



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



UNIVERSITE ABOUBAKR BELKAÏD – TLEMCEEN–

*FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE & DES SCIENCES DE
LA TERRE ET DE L'UNIVERS*

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DES PRODUITS NATURELS (LAPRONA)

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de L'OBTENTION DU DIPLOME de Master EN BIOLOGIE

OPTION : Sciences des aliments

THEME

**Contribution à l'étude phytochimique et activité
antioxydante des extraits des composés phénoliques des
fruits d'*Helianthemum lippii* (Rguig)**

Présenté par :

Melle Benmansour Aouicha

Soutenu le : 03/07 /2013 devant le jury composé de :

Mme. ATIK-BEKKARAF. Professeure à l'université de Tlemcen Présidente

Mme BENDIMERADN .Professeure à l'université de Tlemcen Examinatrice

Mr. BELYAGOUBI L Maître Assistant à l'université de Tlemcen Examineur

Mme BELYAGOUBI. N Maître de conférences à l'université de Tlemcen Encadreur

Année universitaire: 2012-2013

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

À ceux qui sont les plus chers au monde, mes parents :

À mon père, pour m'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour. Père, ce travail est le tien.

À ma mère, voici l'aboutissement de tes nombreuses nuits de prières de ta sagesse et ta générosité pour votre fille. Chère mère, ce travail est le fruit de tes efforts.

À ma petite sœur Wissem, le chemin est dur et encore long, il faudrait du courage et beaucoup de chance, que dieu vous garde.

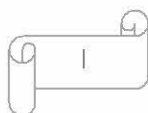
Je n'oublie jamais aussi la générosité illimitée de mes grandes sœurs, Leurs soutien moral, tous simplement je voudrais leurs dire je les aime de tout mon cœur.

À mon neveu et mes nièces :

Je vous souhaite beaucoup de chance. J'espère que vous allez suivre les pas de votre tante, que Dieu vous protège.

À toute la famille Benmansour.

À mes très chers amis.





REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout d'abord à ALLAH tout puissant pour m'avoir donné la volonté, la patience et le courage nécessaire pour mener ce modeste travail à bout.

Ce travail de recherche a été effectué au Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA) de l'Université Abou Bakr Belkaid TLEMCEN, sous la direction de madame BELYAGOUBI Née BENHAMMOU N.

✽✽✽

Ce mémoire n'aurait pu voir le jour sans la participation de nombreuses personnes, je vais m'essayer de trouver les mots justes pour exprimer spécifiquement mes reconnaissances à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

✽✽✽

A mon encadreur Madame BELYAGOUBI Née BENHAMMOU Nabila, Maître de Conférences B, à l'Université de Tlemcen, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, vous m'avez initiée à la recherche. Votre orientation m'a été très bénéfique pour la réalisation de ce travail, votre rigueur et façon de travailler, m'as permis d'être plus attentive et critique vis-à-vis de mon travail. Merci pour votre patience dans la correction de ce mémoire. J'espère avoir été à la hauteur de votre attente.

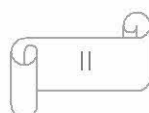
✽✽✽

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à Mme ATIK BEKKARA Fawzia, Professeur à l'Université de Tlemcen, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers de m'avoir fait honneur de présider ce jury.

✽✽✽

J'exprime mes vifs remerciements à Mme BENDIMERAD Nassima, Professeur à l'Université de Tlemcen, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

✽✽✽



Que Monsieur BELYAGOUBI Larbi, Maître Assistant A, à l'Université de Tlemcen, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, trouve ici l'expression de ma gratitude pour avoir accepté d'examiner et juger ce travail.

❦❦❦❦❦

Je ne voudrais surtout pas oublier de remercier toute les professeurs et les enseignants dans tous les niveaux scolaire et universitaire qui me s'ont formé.

❦❦❦❦❦

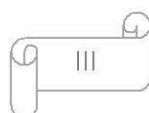
Je ne saurai oublier de remercier les doctorants du laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA), Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Tlemcen, je cite ici : GHEMBAZA N, TOULF, ZITOUNI A, BELMAHJOUB M, AISSAOUI G, pour leur gentillesse et leur aide dans la réalisation de ce modeste travail.

❦❦❦❦❦

Je remercie tous mes amis et camarades, notamment ma très chère amie Amina, collègue du laboratoire, avec qui j'ai passé de très bons moments inoubliables en réalisant ce travail dans une ambiance d'amitié. Merci pour ton encouragement et ton soutien moral.

❦❦❦❦❦

Enfin, Un grand merci à ma promotion de sciences des aliments et à tous les étudiants du département de Biologie de Tlemcen.



Résumés

Résumé:

Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydantes d'origine naturelle. La présente étude est consacrée à l'étude phytochimique ainsi que l'activité antioxydante des extraits des fruits d'*Helianthemum lippii*, une plante saharienne appartenant à la famille des Cistacées.

Les tests phytochimiques réalisés sont permis de mettre en évidence la présence des flavonoïdes, des tanins galliques, des saponosides, des alcaloïdes, des composés réducteurs et des hétérosides stéroïdiques et triterpènes dans les fruits de la plante.

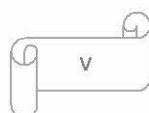
Les extractions sélectives des principales familles ont révélés un fort rendement à raison de 16.51 % pour la fraction méthanolique de l'extrait brut.

Les teneurs en phénols totaux et en flavonols dans l'extrait brut sont de l'ordre de 73.168 ± 0.097 mg EAG/ g MS et 4.869 ± 0.140 mg EQ/ g MS pour la fraction méthanolique et 25.466 ± 0.066 et 1.398 ± 0.156 mg/ g pour la fraction aqueuse, respectivement. Alors que, les teneurs en flavonoïdes et en tanins condensés dans les deux fractions sont presque comparables.

L'analyse qualitative par CCM des deux fractions acétate d'éthyle et butanolique a révélé la présence des flavonols et d'autres classes de flavonoïdes telles que les aurones et les chalcones.

Les propriétés antioxydantes des différents extraits ont été évaluées par trois méthodes : la capacité antioxydante totale (CAT), la réduction du fer et le piégeage du radical DPPH. La fraction méthanolique de l'extrait brut possède la meilleure CAT de l'ordre de 14.655 ± 0.002 mg EAA/ g MS. Pour les deux autres tests, les tanins et la fraction butanolique ont présenté des activités intéressantes de 0.103 ± 0.003 et 0.142 ± 0.037 mg/ ml à réduire le fer et 0.194 ± 0.008 et 0.135 ± 0.004 mg/ ml à neutraliser le DPPH respectivement.

Mots clés: *Helianthemum lippii*; Etude phytochimique; Composés phénoliques; CCM ; Activité antioxydante ; CAT ; FRAP ; DPPH.



Abstract:

Most of interest of current research relates to study the natural antioxidant molecules. This work is dedicated to the phytochemical study and antioxidant activity of extracts from fruits of *Helianthemum lippii*, a Saharan plant belonging to the Cistaceae family.

The phytochemical tests realized can be to highlight the flavonoids, the tannins, the saponins, the alkaloids, the reducing compounds and the heterosides, steroidal and triterpenes in the fruits of the plant.

The selective extraction of the main families showed a strong yield at 16.51% for the methanolic fraction of the crude extract.

The contents of total phenolics and flavonols in the crude extract are about 73.168 ± 0.097 mg GAE/ g DM and 4.869 ± 0.140 mg QE/ g DM for the methanol fraction and 25.466 ± 0.066 and 1.398 ± 0.156 mg/ g for the aqueous fraction, respectively. Whereas, the flavonoids and condensed tannins contents in both aqueous and methanolic fraction were almost comparable.

The qualitative analysis of ethyl acetate and butanolic fractions showed the presence of flavonols and other classes of flavonoids such as aurones and chalcones.

The antioxidant properties of different extracts were evaluated by three methods: total antioxidant capacity (TAC), reducing power and free radical scavenging activity. The methanolic fraction of the crude extract has the best TAC about 14.655 ± 0.002 mg AAE/ g DM. For the other two tests, the tannins and the butanolic fraction showed the interesting activities of 0.103 ± 0.003 and 0.142 ± 0.037 mg/ ml to reduce iron and 0.194 ± 0.008 and 0.135 ± 0.004 mg / ml to neutralize the DPPH, respectively.

Keywords: *Helianthemum lippii*; Phytochemical study; Phenolic compounds; TLC; Antioxidant activity; TAC; FRAP; DPPH.

جزء كبير من الأبحاث المهمة حاليا تعمل على دراسة الجزيئات الطبيعية المضادات للأكسدة.

Helianthemum lippii

يخصص هذا العمل الى الدراسة الفيتو كيميائية والنشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات فاكهة

نبات الصحراء الذي ينتمي الى عائلة Cistacées.

الفحص الفيتوكيميائي المحقق سمح لنا بإظهار الفلافونويد , التانات سيونوزيد, المركبات لمرجعة عائلة الأيتيروزيد ستيروزيديك والتريتاربان.

الاستخلاصات الانتقائية لهذ المركبات الثانوية تظهر مردود ملحوظ في الجزء الميتانولي للمستخلص الخام وهو 16.51% كمية الفينولات والفلافون في المستخلص الخام قَدَم 73.1668 ± 0,097 بمغ ما يعادل حمض الغاليك و 4.869 ± 0.140 بمغ ما يعادل الكاربيتين بالنسبة للجزء الميتانولي للمستخلص الخام و 25.466 ± 0.066 , 1.39 ± 0.156 على التوالي في حين أن كمية التانات المكثفة والفلافونويدات فهي مماثلة تقريبا في الجزء الميتانولي والمائي للمستخلص الخام.

التحليل الكروماتوغرافي على الطبقة الرقيقة للجزأين خلاص الإيتيلوبيوتانول أظهر وجود الفلافون وفئات أخرى من الفلافونويد الجالكونات و auronés.

تمت دراسة الخصائص المضادة للأكسدة لمختلف المستخلصات بواسطة ثلاث طرق : القدرة المضادة للأكسدة الإجمالية, ارجاع الحديد. الجزء الميتانولي للمستخلص الخام لديها لقدرة المرتفعة المضادة للأكسدة الإجمالية 14,655 ± 0,002 ما يعادل حمض الاسكوريك للفواكه الجافة بغ. للاختبارين الاخرين, قَدَمَت التانات وجزء البيتانول نشاط مضاد للأكسدة مثير للاهتمام للقدرة على ارجاع الحديد بقيمة 0.103 ± 0.000 و 0,142 ± 0,037 مغ/مل و 0.194 ± 0,008 , 0.135 ± 0.004 مغ/مل قدرتها على تثبيط الجدر الحر على التوالي.

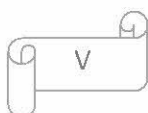
الكلمات المفتاحية: *Helianthemum lippii* ; الدراسة الفيتوكيميائية ; المركبات الفينولية التحليل الكروماتوغرافي على الطبقة الرقيقة,النشاط المضاد للأكسدة ; CAT; FRAP; DPPH.

Liste des Figures

Figure 01 : Structure générale du noyau des flavonoïdes.....	12
Figure 02 : Carte géographique de la station d'étude	22
Figure 3 : Protocole d'extraction des fractions flavoniques (Bekkaraet al., 1998).....	28
Figure 04 : Rendements en extraits obtenus.....	34
Figure 05 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.....	35
Figure 06 : Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes.....	35
Figure 07 : Courbe d'étalonnage de la quercitrine pour le dosage des flavonols.....	36
Figure 08 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.....	36
Figure 09 : Comparaison de la capacité antioxydante totale des différents extraits d' <i>H. lippii</i>	38
Figure 10 : Pouvoir réducteur des extraits des fruits d' <i>H. lippii</i>	39
Figure 11 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait brut, la fraction acétate d'éthyle, la fraction butanolique et les tanins	41
Figure 12 : Pourcentage d'inhibition du DPPH (%) en fonction des concentrations de la fraction aqueuse , de la fraction méthanolique, de la fraction acétate d'éthyle, de la fraction butanolique, et des tannins des fruits d' <i>H. lippii</i>	43
Figure 13 : Structures chimiques des proanthocyanidols dimériques(Perret, 2001).....	48

Liste des tableaux

Tableau 01: Structure chimique de quelques flavonoïdes (Heim et al., 2002).....	12
Tableau 02: Lieu de récolte de la plante et caractéristiques géographiques et bioclimatiques de la station d'étude(Encarta 2009).....	21
Tableau 03 : Résultats des tests phytochimiques recherchés dans les fruits d' <i>H. lippii</i>	33
Tableau 04: Teneur en phénols totaux, en flavonoïdes, en flavonols et en tanins catéchiques.....	37
Tableau 05 : Concentration IC ₅₀ des extraits des composés phénoliques d' <i>H. lippii</i> obtenues par le test de la réduction du fer	40
Tableau 06: Concentrations EC ₅₀ des extraits des composés phénoliques d' <i>H. lippii</i> obtenues par le test DPPH	42
Tableau 07: Les classes de flavonoïdes des fractions acétate d'éthyle et butanolique des fruits d' <i>H. lippii</i>	46
Tableau 08 : Les RF des témoins sous l'UV à 360 nm	46



Liste des photos

- Photo 1:** *Helianthemum lippii* (L) Pers. (A*: www.sahara-nature.com).....06
- Photo 2 :** Chromatogramme résultant de l'analyse des fractions flavoniques (acétate d'éthyle et butanolique) et des témoins par chromatographie sur polyamide (révélation à l'UV : 365 nm)45

Liste des abréviations

%: Pourcentage

°C : Degré Celsius

µl: Microlitre

ADN : Acide désoxyribonucléique

CCM : Chromatographie sur couche mince

cm : Centimètre

DO : densité optique

EAA : équivalent d'acide ascorbique

EAG : Equivalent d'acide gallique

EC : Equivalent de catéchine

EQ : équivalent de quercétine

EC₅₀(*efficient concentration value*) : concentration permettant d'inhiber 50% du DPPH

g : Gramme

H. : *Helianthemum*

h : heure

IC₅₀(*inhibitory concentration*) : concentration permettant d'inhiber 50% du fer

l : Litre

LDL : Low Density Lipoprotein

m : Mètre

M : Molarité (mole/l)

Mg : Milligramme

min : Minute

ml : Millilitre

mM: Millimole/l

MS : matière sèche

m/v : rapport masse par volume

nm : nanomètre

Rf : Rapport frontal

UV: ultraviolet

V/V: rapport volume par volume

Table de matières

<i>Dédicace</i>	I
<i>Remerciements</i>	II
<i>Résumés</i>	V
<i>Liste des figures</i>	VIII
<i>Liste des tableaux</i>	IX
<i>Liste des photos</i>	X
<i>Liste des abréviations</i>	XI
<i>Introduction générale</i>	02

1ère Partie : Etude Bibliographique

Chapitre 1 : Présentation de l'espèce

1. Généralité	05
2. Description botanique d' <i>Helianthemum lippii</i>	05
3. Habitat.....	06
4. Position systématique.....	06
5. Toxicité.....	07
6. Propriétés et usages thérapeutiques.....	07
7. Travaux antérieurs.....	08

Chapitre 2 : Généralités sur les métabolites secondaires

1. Introduction.....	09
2. <i>Les saponines</i>	09
3. <i>Les alcaloïdes</i>	10
4. <i>Les composés phénoliques ou les polyphénols</i>	10
4.1 Les acides phénoliques.....	10
4.1.1. Les acides phénoliques simples.....	11

4.1.2. Les acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque.....	11
4.1.3. Les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique.....	11
4.2. Les coumarines.....	11
4.3. Les flavonoïdes.....	11
4.4. Les tanins.....	14
4.5. Les anthocyanes.....	14
5. Rôle des polyphénols.....	15

Chapitre 3 : Radicaux libres, Antioxydants et Activité antioxydante

1. Paradoxe de l'oxygène.....	16
2. Les radicaux libres ou les espèces réactives oxygénées (ERO).....	16
3. Principales sources d'espèces réactives de l'oxygène.....	16
3.1. Sources exogènes d'ERO.....	16
3.2. Sources endogènes d'ERO.....	17
4. Conséquences de la production des ERO sur l'organisme.....	17
5. Systèmes de défense.....	18
5.1. Les antioxydants enzymatiques.....	18
5.2. Les antioxydants non enzymatiques.....	18
6. Méthodes de mesure de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	19

2 ème Partie : Matériel et méthodes

Chapitre 1 : Matériel Végétal

1-Choix du matériel végétal.....	21
2-Identification de la plante.....	21
3-Station d'étude.....	21
4-Préparation des échantillons.....	21

CHAPITRE 2 : Tests Phytochimiques

1-Introduction.....	23
2-Tests phytochimiques.....	23
2.1. <i>Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaud</i>	20
2.1.1-Détection des saponosides.....	23
2.1.2-Détection des tanins.....	24
2.1.3-Détection des anthocyanes.....	24
2.2. <i>Epuisement du matériel végétal avec l'éthanol</i>	24
2.2.1- Détection des flavonoïdes.....	24
2.2.2- Détection des tannins galliques et cathéchiques.....	24
2.2.3-Détection des composés réducteurs.....	24
2.3- <i>Macération du matériel végétal avec l'acide sulfurique (H₂SO₄)</i>	25
2.3.1-Détection des alcaloïdes.....	25
2.4- <i>Détection des coumarines</i>	25
2.5- <i>Détection des stérols et triterpènes</i>	25

Chapitre 4: Extraction des principales familles, l'étude du pouvoir antioxydant et analyse par CCM

1-Introduction.....	28
2-Extraction des principales familles de métabolisme secondaire.....	28
2.1- Extraction des fractions flavoniques (fractions acétate d'éthyle et n-butanol).....	28
2.2-Extraction des tanins.....	29
3-Etude du pouvoir antioxydant des différents extraits.....	29
3.1- Activité antioxydante totale (CAT).....	29
3.2-Réduction du fer (FRAP: <i>ferricreducingantioxidant power</i>).....	29
3.3- Piégeage du radical libre DPPH [•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil).....	30
3-Analyse statistique.....	31

4-Chromatographie sur couche mince.....	31
---	----

3ème Partie : Résultats et Discussions

Chapitre 1: Tests phytochimiques

1-Tests phytochimiques.....	33
-----------------------------	----

Chapitre 2: Rendements et teneurs en composés phénoliques flavonoïdes et tannins condensés

2-Rendement des extraits sec.....	34
-----------------------------------	----

3-Teneur en phénols totaux en flavonoïdes, en flavonols et en tanins catéchiques.....	35
---	----

Chapitre 3: Etude de l'activité antioxydante et la chromatographie sur couche mince

1-Introduction.....	38
---------------------	----

2- Capacité antioxydante totale (CAT).....	38
--	----

3-Réduction du fer.....	38
-------------------------	----

4- Piégeage du radical libre DPPH'.....	40
---	----

5-Analyse qualitative du pool flavonique des fractions d' <i>H.lippii</i> obtenues par l'acétate d'éthyle et le butanol.....	44
--	----

<i>Conclusion générale.....</i>	<i>50</i>
---------------------------------	-----------

<i>Référence bibliographique.....</i>	<i>53</i>
---------------------------------------	-----------

<i>Annexe.....</i>	<i>69</i>
--------------------	-----------

Introduction
Générale

Depuis les temps anciens, on sait que les végétaux peuvent soulager les symptômes de nombreuses maladies. Par exemple, une infusion à base d'écorce de Saul permet d'atténuer les maux de tête. Cette écorce contient de l'acide acétylsalique, mieux connu sous le nom d'aspirine. Pendant des siècles ce savoir-faire se transmet de bouche à oreille et s'enrichit grâce aux naturalistes qui récoltaient les plantes (Murray, 2008).

