



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Med Khider Biskra

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

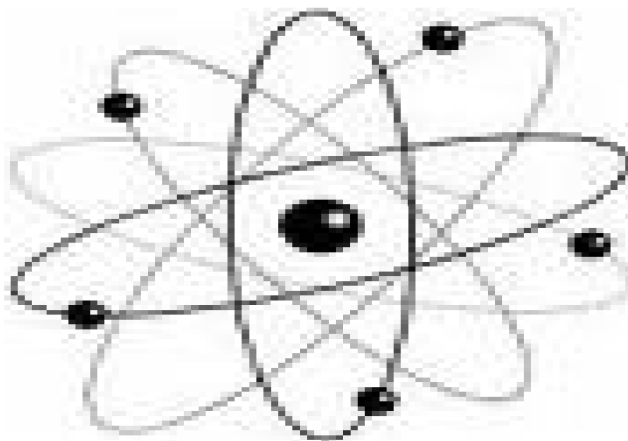


Département des Sciences de la Matière

Domaine : Sciences de la Matière

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie Pharmaceutique



Mémoire de fin d'étude en Master

Intitulé :

Evaluation de l'activité antioxydante des extraits acétate d'éthyle et butanolique de *Fumana thymifolia*

Présentée par : **Ouahrani Asma**

Devant le jury :

Khamouli Saida	(M.A.A)	Université de Biskra	Présidente
Laraoui Habiba	(M.C.B)	Université de Biskra	Rapporteur
Fettah Asma	(M.A.A)	Université de Biskra	Examinatrice

2017-2018

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je remercie le bon dieu tout puissant pour m'avoir donné la force et la patience et de m'avoir gardé en bonne santé pour mener ce travail à terme.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de chimie organique à l'Université de Biskra et à la station expérimentale de L'outaya Centre De Recherche Scientifique Et Technique Sur Les Régions Arides (CRSTRA).

Je voudrais exprimer mes sincères remerciements à **Mademoiselle Laraoui Habiba**, maître de conférences classe B à L'université de Biskra, pour avoir accepté de me superviser. Merci pour votre patience, votre disponibilité, votre soutien, votre précieux conseil et votre gentillesse. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée. Ce fut un honneur de travailler avec vous. Mon grand respect.

Je remercie Madame **Khamouli Saïda** maître assistant classe A à L'université de Biskra, pour l'intérêt qu'elle a bien voulu porter à ce travail en me faisant l'honneur de présider ce jury.

À Madame **Fettah Asma** maître assistant classe A à L'université de Biskra qu'a accepté de juger ce travail.

Je remercie également Monsieur **Kechebar Mohamed .S.A** et Madame **Karoune Samira** chercheurs au centre de recherche scientifique et technique sur les régions arides de Biskra pour leurs précieux conseils et leur collaboration fructueuse.

Enfin, je n'oublierai pas d'exprimer ma reconnaissance pour tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Mes très chers parents, je ne saurais trouver les mots pour vous dire merci, car aucune parole ni expression ne serait suffisamment puissante pour vous exprimer mon immense gratitude et ma reconnaissance éternelle.

Merci pour votre soutien, vos encouragements, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir accompagnée durant toutes mes études, merci de m'avoir enseignée la vie, merci d'être les personnes que vous êtes, merci d'être mes parents. Je suis fier d'être votre fille.

Je vous adresse le plus respectueux et le plus émotionnel « **je vous aime** ».

À la plus chère sœur au monde **Imane**, les mots me manquent pour exprimer comment je t'aime, tu me manques beaucoup, je suis fière d'être ma sœur.

À Mes chers frères: **Chaouki, Nadjib et Sami**. Je ne peux vous remercier assez pour toujours, pour votre collaboration présence à tout moment.

Mes belles sœurs **Fatima Zohra et Selma**, j'ai de la chance d'avoir des sœurs comme vous « **je vous aime** ». Sans oublier les fleures, **Nourreine** et **Haytham** qui mettent le bonheur et la joie dans la vie.

Mon marie walid et mes parents c'est ma seconde famille « **BRAHIMI** », ayant l'honneur de faire partie de votre famille. à mes baux frères: **Amir, Rafik** et la petite **Amina**. Tous les mots de respect, Et gratitude envers vous.

votre sympathie chaleureuse, et l'appui inestimable, le sourire dans les moments difficiles. Je vous aime.

Asma

LISTE DES TABLEAUX

N°	Tableau	Page
Tableau I.1	Classification de Cronquist (1981).	3
Tableau I.2	Principaux métabolites secondaires des plantes Cistaceae.	5
Tableau I.3	Principaux métabolites secondaires isolés du genre <i>Fumana</i> .	9
Tableau I.4	Position systématique de <i>Fumana thymifolia</i> .	19
Tableau IV.1	Teneur en PPT de la plante <i>F. thymifolia</i> (AcOEt et <i>n</i> -BuOH)	46
Tableau IV.2	Teneur en FVT de la plante <i>F. thymifolia</i> (AcOEt et <i>n</i> -BuOH)	48
Tableau IV.3	Teneur en TC de la plante <i>F. thymifolia</i> (AcOEt et <i>n</i> -BuOH)	49
Tableau IV.4	Activité anti-radicalaire des extraits (AcOEt et <i>n</i> -BuOH) et antioxydant standard	51

LISTE DES FIGURES

N°	Figure	Page
Figure I. 1	Répartition géographique des plantes Cistaceae	3
Figure I.2	Quelques espèces de la famille Cistaceae	4
Figure I.3	Quelques espèces du genre <i>Fumana</i>	7
Figure I.4	<i>Fumana thymifolia</i> (fleur, feuille et fruit)	19
Figure II .1	Stress oxydant	20
Figure II.2	Forme d'un radical libre	21
Figure II.3	Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO)	22
Figure II.4	Formation des Espèces Réactives résulte d'une réduction progressive de l'oxygène	23
Figure II.5	Radiations UV de la lumière	24
Figure II.6	Actions de la vitamine C sur les radicaux actifs	25
Figure II.7	Aperçu des différentes espèces oxygénées activées(ERO) et des antioxydants régulateurs de leur production	25
Figure II.8	Structure des antioxydants les plus connus	26
Figure II.9	Squelette de base des flavonoïdes	29
Figure II.10	Structures des différents squelettes flavonoïdiques	30
Figure II.11	Acides gallique et ellagique	31
Figure II.12	Tanins condensés (dimérisation au niveau de liaisons C4-C8)	31
Figure II.13	Alimentation riche en flavonoïdes (polyphénols)	32
Figure II.14	Effets santé potentiels des polyphénols végétaux	33
Figure III.1	Macération pendant 48h à T° ambiante	34

LISTE DES FIGURES

Figure III.2	Etape de filtration	34
Figure III.3	Evaporation non à sec des filtrats	35
Figure III.4	Différentes étapes pour obtentions des extraits secs	35
Figure III .5	Chromatogrammes des différents extraits obtenus	36
FigureIII.6	le spectrophotomètre UV-Vis	37
Figure III.7	Etapes de préparation des dilutions des extraits AcOEt et <i>n</i> -BuOH	38
Figure III.8	Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm de trois essais SD)	39
Figure III.9	Solutions préparées selon la méthode de Folin-Ciocalteu , avant l'incubation	39
Figure III.10	Echantillons préparés pour la mesure de l'absorbance (dosage des flavonoïdes)	40
Figure III.11	Droite d'étalonnage de la catéchine (moyenne \pm de trois essais SD)	41
Figure III.12	Echantillons préparés pour la mesure de l'absorbance (dosage des tanins)	42
FigureIII. 13	Structure chimique du radical synthétique DPPH et du DPPH-H (non radicalaire)	43
Figure III.14	Changement de couleur des échantillons de violet au jaune	43
Figure IV.1	Protocole d'extraction de la plante <i>F.thymifolia</i>	45
Figure IV.2	Composition en PPT des extraits AcOEt et <i>n</i> -BuOH de l'espèce <i>Fumana thymifolia</i>	47
Figure IV.3	Composition en FVT des extraits AcOEt et <i>n</i> - BuOH de l'espèce <i>Fumana thymifolia</i>	48
Figure IV.4	Composition en TC des extraits AcOEt et <i>n</i> -BuOH de l'espèce <i>Fumana thymifolia</i>	49

LISTE DES FIGURES

Figure IV.5	Comparaison de l'activité anti-oxydante des extraits (AcOEt et <i>n</i> -BuOH) de la plante <i>F. thymifolia</i>	51
--------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

Symbole et abréviation

AcOEt : Acétate d'éthyle

Abs : Absorbance

AlCl₃ : Chlorure d'Aluminium

AG : Acide Gallique

BHT : Butylhydroxytoluène

BuOH : Butanol

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CI₅₀ : Concentration correspondante à 50% d'inhibition de l'échantillon à analyser

CHCl₃ : Chloroforme

DPPH : 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl

DO Témoin : Densité optique du témoin négatif

DO extrait : Densité optique de la solution d'extrait

EP : Ether de pétrole

ERO : Espèce réactives oxygénées

EtOH : éthanol

FVT : flavonoïdes totaux

FCR : Folin-Ciocalteu

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₃PW₁₂O₄₀ : Acide phosphotungstique

H₃PMo₁₂O₄₀ : Acide phosphomolybdique

Mo₈O₂₃ : Oxyde de molybdène

mg/ml : milligramme par millilitre

Symbole et abréviation

$\mu\text{g.ml}^{-1}$: microgramme par millilitre

mg EAG.g⁻¹ extrait : milligrammes équivalent en acide gallique par gramme d'extrait

mg EC.g⁻¹ extrait : milligrammes équivalent en catéchine par gramme d'extrait

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium

NaNO₂ : Nitrite de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

OH· : Radical hydroxyl

O₂⁻ : Anion superoxyde

PPT : Polyphénols totaux

ROO· : Radical peroxy

R² : Coefficient de corrélation

TC : Tanins condensés

W₈O₂₃ : Oxydes de tungstène

SOMMAIRE

Remerciements	
Dédicace	
Liste des tableaux.....	
Liste des figures	
Symboles et abréviations.....	
Sommaire	
Introduction	1

CHAPITRE I

Généralités sur la famille Cistaceae, genre *Fumana*

I.1. Famille Cistaceae.....	3
I.1.1. Classification de la famille Cistaceae.....	3
I.1.2. Aspects botaniques et répartition géographique des Cistaceae.....	4
I.1.3. Principaux métabolites secondaires des plantes Cistaceae.....	5
I.1.4. Activités biologiques des plantes de Cistaceae.....	6
I.2. Genre <i>Fumana</i>	7
I.2.1. Etudes chimiques antérieures sur le genre <i>Fumana</i>	8
I.3. Espèce <i>Fumana thymifolia</i>	18
I.3.1. Distribution géographique et position systématique de l'espèce <i>Fumanathymifolia</i>	19

CHAPITRE II

Synthèse bibliographique

II.1. Activité anti-oxydante	20
II.1.1. Stress oxydant	20
II.1.1.1. Radicaux libres et espèces réactives	21
II.1.1.2. Origines des espèces réactives de l'oxygène	22
II.1.2. Maladies liées aux stress oxydatifs	24
II.1.3. Antioxydants et système de défense	24
II.1.4. Méthodes d'évaluation de propriété anti-oxydante <i>in vitro</i>	26
II.2. Composés phénoliques	27
II.2.1. Acides phénoliques	27
II.2.2. Flavonoïdes	29
II.2.3. Tanins.....	30
II.2.3. Polyphénols et santé	32

CHAPITRE III

Matériel et méthodes

III.1. Récolte de la plante <i>Fumana thymifolia</i>	34
III.2. Procédure de l'extraction.....	34
III.2.1. Macération de la poudre	34
III.2.2. Filtration des macérats.....	34
III.2.3. Evaporation des filtrats	35
III.2.4. Préparation des différents extraits.....	35
III.1.2. Tests des extraits obtenus sur CCM	35
III.2.1. Dosage des composés phénoliques.....	36
III.2.1.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT).....	37
1. Préparation des échantillons.....	38
2. Préparation de la gamme d'étalon de l'acide gallique.....	38
3. Mode opératoire de la méthode de Folin-Ciocalteu	39
III.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT).....	40
III.2.3. Dosage des tanins condensés (TC)	41

III.3. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité anti-oxydante	42
III.3.1. Test du radical libre DPPH	42
III.4. Analyse statistique	44

CHAPITRE IV

Résultats et Discussion

IV.1. Extraction	45
IV.2. Analyse chromatographique.....	46
IV.3. Dosage des phénols.....	46
IV.3.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT)	46
IV.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)	47
IV.3.3. Dosage des tanins condensés (TC)	49
IV.3.4. Conclusion	50
IV.4. Evaluation de l'activité anti-oxydante	50
II.4.1. Test du radical libre DPPH	50

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE	53
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	54
Resume	
Annexes.....	

INTRODUCTION GENERALE

La nature, ou comme l'appelle Pierre Potier « le Magasin du Bon Dieu », avec 250000 à 500000 espèces de plantes [1], ses micro-organismes et ses produits marins, est la source d'une formidable biodiversité, possédant parfois des propriétés thérapeutiques, mais malheureusement, seule une partie de cette richesses a été explorée [2].

Depuis quelques décennies, la recherche d'une vie saine et le retour à la nature, fait renaître un enthousiasme certain pour les plantes. Elles se sont adaptées à leur environnement en produisant divers métabolites secondaires. Ces métabolites secondaires bioactifs ont été intensifiés grâce aux recherches scientifiques. Les progrès de la science ont permis également un rapprochement significatif entre la pharmacopée végétale et la médecine [3].

Les polyphénols, acides phénols, flavonoïdes et tanins, font partie des métabolites secondaires. Ils sont considérés comme les principaux composés phénoliques présentant un large éventail de propriétés physiologiques, tels que : anti-allergiques, anti-athérogènes, anti-inflammatoire, antioxydant, anti-thrombotiques, cardioprotecteurs et vasodilatatrices [4].

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires [5].

L'activité anti-oxydante est attribuée à la capacité des composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH^\bullet) et superoxydes (O_2^\bullet). Les composés antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques [5].

Notre travail de recherche est centré sur l'évaluation des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de la plante méditerranéenne *Fumana thymifolia*, appartenant à la famille Cistaceae, en composés phénolique ainsi que l'étude *in vitro* de l'activité anti-oxydante de cette espèce.

Sur un plan méthodologique ce mémoire comporte quatre chapitres :

Dans le premier chapitre, nous nous sommes intéressés à citer quelques connaissances bibliographiques concernant l'espèce *Fumana thymifolia* en particulier et la famille Cistaceae en général.

Le deuxième chapitre est consacré à une étude bibliographique sur les polyphénols, leur classification, leurs propriétés thérapeutiques, ainsi qu'une mise au point sur le stress oxydatif, les radicaux libres, les antioxydants dans la nature et leur mécanisme d'actions.

Le troisième chapitre présente le travail expérimental réalisé dans le cadre de l'étude phytochimique (procédure d'extraction et contrôle sur CCM) et l'évaluation de l'activité anti-oxydante (test au radical libre DPPH[•]) des extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Fumana thymifolia*.

Le quatrième chapitre est consacré à la discussion des résultats obtenus et conclusion générale .

I.1. Famille Cistaceae

La famille des Cistaceae dispose de huit genres principalement localisés dans la région méditerranéenne. En effet, les cinq genres (*Cistus*, *fumana*, *Halimium*, *Helianthemum* et *Tuberaria*) sont originaires de cette région. Les trois autres (*Crocanthemum*, *Hudsonia* et *Lechea*) se rencontrent dans les régions tempérées de l'Amérique (Figure I.1) [6].

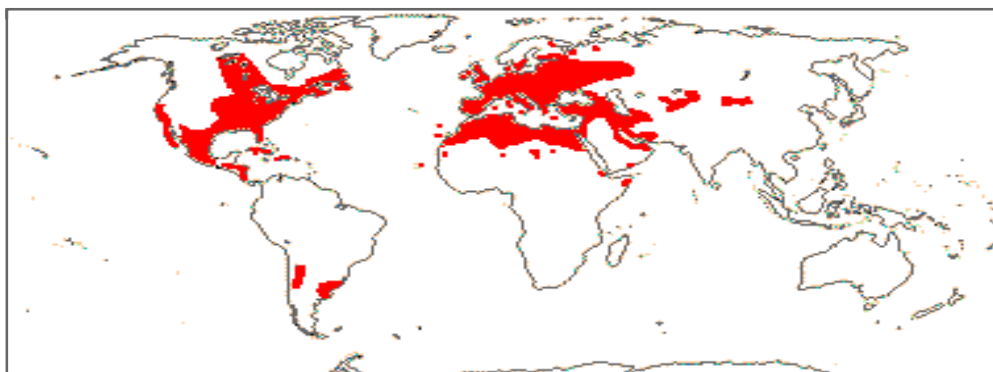


Figure I. 1 : Répartition géographique des plantes Cistaceae

I.1.1. Classification de la famille Cistaceae

Selon Cronquist les plantes Cistaceae sont classées dans l'ordre des Malvales. Le tableau ci-dessous montre leur classification (tableau I .1) [7].

Tableau I.1: Classification de Cronquist (1981)

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Dilleniidae
Ordre	Malvales
Famille	Cistaceae

I.1.2. Aspects botaniques et répartition géographique des Cistaceae

Les espèces constituent la famille Cistaceae sont en générale, des arbustes, plantes herbacées, poilues ou velues, pérennes ou annuelles, à feuilles simples souvent opposées, à fleurs solitaires ou en cymes, à 5 pétales libres (Figure I.2) [8-9].



