



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

Référence

..... /
.....

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature
et de la vie

Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biochimie
Appliquée

Présenté et soutenu par :

ANANI Kawter

Le : 2019

Impact d'extraction et de fractionnement sur l'activité antioxydante de *Thymus serpyllum* L. et *Equisetum arvense* L.

Jury :

Mdm	Fatiha Bengereuchi	MAA	Université de Biskra	Président
Dr.	TRABSA Hayat	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
Dr.	Bilal Ben Amor	MCA	Université de Biskra	Examineur

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Allah, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

Je voudrais remercier docteur Trabsa Hayat, Maître de conférence au département de Biologie, Université Mohamed Khider Biskra, pour avoir accepté de m'encadrer, pour ses conseils et ses informations scientifique importantes.

Je tiens à remercier madame Bengreuchi Fatiha, Maître assistante au département de Biologie, Université Mohamed Khider Biskra, pour avoir accepté d'être présidente du jury de mon mémoire.

Je remercie également docteur Ban Amor Bilal, Maître conférence au département de Biologie, Université Mohamed Khider Biskra, pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie ma mère de m'orienter pour le choix des plantes.

Mes sentiments de reconnaissances et mes remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Je remercie mes collègues et mes amies pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

DEDICACE

A mes très chers parents.

Aucune dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer à leur juste valeur la gratitude et l'amour que je vous porte. Je mets entre vos mains, le fruit de longues années d'études, de longs mois de distance de votre amour de votre tendresse, de longs jours d'apprentissage. Lionnes de vous, votre soutien et votre encouragement m'ont toujours donné de la force pour persévérer et pour prospérer dans la vie. Chaque ligne de cette thèse chaque mot et chaque lettre vous exprime la reconnaissance, le respect, l'estime et le merci d'être mes parents.

A mes sœurs et mes frères, et à toute la famille.

A tous mes amies et collègues.

A tous ceux que j'aime

Table des matières

Liste des Tableaux.....	I
Liste des Figures.....	II
Liste des abréviations	III
Introduction	1
Chapitre 1 : Stress oxydant.....	3
1.1. Définition.....	3
1.2. Radicaux libres	3
1.3. Formes des radicaux libres	3
1.3.1. ROS.....	3
1.3.1.1. Superoxide ($O_2^{\cdot-}$).....	3
1.3.1.2. Radical hydroxyle (OH^{\cdot})	4
1.3.1.3. Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	4
1.3.1.4. Oxygène singlet (1O_2).....	4
1.3.2. RNS.....	4
1.3.2.1. RNS radicalaires.....	4
1.3.2.2. RNS non radicalaires.....	4
1.4. Sources des radicaux libres.....	5
1.4.1. Sources endogène.....	5
1.4.1.1. Respiration mitochondriale	5
1.4.1.2. Phagocytose.....	5
1.4.1.3. Xanthine oxydase (XO).....	6
1.4.1.3. Oxyde nitrique synthase (NOS)	6
1.4.2. Sources exogène.....	6
1.5. Rôle physiologique et pathologique des ROS	6
1.6. Antioxydants.....	6
1.6.1. Enzymatique	6

1.6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)	6
1.6.1.2. Glutathion peroxydase (GPx).....	7
1.6.1.3. Catalase	7
1.6.2. Antioxydants non Enzymatique	7
1.6.2.1. Vitamine C (acide ascorbique).....	7
1.6.2.2. Vitamine E (tocophérol).....	7
1.6.2.3. Les polyphénols.....	7
1.7. Flavonoïdes.....	7
1.7.1. Définition	7
1.7.2. Structure	7
1.7.3 Classification.....	8
1.7.4. Activités biologiques des flavonoïdes	8
Chapitre 2 : Plantes médicinales	9
2.1. <i>Thymus serpyllum</i> L. (TS)	9
2.1.1. Généralité et utilisation traditionnel	9
2.1.2. Classification	9
2.1. <i>Equisetum arvense</i> L. (EA)	10
2.1.1. Généralité et utilisation traditionnel	10
2.1.2. Classification	10
Chapitre 3 : Matériel et Méthodes.....	11
3.1. Matériel.....	11
3.1.1. Matériel biologique	11
3.1.2. Matériel chimique	11
3.1.3. Appareillage	11
3.2. Méthodes	11
3.2.1. Préparation de matériel biologique	11
3.2.2. Préparation et fractionnement des extraits bruts (EBr).....	11

3.2.2.1. Préparation des extraits bruts	11
3.2.2.1. a. Préparation de l'extrait brut hydro-alcoolique (EBr HAl).....	11
3.2.2.1. b. Préparation de l'extrait brut alcoolique (EBr Al).....	12
3.2.2.2. Fractionnement des extraits bruts.....	12
3.2.2.2. a. Fractionnement de l'EBr HAl par lavage liquide-liquide	12
3.2.2.2. b. Fractionnement de l'EBr Al par chromatographie sur phase inverse	12
3.2.3. Analyse des EBr et des Fractions	13
3.2.3.1. Dosage des flavonoïdes	13
3.2.3.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)	13
3.2.4. Tests d'activité antioxydante	14
3.2.4.1. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH).....	14
3.2.4.2. Teste d'activité chélatrice (Ferrozine).....	14
3.2.4.3. Test d'activité réductrice (FRAP)	15
Chapitre 4 : Résultats et discussions	17
4.1. Rendement d'extraction et de fractionnement des EBr	17
4.1.1. Rendement des EBr Al et HAl.....	17
4.1.2. Rendement du fractionnement des EBr	18
4.1.2.1. Rendement du fractionnement de l'EBr HAl par lavage liquide-liquide.....	18
4.1.2.2. Rendement du fractionnement d'EBr Al par chromatographie d'adsorption en phase inverse	19
4.2. Analyses des extraits et des fractions	20
4.2.1. Dosage des flavonoïdes.....	20
4.2.2. Analyse par chromatographie sur couche mince	22
4.3. Tests d'activité antioxydante	26
4.3.1. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH)	26
4.3.2. Test de chélation des métaux (Ferrozine)	33
4.3.3. Test d'activité réductrice (FRAP).....	39

Conclusion.....	43
Références	45
Annexe.....	54

Liste des Tableaux

Tableau 1. Classification botanique de <i>Thymus serpyllum</i> L.....	9
Tableau 2. Classification botanique d' <i>Equisetum arvense</i> L.....	10
Tableau 3. Différentes pourcentage hexane/éthanol utilisés dans le fractionnement des EBr Al.....	13
Tableau 4. Phases mobiles utilisées pour la CCM.....	14
Tableau 5. Pourcentage de rendement d'extraction HAl et Al de TS et EA.....	17
Tableau 6. Rendements en extrait obtenus à partir une extraction Al de déférentes plantes médicinales.....	18
Tableau 7. Rendements en extrait obtenus à partir une extraction HAl de déférentes plantes médicinales.....	18
Tableau 8 . Rendements (Rdm) des fractions issues de lavage liquide-liquide avec différents solvants par rapport au poids total d'EBr.....	19
Tableau 9. Rendement de fractionnement par chromatographie sur phase inverse en pourcentage par rapport d'EBr-Al.....	20
Tableau 10. Dosage des flavonoïdes des plantes EA / TS	21
Tableau 11. Rapports frontaux (Rf) des spots des extraits et fractions en différente systèmes d'éluion.....	22
Tableau 12. Meilleurs systèmes d'éluion avec le nombre des spots et les rapports frontaux.....	25
Tableau 13. IC ₅₀ d'activité anti-radicalaire <i>vis-à-vis</i> le DPPH des extraits des plantes.....	29
Tableau 14. Valeurs de TAP des FR-HAl-TS à 30 min de réaction en utilisant le test de FRAP.....	40
Tableau 15. Valeurs de TAP des FR-Al-TS à 30 min de réaction en utilisant le test de FRAP.....	40
Tableau 16. Valeurs de TAP des FR-HAl-EA à 30 min de réaction en utilisant le test de FRAP.....	41
Tableau 17. Valeurs de TAP des FR-HAl-TS à 30 min de réaction en utilisant le test de FRAP.....	42

Liste des Figures

Figure 1. Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire	5
Figure 2. Structures de l'enchaînement benzo- γ -pyrone.....	8
Figure 3. Aspect morphologique de (<i>Thymus serpyllum</i> L.).....	9
Figure 4. Aspect morphologique (d' <i>Equisetum arvense</i> L.).....	10
Figure 5. Courbe d'étalonnage d'interaction de la quercétine avec l' $AlCl_3$	13
Figure 6. Courbe d'étalonnage de $FeSO_4$, la concentration exprimer par mM.	16
Figure 7. Réaction de réduction du radical DPPH	26
Figure 8. Cinétique d'activité anti-radicalaire des quatre extraits de deux plantes TS/EA avec les standards	27
Figure 9. IC_{50} du radical DPPH par les EBr HAl et Al des deux plantes.....	28
Figure 10. Pourcentage d'inhibition radicalaire de l'EBr HAl TS et ses fractions à une concentration de 15.83 $\mu g/ml$	29
Figure 11. Pourcentage d'inhibition radicalaire de l'EBr Al TS et ses fractions à concentration 15.83 $\mu g/ml$	30
Figure 12. Pourcentage d'inhibition radicalaire de l'EBr HAl EA et ses fractions concentration 15.83 $\mu g/ml$	31
Figure 13. Pourcentage d'inhibition radicalaire de l'EBr Al EA et ses fractions à concentration 15.83 $\mu g/ml$	32
Figure 14. Pourcentage pratique et théorique d'inhibition radicalaire des déférents l'EBr de deux plantes 15.83 $\mu g/ml$	32
Figure 15. Chélation des ions ferreux les EBr des deux plantes (TS et EA) avec les standards	33
Figure 16. Concentration effective qui exprime 50% de chélation des ions ferreux par les EBr des deux plantes et la quercétine.....	35
Figure 17. Pourcentage de chélation des ions ferreux par l'EBr HAl TS et ses fractions à concentration 15.83 $\mu g/ml$	36
Figure 18. Pourcentage de chélation des ions ferreux par l'EBr Al TS et ses fractions à concentration 15.83 $\mu g/ml$	36
Figure 19. Pourcentage de chélation des ions ferreux par l'EBr HAl EA et ses fractions à concentration 15.83 $\mu g/ml$	37
Figure 20. Pourcentage de chélation des ions ferreux par l'EBr Al EA et ses fractions à concentration 15.83 $\mu g/ml$	38

Figure 21. Pourcentage pratique et théorique de chélation des ions ferreux de différents l'EBr des deux plantes 15.83 µg/ml 39

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BHT	Butylated Hydroxy Toluène
CCM	Chromatographie sur couche mince
Cu	Cuivre
DPPH	Diphenylpicrylhydrazyl
EA	<i>Equisetum arvense</i>
EAe	Extrait Acétate d'éthyle
EAq	Extrait Aqueux
EB Al	Extrait Brut Alcoolique
EBr	Extrait brut
EBr HAl	Extrait Brut Hydro-alcoolique
EC₅₀	Concentration effective qui chélate 50 % de Fe ²⁺
ECh	Extrait Chloroforme
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EEp	Extrait Ether de pétrole
EQ	Equivalent de Quercétine
EtOH	Ethanol
F10%	Fraction hexane/éthanol (90/10 %, respectivement)
F20%	Fraction hexane/éthanol (80/20 %, respectivement)
F40%	Fraction hexane/éthanol (60/40 %, respectivement)
F60%	Fraction hexane/éthanol (40/60 %, respectivement)
F80%	Fraction hexane/éthanol (20/80 %, respectivement)
FAp	Fraction Apolaire
Fe	Fer
FP	Fraction Polaire
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
FR-HAl-TS	Fractions hydro-alcooliques de <i>Thymus Serpyllum</i>
FR-Al-TS	Fractions alcooliques de <i>Thymus Serpyllum</i>

FR-HAI-EA	Fractions hydro-alcooliques <i>Equisetum arvense</i>
FR-AI-EA	Fractions alcooliques <i>Equisetum arvense</i>
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
I %	Pourcentage d'inhibition
IC₅₀ %	Concentration inhibitrice de 50 %
MeOH	Méthanol
N₂O₃	Ion trioxyde d'azote
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Ns	Non significative
NO	Monoxyde d'azote
NO[•]	Oxyde Nitrique
NO₂	Ion dioxyde d'azote
NO³⁻	Ion nitrate stable
NOS	Oxyde nitrique synthase
O₂⁻/O₂^{•-}	Anion Superoxyde
OH[•]	Radical hydroxyle
Rdm	Rendement
Rf	Rapport frontal
RNS	Reactive nitrogene species
ROS	Reactive oxygene species
SOD	Superoxyde dismutase
TAP	Pouvoir antioxydant total
TPTZ	2,4,6- tripyridyl-s-triazine
TS	<i>Thymus Serpyllum</i>
XO	Xanthine oxydase
% de solvant	Pourcentage de solvant
% de chélation	Pourcentage de chélation
%	Pourcentage

Introduction

Dans le monde entier, les recherches des dernières décennies ont montré un intérêt accru pour les produits phytochimiques et les extraits des plantes, en raison de son utilisation fréquente dans la prévention et le traitement de certaines maladies. Plusieurs études ont démontré que les antioxydants des plantes présentent un intérêt majeur en médecine, en raison du fait qu'ils protègent l'organisme contre le stress oxydatif (Pallag *et al.*, 2018).

Le stress oxydant a été décrit réellement comme un facteur étiologique crucial impliqué dans diverses maladies chroniques humaines telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, inflammation, diabète et vieillissement. Ces dommages oxydants sont réalisés par l'attaque des radicaux libres sur divers biomolécules, en particulier les protéines, les lipides et l'ADN, ayant finalement comme conséquence la dégradation et la mort de cellules (Moon et Shibamoto, 2009).

L'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées (Ghedadba *et al.*, 2015).

Les plantes constituent une source immense de molécules chimiques complexes (métabolites secondaires), largement exploités dans les industries cosmétologiques agroalimentaires et pharmaceutiques. Parmi ces métabolites, on distingue les terpénoïdes, les alcaloïdes et les polyphénols. Ces derniers et principalement les flavonoïdes sont essentiellement connus pour leurs nombreuses activités biologiques, parmi lesquelles : leur actions antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancéreuses et antimicrobienne (Saffidine, 2015).

L'extraction et le fractionnement des principes actifs à haute valeur ajoutée à partir de la matière végétale, notamment le cas des flavonoïdes, qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêt grâce à leurs pouvoir antioxydant, sont des étapes très importantes dans l'isolement aussi bien que dans l'identification de ces composés. En conséquence, l'absence des études sur l'influence de différentes conditions d'extraction et de fractionnement sur les rendements et les activités antioxydant orientent ce travail pour valoriser l'effet de ces paramètres.

L'objectif principal de cette étude est d'élucider la comparaison entre une macération à utilisant un système d'extraction hydro-alcoolique et autre alcoolique, ainsi que le fractionnement à base de méthode lavage liquide-liquide à l'aide des différents solvants a polarité croissante et chromatographie à l'aide de deux solvants a des pourcentages variables.

Puis l'impact de ces méthodes et solvants sur l'activité antioxydante des extraits de deux plantes médicinales, *Thymus serpyllum* L. et *Equisetum arvense* L. qui appartiennent à la famille des Lamiacées et Equisetaceae, respectivement *in vitro*. Elles sont parmi les familles de plantes les plus utilisées comme source mondiale d'extraits à qualité médicale intéressante au moyen de trois méthodes : celle d'activité anti-radicalaire (DPPH), la méthode de chélation des métaux (Ferrozine) et la méthode de FRAP.

Chapitre 1 : Stress oxydant

1.1. Définition

Les Radicaux libres sont présents dans la cellule à des doses raisonnables : leur concentration est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants. Cependant cette homéostasie redox peut être déséquilibrée soit par une production excessive des ROS (Reactive oxygen species), soit par une diminution des capacités antioxydantes. On parle alors de stress oxydant (Bouden, 2018).

1.2. Radicaux libres

Sont des espèces chimiques possédant, sur leurs couche externe, un ou plusieurs électrons célibataires qui lui permet d'être des molécules hautement réactives, toxiques et responsables de nombreux dommages vis-à-vis des constituants cellulaires de l'organisme (Ndiaye *et al.*, 2018).

1.3. Formes des radicaux libres

Dans la cellule les espèces radicalaires former naturellement et jouer un rôle particulier en physiologie, c'est les radicaux primaires qui sont transformés par certain réactions sur les composés biochimique cellulaire en radicaux secondaires. Mais il y a d'autres classification base sur type de radicaux qui sont divisé en deux groupes principales : des radicaux dérivé de l'oxygène (Reactive oxygen species : ROS) et d'autres atomes comme l'azote (Reactive nitrogen species : RNS) (Yan, 2014).

1.3.1. ROS

Des ROS sont formées en tant qu'intermédiaires de réduction de l'O₂ et comprennent l'anion superoxyde (O₂⁻), le radical hydroxyle (OH^{*}) le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et Oxygène singlet (¹O₂). Ces ROS peuvent endommager les macromolécules cellulaires (ADN, ARN, protéines et lipides), entraînant des dommages à la membrane, une perte de la fonction des protéines, un blocage de la réplication de l'ADN et des mutations (Hug et Johnson, 2019).

1.3.1.1. Superoxide (O₂⁻)

C'est le résultat de l'ajout d'un seul électron à une molécule d'O₂ qu'été à l'état fondamental. C'est un précurseur aux autre ROS. Survie généralement dans la mitochondrie et a une demie vie plus longue qui permet la diffusion dans la cellule (Gutowski et Kowalczyk, 2013).

1.3.1.2. Radical hydroxyle (OH[•])

Hautement positif de +2310 mV (Gutowski et Kowalczyk, 2013). Issue à la réduction mono électronique du H₂O₂ (Bouden, 2018). Il est de courte durée (~ 10⁻⁹ ans), mais réagit très rapidement avec presque tous les types de molécules trouvés dans les cellules vivantes (Gutowski et Kowalczyk, 2013).