Tous les êtres vivants ont un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base: acides nucléiques (ARN, ADN), lipides, protéines, acides aminés, carbohydrates. Chez les plantes, il existe aussi des métabolites secondaires qui sont produits en très faible quantité. Ils existent plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes et les composés phénoliques (Djerdane 2008).

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures de tissus végétaux *in vivo* et *in vitro*. Ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicalaires, en particulier les flavonoïdes (Maamri, 2008).

De ce fait, les chercheurs se sont intéressés ces dernières années, à des antioxydants naturels, notamment ceux issus des plantes (N'Guessan et al., 2009). Nous citons à titre d'exemple notre laboratoire de recherche des Produits Naturels particulièrement notre équipe de la phytochimie et aux activités biologiques des extraits végétaux des plantes médicinales (Benhammou et al., 2007; Benhammou et al., 2008; Atik Bekkara et al., 2008; Belarbi-Benmahdi et al., 2009; Mohammedi et al., 2011; Sour et al., 2011; Bekhchi et al., 2012; Belmekki et al., 2012).

Dans cette étude et pour la première fois, nous ont permis de mettre en place une stratégie de recherche pour l'étude phytochimique des fruits de la plante *Helianthemum lippii*, en quantifiant les composés phénoliques et en évaluant l'activité antioxydante *in vitro* des extraits obtenus.

A travers ce travail, nous s'intéressons aux étapes suivantes:

- ✓ **La première partie** reporte quelques connaissances bibliographiques concernant la présentation de la plante étudiée et quelques travaux antérieurs en premier chapitre. En deuxième chapitre, généralité sur les composés phénoliques et en troisième chapitre, un aperçu sur l'activité antioxydant.
- ✓ **La deuxième partie** présente la description du protocole expérimental en quatre étapes en exposant les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail:
 - Les tests phytochimiques des fruits d'*H. lippii* ;
 - Les dosages des phénols totaux, des flavonoïdes, des flavonols et des tanins condensés ;
 - L'extraction des principales familles de métabolites secondaires: des flavonoïdes (fractions flavoniques), des tanins et de l'extrait brut;
 - L'évaluation du pouvoir antioxydant de ces composés par trois méthodes : la méthode de la capacité antioxydante totale (CAT), la réduction du fer (FRAP) et le piégeage du radical DPPH.
 - Analyse de la composition chimique des fractions acétate d'éthyle et n- butanol des flavonoïdes par chromatographe sur couche mince.
- ✓ **Dans la troisième partie**, nous interprétons et discutons les résultats obtenus et notre travail est achevé par une conclusion.

Etude

bibliographique

Chapitre 1 : Présentation de l'espèce

1. Généralité

La famille des Cistacées est une famille de plantes dicotylédones qui comprend moins de 200 espèces et maximum dix genres. Selon le centre national de l'information biotechnologique (NCBI), cette famille présente huit genres incluant, *Cistus*, *Crocanthemum*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum*, *Hudsonia*, *Lechea*, *Tuberaria*. Ce sont des arbustes, des plantes herbacées, poilues ou velues, pérennes ou annuelles, à feuilles simples souvent opposées, à fleurs solitaires ou en cymes, à cinq pétales libres des régions tempérées à subtropicales surtout présents autour du bassin méditerranéen (**Paul. Serin, 1997**).

L'Algérie constitue avec le Maroc et la péninsule ibérique, le territoire de prédilection des Cistacées de l'ancien monde (**Ozenda, 1977**).

Le genre *Helianthemum* fait partie de cette famille, il comporte les espèces *H. aegyptiacum*, *H. almerianse*, *H. apenninum*, *H. canum*, *H. grandiflorum*, *H. kahircum*, *H. ledifolium*, *H. marifolium*, *H. nummularium*, *H. oelandicum*, *H. scopulicola*, *H. squamatum*, *Hudsonia tomentosa* et *H. lippii*

2. Description botanique d'*Helianthemum lippii*

Cette espèce est une plante polymorphe en buisson imbriqué ne dépassant guère 50 cm. Un arbrisseau vivace très rameux à feuilles sessiles couvertes de très courts poils ce qui donne une couleur blanchâtre à la plante. L'écorce des rameaux est également blanchâtre. Les feuilles comportent deux stipules. Les fleurs sont petites, jaunes et sessiles (**Quezel et Santa, 1963**).

C'est au pied de cette plante que pousse la terfas (*Terfezia ovalispora*), délicieuse truffe blanche.

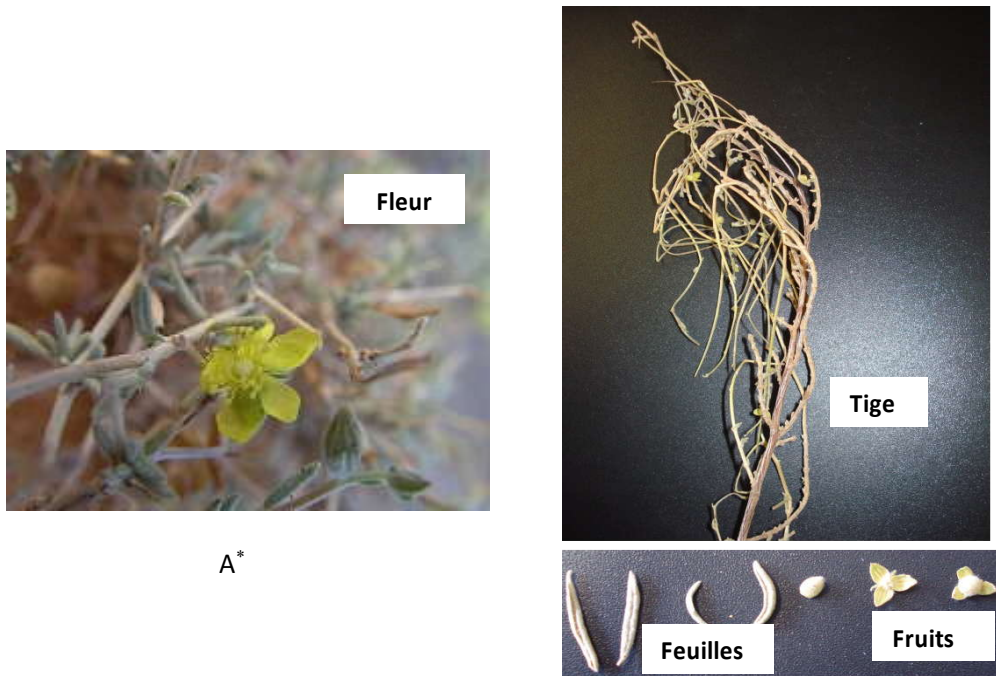
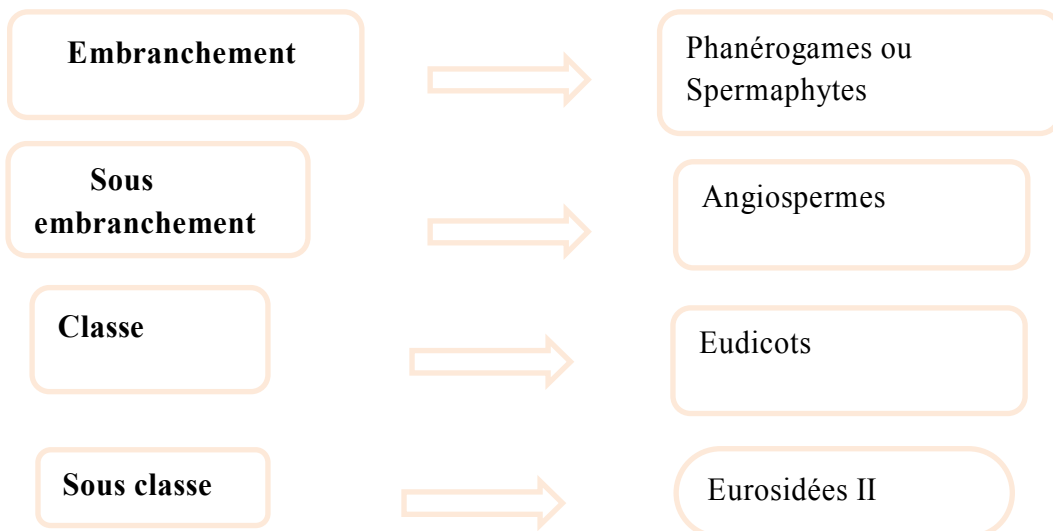


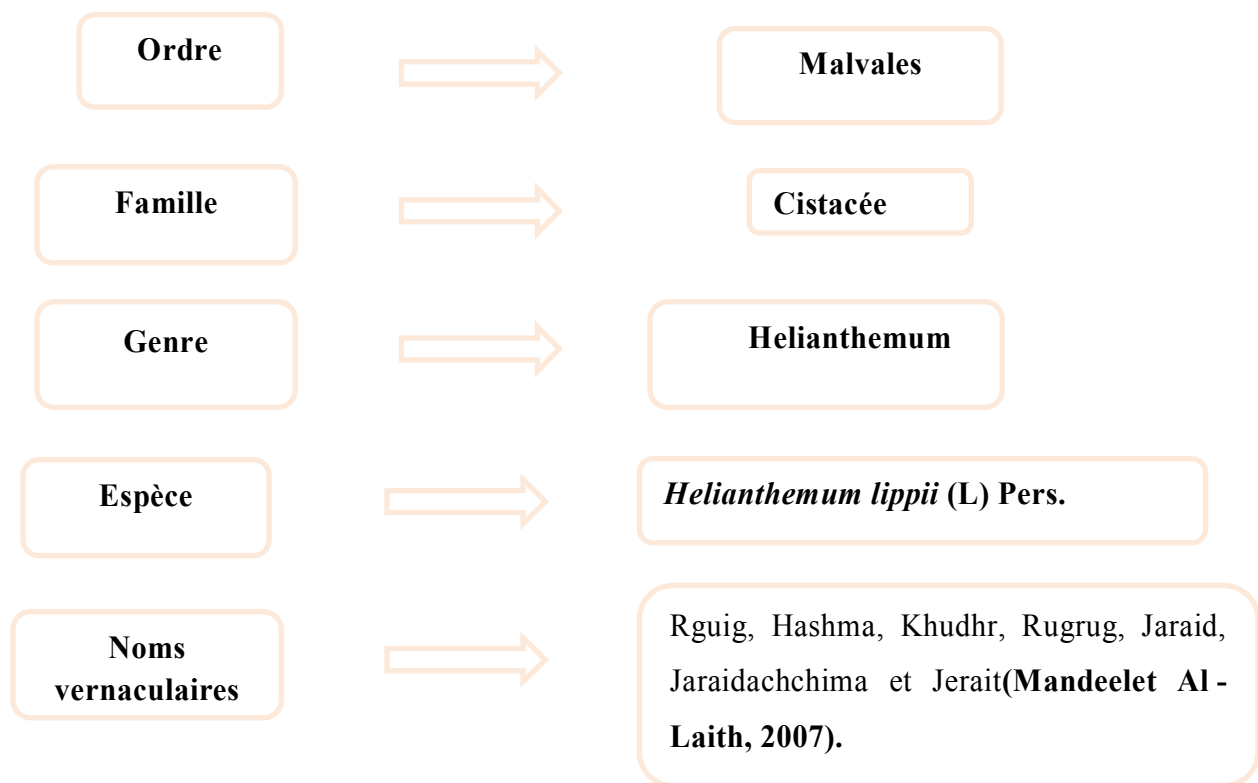
Photo 1 : *Helianthemum lippii*(L) Pers. (A* : www.sahara-nature.com)

3. Habitat

Les hélianthèmes, comme toute la famille des Cistacées, sont des plantes de souche méditerranéenne et ce genre, encore assez bien représenté dans le Sahara Septentrional (Situé au nord), fait presque défaut dans le Sahara méridional et occidental ou il n'est représenté que par *H. Lippi*(**Ozenda, 1977**). Cette espèce se répartit dans les pâturages désertiques, les rocailles et les sables (**Quezel et Santa, 1963**).

4. Position systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007) :





5. Toxicité

D'après les nomades, *H. lippii* ainsi que des espèces voisines *H. tunetanum* Coss et *H. kahiricum* Del provoqueraient chez les dromadaires des boiteries. Cette maladie que les nomades connaissent sous le nom de *gafou* de *kraft* serait une sorte de rhumatisme du dromadaire, Mais la toxicité de cette plante n'est pas bien établie. (Bellakhdar, 1997).

6. Propriétés et usages thérapeutiques

Toutes les espèces de la famille Cistacées sont fréquemment employées dans la médecine traditionnelle pour leurs propriétés antimicrobienne, antitumorale, antivirale, anti-inflammatoire, antifongique, antiulcéreuse, antioxydante, antispasmodique et contre l'hypotension) (Bouamama et al., 2006).

Pour *H. lippii*, cette plante est employée pour calmer les douleurs des règles menstruelles d'après notre enquête ethnobotanique auprès de la population de la région d'étude. Comparativement à d'autres espèces, *H. glomeratum* a montré ces effets antibactériens, antiprotozoaires et pour traiter les troubles gastro-intestinaux comme les diarrhées et les dysenteries (Barbosa et al., 2006 ; Buzzini et al., 2007). Concernant l'activité

antioxydante, cette propriété a été prouvée par la littérature chez *H. ledifolium* (Tawaha *et al.*, 2007).

7. Travaux antérieurs

La majorité des études phytochimiques effectuées sur un nombre important d'espèces de la famille des Cistacées montre la richesse ainsi que la diversité structurale de ces dernières en métabolites secondaires incluant en particulier les terpènes, les composés phénoliques constituant principalement les flavonoïdes, et les tanins en faibles quantités (Nouri *et al.*, 2012).

Certains auteurs ont pu isoler quelques flavonoïdes chez *H. glomeratum* du type flavan-3-ols : (-)-épicatéchine et (-)-épigallocatechine gallate (Meckes *et al.*, 1999) et du type flavonols : kaempférol, tiliroside et quercétine (Calzada *et al.*, 1999). D'autres ont reporté la richesse des espèces d'*Helianthemum* par les tanins (Barroso *et al.*, 2001).

Chapitre 2 : Généralités sur les métabolites secondaires

1. Introduction

Les métabolites primaires sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ils sont classés en quatre grandes catégories : les glucides, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques(Hartmann, 2007). Tandis que les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée. Ils y jouent différents rôles, dont celui de moyen de défense contre les agressions externes. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante.

Les produits du métabolisme secondaire sont en très grand nombre, plus de 200.000 structures définies (Hartmann, 2007) et sont d'une variété structurale extraordinaire mais sont produits en faible quantité. Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique(Hartmann, 2007).

Dans ce chapitre, nous présenterons à travers des exemples de métabolites secondaires, tel que les saponines, les alcaloïdes et des composés phénoliques qui constituent les catégories les plus importantes des métabolites secondaires.

2. Les saponines

Le nom saponine dérive du mot latin « sapo », qui signifie savon, parce que ces composés moussent une fois agités avec de l'eau. Ils se composent d'aglycones non polaires liés à un ou à plusieurs sucres. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires en leurs molécules explique leur comportement moussant en solution aqueuse(Kone, 2009).

Comme définition, on dirait qu'une saponine est un glycoside de stéroïde ou de triterpène. Ils manifestent des propriétés hémolytiques, antimicrobiennes, insecticides, molluscicides (Vincken et al., 2007), anti-inflammatoires et antalgiques (Kone, 2009)

3. Les alcaloïdes

Le terme d'alcaloïde a été introduit par W. Meisner au début du XIX^{ème}. La définition admise des alcaloïdes est celle donnée par **Winterstein et Trier en 1910**.

Un alcaloïde est un composé azoté naturel, hétérocyclique, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose (**Bruneton, 1999 ; Zenk et Juenger, 2007**). Représentant un groupe fascinant de produits naturels, ils constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 différentes structures (**Roberts et Wink, 1999 ; Stöckigt et al., 2002**).

4. Les composés phénoliques ou les polyphénols

Le terme *polyphenols* est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. En fait, il devrait être réservé aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols. Ce qui exclurait alors les monophénols, pourtant abondants et importants chez les végétaux. Donc la désignation générale «composés phénoliques» concerne à la fois les mono-, di- et polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques (**Macheixet al., 2005**).

Près de 8000 composés naturels appartiennent à cette famille ; ils ont en commun un noyau benzénique portant au moins un groupement hydroxyl. Selon le nombre d'unités phénoliques présents, on les classe en composés phénoliques simples et polyphénols. Par abus, on les appelle indifféremment composés phénoliques ou polyphénols et comprennent essentiellement les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins hydrolysables et condensés, les coumarines et les anthocyanes (**Stalikas, 2007**).

4.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont largement distribués dans les fruits (**Garcia-Viguera et al., 1994**), les tiges et les feuilles des légumes (**Morton et al., 2000**). De plus, le thé et le vin rouge sont riches en ces composés (**Harbowy et Balentie, 1997**). Ils sont en principe solubles dans les solvants organiques polaires (**Bruneton, 1993**). Les acides phénoliques sont classés en trois groupes : les acides phénoliques simples, les acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque et les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique.

4.1.1. Les acides phénoliques simples sont rares à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles végétales (**Bruneton, 1993**).

4.1.2. Les acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque sont des dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque comme l'acide vanillique (Haslam et Lilley, 1988).

4.1.3. Les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique ont une distribution très large. L'acide caféique et l'acide férulique sont les composés majeurs (Bruneton, 1993).

4.2. Les coumarines

Ce sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Isolées la première fois de *Coumarouna odorata* par Vogel en 1820, aujourd'hui, près de 1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les micro-organismes. Dans les plantes, on les rencontre dans les Apiacées, Astéracées, Fabacées, Rosacées, Rubiacées, Rutacées et Solanacées (Kone, 2009).

Les coumarines sont connues par leurs activités cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du cœur), hypotensives ; elles sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées (Gonzalez et Estevez-Braun, 1997).

4.3. Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux (Merfak, 2003).

De nos jours, plus de 8000 flavonoïdes ont été identifiés. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone, constitué de deux unités aromatiques ; deux cycles en C6 (A et B), reliés par un hétérocycle en C3 (Figure 1) (Bruneton, 1999; Pietta, 2000).

