

République Algérienne Démocratique et Populaire



**UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA**

**FACULTE DES SCIENCES  
ET TECHNOLOGIE ET SCIENCES DE LA MATIERE**

**Thèse**

*Présentée pour l'obtention du diplôme de*

**DOCTORAT**

**Spécialité : Chimie**

**Option : Chimie organique appliquée**

**Par : HAMIA Chahrazed**

**Thème**

**Investigation phytochimique du *Rhanterium  
adpressum* pour ses propriétés  
antioxydantes et antiradicalaires**

Soutenu publiquement le: 15/01/2015

Devant le jury composé de :

Mr DENDOUGUI Hocine	Professeur	Université d' Ouargla	Président
Mr HADJADJ Mohamed	MCA	Université d'Ouargla	Examineur
Mr LANEZ Touhami	Professeur	Université d'El Oued	Examineur
Mr NADJEMI Boubakeur	Professeur	E.N.S. Kouba- Alger	Examineur
Mr YOUSFI Mohamed	Professeur	Université de Laghouat	Directeur de thèse
Mr SAIDI Mokhtar	Professeur	Université d'Ouargla	Codirecteur de thèse



*A la mémoire de mon Père*

*A ma mère*

*A mon Époux*

*A mes sœurs et mon petit frère*

*A mes petites filles: Yasmine, Khadidja et F.Z*

# Remerciements

*L'ensemble de travail de cette thèse a été réalisé au Laboratoire des Sciences Fondamentales LSF à l'université de Laghouat sous la direction du directeur de ce laboratoire Mr **M. Yousfi**. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance et ma gratitude tout particulièrement pour ses efforts, son soutien et ses encouragements. Je le remercie vivement de m'avoir accueilli dans son groupe et de m'avoir donné l'opportunité de me former en phytochimie. Je tiens à le remercier également de m'avoir donné la possibilité de présenter mes résultats.*

*Mes remerciements vont aussi à Mr **M. Saïdi** pour avoir bien voulu participer à l'encadrement de cette thèse.*

*Je tiens à remercier Mr **D. Benbertal**, ancien directeur du Laboratoire des Sciences Fondamentales, et directeur de l'université de Laghouat, pour avoir mis à notre disposition tout les moyens possibles nécessaires pour mener à bien une partie de ce travail.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mr **H. Dendougui**, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de thèse de Doctorat.*

*Je suis très reconnaissante à messieurs: **H. Lanez**, **B. Nedjemi** et **M. Hadjadj** d'avoir accepté le rôle de rapporteur pour leurs contributions à améliorer de manière significative le contenu de ce document.*

*Bien que la thèse soit fondamentalement un travail individuel, elle n'aurait pu être menée à bien sans une équipe de collègues qui contribuent au bon fonctionnement du Laboratoire, avec lesquels il est possible d'échanger conseils et suggestions, et qui assurent une atmosphère de travail donnant envie de se lever chaque matin. Je remercie pour cela tous mes collègues de ce laboratoire: **Z. Hadbaoui**, **N. Gourine**, **A. Djeridane** et **M. Benafia**.*

*Je n'oublierai remercier Melle **H. Boussoussa** pour l'aide qu'elle m'a fournie à mener à bien une partie de ce travail.*

*Je clos enfin ces remerciements en témoignant ma gratitude toute particulière à l'égard de ma famille: ma mère, mes sœurs, mon époux et ma belle mère qui m'ont soutenu continuellement tout au long de ces années de travail.*

## Résumé

Le présent travail a pour objectif l'analyse des fractions lipidiques, des huiles essentielles et des composés phénoliques des fleurs du *Rhanterium adpressum* collectés dans la région de Zelfana ainsi que leurs activités antioxydantes. La composition en acides gras des lipides a permis de déduire que le pourcentage des acides gras totaux saturés accroît au détriment des acides gras totaux insaturés et que les acides gras totaux insaturés seront majoritaires dans le mois de mars qui est le mois de la floraison de la plante étudiée. D'autre part, les résultats des teneurs en tocophérols totaux, en stérols et en phénols totaux montrent qu'ils varient au sens contraire aux proportions des acides gras totaux insaturés et dans le même sens que celles des acides gras totaux saturés. Les échantillons d'huiles essentielles obtenus par hydrodistillation, ont été analysés par CPG et CG-SM. Un nombre total de 25 constituants chimiques a été identifié. Les résultats montrent qu'ils existent des différences quantitatives entre l'huiles essentielles F1 et F2. L'huile essentielle de l'échantillon F1 est caractérisée par les constituants majoritaires suivants:  $\alpha$ -pinène (17,39%), le Camphène (21,81%) et le Myrcènes (19,28%). En revanche, l'huile de l'échantillon F2 est caractérisée par les mêmes constituants majeurs mais avec des proportions différentes (24,35% pour l' $\alpha$ -pinène, 17,79% pour le Camphène et 18.6% pour le Mycènes). L'analyse qualitative des huiles essentielles de *Rhanterium adpressum* en phénols totaux montre qu'elles sont en faibles possessions en ces composés. L'étude des composés phénoliques des fleurs de *Rhanterium adpressum* montre que les résultats obtenus de l'extraction et la quantification des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés reflètent que les extraits d'acétate d'éthyle et butanoliques de cette espèce sont relativement riches en composés phénoliques. L'analyse des extraits phénoliques des fleurs de *Rhanterium adpressum* par CLHP montre que la majorité des composés phénoliques des extraits butanol et acétate d'éthyle sont de types flavonoïde. L'évaluation du pouvoir antioxydant des extraits lipidiques, huiles essentielles et composés phénoliques par différents tests chimiques in vitro, indique que nos extraits possèdent des activités antioxydantes intéressantes.

**Mots clés :** *Rhanterium adpressum*, fractions lipidiques, , huiles essentielles, composés phénoliques, pouvoir antioxydant.

## **Abstract**

This present work aims to study the lipid fractions, essential oils, phenolic compounds and their antioxidant activities of the flowers of *Rhanterium adpressum* collected in the region Zelfana.

The fatty acid composition of lipids allowed to deduct the percentage of saturated fatty acids increases the total expense of unsaturated fatty acids and total unsaturated fatty acids will total majority in the month of March is the month of the flowering of plant studied. On the other hand, the results of total tocopherols content in sterols and total phenols show that they vary in the opposite direction to the proportions of the total unsaturated fatty acids and in the same direction as those of saturated fatty acids total. The essential oils obtained by hydro-distillation samples were analyzed by GC and GC-MS. A total of 25 chemical constituents been identified. The results show that there are quantitative differences between the essential oils F1 and F2 . The essential oil sample F1 is characterized by the following major constituents:  $\alpha$ -pinene (17.39%), camphene (21.81%) and Mycenae (19.28%). However, the oil sample F2 is characterized by the same major components but with different proportions (24.35% for the  $\alpha$ -pinene, 17.79% to 18.6% and camphene for Mycènes).