Fumana scoparia



Cistus salvifolius



*Lavevipes
helianthemum*



Halimium commutatum



Lechea racemulosa



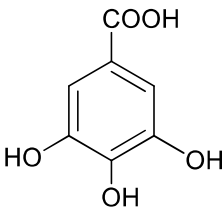
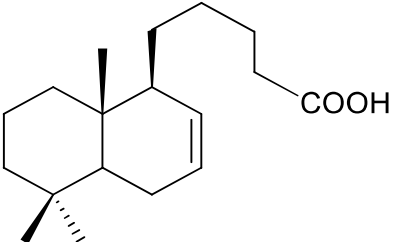
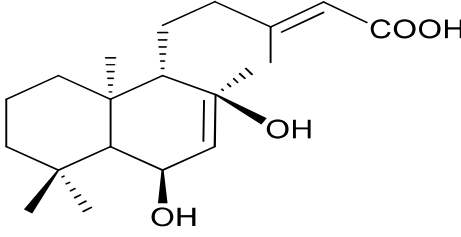
Thymifolia hudsonia

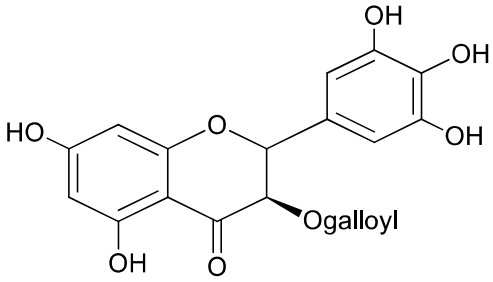
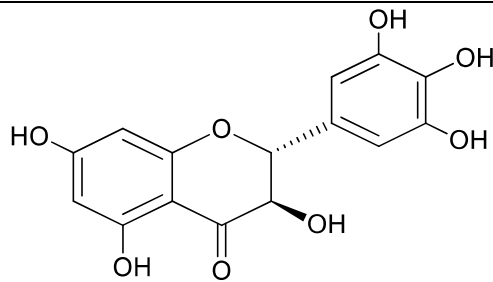
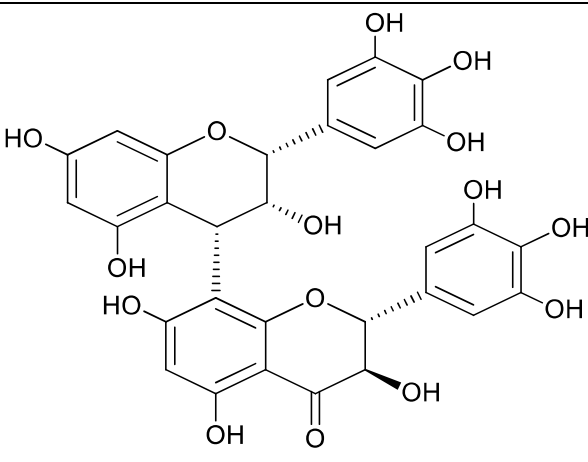
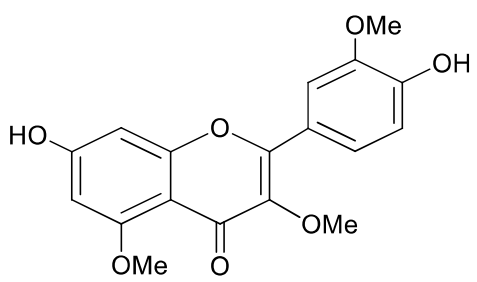
Figure I.2 : Quelques espèces de la famille Cistaceae

I.1.3. Principaux métabolites secondaires des plantes Cistaceae

Les investigations phytochimiques effectuées sur les espèces de la famille Cistaceae, ont révélées leur grande richesse en produits naturels tels que : diterpènes, huiles essentielles et polyphénols (notamment les flavonoïdes et les acides phénolique). Le tableau ci-après regroupe quelques composés isolés des Cistaceae :

Tableau I.2 : Principaux métabolites secondaires des plantes Cistaceae

ACIDE PHENOLS		
Nomenclatureur	Structure	Référence
acide gallique		[10]
DITERPENES		
Acide cativique		[11]
6 β , 8 β -dihydroxy- <i>ent</i> -13- <i>E</i> -labden-15-oïque		[12]

FLAVONOÏDES		
Gallocatéchine-3- <i>O</i> -gallate		[13]
(+)-catéchine		[13]
Procyanidine B ₃		[13]
3,5,3'-triméthyl éther quercétine		[14]

I.1.4. Activités biologiques des plantes de Cistaceae

Une récente étude biologique effectuée sur onze taxons du genre *Helianthemum* confirme le pouvoir antioxydant et antimicrobien chez les Cistaceae. Une forte relation a

été trouvée entre les profils polyphénoliques des différents extraits (aqueux et méthanolique) des feuilles de chaque taxon et les activités anti-oxydante et antibactérienne [15].

Les investigations pharmacologiques réalisées sur l'extrait méthanolique de l'espèce *Helianthemum glomeratum* ont montré des propriétés anti-giardiales [16].

I.2. Genre *Fumana*

Le genre *Fumana*, appartenant à la famille Cistaceae, est constitué de plantes à tige ligneuse, à feuilles alternes (ou les inférieures sont opposées), linéaires en aiguille subtrigone. Les fleurs sont petites et jaunes. Le calice est composé de cinq pétales de taille inégale dont deux plus courts, les externes étant stériles. Le fruit est recouvert d'une capsule ovale, trigone, glabre s'ouvrant par trois valves [17]. En Algérie, ce genre est représenté par cinq espèces : *F. thymifolia*, *F. laevipes*, *F. calycina*, *F. arabica* et *F. ericoides* (Figure I.3) [18].



Fumana thymifolia



Fumana laevipes



Fumana arabica



Fumana ericoides



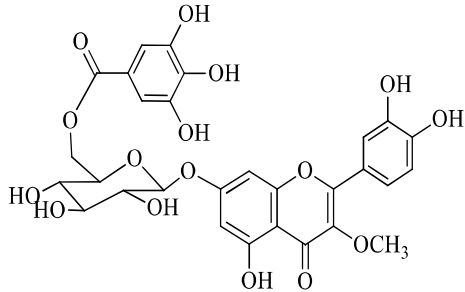
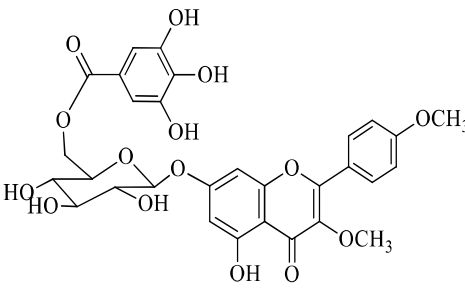
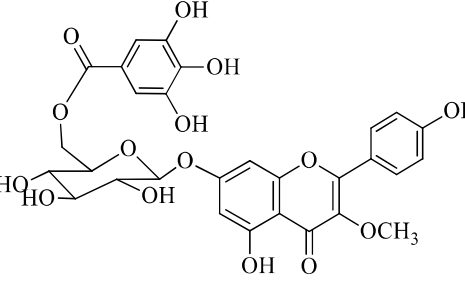
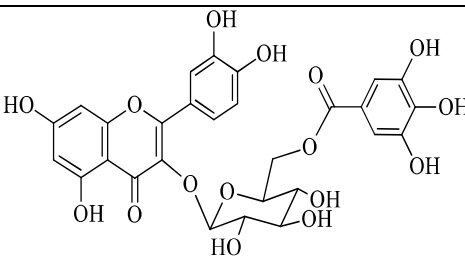
Fumana calycina

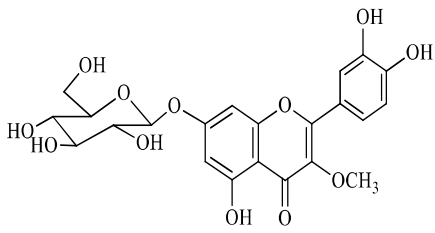
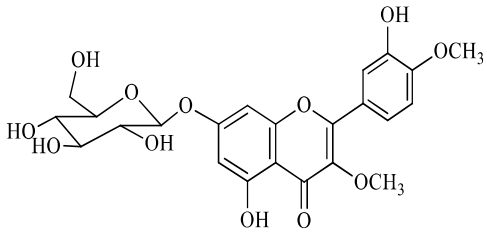
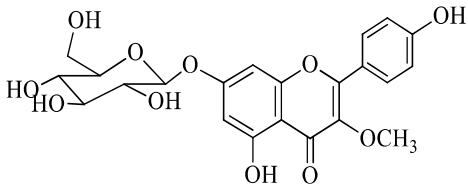
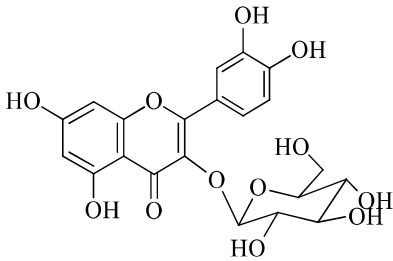
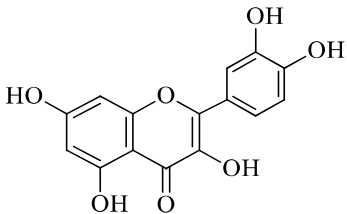
Figure I.3 : Quelques espèces du genre *Fumana*

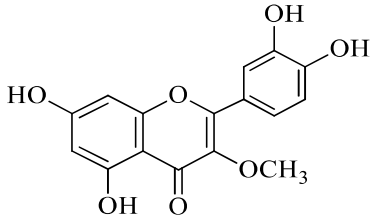
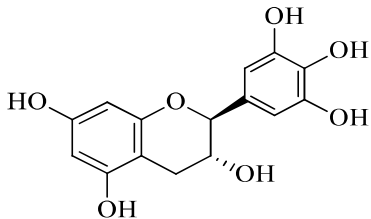
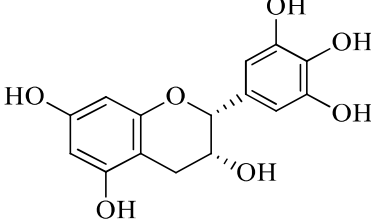
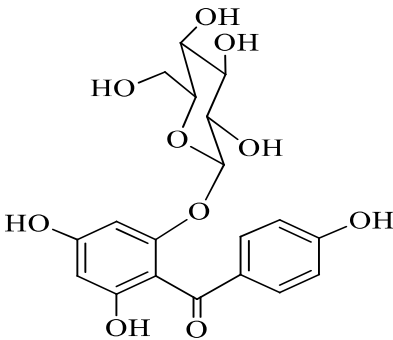
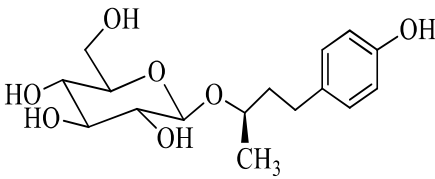
I.2.1. Etudes chimiques antérieures sur le genre *Fumana*

Les travaux de recherches réalisés sur le genre *Fumana*, se sont limités aux trois espèces *Fumana montana*, *Fumana thymifolia* et *Fumana procumbens* [19-20]. Les métabolites secondaires isolés à partir de ces espèces sont regroupés dans le tableau I.3 :

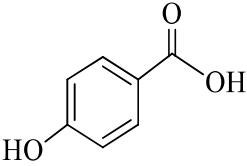
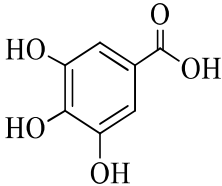
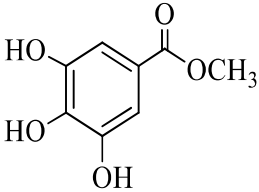
Tableau I.3: Principaux métabolites secondaires isolés du genre *Fumana*

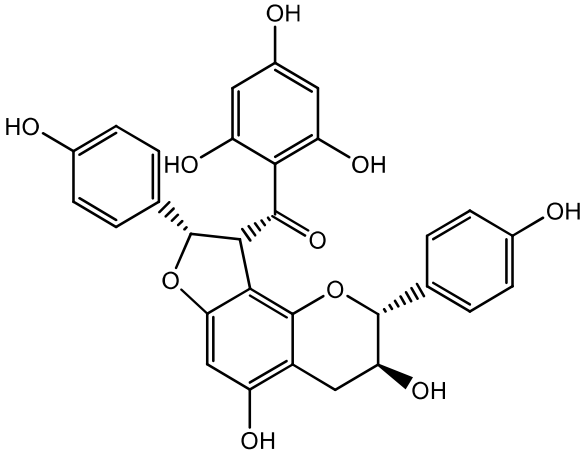
Composés isolés de l'espèce <i>Fumana montana</i> Pomel [19]	
Nomenclature	Structure
3-méthoxy-7-O-β-(6"-galloylglucopyranoside) quercétine	
3,4'-diméthoxy-7-O-β-(6"-galloylglucopyranoside) quercétine	
3-méthoxy-7-O-β-(6"-galloylglucopyranoside) kaempférol	
Tellimoside	

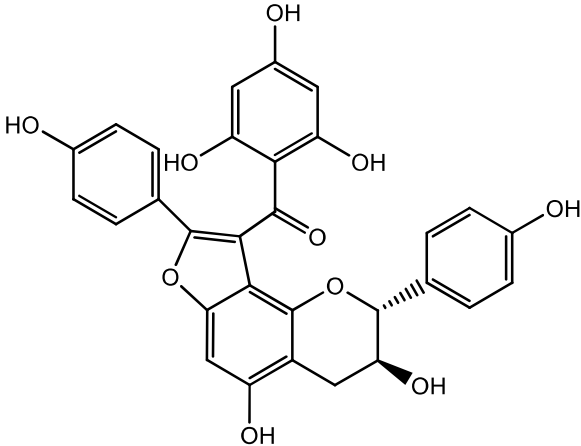
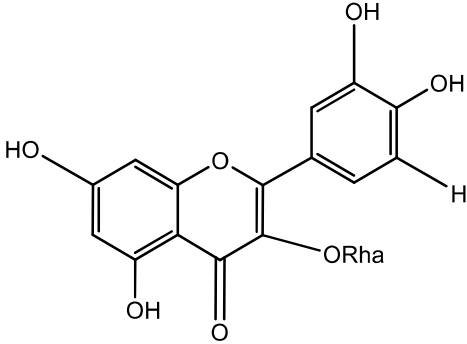
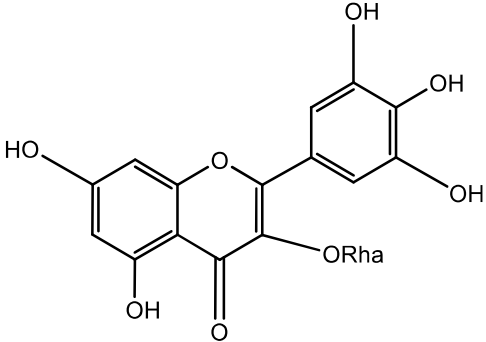
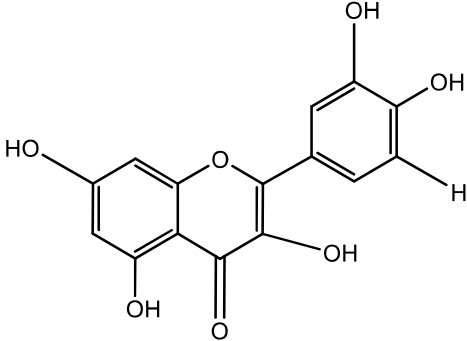
<p>3-méthoxy-7-O-β-glucopyranoside quercétine</p>	 <p>The structure shows a quercetin aglycone with a methoxy group at C-3 and a beta-D-glucopyranoside moiety attached to C-7.</p>
<p>3,4'-diméthoxy-7-O-β-glucopyranoside quercétine</p>	 <p>The structure shows a quercetin aglycone with methoxy groups at C-3 and C-4', and a beta-D-glucopyranoside moiety attached to C-7.</p>
<p>3-méthoxy-7-O-β-glucopyranoside kaempférol</p>	 <p>The structure shows a kaempferol aglycone with a methoxy group at C-3 and a beta-D-glucopyranoside moiety attached to C-7.</p>
<p>Isoquercétrine</p>	 <p>The structure shows a quercetin aglycone with a beta-D-glucopyranoside moiety attached to C-3 and a galactose moiety attached to C-7.</p>
<p>Quercétine</p>	 <p>The structure shows the quercetin aglycone with hydroxyl groups at C-3, C-7, and C-8.</p>

<p>3-méthoxy quercétine</p>	
<p>(-)-Gallocatechine</p>	
<p>(-)-Epigallocatechine</p>	
<p>Iriflophénone-2-O-β-D-glucopyranoside</p>	
<p>(-)-Rhododendrine</p>	

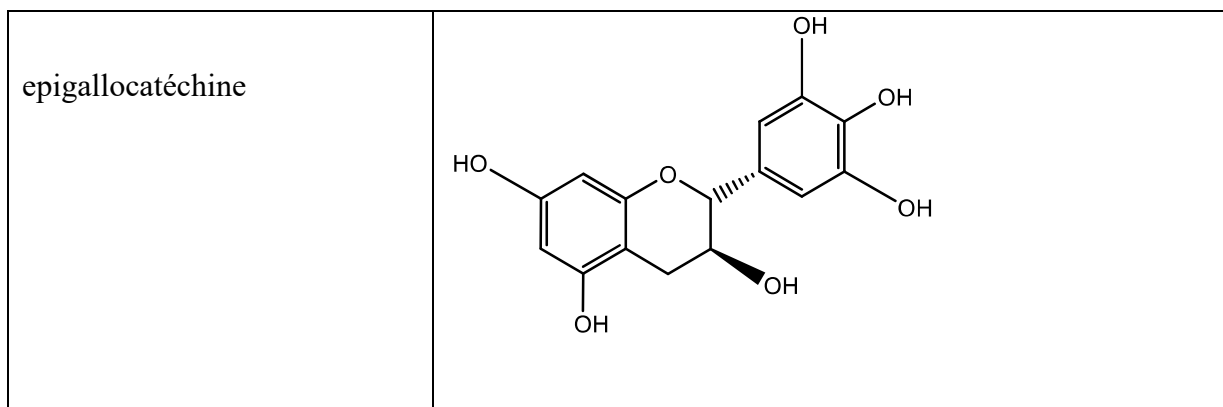
CHAPITRE I généralités sur la famille Cistaceae, genre Fumana