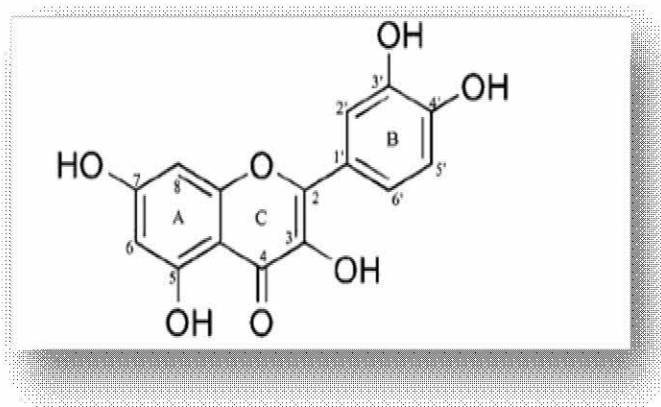


Figure 1 : Structure générale du noyau des flavonoïdes(D'après Heim et al., 2002)

Structuralement les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C (Pietta, 2000), 14 groupes différents ont été identifiés dont six groupes sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés : flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols, anthocyanidines (Heim et al., 2002 ; Hendrich., 2006) (Tableau 1).

Ces composés ont été identifiés dans presque toutes les parties de la plante : les feuilles, les racines, les tiges, les fleurs, les graines et l'écorce (Lee et al., 1994). Ils sont trouvés dans les fruits, les légumes, les noix, les herbes, les épices, aussi bien que dans le thé et le vin rouge. Ils sont consommés régulièrement avec l'alimentation humaine qui nous apporte environ 75 mg de flavonoïdes par jour. En effet, le thé, les agrumes, les pommes, l'huile d'olive, les oignons, le cacao et plusieurs autres fruits et légumes sont très riches en flavonoïdes, les flavanols et les flavonols y seraient les plus abondants(Heim et al., 2002)

Tableau 1 : Structure chimique de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe (Heim et al., 2002).

Classe	structure générale	flavonoïdes typiques	Substituants
Flavanol		(+)-catechin (-)-epicatechin Epigallocatechin gallate	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH,3-gallate
Flavone		chrysin apigenin rutin luteolin luteolin glucosides	5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3',4'-OH, 3-rutinoses 5,7,3',4'-OH 5,7,3'-OH, 4'-glucose 5,4'-OH, 4',7-glucose
Flavonol		kaempferol quercetin	3,5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH
		myricetin tamarixetin	3,5,7,3',4',5'-OH 3,5,7,3'-OH,4'-OMe
Flavanone (dihydroflavon)		naringin naringenin taxifolin eriodictyol hesperidin	5,4'-OH,7-rhamnoglucose 5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 5,7,3',4'-OH 3,5,3'-OH,4'-OMe, 7-rutinoses
Isoflavone		genistin genistein daidzin daidzein	5,4'-OH, 7-glucose 5,7,4'-OH 4'-OH, 7-glucose 7,4'-OH
Anthocyanidin		apigenidin cyanidin	5,7,4'-OH 3,5,7,4'-OH,3,5-OMe

4.4. Les tanins

Les tanins sont des molécules polyphénoliques de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da. Ils sont présents dans les feuilles, les fleurs et les graines des plantes (**Watterson et Butler, 1983**). Ils sont du grand intérêt pour la nutrition et la médecine à cause de leur capacité antioxydante puissante. La caractéristique majeure des tanins est de former des complexes avec les macromolécules, en particulier avec les protéines. Les liaisons covalentes, hydrogènes et hydrophobes participent à la formation du complexe tanins-protéines (**Hagerman et Butler, 1978 ; Mc Manus et al ; 1981**).

Les tanins sont subdivisés en deux classes différentes, largement distribués chez les végétaux supérieurs, qui sont les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

Les tanins condensés ou proanthocyanidines sont des oligomères ou polymères de flavonoïdes, constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone, le plus souvent entre C4 et C8 ou C4 et C6 (**Mehansho et al., 1987 ; Haslam et Lilley, 1988**). La taille de molécule peut être décrite par leur degré de polymérisation (DP) (**Oszmianski et al., 2007**).

Les tanins hydrolysables sont des hétéropolymères dont l'hydrolyse chimique ou enzymatique libère un sucre, généralement le glucose et un acide phénolique. L'acide phénolique libéré peut être l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, l'acide hexahydroxydiphénique et ses dérivés comme l'acide éllagique dans le cas des tanins éllagiques (**Mehansho et al., 1987**).

4.5. Les anthocyanes

Les anthocyanes (du grec *anthos*, fleur et *Kuanos*, bleu violet) terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés. Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, ce sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange. Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu. A l'origine de la couleur des fleurs, des fruits et des baies rouges ou bleues, elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplies d'eau. On trouve également les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines. En automne, les couleurs caractéristiques des feuilles des arbres sont dues aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle (**Bassas et**

al, 2007).

5. Rôle des polyphénols

☞ *Chez les plantes* : Les composés phénoliques en particulier les flavonoïdes seraient impliqués dans un certain nombre de fonctions :

- ✓ ils assurent la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines pour attirer les pollinisateurs et les disperseurs de graine ;
- ✓ ils représentent un système de défense contre les organismes micropathogènes ;
- ✓ ils protègent les plantes contre les radiations UV en absorbant à la fois ces radiations et les espèces réactives de l'oxygène formées ;
- ✓ ils interviennent dans la fertilité des plantes et la germination du pollen (Stalikas, 2007).

☞ *Chez l'homme* : Plusieurs propriétés biologiques ont été attribuées aux polyphénols :

- Anticancérigènes : flavonoïdes (Ko et al., 2000 ; Li et al., 2008 ; Hirata et al., 2009), coumarines (Ito et al., 2005 ; Win, et al., 2008; Hirata et al., 2009) ;

- Antiulcéreuses : flavonoïdes et acides phénoliques (Martin et al., 1993 ; Sannomiya et al., 2005 ; De Barros et al., 2008 ; Gurbuzet al., 2009) ;

- Anti-inflammatoires : flavonoïdes (Nowakowska, 2007 ; Sutradhar et al., 2008 ; Rao et al., 2009 ; Vafeiadou et al., 2009), les lignanes (Küpeli et al., 2003 ; Da Silva et al., 2005 ; Da Silva et al., 2008, Kim et al., 2009), coumarines (Kalkhambkar et al., 2007 ; Melagraki et al., 2009) ;

- Analgésiques : flavonoïdes (Küpeli, Yesilada, 2007 ; Sutradhar et al., 2008 ; Borsato et al., 2000 ; Küpeli et al., 2003 ; da Silva et al., 2005), coumarines (Lino et al., 1997 ; Kalkhambkar et al., 2007).

- Antibactériennes et antifongiques : les terpènes (Ouzilleau et al, 1975).

Chapitre 3 : Radicaux libres, antioxydants et activité antioxydante

1. Paradoxe de l'oxygène

L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies. Mais l'oxygène peut être également une source d'agression pour ces organismes. En effet, des dérivés hautement réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons U.V, des radiations ionisantes et de métaux de transition. Les conséquences au niveau de l'organisme se font ressentir sur l'ADN, les lipides et les protéines (MogodeDebete, 2004).

2. Les radicaux libres ou les espèces réactives oxygénées (ERO)

Un radical est une molécule caractérisée par la présence d'un électron libre (célibataire) sur ses orbitales électroniques externes qui leur confère une très grande instabilité. Ces radicaux ont la possibilité de réagir avec de nombreux composés dans des processus le plus souvent non spécifiques, donc leur durée de vie en solution est très courte (Halliwell, 1993).

Aussi, l'oxygène est un radical libre peu réactif, présent le plus souvent sous forme de dioxygène. Dans les conditions physiologiques, 2% à 5% de l'oxygène utilisé par les mitochondries sont partiellement réduits par des électrons qui s'échappent des transporteurs de la chaîne respiratoire en formant ainsi des dérivés plus réactifs appelés espèces réactives oxygénées (ERO) (Ichai et al., 2011).

Parmi ces molécules, nous citons :

-les radicaux libres oxygénés (espèces chimiques possédant un électron célibataire non apparié) comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (HO^{\bullet}), le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) ...

-les dérivés de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène (ne possédant pas d'électron célibataire) comme l'anion peroxyde (ROO^{\bullet}), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), peroxydinitrite ($ONOO^-$) (Novelli, 1997 ; Favier, 2003).

3. Principales sources d'espèces réactives de l'oxygène

3.1. Sources exogènes d'ERO

La production exogène des ERO résultent de l'exposition aux rayons ionisants (soleil, radioactivité), aux métaux de transition ou à l'oxygène en quantité excessive, la pollution, la

prise de certains médicaments, le contact avec certains pesticides et solvant, la consommation du tabac et d'alcool, la pratique du sport intensif et tout processus susceptible de surcharger les réactions de détoxification hépatique, notamment une perte de poids importante (Médart,2009 ; Freeman *et al.*, 1984 ; Fukushima *et al.*,1995).

3.2. Sources endogènes d'ERO

Le métabolisme aérobie de chaque organisme permet de produire des ERO d'une manière endogène, comme des sous-produits des chaînes de transport des électrons de la respiration cellulaire dans les mitochondries (Halliwell,1993). Elles sont aussi produites dans différentes réactions enzymatiques.

De plus, dans l'organisme, l'oxygène est réduit à 95 % dans les mitochondries (centrale énergétique de la cellule) par voie enzymatique en molécule non toxique comme H₂O. Cependant, il peut subir une réduction monoélectronique et former une espèce beaucoup plus réactive comme l'anion superoxyde. Cet anion n'est pas le radical le plus délétère, cependant il peut donner naissance à des espèces beaucoup plus réactives comme le radical hydroxyle •OH. Ces ERO mitochondriales pourraient intervenir dans l'oxydation des LDL(Mabile *et al.*,1997).

4. Conséquences de la production des ERO sur l'organisme

Normalement, un équilibre relatif existe entre la formation de radicaux libres et la neutralisation de ceux-ci par des molécules antioxydantes. Toutefois, une production excessive de radicaux libres ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant/antioxydant favorisant l'apparition du « stress oxydant » (Médart,2009 ; Papazian *et al.*,2008 ; Poncelet *et al.*,2011).Ce statut oxydatif touche tous les tissus et tous leurs composants à savoir les lipides, les protéines, les glucides et l'ADN (Valko *et al.*, 2006).

Par conséquence, l'altération des fonctions cellulaires, la perte de leur intégrité voire la mort cellulaire qui en résultent, sont responsables des processus de vieillissement et de pathologies multiples : initiation et promotion des cancers, maladies cardio-vasculaires et pathologies neurodégénératives, cataracte, dégénérescence maculaire et la destruction auto-immune des cellules bêta-pancréatique lors du diabète de type1 (Médart,2009).

5. Systèmes de défense

En guise de protection, les cellules possèdent des mécanismes de défense endogènes enzymatiques et non-enzymatiques qui, de manière générale, suffisent à neutraliser et de dégrader les radicaux libres toxiques pour les tissus résultant du métabolisme aérobie et que l'on appelle antioxydant (Solzbach *et al.*, 1997 ; Boldyrev, 2005). Cette substance qui est présentée en concentrations faibles, comparée à celle du substrat oxydable, capable de retarder ou prévenir de façon significative ou empêcher, l'oxydation de ce substrat (Halliwell *et al.*, 1995).

5.1. Les antioxydants enzymatiques

Ils sont représentés par trois enzymes qui sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase, intervenant dans la détoxification des ERO. Ces enzymes sont préventives parce qu'elles agissent sur les espèces impliquées dans l'initiation de la chaîne de réactions des radicaux libres. Alors que, les molécules antioxydantes les plus petites, comme l'ascorbate, le tocophérol, l'ubiquinone et l'urée, sont capables de piéger directement les radicaux oxydants et sont ainsi des antioxydants «briseurs» de la chaîne radicalaire (Buettner, 1993).

5.2. Les antioxydants non enzymatiques

Ce type d'antioxydants regroupe un grand nombre de substances hydrophiles ou lipophiles de faible poids moléculaires et ils sont en partie produits par l'organisme au cours de processus biosynthétiques. On peut citer parmi les plus actifs : le glutathion (Halliwell *et al.*, 2007), l'acide urique (Ames *et al.*, 1993) l'acide lipoïque (Packer *et al.*, 2011) ou la bilirubine (Stocker *et al.*, 1987). Ces sont capables de prévenir des dommages oxydatifs en se comportant comme des piègeurs des radicaux libres par les interventions directes sur les molécules pro-oxydantes ou indirectement, en chélatant les métaux de transition, empêchant ainsi la réaction de Fenton.

Le taux de ce système de défense dans l'organisme est essentiellement assuré par un apport alimentaire. Parmi les antioxydants naturels, on peut citer les plus connus et les plus importants : l'acide ascorbique ou la vitamine C, La vitamine E ou tocophérol, le sélénium, les caroténoïdes, les composés phénoliques, les flavonoïdes et les tanins.

6. Méthodes de mesure de l'activité antioxydante *in vitro*

Grâce à la propriété essentielle de l'antioxydant, plusieurs méthodes ont été mises au point pour évaluer l'efficacité des antioxydants à piéger les radicaux libres et d'empêcher les réactions radicalaires. La majorité de ces méthodes se base sur des phénomènes chimiques, des processus physiques et des instrumentations spécifiques. La plupart des procédés analytiques exigent un prétraitement avant la mesure. Toutes ces méthodes couvrent les antioxydants primaires et secondaires (Hanasaki et al., 1994).

En principe, si un composé montre une faible activité antioxydante *in vitro*, il est très rare qu'il présente une activité meilleure *in vivo* (Hanasaki et al., 1994), aussi les mécanismes d'oxydation et de prévention *in vivo* sont différents à cause de la perméabilité cellulaire et du processus de transport (Antolovich et al., 2002).

D'après Sanchez-Moreno (2002) et Huang et al (2005), les techniques d'évaluation des propriétés antioxydantes peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes : soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron.

Les tests du premier groupe sont employés pour évaluer la peroxydation lipidique en utilisant un substrat lipidique ou lipoprotéique. La quantification de cette propriété est exprimée par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation (Sanchez-Moreno et Larrauri, 1998).

Alors, les tests du deuxième groupe sont ceux qui interviennent dans la mesure de l'habilité du piégeage des radicaux libres. Ils comportent le balayage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de l'acide hypochloreux ($HOCl$), de l'hydroxyle (OH^\bullet), des anions superoxyde ($O^{\bullet-2}$), du peroxyde (ROO^\bullet) et de l'oxyde nitrique (NO^\bullet) (Sanchez-Moreno, 2002).

Matériel

Et

Méthodes

1- Choix du matériel végétal

Les fruits d'*Helianthemum lippii* ont été récoltés durant le mois de Mai 2007, de la commune de Aïn Ben Khelil, Wilaya de Naâma. Le choix de cette plante est appuyé sur une enquête ethnobotanique auprès de la population ayant connaissance de l'usage de cette espèce en médecine traditionnelle.

2. Identification de la plante

L'espèce a été identifiée par Docteurs **Hassani F.**, et **Stamboli H.**, membres du laboratoire d'Ecologie et de Gestion des Ecosystèmes Naturels au département de Biologie et Environnement. La plante a été classée dans le laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA) et a été enregistrée sous la référence suivante :

- Mill. 2086 pour *Helianthemum lippii* (L.) Pers.

3- Situation géographique de station d'étude

La situation ainsi que l'étage bioclimatique de notre station d'étude est représenté dans le **tableau 2 et la figure 2**.

Tableau 2 : Lieu de récolte de la plante et caractéristiques géographiques et bioclimatiques de la station d'étude (Encarta 2009).

Station	Partie étudiée	Longitude (O)	Latitude (N)	Altitude (m)	Etage bioclimatique
Aïn Ben Khelil (Naâma)	Fruits	0° 45'	33° 15'	1156	Aride-chaud

4- Préparation des échantillons

Le matériel végétal (fruits) a été séché à l'ombre et à l'abri de l'humidité à température ambiante pendant quelques jours. Une fois séché, les fruits ont été réduits en poudre à l'aide d'un mortier puis conservée dans des sacs en papier pour des utilisations ultérieures.

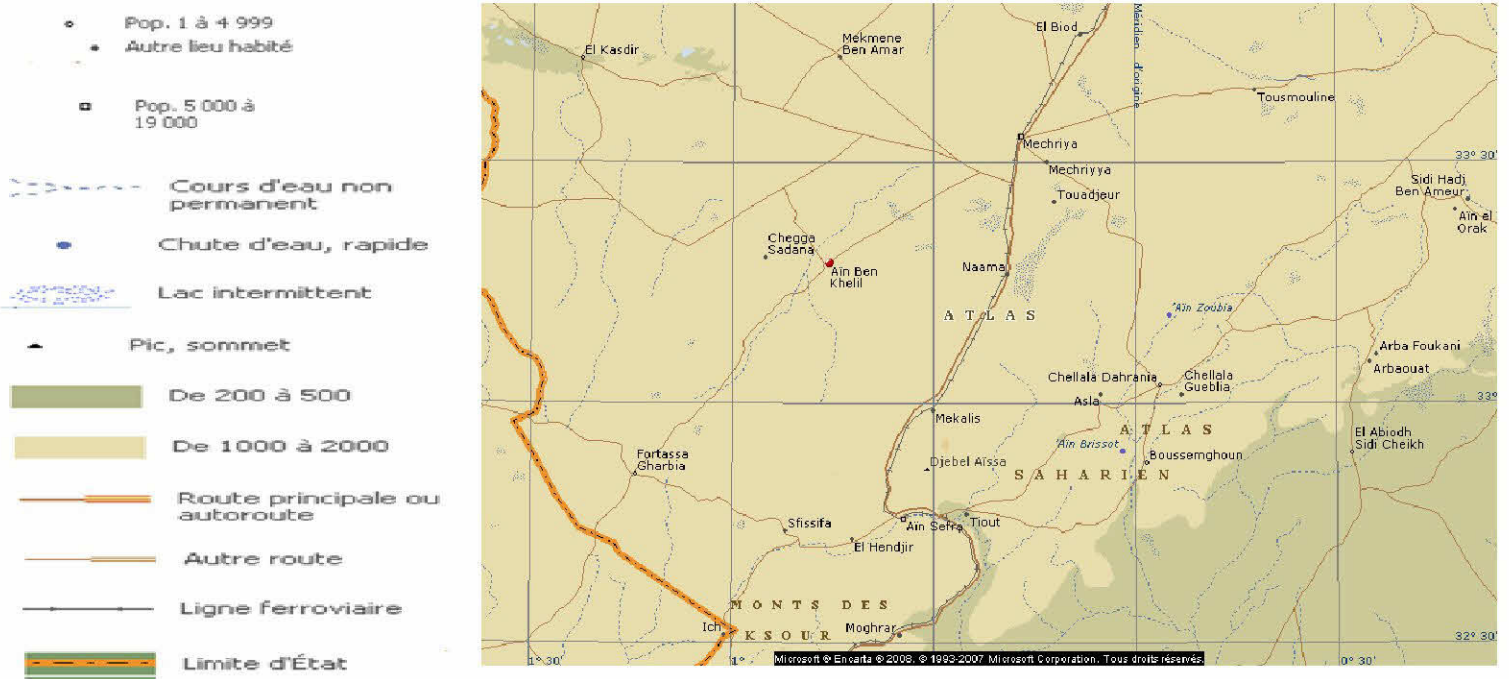


Figure 02: Carte géographique de la station d'étude Ain Ben Khelil

CHAPITRE 2 : Tests Phytochimiques

1-Introduction

L'examen phytochimique est un premier pas dans la recherche des molécules à activités thérapeutiques dans les plantes. Il permet la détection des classes de composés chimiques essentiellement les composés phénoliques, les saponosides, les alcaloïdes, les isoprénoïdes qui renferment les terpénoïdes et les composés réducteurs.

