



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Aboubakr Belkaïd – Tlemcen –



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

Département de Biologie

Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA)

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER

En Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

Thème

Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante du tubercule d'*Arisarum vulgare*

Préparé par :

MIDOUN Ghizlane

MESTEFTAH Zineb

Soutenu le : 21/09/2020

Devant le jury composé de :

Président	Mr CHERRAK SABRI	MCA	Université de Tlemcen
Examineur	Mr BENYOUB Nor eddine	MAA	Université de Tlemcen
Encadrant	Mr CHAUCHE Tarik Mohammed	MCA	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2019-2020

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

Nous remercions d'abord le bon **Dieu** le tout puissant de nous avoir accordé la santé et le courage pour accomplir ce travail

Ce travail a été réalisé au Laboratoire des Produits Naturels (**LAPRONA**). Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen

Nous tenons tout d'abord à exprimer nos vifs remerciements et toutes nos reconnaissances à **M^r CHAUCHE Tarik Mohammed** maitre de conférences classe « A » au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen, Qu'il soit également remercier pour sa disponibilité permanente, son aide, et ses précieux conseils et surtout sa gentillesse ainsi que pour la confiance qu'il nous a accordé en réalisant ce travail, il trouve ici l'expression de nos profondes gratitude.

Nous tiens à exprimer toutes nos reconnaissances à **M^{me} HADDOUCHI Farah** pour son encouragement et ses aide précieuse durant toute la période de notre travaille.

Nous adressent nos sincères remerciements à **CHERRAK SABRI** d'avoir acceptée de présider le jury.

Nous expriment également nos remerciements à **BENYOUB NOR EDDINE** pour accepter d'examiner ce mémoire.

Nous tenons également à **M^{elle} Ghellai Imene** pour son soutien tout au long de la période de la pratique.

Nous nous remerciant toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



DÉDICACE

Je dédie ce modeste travail Aux êtres qui me sont le plus chers dans ma vie.

À la bougie qui est la source de la lumière de ma vie, qui se fond toujours pour éclairer ma route, à mon **cher père** je dédie ce travail et je lui souhaite une longue belle vie.

À la fleur qui rehausse et aromatise mes jours, qui garde les nuits pour que je me rendorme, à ma très **chère mère** je dédie ce travail et je lui souhaite une longue belle vie.

À ma sœur ; **RAWDA.**

À mes frères; **ANAS** et **AMINE.**

À mes amies **AMEL** et **AICHA** et tous ceux qui me sont chers.

À toute ma famille de près ou de loin.

À tous mes collègues de la promotion avec qui j'ai partagé les joies et les difficultés durant ces années.

À tous ceux qui me connaissent

Ghizlane



DÉDICACE

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie que je dédie ce travail à

Mes chers et magnifiques **parents** pour leur patience, leur amour, leur soutien, leur encouragement et leurs sacrifices tout au long de ma vie aucune expression ne serait exprimer mon grand amour, que dieu les gardes.

À ma sœur ; **MALIKA**.

À mes frères ; **AHMED, KADOUR** et **MOUSSA**.

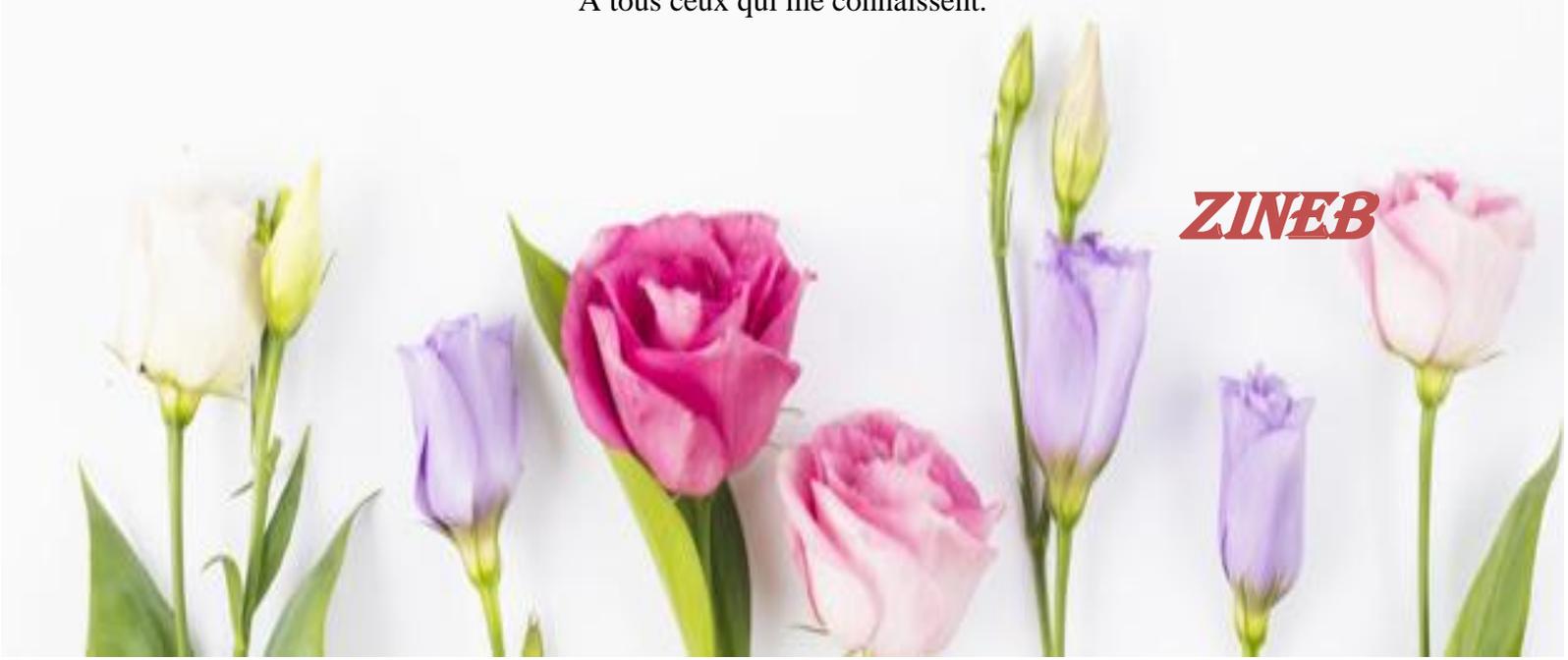
À ma très chère copine et binôme **GHIZLANE** avec elle on a peut surmonter tous les obstacles.

à mes amies **AMEL** et **AICHA** et tous ceux qui me sont chers.

À mes collègues de la promotion.

À toute ma famille de près ou de loin.

À tous ceux qui me connaissent.



ZINEB

ملخص

كجزء من تقييم النباتات الطبية والدراسات المتعلقة بالبحث عن مضادات الأكسدة الطبيعية ، نحن مهتمون بدراسة نبات طبي، *Arisarum vulgare* ينتمي إلى عائلة Araceae وذلك لمقارنة محتويات البوليفينول ولتقييم النشاط المضاد للأكسدة لجذرين من جذور (القشرة والللب) ، تم الاستخلاص تحت الارتجاع ، باستخدام مذيبات ذات قطبية متزايدة ، في البداية استخلاص بالهكسان من أجل إزالة الدهون ، ثم باستخدام ثنائي كلورو ميثان ، وأخيراً بمزيج من الميثانول / الأسيتون / الماء (10/20/70).

يتم إجراء تحديد إجمالي الفينولات والفلافونويد والعفص المكثف لمستخلصات هيدرو أسيتو ميثانول. عن طريق Folin-Ciocalteu, و ثلاثي كلوريد الألومنيوم والفانيلين على التوالي. يحتوي المستخلص من جزء القشرة على أعلى محتوى من البوليفينول (12.33 مجم EAG / جم DM) والفلافونويد (7.69 مجم EC / جم DM).

تتوافق نتائج تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصين ، من خلال السعة الكلية لمضادات الأكسدة ، واختبار DPPH وقدرة ارجاع الحديد (FRAP) مع نتائج المقاييسات ، يكشف جزء القشرة عن نشاط مضاد للأكسدة المهم مقارنةً بالللب.

الكلمات المفتاحية : ، البوليفينول ، الفلافونويد ، التانينات ، نشاط مضادات الأكسدة، *Arisarum vulgare*

Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales et les études portant sur la recherche d'antioxydants naturels, on est intéressé à l'étude d'une plante médicinale, *Arisarum vulgare* appartenant de la famille des Aracées et cela dans le but de comparer les teneurs polyphénoliques et d'évaluer l'activité antioxydante des deux parties de rhizome (la croûte et la pulpe), l'extraction a été effectuée sous reflux, par l'utilisation de solvants à polarité croissante, initialement une extraction à l'hexane pour une délipidation, ensuite au dichlorométhane, et enfin à un mélange du méthanol/acétone/eau (70/20/10).

Le dosage des phénols totaux, des flavonoïdes, et les tannins condensés sont effectués pour les extraits hydro-acéto-méthanoliques. Par les méthodes de Folin-Ciocalteu, trichlorure d'aluminium, et de la vanilline respectivement.

L'extrait de la partie croûte présente les teneurs les plus élevés en polyphénols (12.33 mg EAG/g MS) et en flavonoïdes (7.69 mg EC/g MS).

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydants des deux extraits, par la capacité antioxydante totale, le test DPPH et le pouvoir réducteur de fer (FRAP) concorde avec les résultats des dosages, la partie croûte révèle une activité antioxydante importante par rapport à celle de la partie pulpe.

Mots clé : *Arisarum vulgare*, polyphénol, flavonoïdes, tanins, activité antioxydants

Abstract

As part of the valuation of medicinal plants and studies relating to the search for natural antioxidants, we are interested in the study of a medicinal plant, *Arisarum vulgare* belonging to the Araceae family and that in order to compare the polyphenolic contents and to evaluate the antioxidant activity of the two parts of rhizome (the rind and the pulp), the extraction was carried out under reflux, by the use of solvents with increasing polarity, initially an extraction with hexane for delipidation, then with dichloromethane, and finally with a mixture of methanol / acetone / water (70/20/10).

The determination of total phenols, flavonoids, and condensed tannins are carried out for the hydro-aceto-methanolic extracts. By the methods of Folin-Ciocalteu, aluminum trichloride, and vanillin respectively.

The extract from the rind part has the highest contents of polyphenols (12.33 mg EAG / g DM) and flavonoids (7.69 mg EC / g DM).

The results of the evaluation of the antioxidant activity of the two extracts, by the total antioxidant capacity, the DPPH test and the reducing power of iron (FRAP) agree with the results of the dosages, the rind part reveals a significant antioxidant activity compared to that of the pulp part.

Keywords: *Arisarum vulgare*, polyphenol, flavonoids, tannins, antioxidant activity.

Listes des figures

Figure 1: Fleurs d' <i>Arisarum vulgare</i>	6
Figure 2: Structure de Flavone C glucoside.....	23
Figure 3: La R-irniine.....	7
Figure 4: La bgugaine.....	7
Figure 5: Irnigaine 3.....	24
Figure 6: N-methylirnigaine 4.....	8
Figure 7: Déséquilibre de la balance entre oxydant et antioxydant (stress oxydatif),.....	14
Figure 8: Les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.	15
Figure 9: Structure d'un noyau phénol	21
Figure 10: Structure de l'enchaînement benzo-y-pyrone	23
Figure 11: Etape de la biosynthèse des flavonoïdes	26
Figure 12: Exemple d'un tanin hydrolysable (pentagalloylglucose)	28
Figure 13: Exemple d'un tanin (polymère de procyanidine)	28
Figure 14: Forme réduit du radical DPPH.....	34
Figure 15: Etapes de la réalisation de l'étude phytochimique et l'activité antioxydante de deux extraits tubercule d' <i>Arisarum vulgare</i>	38
Figure 16: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	39
Figure 17: Histogrammes du teneur en polyphénol des extraits	39
Figure 18: Courbe d'étalonnage de catéchine.....	40
Figure 19: Histogramme de teneur en flavonoïde des extraits	40
Figure 20: Courbe d'étalonnages de catéchine	41
Figure 21: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour la détermination de la capacité antioxydante totale	42
Figure 22: capacité antioxydante total des extraits hydro-acéto-méthanoliques.....	42
Figure 23: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de différentes concentrations de BHA	43
Figure 24: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits	43
Figure 25: Valeurs d'IC ₅₀ des extraits hydro-acéto-méthanolique et du BHA par la méthode de piégeage du radical libre DPPH.....	44
Figure 26: Pouvoir réducteur de fer des extrait et de l'antioxydante de synthèse	45
Figure 27: Pouvoir réducteur de fer exprimé par les valeurs de CE ₅₀ des extraits et de l'antioxydante de synthèse.....	45

Liste des tableaux

Tableau 1: Avantages et inconvénients des antioxydants	17
Tableau 2: Les principales classes des composées phénoliques	20
Tableau 3: Classification et structure des flavoïdes	24
Tableau 4: Quelques sources naturelles des flavonoïdes	25

Tableau 5: Aspets et couleurs des extraits obtenues par extractions successives aux reflux.. 37

Liste de la photo

Une photo : Le tubercule d'Arisarum vulgare.....

