



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

Référence / 2018

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté et soutenu par :

ABBASSI Randa

Le : mardi 26 juin 2018

Evaluation de l'activité antioxydante des graines de *Bunium bulbocastanum* L

Jury:

Mme. BOUDJOU DJOU Lamia	MAA	Université de Biskra	Président
M. DEGHIMA Amirouche	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mlle. GUEROUI Mona	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2017 - 2018



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

Référence / 2018 .

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté et soutenu par :
ABBASSI Randa

Le : mardi 26 juin 2018

Evaluation de l'activité antioxydante des graines de *Bunium bulbocastanum* L

Jury :

Mme. BOUDJEDOU Lamia	MAA	Université de Biskra	Président
M. DEGHIMA Amirouche	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mlle. GUEROUI Mona	MAB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2017 - 2018

Remerciements

Avant toutes choses, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience et la volonté pour réaliser ce mémoire.

*J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon promoteur **Mr DEGHIWA***

***AMIROUCHE** pour avoir acceptée d'encadrer et de diriger ce travail*

Pour sa disponibilité, ses conciles, ses orientations, sa patience et la confiance qu'il m'a accordé et mon permet de réaliser ce travail

Je tiens à remercier les membres de jury, chacun de son nom, d'avoir accepté de juger mon travail.

*Mes remerciements s'adresser aussi à Mr **BENKADOUR BACHIR** pour leur aide.*

Sans oublier de remercier chaleureusement tous les membres du laboratoire de la faculté, pour leur aide et leur soutien.

Merci de fond de cœur.

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à mes chers **parents** pour tous ses sacrifices, encouragements et leurs amour, qu'Allah les préserve et prolonge leur vie.*

*A mes chères frères **Omar et Salah Eddine***

*A mes chères sœurs **Fatima et Hanan***

*A toute ma famille, qui porte le nom **Abbassi**, surtout **Youcef***

A toutes mes chères amies.

Randa.

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....1

Première partie : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. Présentation de la plante *Bunium bulbocastanum* L

- 1. La famille des apiacées 2
- 2. Le genre *Bunium* 2
- 1. L'espèce *Bunium bulbocastanum* L..... 2
- 2. Classification.....3
- 3. Composition chimique.....3
- 4. Utilisation traditionnelle et activités biologiques4

Chapitre 2. Notions sur les métabolites secondaires

- 1. Les métabolites secondaires 5
 - 1.1 Les composés phénoliques5
 - 1.1.1 Structure chimique5
 - 1.1.2 Classification6
 - 1.1.2.1 acides phénoliques6
 - 1.1.2.2. Les flavonoïdes6
 - a) Les flavonols.....8
 - 1.1.2.3. Les tanins8
 - 1.2. Les terpènes8
 - 1.2.1 Les triterpenes.....9

Chapitre 3. Stress oxydatif et radicaux libres

- 1. Stress oxydatif.....10
 - 1.1. Les radicaux libres10
 - 1.2 Notion Stress oxydatif10
 - 1.3. Les maladies liée aux stress oxydatif.....10
- 2. Les antioxydants.....10
 - 2.1 Les antioxydants d'origine végétal.....10

Deuxième partie : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 4. Matériels et méthodes

1. Matériels.....	12
2. Méthodes.....	12
2.1 Extraction des graines de <i>Bunium bulbocastanum</i>	12
2.1.1 Rendement d'extraction.....	14
2.2 Dosage des polyphénols totaux.....	14
2.2.1 Principe.....	14
2.2.2. Mode opératoire.....	15
2.2.3 Expression des résultats.....	15
2.3 Dosage de flavonoïdes totaux	15
2.3.1 Principe.....	15
2.3.2 Mode opératoire.....	15
2.3.3 Expression des résultats.....	15
2.4 Dosage de flavonols.....	15
2.4.1 Principe.....	15
2.4.2. Mode opératoire.....	15
2.4.3 Expression des résultats	16
2.5 Dosage des triterpènes.....	16
2.5.1 Principe.....	16
2.5.2 Mode opératoire	16
2.5.3 Expression des résultats.....	16
2.6 Evaluation de l'activité antioxydante	17
2.6.1 Test de pouvoir réducteur.....	17
2.6.2 Test d'inhibition de radical ABTS	17
2.6.3 Test d'activité antioxydante total	18

Chapitre 5. Résultats et discussion

1. Rendement d'extraction	20
2. Dosage des polyphénols totaux.....	22
3. Dosage des flavonoïdes totaux.....	24

4. Dosages des flavonols.....	26
5. Dosage des triterpènes	28
6. Evaluation des activités antioxydants.....	30
6.1 Test pouvoir réducteur.....	30
6.2 Test d'inhibition du radical ABTS	33
6.3 Test d'activité antioxydante total.....	37
Conclusion.....	40
Références bibliographique.....	41

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification botanique de *Bunium bulbocastanum* L3
Tableau 2. Principales classes des composés phénoliques6

Liste des figures

Figure 1. Plante <i>Bunium bulbocastanum</i>	3
Figure 2. Graine de <i>Bunium bulbocastanum</i>	3
Figure 3. Quelques composés phénoliques de base :acide salicylique (a),acide caféique (b)...	5
(b).....	5
Figure 4. Structure de base de flavonoïde.....	7
Figure 5. Les différentes classes des flavonoïdes.....	7
Figure 6. Structure de base de flavonol.....	8
Figure 7. Structure de rutine.....	8
Figure 8. Structure de l'isoprène.....	9
Figure 9. Structure de l'acide ursolique.....	9
Figure 10. Protocole d'extraction des graines de <i>Bunium bulbocastanum</i>	13
Figure 11. Histogramme du rendement d'extrait brut des graines de <i>Bunium bulbocastanum</i>	20
Figure 12. Histogramme du rendement des fractions des graines <i>Bunium bulbocastanum</i> L.....	21
Figure 13. Droite d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux....	22
Figure 14. Teneur des fractions en polyphénol totaux en µg EAG / mg d'extrait.....	23
Figure 15. Droite d'étalonnage de quercétine pour le dosage des flavonoïdes.....	24
Figure 16. Teneur des fractions en flavonoïdes totaux en µg EQ / mg d'extrait.....	25
Figure 17. Droite d'étalonnage de la rutine pour le dosage de flavonol.....	26
Figure 18. Teneur des fractions en flavonol totaux en µg ER / mg d'extrait.....	27
Figure 19. Droite d'étalonnage de l'acide ursolique pour le dosage des triterpènes.....	28
Figure 20. Teneur des fractions en triterpènes en µg EAU / mg d'extrait.....	29
Figure 21. Pouvoir réducteur des fractions des graines de <i>Bunium bulbocastanum</i> L.....	30
Figure 22. Pouvoir réducteur des standards.....	30
Figure 23. Droite d'étalonnage d'acide ascorbique.....	31
Figure 24. Résultats de comparaison de pouvoir réducteur des graines de <i>Bunium bulbocastanum</i> et des standards.....	31
Figure 25. Activité anti radicalaire des fractions d'hexane et aqueuse des graines de <i>Bunium bulbocastanum</i> vis-à-vis le radical ABTS ⁺	33

Figure 26. Activité anti radicalaire des fractions du butanol, acétate d'éthyle et chloroforme des graines de <i>Bunium bulbocastanum</i> vis-à-vis le radical ABTS ⁺	34
Figure 27. Activité anti radicalaire des standards BHA, BHT et la quercétine vis-à-vis le radical ABTS.....	34
Figure 28. Droite d'étalonnage du Trolox.....	35
Figure 29. TEAC des fractions chloroforme, acétate d'éthyle, butanol et les standards.....	35
Figure 30. TEAC des fractions d'hexane, aqueuse et les standards.....	36
Figure 31. Droit d'étalonnage d'acide ascorbique.....	37
Figure 32. Les TAC des fractions des graines de <i>Bunium bulbocastanum</i> L et les standards utilisés.....	38

Liste des abréviations

- ABTS** : Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
- AC** : Absorbance de control
- AT** : Absorbance de test
- BHA** : Butylhydroxyanisole
- BHT** : Butylhydroxytoluène
- CAT** : Capacité antioxydante total
- EAA** : Equivalent acide ascorbique
- EAG** : Equivalent en acide gallique
- EAU** : Equivalent en acide ursolique
- EQ** : Equivalent en quercétine
- ER** : Equivalent en rutine
- ET** : Equivalent trolox
- M e b** : la masse d'extrait brut
- M ech** : la masse sèche de l'échantillon végétal
- M f** : la masse de fraction après évaporation du solvant
- Me** : la masse de l'extrait après évaporation du solvant
- R (%)** : rendement en %
- ROS** : Espèces réactives d'oxygène
- TCA** : Acide Trichloracétique
- TEAC** : Capacité Antioxydante en Équivalent Trolox.
- Trolox** : 6 hydroxy 2,5,7 tetramethyl chromane -2- carboxylic acide

Introduction

Introduction

L'oxygène est une molécule indispensable pour la vie mais peut entraîner des dommages cellulaires importants par la formation des dérivés oxygénés actifs, de très nombreuses études cliniques ont plus que suggéré le rôle de ces espèces réactives de l'oxygène ROS dans le développement de nombreux processus pathologiques comme l'athérosclérose et la cancérogenèse (Pincemail et *al.*, 2002).

Depuis des milliers d'années l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter traditionnellement toutes sortes de maladies. Ces plantes représentent une source naturelle importante des métabolites secondaires qui possèdent une très large activité biologique (Chevallier, 2001).

De nos jours nous comprenons que les plantes médicinales riches en antioxydants, jouent un rôle protecteur dans la santé et leurs consommations ont baissé le risque de plusieurs maladies. (François et *al.*, 2009).

La plante *Bunium bulbocastanum* fait partie de ces plantes, leurs graines utilisées traditionnellement pour leurs propriétés thérapeutiques.

L'objectif de notre travail, est l'estimation de contenu des graines de *Bunium bulbocastanum* en polyphénol totaux, en flavonoïdes totaux, en flavonol et en triterpènes, et l'évaluation de l'activité antioxydante de cette plante.

Le présent travail est scindé en deux parties. La première est une étude bibliographique concernant des informations sur la plante *Bunium bulbocastanum*, des notions sur métabolites secondaires et les stress oxydatif. La deuxième partie, le matériel et la méthodologie de travail et les résultats obtenus suivie des discussions. Enfin la conclusion.

Première partie

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 :
Présentation de la plante
***Bunium bulbocastanum* L**

1. La famille des apiaceae

Cette famille rassemble 446 genres et environ 3500 espèces cosmopolites, mais elle est particulièrement représentée dans les régions tempérées de l'hémisphère nord et les montagnes tropicales (Botineau, 2010). Cette famille est très importante dans la flore Algérienne où elle est représentée par 55 genres (Quezel et Santa, 1963). C'est une famille très homogène, une des plus faciles à reconnaître, grâce à ces inflorescences en ombelles composées. Inversement, les espèces sont parfois difficiles à distinguer les unes des autres.

Ce sont essentiellement des herbes annuelles comme le cerfeuil, bisannuelles comme le carotte, le plus souvent vivaces. La tige est ordinairement cannelée et creuse, les feuilles sont alternes, souvent très découpées et comportent une gaine très développée comparable à celle que l'on rencontre chez les Monocotylédones. Les racines, tige et feuilles sont parcourues par des canaux sécréteurs qui contiennent un mélange d'essences et de résine, ces canaux expliquent l'odeur forte qui se dégage des apiacées lorsqu'on l'écrase (Dupont et Guinard, 2012).

2. Le genre *Bunium*

Bunium est un genre de plantes à fleurs chez les apiacées, avec 45 à 55 espèces (Lariushin, 2012). Les fleurs sont blanches, rayons des ombelles et des ombellules s'épaississant à maturité, rigides très divergents. Tige de 1- 5 cm robustes. Feuilles à divisions linéaires (Quezel et Santa, 1963).

3. L'espèce *Bunium bulbocastanum* L (black cumin).

Cette espèce provient des Baléares, de l'Ouest de l'Europe Centrale au nord- ouest de l'ex- Yougoslavie (Teuscher et *al.*, 2004).

C'est une plante vivace herbacée de 30-70 cm, à port d'ombellifère la tige est grêle, sillonnée, surtout vers le haut, les feuilles sont alternes, 2-3 fois divisées en lanières étroites de contour générale triangulaire et ses fruits environ 2 fois plus longs que large, à cotes saillantes, aromatiques. Partie souterraine tubercule brunâtre généralement arrondi de 1-2 cm de diamètre, brunâtre à l'extérieur, blanc à l'intérieur. (**Figure 1 et 2**) (Couplan et Styner, 1994).

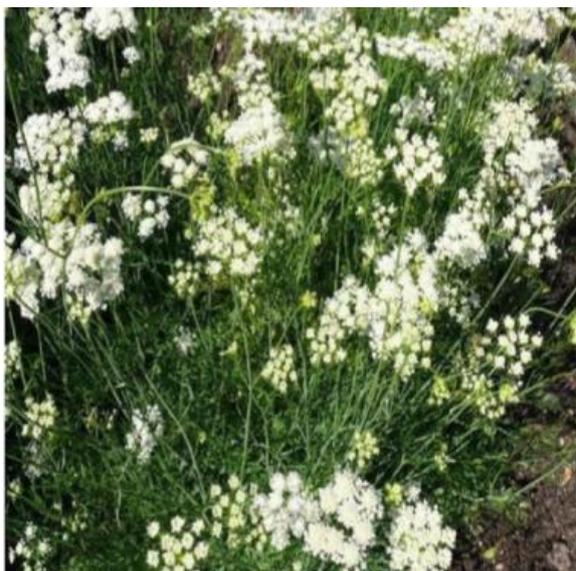


Figure 1. Plante *Bunium bulbocastanum* L (Lariushin, 2012)

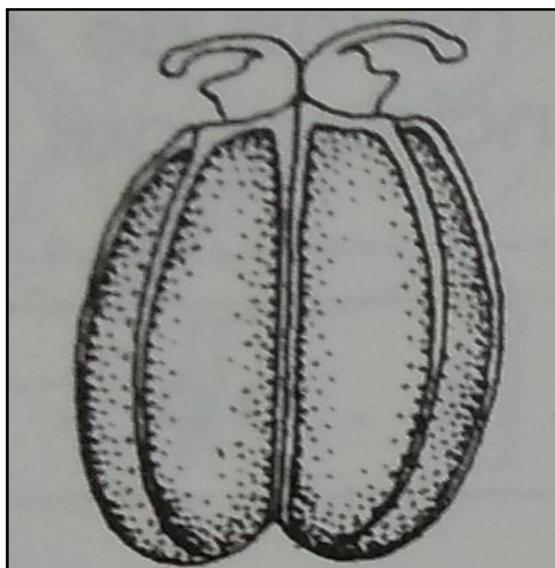


Figure 2. Graine de *Bunium bulbocastanum* (Jauzein, 2011)

4. Classification

La classification de la plante *Bunium bulbocastanum* L est montré dans le **tableau 1**

Tableau 1. Classification botanique de *Bunium bulbocastanum* L selon (Cronquist, 1981).

Situation botanique de l'espèce <i>Bunium bulbocastanum</i> L	
Règne	Plantae
Sous- règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae
Espèce	<i>Bunium bulbocastanum</i> L

5. Composition chimique

Les investigations phytochimiques réalisées sur les différentes espèces du genre *Bunium* ont indiqués la présence des nombreux composants tel que : les coumarines ; Scopolétine, Scoparone, (Appendio et *al.*, 1994), les huiles essentielles (monoterpènes) : Caryophyllée, γ -

terpinene, p-cymene, β -pinène, limonène (Agrwal et *al.*, 1974) et les flavonoïdes (Lefahal et *al.*, 2017).

6. Utilisation traditionnelle et activités biologiques

Les espèces du genre *Bunium* L sont des plantes aromatiques ayant des propriétés médicinales, leurs huiles essentielles ainsi que leurs graines sont souvent utilisés dans l'alimentation et la médecine (Jassbi et *al.*, 2005).

Les graines de *Bunium bulbocastanum* peuvent être utilisés sous forme brute ou cuite pour améliorer les arômes alimentaires ou pour améliorer le gout, médicalement elles sont également utilisées comme astringent (Khan et *al.*, 2013), par ailleurs d'autre espèces : *B. persicum* est utilisé comme antispasmodique, anti-obésité et hypoglycémiant (Lefahal et *al.*, 2017), l'espèce *B. paucifolium* sert à traiter l'inflammation urinaire (Cakilcioglu et *al.*, 2011).