Ces tests phytochimiques sont représentés par :

- Des réactions de coloration et de précipitation ;
- Des essais de solubilités des constituants présents dans la plantes vis-à-vis des solvants organiques de polarité différente ;
- Des examens sous la lumière ultraviolette.

2-Tests phytochimiques

La détection des principaux constituants chimiques est réalisée sur les différents extraits obtenus par épuisement avec de l'eau, avec de l'éthanol et macération par H₂SO₄ pour la partie fruit d'*Helianthemum lippii*.

2.1-Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaud

Dans un ballon monocol surmonter d'un réfrigérant, 10 g du matériel végétal est mis en présence de 120 ml d'eau. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite le mélange est filtré et l'extrait aqueux est soumis aux tests suivants :

2.1.1-Détection des saponosides

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait aqueux, puis la solution est fortement agitée. Ensuite, le mélange est abandonné pendant 20 min et la teneur en saponosides est évaluée :

- ☞ Pas de mousse : test faiblement positif.
- ☞ Mousse moins de 1 cm = test positif.
- ☞ Mousse de 1-2 cm = test positif.
- ☞ Mousse plus de 2 cm = test très positif (**Trease et Evans, 1987**).

2.1.2-Détection des tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant à 1 ml de l'extrait aqueux, 1ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl_3 diluée (1%). L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleu-verte indique la présence des tanins (Trease et Evans, 1987).

2.1.3- Détection des anthocyanes

Un volume de 2 ml d'infusé aqueux est ajouté à 2 ml de HCl 2N. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes (Debrayb *et al*, 1971 ; Paris *et al*, 1969).

2.2-Epuisement du matériel végétal avec du l'éthanol

Dans un ballon monocol surmonté d'un réfrigérant, 10 g du matériel végétal est mis en présence de 60 ml d'éthanol. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite, le mélange est filtré et l'extrait éthanolique est soumis aux tests suivants :

2.2.1-Détection des flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml de l'extrait éthanolique avec 1 ml de HCl concentré et 0.5 g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 min (Earnsworth, 1974).

2.2.2-Détection des tanins galliques et cathéchiqes

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant à 1 ml de l'extrait éthanolique, 2 ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl_3 diluée (1%).

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire (tanins galliques) ; verte ou bleu-verte (tanins cathéchiqes) (Trease et Evans, 1987).

2.2.3-Détection des composés réducteurs

Leur détection consiste à traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec de l'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling, puis chauffer.

Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique (Trease et Evans, 1987).

2.3-Macération du matériel végétal avec l'acide sulfurique (H₂SO₄)

Ajouter 10 ml de H₂SO₄ dilué (1/10) à 10 g de la poudre végétale dans un erlenmeyer de 250 ml. Laisser agiter et macérer pendant 24 h à la température ambiante du laboratoire. Après filtrer sur papier lavé à l'eau distillée de manière à obtenir environ 10 ml de filtrat (Paris et al., 1969).

2.3.1-Détection des alcaloïdes

- 1 ml de filtrat + 5 goutte du réactif de Mayer, s'il apparaît un précipité blanc-jaunâtre c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes.
- 1 ml de filtrat + 5 gouttes du réactif de Wagner, s'il apparaît un précipité brun c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes (Paris et al., 1969).

2.4-Détection des coumarines

Placer 1 g d'échantillon de la plante humide dans un tube à essai. Couvrir le tube avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et le placer dans un bain marie pendant quelques minutes. Ajouter 0.5 ml de NH₄OH (10 %). Mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines (Rizk, 1982).

2.5-Détection des stérols et triterpènes

Deux essais ont été effectués :

- Essai 01 : Test pour les stérols et stéroïdes

10 ml de l'extrait éthanolique est placé dans un erlenmeyer. Après évaporation à sec, le résidu est solubilisé avec 10 ml du chloroforme anhydre. Ensuite mélanger 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydre acétique, ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, agiter puis laisser la solution se reposer.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 min à 21°C) (Trease et Evans, 1987).

- Essai 02 : Test pour les hétérosides stéroïdiques et triterpéniques

Il consiste à évaporer à sec l'extrait éthanolique correspondant à 10 ml. Ensuite dissoudre le résidu obtenu dans le mélange d'anhydre acétique /chloroforme (5/5 : V/V). Puis, filtrer et traiter le filtrat par quelques gouttes d'acide sulfurique concentré (la réaction de Liebermann-Burchardt). Si, cette réaction donne des colorations verte-bleue et verte-violette, elle indique la présence des hétérosides stéroïdiques et triterpéniques respectivement (Trease et Evans, 1987).

CHAPITRE 3 : *Dosage des phénols totaux, des flavonoïdes, des flavonols et des tanins condensés*

1-Préparation de l'extrait brut hydro-alcoolique

Une quantité de 1g de la poudre végétale des fruits d'*H. lippii* est mise à macérer dans un mélange hydro-alcoolique (méthanol/eau ; 70/30 V/V) pendant 24 h. Après la filtration, la solution hydro-méthanolique est évaporée à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif de type Büchi R-200 à 60°C. Le résidu sec pesé est repris par 3ml du méthanol et 2ml d'eau pour l'obtention de deux fractions.

✚ Calcul du rendement en extrait sec:

Nous pouvons déterminer le rendement de la plante en extrait sec en calculant le rapport suivant:

$$R (\%) = (P_1 - P_2 / P_3) \times 100$$

R: Rendement en pourcentage;

P₁: Poids du ballon après évaporation;

P₂: Poids du ballon avant évaporation;

P₃: Poids de la matière végétale de départ.

2-Dosage des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux dans les fractions méthanolique et aqueux a été effectué par une méthode adaptée par **Singleton et Rossi (1965)** avec le réactif du Folin-Ciocalteu.

Une quantité de 200 µl de chaque fraction est introduite dans des tubes à essais, le mélange (1 ml du Folin Ciocalteu dilué 10 fois et 0.8 ml de carbonate de sodium à 7.5 %) est additionné. Les tubes sont agités et conservés durant 30 min.

L'absorbance est mesurée à 765 nm en utilisant le spectrophotomètre Jenway 6405 UV/Vis.

Une courbe d'étalonnage à différentes concentrations d'acide gallique a été préparée. Les teneurs exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/g MS). Les expériences ont été répétées trois fois.

3-Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes est déterminée en utilisant la technique de **Zhishen *et al* (1999)**. Une quantité de 500 µl de solution méthanolique de catéchine à différentes concentration ou des fractions méthanolique et aqueux convenablement diluée est ajoutée à 1500 µl de l'eau distillée. Au temps zéro, 150 µl de nitrite de sodium (NaNO_2) à 5 % est ajouté au mélange. Après 5 min, 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) à 10 % (m/v) est ajouté. Après l'incubation de 6 min à la température ambiante, 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1 M) est additionnée. Immédiatement, le mélange est complètement agité afin d'homogénéiser le contenu.

L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est déterminée à 510 nm contre le blanc. La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EC/ g MS).

4-Dosage des flavonols totaux

Le contenu des flavonols a été déterminé par la méthode décrite par **Kumaran *et al* (2007)**. Une quantité de 0.25 ml d'extraits a été mélangée avec 0.25 ml d' AlCl_3 (2 mg/ ml) et 1.5 ml d'acétate de sodium (50 mg/ ml). L'absorbance à 440 nm a été enregistrée après 2.5 h. La teneur en flavonols a été exprimée en milligramme (mg) équivalent de quercétine par gramme (g) de poids de la matière sèche (mg EQ/g MS). Les expériences ont été répétées trois fois.

5-Dosage des tanins condensés

Les quantités des tanins condensés sont estimées en utilisant la méthode de vanilline (**Julkunen-Titto, 1985**). Un volume de 50 µl de chaque fraction est ajouté à 1500 µl de la solution vanilline /méthanol (4% ; m/v) puis mélangé le contenu à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 µl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à la température ambiante pendant 20 min.

L'absorbance à 550 nm est mesurée contre le blanc. La concentration des tanins est estimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EC/ g MS) à partir de la courbe d'étalonnage.

CHAPITRE 4 : *Extraction des principales familles, l'étude du pouvoir antioxydant et l'analyse par CCM*

1-Introduction

Les extractions sélectives des principales familles des composés phénoliques ont été effectuées sur les fruits d'*H. lippii* selon les méthodes suivantes :

2. Extraction des principales familles de métabolisme secondaire

2.1- Extraction des fractions flavoniques (fractions acétate d'éthyle et n-butanol)

Le schéma suivant décrit la méthode d'extraction des deux fractions des flavonoïdes : d'acétate d'éthyle et butanolique des fruits d'*H.lippii* selon la méthode de **Bekkara et al., 1998** :

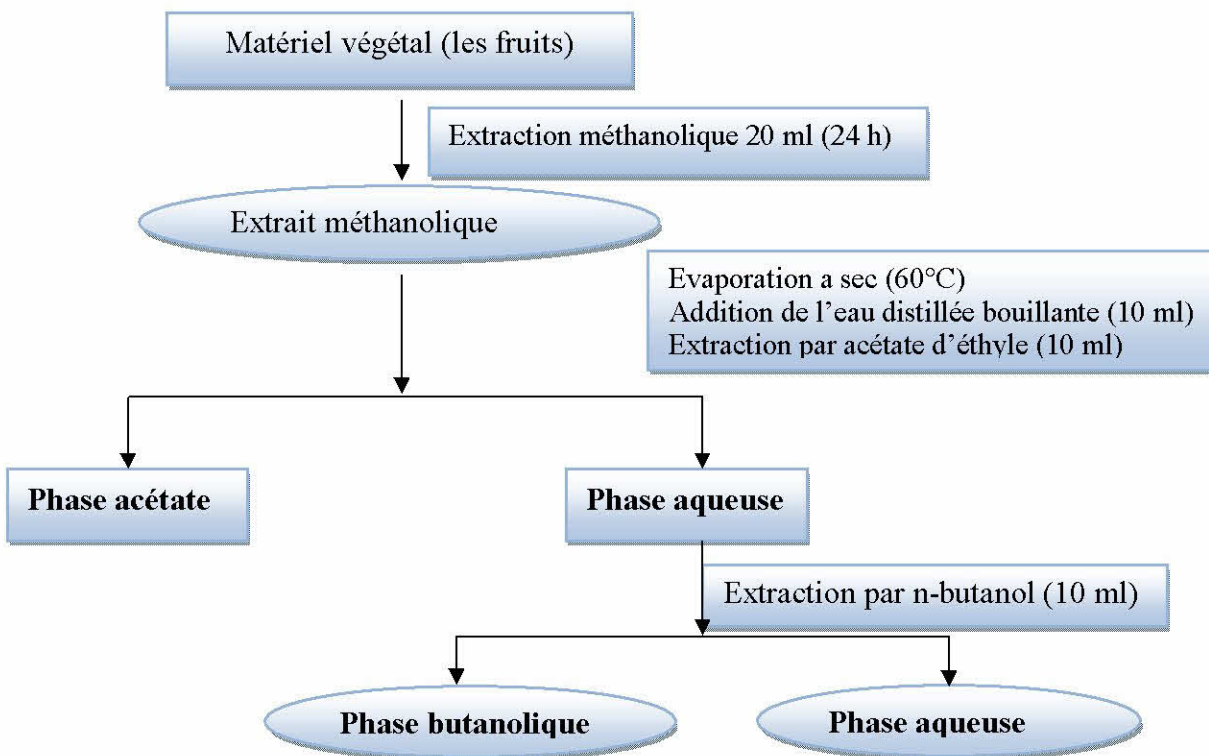


Figure 3 : Protocole d'extraction des fractions flavoniques (Bekkara et al., 1998)

2.2-Extraction des tanins

L'extraction des tanins est obtenue en suivant la méthode de **Zhang et al (2008)**. Le broyat (fruit) (2.5 g) a été extrait par 50 ml du mélange acétone /eau distillée (35/15 ; V/V) durant trois jours à une température ambiante. La solution est filtrée et évaporée à 40°C par un rotavapeur type Buchi R-200 pour éliminer l'acétone. Puis, la phase aqueuse est lavée par 30 ml de dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides. Après la séparation de la phase organique, la phase aqueuse a été extraites deux fois avec 30 ml d'acétate d'éthyle puis les phases organiques sont mélangées et évaporées à sec à 40 °C. Le résidu sec obtenu est pesé puis repris par 3 ml du méthanol.

3-Etude du pouvoir antioxydant

La mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits d'*H. lippii* a été réalisée par trois méthodes à savoir : la capacité antioxydante totale (CAT), la réduction du fer et le piégeage du radical libre DPPH.

3.1/Activité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène de **Prieto et al (1999)**. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdate Mo (V) MoO_2^+ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate /Mo(V) à pH acide .

Un volume de 0.3 ml de chaque extrait est mélangé avec 3 ml de solution de réactif (acide sulfurique 0.6M, phosphate de sodium 28 mM et molybdate d'ammonium 4 mM). Les tubes sont visés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après, refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 ml de la solution du réactif et 0.3 ml du méthanol et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon.

La CAT est exprimée en milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme de matière sèche (mg EAA/g MS). Les expériences sont répétées en deux fois.

3.2/ Réduction du fer (FRAP : *Ferric reducing antioxidant power*)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}).

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée par **Oyaizu (1986)**. En effet, 1 ml de différentes concentrations de chaque extrait dilué dans le méthanol est mélangé avec 2.5 ml de la solution tampon phosphate (0.2 M ; pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) à 1 %. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 30 min. Après, 2.5 ml de l'acide trichloracétique (10 %) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. Ensuite, 2.5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2.5 ml de l'eau distillée et 0.5 ml $FeCl_3$ (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type Specord^R 200 Plus.

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

L'acide ascorbique est utilisé comme un contrôle positif. Les expériences sont répétées deux fois.

3.3-Piégeage du radical DPPH

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH[•]) est un radical stable qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm (**Bandoniène et al., 2002 ; Pavlov et al., 2002 ; Gazi et al., 2004**). Le DPPH, initialement violet, est décoloré lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité de l'extrait à piéger ce radical libre indépendamment de toutes activités enzymatiques (**Djeridane et al., 2006**).

L'effet des extraits d'*H. lippii* sur le (DPPH[•]) est mesuré par la procédure décrite par **Sanchez et ses collaborateurs (1998)**. Un volume de 50 µl de différentes concentrations de l'extrait exprimées en mg/ml est ajouté à 1.950 µl de la solution méthanolique du DPPH (0.025 g/l) fraîchement préparée. L'absorbance est mesurée à 515 nm après 30 min d'incubation à la température ambiante. Les pourcentages d'inhibition (%) du radical DPPH sont calculés à partir de la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(DO_{\text{témoin}} - DO_{\text{échantillon}}) / DO_{\text{témoin}}] * 100$$

Où : $DO_{\text{témoin}}$: représente l'absorbance du contrôle sans extrait après 30 min.

$DO_{\text{échantillon}}$: représente l'absorbance en présence d'extrait après 30 min.

La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations d'extrait nous a permis de calculer la concentration efficace (efficient concentration value : EC_{50}). Cette

dernière est définie comme la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration initiale du DPPH à 50%.

3.4-Analyse statistique

Dans toutes les expériences du dosage et d'évaluation de l'activité antioxydante, les données expérimentales obtenues ont été exprimées en tant que la moyenne \pm l'écart-type. Le coefficient de corrélation (R^2) de l'activité antioxydante a été déterminé en utilisant les programmes Origine 6 et l'Excel 2003.

4-Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant (**Antonot et Marchal, 1998**).

Dans notre travail, nous avons procédé à une chromatographie sur couche mince CCM pour la séparation du pool flavonique des deux fractions d'acétate d'éthyle et butanolique. Le système d'élution choisi après plusieurs essais est celui du Butanol/Acide acétique/Eau (BAW) (40 :10 : 50) sur la plaque en plastique du support polyamide de taille 20 x 20 cm. Après développement, la plaque a été observée sous la lampe UV à 254 et 366 nm. Les couleurs des spots ont été enregistrées ainsi de même pour les Rf.

Nous avons utilisé les 13 témoins suivants

La catéchine, l'acide gallique, l'acide tannique, l'acide *para*-coumarique, la quercétine, la naringénine, l'hydroquinone, le pyrocatechol, le phloroglucinol, l'acide synergique, l'acide vanillique, l'acide férulique et la résorcinol.

Résultats
Et discussion

Chapitre 1 : Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques réalisés sur les fruits d'*H. lippii* ont permis de mettre en évidence les différentes familles de composés chimiques (**Tableau 03**)

Tableau 03: Résultats des tests phytochimiques recherchés dans les fruits d'*H. lippii*.

Les extraits	Familles chimiques	Résultat trouvé
Extrait aqueux	Saponosides	++
	Tanins	+++
	Anthocyanes	-
Extrait éthanolique	Flavonoïdes	+++
	Composés réducteurs	+
	Stérols et stéroïdes	-
	Hétérosides stérosidiques et triterpènes	+
	Tanins galliques	+++
	Tanins cathéchiques	-
Poudre végétale	Coumarines	-
	Alcaloïdes	++

(+++): Test fortement positif ; (++) : test positif ; (+) : test faiblement positif ; (-) : test négatif.

Le **Tableau 03** montre la richesse des fruits d'*H. lippii* en flavonoïdes et en tanins particulièrement les tanins galliques, tandis que les saponosides, les alcaloïdes, les composés réducteurs et les hétérosides stérosidiques et triterpènes sont présents en faible quantité.

Nous enregistrons aussi l'absence des tanins cathéchiques, des stérols et stéroïdes, des anthocyanes et des coumarines. En comparaison avec la littérature, nos résultats sont comparables avec les travaux de **Nouri et al (2012)**. Ces auteurs ont mis en évidence la présence des différentes familles chimiques à l'exception des alcaloïdes qui sont absents.