Tables de matières

Remerciements

Dédicaces

Résumé

ملخص

Abstract

Liste des figures, liste des tableaux et Liste des photos

Introduction générale.....	1
Partie bibliographique.....	3
Chapitre 01 :	4
Etude botanique de la plante étudiée.....	4
1. Généralité sur la plante étudiée.....	5
1.1 Famille des Aracée.....	5
1.2 Arisaum vulgare.....	5
1.2.1 Position systématique	5
1.2.2 Appellations.....	6
1.2.3 Description botanique	6
1.2.4 Propriétés et utilisations	7
1.2.5 Compositions phytochimique.....	7
1.2.6 Toxicité	8
1.2.7 Les travaux antérieurs	8
Chapitre 02 : Radicaux libres, Stress oxydatifs et Antioxydants	9
1. Les espèces antioxydants	10
1.1 Espèces Réactives Oxygénés ERO.....	10
1.1.1 ERO Radicalaire.....	10
1.1.2 ERO Non Radicalaire.....	11
1.2 Espèces Réactives Azoté (ERN).....	11

1.2.1	Espèce azotée radicalaire	11
1.2.2	Espèce azotée non radicalaire	12
2.	Les principales origines des radicaux libres.....	12
3.	Les méfaits des radicaux libres.....	13
4.	Stress oxydatif	14
5.	Antioxydant	14
5.1	Le système antioxydant enzymatique	15
5.2	Le système antioxydant non enzymatique « exogène »	16
5.3	Avantages et inconvénients des antioxydants	17
Chapitre 03 : La phytothérapie et plante médicinale.....		18
1.	Plante médicinale	19
2.	La phytothérapie	19
3.	Les métabolites secondaires	19
3.1	Les composées phénoliques.....	20
3.1.1	Définition	20
3.1.2	Distribution et localisation des polyphénols	20
3.1.3	La biosynthèse des polyphénols.....	21
3.1.4	Propriétés biologiques des polyphénols	21
3.2	Les acides phénoliques.....	22
3.2.1	Les acides hydroxybenzoïques	22
3.2.2	Les acides hydrocinnamiques.....	22
3.3	Les flavonoïdes	23
3.3.1	Définition des flavonoïdes.....	23
3.3.2	Structure et classification des flavonoïdes.....	23
3.3.3	Distribution et localisation des flavonoïdes	25
3.3.4	Biosynthèses des flavonoïdes.....	26
3.3.5	Intérêt des flavonoïdes.....	26
3.4	Les tanins	27
3.4.1	Définition des tanins.....	27
Partie expérimentale		29
Matériel et méthodes		30
1.	Matériel végétal	31
2.	Extraction à reflux par des solvants à polarité croissante.....	31
3.	Quantification de quelques classes phénoliques dans les extraits	32

3.1	Les polyphénols totaux.....	32
3.2	Les flavonoïdes	32
3.3	Les tanins condensés.....	33
4.	Détermination de l'activité antioxydants, in vitro	33
4.1	La capacité antioxydante totale	33
4.2	Le piégeage du radical DPPH	34
4.3	Le pouvoir réducteur de fer	35
	Résultats et discussion	36
1.	Introduction.....	37
2.	Rendements des extraits hydro-acéto-méthanolique	38
3.	Dosages des composées phénoliques.....	38
3.1	Teneur en phénol totaux.....	39
3.2	Teneur des extraits en flavonoïdes totaux.....	40
3.3	Teneur des extraits des tanins condensés	41
4.	Evaluation de l'activité antioxydant	41
4.1	Capacité antioxydante totale	42
4.2	Piégeage du radical libre DPPH	42
4.3	Pouvoir réducteur de fer	44
	Conclusion générale et perspectives	47
	Références bibliographiques	49

Introduction générale

L'Afrique du nord comprend géographiquement une position privilégiée ; grâce à cette position, l'Algérie regorgeant une flore extrêmement riche et variée représentée par 4125 plantes vasculaires inventoriées, réparties en 123 familles botaniques ; cette biodiversité végétale font que l'analyse de la flore d'Algérie présente un intérêt scientifique appliqué pour la connaissance et le savoir dans le domaine de la valorisation des substances naturelles et un intérêt scientifique fondamental dans le domaine de l'ethnobotanique et de la pharmacopée traditionnelle (**Quézel et Santa, 1962**).

L'humanité a été toujours en enquête perpétuelle pour découvrir l'ensemble des qualités thérapeutiques des plantes à partir l'étude de la chimie des plantes (la phytochimie). Ce dernier fait que la flore végétale représente une source importante d'une immense variété de substances bioactives qui ont des intérêts multiples en industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie ; parmi ces composées on retrouve les acides phénolique, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins, les terpènes (**Bahorun et al., 1996**).

La majorité des études ont mis en évidences la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les activités antioxydants, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, anticancéreuses, dans la prévention et les traitements des maladies cardiovasculaires et aussi également utilisée comme additifs en industrie pharmaceutique et cosmétique. Dès maintenant, l'exploitation des nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchés car l'utilisation des antioxydants de synthèse peuvent engendrer des effets néfastes. (**Bougandoura et Bendimrad, 2012**)

Dans ce contexte, ce travail est dédié à l'étude phytochimique et à la valorisation du potentiel antioxydante d'extraits d'*Arisarum vulgare*, le manque d'activité et de la recherche de nature chimique et/ou biologique sue cette espèce justifie le choix de la plante.

Cette étude comporte trois parties :

- La première partie est à une synthèse bibliographique sur la plante étudiée, la classification et l'intérêt des métabolites secondaire, les oxydants et les antioxydants.
- La seconde décrit le matériel et les méthodes utilisés dans notre travail.
- La troisième est consacrée aux résultats expérimentaux trouvés et à la discussion.

Le mémoire est achevé par une conclusion et perspectives de notre travail.

Partie bibliographique

Chapitre 01 :

Etude botanique de la plante étudiée

1. Généralité sur la plante étudiée

1.1 Famille des Aracée

Les Aracées comptent près de 3800 espèces distribuées dans au moins 118 genres de la famille de plantes monocotylédones, répandant surtout dans le tropicale au surplus on peut trouver en milieux tempérés.

Inflorescence caractéristique d'une spathe est une bractée colorée qui enveloppe l'inflorescence et former une chambre de pollinisation et un spadice colonne sur laquelle sont distribuées les fleurs.

La pollinisation des aracées fait grâce aux insectes faisant aux ordres des coléoptères (scarabées), des diptères (mouches) ou des hyménoptères (abeilles). Cette interaction est dit mutualisme, car elle est avantageuse pour les deux participants, car la plante assure sa reproduction et le pollinisateur recevoir leur ressource recherchée.

Dans cette famille on peut distinguer des espèces à fleurs bisexuées et d'autres à fleurs unisexuées.

- Inflorescence à fleurs bisexuées : Le spadice est formé d'un grand nombre de fleurs complètes, chacune possède les pièces mâles et femelles.

- Inflorescence à fleurs unisexuées : Les fleurs femelles constituées d'un gynécée sont situées dans la partie basse de la colonne et les fleurs mâles comprennent l'étamine dans le haut (**Gibernau et Quilichini, 2015**).

1.2 Arisaum vulgare

1.2.1 Position systématique

Embranchement : Spermatophytes

Sous Embranchement : Angiospermes

Class : Monocots

Ordre : Arales

Famille : Aracées

Genre : Arisarum

Espèce : *Arisarum vulgare*

1.2.2 Appellations

Nom scientifique : *Arisarum vulgare* Targioni-Tozzeti

Nom en commun : gouet à capuchon

Nom en arabe : tabgouga, irni (Site 01).

1.2.3 Description botanique

C'est une herbacée pérenne, de la hauteur 20 à 30 cm ou plus, méditerranéenne se trouve aussi en Espagne. Il vit à l'est et au sud-est également aux Baléares et aux Canaries. Elle répandue dans plusieurs endroits : le long de la plaine côtière ; dans les vallées intérieures et sur les montagnes ; les maquis, les garrigues et les steppes rocheuses ; le long des routes et dans les fissures ; à la périphérie des plantes buissonnantes, là où l'ombre n'est pas trop dense ; Elle pousse également de manière luxuriante autour des arbres ; dans des bosquets et des vergers relativement peu nombreux où le système de culture sans labour est pratiqué ; dans des endroits humides et fertiles et abrités.

Les organes géophiles se développent selon leur profondeur. Les plantes profondes produisent des cornes verticales massives dans des conditions ensoleillées, tandis que les plantes peu profondes donnent naissance à des tubercules horizontaux allongés. Cette plante qui est connue pendant la période de disettes, le tubercule est ovoïde irrégulier , Les feuilles sont ovoïdes ou en forme de flèche sagittée avec un long pétiole (figure01), un limbe cordé, Inflorescence caractéristique en spadice apparaît sur un pédoncule érigé, avec des taches violettes Spathes allongées, jusqu'à 7 cm, cylindrique, recourbé au-dessus, avec un apex pointu, violet foncé avec des bandes longitudinales blanches en dessous. Spadice 2-6 cm avec les fleurs femelles en dessous et les fleurs mâles au-dessus, atteignant jusqu'à un tiers du spadice, la florisation se fait de septembre à juin (**Ferrer-Gallego**, 2014); (Koach et **Galil**, 1986); (**González et al.**, 2018))



Figure 1: Fleurs d'*Arisarum vulgare* (2011 par Kadri Hadjer)

1.2.4 Propriétés et utilisations

Dans la médecine traditionnelle, chaque partie de cette plante a été utilisée pour le traitement d'une ou plusieurs affections : les racines comme éméto-cathartique et contre les maladies des voies respiratoires (**Melhaoui**, 1993) ; dans Majorque l'une des îles espagnoles ont été réalisées des pansements à partir des feuilles comme vulnéraire pour soigner les blessures. Les fleurs ont été mélangées avec l'huile d'olive brute, cette préparation a été appliquée localement, comme un agent de guérison (**González et al.**, 2018).

Les utilisations d'*Arisarum vulgare* ne se limitant pas uniquement au traitement, dans la période de pénurie, les gens comptaient sur ses tubercules pour leur nourriture qui sont à l'origine collectés pour nourrir le bétail, surtout pour les porcs. Cette plante est considérée comme un bon aliment tout au long de l'année mais sa qualité diminue à la fin du printemps et en été, lorsque la partie aérienne reste sèche (**González et al.**, 2018).

1.2.5 Compositions phytochimique

La famille à laquelle appartient la plante étudiée est caractérisée par la présence des saponines, les polyphénols, les composés cyanogènes, et les alcaloïdes dans ses métabolites secondaires (**Kadri**, 2017)

Des études antérieures sur l'*Arisarum vulgare* ont montré la présence de plusieurs composants, les plus importants d'entre eux le Flavone C glycosides (figure02)(**Williams et al.**, 1981). La R-irniine est un alcaloïde de type 2-alkylpyrrolidine (2R)-N-méthyl-2-(9-phénylnonyl) pyrrolidine existe dans le tubercule (figure03) (**Lamkadem et al.**, 2004 ; **Melhaoui**, 1998). La bgugaine est un alcaloïde aussi analogue d'irniine (figure04) (**Melhaoui**, 1993)

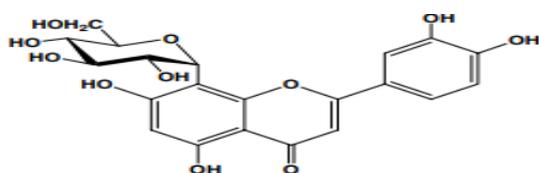


Figure 2: Structure de Flavone C glucoside (Zhang et al.,2008)

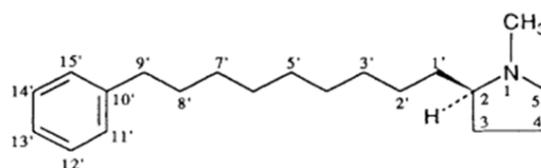


Figure 3: La R-irniine (Melhaoui, 1995)

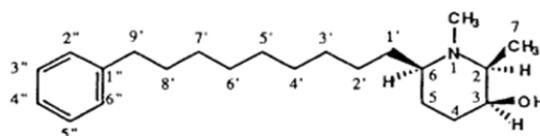


Figure 4: La bgugaine (Melhaoui, 1995)

Irnigaine 3: (-)-(2S, 3S, 6R)-3-hydroxy-2-methyl-6-(9'-phenylnonyl) pipéridine (figure 05) et N-methylirnigaine 4 (-)-(2S, 3S, 6R) - 1, 2-diméthyl-3-hydroxy-6- (9'- phenylnonyl) piperidine (figure 06).

Deux alcaloïdes toxiques de pipéridonal situés aux tubercules (**Melhaoui et Bodo, 1995**)

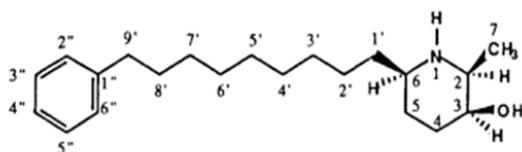


Figure 5: Irnigaine 3(Melhaoui, 1995)

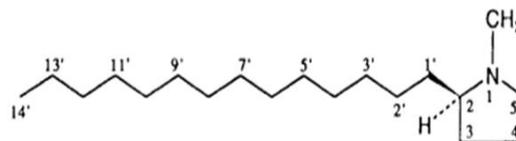


Figure 6: N-methylirnigaine 4 (Melhaoui, 1995)

1.2.6 Toxicité

Bien sûr comme elle a des bénéfiques, elle a des effets néfastes, la consommation d'*Arisarum vulgare* fraîches par les humaines et les animaux conduit à provoquer des troubles digestifs et des réactions allergiques graves (**Melhaoui et al., 1993**), aussi elle peut en résulter plusieurs manifestations toxicologiques, telles que l'irritation des muqueuses, des gastro-entérites et des symptômes allergiques, principalement des dermatites et des prurits, et a parfois entraîné la mort(**Melhaoui et al., 1992**).

1.2.7 Les travaux antérieurs

La bbugaine et l'irniine deux alcaloïdes isolé des tubercules d'*Arisarum vulgare* et élucidée par la technique de RMN. Ces alcaloïdes montrent des effets inhibiteurs sur la croissance des bactéries Gram positives, des levures et de certains champignons filamenteux (**Melhaoui et al., 1993**).

Une étude de toxicité de bbugaine faite sur trois modèles différents de culture de cellules hépatiques. Les résultats montrent que la bbugaine induite une hépatotoxicité importante, n'est pas médisée par un dérivé métabolique et induit des dommages à l'ADN significatif (**Rakba et al., 1999**).

Une étude faite par (**Lamkadem et al., 2004**) sur l'effet cytotoxique et l'activité électrophysiologique de la R-irniine sur ces fibroblastes de la MRC-5. Les résultats montrent que l'insertion de la R-irniine dans l'ADN agirait sur le métabolisme de l'ARN et donc sur les protéines, explication possible leurs effets toxiques cette action cytotoxique étant indépendante d'une activité électro- physiologique.

Chapitre 02 : Radicaux libres, Stress oxydatifs et Antioxydants

La production physiologique des radicaux libres est parfaitement contrôlée par des systèmes de défense, dans les conditions ordinaires on dit que la balance pro- oxydant / et antioxydant est en équilibre, si tel n'est pas le cas, l'excès de ces radicaux appelé le stress oxydatif. Ce dernier est lié de nombreuses pathologies, par exemple les cancers, le diabète du type 2, les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington) et Rhumatismales (**Favier**, 2003). C'est pour cela que ces dernières années, la recherche sur les antioxydants naturels c'est beaucoup développée (**Belaich et Boujraf**, 2016).

1. Les espèces antioxydants

Un radical est un atome ou une espèce chimique qui porte un ou plusieurs électrons célibataires (non appariés) sur sa couche électronique périphérique, c'est-à-dire non couplés à un électron d'éléments voisins (**Rochette**, 2008 ; **Leverve**, 2009). Ils ont une demi-vie très courte et une faible concentration à l'état stable (**Martinez-cayuela**, 1995).

1.1 Espèces Réactives Oxygénés ERO

On distingue deux grands groupes de ERO : les espèces radicalaires (radical libre de l'oxygène convient) ou non radicalaires (certains dérivés oxygénés réactifs ne possèdent pas d'électrons célibataires). Les différentes ERO sont : l'anion radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical perhydroxyle (HO_2^{\cdot}), hydroxyle, alkoxy, peroxy (**Gardes- Albert et al.**, 2003).