Chapitre 2 :
Notions sur les
métabolites secondaires

1. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes (Lutge et *al.*, 2002). Ces molécules jouent un rôle dans l'adaptation des plantes à leur environnement et représente également une source important de produits pharmaceutiques, (Bourgau et *al.*, 2001). Ils appartiennent à des groupes chimiques variés : alcaloïdes, terpènes et composés phénoliques (Macheix et *al.*, 2005).

1-1. Les composé phénoliques

Les polyphénols constituent un groupe de substances ubiquistes et variées allant de molécules simples jusqu'à des structures très complexes (Marouf et Reynaud, 2007). Les composés phénoliques jouent un rôle important dans les qualités sensorielles et nutritionnelles des produits végétaux car ils sont présents dans la plupart des organes et tissus utilisés ou consommés par l'homme (Manchado et Cheynier, 2006).

1.1.1 Structure chimique

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques (Hennebelle et *al.*, 2004). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique (**figure 3**) auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction, éther, ester (Bruneton, 2009).

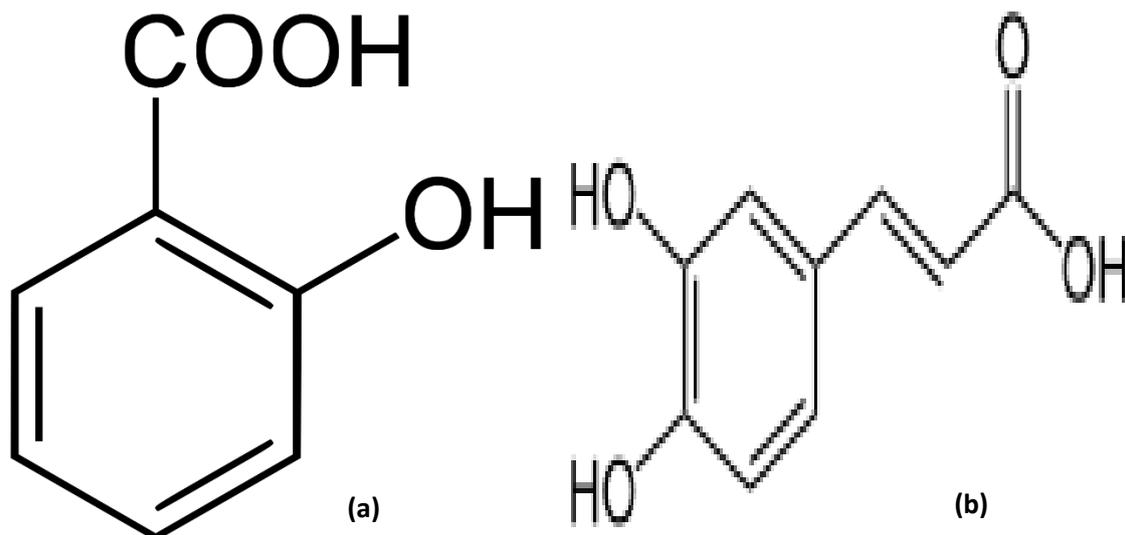


Figure 3. Quelques composés phénoliques de base : acide salicylique (a), acide caféique (b).

(Hennebelle et *al.*, 2004).

1.1.2 Classification

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes (**Tableau 2**) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base, ensuite par le degré de modifications de se squelette, en fin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autre molécules (glucide, lipides) (Manchado et Cheyner, 2006).

Tableau 2. Principales classes des composés phénoliques (Manchado et Cheyner, 2006)

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C6	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C6- C1	Acide hydroxybenzoïques	p-hydroxybenzoïques	Epices, fraise
C6-C3	Acide hydroxycinnamiques coumarines	Acide caféique scopolétine	Pomme de terre, pomme, citrus
C6-C4	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C6-C2-C6	Stilbénes	Resvératol	Vigne
C6-C3-C6	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Queurcétine, cyanidine , daidzéine	Fruit, légumes, fleurs soja, pois
(C6-C3)2	Lignane	Pinorésinol	Pin
(C6-C3-C6) n	Tanins condensés		Raisin, kaki

1.1.2.1 Acides phénoliques

Les acides hydroxybenzoïques (protocatéchique, vanillique, gallique) sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C₆-C₁ (Macheix et *al.*, 2005). Les acides hydroxycinnamiques, d'autre part, ont la structure C₆-C₃ (acide caféique – férulique- sinapique) et ont une distribution très large (Bruneton, 2009).

1.1.2.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes lato sensu sont des pigments quasiment universels des végétaux presque toujours hydrosolubles (Bruneton, 2009). Avec plus de 4000 structures décrites (Marouf et Reynaud, 2007). Responsables des colorations jaunes, orange, et rouges de différentes organes végétaux (K. Ghedira, 2005).

Les flavonoïdes sont formés d'un squelette à 15 atomes de carbones (C₆.C₃-C₆) comme le montre la (**figure 4**) (Collin et Crouzet, 2011).

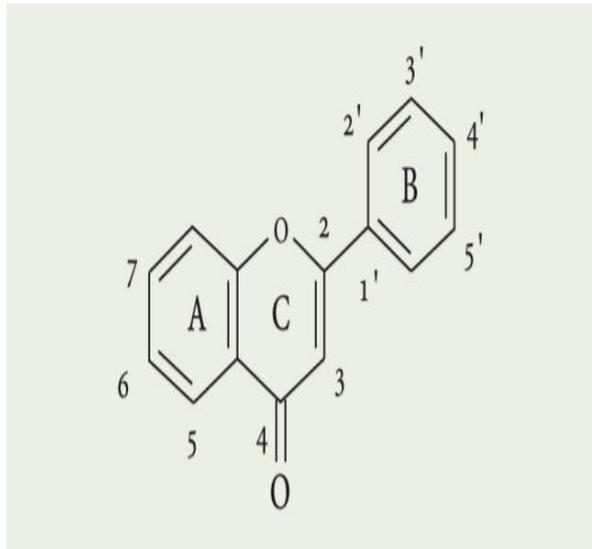


Figure 4. Structure de base de flavonoïde (Collin et Crouzet, 2011).

La structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation permettent de distinguer les différentes classes des flavonoïdes (**figure5**) (Manchado et Cheynier, 2006).

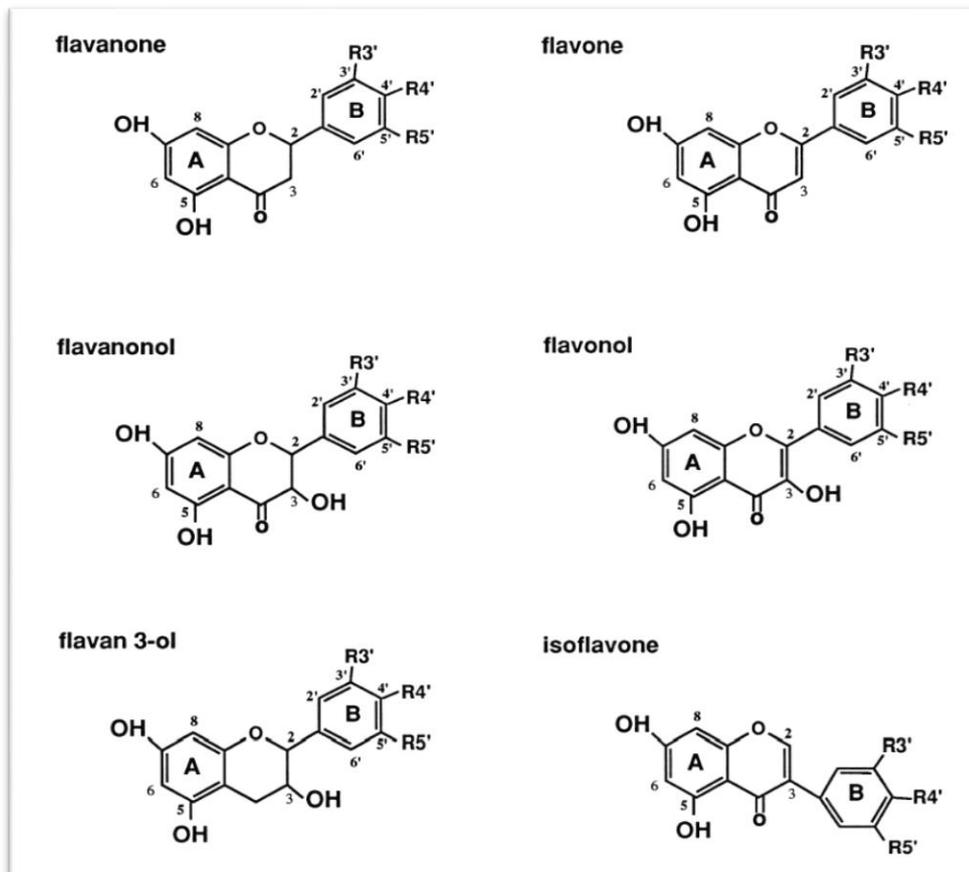


Figure 5. Les différentes classes des flavonoïdes (Manchado et Cheynier, 2006).

a) Les flavonols

Les flavonols (**Figure 6**) sont les flavonoïdes les plus répandus dans les aliments végétaux (Manach et *al.* 2004). Dans ces molécules le cycle A est près de 90% de cas substitués par deux hydroxyles phénoliques en C₅ et C₇ (Bruneton, 2009), ces composés sont présents sous des formes glycosylées, exemple la rutine (**figure 7**). La fraction de sucre associés est très souvent du glucose, xylose (Manach et *al.*,2004).

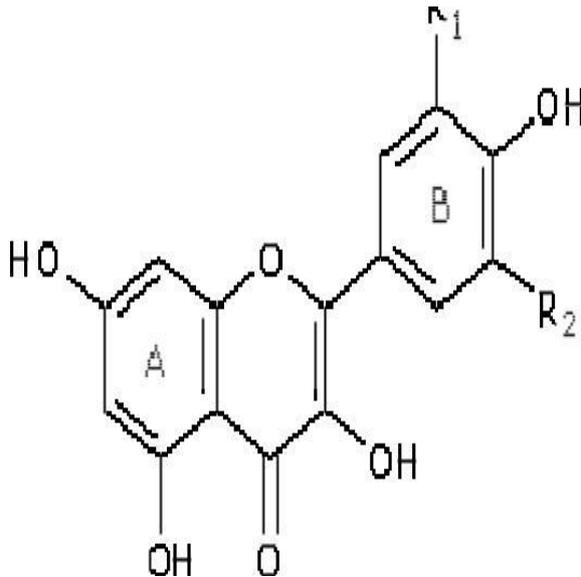


Figure 6. Structure de base de flavonol

(Richter, 1993).

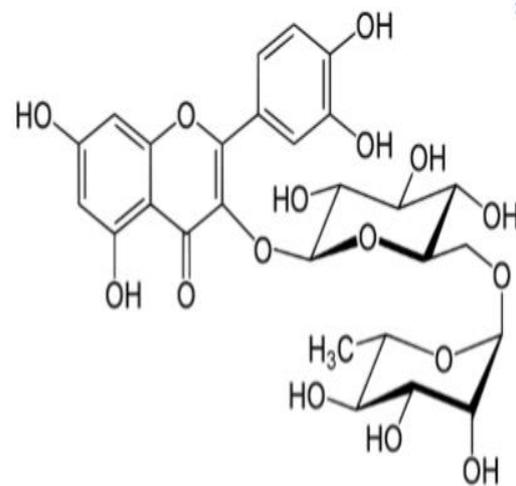


Figure 7. Structure de rutine

(Catherine et *al.*, 1996)

1.1.2.3 Les tanins

Les tanins sont des composés phénoliques de masse moléculaire comprise entre 500 à 4000 KD. Les tanins sont communément trouvés combinés avec les alcaloïdes, des polysaccharides et des protéines (Haung, 2009). On les trouve dans presque toutes les parties de la plante, l'écorces, le bois, les feuilles et les fruites.

Les deux principaux types de tanins sont chimiquement assez différents : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Hygerman, 1988).

1.2 Les terpènes

La très grande majorité des terpènes sont spécifiques du règne végétal, mais on peut en rencontrer chez les animaux (Manchado et Cheynier, 2006). Les terpènes sont des dérivés de

l'isoprène C_5H_8 (**figure 8**) et ont pour formule de base des multiples de celle-ci, c'est-à-dire $(C_5H_8)_n$. La plupart de ces composés ont des structures polycycliques qui diffèrent les uns des autres non seulement par les groupes fonctionnels, mais aussi par la structure basique de leur squelette hydrocarboné. (Fontanay, 2012).

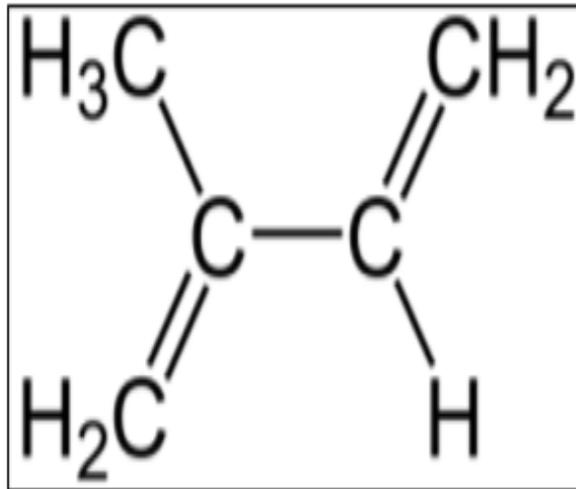


Figure 8. Structure de l'isoprène $(C_5H_8)_n$ (Richter, 1993).

1.2.1 Les triterpènes

Les triterpènes sont des composés en C_{30} , plus de 4000 composés construits sur plus de 40 squelettes différents (Bruneton, 2009). Ils comportent plusieurs groupes de substances et de nombreux composés importants sur le plan biologique : stérols, saponines, hormones. (Richter, 1993), exemple l'acide ursolique (**figure 9**).

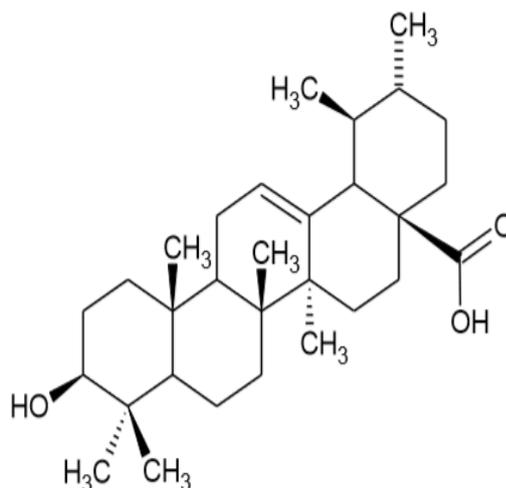


Figure 9. Structure de l'acide ursolique (Sun et *al.*, 2006)

Chapitre 3 :
Stress oxydatif et
radicaux libres

1. Stress oxydatif

1.1 Les radicaux libres

Un radical libre est défini comme une molécule possédant un ou plusieurs électrons libres (Borg et Reeber ,2004). Les radicaux libres ont tendance à revenir immédiatement à l'état stable en donnant un électron ou en prenant une à une autre molécule : ils peuvent donc être réducteurs ou oxydant, ils ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs vis -à-vis d'autre molécules, possédant un temps de demi-vie extrêmement court (Ramonatxo, 2006).

1.2 Notion de stress oxydatif

A l'état physiologique on peut considérer qu'il existe un équilibre entre la production des radicaux libres et les systèmes antioxydant. Cependant, dans certaines conditions, il apparait un déséquilibre provoqué par une production exagérée des radicaux libres ou par une diminution des antioxydants, ou encore par une association des deux phénomènes. On parle alors de « stress oxydants » (Delattre et *al* , 2003).

1.3 Les maladies liées aux stress oxydant

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution, il est un des facteurs potentialisant l'apparition des maladies plurifactorielles tels le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Favier, 2003).

Le stress oxydant est aussi la cause initiale essentielle de cancer, cataracte, l'œdème pulmonaire et le vieillissement accéléré (Favier, 2006).

2. Les antioxydants

Un antioxydant est toute substance qui, lorsqu'elle est présente à des faibles concentrations comparées à celles d'un substrat oxydable retarde ou empêche de manière significative l'oxydation de ce substrat. Le terme substrat oxydable englobe les protéines, les lipides, les glucides, et l'ADN (Cadehas et Packer, 2002).

