is represented by acetone extract which showed a dose-dependent activity with a maximal absorbance value of 0.74 at a concentration of 6 mg/ml. The β -carotene / linoleic acid test showed that aqueous extract possesses a higher activity than organic extracts with percentage inhibition equal to 88.63%.

Key words: *Bunium incrassatum*, aqueous extract, organic extracts, antioxidant activity, polyphenols, DPPH, FRAP, β carotene.

Sommaire

Introduction	1
Chapitre 1 : revue bibliographique.	
1- La plante <i>Bunium incrassatum</i>	3
1.1- La famille des <i>Apiaceae</i>	3
1.1.1-Généralités	3
1.1.2 - Composition chimique	4
1.2- Le genre <i>Bunium</i> L.	4
1.2.1- Morphologie	4
1.2.2- Les espèces algériennes du genre <i>Bunium</i>	4
1.3- L'espèce <i>Bunium incrassatum</i>	4
1.3.1- Description botanique	4
1.3.2- Classification	5
1.3.3- Composition chimique	5
1.3.4- Intérêts thérapeutiques	6
2 - Les radicaux libres et le stress oxydant	6
2.1 - Les radicaux libres	6
2.1.1- Définition	6
2.1.2- Les principaux radicaux libres	7
2.2.2.1- L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$).....	7
2.2.2.2- Le radical hydroxyle (OH^{\bullet}).....	7
2.1.2.3- Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et L'oxygène singulet (1O_2).....	7
2.1.2.4- Le monoxyde d'azote (NO).....	7
2.1.3- Sources des ROS	8
2.1.3.1- Origine endogène	8
A- Membranes mitochondriales.....	8
B- La xanthine oxydase.....	8
C- L'enzyme NOS (Nitric Oxide Synthase).....	8
D- La NADPH oxydase.....	8
E- L'auto-oxydation de certaines petites molécules.....	8
2.1.3.2- Origine exogène	9
2.1.4- Rôles biologiques des radicaux libres	9
2.2- Le stress oxydant	9

2.2.1- Définition	9
2.2.2- Conséquences biochimiques du stress oxydant	9
2.2.2.1- Oxydation de l'ADN.....	9
2.2.2.2- Oxydation des protéines.....	10
2.2.2.3- Peroxydation des lipides.....	10
2.2.3. Maladies liées au stress oxydant.....	10
3- Les antioxydants	10
3.1- Définition	10
3.2- Les classes d'antioxydants	11
3.2.1- Les antioxydants enzymatiques	11
3.2.1.1- La superoxyde dismutase (SOD).....	11
3.2.1.2- La catalase.....	11
3.2.1.3 - Glutathion peroxydase (GPX).....	11
3.2.2- Les antioxydants non enzymatiques	12
3.2.2.1- L'acide L-ascorbique.....	12
3.2.2.2- La vitamine E.....	12
3.2.2.3- β carotène.....	12
3.2.2.4- Sélénium.....	12
4 - Les polyphénols	13
4.1- Définition et structure	13
4.2 - Classification des polyphénols	13
4.2.1 - Les acides phénoliques	13
4.2.1.1- Les acides hydroxybenzoïques.....	13
4.2.1.2- Les acides hydroxycinnamiques.....	14
4.2.2 - Les flavonoïdes	14
4.2.3 -Les tannins	15
4.2.3.1- Les tannins condensés.....	15
4.2.3.2- Les tannins hydrolysables.....	16
4.3 - Activités biologiques des polyphénols	16
Chapitre 2 : Matériel et méthodes.	
1- Matériel	17
1.1- Matériel végétal	17
1.2- Produits chimiques	17
2- Méthodes	18
2.1- Méthodes d'extraction	18

2.1.1- Préparation de l'extrait aqueux	18
2.1.2- Préparation des extraits organiques	18
2.2- Etude phytochimique	20
2.2.1 - Les flavonoïdes	20
2.2.2- Les tannins	21
2.2.3- Les quinones	21
2.2.4- Les terpénoïdes	21
2.2.5- Les saponines	21
2.3- Dosages de quelques métabolites secondaires	21
2.3.1- Dosage des polyphénols totaux	21
2.3.2- Dosage des flavonoïdes	22
2.3.3- Détermination de la teneur totale en tannins	23
2.4- Etude de l'activité antioxydante des extraits de la plante	24
2.4.1- Test de DPPH	24
2.4.2- Pouvoir réducteur de fer	24
2.4.2.1- Préparation du tampon phosphate 0.2 M (pH 6.6)	24
2.4.2.2- Réalisation du test	25
2.4.3- Test du β - carotène/acide linoléique	25
2.5- Etude statistique	26

Chapitre 3 : Résultats et discussion.

1- Extraction	27
2- Etude phytochimique	28
3- Dosage des composés phénoliques de la plante	28
4 - Activité antioxydante des extraits aqueux et organiques	30
4.1- Piégeage du radical DPPH	30
4.2- Pouvoir réducteur du fer (FRAP).....	31
4.3- Test de β -carotène/acide linoléique	33
Conclusion et perspectives.....	36
Références	37

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Répartition géographique des <i>Apiaceae</i> dans le monde.	3
2	Structure du noyau phénol.	13
3	Structure de l'acide benzoïque.	14
4	Structure de l'acide hydroxycinnamique.	14
5	Structures chimiques des principales familles des flavonoïdes.	15
6	Structure de tannins condensés.	16
7	Structure de tannins hydrolysables.	16
8	La plante <i>Bunium incrassatum</i> . A : Partie souterraine formée de racines blanches et d'un tubercule. Partie aérienne très courte, formée d'un petit amas de feuilles. B : Plante après floraison (partie aérienne étendue).	17
9	Extraction aqueuse à partir des tubercules de <i>Bunium incrassatum</i> .	19
10	Extraction organique à partir des tubercules de <i>Bunium incrassatum</i> .	20
11	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	22
12	Courbe d'étalonnage de la quercétine.	23
13	Courbes d'étalonnage de l'acide tannique.	23
14	Représentation de l'inhibition du radical DPPH par l'estimation des valeurs de l'IC50 des extraits de <i>Bunium incrassatum</i> et de la quercétine.	30
15	Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique.	32
16	Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>Bunium incrassatum</i> par la méthode FRAP.	32
17	(A). Activité antioxydante des extraits aqueux et organiques de <i>Bunium incrassatum</i> par le test du β -carotène/acide linoléique durant 48h. (B). Pourcentages d'inhibition des extraits aqueux et organiques par le test du β -carotène/acide linoléique après 24h.	34

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Composition chimique de <i>Bunium incrassatum</i> (Huiles essentielles).	5
II	Rendements des extractions aqueuse et organiques de <i>Bunium incrassatum</i> .	27
III	Analyse phytochimique des différents extraits de <i>Bunium incrassatum</i> .	28
IV	Dosage des polyphénols, flavonoïdes et tannins totaux des extraits de <i>Bunium incrassatum</i> .	29

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

BHT : Hydroxytoluène butylé.

CAT : Catalase.

DMSO : Diméthyle sulfoxyde.

DPPH : 2,2'-diphénylpicrylhydrazyl.

GPX : Glutathion peroxydase.

GSH : Forme réduite de Glutathion.

GSSG : Forme oxydée de Glutathion.

IC₅₀ : Concentration d'inhibition 50%.

NADH : Nicotinamide-adénine-dinucléotide d'hydrogène.

NADPH : Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate.

NOS: Nitric oxide synthase.

ROS : Reactive oxygen species.

SOD : Superoxyde dismutase.

UV : Ultra-violet.

Introduction

A travers les siècles, l'homme a su acquérir la connaissance des plantes et leurs propriétés thérapeutiques. Ces savoirs traditionnels ont été transmis d'une génération à l'autre, et constituent aujourd'hui, d'une part, un trésor d'informations pour ceux qui préfèrent les usages populaires, et d'autre part, une ressource inestimable pour l'industrie pharmaceutique (Goeb, 1999 ; Boudjemaa et Ben Guegua, 2010).

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 ; et malgré les remarquables progrès en chimie organique de synthèse du vingtième siècle, plus de 25% des médicaments prescrits dans les pays industrialisés tirent directement ou indirectement leurs origines des plantes (Newman *et al.*, 2000 ; Calixto, 2005).

Le stress oxydatif, qui survient lors de déséquilibres entre la production de radicaux libres et le taux des antioxydants, est en relation avec l'apparition de maladies telles que l'Alzheimer, l'athérosclérose et le cancer. Une façon de prévenir ce stress oxydatif qui endommage et détruit les cellules est de rechercher un apport supplémentaire de composés antioxydants. Les principes actifs des extraits des plantes continuent à avoir un très grand intérêt comme suppléments en médecine complémentaire. La plupart de ces extraits contiennent des vitamines, des flavonoïdes et autres polyphénols connus par leur pouvoir antioxydant (Mohammedi, 2013).

Bunium incrassatum est une plante médicinale utilisée traditionnellement dans le traitement de plusieurs désordres tels que les goitres, les hémorroïdes inflammatoires, la diarrhée et la bronchite. Peu d'études existent sur les activités biologiques de cette plante ; dans ce travail l'activité antioxydante des extraits préparés des tubercules de la plante est étudiée pour la première fois. Ce travail est une contribution à :

- La préparation des extraits à partir des tubercules de *Bunium incrassatum*.
- L'investigation de la présence ou l'absence des principaux groupes des composés chimiques végétaux dans les extraits.
- L'étude quantitative des polyphénols, des flavonoïdes et des tannins des extraits préparés.

- L'étude du pouvoir antioxydant des extraits de la plante par le test au DPPH, la méthode de FRAP et le test de β carotène/acide linoléique.

Chapitre 1

Partie bibliographique

1- La plante *Bunium incrassatum*

1.1- La famille des *Apiaceae*

1.1.1-Généralités

Les Apiacées, anciennement appelées Ombellifères, sont une famille de plantes appartenant à la classe des Magnoliopsida (Dicotylédones). Cette famille constitue de 3000 à 3700 espèces regroupées en 300 à 450 genres; Elle est très homogène et facile à reconnaître grâce à son inflorescence en ombelles composées, mais les espèces de cette famille sont assez difficiles à différencier les unes des autres (Constance, 1971 ; Pimenov et *al.*, 1987 ; Stephen et *al.*, 2000 ; Serge, 2012).

Les plantes de la famille des Apiacées sont des végétaux herbacés, des arbres et des arbustes qui sont soit bisannuelles, annuelles ou vivaces ; elles présentent une tige cannelée et noueuse. Ce sont souvent des plantes alimentaires, des condiments, des plantes médicinales ainsi que des plantes toxiques. Elles s'étendent sur différentes parties du globe, mais surtout dans les régions tempérées, et relativement rares dans la zone tropicale (figure 1). Dans la flore Algérienne on peut inventorier 55 genres incluant de nombreuses espèces (Heywood et *al.*, 1996 ; Bruneton, 2009 ; Bouderdara, 2013 ; Lefahal, 2014).

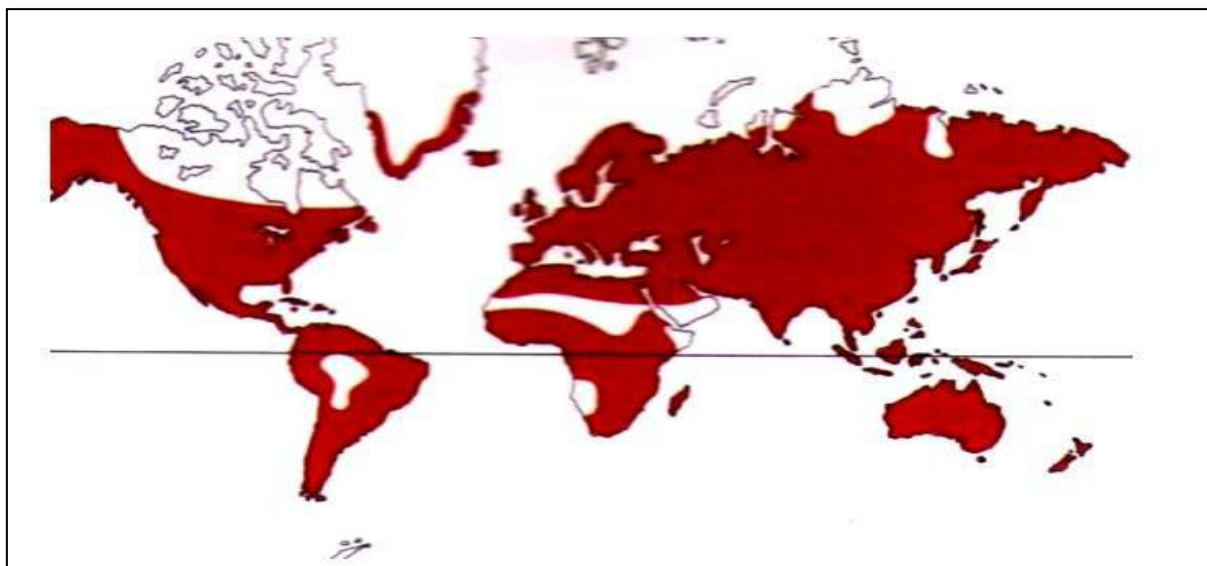


Figure 1 : Répartition géographique des *Apiaceae* dans le monde (couleur rouge = présence des *Apiaceae*) (Heywood, 1996).