1.1.1 ERO Radicalaire

❖ Radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

L'anion radical superoxyde résulte de la contribution d'un électron supplémentaire à la structure primaire de l'oxygène, il est peu toxique par lui-même, parce qu'il a une réactivité moyenne. Ce radical a quelques principales cibles sont : le cytochrome 'C', l'acide ascorbique et surtout l'enzyme superoxyde dismutase (SOD). (**Gardes- Albert et al.**, 2003).

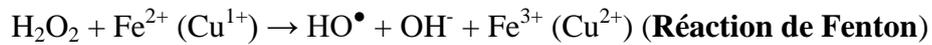
Ce radical métabolisé par SOD : $(O_2^{\cdot-}) + (O_2^{\cdot-}) + (2H^+) \rightarrow H_2O_2 + O_2$

❖ Radical perhydroxyle HO_2^{\cdot}

Celui-ci est plus réactif que le superoxyde, car le potentiel standard d'oxydoréduction est plus élevé, il est obtenu après protonation du radical précédent en milieu $PH < 4,8$ ($pKa (HO_2^{\cdot} / O_2^{\cdot-}) = 4,8$). (**Delattre.**, 2005).

❖ Radical hydroxyle HO[•]

Résulte par la réduction mono-électrique du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ avec des ions métalliques (fer ou cuivre) dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Réaction de Fenton) :



Cette réaction constitue un très bon oxydant pour la majorité de composé organique et joue un rôle majeur dans la peroxydation lipidique et dans la destruction du matériel génétique (**Hennebelle**, 2006).

❖ Radical peroxyde RO₂[•]

C'est un radical secondaire issu de la radiolyse ou l'irradiation de solvant comme éthanol, ces radicaux peuvent être captés par l'ascorbate qui devient le radical ascorbyle qui est relativement inerte par rapport aux matériaux biologiques (**Gardes-Albert et al.**, 2003).

❖ Radical Alkoxy RO[•]

Générer par la décomposition de l'hydroperoxyde RO₂H, issu de l'oxydation du substrat RH, par des cations métalliques (**Gardes-Albert et al.**, 2003).

1.1.2 ERO Non Radicalaire

❖ Peroxyde d'hydrogène H₂O₂

La dismutation spontanée de l'anion superoxyde dismutase générer le peroxyde d'hydrogène (**Deby et Goutier**, 1990) ; Il est métabolisé par la catalase et la glutathion peroxydase (**Afonso et al.**, 2007). Ce radical peut réagir avec les métaux de transitions pour former du radical hydroxyle, c'est la réaction de Fenton et d'Haber-Weiss (**Wardman et Candeis**, 1996).

1.2 Espèces Réactives Azoté (ERN)

Les espèces réactives sont principalement issues de l'oxygène mais certains proviennent de l'azote.

1.2.1 Espèce azotée radicalaire

❖ Le monoxyde d'azote (NO[•]) ou oxyde nitrique obtenu par la catalysation de l'enzyme NO-synthase à partir d'arginine et d'oxygène (**Speckman et al.**, 2016).

❖ Le NO[•] joue un rôle physiologique, c'est un protecteur vis-à-vis du stress oxydant, il est paradoxalement impliqué dans de nombreuses maladies (**Rezaire**, 2012).

1.2.2 Espèce azotée non radicalaire

Le monoxyde d'azote radicalaire peut réagir avec la plupart des espèces oxygénées, qui peuvent être donné des espèces non radicalaires :

❖ Le dioxyde d'azote (NO₂) capable de réagir avec des protéines ou des thiols

❖ Le trioxyde et tétraoxyde d'azote (N₂O₃) (N₂O₄) qui peuvent faire aussi des réactions sur des groupements thiols (**Pacher et al.**, 2007).

2. Les principales origines des radicaux libres

Les radicaux libres découlent de plusieurs sources possibles, il s'agit principalement de différents types :

- D'origine physiopathologique : maladie mitochondriale, déficit enzymatique, déficit en GSH (glutathion réduit) et inflammation.

- Physiologique : respiration, hormones, cytokine et phagocytose.

- Physique ou/et chimique ou exogène comme : l'irradiation x ou gamma, radiolyse de l'eau, les xénobiotiques oxydants (médicaments, polluants), exercice physique excessif, la cigarette etc. (**Delattre et al.**, 2005; **Valko et al.**, 2006).

- D'origine endogène : les différentes études données que la majorité des systèmes enzymatiques produisent des oxydant :

Le NADPH oxydase : c'est une oxydase liée à la membrane plasmique et qui génèrent (O₂^{•-}) en utilisant NADH ou NADPH comme substrat pour jouer un rôle fondamental dans la lutte contre les microorganismes (**Krause**, 2004).

La xanthine-oxydase : enzyme présent dans le sang, les cellules endothéliales des capillaires, ils réduisant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique, joue un rôle important dans la génération des oxydants (principalement O₂^{•-} et H₂O₂), lors de l'ischémie/reperfusion (**Harrison**, 2002).

La formation des hydroperxydes issus de l'oxydation de l'acide arachidonique soit par les cyclooxygénases, soit par les lipooxygénases (métallo-enzymes à fer).

Les ERO mitochondriales : la molécule non toxique issue de l'oxydation de l'oxygène par voie enzymatique, comme H_2O , peut subir une réduction monoélectronique et former une espèce beaucoup plus réactive comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), qui donne naissance à des espèces beaucoup plus réactives comme le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) (Salvayre et al., 2003).

3. Les méfaits des radicaux libres

Les oxydants ayant de plusieurs dommages sur les êtres vivants, on relève principalement :

- ❖ les effets physiologiques (croissance cellulaire, inflammation) et des effets d'adaptation au stress oxydant : répression des gènes (pro-oxydant) et induction des gènes (antioxydants) (Sahnoun et al., 1997).

- ❖ Les effets toxiques : les ROS ont des effets toxiques sur :

L'ADN : l'exposition au stress oxydant induit la génotoxicité qui forme de 8-OH Guanine, qui est une analogue de base de l'ADN. Ce dernier est possible de provoquer de dérapage dans l'ADN, qui fait des mutations et donc des cancers (Favier, 2006).

L'ARN : peut souffrir des oxydations et donc des altérations dans la formation des protéines (Favier, 2006).

Les lipides : pourront subir une peroxydation, qui peut jouer un rôle dans la formation de l'athérosclérose (Henriksen et al., 1983).

Les protéines : peuvent subir des oxydations surtout sur des nitrosylations, des carbonylations ou encore recevoir des signaux de dénaturation au cours d'agrégations de protéines anormales (Maladie de Parkinson ou Alzheimer) (Barouki, 2006).

Les glucides peuvent subir les anomalies de glycation et induire un diabète du type 2 (Bonnard et al., 2008).

4. Stress oxydatif

La production des EOR et ERN sont à la fois utiles, mais peuvent être néfaste pour l'organisme lors d'une génération excessive et en l'absence de mécanisme de défense. C'est ce que l'on appelle le stress oxydatifs (figure07)



Figure 7: Déséquilibre de la balance entre oxydant et antioxydant (stress oxydatif) (Belaich et Boujraf, 2016)

Bénéfique : impliqués dans des fonctions physiologiques au niveau des réponses cellulaires, telles que la lutte contre des agents infectieux et leur rôle dans les systèmes de signalisation cellulaire (**Belaich et Boujraf, 2016**).

Néfaste : la survenue de nombreuses pathologies graves (cancer, l'athérosclérose, maladie cardiovasculaire, arthrite etc.) (**Belaich et Boujraf, 2016**).

Une des principales fonctions déclenchées par ce déséquilibre (entre les ERO et le système de défense) est la mort cellulaire programmé ou apoptose (**Evans et Halliwell, 1999**).

5. Antioxydant

Notre organisme est capable de réguler la production des radicaux libres et qui a développée des moyens de défense (antioxydant), dans une certaine mesure, pour limiter les dommages causés par les radicaux libres (**Hennebelle, 2006**) ; les antioxydants sont des molécules ou des substances capables d'inhibent ou ralentissent l'oxydation d'un substrat. (**Wainsten, 2009**). Le bon antioxydant se faudra de respecter quelque norme :

- capable de piéger directement et spécifiquement les oxydants.
- Chélate des ions de métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^+).
- Être rapidement absorbé.
- Interagir avec d'autres antioxydants, et, dans la mesure du possible, les régénérer.

- Avoir une concentration qualifiée de « physiologique » dans les tissus et les fluides biologiques.

- Être efficace en milieu aqueux et/ou dans le milieu membranaire.

- Avoir un effet positif sur l'expression génique ; (Valko et al., 2006).

Il existe deux types d'antioxydant : les antioxydants enzymatiques (endogènes) et les antioxydants non enzymatiques (exogènes) ; ces derniers peuvent être classés selon leur mode d'action (figure08), leur origine et leur localisation cellulaire (Delattre et al., 2005).

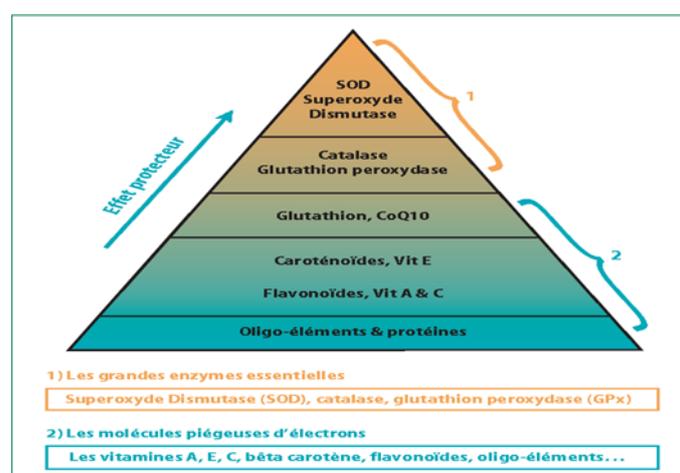


Figure 8: Les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Menvielle-Bourg, 2005).

5.1 Le système antioxydant enzymatique

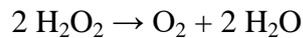
Les principales protéines enzymatiques antioxydantes forment les premières barrières de cette défense antioxydante chez les êtres vivants sont : les superoxydes dismutases, la catalase et la glutathion peroxydase (Mates et al., 1999; Sharma et al., 2012).

Superoxyde dismutase (SOD) : les superoxydes dismutases sont des antioxydants enzymatiques ubiquitaires ; le rôle majeur de ces métalloenzymes (Ce sont des enzymes utilisant des métaux comme cofacteurs) est l'élimination de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ par une réaction de catalyser la dismutation de ce dernier et en le transforme en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante : (Haleng et al., 2007)



La catalase : les catalases sont essentiellement localisées dans les peroxysomes et dans les érythrocytes, l'activité des catalases est coordonnée avec la concentration en H_2O_2 , elles

sont capables de transformer la peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante :



Glutathion peroxydase : se trouve dans le cytosol, le réticulum endoplasmique et dans la membrane interne des mitochondries ; elle permet de détoxifier le peroxyde d'hydrogène en H₂O en parallèle de l'oxydation du glutathion selon la réaction suivante (**Thérond**, 2003):



5.2 Le système antioxydant non enzymatique « exogène »

L'organisme possède une deuxième ligne de défense « les piègeurs de radicaux libres » qui sont des composés complémentaires, non synthétisés par le corps humain, mais pour la plupart sont apportés par l'alimentation, et dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des ERO, ralentir et limiter aussi tout atteinte de l'intégrité cellulaire (**Koehler-Ramonatxo**, 2006), parmi ces antioxydants il y'a : les vitamines C et E, les polyphénols, les caroténoïdes et les minéraux.

- Vitamine C : un excellent piègeur des ERO avec (HO[•] ou O₂^{•-}), l'effet antioxydant pourrait également inhiber les processus d'oxydation et les radicaux libres qui jouent un rôle dans l'initiation et la promotion du processus néoplasique (**Block**, 1992).

- Polyphénols : ce sont des métabolites secondaires hydrosolubles majoritairement retrouvés dans le règne végétal, ils sont capables de chélater les métaux de transition comme le Fer et le Cuivre qui permettent de catalyser les oxydations (**Stevenson** et **Hurst**, 2007).

- Les caroténoïdes : sont regroupés en deux grandes familles: les carotènes et les xanthophylles. Plus de 600 caroténoïdes différents ont été isolés à partir des sources naturelles. Ils piègent des radicaux libres par la neutralisation de l'oxygène singulier dans les tissus rétiniens, prévenant la dégénérescence, qui est la première cause de cécité chez la personne âgée (**Valko et al.**, 2006).

5.3 Avantages et inconvénients des antioxydants

Les antioxydants naturels et synthétiques ayant des avantages et des inconvénients, les plus utilisés pour la protection des denrées alimentaires et pharmaceutiques, sont présentés dans le tableau 01. (Valenzuela et Nieto, 1996).

Tableau 1: Avantages et inconvénients des antioxydants (Valenzuela et Nieto, 1996).

Antioxydants naturels	Antioxydants synthétiques
Coûteux	Peu coûteux
Limités	Largement appliqué
Moyenne à forte activité antioxydants	Moyenne à forte activité antioxydants
Perçus comme des substances inoffensives	Substances toxiques
Augmentation de l'utilisation	Utilisation de certains d'entre eux interdit
Large gamme de solubilité	Faible solubilité dans l'eau
Intérêt croissant	Intérêt décroissant
Complètement métabolisé	Certains d'entre eux sont stockés dans le tissu adipeux

Chapitre 03 : La phytothérapie et plante médicinale

1. Plante médicinale

D'après la pharmacopée française « 2013, la X^{ème} édition » les plantes médicinales sont des drogues végétales (**Sofowora**, 2010). Par définition, celles qui possèdent une richesse précieuse pour l'humanité. Elles sont des usines chimiques naturelles, pour ses propriétés particulières bénéfiques pour la santé humaine ou animale à cause de la production des substances actives biochimiques : alcaloïde, flavonoïde, tanins, huile essentielle...etc.; à partir de différentes méthodes (décoction, macération, infusion...) par l'utilisation de différente partie de plante (tige, fleurs, feuilles, racines, tubercule...etc.) ; ces dernières sont destinées à la phytothérapie, à l'élaboration des arômes, à la production de molécules pour la médecine allopathique (**Baran**, 2000 ; **Benjilali** et **Zarira**, 2005).