2.1 Les antioxydants d'origine végétale

L'utilisation de la médecine traditionnelle est largement répandue et les plantes présentent encore une grande source de nouveaux composés biologiques actifs ayant différentes activités (Cespedes et *al.*, 2013).

Les composés phénoliques présentent une large gamme de propriétés physiologiques, telles que, anti-inflammatoires, anti-allergènes, antioxydants, antimicrobiens, effets anti-thrombotiques, cardioprotecteurs et vasodilatateurs (Balasundram et *al.*, 2006). De nombreux polyphénols sont des antioxydants naturels disponibles : vitamine E (abondante dans les germes de blé, les légumes verts.), flavonoïdes et flavones (les fruits, le vin, le thé), caroténoïdes (présents dans les carottes, les fruits rouges et jaunes, les légumes verts) et vitamine C (les agrumes, les fruits rouges, les pommes). (Marc et *al.*, 2004).

Deuxième partie
Partie expérimentale

Chapitre 4 :

Matériels et méthodes

1- Matériel

- **Matériel végétal**

Les graines de la plante *Bunium bulbocastanum* ont été récolté au mois de Mai 2017 dans la région Taglait (sud de Bordj bou arréridj). Les graines ont été séchées à l'ombre et à température ambiante pendant 30 jours.

2- Méthodes

2.1 Extraction des graines de *Bunium bulbocastanum* L

L'extraction a été réalisé selon la méthode de **Markham 2006**.

100 g de poudre des graines de *Bunium bulbocastanum* a été macéré dans 500 ml de mélange méthanol / eau distillée (85%), sous l'agitation, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après 24 h le mélange a été filtré, le filtrat est conservé à 4° C ensuite le précipité est soumis à une deuxième extraction dans 500 ml de mélange méthanol / eau (50%) pendant 24 h de la même façon que la première extraction.

Après filtration les deux filtrats sont combinés puis soumis à une évaporation à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif pour obtenir l'extrait brut.

- **Fractionnement**

L'extrait brut est soumis à une série de fractionnement liquide-liquide à l'aide de différents solvants à polarité croissante (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et butanol).

Dans une ampoule à décanté l'extrait brut déjà dissout dans l'eau distillée a été mélangé avec l'hexane (200 ml), après décantation l'hexane a été récupéré, la décantation a été répété par le même solvant (hexane) jusqu'à ce que sa couleur devienne transparente, l'hexane est ensuite évaporé pour obtenir en fin la fraction d'hexane.

De la même façon la phase aqueuse est soumise aux fractionnements par le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le butanol, à la fin on obtient quatre fractions et la phase aqueuse a été définie comme la cinquième fraction.

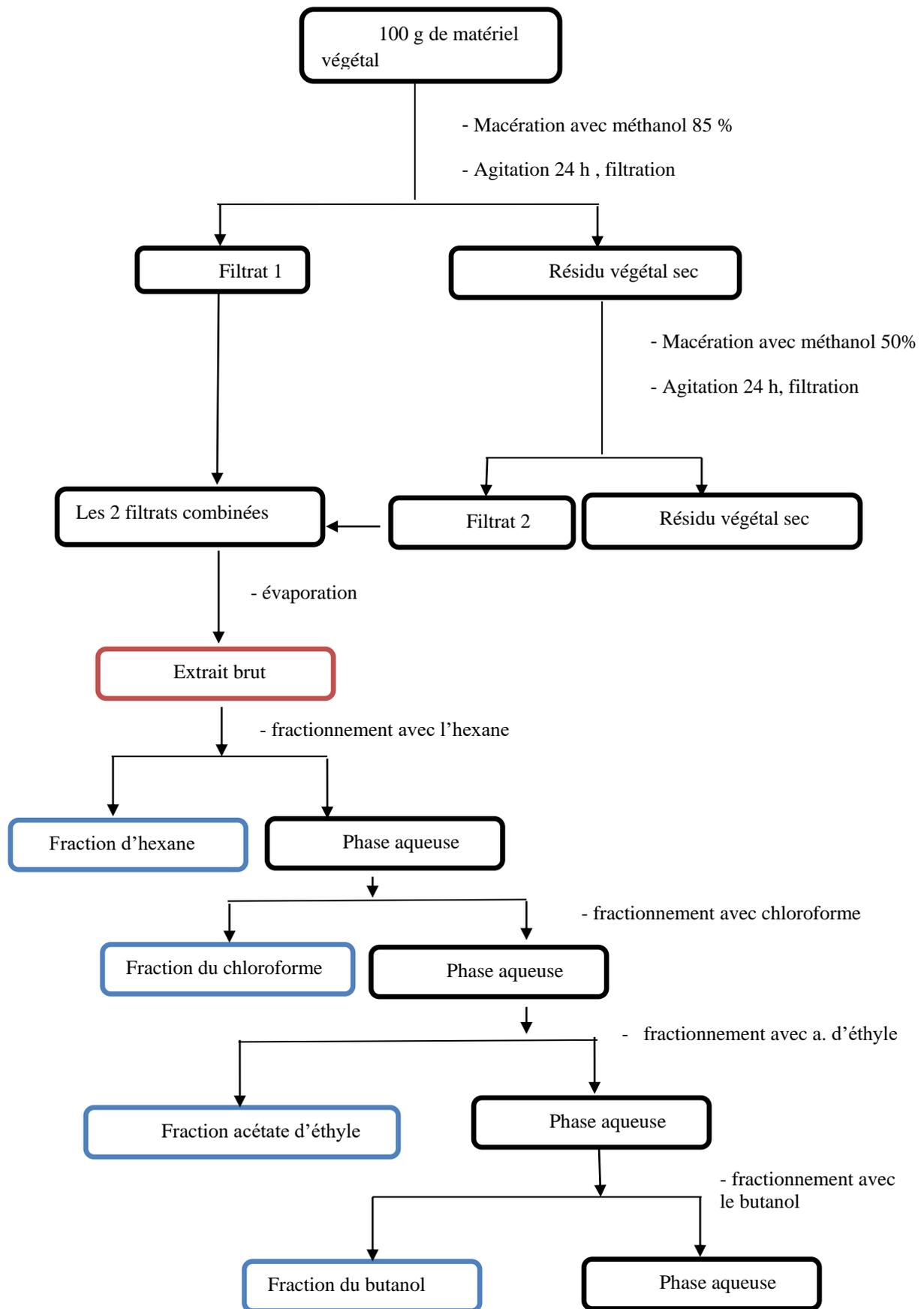


Figure 10. Protocole d'extraction des graines de *Bunium bulbocastanum* L

(Markham 2006).

2.1.1 Rendement d'extraction

Le rendement de l'extraction est calculé via la formule suivante :

$$R (\%) = (Me / M_{eh}) \times 100$$

Où

R (%) : rendement en %

Me : est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en g

M_{eh} : la masse sèche de l'échantillon végétal en g (Mahmoudi et *al.*, 2013)

- **Rendement de fractionnement**

Le rendement des fractions est calculé par rapport au poids de l'extrait brut.

$$R F (\%) = (M f / M e b) \times 100$$

Où

R (%) : rendement de fraction en %

M f : est la masse de fraction après évaporation du solvant en g

M e b : la masse d'extrait brut en g

2.2. Dosage des Polyphénols totaux

2.2.1. Principe

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin Ciocalteu selon la méthode Singleton et Rossi (1965) .

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) de coloration jaune. Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxyde bleue de tungstène et de molybdène. La coloration est proportionnelle à la quantité de polyphénols présentes dans l'extraits (Boizot et Charpentier ,2006).

2.2.2 Mode opératoire

Dans des tubes à essais 200 μ l d'extrait et 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu à 10 % sont mélangés, quatre minutes après, 800 μ l de solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3 : 7,5

%) est ajoutée et incubé 2 heures à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc qui contient 200 µl de méthanol, 1 ml de Folin Ciocalteu et 800 µl de Na₂CO₃. Le test est réalisé en triplicata.

2.2.3 Expression des résultats

Les concentrations en composés phénoliques totaux des extraits sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue à différentes concentrations d'acide gallique dans le méthanol. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent en acide gallique par 1 milligramme d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

2.3 Dosage des Flavonoïdes totaux

2.3.1 Principe

La détermination de la teneur des flavonoïdes totaux a été effectuée par une méthode adaptée par (Djeridane et *al.* 2006) avec le trichlorure d'aluminium. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes qui absorbe dans le visible à 430 nm.

2.3.2 Mode opératoire

Dans des tubes à essais 1 ml d'AlCl₃ à 2% est ajouté à 1 ml d'extrait, puis le mélange est agité. L'absorbance est lue à 430 nm après incubation de 15 minutes à l'obscurité, contre un blanc qui contient 1 ml d'AlCl₃ et 1 ml de méthanol. Le test est réalisé en triplicata.

2.3.3. Expression des résultats :

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de Quercétine par un milligramme d'extrait (µg EQ / mg d'extrait).

2.4 Dosage de flavonols

La méthode décrite par (M baebie et *al.* ;2012) a été utilisée pour la quantification des flavonols dans les différents extraits.

2.4.1 Principe

Les flavonols réagissent avec les trichlorure d'aluminium et l'acétate de sodium et donnent une coloration jaune mesurable à 440 nm.

2.4.2 Mode opératoire

Dans des tubes à essais 1 ml d'extrait est mélangé avec, 1 ml de AlCl₃, 1.5 ml d'acétate de sodium, le mélange est homogénéisé puis, il est mis en incubation pendant 2.30 h

à 25°C à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 440 nm contre un blanc dans lequel l'extrait est remplacé par le méthanol.

2.4.3 Expression des résultats

Les résultats sont obtenus en $\mu\text{g ER/ mg}$ d'extrait sec par extrapolation sur la courbe d'étalonnage de la Rutine (Absorbances en fonction de la concentration)

2.5 Dosage des triterpènes

La méthode décrite par (Chang, 2006) a permis la détermination des triterpènes dans les différentes fractions.

2.5.1 Principe

Le principe de base de cette méthode est la réaction des triterpènes oxydés avec la vanilline, où l'acide sulfurique est utilisé comme oxydant. Les sapogénines stéroïdiennes avec ou sans double liaison en C-5, les sapogénines triterpénoïdes et les acides stéroliques et biliaires qui ont un groupe OH en position C-3 réagissent avec la vanilline en milieu acide pour donner des chromogènes avec des maximal d'absorbance à 548 nm, selon la nature des saponines.

2.5.2 Mode opératoire

Dans des tubes à essais 20 μl d'extrait sont mélangé avec, 30 μl ml de vanilline, 100 μl d'acide perchlorique, le mélange est homogénéisé puis, il est mis en incubation pendant 45 minutes à 60°C à l'obscurité. Après refroidissement dans un bain glacé, 450 μl d'acide acétique sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 548 nm contre un blanc qui contient tous les réactifs précédemment décrits sauf que l'extrait est remplacé par le méthanol.

2.5.3 Expression des résultats

Les résultats sont obtenus en $\mu\text{g EAU/ mg}$ d'extrait sec par extrapolation sur la courbe d'étalonnage de l'acide ursolique (Absorbances en fonction de la concentration).

2.6 Evaluation de l'activité antioxydante

2.6.1 Test de Pouvoir réducteur

- **Principe**

Cette méthode est basée sur l'aptitude des extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Abeddou, 2015).

- **Mode opératoire Selon le protocole (oyaizu, 1986).**

1.25 ml de chaque extrait est mélangé avec 1.25 ml de tampon phosphate (0.2 M à pH 6.6) et 1.25 ml de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1 %. Les tubes sont agités et incubés à 50°C pendant 20 min dans un bain marie. Après l'incubation 1.25 ml de TCA sont ajoutés, les tubes sont centrifugés 10 min à 700 TPM, 1.25 ml du surnageant sont additionnés de 1.25 ml d'eau distillée et 500 μl de chlorure de fer (FeCl_3) à 0.1%. L'absorbance des solutions est mesurée à 700 nm contre un blanc dans la quel l'extrait est remplacé par le méthanol.

- **Expression des résultats**

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonctions des différentes concentrations utilisées pour les différentes fractions d'extraits étudiés. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées. Les résultats sont aussi calculés en μg EAA/ mg d'extrait sec par extrapolation sur la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (Absorbances en fonction de la concentration).

2.6.2 Inhibition du radical cation ABTS⁺

- **Principe**

En réagissant avec le persulfate de potassium ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) forme le radical ABTS⁺, de couleur bleu-vert.

L'ajout d'antioxydant réduit ce radical et provoque une décoloration de l'ABTS. La décoloration du radical mesurée par spectrophotométrie à 734 nm (Hajjaj,2017)

- **Mode opératoire**

100 μl de chaque extrait est mélangé avec 1.9 ml de solution d'ABTS⁺, après agitation les tubes sont incubés pendant 7 min à l'obscurité et à température ambiante. L'absorbance

des solutions est mesurée à 734 nm contre un control qui contient 100 µl de méthanol et 1.9 ml d'ABTS⁺.

- **Expression des résultats**

Calcul des pourcentages d'inhibitions

Les résultats sont représentés en % d'inhibition

$$\% \text{ d'inhibition du radical ABTS}^+ = (AC - AT) / AC \times 100$$

Où :

AC=Absorbance du control

AT= Absorbance du test

Les résultats sont aussi exprimés en TAEC « la capacité antioxydant équivalente au Trolox) est calculé par la formule suivant :

$$\begin{aligned} \text{trolox} &= \frac{((IC\%_{\text{sample}} - b)/a)(\text{mg/mL}) * 10^3}{c_{\text{sample}}(\text{mg/mL})} \\ &= \text{mg trolox equivalent/g extract} \end{aligned}$$

L'augmentation de TEAC correspond à une augmentation de l'activité inhibitrice de radical ABTS⁺ des fractions testées.

2.6.3 Activité antioxydante totale (TAC)

- **Principe**

La capacité antioxydante totale (TAC) 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 MoO₄²⁻ à molybdène Mo (V) MoO₂⁺ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide (Belyagoubi, 2011).

- **Mode opératoire**

100 µl de chaque extrait est mélangé avec 1 ml de solution du réactif (0.6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium). Les tubes sont incubés à 95°C pendant 90 min à l'obscurité. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 1 ml de la solution du réactif et 100 µl du méthanol, il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon.

- **Expression des résultats**

La capacité antioxydante totale est exprimée en microgramme équivalents d'acide ascorbique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAA} / \text{mg d'extrait}$).

Chapitre 5 :

Résultats et discussions

1. Rendement

• Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction des graines de *Bunium bulbocastanum* par la méthode de (Markham 2006) est représenté dans la (figure 11)

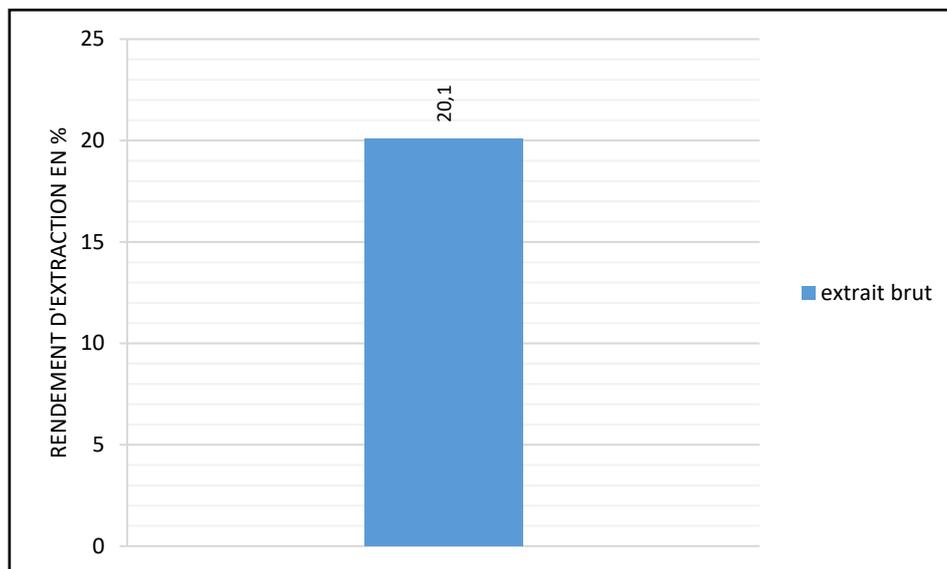


Figure 11. Histogramme du rendement d'extrait brut des graines de *Bunium bulbocastanum*.

