



Université Mohamed Khider 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

Filière : sciences biologiques

Réf:...../2018

UNIVERSITE
DE BISKRA

Mémoire de master

Spécialité Biochimie Appliquée

Présentée et soutenu par :

BELHADJ Hanane

Le : 26 juin 2018

Évaluation de l'effet antioxydant de l'extrait acétonique de *Pergularia tomentosa in vitro*

Jury :

Dr : DJOUAMA Manel

MAA Université de biskra

Président

Dr : SAIDI Asma

MAA Université de biskra

Rapporteur

Dr : DHIMAT Abdelouahab

MAA Université de biskra

Examineur

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur **Mdm : Saidi A**, son précieux conseil et son aide durant toute la période du travail.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail Et de l'enrichir par leurs propositions.

Enfin, nous tenons également à remercier (youcef, Riad, chaima, Samih, Hayat....) et toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Dédicace

C'est avec l'aide et la grâce du dieu que j'ai achevé ce modeste travail que je dédie :

A mes très chers parents,

Pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,

A mes chères sœurs

Fatima, khalida, soumia, khadidja, nousyba et surtout me âme sœur souadet leurs enfants Taha, Oussama, Abd Ellah, Billel, pour leurs encouragements pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,

A mes chers frères,

Hesen, Hassan, Hammadi, Ahmed, Djamel et surtout youssouf et leurs femmes, pour leur appui et leur encouragement

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire

A mes chères amies

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous être pour moi des sœurs et des amies qui je peux compter

Asma, Kinza, Aicha, yasmine, Aicha, Roukaya, Amira, Amel, Ines, Narimene

Liste des abréviations

Liste des abréviations

CAT	Catalase
EC ₅₀	Concentration effective qui réduit 50 % du Fe ²⁺
GPx	Glutathion peroxydase
IC ₅₀	Concentration inhibitrice de 50 % du radical DPPH
EAG	Equivalent d'acide gallique
EQ	Equivalent de quercétine
EC	Equivalent de catéchine
EAc	Extrait acétonique
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
LDL	Lipoprotéine de basse densité
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
SOD	Superoxyde dismutase

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1.Représentation schématique du stress oxydant.....	1
Figure 2.Photo de <i>pergularia tomentosa</i>	6
Figure 3. Protocole d'extraction acétonique de <i>pergularia tomentosa</i>	13
Figure 4. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.....	21
Figure 5. Courbe d'étalonnage de quercetine.....	21
Figure 6. Courbe d'étalonnage de la catéchine.....	21
Figure 7. Activité anti-radicalaire de l'acide gallique et la quercetine vis-à-vis du DPPH.....	23
Figure 8.Activité anti-radicalaire de l'extrait acétonique de <i>P.tomentosa</i> vis-à- vis du DPPH.....	23
Figure 9.Pouvoir reducteur engendré par l'EAc de <i>P.tomentosa</i>	25
Figure 10.Pouvoir reducteur engendré par l'acide gallique.....	25
Figure 11.Pouvoir reducteur engendré parla quercétine.....	25
Figure 12.Réduction de Phosphomolybdate par l'acide ascorbique.....	26

Liste des Tableaux

Liste des Tableaux

Tableau 1. Equations correspondant à la production d'espèces réactives de l'oxygène.....	3
Tableau 2. Sources des antioxydants.....	5
Tableau 3. Enquêtes ethnobotaniques réalisées sur <i>P. tomentosa</i>	8
Tableau 4. Screening phytochimique d'extrait acétonique de <i>P. tomentosa</i> ..	18
Tableau 5. Teneur en métabolites secondaires de l'extrait acétonique du <i>P. tomentosa</i>	20
Tableau 6. IC ₅₀ enregistrées par l'acide gallique, la quercétine et le volume de l'EAc de <i>P. tomentosa</i> correspond à cette concentration.....	24

Table des matières

Contenu

Remerciements.....	
Dédicace.....	
Liste des abréviations.....	
Liste des Figures	
Liste des Tableaux	
Introduction générale	
Chapitre I	
I. stress oxydant	8
I.1. ERO et leur production	9
I. 2. Conséquence des ERO sur les macromolécules cellulaires	10
I.3. Implications pathologiques du stress oxydant	11
I.4. Antioxydants	12
Chapitre II.	
II.1. <i>Pergularia Tomentosa</i> L.....	13
II.1.1 Description et classification botanique	13
II.1.2. Usages traditionnels	14
II.1.3. Composition chimique	15
II.1.4. Activités biologiques du <i>Pergularia tomentosa</i>	15
II .2. Métabolites secondaires à base de plantes.....	16
II.2.1. Polyphénols.....	16
II. 2.2 Activités biologiques des polyphénols.....	17
Chapitre III.....	
Matériels et Méthodes	
III.1 Matériel	19
III.1.1. Matériel végétal	19
III.1.2. Produits chimiques	19
III.2. Méthodes	19
III.2.1. Préparation de l'extrait acétonique	20
III.2.2. Screening phytochimique de l'extrait acétonique	20
III.2.3 Quantification des métabolites secondaires du <i>P. tomentosa</i>	21

III.2.4 Evaluation des activités antioxydantes de l'EAC du <i>P. tomentosa</i>	22
Chapitre IV.....	
Résultats et discussion	
IV.1 Extraction.....	24
IV.2.Screening phytochimique de l'extrait acétonique du <i>P. tomentosa</i>	24
IV.3.Quantification des métabolites secondaires du <i>P. tomentosa</i>	25
IV.4 Evaluation des activités antioxydantes <i>in vitro</i> de l'EAC du <i>P.tomentosa</i>	28
IV.4.1 Activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical DPPH.....	28
IV.4.2 Test du pouvoir réducteur.....	30
IV.4.3 Test de molybdate phosphate	32
Conclusion	34
Référence bibliographie	37
Résumés	

Introduction

Introduction générale

Introduction générale

En effet, les plantes médicinales représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui révèlent une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un large spectre d'activités biologiques et des vertus thérapeutiques. Cependant, l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études. Aujourd'hui les principes actifs à base de plantes sont des composants essentiels d'une grande partie de nos médicaments et produits de soins (Flans, 2007). Malgré les multiples progrès de la médecine moderne, il y a un net regain d'intérêt vis-à-vis de la phytothérapie. Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), plus de 80% de la population mondiale ont recours à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de la santé (Farnsworth *et al.*, 1986).

Toutefois, nos cellules convertissent également une partie de l'oxygène moléculaire apporté lors de la respiration en des espèces réactives, radicalaires ou non, communément appelées espèces réactives oxygénées, les ERO. Ces dérivés oxygénés très instables et très réactives sont parfois toxiques. En effet, le stress oxydant est défini comme un déséquilibre, à l'origine de nombreux facteurs endogènes et exogènes, entre la production de ces espèces et leur destruction par les systèmes antioxydants (Favier, 2003).

En raison de leur capacité à altérer les macromolécules telles l'ADN, les protéines et les lipides, les ERO semblent être les responsables d'endommager les cellules, les tissus et les organes, ils sont impliqués alors dans un grand nombre de pathologies, tant aiguës que chroniques (Fu *et al.*, 1995; Cadet *et al.*, 1999).

La recherche des principes actifs, à activité antioxydant, extraits de plantes est donc d'intérêt capital qui a permis la découverte de nouveaux remèdes thérapeutiques. C'est dans ce cadre que nous avons opté d'étudier l'une des espèces qui appartient à la famille des asclépiadacées, le *Pergularia tomentosa* L. Récoltée à partir de la région Bourj El-nouse (wilaya de Biskra) qui est très répandue en médecine folklorique dans les zones arides et semi-arides.

Ce travail a pour but de valoriser la plante *P. Tomentosa* et donc pour objectif général d'analyser son contenu en métabolites secondaires, en appliquant différents

Introduction générale

tests de criblage phytochimie et de dosage. L'activité antioxydant de partie aérienne de cette plante a été également évaluée dans la présente étude.

En effet notre étude est répartie en trois parties:

➤ Dans la première partie de ce manuscrit, une étude bibliographique est effectuée sur:

- Le stress oxydatif et les systèmes antioxydants

-La description de la plante, sa composition et son usage.

- les métabolites secondaires à base de plants et leurs d'activités pharmacologiques

➤ Dans la deuxième partie expérimentale, nous avons envisagé la matériel utilisé et les différentes méthodes effectuées.

➤ La troisième partie est consacrée à la représentation des résultats obtenus lors cette étude et à la discussion.

Chapitre I : stress oxydant

I. stress oxydant

Stress oxydant a défini comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression associée aux espèces réactives d'oxygène (ERO), suite à un déséquilibre lié (Figure 1), soit à une production accrue de ces espèces, soit à une diminution de la capacité de défenses antioxydants (Sies, 1991). Le stress oxydant active des voies de signalisation intracellulaire, impliquant des protéines et des facteurs de transcription et l'expression des gènes, avec des conséquences sur la croissance, la prolifération et l'apoptose cellulaires (Favier, 2003 ; Benaïssa, 2012).

En effet, Ces gènes sont également impliqués dans les processus inflammatoires, créant donc un lien direct entre le stress oxydant vasculaire et la réaction inflammatoire chronique, qui caractérise nombreuses pathologies et des affectations comme l'athérosclérose, allant jusqu'au cancer (Benaïssa, 2012). Parmi les dérivés oxygénés ERO, les radicaux libres constituent des espèces chimiques possédant un électron célibataire sur leur couche périphérique, ce qui leur confère un fort degré de réactivité. Ils ont été longtemps considérés comme nuisibles, responsables de potentiels dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides (Harman, 1956).Ceux-ci sont alors considérés la cause direct qui peut induit certaines maladies ou ils contribuent au moins aux complications de la plupart des affectations pathologiques (Favier, 2003 ; Benaïssa, 2012).

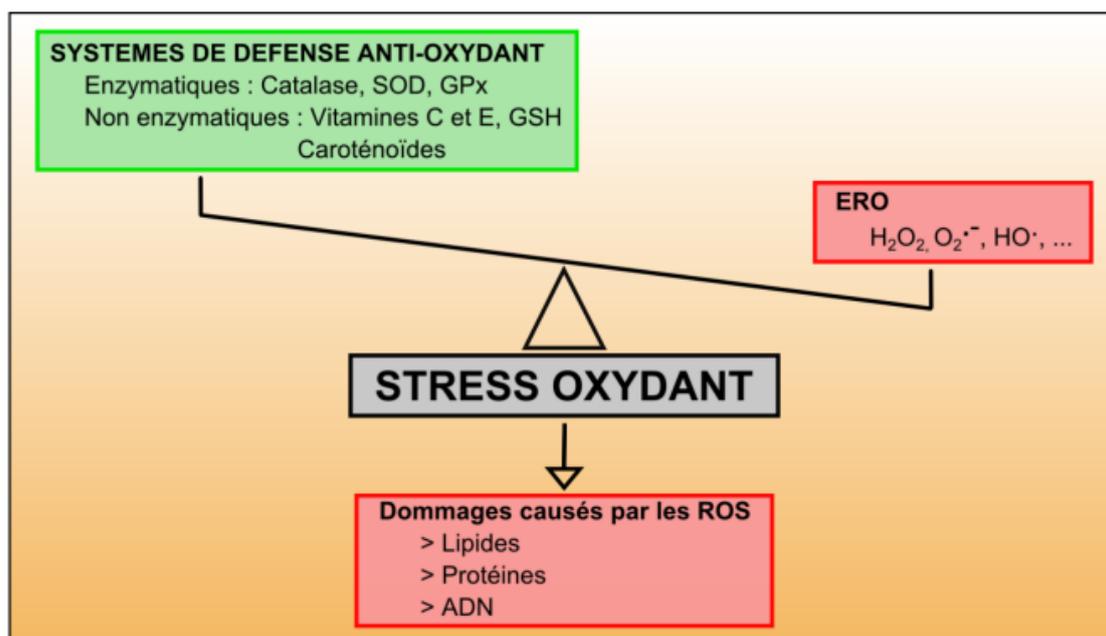


Figure 1. Représentation schématique du stress oxydant (Alexis, 2014).