1.1.2 - Composition chimique

L'ensemble des résultats de la littérature a montré que cette famille contient une grande variété de coumarines, de sesquiterpènes, de composés acétyléniques d'huiles essentielles, de flavonoïdes et de lactones sesquiterpéniques. Ces composés sont les principaux métabolites secondaires qui caractérisent les Apiacées (Bouderdara, 2013).

1.2- Le genre *Bunium* L.

1.2.1- Morphologie

Les plantes du genre *Bunium* sont des plantes distinguées par des rayons des ombelles et des ombellules très divergents s'épaississant à maturité pour devenir plus rigides, avec une tige de 1 à 5 cm, des feuilles à divisions linéaires et des fruits non reliés au sommet (Quezel et Santa, 1963).

1.2.2- Les espèces algériennes du genre *Bunium*

Le genre *Bunium* L. est représenté en Algérie par sept espèces qui sont (Quezel et Santa, 1963) :

- *Bunium incrassatum* ;
- *Bunium fontanesii* ;
- *Bunium chaberti* ;
- *Bunium elatum*;
- *Bunium crassifolium*;
- *Bunium macuca*;
- *Bunium alpinum*.

1.3- L'espèce *Bunium incrassatum*

1.3.1- Description botanique

Plante vivace, herbacée ayant des rayons des ombelles et des ombellules restant grêles, de 5 à 7 cm de large ; les fruits sont rétrécis au sommet à méricarpe contigus et sont 4 à 5 fois plus longs que larges ; les tiges sont grêles de 10 à 50 cm d'hauteur et les feuilles sont bipennatiséquées, à segments linéaires ou linéaires lancéolés (Quezel et Santa, 1963).

1.3.2- Classification

B. incrassatum est une plante médicinale largement distribuée dans l'est Algérien où elle est connue par son nom vernaculaire « Talghouda ». La classification de cette plante est comme suit (Quezel et Santa, 1963) :

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Dilleniidea

Ordre : Apiales

Famille : *Apiaceae*

Genre : *Bunium*

Espèce : *Bunium incrassatum*

1.3.3- Composition chimique

Une étude phytochimique sur la plante médicinale *B. incrassatum* a montré qu'elle comporte les composés suivants : saccharose, scopolétine, scoparone et β -sitostérol (Bousetla et al., 2011).

D'après (El kolli et al., 2017), qui ont réalisé une étude sur la composition chimique des huiles essentielles de la partie aérienne de *Bunium incrassatum*, 31 composés sont identifiés, dont les composants les plus abondants sont les terpènes et leurs dérivés, le l'acide palmétique, l'oxyde de caryophyllène, le β -eudesmol, le n-pentacosane, le 10-épi- α -muurolol, l'hedycaryol et le spathuléol (tableau I).

Tableau I : Composition chimique de *Bunium incrassatum* (Huiles essentielles)
(El kolli et al., 2017).

Composé	%	Composé	%
Thymol	0.65	Salvial-4(14)-en-1-one	2.4
Carvacrol	0.76	Carvone	0.71
β - <i>élémente</i>	0.28	Humulène époxyde-1	1.85
(E)caryophyllène	2.62	10-api- α -muurolol	4.36
(E)- β - <i>farnésène</i>	0.25	β -eudèsamol	13.95
α -humulène	0.31	Apiol	0.94
γ -muurolène	0.67	α -bisabolol	2.11
D-germacrène	0.55	Apritone	2.98
α - muurolène	0.27	Acide myristique	2.4
β -bisabolène	0.48	6,10,14-Trimethylpentadecan-2-one	1.61
β -sesquiphellandrène	0.65	Acide pentadécanoïque	1.8
1-endo-bourbonanol	2.43	Acide palmitique	18.39
β -calacorène	0.66	Acide linoléique	1.09
Hedycaryol	4.14	n-tricosane	1.35
<i>Spathulénol</i>	4.04	n-pentacosane	5.13
Oxyde de caryophyllène	17.36		

1.3.4- Intérêts thérapeutiques

Depuis longtemps, cette plante été utilisée dans l'alimentation et la médecine traditionnelle dans le monde grâce à ces racines très nutritives (utilisées en alimentation comme pommes de terre). D'autre part, les tubercules transformés en poudre sont utilisés comme anti-diarrhéique, astringent ou contre les hémorroïdes inflammatoires. En outre, ils sont utilisés pour traiter la bronchite et la toux. Selon les guérisseurs traditionnels, cette plante est également utilisée dans le but d'augmenter le poids, la sécrétion de lait de certains animaux de ferme et régler la sécrétion glandulaire surtout celle de la glande thyroïdienne (Jassbi et *al.*, 2005).

2 - Les radicaux libres et le stress oxydant

2.1 - Les radicaux libres

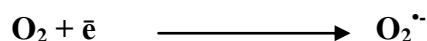
2.1.1- Définition

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, très réactives, caractérisés par une demi-vie très courte, contenant un ou plusieurs électrons célibataires (non appariés), ce qui entraîne une instabilité. Ce déséquilibre est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule (système redox) (Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Halliwell et Gutteridge, 1990 ; Halliwell, 1996).

2.1.2- Les principaux radicaux libres

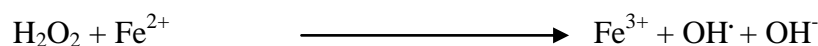
2.1.2.1- L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$)

Le radical le plus fréquemment produit dans l'organisme, Il est chargé négativement et généré par la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire, qui est réduit selon la réaction suivante (Hadi, 2004 ; Scheibmeir et *al.*, 2005 ; Lacolley et *al.*, 2007) :

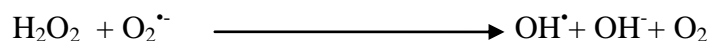


2.1.2.2- Le radical hydroxyle (OH^{\bullet})

L'oxydant le plus réactif et le plus puissant, il est produit à partir du H_2O_2 qui réagit avec des ions Fe^{2+} selon la réaction de Fenton (Marusawa et *al.*, 2002 ; Favier, 2003) :



L' H_2O_2 peut aussi réagir avec le radical superoxyde, selon la réaction d'Haber et Weiss (Sorge, 2004) :



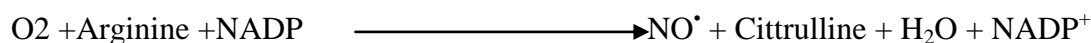
2.1.2.3- Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et L'oxygène singulet (1O_2)

Deux molécules qui ne sont pas des radicaux libres proprement dits (non radicalaires). L' H_2O_2 a la capacité de traverser les membranes des cellules et des organites cellulaires. Le 1O_2 est une forme excitée d'oxygène, hautement oxydative (Halliwell et Gutteridge, 1996 ; Wardman et Candeias, 1996 ; Hadi, 2004) :

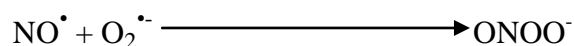


2.1.2.4- Le monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique est un radical libre ubiquitaire synthétisé par l'enzyme NOS à partir de l'arginine et l'oxygène moléculaire (Coleman, 2001):



De plus, le monoxyde d'azote forme avec l'anion superoxyde le peroxynitrite (ONOO⁻):



Ce dernier est moins réactif que son précurseur azoté, mais responsable de l'oxydation de nombreuses biomolécules (Rezaire, 2012).

2.1.3- Sources des radicaux libres

2.1.3.1- Origine endogène

A - Membranes mitochondriales

Les ROS sont produits en majorité au niveau des chaînes respiratoires mitochondriales des cellules des organismes aérobies ; environ 90% de l'oxygène consommé durant la respiration cellulaire est réduit en eau, tandis que 5% se transforme en ROS, plusieurs enzymes se trouvent au niveau des membranes mitochondriales qui sont responsables de cette transformation telles que la NADH déshydrogénase qui réduit l'O₂ en O₂^{•-} (Becker, 2004).

B - La xanthine oxydase

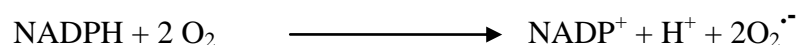
La xanthine oxydase qui produit l'O₂^{•-} par la réduction de l'hypoxanthine en xanthine et celle-ci en acide urique (Harison, 2002).

C - L'enzyme NOS (Nitric Oxide Synthase)

Cette enzyme produit le radical NO[•] qui va être oxydé et produit d'autres types de RNS (Coleman, 2001).

D - La NADPH oxydase

Elle utilise l'oxygène pour produire de l'O₂^{•-} selon la réaction suivante (Gutteridge, 1992 ; Piotrowski et Marczak, 2000) :



E - L'auto-oxydation de certaines petites molécules

Parmi ces molécules, on cite la dopamine, l'adrénaline, la flavine et l'hydroquinone ainsi que quelques groupements thiols, hémoprotéines, tetrahydroprotéines et quelques ions métalliques (Younes, 1999 ; Thannickal et Fandurg, 2000).

2.1.3.2- Origine exogène

Le déséquilibre peut être dû aux produits des radiations (rayons x et lumière UV), polluants de l'air (N, NO₂), solvants organiques, pesticides, drogues, xénobiotiques, l'alimentation, la fumée et certains médicaments (Halliwell et Gutteridge, 1989).

2.1.4- Rôles biologiques des radicaux libres

Les radicaux libres jouent des rôles essentiels dans le bon déroulement de la réaction immunitaire par l'activation de la NADPH oxydase, l'action des superoxydes dismutases (SOD) et la NO Synthase (NOS) qui aboutissent à l'O^{•-}, H₂O₂, HO[•] et autres radicaux libres. La présence de chlore donnera la naissance à l'acide hypochlorique HOCl, c'est l'oxydant microbicide le plus puissant dans la phagocytose des bactéries et des parasites par les macrophages ou les polynucléaires. Les radicaux libres peuvent aussi agir en tant que molécules de signal et intervenir dans la communication intracellulaire et intercellulaire et participent à l'expression de certains gènes et à leur régulation (Favier, 2003).

2.2- Le stress oxydant

2.2.1- Définition

Le stress oxydant est défini par Halliwell et Gutteridge (1989) comme, l'incapacité pour un organe ou des cellules de se défendre contre l'agression des radicaux libres. En cas physiologique il y a un équilibre parfait entre la production des ROS et les systèmes de défenses antioxydants ; le déséquilibre peut avoir diverses origines : déficit nutritionnel en antioxydants, surproduction endogène d'origine inflammatoire, exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants; soit d'une production exagérée d'agents oxydants ou d'une altération des mécanismes de défense (Favier, 1997 ; Morena et *al.*, 2002 ; Swain et *al.*, 2002).

2.2.2- Conséquences biochimiques du stress oxydant

2.2.2.1 - Oxydation de l'ADN

Les radicaux libres attaquent principalement la molécule d'ADN, entraînant des modifications comme : La conversion des résidus de la guanine en 8-hydroxy guanine, la conversion des résidus thymine en thymine glycol et 5-hydroxy méthyluracile et l'oxydation du désoxyribose qui entraîne une coupure des brins de la double hélice. Ces dénaturations

peuvent avoir de graves conséquences sur la réplication du génome causant ainsi la mutagenèse, la carcinogénèse et la mort cellulaire (Pasquier, 1995 ; Leverse et *al.*, 2001).

2.2.2.2 - Oxydation des protéines

Les radicaux libres peuvent attaquer la structure de certaines protéines, principalement les protéines contenant un groupement sulfhydryle (-SH), c'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées entraînant la formation des ponts entre protéines, ou encore ils peuvent être fragmentées ou dénaturées (Lacolley et *al.*, 2007).

2.2.2.3 - Peroxydation des lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle HO[•], qui est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué qui sera oxydé en radical peroxyde. Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne, car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (Esterbauer et *al.*, 1992).

2.2.3- Maladies liées au stress oxydant

Le stress oxydant sera la cause initiale essentielle de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale, syndrome de détresse pulmonaire aigu, oxydation des LDL, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré et inflammation. Il sera aussi l'un des facteurs potentialisant la genèse de maladies plurifactorielles telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Favier, 2003).

3- Les antioxydants

3.1- Définition

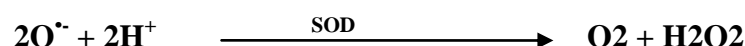
Les antioxydants sont des substances à concentrations relativement faibles, qui ont la capacité de piéger, retarder ou empêcher l'oxydation des radicaux libres. Les antioxydants au niveau du corps correspondent aux enzymes et acides antioxydants produits par l'organisme ainsi qu'aux antioxydants consommés par voie alimentaire (Droge, 2002 ; Charles et *al.*, 2005).