The qualitative analysis of essential oils *Rhanterium adpressum* total phenols shows that they are low in these compounds possessions. The result of the extraction and quantification of total phenols, flavonoids, and tannins reflect the butanol and ethyl acetate extracts of this species are relatively rich in phenolic compounds. Analysis of phenolic extracts of flowers *Rantherium adpressum* by HPLC showed that the majority of the phenolics extracts butanol and ethyl acetate are flavonoid type. Evaluation of antioxidant lipid extracts, essential oils and various phenolic compounds by in vitro tests, indicates that our extracts possess valuable antioxidant activities.

**Keywords:** *Rhanterium adpressum*, lipids, fatty acids, tocopherols, sterols, essential oils, phenolic compounds, flavonoids, tannins, antioxidant activity.

## ملخص

يهدف هذا العمل إلى دراسة المستخلصات الدهنية، والزيوت العطرية والمركبات الفينولية لزهور *Rhanterium adpressum* وكذا دراسة قدراتها المضادة للأكسدة التي تم جنيها من منطقة زلفانة. أستنتج من التركيب الكيميائي للبيدات أن نسبة الأحماض الدسمة المشبعة تزيد على حساب الأحماض الدهنية غير المشبعة و أن هذه الأخيرة هي الأكثر نسبة في شهر مارس الذي هو شهر الازهار لهذه النبتة. من ناحية أخرى، فإن نتائج التوكوفيرول والستيرول والفينولات تظهر أنها تختلف في الاتجاه المعاكس لنسب الأحماض الدهنية غير المشبعة و في نفس اتجاه تلك من مجموع الأحماض الدهنية المشبعة. بعد استخلاص الزيوت العطرية بواسطة التقطير المائي من أزهار شجيرة *Rhanterium adpressum* ، قمنا بتحليلها بواسطة كروماتوغرافيا الطور الغازي GC وكروماتوغرافيا الطور الغازي بالتزواج مع مطياف الكتلة GC-MS. تم التعرف على خمسة و عشرون مركبًا من الزيوت العطرية. أظهرت النتائج أن هناك اختلافات كمية بين الزيوت العطرية F1 و F2. تتميز العينة F1 بالمكونات الرئيسية التالية :  $\alpha$ -بينين (17,33) % ، كمفين (21,81) % و ميرسين (19,28) % . أما F2 فب (24,35) % بالنسبة لـ  $\alpha$ -بينين و كمفين (17,79) % و ميرسين (6, 18) % . أظهر التحليل الكيفي للمركبات الفينولية في الزيوت العطرية لأزهار *Rhanterium adpressum* / R أن هذه الأخيرة ذو محتوى ضعيف من هذه المركبات. بينت نتائج استخلاص و تقدير المركبات الفينولية ،الفلافونويدات والتانات في زهور *Rhanterium adpressum* أن جميع المستخلصات غنية بالمركبات الفينولية. دل التحليل بواسطة كروماتوغرافيا السائلة ذات الجودة العالية لمستخلصات البوتانول ووخلات الإيثيل أن هي من نوع الفلافونويدات. بدراسة الخاصية المضادة للأكسدة للمستخلصات الليبيدية، والزيوت العطرية والمركبات الفينولية باستعمال مختلف الاختبارات الكيميائية تبين أن كل المستخلصات تملك فعالية مهمة.

**الكلمات المفتاحية :** *Rhanterium adpressum* ، الليبيدات ، الزيوت العطرية، المركبات الفينولية ، الفعالية المضادة لأكسدة.

## *Table des matières*

Liste des notations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	<b>1</b>
<b>Chapitre -I- Généralités sur la plante investiguée</b>	<b>3</b>
<b>Aperçu bibliographique</b>	<b>4</b>
I-1- La famille des Astéracées (Composées)	<b>4</b>
I-1-1- Généralités	<b>4</b>
I-1-2- Description botanique	<b>4</b>
I-1-3- Utilisation	<b>5</b>
I-2- Le genre <i>Rhanterium</i>	<b>5</b>
I-2-1- Introduction	<b>5</b>
I-2-2- Description botanique du genre	<b>6</b>
I-2-3- Distribution géographique	<b>6</b>
<b>Partie expérimentale et résultats</b>	<b>8</b>
I-1- <i>Rhanterium adpressum</i>	<b>8</b>
I-1-1- Description botanique	<b>8</b>
I-1-2- Systématique	<b>8</b>
I-1-3- Collecte de la plante	<b>9</b>
<b>Chapitre -II- Etude des lipides de <i>Rhanterium adpressum</i></b>	<b>12</b>
<b>Aperçu bibliographique</b>	<b>13</b>
II-1- Les lipides	<b>13</b>
II-1-1- Définition	<b>13</b>
II-1-2- Rôle biologique des lipides	<b>13</b>
II-1-3- Classification des lipides	<b>14</b>
II-1-3-1- Les lipides vrais	<b>14</b>
II-1-3-2- Composés à caractère lipidique (Lipoïdes)	<b>14</b>
II-2- Composition des lipides	<b>15</b>
II-2-1- Constituants majeurs	<b>15</b>
II-2-1-1- Acides gras	<b>15</b>
II-2-1-2- Triglycérides	<b>17</b>
II-2-2- Constituants mineurs	<b>18</b>
II-2-2-1- Phospholipides	<b>18</b>
II-2-2-2- Monoglycérides et diglycérides ou glycérides partiels	<b>19</b>
II-2-2-3- Insaponifiables	<b>20</b>