1.3.1.3. Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène peut être généré par n'importe quel système superoxyde, car l'anion radical se démultiplie facilement. La présence d'oxydases (urate oxydase, glucose oxydase, D-aminoacide oxydase) peut entraîner la synthèse directe de peroxyde d'hydrogène par le transfert de deux électrons à l'oxygène moléculaire. H₂O₂ est capable de produire des radicaux hautement réactifs à la suite de son interaction avec des ions métalliques (Magdalena et Aneta, 2015).

1.3.1.4. Oxygène singlet (¹O₂)

Est la forme diamagnétique de l'oxygène, est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes. Bien qu'il ne soit pas un radical, il joue un rôle dans le vieillissement cutané et certaines maladies liées à l'âge (Bouden, 2018).

1.3.2. RNS

1.3.2.1. RNS radicalaires

Le monoxyde d'azote (NO) est produit de manière endogène à partir de L-arginine de l'oxygène et du NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) par l'enzyme NO synthase endothéliale joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie hépatique du glucose. La mitochondrie représente leur cible majeure (Bassot *et al.*, 2018). Malgré son rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydant, il est paradoxalement impliqué dans nombreuses pathologies telles que le diabète, l'athérosclérose, le cancer et les lésions neurodégénératives (Droge, 2016).

1.3.2.2. RNS non radicalaires

Caractérisé par sa grande faculté de diffusion dans les membranes cellulaires. Le monoxyde d'azote radicalaire peut aisément réagir avec la plupart des espèces oxygénées et se transformer en dioxyde d'azote (NO₂) lequel peut donner du trioxyde d'azote (N₂O₃) pour enfin aboutir à un ion nitrate stable (NO₃⁻) (Bouden, 2018).

1.4. Sources des radicaux libres

La production des espèces oxydantes est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. En effet, l'organisme a besoin d'O₂ pour produire de l'énergie au cours des réactions dites de respiration oxydative (Wl *et al.*, 2010).

1.4.1. Sources endogène

Où les radicaux libres sont des produits des réactions de l'organisme (Migdal et Serres, 2011).

1.4.1.1. Respiration mitochondriale

Les mitochondries sont des organites intracellulaires qui permettent principalement la synthèse d'énergie cellulaire par la production d'ATP (Adénosine triphosphate). Chez la plupart des organismes eucaryotes, l'accepteur final d'électrons est l'oxygène : il s'agit de la respiration aérobie. La majorité de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente, ce qui conduit à la production d'eau, cette réaction est catalysée par l'enzyme cytochrome oxydase :



Cette réaction peut cependant laisser fuir des électrons qui vont produire des espèces radicalaires de l'oxygène. Ces électrons réagissent avec les molécules d'oxygène, créant ainsi des radicaux superoxydes (0,4 à 4 % de l'oxygène consommé) (Guillouty, 2016).

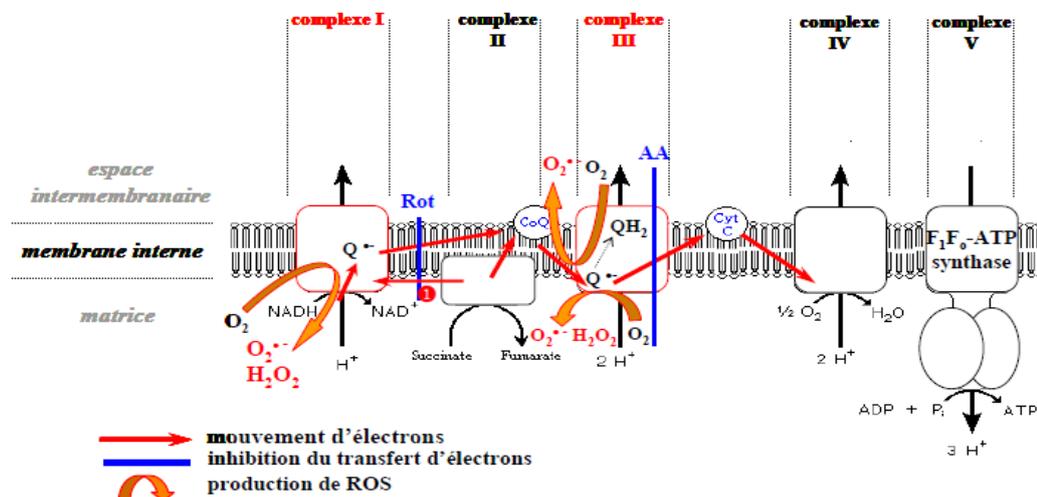


Figure 1. Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire (Garait, 2006).

1.4.1.2. Phagocytose

Lorsqu'un agent étranger a réussi à traverser les barrières naturelles de l'organisme, le système immunitaire se met en place de façon rapide et locale une réponse immédiate et non spécifique. Il s'agit de la phagocytose, La NADPH-oxydase est composée de différentes sous-unités cytosoliques et membranaires qui s'assemblent à la membrane du phagosome.

L'activation du système enzymatique de la NADPH-oxydase dans l'explosion oxydative entraîne la production de formes réactives de l'oxygène. Une fois phagocytée, les ROS synthétisées par la NADPH-oxydase vont détruire l'agent responsable puis les déchets sont expulsés (Guillouty, 2016).

1.4.1.3. Xanthine oxydase (XO)

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

1.4.1.3. Oxyde nitrique synthase (NOS)

Est un générateur important du NO^{\bullet} (oxyde Nitrique), à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages. Le NO^{\bullet} permet la production des autres RNS tel que le peroxydite $ONOO^{\bullet}$ (De Marco, 2013).

1.4.2. Sources exogène

Les êtres vivants sont exposés quotidiennement à des polluants (fumée de cigarette, rayons ultraviolets, les métaux tels que le fer (Fe), cuivre (Cu), différentes expositions de pesticide ...) susceptibles d'être à l'origine de la production de radicaux libres (Saffidine, 2015).

1.5. Rôle physiologique et pathologique des ROS

Dans les conditions dites physiologiques, il y a un équilibre entre la production des radicaux libres et les mécanismes endogènes de défenses antioxydantes, les ROS peuvent fonctionner comme des seconds messagers dans les cellules des mammifères pour réguler les voies de transduction de signal et participent à des nombreuses fonctions comme dans la phagocytose, bactéricide. Leurs surproductions et/ou un déficit en systèmes antioxydants sont, à ce titre, impliqués dans les mécanismes physiopathologiques de nombreuses pathologies tel que le cancer, diabète, maladies neurodégénératives, ...etc. (Bouden, 2018).

1.6. Antioxydants

Les antioxydants sont des composés pouvant être de nature exogène ou endogène et possédant la capacité d'empêcher la génération des oxydants toxiques (Saffidine, 2015).

1.6.1. Enzymatique

1.6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Est une enzyme localisée dans le cytosol et les mitochondries. Elle catalyse dismutation

de l'anion superoxyde (O_2^-) en H_2O_2 . La SOD élimine les ROS après leur formation (Garait, 2006).

1.6.1.2. Glutathion peroxydase (GPx)

La GPx est une famille d'enzyme divisé en deux groupes, les enzymes sélénium (Se)-indépendant et les enzymes (Se)-dépendant présentent dans le cytoplasme et dans la mitochondrie. Elle catalyse la conversion de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (Garait, 2006).

1.6.1.3. Catalase

La catalase est également responsable de l'élimination d' H_2O_2 par une transformation en H_2O et O_2 . Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges (Garait, 2006).

1.6.2. Antioxydants non enzymatique

1.6.2.1. Vitamine C (acide ascorbique)

Est un antioxydant hydrosoluble très puissant qui se concentre au niveau de l'organisme dans les milieux aqueux, ses associés antioxydants primaires sont la vitamine E et les caroténoïdes (Ré *et al.*, 2005).

1.6.2.2. Vitamine E (tocophérol)

Elle est considérée comme le principal antioxydant attaché à la membrane utilisé par la cellule pour inhiber la peroxydation lipidique (Padayatty, 2003).

1.6.2.3. Polyphénols

Les polyphénols constituent le groupe de métabolites le plus large (flavonoïdes, tannins, esters d'hydroxycinnamates et lignines). En effet, les antioxydants phénoliques interfèrent dans l'oxydation des lipides et d'autres molécules par le transfert rapide d'un atome d'hydrogène aux radicaux (Saffidine, 2015).

1.7. Flavonoïdes

1.7.1. Définition

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents végétaux (Ghedira, 2005).

1.7.2. Structure

Ils sont chimiquement basés sur un composé de quinze atomes de carbone. Squelette

constitué de deux cycles benzéniques (A et B) liés par un cycle pyrane hétérocyclique (C) (Shahank et Abhay, 2013).

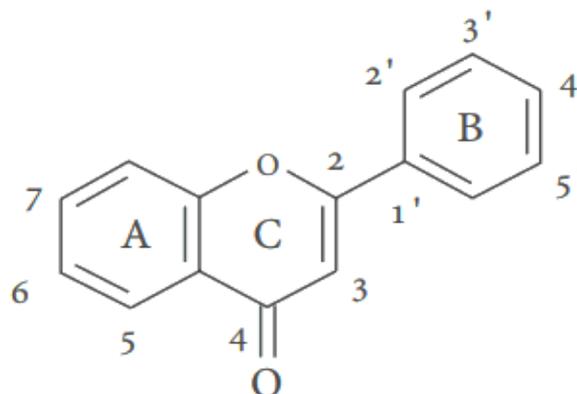


Figure 2. Structures de l'enchaînement benzo- γ -pyrone (Ghedira, 2005).

1.7.3 Classification

Les flavonoïdes peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- γ -pyrone. Les flavonoïdes au sens strict sont des composés dont la substitution par un noyau benzénique se fait en position 2. Les composés présentant une substitution en position 3 sont désignés par le terme isoflavonoïdes. Selon la nature de l'hétérocycle (γ -pyrone ou son dihydro-dérivé), on distingue : les flavones, les flavonols, les flavanones, et les dihydroflavanols. Les flavonoïdes peuvent se présenter sous forme d'aglycones ou génines (entités dépourvues de reste osidique) ou d'hétérosides (portant un ou plusieurs résidus osidiques) (Annexe 1) (Ghedira, 2005).

1.7.4. Activités biologiques des flavonoïdes

Flavonoïdes sont responsables de la diversité des activités pharmacologiques. Leurs activités dépendent de leurs structures, nature chimique et degré d'hydroxylation. Intérêt récent dans ces substances a été stimulé par le potentiel bienfait pour la santé découlant des activités antioxydantes de ces composés polyphénoliques. Groupes hydroxyle fonctionnels dans les flavonoïdes atténuent leurs effets antioxydants en nettoyant radicaux libres et/ou par chélation d'ions métalliques. Le nombre d'études a suggéré des effets protecteurs de flavonoïdes contre de nombreuses maladies infectieuses (bactériennes et virales) et les maladies dégénératives telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers et autres maladies liées à l'âge (Shahank et Abhay, 2013).

Chapitre 2 : Plantes médicinales

2.1. *Thymus serpyllum* L. (TS)

2.1.1. Généralité et utilisation traditionnel

Thym sauvage (*Thymus serpyllum* L.), une plante aromatique appartenant à la famille Lamiaceae, c'est une plante bien connu et largement distribué dans la région montagneuse de l'Anatolie centrale de la Turquie, a des propriétés biologiques et pharmacologiques. *Thymus serpyllum* L., qui possède une activité : antiseptique, diaphorétique, analgésique, antitussif et spasmolytique est considéré comme un excellent médicament pour la préparation de bains aux herbes et oreillers à base de plantes. Le thé fait de ces feuilles aromatiques est bon contre troubles nerveux et excellent contre les crampes. L'infusion d'herbes est réputée utile dans le traitement de l'alcoolisme, alors que la décoction d'herbes est généralement utilisée pour soulager la coqueluche, les spasmes et prévenir la chute des cheveux (Wesolowska *et al.*, 2014).



Figure 3. Aspect morphologique de *Thymus serpyllum* L.

2.1.2. Classification

Tableau 1. Classification botanique de *Thymus serpyllum* L. (Ghedira et Goetz, 2010).

Classification	réparation systématique
Règne	Plantae
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	Thymus
Espèce	<i>Thymus serpyllum</i>

2.1. *Equisetum arvense* L. (EA)

2.1.1. Généralité et utilisation traditionnel

La prèle des champs, plante herbacée vivace de 30 à 40 cm de haut, comporte des tiges fertiles terminées par un épi sporangifère roux, ovale et des tiges stériles creuses, cannelées, articulées. Aux nœuds, sont insérées des feuilles verticillées, de taille réduite ; en forme de dents soudées à extrémité noire, ces feuilles forment une gaine autour de la tige. Fréquente en France et dans les pays tempérés de l'hémisphère Nord, elle croît dans les sols humides, voire marécageux, argilosiliceux. Cette plante a un effet reminéralisant, antidiabétique, antimicrobienne, anti-inflammatoire, Analgésique (Ghedira et Goetz, 2010).



Figure 4. Aspect morphologique d'*Equisetum arvense* L.

2.1.2. Classification

Tableau 2. Classification botanique d'*Equisetum arvense* L. (Ghedira et Goetz, 2010).

Classification	répartition systématique
Règne	Plantae
Classe	Equisetopsida
Ordre	Equisetales
Famille	Equisetaceae
Genre	Equisetum
Espèce	<i>Equisetum arvense</i> L.

Chapitre 3 : Matériel et Méthodes

3.1. Matériel

3.1.1. Matériel biologique

La récolte du *Thymus serpyllum* L. a été effectuée au mois de juillet (El-Kantara wilaya de Biskra). La récolte de l'*Equisetum arvense* L. a été effectuée au mois d'Aout (Jijel), les deux plantes ont été identifiées par le Prof. Oudjih Bachir (Département d'agronomie, université de Batna).

3.1.2. Matériel chimique

Parmi les produits utilisés dans la réalisation de ce présent travail : acétate de sodium, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, acide acétique, chloroforme, EDTA (Ethylene Diamine Tetra acetic Acid), FeCl_3 , (BIOCHEM).

Acétate d'éthyle, acide Sulfurique, BHT (Butylated Hydroxy Toluène), DPPH, éthanol, éther de pétrole, Ferrozine, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, gel de silice, HCl, hexane, quercitrine, TPTZ (Tripyridyl-triazine), et la Vanilline ont été obtenues de (SIGMA-ALDRICH).

Le Méthanol (EMSURE) et le $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (ANALAR NORMAPUR).

Les plaques de gel de silice (20/20) ont été obtenues de (MERCK).

3.1.3. Appareillage

Balance numérique (SCOUT SE-OHAUS), balance analytique (KERN-ABJ), rotavapeur (HEIDOLPH), spectrophotomètre UV-Visible (JENWAY6300, UV-2005 J.P.SELECTA).

3.2. Méthodes

3.2.1. Préparation de matériel biologique

Les parties aériennes des deux plantes ont été nettoyé et séché à température ambiante et à l'ombre, en suite broyé à l'aide d'un mortier. Pour obtenir le broyat des plantes.

3.2.2. Préparation et fractionnement des extraits bruts (EBr)

3.2.2.1. Préparation des extraits bruts

3.2.2.1. a. Préparation de l'extrait brut hydro-alcoolique (EBr HAl) : les broyats (100 g) ont été macérés avec 1 litre de méthanol/eau (80/20 %, respectivement). Le mélange a été laissé macérer pendant 48h. Ensuite, le mélange a été filtré à l'aide d'un papier filtre. Le filtrat obtenu a été conservé à 4°C tandis que le précipité a été soumis à une deuxième extraction avec 1 litre de méthanol/eau (50/50 %, respectivement), le deuxième filtrat a été mélangé avec

le premier et le deuxième précipité a été jeté. Les deux filtrats obtenus ont été mis à l'évaporation à 40°C pour éliminer le maximum du solvant. L'extrait obtenu pour chaque plante est considéré comme étant l'extrait brut hydro-alcoolique (EBr HAl). La moitié de volume de ce dernier a été séché et conservé à 4°C et l'autre moitié subie un fractionnement avec différents solvants (Markham, 1982).

3.2.2.1.b. Préparation de l'extrait brut alcoolique (EBr Al) : les broyat (100 g) ont été macérés avec 1 litre de méthanol, le mélange a été laissé macérer pendant 48h. Ensuite le mélange a été filtré à l'aide d'un papier filtre, le filtrat obtenu a été conservé à 4°C tandis que le précipité a été soumis à une deuxième extraction méthanolique (1 litre), le deuxième filtrat a été mélangé avec le premier et le deuxième précipité a été jeté. Les deux filtrats obtenus ont été mis à une évaporation à 40°C pour éliminer le maximum du méthanol. L'extrait obtenu pour chaque plante est considéré comme étant l'extrait brut alcoolique (EBr Al), ce dernier a été séché et conservé à 4°C jusqu'à son utilisation (Trabsa *et al.*, 2015).

3.2.2.2. Fractionnement des extraits bruts

3.2.2.2.a. Fractionnement de l'EBr HAl par lavage liquide-liquide : l'EBr HAl pour chaque plante a été initialement mélangé avec l'éther de pétrole, dans une ampoule à décanté, le mélange a été laissé décanter, et la phase organique supérieure a été récupérée. L'extraction est refaite plusieurs fois jusqu'à ce que le solvant (éther de pétrole) devienne transparent. L'éther de pétrole est par la suite évaporé et l'extrait résultant est considéré comme étant l'extrait de l'éther de pétrole (EEp). La phase aqueuse résiduelle est soumise à une autre extraction par le chloroforme, et enfin par l'acétate d'éthyle en suivant les mêmes étapes que la première extraction par l'éther de pétrole. Quatre extraits sont obtenus ; l'extrait d'éther de pétrole (EEp), l'extrait du chloroforme (ECh), l'extrait de l'acétate d'éthyle (EAe) et l'extrait aqueux (EAq) résiduelle. Les quatre extraits ont été séchés et conservés à 4°C jusqu'à son utilisation (Markham, 1982).