2. La phytothérapie

Le mot phytothérapie vient du mot grec signifier (pytos : végétal et terapin : soigner), c'est à dire soigner par les plantes (**Morel**, 2008) ; par définition, la phytothérapie est une étude allopathique destinée à prévenir et à traiter quelques troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plante, ou de préparation à base de plantes, qu'elles soient utilisée en voie externe (**Wichtl** et **Anton**, 2003).

3. Les métabolites secondaires

En plus des métabolites primaires qui présentant dans toutes les cellules végétales capables de se diviser et qui fournit les molécules de base, les plantes produisent des métabolites secondaires, ce terme qui employer la première fois par **Kossel**, en 1891, sont des composées résultent des réactions chimiques ultérieures contrairement aux métabolites primaires. Ils ne sont pas essentiels à la vie de la plante et ne sont présents que «accidentellement» (**Rhodes**, 1994). Ils représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines différents et très variées, comme des arômes, des colorants et les plus importants comme des principes actifs de plusieurs médicaments (**Bouque**, 1997). Selon leur structure chimique sont classées-on trois grands groupes, les composés phénoliques, les terpènes et les stéroïdes et les composées azotées, chacune des classes renferme une très grande diversité de composées (**Palici**, 2016)

3.1 Les composées phénoliques

3.1.1 Définition

Les composées phénoliques ou les polyphénols constituant une famille de métabolites secondaires très vaste qui englobe plus de 8000 molécules divisées en une dizaine de classes chimiques (**Zergani**, 2015). Caractérisées par un élément structural qui est la présence d'au moins un noyau benzénique lui-même porteur au moins un groupement hydroxyles libre ou engagé dans une autre fonction, comme l'éther, l'ester, l'hétéroside (**Bruneton**, 2009). Ils sont classés selon le nombre d'atomes constitutifs et la structure de squelette de base (tableau 02) (**Machiex**, 1996).

Tableau 2: Les principales classes des composées phénoliques (Machiex, 1996)

Nombre d'atome de carbone	Squelette de base	Classe	Exemple	Plante alimentaire (exemple)
6	C6	Phénols simples	Catéchol	Epices, fraise
7	C6-C	Acide Hydroxybenzolques	p-Hydroxybenzolque	Pomme, P. de terre
9	C6-C3	Acide Hydroxycinnamiques Coumarines	acide Caféique Scopoline	Citrus
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone	Noix
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiferine	Mangue
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes Isoflavonides	Quercétol cyanidol Daidzeine	Fruits, légumes Soja, pois
n	(C6-C3) n	Lignines		Fruits à noyau
n	(C15) n	Tannins		Raisin rouge, kaki

3.1.2 Distribution et localisation des polyphénols

Présents chez tous les végétaux supérieurs mais avec une distribution qualitative et quantitative très inégale. Ils varient selon les espèces, les organes, les tissus et les stades

physiologiques. Ils se trouvent sous forme simples (figure 09), solubles et polymérisées plus ou moins solubles (tannins) dans la vacuole.

Par contre, les formes insolubles (lignines, formes liées à la subérine, la cutine et a des macromolécules glucidiques) sont directement associées à la paroi. (**Machiex**, 1996).

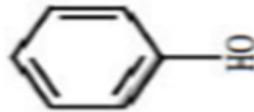


Figure 9: Structure d'un noyau phénol(Bruneton, 1999)

3.1.3 La biosynthèse des polyphénols

Les composés phénoliques sont le produit de métabolismes secondaires des plantes, synthétisés uniquement par l'ensemble des végétaux (**Bruneton**, 2009). Ils participent aux protections de la plante, face aux plusieurs agressions biotiques (agents pathogènes) ou abiotiques (rayonnements UV). Cette grande famille de métabolites secondaires synthétisés à partir de deux grandes voies d'aromagenèse :

- La de voie de l'acide shikimiques : la plus courante, responsable de la synthèse des acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine), après désamination conduit aux acides cinnamiques et à leurs très nombreuses dérivées telles que: acides benzoïques, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines.
- La voie de l'acétate : utilise comme précurseur l'acide acétique activé sous forme d'acétyl-S-coenzyme A. Le couplage des unités acétates conduit à la formation des poly-3-cétoesters de longueur variable qui après cyclisation (réactions de CLAION ou condensation aldolique), donnent naissance aux composés souvent polycycliques comme chromones, isocoumarines, orcinols, despsides, depsidones, xanthones, quinones. (**Machiex**, 1996).

3.1.4 Propriétés biologiques des polyphénols

•Les polyphénols participent à deux principaux processus : la photosynthèse et la respiration, peuvent interviennent dans les processus de croissance, la germination, la morphogenèse des tiges et la lignification, et Ils permettent aux végétaux de se défendre contre les rayons ultraviolets (**Merghem**, 2009).

- Rôle important dans certaines structures essentielles comme la lignine, et la coloration de certains tissus végétaux (**Macheix**, 1996).

- Attirent l'attention des insectes pollinisateurs, ou servent au contraire pour éloigner les prédateurs par les pigments non azotés (**Merghem**, 2009)

- Les polyphénols utilisés comme additif alimentaire, colorant, arôme ou agent de conservation (**Bruneton**, 1999).

- Ils ont été décrits comme neuroprotecteurs, antiviraux, antioxydants, antiagrégants plaquettaires, anti-inflammatoires, anti-allergènes, anti thrombotiques et des anti- tumoraux (**Hanhineva**, 2010).

- La consommation d'une alimentation riche en polyphénols abaisser la pression artérielle, empêcher l'oxydation des LDL (lipoprotéines de faible densité) et inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (**Martin** et **Andrantsitohaina**, 2002).

3.2 Les acides phénoliques

Sont les composés phytochimique bioactifs les plus simples, se trouvent dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales (**Psotova** et al., 2003).

Structurellement, possédant au moins une fonction

carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, terme de cette dénomination est réservé aux seuls dérivé des acides benzoïques et cinnamiques (**Watson** et al., 2013).

3.2.1 Les acides hydroxybenzoïques

Sont les dérivés de l'acide benzoïque, dont la structure de base (C_6-C_1), par exemple acide gallique, acide salicylique. Très fréquents sous forme libre ou combiné à l'état d'esters ou d'hétérosides (**Tsao**, 2010)

3.2.2 Les acides hydrocinnamiques

Les acides hydrocinnamiques courant une classe très importante des polyphénols, ont une formule de base de type ($C_6.C_3$), les molécules de base les plus répandus de la série hydrocinnamique : l'acide p-coumarique, caféique, férulique et l'acide sinapique (**Macheix** et al., 2005).

3.3 Les flavonoïdes

3.3.1 Définition des flavonoïdes

Le terme flavonoïde est dérivé du mot latin « falavus » qui signifie jaune (**Prochazkova et al.**, 2011). Parmi les grands groupes des composés polyphénoliques caractérisés par une structure benzo- γ -pyrone (**Yao et al.**, 2004). Ils constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Responsables des colorations jaune, orange et rouges de différents organes végétaux grâce à leurs pigments (**Ghedira**, 2005).

3.3.2 Structure et classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés de faible poids moléculaire, dérivent d'une structure de base commune l'enchaînement benzo- γ -pyrone (**Ghedira**, 2005). Un squelette carboné de configuration (C6-C3-C6) comme le montre à la figure 10, qui contient quinze atomes de carbone où une unité C de trois atomes de carbone sous forme d'un anneau hétérocyclique relié deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbone. Le cycle aromatique A est dérivé de la voie acétate/malonate, tandis que le cycle B est dérivé de la phénylalanine par la voie shikimate (**Ignat et al.**, 2011).

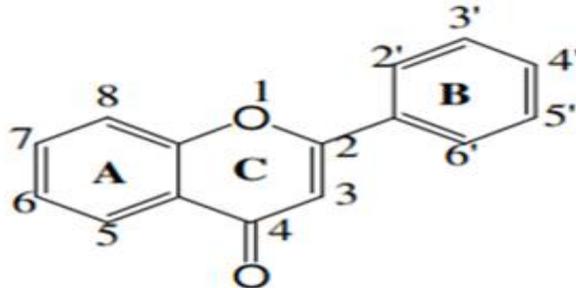
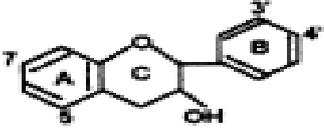
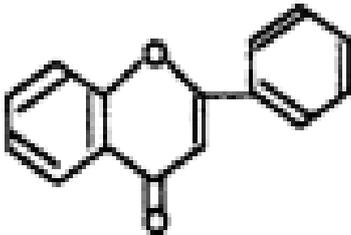
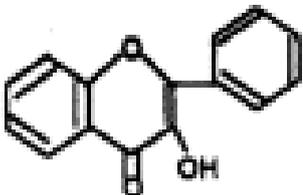
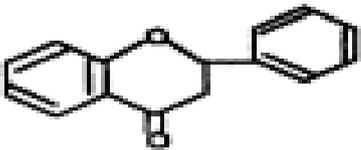
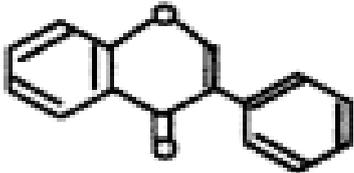
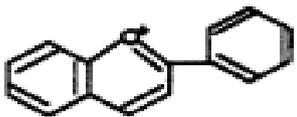


Figure 10: Structure de l'enchaînement benzo- γ -pyrone (Tapas et al.,2008)

Selon la cyclisation et le degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C, on distingue les principales classes des flavonoïdes « le tableau 03 » : les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavanols (ou catéchines), les isoflavones, les flavanonols et les anthocyanidines dont flavones et les flavonols, représentent les composés flavonoïdiques les plus répandus sur le plan structurale. Les composés de chaque classe se distinguent entre eux par le nombre, la position et la nature des substituants sur les deux cycles aromatiques A et B (**Ignat et al.**, 2011002)

Tableau 3: Classification et structure des flavoïdes (Heim et al.,2002)

Classe	Structure générale	Flavonoïdes	Substituant
Flavano		catéchine epicatéchine	3, 5, 7, 3',4'-OH 3, 5, 7, 3',4'-OH
Flavone		Chryisine Apigénine Luteoline	5,7-OH 5, 7, 4'-OH 5, 7, 3', 4'-OH
Flavonol		Kaempférol Quercétine Myricétine tamarixétine Rutine	3, 5, 7, 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4', 5'-OH 3, 5, 7, 3'-OH, 4-OMe 5, 7, 3', 4'-OH, 3-rutinosé
Flavanone (dihydroflavone)		naringène Naringénine Taxifoline	5,4'OH,7rhamnoglucose 5, 7, 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4'-OH
Isoflavone		Genistine Genisteine Daidzine Daidzeine	5, 4'-OH, 7-glucose 5, 7, 4'-OH 4'-OH, 7-glucose 7, 4'-OH
Anthocyanidines		Apigénidine Cyanidine	5, 7, 4'-OH 3, 5, 7, 4'-OH, 3, 5-Ome

3.3.3 Distribution et localisation des flavonoïdes

Ces composées ; synthétisés uniquement par les plantes à l'exception d'une isoflavonoïdes, qui a été isolés d'un corail marin *Fchinophora lamellosa* et deux flavanols présenté dans un petit nombre de champignons y compris *Aspergillus candidus*. Se trouvent beaucoup plus sous forme de glycosides dans les vacuoles et selon les espèces on peut rencontrer dans des fleurs, des feuilles, des tiges ou des racines.

Aussi, dans certaines plantes, on trouve les flavonoïdes simples comme exsudats farineuses ou de la cire sur les feuilles, les écorces et les bourgeons ou des cristaux dans les cellules de cactus (**Iwashina**, 2000).

On plus des plantes médicinales, les flavonoïdes très rencontrés sans les fruits, les légumes et des boissons tell que le vin rouge, le thé, le café et la bière, le tableau 04 présent quelque source de flavonoïdes (**Ghedira**, 2005).

Tableau 4: Quelques sources naturelles des flavonoïdes (Ghedira, 2005)

Flavonoïdes	Source : plantes médicinales
Flavones Apigénine	<i>Apium graveolens, Passiflora incarnata, Petroselinum sativum</i>
Flavones glycosylés Baicaline	<i>Scutellaria baicalensis</i>
Flavonols Quercétine	<i>Allium cepa, Crataegus cuneata, Ginkgo biloba, Glycyrrhiza glabra, Morus alba, Olea europea, Solanum lycopersicum, Thea sinensis, Vaccinium macrocarpon, Vitis vinifera, Pueraria thumbergiana</i>
Kaempférol	<i>Cichorea endivia, Ginkgo biloba, Raphanus sativus, Thea sinensis, Vitis vinifera</i>
Myricétine	<i>Thea sinensis, Vaccinium macrocarpon, Vitis vinifera</i>
Flavonols glycosylés Rutine (rutoside)	<i>Eucalyptus macrorrhyncha, Fagopyrum esculentum, Stellaria media, Sophora japonica</i>
Flavan-3-ols Catéchine	<i>Thea sinensis, Vitis vinifera</i>
Flavanones Naringénine	fruits du genre Citrus (sp.aurantium, limon, etc.)
Isoflavones Génistéine	<i>Soya hispida, Stellaria media, Pueraria lobata, Sophora japonica</i>

3.3.4 Biosynthèses des flavonoïdes

Comme nous avons indiqué, le cycle A de squelette benzo- γ -pyrone (dérivé de la voie acétate/malonate), il est formé à partir de trois molécules de malonyl coenzyme A (malonyl-CoA). Le cycle B dérivé de la voie phénylalanine par la voie du shikimate (**Balasundram et al.**, 2006).

La désamination d'un acide aminé essentiel la phénylalanine par la phényl ammonia lyase (PAL) et conduit à la formation de cinnamate. Ce dernier est ensuite transformé en acide coumarique par l'enzyme cinnamate-4- hydroxylase (C4H) puis en 4-coumaroyl-coenzyme A, catalysée par l'enzyme cinnamate-4- hydroxylase (C4H) et la CoA-ligase (4CL).

Après cette étape, la chalcone synthase intervenir dans une réaction de condensation de malonylCoA et le coumaroyl-CoA aboutir le chalcone qui est le point de départ de la synthèse des différents groupes des flavonoïdes (figure 11)(**Balasundram et al.**, 2006).