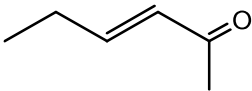
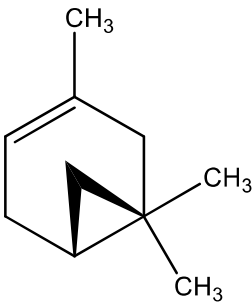
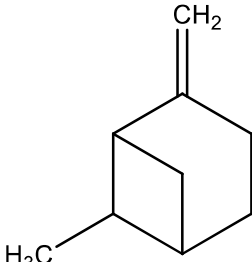
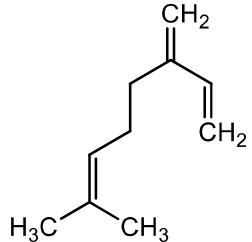
Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	
Acide gallique	
Gallate de méthyle	

Composés isolés de <i>Fumana procumbens</i> [20]	
Nomenclatureur et référence	Structure
dihydrodaphnodorine B	

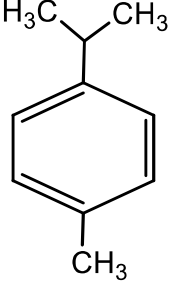
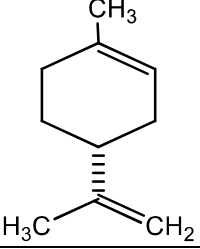
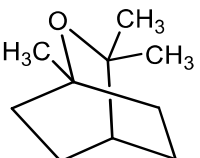
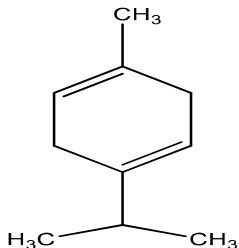
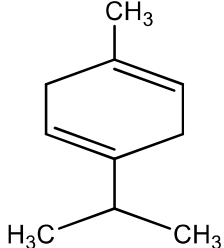
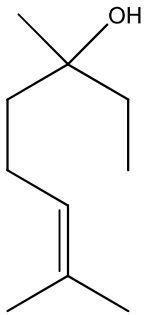
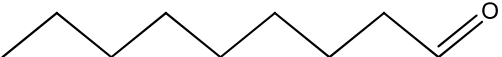
<p>daphnodorin B</p>	
<p>quercitrine</p>	
<p>myricitrine</p>	
<p>quercetine</p>	

CHAPITRE I généralités sur la famille Cistaceae, genre Fumana

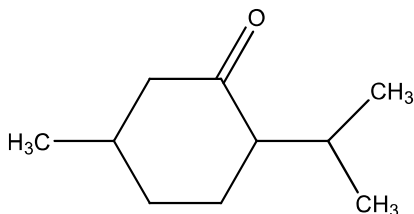
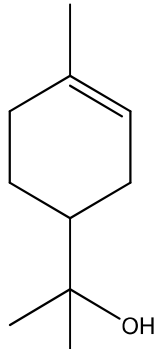
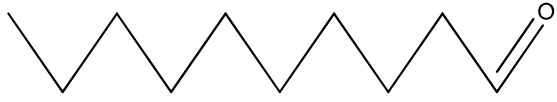
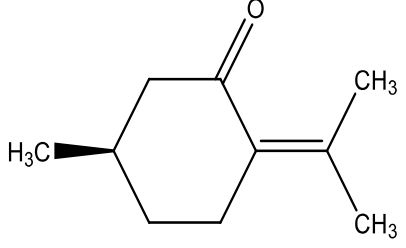
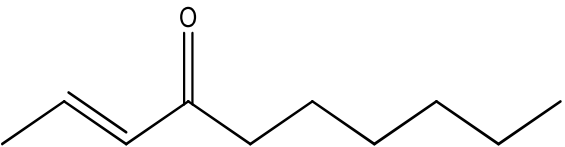
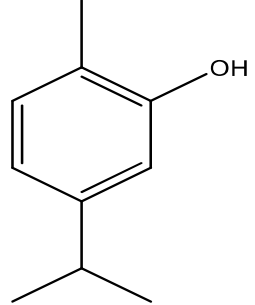


Composition de l'huile essentielle issue de <i>Fumana thymifolia</i> [21]	
Nomenclatureur	Structure
(E) -2-hexénal	
α -pinéne	
β -pinéne	
Myrcéne	


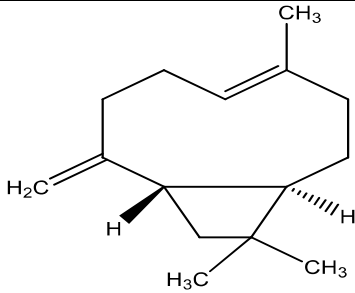
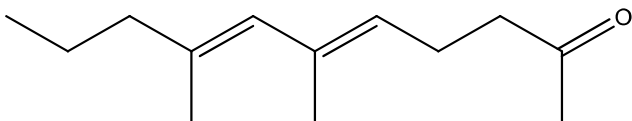
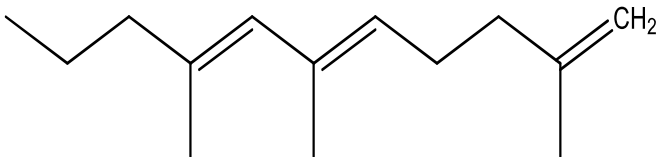
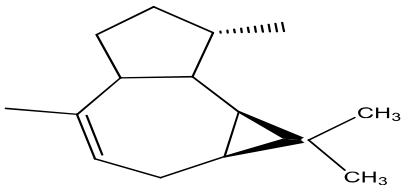
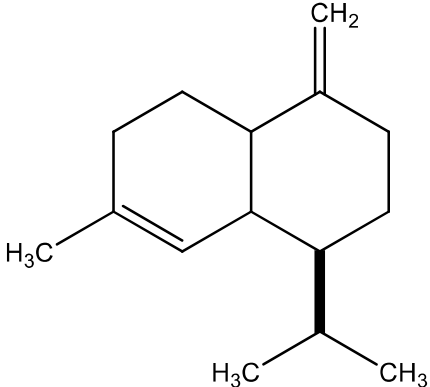
CHAPITRE I généralités sur la famille Cistaceae, genre Fumana

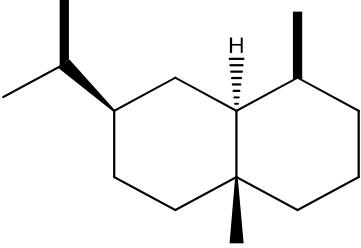
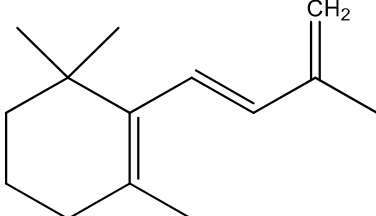
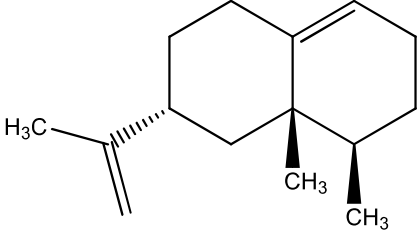
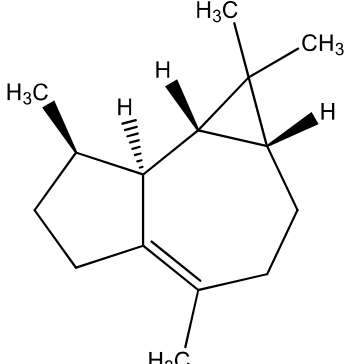
P-cymène	 <chem>CC(C)c1ccc(C)cc1</chem>
Limonène	 <chem>CC(C)=C[C@H]1C=CCCC1</chem>
1,8-cinéole	 <chem>CC1(C)C2CCC1C2O</chem>
γ -terpinène	 <chem>CC(C)C1=CC=C(C)CC1</chem>
Terpinolène	 <chem>CC(C)C1=CC=C(C)CC1</chem>
Linonal	 <chem>CC(C)=CC(O)CC</chem>
Nonanal	 <chem>CCCCCCCCC=O</chem>

CHAPITRE I généralités sur la famille Cistaceae, genre Fumana

Isomenthone	
Terpinéole	
Décanal	
Pulégone	
E-2-décadiéna	
Cavacrol	

CHAPITRE I généralités sur la famille Cistaceae, genre Fumana

(E,E)-2,4-undécanal	
β -caryophyllène	
Geranyl acétone	
E- β -famesène	
Dehydroaromadendrene	
γ -muulrolne	

<p>β -salinéne</p>	
<p>(E)-β-ionone</p>	
<p>Valencéne</p>	
<p>Viridfloréne</p>	

I.3. Espèce *Fumana thymifolia*

Fumana thymifolia provient du nom latin *fumus* qui veut dire « fumé » (allusion à l'aspect grisâtre et enfumé de certaines espèces), tandis que *thymifolius* en liaison avec les feuilles de thym [22].

Fumana thymifolia (L.) Spach ex Webb (Figure I.4), l'objet de cette étude, est une espèce thermophile à caractères héliophile et xérophile. Elle est glanduleuse, atteint 10 à 20 cm de long. Les feuilles persistantes, linéaires à bords plus ou moins enroulés en dessous, les supérieures alternes et les inférieures opposées. Les stipules se terminent par un poil. Les fleurs, réunies en grappe, sont courtes. Les pétales sont jaunes, non tachées à la base [22].



Figure I.4 : *Fumana thymifolia* (fleur, feuille et fruit)

I.3.1. Distribution géographique et position systématique de l'espèce *Fumana thymifolia*

Fumana thymifolia est une espèce méditerranéenne très commune en Algérie et se localise spécialement sur le littoral ou elle accompagne les pinèdes [23]. Elle pousse aussi dans les pâturages rocailloux et calcaires algériens [24]. Elle est classée systématiquement dans le tableau suivant :

Tableau I.4: Position systématique de *Fumana thymifolia*

Classification	
Famille	Cistaceae
Genre	<i>Fumana</i>
Espèce	<i>Fumana thymifolia</i>
Nom commun	Azir nyedhma, rock rose

II.1. Activité anti-oxydante

Nos cellules et tissus peuvent être soumis à une grande variété d'agression physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dû à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène [25].

II.1.1. Stress oxydant

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes de l'organisme en faveur des premiers, ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles [26]. Cette perturbation peut avoir diverses origines, telle que la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants comme la pollution, le contact avec le rayonnement gamma, ultraviolet ou même l'ozone, certains pesticides et solvants, les métaux toxiques, exercice intense ou mal géré, la consommation de tabac et d'alcool et aussi la prise des médicaments (Figure II.1) [27].



Figure II .1 : Stress oxydant

Cependant, le stress oxydatif est un fonctionnement de l'organisme qui est normal tant qu'il ne dépasse pas certaines limites. En effet, tous les organismes vivants qui consomment de l'oxygène produisent des radicaux libres qui sont de petites substances chimiques très oxydées par le contact avec l'oxygène, et dont nos cellules savent normalement très bien se débarrasser. Le stress oxydatif devient anormal lorsque les cellules sont soit dépassées par la quantité de radicaux libres à éliminer, soit ne disposent pas de ressources anti-oxydantes (vitamines, oligoéléments, enzymes) suffisantes pour les éliminer [28].

II.1.1.1. Radicaux libres et espèces réactives

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomiques ou moléculaires) possédant un électron ou plusieurs électrons célibataires non appariés sur son orbitale externe. De ce fait, un radical libre est très réactif et sa durée de vie très courte (de l'ordre 10^{-3} à 10^{-6} seconde) (figure II.2) [29].

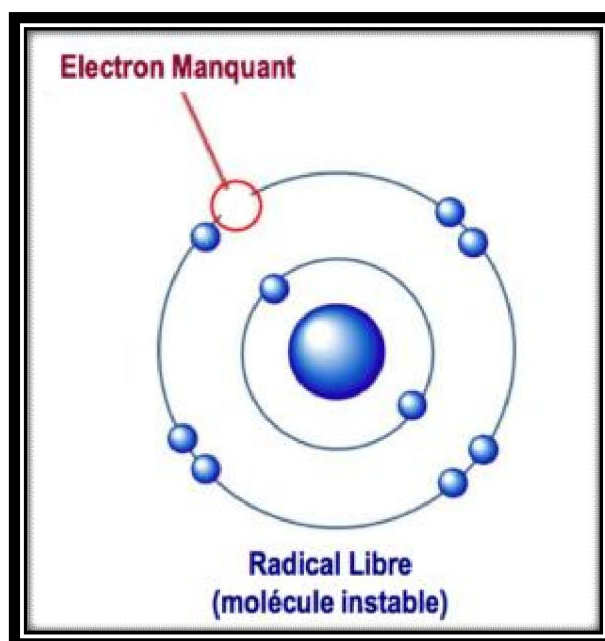


Figure II.2 : Forme d'un radical libre

Les espèces réactives oxygénées ERO, classe spécifique de radicaux, incluant les radicaux libres comme le radical hydroxyl ($\text{OH}\cdot$), le radical superoxyde ($\text{O}_2\cdot$) et sa forme

protonnée (HO_2^\cdot), le radical peroxy (ROO^\cdot) ainsi que les espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène (O_2) sont produits par divers mécanismes physiologiques à dose raisonnable (Figure II.3) [30]. Ces espèces réactives de l'oxygène doit être neutralisées immédiatement par différents systèmes antioxydants [31].

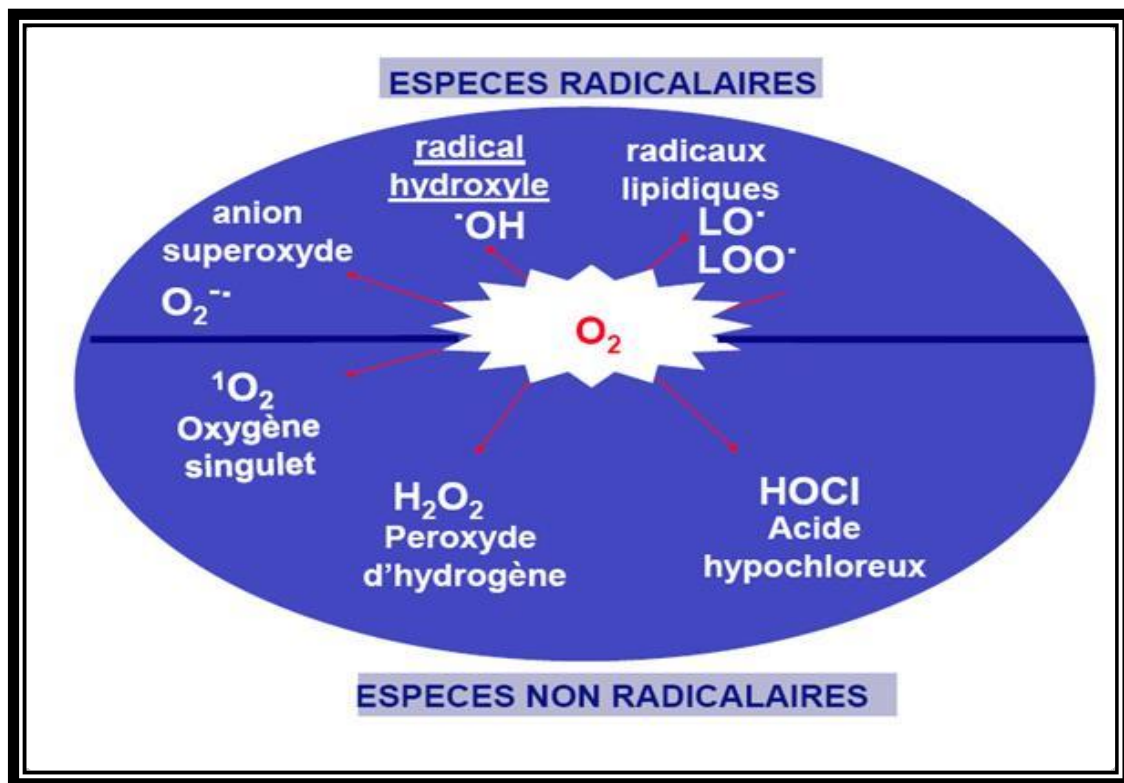


Figure II.3: Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO)

II.1.1.2. Origines des espèces réactives de l'oxygène

Il existe deux sources différentes de ces radicaux libres :

➤ Production endogène

La chaîne respiratoire mitochondriale, dans laquelle les êtres aérobies puisent leur énergie, joue un rôle capital dans la cellule en couplant l'oxydation de coenzymes transporteurs d'hydrogène ou d'électrons avec la phosphorylation de l'ADP (Adenosine DiPhosphate) en ATP (Adenosine TriPhosphate). Les conséquences de cette activité mitochondriale sont doubles et paradoxales. D'une part, la mitochondrie fournit à la cellule une source d'énergie importante puisque 36 molécules d'ATP à haut potentiel énergétique sont générées lors de la réduction de l'oxygène. Par contre, dans les conditions

physiologiques, environ 0,4 à 4 % d'électrons s'échappent, réagissent directement avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme et donnent naissance à des ERO (Figure II.4) [32-33].

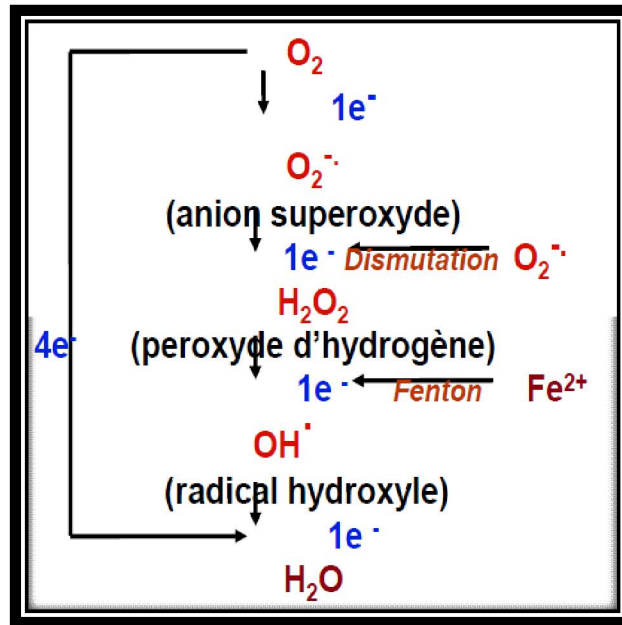


Figure II.4 : Formation des Espèces Réactives résulte d'une réduction progressive de l'oxygène

➤ Formation par voie exogène

Les ERO peuvent également être générées par différents agents non enzymatiques comme les rayonnements UV induisant la synthèse de radicaux libres ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot}) et des molécules génératrices de radicaux libres (H_2O_2) par l'intermédiaire d'agents photosensibilisants, ainsi que les radiations ionisantes (Figure II.5). L'ingestion d'alcool ou de médicaments est suivie de formation de radicaux libres selon divers mécanismes dont leurs structures peuvent jouer le rôle d'accepteurs et de donateurs d'électrons [34].