3.2.2.2.b. Fractionnement de l'EBr Al par chromatographie sur phase inverse : l'EBr Al de chaque plante a été séparé sur une colonne chromatographique d'adsorption en phase inverse sur un gel de silice. L'activation de ce dernier a été réalisée en mélangeant une quantité de gel de silice avec l'EBr Al de chaque plante (TS ; 0.321 g et EA ; 0.633 g), après séchage, le gel active a été coulé dans une colonne. Le système d'élution choisi est un mélange de solvant hexane/éthanol à polarité croissante (Xu *et al.*, 2011).

Les pourcentages des solvants utilisés et le nombre des fractions obtenus sont récapitulés dans le tableau suivant :

Tableau 3. Différents pourcentage hexane/éthanol utilisés dans le fractionnement des EBr Al.

Fraction	FAp	F10%	F20%	F40%	F60%	F80%	FP
% éthanol	0	10	20	40	60	80	100
% hexane	100	90	80	60	40	20	0

Ap : Apolaire P : polaire

3.2.3. Analyse des EBr et des Fractions

3.2.3.1. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes des extraits de deux plantes a été effectué selon la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (Bahorun *et al.*, 1996) ; 1V de chaque extrait (préparé dans l'éthanol) avec des dilutions convenables, a été ajouté à un 1 V de solution d' AlCl_3 (2 % dans l'éthanol). Après 10 min d'incubation, l'absorbance a été lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes a été déduite à partir la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (Figure 5) (0.625 – 40 $\mu\text{g/ml}$) et exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg}$).

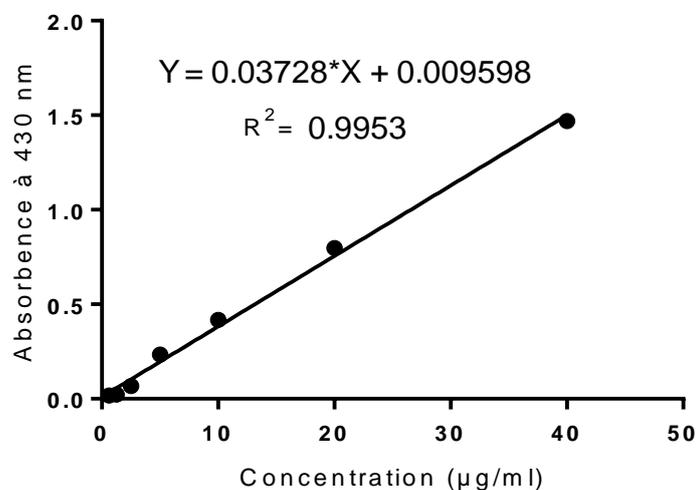


Figure 5. Courbe d'étalonnage d'interaction de la quercétine avec l' AlCl_3 . Chaque point des deux courbes représente la moyenne \pm SD (n = 3).

3.2.3.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Tous les extraits et les fractions ont été analysés en utilisant la CCM en tant qu'empreinte digitale. C'est une technique simple et rapide, largement utilisé pour la séparation des extraits des plantes qui sont des mélanges très complexe des composés polaire et apolaire. Environ 1 cm à partir de bas de plaque de gel de silice, 2.50 μl de chaque extrait

(concentration de chaque extrait = 50 mg/ml) a été déposé sur la ligne de dépôt puis la plaque a été mise dans une chambre de migration avec deux systèmes d'élution (chloroforme/éthanol, acétate d'éthyle/éthanol) à différentes pourcentages. La révélation de plaque de CCM se fait par pulvérisation de réactif de vanilline-acide sulfurique (0.10 g vanillines : 28 ml éthanol : 1 ml acide sulfurique concentré), les plaques ont été chauffés pendant 4 min à 100 °C (Manyi-Loh, 2012).

Tableau 4. Phases mobiles utilisées pour la CCM.

Système d'élution	Volume v/v
Chloroforme/éthanol	10/90, 20/80, 30/70, 40 /60
Acétate d'éthyle/éthanol	10/90, 20/80, 30/70, 40 /60

3.2.4. Tests d'activité antioxydante

3.2.4.1. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH)

Le test d'activité anti-radicalaire est une méthode simple et la plus utiliser pour tester l'activité antioxydante dans différentes extraits des plantes. Dans ce test, l'effet piègeur de radical DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) est suivi spectrophotométriquement à une longueur d'onde 517 nm par la décoloration de radical DPPH de couleur violet au couleur jaune donc une diminution dans l'absorbance en présence d'un antioxydant.

Pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de deux plantes, une gamme des concentrations a été réalisée pour tous les EBrS (Al et HAl), par contre le test a été réalisé pour une concentration fixe (400 µg/ml) de chaque fraction. 40 µl de chaque teste été incubé avec 1 ml de solution éthanolique de DPPH à 0.004 % pendant 30 min (Boumerfeg *et al.*, 2012). Après l'incubation, une lecture au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 517 nm a été faite. Le pourcentage d'inhibition (% I) du radical DPPH par les extraits a été calculé comme suit :

$$\% I = [(AC - AE) / AC] \times 100$$

AC : absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)

AE : absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon)

3.2.4.2. Teste d'activité chélatrice (Ferrozine)

La capacité chélatrice des extraits est mesurée en suivant l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferozine après incubation des échantillons, à différents concentrations, avec le fer divalent selon la méthode de Decker et Welch (1990).

Les solutions d'échantillons (500 µl) sont initialement mélangées avec 100 µl de FeCl₂ (0.6 mM dans l'eau distillée) et 900 µl d'éthanol. Après 5 min, 100 µl de ferrozine (5 mM dans l'éthanol) sont additionnés au milieu réactionnel, le mélange est bien agité puis laissé pour réagir pendant 10 min à température ambiante permettant ainsi la formation de complexe avec un couleur violet (Fe(II)-Ferrozine) ayant un maximum d'absorption à 562 nm. Par ailleurs, le contrôle négatif contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui est remplacé par un volume égal d'éthanol. L'EDTA est utilisé comme chélateur de référence à un intervalle de concentration de 0-40 µg/ml.

L'effet séquestrant des échantillons vis-à-vis du fer est exprimé en pourcentage de chélation selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Chélation} = [1 - (\text{Abs}_{562} \text{ échantillon} - \text{Abs}_{562} \text{ contrôle})] \times 100$$

3.2.4.3. Test d'activité réductrice (FRAP)

Le test de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) est basé sur la réduction de complexe tripyridyl-triazine ferrique (TPTZ-Fe³⁺) en tripyridyl-triazine ferreux (TPTZ-Fe²⁺) dans un milieu acide, cette réduction développe une coloration bleu intense qui peut estimer spectrophotométriquement à une longueur d'onde 593 nm. Cette méthode est décrite initialement par Benzie and Strain (1996) et qu'elle est appliquée sur le plasma. Pulido *et al.* (2000) ont modifié cette méthode et des nouveaux paramètres sont ajoutés. Les différentes concentrations des extraits de deux plantes et ces fractions du 1V a été mélangées avec 1V de TPTZ de 10 mM dans 40 mM HCl et avec 10 V tampon acétate de concentration 300 mM et de pH 3.6 ajusté par l'acide acétique et avec 1V de FeCl₃ 20 mM; la réaction est suivi pendant 30 min (une lecture dans chaque 15 sec pour 4 min puis chaque 5 min jusqu'à 30 min).

Une gamme du FeSO₄·7H₂O (étalon réducteur) entre 0.31 et 1 mM a été utilisée pour calculer les valeurs FRAP des extraits. Le pouvoir réducteur (TAP) est également exprimé en millimole d'équivalents du FeSO₄ par 400 microgramme d'extrait (mmole d'équivalent FeSO₄/400 µg extrait) (Figure 6).

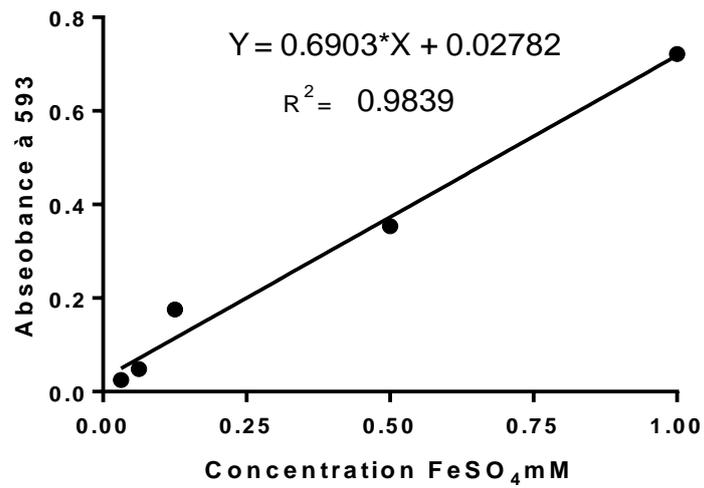


Figure 6. Courbe d'étalonnage de FeSO₄·7H₂O, la concentration exprimer par mM. Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n=3).

Chapitre 4 : Résultats et discussions

4.1. Rendement d'extraction et de fractionnement des EBr

4.1.1. Rendement des EBr Al et HAl

L'extraction des flavonoïdes des deux plantes médicinales a été effectuée par macération dans deux systèmes d'extraction ; hydro-alcoolique (méthanol-eau) et alcoolique (méthanolique) à partir d'une poudre végétale. L'extraction du méthanol peut récupérer des molécules dont la polarité est identique à celle du méthanol (polarité 6.6) ou moins. Mais il existe des molécules hydrosolubles qui sont insoluble dans méthanol, ce qui nécessite une seconde extraction hydro-alcoolique pour récupérer ces molécules. Cette catégorie de molécules comprend une grande partie non flavonoïde et une petite partie flavonoïde (Bourgoui *et al.*, 2016). Le calcul des rendements par rapport au poids de la poudre végétale présenté dans le tableau 5.

D'après le tableau 5, les teneurs en extraits secs varient non seulement d'une plante à une autre mais également en fonction des systèmes d'extractions (Al ou HAl). Pour les rendements des plantes, la plante TS donne un rendement supérieur de celle de la plante EA. Mais pour le système d'extraction le plus grand rendement déterminé raisonnablement est celui d'extraction hydro-alcoolique à cause de leur récupération des molécules hydrosolubles (en plus des molécules soluble dans le méthanol).

Tableau 5 . Pourcentage de rendement d'extraction HAl et Al de TS et EA.

Rendement de plante (%)	TS	EA
EBr HAl	15.50	13.12
EBr Al	11.30	7.45

La comparaison entre les % de rendements par rapport l'EBr Al (Tableau 6) montre que TS présente un rendement inférieur à celle de *Thymus vulgaris* et *Thymus ciliatus coloratus*, ce qui confirme qu'il y a une différence entre le rendement d'extraction des plantes de même genre, en plus l'EBr TS est inférieur aussi à celle de *Origanum majorana* L., et *Salvia officinalis* L. qui sont des plantes de la même famille que TS. En effet, l'EBr Al EA représente un faible rendement par rapport aux autres plantes. Ces résultats traduit par l'influence significatif de l'espèce sur le rendement d'extraction même si du même genre ou famille.

Tableau 6. Rendements en extrait obtenus à partir une extraction AI de déférentes plantes médicinales.

Plante	Rendement AI %	Reference
<i>Origanum majorana L.</i>	28.44	(Hussein <i>et al.</i> , 2013)
<i>Thymus vulgaris</i>	24.66	(Hussein <i>et al.</i> , 2013)
<i>Salvia officinalis L.</i>	23.41	(Hussein <i>et al.</i> , 2013)
<i>Thymus ciliatus coloratus</i>	13.31	(Kholkhal, 2014)

D'autre part, l'EBr HAl TS et EA représentent un rendement moyen par rapport aux autres plantes (Tableau 7).

Tableau 7. Rendements en extrait obtenus à partir une extraction HAl de déférentes plantes médicinales.

Plante	Rendement HAl %	Reference
<i>Terminalia glaucescens planch</i>	21.90	(Bolou <i>et al.</i> , 2011)
<i>Cynara scolymus L.</i>	14.00	(Mahmoudi <i>et al.</i> , 2013)
<i>Lepidium sativum</i>	7.60	(Medini <i>et al.</i> , 2018)

4.1.2. Rendement du fractionnement des EBrS

4.1.2.1. Rendement du fractionnement de l'EBr HAl par lavage liquide-liquide

Le calcul des rendements par rapport au poids d'EBr HAl (Tableau 8) a montré pour la plante TS que l'EAq représente le rendement le plus élevé, suivi par l'ECh, et enfin le rendement de l'EEp et EAe sont les plus faible et cela indique que cette plante est riche en molécules hautement polaire. L'ordre de % de rendement obtenu pour la deuxième plante (EA) a montré que l'EAq représente le rendement le plus élevé (61.75 %) suivi par l'EAe, l'ECh et en fin le rendement de l'EEp est le plus faible ce qui signifie que cette plante est riche en molécules hautement polaire.

D'après Markham (1982), l'utilisation des solvants à polarité croissante permet la récupération des flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés, les graisses, les stérols et les pigments par l'ajout de l'éther de pétrole, des flavonoïdes aglycones par l'ajout de chloroforme, des flavonoïdes glycosylés en particulier mono, di et tri-glycosylés moyennement polaires à l'aide de l'utilisation d'acétate d'éthyle. Et le reste c'est la fraction aqueuse qui récupérée les flavonoïdes les plus polaire (di, tri et tétra-glycosylés).

Tableau 8 . Rendements (Rdm) des fractions issues de lavage liquide-liquide avec différents solvants par rapport au poids total d'EBr.

Fraction	Rdm TS %	Rdm EA %
EEp	13.60	3.25
ECh	28.40	6.00
E Ae	13.60	15.50
E Aq	36.40	61.75

4.1.2.2. Rendement du fractionnement d'EBr Al par chromatographie d'adsorption en phase inverse

Après l'extraction alcoolique le fractionnement des deux EBr Al a été effectué par chromatographie d'adsorption qui est utilisé pour la séparation des substances et molécules d'un mélange, basé sur les interactions intermoléculaire entre la substance à étudier (soluté) l'adsorbant ou éluant (solvant) et l'adsorbant la phase stationnaire. L'interaction des groupes fonctionnels polaires de l'échantillon avec des sites d'adsorption distribué sur la phase stationnaire. La force de ces interactions polaires est responsable de la sélectivité de la séparation en chromatographie liquide-solide (Ahuja, 2003). Les flavonoïdes sont des composés hautement polaires capables d'interagir et former un réseau de liaisons hydrogène, pour cela le gel de silice qu'est très polaire est choisi pour être la phase stationnaire et la phase mobile utilisée est un mélange binaire (Hexane/Ethanol) à polarité croissante. Sept fractions ont été obtenues dont les rendements de ces fractions par rapport au poids de l'EBr Al ont été calculés (Tableau 9).

A cause de l'utilisation d'un éluant à polarité croissante, les molécules éluer dans F1 ont un temps de rétention plus court que celle éluer dans F2, à cause de leur faible polarité, l'interaction des groupes fonctionnels polaires de la molécule avec les sites d'adsorption distribué sur la phase stationnaire est désactivé par l'éluant qui est plus polaire, par conséquence une molécule très polaire nécessite une éluant plus polaire pour désactivé ces groupes fonctionnels polaires. Donc les molécules présentent dans l'EBr sont séparés en fonction de leur polarité.

Pour la plante TS la première fraction (Ap) enregistre le plus grand rendement par rapport aux autres fractions ceci peut être due à la richesse de cette plante par des composés faiblement polaire, suivi par F40%, F20%, FP, F10%, F60% et enfin F80% à le rendement le plus faible 2.39 %.

Tableau 9. Rendement de fractionnement par chromatographie sur phase inverse en pourcentage par rapport d'EBr-Al.

Fraction	TS Rdm %	EA Rdm %
Ap	15.24	2.02
10%	7.62	18.00
20%	9.56	25.83
40%	9.57	19.01
60%	5.08	4.71
80%	2.39	0.94
P	8.72	4.33

Pour la plante EA la troisième fraction (F20%) enregistre le plus grand rendement par rapport aux autres fractions ceci peut être due à la richesse de cette plante par des composés moyennement polaire, suivi par F40%, F10%, F60%, FP et en fin F80% à rendement le plus faible.

4.2. Analyses des extraits et des fractions

4.2.1. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes comme l'un des groupes les plus représentatifs des composés phénoliques sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux, ces composés ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Comme la plupart des flavonoïdes, ils possèdent des propriétés antioxydantes. Le spectre d'activités biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes a été signalé en exerçant une activité biologique multiple (les activités antimicrobiennes, cytotoxiques, anti-inflammatoires et anti tumorales) mais, l'activité la mieux décrite, de presque tous les groupes des flavonoïdes, est leur capacité à agir comme des puissants antioxydants qui peuvent protéger le corps humain contre les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (Manzo, 2018).

L'estimation quantitative des flavonoïdes a été réalisée selon la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), la quercétine a été utilisé comme étalon. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 430 nm.

La quantité des flavonoïdes a été rapportée en microgramme d'équivalent de la quercétine par un milligramme d'extrait (μg EQ/mg d'extrait).

Les résultats du tableau 10 montrent que les teneurs en flavonoïdes varient considérablement entre les différents extraits et plantes. La teneur en flavonoïdes des extraits et fractions TS diminue dans l'ordre : EBr HAl, EBr Al, ECh, EAe, FAp, F40%, EAq, F20%, F10%, F60%, F80%, FP et EEp, d'après ces doses les EBr Al et HAl présentent des proches teneurs en flavonoïdes.

Tableau 10. Dosage des flavonoïdes des plantes TS/EA

Extrait	TS µg EQ/mg d'extrait	EA µg EQ/mg d'extrait
HAl	11.72 ± 0.30	6.24 ± 0.14
EEp	0.22 ± 3.39	1.75 ± 0.02
ECh	7.68 ± 0.39	46.76 ± 2.04
EAe	7.39 ± 0.20	18.25 ± 1.86
EAq	2.19 ± 0.07	2.32 ± 0.06
Al	11.15 ± 1.75	6.11 ± 0.32
FAP	5.34 ± 0.21	1.42 ± 0.09
F10%	1.50 ± 0.13	1.05 ± 0.25
F20 %	1.74 ± 0.10	4.91 ± 0.17
F40 %	2.52 ± 0.10	5.34 ± 0.31
F60 %	0.74 ± 0.07	3.98 ± 0.24
F80 %	0.69 ± 1.35	1.09 ± 0.24
FP	0.33 ± 0.14	0.85 ± 0.03

Le dosage des flavonoïdes dans l'EBr HAl de *Thymus Algeriensis* a été fait par la même méthode du chlorure d'aluminium, et montre que l'EBr HAl de cette plante possède une teneur en flavonoïdes de 2.10 ± 0.54 mg EQ/g (Bakchiche et Gherib, 2014), la comparaison de ce résultat avec le rendement d'EBr HAl TS montre que l'espèce influence significativement sur les doses des flavonoïdes.