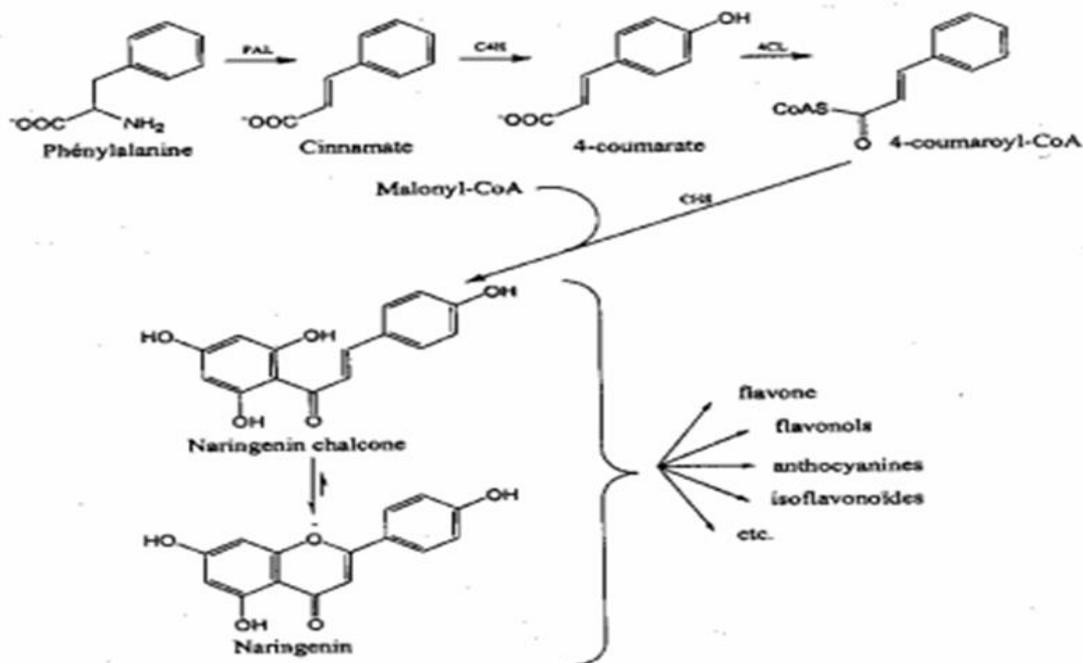


Figure 11: Etape de la biosynthèse des flavonoïdes (Bensegueni, 2007)

3.3.5 Intérêt des flavonoïdes

- Plusieurs remèdes à base des plantes contiennent les flavonoïdes. Ils sont utilisés en médecines traditionnelles, peuvent influencer sur plusieurs fonctions biologiques.

- la propriété antioxydantes : les flavonoïdes a la capacité de piéger les radicaux libress (radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$), anions superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot -}$)) grâce à leur groupements hydroxyle (C3-OH), fortement réactif et leur capacité à chélate les ions métalliques, donc peuvent

prévenir des anomalies liées aux stress oxydatifs, telle que l'anoxie et l'inflammation. Ils sont capables d'inhiber la carcinogenèse, l'angiogenèse, la prolifération cellulaire et affectent le potentiel invasif et métastatique des cellules tumorales.

- Effets protecteurs vasculaires : le maintien d'une perméabilité vasculaire normale par l'agit sur les vaisseaux sanguins sous forme d'activité vitaminique.

- Propriétés antiallergiques : la quercétine exerce un puissant effet inhibiteur de la libération d'histamine à partir des mastocytes.

- Des études sur des souris intoxiquées par l'acétaminophène révélant la propriété anti-hépatotoxiques des flavolignane.

- Autres propriétés pharmacologiques sont aussi rencontrées aux flavonoïdes dont l'effet hypoglycémiant et hypotriglycéridémiant, l'activité immuno-modulatrice et des propriétés antibactériennes et antivirales (**Ghedira**, 2005).

3.4 Les tanins

3.4.1 Définition des tanins

Les tanins sont des composés phénoliques complexes, de poids moléculaires compris entre 500 et 3000 KDa (**Kamira** et al., 2006). Ils constituent le troisième groupe important de composés phénoliques (**Ignat** et al., 2011). Toutes les plantes en contiennent à des degrés différents (**Palici**, 2016).

On raison de leurs potentiels chélateurs d'ions métalliques et la précipitation des protéines, les tanins ont des effets divers sur les systèmes biologiques (**Ignat** et al., 2011).

D'après leurs structures et leurs propriétés, deux types de tannins sont distingués: les tannins hydrolysables et les tannins condensés :

- ✓ Les tanins hydrolysables : sont des dérivés de l'acide gallique (**Ignat** et al., 2011), ils sont des oligo ou polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol (**Bruneton**, 1993).

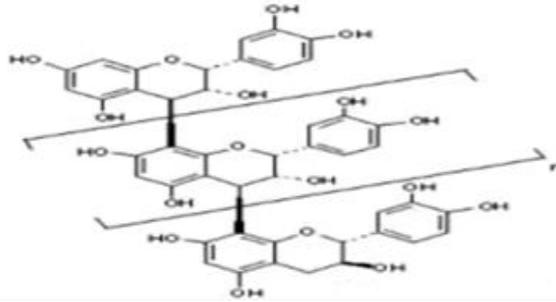


Figure 12: Exemple d'un tannin hydrolysable (pentagalloylglucose) (Ignat et al.,2011)

- ✓ Les tanins condensés : (ou proanthocyanidines) sont des oligomères hétérogènes dont la structure est liée aux flavan 3-ols et flavan 3,4- diol. Ils sont distingués en procyanidine (dérivé de catéchine, épicatechine et leurs esters galliques) et en prodelphinidines (dérivés de gallocatéchine, épigallocatéchine et leurs esters galliques). (Ignat et al., 2011).

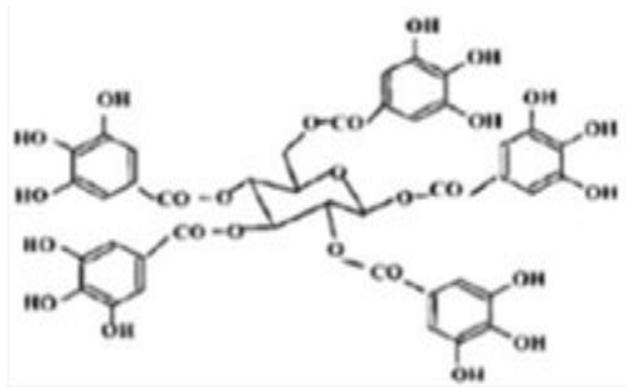


Figure 13: Exemple d'un tannin (polymère de procyanidine) (Ignat et al.,2011)

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

Cette étude expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA), elle se compose de deux parties :

- ❖ La première partie : dosages quantitatifs des polyphénols totaux, flavonoïdes et des tanins.
- ❖ La deuxième partie : évaluation de l'activité antioxydante en utilisant trois techniques : La capacité antioxydante totale, le piégeage du radical libre (DPPH) et le pouvoir réducteur de fer.

1. Matériel végétal

La plante *Arisarum vulgare* a été récoltée dans la région de Maghnia-Tlemcen, le mois d'avril 2019.

Le tubercule (Photo) a été séparé en deux, la croûte et la partie interne. Les deux parties ont été séchées dans un endroit bien aéré, à une température ambiante.



Photo : le tubercule d'*Arisarum vulgare*

2. Extraction à reflux par des solvants à polarité croissante

50 g de chacune, la croûte et la partie interne du tubercule d'*Arisarum Vulgare* ont été broyés séparément et soumis à une extraction à reflux dans des solvants à polarité croissante selon la méthode décrite par (Chaouche et al., 2015). D'abord dans 300 mL d'hexane pendant 1 heure et demi pour éliminer les matières grasses, ensuite dans 300 mL de dichlorométhane pendant 2 heures et enfin dans un mélange de trois solvants (méthanol-acétone-eau) (70/20/10 : V/V/V) à peu près 1000 ml pendant 2 heures également. Les extraits obtenus sont filtrés puis évaporés via un rotavapeur et maintenus à sec pour les analyses ultérieures.

Le rendement (Rdt) de l'extrait sec est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Rdt \%} = \frac{P1 - P2}{P3} \times 100$$

P1 : Poids du ballon après évaporation ;

P2 : Poids du ballon avant évaporation (ballon vide) ;

P3 : Poids de la matière végétale sèche de départ.

3. Quantification de quelques classes phénoliques dans les extraits

3.1 Les polyphénols totaux

Le réactif utilisé « Folin-Ciocalteu », est un mélange de complexes d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) et d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) de couleur jaune. Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif. Cette oxydation entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu qui absorbe à 750 nm. Ce dosage est réalisé par la comparaison de la densité optique (DO) observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue.

Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par (Vermerris et al., 2006) : Une prise de 100 μ L de l'extrait est mélangée avec 2 mL d'une solution de carbonate de sodium à 2% fraîchement préparée, le tout est agité par un vortex. Après 5 min, 100 μ L du réactif de Folin-Ciocalteu (1N) sont additionnés au mélange, le tout est laissé à température ambiante pendant 30 min et la lecture est réalisée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 750 nm.

Une gamme étalon à base de l'acide gallique est également préparée à des concentrations allant de 0 à 500 μ g/mL. Les teneurs en Polyphénols totaux des extraits sont alors exprimées en milligramme équivalent acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg EAG/g MS).

3.2 Les flavonoïdes

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par deux réactifs incolores, le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et le nitrite de sodium ($NaNO_2$). Elle entraîne la formation d'un complexe brunâtre qui absorbe à 510 nm. La comparaison de la DO observée

à celle obtenue par un étalon de catéchine de concentration connue permet d'évaluer la teneur totale en flavonoïdes.

La quantification des flavonoïdes est faite selon une méthode colorimétrique décrite par (Dewanto et al., 2002). Une prise de 250 µL d'extrait dilué est ajoutée de 75 µL d'une solution de NaNO₂ à 5%.

Après incubation pendant 6 min à température ambiante, 150 µL d'une solution fraîchement préparée de chlorure d'aluminium (AlCl₃, 10%) est ajouté au mélange. Après repos à température ambiante pendant 5 min, 500 µL de soude (NaOH, 1M) est ajouté au mélange. Le volume final est porté à 2,5 mL avec de l'eau distillée. L'absorbance de cette préparation est mesurée contre un blanc à 510 nm. Une gamme étalon à base de catéchine est également préparée à des concentrations allant de 0 à 500 µg/mL. Les teneurs en flavonoïdes des extraits sont alors exprimées en milligramme équivalent catéchine par gramme de la matière sèche (mg EC/g MS).

3.3 Les tanins condensés

Les tanins condensés en présence d'acide chlorhydrique se dépolymérisent et par réaction avec la vanilline, se transforment en anthocyanidols de couleur rouge, mesurables par spectrophotométrie à 500 nm. Une prise de 50 µL d'extrait est ajoutée à 3 mL de vanilline à 4% et 1,5 mL du chlorure d'hydrogène (HCl). Après homogénéisation, le mélange est mis en incubation pendant 15 min à température ambiante. L'absorbance est mesurée contre un blanc à 500 nm. Les teneurs en tanins condensés, déterminées en se référant à une gamme étalon de catéchine (0 à 500 µg/mL), sont exprimées en milligramme équivalent catéchine par gramme de la matière sèche (mg EC/ g MS) (Sun et al., 1998).

4. Détermination de l'activité antioxydants, in vitro

4.1 La capacité antioxydante totale

Ce test est basé sur la réduction du molybdène (VI) en molybdène (V) par l'extrait de plante. Cette réduction induit, à pH acide, la formation du complexe phosphate/Mo (V) de couleur verte. Une prise de 100 µL d'extrait est combinée dans un tube avec 1 mL de solution composée d'acide sulfurique (0,6 N), de phosphate de sodium (28 mM) et de molybdate d'ammonium (4 mM). Les tubes sont incubés à 95 °C pendant 90 min. Après un repos de 6 min à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 695 nm contre un blanc contenant du méthanol à la place de l'extrait. Comme pour les polyphénols totaux, l'activité antioxydant

totale est exprimée en milligramme équivalent acide gallique par gramme de la matière sèche (mg EAG/g MS) (Prieto et al., 1999).

4.2 Le piégeage du radical DPPH

Le DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radical libre et la simplicité de l'analyse. Il absorbe dans le visible à une longueur d'onde de 515 à 520 nm. La méthode de DPPH présente plusieurs avantages du fait qu'elle soit indépendante, simple et rapide. Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette), en présence des molécules dites « antioxydants » afin de mesurer leur capacité à réduire ce radical (figure 14). La forme réduite (de couleur jaune) n'absorbe plus, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde.

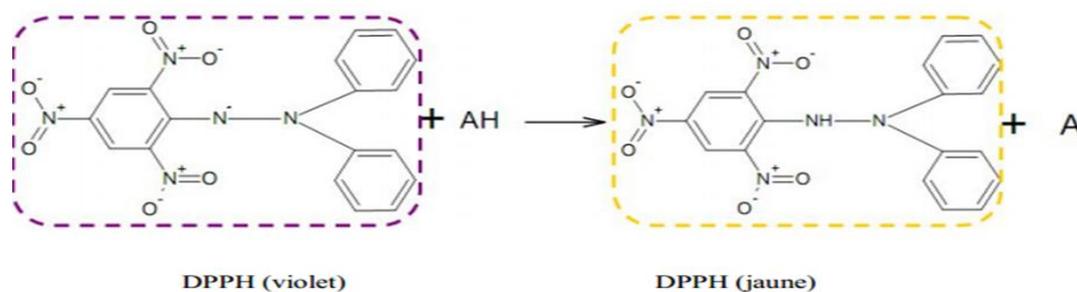


Figure 14: Forme réduit du radical DPPH

A différentes concentrations, 50 µL de chaque échantillon, sont ajoutés à 1950 µL d'une solution méthanolique de DPPH à $6,34 \times 10^{-5}$ M (0,0025 g dans 100 mL méthanol). Pour chaque concentration un blanc est préparé. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé, en parallèle, en mélangeant 50 µL du méthanol avec 1950 µL d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée. Après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, la réduction de DPPH s'accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune de la solution. La lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le témoin positif utilisé est le butylhydroxyanisol (BHA). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition, calculé suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange, à l'aide de la formule suivante (Atoui et al., 2005) :

$$PI = (DO_{\text{témoin}} - DO_{\text{extrait}} / DO_{\text{témoin}}) \times 100$$

PI : pourcentage d'inhibition.

$DO_{\text{témoin}}$: absorbance du témoin négatif.

DO_{extrait} : absorbance de l'extrait.

L'étude de la variation de l'activité anti-radicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (CI_{50}). Une valeur faible de CI_{50} correspond à une grande efficacité de l'extrait.

4.3 Le pouvoir réducteur de fer

L'activité réductrice d'un extrait est évaluée par la réaction d'oxydoréduction entre l'extrait et les ions métalliques de transition, notamment le fer. Le ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ fournit des ions Fe^{3+} qui seront réduits en Fe^{2+} par les antioxydants présents dans l'extrait végétal. Le pouvoir réducteur est déterminé selon la méthode décrite par **Oyaizu**, en 1986. Cette méthode consiste à mélanger 1 mL de l'extrait à différentes concentrations avec 2,5 mL de tampon phosphate 2,2 M à pH 6,6 et 2,5 mL d'une solution de $K_3Fe(CN)_6$ à 1% (m/v). Le mélange obtenu est incubé pendant 20 min à 50°C, puis 2,5 mL d'acide trichloracétique à 10% (m/v) sont ajoutés pour arrêter la réaction.