Les graines de *Bunium bulbocastanum* ont donné un rendement de 20.1 %. Dans une étude réalisée par (Bekara, 2017) qui ont travaillé sur les graines de *Pimpinelle anisum* (la même famille), le rendement de l'extrait brut aqueux est 20.99 %, ce résultat est très proche de notre résultat. Une autre étude effectuée par (Giancarlo et al., 2006) qui ont travaillé sur l'espèce *Bunium persicum*, l'extrait méthanolique donne un rendement 11.9 g, ce résultat est inférieur au résultat que nous avons obtenu (20.1 g).

- **Rendement de fractionnement**

Le rendement de fractionnement des graines de *Bunium bulbocastanum* obtenu par différents solvants est représenté dans la (figure 12).

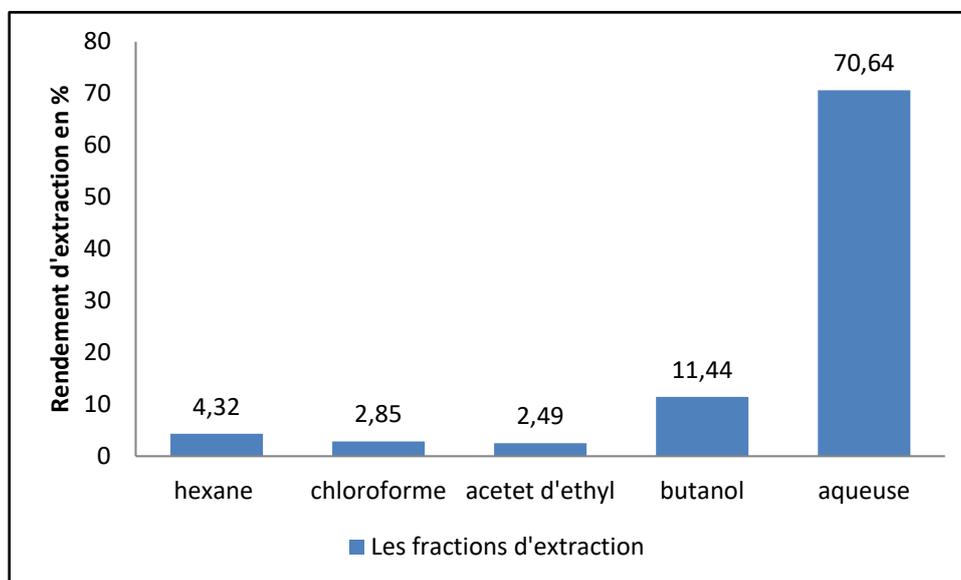


Figure 12. Histogramme du rendement des fractions des graines *Bunium bulbocastanum* L.

Le rendement d'extraction le plus important est celui de la fraction aqueuse avec 70.64 %, suivi par 11.44 % pour la fraction butanolique, puis la fraction d'hexane avec 4.32 %, en fin les rendements du chloroforme et acétate d'éthyle qui sont approximativement égaux avec 2.85 % et 2.49 % respectivement.

Selon les résultats de (Giancarlo et al., 2006), le rendement de la fraction d'hexane est de 0.42g, ce résultat est inférieur au nôtre (0.8 g), dans la même étude le rendement de la fraction d'acétate d'éthyle est 0.76 g ce résultat est presque égal de notre résultat de la même fraction (0.50g).

Dans une autre étude réalisée par (Sharififar et al., 2010) qui ont travaillé sur l'espèce *Bunium persicum* le rendement de la fraction de chloroforme est 3.1 %, ce résultat est approximativement égal de notre résultat pour la même fraction (2.85 %).

Selon les résultats de (Khalfallah et al., 2014) qui ont travaillé sur l'espèce *Eryngium triquetrum*, la fraction de chloroforme donne un rendement 0.8 g, ce résultat est supérieur au rendement de la même fraction que nous avons trouvé (0.57 g), la fraction d'acétate d'éthyle dans la même étude est représenté par un rendement 1.3g, celle-ci est supérieur au rendement

que nous avons trouvé pour la même fraction (0.50g), la fraction du butanol donne un rendement 11g, la même fraction de notre plante a un rendement inférieur à ce dernier (2.3 g).

D'une manière général le rendement d'extraction varie en fonction de l'espèce végétal, l'organe utilisé dans l'extraction, la richesse de chaque espèce en métabolite, et aussi le rendement d'extraction varie selon des facteurs environnementaux (climat, exposition aux ravageurs), des maladies, des conditions et la durée du stockage, la période de récolte et la méthode d'extraction appliquée, (Wojdylo et al., 2009 ; Doaudi et al., 2015). En outre le rendement d'extraction dépend aussi de type de solvant utilisé (Zhao at al., 2006).

2. Dosage des polyphénols totaux

La détermination de la teneur en polyphénol totaux des fractions des graines de *Bunium bulbocastanum* est faite par l'utilisation de réactif de Folin Ciocalteu selon la méthode Singleton et Rossi (1965) , et l'utilisation des différents concentration d'acide gallique comme standard (5 à 200 µg /ml). Les tests sont réalisés en triplicata. Les résultats obtenus sont montrés dans la (figure 13).

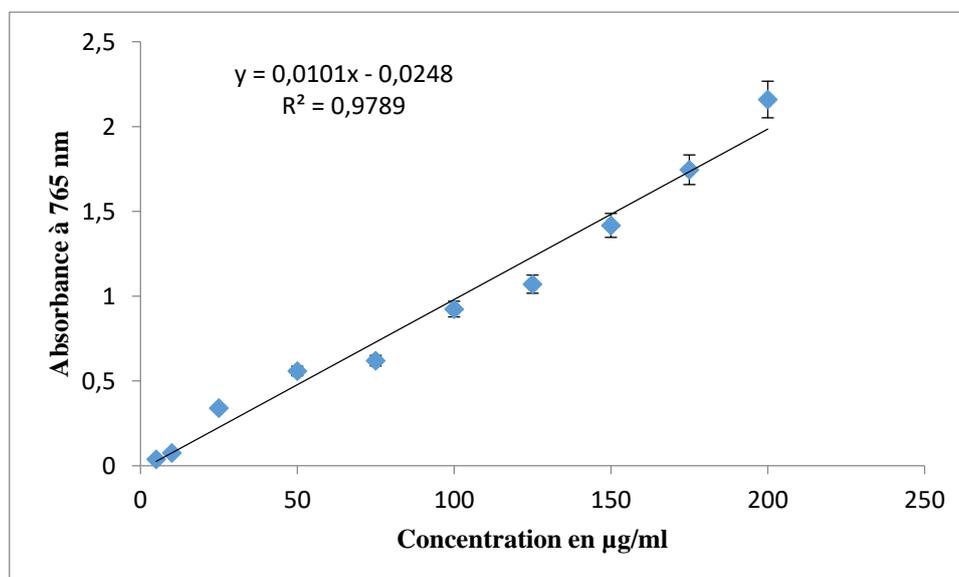


Figure 13. Droite d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

La quantité des polyphénols totaux dans les fractions est exprimée en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg d'extraits). Les résultats obtenus sont présentés dans la (figure 14).

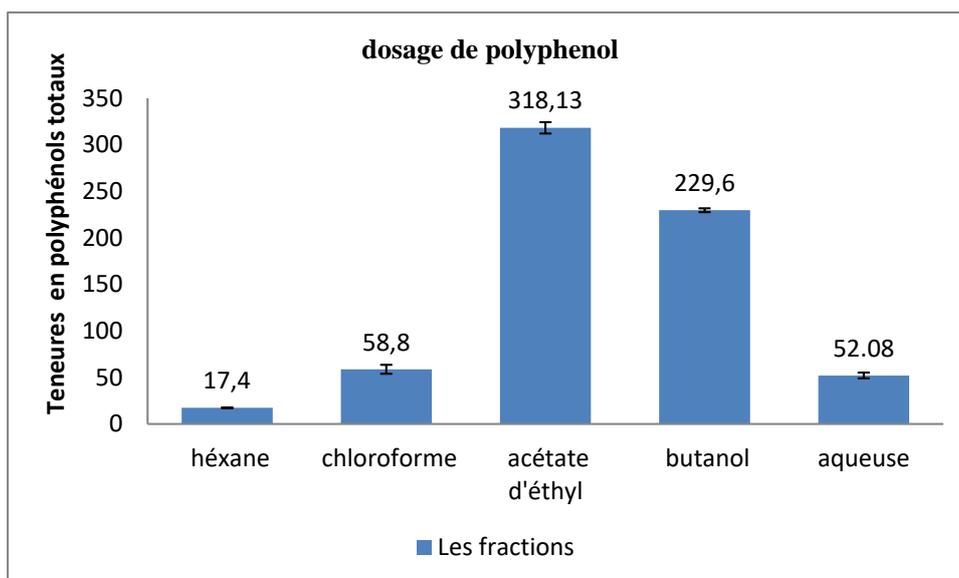


Figure 14. Teneur des fractions en polyphénol totaux en $\mu\text{g EAG / mg d'extrait}$.

Les résultats de la (**figure 14**) montre que la fraction d'acétate d'éthyle est le plus riche en polyphénols totaux par sa teneur de $318.13 \pm 6.11 \mu\text{g EAG /mg d'extrait}$, suivi par la fraction butanolique représenté par une teneur $229.6 \pm 2.01 \mu\text{g EAG /mg d'extrait}$, la fraction de chloroforme contient une teneur $58.8 \pm 4.77 \mu\text{g EAG /mg d'extrait}$ tandis que la fraction aqueuse contient une teneur $52.08 \pm 3.04 \mu\text{g EAG /mg d'extrait}$, la teneur la plus faible correspondant donc la fraction d'hexane $17.4 \pm 0.46 \mu\text{g EAG /mg d'extrait}$.

Selon les résultats de (Athemna *et al.*, 2010) qui ont travaillé sur la plant *Cuminum cyminum*, la fraction d'acétate d'éthyle contient une teneur $19.39 \pm 1.89 \text{ mg EAG/g d'extrait}$ en polyphénols totaux, ce résultat est largement inférieur à notre résultat pour la même fraction ($318.13 \pm 6.11 \mu\text{g EAG/ mg d'extrait}$), la fraction butanolique dans la même étude contient une teneur $595.45 \pm 4.45 \text{ mg EAG/ g d'extrait}$ en polyphénols totaux, ce résultat est supérieur à ce que nous avons obtenu pour la même fraction ($229.6 \pm 2.01 \mu\text{g EAG/ mg d'extrait}$). Dans une autre étude réalisée par (Bendiabdellah *et al.*, 2012) sur la plante *Daucus crinitus*, la fraction aqueuse a donné une teneur $89.80 \pm 3 \mu\text{g EAG / mg d'extrait}$, ce résultat est supérieur à notre résultat pour la même fraction ($52.08 \pm 3.04 \mu\text{g EAG/mg d'extrait}$).

Une autre étude réalisée par (Ammor *et al.*, 2017) sur la plante *Ammi visnaga*, la fraction aqueuse contient une teneur $66.10 \pm 1.27 \text{ mg EAG/g d'extrait}$, ce résultat est supérieur à notre résultat pour la même fraction mais reste très proche ($52.08 \pm 3.04 \mu\text{g EAG /mg d'extrait}$).

La solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique dans la plante, qui varie de composés simples à fortement polymérisés. Cette diversité structurale est

responsable de la grande variabilité des propriétés physicochimique influençant l'extraction des polyphénols. En outre la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant (Mahmoudi et *al.*, 2013). Le solvant d'extraction emporte des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peut interférer pendant toute l'évaluation phénoliques (Djeridane et *al.* 2006).

La répartition qualitative et quantitative des composés phénoliques est inégale selon les espèces, les organes, les tissus et les stades physiologiques (Benchiha et *al.*, 2015). Le contenu phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques (Falleh et *al.*, 2008).

3. Dosage des flavonoïdes totaux

Une courbe d'étalonnage de quercétine (5 à 50 µg /ml) est utilisée pour la quantification des flavonoïdes totaux dans les différentes fractions (**Figure 15**). Les essais ont été réalisés en triplicata.

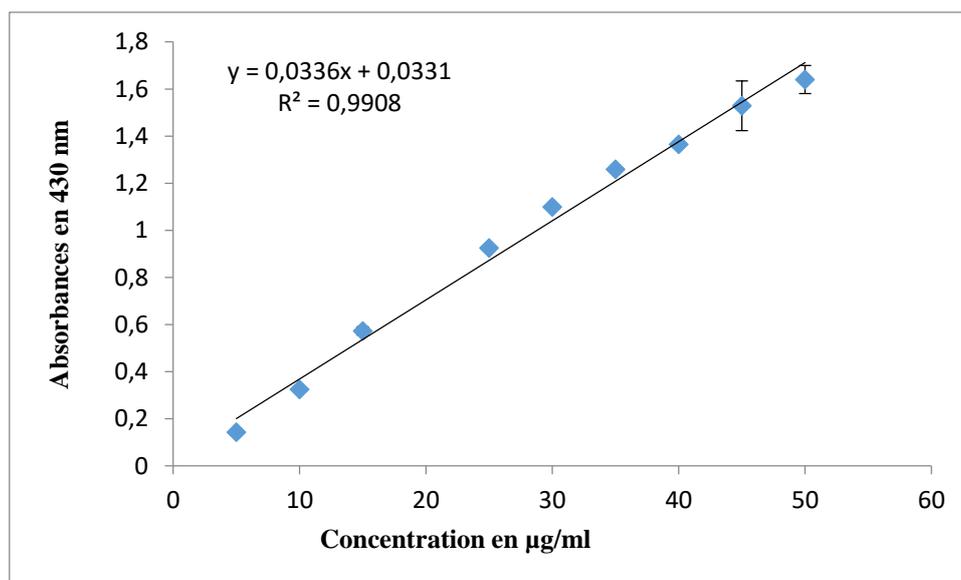


Figure 15. Droite d'étalonnage de quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

La quantité des flavonoïdes a été rapportée en microgramme d'équivalent quercétine par un milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait). Les résultats obtenus ont été montrés dans la (**figure 16**).

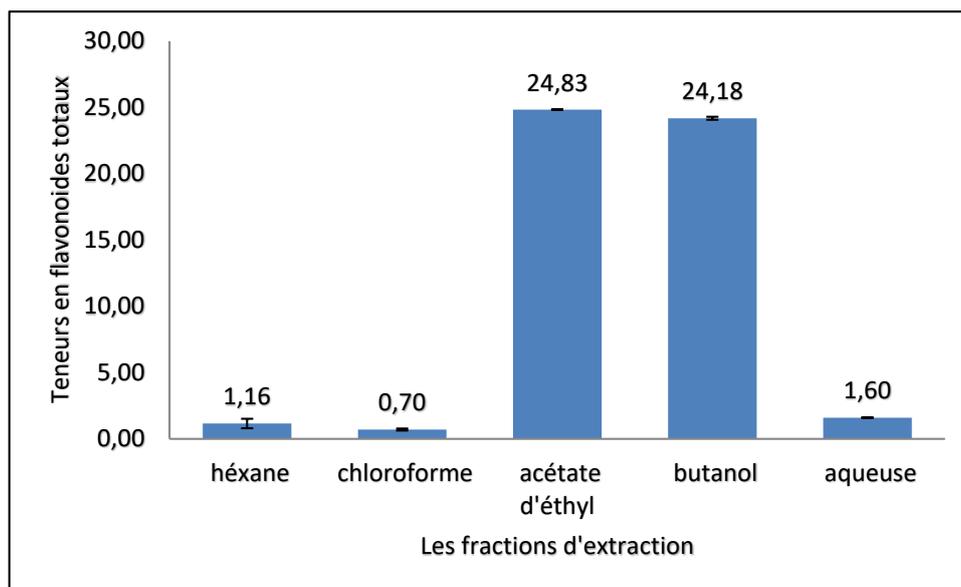


Figure 16. Teneur des fractions en flavonoïdes totaux en $\mu\text{g EQ} / \text{mg d'extrait}$.

Les résultats montrés dans la figure précédente montrent que la fraction d'acétate d'éthyle est la plus riche en flavonoïdes totaux avec une teneur $24,83 \pm 0,03 \mu\text{g EQ} / \text{mg d'extrait}$, suivi par la fraction butanolique avec la même quantité ($24,18 \pm 0,11 \mu\text{g EQ} / \text{mg d'extrait}$), puis la fraction aqueuse $1,60 \pm 0,021 \mu\text{g EQ} / \text{mg d'extrait}$, puis la fraction d'hexane $1,16 \pm 0,35 \mu\text{g EQ} / \text{mg d'extrait}$, en fin la fraction de chloroforme est le plus pauvre en flavonoïdes totaux $0,70 \pm 0,07 \mu\text{g EQ} / \text{mg d'extrait}$.