Pour la deuxième fois les résultats de dosage présentent des concentrations rapprochés des deux EBr Al et HAl de plante EA ce qui signifie que le solvant d'extraction n'a pas influencé significativement sur le dosage des flavonoïdes pour les deux plantes.

D'après les données du tableau, l'ordre croissant des teneurs en flavonoïdes pour les fractions HAl EA sont disposés comme suit : EEp > EAq > EAe > ECh, et pour les fractions

Al EA sont disposés comme suit en ordre croissant : FP > F10% > F80% > FAP > F60% > F20% > F40%.

L'ECh de plante EA présente une teneur $46.76 \pm 2.04 \mu\text{g EQ/mg}$ qui est inférieur à celle de l'ECh de *Scabiosa Atropurpurea* $58\mu\text{g EQ/mg}$ (Fahima *et al.*, 2018).

Au regard des résultats de dosage, la plante TS présente la teneur la plus élevée en flavonoïdes, mais les techniques de fractionnement utilisées dans cette étude ont séparé une fraction (ECh EA) très riche en flavonoïde avec une très forte concentration. Ce qui est peut-être dû à la richesse de cette plante (EA) en flavonoïde aglycone.

4.2.2. Analyse par chromatographie sur couche mince

Pour une caractérisation partielle des différents extraits des deux plantes. En utilisant la CCM sur des plaques de gel de silice. C'est une technique simple largement utilisée pour la séparation des extraits de plante qui sont des mélanges très complexes des composés polaire et apolaire ; un large choix de solvant peut être utilisé (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008).

Les résultats de séparation des EBr et des fractions sont présentés sous formes des spots avec les rapports frontaux (Tableau 11)

Tableau 11. Rapports frontaux (Rf) des spots des extraits et fractions en différents systèmes d'éluion.

Système	% éluant chloroforme ou acétate d'éthyle/EtOH %	Extrait	Nbr des spots	Rf/TS	Nbr des spots	Rf / EA
chloroforme / éthanol	10/90 %	HAI	1	0.65	3	0.25/0.67/0.9
		EEp	2	0.62/0.87	2	0.51/0.88
		ECh	3	0.67/0.8/0.93	2	0.64/0.9
		EAE	2	0.62/0.8	1	0.93
		EAg	3	0.65/0.75/0.84	1	0.62
		AI	1	0.65	1	0.67
		FAP	0	/	0	/
		F1%	2	0.69/0.81	0	/
		F2%	1	0.79	2	0.75/0.92
		F40%	2	0.53/0.77	1	0.72
		F60%	3	0.2/0.61/0.84	1	0.7
		F80%	3	0.16/0.59/0.89	1	0.53
		FP	1	0.32	1	0.58
chloroforme / éthanol	20/80 %	HAI	4	0.4/0.49/0.6/0.74	0	/
		EEp	1	0.89	1	0.6
		ECh	5	0.61/0.68/0.71/0.83 /0.95	3	0.57/0.78/0.94
		EAE	4	0.48/0.58/0.71/0.83	3	0.65/0.72/0.94

Chloroforme / éthanol	20/80 %	EAq	3	0.42/0.67/0.86	3	0.19/0.3/0.61
		Al	3	0.43/0.72/0.87	1	0.64
		FAP	0	/	0	/
		F10%	0	/	0	/
		F20%	4	0.2/0.69/0.76/0.9	5	0.13/0.46/0.72/0.78/0.93
		F40%	5	0.26/0.6/0.67/0.75/ 0.79	4	0.69/0.77/0.86/0.96
		F60%	3	0.72/0.84/0.94	3	0.57/0.7/0.79
		F80%	2	0.5/0.86	3	0.25/0.44/0.56
		FP	1	0.13	3	0.3/0.57/0.73
chloroforme / éthanol	30/70 %	HA1	3	0.37/0.62/0.83	1	0.27
		EEp	1	0.52	1	0.53
		ECh	3	0.62/0.77/0.89	0	/
		EAc	6	0.3/0.4/0.52/0.67/ 0.84/0.88	3	0.62/0.8/0.93
		EAq	2	0.45/0.61	4	0.41/0.57/0.78/0.93
		Al	6	0.38/0.5/0.51/0.61/ 0.76/0.9	4	0.16/0.36/0.63/0.89
		FAP	3	0.46/0.77/0.91	0	/
		F10%	3	0.37/0.76/0.91	1	0.4
		F20%	5	0.14/0.45/0.62/0.78 / 0.95	2	0.64/0.8
		F40%	5	0.46/0.56/0.6/0.77/ 0.94	3	0.62/0.77/0.91
		F60%	4	0.12/0.32/0.58/0.9	4	0.16/0.43/0.61/0.73
		F80%	3	0.14/0.21/0.9	2	0.18/0.35
		FP	2	0.08/0.31	2	0.33/0.43
chloroforme / éthanol	40/60 %	HA1	4	0.25/0.37/0.45/0.7	1	0.29
		EEp	1	0.42	0	/
		ECh	4	0.24/0.39/0.45/0.78	0	/
		EAc	5	0.27/0.38/0.55/0.59 / 0.68	4	0.25/0.48/0.67/0.88
		EAq	0	/	3	0.1/0.27/0.5
		Al	4	0.26/0.39/0.49/0.82	1	0.47
		FAP	0	/	0	/
		F10%	3	0.21/0.28/0.6	3	0.47/0.63/0.8
		F20%	2	0.42/0.91	4	0.25/0.48/0.61/0.81
		F40%	4	0.42/0.5/0.77/0.88	3	0.52/0.6/0.85
		F60%	5	0.28/0.35/0.42/0.74 / 0.92	1	0.53
F80%	3	0.07/0.21/0.68	1	0.33		
FP	1	0.18	2	0.26/0.36		
Acétate d'éthyle /éthanol	10/90%	HA1	1	0.76	0	/
		EEp	0	/	0	/
		ECh	1	0.81	0	/
		EAc	1	0.85	0	/

Acétate d'éthyle /éthanol	10/90%	EAq	1	0.85	1	0.74
		Al	1	0.69	0	/
		FAP	0	/	0	/
		F10%	1	0.68	0	/
		F20%	1	0.68	1	0.78
		F40%	3	0.2/0.66/0.82	1	0.78
		F60%	1	0.66	2	0.38/0.78
		F80%	1	0.82	0	/
		FP	1	0.1	1	0.6
Acétate d'éthyle /éthanol	20/80 %	HA1	3	0.59/0.72/0.86	1	0.22
		EEp	2	0.35/0.64	2	0.25/0.56
		ECh	3	0.65/0.7/0.8	3	0.22/0.68/0.8
		EAc	5	0.44/0.56/0.63/0.72 / 0.86	3	0.24/0.67/0.8
		EAq	4	0.53/0.61/0.75/0.84	3	0.25/0.68
		Al	2	0.69/0.84	3	0.21/0.6/0.89
		FAP	0	/	0	/
		F10%	1	0.68	0	/
		F20%	4	0.56/0.65/0.7/0.8	2	0.74/0.97
		F40%	4	0.61/0.67/0.74/0.9	3	0.72/0.81/0.94
		F60%	3	0.18/0.51/0.74	3	0.56/0.69/0.82
		F80%	4	0.18/0.43/0.82/0.92	1	0.49
		FP	2	0.21/0.33	0	/
Acétate d'éthyle /éthanol	30/70 %	HA1	3	0.46/0.72/0.9	2	0.69/0.82
		EEp	3	0.11/0.25/0.55	2	0.56/0.89
		ECh	4	0.43/0.46/0.71/0.81	2	0.44/0.67
		EAc	3	0.42/0.66/0.89	4	0.4/0.57/0.71/0.92
		EAq	4	0.41/0.52/0.7/0.89	1	0.57
		Al	3	0.4/0.74/0.85	2	0.67/0.9
		FAP	0	/	0	/
		F10%	3	0.4/0.6/0.77	0	/
		F20%	4	0.41/0.6/0.73/0.93	4	0.44/0.75/0.79/0.94
		F40%	5	0.41/0.48/0.62/0.76 / 0.83	2	0.73/0.86
		F60%	5	0.19/0.39/0.42/0.63 / 0.77	1	0.71
		F80%	3	0.14/0.23/0.76	1	0.52
		FP	5	0.14/0.19/0.23/0.78 / 0.9	1	0.55
Acétate d'éthyle /éthanol	40/60 %	HA1	3	0.32/0.6/0.84	2	0.2/0.57
		EEp	3	0.09/0.53/0.83	2	0.28/0.47
		ECh	4	0.35/0.65/0.8/0.88	2	0.46/0.59
		EAc	3	0.62/0.86/0.94	7	0.26/0.36/0.6/0.67/0.71/ 0.84/0.92
		EAq	2	0.06/0.74	2	0.27/0.59
		Al	4	0.33/0.45/0.57/0.64	2	0.4/0.56
		FAP	1	0.69	3	0.43/0.69/0.8
		F10%	3	0.93/0.72/0.54	0	/

Acétate d'éthyle /éthanol	40/60 %	F20%	3	0.44/0.61/0.7	2	0.64/0.75
		F40%	6	0.27/0.47/0.61/0.68 / 0.79/0.84	3	0.63/0.78/0.95
		F60%	3	0.58/0.72/0.86	3	0.46/0.61/0.78
		F80%	3	0.56/0.66/0.86	1	0.52
		FP	3	0.5/0.61/0.75	1	0.56

Les meilleurs systèmes d'éluion sont présents dans le tableau suivant (Tableau 12) :

Tableau 12. Meilleurs systèmes d'éluion avec le nombre des spots et les rapports frontaux.

Plante	Extrait ou fraction	Meilleur système d'éluion	% éluant chloroforme ou acétate d'éthyle/EtOH %	Nbr des spots	Rf
TS	Al	Chloroforme/éthanol	30/70 %	6	0.38/0.50/0.51/0.61/0.76/ 0.90
	FAP	Chloroforme/éthanol	30/70 %	3	0.46/0.77/0.91
	F10%	Chloroforme/éthanol	40/60 %	3	0.21/0.28/0.60
	F20%	Chloroforme/éthanol	30/70 %	5	0.14/0.45/0.62/0.78/0.95
	F40%	Acétate d'éthyle/éthanol	40/60 %	6	0.27/0.47/0.61/0.68/0.79/ 0.84
	F60%	Chloroforme/éthanol	40/60 %	5	0.28/0.35/0.42/0.74/0.92
	F80%	Acétate d'éthyle/éthanol	20/80 %	4	0.18/0.43/0.82/0.92
	FP	Acétate d'éthyle/éthanol	30/70 %	5	0.14/0.19/0.23/0.78/0.9
	HAl	Chloroforme/éthanol	40/60 %	4	0.26/0.39/0.49/0.82
	EEp	Acétate d'éthyle/éthanol	40/60 %	3	0.09/0.53/0.83
	ECh	Chloroforme/éthanol	20/80 %	5	0.61/0.68/0.71/0.83/0.95
	EAc	Chloroforme/éthanol	30/70 %	6	0.30/0.40/0.52/0.67/0.84/ 0.88
	EAcq	Acétate d'éthyle/éthanol	30/70 %	4	0.41/0.52/0.70/0.89
EA	Al	Chloroforme/éthanol	30/70 %	4	0.16/0.36/0.63/0.89
	FAP	Acétate d'éthyle/éthanol	40/60 %	3	0.43/0.69/0.80
	F10%	Chloroforme/éthanol	40/60 %	3	0.47/0.63/0.80
	F20%	Chloroforme/éthanol	20/80 %	5	0.13/0.46/0.72/0.78/0.93
	F40%	Chloroforme/éthanol	20/80 %	4	0.69/0.77/0.86/0.96
	F60%	Chloroforme/éthanol	20/80 %	3	0.57/0.70/0.79
	F80%	Chloroforme/éthanol	20/80 %	3	0.25/0.44/0.56
FP	Chloroforme/éthanol	20/80 %	3	0.30/0.57/0.73	

	HAI	Chloroforme/éthanol	10/90 %	3	
	EEp	Acétate d'éthyle/éthanol	40/60 %	2	0.28/0.47
	ECh	Chloroforme/éthanol	20/80 %	3	0.57/0.78/0.94
EA	EAe	Acétate d'éthyle/éthanol	40/60 %	7	0.26/0.36/0.60/0.67/0.71/ 0.84/0.92
	EAq	Chloroforme/éthanol	30/70 %	4	0.41/0.57/0.78/0.93

4.3. Tests d'activité antioxydante

L'activité antioxydante des différents extraits issus des deux plantes étudiées a été évaluée *in vitro* par trois méthodes différentes, le piégeage du radical libre, la chélation des ions de fer et le test de FRAP.

4.3.1. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH)

L'activité anti-radicalaire des différents extraits a été évaluée par leur activité inhibitrice sur une solution éthanolique de DPPH, mesurée à 517 nm. Les standards utilisés étaient la quercétine et le BHT. Dans le test d'activité anti-radicalaire, les antioxydants présents dans les extraits réduisent le diphenyle picryl-hydrazyl ayant une couleur violette en diphenyl picryl-hydrazine de couleur jaune par la donneur d'un atome d'hydrogène ou d'un électron (Ghedadba *et al.*, 2014) (Figure7).

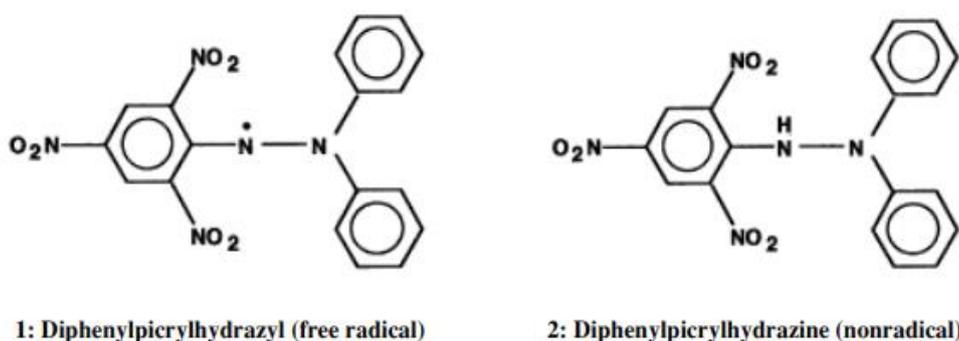


Figure 7. Réaction de réduction du radical DPPH (Philip, 2004).

Les résultats obtenus du cinétique d'inhibition, ont montré que les quatre extraits présentent une activité anti-radicalaire dose dépendante (Figure 8).

Pour la plante TS l'EBr HAI (Figure 8) présente le pouvoir réducteur le plus important par rapport l'EBr Al. A une concentration de 576.92 µg/ml, il atteint un pourcentage d'inhibition égale à 96.96 ± 1.69 %, alors que l'EBr Al n'a atteint que 71.87 ± 0.13 % à la même concentration. Ces activités expriment que l'extraction HAI de cette plante récupère des molécules qui ont une bonne activité anti-radicalaire. Dans cette étude, les résultats ont

montés que les standards utilisés (quercétine et BHT) ont donné un effet supérieur de celui des extraits testés. Ils ont atteint le 100 % d'inhibition à des concentrations de 38,46 µg/ml. En effet, la plante TS a montré un pouvoir de piégeage du radical DPPH très important, à de faibles concentrations, et supérieure à celle de l'EBr de *Thymus ciliatus coloratus* qui présente des pourcentages de 94 % à la concentration de 2,50 mg/ml (Kholkhal, 2014).

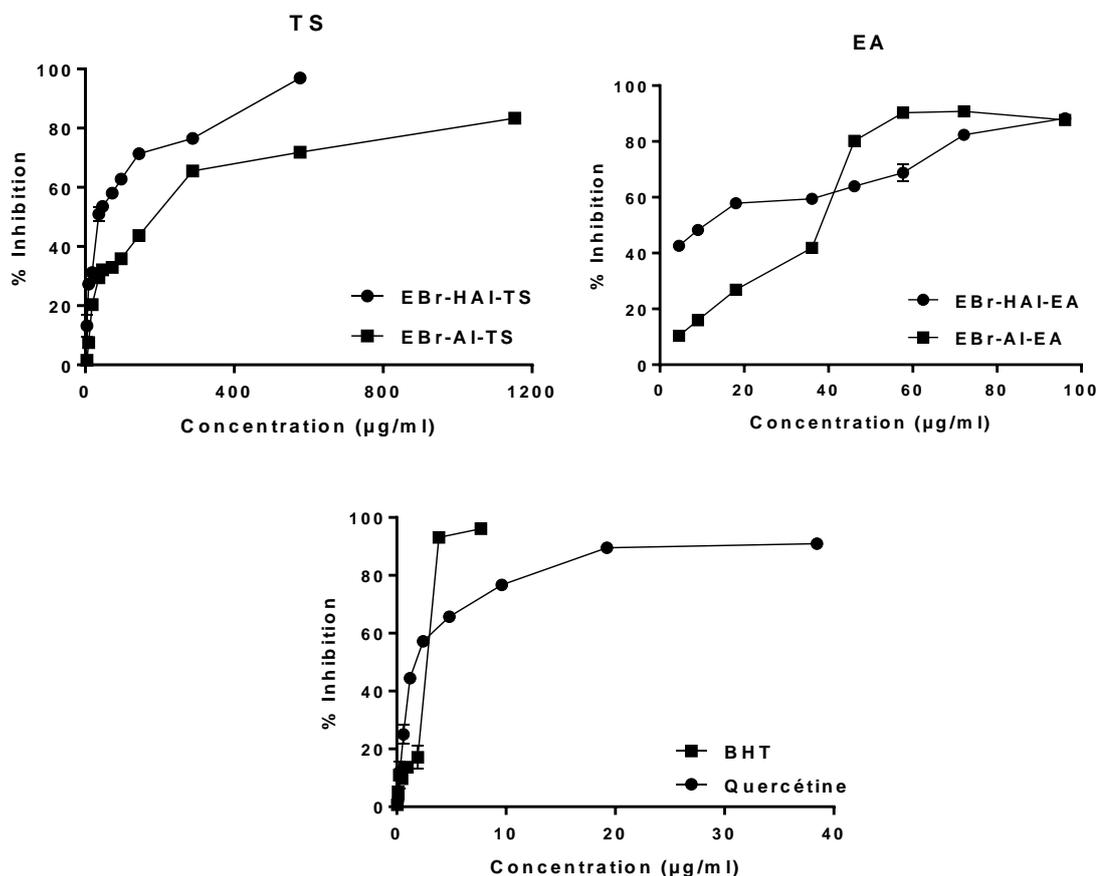


Figure 8. Cinétique d'activité anti-radicalaire des quatre extraits de deux plantes TS/EA avec les standards. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3).