2,5 mL du mélange sont additionnés de 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL de $FeCl_3$ à 0,1% (m/v). La lecture de l'absorbance se fait à 700 nm contre un blanc. Les résultats permettent de calculer la concentration efficace (CE_{50}), concentration de l'extrait correspondante à une absorbance égale à 0,5 obtenue par l'interprétation de la courbe de régression linéaire ($D.O = f([])$). L'activité de l'extrait est enfin comparée à celle de témoin positif, le butylhydroxyanisole (BHA).

Résultats et discussion

1. Introduction

La croûte et la partie interne de tubercule d'*Arisarum vulgare* ont été choisis séparément pour la réalisation des extractions sous reflux par épuisements successifs, en utilisant des solvants de polarité croissante, l'hexane, le dichlorométhane et le mélange méthanol (70%) acétone (20%) eau distillée (10%), en séparent les molécules en fonction de leur affinité aux solvants (figure 15), dans le but de simplifier le dernier extrait. Les extraits polaires de la croûte et de la partie interne servent à quantifier les composés phénoliques et l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante.

Après chaque extraction successive, on obtient un extrait différent d'aspect, de couleur et de rendement (tableau 05).

Tableau 5: Aspects et couleurs des extraits obtenus par extractions successives aux reflux

Tubercule	La croûte			La partie interne (blanche)		
	H	Dich	M A E	H	Dich	M A E
Extrait sec	H	Dich	M A E	H	Dich	M A E
Aspect	Visqueux	Poudre	Pâte collante	visqueux	poudre	Pâte collante
Couleur	Caramel	caramel	Marron foncé	caramel	caramel	Marron foncé

H:hexane

Dich : dichlorométhane

M A E : mélange de méthanol (70%) acétone (20%) eau distillée (10%)

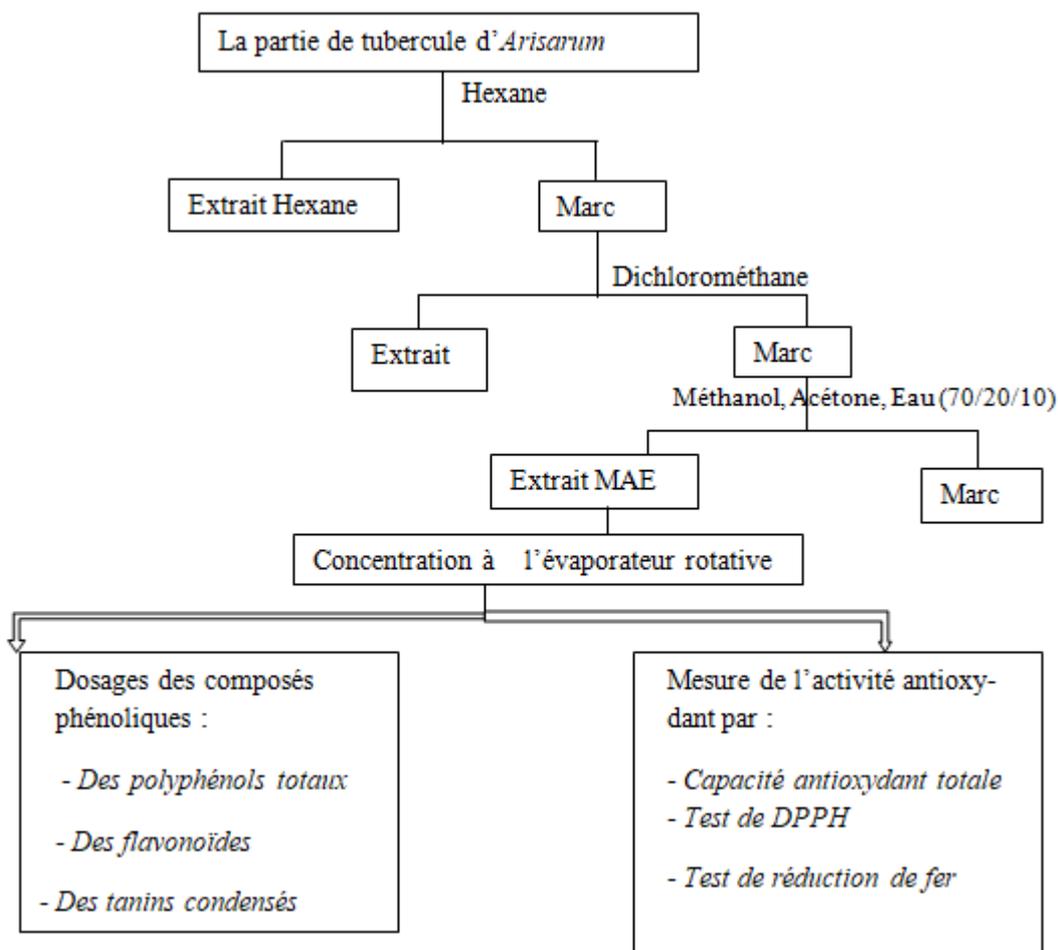


Figure 15: Etapes de la réalisation de l'étude phytochimique et l'activité antioxydante de deux extraits tubercule d'*Arisarum vulgare*

2. Rendements des extraits hydro-acéto-méthanolique

Après avoir effectué la préparation des extraits, ont été pesés pour déterminer le poids sec, d'après les résultats, il n'y a pas une grande différence entre le rendement des deux extraits où le rendement de l'extrait de la croûte égale 6.5% légèrement supérieur à celle de l'extrait de la partie interne égale 5%.

3. Dosages des composées phénoliques

Les polyphénols constituent l'une des principales classes de métabolites secondaires suscitent un grand intérêt de par leurs nombreux effets bénéfiques. De ce fait des dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés, ont été effectués pour deux extraits hydro-acéto-méthanoliques par des méthodes spectrophotométriques.

3.1 Teneur en phénol totaux

La teneur des composés phénoliques des deux extraits se fait selon la méthode de décrite par (Vermeris et al., 2006), par l'utilisation de réactif de «Folin-Ciocalteu». C'est un mélange de complexes d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de couleur jaune forme un complexe molybdène-tungstène de couleur bleue par l'oxydation des composés phénoliques (Boizot et al., 2006).

La quantification des phénols totaux à a été faite grâce à une courbe d'étalonnage (figure 16) réaliser avec un extrait d'acide gallique, dans une gamme de concentrations allant de 62,5 à 500 mg/ml.

Les résultats exprimés en milligrammes équivalents à l'acide gallique (mg EGA) par gramme de matière sèche.

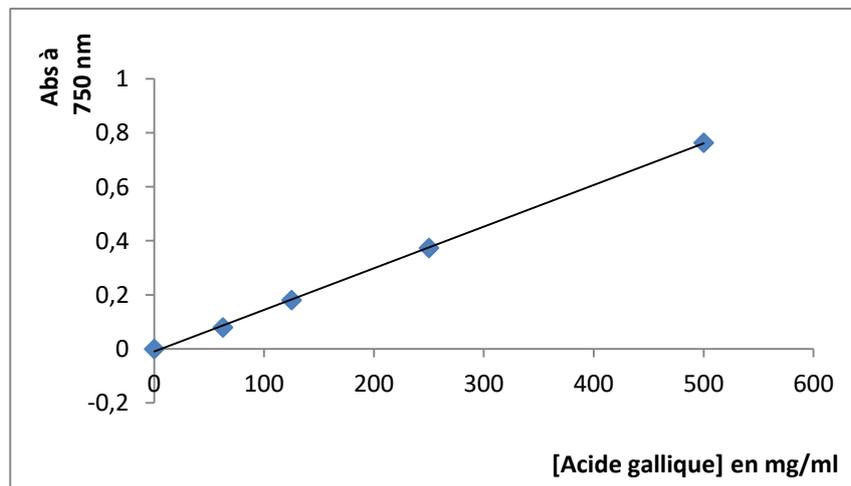


Figure 16: Courbe d'étalonnage de l'acide

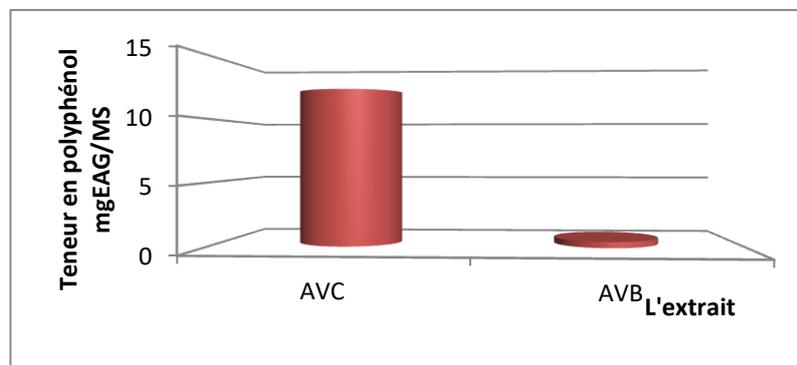


Figure 17: Histogrammes du teneur en polyphénol des

AVC : l'extrait de la croûte de tubercule

AVB : L'extrait de la partie interne de tubercule

Comme montré la figure ci-dessus, il y a une grande différence dans la teneur des polyphénols dans les deux extraits qui sont passés par le même protocole d'extraction 12,33 mg EAG/g MS pour la croûte de tubercule et 0,47 mg EAG/g MS pour la partie interne.

Les travaux de (Kadri, 2017) montrent que le tubercule complet non séparé de la même plante, récolté d'El kala (nord-est algérien), présente une teneur en polyphénol dans l'extrait hydro-méthanolique égale à 12,686 mg EAG/g MS et 0,8872 mg EAG/g MS dans l'extrait méthanolique. Le premier est très similaire avec notre résultat de l'extrait de la croûte. D'autre part les travaux de (Çiğdem et al., 2017) ont démontré une teneur plus importante dans l'extrait éthanolique du tubercule complet (37,8 mg EAG/g MS).

3.2 Teneur des extraits en flavonoïdes totaux

L'estimation de la concentration des flavonoïdes dans les deux extraits effectués par une méthode colorimétrique décrite par (Dewanto et al., 2002). Les taux des flavonoïdes des deux extraits obtenus à partir de la droite d'étalonnage de catéchine (figure 18). Les quantités rapportées en mg équivalent de catéchine par gramme du matériel végétal.

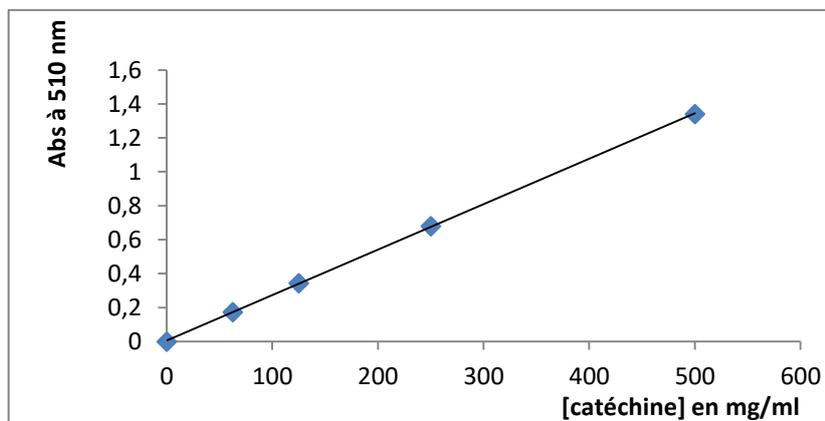


Figure 18: Courbe d'étalonnage de catéchine

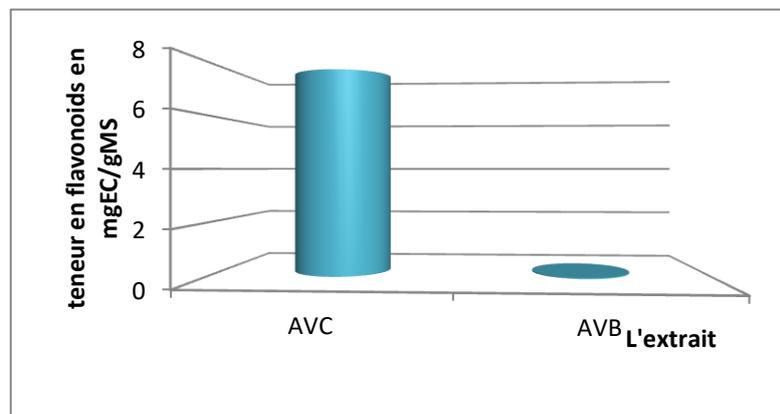


Figure 19: Histogramme de teneur en flavonoïde des extraits

AVC : l'extrait de la croûte de tubercule

AVB : L'extrait de la partie interne de tubercule

Comme dans les résultats des teneurs en phénols aussi dans les teneurs en flavonoïdes (figure 19), il y a une différence significative entre les deux parties étudiées, l'extrait de la croûte 7,69 mg EC/g MS et de la partie interne 0,029 mg EC/g MS.

Notre valeur de l'extrait de la croûte est plus élevée par rapport aux teneurs déterminées par (Kadri, 2017) dans les deux extraits du tubercule qui sont 1,4403 mg EC/g MS pour l'extrait hydro-méthanolique et 1,239 mg EC/g MS pour l'extrait méthanolique.

3.3 Teneur des extraits des tanins condensés

Des dosages spectrophotométriques ont été effectués pour déterminer la teneur en tanins condensés à partir des extraits hydro-acéto-méthanoliques des tubercules de l'*Arisarum vulgare*, les taux des tanins des deux extraits ont été obtenus à partir de la courbe d'étalonnage de catéchine (figure 20) qui suit une équation de type $Y = 0,00033x + 0,00097$ avec un coefficient de détermination $R^2 = 0,99950$.