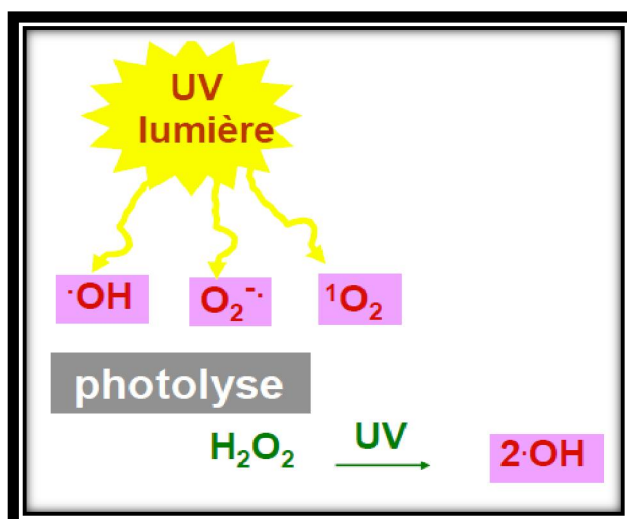


Figure II.5: Radiations UV de la lumière

II.1.2. Maladies liées aux stress oxydatifs

De nombreuses anomalies pathologiques sont induites par le stress oxydant : baisse de la fluidité des membranes, diminution de la sensibilité à l'insuline, perturbation de l'immunité cellulaire, fibrose, dépôts de lipides oxydés, affaiblissement musculaire, lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides, malformation des fœtus, formation d'auto-anticorps et immunosuppression [35].

En conséquence, le stress oxydant sera la cause initiale essentielle de plusieurs maladies telles que le cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse pulmonaire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, parkinson, infections intestinales, rhumatisme et diabète [36-37].

II.1.3. Antioxydants et système de défense

Les antioxydants, analogues de l'acide ascorbique, sont des substances naturellement présentes dans l'organisme capables de neutraliser ou stabiliser les radicaux libres par résonance (Figure II.6).

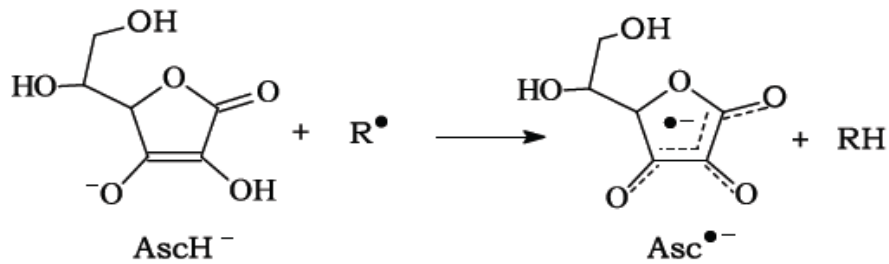


Figure II.6 : Actions de la vitamine C sur les radicaux actives

En effet, les cellules disposent d'un ensemble complexe de défenses anti-oxydantes (Figure II.7). Ces derniers peuvent se diviser en systèmes non enzymatiques ; apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque ; et systèmes enzymatiques qui se composent d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases [38].

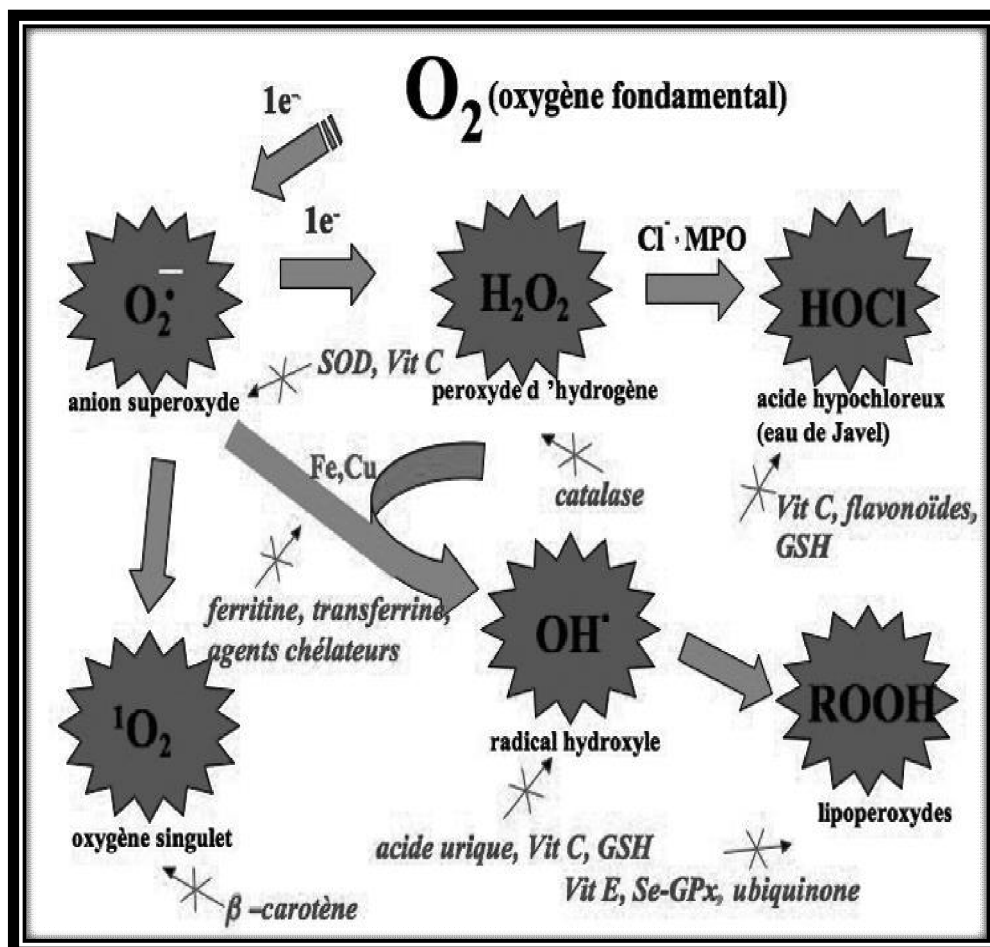


Figure II.7 : Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (ERO) et des antioxydants régulateurs de leur production

II.1.4. Méthodes d'évaluation de propriété anti-oxydante *in vitro*

L'activité anti-oxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques (acide gallique) (Figure II.8).

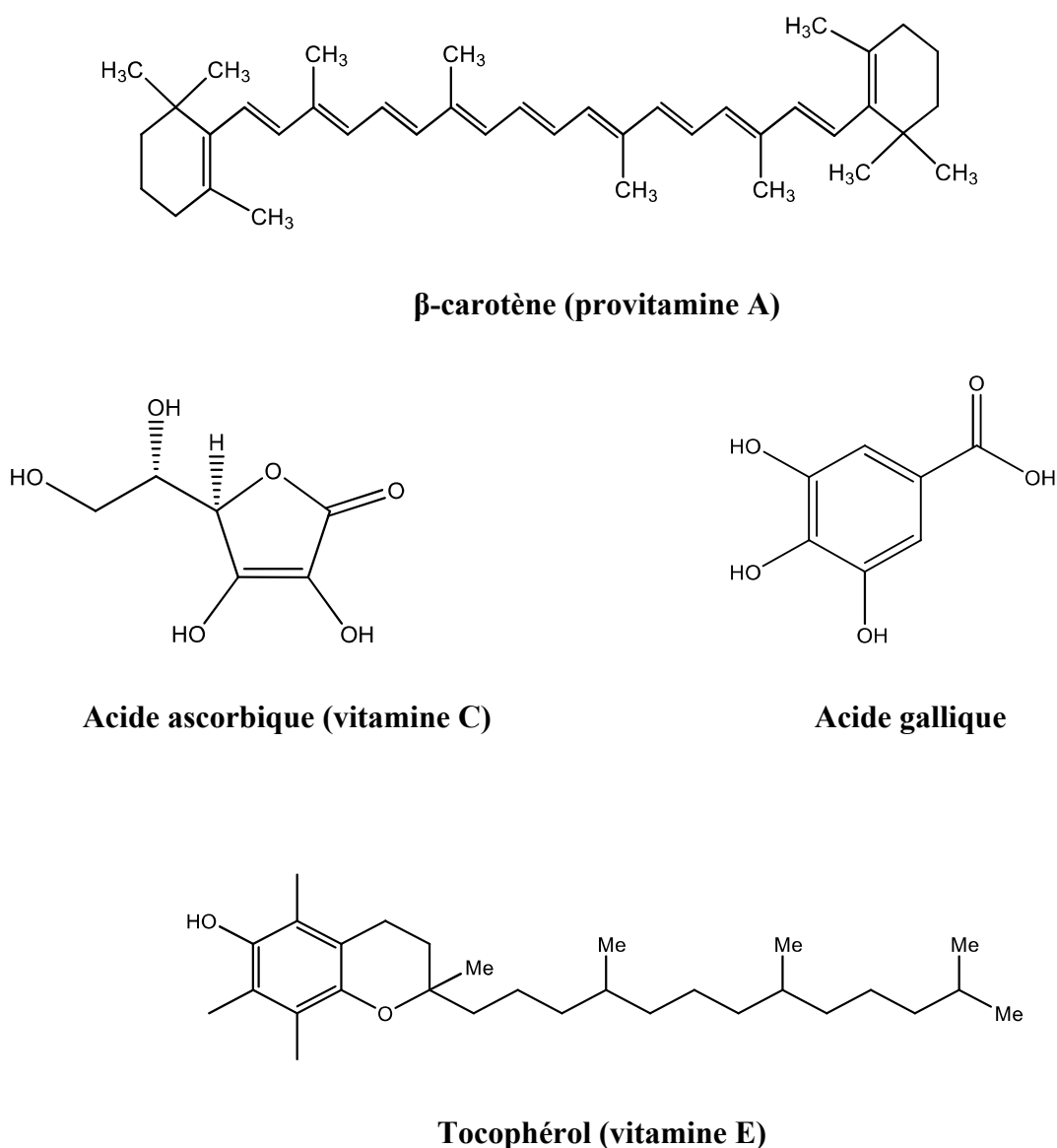


Figure II.8 : Structure des antioxydants les plus connus

En revanche, la plupart des structures des antioxydants possèdent des groupes hydroxyphénoliques dont leurs propriétés anti-oxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH^\bullet) et superoxydes (O_2^\bullet) [39].

Plusieurs méthodes sont disponibles pour évaluer, *in vitro*, l'activité anti-oxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes ROO^\bullet par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) [40]. et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) [41]. les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) [42]. ou les radicaux ABTS^\bullet (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) [43]. ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH $^\bullet$ (diphényl-picrylhydrazyle) [44].

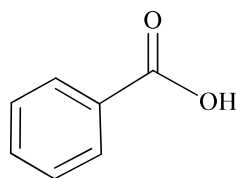
De point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH $^\bullet$ est recommandé pour des composés possédant la fonction OH [45]. Il s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles. Le test est largement utilisé au niveau de l'évolution des extraits naturels très riches en composés phénoliques [46-47].

II.2. Composés phénoliques

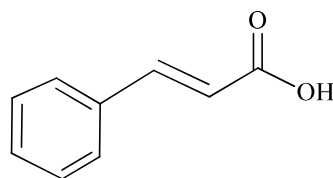
Les composés phénoliques (polyphénols) forment une grande classe des métabolites secondaires des végétaux. Ils sont largement présents dans tous les organes de la plante [48]. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou substitués [49]. Ces composés sont polyhydroxylés et comprenant au moins un noyau aromatique à 6 carbones. Cette classe de métabolites secondaire très importante, est subdivisée généralement en sous classes principales : acides phénoliques, flavonoïdes, tannins...etc [50].

II.2.1. Acides phénoliques

Le terme acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ces composés regroupent les acides benzoïques et hydroxycinnamiques.



Acide benzoïque

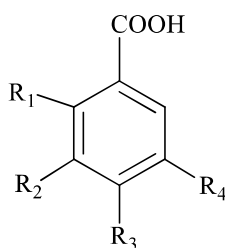


Acide cinnamique

On distingue deux classes appartenant à cette catégorie. Les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique

➤ **Acide phénols dérivés de l'acide benzoïque**

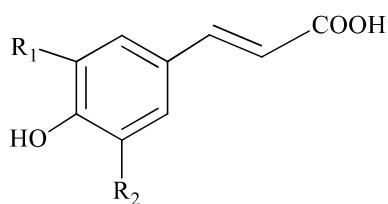
Les acides phénols dérivés de l'acide benzoïque, sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside. L'acide gallique et son dimère (l'acide hexahydroxydiphénique) sont les éléments constitutifs des tannins hydrolysables. D'autres aldéhydes correspondants à ces acides, comme la vanilline, est très utilisé dans le secteur pharmaceutique [51].



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Acide <i>p</i> -hydroxy benzoïque	H	H	OH	H
Acide protocatéchique	H	OH	OH	H
Acide vanillique	H	OH	OH	OCH ₃
Acide gallique	H	OH	OH	OH
Acide syringique	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Acide salicylique	OH	H	H	H
Acide gentisique	OH	H	H	OH

➤ **Acides phénols dérivés de l'acide cinnamique**

Les acides hydroxycinnamiques sont principalement composés des acides *p*-coumarique, caféique, férulique et sinapique [52]. On les trouve à l'état libre ou combiné (esters, amide, glucosides). Ils acylent fréquemment les métabolites les plus divers [53].



	R ₁	R ₂
Acide <i>p</i> -coumarique	H	H
Acide caféique	H	OH
Acide férulique	H	OCH ₃
Acide sinapique	OCH ₃	OCH ₃

II.2.2. Flavonoïdes

Les polyphénols, en particulier les flavonoïdes, sont présent dans de nombreux organismes (végétaux, fruits et légumes), que ce soit au niveau de leurs feuilles, tiges, fleurs et fruits [54]. Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (C6-C3-C6) c'est-à-dire contiennent quinze atomes de carbone formant deux cycles aromatiques A, B et C (Figure II.9) [55].

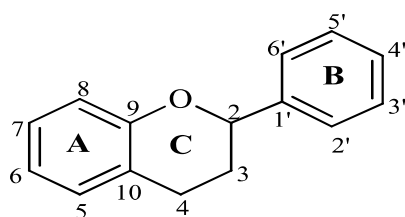
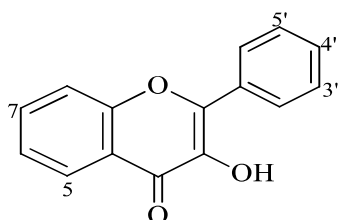
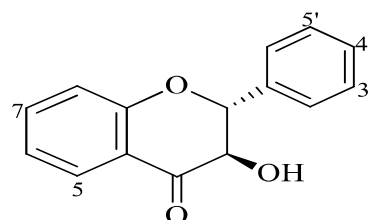


Figure II.9: Squelette de base des flavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs groupes selon le degré d'oxydation du cycle pyranique (C). En général, les flavonoïdes peuvent être hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4', 5' et/ou 6'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Ils peuvent être présents sous forme *C*- ou *O*-glycosylés [56]. En conséquent, on distingue les principales classes suivantes (Figure II.10) :



Flavonols



Dihydroflavonols

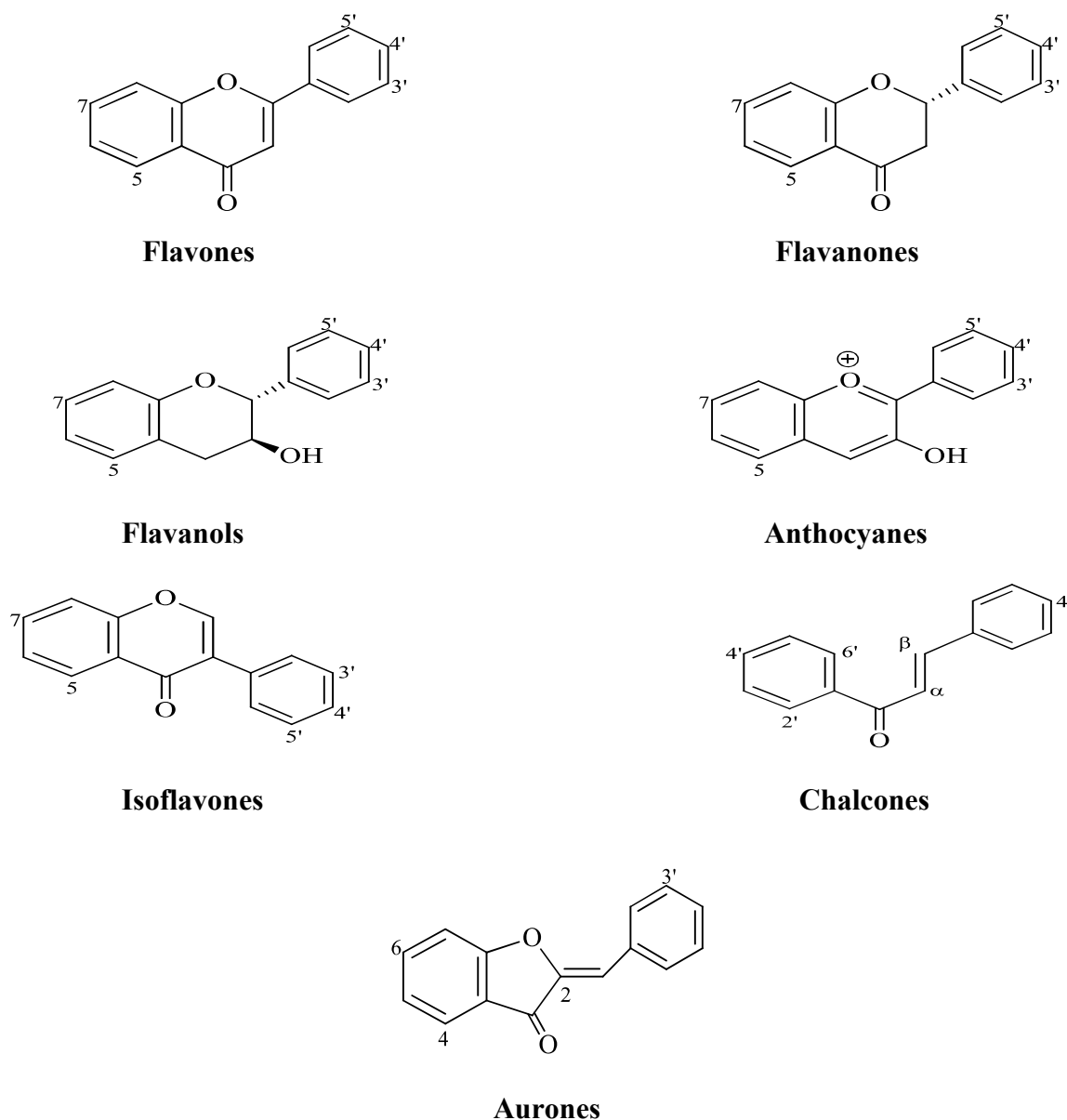


Figure II.10: Structures des différents squelettes flavonoïdiques

II.2.3. Tanins

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire élevée [57-58]. Les tanins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, bois, feuilles, fruits et racines [59].