I.1. ERO et leur production

L'oxygène est un gaz indispensable à la vie mais il peut être toxique par lui-même et par la formation de radicaux libres, lors de réduction le dioxygène peut conduire à des dérivés réactifs (Figure 2), les radicaux oxygénés libres, dont leurs précurseurs sont l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$, et son acide conjugué tels le radical hydroxyle OH° et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (saulnier *et al.*, 1995).

Lors de la respiration, le dioxygène se réduit en eau à la fin de la chaîne respiratoire mitochondriale, par un ou deux électrons, mais aucun intermédiaire moléculaire ou radicalaire ne devrait sortir. Or il se produit des fuites de radicaux $O_2^{\circ-}$ (tableau 1. Eq 1) qui sortent dans le cytosol, correspondant à 1 à 2 % du dioxygène respiré (Radi, 2004 ; (Barouki, 2006) ; De Mel *et al.*, 2011). Cependant, cette espèce radicalaire peut jouer le rôle du précurseur qui s'implique dans les différentes voies de production d'autres espèces d'ERO. En effet, ces entités radicalaires et moléculaires sont beaucoup plus réactives que l'oxygène qui leur a donné naissance (Guichard *et al.*, 2006)

Par ailleurs, la NADPH oxydase est exprimée par la plupart des cellules immunitaires, ainsi que la NOSs, sont des enzymes catalysant la réduction nanoélectronique de l'oxygène (eq5), en utilisant le NADPH, NAD, ou FAD comme donneur d'électron, ce qui favorise la génération des anions superoxyde (Guichard *et al.*, 2006).

La xanthine oxydase (XO) est une enzyme qui utilise l'oxygène moléculaire comme un accepteur d'électrons en produisant l' $O_2^{\circ-}$ au cours de l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique selon l'équation 6 (O'Mahony *et al.*, 2013).

Le peroxyosome est une source importante dans la production cellulaire d' H_2O_2 , cet organite contient de nombreuses enzymes générant d' H_2O_2 (eq 7) (Sandalio *et al.*, 2013).

Les ions métalliques, comme le fer et le cuivre sous leurs formes réduites, ils transforment l' H_2O_2 en OH° , est dite réaction de Fenton comme dans l'équation 8 (Fontaine, 2007 ; Cotticelli *et al.*, 2013).

Stress oxydant

Finalement, la pollution, le tabagisme, l'alcoolisme, la prise des contraceptifs, l'exposition prolongée au soleil ou à des radiations, la pratique du sport de haut niveau et l'inflammation chronique sont des sources exogènes provoquant la génération des ERO (Benaissa, 2012).

Tableau1. Equations correspondant à la production d'espèces réactives de l'oxygène.

Eq 1	$O_2 + e \longrightarrow O_2^{\circ-}$
Eq 2	$O_2^{\circ-}, 2H, e \longrightarrow H_2O_2$
Eq 3	$H_2O_2 + e \longrightarrow OH^{\circ} + OH^-$
Eq 4	$OH^{\circ} + e \longrightarrow OH^-$
Eq 5	$NADPH + 2 O_2 \longrightarrow NADP^+ + 2 O_2^{\circ-} + H^+$
Eq 6	$Xanthine + 2 O_2 + 2 H_2O \longrightarrow Acide\ urique + O_2^{\circ-} + 2H^+$
Eq 7	$2 O_2^{\circ-} + 2 H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$
Eq 8	$H_2O_2 + Fe^{+2} \longrightarrow OH^{\circ} + OH^- + Fe^{+3}$

I. 2. Conséquence des ERO sur les macromolécules cellulaires

Une accumulation d'ERO est extrêmement délétère pour la cellule et peut entraîner des dommages irréversibles sur les biomolécules comme l'ADN, les lipides, les protéines et les glucides (Fu *et al.*, 1995; Cadet *et al.*, 1999).

Les dommages oxydatifs que subit le génome mitochondrial, par exemple, entraînent une dysfonction des protéines impliquées dans le transfert d'électrons de la chaîne respiratoire. Ces modifications aboutissent à une diminution des capacités de la mitochondrie à produire de l'ATP et également une augmentation de la production d'ERO due au ralentissement de la chaîne respiratoire. Les ERO sont également impliquées dans la régulation de l'expression de gènes où l' H_2O_2 peut induire l'activation de NF- κ B, un facteur de transcription impliqué dans de nombreux

Stress oxydant

processus cellulaires tels l'inflammation, la prolifération cellulaire irrégulière ou même l'apoptose (Zhou *et al.*, 2001).

L'oxydation des protéines sous l'effet des radicaux libres contribue à des modifications de carbonylation au niveau d'acides aminés (Grune *et al.*, 2001), aboutissant à une dénaturation associée à la perte de fonction des protéines. En effet, ces protéines oxydées ne peuvent pas être réparées mais elles sont dégradées par le protéome (Rossi *et al.*, 2008). En outre, les chaînes polyinsaturées des acides gras des membranes sont la cible des ERO qui la peroxydation lipidique. Cela a pour conséquence une diminution de la fluidité membranaire, une augmentation de la perméabilité et enfin cela peut conduire des dommages au niveau des protéines membranaires (Richter, 1987).

I.3. Implications pathologiques du stress oxydant

Le stress oxydant et ses produits toxiques seraient responsable de l'apparition de nombreuses pathologies au cours du vieillissement (Brieger *et al.*, 2012), particulièrement, les ERO sont impliqués dans des plusieurs affectations comme les maladies cardiovasculaires, le diabète, les troubles neurologiques, la maladie de Parkinson, les cancers ... etc . (Maggio *et al.*, 2006).

En outre, la production de ERO est important dans le muscle lors d'un exercice de contraction aussi bien lors d'inactivation ou immobilisation (Reid *et al.*, 1992; Kondo *et al.*, 1993). En effet, certaines études menées à la fois sur l'animal et sur l'homme ont montré que l'immobilisation peut s'associer également aux dommages oxydatifs dans les fibres musculaires et que cela conduit à une atrophie musculaire (Kondo *et al.*, 1993; Dalla Libera *et al.*, 2009). Parfois, l'augmentation des dommages oxydatifs conduit à une diminution de la capacité de contraction du muscle associée à du déclin du muscle squelettique, ce qui conduit à une sarcopénie (Pansarasa *et al.*, 2000; Fanò *et al.*, 2001).

I.4. Antioxydants

Les antioxydants peuvent être des enzymes ou de simples molécules. Certains sont produits par l'organisme, ce sont les antioxydants endogènes, ou proviennent de l'alimentation ou la médication, et sont donc exogènes (Salvayre R *et al.*, 2003).

Stress oxydant

Tableau1 : les systèmes de défense antioxydants endogènes et exogènes.

Source	Système antioxydant	Action	Références
Endogène	Enzymatique		
	SOD	Elles catalysent la dismutation d'anion Superoxyde en eau oxygénés. $2 H^+ + 2 O_2^{\circ-} \rightarrow H_2O_2 + O_2$	(Hattori I <i>et al.</i> , 2003)
	GPx et TPx	Elles impliquent dans la réduction des Peroxydes comme l' H_2O_2 au niveau de mitochondrie et cytosol $2 GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2 H_2O$	(Arthur, 2000)
	CAT	Elle catalyse la réaction de détoxification du H_2O_2 au niveau des globules rouges et du Foie $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$	(Hattori I <i>et al.</i> , 2003)
	non enzymatique		
	Glutathion	réparation des protéines oxydées et peut aussi interagir de manière spontanée avec les ERO.	(Zhang and Forman, 2012).
	Ac. Urique	Est un piègeur d' $O_2^{\circ-}$, des radicaux peroxydes et hydroxyles (RO_2° et HO°).	
	Protéines plasmatiques	diminuent le taux des ions métalliques libres en les complexant (diminution de leur pouvoir oxydant)	Adman P et Candeias, 1996)
Exogène	Vitamines C ou acide ascorbique	L'anion ascorbate est capable de piéger des radicaux libres (majoritairement l' $O_2^{\circ-}$)	(Vertuani S <i>et al.</i> , 2004)
	Vitamines E	est un inhibiteur de la propagation radicalaire, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO_2°	
	Polyphénols		
	AC. Phénoliques	ont une bonne activité antioxydante.	(Kochetova M V <i>et al.</i> , 2007)
	Flavonoïdes	permettent de réduire le taux de cholestérol (LDL)	(Anderson J W <i>et al.</i> , 1991)
Tanins	une activité antioxydante très puissante due au piégeage de $O_2^{\circ-}$ grâce aux différents groupes phénoliques.		

**Chapitre II: *Pergularia*
tomentosa L.**

II.1. *Pergularia Tomontosa* L

II.1.1 Description et classification botanique

Pergularia tomentosa L. (Asclepiadacée) est une plante herbacée ou semi-ligneuse, arbrisseau vivace pouvant dépasser 1m d'hauteur. Les jeunes rameaux volubiles s'enroulent fréquemment autour des plus anciens lui donnant un aspect touffu (Schmelzer et Gurib-Fakim, 2013). La tige couverte de courts poils verdâtres, grimpante ou volubile, tomenteuse à l'état jeune alors que ses feuilles opposées verdâtre sont ovales ou arrondies, en cœur à la base, caractérisée par l'absence des stipules et pétiole de 0,5 à 1,5cm de long (Schmelzer et Gurib-Fakim, 2013). En printemps, les fleurs, qui sont bisexuées, régulières et parfumées, se fleurissent en grappes abondantes au bout de longs pédoncules, alors que les graines de 7-9 mm sont ovoïdes, aplaties, à poils courts denses. Cependant, les fruits, composés de deux follicules, portent de petites pointes (Chehema, 2006).



Figure 2. *Pergularia tomentosa* L. (Originale).

Chapitre II : *Pergularia tomentosa*

Systématiquement, la plante est classifiée comme suivant :

Embranchement : Spermaphytes

Sous Embranchement: Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Rosidae

Ordre : Gentianales

Famille : Asclepiadaceae

Genre : *Pergularia*

Espèce : *Pergulariatomentosa* L.

II.1.2. Activités biologiques du *Pergularia tomentosa*

La plante *P. tomentosa* semble posséder nombreuses activités biologiques telles l'activité anti tumorale. En effet, des glycosides cardénolides isolée des racines de *P. tomentosa* ont été testés dans un essai *in vitro* d'inhibition de la croissance de souches cancéreuses. Cela comprenait six différentes lignées cellulaires humaines de cancer, et pour leur capacité à inhiber la Na⁺/K⁺-ATPase (Piacente *et al.*, 2009). En outre, des effets antifongiques ont été montrés chez les extraits aqueux et à plusieurs solvants organiques des feuilles, des tiges et des racines contre une série de champignons pathogènes comme *Aspergillus Niger*. Les travaux effectués par Hussein *et al.*, 1999 et par Bekheet *et al.*, (2011) ont reporté que cette plante s'avère un agent molluscicide.

II.1.3. Usages traditionnels

P. tomentosa possède un large spectre d'utilisations en médecine traditionnelle. Le **tableau 2** représente les principales enquêtes ethnobotaniques réalisées sur cette espèce, en précisant l'origine géographique, la partie utilisée son usage et la mode d'utilisation.

Chapitre II : *Pergularia tomentosa*

Tableau 2. Enquêtes ethnobotaniques réalisées sur le *P. tomentosa*.

Région	Partie utilisée	Mode d'utilisation	Usages	Références	
Sahara septentrional	Feuilles et fleurs	Décoction	Angine, teigne, dermatose	Ould El hadj <i>et al.</i> , (2003)	
Algérien	Partie aérienne	décoction	hypoglycémiant	Kemassi <i>et al.</i> , (2014)	
Tassili N' aiier	Racine	Usage intene	Les frissons, Bronchite, Contipation,	Hammiche et Maiza, (2006)	
	Partie airienne		Décoction et usage interne		Helminthiases abortive
			Décoction et usage externe		dermatose Allergie
Mauritanie	/	/	Morsures Venimeuses Tuberculose	Hmeyada, (2009).	
Afrique du Nord	/	/	Avortement	Schmelzer et Gurib-fakim, (2013)	
Sahara central	/	/	La tuberculose Et les hémorroïdes		
Cote d'ivoire	Feuille	Jus	Collyre, les maux De tête.		
Milieu rural	/	/	Tannerie		

II.1.4. Composition chimique

Les études phytochimiques menées sur le *Pergularia tomentosa* montrent la richesse de cette plante en métabolites primaires et particulièrement en métabolites secondaires (Hassan *et al.*, 2007; Hifnawy *et al.*, 2014). En effet, *P. tomentosa* est connu par son contenu en molécules biologiquement actives notamment les polyphénols tels que les flavonoïdes, les saponines, les tanins, les glycosides cardiaques et des glycosides cyanogènes (Hassan *et al.*, 2007). Toutes les parties de la plante sont, de ce fait, des sources importantes d'hétérosides cardénolides, avec l'uzariénine, la coroglaucigénine et le glucose avec le digitoxose comme sucres (Hifnawy *et al.*, 2014).