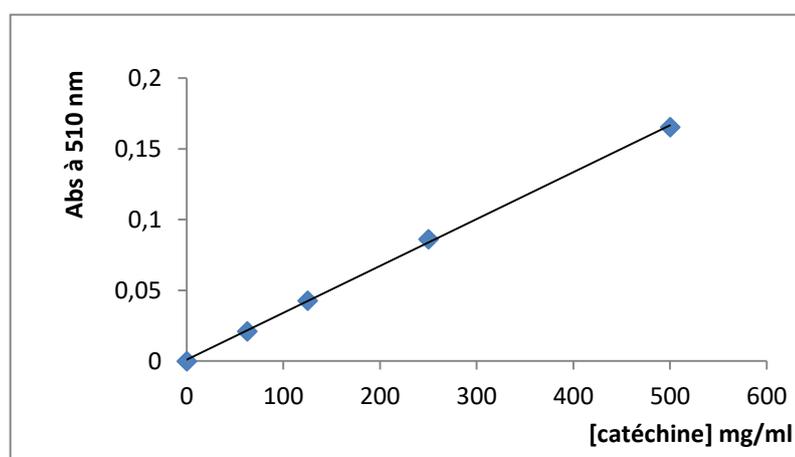


Figure 20: Courbe d'étalonnage de catéchine

Pour l'extrait hydro-acéto-méthanolique de la partie blanche, le résultat est nul ne contient pas des tanins, tandis que l'extrait d'hydro-acéto-méthanolique de la croûte contient une faible quantité estimée à 0,2208 mg EC/g MS.

4. Evaluation de l'activité antioxydant

Trois techniques sont menées pour évaluer l'activité antioxydant des deux extraits hydroacétométhanoliques. Les techniques sont la capacité antioxydante total, DPPH et FRAP.

4.1 Capacité antioxydante totale

La figure 21 présente la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, à travers lequel la capacité antioxydante totale (CAT) des deux extraits a été déterminée, les résultats sont exprimés en milligramme équivalent acide gallique par gramme de matière sèche.

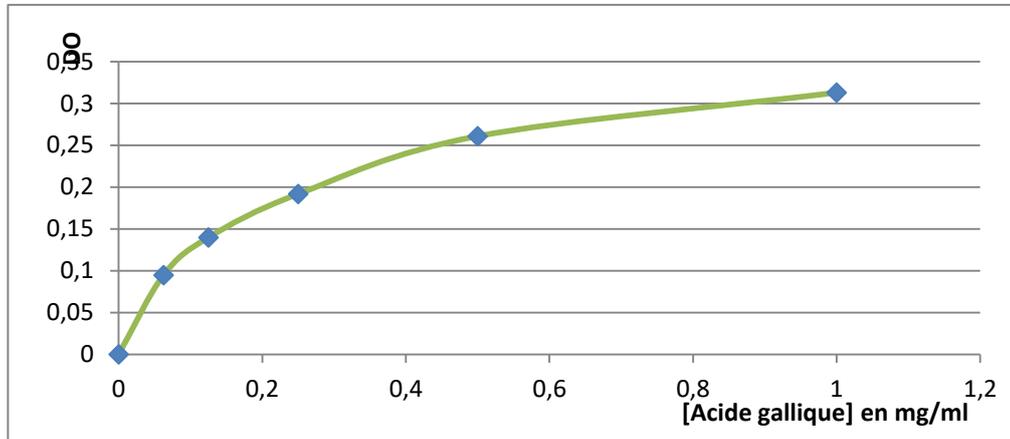


Figure 21: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour la détermination de la capacité antioxydante totale

Comme la montre la figure ci-dessous, il existe une différence importante dans la CAT entre les deux extraits ; l'extrait de la partie croûte avec 0,75 mg EAG/g MS est plus puissant par rapport à celle de la partie interne (blanche) 0,006 mg EAG/g MS.

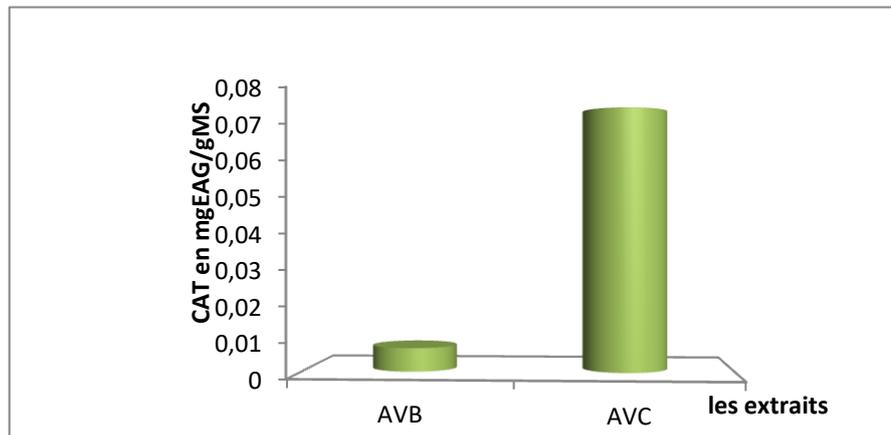


Figure 22: capacité antioxydante totale des extraits hydro-acéto-méthanoliques

4.2 Piégeage du radical libre DPPH

L'activité antioxydante a été vérifiée spectrophotométriquement par le test de DPPH, en présence des antioxydantes dans les extraits de la plante. Le radical libre DPPH (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl) de couleur violette réduite en (2,2 Diphényl 1 picryl hydrazine)

de couleur jaune. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance en mesurant à 517 nm (Molyneux, 2004).

Deux gammes de concentrations ont été faites : pour l'extrait de la croûte de tubercule, allant de 0,25 à 3 mg/ml et pour l'extrait de la partie interne de tubercule, allant de 0,5 à 5 mg/ml. En comparant les résultats avec celle d'antioxydante de synthèse BHA.

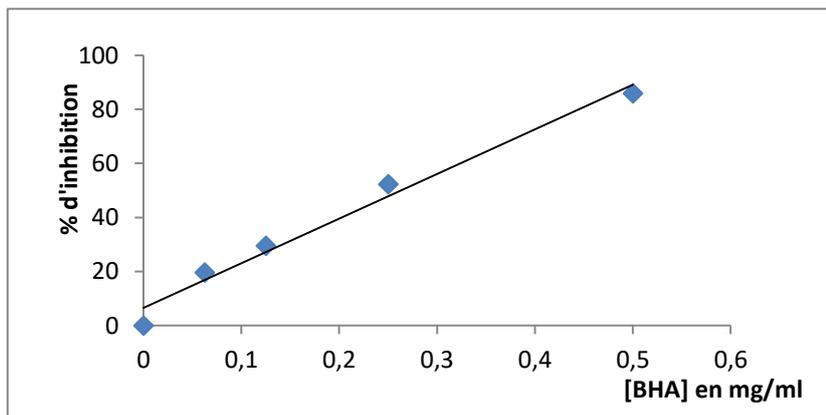


Figure 23: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de différentes concentrations de BHA

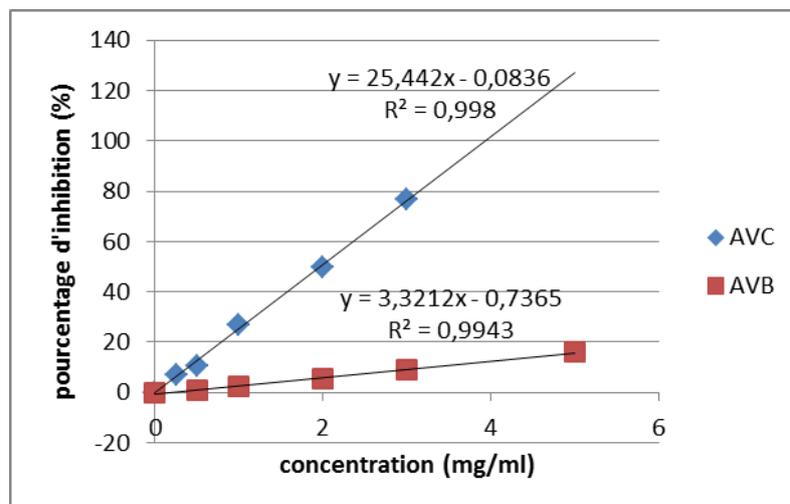


Figure 24: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits

A une faible concentration de 0,5 mg/ml l'antioxydante de synthèse BHA révèle une activité importante, plus de 85 % d'inhibition du DPPH ; à cette concentration les deux extraits montrent une très faible concentration, n'atteindre pas 1 % pour l'extrait de la partie interne de tubercule et 10,76 % pour l'extrait de la croûte de tubercule.

En comparant nos résultats avec l'étude effectuée par (Çiğdem et al.,2017), sur un extrait éthanolique de la partie souterraine d'*Arisarum vulgare*, qui a montré que l'extrait exerce un effet piègeur anti-radicalaire plus élevé 84,32% à une faible concentration 1mg/ml.

Pour mieux caractériser le pouvoir anti radicalaire, les résultats sont exprimés en termes d'CI₅₀ (concentration de substrat qui inhibe 50% de radicaux DPPH présents dans le milieu réactionnel).

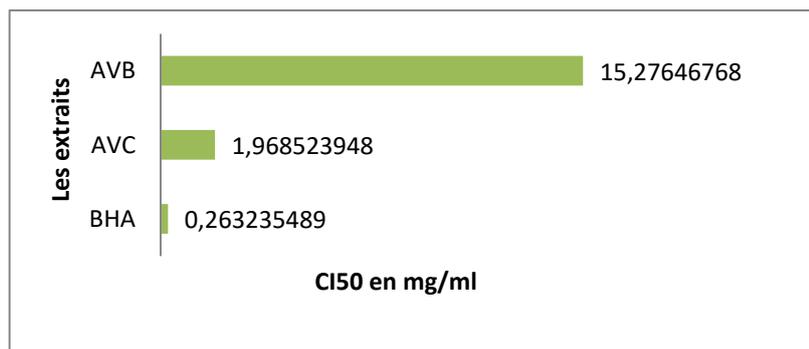


Figure 25: Valeurs d'IC₅₀ des extraits hydro-acéto-méthanolique et du BHA par la méthode de piégeage du radical libre DPPH

A partir de la figure 25 on remarque que l'IC₅₀ de la croûte de tubercule (1,96 mg/ml) est plus puissant à celle de la partie interne de tubercule (15,27 mg/ml), mais il reste faible, en comparant avec l'antioxydante de synthèse BHA (0,26 mg/ml). Comme le pourcentage d'inhibition révélé par (Çiğdem et al.,2017) est plus élevé, cela fait que la CI₅₀ sera moins faible (0,089 mg/ml).

4.3 Pouvoir réducteur de fer

Dans cette méthode, la détermination de l'activité antioxydante est basée sur la capacité des antioxydants présents dans l'extrait à réduire le fer ferrique Fe³⁺ en fer ferreux Fe²⁺, en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleue dans le milieu réactionnel à 700 nm de ce dernier pour évaluer l'activité antioxydante.

A partir des valeurs des DO obtenues par des dilutions en cascade des deux extraits de la plante et l'antioxydante de synthèse ; On a tracé des courbes linéaires (figure 26).

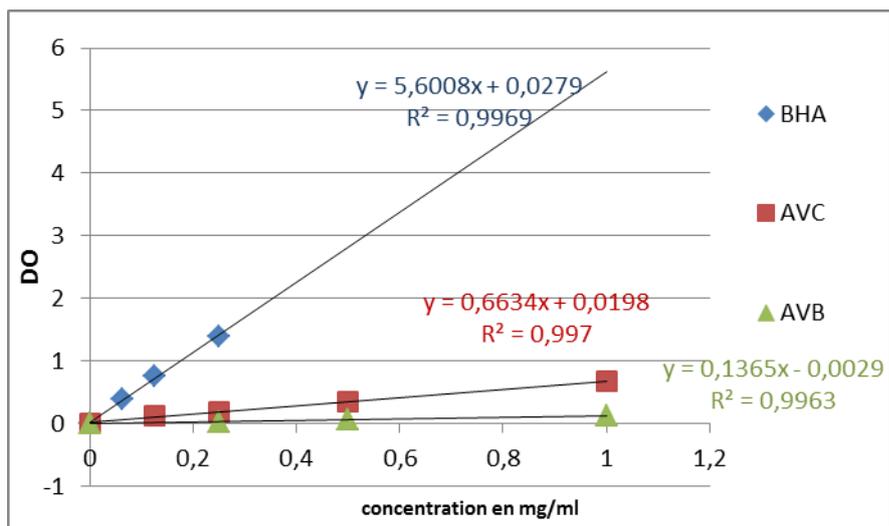


Figure 26: Pouvoir réducteur de fer des extrait et de l'antioxydante de synthèse

A partir de courbes obtenues, on remarque que la capacité des extraits de réduire le Fer est largement inférieure à celle de BHA. A la concentration de 1 mg/ml la partie interne révèle une activité réductrice très faible (presque nul) par rapport à l'extrait de la croûte (DO=0,68) et le BHA (DO=1,4) à concentration de 0,25 mg/ml.

Pour bien définir la capacité antioxydante, on détermine la concentration efficace CE₅₀ qui correspond à une absorbance égale à 0,5 les valeurs sont exprimées en mg/ml dans la figure 27.

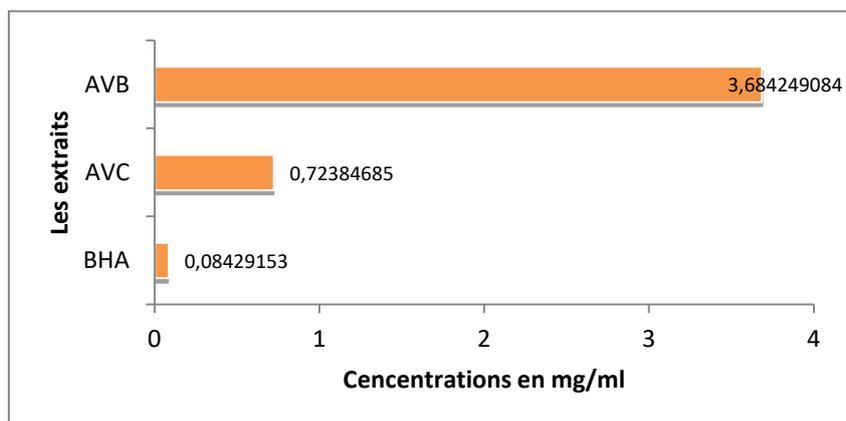


Figure 27: Pouvoir réducteur de fer exprimé par les valeurs de CE₅₀ des extraits et de l'antioxydante de synthèse

Les résultats obtenus montrés que l'extrait de la partie interne de tubercule (AVB) à une valeur de 3,68 mg/ml supérieures à celle de l'extrait de la croûte et de BHA donc indiquée une faible capacité réductrice et donc une faible activité antioxydante. Par contre l'extrait de la croûte (AVC) enregistre une CE₅₀ la plus basse (0,72 mg/ml) donc il possède la meilleure

capacité réductrice ce qui se traduit une meilleure activité antioxydante par rapport à l'extrait d'AVB.

La capacité de réduction de fer par les extraits testés sont classées comme suit BHA>AVC>AVB.

Conclusion générale et perspectives

De nos jours, notre pays possède une grande biodiversité végétale qui reste à découvrir et une grande partie de cette flore est constitué par des espèces médicinales qui ne sont pas évaluée scientifiquement. Donc le travail que nous avons entrepris a pour but principal la contribution à une meilleure connaissance de ces espèces végétale.