3.2- Les classes des antioxydants

3.2.1- Les antioxydants enzymatiques

3.2.1.1- La superoxyde dismutase (SOD)

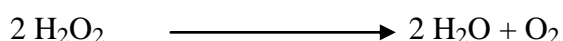
Métalloprotéine qui représente l'une des premières lignes de défense contre le stress oxydant en assurant l'élimination de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ par une réaction de dismutation en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante (Haleng et al., 2007) :



Chez l'Homme, trois isoformes de l'enzyme SOD qui diffèrent par leur structure et leur localisation cellulaire ont été caractérisées de façon biochimique et moléculaire : La Cu/Zn-SOD ou SOD1 cytosolique, la SOD2 et la ECSOD ou SOD3 extracellulaire (Afonso et al., 2007).

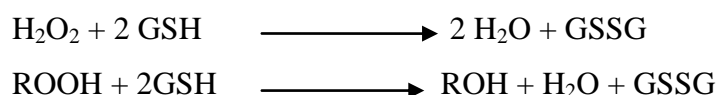
3.2.1.2- La catalase

Cette enzyme est responsable de la détoxification du peroxyde d'hydrogène produit dans les conditions physiologiques. Elle est localisée principalement dans les peroxysomes, mais aussi dans les mitochondries et le cytoplasme (Lindau et Shaffer, 1993 ; Niki et al., 2007).



3.2.1.3 - Glutathion peroxydase (GPX)

Enzyme tétramérique, elle se trouve au niveau des mitochondries et dans le cytosol ; elle peut réduire le peroxyde d'hydrogène en eau par les réactions suivantes (Ganther, 1999 ; Matés et al., 1999 ; Lacolley et al., 2007):



3.2.2- Les antioxydants non enzymatiques

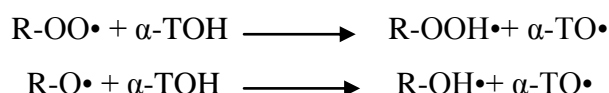
L'organisme possède une seconde ligne de défense « les piègeurs de radicaux libres » qui sont des composés pour la plupart apportés par l'alimentation et dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des ROS.

3.2.2.1- L'acide L-ascorbique

Appelé aussi la vitamine C, est un antioxydant hydrosoluble, qui se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; il peut piéger directement l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, le radical hydroxyle HO^{\bullet} , l'oxygène singulet et réduit le peroxyde d'hydrogène en eau via l'ascorbate peroxydase (Evans, 2000).

3.2.2.2- La vitamine E

Dite aussi α -tocophérol, elle fait partie de la famille des tocophérols, et décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes chez l'homme, située dans les lipoprotéines et dans les membranes. Elle est capable, d'une part, de piéger l'oxygène singulet en s'oxydant en quinone, et d'autre part, de réagir avec le radical hydroxyle (HO^{\bullet}), mais son principal rôle biologique est de réagir avec les radicaux peroxydes ROO^{\bullet} pour former un radical tocophéryle (Cuvelier et *al.*, 2003 ; Dellatre, 2005).



3.2.2.3- β carotène

Le β carotène appartient à la grande famille des caroténoïdes, constituée de plus de 600 pigments identifiés dans de nombreux fruits et légumes, il possède des propriétés antioxydantes par sa capacité à piéger les radicaux hydroxydes (HO^{\bullet}) et peroxydes (ROO^{\bullet}), inhiber les chaînes de peroxydations lipidiques et neutraliser également l'oxygène singulet (Beaudeau et Geneviève, 2011).

3.2.2.4- Sélénium

C'est un élément minéral essentiel contenu à l'état de traces dans l'organisme. Il joue un rôle de cofacteur enzymatique de la glutathion peroxydase (Roberfroid et *al.*, 2008).

4 - Les polyphénols

4.1- Définition et structure

Le groupe de métabolites secondaires le plus répandu du règne végétal ; plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues. L'élément structural fondamental qui caractérise ces composés est la présence d'au moins un noyau benzénique lié au moins à un groupe hydroxyle libre ou engagé avec une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (figure 2). Ce sont des pigments généralement responsables de la teinture des feuilles et les couleurs des fleurs et des fruits. Ils sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs et les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires des polyphénols sont les fruits, les légumes et les céréales (Martin et Andriantsitohaina, 2002 ; Bruneton, 2009).

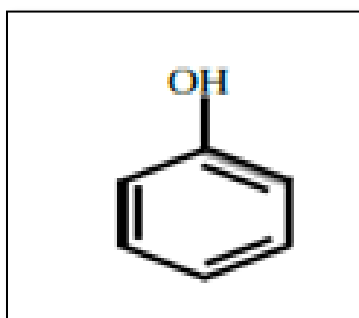


Figure 2 : Structure du noyau phénol (Sarni et *al.*, 2006).

4.2 - Classification des polyphénols

Les principaux groupes appartenant aux polyphénols sont les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins.

4.2.1 - Les acides phénoliques

Les principaux polyphénols alimentaires, présents dans tous les fruits et les légumes et représentent environ un tiers de la teneur totale de l'alimentation en polyphénols. Ils existent sous deux formes (Waston et *al.*, 2013) :

4.2.1.1- Les acides hydroxybenzoïques

Dérivés de l'acide benzoïque (figure 3), ont une formule de base de type (C6-C1). Sept acides benzoïques sont connus: acide p-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicylique et gentsique (Macheix et *al.*, 2005 ; Collin et Crouzet, 2011).

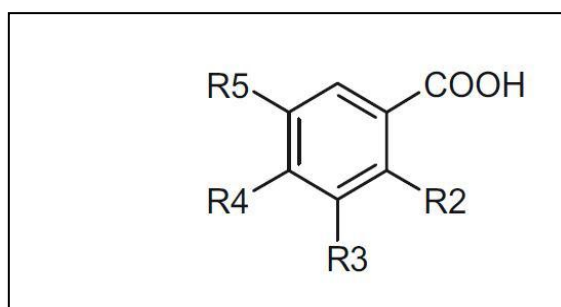


Figure 3 : Structure de l'acide benzoïque (Chira *et al.*, 2008).

4.2.1.2- Les acides hydroxycinnamiques

Représentent un groupe très important des polyphénols, dont la structure de base (C6-C3) dérive de celle de l'acide cinnamique (figure 4). Les molécules de base de la série hydroxycinnamique sont : l'acide p-coumarique, caféïque et férulique (Macheix *et al.*, 2005).

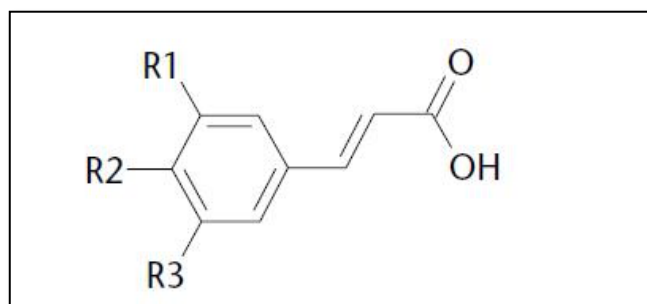


Figure 4 : Structure de l'acide hydroxycinnamique (Laguerre *et al.*, 2007).

4.2.2 - Les flavonoïdes

Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés chez les plantes ; la liste de ces derniers est en croissance continue. Ce sont des composés qui possèdent deux noyaux aromatiques et un hétérocycle central de type pyrane (squelette de base à quinze atomes de carbone), formant une structure C6-C3-C6 ; ils sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Les flavonoïdes interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes (Korkina *et al.*, 1997 ; De Souza *et al.*, 2004 ; D'Archivio *et al.*, 2007). Les principales classes des flavonoïdes sont : les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les isoflavones et les anthocyanes (figure 5).

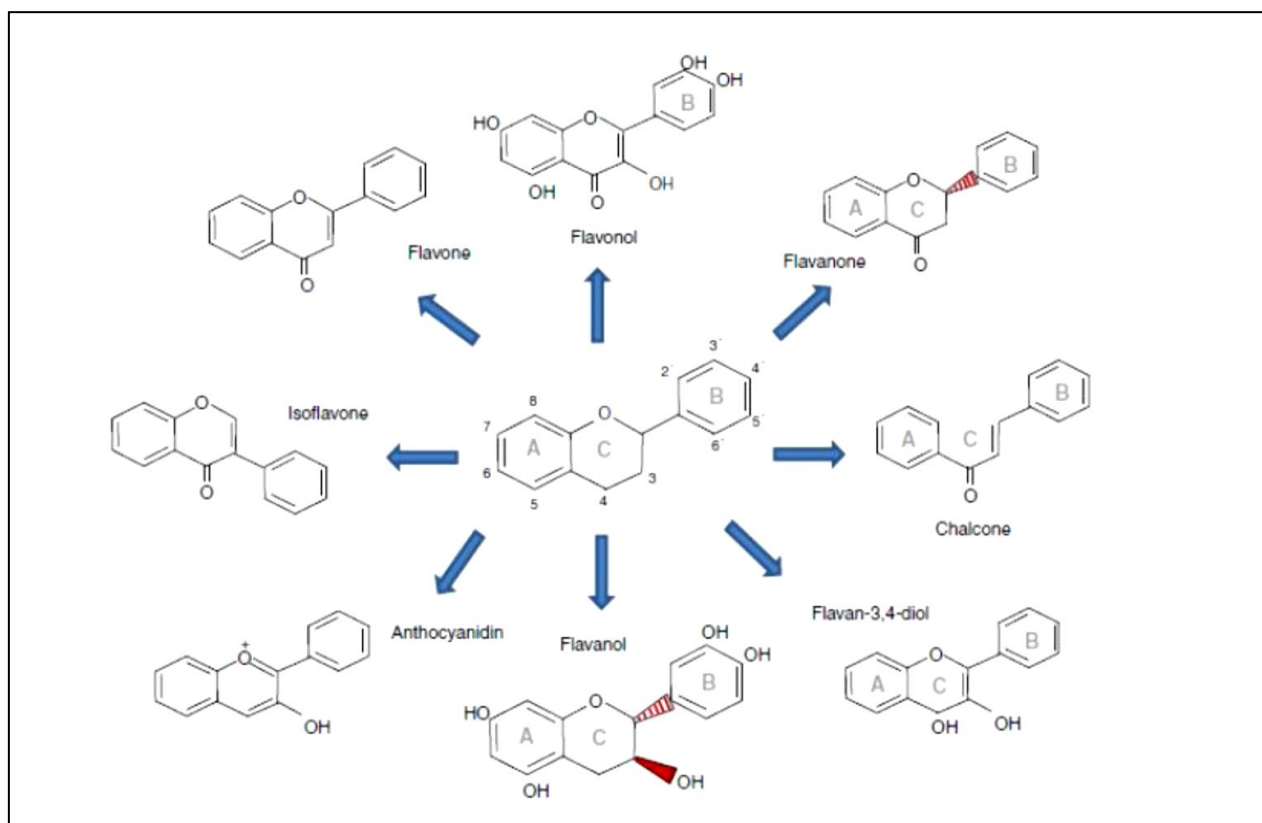


Figure 5 : Structures chimiques des principales familles des flavonoïdes
(Fraga et Oteiza, 2011).

4.2.3 -Les tannins

Le terme tannins provient d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour «tanner» les peaux d'animaux. Ce sont des composés polyphénoliques, hydrosolubles, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000, localisés dans les vacuoles ; il existe deux groupes de tannins qui diffèrent par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique (Hopkins, 2003).

4.2.3.1- Les tannins condensés

Sont également appelés proanthocyanidines, tannins vrais ou tannoïdes; résultent de la condensation de molécules élémentaires de type flavane-3-ol (catéchines) ou flavane 3-4 diols (entre les carbones C4 et C8 ou C4 et C6) tels que les leucoanthocyanidines, les liaisons formées sont de type carbone-carbone ce qui rend ces molécules difficilement hydrolysables (figure 6) (Hopkins, 2003).

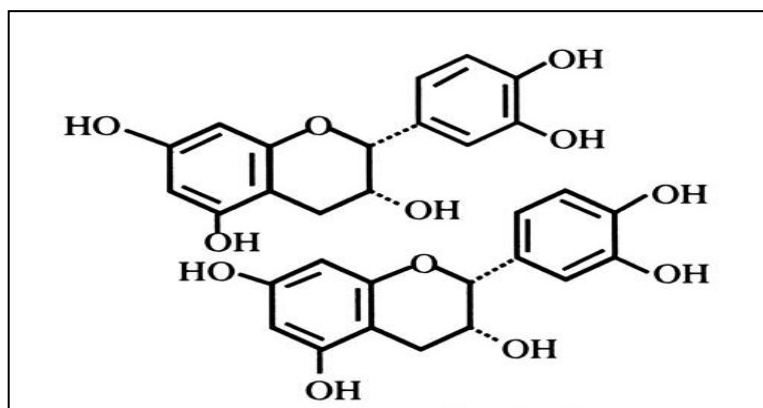


Figure 6 : Structure des tannins condensés (Cowan, 1999).

4.2.3.2- Les tannins hydrolysables

Appelés aussi acides tanniques, sont des polymères de l'acide gallique ou de son produit de condensation (acide ellagique) (figure 7) (Jarrige et *al.*, 1995).