Il existe deux groupes différents par leurs structures et également par leurs origines biogénétiques: Tanins hydrolysables et Tanins condensés.

➤ **Tanins saponifiables ou hydrolysables**

Les tanins hydrolysables sont des esters de glucides ou d'acides phénols (acide gallique), ou de dérivés d'acides phénols (Acide ellagique) (Figure II.11). La molécule glucidique est en général du glucose, mais dans certains cas des polysaccharides. Ces tanins en raison de leurs nombreux groupements OH se dissolvent plus ou moins (en fonction de leur poids moléculaire) dans l'eau, en formant des solutions colloïdales [60-61].

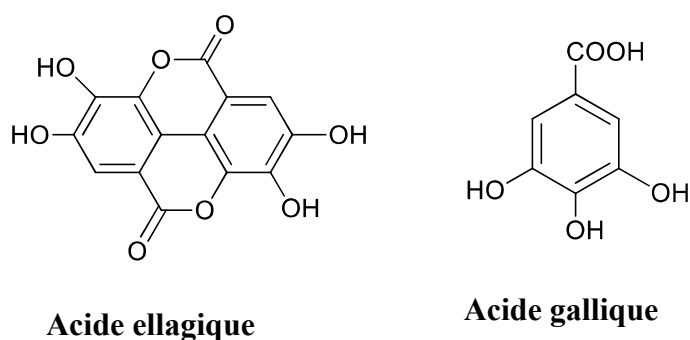


Figure II.11: Acides gallique et ellagique

➤ **Tanins condensés (pyrocatéchique ou proanthocyanidols)**

Les tanins condensés, appelés aussi polyphénols ou procyanidoliques, sont largement répandus dans l'alimentation humaine. Ces tanins sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols (Figure II.12) qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison inter monomérique [62].

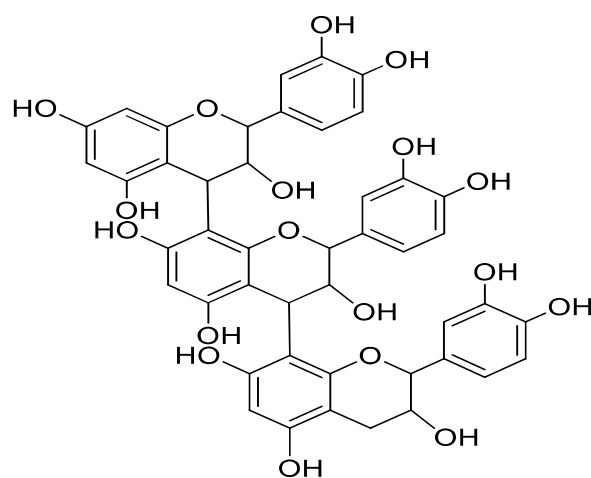


Figure II.12 : Tanins condensés (dimérisation au niveau de liaisons C4-C8)

II.2.3. Polyphénols et santé

Une alimentation (fruits et légumes) contenant les flavonoïdes (Figure II.13), joue un rôle important dans la prévention contre le cancer de la prostate, du poumon, de l'estomac et du sein [63].

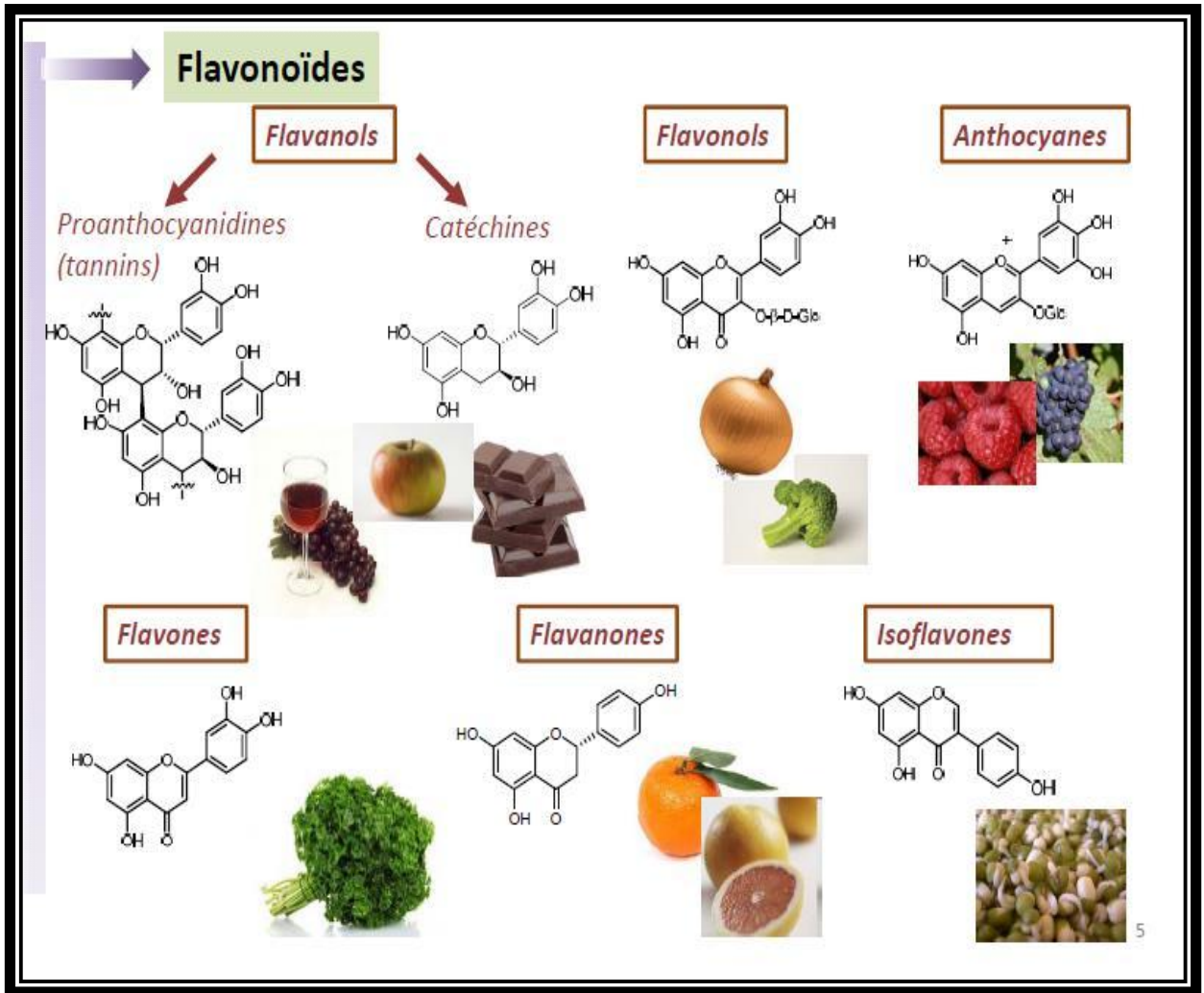


Figure II.13 : Alimentation riche en flavonoïdes (polyphénols)

Des effets protecteurs de la consommation d'aliments riches en polyphénols vis-à-vis de différentes pathologies (maladies cardiovasculaires, neurologiques, cancer...) ont été mis en évidence d'un point de vue épidémiologique ainsi qu'expérimental (Figure II.14) [64].

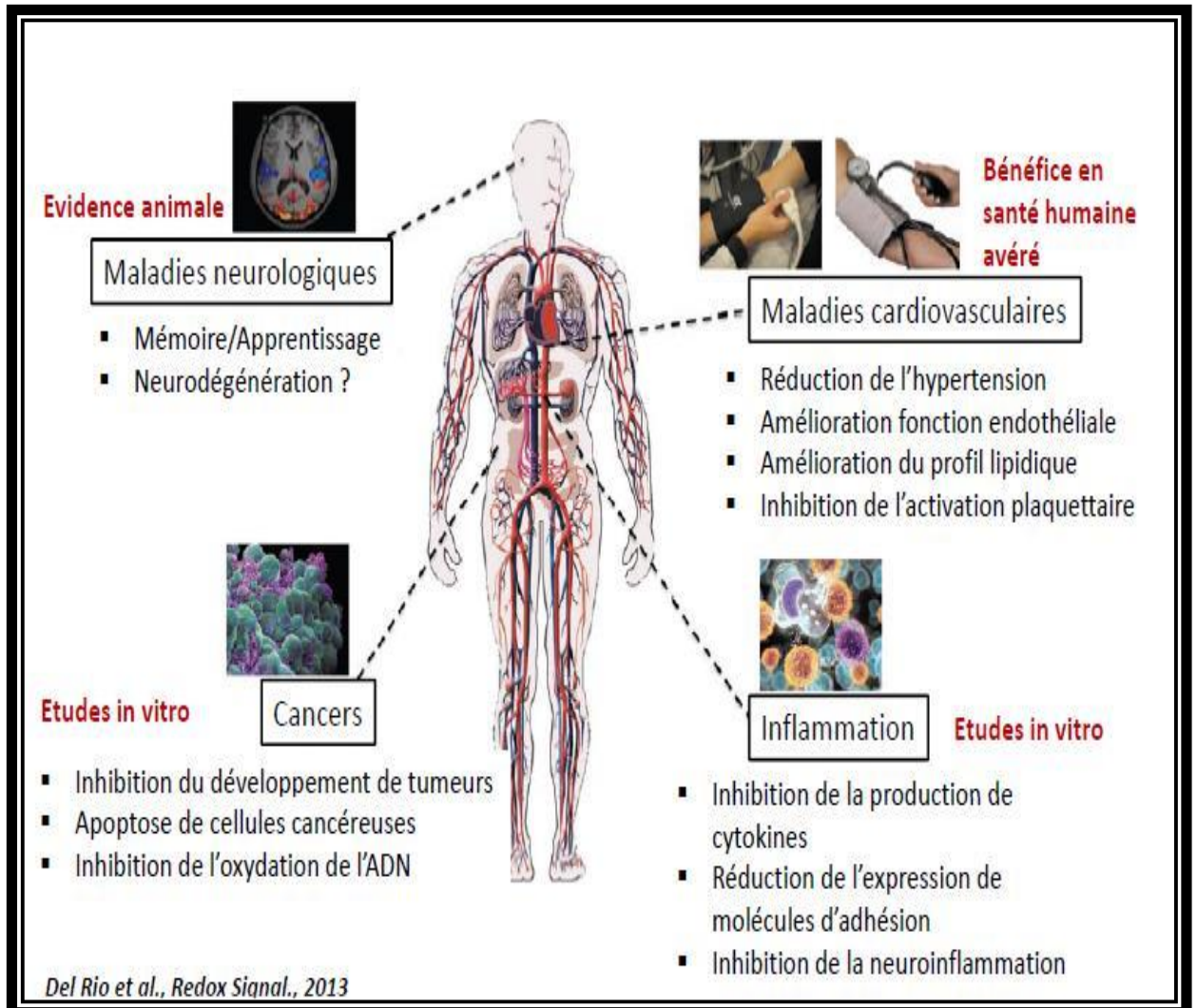


Figure II.14 : Effets santé potentiels des polyphénols végétaux

III.1. Récolte de la plante *Fumana thymifolia*

La plante *Fumana thymifolia* a été récoltée dans la région de Djarema (Willaya de batna), au mois de mai 2013. Cette plante a été identifiée par le professeur Bachir Oudjehih du département d'agronomie de l'Institut des sciences Vétérinaires et Agronomiques de l'université Batna-1.

III.2. Procédure de l'extraction

La matière végétale (plante entière) doit être séchée à l'abri de la lumière, ensuite coupée en petit morceaux pour les broyer.

III.2.1. Macération de la poudre

1 kg de la poudre obtenue sont mise à macérer dans un mélange hydro-alcoolique (éthanol/eau : 70/30 %) pendant 48h sous agitation et à température ambiante (opération répétée deux fois) (figure III.1).



Figure III.1 : Macération pendant 48h à T° ambiante

III.2.2. Filtration des macérats

Les différents macérats obtenus sont filtrés par une filtration simple, ensuite les filtrats récupérés pour les évaporer (Figure III.2).



Figure III.2 : Etape de filtration

III.2.3. Evaporation des filtrats

Après évaporation non à sec des filtrats par un appareil rotavapeur, 600 ml d'extrait aqueux ont été obtenus (figure III.3).



Figure III.3 : Evaporation non à sec des filtrats

III.2.4. Préparation des différents extraits

L'extrait aqueux obtenu a subi des extractions liquide-liquide (Figure III.4) successives au moyen de trois solvants organique de polarité croissante : éther de pétrole, acétate d'éthyle et *n*-butanol. L'évaporation à sec des différents solvants a permis d'obtenir les trois extraits : étheropétrolique (5 g), acétate d'éthyle (14 g) et butanolique (41 g).



Figure III.4 : Différentes étapes pour l'obtention des extraits secs

III.1.2. Tests des extraits obtenus sur CCM

Les extraits obtenus (EP, AcOEt et *n*-BuOH) sont testés sur une chromatographie sur couche mince de gel de silice. Les plaques CCM réalisées dans différents systèmes d'éluion, sont examinées sous la lumière UV à 254 et 366 nm, puis révélées en utilisant une solution acide (10 ml acide acétique, 10 ml acide sulfurique, 80 ml H₂O) et chauffage à 100°C.



Figure III .5 : Chromatogrammes des extraits obtenus (EP, AcOEt et *n*-BuOH) dans différents systèmes d'élution

III.2. Dosage des composés phénoliques

La plante *Fumana thymifolia*, appartenant à la famille Cistaceae, a été choisie pour l'évaluation de l'activité anti-oxydante sur la base de sa richesse en composés phénoliques. La recherche bibliographique réalisée sur les plantes Cistaceae en générale et les *Fumana* en particulier, ainsi que l'analyse des chromatogrammes des extraits AcOEt et *n*-BuOH, ont confirmée cette richesse. En conséquent, la teneur en composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins) de nos extraits choisis est déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis de marque DR2800 HACH LANGE (Figure III.6).



Figure III.6 : Spectrophotomètre UV-Vis

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert.

Tous les dosages des composés phénoliques, également le test DPPH ont été réalisés dans le laboratoire de phytochimie du Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides, Biskra (Algérie).

III.2.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT)

➤ Principe

Le dosage des polyphénols se fait avec le réactif de Folin-Ciocalteu, qui en milieu alcalin se réduit en oxyde de tungstène et de molybdène donnant une couleur bleue en présence de polyphénols [65]. Le réactif FCR est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de coloration jaune. Lors de l'oxydation, il est réduit en mélange d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait analysé.

➤ **Protocole**

1. Préparation des échantillons

1 mg de chaque extrait (AcOEt et *n*-BuOH) sont dilués dans 1 µl du méthanol (Figure III.7). La même dilution est utilisée dans tous les protocoles des dosages.



Figure III.7 : Etapes de préparation des dilutions des extraits AcOEt et *n*-BuOH

2. Préparation de la gamme d'étalon de l'acide gallique

On réalise une gamme d'étalonnage en milieu aqueux (6 points de concentrations à partir de A1 jusqu'à A6, voir annexe) avec un polyphénol témoin, en général de l'acide gallique (2 g de l'AG dissoudre dans 2 ml d'eau distillée pour obtenir la solution S1).

On peut représenter la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Figure III.8) en prenant la concentration (mg/ml) en fonction de l'absorbance, le coefficient de corrélation $R^2 = 0,98646$.

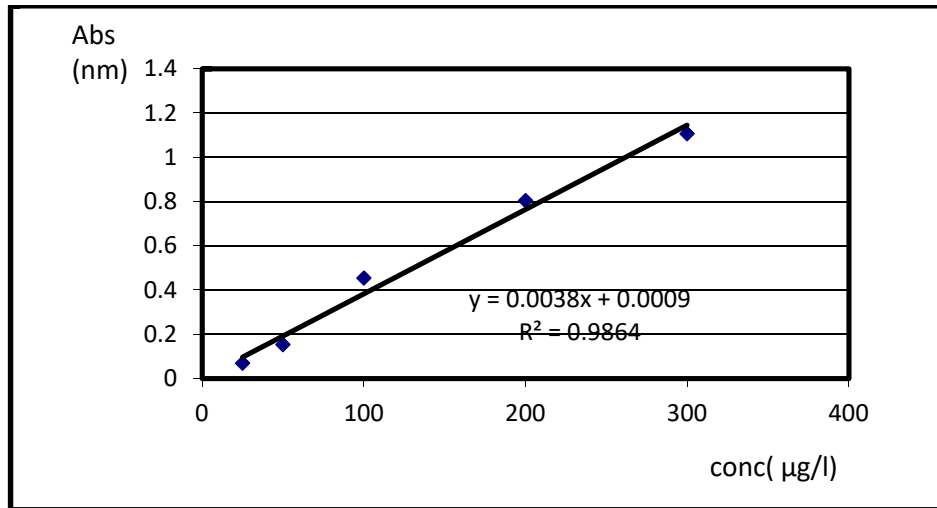


Figure III.8 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm de trois essais SD)

3. Mode opératoire de la méthode de Folin-Ciocalteu

Brièvement 125 μ l d'extrait de l'échantillon (AcOEt ou *n*-BuOH) ont été ajoutés à 125 μ l de réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué). Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 3 minutes à une température ambiante.