<b>Partie expérimentales et résultats</b>	<b>24</b>
II-1- Extraction des lipides	24
II-2- Analyses des acides gras 25	
II-2-1- Préparation des esters méthyliques d'acides gras (EMAG) des lipides des fleurs de <i>Rhanterium adpressum</i>	25
II-2-1-1- Mode opératoire	25
II-2-2- Analyse des esters méthyliques d'acides gras	26
II-2-2-1- Conditions d'analyses	26
a- analyses chromatographiques CPG	26
b- Analyses spectrales CG-SM	27
II-2-2-2- Résultats	27
II-3- Etude des composés mineurs	29
II-3-1- Dosage des tocophérols totaux	29
II-3-1-1- Principe	29
II-3-1-2- Courbe d'étalonnage	30
II-3-1-3- Résultats	31
II-3-2- Dosage des stérols	31
II-3-2-1- Principe	31
II-3-2-2- Courbe d'étalonnage	31
II-3-2-3- Résultats	32
II-4- Quantification des composés phénoliques	33
II-4-1- Principe	33
II-4-2- Courbe d'étalonnage	33
II-4-3- Résultats	34
II-5- Conclusion	35
<b>Chapitre -III- Etude des huiles essentielles de <i>Rhanterium adpressum</i></b>	<b>37</b>
<b>Aperçu bibliographique</b>	<b>38</b>
III-1- Les huiles essentielles	38
III-1-1-Définitions et rôle écologique	38
III-1-2- Répartition et localisation des huiles essentielles	38
III-1-3- Caractéristiques traditionnelles	39
III-1-4- Composition chimiques des huiles essentielles	40
III-1-5- Les applications des huiles essentielles	42
III-1-6- Méthodes d'extraction des huiles essentielles	44
III-1-7- Les méthodes d'analyse	46
<b>Partie expérimentales et résultats</b>	<b>47</b>
III-1- Conservation	47
III-2- Méthodes expérimentales	47
III-2-1- Extraction des huiles essentielles	47
III-2-2- Teneurs en huiles essentielles	48
III-2-3- Analyse et composition chimique des huiles essentielles	49
III-2-4- Quantification des phénols totaux dans les huiles essentielles	53

III-2-4-1- Dosage des phénols totaux	53
III-2-4-2- Principe	54
III-2-4-3- Le mode opératoire	54
III-2-4-4- Teneurs des huiles essentielles en phénols totaux	54
<b>Chapitre -IV- Etude des composés phénoliques de <i>Rhanterium adpressum</i></b>	<b>56</b>
<b>Aperçu bibliographique</b>	<b>57</b>
IV-1- Les composés phénoliques	57
IV-1-1- Les acides phénoliques	58
IV-1-2- Les flavonoïdes	59
IV-1-2-1- Propriétés des flavonoïdes	61
Activité biologique des flavonoïdes dans les règnes végétales et animal	61
IV-1-2-1-2- Propriétés biologiques et pharmaceutiques des flavonoïdes	63
IV-1-3- Les tanins	65
IV-1-3-1- Types des tanins	65
a- Les tanins hydrolysables	65
b- Les tanins condensés	66
IV-1-3-2- Activité biologique des tanins	66
<b>Partie expérimentale et résultats</b>	<b>68</b>
IV-1- Préparation du matériel végétal	68
IV-2- Extraction des composés phénoliques	68
IV-3- Quantification des composés phénoliques	70
IV-3-1- Dosage des phénols totaux	70
IV-3-2- Résultats	71
IV-3-2- Dosage des flavonoïdes	73
IV-3-2-1- Principe	73
IV-3-2-2- Courbe d'étalonnage	73
IV-3-2-3- Résultats	74
IV-3-3- Dosage des tanins condensés	75
IV-3-3-1- Principe	75
IV-3-3-2- Courbe d'étalonnage	75
IV-3-3-3- Résultats	76
IV-4- Analyse des phénols totaux	83
<b>Chapitre -V- Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits: lipides, huiles essentielles et composés phénoliques de <i>Rhanterium adpressum</i></b>	<b>86</b>
<b>Aperçu bibliographique</b>	<b>87</b>
V-1- Introduction	87
V-2- Les radicaux libres	87
V-3- Le stress oxydants	88
V-4- Antioxydants	89

V-5- Les principaux tests d'activité antioxydante	<b>90</b>
<b>Partie expérimentale et résultats</b>	<b>91</b>
V-1- Etude du pouvoir antioxydant des extraits de <i>Rhanterium adpressum</i>	<b>91</b>
V-1-1- Test du DPPH	<b>91</b>
V-1-1-1- Principe	<b>91</b>
V-1-1-2- Protocole expérimental	<b>93</b>
V-1-2- Test de FRAP	<b>94</b>
V-1-2-1- Principe	<b>94</b>
V-1-2-2- Protocole expérimental	<b>95</b>
V-1-3- Test de Phosphomolybdate (PPM)	<b>96</b>
V-1-3-1- Principe	<b>96</b>
V-1-3-2- Protocole expérimental	<b>96</b>
V-1-4- Le test du Radical cation ABTS <sup>+</sup>	<b>96</b>
V-1-4-1- Principe	<b>96</b>
V-1-4-2- Protocole expérimental	<b>97</b>
V-2- Activités antioxydantes des lipides des fleurs de <i>Rhanterium adpressum</i>	<b>98</b>
V-2-1- Activité antioxydante des lipides en utilisant le test DPPH	<b>98</b>
V-2-2- Activité antioxydante des lipides en utilisant le test Phosphomolybdate	<b>100</b>
V-2-3- Conclusion	<b>102</b>
V-3- Activités antioxydantes des huiles essentielles de fleurs de <i>Rhanterium adpressum</i>	<b>102</b>
V-3-1- Activités antioxydantes des huiles essentielles en utilisant le test DPPH	<b>102</b>
V-3-2- Activités antioxydantes des huiles essentielles en utilisant le test FRAP	<b>105</b>
V-3-3- Activités antioxydantes des huiles essentielles en utilisant le test Phosphomolybdate	<b>107</b>
V-3-4- Conclusion	<b>108</b>
V-4- Activités antioxydantes des extraits phénoliques des fleurs de <i>Rhanterium adpressum</i>	<b>109</b>
V-4-1- Activités antioxydantes des extraits phénoliques en utilisant le test DPPH	<b>109</b>
V-4-2- Activités antioxydantes des extraits phénoliques en utilisant le test Phosphomolybdate	<b>116</b>
V-4-3- Activités antioxydantes des extraits phénoliques en utilisant le test ABTS	<b>123</b>
V-4-4- Conclusion	<b>129</b>
Conclusion générale	<b>130</b>
Références bibliographiques	<b>134</b>
Annexes	<b>158</b>

## *Liste des abréviations*

<b>ABTS</b>	2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique acide)
<b>AEAC</b>	Ascorbic acid Equivalent Antioxidant Capacity
<b>AFNOR</b>	Association Française de NORmalisation
<b>AG</b>	Acide Gras
<b>AGE</b>	Acide Gras Essentiel
<b>AGI</b>	Acide Gras Insaturé
<b>AGMI</b>	Acide Gras Mono Insaturé
<b>AGPI</b>	Acide Gras Poly Insaturé
<b>AGS</b>	Acide Gras Saturé
<b>AOX</b>	AntiOXydant
<b>CCM</b>	Chromatographie sur Couche Mince
<b>CE</b>	Equivalent en Catéchine
<b>CG/SM</b>	Chromatographie gazeuse couplée a la Spectrométrie de Masse
<b>CLHP</b>	Chromatographie liquide haute performance
<b>CPG</b>	Chromatographie en Phase Gazeuse
<b>DPPH</b>	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>EAG</b>	Equivalent en Acide Gallique
<b>EMAG</b>	Ester Méthylique d'Acide Gras
<b>ERO</b>	Espèces Réactives de l'Oxygène
<b>F<sub>1</sub></b>	Fleurs: échantillon 1
<b>F<sub>2</sub></b>	Fleurs: échantillon 2