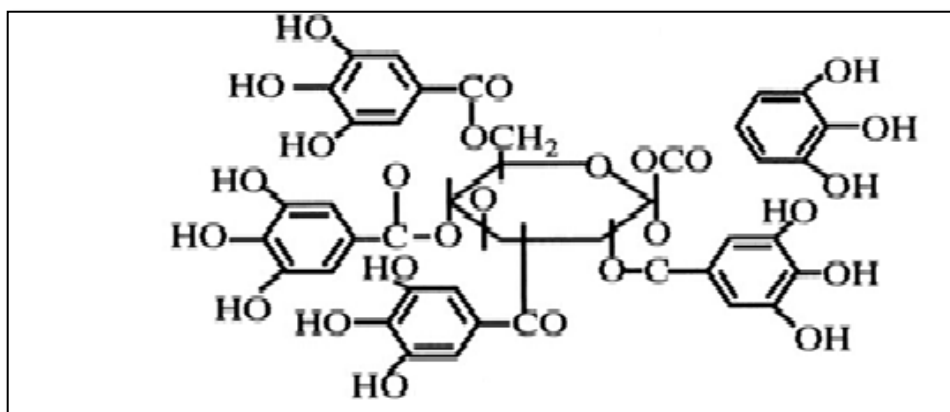


Figure 7 : Structure de tannins hydrolysables (Cowan, 1999).

4.4 - Activités biologiques des polyphénols

La consommation d'aliments riches en polyphénols réduit le développement de nombreuses pathologies, telles que le cancer, l'ischémie cardiaque, l'athérosclérose et l'hypertension. Cela peut-être expliqué par le fait que ces composés ont la capacité de modifier certains facteurs impliqués dans la genèse de ces maladies. Ces composés montrent des activités antioxydantes, antivirales, antibactériennes, antiallergiques, antiathérogènes, anti-inflammatoires, anti thrombotiques et vasodilatatrices (Martin et Andriantsitohaina, 2002 ; Babar et *al.*, 2007 ; Falleh et *al.*, 2008 ; Chew et *al.*, 2009).

Chapitre 2

Matériel et méthodes

1-Matériel

1.1- Matériel végétal

La plante *Bunium incrassatum* (figure 8) est récoltée la fin du mois de février 2018 dans un champ de culture près du lac de M'sila (barrage de Ksob). L'identification botanique a été confirmée après floraison de la plante (mois de Mai), par Pr. Laouar Hocine (Laboratoire de valorisation des ressources biologiques, université Ferhat Abbas-Sétif 1). Les tubercules sont récupérés, lavés, écaillés et coupés en couches fines pour être séchés à l'obscurité pendant 10 jours. Les tubercules sont ensuite broyés afin d'obtenir une poudre d'une couleur jaunâtre qui sera, ultérieurement, utilisée pour la préparation des extraits.



-A- (26/02/2018).



-B- (14/05/2018).

Figure 8: la plante *Bunium incrassatum*. A : Partie souterraine formée de racines blanches et d'un tubercule. Partie aérienne très courte, formée d'un petit amas de feuilles. B : Plante après floraison (partie aérienne étendue).

1.2- Produits chimiques

Tous les produits chimiques utilisés proviennent de Sigma, Fluka, Biochem et prolabo. Les solvants utilisés proviennent de Sigma-Aldrich, Honeywell et AnalaR NORMAPUR.

2- Méthodes

2.1- Méthodes d'extraction

Afin d'extraire les molécules actives de la plante *Bunium incrassatum*, on a utilisé quatre solvants de polarités différentes : l'eau distillée, le méthanol, l'acétone et l'hexane.

2.1.1- Préparation de l'extrait aqueux

Dans un flacon, 50 g du matériel végétal sont soumis à une macération par 500 ml d'eau distillée à 70°C durant une heure avec agitation. Le mélange est laissé durant deux jours à température ambiante et à l'abri de la lumière, avec agitation occasionnelle. La filtration du mélange est réalisée par du coton puis par du papier whatman. Le filtrat est ensuite soumis à une évaporation par un rotavapor (BÜchi) pour éliminer l'eau. L'extrait obtenu est séché à l'étuve et conservé dans des eppendorfs à 4°C jusqu'à utilisation (figure 9) (Gnanaprakash et al., 2010).

2.1.2- Préparation des extraits organiques

L'extraction est effectuée selon la méthode décrite par Siracusa et ses collaborateurs en 2011, avec quelques modifications.

50 g de la poudre du matériel végétal sont macérés dans 500 ml d'hexane pendant deux jours avec une agitation occasionnelle à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après filtration, le filtrat est soumis à une évaporation et l'extrait obtenu est ensuite séché à l'étuve et conservé dans des eppendorfs à 4°C jusqu'à utilisation. Les débris de la plante sont macérés à la suite dans 500ml d'acétone et ensuite par du méthanol en suivant la même méthode utilisée pour l'hexane (figure 10).

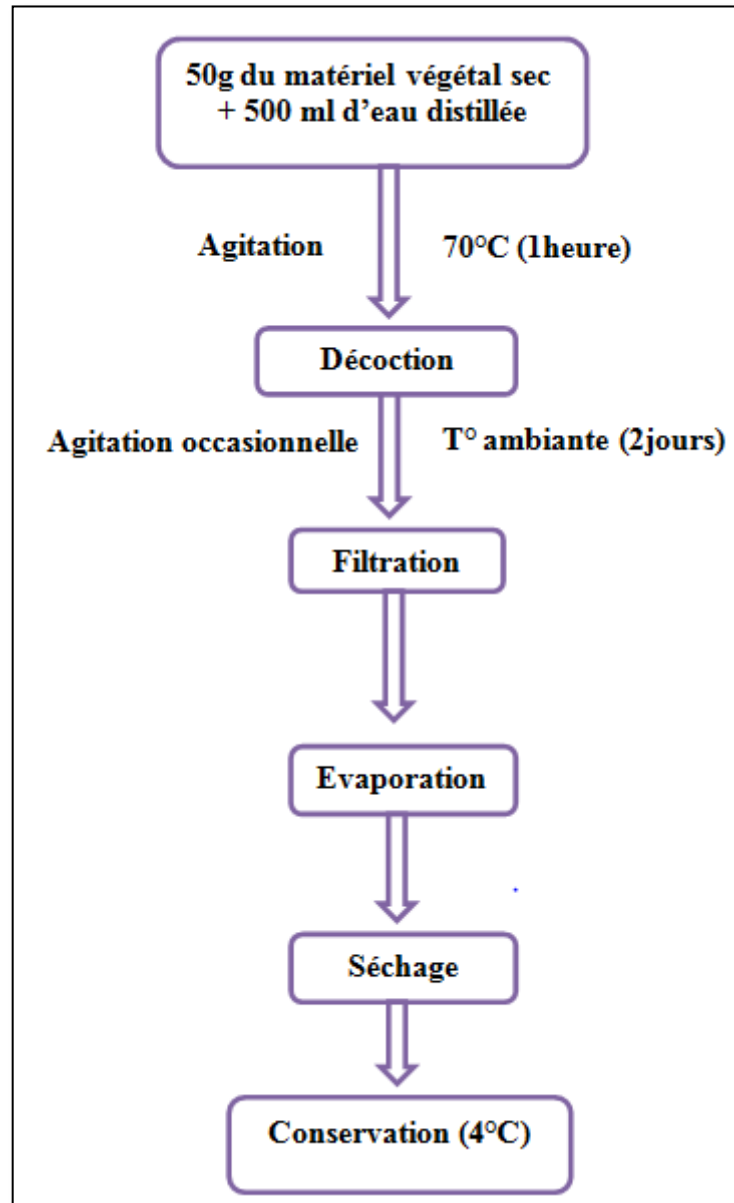


Figure 9 : Extraction aqueuse à partir des tubercules de *Bunium incrassatum* (Gnanaprakash *et al.*, 2010).

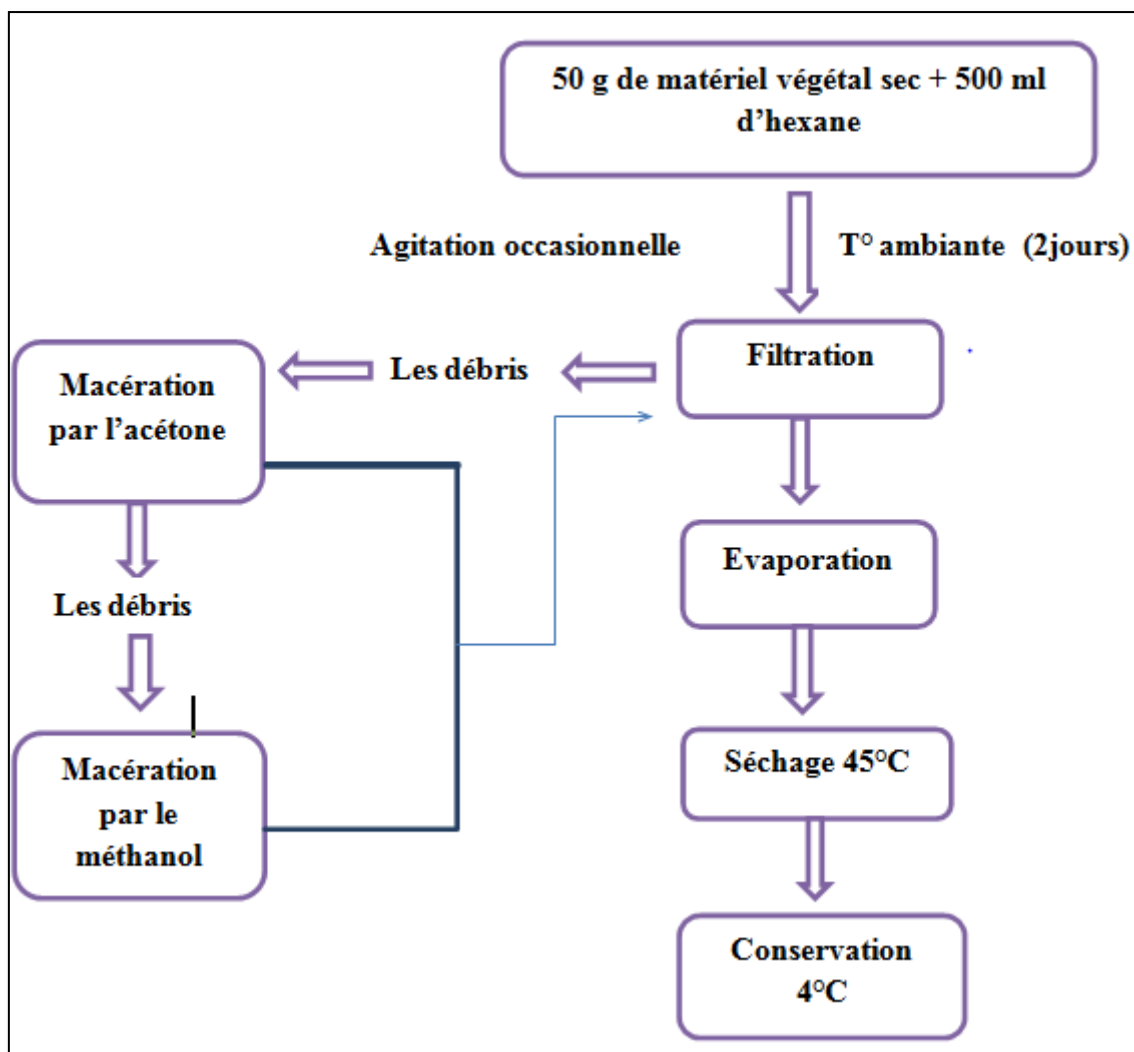


Figure 10 : Extraction organique à partir des tubercules de *Bunium incrassatum* (Siracusa et al., 2011).

2.2- Etude phytochimique

Pour investiguer la présence ou l'absence des principales familles des composés chimiques dans les extraits étudiés, on a utilisé des tests simples selon la méthode décrite par Sunil et ses collaborateurs (2012).

2.2.1 - Les flavonoïdes

On ajoute quelques gouttes d'hydroxyde de sodium (NaOH) dilué à 1 ml d'extrait de concentration 4 mg/ml. L'apparition d'une couleur jaune intense puis sa disparition à l'addition de quelques gouttes d'acide dilué indique la présence des flavonoïdes dans l'extrait.

2.2.2- Les tanins

Pour tester la présence des tannins, on met dans un tube à essai 1 ml d'extrait (concentration 4mg/ml) plus quelques gouttes de chlorure ferrique (FeCl_3) 0.1%. La présence des tannins est indiquée par la formation d'un précipité noir bleuâtre ou noir verdâtre.

2.2.3- Les quinones

Dans un tube à essai on met 500 μl d'extrait de concentration 4 mg/ml et 500 μl d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4). L'apparition d'une coloration rouge indique la présence de quinones.