L'extrait des tiges du *P. tomentosa* semble contenir des flavanols glycosides, y compris les 3-O-galactoside et 3-O-glucosides de quercétine et Kaempférol, et

malonylhexosides de quercétine, kaempférol et Isorhamnetin. (Heneidak *et al.*, 2006).

En outre, les triterpènes ont été isolés à partir de *P.tomentosa*, Il s'agit de l'acide oléique, (9Z, 12Z) - acide octadecadiénoïque, α -amyrine, le 3-acétyl taraxastérol, le 3-taraxastérol, 16- α -hydroxy taraxastérol-3-acétate, l'acide 3-épi-micromérique, et le (9Z, 12Z) glucoside de l'acide octadecadiénoïque. Pergularine A, pergularine B. (Babaamer *et al.*, 2012). La présence du β -sitostéro glucoside a été également reportée par les études effectuées par Gohar *et al.*, (2000).

II .2. Métabolites secondaires à base de plantes

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités dans les vacuoles de plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles qui sont les polyphénols, les terpènes et les stéroïdes, et les alcaloïdes (Lutge *et al.*, 2002 ; Abderrazak et Joël, 2007).

II.2.1. Polyphénols

Les polyphénols, ces espèces organiques, constituent le groupe le plus vaste de produits phénoliques naturels, résultent du métabolisme secondaire des végétaux, et le plus largement distribué dans le royaume des plantes (Lugasi *et al.*, 2003). Les principales classes de composants phénoliques sont les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, et les coumarines (King et Young., 1999 ; Tapiero *et al.*, 2002).

II.2. 1.1. Les acides phénoliques

Ils sont des composés polyphénoliques non-flavonoïdes qui peuvent être divisés en deux classes principaux, qui sont des dérivés d'acide benzoïque (C6-C1) comme l'acide sinapique et acide férulique, ou de l'acide cinnamique (C6-C3) comme l'acide vanillique, acide gallique (Tsao, 2010).

II.2.1.2 flavonoïdes

Les flavonoïdes sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ces molécules sont les polyphénols les plus abondants de notre alimentation (Bruneton, 1999 ; D'archivio *et al.*, 2007). Ils présentent une structure commune en C6-C3-C6, Deux cycles aromatiques (A et B) sont liés par une chaîne de 3 carbones

formant un hétérocycle oxygéné (C) (Macheik *et al.*, 2006). Les flavonoïdes sont subdivisés en sous-classes selon la structure de l'hétérocycle C. On distingue alors les 4-oxoflavonoïdes (flavones, isoflavones, flavonols et flavanones, les flavanols) et les proanthocyanidines (tanins condensés), les anthocyanes ainsi que des composés plus minoritaires, les chalcones et dihydrochalcones (Crozier *et al.*, 2009).

II.2.1.3 Tanins

Les tanins sont des composés phénoliques solubles ou non dans l'eau, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, capable de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les protéines (Peronny, 2005). On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs deux groupes basés sur des différences structurales : les tanins hydrolysables et les tanins non hydrolysables (Fiorucci, 2006)

II. 2.2 Activités biologiques des polyphénols

II.2 .2.1 Activité antioxydant

Cette activité est, sans nul doute, celle qui caractérise le mieux les polyphénols, particulièrement les flavonoïdes. En effet, de nombreuses revues leur confèrent le rôle d'excellents piègeurs d'espèces réactives directement issues de l'oxygène (O_2° , HO° , NO° , H_2O_2) provenant de biomolécules telles que les lipoprotéines, les protéines et les acides oligonucléiques (ADN, ARN). Cette faculté, tant étudiée et si reconnue, est fréquemment citée comme étant une clé pour la prévention et/ou la réduction du stress oxydatif en lien direct avec des maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, la carcinogénèse et les maladies neurodégénératives. Les radicaux libres seraient aussi impliqués dans le processus de vieillissement (Quideau *et al.*, 2011)

II.2.2 .2 Activités antimicrobienne

Les phénols jouent un rôle de protection des plantes contre les invasions microbiennes, et présentent d'autres mécanismes d'action de lutte contre les champignons, bactéries et virus. Ces propriétés antifongiques et antivirales trouvent de nombreuses applications en médecine humaine (Xia *et al.*, 2011).

II.2.2.3 Activité anti-inflammatoire

L'action des flavonoïdes d'un extrait de citron sur la perméabilité membranaire fut le premier effet pharmacologique connu de ces composés, il y a plus de 50 ans (Sartorithiel, 2003). Les études sur les flavonoïdes issus de plantes utilisées traditionnellement restent encore très répandues car, bien que l'inflammation soit un

Chapitre II : Pergularia tomentosa

phénomène normal d'autodéfense de l'organisme contre des blessures, les conflits auto-immuns, où en cas allergiques (Benavent-Garcia et Castillo, 2008 ; Conforti *et al.*, 2008). Dans la famille des stilbènes, le resvératrol, a montré des propriétés anti-inflammatoires *in vivo* et *in vitro*. Les recherches se tournent actuellement vers la synthèse de produits à base de resvératrol dans le but de diminuer l'utilisation de médicaments synthétiques (Udenigwe *et al.*, 2008).

En outre, la consommation des polyphénols favorise la protection contre les altérations cardiaques et vasculaire. En effet, au niveau des artères, ces molécules préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) évitant ainsi l'athérosclérose (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

Partie expérimental

Chapitre III : matériel et méthodes

III.1 Matériel

III.1.1. Matériel végétal

La récolte de *Pergularia tomentosa* L. a été fait au mois de décembre 2017, de la région de Bordj Ennouse (commune d'El-Hajeb, wilaya de Biskra), l'espèce étudiée a été identifier par Dr. Salem-Cour N. (Centre de recherche scientifique et technique des régions arides - Biskra). La partie aérienne, constituant des petites tiges, les feuilles et les fleurs, est nettoyée des impuretés et séchées à l'ombre dans un endroit sec et à température ambiante pendant quelques jours et ensuite stockée à température ambiante dans des sacs foliacés jusqu'à son utilisation.

III.1.2. Produits chimiques

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, qui sont de analytique et provenant de Sigma et biocham. Parmi ces produits :Acide sulfurique (H_2SO_4), acide chlorhydrique (HCl), Folin-Ciocalteu, Acide Gallique, Catéchine, Acide Ascorbique (vitamneC), Quercétine, ferricyanide de potassium $K_3Fe(CN)_6$, trichloracétique (TCA), chlorure ferrique ($FeCl_3$), 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle (DPPH), méthanol, Acétone, trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), Phosphate sodique monobasique, Phosphate sodique bibasique, Carbonates de sodium, Vanilline, Acide chlorhydrique, magnésium, formaldéhyde, acétate de sodium, sodium monobasique et molybdate d'ammonium.

III.2. Méthodes

III.2.1. Préparation de l'extrait acétonique

Extraite acétonique (EAc) de *Pergularia tomentosa* a été préparé selon la méthode d'extraction effectuée par Senthikumar *et al* (2005) sur 100g de la partie aérienne de cette plante. Brièvement, la matière végétale a subi une macération dans de l'acétone 10% (w: v) sou agitation douce à température ambiante pendant 48h. Après filtration du mélange sous vide, le filtrat a soumis à l'évaporation sous pression (rota vapeur, Heidolph, Jermeny) afin d'éliminer le solvant résiduel. Dans une ampoule à décanter, l'extrait récupéré est ensuite subi la décantation, en ajoutant l'éther de pétrole afin d'éliminer des résidus lipidique indésirables. La phase acétone est ensuite subi l'évaporation afin de récupérer finalement un extrait EAc verdâtre qui est conservé à $-4^{\circ}C$ jusqu'à l'utilisation.

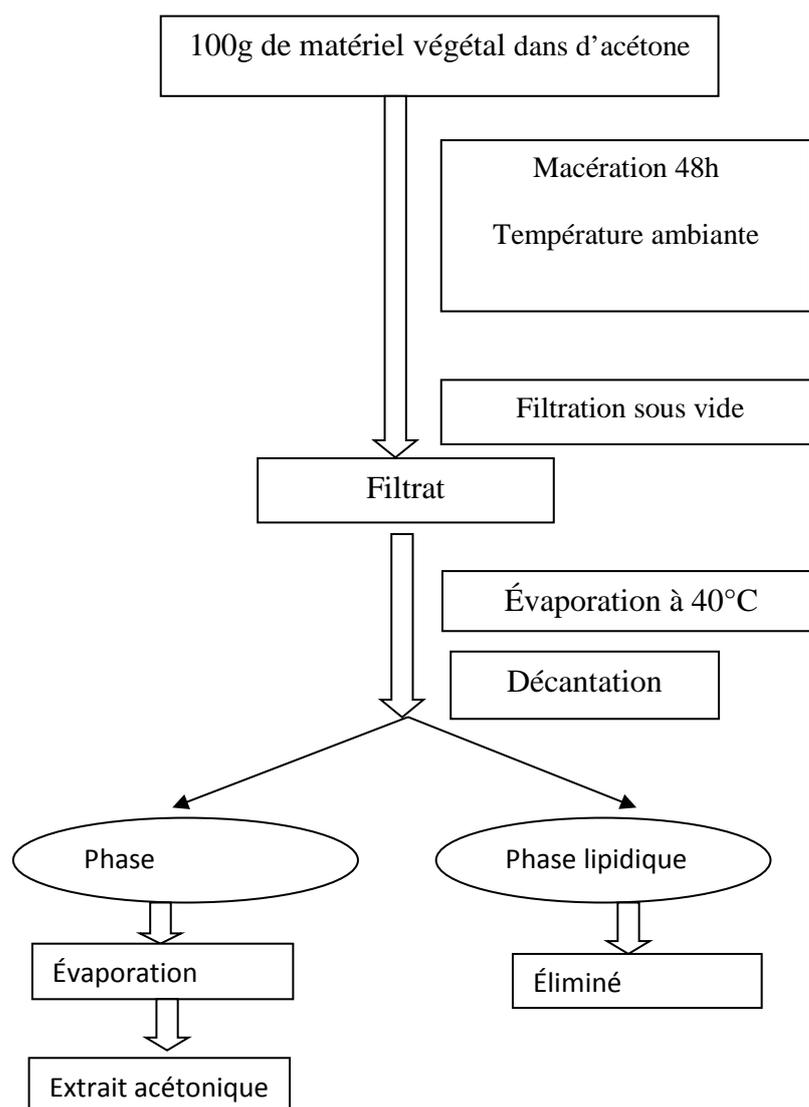


Figure 3. Protocole d'extraction acétonique de la partie aérienne de *Pergularia tomentosa* (Senthikumar *et al.*, 2005).

III.2.2. Screening phytochimique de l'extrait acétonique

III.2.2.1. Caractérisation des polyphénols

La réaction au chlorure ferrique (FeCl_3) nous permet de caractériser la présence de polyphénols dans un extrait. Une goutte de solution méthanolique de FeCl_3 à 2% a été ajoutée à 2ml d'extrait acétonique de *Pergularia tomentosa*. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée est le signe de la présence de polyphénols (N'Guessan *et al.*, 2009).