Dans le présent travail, ont été étudié différent aspect de tubercule d'*Arisarum vulgare*, en tant qu'une analyse quantitative de ses composés phénolique : les polyphénols totaux, les flavonoïdes et les tanins condensé, et aussi la détermination du potentiel anti-radicalaire et réducteur par trois méthodes : la capacité antioxydante totale, le piégeage de radical libre DPPH et le pouvoir réducteur du Fer.

L'extraction sous reflux de la partie sous terrain d'*Arisarum vulgare* la croute et la partie interne permis d'obtenir des rendements qui différent en fonction des solvants utilisée, alors que la teneur en composé phénolique la croute possède la teneur la plus élevée en polyphénols totaux (12.33 mg EAG/g MS) et en flavonoïdes (7.69 mg EC/g MS) par rapport à la partie interne, tandis que les tanins condensés la croûte contient une très faible quantité (0.2208 mg EC/g MS) et la partie interne est nul. Pour la capacité antioxydante totale ont révèle que la croute possède une capacité la plus puissant (0.75 mg EAG/g MS) a celle de la partie interne (0.006 mg EAG/g MS) est le moins actif. En effet le potentiel anti-radicalaire et réductrice le montrent que l'extrait de la croute indique des propriétés remarquables, avec un CI_{50} de (1.96 mg/ml) et une CE_{50} de (0,72 mg/ml). Mais restent des activités plus moins actives par rapport au BHA.

A la suite de ces résultats, la plante sélectionnée contient des agents antioxydants très intéressantes seulement dans la croute de tubercule, qui peuvent être employée pour les applications thérapeutiques.

Globalement, ces résultat obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche scientifique, donc une étude biologique in vivo est souhaitable pour montrer une vue plus approfondie sur les activités antioxydante, antidiabétique et anti-inflammatoire. Enfin, il est primordial d'évaluer leur effet cytotoxique de cette plante envers un modèle de cellule animale.

Références bibliographiques

- (1) Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., Lomri, A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74(4), 324-329.
- (2) 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.
- (3) Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin M., Cazin J C., Pinkas M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei. Forschung*, 46, 1086-1089.
- (4) Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191–203.
- (5) Baran, J. M., (2000). Daturas, plantes magiques, hallucinogènes et médicinales à l'île de la Réunion et dans le monde. (Thèse de doctorat) : médecine. Université de Nancy. France.114p
- (6) Barouki, R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *médecine/sciences*, 22(3), 266- 272.
- (7) Benjilali, B., Zrira, S., (2005). Plantes Aromatiques et Médicinales : Atouts du secteur et exigences pour une valorisation durable. Actes Editions, Rabat, 346 p
- (8) Bensegueni, A., (2007). Etude théorique des métabolites secondaires des végétaux et des composés de synthèse sur le plan de l'activité biologique : simulation par docking (arrimage) moléculaire sur la lipoxygénase et la cyclooxygénase. (Thèse de doctorat) : Biochimie appliquée. Université Mentouri Constantine. 91p.
- (9) Block, G. (1992). Vitamin C status and cancer. Epidemiological of reduced risk. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 669, 280–90.
- (10) Bonnard, C., Durand, A., Peyrol, S., Chanseume, E., Chauvin, M., Morio, B., Vidal, H., Rieusset, J. (2008). Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress

in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *Journal of Clinical Investigation*, 118(2), 789-800.

- (11) Bougandoura, N., Bendimerad, N. (2012). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technologie*, 9, 14 – 19.
- (12) Bouque, V. (1997). Etude de la production de métabolites secondaires par des cultures in vitro de Psoralées (Leguminosae). (Thèse de doctorat): Sciences Agronomiques. Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL). Ecole Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires. 200p
- (13) Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation, 2ème Edition, Lavoisier, Paris. France. 274-285.
- (14) Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. Technique et Documentation, 4ème édition, Lavoisier, Paris. France. 1288 p.
- (15) Chaouche, T. M., Haddouchi, F., Atik-Bekara, F., Ksouri, R., Azzi, R., Boucherit, Z., Larbat, R. (2015). Antioxidant, haemolytic activities and HPLC–DAD–ESI–MSn characterization of phenolic compounds from root bark of *Juniperus oxycedrus subsp. Oxycedrus*. *Industrial Crops and products*. Elsevier, 1-6.
- (16) Deby, C., Goutier, R. (1990). New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochemical Pharmacology*, 39(3), 399- 405.
- (17) Delattre, J., Beaudeau, J., Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant. Technique et Documentation, 1ère édition. Paris. France.
- (18) Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(10), 3010-3014.
- (19) Evans, P., Halliwell, B. (1999). Free radicals and hearing: Cause, consequence, and criteria. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 884, 19-40.
- (20) Favier, A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64(6), 390-396.

- (21) Favier, A., (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, 108 – 115.
- (22) Ferrer-Gallego, P., (2014). Typification of *Arisarum vulgare* O. Targ. Tozz. (Araceae). *Candollea*, 69(2), 115-118.
- (23) Gardes-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?. *L'actualité chimique*, 278 (277), 57- 64.
- (24) Ghedira, K., (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.
- (25) Gibernau, M., Quilichini, A. (2015). La pollinisation des Aracées (1ère partie) : des « histoires » d'Amour. *Botanique - Jardins de France*, 636, 31-34.
- (26) González, J. A., Vallejo, J. R., Amich, F. (2018). *Arisarum vulgare* Targ. Tozz. In : *Inventario Español de los Conocimientos Tradicionales Relativos a la Biodiversidad*. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, de l'Alimentation et de l'Environnement (MAPAMA), 1ère Edition, 58-59.
- (27) Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*, 62, 628 – 638.
- (28) Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., Poutanen, H. (2010). Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 1365-1402.
- (29) Harrison, R. (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase where are we now?. *Free radical biology and medicine*, 33(6), 774-797.
- (30) Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity Relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572–584.
- (31) Hennebelle, T., (2006). Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants. (Thèse de Doctorat) : Chimie Organique et Macromoléculaire. Université des sciences et technologies de Lille-Lille 1.304p.

- (32) Henriksen, T., Mahoney, E., Steinberg, D. (1983). Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 3(2), 149-159.
- (33) Ignat, I., Volf, I., Popa, I.V. (2011). A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry*, 126, 1821-1835
- (34) Iwashina, T. (2000). The structure and distribution of the flavonoids in Plants. *Journal of Plant Research*, 113, 287-299.
- (35) Judd, W. S., Campbel, C. S., Kellogge, A., Stevens, P. (2002). *Botanique systématique, une perspective phylogénétique*. 1ère Edition, Université De Boeck, Bruxelles, Paris. France. 467 p.
- (36) Kadri, H., (2017). *Etude phytochimique de quelques plantes de la Numidie Algérienne. (Thèse de doctorat): Synthèse et Développement de Molécules Bioactives*. Université Badjimokhtar Annaba.173p.
- (37) Kamra, D.N., Agarwal, N., Chaudhary L.C. (2006). Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series*, 1293, 156–163.
- (38) Koach, J., Galil, J. (1986). The breeding system of *Arisarum vulgare targ-tozz*. *Israel Journal of Botany*, 35, 79-90.
- (39) Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et supplémentation antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans la maladie respiratoire. *Nutrition Clinique & Métabolisme*, 20, 165 – 177.
- (40) Kossel, H. (1891). Über die chemische zusammensetzung der zelle. *Archives of Physiology and Biochemistry. Archiv für Anatomie, Physiologie* : 181-186.
- (41) Krause, K.H. (2004). Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 57, 28-29
- (42) Lamkadem, M., AZIZ, M., Schwob, I., Rabier, J., Mimouni, J., Fontonge, R., Melhaoui, A. (2004). Cytotoxic effect and electrophysiological study on human mrc-5

fibroblasts of r-irniine, a natural alkylypyrrolidine alkaloid. *Natural Product Research*, 18, 311-318.

- (43) Leverage, X., (2009). Stress oxydant et antioxydants ?. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 44(5), 219-224.
- (44) Macheix, J. J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. Edition Lausanne, Presses Polytechniques & Universitaires Romandes, 192p.
- (45) Macheix, J.J., (1996). Les composés phénoliques des végétaux: quelles perspectives à la fin du XXème siècle. *Acta botanica gallica*, 143(6), 473-479.
- (46) Martin, S., Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angiologie*, 51, 304-315.
- (47) Martínez-Cayuela, M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, 77 : 147-161.
- (48) Mates, J. M., Pérez-Gomez, C., De Castro, I. N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 32(8), 595-603
- (49) Melhaoui, A. (1998). A new toxic alkylypyrrolidine alkaloid from *Arisarum vulgare*. *Planta Medica*, 64, 476-477.
- (50) Melhaoui, A., Bodo, B. (1995). Irnigaine and N-methylirnigaine, two new piperidinol alkaloids from the tubers of *Arisarum vulgare*. *Natural Product Letters*, 7, 101-108.
- (51) Melhaoui, A., Jossang, A., Bodo, B. (1992). Structure of irniine a pyrrolidine alkaloid from *Arisarum vulgare*. *Journal of Natural Products*, 55, 950-952.
- (52) Melhaoui, A., Mallea, M., Jossang, A., Bodo, B. (1993). Antibiotic and antifungal pyrrolidine alkaloids, from *Arisarum vulgare*. *Natural Product Letters*, 2(3), 237-242.
- (53) Menvielle-Bourg, F. J. (2005). La superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale. *Phytothérapie*, 3, 118 – 121.

- (54) Merghem, R. (2009). Element de biochimie végétale, 1ier Edition, Edition Bahaeddine, 107-133.
- (55) Morel, J. M. (2008). Traité pratique de phytothérapie: remèdes d'hier pour médecine de demain. Grancher, Paris. France. 620p.
- (56) Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. The Japanese journal of nutrition and dietetics, 44(6), 307-315.
- (57) Pacher, P., Beckman, J., Liaudet, L. (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. Physiological Reviews, 87(1), 315-424.
- (58) Palici, I.F. (2016). Valorisation des activités biologiques de certaines espèces végétales sahariennes nord-africaines. (Thèse de doctorat) : Biologie végétale. Université de Bordeaux. Ecole Doctorale Sciences de l'Environnement.151p.
- (59) Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxydant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamine E. Analytic Biochemistry, 269, 337-341.
- (60) Prochazkova, D., Bousova, I., Wilhelmova, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. Fitoterapia, 82, 513-523
- (61) Psotová, J., Lasovsky, J., Vicar J. (2003). Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. Biomedical Papers, 147(2), 147-153.
- (62) Quezel, P., Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et méridionales. Tome II, édition Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. 1963.
- (63) Rakba, N., Melhaoui, A., Loyer, P., Delcros, J.G., Morel, I., Lescoat, G. (1999). Bgugaine, a pyrrolidine alkaloid from *Arisarum vulgare*, is a strong hepatotoxin in rat and human liver cell cultures. Toxicology Letters, 104, 239-248.
- (64) Rezaire, A. (2012).Activité anti-oxydant et caracterisation phénolique du fruit de palmier amazonien oencarpus bataua (patawa). (Thèse de Doctorat) : Phytochimie. université des Antilles et de la Guyane.208p.

- (65) Rhodes, M. J. C. (1994). Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. *Plant Molecular Biology*, 24(1), 20.
- (66) Rochette, L., (2008). Stress oxydant et sepsis. *Réanimation*, 17(6), 1-4.
- (67) Sahnoun, Z., Jamoussi, K., Zeghal, K.M. (1997). Free radicals and antioxidants: human physiology, pathology and therapeutic aspects. *Thérapie*. Jul-Aug, 52(4), 251-70.
- (68) Salvayre, R., Auge, N., Nègre-Salvayre, A., Toussaint, M. P., Jacob, L., Lagrost J. (2003). Rôle de l'oxydation dans la genèse et la progression de l'athérosclérose. *L'athérosclérose: physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques*. Champan, Eds. Masson: Paris, 14, 269-290.
- (69) Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 1-26.
- (70) Sofowora, A. (2010). *Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique*. Edition Karthala. Paris. 22p.
- (71) Speckmann, B., Steinbrenner, H., Grune, T., Klotz, L. (2016). Peroxynitrite: From interception to signaling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 595,153-160.
- (72) Stevenson, D., Hurst, R. (2007). Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more?. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(22), 2900-2916.
- (73) Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(10), 4267-4274.
- (74) Tapas, A. R., Sakarkar, D. M., Kakde, R. B. (2008). Flavonoids as nutraceuticals. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1089-1099.
- (75) Théron, P. (2003). Le sélénium : Un oligo-élément essentiel pour la santé humaine. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 38 (4), 250-256.

- (76) Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231-1246.
- (77) Valenzuela, A. B, Nieto, S. K. (1996). Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y Aceites*, 47(3), 186-196.
- (78) Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. et Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40.
- (79) Vermerriss, W., Nicholson, R. (2006). *Phenolic compound Biochemistry*. Springer.
- (80) Wainsten, J. (2009). *Le Larousse Médical*. Larousse, Paris. France. 1113p.
- (81) Wardman, P., Candeias, L. P. (1996). Fenton chemistry: An introduction. *Radiation Research* 145(5), 523-531.
- (82) Waston, R. R., Preedy, V. R., Zibadi, S. (2013). *Polyphenol in Human Health and Disease*. Edition Academic Press is an Imprint of Elsevier, 643p.
- (83) Wichtl, M., Anton, R., Czygan, F. C., Frohne, D., Hiller, K., Holtzel, C., Nagell, A., Pachaly, P., Pfander, H. J., Willuhn, G., Buff, W.(2003). *Plantes thérapeutiques. Technique et Documentation Médicales Internationales*, 2ème édition, Lavoisier, Paris. France. 26p.
- (84) Williams, C. A., Harborne, J.B., Mayot, S J. (1981). Anthocyanin pigments and leaf flavonoids in the family Araceae. *Pergamon Press Ltd*, 20, 217-234.
- (85) Yao, L.H., Jiang, Y.M., SHI, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59, 113-122
- (86) Zerargui, F. (2015). *Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis* L. et caractérisation des substances bioactives. (Thèse de doctorat) : Biochimie. Université Ferhat Abbas Sétif 1.126 p.*
- (87) Zhang, Y., Jiao, J., Liu, C., Wu, X., Zhang, Y. (2008). Isolation and purification of four flavone C-glucosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporus resin

column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography. Food Chemistry, 107, 1326-1336.

- [Site 01] : Unité de Malherbologie & Agronomie INRA-Dijon. (12/04/2007). Disponible sur : http://www.dijon.inra.fr/bga/hyppa/hyppa-f/aauvu_fh.htm, page consultée le (10/05/2020).