<b>FID</b>	Détecteur d'Ionisation à Flamme
<b>FRAP</b>	Ferric Reducing Ability of Plasma
<b>IC<sub>50</sub></b>	Inhibition Concentration (Concentration requise pour inhiber 50% des radicaux libres)
<b>IRL</b>	Indice de Rétention Linéaire
<b>Min</b>	Minute
<b>mM</b>	mmol/L
<b>MS</b>	Matière sèche
<b>ORAC</b>	Oxygen Radical Absorbance Capacity
<b>PPM</b>	PhosPhoMolybdate
<b>RE</b>	Equivalent en Rutine
<b>R<sub>f</sub></b>	Facteur de Rétention
<b>RI</b>	Indice de Rétention
<b>TG</b>	Triglycéride
<b>TPTZ</b>	Tripyridyl-triazine
<b>VEEAC</b>	Vitamin E Equivalent Antioxidant Capacity

## *Liste des figures*

<u><i>Chapitre I</i></u>		
<b>Figure I.1</b>	Photos illustrant le <i>Rhanterium adpressum</i>	<b>8</b>
<b>Figure I.2</b>	Carte géographique représentant la zone de collecte des fleurs de <i>Rhanterium adpressum</i>	<b>10</b>
<u><i>Chapitre II</i></u>		
<b>Figure II.1</b>	Structure des: a- Monoglycérides, b- Diglycérides	<b>19</b>
<b>Figure II.2</b>	Structure de base des stérols	<b>21</b>
<b>Figure II.3</b>	Structure des différents tocophérols et tocotriénols	<b>22</b>
<b>Figure II.4</b>	Courbe d'étalonnage de la vitamine E	<b>30</b>
<b>Figure II.5</b>	Courbe d'étalonnage du cholestérol	<b>32</b>
<b>Figure II.6</b>	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	<b>34</b>
<u><i>Chapitre III</i></u>		
<b>Figure III.1</b>	Structure chimique de l'isoprène	<b>40</b>
<b>Figure III.2</b>	Exemple des composants monoterpéniques	<b>40</b>
<b>Figure III.3</b>	Exemple des composants sesquiterpéniques	<b>41</b>
<b>Figure III.4</b>	Exemple des composants diterpéniques	<b>41</b>
<b>Figure III.5</b>	Exemple des composants triterpéniques	<b>41</b>
<b>Figure III.6</b>	Caoutchouc naturel	<b>42</b>
<b>Figure III.7</b>	Récapitulatif des différentes méthodes de notre étude	<b>47</b>
<b>Figure III.8</b>	Variation des teneurs des différentes classes chimiques des huiles essentielles des fleurs de <i>Rhanterium adpressum</i> .	<b>52</b>
<b>Figure III.9</b>	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	<b>54</b>
<u><i>Chapitre IV</i></u>		
<b>Figure IV.1</b>	Les dérivés de l'acide p-hydroxybenzoïque	<b>58</b>
<b>Figure IV.2</b>	Les acides hydroxycinnamiques	<b>58</b>
<b>Figure IV.3</b>	Structure de base des flavonoïdes : la phényl-2 benzopyrone	<b>59</b>

<b>Figure IV.4</b>	Structures des différentes classes des flavonoïdes	<b>60</b>
<b>Figure IV.5</b>	Structure des tannins condensés	<b>66</b>
<b>Figure IV.6</b>	Courbe d'étalonnage de la rutine	<b>74</b>
<b>Figure IV.7</b>	Courbe d'étalonnage de la catéchine	<b>76</b>
<b>Figure IV.8</b>	Comparaison entre les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins des différentes fractions issues de l'extraction (acétone/eau)	<b>78</b>
<b>Figure IV.9</b>	Comparaison entre les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins des différentes fractions issues de l'extraction(méthanol/eau)	<b>79</b>
<b>Figure IV.10</b>	Variation de la concentration en phénols totaux en fonction de la teneur en flavonoïdes et en tanins des différentes fractions d'acétate d'éthyle issues d'une extraction (acétone/eau)	<b>80</b>
<b>Figure IV.11</b>	Variation de la concentration en phénols totaux en fonction de la teneur en flavonoïdes et en tanins des différentes fractions butanoliques issues d'une extraction (acétone/eau)	<b>81</b>
<b>Figure IV.12</b>	Variation de la concentration en phénols totaux en fonction de la teneur en flavonoïdes et en tanins des différentes fractions d'acétate d'éthyle issues d'une extraction (méthanol/eau)	<b>82</b>
<b>Figure IV.13</b>	Variation de la concentration en phénols totaux en fonction de la teneur en flavonoïdes et en tanins des différentes fractions butanoliques issues d'une extraction (méthanol/eau)	<b>83</b>
	<b><u>Chapitre V</u></b>	
<b>Figure V.1</b>	Courbes cinétiques représentant la variation de la densité optique en fonction du temps dans le test du DPPH	<b>92</b>
<b>Figure V.2</b>	Réduction du radical libre DPPH	<b>92</b>
<b>Figure V.3</b>	Mécanisme réactionnel général associé à la méthode du test FRAP	<b>94</b>
<b>Figure V.4</b>	Forme réduite ABTS, forme radical cation ABTS <sup>•+</sup>	<b>97</b>
<b>Figure V.5</b>	Courbes représentant l'activité antioxydante des deux extraits lipidiques du test DPPH (a) : lipides mai, (b) : lipides mars	<b>99</b>
<b>Figure V.6</b>	Courbe d'étalonnage de la vitamine E	<b>100</b>
<b>Figure V.7</b>	Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration des extrais (a) : lipides mars, (b) : lipides mai	<b>101</b>
<b>Figure V.8</b>	Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des huiles essentielles des fleurs de <i>Rhanterium adpressum</i>	<b>102</b>