III.2.2.2. Caractérisation des flavonoïdes (Test de Shibata ou Shinoda test)

La présence des flavonoïdes dans l'extrait acétonique de *P. tomentosa* a été mise en évidence par la réaction à la cyanidine (Ciulel, 1982). En effet, les flavonoïdes sont

Matériels et méthodes

responsables d'un dégagement d'hydrogène et de l'apparition d'une coloration allant de l'orangé au rouge pourpre, en présence d'acide chlorhydrique concentré et de magnésium (Hadj-Salem, 2009). Une quantité de 0.5g d'extrait a été dissoute dans 1.5ml du méthanol (50%) et chauffé dans un bain d'eau bouillante. Un volume de 5ml d'HCl et quelques fragments de magnésium ont été ensuite ajoutés. Après dégagement d'hydrogène par réduction des flavonoïdes aglycones en anthocyanes, une coloration rouge est obtenue (Aliyu *et al.*, 2011).

III.2.2.3 Caractérisation des Tanins

Une quantité de 2à3 gouttes de FeCl₃ (1%) a été ajoutée à 1ml de l'extrait. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins gallique et au brun verdâtre en présence de tanin catéchiques (Dohou *et al.*, 2003).

Le réactif de Stiansy a été utilisé afin de différencier convenablement entre les tanins galliques et tanins catéchiques. Pour cela, un volume de 15ml du réactif de Stiansy (10ml de formaldéhyde + 5ml d'HCL concentré) a été ajouté à 5ml de l'extrait. Le mélange est incubé au bain-marie à 80°C pendant 30min. l'observation d'un précipité engros flocons reflète la présence des tanins catéchique. Pour les tanins galliques, la solution précédente a été filtrée, et le filtrat recueilli est saturé d'acétate de sodium. L'addition de 3 gouttes de FeCl₃ provoque l'apparition d'une coloration bleu-noir intense, indique la présence de tanins galliques (N'Guessan *et al.*, 2009).

III.2.3 Quantification des métabolites secondaires du *P. tomentosa*

III.2.3.1 Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux de l'Extrait EAc de *P. tomentosa* a été quantifiée selon la méthode décrit par Slinkaret Singleton (1977) avec le réactif Folin-Ciocalteu. 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu (10%) a été ajouté à 200µl d'extrait ou d'acide phénolique, utilisé comme standard à différentes concentrations. Après 4 min, 800µl d'une solution de carbonate de sodium (75mg/ml) sont additionnés. Après 2h d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été lue à 765 nm (JENWAY 6300 spectrophotomètre). Le contenu de l'extrait en polyphénols totaux a été estimée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (5-100µg/ml) et il est exprimé en microgramme équivalent d'acide gallique/milligramme d'extrait (µg EqAG/mg d'extrait).

III.2.3.2 Dosage des flavonoïdes

Matériels et méthodes

Le dosage des flavonoïdes d'extrait acétonique de la partie aérienne du *pergularia tomentosa* a été effectué selon la méthode du trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ (Bahorun *et al.*, 1996). Cette méthode se base sur une réaction entre le trichlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène de groupement hydroxyle présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes, entraînant la formation d'un complexe à coloration jaunâtre (Lagnika, 2005).

Un volume de 1ml d'extrait acétonique solubilisé dans du méthanol ou de quercétine, flavonoïde standard utilisé à différentes concentrations, a été mélangé avec 1ml d' $AlCl_3$ 2% (w:v). Après 10min d'incubation, l'absorbance est mesurée à 430nm. La teneur de l'extrait en flavonoïdes est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie par la quercétine de 2 à 16 $\mu\text{g/ml}$. Elle est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine /milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait).

III.2.3.3 Dosage des tanins condensés

Sous l'effet de la vanilline, les tanins présents dans un extrait végétal se transforment en anthocyanidols de couleur rouge spécifique (Sun, 1998). Un aliquote de 250 μl d'extrait acétonique ou catéchine est alors additionné à 625 μl vanilline 1% (w: v) et 625 μl de acide sulfurique/Méthanol (50%). Après 15 min d'incubation à une température ambiante, l'absorbance est mesurée à 500nm. Une gamme étalonnage de catéchine (C), de différentes concentrations de 20 $\mu\text{g/ml}$ à 200 $\mu\text{g/ml}$, a été réalisée. La teneur de l'extrait EAc en tanins est alors calculé par extrapolation sur la courbe d'étalonnage de la catéchine et l'équation de régression et elle s'exprime en équivalent de catéchine $\mu\text{g EC/mg}$ d'extrait sec.

III.2.4 Evaluation des activités antioxydantes de l'EAc du *P. tomentosa*

III.2.4.1 Activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical DPPH

Ce test nous permet d'évaluer la capacité d'un extrait à donner d'un atome d'hydrogène ou d'un électron à un radical, il fournit alors une mesure de l'activité antioxydant de piégeage des radicaux libres. En effet, le DPPH est un radical libre de couleur pourpre. Il devient jaune lorsqu'il est réduit.

Selon Cuendet *et al* (1997), avec légère modification, 50 μl de différentes dilutions d'EAc de *Pergularia tomentosa* du standard à activité antioxydant, en utilisant l'acide gallique et la quercétine, ont été mélangés avec 1250 μl d'une solution méthanolique à 0.004% du DPPH. Après une période d'incubation de 30min à

Matériels et méthodes

l'obscurité à température ambiante, l'absorbance des échantillons a été lue à 517nm. Une absorbance plus faible du mélange réactionnel indiquait un effet piègeur plus important du radical DPPH. L'activité anti-radicalaire a été calculée en appliquant la formule suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [(\text{Abs de contrôle} - \text{Abs de test}) / \text{Abs de contrôle} \times 100]$$

III.2.4.2 Test du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur de l'extrait EAc est évalué par la méthode d'Oyaizu (1986). Cet est se repose sur la réaction de réduction du fer ferrique Fe^{+3} présent dans le complexe ferrocyanure de potassium $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ en fer ferreux Fe^{+2} , ce qui s'associe au virage de couleur jaune en vert. Différentes concentration d'extrait ou de l'antioxydant standard (Acide gallique et quercétine) sont additionnés à 2.5ml de tampon phosphate (0.2M, pH 6.6) et 2.5ml de ferricyanide de potassium $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1%).le mélange est incubé à 50°C pendant 20min. Quand, les 2.5ml de trichloracétique TCA (10%) ont été ajoutés, le mélange a subi une centrifugation de 1000rpm/10min à refroidissement (JENWAY 6300 spectrophotomètre). 2.5ml d'eau distillée et 0.5ml de FeCl_3 (0.1%) sont additionnées à 2.5ml du surnageant. L'absorbance est lue à 700 nm contre un blanc contenant tous les réactifs sauf le FeCl_3 .

III.2.4.3 Test de phosphomolybdène

Le potentiel d'extrait EAc de *P. tomentosa* à réduire le phosphomolybdène est évalué par la méthode de Prieto (1999). Cette méthode se base sur la réduction de l'acide phosphomolybdique pour former un complexe bleu de phosphomolybdène par le sulfure de sodium. Le complexe bleu de phosphomolybdène obtenu est oxydé par l'ajout de nitrite, ce qui entraîne une réduction de l'intensité de la couleur bleu.

Préalablement, le réactif de molybdate d'ammonium (0,049g) a été préparé en ajoutant 0,588 ml d'acide sulfurique, et 0,036 g de phosphate de sodium. Un volume final est égale à 10ml a été complété avec de l'eau distillé. Ensuite, 100µl d'EAc (30µl/ml) de la partie aérienne de la plante *Pergularia tomentosa* a été ajouté à 1ml de solution de réactif molybdate. Dans un bain marin à 95°C, le mélange a été incubé pendant 90min. Après incubation, l'absorbance de la solution a été lue à 695nm. L'acide ascorbique à différentes concentrations (10µg/ml à 300µg/ml) a été utilisé comme antioxydant standard. Le potentiel de réduction du phosphomolybdène (PRP)

Matériels et méthodes

d'extrait étudié est exprimé en microgramme d'équivalent d'acide ascorbique par millilitre d'extrait (μg EAA/ml d'extrait).

Chapitre VI : Résultats et discussion

Résultats et discussion

IV.1 Extraction

L'extrait préparé à partir de partie aérienne de *pegularia tomentosa* par choisi une méthode d'extraction permettre d'extraire le maximum de composants bioactifs et les prévenir contre la dénaturation ou les modifications probables. En outre, utilisation un solvant de degré de polarité moyenne afin de séparer et sélectionner les composés phénoliques.

Dans notre cas, avant de procéder à l'extraction, nous avons d'abord séché le matériel végétal à l'air libre et à l'abri de la lumière, afin d'éviter la dégradation de certains composés phénoliques sous l'effet des hydrolases qui peuvent exister dans le matériel végétal frais. Par la suite, la matière sèche retenue est réduite en poudre fine, pour augmenter la surface de contact avec le solvant et améliorer le rendement de l'extraction.

Le rendement obtenu d'EAc égale 2.98% qui caractérisé par un aspect liquide dense et par un couleur vert foncé.

IV.2. Screening phytochimique de l'extrait acétonique du *P. tomentosa*

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de certains métabolites secondaires contenant dans la partie aérienne de *Pergularia tomentosa*. En effet, la détection de ces composés est basée sur des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques (Hamidi, 2012). Les résultats sont représentés dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau3. Screening phytochimique d'extrait acétonique de *P. tomentosa*

	polyphénols	Flavonoïdes	Tanins	
			Cat	Gal
EAc	+	++	+	+

L'étude de criblage phytochimique de l'extrait acétonique de *Pergularia tomentosa* a montré que cette plante est riche en composés phénoliques en particulier les acides phénolique, les flavonoïdes, les tanins galliques hydrolysable et les tanins catéchiques condensés. Ce résultat s'accorde avec celui reporté dans nombreuses études phytochimiques qui ont confirmé la richesse du genre *Pergularia* en ces composés phénoliques (karthishwaran, Mirunalini, 2010; Hosseini Kahnouj *et al.*, 2017 ; Suliman, Yasser, 2017).

Résultats et discussion

S'accorde aussi avec autre étude phytochimique pour *Pergularia demiea* (Bhaskar et Balakrishnan, 2009).

IV.3. Quantification des métabolites secondaires du *P. tomentosa*

Le dosage des phénols totaux dans l'EAc de la partie aérienne de la plante *P. tomentosa* a été effectué par la méthode Slinkar et Singleton (1977) avec le réactif de Folin-Ciocalteu, l'acide gallique est utilisé comme un acide phénolique standard. Le résultat obtenu est exprimé en μg équivalent d'acide gallique par millilitre de l'extrait (μg EAG/ml E). La teneur est alors calculée, en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique ($y = 0.017x - 0.058$) sachant que $R^2 = 0.998$ (Figure 4).

La quantification des flavonoïdes dans l'EAc du *P. tomentosa* a été faite par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium décrite par Bhorun *et al.*, (1996). La quercétine est utilisé comme un flavonoïde standard. La teneur en flavonoïdes de la plante est exprimée alors en μg équivalent de quercétine (EQ) par milligramme d'extrait, en basant sur l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de quercétine ($y = 0.048x - 0.088$), $R^2 = 0.987$ (Figure 5).

L'estimation de la teneur d'EAc du *P. tomentosa* en tanins a été effectuée par la méthode de dosage adaptée par Sun (1998). Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant la catéchine comme standard. Les résultats sont exprimés en microgramme (μg) d'équivalent de la catéchine par millilitre d'extrait (μg EC/ml), à l'aide de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage établie par la catéchine ($y = 0.005x - 0.209$), $R^2 = 0.884$ (Figure 6).

Le tableau 4 représente les teneurs de l'EAc de la partie aérienne de la plante *P. tomentosa* en métabolites secondaires phénoliques. D'après les résultats obtenus, le contenu estimé d'EAc en polyphénols totaux est de l'ordre de 2166.33 ± 0.16 μg EAG/ml d'extrait. De plus, le dosage des flavonoïdes dans l'EAc, nous a permis constater que la partie aérienne de la plante *pergularia tomentosa*, notamment ses feuilles, présente une richesse en flavonoïdes avec une valeur enregistrée de teneur égale à 428.33 ± 0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'extrait. Cependant, cette plante semble posséder une teneur en tanins correspond à la valeur de 800.33 ± 0.08 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Résultats et discussion

Tableau 4. Teneurs en métabolites secondaires de l'extrait acétonique de *P. tomentosa*. Les valeurs représentées sont $m \pm SD$ (n=3).