Chapitre 2: Rendements et teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes, en flavonols et en tanins condensés**1. Rendement des extraits secs**

Les extractions des différents composés phénoliques les plus abondant dans notre plante nous ont permis de calculer le rendement de chaque extrait notamment les extraits bruts méthanoliques, les flavonoïdes (fraction acétate d' éthyle et butanolique) et les tanins. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 04.

Nous notons que l'extrait brut méthanolique des fruits de l'ordre de (16.51%) est solubilisé dans deux solvants, une partie dans l'eau est appelée la fraction aqueuse et l'autre dans le méthanol est appelée la fraction méthanolique.

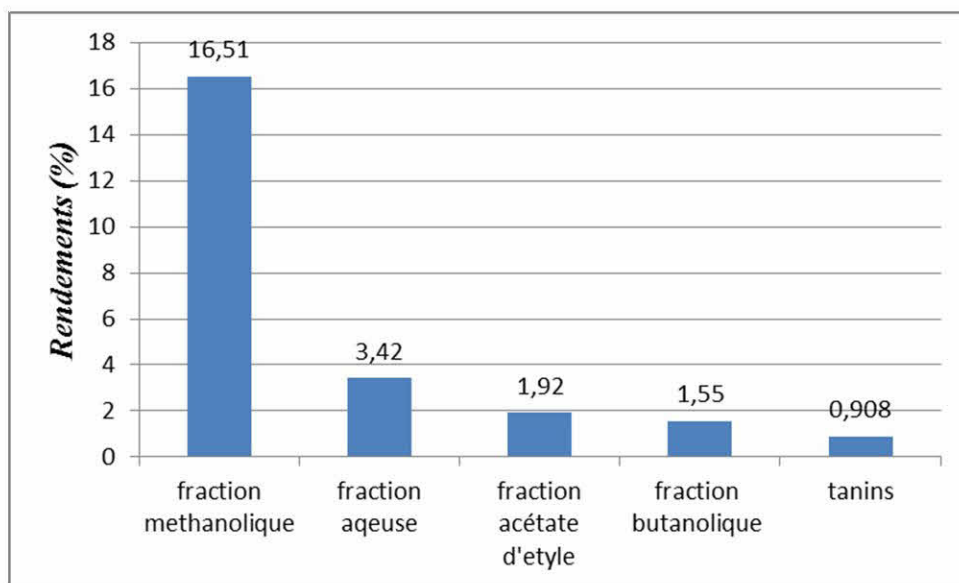


Figure 04 : Rendements des extraits des composés phénoliques.

D'après la figure 04, nous constatons que le rendement le plus élevé est celui de la fraction méthanolique de l'extrait brut des fruits d'*H. lippii* de l'ordre de 16.51%, suivi par la fraction aqueuse à raison de 3.42 %. En ce qui concerne la répartition des autres métabolites

secondaires, nous enregistrons des rendements faibles pour les tanins (0.908 %), la fraction acétate d'éthyle (1.92 %) et la fraction butanolique (1.55 %). Comparativement avec d'autres travaux, **Abdul Gbaj et al (2012)** ont trouvé un rendement en extrait méthanolique de l'ordre de 12.90 %, ce qui est inférieur à nos résultats.

2. Teneur en phénols totaux, en flavonoïdes, en flavonols, en tanins condensés

Les teneurs des composés phénoliques dans les fruits d'*H. lippii* sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage exprimées en mg équivalent d'acide gallique (mg EAG) pour les phénols totaux, mg équivalent de catéchine (mg EC) pour les flavonoïdes et les tanins condensés et mg équivalent de quercétine pour les flavonols par g de la matière sèche (MS) (**figure 5, 6, 7, 8**).

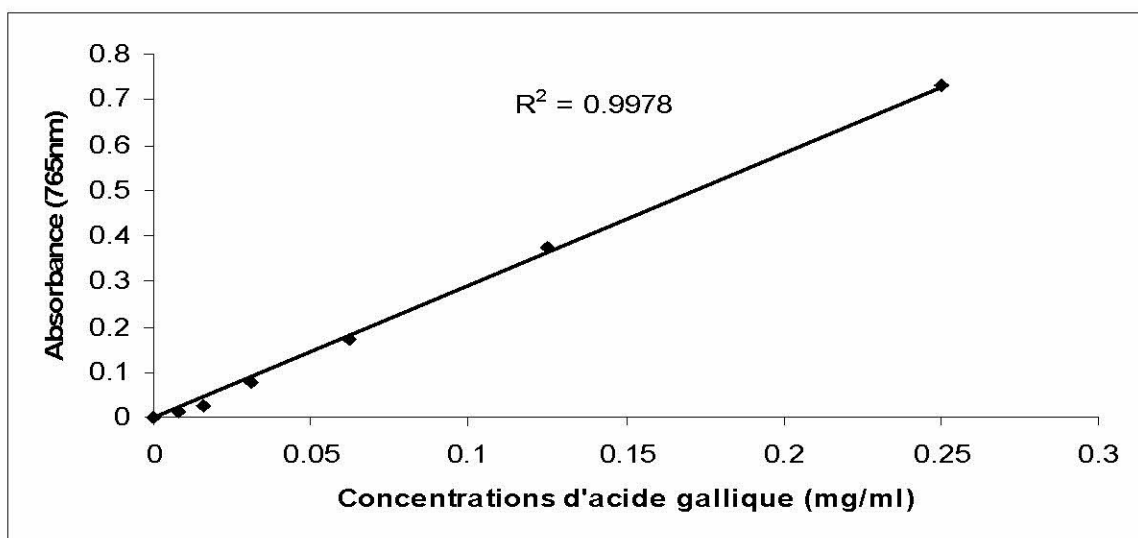


Figure 5 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

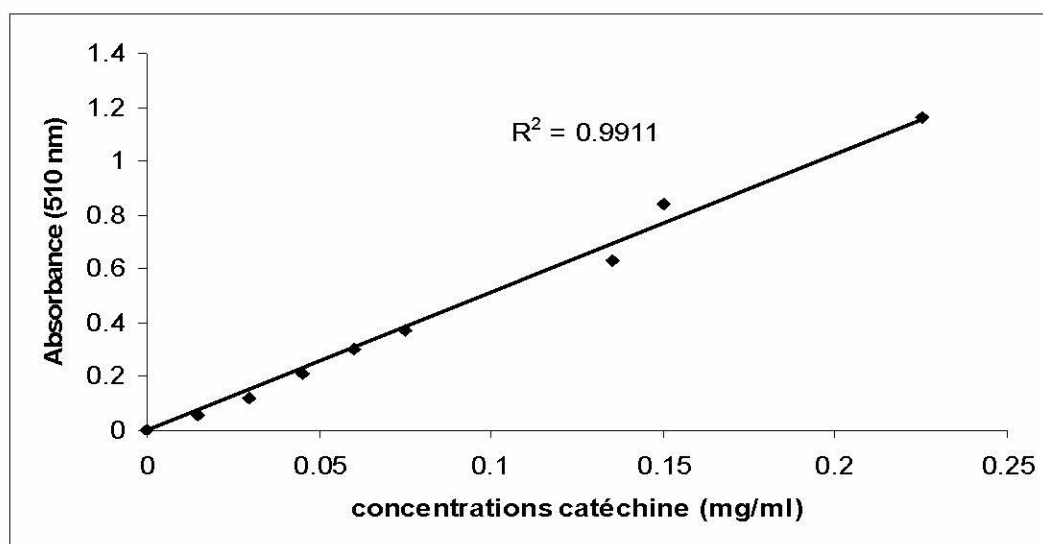


Figure 6: Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

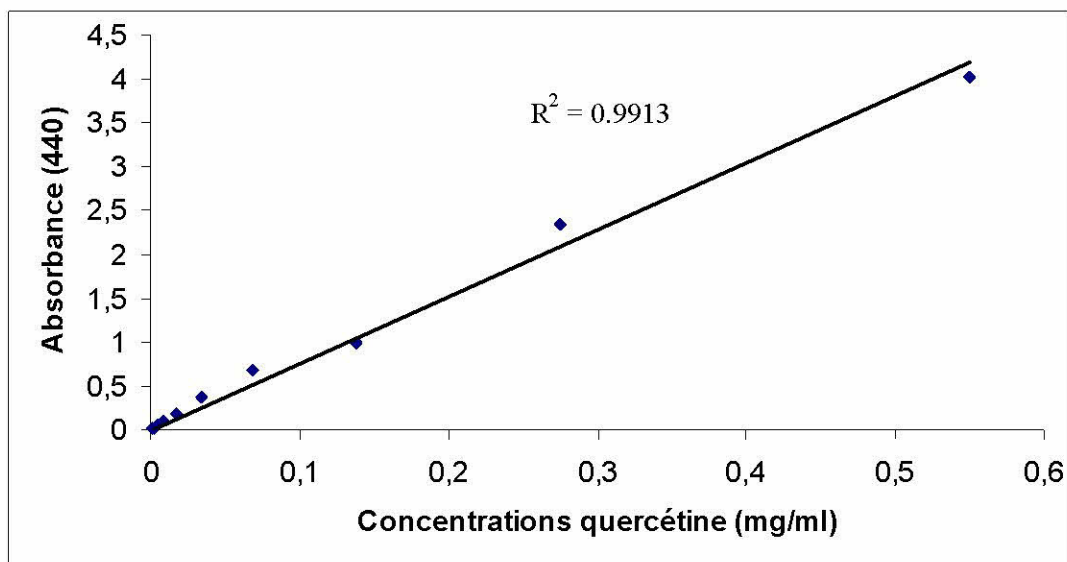


Figure 7: Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonols.

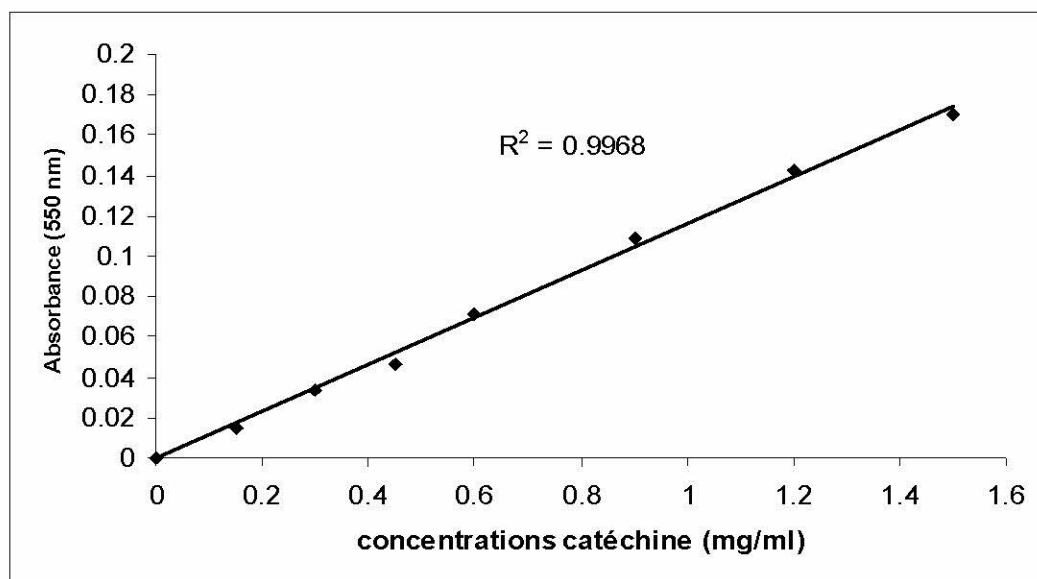


Figure 8: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.

Le Tableau 04 résume les résultats obtenus des teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes, en flavonols et en tanins catéchiques.

Tableau 04 : Teneur en phénols totaux, en flavonoïdes, en flavonols et en tanins catéchiques

Teneurs	Fraction méthanolique	Fraction aqueuse
Phénols totaux (mg EAG/ g MS)	73.168 ± 0.097	25.466 ± 0.066
Flavonoïdes (mg EC/ g MS)	3.498 ± 0.215	3.161 ± 0.105
Flavonols (mg EQ/ g MS)	4.869 ± 0.140	1.398 ± 0.156
Tanins condensés (mg EC/ g MS)	5.396 ± 1,525	5.001 ± 0.522

Nous observons que la fraction méthanolique de l'extrait des fruits d'*H. lippii* possède des teneurs plus élevées en phénols totaux (73.168 ± 0,097 mg EAG/ g MS) et en flavonols (4,869 ± 0.140 mg EQ/ g MS). Les teneurs en flavonoïdes et en tanins condensés présentent des valeurs presque comparables à raison de 1,398 ± 0,156 et 5,001 ± 0,522 mg/g pour la fraction aqueuse et 4,869 ± 0.140 et 5,396 ± 1,525 pour la fraction méthanolique, respectivement.

Ces teneurs élevées en phénols totaux sont supérieures par rapport aux résultats trouvés par Alali et al (2007) sur les extraits méthanoliques (25.0 mg/g de poids sec) et aqueux (30.5 mg/g) d'*H. lippii*.

1. Introduction

Dans notre étude, l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits des composés phénoliques des fruits d'*H. lippii* a été réalisée par trois tests chimiques à savoir : la capacité antioxydante totale (CAT), la réduction de fer et le piégeage du radical libre DPPH.

2. Méthode de la capacité antioxydante totale

La figure 9 montre que tous les extraits présentent des capacités antioxydantes totales différentes.

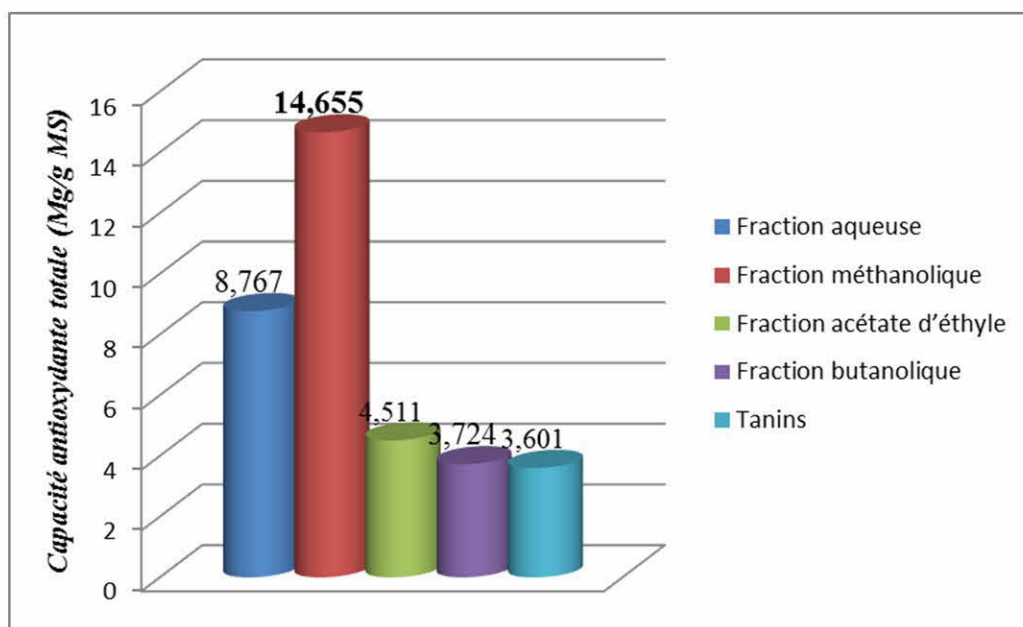


Figure 09 : Comparaison de la capacité antioxydante totale des différents extraits d'*H. lippii*.

Nous constatons que la fraction méthanolique de l'extrait brut possède la meilleure capacité antioxydante totale de l'ordre de $14,655 \pm 0,002$ mg EAA/g MS suivi par la fraction aqueuse ($8,766 \pm 0,205$ mg EAA/g MS). Pour les autres extraits, les capacités antioxydantes totales enregistrées sont faibles et varient entre $3,601 \pm 0,377$ et $4,511 \pm 0,117$ mg/g.

3. Réduction du fer

Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} (Karagozler *et al.*, 2008).

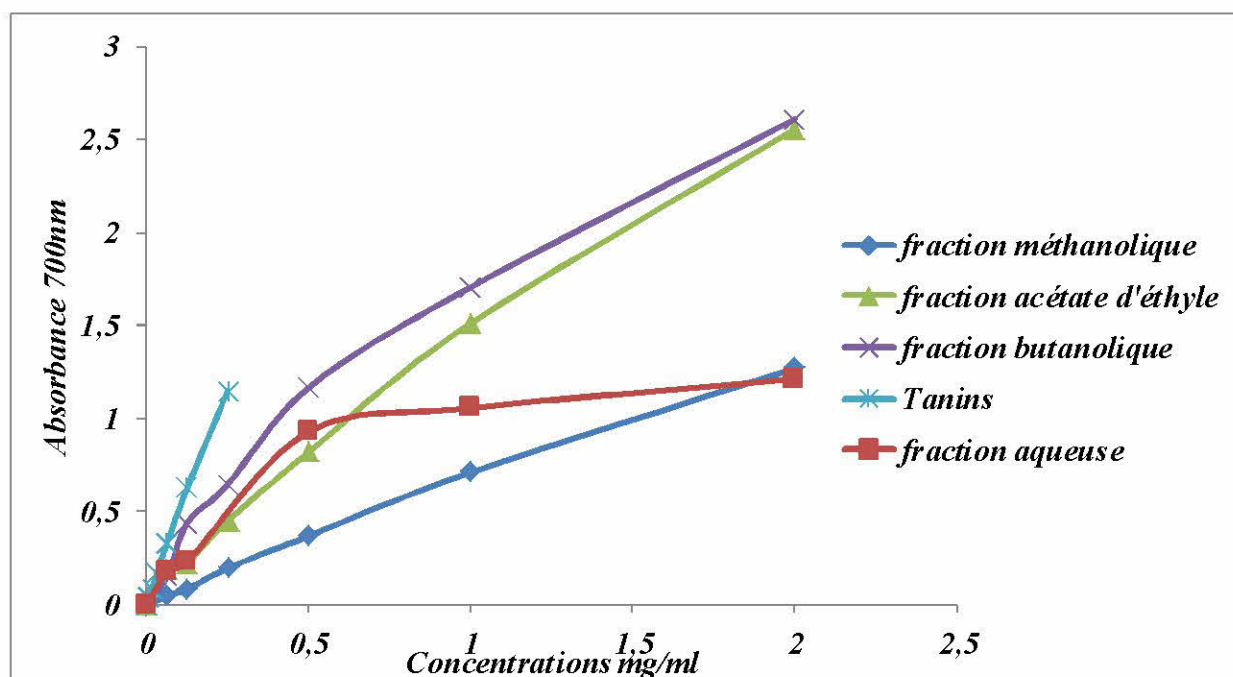


Figure 10: Pouvoir réducteur des extraits des fruits d'*H. lippii*

Le résultat représenté dans la figure 10 nous a montré que la capacité réductrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons, c'est-à-dire que le pouvoir réducteur des extraits est dose dépendante (concentration dépendante).