2.2.4- Les terpénoïdes

1 ml de chaque extrait (4mg/ml) est mélangé avec 0.5 ml de chloroforme. Puis, 0,75 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) sont ajoutés doucement. La formation d'un anneau brun rougeâtre à l'interface indique la présence des terpénoïdes.

2.2.5- Les saponines

500 μl d'extrait (4mg/ml) sont dilués par 3 ml d'eau distillée et agités vigoureusement pendant 15 minutes. La formation d'une couche stable de mousse indique la présence des saponines.

2.3- Dosages de quelques métabolites secondaires

2.3.1- Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux est effectué par le test de Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007). Le réactif Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite dont l'absorption est maximale à environ 760-765 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

Brièvement, 1 ml de Folin-Ciocalteu (10 %) est ajouté à 200 μl de chaque extrait à une concentration de 2 mg/ml ou à 200 μl de DMSO utilisé pour dissoudre les extraits (blanc). Après avoir agité et incubé durant 4 min, on ajoute 800 μl de carbonate de Sodium (Na_2CO_3) à une concentration de 75 g/l, puis on incube durant 2 h à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance est ensuite mesurée à $\lambda = 765\text{nm}$ par un spectrophotomètre (Shimadzu UVmini-1240). La courbe d'étalonnage de l'acide gallique (dissout dans le

méthanol) est préparée par cinq concentrations différentes (10, 20, 40, 80 et 100 µg/ml) (figure 11). Les concentrations de polyphénols dans les extraits sont calculées et exprimées en µg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait sec (µg EAG/mg E).

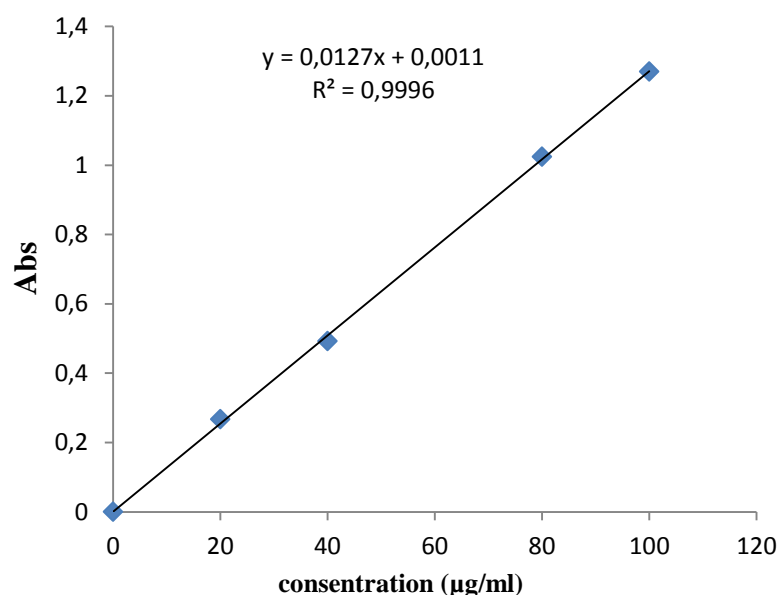


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.
 Chaque point représente la moyenne de trois répétitions.

2.3.2- Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est effectué par la méthode de trichlorure d'Aluminium ($AlCl_3$) (Bahorun et *al.*, 1996). En effet, les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5, qui est susceptible de donner avec le groupement CO un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium), ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons.

On ajoute 1ml d' $AlCl_3$ (2%) à 1 ml de chaque solution des extraits préparés à des concentrations différentes (2 et 4 mg/ml) et dissouts dans le DMSO. Après incubation à l'obscurité durant 10 min, l'absorbance est mesurée à $\lambda = 430$ nm. Le calcul de la concentration des flavonoïdes dans les extraits se fait à l'aide d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (dissoute dans le méthanol) à différentes concentrations (5, 10, 20 et 40 µg/ml) (figure 12), elle est exprimée en µg d'équivalent de la quercétine par mg d'extrait sec (µg EQ/mg E).

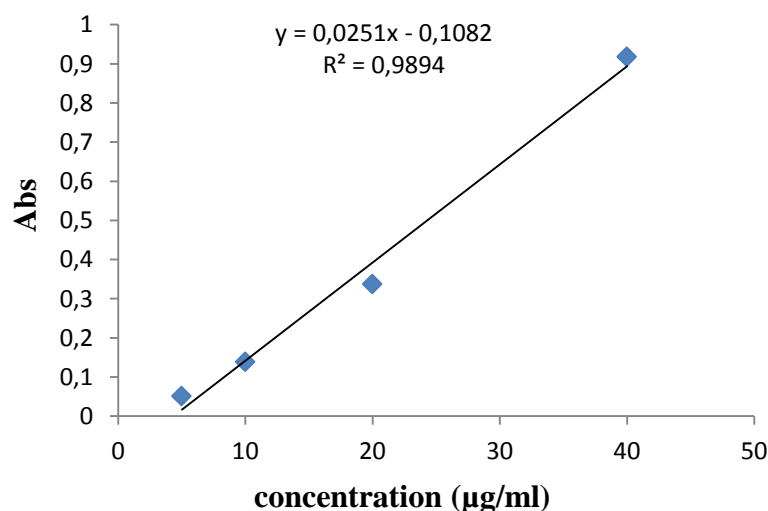


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Chaque point représente la moyenne de trois répétitions.

2.3.3- Détermination de la teneur totale en tannins

Le dosage des tannins est effectué selon la méthode décrite par Prasanth et ses collaborateurs en 2017. Le milieu réactionnel est préparé par l'addition de 350 µl de chaque extrait (3 mg/ml dans le DMSO) à 1.5 ml de Folin-Ciocalteu (10%). Après agitation, 1.5 ml de Na_2CO_3 (7.5%) sont ajoutés et le mélange est incubé pendant 45 min à 45°C. L'absorbance est déterminée à $\lambda = 765$ nm. L'acide tannique est utilisé comme standard à différentes concentrations (37.5, 75, 150, 300 µg/ml) (figure 13). Les teneurs en tannins totaux sont exprimées en µg d'équivalent d'acide tannique par mg d'extrait sec.

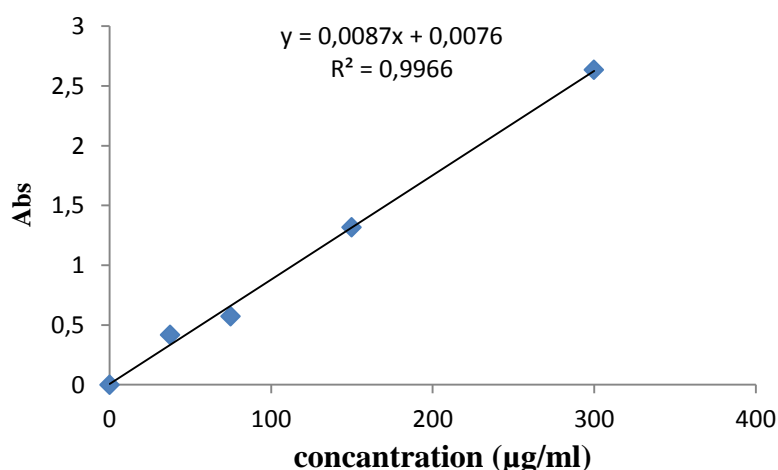


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique.

Chaque point représente la moyenne de trois répétitions.

2.4- Etude de l'activité antioxydante des extraits de la plante

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de la plante *Bunium incrassatum* est effectuée par trois tests différents : DPPH, FRAP et β carotène/acide linoléique.

2.4.1- Test de DPPH

Le test de DPPH (2,2' diphenylpicrylhydrazyl) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante. Ce test est réalisé suivant le protocole décrit par Brand Williams et ses collaborateurs (1995).

1250 μ l d'une solution méthanolique du DPPH (0.04mg/ml) sont ajoutés à 50 μ l de chaque extrait (à concentrations différentes) ou à 50 μ l de DMSO (témoin négatif). Après agitation, les tubes sont conservés à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 30 min et l'absorbance des solutions est mesurée à 517 nm. La quercétine (dissoute dans le méthanol) est utilisée comme témoin positif.

Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH est calculé par la formule suivante :

$$I\% = [(A_{\text{témoin}} - A_{\text{éch}}) / A_{\text{témoin}}] \times 100$$

I% : pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH.

$A_{\text{témoin}}$: Absorbance du témoin négatif.

$A_{\text{éch}}$: Absorbance de l'échantillon.

2.4.2 - Pouvoir réducteur de fer (FRAP ou Ferric Reducing Antioxidant Power)

L'activité antioxydante totale des extraits peut être estimée par l'évaluation du pouvoir antioxydant réducteur ferrique. Cette méthode est basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}). Ce test est effectué selon la méthode décrite par Maruthamuthu et Kandasamy (2016).

2.4.2.1- Préparation du tampon phosphate 0.2 M (pH 6.6)

On dissout 8 g de chlorure de sodium (NaCl), 0,2 g de chlorure de potassium (KCl), 1,44 g de disodium hydrogénophosphate (Na_2HPO_4), 0,24 g de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) dans 800 ml d'eau distillée. Ensuite, on ajuste le pH à 6,6 par l'acide chlorhydrique et on complète le volume jusqu'à 1 L par l'eau distillée.

2.4.2.2- Réalisation du test

Dans un tube à essai en verre contenant 500 µl de solution d'échantillon (les différents extraits) à différentes concentrations (1, 2, 4 et 6 mg /ml), on ajoute 1250 µl de tampon phosphate (pH 6,6) puis 1250 µl de potassium hexacyanoferrate [K₃Fe(CN)₆] (1%). L'ensemble est agité puis incubé à 50°C au bain marie pendant 20 minutes. Après refroidissement, un volume de 1250 µl d'acide trichloracétique (TCA à 10%) est ajouté et le mélange est centrifugé à 3000 tr/min pendant 10 minutes. 1250 µl de surnageant sont ensuite transférés dans un autre tube auquel on ajoute 1250 µl d'eau distillée et 250 µl de Chlorure ferrique (FeCl₃ à 0,1%) fraîchement préparé dans l'eau distillée ; l'ensemble est incubé pendant 10 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance est effectuée à 700 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par le DMSO. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés. Le contrôle positif utilisé est représenté par l'acide ascorbique préparé à différentes concentrations (5,10, 20, 40, 50 mg /ml). Chaque solution est répétée trois fois.

2.4.3- Test du β- carotène/acide linoléique

La capacité antioxydante des extraits est estimée par la mesure de l'inhibition des composés organiques volatils et les hydro-péroxydes conjugués diène résultant de l'oxydation de l'acide linoléique. Le test est réalisé selon la méthode décrite par Dapkevicius et ses collaborateurs (1998).

La préparation de la solution de β- carotène consiste à dissoudre 0.5 mg de β- carotène dans 1 ml de chloroforme, à laquelle on ajoute 25 µl d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation de chloroforme par Rotavapor (40°C), 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés avec agitation vigoureuse. A partir de la nouvelle solution, on met 2.5 ml dans des tubes à essai et on ajoute 350 µl de chaque extrait à une concentration de 3 mg/ml ou de l'hydroxytoluène butylé (BHT) utilisé à même concentration comme contrôle positif, ou encore de DMSO, eau distillée ou du méthanol utilisés comme des contrôles négatifs. Chaque solution est répétée trois fois.

L'absorbance des solutions est mesurée à 490 nm au temps « 0 » puis à différents intervalles de temps : 1h, 2h, 3h, 4h, 24h et 48h. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la relation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = (A_t / A_{t_0}) * 100$$

A_t: absorbance au temps (t).

A_{t₀}: absorbance initiale.

2.5- Etude statistique

Les courbes et les histogrammes sont tracés par Microsoft Excel 2010. Le logiciel utilisé pour l'étude statistique est GraphPad Prism 7.04. Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm écart-type (n=3) ; les valeurs d'IC50 (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentration)]. La signification statistique est déterminée par le test de Student et les différences sont considérées significatives au seuil de $p < 0.05$.

Chapitre 3

Résultats et discussion

1- Extraction :

Les quatre extraits (hexanique, acétonique, méthanolique et aqueux) sont obtenus à partir de la partie souterraine (tubercules) de la plante *B. incrassatum* en utilisant la technique de macération.

Les résultats indiquent qu'à partir de 50 g de la poudre macérés dans 500 ml de chaque solvant, on a eu des rendements d'extraction qui sont exprimés en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse initiale du matériel végétal. Les rendements obtenus sont représentés dans le tableau II.

Tableau II : Rendements des extractions aqueuse et organiques de *B. incrassatum*

Extrait	Rendement (%)
Hexane	11.28
Acétone	0.52
Méthanol	3.36
Aqueux	24.48

Puisque chaque solvant est capable d'extraire des composés phytochimique qui ne peuvent être obtenus probablement que par l'utilisation de celui-ci, on a utilisé quatre solvants de polarités différentes afin d'extraire le maximum de constituants chimiques de la plante (Fleurentin et *al.*, 1991).