Dans une étude présentée par (Athemna et al., 2010), qui ont travaillé sur la plante *Cuminum cyminum*, la fraction d'acétate d'éthyle contient une teneur $54,21 \pm 2,82 \text{ mg EQ/g}$ d'extrait en flavonoïdes totaux, ce résultat est supérieur à notre résultat pour la même fraction ($24,83 \pm 0,03 \mu\text{g EQ} / \text{mg d'extrait}$), la fraction butanolique de la même étude est représentée par une teneur $20,11 \pm 5,80 \text{ mg EQ/g}$ d'extrait, ce résultat est presque similaire aux résultats que nous avons obtenus pour la même fraction ($24,18 \pm 0,11 \mu\text{g EQ} / \text{mg d'extrait}$). Selon les résultats de (Bendiabdellah et al., 2012), qui ont travaillé sur l'espèce *Daucus crinitus*, la fraction aqueuse contient une teneur $49,77 \pm 2$ en flavonoïdes totaux, ce résultat est largement supérieur à notre résultat pour la même fraction ($1,60 \pm 0,021 \mu\text{g EQ} / \text{mg d'extrait}$).

Une autre étude réalisée par (Ammor et al., 2017) sur la plante *Ammi visnaga*, la fraction aqueuse contient une teneur $5,21 \text{ mg EQ/g}$ d'extrait en flavonoïdes totaux, ce résultat est supérieur à notre résultat pour la même fraction ($1,60 \pm 0,021 \mu\text{g EQ} / \text{mg d'extrait}$).

4. Dosage de flavonol

L'estimation des teneurs en flavonols dans les différentes fractions des graines de *Bunium bulbocastanum* se fait par la méthode de (M baebie et al., 2012). Le standard utilisé est la rutine avec différentes concentrations (10 à 200 µg /ml).

Les concentrations en flavonol ont été déterminées à partir de droit d'étalonnage ayant l'équation suivant : $y = 0.0066 x + 0.0992$ (figure 17).

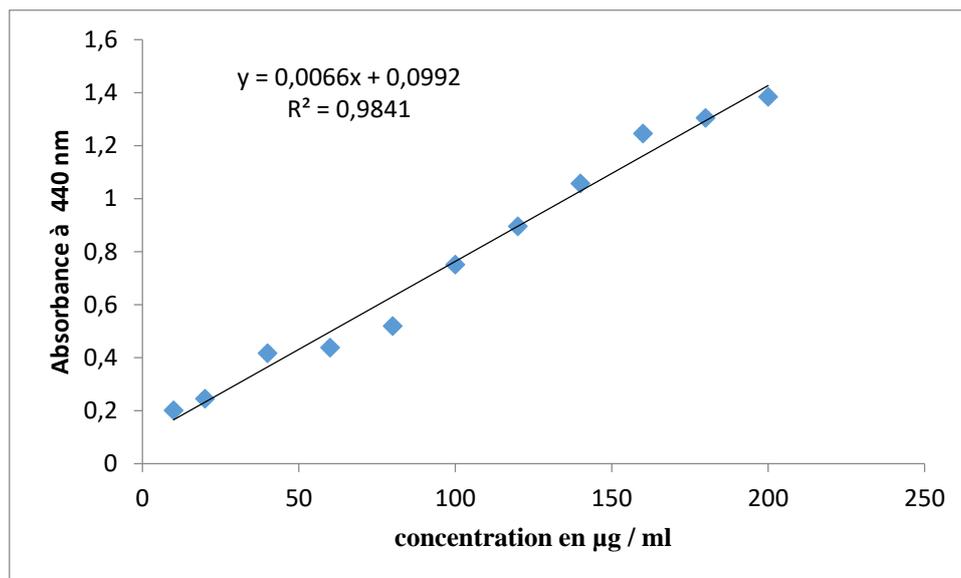


Figure 17. Droite d'étalonnage de la rutine pour le dosage de flavonol.

La quantité des flavonols a été rapportée en microgramme d'équivalent rutine par un milligramme d'extrait (µg ER /mg d'extrait). Les résultats obtenus ont été montrés dans la (figure 18).

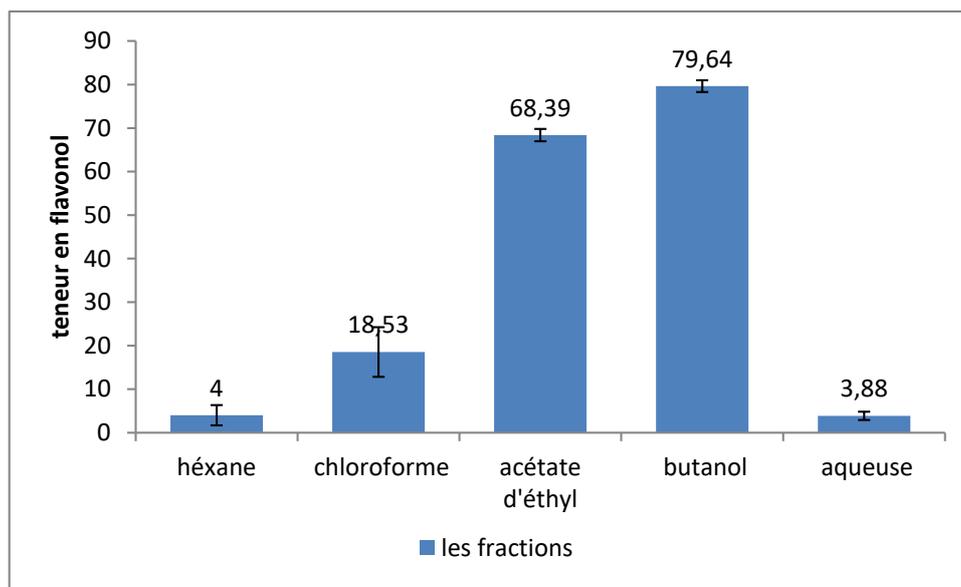


Figure 18. Teneur des fractions en flavonol en $\mu\text{g ER} / \text{mg d'extract}$.

Les résultats de la (**figure 18**) montrent que la fraction du butanol est très riche en flavonol avec une teneur $79.64 \pm 1.35 \mu\text{g ER} / \text{mg d'extract}$ suivi par la fraction d'acétate d'éthyle avec une teneur $68.39 \pm 1.41 \mu\text{g ER} / \text{mg d'extract}$ puis la fraction de chloroforme représenté par teneur $18.53 \pm 5.70 \mu\text{g ER} / \text{mg d'extract}$, en fin les fractions les moins riche en flavonols sont la fraction d'hexane et la fraction aqueuse avec des teneurs $4 \pm 2.32 \mu\text{g ER} / \text{mg d'extract}$ et $3.88 \pm 0.9632 \mu\text{g ER} / \text{mg}$ respectivement.

A notre connaissance, aucune étude n'été réalisé sur le dosage des flavonols sur la plante *Bunium bulbocastanum* . Pour cela il est difficile de comparer nos résultats avec d'autres travaux.

La famille des flavonols est classé structurellement dans l'ordre myricétine (3',4',5' OH)> quercétine (3',4' OH)> quercitrine (quercétine glycosylées)> kaempférol (4'OH). (Manchado et Cheyner, 2006). Cette diversité structurelle explique la différence des flavonols dans les différentes fractions dont la présence de OH augmente leur solubilité dans les solvants polaires.

5. Dosage des triterpènes

L'estimation des teneurs en triterpènes dans les différentes fractions des graines de *Bunium bulbocastanum* se fait par la méthode de (Chang, 2011), le standard utilisé est l'acide ursolique avec différents concentration (5 à 300 µg/ml).

Les tests sont réalisés en triplicata et les concentrations en triterpènes ont été déterminées à partir de droit d'étalonnage ayant l'équation de type : $y = 0.0015x + 0.0769$ (**figure 19**).

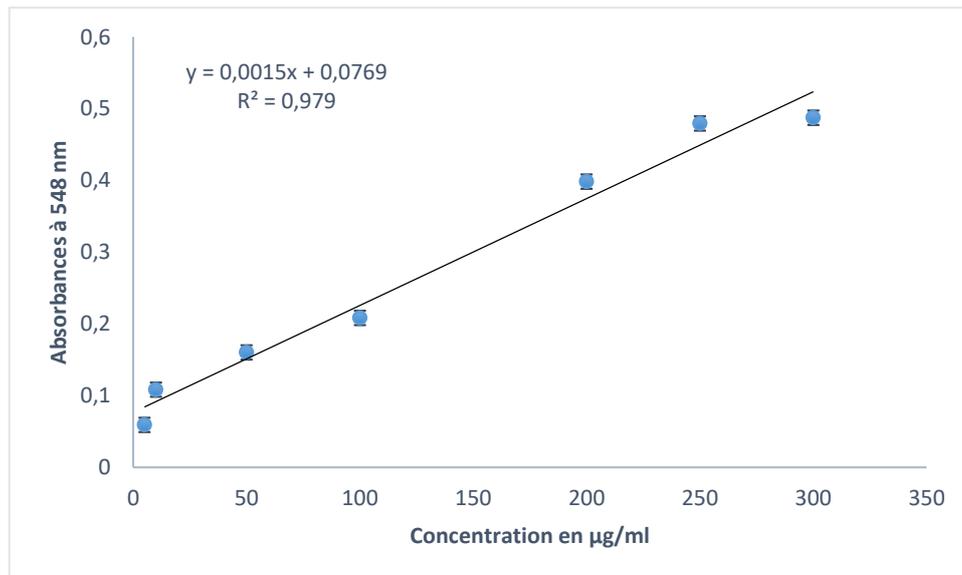


Figure 19. Droite d'étalonnage de l'acide ursolique pour le dosage des triterpènes.

La quantité des triterpènes dans les fractions est exprimée en microgramme équivalant de l'acide ursolique par mg d'extrait. Les résultats obtenus sont présentés dans (**Figure 20**).

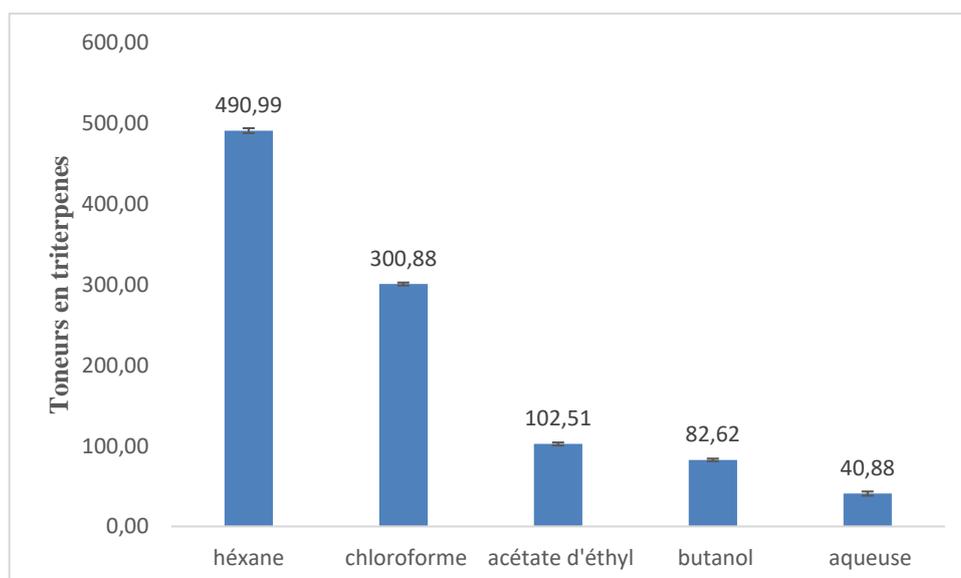


Figure 20. Teneur des fractions en triterpènes en µg EAU / mg d'extrait.

Les résultats de la (**figure 20**) ont montré que la fraction d'hexane contient une teneur plus élevée en triterpènes, 490.99 ± 3.07 µg EAU/mg d'extrait, suivie par la fraction de chloroforme qui renferme une teneur de 300.88 ± 1.73 µg EAU/mg d'extrait, puis la fraction d'acétate d'éthyle avec une teneur 102.51 ± 1.79 µg EAU/mg d'extrait, la fraction de butanol est représentée par une teneur 82.62 ± 1.60 µg EAU/mg d'extrait, en fin la fraction aqueuse avec la plus faible teneur en triterpènes 40.88 ± 2.51 µg EAU/mg d'extrait.

La faible solubilité dans l'eau et la haute liposolubilité sont des propriétés caractéristiques des triterpènes (Niego et *al.*, 2017). Ces caractéristiques expliquent la richesse de la fraction d'hexane (solvant apolaire) en triterpènes et la différence de répartition de cette dernière dans les autres fractions (répartition selon la polarité des solvants).

6. Activité antioxydante

6.1 Test du pouvoir réducteur

Les résultats obtenus lors du test du pouvoir réducteur des différentes fractions d'extrait des graines *Bunium bulbocastanum* sont montrés dans la (**figure 21**), et celle des standards dans la (**figure 22**). Tous les fractions sont dotés d'un pouvoir réducteur du fer dose-dépendant.

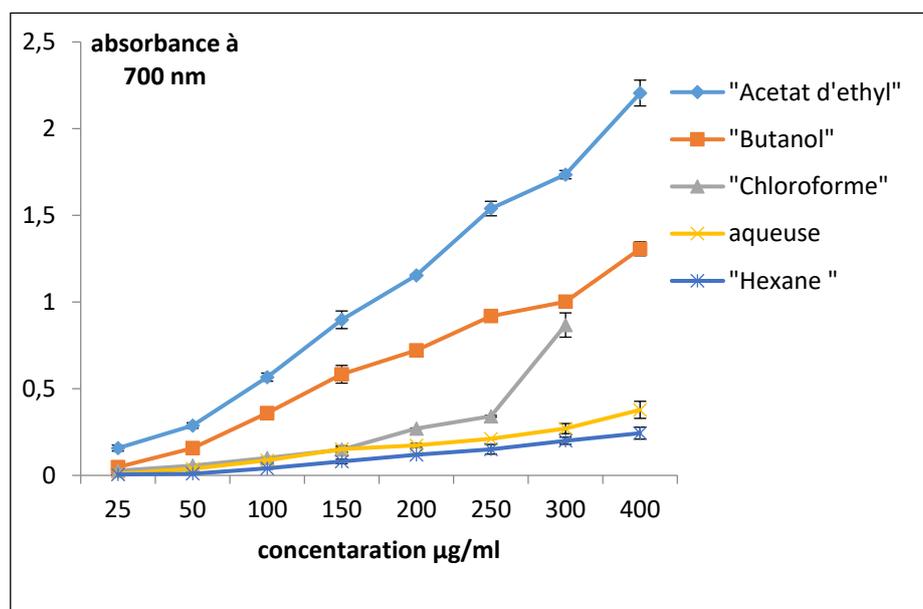


Figure 21. Pouvoir réducteur des fractions des graines de *Bunium bulbocastanum* .

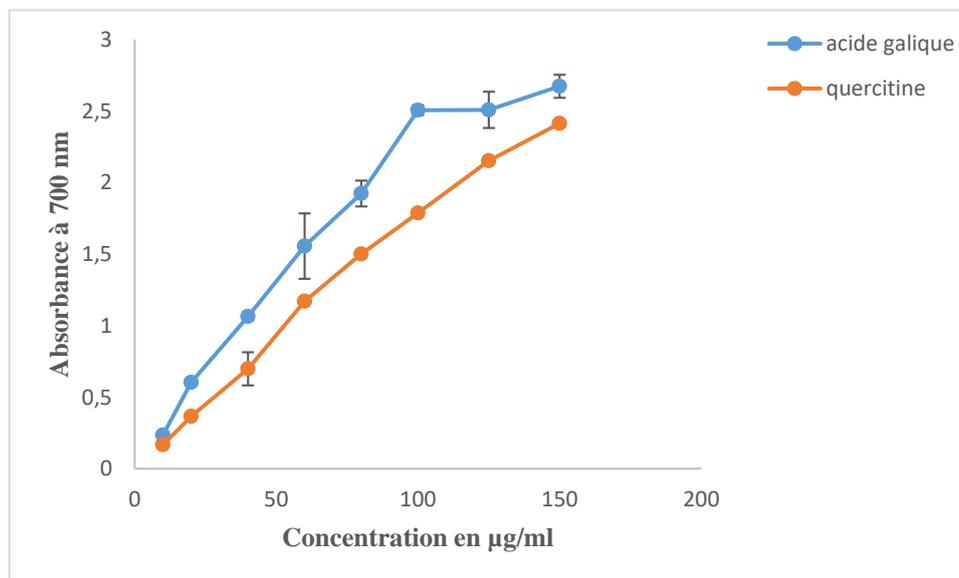


Figure 22. Pouvoir réducteur des standards.