Pour la plante EA (Figure 8), l'EBr HAl commence avec une activité puissante à faible concentration puis il ralentit après la concentration 40 µg/ml. En revanche, l'EBr Al présente une activité lente qui augmente après la concentration 40 µg/ml. Les deux extraits bruts représentent la même activité dans la concentration 96,15 µg/ml. Ces résultats montrent que, dans l'intervalle de concentration 4,50 µg/ml jusqu'à 40 µg/ml l'EBr HAl est plus active que l'EBr Al. En suite, après la concentration 40 µg/ml l'EBr Al devient le plus active puis les deux extraits atteignent la même activité $87,68 \pm 0,57$ % à la concentration 96,15 µg/ml. Les

standards utilisés représentent aussi une activité anti radicalaire supérieur de celle des EBr EA.

L'IC₅₀ c'est les concentrations des différents extraits qui piègent 50 % du radical DPPH. C'est un paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydante ; plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est très élevé (Atoui *et al.*, 2005).

Les résultats obtenus d'IC₅₀ de chaque extrait ont montrés que, l'EBr HAl EA possède l'activité anti-radicalaire la plus puissante parmi les quatre extraits avec une valeur de IC₅₀ = 14.11 ± 3.50 µg/ml, suivi par l'EBr Al du même plante avec IC₅₀ = 30.45 ± 0.16 µg/ml ; tandis que, l'EBr HAl et Al TS ayant l'activité anti-radicalaire la plus faibles avec des valeurs d'IC₅₀ de 54.59 ± 3.07 µg/ml et IC₅₀ = 294.22 ± 55.35 µg/ml, respectivement (Figure 9).

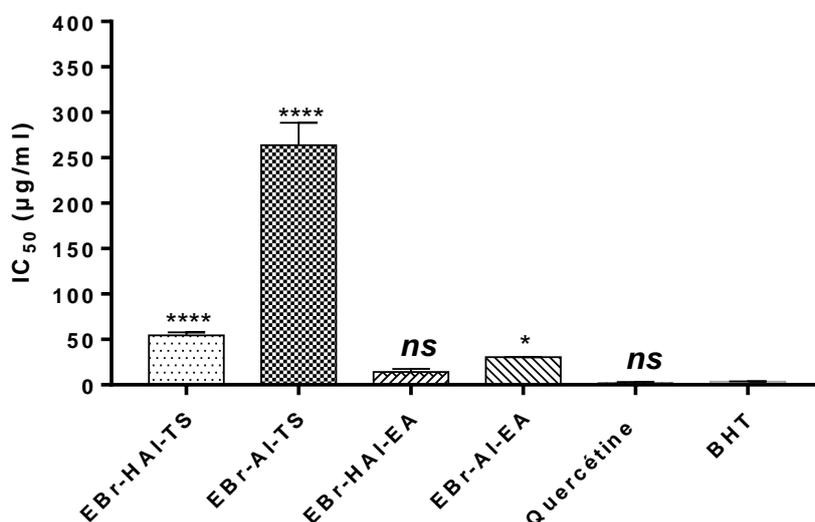


Figure 9. IC₅₀ du radical DPPH par les EBr HAl et Al des deux plantes, quercétine et BHT. Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n=3). **** : $p \leq 0.0001$, * : $p \leq 0.01$, ns : non significatif en comparant avec la BHT.

À des fins comparatives, des antioxydants standards sont utilisés : quercitine et BHT qui ont des IC₅₀ = 2.38 ± 0.88 et 3.44 ± 0.29 µg/ml, respectivement. Cette étude a montré une activité anti-radicalaire très puissante des deux EBr HAl et Al EA ce qui traduit par leur bonne activité anti radicalaire suivie par EBr HAl TS qui a une activité moyenne par rapport aux standards.

La comparaison avec d'autres résultats qui ont été obtenus par la méthode de DPPH sur des EBr HAl et Al des différents plantes (Tableau 13) ont montrés que l'EBr Al TS et EA ont une activité inférieure de celle de EBr Al de *Thymus vulgaris*, *Origanum majorana* L. et *Salvia officinalis* L. et supérieur à celle de EBr Al *Thymus ciliatus coloratus*. D'autre part, l'EBr

HAI TS et EA enregistrent une activité anti radicalaire supérieur à celle d'EBr HAI de *Lepidium sativum*. La comparaison entre les deux plantes montre que EA présente l'activité la plus puissante, la projection de cette résultat sur le dosage des flavonoïdes montre que l'activité des EBr de cette plante est peut être due à d'autres classe des molécules ou bien liée à la nature des flavonoïdes.

Tableau 13. IC₅₀ d'activité anti-radicalaire *vis-à-vis* le DPPH des extraits des plantes.

Extrait	Plante	IC ₅₀ µg /ml	Reference
EBr AI	<i>Thymus vulgaris</i>	1.10 ± 0.10	(Hussein <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Salvia officinalis</i> L.	1.20 ± 0.10	(Hussein <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Origanum majorana</i> L.	1.30 ± 0.10	(Hussein <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Thymus ciliatus coloratus</i>	1070	(Kholkhal, 2014)
Br HAI	<i>Lepidium sativum</i>	11500	(Medini <i>et al.</i> ,2018)

En conclusion, pour les deux plantes l'extraction HAI influence positivement sur l'activité anti-radicalaire vis-à-vis le DPPH.

Les % d'inhibition (concentration 15.83 µg/ml) de l'EBr HAI TS et ses fractions avec les standards (quercétine et BHT) (Figure 10) ont montré que l'EAE exerce l'activité d'inhibition radicalaire la plus puissante, et proche à celle de l'ECh avec % I = 59.68 ± 0.63 % et 50.94 ± 1.67 % respectivement, suivit par les extraits EAq et EEp ayant la faible activité d'inhibition par rapport les standards tester.

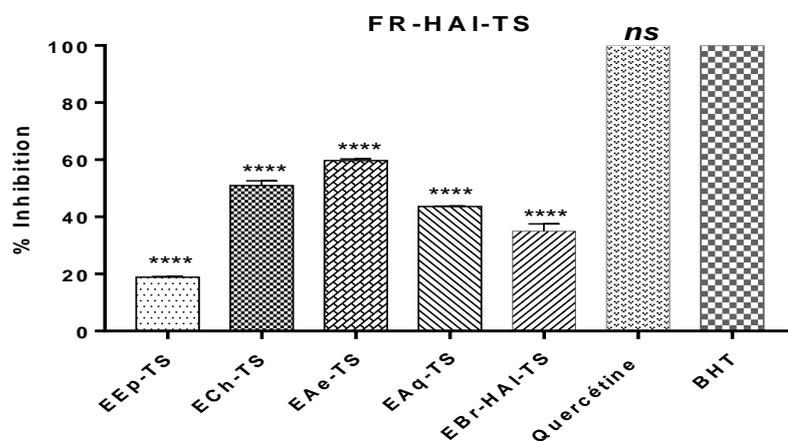


Figure 10. Pourcentage d'inhibition radicalaire de l'EBr HAI TS et ses fractions à une concentration de 15.83 µg/ml. Chaque valeur exprime la moyenne ± SD (n = 3), **** : $p \leq 0.0001$, ns : non significatif, en comparant avec la BHT.

La comparaison entre ces résultats et les résultats de dosage où l'EBr HAl présente la concentration la plus élevée en flavonoïdes mais il ne présente pas l'activité d'inhibition la plus forte. L'ECh aussi, présente une teneur en flavonoïdes supérieure à celle de l'EAE mais l'activité d'inhibition radicalaire de l'EAE est supérieure à celle d'ECh. Ce qui montre que peut-être il y a des autres molécules exercent cette activité et la concentration en flavonoïde ne signifie pas la forte activité d'inhibition radicalaire.

D'après la figure 11 qui présente les différentes activités d'inhibition radicalaire de l'EBr Al TS et ses fractions (concentration 15.83 µg/ml). Les données montrent un ordre croissant des activités d'inhibition radicalaire des différents extraits et des standards (quercétine et BHT) comme suivant : FAP < F10% < FP < F80% < F60% < F20% < F40% enfin les standards qui exercent 100% d'activité d'inhibition. La F40% possède la plus forte activité inhibitrice 36.38 ± 0.28 % mais elle est faible par rapport aux standards. Donc, elles ont un pouvoir antioxydant plus faible que celui des extraits de système HAl.

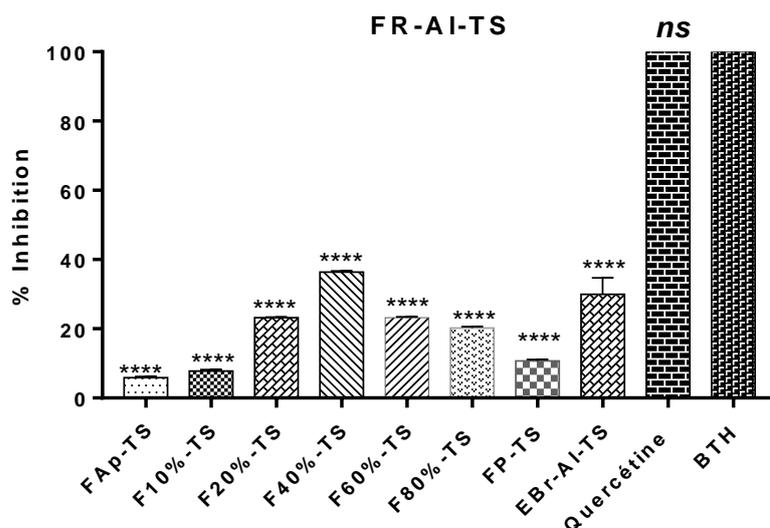


Figure 11. Pourcentage d'inhibition radicalaire de l'EBr Al TS et ses fractions à concentration 15.83 µg/ml. Chaque valeur exprime la moyenne \pm SD (n = 3), **** : $p \leq 0.0001$, ns : non significatif, en comparant avec la BHT.

La comparaison entre ces résultats et les résultats de dosage où la FAp présente la concentration la plus élevée en flavonoïdes, mais il ne présente pas l'activité inhibitrice la plus faible ce qui exprime que ces flavonoïdes n'exercent pas une activité antioxydante.

Pour la plante EA, une concentration de 15.83 µg/ml d'EEp atteint un pourcentage d'inhibition égale à 82.24 % (Figure 12), alors que les EAq, ECh et EAE n'ont atteint que 60.90 ± 0.43 %, 58.24 ± 2.44 % et 49.67 ± 0.97 %, respectivement à la même concentration.

Ces résultats permettent d'évaluer et de comparer l'efficacité de ces extraits avec l'EBr Al et les standards utiliser.

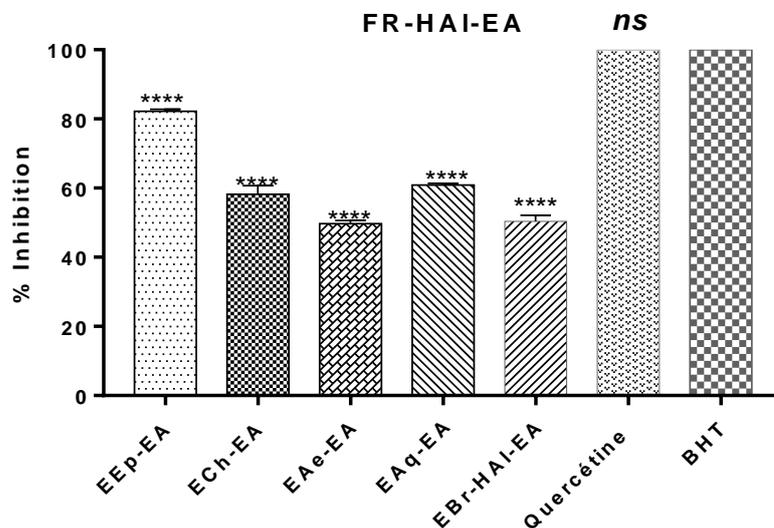


Figure 12. Pourcentage d'inhibition radicalaire de l'EBr HAl EA et ses fractions concentration 15.83 $\mu\text{g/ml}$. Chaque valeur exprime la moyenne \pm SD ($n=3$), **** : $p \leq 0.0001$, *ns* : non significatif, en comparant avec la BHT.

Il est admis que l'EEp présente une forte activité inhibitrice radicalaire malgré leur pauvreté aux flavonoïdes, ce qui propose l'existence d'autres molécules exercent cette activité donc la corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et l'importance de l'activité antioxydante n'est pas toujours évidente, mais le lien entre l'activité antioxydante et la nature des flavonoïdes est encore proposé.

L'analyse de l'ensemble des résultats obtenus (Figure 13) pour l'activité inhibitrice de DPPH à la concentration 15.83 $\mu\text{g/ml}$ de l'EBr Al EA et ses fractions, affiche que l'EBr Al qui exprime l'effet le plus puissant a une activité très faible ($24.86 \pm 2.10\%$), en comparant à celui des deux standards.

L'EBr Al présent la teneur la plus élevée en flavonoïdes (Figure13), ce qui exprime la possibilité de présence d'une corrélation entre les teneurs en flavonoïde de cette fraction et l'activité antioxydante. Par ailleurs, les données montrent également un ordre décroissant de l'activité pour les Fr-Al-EA : $F60\% < F80\% < FP < F40\% < F20\% < FAP < F10\%$. On constate que les fractions Al EA ont une fiable activité d'inhibition radicalaire.

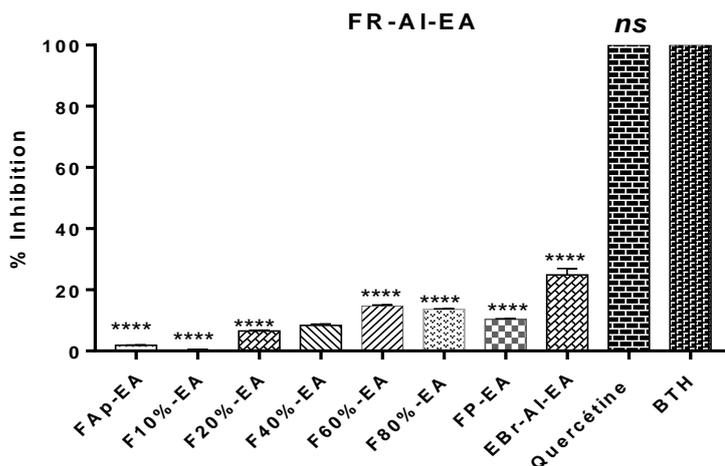


Figure 13. Pourcentage d’inhibition radicalaire de l’EBr Al EA et ses fractions à concentration 15.83 µg/ml. Chaque valeur exprime la moyenne ± SD (n = 3), **** : $p \leq 0.0001$, ns : non significatif, en comparant avec la BHT.

Pour bien analyser les activités des différents extraits et fractions, la figure 14 exprime les différentes valeurs théorique et pratique des extraits.

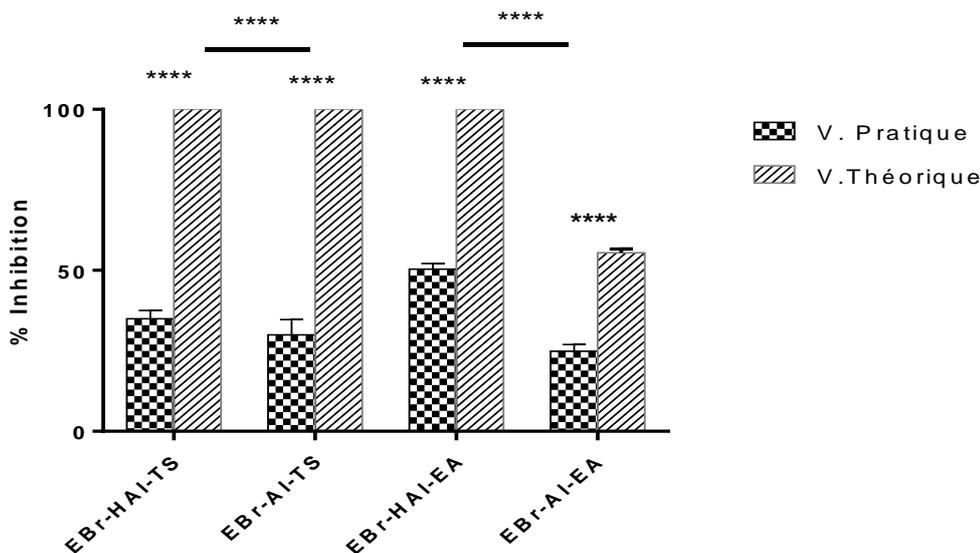


Figure 14. Pourcentage pratique et théorique d’inhibition radicalaire des différents l’EBr de deux plantes 15.83 µg/ml. Chaque valeur exprime la moyenne ± SD (n = 3), **** : $p \leq 0.0001$, en comparant avec la valeur théorique.