L'extrait aqueux (préparé sous forme d'une décoction) a donné le rendement le plus élevé (24.48 %) par rapport aux autres extraits. Il est bien connu que le chauffage peut améliorer la solubilité de certains composés et donc augmenter le rendement de l'extraction. L'extrait aqueux est suivi par l'extrait d'hexane dont le rendement est égale à 11.28 %, puis l'extrait méthanolique (3.36%) et enfin l'extrait acétonique qui a montré le rendement le plus faible (0.52%).

Le rendement de l'extraction dépend de plusieurs facteurs à savoir la méthode d'extraction, la durée de macération du matériel végétal dans le solvant, la température, le solvant utilisé et la nature chimique de l'échantillon (Su et *al.*, 2006).

Les solvants polaires sont fréquemment utilisés pour la récupération des polyphénols à partir d'une matrice végétale. Les extraits aqueux sont connus pour être riches en phénols polaires et en flavonoïdes hautement polaires (flavonoïdes di, tri et tétraglycosylés). L'acétone est également un solvant fréquemment utilisé dans l'extraction des plantes pour préparer les

extraits riches en flavonoïdes, tandis que l'hexane peut généralement extraire les lipides et les flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés (Boussoualim, 2014).

2- Etude phytochimique

Les résultats des divers tests phytochimique effectués sur les extraits sont reportés dans le tableau III.

Tableau III : Analyse phytochimique des différents extraits de *Bunium incrassatum*.

Extrait	Hexane	Acétone	Méthanol	Aqueux
flavonoïdes	+	+	+	+
Saponines	-	-	-	-
Tannins	+	+	+	+
Terpénoïdes	+	+	+	-
quinones	+	+	+	+

(+) : présence, (-) : absence.

Selon les résultats montrés dans le tableau 4, les flavonoïdes, les tannins et les quinones sont présents dans tous les extraits étudiés, alors que les terpénoïdes sont absents seulement dans l'extrait aqueux. Les saponines sont absents dans les quatre extraits.

Les tests utilisés dans l'étude phytochimique préliminaire sont des méthodes simples qui donnent une idée générale sur les différents groupes de composés contenus dans chaque fraction de la plante. Les flavonoïdes et les tannins appartiennent au groupe des polyphénols qui sont les métabolites secondaires les plus abondants dans les plantes. Les quinones, connus pour leur activité antimicrobienne, possèdent des cycles aromatiques avec deux substituant cétones et les terpénoïdes sont des précurseurs pour la synthèse des stéroïdes dans les plantes (Tiwari *et al.*, 2011).

3- Dosage des composés phénoliques de la plante

Dans le but de caractériser les extraits préparés, un dosage des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins totaux a été effectué. Les résultats sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV : Dosage des polyphénols, flavonoïdes et tannins totaux des extraits de *Bunium incrassatum*.

Extrait	Teneur en polyphénols ($\mu\text{g EAG/mg E}$)	Teneur en flavonoïdes ($\mu\text{g EQ/mg E}$)	Teneur en tannins ($\mu\text{g EAT/mg E}$)
Aqueux	6,925 \pm 0,004	6,919 \pm 0,014	4,721 \pm 0,002
Méthanol	13,007 \pm 0,091	16,328 \pm 0,052	17,237 \pm 0,017
Acétone	47,102 \pm 0,048	27,601 \pm 0,024	22,505 \pm 0,015
Hexane	5,685 \pm 0,003	32,842 \pm 0,015	32,065 \pm 0,026

EAG : équivalent d'acide gallique, EQ : équivalent de quercétine, EAT: équivalent d'acide tannique ; E : extrait.

Selon le tableau, l'extrait acétonique est le plus riche en polyphénols par rapport aux autres extraits (47,102 $\mu\text{g EAG/mg E}$), suivi par l'extrait méthanolique (13,007 $\mu\text{g EAG/mg E}$), tandis que l'extrait aqueux et d'hexane sont les plus pauvres en polyphénols avec des teneurs proches (6,925 et 5,685 $\mu\text{g EAG/mg E}$, respectivement). D'après une étude réalisée par El Kolli et ses collaborateurs en 2017, la teneur totale en composés phénoliques dans l'extrait méthanolique préparé à partir de la partie aérienne de la plante est de 236,6 $\mu\text{g EQ / mg E}$.

Pour les flavonoïdes, la teneur est inversement proportionnelle à la polarité des extraits ; l'extrait d'hexane contient la quantité la plus importante des flavonoïdes (32,842 $\mu\text{g EQ/mg E}$), suivi par l'extrait d'acétone (27,601 $\mu\text{g EQ/mg E}$), puis l'extrait de méthanol (16,328 $\mu\text{g EQ/mg E}$) et enfin l'extrait aqueux (6,919 $\mu\text{g EQ/mg E}$).

La quantification des tanins dans les extraits a révélé que les quantités les plus élevées sont trouvées dans les fractions d'hexane et d'acétone (32.065 et 22.505 $\mu\text{g EAT/mg E}$, respectivement), suivis de l'extrait méthanolique avec une concentration de 17.237 $\mu\text{g EAT/mg E}$ et de l'extrait aqueux avec une concentration de 4.721 $\mu\text{g EAT/mg E}$. De même, dans ce dosage, les teneurs trouvées sont inversement proportionnelles à la polarité des extraits.

4 - Activité antioxydante des extraits aqueux et organiques

L'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits de *B. incrassatum* a été réalisée par trois tests *in vitro* : le test au DPPH, la méthode de FRAP et le test de blanchissement de β -carotène.

4.1- Piégeage du radical DPPH

Le DPPH se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. La présence de ces radicaux (DPPH•) donne lieu à une coloration violette foncée de la solution. La réduction des radicaux DPPH• par un agent antioxydant (en 2,2 diphenylpicrylhydrazine) entraîne une décoloration de la solution en couleur jaune. Le changement de couleur peut être suivie par spectrophotométrie à 517 nm et de cette façon le potentiel antioxydant d'une substance ou un extrait de plante peut être déterminé (Popovici et al, 2010 ; Molyneux, 2004).

L'inhibition du radical DPPH est exprimée en IC_{50} ; ce paramètre est défini comme étant la concentration efficace de l'extrait capable de piéger 50% des radicaux DPPH dans le mélange réactionnel, plus la valeur d' IC_{50} est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (Hebi et Eddouks, 2016). L'histogramme ci-dessous (figure 14) représente les valeurs de IC_{50} pour les extraits étudiés et pour la quercétine (contrôle positif).

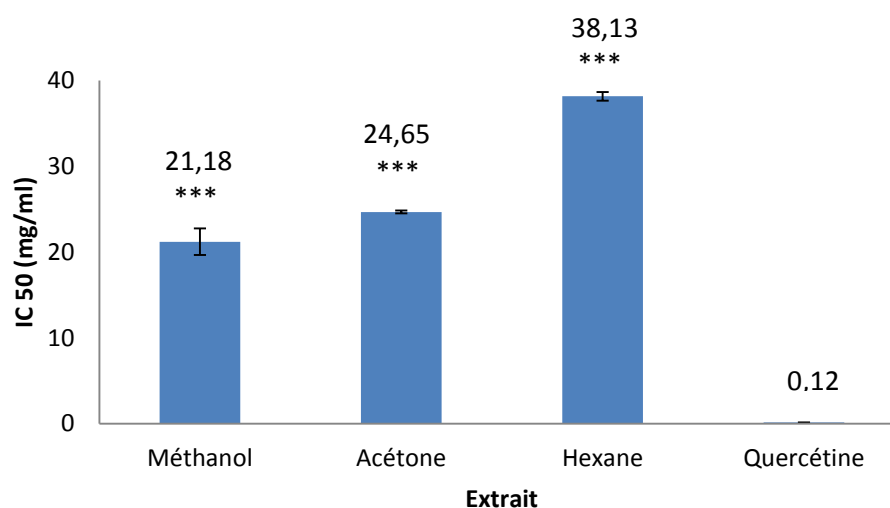


Figure 14 : Représentation de l'inhibition du radical DPPH par l'estimation des valeurs de l' IC_{50} des extraits de *Bunium incrassatum* et de la quercétine.

($p < 0.001$)***. Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions \pm écart type ($M \pm SD$).

D'après les résultats obtenus, le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente parallèlement à l'augmentation de la concentration soit pour la quercétine ou pour les différents extraits de la plante. Les quatre extraits possèdent une activité de piégeage très faible contre le radical DPPH avec des valeurs élevées d'IC₅₀ allant de 21,114 jusqu'à 38,125 mg/ml, cependant, l'extrait aqueux n'a montré aucune activité anti radicalaire même pour la plus grande concentration utilisée (21 mg/ml). L'IC₅₀ obtenue pour le standard est de 125,142 µg/ml, est nettement inférieure à ceux des extraits, il possède donc l'activité la plus importante.

A travers la recherche bibliographique, de très grandes différences de points de vue sont notées à propos de la corrélation entre les polyphénols et l'activité antioxydante. Certains travaux ont montré une bonne corrélation entre les IC₅₀ et la teneur en polyphénols et en flavonoïdes, au contraire, d'autre études n'ont pas établie cette corrélation (Athamena *et al.*, 2010 ; Mariod *et al.*, 2010).

D'après l'étude réalisée par El Kolli et ses collaborateurs en 2017, l'extrait méthanolique préparé de la partie aérienne de *Bunium incrassatum* a donné une IC₅₀ égale à 55,77 µg/ml dans le test au DPPH.

Les polyphénols sont caractérisés par un nombre élevé des groupements hydroxyles qui présentent l'activité antioxydante la plus élevée, due à leur pouvoir de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres. Ainsi, l'effet antioxydant n'est pas seulement dose-dépendant mais également structure-dépendant (Heim *et al.*, 2002 ; Torres de pinedo *et al.*, 2007 ; Rodriguez-Bernaldo *et al.*,2010).

4.2- Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

L'activité antioxydante des extraits aqueux et organiques de la plante a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Les résultats sont résumés dans les figures 15 et 16.

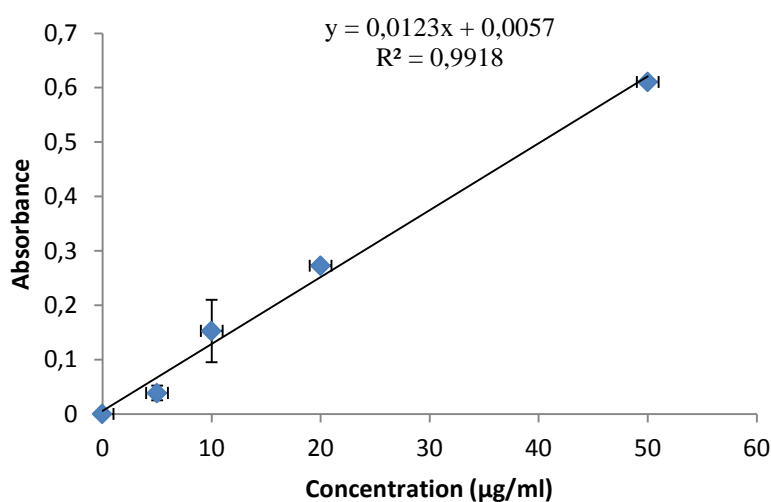


Figure 15 : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique.

Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions \pm écart type ($M \pm SD$).

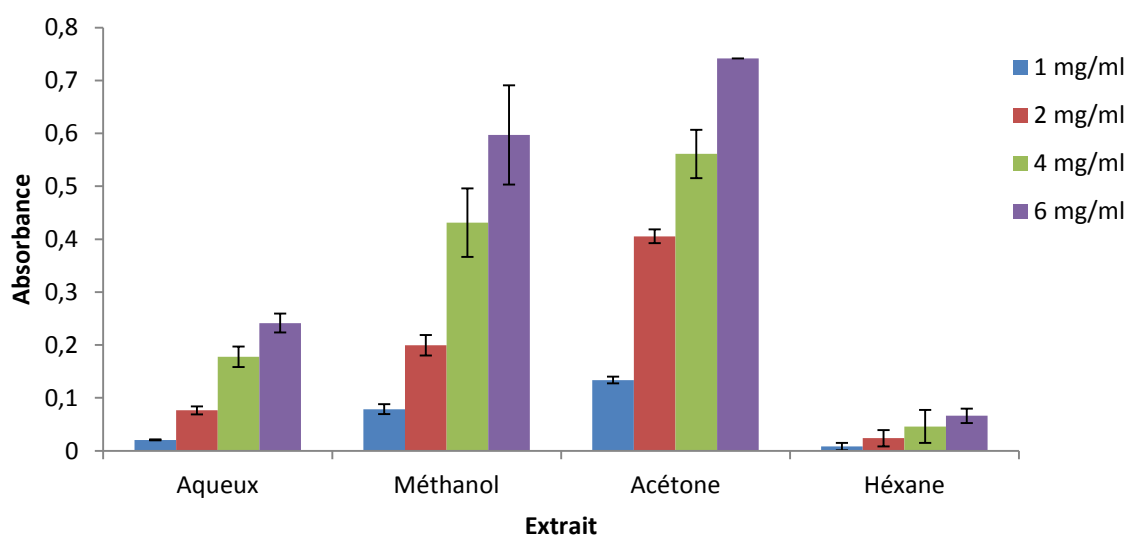


Figure 16 : Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Bunium incrassatum* par la méthode FRAP.

Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions \pm écart type ($M \pm SD$).

Ce test est un essai simple, rapide et reproductible qui permet le transfert de la couleur jaune à la couleur vert pâle et bleue en fonction de la concentration d'antioxydants dans les échantillons ; la présence des réducteurs (AH) dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} / complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, le Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu cyanée

dans le milieu réactionnel à 700 nm (Chung *et al*, 2002 ; Bougandoura et Bendimerad, 2012 ; Bentabet *et al*, 2014).

A partir des résultats obtenus, on remarque que le pouvoir réducteur des extraits de la plante est dose-dépendant, c'est-à-dire que la capacité de réduction de fer est proportionnelle à la concentration des extraits et du standard utilisé (augmentation de l'absorbance).

La capacité des extraits à réduire le fer est largement inférieure à celle de l'acide ascorbique dont la valeur de l'absorbance est de 0.61 pour la concentration 50 µg/ml. Parmi les extraits étudiés, l'extrait acétonique a montré la meilleure capacité réductrice ($A = 0.74$) par rapport aux autres extraits pour la même concentration (6mg/ml), suivi de l'extrait méhanolique ($A = 0.59$), puis l'extrait aqueux ($A = 0.24$) et enfin l'extrait d'hexane qui a eu la plus faible capacité réductrice ($A = 0.06$).

Le pouvoir réducteur des extraits dans cette étude est proportionnel à leur contenu en polyphénols. Il est probablement dû à la présence de groupements hydroxyles dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électrons (Bougandoura et Bendimerad, 2012). L'interaction des polyphénols avec les métaux de transition joue un rôle important dans les propriétés antioxydantes, surtout pour les flavonoïdes qui ont en point de vue structural plusieurs sites potentiels de complexation métallique (Achat, 2013) :

- Les 5-hydroxyflavones peuvent chélater les ions métalliques grâce au groupement 5-hydroxy-4-oxo pour donner un chélate à six centres.
- Les 3-hydroxyflavones forment avec les ions métalliques un complexe à cinq centres grâce au groupement 3-hydroxy-4-oxo.
- Les 3',4'-dihydroxyflavones chélatent les ions métalliques par l'intermédiaire de leur groupement *ortho*-dihydroxybenzène (catéchol) présent sur le cycle B.

4.3- Test de β -carotène/acide linoléique

La technique de blanchissement du β -carotène a été utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des quatre extraits par l'inhibition de la peroxydation lipidique en suivant l'absorbance au cours du temps. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport à l'absorbance initiale (figure 17).

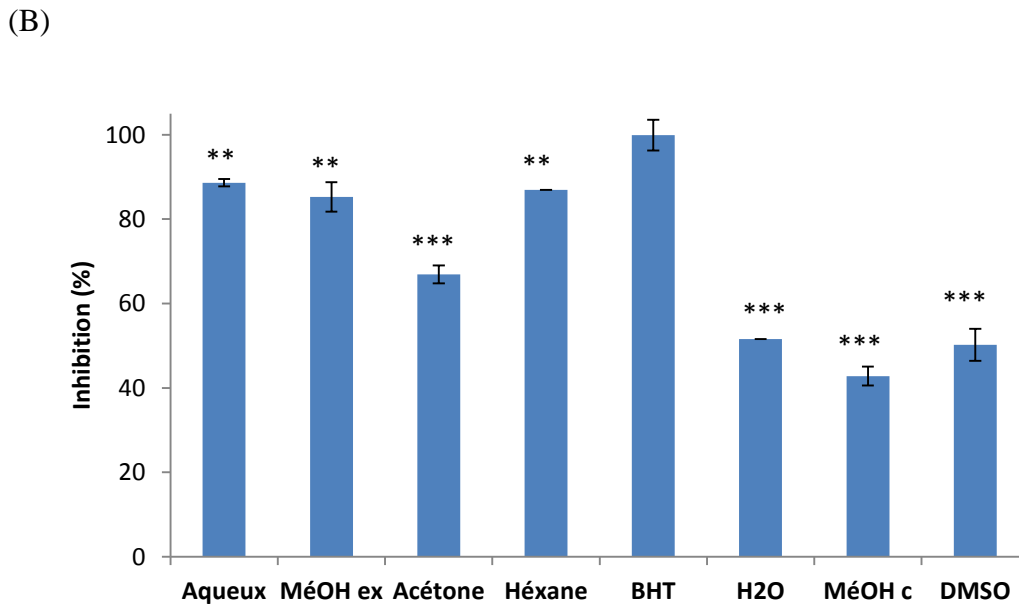
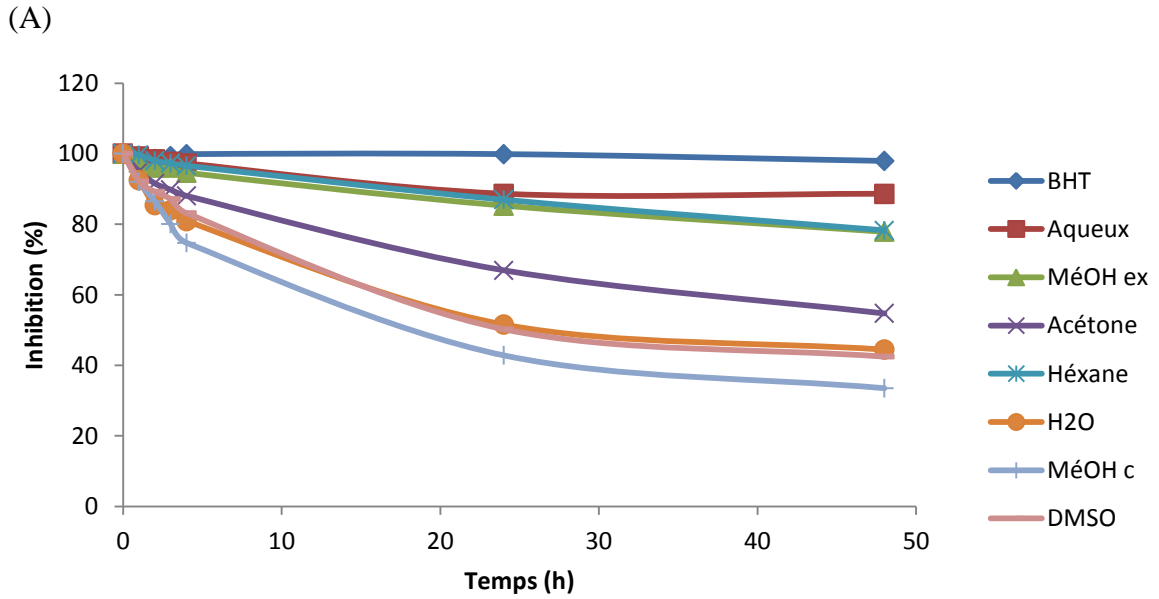


Figure 17 : (A). Activité antioxydante des extraits aqueux et organiques de *Bunium incrassatum* par rapport aux témoins (BHT, méthanol, eau distillée et DMSO) par le test du β -carotène/acide linoléique durant 48h. (B). Pourcentages d'inhibition des extraits aqueux et organiques et des témoins (BHT, méthanol, eau distillée et DMSO) par le test du β -carotène/acide linoléique après 24h. (H₂O : Eau distillée, MéOH c : control méthanol).

($p < 0.01$)**, ($p < 0.001$)***. Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions \pm écart type (M \pm SD).

L'oxydation de l'acide linoléique produit des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur orange, qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation du β carotène, la diminution de l'absorbance est due à l'oxydation du β -carotène et l'acide linoléique ; l'ajout de substance antioxydante joue un rôle protecteur et empêche ou ralentit cette oxydation (Manallah, 2012).

D'après les résultats, on observe que dans les milieux réactionnels des blancs (méthanol, eau distillée et DMSO), les pourcentages d'inhibitions diminuent rapidement au cours du temps, alors qu'en présence des extraits et du BHT la diminution est ralentie.

Après 24 h d'incubation, l'activité antioxydante (inhibition%) la plus élevée est présentée par l'extrait aqueux (88,63%) qui est la plus proche de celle du BHT ; ce dernier a montré la plus forte activité antioxydante (99,88%). L'extrait d'hexane et de méthanol ont donné des pourcentages d'inhibition proches (86,95% et 85,27 %, respectivement), tandis que l'extrait d'acétone a montré l'activité la plus faible par rapport aux autres extraits (66,93%).

A la lumière de ces résultats, les extraits de la plante ont un effet inhibiteur significatif contre la peroxydation lipidique surtout pour l'extrait aqueux. Selon Haddadi (2005), plusieurs facteurs semblent moduler les résultats d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique à savoir la nature liposoluble ou hydrosoluble des antioxydants mais aussi leur concentration. Des études récentes ont mis en évidence que la polarité et l'hydrophobicité des agents antioxydants sont deux facteurs importants dans les systèmes de biomembranes, c'est la raison par laquelle beaucoup de chercheurs de l'activité antioxydante choisissent le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplés à celle du β - carotène comme modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (Ferreria et *al.*,2006 ; Gachkar et *al.*, 2007 ; Terpinc, et *al.*,2009).

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales continuent toujours d'être la provenance idéale des principes actifs, ce qui explique leur exploitation accrue en industrie pharmaceutique. Les polyphénols sont les composés végétaux les plus intéressants et les plus étudiés de nos jours.

Bunium incrassatum est une plante médicinale de la famille des Apiacées, espèce intéressante car peu étudiée. L'étude phytochimique de cette plante a montré la présence des flavonoïdes, tannins et quinones dans tous les extraits préparés à partir des tubercules de la plante, tandis que les terpénoïdes sont trouvés dans tous les extraits à l'exception de l'extrait aqueux. L'évaluation quantitative des polyphénols totaux par la méthode de Folin-ciocalteu a révélé la présence de la quantité la plus élevée de ces métabolites dans l'extrait acétonique, cependant, l'extrait d'hexane a montré la teneur la plus élevée en flavonoïdes et en tannins.

L'évaluation de l'activité antioxydante a montré que les extraits de la plante possèdent une faible activité de piégeage contre les radicaux DPPH. La meilleure capacité réductrice de fer est présentée par l'extrait acétonique, en effet, cette activité a été proportionnelle au contenu des extraits en polyphénols totaux. Le pouvoir antioxydant évalué par le test de β -carotène/acide linoléique a montré que l'extrait aqueux avait le pourcentage d'inhibition le plus important.

Comme perspectives, on propose d'autres études complémentaires pour identifier les composés phytochimique, précisément les molécules impliquées dans l'effet antioxydant et évaluer les autres activités biologiques probables de cette plante.

Références

A

- **Achat S., 2013** : Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques 150.
- **Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P. & Lomri A., 2007** : Radicaux libre dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases 74, 636 – 643.
- **Athamena S., Chalghem I., Kassah-Laouar A., Laroui S. & Khebri S., 2010** : Activite antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *cuminum cyminum* L. *Lebanese science journal* 11 (1), 69 – 81.

B

- **Babar, M. A., Hahn, E. J., & Paek, K. Y., 2007** : Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in panax ginseng bioreactor root suspension cultures. *Molecules*, 12, 607 – 621.
- **Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luycky M. & Gazin M., 1996** : Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation 31, 1-6.
- **Beaudeau J. L. & Geneviève D., 2011** : Biochimie médicale : Marqueurs actuels et perspectives. 2ème édition. Edition *Lavoisier Chantal Arpino*, p 130, 131.
- **Becker L.B., 2004** : New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology 61, 461-470.
- **Bentabet N., Boucherit-Otmani Z. & Boucherit K., 2014** : Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de béchar en algérie. *Phytothérapie* 12, 364 – 371.
- **Bouderdara N., 2013** : Séparation et détermination de structures des métabolites secondaires de *Cachrys libanotis* L 9- 26.
- **Boudjemaa, N., Ben Guegua, H., 2010**: L'effet antibactérien de *Nigella Sativa*. Mémoire de fin d'études. Université de Ouargla. p. 2.
- **Bougandoura N. & Bendimerad, N., 2012** : Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp* 9, 14 – 19.
- **Bousetla H. & Zellagui A., 2011** : Chemical constituents of the roots of Algerian *Bunium incrassatum* and evaluation of its antimicrobial activity.
- **Boussoualim N., 2014** : Activités biologiques de plantes médicinales: *Anchusa azurea* L. et *Globularia alypum* L, 50.
- **Brand-Williams W., Cuvelier M. & Berset C., 1995** : Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss-Technol* 28, 25–30.
- **Bruneton J., 2009** : Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales.

C

- **Calixto J. B., 2005** : Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 131 – 134.