<b>Figure V.9</b>	Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des antioxydants de références	<b>103</b>
<b>Figure V.10</b>	Test FRAP : L'évolution de l'absorbance à 593 nm en fonction du temps de la réaction pour différentes concentrations de l'échantillon d'huile essentielle de fleurs F1 de <i>Rhanterium adpressum</i>	<b>105</b>
<b>Figure V.11</b>	Histogramme montrant l'évolution du pouvoir réducteur (AEAC) des huiles essentielles de fleurs de <i>Rhanterium adpressum</i> ainsi que les antioxydants de références (test: FRAP)	<b>107</b>
<b>Figure V.12</b>	Courbe d'étalonnage de la vitamine E	<b>107</b>
<b>Figure V.13</b>	Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration en phénols des extraits d'acétate d'éthyle et de butanol issus d'une extraction (acétone/eau)	<b>110</b>
<b>Figure V.14</b>	Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration en phénols des extraits d'acétate d'éthyle et de butanol issus d'une extraction (méthanol/eau)	<b>110</b>
<b>Figure V.15</b>	Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration en antioxydants standards	<b>111</b>
<b>Figure V.16</b>	Variation des valeurs d'IC <sub>50</sub> en fonction des teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins des extraits issus d'une extraction (acétone/eau)	<b>114</b>
<b>Figure V.17</b>	Variation des valeurs d'EC <sub>50</sub> en fonction des teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins des extraits issus d'une extraction (méthanol/eau)	<b>115</b>
<b>Figure V.18</b>	Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction (acétone/eau)	<b>117</b>
<b>Figure V.19</b>	Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction (méthanol/eau)	<b>117</b>
<b>Figure V.20</b>	Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en antioxydants de référence	<b>118</b>
<b>Figure V.21</b>	Corrélation entre les valeurs de AEAC et des teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins des extraits issus d'une extraction (acétone/eau)	<b>121</b>



<b>Figure V.22</b>	Corrélation entre les valeurs de AEAC et des teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins des extraits issus d'une extraction (méthanol/eau)	<b>122</b>
<b>Figure V.23</b>	Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition PI% en fonction de la concentration en phénols des extraits d'acétate d'éthyle et de butanol issus d'une extraction (acétone/eau)	<b>123</b>
<b>Figure V.24</b>	Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition PI% en fonction de la concentration en phénols des extraits d'acétate d'éthyle et de butanol issus d'une extraction (méthanol/eau)	<b>124</b>
<b>Figure V.25</b>	Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition PI% en fonction de la concentration en antioxydant standards	<b>124</b>
<b>Figure V.26</b>	Variation des valeurs d'IC <sub>50</sub> en fonction des teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins des extraits issus d'une extraction (acétone/eau)	<b>127</b>
<b>Figure V.27</b>	Variation des valeurs d'IC <sub>50</sub> en fonction des teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins des extraits issus d'une extraction (méthanol/eau)	<b>128</b>

## *Liste des tableaux*

<u><i>Chapitre I</i></u>		
<b>Tableau I.1</b>	La systématique de l'espèce <i>Rhanterium adpressum</i> Coss. & Durieu	<b>9</b>
<b>Tableau I.2</b>	La situation géographique et l'étage bioclimatique de la région de collecte	<b>11</b>
<b>Tableau I.3</b>	L'année et le mois de collecte des échantillons	<b>11</b>
<u><i>Chapitre II</i></u>		
<b>Tableau II.1</b>	Rendement en lipides et pourcentage en insaponifiable des fleurs de <i>Rhanterium adpressum</i>	<b>24</b>
<b>Tableau II.2</b>	Composition relative en acide gras des lipides des fleurs de <i>Rhanterium adpressum</i>	<b>28</b>
<b>Tableau II.3</b>	Concentrations en tocophérols en équivalence de la vitamine E en µg/g	<b>31</b>
<b>Tableau II.4</b>	Concentrations en stérols en équivalence du cholestérol en µg/g	<b>33</b>
<b>Tableau II.5</b>	La teneur en phénols totaux des extraits lipidiques des fleurs de <i>Rhanterium adpressum</i>	<b>35</b>
<u><i>Chapitre III</i></u>		
<b>Tableau III.1</b>	Teneurs des huiles essentielles des fleurs de <i>Rantherium adpressum</i>	<b>48</b>
<b>Tableau III.2</b>	Teneurs en huiles essentielles de quelques plantes	<b>48</b>
<b>Tableau III.3</b>	Composition chimique des huiles essentielles des fleurs du <i>Rhanterium adpressum</i>	<b>51</b>
<b>Tableau III.4</b>	Teneur des huiles essentielles des fleurs de <i>Rantherium adpressum</i> en phénols totaux	<b>55</b>
<u><i>Chapitre IV</i></u>		
<b>Tableau IV.1</b>	La teneur, l'aspect et la couleur des extraits obtenus à partir d'une extraction (acétone/eau) de polarité croissante	<b>69</b>
<b>Tableau IV.2</b>	La teneur, l'aspect et la couleur des extraits obtenus à partir d'une extraction (méthanol/eau) de polarité croissante	<b>70</b>
<b>Tableau IV.3</b>	La teneur en phénols totaux des extraits issus de l'extraction (acétone/eau) et (méthanol/eau)	<b>71</b>

<b>Tableau IV.4</b>	Comparaison de la teneur en phénols totaux des fleurs de <i>Rhanterium adpressum</i> avec quelques plantes médicinales de la famille des Astéracées	<b>72</b>
<b>Tableau IV.5</b>	La teneur en flavonoïdes des extraits issus de l'extraction (acétone/eau) et (méthanol/eau)	<b>74</b>
<b>Tableau IV.6</b>	La teneur en tanins condensés des extraits issus de l'extraction (acétone/eau) et (méthanol/eau)	<b>77</b>
<b>Tableau IV.7</b>	Le programme de l'élution	<b>84</b>
<b>Tableau IV.8</b>	Les classes des composés phénoliques de l'extrait butanol	<b>84</b>
<b>Tableau IV.9</b>	classes des composés phénoliques de l'extrait acétate d'éthyle	<b>85</b>
	<b><u>Chapitre V</u></b>	
<b>Tableau V.1</b>	Les valeurs d' IC <sub>50</sub> des extraits lipidiques et des antioxydants standards	<b>100</b>
<b>Tableau V.2</b>	L'activité antioxydante des huiles essentielles de fleurs de <i>Rhanterium adpressum</i> et de l'antioxydant de référence Vitamine C (Test Phosphomolybdate)	<b>101</b>
<b>Tableau V.3</b>	l'activité antioxydante des huiles essentielles de fleurs de <i>Rhanterium adpressum</i> (Test DPPH)	<b>104</b>
<b>Tableau V.4</b>	L'activité antioxydante des huiles essentielles de fleurs de <i>Rhanterium adpressum</i> et de quelques antioxydants de références synthétiques (Test FRAP)	<b>106</b>
<b>Tableau V.5</b>	l'activité antioxydante des huiles essentielles de fleurs de <i>Rhanterium adpressum</i> et de l'antioxydant de référence Vitamine C (Test Phosphomolybdate)	<b>108</b>
<b>Tableau V.6</b>	Les valeurs d'IC <sub>50</sub> en (µg/ml) des différents extraits issus de l'extraction (acétone/eau) et (méthanol/eau)	<b>112</b>
<b>Tableau V.7</b>	Les AEAC des différents extraits issus de l'extraction (acétone/eau) et (méthanol/eau) et de l' α-tocophérol	<b>119</b>
<b>Tableau V.8</b>	Les valeurs d'IC <sub>50</sub> en (µg/ml) des différents extraits issus de l'extraction (acétone/eau) et (méthanol/eau)	<b>125</b>