Après l'incubation 1250 μ l de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (75 g/l) a été ajoutée. Le mélange a été ensuite ajusté avec 1 ml d'eau distillé puis incubé pendant 90 min dans l'obscurité à température ambiante (Figure III.9). L'absorbance a été mesurée à la longueur d'onde $\lambda = 760$ nm.

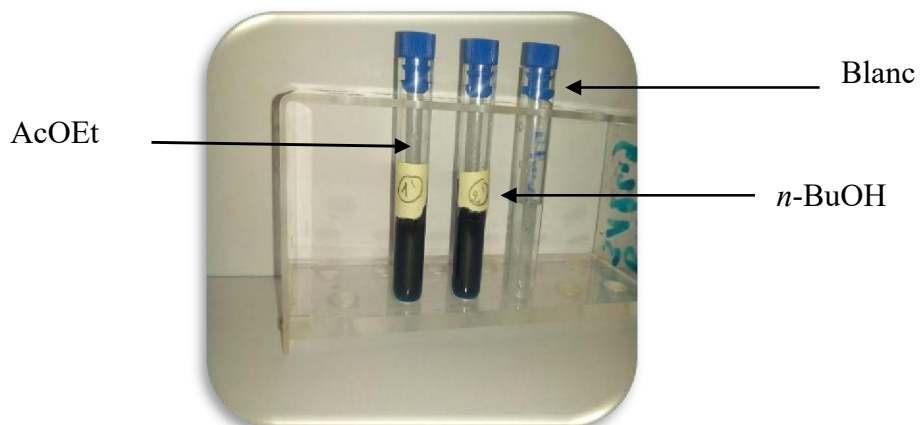


Figure III.9 : Solutions préparées selon la méthode de **Folin-Ciocalteu**, après l'incubation

A partir de la courbe d'étalonnage précédente, la concentration des polyphénols totaux des extraits est calculée. Le résultat est exprimé en μg d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (μg EAG/mg d'extrait).

III.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)

➤ Principe

La quantification des flavonoïdes dans les extraits acétate d'éthyle et butanolique de la plante *Fumana thymifolia*, a été faite par la méthode colorimétrique de trichlorure d'aluminium [66].

➤ Protocol

250 μl d'extrait dilué (AcOEt ou *n*-BuOH) sont ajoutés à 75 μl d'une solution de NaNO_2 à 5%. Après 6 mn d'incubation à température ambiante, 150 μl d'une solution fraîchement préparée de chlorure d'aluminium (AlCl_3 , 10%) sont ajoutés au mélange précédent. Après 5 mn de repos, toujours à température ambiante, 500 μl de soude (NaOH , 1M) sont additionnés. Le mélange homogène résultant est ajusté à 2500 μl avec de l'eau distillée (Figure III.10). L'absorbance de cette préparation est mesurée à 510 nm.

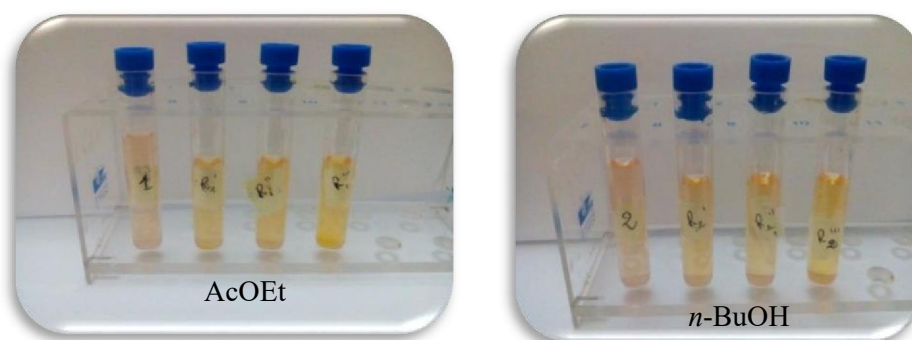


Figure III.10: Echantillons préparés pour la mesure de l'absorbance (dosage des flavonoïdes)

La concentration des flavonoïdes dans les extraits est calculée à partir de la gamme d'étalonnage de la catéchine (Figure III.11) et exprimées en mg d'équivalents de la catéchine par gramme d'extrait (mg EC g^{-1} extrait).

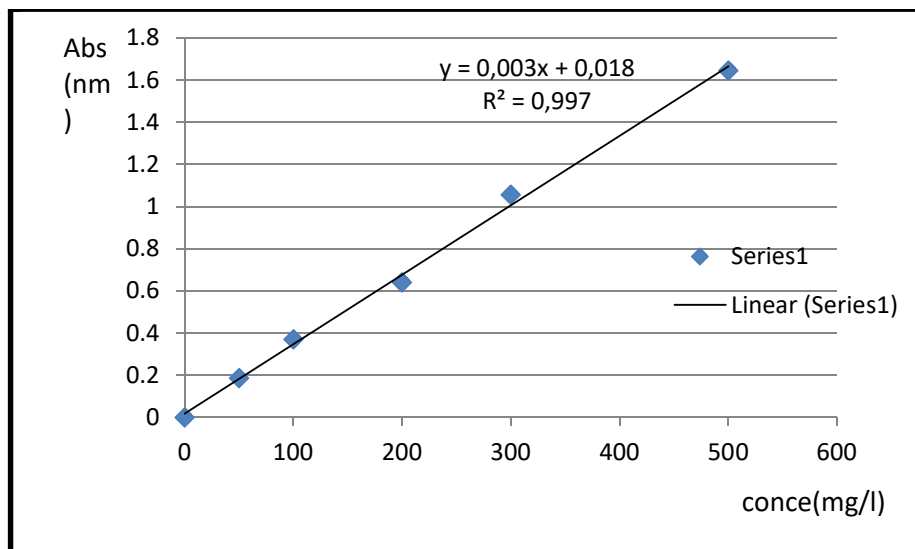


Figure III.11 : Droite d'étalonnage de la catéchine (moyenne \pm de trois essais SD)

III.2.3. Dosage des tanins condensés (TC)

➤ Principe

En milieu acide, les tanins condensés se dépolymérisent et par réaction avec la vanilline, se transforment en anthocyanidols de couleur rouge, mesurables par spectrophotométrie à 500 nm [67].

➤ Protocol

Une aliquote de 0,05 ml d'extrait est ajoutée à 1,5 ml de vanilline à 4% et 750 ml d'acide chlorhydrique (HCl). Le milieu réactionnel est mélangé grâce à un vortex, laissé à incuber pendant 20 minutes puis analysé en spectrophotométrie à 500 nm contre un blanc contenant de l'acétone 80 %.

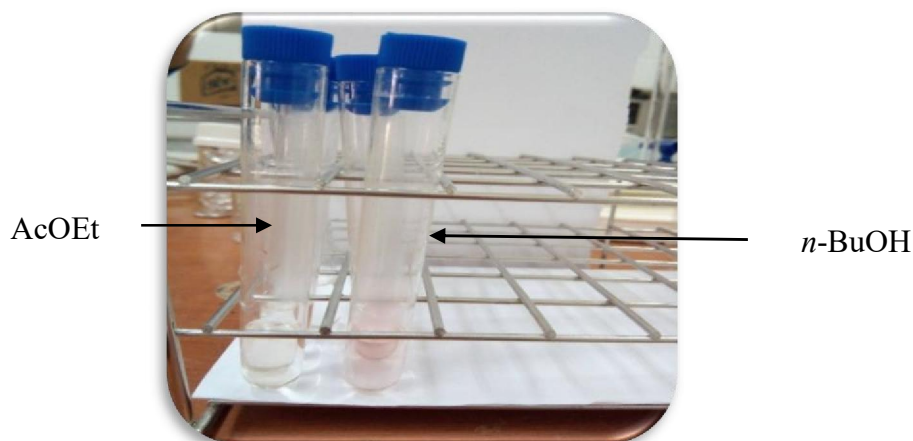


Figure III.12 : Echantillons préparés pour la mesure de l'absorbance (dosage des tanins)

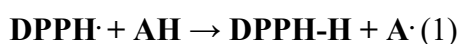
Les teneurs en tanins condensés sont déterminées en se référant à une gamme étalon de catéchine (0 à 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Figure III.12). Comme pour les flavonoïdes, les teneurs en tanins condensés sont exprimées en mg d'équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg EC g^{-1} extrait).

III.3. Evaluation *in vitro* de l'activité anti-oxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro*, l'activité anti-oxydante. De ce cadre, nous nous sommes intéressés à l'évaluation du pouvoir antioxydant des deux extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Fumana thymifolia* en vue de leur valorisation en tant qu'antioxydants. En effet, on a choisi pour cette étude une méthode de mesure de la capacité antiradicalaire à l'aide du DPPH•.

III.3.1. Test du radical libre DPPH

A température ambiante, le radical synthétique 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) présente une intense coloration violette qui disparaît au contact d'une substance donneuse de protons selon la formule suivante (1):



(violet)

(Jaunâtre)

Il est donc possible de détecter la diminution de l'intensité de cette coloration par spectrophotométrie. Cette décoloration met en évidence le pouvoir antioxydant d'un échantillon par sa capacité à piéger le radical libre (figure III.13).

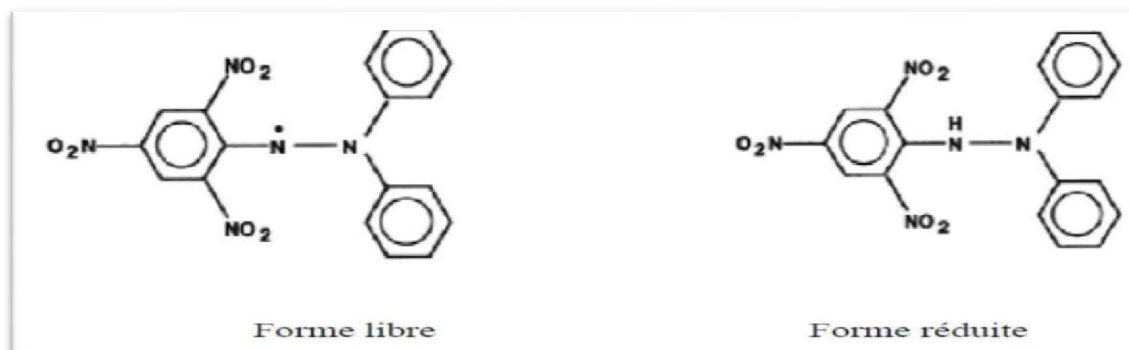


Figure III. 13: Structure chimique du radical synthétique DPPH· et du DPPH-H (non radicalaire)

➤ Mode opératoire

Pour la mesure de cette activité antiradicalaire, une prise d'essai de 1 ml d'extrait à différentes concentrations est mise en présence de 250 μ l d'une solution méthanolique de DPPH (0,2 mM). Le mélange est placé pendant 30 mn à l'obscurité pour réagir [68]. L'absorbance est mesurée à 517 nm contre un témoin négatif (sans extrait). Le témoin positif utilisé est un antioxydant de synthèse: le 2,6-di-t-butyl-4-méthylphenol ou butylhydroxytoluène (BHT) (figure III.14).

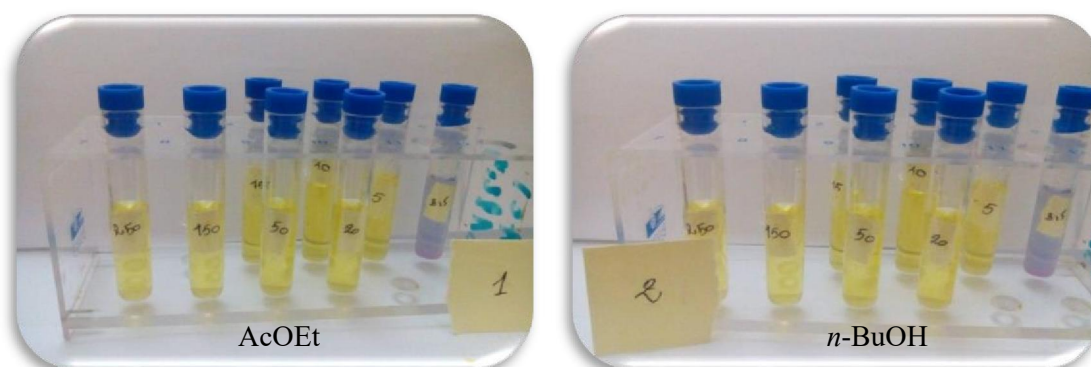


Figure III.14 : Changement de couleur des échantillons de violet au jaune

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition, calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange, selon la formule :

$$PI = (DO \text{ témoin} - DO \text{ extrait} / DO \text{ témoin}) * 100$$

PI : pourcentage d'inhibition.

DO témoin : absorbance du témoin négatif.

DO extrait : absorbance de la solution d'extrait

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

III.4. Analyse statistique

Les résultats expérimentaux des dosages et de l'évaluation de l'activité anti-oxydante ont été exprimés par la moyenne \pm écart type en utilisant les programmes: Excel 2007 et MINITAB 2000.

IV.1. Extraction

Le processus d'extraction est résumé par l'organigramme suivant (Figure IV.1)

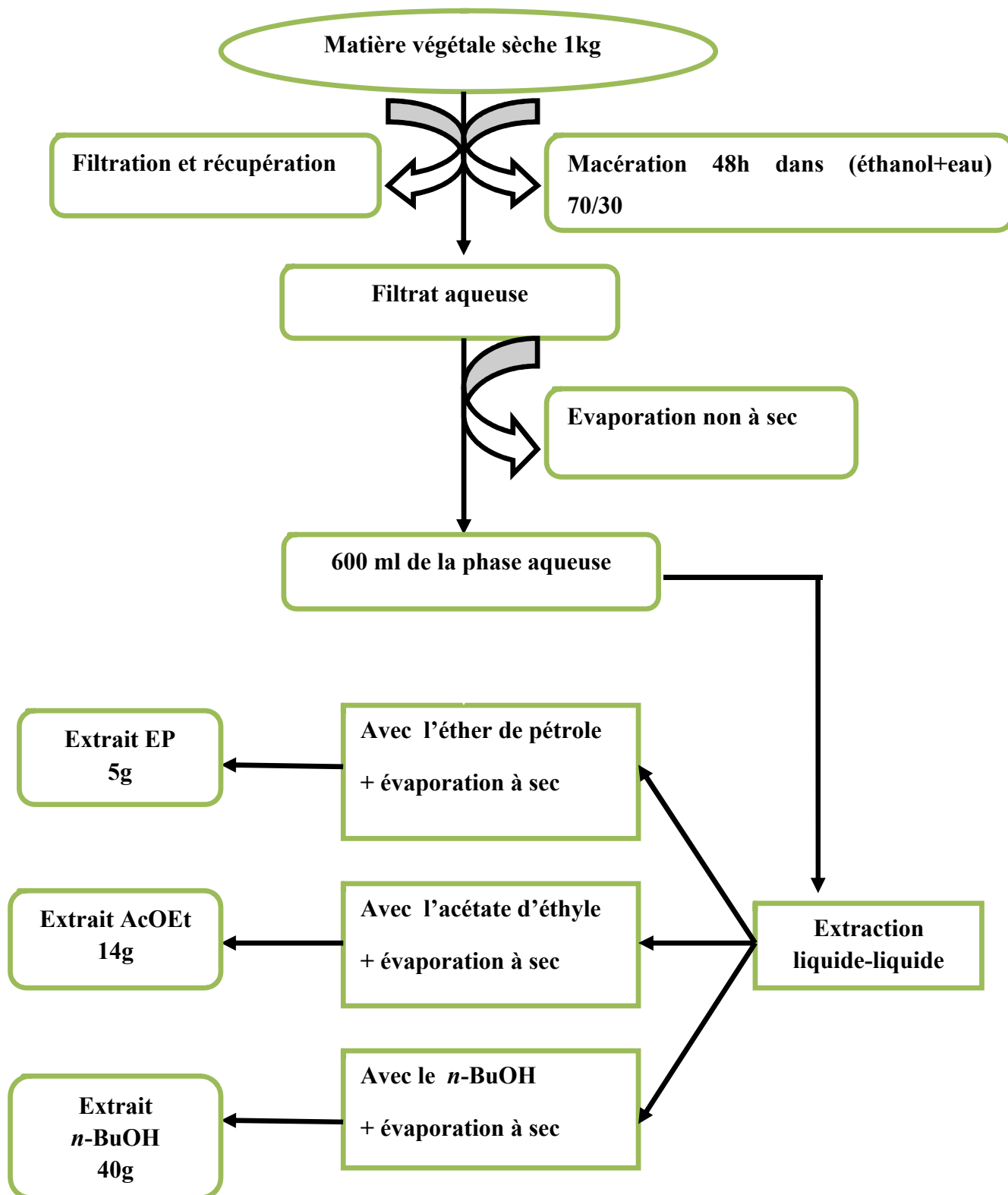


Figure IV.1: Schéma d'extraction de la plante *F.thymifolia*

IV.2. Analyse chromatographique

Les profils chromatographiques des deux extraits *n*-BuOH et AcOEt montrent clairement leurs richesses en polyphénols et en particulier les flavonoïdes. Ceci à travers les différentes taches visibles sous la lumière UV à la longueur d'onde 254 nm et 366 nm ainsi que leur révélation en jaune.