A la concentration 2 mg/ ml, les pouvoirs réducteurs des fractions acétate d'éthyle et butanolique sont nettement supérieurs, les valeurs maximales de l'absorbance sont de 2,56 et 2,67 respectivement.

Les fractions aqueuses et méthanolique vu que ces deux dernières ont aussi une activité intéressante. Il est à signaler que les extraits tanniques s'avèrent le plus puissant vis à vis de réduction de fer à la concentration 0.25 mg/ml (la valeur de $DO_1 = 1,15$)

Afin de comparer l'efficacité réductrice des extraits à libérer un électron, nous avons déterminé la concentration IC_{50} . Ce paramètre est défini comme la concentration nécessaire pour réduire 50 % du fer. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 5.

Tableau 5: Concentration IC₅₀ des extraits des composés phénoliques d'*H. lippii* obtenues par le test de la réduction du fer

Les extraits		IC ₅₀ (mg/ml)
Extrait brut méthanolique	Fraction aqueuse	1.070±0.032
	Fraction méthanolique	0.740 ± 0.010
Flavonoïdes	Fraction acétate d'éthyle	0.285 ± 0.002
	Fraction butanolique	0.142 ± 0.037
	Tanins	0.103 ± 0.003
	Acide ascorbique	0.06 ± 0.00

Nous remarquons que tous les extraits d'*H. lippii* possèdent des capacités réductrices différentes. Les concentrations IC₅₀ les plus faibles sont signalées dans l'extrait tannique (0,10 ± 0,00 mg/ml) et la fraction butanolique (0,14 ± 0,07 mg/ml), ce qui est expliqué par la forte activité antioxydante à réduire le fer mais faible par rapport à celle de l'acide ascorbique (0.06 ± 0.00 mg/ml). Pour les autres extraits, les concentrations IC₅₀ varient entre 0,28 ± 0,00 mg/ml pour la fraction acétate d'éthyle et 1,07 ± 0,03 mg/ml pour la fraction aqueuse.

Nous pouvons classer la puissance de la réduction du fer des différents extraits comme suit: Acide ascorbique > Tanins > Fraction butanolique > Fraction acétate d'éthyle > fraction aqueuse (extrait brut) > fraction méthanolique (extrait brut).

4. Piégeage du radical libre DPPH•

L'activité antioxydante des différents extraits d'*H. lippii* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 515 nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaires (Majhenic et al, 2007).

D'une manière générale, tous les extraits testés ont provoqué une diminution plus ou moins importante de l'absorbance selon leurs concentrations.

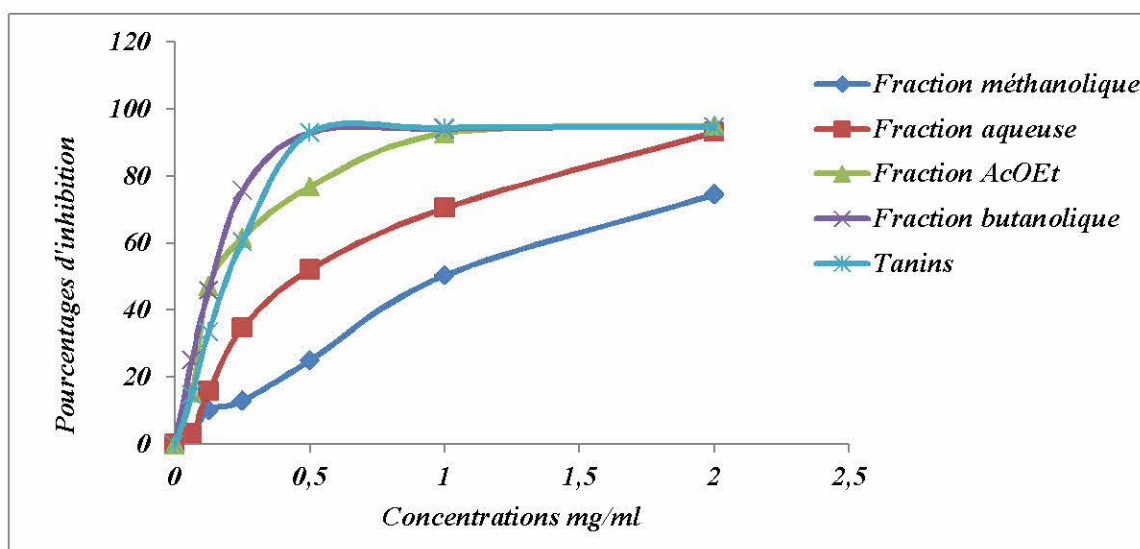


Figure 11: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait brut, la fraction acétate d'éthyle, la fraction butanolique et les tanins

A partir de cette figure, nous constatons que le pourcentage d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration.

A la concentration 2 mg/ml, la fraction acétate d'éthyle enregistre un pourcentage d'inhibition le plus important de l'ordre de 95% comparativement à la fraction butanolique (94.75%), ainsi à celui des tanins (94.62%) et de la fraction aqueuse (93.18%). Pour la fraction méthanolique, le pourcentage d'inhibition est de l'ordre de 74.5% à la même concentration.

Pour comparer la capacité antioxydante de nos extraits, nous avons déterminé expérimentalement, le paramètre EC_{50} (Tableau 6). Ce paramètre qui est appelé aussi la valeur IC_{50} a été présenté récemment pour l'interprétation des résultats de la méthode du DPPH. Ceci est défini comme la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH[•]. Plus la valeur d' EC_{50} est petite, plus l'activité de l'extrait testé est grande (Pokorny et al., 2001).

Tableau 6 : Concentrations EC₅₀ des extraits des composés phénoliques d'*H. lippii* obtenues par le test DPPH.

Les extraits		EC ₅₀ (mg/ ml)
Extrait brut méthanolique	Fraction aqueuse	0.487 ± 0.016
	Fraction méthanolique	1.058 ± 0.011
Flavonoïdes	Fraction acétate d'éthyle	0.178 ± 0.003
	Fraction butanolique	0.135 ± 0.004
	Tanins	0.194 ± 0.008
	Acide ascorbique	0.12 ± 0.00

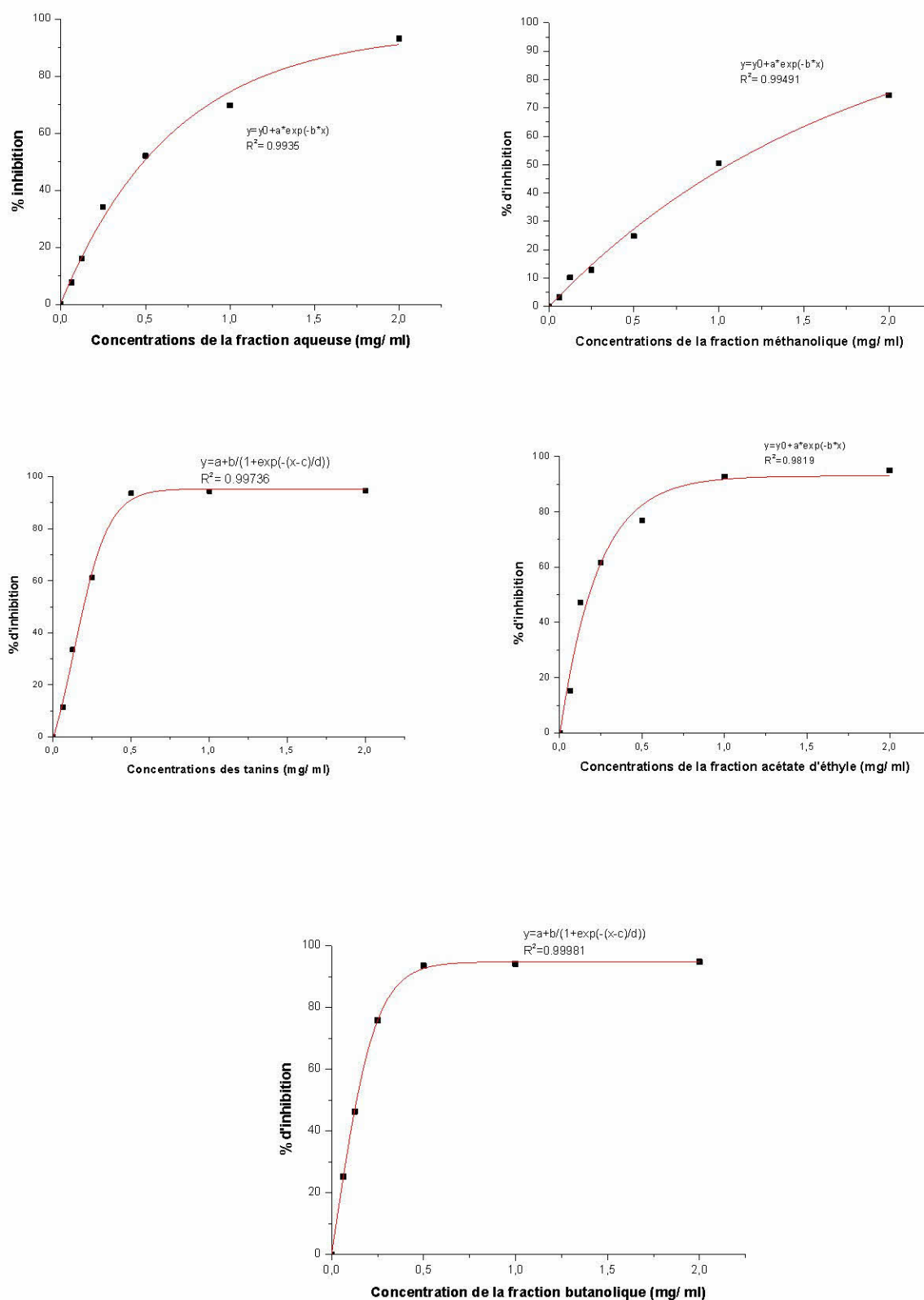


Figure 12: Pourcentage d'inhibition du DPPH (%) en fonction des concentrations de la fraction aqueuse , de la fraction méthanolique,de la fraction acétate d'éthyle, de la fraction butanolique, et des tannins des fruits d'*H.lippii*.

D'après ce tableau, nous remarquons que tous ces extraits possèdent une activité antiradicalaire puissante, c'est à dire une affinité facile à céder le proton H^+ qui neutralise le radical DPPH. En comparant les EC_{50} des différents extraits testés, nous remarquons une activité antioxydante élevée de la fraction butanolique avec une concentration EC_{50} égale à 0.13 mg/ml. Cette valeur est proche à celle de l'acide ascorbique (0.12 mg/ml). Alors, les concentrations EC_{50} de la fraction acétate d'éthyle, les tanins les fractions aqueuse et méthanolique sont de l'ordre de $0.178 \pm 0,000$, 0.194 ± 0.004 , $0,487 \pm 0.016$ et 1.058 ± 0.011 mg/ml respectivement.

D'après les valeurs de la concentration EC_{50} , le classement de l'efficacité des extraits par ordre décroissant est le suivant:

Acide ascorbique > fraction butanolique > fraction acétate d'éthyle > Tanins > Fraction aqueuse > Fraction méthanolique.

Les résultats de cette activité antioxydante de nos extraits sont nettement supérieurs par rapport à ceux reportés par (Abdul et al.,2012) Ces auteurs ont montré que l'extrait méthanolique d'*H. lippii* possède une forte activité à piéger le DPPH à raison de 0.045 ± 0.023 mg/ml.

5. Analyse qualitative du pool flavonique des fractions d'*H. lippii* obtenues par l'acétate d'éthyle et le butanol

Nous avons soumis nos fractions acétate d'éthyle et butanolique à une analyse sur chromatographie sur couche mince. Le système de solvants utilisé est celui du Butanol/ Acide acétique/ Eau (BAW) (4/1/5) pour la plaque polyamide.

Après le développement, la plaque a été retirée, séchée et examinée sous la lampe UV à 365 nm en basant sur la couleur et le R_f des taches obtenues. Les 13 témoins employés sont les suivants : la catéchine, l'acide gallique, l'acide tannique, l'acide *para*-coumarique, la quercétine, la naringénine, l'hydroquinone, le pyrocatechol, le phloroglucinol, l'acide synergique, l'acide vanillique, l'acide férulique et la résorcinol.

Le résultat obtenu est résumé dans le tableau 7.

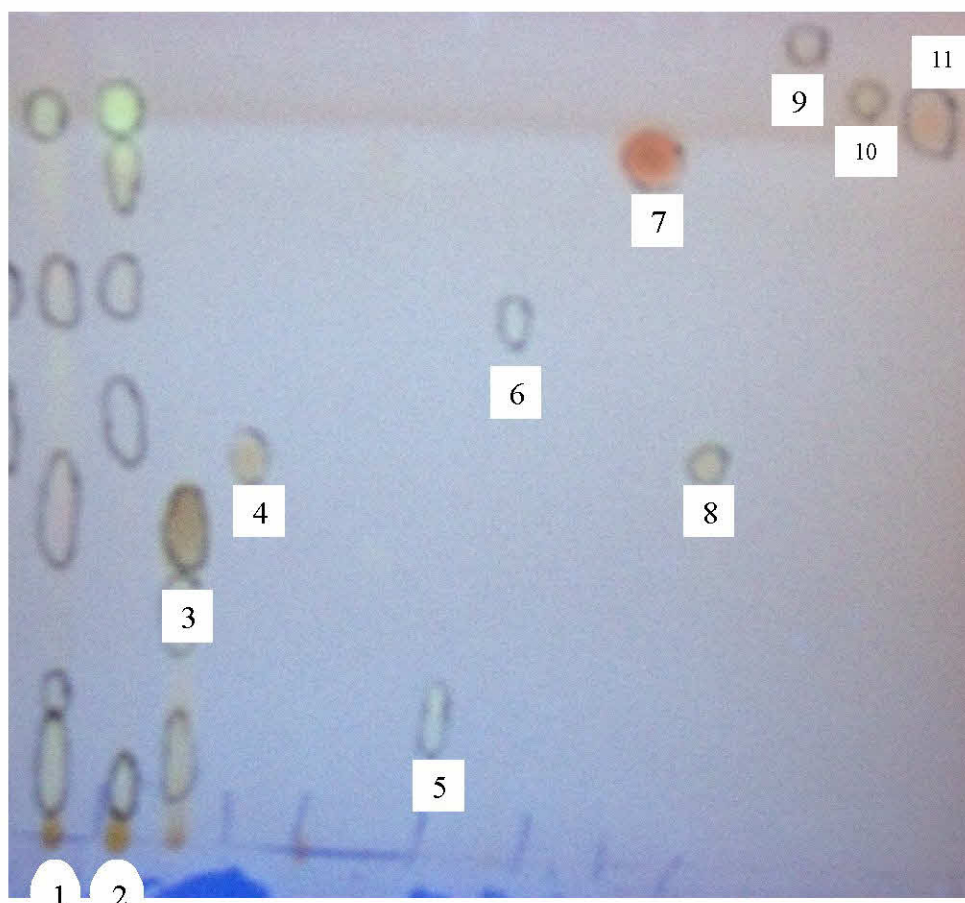


Photo 2 : Chromatogramme résultant de l'analyse des fractions flavoniques (acétate d'éthyle et butanolique) et des témoins par chromatographie sur polyamide (révélation à l'UV : 365 nm) avec le système Butanol/Acide acétique/Eau (BAW) (40 :10 : 50).

1: Fraction acétate d'éthyle ; 2: Fraction butanolique ; 3: la catéchine ; 4: l'acide gallique ; 5: la quercétine ; 6 : la naringénine ; 7 : le pyrocatechol ; 8 : le phloroglucinol ; 9 : l'acide synergique ; 10 : l'acide vanillique ; 11 : l'acide férulique

Tableau 7: Les classes de flavonoïdes des fractions acétate d'éthyle et butanolique des fruits d'*H. lippii*.

Fraction de l'extrait	Rf (cm)	Révélation sous UV 365 nm	Type flavonoïdes possibles (Markham, 1982)
Fraction acétate d'éthyle	0.07	Jaune pale	Flavonols
	0.15	Fluorescence Jaune	-Flavonols -Aurone et chalcones
	0.35	Rouge	Anthocyanidine
	0.60	Jaune	Flavonols
	0.78	Vert clair	-flavonones ou aurones
Fraction butanolique	0.05	Vert	-flavonones ou aurones
	0.46	Fluorescence Jaune	-Flavonols -Aurone et chalcones
	0.60	Jaune	Flavonols
	0.72	Fluorescence blanche	Isoflavones
	0.78	Jaune pale	Flavonols

Tableau 08 : Les RF des témoins sous l'UV à 360 nm.

Étalons	RF	Classes phénoliques
Catéchine	0.33	Flavan-3-ols
Acide gallique	0.42	Acide phénol
Quercétine	0.14	Flavonol
Naringénine	0.57	Flavanone
Pyrocatechol	0.75	Phénol simple
Phloroglucinol	0.43	Phénol simple
Acide synergique	0.86	Acide phénol
Acide vanillique	0.80	Acide phénol
Acide férulique	0.79	Acide phénol

En comparaison avec les témoins, nous ne sommes pas arrivées à une bonne identification de nos extraits, pour cela les couleurs des taches des fractions flavoniques ont été comparées avec celles établis par **Markham (1982)**.

Pour la fraction acétate d'éthyle, on a pu suspecter la présence des flavonols (jaune), des flavonols- aurone et quelques 2-,4-OH chalcones (fluorescence jaune), d'anthocyanidine 3,5-diglycosides (rouge) et des flavonols avec 3-OH libre, des flavonones ou auronnes (vert clair).

De même pour la fraction butanolique, on a eu des flavonols (jaune), des Isoflavones (fluorescence blanche), des flavonols, aurone et quelques 2-,4-OH chalcones (fluorescence jaune) et des flavonones ou auronnes (couleur verte).

En effet, après la synthèse de ces résultats, nous constatons qu'il y a une relation étroite entre la teneur en phénols totaux et la capacité antioxydante totale des deux fractions de l'extrait brut. Ce résultat a été prouvé par **Tawaha et al (2007)** qui ont montré qu'il existe une corrélation linéaire significative entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques totaux pour les extraits méthanoliques et aqueux d'*H. lippii*. Cette confirmation a été reporté par plusieurs auteurs sur d'autres espèces (**Zheng et Wang., 2001; Cai et al., 2004**).

Contrairement, l'activité antioxydante étudiée par les deux autres tests de l'extrait brut des composés phénoliques reste faible comparativement aux tanins et aux flavonoïdes qui sont représentés par les deux fractions acétate et butanolique. Ceci est expliqué par l'absence de synergie entre les molécules des composés phénoliques. Notant que l'expression de l'activité antioxydante d'un extrait est corrélée non seulement de la quantité en polyphénols mais aussi de la structure chimique de ces molécules.