# *Introduction générale*

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins: nourriture, médicaments, abris,... Bien qu'une grande partie du XXème siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs via le screening des ressources naturelles a conduit à la découverte d'un grand nombre de plantes à lipides, d'huile essentielle et de plantes à composés phénoliques de réserve utile. Ces plantes commencent à jouer un rôle majeur dans divers industries (alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques).

L'utilisation des plantes et de leurs vertus pour répondre à certains besoins de l'homme est connue depuis l'antiquité et évolue avec l'histoire de l'humanité. C'est pour cela que l'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie s'emploient à recenser, partout dans le monde, des plantes réputées actives pour les quelles il convient de préciser les propriétés et valider les usages. La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de cette biodiversité végétale.

L'Algérie dispose d'une flore naturelle très riche et diversifiée, quasiment inexplorée et inexploitée. La plupart des espèces, pérennes ou saisonnières, possèdent des extraits actifs qui peuvent jouer un rôle utiles pour les industries pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires.

Le but de cette étude est la valorisation de ressources végétales de notre région par des recherches scientifiques , et plus spécifiquement une contribution à l'étude des propriétés antioxydantes de l'espèce *Rhanterium adpressum*. Parmi les raisons ayant conduit au choix de cette plante:

- ✓ Tous d'abord, le *Rhanterium adpressum* est une plante spontanée qui est couramment rencontrée dans les zones sahariennes arides de l'Algérie d' où elle est souvent employée par la population locale pour le tannage et en médecine populaire comme un antidiurétique.
- ✓ Par ailleurs, à notre connaissance, aucun travail sur la fraction lipidique de cette espèce n'a été mené auparavant et peu de travaux ont été consacrés à l'étude des huiles essentielles et des composés phénoliques de celle-ci.

Donc, il nous a paru intéressant d'épuiser le potentiel organique lipophile et hydrophile des fleurs de cette plante en exposant les volets suivants:

- Dans un premier volet, des généralités sur l'espèce sont présentées ainsi que le lieu et le moment de récolte de la plante pour chaque métabolite étudié.
  
- Le second volet de ce travail sera consacré à l'étude de la fraction lipidique. Nous déterminerons, dans un premier temps, la composition en acide gras, identifiée par le couplage chromatographique en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse. Dans un second temps, nous étudierons la composition qualitative des tocophérols de façon à connaître le potentiel vitaminique des huiles. Nous envisagerons ensuite l'analyse des stérols et des composés phénoliques par des méthodes spectrophotométriques.
  
- Le troisième volet mettra la lumière sur la composition chimique des huiles essentielles ainsi qu'au dosage des phénols totaux.
  
- L'étude des composés phénoliques fait l'objet du quatrième volet en se focalisant sur le dosage de composés pouvant présenter des activités et intérêts potentiels comme les phénols totaux, les flavonoïdes et les tanins.
  
- Le cinquième volet expose la détermination de l'activité antioxydante qui a été investiguée en parallèle pour tous les échantillons.

## *CHAPITRE -I-*

### *Généralités sur la plante investiguée*

---

## ***Aperçu bibliographique***

---

### **I-1- La famille des Astéracées (Composées)**

#### **I-1-1- Généralités**

La famille des Astéracées ou composées est la plus vaste famille de la division des spermatophytes avec près de 17 tribus, 1000 genres et au moins 25000 espèces répandues à travers le monde (*J L Guignard, 1994; H Gaussen et F Leroy, 1882*). En Algérie elle compte environ 109 genres et plus de 408 espèces (*P Quezel et S Santa, 1963*).

Les Astéracées connaissent une distribution géographique mondiale, à l'exception de l'Antarctique. Elles s'acclimatent bien aux régions tropicales et subtropicales semi-arides, à la toundra alpine et arctique et aux régions tempérées. Elles sont, en revanche, peu présentes dans la forêt tropicale (*J. L Guignard, 1994*).

#### **I-1-2- Description botanique**

Les Astéracées sont principalement des herbes, vivaces ou non, mais aussi des arbustes ou sous arbrisseaux, parfois des arbres, rarement des plantes aquatiques ou des plantes grimpantes ou encore des épiphytes, les feuilles sont le plus souvent alternes mais aussi opposées ou radiales, simples, ex-stipulées (*H Gaussen et F Leroy, 1882*). Les fleurs des composées sont toujours groupées en une inflorescence (groupe de fleurs sur la même tige) appelées tête ou capitule qui fonctionne comme une fleur unique. Chez la moitié des espèces, les petites fleurs centrales sont tubuleuses, en forme de minuscules disques, alors que celles de la périphérie ont des corolles en forme de languettes évasées vers l'extérieur, comme autant de pétales, qui attirent les insectes pollinisateurs. Les corolles sont entourées à la base de bractées. Le calice (ou Pappus) de chacune des fleurs du capitule est formé d'écailles ou de longs poils favorisant la dispersion des graines. Chez le pissenlit, le Pappus se compose de fines aigrettes qui permettent au fruit de flotter dans la brise (*J L Guignard, 1994; H Gaussen et F Leroy, 1882; Frère Marie-Victorin, 1885-1944*).



Les pétales des capitules sont soudés à la base en une corolle tubulaire. Les anthères se rejoignent pour former un tube que traverse le style (partie médiane du pistil entre l'ovaire et le stigmate). Les anthères déversent le pollen dans le tube et le style s'allonge pour pousser le pollen hors du tube pollinique et le rendre accessible aux insectes pollinisateurs ou faciliter sa dispersion par le vent. Le stigmate (partie supérieure du pistil recevant le pollen) se rétracte après l'allongement du style pour éviter l'autopollinisation, ce qui arrive parfois lorsque le stigmate s'incurve dans le tube pollinique. Après la fécondation, le pistil portant l'ovaire de la fleur et d'autres éléments floraux se développe pour constituer un fruit à enveloppe dure et à graine unique (*J L Guignard, 1994; H Gaussen et F Leroy, 1882; Frère Marie-Victorin, 1885-1944*).