Sachant que la valeur pratique représente l’activité de l’extrait brut sans fractionnement de leurs compositions et la valeur théorique représente la somme des activités des extraits issus de fractionnement à base de polarité croissante. La comparaison des valeurs théoriques et pratiques des deux plantes montre que pour tous les cas tester les valeurs pratiques

inférieures à celle-ci proposée théoriquement, ces résultats peut-être expliquent par le démasquage de leur activité par le fractionnement et/ou l'antagonisme moléculaire.

4.3.2. Test de chélation des métaux (Ferrozine)

L'activité de chélation de fer ferreux par les extraits suivant la méthode de Welch (1990) consiste à suivre l'inhibition de la formation du complexe Fer (II)-Ferrozine après l'incubation des extraits.

Cependant, en présence d'agents chélatants, la formation du complexe est perturbée de telle sorte que la couleur du complexe est diminuée. La mesure de la réduction de la couleur, par conséquent, permet l'estimation de l'activité de chélation de l'agent chélatant coexistante (Kaur *et al.*, 2006). Les résultats obtenues ont montré que les quatre extraits des deux plantes (TS et EA) présentent une activité chélatrice dose dépendante (Figure 15).

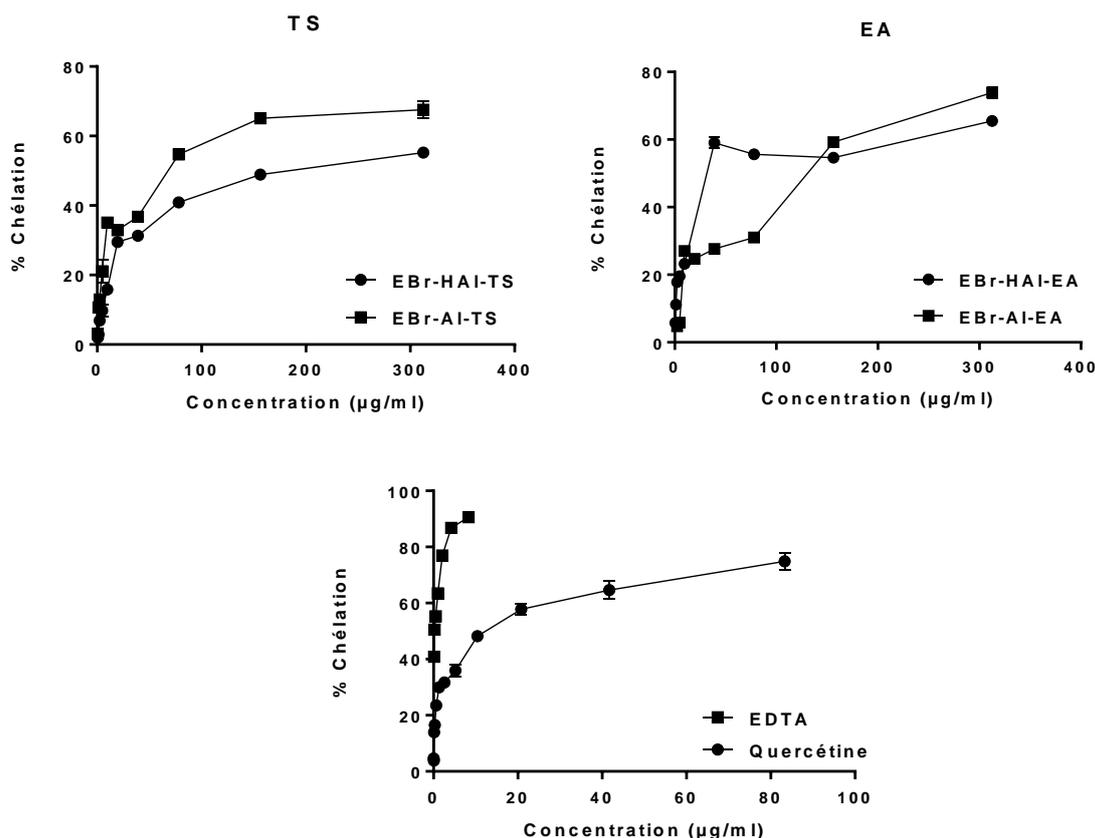


Figure 15. Chélation des ions ferreux les EBr des deux plantes (TS et EA) avec les standards. Les résultats exprimés en moyen \pm SD (n = 3).

Dans la nature, le Fer peut être trouvé en tant que ion ferreux ou ferrique ou d'autre, et la forme de l'ion ferrique prédominant dans les aliments. L'ion ferreux bivalent joue un rôle important en tant que catalyseurs des processus oxydatifs, conduisant à la formation de radicaux superoxydes et d'anions hydroxyles par des réactions de Fenton. Il est rapporté que les radicaux libres générés provoqueraient la peroxydation lipidique et les dommages d'ADN (Gülçin *et al.*, 2010). Les chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre impliqués dans la génération de radicaux libres peuvent prévenir les oxydations. Ces chélateurs forment des composés de coordination avec les métaux en inhibant ainsi le cycle redox du métal ou forment des complexes métalliques insolubles. Les flavonoïdes sont de bons chélateurs du fer ce qui est un des mécanismes de leur activité antioxydante (Ferrali *et al.*, 1997).

Pour la plante TS (Figure 15), les deux EBr HAl et Al présentent une activité de chélation proche et rapide du faible jusqu'à la concentration 39 µg/ml qui atteint une activité de 31.31 ± 0.74 % et 36.76 ± 0.24 %, respectivement, puis ils continuent leurs activités rapidement pour l'EBr HAl jusqu'au plafond qui est de 55.23 ± 0.20 % de chélation à une concentration de 312 µg/ml et lentement pour l'EBr Al qui arrive à 67.55 ± 2.40 % à la même concentration.

Les résultats de la détermination de l'activité chélatrice de l'EBr HAl et Al EA montrent que le maximum de chélation de l'EBr HAl est de 65.50 ± 0.34 % à une concentration de 312 µg/ml et l'EBr Al atteint le maximum de chélation qui est de 73.89 ± 1.74 % à la même concentration. Ce qui signifie que l'EBr Al a une activité rapide mais inférieure à celle de l'EBr HAl, qui a une bonne activité, mais lente ce qui surgit que l'extraction HAl permet la récupération des molécules active ou agit positivement sur l'activité chélatrice.

À partir des profils de chélation obtenus (Figure 15), il semble que la linéarité des courbes tracés avant la saturation est plus importante dans le cas de l'EDTA ; ligand hexadénate dont la constante de liaison avec le fer a un pourcentage de 92 ± 0.56 % à la concentration de 16 µg/ml suivie par le deuxième standard (quercétine) qui présente une activité de chélation lente par rapport à l'EDTA et qui atteint 74 ± 3.09 % à la concentration 83 µg/ml. Cependant pour les extraits, cette linéarité est moins importante. Cela reflète simplement la nature complexe des extraits contenant un ou plusieurs chélateurs ayant des affinités différentes pour le fer, en concurrence avec la ferrozine. Toutefois, l'effet chélateur est saturable à une concentration moyennement d'extrait.

Dans ce teste la comparaison entre les activités de deux plantes (Figure 15) indique aussi que les EBr de EA sont plus active que les EBr de TS.

La valeur d'EC₅₀ obtenue avec l'EDTA est très faible ($1.88 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$), reflétant son puissant effet chélateur. Pour mieux caractériser l'efficacité des extraits, les résultats de figure16 expriment leurs activités chélatrice comparé avec EDTA.

L'EBr Al TS présente l'activité la plus importante ($EC_{50} = 148.89 \pm 1.25 \mu\text{g/ml}$), suivi par l'EBr HAl EA ($152.23 \pm 2.17 \mu\text{g/ml}$) qui représente une activité proche avec l'EBr Al TS et l'EBr Al EA ($165.45 \pm 1.43 \mu\text{g/ml}$) et la plus faible activité a été exprimée par l'EBr HAl TS ($219.30 \pm 0.87 \mu\text{g/ml}$). Les EC₅₀ expriment que L'EBr Al TS, l'EBr HAl EA et l'EBr Al EA ont une capacité moyenne de chélation des ions de Fe²⁺ avant le ferrozine par rapport à celle du chélateur biologique (quercétine) et chimique (EDTA). Les résultats d'EC₅₀ ne présentent pas une linéarité entre l'activité et la teneur en flavonoïdes ce qui suggère que l'activité de chélation n'est pas due à la teneur des flavonoïdes.

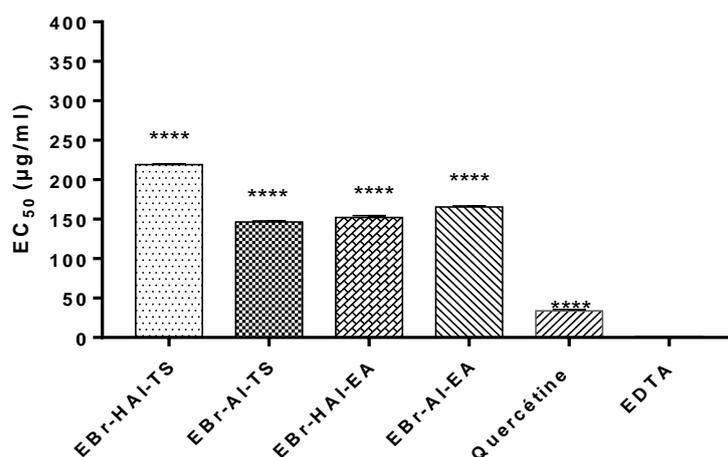


Figure 16. Concentration effective qui exprime 50% de chélation des ions ferreux par les EBr des deux plantes, la quercétine et l'EDTA. Chaque valeur exprime la moyenne \pm SD ($n = 3$), **** : $p \leq 0.0001$, en comparant avec l'EDTA.

La comparaison des résultats obtenus avec les résultats l'étude de KhadriH *et al.* (2013) montrent que tous les EBr testé présentent une bonne activité par rapport à l'EBr Al d'*Atractylis gummifera* avec EC₅₀ égal à 11700 µg/ml.

La figure 17 superpose l'histogramme obtenu à partir des pourcentages de chélation en fonction de l'EBr HAl TS et ses fractions à la concentration de 15.83 µg/ml ce qui signifie que l'EAq ($62.47 \pm 0.85 \%$) présente la plus forte activité chélatrice de Fe²⁺ qui est supérieur à celle d'EBr HAl ($16.60 \pm 0.24 \%$), du standard quercétine et proche d'EDTA, malgré leur

pauvreté en flavonoïdes mais leur activité est peut être due à des molécules non flavonoïdiques ou à la nature de ses flavonoïdes.

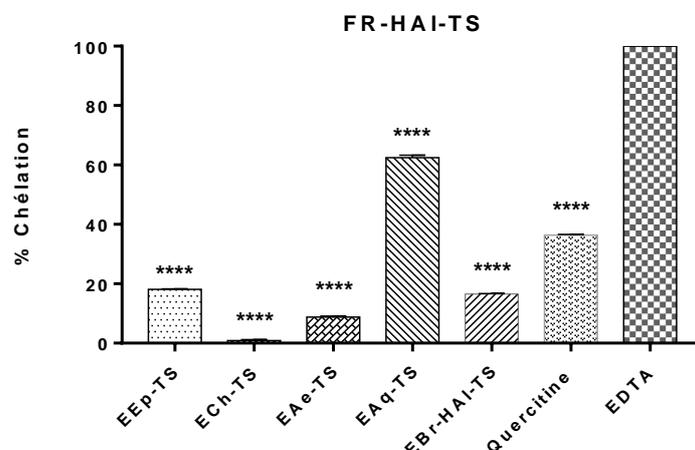


Figure 17. Pourcentage de chélation des ions ferreux par l'EBr HAI TS et ses fractions à concentration 15.83 $\mu\text{g/ml}$. Chaque valeur exprime la moyenne \pm SD (n = 3), **** : $p \leq 0.0001$, en comparant avec l'EDTA.

Le pourcentage de chélation de l'EAq est suivi par l'EEp (18.11% \pm 0.20), l'EAe (10.63 \pm 3.21%) et enfin l'ECh (0.89% \pm 0.27). Les résultats obtenus montrent une faible corrélation linéaire entre la teneur en flavonoïdes et le pouvoir de chélation de Fe^{2+} . Les différentes activités des fractions montrent qu'il y a un antagonisme moléculaire entre les différentes fractions, donc le fractionnement conduit à la présentation d'une bonne activité cela est peut être due au démasquage de ces activités et/ou par l'inhibition de compétition moléculaires (Figure 17).

L'extrait le plus actif, parmi les Fr-AI-TS (Figure 18), c'est la FAP avec un pourcentage de chélation 57.04 \pm 0.35 % suivi par la F60%, FP, F20%, F80%, F10% et enfin F40%.

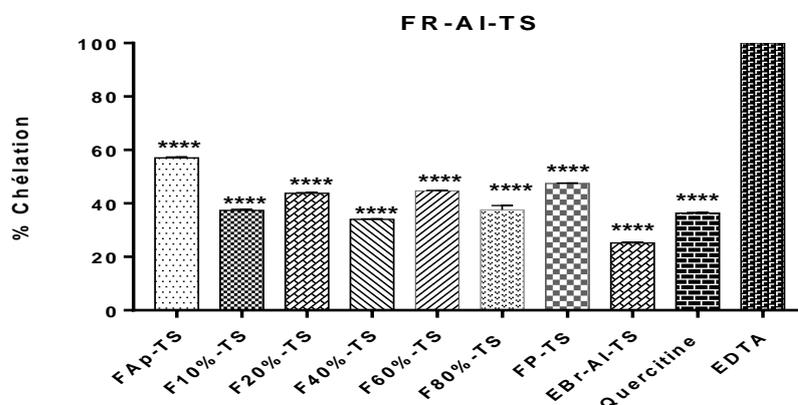


Figure 18. Pourcentage de chélation des ions ferreux par l'EBr AI TS et ses fractions à concentration 15.83 $\mu\text{g/ml}$. Chaque valeur exprime la moyenne \pm SD (n = 3), **** : $p \leq 0.0001$, en comparant avec l'EDTA.

Les résultats obtenus indiquent que la bonne activité de la FAP est supérieure à celle de l'EBr Al ($25.20 \pm 0.37 \%$), le standard quercétine et active par rapport l'EDTA. Cette activité est peut due à leur importante teneur en flavonoïdes, mais globalement, il y a une absence de corrélation linéaire entre la teneur en flavonoïdes et l'activité de chélation de Fe^{2+} . L'activité de EBr Al de la plante *Mentha pulegium* $EC_{50} = 40.22 \pm 3,54 \%$ trouve par Serteser, *et al.* (2009) est plus efficace que l'EBr Al TS.

L'effet chélateur maximal de $70.33 \pm 2.1 \%$ est atteint par l'EAE à une concentration de $15.83 \mu\text{g/ml}$ (Figure 19) cette activité est proche à celle de l'EDTA et supérieur à celle de l'EBr HAI ($27.90 \pm 0.14 \%$), ce qui exprime que le fractionnement liquide-liquide a agi positivement sur l'activité chélatrice. Puis l'activité est décroissante comme suit : EEp ($55.84 \pm 0.45 \%$) > ECh ($32.52 \pm 0.9 \%$) > EAq ($15.24 \pm 0.34 \%$) à la même concentration. Ces pourcentages de chélation indiquant une absence de leurs proportionnalités avec la teneur en flavonoïde des extraits.

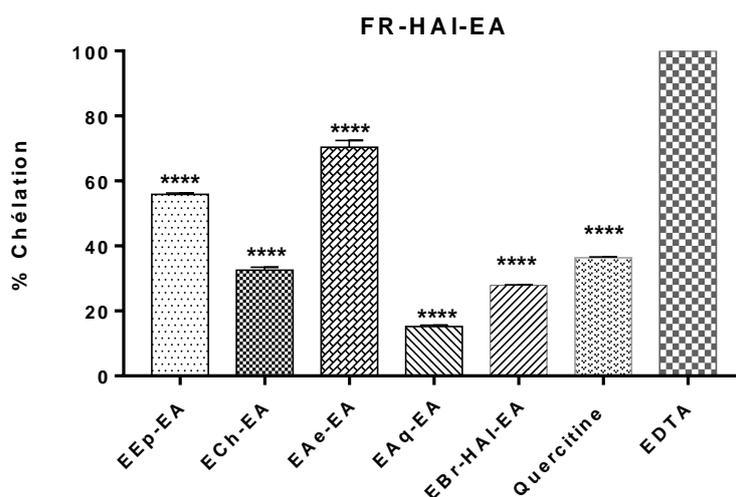


Figure 19. Pourcentage de chélation des ions ferreux par l'EBr HAI EA et ses fractions à concentration $15.83 \mu\text{g/ml}$. Chaque valeur exprime la moyenne \pm SD ($n = 3$), **** : $p \leq 0.0001$, en comparant avec l'EDTA.

A des fins comparatives, le pourcentage de chélation d'EBr HAI EA (Figure 19) représente une forte activité chélatrice par rapport la plante *Mentha spicata* qui inhibe $39.64 \pm 2.12 \%$ à la concentration 6 mg/ml (Serteser *et al.*, 2009).

Pour les fractions de l'EBr Al EA, les résultats mentionnés dans la figure 20, révèlent une activité chélatrice puissante exercé par la FAp et la F10% ($\%I = 72.88 \pm 8.67$ et $66.25 \pm 2.64 \%$, respectivement) qui est supérieur à celle de l'EBr Al ($18.54 \pm 0.46 \%$), la quercétine et proche à l'EDTA.