La forte activité antioxydante des fractions flavoniques, acétate d'éthyle et butanolique, d'*H. lippii* reportée dans cette étude est due probablement à la teneur élevée en flavonols enregistrée dans l'extrait brut. Ceci a été confirmé par la chromatographie sur couche mince de ces deux fractions où la classe des flavonols renforce la capacité des extraits à céder un proton pour réduire le DPPH et de libérer un électron pour réduire le fer, ce qui est prouvé par **Tawaha et al (2007)**. Parmi ces composés, nous citons la présence du Kaempférol et de quercétine dans la partie aérienne d'*H. glomeratum*. Ces deux constituants sont dotés d'avoir une forte activité antioxydante (**Cai et al., 2004**). D'autres études ont montré que les substances phénoliques, comme les flavonoïdes et les acides phénoliques, sont

considérablement plus antioxydants que la vitamine C et la vitamine E (Cao *et al.*, 1997 ; Vinson *et al.*, 1995).

L'efficacité antioxydante des tanins dans notre étude a été aussi reportée par la littérature et cela est dû à la présence des noyaux phénols (Peronny, 2005). Cette structure possède la particularité d'inhiber la peroxydation des lipides, en agissant comme donneur de proton aux radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'auto-oxydation (Perret, 2001).

Nous notons que les tanins hydrolysables et condensés sont 15 à 30 fois plus efficaces que les phénols simples et même plus actifs que les vitamines (Peronny, 2005). Par exemple, l'étude de la propriété antiradicalaire des tanins a montré que les procyanidines dimériques peuvent emprisonner 8 radicaux pyroxyles alors que l'acide ascorbique emprisonne un seul radical et l' α tocophérol emprisonne deux radicaux.

D'après De Bruyne *et al.* (1999), plusieurs propriétés structurales des tanins augmentent leur activité antioxydante : la galloylation, préférablement en position 3' augmente la capacité du piégeage pour les deux radicaux O_2^\bullet et OH^\bullet , aussi le piégeage de O_2^\bullet est plus important pour les dimères procyanidines couplés par une liaison (4 \rightarrow 8) que les dimères liés par (4 \rightarrow 6).

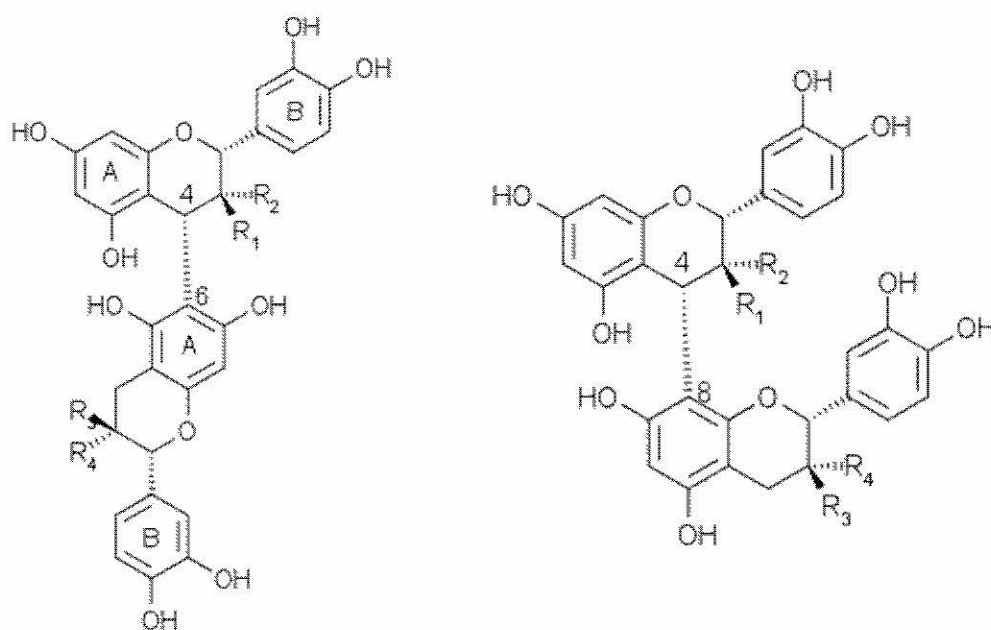


Figure 13 : Structures chimiques des proanthocyanidols dimériques (Perret, 2001).

Conclusion

Générale

A l'heure actuelle, les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme une source de matières premières essentielles pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments. C'est pour cette raison que le patrimoine végétal doit être absolument préservé dans sa diversité et dans son étendue.

Par l'étendue des domaines de recherches impliqués actuellement, nous nous sommes intéressés dans ce travail à la quantification phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de la plante médicinale Saharienne *Helianthemum lippii* (Cistacées).

Les résultats obtenus de cette étude nous ont permis de conclure:

La richesse des fruits de la plante par les flavonoïdes, les tanins galliques et les saponosides. Les composés réducteurs, les alcaloïdes et les hétérosides stérosidiques et tritèrènes se trouvent en faibles quantités.

Le rendement le plus élevé est celui de la fraction méthanolique de l'extrait brut de l'ordre de 16.51%.

Le dosage de la teneur en phénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu montre que cette plante est une source importante en composés phénoliques à raison de 73.168 mg EAG/ g MS pour la fraction méthanolique contre $25.466 \pm 0,066$ mg/ g pour la fraction aqueuse. Alors que, les teneurs en tannins condensés, en flavonoïdes et en flavonols sont respectivement de 5.396 ± 1.525 , 3.498 ± 0.215 mg EC/ g de MS et $4,869 \pm 0.140$ mg EQ/ g de MS pour la fraction méthanolique et 5.001 ± 0.522 , 3.161 ± 0.105 et 1.398 ± 0.156 mg/ g pour la fraction aqueuse.

L'étude du pouvoir antioxydant par trois tests montre que la fraction méthanolique de l'extrait brut possède la meilleure capacité antioxydante totale (CAT) de l'ordre de 14.655 ± 0.002 mg EAA/g MS.

En outre, le test du pouvoir réducteur par la méthode du FRAP enregistre que tous les extraits étudiés des fruits ont des capacités réductrices dont la plus importante est celle de

l'extrait tannique avec une concentration de 0.10 ± 0.00 mg/ml. Cette valeur est légèrement supérieure à celle de l'acide ascorbique (0.06mg/ml).

Le troisième test du piégeage du radical DPPH révèle la présence d'une activité inhibitrice intéressante de 0.13 mg/ml pour la fraction butanolique. Ce pouvoir est proche à celui de l'acide ascorbique (0.12 mg/ml).

La fraction acétate d'éthyle et les tanins détiennent presque les mêmes activités de 0.178 ± 0.003 et 0.194 ± 0.008 mg/ml respectivement, suivi par les fractions aqueuse (0.487 ± 0.016 mg/ml) et méthanolique (1.058 ± 0.011 mg/ml) de l'extrait brut respectivement.

L'analyse qualitative des flavonoïdes des deux fractions acétate d'éthyle et butanolique par CCM a révélé la richesse des fruits de la plante par les flavonols, une fameuse classe identifiée dans la famille des Cistacées et qui possède une forte activité antioxydante.

Cette étude reste qu'un premier pas dans la recherche des antioxydants de la plante *H. lippii*. Un travail complémentaire est nécessaire en vue :

- ✓ D'identifier et purifier les différentes molécules bioactives en particulier les composés phénoliques en utilisant diverses techniques chromatographiques (HPLC ; UV, RMN, SM) ;
- ✓ D'élargir le panel des tests d'activité antioxydante *in vitro* et *in vivo* de ces molécules identifiées ;
- ✓ D'exploiter ces composés dans l'industrie agro-alimentaire.

Références

bibliographiques

-A-

Abdul, G., Sami, G.A ., Alsabri, A., Abdulmottaleb, E., Zetrini, A.A., Nouri, B.E., Aburas, K. M., Ermeli, B., Salah,B.M ., Safa,R.F., Bensaber, S.M ., Mousa,I.,Hermann, A. **(2012)**. Study of eight medicinal plants for antioxidant activities.*Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **4(8)**:4028-4031

Alali, F., Tawaha, K., El-Elimat, T., Syouf, M., El-Fayad, M., Abulaila, K., Nielsen, S.J., Wheaton, W. D., Falkinham, J. O. Oberlies, N. H. **(2007)**. Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants.*Natural Product Research*, **21**: 1121-1131.

Ames, B.N.,Shigenaga, K.,Hagen,T.M.**(1993)**.Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging.*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:7915-7922.

Antolovich, M.,Prenzler, D. P., Patsalides ,E .,Robards ,K. **(2002)**.Methods for testing antioxidant activity *Analyst*, **127**: 183-198.

Antonot, E., Marchal, R. **(1998)**. Chromatographie. Stage MAPEN, p 5.

-B-

Bandoniene, D., Murkovic, M., Pfannhauser, W., Venskutonis, P.R., Gruzdiene, D. **(2002)**. Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and online HPLC-DPPH methods. *Eur Food Res Technol*, **214**: 143-147.

Barbosa, E., Calzada,F., Campos,R.**(2006)**. Antigiardial activity of methanolic extracts from *Helianthemum glomeratum*Lag.and*Rubuscoriifolius*Fockein suckling mice CD-1.*J Ethnopharmacology* ,**108**:395-397.

Barroso, F.G., MartmHnez, T.F., Paz, T., Parra, A., Alarcon, F.J. (2001). Tannins content of grazing plants of southern Spanish arid lands. *J. Arid. Environ*, **49**: 301-314.

Bassas, A., Benmoussa, L.; Kerarma, M. (2007). Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud Algérien. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en biologie. Université Djillali Liabes - Sidi Bel Abbès.

Bekhechi, C., Atik Bekkara, F., Consiglio, D., Bighelli, A and Tomi, F. (2012). Chemical Variability of the Essential Oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinate* from Algeria. *Chemistry & Biodiversity*, **9**: 2743-2753.

Bekkara, F., Jay M., Viricel M.R., Rome, S. (1998). Distribution of phenolic compounds within seed and seedling of two *Vicia faba* cv's differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudation. *Journal Plant and Soil*, **203**: 27-36.

Belarbi-Benmahdi, M., Khaldi, D., Beghdad, C., Gouzi, H and Bendimerad, N., Hammouti, B. (2009). Physicochemical and nutritional study of argan oil (*Argania spinosa* L.) in southwestern Algeria. *Pigment & Resin Technology*, **38(2)**: 96–99.

Bellakhdar, J. (1997). Médecine arabe ancienne et savoir populaires La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ibris Press, **254**.

Belmekki, N., Bendimerad, N and Seladji, M. (2012). Phytochemical constituents of some Algerian medicinal plants. *J. Nat. Prod. Plant Resour*, **2(5)**: 558-562.

Benhammou, N., Atik Bekkara, F., Kadifkova, P. (2007). Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf. *Advances in Food Sciences*, **29(3)**: 155-161.

Benhammou, B., Bekkara, F. A., & Panovska, T. K. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2(2)**: 22-28.

Boldyrev, A.A.(2005), Protection of proteins from oxidative stress: a new illusion or a novel strategy. *Ann. N.Y.Acad.Sci*,**1057**: 193-205.

Boldyrev, A.A. (1993), Does carnosine possess direct antioxidant activity. *Int. J. Biochem.*, **25(8)**:1101-1107.

Borsato, M.L.C., Graef, C. F.F., Souza, G. E.P., Lopes, N.P. (2000). Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora aericoides*. *Phytochemistry*, **55**:809 – 813.

Bouamama, H., Noel, H., Villard, J., Benharref, A., Jana, M. (2006). Antimicrobial activities of the leaf extract of two Moroccan *Cistus* L. species. *Journal of Ethnopharmacology*, **104 (1-2)**: 104–107.

Bruneton, J. (1999). Flavonoïdes In Pharmacognosie, Phytochimie: Plantes médicinales, 3^{ème} édition, Technique et Documentation (Paris), pp: 310-353.

Bruneton, J. (1993). Composés phénoliques: Shikimate-acétates. In: « Pharmacognosie: phytochimie, Plantes médicinales ». *Technique et Documentation-Lavoisier* (Paris); Chap 3199–383.

Buettner, G.R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2**:535-543.

Buzzini, P., Turchetti, B., Ieri, F., Goretti, M., Branda, E., Mulinacci, N., Romani, A. (2007). Catechins and Proanthocyanidins: Naturally Occurring O-Heterocycles with antimicrobial activity. *Top Heterocycl Chem*, **10**: 239–263.

-C-

Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2004). Antioxidant and phenolic compounds of 112 Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, **74**:2157-2184.

Calzada, F., Meckes, M., Cedillo-Rivera, R.(1999). Antiamoebic and anti-giardial activity of plant flavonoids.*Plant Med*,**65**:78-80.

Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids:structure activity relationships. *Free Radic Biol Med*, **22**: 749–60.

-D-

Da Silva, R., Saraiva J., de Albuquerque, S., Curti, C., Donate, P.M., Bianco, T.N.C., Bastos, J.K. Silva, M.L.A. (2008). Trypanocidal structure–activity relationship for cis- and trans-methylpluviatolide. *Phytochemistry*, **69**: 1890 – 1894.

Dasilva, R., de Souza, G.H. B., da Silva, A. A. de Souza, V. A., Pereira, A.C., Royo, V.A., Silva, M.L. A., Donate, P. M., Ara újo, A.L.S.M., Carvalho, J.C. T., Bastos, J.K.(2005). Synthesis and biological activity evaluation of lignan lactones derived from (-)-cubebin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **15**: 1033–1037.

Debray, M., Jacquemin, H., Razafindrambo, R. (1971). Travaux et documents de L'Orstom. (Paris, N°8).

De Barros, M. P., Lemos, M., Maistro, E. L., Leite, M. F., Sousa, J.P.B., Bastos, J.K., d'Andraded, S.F. (2008). Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis.*Journal of Ethnopharmacology*, **120**: 372–377.

De Bruyne, T., Pieters., Deelstra, H., Vlietink, A.(1999). Condensed vegetable tannins: Biodiversity and biological activities.*Biochemical Systematics and Ecology*,**27**:445-459.

Djeridane, M., Yousfi, B., Nadjemi, D., Boutassouna, P., Stocker, N. Vidal.(2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, **97 (4)**: 654-660.

Djerdane, A. (2008). Evaluation du pouvoir antioxydant et de l'inhibition d'enzymes (la Carboxylestérase et l'Acylase) par des extraits phénoliques de dix-neuf plantes médicinales

locales, Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat (L'école normale supérieure de KOUBA-ALGER DOCTEUR)

Dupont, F., Guignard, J.L. (2007). Abrèges botanique systématique moléculaire. 14^{ème} édition révisée, Masson.

-E-

Earnsworth, N.R., Berderka, J.P., Moses, M. (1974). Screening of Medicinal plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **63**: 457-459.

-F-

Favier, A. (2003), Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, **108-115**.

Freeman, B. A., O'Neil, J. J. (1984). Tissue slices in the study of lung metabolism and toxicology. *Environ Health Perspect*, **56**:51-60.

Fukushima, T., Tawara, T., Isobe, A., Hojo, N., Shiwaku, K., Yamane, Y. (1995). Radical formation site of cerebral complex I and Parkinson's disease. *J Neurosci Res*, **42**: 385-390.

-G-

Garcia-Viguera, C., Bridle, P., Ferreres, F., Tomas, B. (1994). Influence of variety, maturity and processing on phenolic compounds of apricot juices and jams. *Z Lebensm Unters Forsch*, **199**: 433–436.

Gazi, M.R., Kanda, K., Yasuda, M., Kato, F. (2004). Optimisation of cultural conditions and some properties of radical scavenging substances from *Sporobolomyces salmonicolor* Pak. *Journal Biol. Sci*, **7**: 1365-1370.

Gurbuz, I., Yesilada, E., Ito, S. (2009). An anti-ulcerogenic flavonoid diglucoside from *Equisetum palustre* L. *Journal of Ethnopharmacology*, **121**: 360–365.

Gonzalez, A. G., Estevez-Braun, A. (1997). Coumarins, *Nat. Prod. Reprod*, **14** : 465-475.

-H-

Hagerman, A. E., Butler, L. G. (1989). Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *J Chem Ecol.* **15(6)**: 1795–1810.

Haslam, E., Lilley, T.H. (1988). Natural astringency in foodstuffs: a molecular interpretation. *Crit Rev food Sci Nutr*, **27(1)**:1-40.

Hagerman, A. E., Butler, L.G. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *J Agr Food Chem*, **26** :809-812.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.(2007). Free radicals in biology and medicine, 3rd edition, Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.(1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med*, **18(1)**:125-126.

Halliwell, B. (1993). The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis*, **23**:118-126.

Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygen scavenging and oxidative effects of flavonoids. *Free Rad Biol Med*, **16**: 845-850.

Harbowy, M. E., Balentine, D. A. (1997). Tea chemistry. *Crit Rev Plant Sci*, **16**: 415–480.

Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, **68**:2831–2846.

Haslam, E., Lilley, T. H. (1988). Natural astringency in foodstuffs: a molecular interpretation. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **27(1)**: 1–40.

Heim, E.K., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**: 572-584.

Hendrich, A.B. (2006). Flavonoid-membrane interactions: possible consequence for biological effects of some polyphenolic compounds. *ActapharmacolSin*, **27**: 27-40.

Hirata, T., Fujii, M., Akita, K., Yanaka, N., Ogawa, K., Kuroyanagi, M., Hongo, D. (2009). Identification and physiological evaluation of the components from Citrus fruits as potential drugs for anti-obesity and anticancer. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **17**: 25–28.

Huang, D., Ou, B., Prior, R.I. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assay. *J. Agric. Food Chem*, **53**: 1841-1856.

-I-

Ichhai, C., Quintard, H., Orban, J.C. (2011). Désordres métaboliques et réanimation: De La Physiopathologie au traitement. Springer-Verlag, France, p.427- 429.

Ito, C., Itoigawa, M., Onoda, S., Hosokawa, A., Ruangrungsi, N., Okuda, T., Tokuda, H., Nishino, H., Furukawa, H. (2005). Chemical constituents of *Murrayasiamensis*: threecoumarins and their anti-tumor promoting effect. *Phytochemistry*, **66**: 567–572.

-J-

Julkunen-Titto, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **33**: 213-217.

-K-

Kalkhambkar, R.G., Kulkarni, G.M., Shivkumar, H., Rao, R.N. (2007). Synthesis of novel triheterocyclic thiazoles as anti-inflammatory and analgesic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **42**: 1272 -1276.

Kim, J.Y., Lim, H.J., Lee, D.Y., Kim, J.S., Kim, D.H., Lee, H.J., Kim, H.D., Jeon, R., Ryu, J.H. (2009). In vitro anti-inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargesii*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **19**: 937– 940.

Ko, W. G., Kang, T. H., Lee, S. J., Kim, N. Y., Kim, Y. C., Sohn, D. H., Lee, B. H. (2000). Polymethoxyflavonoids from *Vitex rotundifolia* inhibit proliferation by inducing apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Food and Chemical Toxicology*, **38**: 861 – 865.

Kone, D. (2009). Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales –extraction identification d’alcaloïdes caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante. Thèse de doctorat, l’université de Bamako (Université Paul Verlaine de Metz-UPV-M France).