Pour une meilleure comparaison de pouvoir réducteur entre nos fractions et les standards, on utilise l'acide ascorbique comme référence avec différentes concentrations (10 à 150 µg/ml) (**figure 23**).

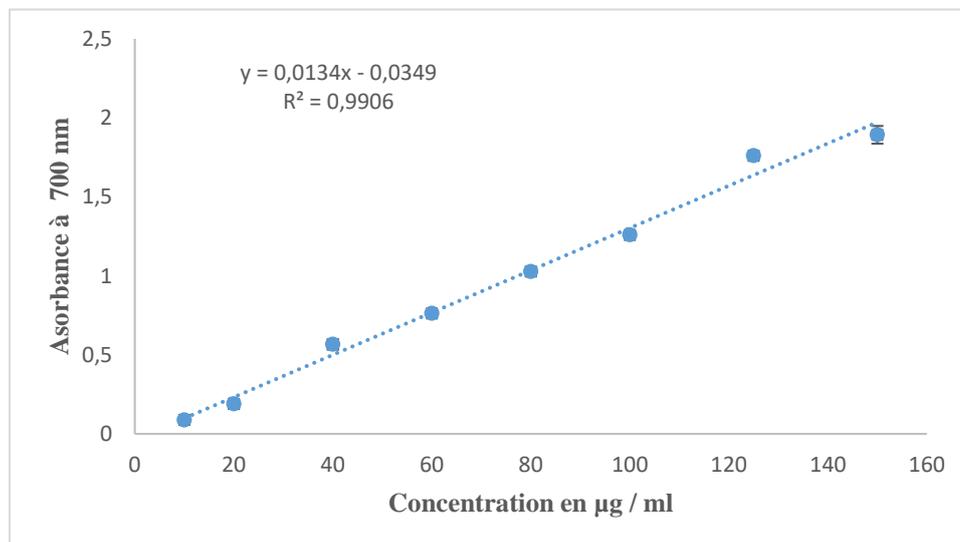


Figure 23. Droite d'étalonnage d'acide ascorbique.

Les résultats sont exprimés en µg EAA/mg d'extrait, la comparaison se fait pour la concentration 100 µg/ml (**figure24**).

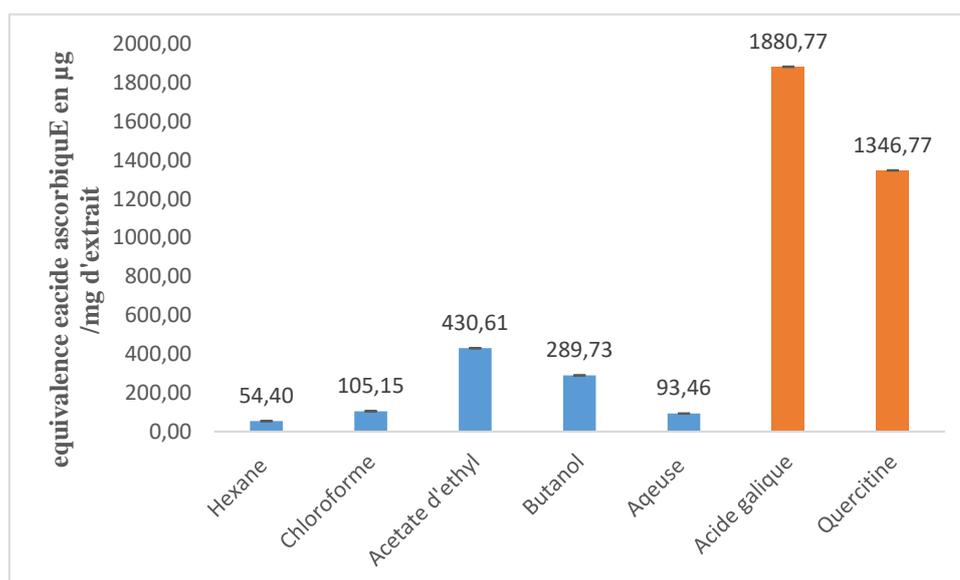


Figure 24. Résultats de comparaison de pouvoir réducteur des graines de *Bunium bulbocastanum* et des standards.

Les résultats montrent que la fraction d'acétate d'éthyle possède le pouvoir réducteur de fer la plus important $430.51 \pm 1.20 \mu\text{g EAA/mg}$ d'extrait suivi par la fraction butanolique avec une pouvoir réducteur $289.73 \pm 3.01 \mu\text{g EAA/mg}$ d'extrait à la même concentration, puis les fraction du chloroforme et aqueuse qui ont des pouvoir réducteur presque similaire ($105.42 \pm 1.29 \mu\text{g EAA/mg}$ d'extrait et $93.46 \pm 2.23 \mu\text{g EAA/mg}$ d'extrait respectivement), le pouvoir réducteur le plus faible est celui de la fraction d'hexane ($54.40 \pm 1.29 \mu\text{g EAA/mg}$ d'extrait).

Tandis que le standard acide gallique, a le pouvoir réducteur le plus fort $1880.77 \pm 0.43 \mu\text{g EAA/mg}$ d'extrait et supérieur à celle de standard quercétine est $1346.77 \pm 0.14 \mu\text{g EAA/mg}$ d'extrait, le pouvoir réducteur de nos fractions est reste inférieur par rapport au standards utilisés.

Selon les résultats de (Athmouni, 2015) qui a travaillé sur la plante *Thapsia garganica*, la fraction d'acétate d'éthyle a donné un pouvoir réducteur avec une absorbance 0.580 enregistré à la concentration $200 \mu\text{g/ml}$, ce pouvoir réducteur est inférieur au pouvoir réducteur que nous avons obtenu pour la même fraction avec (absorbance 1.154), la fraction d'hexane selon la même étude a donné un pouvoir réducteur avec une absorbance 0.400 celle-ci est supérieur à notre résultat pour la même fraction (0.119) à la même concentration, selon la même étude la fraction aqueuse a un pouvoir réducteur avec une absorbance 0.240 qui est supérieur à notre pouvoir réducteur (l'absorbance 0.173) à la même concentration.

Dans une autre étude réalisée par (Bendiabdellah et al., 2012) sur la plante *Daucus crinitus*, la fraction aqueuse a donné un pouvoir réducteur avec une absorbance 0.100, c'est inférieur au pouvoir réducteur de notre fraction (0.211) à la même concentration ($250 \mu\text{g/ml}$). La fraction aqueuse dans l'étude réalisé par (Oktay et al., 2002) sur la plant *Foeniculum vulgare* a donné un pouvoir réducteur avec une absorbance 0.500, celle-ci est supérieur au pouvoir réducteur que nous avons obtenu pour la même fraction (l'absorbance 0.087) pour un concentration $100 \mu\text{g/ml}$.

Il existe une haute corrélation entre le pouvoir réducteurs des fractions des graines de *Bunium bulbocastanum* et leurs teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes totaux, en flavonols avec des $R^2 = 0.99 > 0.94 > 0.9$ respectivement. Par contre il y'a une corrélation négative entre le pouvoir réducteur et les teneurs des fractions en triterpènes $R^2 = -0.55$. Ce qui explique la forte activité de l'extrait d'acétate d'éthyle le plus riche en polyphénols totaux et le faible pouvoir réducteur de la fraction d'hexane malgré sa richesse en triterpènes. Cela indique

clairement que les polyphénols sont responsables du pouvoir réducteur exhiber par les extraits et les fractions de plantes médicinales.

La capacité de don d'électron reflétant le pouvoir réducteur des composés phénoliques et des flavonoïdes constitue un indicateur significatif de son activité antioxydante (Pokorny et al., 2000). La capacité de don d'électron des substitutions méthyle et éthyle aux positions ortho et para par rapport aux groupes hydroxyles augmente considérablement l'activité antioxydante de phénol (Faten R et al., 2011).

6.2 Inhibition du Radical cation ABTS⁺

Le radical synthétique ABTS⁺ est souvent utilisé comme indicateur pour tester la capacité de don d'hydrogène et donc l'activité antioxydante (Shan et al., 2005).

Les résultats qui montrent l'inhibition du radical libre ABTS⁺ par les fractions sont représentées dans les (figure 25 et 26) et celle des standards sont représentées dans la (figure 27). Les résultats montrent que l'effet anti-radicalaire de tous nos fractions augmente en fonction de la concentration.

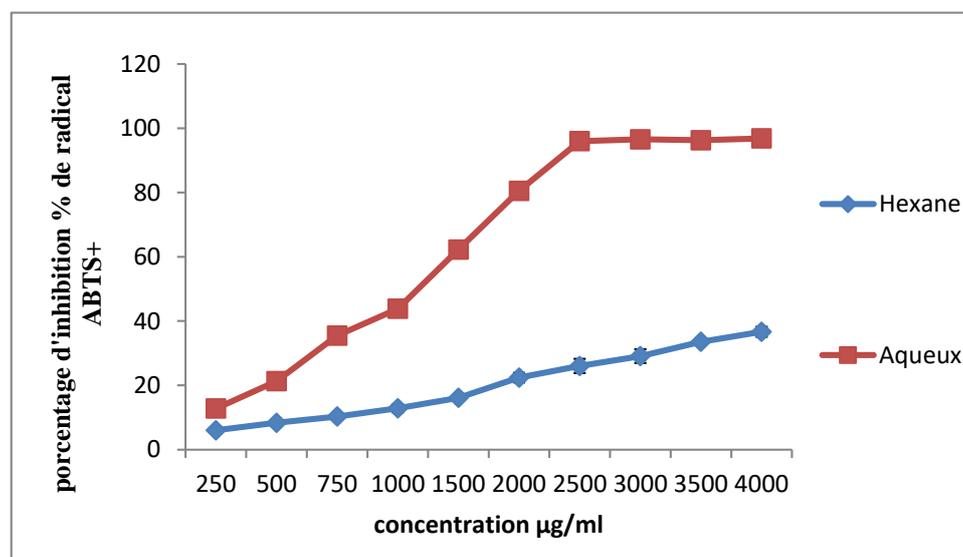


Figure 25. Activité anti radicalaire des fractions d'hexane et aqueuse des graines de *Bunium bulbocastanum* vis-à-vis le radical ABTS⁺. Chaque valeur représentée la moyenne trois essais ± SD.

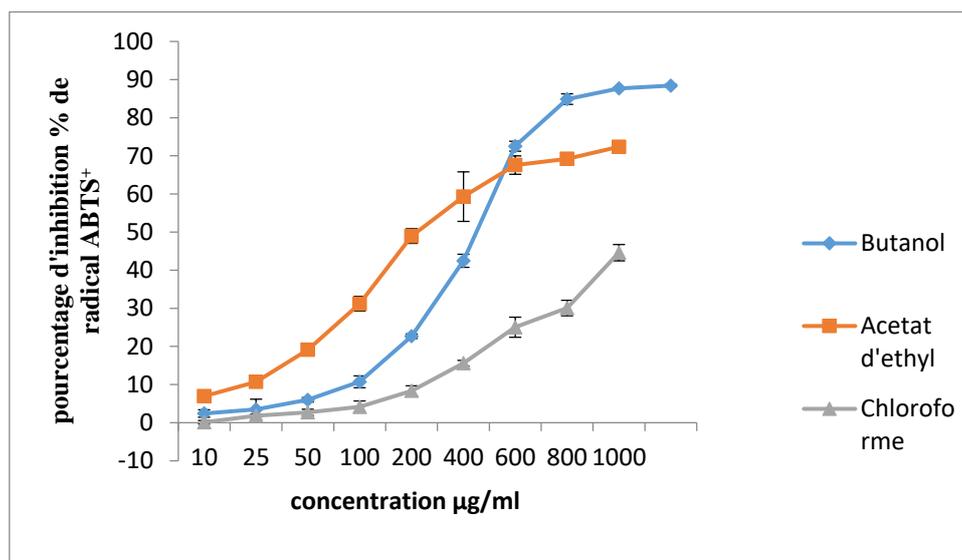


Figure 26. Activité anti radicalaire des fractions du butanol, acétate d'éthyle et chloroforme des graines de *Bunium bulbocastanum* vis-à-vis le radical ABTS⁺. Chaque valeur représentée la moyenne trois essais ± SD.

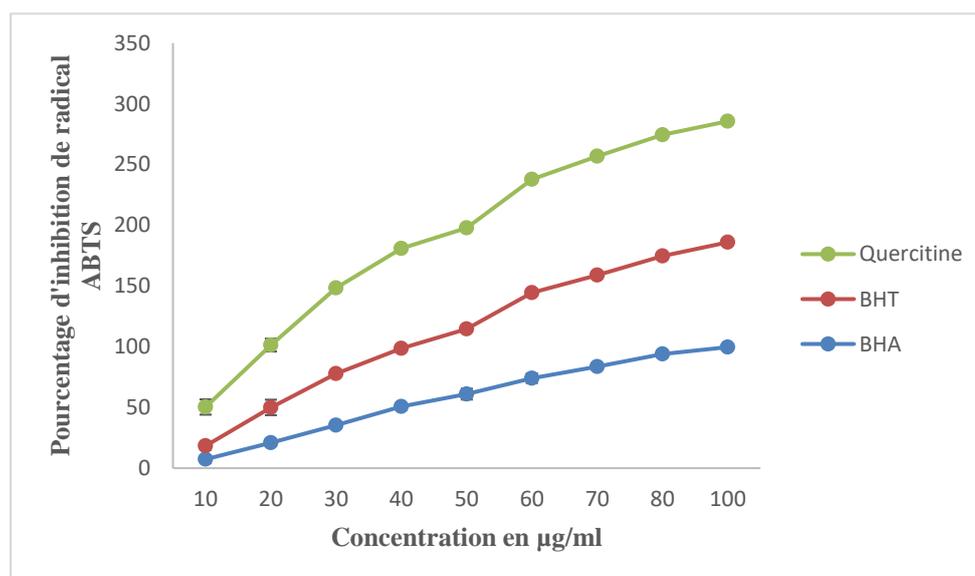


Figure 27. Activité anti radicalaire des standards BHA, BHT et la quercétine vis-à-vis le radical ABTS⁺. Chaque valeur représentée la moyenne trois essais ± SD.

Pour une meilleure comparaison entre nos fractions et les standards utilisés, on a calculé les TEAC (capacité antioxydante équivalente au Trolox) obtenus à partir de la courbe d'étalonnage du Trolox (**figure 28**), plus la valeur de TEAC est élevée, plus la molécule est active. Les résultats de comparaison sont présentés dans les (**figure 29,30**).

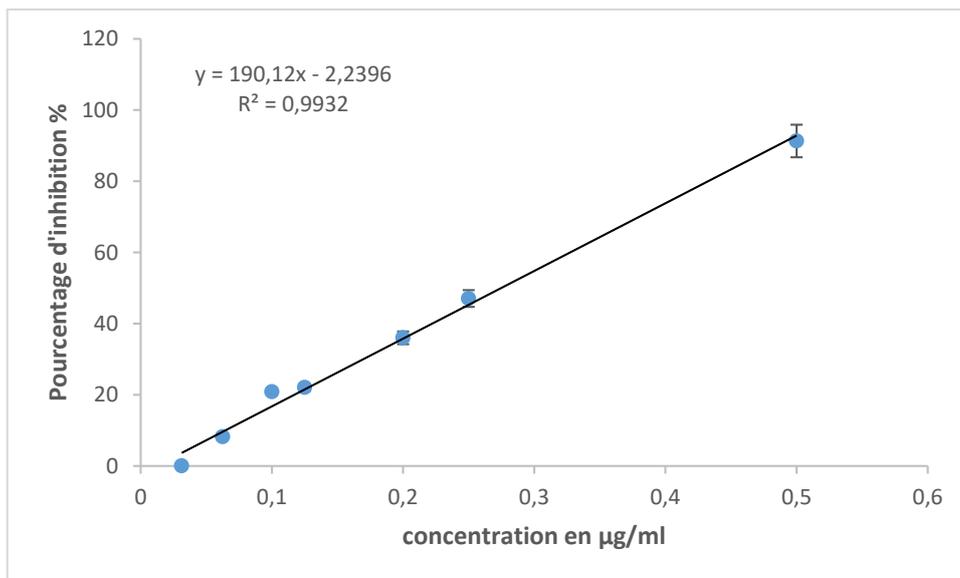


Figure 28. Droite d'étalonnage du trolox.