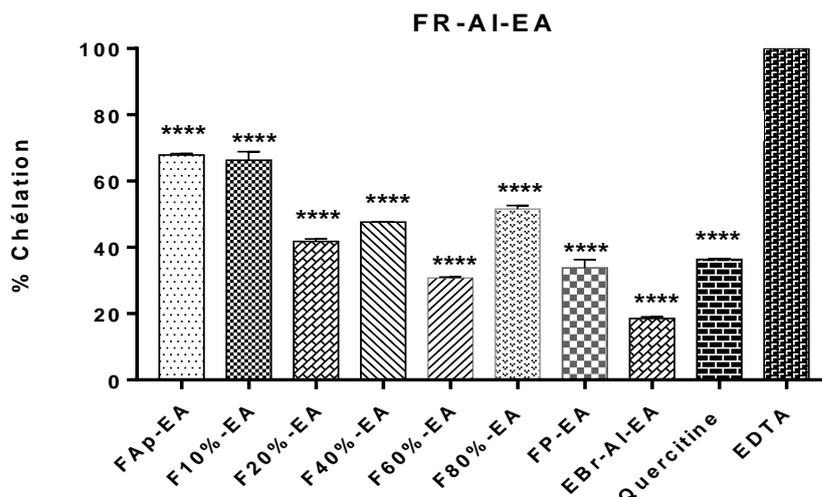


Figure 20. Pourcentage de chélation des ions ferreux par l'EBr Al EA et ses fractions à concentration 15.83 $\mu\text{g/ml}$. Chaque valeur exprime la moyenne \pm SD (n = 3), **** : $p \leq 0.0001$, en comparant avec l'EDTA

Cependant le pourcentage de chélation croissant enregistrée comme suit : FP (33.8 ± 2.5 %) < F60% (34.26 ± 6.08 %) < F20% (45.08 ± 5.7 %) < F40% (47.64 ± 0.32 %) < F80% (55.96 ± 7.66 %) < F10% (66.25 ± 2.64 %). Pour ces fractions il y a aussi l'absence de corrélation entre la teneur en flavonoïdes et l'activité de chélation. Le pourcentage de chélation d'EBr Al EA représente une forte activité chélatrice a rapport la plante *Mentha longifolia* 37.23 ± 2.13 % à la concentration 6 mg/ml trouve par Serteser *et al.* (2009). La chélation de Fe ferreux par tous les extraits est peut traduite par la présence d'un ou de plusieurs composés agissant indépendamment ou en synergie avec les flavonoïdes présent dans les différents extraits, ce qui est traduit par l'absence de corrélation linéaire entre la teneur en flavonoïdes et l'activité chélatrice.

D'après les résultats de cette étude (Figure 21), il est évident que tous les fractions obtenus après chromatographie sur phase inverse et le lavage liquide-liquide qui sont par la somme représentes la valeur théorique proposées, exercent une active plus forte que les EBr pratiquement, ce qui peut montrer l'effet positive du fractionnement.

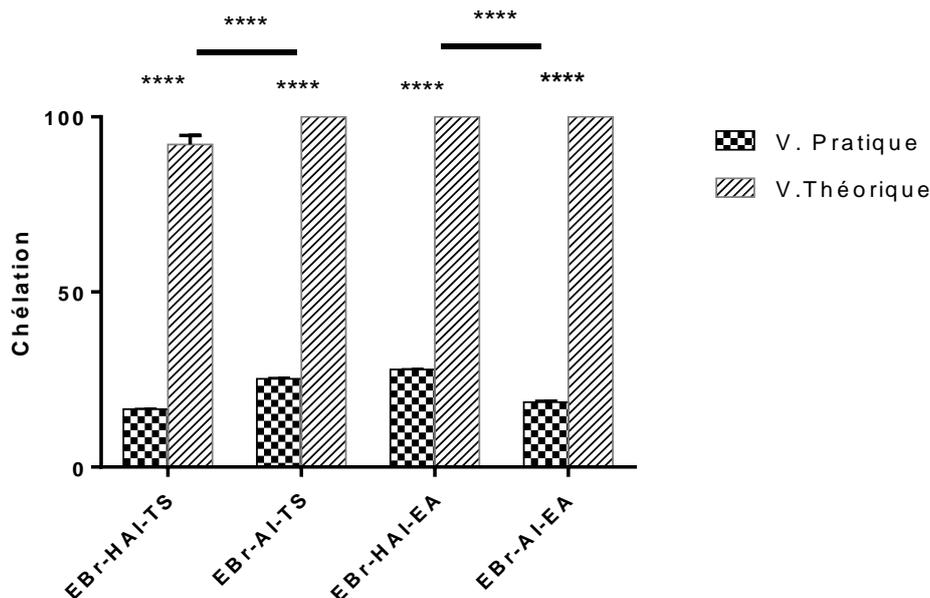


Figure 21. Pourcentage pratique et théorique de chélation des ions ferreux de différents l'EBr des deux plantes 15.83 $\mu\text{g/ml}$. Chaque valeur exprime la moyenne \pm SD (n = 3), **** : $p \leq 0.0001$, en comparant avec la valeur théorique.

4.3.3. Test d'activité réductrice (FRAP)

Pour mieux évaluer l'effet antioxydant des extraits, le teste de FRAP permet de mesurer la réduction du Fe^{3+} (fer ferrique) en Fe^{2+} (fer ferreux) en présence d'un antioxydant (Ou *et al.*, 2002). Le pouvoir réducteur ou le pouvoir antioxydant total (TAP) est également exprimé en millimole d'équivalents du FeSO_4 par 400 μg d'extrait ou de standard (mmole d'équivalents $\text{FeSO}_4/400 \mu\text{g}$ extrait).

D'après le tableau 14, Parmi les FR-HAI-TS, L'EAe est le réducteur le plus important, malgré leur teneur moyenne en flavonoïdes, son activité est peut être due à la nature des flavonoïdes ou des autres molécules actives non flavonoïdique. L'activité de ce dernier est supérieure à celle de l'EBr Hal, ce qui monte l'impact positif de fractionnement liquide-liquide sur l'activité réductrice de cette plante.

L'EAe forme une bonne source d'antioxydants. La capacité antioxydante de l'EAq, EEp et ECh estimée par la technique FRAP est la plus faible. Les résultats obtenus montrent que la capacité des fractions à réduire le TPTZ- Fe^{3+} en TPTZ- Fe^{2+} inférieure à celle de la quercétine.

Tableau 14. Valeurs de TAP des FR-HAl-TS à 30 min de réaction en utilisant le test de FRAP. Chaque valeur présente la moyenne \pm SD (n=2), **** : $p \leq 0.0001$. La comparaison est réalisée contre la quercitine.

FR-HAl-TS	TAP (mmole FeSO4/400 μ g d'EBr)
Quercitine	16.67 \pm 0.30****
EBr HAl	7.83 \pm 0.02****
EEp	0.55 \pm 0.56****
ECh	0.17 \pm 0.07****
E Ae	11.61 \pm 0.07****
E Aq	1.52 \pm 0.05****

La valeur FRAP est exprimé par le paramètre TAP des FR-Al-TS, il apparaît ainsi que la capacité réductrice de l'EBr Al est plus élevée 3.5 fois que le standard quercitine. Ce qui prouvé la possibilité de présence d'une synergie entre les différents molécules de cette extrait au contraire aux fractions qui ont une faible activité réductrice (Tableau 15), ce qui montre l'influence négatif de fractionnement chromatographique sur le pouvoir réducteur de cette plante. En effet il y a une corrélation linéaire entre la teneur en flavonoïdes deux extraits Al et Ap et l'activité réductrice mais pour le reste des fractions l'absence de corrélation linéaire entre leurs activités et la teneur en flavonoïdes.

Tableau 15. Valeurs de TAP des FR-Al-TS à 30 min de réaction en utilisant le test de FRAP. Chaque valeur présente la moyenne \pm SD (n=2), **** : $p \leq 0.0001$. La comparaison est réalisée contre la quercitine.

FR-Al-TS	TAP (mmole FeSO4/400 μ g d'EBr)
Quercitine	16.67 \pm 0.30
EBr Al	56.18 \pm 0.30****
FAP	1.02 \pm 0.05****
F10%	0.65 \pm 0.20****
F20%	0.38 \pm 0.30****
F40%	0.4 \pm 0.35****
F60%	0.53 \pm 0.38****
F80%	0.67 \pm 0.17****
FP	0.49 \pm 0.38****

L'évaluation de l'activité anti radicalaire par la méthode de FRAP (Tableau 16) de l'EBr HAl EA et ses fractions a montré que, l'EBr HAl présent une activité supérieur à celle des fractions ce qui peut exprimer la présence d'une synergie entre ces molécules. Les valeurs de TAP de l'EBr HAl EA et ses fractions indique une faible activité par rapport au standard et les autres extraits et fractions (extrait et fractions TS).

Tableau 16. Valeurs de TAP des FR-HAl-EA à 30 min de réaction en utilisant le test de FRAP. Chaque valeur présente la moyenne \pm SD (n=2), **** : $p \leq 0.0001$. La comparaison est réalisée contre la quercétine.

FR-HAl-EA	TAP (mmole FeSO4/400 μ g d'EBr)
Quercitine	16.67 \pm 0.30
EBr HAl	2.44 \pm 0.09****
EEp	0.02 \pm 0.02****
ECh	0.08 \pm 0.04****
E Ae	2.03 \pm 0.00****
E Aq	0.29 \pm 0.00****

L'E Ae EA qui est a une activité proportionnelle avec leur teneur en flavonoïdes ce qui suggère que ces flavonoïdes présent une bonne capacité réductrice, puis l'E Aq malgré il est pauvre en flavonoïdes mais a une activité réductrice moyennent par rapport les autres extraits, ce qui signifie la présence d'autres molécules active affecte positivement sur leur activité. L'ECh malgré leur richesse en flavonoïdes mais ne présent pas une bonne activité. Enfin EEp qui l'extrait qui a la teneur la plus faible en flavonoïdes et l'activité réductrice la plus faible.

Il ressort de cette étude que les résultats obtenus montrent que l'EBr Al EA montrent une forte activité réductrice 3.5 supérieur de celle de Quercitine, ce qui signifie la présence d'une synergie moléculaires entre ces composes et une corrélation linéaire entre leur teneur en flavonoïdes et l'activité réductrice. La F40% présente la deuxième forte activité qui est proportionnel avec la teneur en flavonoïdes qui sont peut-être active. La valeur TAP est décroissante comme suit : F80% > F60% > F20% > FAP > F10% > FP. Une absence de corrélation linéaire entre la teneur en flavonoïdes et leurs valeurs TAP.

Tableau 17. Valeurs de TAP des FR-HAl-TS à 30 min de réaction en utilisant le test de FRAP. Chaque valeur présente la moyenne \pm SD (n=2), **** : $p \leq 0.0001$. La comparaison est réalisée contre la quercétine.

FR-Al-EA	TAP (mmole FeSO₄/400 μg d'EBr)
Quercitine	16.67 \pm 0.30
EBr Al	56.5 \pm 0.60****
FAP	0.31 \pm 0.17****
F10%	0.26 \pm 0.20****
F20%	1.49 \pm 0.46****
F40%	2.90 \pm 0.15****
F60%	2.14 \pm 0.20****
F80%	2.81 \pm 0.23****
FP	0.17 \pm 0.12****

Conclusion

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Ce modeste travail cible deux plantes parmi ces plantes, c'est *Thymus Serpyllum* et *Equisetum arvense* qui appartient aux familles des Lamiaceae et des Equisetaceae, respectivement.

D'abord L'extraction par macération montre que, la plante TS présente le bon rendement pour les deux EBr HAl et Al. Et concernant les rendements des systèmes extraction HAl et Al, le système HAl exprime le bon rendement pour les deux plantes.

Le fractionnement des EBr HAl à l'aide de lavage liquide-liquide indique pour les deux plantes TS/EA que l'EAq présente le bon rendement par rapport aux autres extraits.

Le fractionnement des EBr Al par chromatographie sur phase inverse exprime que la FAp de TS donne le plus grand rendement et pour la plante EA la F20% donne le plus grand rendement.

En suite l'analyse de CCM montrent que le système chloroforme/éthanol représente le meilleur système d'élution pour la plus part des extraits et des fractions.

L'analyse quantitative des flavonoïdes montre que la plante TS est plus riche en flavonoïdes que EA, pour les fractions TS HAl, l'ECh présente l'extrait le plus concentré en flavonoïdes et pour les fractions TS Al la FAp est la plus concentré en flavonoïdes. D'autre part, le rendement d'ECh EA qui issue du fractionnement HAl exprime la plus forte dose flavonoïdique ce qui montre la réussite de condenser la majorité des flavonoïdes dans cette fraction ce résultat est prouvé par la deuxième extraction Al qui récupère le bon rendement dans la F40% qui a une polarité appropriée à celle du chloroforme.

Après la récupération des extraits et son analyse ce travail a pour le but de tester l'activité antioxydante de tous les extraits et les fractions issues.

Le premier teste réaliser c'est le DPPH, ce teste indique que les deux EBr EA présentent des bonnes activités de piégeage radicalaire avec les meilleur IC₅₀. En suite, les différents résultats de %I indiquent que le fractionnement exerce un démasquage d'activité ce qui montré par les valeurs proposé théoriquement.

Le deuxième teste c'est le test de chélation des métaux (Ferrozine), dans ce teste les L'EBr Al TS présente la bonne activité chélatrice, les résultats de % de chélation indique aussi

que le fractionnement c'est une méthode efficace pour obtenir la meilleure activité chélatrice qui est atteinte par les différentes fractions et qui est supérieure à celle des EBr.

Le dernier test c'est le test de FRAP, qui indique que le fractionnement n'est pas toujours évident pour exercer la meilleure activité anti oxydante il y a des cas où l'EBr brut exerce une activité plus efficace que les fractions ce qui signifie la présence d'une synergie moléculaire.

Des études plus approfondies *in vivo* sont nécessaires pour bien évaluer l'activité antioxydante des extraits de TS et EA leurs doses thérapeutiques ainsi que leurs effets toxiques. Cela permettrait de préparer des produits pharmaceutiques de grand intérêt thérapeutique.

Références

- Wesolowska A., Grzeszczuk M. and Jad D. 2014. Comparison of chemical compositions of essential oils isolated by hydrodistillation from wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) with use of Deryng and Clevenger apparatus. *Herba Polonica*. (60) : 7-17.
- Ahuja S. (2003). *Chromatography and Separation Science*, 234 p.
- Al-Khalidi A., Chaglassian T. 1965. The species distribution of xanthine oxidase. *Biochem Journal*. (1) : 318–320.
- Atoui A., Mansouri A., Boskou G. and Kefalas, P. 2005. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food chemistry*. (89) : 27-36.
- Baghiani A., Boumerfeg S., Adjadj M., Ameni D., Djermouni M., Khelifi-Touhami F. and Arrar L. 2011. Antioxidants, Free Radicals Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibitory Potentials of *Ajuga iva* L. Extracts. *Free Radicals and Antioxidants*. 21-30.
- Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J. and Pinkas M. 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*. (46) : 1086-1089
- Bakchiche B., Gherib, A. 2014. Activités antioxydantes des polyphénols extraits de plantes médicinales. *International Journal of Innovation and Applied Studies*. 167-172
- Bassot A., Gouriou Y., Chauvin M., Vial G. et Cottet C. 2018. Rôle majeur du NO dans la régulation des points de contact mitochondrie – réticulum endoplasmique (MAM) et de la réponse à l'insuline dans le foie. *Elsevier*. (32) :275
- Battelli M., Bortolotti M., Polito L. et Bolognesi A. 2018. The role of xanthine oxidoreductase and uric acid in metabolic syndrome. *BBA - Molecular Basis of Disease*. 2557–2565.
- Benzie I.F. and Strain J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal of Biochemistry*. 239(1): 70-6
- Berry E., Hare J. 2004. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol*. 555(3) : 589-606.
- Bolognesi A., Polito L., Bortolotti M. and Battelli M. 2019. Metabolic syndrome and cancer risk: The role of xanthine oxidoreductase. *Redox Biology*. 1-6.
- Bolou G., Attioua B., N'guessan A., Coulibaly A. and Djaman A. 2011. Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. *Sciences de Liège*. (80) : 772-790.
- Borges F., Fernandes E. and Rolivera F. 2002. Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*. 9(2) : 195-217.
- Bouden I. 2018. Etude de l'activité antiarthritique, antioxydante et antimicrobienne des extraits de *Matricaria pubescens*: Biochimie. These de Doctorat, Université Ferhat Abbas Sétif. 127p.

- Boumerfeg S., Baghiani A., Djarmouni M., Ameni D., Adjadj M., Belkhiri F. and Charef N. 2012. Inhibitory Activity on Xanthine Oxidase and Antioxidant Properties of *Teucrium polium*. *Chinese Medicine*. (3) : 30-41.
- Bourgou S., Beji S., Medini F. et Ksouri R. 2016. Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of sciences*. 28(12) : 1649-1655.
- Bradley D. S., Cheng S., Zhou P., Griffiths M. and Luthra S., 1997. HLA-DQB1 polymorphism determines incidence, onset, and severity of collagen-induced arthritis in transgenic mice, implications in human rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* (100) : 2227-2234.
- Cantu-Medellin N. and Kelley E. 2013. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biology*. (1) : 353–358.
- Chen C., Lü M. and Yao Q. 2016. Hyperuricemia-Related Diseases and Xanthine Oxidoreductase (XOR) Inhibitors: An Overview. *Med Sci Monit*. 2501-2512.
- Day R., Bishoy K., Diluk W., Kenneth M. and Graham G. 2016. Xanthine oxidoreductase and its inhibitors: relevance for gout. *Clinical Science* : 2167–2180.
- De Marco F. 2013. Oxidative stress and HPV Carcinogenesis. *Viruses*. 5(2) : 708–731.
- DeJong J., Schoemaker R., Jonge R., Bernocchi P., Keijzer E., Harrison R. and Ceconi, C. 2000. Enhanced expression and activity of xanthine oxidoreductase in the failing heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. (32) : 2083-2089.
- Droge w. 2016. Free radicals in the physiological control of cell function. *Cellular Physiol Rev*. 82(1) : 47-95.
- Fahima A., Souad M. and Touaibia N. 2018. Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. 13-21.
- Ferrali M., Signorini C., Caciotti B. and Sugerini L. 1997. Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavanoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters*. 416: 123–132.
- Fukushima T., Adachi T. and Hirano K. 1995. The heparin-binding site of human xanthine oxidase. *Biol. Pharm. Bull.* 18(1) : 156-158.
- Furuhashi M., Megumi M., Takayo M., Takashi N., Yukimura H., Masayuki K. and Tetsuji, M. 2019. Independent links between plasma xanthine oxidoreductase activity and levels of adipokines. *J Diabetes Investig.* 1-9.
- GARAIT, B. 2006. LE STRESS OXYDANT INDUIT PAR VOIEMETABOLIQUE (REGIMES ALIMENTAIRES) OUPAR VOIE GAZEUSE (HYPEROXIE) ET EFFET DELA GLISODIN:Biologie Cellulaire. Doctorat,UNIVERSITE JOSEPH FOURIER ,GRENOBLE, 195 p.