- **Charles M., Benbrook Ph.D. & Janvier, 2005 :** Accroître la teneur en antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques.
- **Chew, M. H., Xu, G. G., Ho, P. W., & lee, C. W., 2009 :** A propos d'un cas de syndrome compartimental glutéale après traitement chirurgical d'un anévrisme de l'aorte abdominale. *Annles de chirurgie vasculaire*, **23** (4), 17 – 21.
- **Chira K., Suh j. H., Saucier C., & Teissédre P. L., 2008 :** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie* **6**, 75 – 82.
- **Chung Y. C., Chang C. T., Chao W. W., Lin C. F. & Chou S. T., 2002 :** Antioxydative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **50**, 2454 – 2458.
- **Coleman J.W., 2001 :** Nitric oxide in immunity and inflammation **1**, 1397-1406.
- **Collin S. & Crouzet J., 2011 :** Polyphénols et procédés. *Edition Lavoisier TEC & DOC* **5**, 13 , 16 , 235.
- **Constance L., 1971 :** History of the classification of Umbelliferae (Apiaceae). *The biology and chemistry ofthe Umbelliferae* 1–8.
- **Cowan M. M., 1999 :** Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* **12** (4), 564 – 582.
- **Cuvelier C., Dotreppe O. & Istasse L., 2003 :** Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E, **147**, 315 – 324.

D

- **Dapkevicius A., Venskutonis R., Van Beek T.A. & Linssen P.H., 1998 :** Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J Sci. Food. Agr* **77**, 140–146.
- **D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., & Masella R., 2007 :** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super Sanità* **43** (4), 348 –361.
- **Delattre J., Beaudeau J. L. & Bonnefont-Rousselot : 2005 :** Radicaux libres et stress oxydant:aspects biologiques et pathologiques **14**, 93 , 94.
- **De Souza R.f., W.F., De Giovani., 2004 :** Antioxidant Properties of Complexes of Flavonoïds with metal ions. *Redox Report.* **9**(2): 97-104.
- **Droge W., 2002 :** Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Cellular Physiol Rev* **82**, 47-95.

E

- **El kolli H., laouer H & el kolli M., 2017 :** chemical composition and biological activities of the essential oils and the methanolic extracts of *bunium incrassatum* and *bunium alpinum* from algeria. *Journal of the Chilean Chemical Society* **62**, 3335-3341.
- **Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H. & Jurgens G., 1992 :** The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical. Biology & Medicine* **13**, 341 – 390.
- **Evans W. J., 2000 :** Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr* **72**, 647S– 652S.

F

- **Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Bouraoui N. K., Trabelsi N., Boulaaba M. & Abdelly C., 2008** : Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies* **331**, 372 – 379.
- **Favier A., 1997** : Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur **55**(1).
- **Favier A., 2003** : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique* 108 – 115.
- **Ferreria A., Proenca C., Serralheiro L.M.L., Aranjo M.E.M., 2006** : The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology* **108** : 31-37.
- **Fleurentin J., Cabalion P., Mazars G., Dos Santos J. & Younos C., 1991** : Ethnopharmacologie: Sources, Méthodes et Objectifs 201.
- **Fraga, C. J., & Oteiza, P. I., 2011** : Dietary flavonoides : Role of (-) – epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, **51**, 813 – 823.

G

- **Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A., Rasooli I., 2007** : Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosemarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry* **102** : 898-904.
- **Ganther H.E., 1999** : Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* **20**, 1657-1666.
- **Gnanaprakash K., Madhusudhana Chetty C., Ramkanth S., alagusundaram M., Tiruvengadarajan V.S., Angala Parameswari S. & Mohamed Saleem T.S., 2010** : Aqueous extract of *Flacourtia indica* prevents Carbon Tetrachloride induced hepatotoxicity in rat. *International Journal of Biological and Life Sciences* **6** (1), 51-55.
- **Goeb Ph., 1999** : Aromathérapie pratique et familiale. Ed, MDB. p. 5.
- **Gutteridge, J.M., Halliwell, B., 1992** : Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine. *Free Radical Biol. Med.* **12**, 93-95.

H

- **Haddadi H., 2005** : Détermination de l'activité antioxydante de quelques fruits 76.
- **Hadi M., 2004** : La quercetine et ses dérivés : molécules à caractère pro- oxydant capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur 155.
- **Haleng J., Pincemail J., Defraigne J. O., Charlier C. & Chapelle J. P., 2007** : Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège* **62**, 628 – 638.
- **Halliwell B. & Gutteridge J.M.C., 1989** : Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford 543.
- **Halliwell B. & Gutteridge J.M., 1990** : Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease **186**,1–85.

- **Halliwell B. & Gutteridge J. M. C., 1996** : Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathologie Biologie* **44**, 6 – 13.
- **Harrison R., 2002** : Structure and function of xanthine oxidoreductase **33**, 774-797.
- **Hebi M. & Eddouks M., 2016** : Evaluation de l'activité antioxydante de *Stevia rebaudiana* **14**, 17 – 22.
- **Heim E. K., Tagliaferro A. R. & Bobilya D. J., 2002** : Flavonoïds antioxydants : chemistry ; metabolism and structure-activity relationships. *The journal of Nutritional Biochemistry* **13**, 572 – 584.
- **Hennebelle T., 2006** : Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants 304.
- **Hennen G., 1996** : Biochimie humaine, Introduction biochimique à la médecine interne 360.
- **Heywood V. H., 1996** : Les plantes à fleurs 306 Familles de la flore mondiale 335.
- **Hopkins, W. G., 2003** : Physiologie végétale. 2^{ème} édition. Edition de *Boeck Université*, p 268,280.

J

- **Jarrige R., Ruckebusch Y., Demarquilly C., Farce M. H. & Journet M., 1995** : Nutrition des ruminants domestique: ingestion et digestion. Edition *Inra* 57.
- **Jassbi A.R., Mehrdad M., Soleimani M., Mirzaeian M. & Sonboli A., 2005** : Chemical Composition of the essential oils of *Bunium elegans* and *Bunium caroides*. *Chemistry of Natural Compounds* **41**, 415–417.

K

- **Knaggs, A.R., 2003** : The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, **20** : 119–36.
- **Korkina L.G., Afanas'ev I.B., 1997** : Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv. Pharmacol.* **38**: 151–163.

L

- **Lacolley P., Babuty D., Boulanger C., Ghaleh B., Loirand G., Pinet F. & Samuel J.L., 2007** : Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux. Edition *John Libbey Eurotext* 312 , 316 , 317.
- **Laguerre M., Lecomte J., & Villeneuve P., 2007** : Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research* **46**, 244 – 282.
- **Lefahal M., 2014** : Etude phytochimique, biologique et activité anticorrosion de trois plantes médicinales Algériennes appartenant aux familles *Plumbaginaceae*, *Tamaricaceae* et *Apiaceae* 02.
- **Leverse X., Cosnes J., Erny P. & Hasselmann M., 2001** : Traité de nutrition artificielle de l'adulte. 2^{ème} édition. Edition *Springer*, 241.
- **Li H., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F. & Jiang Y., 2007**: Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry* **102**, 771-776.
- **Lindau-Sehpard B. & Shaffer J., 1993** : Expression of human catalase in acatalasemic murine SVB2 cells confers protection from oxidative damage. *Free Rad Boil Med* **8**, 15 – 581.

M

- **Macheix J. J., Fleuriet A., & Jay-Allemand C., 2005** : Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. Edition *Presses Polytechniques & Universitaires Romandes*, p VII 2, 3.
- **Manallah A ; 2012** : Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L, 62.
- **Mariod A. A., Ramlah M. I., Maznah I. & Norsharina I., 2010** : Antioxydant activities of phenolic rich fraction (PRFs) obtained from black mahlab *Monechma ciliatum* and white mahlab *Prunus mahaleb* seedcakes. *Food Chemistry* **118**, 120 – 127.
- **Martin S. & Andriantsitohaina R., 2002** : Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie* **51**, 304 – 315.
- **Marusawa H., Ichikawa K., Narita N., Murakami H., Ito K. & Tezuka T., 2002** : Hydroxyle radical as a strong electrophilic species. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **10**, 2283 – 2290.
- **Maruthamuthu Vijayalakshmi & Kandasamy Ruckmani., 2016** : Ferric reducing anti-oxidant power assay in plant extract. *Bangladesh J Pharmacol.*
- **Matés J. M., Perez-Gomez C. & Castro N. I., 1999** : Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* **32**, 595 – 603.
- **Merghem R., 2009** : Eléments de biochimie végétale. Editions *Bahaeddine Algérie* 111 123.
- **Mohammedi Z., 2013** : Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie.
- **Molyneux P., 2004** : The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarim J .Sci .Technol* **26**, 211 – 219.
- **Morena, M., Martin-mateo M., Cristol J.P. & Canoud B., 2002** : Stress oxydant, hémoincompatibilité et complication de la dialyse au long cours. *Néphrologie* **23** (5), 201 – 208.

N

- **Newman D. J., Cragg G. M. & Snader K. M., 2000** : The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Report* **17**, 215 – 234.
- **Niki L., Reynaert S. W., Aesif T. M., Amy B., Emiel F. M., Wouters C. G., Irvin., Yvonne M. W. & Janssen-Heininger., 2007** : Catalase over expression fails to attenuate allergic airways disease in the mouse. *The journal of Immunology* **178**, 3814 – 3821.

P

- **Pasquier C., 1995** : Stress oxydatif et inflammation. *Revue Française des Laboratoires* **276**, 87 – 92.
- **Pimenov M. G. & Kljuykov E. V., 1987** : Neoconopodium—a newgenus of the Umbelliferae from the Himalaya **98**: 373–378.
- **Piotrowski W.J & Marczak J., 2000** : Cellular sources of oxidants in the lung **13**, 369-385.
- **Popovici C., Saykova I. & Tylkowskib., 2010** : Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH **4**, 1– 8.
- **Prasanth D. S. N. B. K., Atla S.R. & Rajendra P.Y., 2017** : phytochemical, *in vitro* antioxidant and antibacterial activities of *argyreia pilosa* wight & arn. (whole plant), *Journal of Pharmacognosy* ·

Q

- **Quezel P et Santa S., 1963** : Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris.

R

- **Rezaire A., 2012** : Activité anti-oxydant et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse de Doctorat université des Antilles et de la Guyane.
- **Roberfroid M. B., Coxam V. & Delzenne N. M., 2008** : Aliments fonctionnels. 2ème édition. Edition *Lavoisier TEC & DOC*, 209, 215.
- **Rodriguez-Bernaldo A. Q. F. S., Frecha P. A., Vidal. & Lopez H. J., 2010** : Antioxydant compound in edible brown seaweeds. *European Food Research & Technology* **231** (3), 495 – 498.

S

- **Sarni-Manchado P. et Cheynier V., 2006** : Les polyphénols en agroalimentaire. *Ed Tec et Doc Lavoisier*. pp : 02-11.
- **Scheibmeir H. D., Christensen K., Whitaker S. H., Jegaethesan J., Clancy R. & Pierce J. D., 2005** : A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs* **21** (1), 8 – 24.
- **Serge K., 2012** : Les plantes de la famille des Apiacées dans les troubles digestifs Université de : Joseph Fourier.
- **Siracusa L., Saija A., Cristani M., Cimino F., Manuela D'Arrigo., Domenico T., Felice R., & Giuseppe R., 2011** : Phytocomplexes from liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) leaves Chemical characterization and evaluation of their antioxidant, anti-genotoxic and anti-inflammatory activity.
- **Sorg O., 2004** : Oxidative stress : a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus A Biologies* **327**, 649 – 662.
- **Stephen R. D., Deborah S. K. & Krzysztof S., 2000** : A Phylogeny of Apiaceae tribe Scanadiceae evidence from nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences. *American Journal of Botany* **87**(1): 76–95.
- **Su X., Duan J., Jian Y., Shi J. & Kakuda Y., 2006** : Effect of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *Journal of Food Composition Anal* **19**, 348- 353.
- **Sunil H. G., Shweta P. D. & Patil S. U., 2012** : Preliminary Phytochemicals Investigation and TLC Analysis of *Ficus racemosa* Leaves. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*.
- **Swain S. D., Rohn T. T. & Quinn M. T., 2002** : Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. *Antioxid Redox Signal* **4**, 69–83.

T

- **Thannickal V. J. & Fanburg B.L., 2000** : Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol* **279**, 1005-1028.
- **Terpinc P., Bezjak M., Abramovic H., 2009** : A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food Chemistry* **115** : 740-744.

- **Tiwari P., Kumar B., Kaur M., Kaur G. &Kaur H., 2011** : Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale Pharmaceutica Scientia* **1**, 98-106.
- **Torres De Pinedo A., Pen alver P. & Morales J. C., 2007** : Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: structure-activity relationship. *Food Chem* **103**, 55–61.

W

- **Wardman P. & Candeias L. P., 1996** : Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res* **145**, 523 – 531.
- **Waston R. R., Preedy V. R. & Zibadi S., 2013** : Polyphenol in Human Health and Disease. Edition *Academic Press is an Imprint of Elsevier* 643

Y

- **Younes M., 1999** : Free Radicals and Reactive Oxygen Species. *Academic Press* 111-125.
-