	Polyphénols ($\mu\text{g EAG/ml E}$)	Flavonoïdes ($\mu\text{g EQ/ml E}$)	Tanins ($\mu\text{g EC/ml E}$)
EAc	2166.33 ± 0.16	428.33 ± 0.03	800.33 ± 0.08

De point de vue comparatif, l'analyse du contenu chimique de l'EAc de la plante *P. tomentosa* a révélé que la présence de tanins dans la partie aérienne est significativement ($p \leq 0.05$) plus importante que celle de flavonoïdes, où la teneur en premiers est deux fois plus élevée qu'aux deuxièmes. Toutefois, cette espèce semble être une source prometteuse des dérivés phénoliques bioactifs.

En outre, sa teneur en composés phénoliques totaux semble être nettement supérieure à celle trouvée par les travaux réalisés par Tlili (2015), sur l'extrait d'acétate d'éthyle de même plante de région Metlili (Ghardaia-Algérie), qui est égale à $46,75 \pm 0,07$ mg EAG/g. Néanmoins, l'étude phytochimique menée par Lahmer *et al.* (2012) sur l'extrait chloroformique de la même espèce a montré que la fraction de chloroforme est plus riche en flavonoïdes au-delà de $33.53 \pm 0,66$ g EQ/100gd'extrait ou de matière végétale utilisée lors l'extraction que notre fraction. Par ailleurs, la quantité de tanins estimée dans la présente étude est largement inférieures à celle enregistrée ($59,27 \pm 0,47$ mg EC/g d'extrait) par l'extrait éthanolique de cette plante récoltée à partir de la wilaya de Ghardaia (Tlili *et al.*, 2018).

En effet, les polyphénols, en particulier les flavonoïdes, constituent une grande famille de métabolites secondaires qui regroupent un large spectre des molécules polaires, à polarité moyenne et à faible polarité (Belboukhari et Cheriti, 2006). La différence constatée alors entre nos résultats et ceux-ci reporté par les autres travaux peut se lier, d'une part, aux propriétés génotypiques de l'espèce *P.tomentosa* elle-même, la période de récolte et les conditions climatiques, et d'une autre part, à la nature chimique et la solubilité de ces espèces chimiques extraites avec les différents systèmes d'extraction utilisés d'acétone, d'éthanol, d'éthyle acétate et de chloroforme (Ozenda, 1958 ; El-Waziry, 2017).

Résultats et discussion

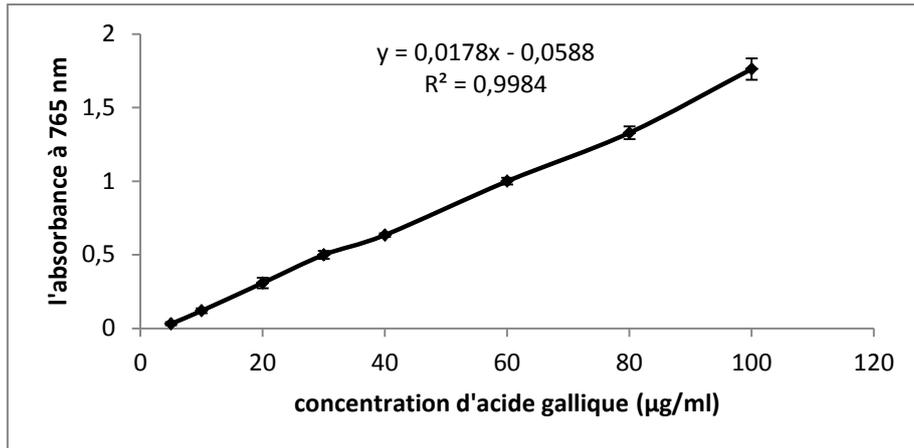


Figure 4. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique $m \pm SD$ (n=3).

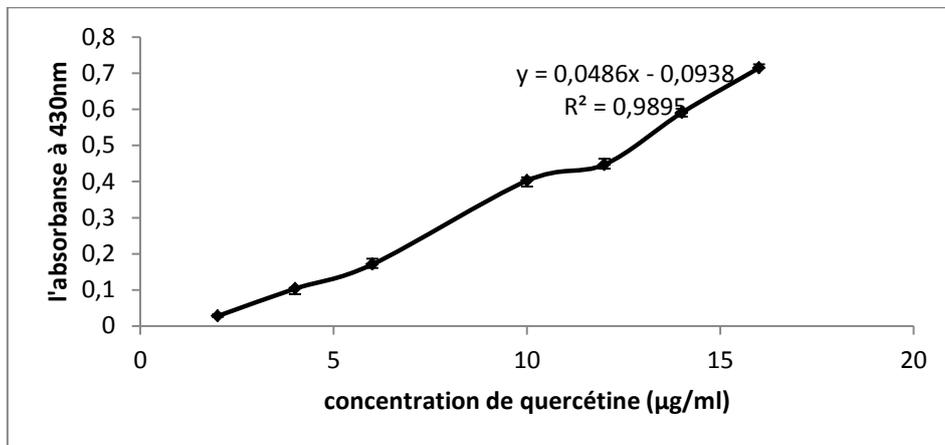


Figure 5. Courbe d'étalonnage de quercétine $m \pm SD$ (n=3).

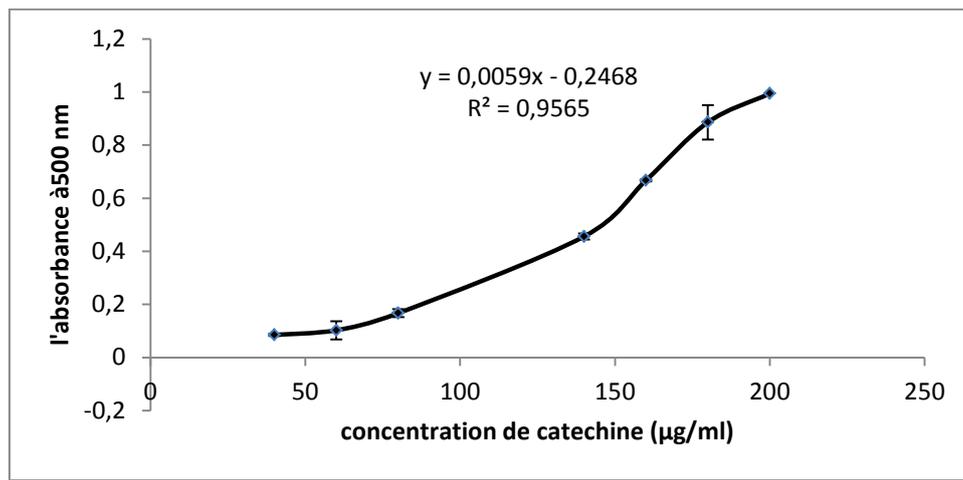


Figure 6. Courbe d'étalonnage de la catéchine $m \pm SD$ (n=3).

Résultats et discussion

IV.4 Evaluation des activités antioxydantes *in vitro* de l'EAc de *P.tomentosa*

IV.4.1 Activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical DPPH

L'effet piègeur de l'extrait acétonique de *P. tomentosa* à différents volumes (10 à 150 μ l) *vis-à-vis* du radical DPPH a été évalué spectro-photométriquement, en suivant la réduction ou le piégeage de ce radical qui s'accompagne d'un virage de sa couleur violette à une couleur jaune mesurable aux alentours de 517 nm.

À partir des valeurs obtenues d'absorbance, nous avons calculé les pourcentages d'activité anti-radicalaire, en appliquant la formule donnée auparavant, contre un contrôle qui ne contient que le radical DPPH dissous dans du méthanol. Le profil d'activité anti-radicalaire obtenu indique que l'EAc (Figure 8) de *P. tomentosa* a exercé, et d'une manière dose dépendante, un effet piègeur important jusqu'à une activité maximale de 67.175% à volume relative à 150 μ l. Cependant, l'acide gallique et la quercétine, à partir d'une concentration initiale égale à 1 mg/ml, sont utilisés à différents volumes comme des agents phénolique antioxydants standards. En effet, ils ont montré un effet maximal de 96.66% et de 94.320% à partir d'une concentration de 0.32 mg/ml et de 0.2 mg/ml qui correspondent, respectivement, aux volumes 640 μ l et 400 μ l en vers le radical DPPH (Figure 7).

La valeur de concentration inhibitrice IC_{50} ou du volume d'un composé, qui fournit une réduction de 50% du radical DPPH, est inversement liée à la capacité anti-radicalaire de celui-ci (Boumarfegue *et al.*, 2012). L'ensemble des valeurs d' IC_{50} déterminées pour l'extrait acétonique de *P. tomentosa* et pour les phénols standards utilisés, à activité antioxydant, ont été représentées dans le Tableau 6.

En comparaison aux antioxydants standards, l'EAc testé s'avère significativement ($p \leq 0.05$) très actif sur le radical DPPH, avec une IC_{50} correspond à un volume égal à 150 μ l qui fait piéger d'environ 50% de cette espèce radicalaire. En effet, l'acide gallique constitue un excellent antioxydant avec une valeur moindre de IC_{50} de l'ordre de 0.044 ± 0.004 mg/ml, par rapport à celle engendrée par la quercétine (0.065 ± 0.008 mg/ml) qui semble être statistiquement ($p \leq 0.01$) un antioxydant puissant que l'EAc.

Une étude antérieure effectuée par Suliman et Yasser (2017) a démontré que l'extrait d'acétate d'éthyle de l'espèce *P. tomentosa* renferme une activité anti-radicalaire important (3.34 mg/ml).

Résultats et discussion

La détermination des coefficients de corrélation entre les IC_{50} et le contenu en polyphénols a montré l'existence d'une corrélation négative significative. Ce qui se traduit par des activités antioxydants très élevées autrement dit une capacité de piégeage importante des radicaux libres dans les extraits riches en polyphénols.

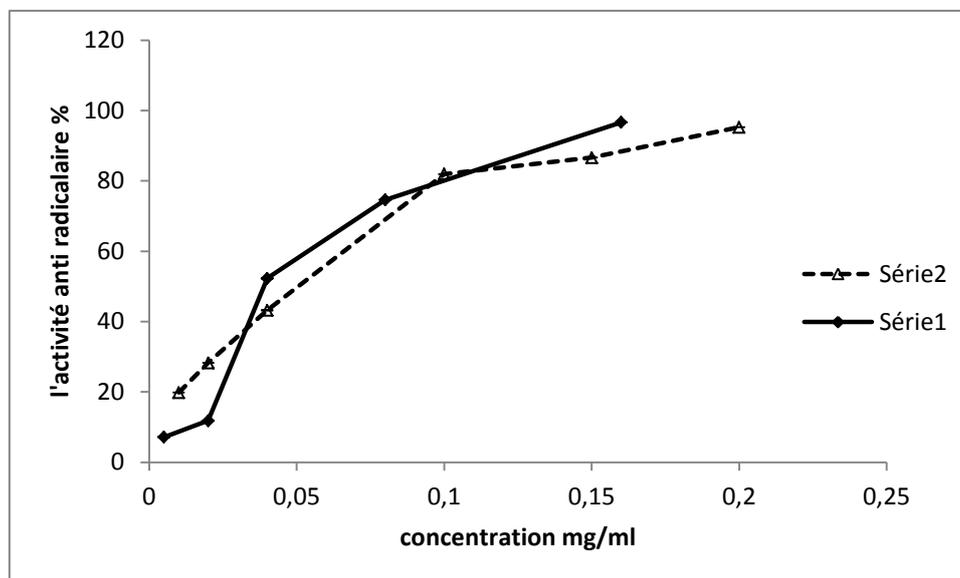


Figure 7. Activité anti-radicalaire de l'acide gallique et la quercétine vis-à-vis du DPPH ($m \pm SD$) en triplicata.