### **I-1-3- Utilisation**

Cette vaste famille est économiquement importante, elle fournit des plantes alimentaires: La laitue est la plante la plus cultivée de la famille, suivie de l'artichaut, de l'endive, du salsifis, de la chicorée, de l'estragon et du tournesol. De nombreuses autres espèces ont une utilisation ornementale, telle que la marguerite, le dahlia, le zinnia, le cosmos, le chrysanthème et l'aster. Plusieurs espèces sont utilisées en pharmacie: l'Arnica (*Arnica montana* L.), la camomille (*Matricaria chamomilla* L et *Anthemis nobilis* L), le pied de chat (*Antenaria Dioca* Gartn), le tussilage (*Tussilago farfara* L) (*H Gaussen et F Leroy, 1882*).

La famille des Astéracées est anciennement connue pour ses propriétés médicinales et pharmacologiques et utilisée comme remède en médecine traditionnelle. Pour toutes ces raisons, nous nous sommes intéressées au genre *Rantherium*.

## **I-2- Le genre *Rantherium***

### **I-2-1- Introduction**

Le genre *Rantherium* appartient à la famille des Astéracées, sous famille tubuliflore et la tribu Inulée. Ce genre est endémique à l'Afrique du Nord et la péninsule arabe compte seulement sept espèces (*P Quezel et S Santa, 1963; P Ozenda, 1983*):

- ✓ *Rhanterium adpressum* Coss. & Durieu.
- ✓ *Rhanterium epapposum* Oliver
- ✓ *Rhanterium apressum*
- ✓ *Rhanterium. suaveolens* Desf.
- ✓ *Rhanterium. intermedium* Coss. & Durieu ex Pomel
- ✓ *Rhanterium. incrassatum*,
- ✓ *Rhanterium. Squarrosum*

### I-2-2- Description botanique du genre

Ce sont des plantes à capitules hétérogames, multifides, radiées. Fleurs jaunes, les marginales ligulées à ligules unisériées, femelles et 3-dentées ; les centrales tubuleuses et hermaphrodites. Involucre campanulées, à bractées imbriquées sur plusieurs rangs, coriaces, lancéolées, surmontées d'un appendice étalé, arqué en dehors, subulé, triquètre, corné, spinescent. Réceptacle plant, muni de paillettes linéaires-lancéolées, membraneuses sur les bords. Calathide composée au centre de fleurs nombreuses, régulières, hermaphrodites; et à la circonférence de fleurs en languettes et femelles. L'ovaire des fleurs centrale et oblong, glabre, muni à la base d'un petit bourrelet, surmonté d'une aigrette formée de cinq paillettes filiformes, presque soudées par la base et légèrement plumeuses à leur sommet. Les corolles sont glabres, à cinq divisions très aigues ; les anthères sont munies à leur sommet d'appendices très aigus.

Dans les fleurs de la circonférence, l'ovaire est presque entièrement enveloppé par chacune des folioles intérieures de l'involucre ; l'aigrette est nulle ou réduite à une seule paillette rudimentaire et latérale; les corolles sont en languettes oblongues élargies et tridentées au sommet (*P Quezel et S Santa, 1963*).

### I-2-3- Distribution géographique

Ce genre est distribué exactement au nord-ouest de l'Afrique (Algérie et Tunisie) et on peut le trouver aussi en Iraq, Iran, Arabie Saoudite, Koweït et Emirats Arabes Unis (*P Quezel et S Santa, 1963; P Ozenda, 1983; P Vincent, 2008; O Benaïssa, 2011*).

Il y a peu d'études phytochimique sur ce genre. C'est ce qui nous a encouragé à étudier l'espèce : *Rhanterium adpressum* Coss & Durieu communément appelée « Arfedj » (A *Chehna, 2006*).

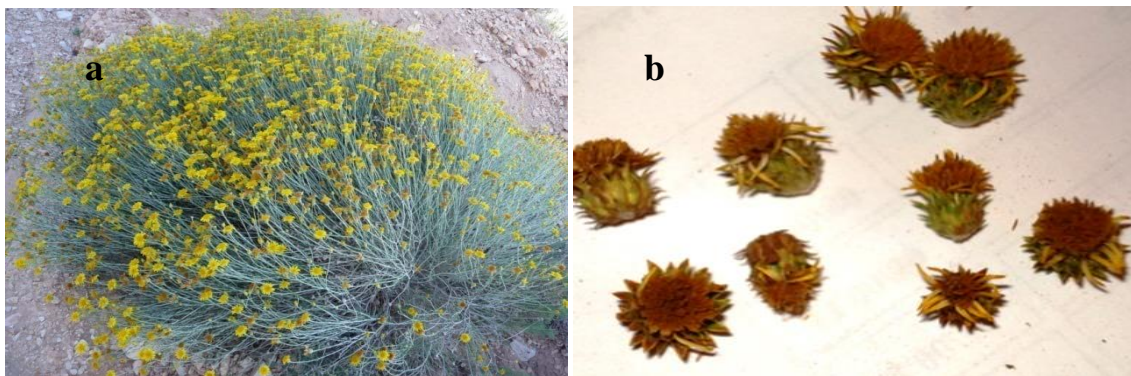
## Partie expérimentale et résultats

### II-1- *Rhanterium adpressum*

Le *Rhanterium adpressum* est très apprécié par les dromadaires. Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle dans la région du Sud de l'Algérie pour ses propriétés antidiurétiques (*M Bouheroum et al, 2007*), elle est aussi utilisée par les populations de cette région notamment pour le tannage. En plus, la population Iranienne l'utilise pour son effet rafraîchissant de la peau (*M S Yaghmai et S Kolbadipour, 1987*).

#### II-1-2- Description botanique

C'est un arbrisseau très ramifié (**Figure I.1. a**). Les fleurs, pouvant atteindre 20 à 60 cm de hauteur à tiges et feuilles revêtues de poils blanchâtres ; les feuilles sont de couleur vert pale, petites légèrement dentées très caduques appliquées, à capitule de 7 mm de diamètre, et réceptacle présentant des paillettes seulement sur le pourtour (*P Quezl et S Santa, 1963*). Les fleurs sont jaunes et marginales ligulées (**Figure I.1. b**).



**Figure I.1** : Photos illustrant la plante de *Rhanterium adpressum*

**a.** Le pied de *Rhanterium*; **b.** Les fleurs.

#### II-1-3- Systématique

La systématique de l'espèce *Rhanterium adpressum* a été établie selon *Ozenda (1983)* (Tableau I.1).