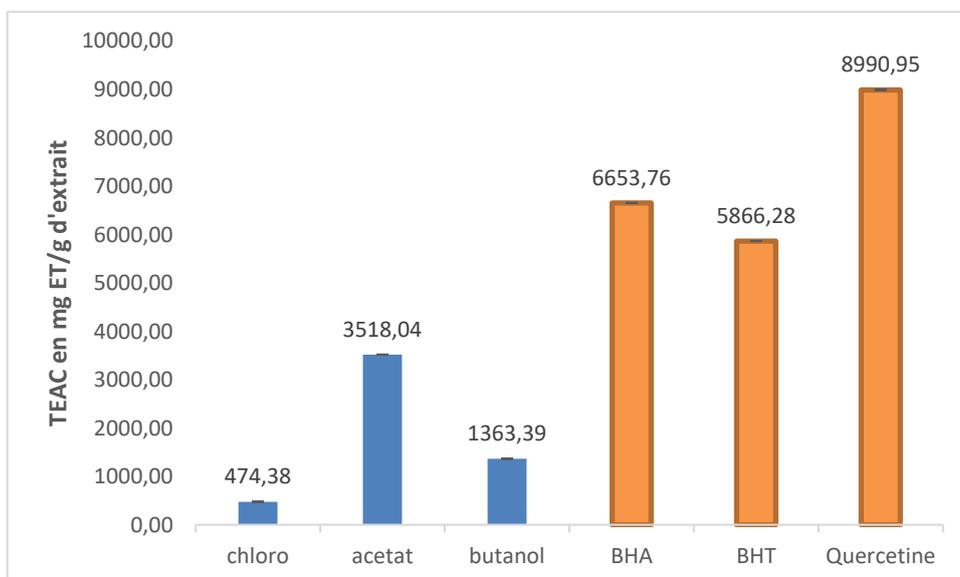


Figure 29. TEAC des fractions chloroforme, acétate d'éthyle, butanol et les standards.

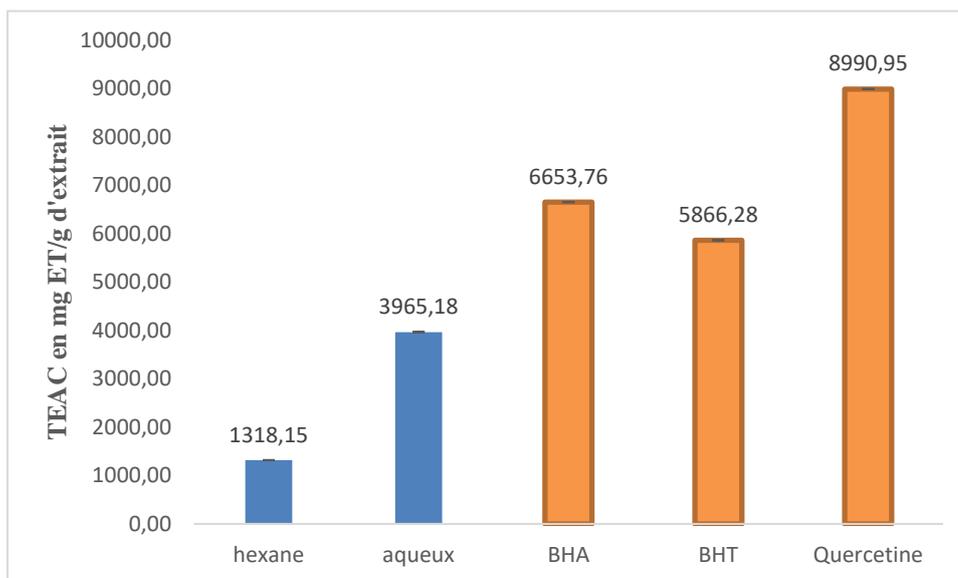


Figure 30. TEAC des fractions d'hexane, aqueuse et les standards.

A une concentration 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ et d'après les résultats obtenus (**figure 29, 30**), parmi les fractions, celui qui a présenté une activité anti radicalaire importante vis-à-vis le radical ABTS^+ est l'acétate d'éthyle avec 3518.04 ± 1.94 mg ET/g d'extrait, suivie par la fraction du butanol avec $1363,39 \pm 1.53$ mg ET/g d'extrait, puis la fraction du chloroforme avec 474.38 ± 0.79 mg ET/g d'extrait. Tandis que à une concentration plus élevée de 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$, les fraction aqueuse et d'hexane présentent des activité anti radicalaire 3965.18 ± 2.08 mg ET/g d'extrait et 1318.15 ± 0.65 mg ET/g d'extrait respectivement ce qui correspond à une activité plutôt faible vue la concentration élevée utilisée pour le calcul des TEAC.

Les standards qui ont été utilisé présentent des activité anti radicalaire plus importante vis-à-vis le radical ABTS^+ , l'activité de nos fractions reste faible par rapport à ces standards.

Il existe une bonne corrélation entre l'activité antiradicalaire d' ABTS^+ et les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes totaux et en flavonols des fractions de notre plante (R^2 0.91-0.74 -0.59), mais cette corrélation est négative avec les teneurs des fractions en triterpènes ($R^2 = -0.66$).

Ceci nous permet de déduire que la capacité inhibitrice de radical ABTS^+ est due à la participation des polyphénols et flavonoïdes dont leurs concentrations élevées se trouve dans les fraction d'acétate d'éthyle et butanol et la faible activité inhibitrice peut expliquer selon (Popovici et *al.*, 2009) par la grande hétérogénéité structurale des composés phénoliques qui se traduit par des différences dans leurs propriétés antioxydante.

Les flavonoïdes avec des groupes hydroxyles libres agissent comme des piègeurs des radicaux libres, et les multiples groupes d'hydroxyles, en particulier dans le cycle B renforcent leur activité antioxydante (l'activité efficace du don d'hydrogène est principalement due à l'ortho- di hydroxylation sur l'anneau B) (Pokorny *et al.*,2000).

6.3 Activité antioxydante total (TAC)

Les résultats sont exprimés en microgramme equivalent d'acide ascorbique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAA}/\text{mg}$ d'extrait). Il son calculé en utilisant la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (**figure 31**).

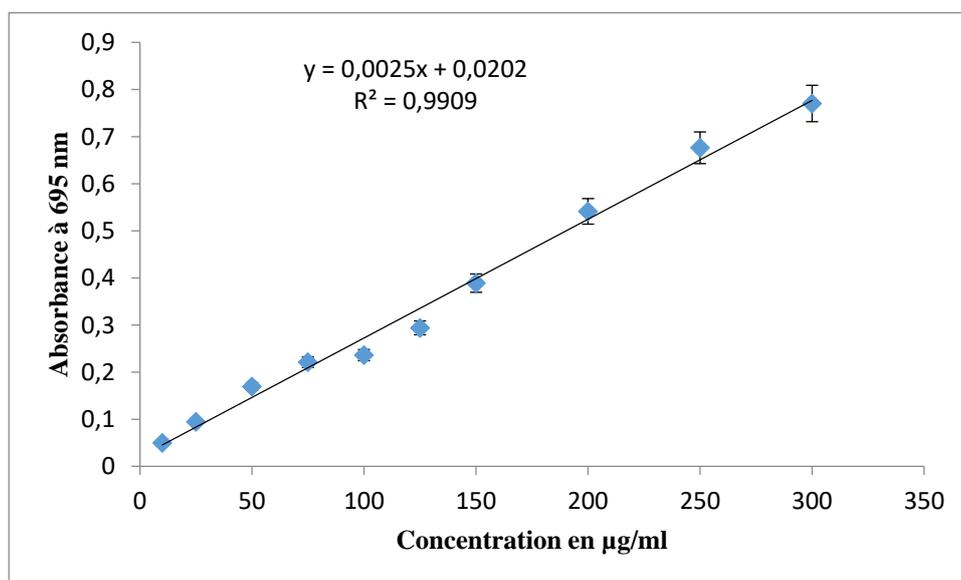


Figure 31. Droit d'étalonnage d'acide ascorbique.

Les résultats obtenus de l'activité antioxydante total des différentes fractions d'extrait des graines *Bunium bulbocastanum* sont montré dans la (**figure 32**).

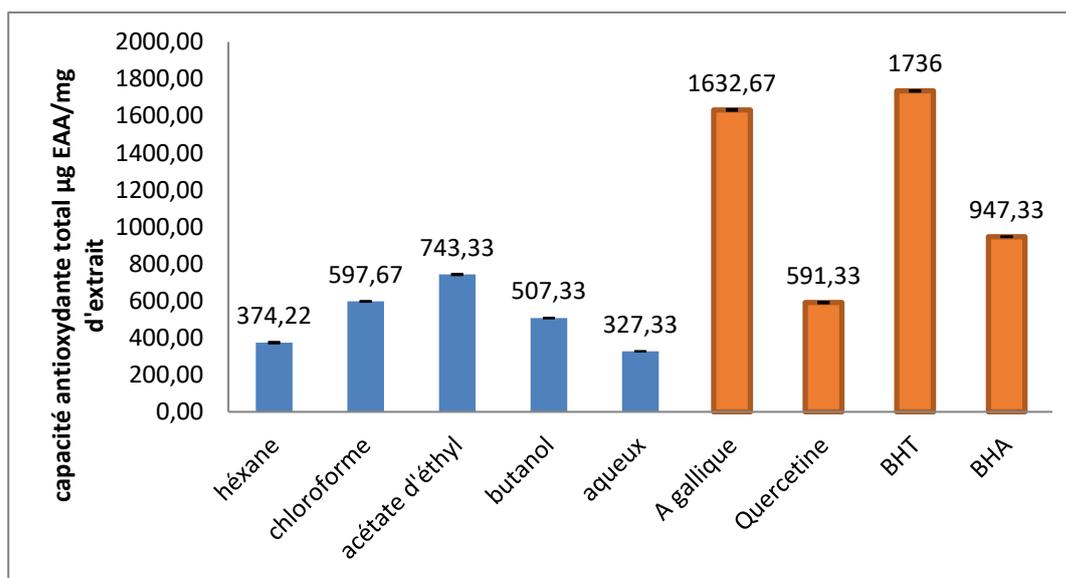


Figure 32. Les TAC des fractions des graines de *Bunium bulbocastanum* L et les standards utilisés.

Les résultats montrent que la fraction d'acétate d'éthyle possède la activité antioxydante total (TAC) la plus important avec $743.33 \pm 3.46 \mu\text{g EAA} / \text{mg d'extrait}$, suivi par la fraction du chloroforme avec une TAC $597.67 \pm 2.30 \mu\text{g EAA} / \text{mg d'extrait}$, puis la fraction butanolique avec une TAC $507.33 \pm 2.63 \mu\text{g EAA} / \text{mg d'extrait}$, la fraction d'hexane possède une TAC $374.22 \pm 3.65 \mu\text{g EAA} / \text{mg d'extrait}$, tandis que la plus faible TAC correspond la fraction aqueuse $327.33 \pm 1.96 \mu\text{g EAA} / \text{mg d'extrait}$.

On remarque que contrairement aux autres tests, les fraction apolaires (Hexane, chloroforme) et à polarité moyenne (A. Ethyle) possède une meilleur TAC que les fractions polaires (Butanol et aqueuse). La vitamine E est un contributeur majeur à la capacité antioxydante liposoluble globale dans les extraits de graines, comme pour les extraits liposolubles des feuilles de la plante. D'autres composés qui pourraient contribuer à la capacité antioxydante totale des lipides comprennent les caroténoïdes, les flavonoïdes et les dérivés de l'acide cinnamique (Prieto et *al*, 1999).

Les standards utilisés possèdent des activités antioxydante total différentes. Le standard BHT ayant la meilleur TAC d'ordre $1736 \pm 4 \mu\text{g EAA} / \text{mg}$, suivie par l'acide gallique avec une TAC $1632.67 \pm 4.61 \mu\text{g EAA} / \text{mg}$, suivie par le BHA avec une TAC d'ordre $947.33 \pm 2.30 \mu\text{g EAA} / \text{mg}$, la quercétine possède la TAC la plus faible $591.33 \pm 4.16 \mu\text{g EAA} / \text{mg}$.

Par comparaison de CAT de nos fractions et celle des standards les fractions d'acétate d'éthyle et du chloroforme présente une meilleur CAT par rapport au standard quercétine.

Selon les résultats de (Jung et *al.*,2011) qui ont travaillé sur la plante *Apium graveolens* et utilise el standard BHT, la fraction aqueuse présente une capacité antioxydante total supérieur à celle de la fraction d'acétate d'éthyle, ces résultats sont à l'inverse de ce que nous avons obtenu pour ces deux fractions.

En établissent la relation entre les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes, en flavonols et en triterpènes et la capacité antioxydante total, nous montrons qu'il y'a une relation faible entre les teneurs en triterpènes et la capacité antioxydante total ($R^2 = -0,18$), mais cette relation est moyenne avec les teneurs des fractions en flavonols et flavonoïdes avec $R^2 = 0,65$, $R^2 = 0,61$ respectivement. Tandis que la capacité antioxydante total est bien liée avec les teneurs des fractions en polyphénols totaux $R^2 = 0,75$.

Il existe une forte corrélation entre les teneurs totales en composés phénoliques et les flavonoïdes et la capacité antioxydante total des extraits végétaux, les flavonoïdes peuvent participer aux mécanismes de don d'hydrogène, d'élimination des radicaux et des chélation des métaux comme dans d'autre composé phénolique, la position et le nombre des groupes d'hydroxyle des flavonoïdes renforcent leur activité antioxydante (Pokorny et *al.*,2000).

Conclusion

Conclusion

Depuis l'antiquité les plantes font partie de la vie de l'homme ; dans leur nourriture ou leur utilisation thérapeutique. Les plantes médicinales constituent une source très importante des molécules qui ayant des activités biologiques intéressent.

Dans les dernières années des études approfondies ont été réalisées sur les composés d'origines végétaux, qui sont présentés des intérêts particuliers sur le plan pharmacologique et cosmétiques ...

L'extraction et le fractionnement des graines de *Bunium bulbocastanum* a été permis d'obtenir des rendements différents dont le plus élevé est celle de fraction aqueuse (74.64 %), alors que le plus faible rendement correspond la fraction d'acétate d'éthyle, cette fraction malgré son faible rendement elle présente une grande richesse en polyphénol totaux ($318.13 \pm 6.11 \mu\text{g EAG/ mg d'extrait}$) et en flavonoïdes totaux ($24.83 \pm 0.03 \mu\text{g EQ/mg d'extrait}$). Tandis que les fractions d'hexane et le moins riche en polyphénols totaux et celle du chloroforme est le plus pauvre en flavonoïdes totaux.

En plus les résultats de dosage de flavonols montrent que la fraction butanolique est le plus riche avec une teneur $79.64 \pm 1.35 \mu\text{g ER/ mg d'extrait}$, et la faible teneur en flavonol est présentée dans la fraction aqueuse.

Les résultats de dosage de triterpènes révèlent que la fraction d'hexane est la plus riche en triterpènes avec une teneur $490.99 \pm 3.07 \mu\text{g EAU/mg d'extrait}$ et la fraction aqueuse est la moins riche en triterpènes.

Dans tous les tests que nous avons utilisés pour l'évaluation de l'activité antioxydante des graines *Bunium bulbocastanum* la fraction d'acétate d'éthyle présente toujours l'activité la plus puissante de même dépasse celle de standard quercétine dans les tests CAT par une CAT $743,33 \pm 3.46 \mu\text{g EAA/mg d'extrait}$.

Les résultats de notre étude permettent de conclure que les graines de *Bunium bulbocastanum* constituent une très bonne source naturelle des agents antioxydants qui peuvent être utilisés dans le traitement de stress oxydatifs. Les résultats obtenus dans cette étude peuvent être approfondis par d'autres études afin de :

- Evaluer d'autres activités comme : antimicrobiennes, antivirales....
- Réaliser des tests *in vivo* pour évaluer certaines activités thérapeutiques (activité antidiabétique, anti-inflammatoire, ...)