Küpeli, E., Yesilada, E. (2007). Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. *Journal of Ethnopharmacology*, **112**: 524–530.

Küpeli, E., Erdemoğlu, N., Yeşilada, E., Şener, B. (2003). Anti-inflammatory and antinociceptive activity of terpenoids and lignans from the heartwood of *Taxus baccata* L. *Journal of Ethnopharmacology*, **89**: 265 – 270.

-L-

Lee, C. Y., Sharma, A., Cheong, J.E., Nelson, J.I. (2009). Synthesis and antioxidant properties of dendritic polyphenols. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **19**: 6326-6330.

Lee, Y.J., Erdos, G., Hou, Z., Kim, S.H., Kim, J.H., Cho, J.M., Corry, P.M. (1994). Mechanism of quercetin-induced suppression and delay of heat shock gene expression and thermo tolerance development in HT-29 cells. *Molecular and cellular biochemistry*, **137**: 141-154.

Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., Kadota, S. (2008). Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **16**: 5434–5440.

-M-

Maamri, S. (2008). Etude de *Pistacia atlantica* de deux régions de sud algérien: dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. Thèse de Magister (Université M'HAMED BOUGARA, Boumerdès).

Mabile, L., Meilhac, O., Escargueil-Blanc, I., Troly, M., Pieraggi, M.T., Salvayre, R., Nègre-Salvayre, A. (1997). Mitochondrial function is involved in LDL oxidation mediated by human cultured endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, **17**: 1575-1582.

Macheix, J., Annie, F., Christian, A. (2005). Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Lausanne: Presses polytechniques et universitaires romandes, Italie.

Majhenic, L., Kerget, M.S., Knez, Z. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of *Guarana seed* extracts. *Food Chemistry*, **104**: 1258–1268.

Mandeel, Q.A., Al-Laith, A.A.A. (2007). Ethnomycological aspects of the desert truffle among native Bahraini and non-Bahraini peoples of the Kingdom of Bahrain. *J. Ethnopharmacol*, **110**: 118-129.

Marfak A. (2003). Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les Radicaux issus des Alcools : Formation de depsides. *Thèse de doctorat*. Université de Limoges, France.

Markham, K.R. (1982). Techniques of flavonoid identification. Biological Techniques Series. Ed. Treherne J.E. Rubery P.H. Academic Press. London-New York, 113p.

Martin, M. J., Motilva, V., Lastra, C.A. (1993). Quercetin and Naringenin: Effects on Ulcer Formation and Gastric Secretion in Rats. *Phytotherapy Research*, **7**: 150-153.

Meckes, M., Calzada, F., Tapia-Contreras, A., Cedillo-Rivera, R. (1999). Antiprotozoal properties of *Helianthemum glomeratum*. *Phytother Res*, **13**: 102-105.

Médart, J. (2009). Manuel pratique de nutrition: L'alimentation préventive et curative, 2^{ème} édition, Editions De Boeck Université, Bruxelles, p.2-51

Mehansho, H., Butler, L.G., Carlson, D. M. (1987). Dietary tannins and salivary proline –rich proteins:interaction, induction and defense mechanisms. *Annu.Rev Nutr*, **7**: 423-440.

Melagraki, G., Afantitis, A., Igglessi-Markopoulou, O., Detsi, A., Koufaki, M.,Kontogiorgis C., Hadjipavlou – Litina, D. J. (2009).Synthesis and evaluation of theantioxidant and anti-inflammatory activity of novel coumarin-3-aminoamides and their α -lipoicacid adducts. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **10**:1016-1027.

McManus, J.P., Davis, K.G., Lilley, T., Haslam, E. (1981).The association of proteins with polyphenols.*Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **20**: 309-311.

MogodeDebete, Judith. (2004). Etudes phytochimiqueetpharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpinaceae) utilisédansle traitement des dermatoses au Tchad. Thèse de pharmacie, Bamako, P 67.

Morton, L. W., Amsha, A., Caccetta, R., Puddey, I. B., Croft, K. D. (2000). Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: Relevance to cardiovascular disease. *ClinExpPharmacolPhysiol*, **27**: 152–159.

Murray, N. (2008). Biologie végétale, structure, fonctionnement, écologie et Biotechnologies.Université du Mississippi (Etats-Unis).ISBN-13 :9782744073069. P 19.

-N-

N'Guessan, J-D., Boni, A-R., Zirihi, G-N, Djaman, A-J. (2009). Relation entre les activités antioxydantes et les teneurs en polyphénols de six plantes de la pharmacopée ivoirienne. Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique, UFR Biosciences, Université de Cocody-Abidjan, Abidjan, Côte d'Ivoire.

Novelli, G.P. (1997). Role of free radicals in septic shock. *J. Physiol. Pharmacol*, **48(4)**: 517-527.

Nouri, B.E., Sami, G.A., Bensaber, S.M., Salah, B. M., Zetrini, A.A., Aburas,K. M., Safa, R.F., Mousa, I., Jaeda,I., Mrema, A., Hermann,A ., Abdul .M. Gbaj,M. (2012). Screening of

analgesic and anti-inflammatory activities for two Libyan medicinal plants: *Helianthemum lippii* and *Launaea residifolia*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **4(9)**:4201-4205.

Nowakowska, Z. (2007). Mini-review, A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **42**: 125 -137.

-O-

Oszmianski, J., Wojdylo, A., Lamer-Zarawska, E., Swiader, K. (2007). Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. *Food chemistry*, **100**:579-583.

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese. Journal of Nutrition*, **44**: 307-315.

Ozenda, P. (1977). Flore et végétation du Sahara. 3^{ème} édition, CNRS Edition, Paris, France.

-P-

Packer, L., Kraemer, K., Rimbach, G. (2001). Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, **17(10)**: 888-895.

Papazian, L., Roch, A. (2008). Le syndrome de détresse respiratoire aiguë, Springer-Verlag, France, p.153.

Paris, R.R., Moyse, H. (1969). Précis de matière médicale. Paris, Masson.

Pavlov, A., Kovatcheva, P., Georgiev, V., Kolevac, I., Ilieva, M. (2002). Biosynthesis and radical scavenging activity of betalains during the cultivation of red beet (*Beta vulgaris*) hairy root cultures. *Z. Naturforsch*, **57**: 640-644.

Paul, I. (1997). Larousse Encyclopédie des plantes médicinales, 2^{ème} édition, Paris, France. P.10, 11.

Peromny, S. (2005). La perception gustative et la consommation des tannins chez le maki (*Lemur Catta*).Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle.Discipline Eco-Ethologie.151p.

Perret, C. (2001). Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbèneoxydase produite par *Botrytis cinerea* Pers. : FR. Thèse de Doctorat .Université de Neuchâtel. P 173.

Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, **63**: 1035-1042.

Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (2001). Antioxidants in food, Practical applications. Woolhead Publishing Ltd. ISBN: 185573-4463X. P87.

Poncelet, C., Sifer, C. (2011).Physiologie, Pathologie et Thérapie de La Reproduction Chez L'humain, Spring-Verlag France, Paris, p.84.

Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*, **269**: 337-341.

-Q-

Quezel, P., Santa.,S.(1963).Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tomme 2, EdCNRS, Paris France, 693-694.

-R-

Rao, Y. K., Fang, S.H., Hsieh, S.C., Yeh, T.H., Tzeng, Y.M. (2009). The constituents of *Anisomelesindica*andtheir anti-inflammatory activities. *Journal ofEthnopharmacology*, **121**:292–296.

Rizk, A.M. (1982). Constituents of plants growing in Qatar.*Fitoterrapia*, **52 (2)**: 35-42.

Roberts, M.F, Wink, M. (1999). Alkaloids-Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. Book Reviews. *Phytochemistry*,**52**: 1177 – 1180.

-S-

Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Science and Technology International*, **8(3)**: 121-137.

Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **76**: 270-276.

Sannomiya, M., Fonseca, V.B., da Silva, M.A., Rocha, L.R.M., dos Santos, L.C., Hiruma-Lima, C.A., Brito A.R.M. S., Vilegas, W. (2005). Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, **97**: 1- 6.

Schewe, T., Sies, H. (2003). Flavonoids as protectants against prooxidant enzymes. *Biologie Medical*, **34**: 243-253.

Schlesier, K., Harwat, M., Bhm, V., Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic Res*, **36(2)**: 177–87.

Singleton, V.L., Rossi, J.A.Jr (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**: 144-158.

Solzbach, U., Hornig, B., Jeserich, M., Just, H. (1997). Vitamin C improves endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries in hypertensive patients. *Circulation*, **96(5)**: 1513-1519.

Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids Review. *J. Sep. Sci*, **30**: 3268 – 3295.

Stocker, S., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N., Ames, B. N. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, **235(4792)**: 1043-1046.

Stöckigt, J., Sheludko, Y., Unger, M., Gerasimenko, I., Warzecha, H., Stöckigt, D. (2002). High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary

electrophoretic–electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Review Journal of Chromatography A*, **967**: 85–113.

Sutradhar, R. K., Rahman, A.K.M. M., Ahmad M.U., Bachar, S. C. (2008). Bioactive flavones of *Sidacordifolia*. *Phytochemistry Letters*, **1**: 179–182

-T-

Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohamed, M., El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem*, **104**: 1372–1378.

Trease, E., Evans, W.C. (1987). *Pharmacognosy*, 13th edition, Balliere Tindall, London; pp: 61–62.

-V-

Vafeiadou, K., Vauzour, D., Lee, H.Y., Rodriguez-Mateos, A., Williams, R. J., Spencer, J.P.E. (2009). The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **484**: 100–109.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, **160**: 1–40.

Vincken, J.P., Heng, L., De Groot, A., Gruppen, H. (2007). Review Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, **68**, 275–297.

Vinson, J.A., Dabbagh, Y.A., Serry, M.M., Jang, J. (1995). Plant flavonoids, especially tea flavonols are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *J Agric Food Chem*, **43**: 2800–02.

-W-

Watterson, J. J., Butler, L. G. (1983). Occurrence of an unusual leucoanthocyanidin and absence of proanthocyanidins in sorghum leaves. *J Agr Food Chem*; **31**: 41–45.

Win, N.N., Awale, S., Esumi, H., Tezuka, Y., Kadota, S. (2008). Novel anticancer agents, kayeassamins C -I from the flower of *Kayaeaassamica* of Myanmar. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **16**: 8653.

-Z-

Zenk, M.H., Juenger, M. (2007). Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry Review*, **68**: 2757 – 2772.

Zhang, S.Y., Zheng, C.G., Yan, X.Y., Tian, W.X. (2008). Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **371**: 654-658.

Zheng, W., Wang, SY. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 4083-4089.

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, **64 (4)**: 555-561.

Annexes

Annexes N°1 : Réactifs de caractérisation

➤ Alcaloïdes

La caractérisation des alcaloïdes se fait par :

☞ Réactif de Mayer

La préparation de ce réactif s'effectue comme suit:

- ✓ Dissoudre 1.358 g de HgCl_2 dans 60 ml d'eau distillée;
- ✓ Dissoudre 5 g de KI dans 10 ml d'eau distillée;
- ✓ Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 ml d'eau distillée.

Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité blanc.

☞ Réactif de Wagner

Ce réactif a été préparé comme suit:

- ✓ Dissoudre 2 g de KI et 1.27 de I_2 dans 75 ml d'eau;
- ✓ Ajuster le volume total à 100 ml d'eau.

Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité brun.

Annexe N°2: Pouvoir réducteur exprimé en valeurs moyennes de l'absorbance des extraits des fruits d'*Helianthemum lippii*

Concentrations (mg/ml)	DO moyenne				
	Fraction méthanolique	Fraction aqueuse	Fraction acétate d'éthyle	Fraction butanolique	Tanins
2	1.27145	1.21455	2.56	2.61415	
1	0.71145	1.05805	1.51455	1.70785	
0.5	0.36895	0.9286	0.82065	1.1681	
0.25	0.19525	0.2750	0.45255	0.646	1.15145
0.125	0.0829	0.23195	0.2227	0.4394	0.6319
0.0625	0.04785	0.17545	0.1945	0.1535	0.33425
0.0312					0.16815
0.0156					0.08725
0.0078					0.04415

Annexe N°3: Les pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des extraits

Concentrations (mg/ml)	% d'inhibition du DPPH				
	Fraction méthanolique	Fraction aqueuse	Fraction acétate d'éthyle	Fraction butanolique	Tanins
2	74.5	93.18	95	94.75	94.62
1	50.42	70.49	92.8	94.13	94.39
0.5	25.14	52.13	61.62	93	93
0.25	12.91	34.79	47.14	75.8	60.57
0.125	10.22	15.80	47	46	33.62
0.0625	3.28	3.25	15.29	25.26	14.85

Résumé:

Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydantes d'origine naturelle. La présente étude est consacrée à l'étude phytochimique ainsi que l'activité antioxydante des extraits des fruits d'*Helianthemum lippii*, une plante saharienne appartenant à la famille des Cistacées.

Les tests phytochimiques réalisés ont permis de mettre en évidence la présence des flavonoïdes, des tanins galliques, des saponosides, des alcaloïdes, des composés réducteurs et des hétérosides stéroïdiques et triterpènes dans les fruits de la plante.

Les extractions sélectives des principales familles ont révélés un fort rendement à raison de 16.51 % pour la fraction méthanolique de l'extrait brut.

Les teneurs en phénols totaux et en flavonols dans l'extrait brut sont de l'ordre de $73.168 \pm 0,097$ mg EAG/ g MS et 4.869 ± 0.140 mg EQ/ g MS pour la fraction méthanolique et 25.466 ± 0.066 et 1.398 ± 0.156 mg/ g pour la fraction aqueuse, respectivement. Alors que, les teneurs en flavonoïdes et en tanins condensés dans les deux fractions sont presque comparables.

L'analyse qualitative par CCM des deux fractions acétate d'éthyle et butanolique a révélé la présence des flavonols et d'autres classes de flavonoïdes telles que les auronés et les chalcones.

Les propriétés antioxydantes des différents extraits ont été évaluées par trois méthodes : la capacité antioxydante totale (CAT), la réduction du fer et le piégeage du radical DPPH. La fraction méthanolique de l'extrait brut possède la meilleure CAT de l'ordre de 14.655 ± 0.002 mg EAA/ g MS. Pour les deux autres tests, les tanins et la fraction butanolique ont présenté des activités intéressantes de 0.103 ± 0.003 et 0.142 ± 0.037 mg/ ml à réduire le fer et 0.194 ± 0.008 et 0.135 ± 0.004 mg/ ml à neutraliser le DPPH respectivement.

Mots clés: *Helianthemum lippii*; Etude phytochimique; Composés phénoliques; CCM ;Activitéantioxydante ; CAT ; FRAP ; DPPH .

Abstract:

Most of interest of current research relates to study the natural antioxidant molecules. This work is dedicated to the phytochimic study and antioxidant activity of extracts from fruits of *Helianthemum lippii*, a Saharan plant belonging to the Cistaceae family.

The phytochemical tests realized can be to highlight the flavonoids, the tannins, the saponins, the alkaloids, the reducing compound and the heterosidessterosidic and triterpenes in the fruits of the plant.

The selective extraction of the main families showed a strong yield at 16.51% for the methanolic fraction of the crude extract.

The contents of total phenolics and flavonols in the crude extract are about $73.168 \pm 0,097$ mg GAE/ g DM and 4.869 ± 0.140 mg QE/ g DM for the methanol fraction and 25.466 ± 0.066 and 1.398 ± 0.156 mg/ g for the aqueous fraction, respectively. Whereas, the flavonoids and condensed tannins contents in both aqueous and methanolic fraction were almost comparable.

The qualitative analysis of ethyl acetate and butanolic fractions showed the presence of flavonols and other classes of flavonoids such as auronés and chalcones.

The antioxidant properties of different extracts were evaluated by three methods: total antioxidant capacity (TAC), reducing power and free radical scavenging activity. The methanolic fraction of the crude extract has the best TAC about 14.655 ± 0.002 mg AAE/ g DM. For the other two tests, the tannins and the butanolic fraction showed the interesting activities of 0.103 ± 0.003 and 0.142 ± 0.037 mg/ ml to reduce iron and 0.194 ± 0.008 and 0.135 ± 0.004 mg / ml to neutralize the DPPH, respectively.

Keywords: *Helianthemum lippii*; phytochemical study; Phenolic compounds; TLC ;antioxidant activity; TAC; FRAP; DPPH.

ملخص:

جزء كبير من الأبحاث المهمة حاليا تعمل على دراسة الجزيئات الطبيعية المضادات للأكسدة.

Cistacées نبات الصحراء

Helianthemum lippii

يخصص هذا العمل الى الدراسة الفيتو كيميائية والنشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات فاكهة

الفحص الفيتو كيميائي المحقق سمح لنا بإظهار الفلافونويد , التانيناتسيونوزيد , المركبات المرجمة عائلة الأيتيروزيدستيروزيديكوالترتيربين , وسحرصب و سيمييه

لهذا المركبات الثانوية تظهر مردود ملحوظ في الجزء الميتانولي للمستخلص الخام وهو 16.51% كمية الفينولاتو الفلافون في المستخلص الخام قدم $73.1668 \pm 0,097$ بمغمايعادل

حمض الغاليك و 4.869 ± 0.140 بمغمايعادل الكارستينين بالنسبة للجزء الميتانولي للمستخلص الخام و 25.466 ± 0.066 , 1.39 ± 0.156 على التوالي في حين أن كمية التانينات المكثفة و الفلافونويدات فهي مماثلة تقريبا في الجزآن الميتانولي والمائي للمستخلص الخام .

.aurones

التحليل الكروماتوغرافي على الطبقة الرقيقة للجزأ بين خلات الإيتيلوبيوتانول أظهر وجود الفلافون وفئات أخرى من الفلافونويد الجالكونات و

تمت دراسة الخصائص المضادة للأكسدة لمختلف المستخلصات بواسطة ثلاث طرق : القدرة المضادة للأكسدة الإجمالية , ارجاع الحديد وتثبيت الجذر الحر DPPH .

الجزء الميتانولي للمستخلص الخام لديه القدرة المرتفعة المضاد للأكسدة الإجمالية $14,655 \pm 0,002$ مايعدال حمض الاسكوريبيك للفواكه الجافة , للاختبارين الاخرين , قتمت التانيناتو جزأ البيتا نول نشاط مضاد للأكسدة مثير للاهتمام للقدرة على ارجاع الحديد بقيمة $0.103 \pm 0,142$ و $0,037 \pm 0,194$ و 0.008 ± 0.135 و 0.004 مغ/مل قدرتها على تثبيت الجذر الحر على التوالي.

الكلمات المفتاحية :

Helianthemum lippii ; النشاط المضاد للأكسدة ; المركبات الفينولية ; الدراسة الفيتو كيميائية ; التحليل الكروماتوغرافي على الطبقة الرقيقة ; DPPH; FRAP; CAT ;