IV.3. Dosage des phénols

IV.3.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT)

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalent en acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG.g⁻¹ extrait). Les résultats obtenus sont enregistrés dans le tableau (IV.1) et la (figure IV.2) :

Tableau IV.1 : Teneur en PPT de la plante *F. thymifolia* (AcOEt et *n*-BuOH)

Extraits	Polyphénols totaux (mg EAG.g ⁻¹ extrait)
Acétate d'éthyle	396,44 ± 12,01
<i>n</i> -butanol	319,11 ± 6,11

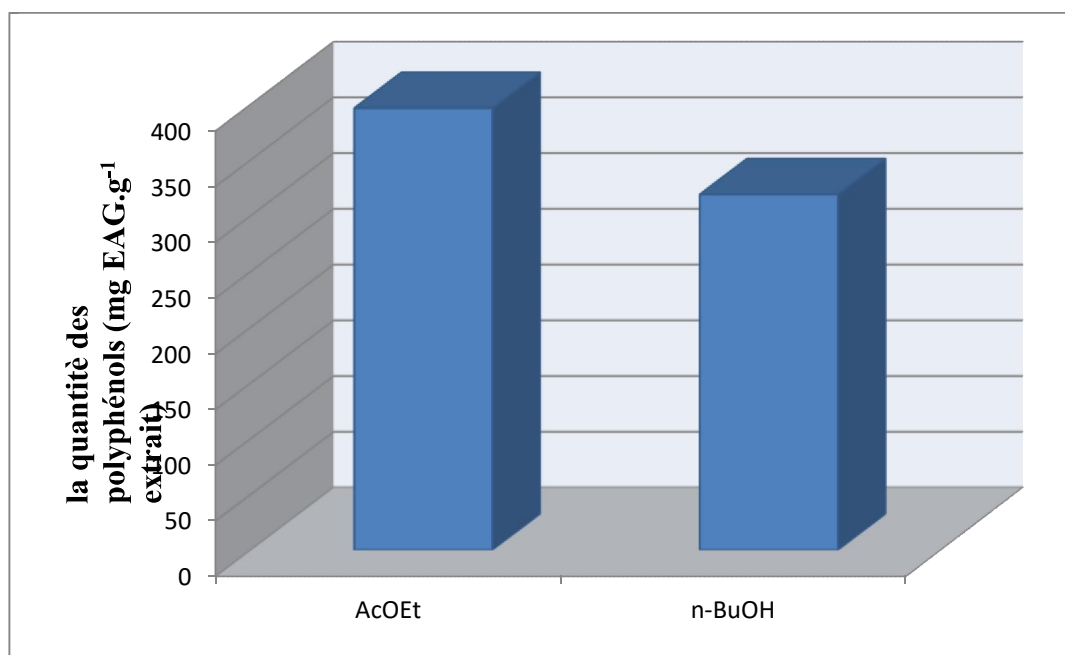


Figure IV.2: Composition en PPT des extraits AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *Fumana thymifolia*

Ces résultats montrent que les deux extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol sont riches en PPT avec les teneurs 396,44 mg EAG.g⁻¹extrait et 319,11 mg EAG.g⁻¹extrait, respectivement. La comparaison des teneurs des extraits de *F.thymifolia* des autres espèces de la famille Cistaceae a montré que notre plante présente la teneur la plus élevée. Par exemple, l'extrait AcOEt de la plante *cistus salviifolius* présente une quantité de 80 ± 0,01 µg (EAG)/100mg [69], également l'espèce *helianthemum sessiliflorum* avec des valeurs 42.51±1.01µg GAE/mg (extrait AcOEt) et 40.02±2.81 µg GAE/mg (*n*-BuOH) [70].

IV.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)

La teneur en flavonoïde des deux extraits a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalent en catéchine par gramme d'extrait (mg EC.g⁻¹ extrait). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau (IV.2) et la (figure IV.3) :

Tableau IV.2: Teneur en FVT de la plante *F. thymifolia* (AcOEt et *n*-BuOH)

Extraits	Flavonoïde totaux (mg EC.g ⁻¹ extrait)
Acétate d'éthyle	85,330 ± 6,563
<i>n</i> -butanol	60,327 ± 5,132

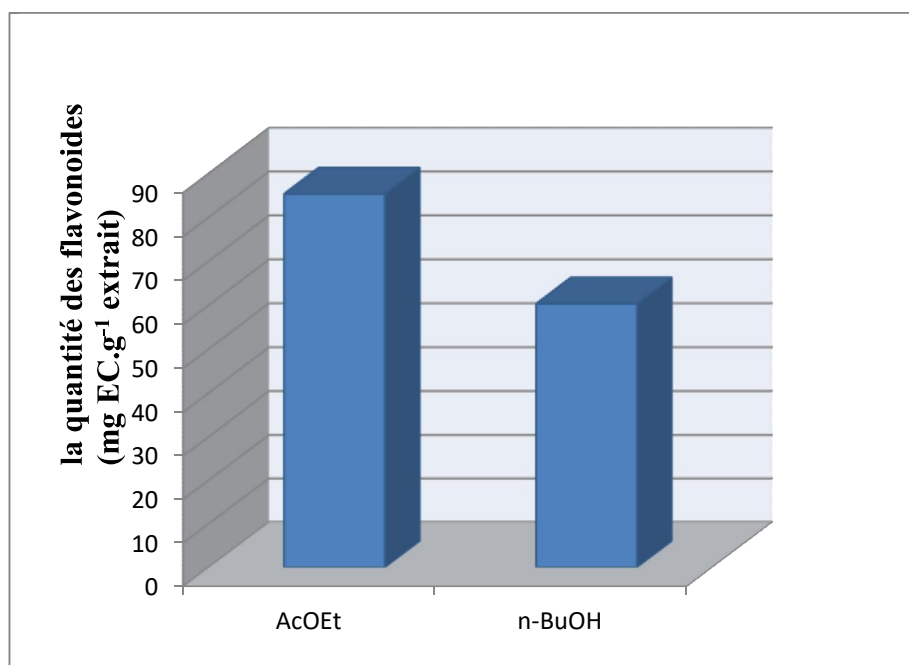


Figure IV.3 : Composition en FVT des extraits AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *Fumana thymifolia*

Les résultats présentés en haut, montrent clairement que la quantité des flavonoïdes est plus élevée dans l'extrait acétate d'éthyle avec une valeur de 85,330 (mg EC.g⁻¹ extrait), suivi par l'extrait *n*-butanol avec une valeur de 60,327 (mg EC.g⁻¹ extrait).

Nos résultats sont aussi significativement élevés par rapport des teneurs trouvés dans l'extrait acétate d'éthyle de *Cistus salviifolius* avec valeur de 4,83 µg (EQ)/mg [69], et dans l'extrait ACOEt (46.70 µg (EQ) /mg) et *n*-BuOH (35.48±0.36 µg (QE)/mg) de l'espèce *Helianthemum sessiliflorum* [70].

IV.3.3. Dosage des tanins condensés (TC)

La teneur en TC des deux extraits (AcOEt et *n*-BuOH) a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalent en catéchine par gramme d'extrait (mg EC.g⁻¹ extrait). Les résultats de cette étude quantitative sont présentés dans le (tableau IV.3) et la (figure IV.4) :

Tableau IV.3: Teneur en TC de la plante *F. thymifolia* (AcOEt et *n*-BuOH)

Extraits	Tanins condensés (mg EC.g ⁻¹ extrait)
Acétate d'éthyle	1,2400 ± 0,5089
<i>n</i> -Butanol	8,5735 ± 0,6939

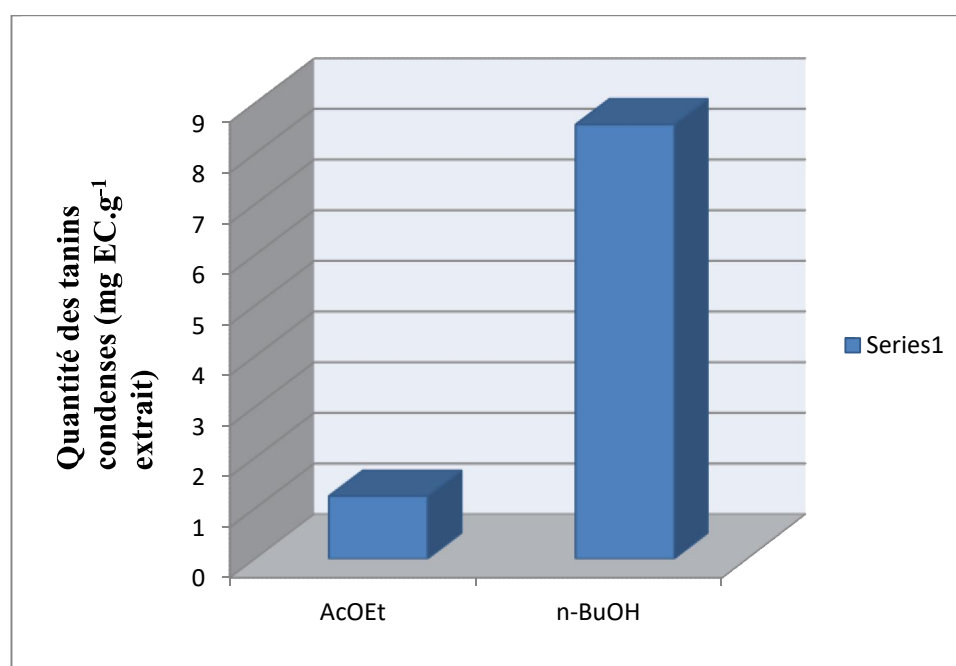


Figure IV.4 : Composition en TC des extraits AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce

Fumana thymifolia

D'après les résultats ci-dessus, on constate que l'extrait *n*-Butanol (8,5735 mg EC.g⁻¹ extrait) est très riche en TC que l'extrait AcOEt (1,2400 mg EC.g⁻¹ extrait).

IV.3.4. Conclusion

Les dosages par spectrophotomètre UV-visible ont montré que les deux extraits (AcOEt et *n*-BuOH) de la plante *Fumana thymifolia* contiennent des composés phénoliques (PPT, FVT et TC) mais avec des quantités différentes.

Plusieurs facteurs influencés sur la teneur en composés phénoliques d'une plante. Ils peuvent êtres d'origine géographique, conditions climatiques, génétiques, période de la maturité à la récolte, conditions de stockage et aussi la technique d'extraction employée [71].

IV.4. Evaluation de l'activité anti-oxydante

IV.4.1. Test du radical libre DPPH

L'effet de piégeage des extraits sur le radical DPPH est exprimé en valeurs de CI₅₀ (µg.ml⁻¹). On rappelle que la CI₅₀ représente la quantité de réactifs nécessaire à l'inhibition de la moitié de la quantité initiale de radicaux présents. En effet, la CI₅₀ est inversement liée à la capacité anti-oxydante d'un composé, plus cette valeur est basse, plus l'activité anti-oxydante est grande.

Les résultats obtenus du test de mesure de l'absorbance du radical libre DPPH (Tableau IV.4) nous a permis de tracer l'histogramme de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de chaque extrait (Figure IV.5) :

Tableau IV.4 : Activité anti-radicalaire des extraits (AcOEt et *n*-BuOH) et antioxydant standard

Extraits	Test DPPH (CI ₅₀ en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
Acétate d'éthyle	5,2533 \pm 1,1690
<i>n</i> -Butanol	6,4000 \pm 0,7810
BHT	11,5

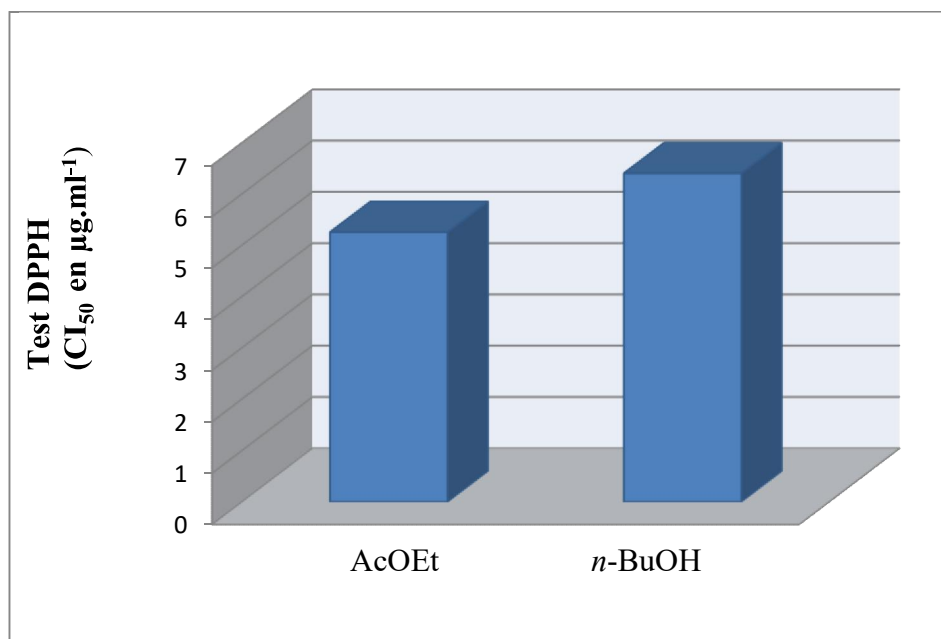


Figure IV.5 : Comparaison de l'activité anti-oxydante des extraits (AcOEt et *n*-BuOH) de la plante *F. thymifolia*

Les profils d'activité anti-oxydante révèlent que l'extrait acétate d'éthyle a manifesté un pouvoir antioxydant important que celui de l'extrait *n*-Butanol, dont la concentration d'inhibition à 50 % de 5,2533 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour AcOEt suivi par la concentration d'inhibition à 50% de 6,4000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour *n*-BuOH. Ce résultat peut être expliqué par la richesse de l'extrait AcOEt en composés phénolique comme les flavonoïdes.

L'étude réalisée par Benabedelaziz et al. (2017) afin de déterminer l'activité antioxydante (méthode de DPPH) des deux extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Helianthemum sessiliflorum* (Cistaceae), a révélée que le pouvoir antioxydant de l'extrait acétate d'éthyle avec ($CI_{50}=23.75\pm 2.07\mu\text{g/ml}$) et plus élevé par rapport à l'extrait *n*-butanol avec ($94.03\pm 1.52\mu\text{g/ml}$), mais moins réactif que le composé standard **BHT** avec $11.5\mu\text{g/ml}$ [70]. Ces résultats sont moins significatifs en comparaison avec ceux donnés par notre étude. Ceci a permis de classer notre plante *Fumana thymifolia* comme un antioxydant puissant.

CONCLUSION GENERALE

Le présent travail est consacré à l'évaluation des extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Fumana thymifolia*, en composés phénoliques (PPT, FVT et TC) afin d'étudier leur activité anti-oxydante.

L'extraction a été faite par macération pendant 48h de la matière végétale dans un mélange hydro-alcolique (EtOH/H₂O : 70/30%). Les extraits bruts sont obtenus après extraction liquide-liquide de la phase aqueuse par trois solvants de polarité croissante EP, AcOEt et *n*-BuOH suivie par étape d'évaporation à sec.

Le profil du chromatogramme des deux extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol a montré la présence des polyphénols. Ceci à travers les taches visible sous la lumière UV à la longueur d'onde 366 et 254 nm.

Les résultats obtenus pour l'analyse quantitative de la composition phénolique des extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *F.thymifolia*, en utilisant le test colorimétrique de Folin Ciocalteu (dosage des PPT), trichlorure d'aluminium (dosage des FVT) et la vanilline (dosage des TC) confirment que cette espèce contient les composés phénoliques et montrent que les deux extraits AcOEt et *n*-BuOH sont riche en polyphénols totaux avec des valeurs (396,44 mg EAG.g⁻¹ extrait) et (319 ,11 mg EAG.g⁻¹ extrait) respectivement. La teneur en flavonoïdes est plus élevée dans l'extrait acétate d'éthyle avec une valeur de (85,330 mg EC.g⁻¹ extrait), suivi par l'extrait *n*-butanol (60,327 mg EC.g⁻¹ extrait). Cependant, l'extrait *n*-butanol présente la valeur la plus élevée dans le dosage des tanins condensés : *n*-BuOH (8,5735 mg EC.g⁻¹ extrait) et AcOEt (1,2400 mg EC.g⁻¹ extrait).

L'évaluation de l'activité anti-oxydante consiste à l'utilisation du test DPPH, qui est basée sur la réduction du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle. Les résultats obtenus montrent que les deux extraits renferment de puissants composés actifs capables de réduire ce radical libre. La valeur la plus basse de CI₅₀ (5,2533 µg.ml⁻¹) a été enregistrée pour l'extrait AcOEt suivi par l'extrait *n*-BuOH avec une valeur 6,4000 µg.ml⁻¹.

Il est important de mentionner que c'est la première fois pour l'espèce *Fumana thymifolia* qu'a fait l'objet d'une étude biologique (évaluation du pouvoir antioxydant).