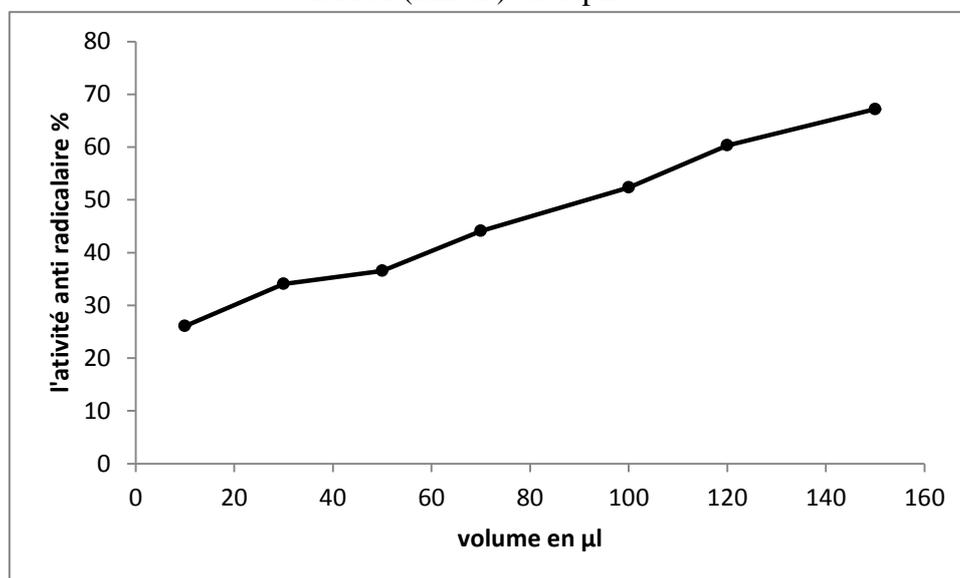


Figure 8. Activité anti-radicalaire de l'extrait acétonique de *P. tomentosa* vis-à-vis du DPPH ($m \pm SD$) en triplicata.

Résultats et discussion

Tableau.6 IC₅₀ enregistrées par l'acide gallique, la quercétine et le volume de l'EAc de *P. tomentosa* correspond à cette concentration (m±SD) en triplicate.

	EAc de <i>P. tomentosa</i> (μ l)	Acide gallique (mg/ml)	Quercétine (mg/ml)
IC ₅₀	70.436±1.436	0.044 ± 0.004	0.065 ±0.008

IV.4.2 Test du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur de l'EAc de la plante étudiée à différents volume (10 à150 μ l) a été alors évalué en appliquant la méthode adoptée par Oyaizu (1986), l'acide gallique et la quercétine à différents volumes, préparés d'une solution à concentration initiale de 1 mg/ml, sont employés comme des réducteurs phénoliques de référence.

En effet, Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe⁺³ en fer ferreux Fe⁺² où la puissance de réduction des métaux de transition est l'un des mécanismes antioxydants et le test du pouvoir réducteur est l'un des indicateurs significatifs du potentiel antioxydant d'une substance (Wang *et al.*, 2008).La capacité réductrice de l'extrait est exprimé en microgramme (μ g) équivalent d'acide gallique et quercetine par microlitre d'extrait, μ g d'EAG ou d'EQ / μ l d'extrait correspond à l'absorbance 0,5 à 700nmOyaizu (1986).

Les résultats obtenus ont révélé que l'extrait acétonique de *P.tomentosa* a réduit le fer ferrique d'une manière dose-dépendante (Figure.9). En effet, le pouvoir, quel présente l'EAc, atteint son maximum à un volume moindre de 150 μ l. Toutefois, l'acide gallique et la quercetine ont montré une activité réductrice maximale à partir d'une très faible concentration égale à 25 et 50 μ g/ml, respectivement (Figure. 10 et 11).

Résultats et discussion

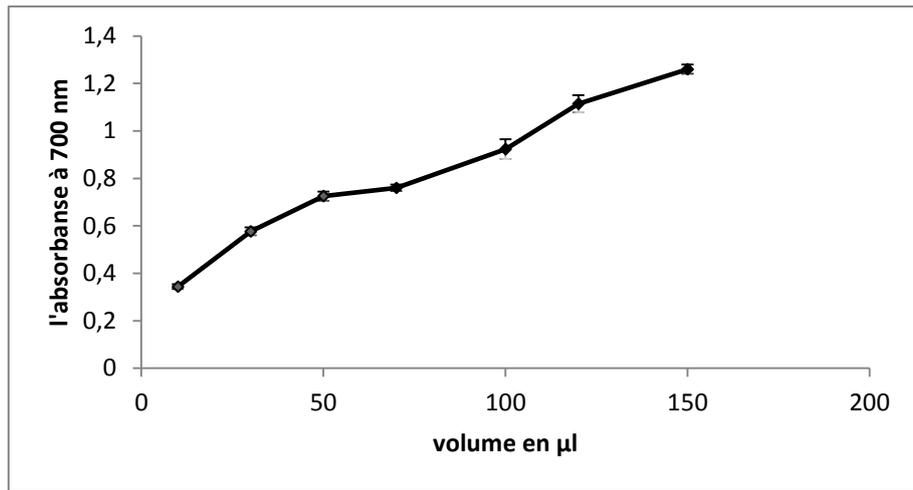


Figure 9. Pouvoir reducteur engendré par l'EAC de *P. tomentosa*. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions \pm SD.

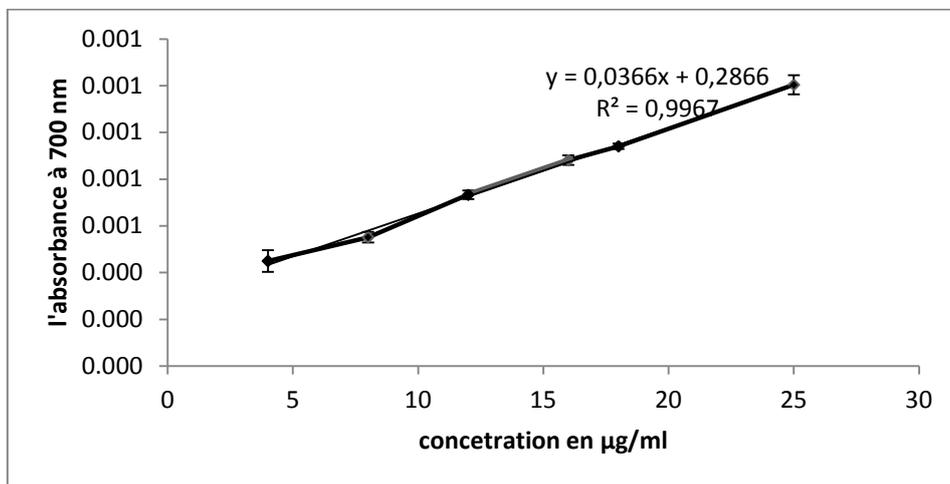


Figure 10. Pouvoir reducteur engendré par l'acide gallique. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions \pm SD.

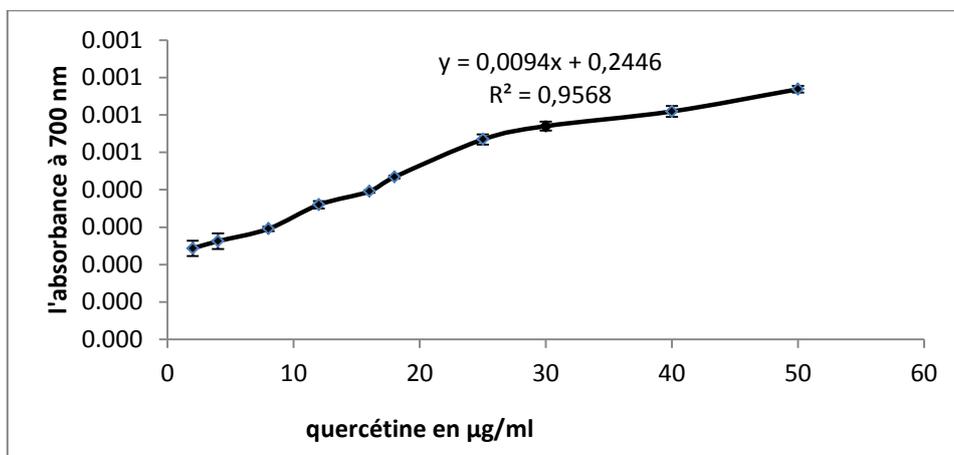


Figure 11. Pouvoir reducteur engendré par la quercétine. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions \pm SD.

Résultats et discussion

En équivalence aux phénols standards, l'activité réductrice, quelle présente l'EAC de la plante *P. tomentosa*, semble être excellente de l'ordre de $0.007 \pm 0 \mu\text{g}$ EAG/ ml d'extrait. De plus, cette activité est supérieure cinq fois qu'à son équivalent de quercétine ($0.035 \pm 0.002 \mu\text{g EQ/ml}$), ce qui indique que l'extrait acétonique de *P.tomentosa* possède significativement un pouvoir réducteur puissant ($P \leq 0,05$). Cela peut être dû à ses teneurs importantes en polyphénols, en tanins et particulièrement en les flavonoïdes qui sont des principaux donneur d'électrons, ce qui favorise la réduction du fer ferrique Fe (III) en fer ferreux, et aussi bien ces principes actifs constituent le majeur contributeur aux activités antioxydants (Ou et al., 2002). En effet, de nombreuses études antérieures ont également démontré que les différents extraits de l'espèce *Pergularia tomentosa*, de diverses régions, en gendrent des effets antioxydants s'intéressants et semblent avoir particulièrement un pouvoir réducteur important (Babaamer et al., 2014 ; Yakubu et al., 2015).

IV.4.3 Test de molybdate phosphate

Le test du pouvoir réducteur du Phosphomolybdate est un essai direct qu'on emploie principalement pour mesurer la puissance des antioxydants non enzymatiques. Il repose sur la réduction, à pH acide, des molybdates en d'un complexe vert de phosphate Molybdène en présence d'extrait, en donnant alors une coloration verte détectable à 695nm. La vitamine C est utilisée comme un antioxydant de référence. Cependant, la capacité antioxydant totale d'un volume de $30 \mu\text{l}$ d'EAC du *Pergularia tomentosa* est exprimée en μg d'équivalent d'acide ascorbique/ml d'extrait, en reposant sur l'équation de régression linéaire d'une courbe d'étalonnage établie par l'acide ascorbique.

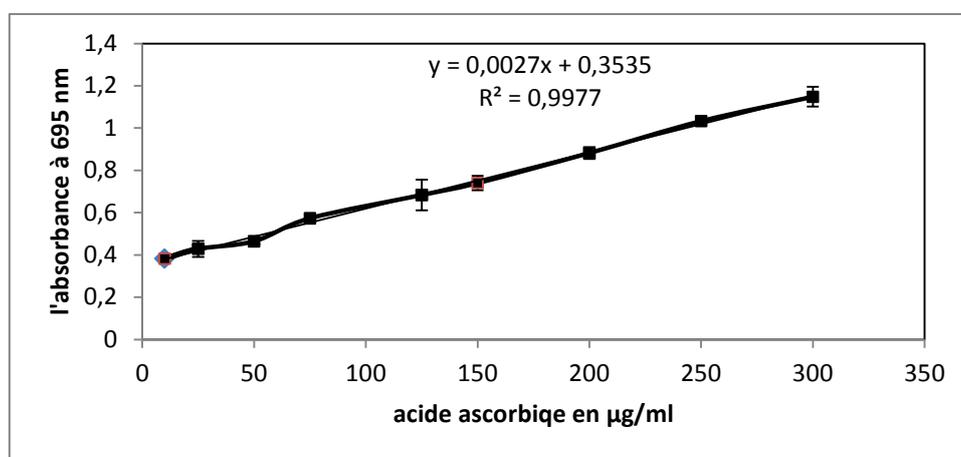


Figure 12. Réduction de Phosphomolybdate par l'acide ascorbique ($m \pm SD$) en triplicate.

Résultats et discussion

Le résultat obtenu, dans le présent travail, a indiqué en évidence que l'extrait acétonique de *P.tomentosa*, à faible volume, présente une importante capacité de réduire le Phospho-molybdate en complexe molybdène. Cela reflète son aptitude antioxydant qui est confirmé par sa valeur enregistrée d'équivalent d'acide ascorbique égale à $501,33 \pm 0.02\mu\text{g EAA/ml}$ d'extrait, par ce test.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Bien que une grande partie du xx ème siècle ont été consacrée à la mise au point de composés antioxydants de synthèse. La recherche de nouveaux antioxydants naturels via le screening de sources végétales et surtout de plantes médicinales a résulté dans la découverte d'un grand nombre de ces composés utiles qui commencent à jour un rôle major dans le traitement de nombreuses maladies humaines et aussi un rôle dans l'industrie alimentaire.