Références bibliographique

Références bibliographiques

« *A* »

- 1) Abeddou F.2015. Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes sahariennes *Rumex vesicarius* L.et *Avillea radiata* Coss et Dur. Thèse doctorat en biologie cellulaire et biochimie. Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen Algérie,144 p.
- 2) Agarwal S.G., Vashst V. N., Atal C. K. 1974. Terpènes and other components from *bunium cylindricum* seeds. *Phytochemistry* 13 : 2024-2025.
- 3) Ammor K., Bousta D., SanaeJ., Chaqroune A., Mahjoubi F.2017. Total Polyphenol Content and Antioxidant Power of *Ammi visnaga* from Morocco. *Der Pharma Chemica*, 9(4) : 73-78.
- 4) Appendino G., Cetin. O. H., Jakupovic J.1994. Prenylated isocoumarins from *bunium paucifolium*. *Phytochemistry* 36 : 531-532.
- 5) Athemna S., Chalghem I. A., Laouar K., Laroui S et Khebri S.2010. Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Science Journal* 11 (1) : 69-81.
- 6) Athmouni K.2015. Effect of solvent polarity on the content of biomolecules and antioxidant activity of *Thapsia garganica* (Apiaceae). *Algerian Journal of Natural Products* 3(3) :194-208.

« *B* »

- 7) Balasundram N., Sundram K., Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products : Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99(1) :191-203
- 8) Bekara A. 2017.Evalauation de l'effet thérapeutique de l'extrait aqueux d'anis vert (*Pimpinella anisum* L) chez les jeunes rats exposés à l'acétate de la plomb pendant la gestion et la lactation : étude neurocomportementale et évaluation de la statut oxydatif. Thèse de doctorat en biochimie appliquée. Université Ahmed ben Bella, Oran-Algérie,123p.
- 9) Belyagoubi N.2011. Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse doctorat en biologie. Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen Algérie,109 p.
- 10) Bendiabdellah A., Dib M. A., Meliani N., Djabou N., Allali H and Tabti B.2012. Preliminary phytochemical screening and antioxidant activities of solvent extracts from *Daucus crinitus* Desf., from Algeria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02 (07) : 92-95

- 11) Boizot N., Charentier J.P. 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier ; INR-Amélioration, génétique et physiologie forestière, laboratoire d'analyse biochimique. Le Cahier des Techniques de l'Inra ,79-82.
- 12) Borg J and Reeber A.2004. Biochimie métabolique. Ellipses, Paris,285p.
- 13) Botineau M.2010.Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Lavoisier. Paris.p.1082.
- 14) Boubekri C. 2014. Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de doctorat en sciences, Université Mohamed Khider – Biskra, Alger, 158 p.
- 15) Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E.2001. Production of plant secondary metabolites : a historical perspective. Review Plant Science 161 : 839–851.
- 16) Botineau M.2010.Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Lavoisier. Paris.p.1082.

« C »

- 17) Cadehas E and Packer L.2002. Hand book of antioxydants second and expanded, p. 4.
- 18) Cakilcioglu U., Khatunb S., Turkoglu I., Haytad S.2011.Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Maden (ElazigTurkey).,Journal of Ethnopharmacology., 137: 469–486.
- 19) Catherine A. Evans R., Nicholas J. M., and George P.1996. Structure-antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, Free radical biology & medicine,20 (7) : 933-956.
- 20) Cespedes C., Sampietro D., Seigler D., Rai M. 2013. Natural antioxydants and biocides from wild medicinal plantes, p. 3.
- 21) Chang H. He and Fan J. P. 2006. "Simultaneous quantification of three major bioactive triterpene acids in the leaves of *Diospyros kaki* by high-performance liquid chromatography method,". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41 (3) : 950–956
- 22) Chevallier A.2001. Encyclopédie des plants medicinale : identification, préparation, soins.p.6.
- 23) Collin S and Crouzet J.2011. Polyphénols et procédés. Lavoisier, Paris.336p
- 24) Couplan F and Styner E.1994. Guide des plantes sauvages comestibles et toxiques. Masson, Paris. pp.119-120
- 25) Cronquist A., 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Ed. Columbia University Press, 1262 p.

« **D** »

- 26) Daoudi A., Sabiri M., M Bammou., Zair T., Ibijbijen J., Nassiri L. 2015. Valorisation des extraits de trois espèces du genre *Urtica* : *Urtica urens* L., *Urtica membranacea* Poiret et *Urtica pilulifera* L. *Journal of Applied Biosciences* 87 : 8094-8104
- 27) Delattre J., Durand G., Jardillier J.C.2003. Biochimie pathologique aspects moléculaires et cellulaires. Flammarion, Paris, p. 60.
- 28) Dif.M. M., Benchiha H., Mehdadi Z., F. Benali-Toumi., M. Benyahia., K. Bouterfas. 2015. Étude quantitative des polyphénols dans les différents organes de l'espèce *Papaver rhoeas* L. *Phytothérapie* 13 :314-319.
- 29) Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N .2005. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97 : 654–660.
- 30) Dupont F and Guignard L.2012. Botanique les familles des plantes. Masson, Paris. 336p.

« **F** »

- 31) Faten R., Ghaffar A and El-Elaimy I.2011. In vitro, antioxidant and scavenging activities of *Hibiscus rosa sinensis* crude extract. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02 (01): 51-58.
- 32) 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.
- 33) Favier A. Stress oxydant et pathologies humaines.2006. *Ann Pharm Fr*, 64 : 390-396.
- 34) Fellah S., Romdhane M., Abderraba. 2008. Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia Officinalis*. L cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. . *Journal de la Société Algérienne de Chimie*, 16(2) : 194-196
- 35) Fontanay S.2012. Complexation de triterpènes penta cycliques par des cyclo dextrines Caractérisation physicochimique et activités biologiques. Université de Lorraine
a. France,287p
- 36) François M., Donatien K., Amadou D., Rachid S., Chafique Y. 2009. Phytochemical Composition and Antioxidant Capacity of Three Malian Medicinal Plant Parts. *Journal CAM* P122-126.

« G »

- 37) Ghedira K. 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* 4 ,162-169.
- 38) Giancarlo S., Rosa L.M., Nadjafi F., Francesco M.2006. Hypoglycaemic activity of two spices extracts : *Rhus coriaria* L. and *Bunium persicum* Boiss. *Natural Product Research : Formerly Natural Product Letters*, 20:(9), 882-886.

« H »

- 39) Hajjaj G. 2017. Screening phytochimique, étude toxicologique et valorisation pharmacologique de *Matricaria chamomilla* et de l'*Ormenis mixta*. (Asteraceae). Thèse de doctorat en Sciences du Médicament. Université Mohammed V Rabat,167p
- 40) Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul F.2004. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie* 1 : 3-6.
- 41) Huang W., Zhong C.Y., Zhang Y.2009. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants : Potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer* 62(1), 1–20.
- 42) Hygerman A. E and Larry G. B. 1988. Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *Journal of Chemical Ecology* 15(6) : 1795-1810.

« J »

- 43) Jassbi A. R., Mehrdad M., Soleimani M., Mirzaeian M., and Sonboli A.2005. Chemical composition of the essential oils of *Bunium elegans* and *Bunium caroides*. *Chemistry of Natural Compounds* 41 (4), 415-416.
- 44) Jauzein P.2011. Flores des champs cultivés. Quae, Paris, p. 503.
- 45) Jung W.S., Chung I.M., Kim S.H., Kim M.Y., A. Ahmad and N Praveen. 2011. In vitro antioxidant activity, total phenolics and flavonoids from celery (*Apium graveolens*) leaves. *Journal of medicinal plants research* 5 (32) : 7022-7030.

« K »

- 46) Khalfallah A., Berreha D., Kabouche A., Karioti A., Bilia A. R., and Zahia Kabouche.2014. Flavonoids, antioxidant and antibacterial activities of *eryngium triquetrum*. *hemistry of Natural Compounds* 50 (1) : 115-116.
- 47) Khan I., Ahmad H., Ali N., Ahmad B and Tanoli H.2013. Screening of *Bunium bulbocastanum* for antibacterial, antifungal, phytotoxic and haemagglutination activities. *Pakistan. Journal. Pharmacy. Sciences* 26 (4) : 787-791.

« L »

- 48) Lariushin B.2012. *Apiaceae Family* : vol.2. pp. 127,132.
- 49) Lefahal M., Zaabat N., Djarri L., Benahmed M., Medjroubi K., Laouer H., Akkal S.2017. Evaluation of the antioxidant activity of extracts and flavonoids obtained from *Bunium alpinum* Waldst. & Kit. (Apiaceae) and *Tamarix gallica* L. (Tamaricaceae). *Pharmacy and Medical Sciences* 30 : 5-9.
- 50) Lutge U ; Kluge M, Bauer G. (2002). *Botanique 3^{ème} Ed* : Technique et documentation. Lavoisier, Paris. p211.

« M »

- 51) Macheix J., Fleuriet A., Jay C. 2005. Les composés phénoliques des végétaux, un exemple des métabolites secondaires. *Collection Biologie*, pp.1,11.
- 52) Mahmoudi S., Khali M., Mahmoudi N .2013. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Revue Nature & Technologie* 09 : 35-40.
- 53) Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L.2004. Polyphénols: food sources and bioavailability. *American Journal Clinical Nutriment* 79 :727-47.
- 54) Manchado P. S and Cheynier V.2006. *Les polyphénols en agroalimentaire*. Lavoisier, Paris.398 p.
- 55) Marc F., Davin A., Deglène.B.L., Ferrand C., Baccaunaud M., Fritsch P. 2004.Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Médecine Sciences* ; 20 (4) : 458-63.
- 56) Markham KR.,Andersen O. 2006. *Flavonoids, Chemistry Biochemistry and Applications* London: Academic Press. 1199p.
- 57) Marouf A and Reynaud J. 2007. *La botanique d'A à Z : 1662 définitions*. Dunod, Paris. 352p.

- 58) Mbaebie B, Edeoga H, Afolayan A. 2012. Phytochemical analysis and antioxidant activities of aqueous stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. *Asian Pac J Trop Biomed* 2 :118–24.

« N »

- 59) Niede A. J. C. F., Pirson L., Edelberg H., Miranda L.M., Loira-Pastoriza C., Preat V., Larondelle Y., and André C.M. 2017. Pentacyclic triterpene bioavailability : an overview of in vitro and in vivo studies. *Molécules* 2-24.

« O »

- 60) Oktay M., Gulcin I., Kufrevioglu I. 2002. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *U.-Technol.* 36 : 263–271.
- 61) Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reactions : antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan. Journal Nutriment.* 44 : 307–315.

« P »

- 62) Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. 2000. Antioxidants in food Practical applications p 48,160.
- 63) Popovici C., Saykova I., Tylkowski B. 2009. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4 : 25-39.
- 64) Prieto P., Pineda M., Aguilar M. 1999. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry* 269:337–341.

« Q »

- 65) Quezel P., Santa S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II, Centre National de la Recherche Scientifique. 1170p

« R »

- 66) Ramonatxo C. K. 2006. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. Nutrition clinique et métabolisme 20 : 165–177.
- 67) Re R., Pellegrini N., Proteggebnte A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.1999.
a. Antioxydant activity applying an improved ABTS radical cation décolorations
b. assay. Sci. Inc. 26 : 1231–1237.
- 68) Richter G.1993.Métabolismes des végétaux : physiologie et biochimie, pp.288,300,322,377.

« S »

- 69) Sun H., Shuo W.F., Wang Z, and Hu C.2006. Structure-activity relationships of oleanane- and ursane type triterpenoids. Botanical Studies 47 : 339-368.
- 70) Sharififar F., Yassa N., and Mozaffarian V.2010. Bioactivity of major components from the seeds of *bunium persicum* (boiss.) fedtch. Pakistan. Journal. Pharmacy. Sciences 23 (3) : 300-304
- 71) Singleton, V.L. and Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and viticulture 16 : 144-158.
- 72) Sun H., Shuo W.F., Wang Z, and Hu C.2006. Structure-activity relationships of oleanane- and ursane type triterpenoids. Botanical Studies 47 : 339-368

« T »

- 73) Teuscher E., Anton R., Lobstein A. 2004. Plantes aromatiques : Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Lavoisier, Paris. p. 215.

« W »

- 74) Wojdylo A., Oszmian´ski J , Czemerys R.2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry 105 : 940–949

« Z »

- 75) Zhao H., Dong J., Lu J., Chen J., Li Y., shan L., Lin Y., Fan W., and Gu G.2006. Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and Selectivity for free phenolic compounds in barley *Hordeum vulgare* L. J. Agric. Food Chemistry 54 : 7277–7286

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة لبذور نبتة الكمون الأسود (*Bunium bulbocastanum*) نبات يستعمل في الطب التقليدي). مكن استخلاص هذه البذور بواسطة المذيبات المتزايدة القطبية من الحصول على مردود مختلف حيث كان اعلى مردود للمستخلص المائي % 74.60. مستخلص خلات الاثيل هو الاكثر احتواء على عديدات فينول $318.13 \pm 6.11 \mu\text{g EAG/mg d'extract}$ و الفلافونيدات $24.83 \pm 0.03 \mu\text{g EQ/mg d'extract}$

التحليل الكمي للفلافونول في مختلف المستخلصات بين ان مستخلص البوتانول هو الاكثر غنا $79.64 \pm 1.35 \mu\text{g ER/mg d'extract}$ في حين لوحظ ان كمية التريترپان الاوفر في مستخلص الهكسين $490.99 \pm 3.07 \mu\text{g EAU/mg d'extract}$.

في جميع الاختبارات المضادة للأكسدة المستخدمة (Pouvoir réducteur, ABTS, CAT) كان مستخلص خلات الاثيل الافضل حيث تجاوز quercétine في اختبار CAT بقيمة $743.33 \mu\text{g EAA/mg d'extract}$.

الكلمات المفتاحية *Bunium bulbocastanum* L, النشاط المضاد للأكسدة, البوليفينول, الفلافونويد, الفلافونول, التريترپان, ABTS, Pouvoir réducteur, CAT

Résumé

Le but de cette étude est l'évaluation de l'activité antioxydante de graines de *Bunium bulbocastanum* L (plante utilisée dans la médecine traditionnelle). L'extraction et le fractionnement des graines de cette plante par des solvants organiques à polarité croissante donnent des rendements différents dont le plus élevé a été obtenu par la fraction aqueuse (70.64%). La fraction d'acétate d'éthyle contient les valeurs les plus élevées en polyphénols totaux ($318,13 \pm 6,11 \mu\text{g EAG/mg d'extract}$) et en flavonoïdes totaux ($24,83 \pm 0,03 \mu\text{g EQ/mg d'extract}$)

L'analyse quantitative de flavonol dans les différentes fractions montre que la fraction butanolique contient la teneur la plus importante $79,64 \pm 1,35 \mu\text{g ER/mg d'extract}$. Tandis que la teneur la plus élevée en triterpènes a été observée dans la fraction d'hexane $490,99 \pm 3,07 \mu\text{g EAU/mg d'extract}$. La fraction d'acétate d'éthyle indique la meilleure activité antioxydante dans tous les tests utilisés pour ce but (pouvoir réducteur, ABTS, CAT), cette activité antioxydante est supérieure à celle de standard quercétine dans le test CAT par un CAT $743,33 \pm 3,46 \mu\text{g EAA/mg d'extract}$

Mots clés: *Bunium bulbocastanum*, activité antioxydante, polyphénols, flavonoïdes, flavonols, triterpènes. Pouvoir réducteur, ABTS, CAT

summary

The aim of this study is the evaluation of the antioxidant activity of *Bunium bulbocastanum* L seeds (plant used in traditional medicine). The extraction and fractionation of the seeds of this plant by organic solvents with increasing polarity, give different yields, the highest of which was obtained by the aqueous fraction (70.64%). The fraction of ethylacetate contains the highest values of total polyphenols ($318.13 \pm 6.11 \mu\text{g EAG / mg of extract}$) and total flavonoids ($24.83 \pm 0.03 \mu\text{g EQ / mg of extract}$)

The quantitative analysis of flavonol in the different fractions showing that the butanolic fraction contains the highest content $79.64 \pm 1.35 \mu\text{g ER / mg of extract}$. While the highest content of triterpenes was observed in the hexane fraction $490.99 \pm 3.07 \mu\text{g EAU / mg of extract}$. The fraction of ethylacetate indicates the best antioxidant activity in all tests used (reducing power, ABTS, CAT), this antioxidant activity is higher than that of standard quercetin in the CAT test by CAT $743.33 \pm 3.46 \mu\text{g EAA / mg of extract}$.

Key words: *Bunium bulbocastanum*, antioxidant activity, polyphenols, flavonoids, flavonols, triterpenes. Reducing power, ABTS, CAT