- [1] Pierre, P (2001). Dans Le Magasin Du Bon Dieu. Les Extraordinaires Richesses Thérapeutiques Des Plantes Et Des Animaux.
- [2] Newmann, D., Cragg, G.M (2007). Natural Products As Sources Of New Drugs Over The Last 25 Years. *Journal Of Natural Products*, 70, 461- 477.
- [3] Laraoui. H (2016). Métabolites Secondaires De *Fumana Montana* Et *Fumana Thymifolia* (Cistaceae). Université Hadj Lakhdar-Batna 1. These De Doctorat En Sciences.
- [4] Balasundram N ., Sundram K ., Samman S (2006). Phénolic Compounds In Plants And Agri Industrial By-Products : Antioxidants Activity , Occurrence, And Potential Uses . *Food Chem.* 99 (1) ,191-203.
- [5] 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.
- [6] P. M. Dansereau (1939). Monographie Du Genre *Cistus* L. *Boissiera*, 4: 1-90 ; W. Greuter, H.M. Burdet, G. Long (1984). Cistaceae. In: *Med-Checklist. Vol. I. Conservatoire Et Jardin Botaniques, Ville De Genève. M.Ed- Checklist Trust Of Optima, Genève*, 315-330.
- [7] V. Hywood , (1996). *Les Plantes A Fleurs*. Nathan.
- [8] Beatriz Guzman, Pablo Vargas (21 January 2009). Historical Biogeography And Character Evolution Of Cistaceae (Malvales) Based On Vaanalysis Of Plastid Rbcl And Trnl –Trmf Sequences ; Science Direct.
- [9] Judd W.S, C.S. Campbell, E.A. Kellogg, P.F. Stevens, M.J. Donoghue (2002). *Systématique D'usine : Une Approche Phylogénétique*, 2ème Edition. 409-410 (Cistaceae). Sunderland, Massachusets : Associés De Sinauer. Isbn 0878934030.
- [10] Camcius Marius, Gavril Neamtu, Undina Stanescu (15 Mars 1993). Constituents Of *Helianthemum Nummularium*, Faculty Of Pharmacy, Agronomic University, Institute Of Molecular Isotopes Technology, 3400 Cluj-Napoca, Romania .
- [11] M. T. Calabuig, M. Cortés, C. G. Francisco, R. Henandez Et E. Suarez Labdane (1981) . Diterpenes From *Cistus Symphytiofolius*. *Phytochemistry*, Vol.20. 9. 2255-2258.

- [12] J. De Pascal Teresa, J.G.Urones ,Marocs, I. S , P. B. Barcala Et M.Narciso (1986). Diterpenoid and Other Components Of *Cistus Laurifolius*. *Phytochemistry* Vol.25 (5) ,1185-1187.
- [13] Frank Petereit, Herbert Kolodziej Et Adolf Nahreste (1991). Flavan-3-Ols And Proanthcyanidins From *Cistus Incanus*. *Phytochemistry*, Vol. 30. 3. 981-985.
- [14] Tomas Vogt Et Paul Gerhard Gultez (1994).Accumulation Of Flavonoids During Leaf Development In *Cistus Laurifolius*. *Phytochemistry*, Vol. 36.3. 591-597 .
- [15] Á. Rubio-Moraga, J. Argandoña, B. Mota, J. Pérez , A. Verde, J. Fajardo, J. Gómez-Navarro, R. Castillo-López, O. Ahrazema, L. Gómez-Gómez (2013). Screening For Polyphenols, Antioxidant And Antimicrobial Activities Of Extracts From Eleven *Helianthemum Taxa* (Cistaceae) Used In Folk Medicine In South-Eastern Spain. *Journal Of Ethnopharmacology*, 148: 287–296.
- [16] E. Barbosa, F. Calzada, R. Campos (2006). Antigriardial Activity Of Methanolic Extracts From *Helianthemum Glomeratum* Lag. And *Rubus Coriifolius* Focke In Suckling Mice Cd-1. *Journal of Ethnopharmacology*, 108: 395-397.
- [17] Rameau, Dominique, Mansion G. Duné., *Livre Flore Forestière Française : Région Méditerranéenne*. ,3^{ème} Eddition , 641-645-649.
- [18] Quezel, P, Santa, S., 1963. *Nouvelle Flore De L'algerie Et Des Régions Désertiques Méridionales*. In : Cnrs (Ed.), Vol. 1-2. Paris.
- [19] Laraoui H (2016). *Métabolites Secondaires De Fumana Montana Et Fumana Thymifolia* (Cistaceae). Université Hadj Lakhdar-Batna 1. These De Doctorat En Sciences. 54-123.
- [20] Perihan Gürbüz, S, engül Dilem Dogan (2017). *Biochemical Systematics and Ecology* 74 57e59.
- [21] Maria Couladis ; Olga Tzakou ; Thr Oil Of *Fumana Thimifolia*(L.) Spach Ex Webb From Greece.
- [22] M. T. Calabuig, M. Cortés, C. G. Francisco, R. Henandez Et E.Suarez, (1981).Labdane Diterpenes From *Cistus Symphytiofolius*. *Phytochemistry*, Vol.20. 9. 2255-2258.

- [23] M. Hamdane Meziane Protection Des Sites Sensibles Naturelles Rapport De Troisième Phase Elements De Plan De Gestion Pour La Zone Littorale.
- [24] Quezel, P, Santa, S (1963). Nouvelle Flore De L'algerie Et Des Régions Désertiques Méridionales. In : Cnrs (Ed.), Vol. 1-2. Paris.
- [25] Walker, J.E.M., Saraste, M.J., Runswick And N.J.Gay (1982). Distantly Related Sequences In The Alpha And Beta-Subunits Of ATP Synthase, Myosin, Kinases And Other ATP-Requiring Enzymes And A Common Nucleotide Binding Fold. *Embo J*, 1 (8) .945-51.
- [26-28] Pincemail J, Meurisse M, Limet R Et Defraigne J O (1999). L'évaluation Du Stress Oxydatif D'un Individu: Une Réalité Pour Le Médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons* .4 (5).
- [27] Poirier, J (2004). *L'indispensable Pour Vivre En Santé*, Edition Merlin, P 72. Médart, J,(2009). *Manuel Pratique De Nutrition: L'alimentation Préventive Et Curative*. Editions De Boeck Supérieur, P 49.
- [29] Ben Aissa Bouguerne (2012). *Production Des Radicaux Libres :Doctorat De Luniv De Toulouse*. P7.
- [30] Chu W L, Lim Y W, Radhakrishnan A K And Lim P E (2010). Protective Effect Of Aqueous Extract From *Spirulina Platensis* Against Cell Death Induced By Free Radicals. *BMC Complementary And Alternative Medicine*, 10 (53), 2-8.
- [31] Favier A (2003).The Oxidative Stress: Concept And Experimental Interest To Understand Diseases Mechanisms And Therapeutic Approaches. *Actualité Chimique*, 108-115.
- [32] Aurousseau, B (2002). Les Radicaux Libres Dans L'organisme Des Animaux D'élevage : Conséquences Sur La Reproduction, La Physiologie Et La Qualité De Leurs Produits. *INRA Prod. Anim*, 15 (1): 67-82.
- [33-38] J. Haleng, J. Pincemail, J.O. Defraigne, C. Charlier, J.P. Chapelle (2007). Le Stress Oxydant. *Rev Med Liege*; 62: 10: 628-638.
- [34] Tamer Fouad, M.D (2003). Free Radicals, Types, Sources And Damaging Reactions, *Internal Medicine Articles*. ([Http://Www.Doctorslounge.Com/Primary/Articles/](http://www.doctorslounge.com/primary/articles/)).

- [35] Favier A (2006). Oxidative Stress In Human Diseases. *Annales Pharmaceutiques Francaises* 64, 390-396.
- [36] Atawodi, S. E (2005). Antioxydant Potential Of African Plants. *Afr J Biotechnol.* 4 (2), 128-133.
- [37] Georgetti, S. R., Casagrande, R., Di-Mambro, V. M., Azzolini, A. E., Fonseca, M. J. V (2003). Evaluation Of Antioxidant Activity Of Different Flavonoids By The Chemiluminescence Method. *A A P S Pharm Sci.* (2), 20.
- [39] 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.
- [40] Cao, G.H., Alessio, H.M., Cutler, R.G (1993). Oxygen-Radical Absorbency Capacity Assay For Antioxidants. *Free Radical Biol Med*, 14: 303-311.
- [41] Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U. Et Locke, S (1985). Quantitative Measurement Of The Total Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Capacity Of Human Blood Plasma By Controlled Peroxidation. *FEBS Letters*, 187: 33-37.
- [42] Benzie, I. F. F. Et Strain, J. J (1996). The Ferric Reducing Ability Of Plasma (FRAP) As A Measure Of Antioxidant Power: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
- [43] Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A (1993). A Novel Method For Measuring Antioxidant Capacity And Its Application To Monitoring The Antioxidant Status In Premature Neonates. *Clin Sci*, 84: 407-412.
- [44] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C (1995). Use Of A Free Radical Method To Evaluate Antioxidant Activity. *Food. Sci. Technol*, 28 : 25-30.
- [45] Salah N., Miller N.J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell, G.P., Rice-Evans C.A (1995). Polyphenolic Flavanols As Scavengers Of Aqueous Phase Radicals And As Chain-Breaking Antioxidants. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 339-346.
- [46] Yi-Zhong Cai, Mei Sun, Jie Xing, Qiong Luo, Harold Corke (2006) .Structure-Radical Scavenging Activity Relationships Of Phenolic Compounds From Traditional Chinese Medicinal Plants. *Life Sciences*, 78(25), 2872-2888.

- [47] Hatzidimitriou Ef., Nenadis N., Tsimidou M.Z (2007). Changes In The Catechin And Epicatechin Content Of Grape Seeds On Storage Under Different Water Activity (Aw) Conditions. *Food Chemistry*, 105, 1504-1511.
- [48-52] T. Beta, S. Nam, J.E Dexter. H.D. Sapirstein (2005). Phenolic Content And Antioxidant Activity Of Pearled Wheat And Roller-Milled Fractions. *Cereal Chem.*, 82(4), 390-393.
- [49-53-56] J. Bruneton (1993). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*. 4ème Edition, Lavoisier, Paris, France.
- [50] SARNI-MANCHADO P, VERONIQUE C (2006). *Les Polyphénols En Agroalimentaires*. Collection Sciences Et Techniques Agroalimentaires, Edition TEC Et DOC, Paris (France): 398.
- [51-60] Bruneton, J (1993). *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales*. 2ème Edition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.
- [54] Tsimogiannins, D.I., Oreopoulou, V (2006). The Contribution Of Flavonoid C-Ring On DPPH Free Radical Scavenging Efficiency. A Kinetic Approach For The 3', 4'-Hydroxy Substituted Members. *Innovat Food Sci Emerg Tech*, 7: 140-146.
- [55] Tapas, A. R., Sakarkar, D. M. & Kakde, R. B (2008). Flavonoids As Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal Of Pharmaceutical Research* 7 (3), 1089-1099.
- [57] Haslam, E (1996). Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) As Drugs: Possible Modes Of Action. *J. Nat Pro*, 59: 205 215.
- [58-61] Cowan, M.M (1999). Plant Products As Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Re*, 12(4): 564- 582.
- [59] Scalbert, A (1991). Antimicrobial Properties Of Tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883.
- [62] Dr Sahraoui, Laboratoire De Pharmacognosie .NET
- [63] C. T. Ho, T. Osawa, M. T. Huang, R. T. Rosen (1994). *Food Phytochemicals For Cancer Prevention II. Teas, Spices, And Herbs*, American Chemical Society, Oxford University Press.

- [64] Claire DUFOUR (2015). Des Fruits Et Légumes A L'effet Santé Des Polyphénols: Une Longue Route. INRA PACA – Avignon.
- [65] Singleton, V.L., R. Orthofer and R.M (1999).Lamuela-Raventos: Analysis of Total Phenols and other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Met. Enzym.* (299, 152-178).
- [66] Dewanto,V.,Wu,X.,Adom,K.K.,Liu,R.H (2002).thermal processing enhances the nutritionalvalue of tomatoes by increasing total antioxidant activity.*journal of agriculture and food chemistry*,50,3010-3014.
- [67] Sun,B.,Richardo-da-silvia,J.M.,Spranger,I (1998).Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins.*journal of agriculture and food chemistry*,46:4267-4274.
- [68] T. Hatano, H. Kagawa, T. Yasuhara (1988). OkudaTwo new flavonoids and other constituents in licorice root their relative astringency and radical scavenging effects *Chem. Pharm. Bull.*, 36, pp. 2090-2097.
- [69] ABETTI Soumia (2013-2014). Etude phytochimique et pouvoirs antioxydant et vasodilatateur desextraits de trois plantes du nord de Maroc (Daphne gnidium,Origanum elongatum, Cistus salviifolius); Université Sidi Mohammed Ben Abdellah Faculté des Sciences et Techniques .
- [70] Imane Benabdelaziz , Laurence Marcourt ,Mohammed Benkhalel ,Jean-Luc Wolfender & Hamada Haba (2017).Antioxydant and antibacterial activities and polyphenolic constituents of helianthemum sessiliflorum pers .,*Natural Product Research* ,31 :6,686-690,DOI :[10.1080/14786419.2016.1209669](https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1209669) .
- [71] Jane ROCHE (2005).Composition de la graine de tournesol (Helianthus annuus L.) sous l'effet conjugué des contraintes agri environnementales et des potentiels variétaux ; Sciences des Agroressources ; Le Titre De Docteur De L'institut Nation Al Polytechnique De Toulouse.

ANNEXES

Annexe A : la gamme d'étalonnage de l'acide gallique.

0,50ml de S1 +0 ,50ml d'eau distillé	A1
0,40ml de S1 +0,60 ml d'eau distillé	A2
0,30ml de S1+0,70ml d'eau distillé	A3
0,20ml de S1+ 0,80 ml d'eau distillé	A4
0,10ml de S1 +0,90ml d'eau distillé	A5
0,05ml de S1+0,95ml de d'eau distillé	A6

(S1) solution d'acide gallique

Annexe B : valeur de l'absorbance pour la courbe d'etalonnage de l'acide gallique.

POLYPHENOLES TOTAUX abs à 760nm			
	R1	R2	R3
Acétate d'éthyle	1,046	1,188	1,226
n-butanol	0,951	0,943	0,978

Annexe C: la gamme d'étalonnage de la catéchine

Catéchine	MOY
0	0
50	0,187
100	0,371
200	0,64
300	1,056
500	1,645

Annexe D : valeur moyennes de l'absorbance de la courbe d'étalonnage de la catéchine

FLAVONOIDES abs à 510 nm			
	R1	R2	R3
Acétate d'éthyle	0,244	0,216	0,254
n-butanol	0,146	0,167	0,176

Annexe E : valeur moyennes de l'absorbance de la courbe d'étalonnage de la catéchine.

TANNINE CONDENSE			abs à 500nm
	R1	R2	R3
Acétate d'éthyle	0,005	0,004	0,002
<i>n</i>-butanol	0,025	0,028	0,024

Annexe F : valeur de l'absorbance des extrait acétate d'éthyle et n-butanol . selon la methode DPPH.

$T_{\text{Négatif}}=0,485$

Extrait Acetate D'ethyle						Abs A 517nm		
Concentration	250	150	50	20	15	10	5	2,5
R1	0,191	0,184	0,207	0,207	0,193	0,189	0,229	0,348
R2	0,193	0,198	0,204	0,157	0,197	0,196	0,238	0,348
R3	0,186	0,216	0,209	0,15	0,191	0,185	0,243	0,347

Extrait n-butanol						Abs à 517 nm		
Concentration	250	150	50	20	15	10	5	2,5
R1	0,219	0,178	0,191	0,209	0,193	0,061	0,26	0,359
R2	0,199	0,157	0,176	0,178	0,198	0,195	0,26	0,374
R3	0,188	0,158	0,186	0,154	0,19	0,197	0,26	0,376

Après les calculs on obtient ces résultats :

Extrait	Répétition	polyphénols	flavonoïde	tanins condensés	CI50
acétate d'éthyle	R1	384,66	87,33	1,684	4,5
	R2	396	78	1,3513	4,66
	R3	408,66	90,66	0,6846	6,6
<i>n</i>-butanol	R1	317	54,66	8,3513	5,5
	R2	314,33	61,66	9,3513	6,8
	R3	326	64,66	8,018	6,9

Résumé /Abstract

Résumé

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'activité anti-oxydante des deux extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol issus de la plante *Fumana thymifolia*. Cette espèce appartient à la famille des Cistaceae connue par sa richesse en polyphénols et en particulier les flavonoïdes. Ceci est confirmé par la réalisation d'une chromatographie sur CCM des extraits obtenus de notre plante, qui a montrée des taches caractéristiques des composés phénoliques.

La teneur en polyphénols totaux (**PPT**), flavonoïdes totaux (**FVT**), tanins condensés (**TC**) des deux extraits (AcOEt et *n*-BuOH) a été effectuée par les méthodes de Folin-Ciocalteu et trichlorure d'aluminium (AlCl₃) et vanilline respectivement. Ce résultat a révélé que l'extrait acétate d'éthyle est le plus riche en PPT (396,44 mg EAG.g⁻¹ extrait) et en FVT (85,330 mg EC.g⁻¹ extrait) tandis que l'extrait *n*-BuOH est plus riche en TC (8,5735 mg EC.g⁻¹ extrait).

L'évaluation de l'activité anti-oxydante *in vitro* des extraits (AcOEt et *n*-BuOH) isolés de la plante *F.thymifolia* a été réalisée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. Les résultats obtenus montrent que les deux extraits ont réagi comme des antioxydants.

Mot clés : Cestaceae; *Fumana thymifolia*; Activité anti-oxydante; polyphénols totaux; flavonoïdes totaux; tanins condensés; DPPH.

Abstract

The main objective of this study is to evaluate the antioxidant activity of two extracts EtOAc and *n*-BuOH from plant *Fumana thymifolia*. This species belonging to the Cistaceae family known for its richness in polyphenols and especially flavonoids. This is confirmed by carrying out a TLC chromatography of the extracts obtained from our plant, which showed characteristic spots of the phenolic compounds.

The total polyphenols (TPP), total flavonoids (TFV) and condensed tannins (CT) content of the two extracts (EtOAc and *n*-BuOH) was carried out by the methods of Folin-Ciocalteu aluminum trichloride (AlCl₃) and vanillin respectively. This result revealed that the ethyl acetate extract contains a great amount of TPP (396.44 mg EAG.g⁻¹ extract) and TFV (85.330 mg EC.g⁻¹ extract) while the *n*-BuOH extract is the richest in TC (8.5735 mg EC.g⁻¹ extract).

The evaluation of antioxidant activity of EtOAc and *n*-BuOH extracts isolated from the *F.thymifolia* plant was carried out by the method of DPPH free radical scavenging. The results obtained show that both extracts reacted as antioxidants.

Key words: Cistaceae; *Fumana thymifolia*; antioxidant activity; total polyphenols; total flavonoids; condensed tannins; DPPH.