Dans ce contexte, nous sommes intéressées à l'étude de l'activité antioxydants d'une plate médecine le poussant spontanément dans la région de Bordj Enouse.

Après l'extraction de *Pergularia tomentosa* on peut conclure que l'extrait acétonique de cette plante présente un rendement de l'ordre 2.92%.

Les dosages des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins ont été effectués à partir des extraits acétoniques, dont les teneurs ont été déterminées à l'aide des courbes d'étalonnages de l'acide gallique, quercétine et catéchine respectivement. En effet, l'analyse quantitative de de cette plante révèle des teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins de l'ordre de 2166,33 μ g/ml, 428,33 μ g/ml et 800.33 μ g/ml respectivement.

Ce qui concerne l'activité antioxydant déterminée par la méthode piégeage de radical libre DPPH, nous avons constaté que l'extrait acétonique (71,436 \pm 1,469 μ l) montre un bon potentiel antioxydant, toutefois, cet effet piégeur est modéré en comparéson à l'acide gallique (0,044 \pm 0,004mg/ml) constitue un excellent antioxydant et quercétine (0,065 \pm 0,008mg/ml).

Le test du pouvoir réducteur qui révéle que l'extrait acétonique de *P.tomentosa* a activité antioxydante puissant (0.007 \pm 0 μ g EAG/ml, 0.035 \pm 0.002 μ g/ml EQ).

Test de molybdate phosphate a indiqué en évidence que l'extrait acétonique de *p.tomentosa* présente une importante capacité de réduit des phosphomolybdate en complexe molybdène (15,04 \pm 0.02 μ g/ μ l d'extrait).

La richesse de la plante *p .tomentosa* en polyphénols et flavonoïdes nous permet de conclure que cette plante peut constituer une source prometteuse de biomolécules naturelles qui peuvent contribuer au développement des nouveaux médicaments avec des principes actifs à base de plantes et présentent un effet antioxydant important en

Conclusion

neutralisant efficacement les radicaux libres et traitant les maladies associées au stress oxydant.

Ces résultats ne constituent qu'une première étape de valorisation de cette espèce végétale. Il serait également intéressant de compléter ce travail par la purification et l'identification de diverses molécules isolées en utilisant la chromatographie liquide à haute performance.

Par conséquent, il est suggéré qu'un travail postérieur doit permettre l'isolation et l'identification du contenu en antioxydants pour cette plante. En outre, l'activité antioxydante *in vivo* avec des différents mécanismes doit nécessairement être investie dans la perspective future de notre travail. L'étude des autres activités biologiques des extraits et plus particulièrement l'activité antifongique. D'exploiter ces molécules en biotechnologie. En particulier en industrie agro-alimentaire en remplaçant les antioxydants synthétiques qui sont néfastes pour la santé humaine.

Référence bibliographique

Référence bibliographie

Abderrazak M. Joël R. 2007. La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. 177p. In Boudjourf Mourad.

Acheuk F. Doumandji-Mitiche B. 2013. Insecticidal activity of alkaloids extract of *Pergularia tomentosa* (Asclepiadaceae) against fifth instar larvae of *Locusta migratoria cinerascens* (Fabricius 1781) (Orthoptera: Acrididae). *International Journal of Science and Advanced Technology*. 3(6): 8-13.

Aliyu A. B. Musa A. M. Abdullahi M.S. Ibrahim H. Oyewale A.O. 2011. Phytochemical screening and antibacterial activities of *Vernonia ambigua*, *Vernonia blumeoides* and *Vernonia ocephala* (ASTERACEAE), *Acta poloniae pharmaceutica Drug Research*, 67-73 .

Anderson J. W. Johnstone B. M. 1995. Cook-Newell M E. Meta-Analysis of the Effects of Soy Protein Intake on Serum Lipids. *N. Engl. J. Med.* 333:276-282.

Babaamer Z.Y., Sakhril., Al-Jaber H.I., Al-Qudah M.A., Abu zarga M.H. 2012. Two new taraxasterol-type triterpenes from *Pergularia tomentosa* growing wild in Algeria, *Journal of Asian Natural Products Research*. Vol. 14, No. 12 : 1137–1143.

Bahorun T., Grinier B., Trotin F., Brunet G., Pin T., Luncky M., Vasseur J., Cazin M., Cazin C., Pinkas M. 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 46(11): 1086-1089.

Barouki, R. 2006. Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/sciences* 22, 266–272.

Bekheet S.H.M., Abdel-Motaal F.F., Et mahalel U.A. 2011. Antifungal effects of *Ficus sycomorus* and *Pergularia tomentosa* aqueous extracts on some organs in *Bufo regularis* treated with *Aspergillus niger*, *Tissue and Cell*. 43: 398-404.

Belboukhari N. Cheriti A. 2006. Phytochemical Investigation of the Bioactive Extract from *Launea arbrecens*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 9(15) :2930- 2932.

Benavente-Garcia O. Castitlo J. 2008. Update on use and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(15) : 6185-6205.

Référence bibliographie

Bhashar H.V. Balakrishnan N. 2009. *in vitro* antioxydant property of laticiferous plant species from western ghats Tamilnadu , India. *Int .J. Health Res.* 2: 163-170.

Bouguern B. 2012. Conception et synthèse de derives phénolique houtement fonctionnalisés et etude de leurs proprietes biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose). Thèse de doctorat d'état, Université de Toulouse, 198 pages.

Boumerfeg S., Baghiani A., Djarmouni M., Ameni D., Adjadj M., Belkhiri F., Charef N., Khennouf S., Arrar L. 2012. Inhibitory activity on xanthine oxidase and antioxydant properties of *Teucrium polium* L. extracts. *Chinese Medicine*, 3; 30-41

Brieger K., Schiavone S., Miller J., Krause K. 2012. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med. Wkly.*

• Bruneton J. 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3 Ème édition. Edition tec & doc, Paris, pp783-823.

• Bruneton J. 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème Edition : Tec & Doc Lavoisier. Paris. 1120p.

• Cadet, J., Delatour T., Douki T., Gasparutto D., Pouget J.P., Ravanat J.L., Sauvaigo S. 1999. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat. Res.* 424, 9–21.

• Chehma A. 2006. Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. Laboratoire de protection des écosystèmes en zone arides et semi arides, Université Kasdi Merbah, Ouargla, 140 p.

• Conforti F., Sosa S., Marrelli M., Menichini F., Statti G. A., Uzunov D., Tubaro A., Et Loggia R. D. 2008. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxydant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of Ethnopharmacology.* 116(1) : 144-151.

• Cotticelli M.G., Crabbe A.M., Wilson R.B., Shchepinov M.S. 2013. Insights into the role of oxidative stress in the pathology of Friedreich ataxia using peroxidation resistant polyunsaturated fatty acids. *Redox Biology*, 1; 398-404. In Trabsa H (2015) Activité antioxydante et anti-inflammatoire des fractions des plantes médicinales : *Sedum sediforme* et *Lycium arabicum* (Stif) page 6.

Référence bibliographie

- Crozier A. Jaganath I.B. Clifford M.N. 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* 26(8): 1001-1043.
- Dalla Libera L., Ravara, B., Gobbo V., Tarricone E., Vitadello M., Biolo G., Vescovo G., Gorza L. 2009. A transient antioxidant stress response accompanies the onset of disuse atrophy in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 107, 549–557
- D'archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Maslla R. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita.* 43(4) : 348-361.
- De Mel A. Murad F. Seifalian A M. 2011. Nitric Oxide: A Guardian for Vascular Grafts. *Chem. Rev.*111(9):5742-5767.
- El-Waziry A. M. 2007. Nutritive value assessment of ensiling or maxing acacia and Atriplex using in vitro gas production technique.
- Fanò G., Mecocci P., Vecchiet J., Belia S., Fulle S., Polidori M.C., Felzani G., Senin U., Vecchiet L., Beal M.F. 2001. Age and sex influence on oxidative damage and functional status in human skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 22, 345–351.
- Fiorucci S. 2006. Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes: approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat. Nice. 211p.
- Fontaine E. 2007. Radicaux libres. In: *Traité de nutrition artificielle de l'adulte.* Springer-Verlag France, pp; 251-257. In Trabsa H (2015) *Activité antioxydante et anti-inflammatoire des fractions des plantes médicinales : Sedum sediforme et Lycium arabicum (Stif)* page 6.
- Fu S., Gebicki S., Jessup W., Gebicki J.M., Dean R.T. 1995. Biological fate of amino acid, peptide and protein hydroperoxides. *Biochem. J.* 311, 821–827.
- Gohar A.A., El-Olemy M.M., Absel-Sattare E., El-Said M., Niwa M. 2000. Cardenolides and β -Sitosterol Glucoside From *Pergularia Tomentosa*. *L. Naturel product Science.* 6(3) : 142-146.

Référence bibliographie

- Grune T., Shringarpure R., Sitte N., Davies K. 2001. Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 56, B459–B467.
- Guignard J. L. 2000. *Biochimie végétale*. 2ème édition. Edition Dunod, Paris, pp 198-207.
- Hamidi. 2012. Etude phytochimique et activité biologique de plante *limoniastrum guyonianum*, 48.
- Hammiche V. Maiza K. 2006. Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology*.105 : 358–367
- Harborne, J. B. Herbert B. 1995. *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. Bristol: Taylor & Francis.
- Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.
- Hassan S., Umar R., Ladan M.J., Myemike P., Wasagu R.S.U., Lawal M., Et Ebbo A.A. 2007. Nutritive Value, Phytochemical and Antifungal Properties of *Pergularia tomentosa* L. (Asclepiadaceae). *International Journal of Pharmacology*.3 : 334–340.
- Hattori I. Nakamura H. Masutai H. et al. 2003. Thioedoxin-dependent redox regulation – implication in aging and neurological diseases. Critical review of oxidative stress and aging. RG Cutler and H Rodriguez Eds. World Scientific. Vol II pp 87 – 101.202
- Heneidak S., Grayer R.J., Kite G.C., Simmonds M.S.J. 2006. Flavonoid glycosides from Egyptian species of the tribe Asclepiadeae (Apocynaceae, subfamily Asclepiadoideae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 34 : 575-584.
- Hifnawy M.S., El-Shanawany M.A., Khalifa M.M., Youssef A.K., Desoukey S.Y. 2014. Cardiotoxic activity of *Pergularia tomentosa* different extracts, fractions and isolated compounds, *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, Volume 9, Issue 1 : 54-60.
- Hmeyada A. 2009. Contribution à l'étude des plantes médicinales de Mauritanie. *Ann. Univ. Lomé (Togo)*, Tome XVII. pp. 9-27.

Référence bibliographie

- Hosseini Kahnouj SH. Ayyari M. Azarnivand H. Piacente S. Zare Chahouki MA. 2017. *Pergularia tomentosa*, from Traditional Uses to Ecology and Phytochemistry. *Journal of Medicinal Plants*. Volume 16, No. 63.
- Hussein H.I., Al-Rajhi D.H., El-Shahawi F.I., Hashem S.M. 1999. Molluscicidal Activity of *Pergularia tomentosa* L. Methomyl and Methiocarb
- Karthishwaran K. Mirunalini S. 2010. therapeutic potential of *pergularia damia* (Forsk): the Ayurvedic Wonder. *International Journal of pharmacology*, 6: 836-843
- Kemassi A., Darem S., Cherif R., Boual Z., Sadine S. E., Aggoune M. S., Ould El hadj-khelil A., Ould El hadj M.D. 2014. Recherche et identification de quelques plantes médicinales à caractère hypoglycémiant de la pharmacopée traditionnelle des communautés de la vallée du M'Zab (Sahara septentrional Est Algérie), *Journal of Advanced Research in Science and Technology*. 1(1) : 1-5.
- King A. Young G. 1999. characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Jof the American dietetic association*. 99:213-218. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008)
- Kochetova M. V., E Semenistaya E. N., Larionov O. G., Revina A. A. 2007. Determination of biologically active phenols and polyphenols in various objects by chromatographic techniques. *Russian Chemical Reviews*. 76(1):79-90.
- Kondo H., Nakagaki I., Sasaki S., Hori S., and Itokawa Y. 1993. Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am. J. Physiol*. 265, E839–E844.
- Lahmar I., Belghith K., Ben Abdallah F. 2012. Exploration de quelques activités antioxydantes d'une espèce spontanée: *Pergularia tomentosa*. Association ténisienne de physiologie et de biosurveillance d'environnement, Université de Sfax, 19-22 décembre 2012, Sfax, Tunisie.
- Lugasi A., Hovari J., Sagi K., and Biro L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *J. Acta biologica. szegediensis*. 47(14):119-125. (Cited in Mohammedi Z, 2005).
- Lutge U., Kluge M., Bauer G. 2002. *Botanique 3ème Ed: Technique et documentation*. Lavoisier .Paris. 211p.