- Ghedadba N., Bousselsela H., Hambaba L., Benbia S. et Mouloud, Y. 2014. Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Springer-Verlag France*. 15-24.
- Ghedadba N., Hambaba L., Ayachi A., Aberkane M., Bousselsela H. et Oueld-Mokhtar S. 2015. Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*. (13) : 118-129.
- Ghedira K. 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Springer Link*. (3):162–169
- Ghedira K. et Goetz P. (2010). Phytothérapie anti-infectieuse. *Springer-Verlag, France*. pp. 388–392.
- Ghedira K. et Goetz P. (2012). Phytothérapie anti-infectieuse. *Springer-Verlag, France*. pp. 349-356.
- Granger D. 1988. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *American Physiological Society*. 1269-1275.
- Guillouty A. 2016, décembre 9. Plantes médicinales et antioxydants: PHARMACIE .POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR, UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER ,France. 101
- Gülçin I., Huyut Z., Elmastas M. and Aboul-Enein H. 2010. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*. (3) : 43-53.
- Gutowski M. and Kowalczyk S. 2013, Mars 19. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Epub*. 60(1):1-16.
- Hamdi B. 2017, mai 5. Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro : Biotechnologies Végétales. Thèse de Doctorat, L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE KOUBA-ALGER, Alger, 154 p.
- Hancock T., Ovejero-Boglione, C., Cherry R., Hoare C., Eisenthal R. and Harrison R. 2002. Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite. *Antimicrob Agents Chemother*. (46) : 3308-3310.
- Hancock T., Salisbury V., Eisenthal R. and Harrison R. 2002. Antimicrobial Properties of Milk: Dependence on Presence of Xanthine Oxidase and Nitrite. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. 3308–3310.
- Harrison R. 2002. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. *Free Radic. Biol. Med*. (33) : 774-797.
- Harrison R. 2004. Physiological Roles of Xanthine Oxidoreductase. *DRUG METABOLISM REVIEWS*. (36) : 363–375.
- Harrison R. 2006. Milk xanthine oxidase: Properties and physiological roles. *International Dairy Journal*. (16) : 546–554.
- Hug L. and Johnson L. 2019, Mars 26. Distribution of reactive oxygen species defense mechanisms across domain bacteria. *Science Direct*. (18) : 5-44

- Hussein M., Hamdy B., Sarhana A. and Khaled S. 2013, May. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Elsevier*. (43) : 827-831.
- Kaur G., Alam M., Jabbar Z. and Javed K. 2006. Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers. *Journal of Ethnopharmacology*. (108) : 340–348.
- Khadri A., EL mokni R. et Smiti S. 2013. COMPOSES PHENOLIQUES ET ACTIVITES ANTIOXYDANTES DE DEUX EXTRAITS DE CHARDON A GLU: *Atractylis gummifera*. *Revue Soc. Sci. Nat. de Tunisie*. (39) : 44-52.
- Kholkhal F. (2014). Etude Phytochimique et Activité Antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *euciliatus* : Produits naturels, Aspects nutritionnels et Activités Biologiques. these Doctorat, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. 200 p.
- Kurosaki M., Zanotta S., Li M., Garattini E. and Terao M. 1996. Expression of xanthine oxidoreductase in mouse mammary epithelium during pregnancy and lactation : regulation of gene expression by glucocorticoids and prolactin. *Biochem. J.* (319) : 801-810.
- Liu H., Zhu H., Lin Y., Gaoxiang M., Guoquan T., Weida R. and Zhengdong Z. (2018). Genetic variants in XDH are associated with prognosis for gastric cancer in a Chinese population. *Gene*. 1-26.
- Magdalena P. and Aneta P. 2015, Avril 18. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Science Direct*. (97) : 55-74
- Maia L. and Moura J. 2018. Putting xanthine oxidoreductase and aldehyde oxidase on the NO metabolism map: Nitrite reduction by molybdoenzymes. *Redox Biology*. 274–289.
- Manyi-Loh C. 2012. Detection of Phytoconstituents in Column Fractions of n-Hexane Extract of Goldcrest Honey Exhibiting Anti-*Helicobacter pylori* Activity. *Archives of Medical Research*. (43) : 197-204.
- Manzo M. 2018. Criblage phytochimique et dosage des polyphénols du *Detarium microcarpum* Guill. et Perr. utilisé dans le traitement des maladies parasitaires au Niger. *Afrique SCIENCE*. 390 - 399.
- Markham K. 1982. Techniques of flavonoid identification (Chapitre 1 et 2): Academic Press, London. pp. 1-113
- Martin M., Kevin P., Eugene B., Susane D. and Roger H. 2004. XANTHINE OXIDOREDUCTASE IS PRESENT IN BILE DUCTS OF NORMAL AND CIRRHOTIC LIVER. *Elsevier*. 37(8) : 1214–1223.
- McManaman J. and Bain D. 2002. Structural and Conformational Analysis of the Oxidase to Dehydrogenase Conversion of Xanthine Oxidoreductase. *JBC Papers in Press*. 1-33.
- Mercier E. et Perrotin D. 2003. L'hépatite ischémique. *Réanimation*. 449–454.

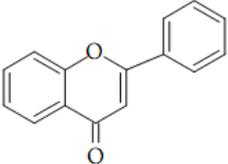
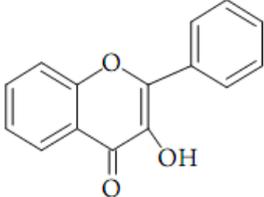
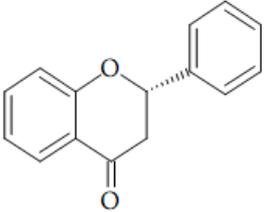
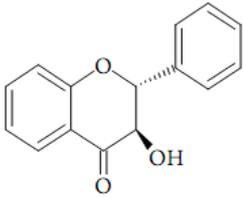
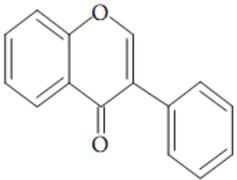
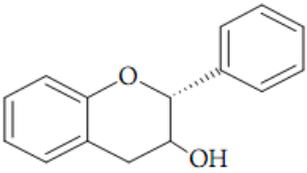
- Migdal C. and Serres M. 2011. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine Sciences*. (27) : 405–412.
- Moon J. and Shibamoto T. 2009. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of agricultural and Food Chemistry*. 57(5) : 1655-1666.
- Muzychka V., Oleksandr L., K., Antonina V., P., Mykhaylo S., F., and Andriy I. 2017. Carboxylated aurone derivatives as potent inhibitors of xanthine oxidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 3606–3613.
- Mahmoudi S., Khali M. et Mahmoudi N. 2013. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technologie*. (9) : 35-40.
- Medini F., Ben hmida M., Atwi A. et Ksouri R. 2018. Effet de l'Eco-extraction sur les teneurs en polyphénols et l'activité antioxydante des grains de *Lepidium sativum*. *Journal of new sciences*. 54 (4) : 2286-5314.
- Ndiaye A., DiorFALL A., Ndiaye M., Ndiaye K., Gueye S., Bassene E. et Dieye M. 2018 . Evaluation de l'activité antioxydante des feuilles de *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) du Sénégal. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 12(4): 1816-1823
- Okamoto K., Kusano T. and Nishino T. 2013. Chemical Nature and Reaction Mechanisms of the Molybdenum Cofactor of Xanthine Oxidoreductase. *Bentham Science Publishers*. 1873-4286
- O'Mahony J., Fox P. and Kelly A. 2013. Indigenous enzymes of milk advanced dairy chemistry. *Springer Science Business Media New York*. (1) : 337-385
- Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M. and Flanagan J. 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
- Pacher P., Nivorozhkin A. and Szabo C. 2006. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacological Reviews*. (58) : 87-114
- Padayatty K. 2003. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*. 22(1) : 18-35
- Philip M. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, Songklanakar J. *Sci. Technol*. 26(2) : 211-219
- Pallag A., Filip A., Olteanu D., Clichici S., Baldea I., Jurca T. and Mureş M. 2018. Equisetum arvense L. Extract Induces Antibacterial Activity and Modulates Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis in Endothelial Vascular Cells Exposed to Hyperosmotic Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. p.14
- Pulido R., Bravo L. and Saura-calixto F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (48) : 3396-3402

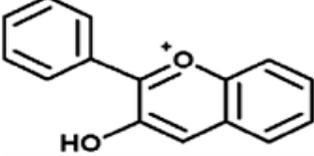
- Ré D., Nafia I., Nieoullon A., Le Goff L. et Had-Aissouni L. 2005. Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate Implications sur la survie neuronale. *ELSevier*. 24(5) : pp.502-509
- Revillard P. 2001. Réponse immunitaire induite par l'introduction d'antigènes dans l'organisme. (D. B. Supérieur., Éd.) *Immunologie 4ème éd.*, 203-204.
- Saffidine K. 2015. Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de: microbiologie. l'obtention du diplôme de Doctorat, Université Ferhat Abbas, Sétif, 101p.
- Schmidt M., Kelley E. and Straub C. 2019. The impact of xanthine oxidase (XO) on hemolytic diseases. *Redox Biology*. 1-6
- Serteser A., Kargiöglu M., Gök V., Bağci Y., Musa-özc M. and Arslan M. 2009. Antioxidant properties of some plants growing wild in Turkey. *GRASAS Y ACEIRES*. 60(2):149-151
- Shahank K. and Abhay K. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*. p.16
- Stevens R., Benboubetra M., Harrison R., Sahinöglu T., Smith C. and Blake R. 1991. Localisation of xanthine oxidase to synovial endothelium. *Annals of the Rheumatic Diseases*. (50) : 760-762
- Stevens C., Benboubetra M., Harrison R., Sahinöglu T., Smith C. and Blake R. 1991. Localisation of xanthine oxidase to synovial endothelium : *Annals of the rheumatic. Annals of the Rheumatic Diseases*. (50) : 760-762
- Sullivan H., Mather H., Greenwalt E. and Madara J. 1982. Purification of xanthine oxidase from the fat-globule membrane of bovine milk by electro focusing. *Molecular and Cellular Biochemistry*. (44) : 13-22
- Thatcher H., Hsiao M., Pinner E., Moshe L., Stephen P., Patricia S. and Richard P. 2013. Neu-164 and Neu-107, two novel antioxidant and anti-myeloperoxidase compounds, inhibit acute cigarette smoke-induced lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. (305) : 165-174
- Trabsa H., Baghiani A., Boussoualim N., Krache I., Khenouf S., Charef N. and Arrar L. 2015. Kinetics of Inhibition of Xanthine Oxidase by *Lycium arabicum* and its Protective Effect against Oxonate-Induced Hyperuricemia and Renal Dysfunction in Mice. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 14 (2) : 249-256
- Tziomalos K. and Hare M. 2009. Role of xanthine oxidoreductase in cardiac nitroso-redox imbalance. *Front Biosci (Landmark Ed)*. (14) : 237-262
- Vorbach C., Harrison R. and Capecchi R. 2003. Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Elsevier*. 24 (9) : 1471-4906.
- Waksmundzka-Hajnos M., Sherma J. and Kowalska T. 2008. Thin layer chromatography in. *CRC Press: New York*. p.6

- Washio K., Yoshiki K., Takayo M., Takashi N. and Hidenori K. 2017. Xanthine oxidoreductase activity is correlated with insulin resistance and subclinical inflammation in young humans. *Metabolism*. 1-29.
- Welch D. 1990. Role of Ferritin as lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agric. Food Chem.* (38) :674-677
- Wi C., Yw L., Radhakrishnan A. and Lim P. 2010. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complement Altern Med.* 10(53): 1472-6882.
- Xu P., Huecksteadt T. and Hoidal J. 1996. Molecular Cloning and Characterization of The Human Xanthine Dehydrogenase Gene (XDH). *GENOMICS.* (34) : 173–180.
- Xu P., Huecksteadt T., Harrison R. and Hoidal J. 1994. Molecular cloning, tissue Expression of human xanthine dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical research Communications.* 199(2) : 998-1004.
- Xu R., Ye Y. and Zhao W. 2011. Introduction to natural products chemistry. *CRC Press.* pp:11.
- yan J. 2014. Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. *Redox Biology.* (2) : 165–169.
- Yoshimitsu K., Tomoko N., Ken O., Tomohiro M., Bryan T. and Takeshi N. 2003. Unique amino acids cluster for switching from the dehydrogenase to oxidase form of xanthine oxidoreductase. *PNAS.* 8170–8175.

Annexes

Annexe 1 : Différentes classes de flavonoïdes et leurs structures (Shank et Abhay, 2013).

Classe	Flavonoïdes	Structure	Substitution
Flavones	Luteoline Apigénine Chrysin		5, 7, 3', 4'-OH 5, 7, 4'-OH 5, 7-OH
Flavonols	Quercétine Kaempférol Myricétine		5, 7, 3', 4'-OH 5, 7, 4'-OH 5, 7, 3', 4', 5'-OH
Flavanones	Hesperétine Naringénine		5, 7, 3', 4 -OCH ₃ 5, 7, 4'-OH
Flavanonols	Taxifoline		3, 5, 7, 3', 4'-OH
Isoflavones	Genistéine Genistéine Daidzéine		5, 7, 4'-OH 5, 4'-OH, 7-Oglu 7, 4'-OH
Flavan-3-ols	catéchine épicatéchine épigallocatéchine		3, 5, 7, 3', 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4', 5'-OH

Anthocyanidine	cyanidine cyanine pelargonidine		3, 5, 7, 3', 4'-OH 3O-glc, 5, 7, 3', 4'- OH 3, 5, 7, 4'-OH
-----------------------	---------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------

ملخص

لقد تم في هذه الدراسة استخلاص كلا النبتتين *Thymus serpyllum* و *Equisetum arvense* بواسطة نظامين مائي-كحولي وكحولي. بعد هذه المرحلة تمت تجزئة كل من المستخلصين الخامين بواسطة الغسل السائل-السائل بمذيبات عضوية متزايدة القطبية بالنسبة للمستخلص الخام المائي-كحولي وخليط مذيبين عضويين بنسب متصاعدة القطبية باستعمال كروماتوغرافيا ذو الامتزاز في الحالة العكسية بالنسبة للمستخلص الخام الكحولي. أظهر اختبار DPPH نشاطاً مثبطاً قوياً لكل من المستخلص الخام المائي-الكحولي والكحولي لنبتت EA. بعد قياس % I يدل على فعالية الكسور مقارنةً بالمستخلصات الخامة. ويشير نشاط المخلب المقدر بواسطة اختبار فيروزين إلى أن المستخلص الخام الكحولي TS يمثل مخلباً جيداً بأدنى EC₅₀. أن فعالية مضادات الأكسدة في المستخلصات الخامة والكسور المقدر في اختبار FRAP قد اثبتت أن EAe TS له نشاط فعال مضاد للأكسدة، لكن EBr HAl EA يسجل نشاط مضادات الأكسدة منخفضاً جداً. لقد اظهرت المستخلصات الخامة لكل من نبتتين نشاطاً فعالاً كمضادات أكسدة. يمكن إثراء هذه النتائج في اختبارات على كائنات حية.

الكلمات المفتاحية: *Thymus Serpyllum*، *Equisetum arvense*، الكسر، الفلافونويد، نشاط مضادات الأكسدة، DPPH، الفيروزين، FRAP.

Résumés

Dans la présente étude, il y a l'extraction de *Thymus Serpyllum* et *Equisetum arvense* par les systèmes hydro-alcoolique et alcoolique, après un fractionnement d'EBr HAl par un lavage liquide-liquide avec différent solvant organique à polarité croissante en suit le fractionnement de l'EBr Al par un mélange de solvant organique en utilisant la chromatographie d'adsorption en phase inverse. L'analyse des EBr et fraction a été réaliser à l'aide de CCM et dosage colorimétrique AlCl₃. Le teste DPPH montre une forte activité inhibitrice d'EBr HAl et Al EA, en suit le mesure des % I indique l'efficacité des fractions par rapport aux EBr. L'activité chélatrice estimé par le test Ferrozine indique qu'EBr Al TS représente un bon chélateur avec la plus faible EC₅₀. Le pouvoir antioxydant des EBr et des fractions estimé par le test de FRAP montre que l'EAe TS possède une activité antioxydante importante, mais pour EBr HAl EA l'activité antioxydante est très faible. Pour les EBr Al des deux plantes, ils présentent une bonne activité. Ces résultats peuvent être enrichis par les tests *in vivo*.

Mots clés : *Thymus Serpyllum*, *Equisetum arvense*, Fractionnement, Flavonoïdes, Activité antioxydante, DPPH, ferrozine, FRAP.

Abstract

In this study, there is the extraction of *Thymus Serpyllum* and *Equisetum arvense* by the hydro-alcoholic and alcoholic systems, after a fractionation of EBr HAl by a liquid-liquid lavage with different organic solvent with increasing polarity after that the EBr Al is fractionated by an organic solvent mixture using reverse phase adsorption chromatography. Extract and fraction analysis was performed using CCM and AlCl₃ colorimetric assay. The DPPH test shows a strong inhibitory activity of EBr HAl and Al EA, following the measurement of % I indicates the effectiveness of the fractions compared to EBr. The chelating activity estimated by the Ferrozine test indicates that Ebr Al TS represents a good chelator with the lowest EC₅₀. The antioxidant potency of EBr and fractions estimated by the FRAP test shows that EAe TS has significant antioxidant activity, but for EBr HAl EA the antioxidant activity is very low. For Al EBr of both plants, they show good activity. These results can be enriched by *in vivo* tests.

Key words : *Thymus Serpyllum*, *Equisetum arvense*, Fractionation, Flavonoids, Antioxidant Activity, DPPH, Ferrozine, FRAP.