Référence bibliographique

- Macheix J.J., Fleuriet A., Sarni-Manchado P. 2006. Composés phénoliques dans la plante - Structure, biosynthèse, répartition et rôles. Les polyphénols en agroalimentaire. Paris, Lavoisier, pp. 1-28
- Maggio M., Guralnik J.M., Longo D.L., Ferrucci, L. 2006. Interleukin-6 in Aging and Chronic Disease: A Magnificent Pathway. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 61, 575–584.
- Martin S. Andriantsitohaina R. 2002. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie.* 51 : 304–315.
- Martin S. Andriantsitohaina R. 2002. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie.* 51 : 304–315.
- Mougeolle A. 2014. Effet du stress oxydant sur les cavéoles dans les cellules musculaires squelettiques .Thèse de doctorat d'état, Université de Bordeaux, français,181 page
- N'Guessan K., Kadja B., Zihiri G. N., Traoré D., Aké-Assi L. 2009. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville , Cote- d'Ivoire) . *Sciences et Nature* 1-15 .
- O'Mahony J. A., Fox P.F., Kelly A.L. 2013. Indigenous enzymes of milk advanced dairy chemistry. Springer Science Business Media New York, pp; 337-385. In Trabsa H (2015) Activité antioxydante et anti-inflammatoire des fractions des plantes médicinales : *Sedum sediforme* et *Lycium arabicum* (Stif) page 5
- Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A., Deemer E.K. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50; 3122-3128.
- Ould El hadj M.D., Hadj-Mahammed M., Zabeirou H. 2003. Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrional est Algérien). *Courrier du Savoir.* 3 : 47-51.
- Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44, 307–315.

Référence bibliographie

- Ozenda P. 1958. Flore du sahara 1ereEd. CNRS,paris,France.
- Pansarasa O., Castagna L., Colombi B., Vecchiet J., Felzani G., and Marzatico F. 2000. Age and sex differences in human skeletal muscle: role of reactive oxygen species. *Free Radic. Res.* 33, 287–293.
- Peronny S. 2005. La perception gustative et la consommation des tannins chez le maki (*Lemur catta*). Thèse de doctorat. Muséum national d'histoire naturelle, France. 151p.
- Piacente S., Masullo M., De ève N., Dewelle J., Hamed A., Kiss R., Mijatovic T. 2009. Cardenolides from *Pergularia tomentosa* Display Cytotoxic Activity Resulting from Their Potent Inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase.*J. Nat. Prod.* 72 : 1087–1091.
- Quideau S., Deffieux D., Douat-Caassus C., Pouysegu L. 2011. Plant polyphenols : Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie - International Edition.* 50(3) : 586-621.
- Radi R. 2004. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. USA.* 101:4003-4008.
- Reid M.B., Shoji T., Moody M.R., and Entman M.L. 1992. Reactive oxygen in skeletal muscle. II. Extracellular release of free radicals. *J. Appl. Physiol.*Bethesda Md 1985 73, 1805–1809.
- Richter C. 1987. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem. Phys. Lipids* 44, 175–189.
- Rossi P., Marzani B., Giardina S., Negro M., Marzatico F. 2008. Human Skeletal Muscle Aging and the Oxidative System: Cellular Events. *Curr.Aging Sci.* 1, 182-191.
- Salvayre R., Auge N., and Nègre-Salvayre A. 2003. Rôle de l'oxydation dans la genèse et la progression de l'athérosclérose. In *L'athérosclérose : Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques.*, J.-F. Toussaint, M.-P. Jacob, L. Lagrost and J. Chapman, Eds. Masson: Paris, Vol. 14, pp 269-290.
- Sandalio L.M., Rodriguez-serrano M., Romero-puertas M., Ddel rio L. 2013. Role of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ROS) signaling molecules. In *Trabsa H (2015) Activité antioxydante et anti-inflammatoire des fractions des plantes médicinales : Sedum sediforme et Lycium arabicum (Stif)* page 6

Référence bibliographie

- Sartori-Thiel A. 2003. Activités anti-microbiennes d'extraits végétaux enrichis en polyphénols. Thèse de doctorat en Sciences et agronomie. Chimie, Avignon . 177p.
- Schmelzer G.H. et Gurib-Fakim A. 2013. Ressources végétales de l'Afrique tropicale 11(2) plantes médicinales 2. Fondation PROTA.Wageningen, Pays-Bas.pp : 224-226.
- Shinkafi S.A. 2013. Antidermatophytic activities, phytochemical screening and Chromatographic studies of *Pergularia tomentosa* L. and *Mitracarpus scaber* Zucc. (Leaves) Used in the Treatment of Dermatophytoses, International Research Journal of Microbiology. Vol. 4(1) : 29-37.
- Sies H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. Am J Med. 91:31-38
Saulnier L. Vgouroux J. Thibault JF.1995. Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran , carbohydr Res. 272:21-53.
- Silinard K. Singleton V. L. 1977. Total phenol analyse : automation and comparison with manual methods. Am. J. Eno. Vitic. 28(1): 49-55
- Suliman M. A.Yesser A. E. 2017. Phytochemical and Biological Evaluation of *Pergularia tomentosa* L. (Solanaceae) Naturally Growing in Arid Ecosystem.International Journal of Plant Science and Ecology, Vol. 3, No. 2 :7-15.
- Tapiero H., Tew K.D., Nguyen B.G., Mathé G. 2002. Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies? Biomed.pharmacother. 56: 200-207. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).
- Tlili M.L., Hadj-mohammed M., Hammoudi R., Dehak K. 2018.Evaluation d'activité antioxydantes des extraits des feuilles de *pergularia tomentosa* issue de mguibra (El-oued).
- Tlili M.L.2015. Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergularia tomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional). Thèse magister, université Kasdi Merbah-Ourgla, page 86.
- Udenigwe C.C., Rampasath V.R., Aluko R.E., Jones P.J.H. 2008. Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. Nutrition Reviews. 66(8) : 445-454.

Référence bibliographique

- Vecchiet L. Beal M.F. 2001. Age and sex influence on oxidative damage and functional status in human skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 22, 345–351.
- Vertuani S., Angusti A., and Manfredini S. 2004. The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview. *Curr. Pharm. Des.* 10:1677-1694.
- Wardman P. Candeias.1996. Fenton centennial symposium. *Radiation research.* 145:523-531.
- Wink M. 1999. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism.* Sheffield, UK, and Boca Raton, FL: Sheffield Academic Press and CRC Press.
- Xia E.Q., Deng G.F., Guo Y. J., Li H.B. 2011. Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences.* 11(2) : 622-646.
- Yakubu R., Musa Jibril F., Lukman A., Sheikh F. 2015. Trends for Antioxidant Power of Phytochemicals from *Pergularia tomentosa L.* (Asclepiadacea) Whole Plant. *Scholars Academic Journal of Pharmacy.* 4(2): 74-80.
- Zhang H. Forman H.J. 2012. Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 722–728.
- Zhou L. Z.-H., Johnson A.P., Rando T. A. 2001. NFκB and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1405–1416.

المخلص

يعرف نبات *pergolaria tomentosa* بأنه نبتة طبية تنتمي الى عائلة Asclepiadacée تنتشر هذه النبتة المعروفة باسم العلقة بصفة خاصة في منطقة جنوب الجزائر. تم الحصول على المستخلص العضوي بواسطة النقع وذلك باستعمال المذيب العضوي اسيتون . فكان المرودود 2,89 %.

وقد ابرزت تجارب الكيمياء النباتية تواجد مختلف المركبات الابيض الثانوية : العفص , الفلافونويدات و البوليفينولات.

تم تحديد المحتوى الفينولي الكلي في المستخلص باستعمال طريقة كاشف folin Ciocalteu كانت النتيجة كما يلي : $2166,33 \mu\text{gEAG/ml}$. تم تقدير الفلافونويدات باستعمال طريقة AlCl_3 كان تركيز هذا الاخير : $428,33 \mu\text{gEQ/ml}$ بينما قدرت كمية العفص المكثف بطريقة (Sun (1998) وكان تركيزها كما يلي $8,33 \mu\text{gEC/ml}$. قدرت النشاطية المضادة للاكسدة باستعمال ثلاثة طرق :تقنية ارجاع الجذر الحر DPPH , ارجاع الحديد و تقنية phosphomolybdate بالنسبة لتقنية الاولى تقدر قيمة IC_{50} ب: $71.436 \pm 1.436 \mu\text{L}$. بالنسبة لتقنية الثانية تقدر نسبة EC_{50} الى مرجعين : $0,035 \pm 0,002 \text{mgEQ/g}$; $0,007 \pm 0,002 \text{mgEAG/g}$: بالنسبة لتقنية الثالثة تدل على ان المستخلص الاسيتوني ل *pergolaria tomentosa* يملك قدرة مضادة للاكسدة الكلية تقدر ب : $0,007 \pm 0$

Résumés

Pergularia tomentosa est une plante médicinale appartenant à la famille des Asclepiadacée, cette espèce connue sous le nom de « Ilka », est très répandue dans le sud algérien. L'extrait organique a été obtenu par macération en utilisant solvant acétone. Le rendement est 2.98%.

La teneur totale en composés phénolique a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de $2166.3 \mu\text{g/ml}$. Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode AlCl_3 , leur teneur est de $428.33 \mu\text{g/ml}$, Les tannins sont estimés par une méthode de Sun(1998). Leur teneur est de $800.33 \mu\text{g/ml}$. L'activité antioxydant a été évaluée en utilisant trois méthodes différentes: la méthode de réduction de radical libre DPPH, test du pouvoir réducteur et test de phosphomolybdène Pour le premier test IC_{50} a été estimée à $71.436 \pm 1.436 \mu\text{L}$. Pour le second test EC_{50} a été estimée par apport deux standard : $0.035 \pm 0.002 \mu\text{g EQ/ml}$; $0.007 \pm 0 \mu\text{g EAG/ml}$ d'extrait. Le troisième test indique que l'extrait acétonique de *p. tomentosa* poussèd une activité anti oxydant total a été estimée à $501.33 \pm 0.02 \mu\text{g EAA/ml}$.

Les mots clés : pergularia tomentosa, composés phénoliques, flavonoides, activité antioxydant

Apstract

Pergularia tomentosa is a medicinal herb belonging to the family Asclepiadaceae, this species known as "Ilka", is very widespread in south Algeria. The organic extract was obtained by maceration using acetone solvent. The yield is 2.92%.

The total content of phenolic compounds was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, it is $2166.3 \mu\text{g / ml}$. The flavonoids were evaluated using the AlCl_3 method, their content is $428.33 \mu\text{g / ml}$. The tannins are estimated by a method of Sun (1998). Their content is $800.33 \mu\text{g / ml}$. The antioxidant activity was evaluated using three different methods: the DPPH free radical reduction method, the reducing power test and the phosphomolybdenum test for the first IC_{50} test was estimated at $71.436 \pm 1.436 \mu\text{L}$. For the second test EC_{50} was estimated by two standard intake: $0.035 \pm 0.002 \mu\text{g EQ / ml}$; $0.007 \pm 0 \mu\text{g EAG / ml}$ of extract. The third test indicates that the acetone extract of *p. tomentosa* increased total antioxidant activity was estimated at $501.33 \pm 0.02 \mu\text{g EAA / ml}$.

Keywords: pergulari tomentosa, phenolic compouds, flavonoids, antioxidant activity.

Partie bibliographique