**Tableau I.1:** La systématique de l'espèce *Rhanterium adpressum* Coss. & Durieu

<b>Règne</b>	<i>Plantae</i>
<b>Embranchement</b>	<i>Spermaphytes</i> (plante à graines)
<b>Sous embranchement</b>	<i>Angiospermes</i> (plante à fleurs)
<b>Classe</b>	<i>Magnolipsida</i> (Dicotylédones)
<b>Sous classe</b>	<i>Magnoliidae</i>
<b>Super ordre</b>	<i>Asterids</i>
<b>Ordre</b>	<i>asterales</i>
<b>Sous ordre</b>	<i>Euasterids II</i>
<b>Famille</b>	<i>Asteraceae (Compositae)</i>
<b>Genre</b>	<i>Rhanterium</i>
<b>Espèce</b>	<i>Rhanterium adpressum</i> Coss. & Durieu
<b>Nom commun : Arfedj</b>	

#### II-1-4- Collecte de la plante

Le *Rhanterium adpressum* a été collecté dans la localité de Zelfana (670 Km sud d'Alger) (Figure I.2). La situation géographique et l'étage bioclimatique de la région de collecte sont consignés dans le (Tableau I.2) par contre l'année et le moi de collecte des échantillons utilisés pour l'étude des différents métabolites (lipides, huiles essentielles et composés phénoliques) sont présentés dans le Tableau I.3.



Figure I.2: Carte géographique représentant la zone de collecte des fleurs de *Rhanterium adpressum*

**Tableau I.2:** La situation géographique et l'étage bioclimatique de la région de collecte.

<i>Région</i>	<i>Altitude</i>	<i>Latitude</i>	<i>Longitude</i>	<i>Étage bioclimatique</i>
<i>Zelfana</i>	<i>354 m</i>	<i>32°23'46" N</i>	<i>5°13'34" E</i>	<i>Chaud et aride</i>

**Tableau I.3:** L'année et le mois de collecte des échantillons.

<i>Année</i>	<i>Moi</i>	<i>Echantillons</i>	<i>Travail réalisé</i>
<i>2010</i>	<i>Mars</i>	<i>Fleurs (F1)</i>	<i>Lipides</i>
<i>2010</i>	<i>Mai</i>	<i>Fleurs (F2)</i>	<i>Lipides</i>
<i>2008</i>	<i>Mai</i>	<i>Fleurs (F1)</i>	<i>Huiles essentielles</i>
<i>2008</i>	<i>Mai</i>	<i>Fleurs (F2)</i>	<i>Huiles essentielles</i>
<i>2010</i>	<i>Mai</i>	<i>Fleurs</i>	<i>Composés phénoliques</i>

Tous ces échantillons ont été déposés au niveau du laboratoire de recherche des sciences fondamentales à l'Université Amar Téliidji de Laghouat.

## *CHAPITRE -II-*

*Compositions en acides gras, teneurs  
en phénols totaux et stéroïls des fleurs  
de *Rhazaria adpressum**



## Aperçu bibliographique

### II-1- Les lipides

#### II-1-1- Définition

Alors que la plupart des familles de molécules de base du monde vivant sont définies par leurs structures chimiques, les lipides (du grec *lipos*: graisse) sont caractérisés par une propriété physique: la solubilité. Ce sont des composés à solubilité nulle ou faible dans l'eau mais par contre élevée dans les solvants organiques apolaires (chloroforme, hexane, éther diéthylique, cyclohexane, acétone, ...) (*W G Hopkins, 2003*). Les termes d'huiles, beurres, graisses et cires ne désignent que leurs états physiques solides ou liquides à la température ambiante.

Un lipide est une molécule:

- Soit complètement apolaire (lipides neutres)
- Soit bipolaire, avec une tête polaire liée à une chaîne fortement polaire (queue).

#### II-1-2- Rôle biologique des lipides

Dans l'organisme, les lipides ont quatre fonctions principales :

- les lipides entrent dans la composition des membranes cellulaires (les membranes qui entourent les cellules). Les acides gras essentiels sont des constituants des membranes cellulaires notamment au niveau des neurones (*A Yvon, 1996*).
- Les lipides sont stockés dans les cellules graisseuses (adipocytes) où ils forment une réserve d'énergie (*M Lagarde, 2003; D Chos, 2005*).
- Les lipides servent à transporter des vitamines (liposolubles) et jouent un rôle essentiel dans plusieurs fonctions vitales (reproduction, immunité, coagulation, inflammation, vision...).

- Les acides gras sont les précurseurs de plusieurs messagers intra et extracellulaires. Par exemple, l'acide arachidonique est le précurseur des eicosanoïdes, hormones intervenant dans l'inflammation, la coagulation sanguine (*A Yvon, 1996*).

### **II-1-3- Classification des lipides**

#### **II-1-3-1- Les Lipides vrais**

Ils résultent de la condensation d'acides gras avec des alcools par une liaison ester ou amide, et nous les subdivisons en (*C Brigitte et al, 2008*):

1- Lipides simples ou homolipides qui sont neutres comme les:

- glycolipides: l'alcool est le glycérol
- cérides: les alcools sont à longue chaîne (gras)
- stérides: l'alcool est un stérol (polycyclique)

2- Lipides complexes qui contiennent en plus des précédents du phosphore, de l'azote et du soufre.

#### **II-1-3-2- Composés à caractère lipidique (Lipoïdes)**

- Isoprénoïdes, dérivés d'unités isoprène: nous trouvons aussi le groupe des composés terpéniques et les dérivés du stéroïdes (*C Brigitte et al, 2008*).

- Eicosanoïdes: des médiateurs chimiques dérivés d'un acide gras à 20 atomes de carbone (*C Brigitte et al, 2008*).

## II-2- Composition des lipides

### II-2-1- Constituants majeurs

#### II-2-1-1- Acides gras

Les acides gras peuvent exister à l'état libre dans la nature. Ce sont des composés organiques à base de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Ils sont formés d'une chaîne hydrocarbonée plus ou moins longue et d'un groupe carboxyle.

La chaîne aliphatique hydrocarbonée peut être saturée ou peut présenter une ou plusieurs doubles liaisons. Ces acides gras, généralement non ramifiés, se différencient donc par la longueur de la chaîne aliphatique, le nombre et la localisation des doubles liaisons éventuelles. On observe une prédominance très marquée des acides de 16 à 18 atomes de carbone dans le règne végétal. La double liaison, lorsqu'elle existe, est plus généralement de configuration *cis*. La plupart des organismes vivants sont capables de synthétiser des AG mono-insaturés par désaturation des AG saturés correspondants (*J L Guingnard, 1985*).

Les acides gras les plus généralement rencontrés sont :

- En série saturée, l'acide palmitique (C16 :0) et l'acide stéarique (C18 :0) sont les plus fréquents dans les huiles végétales, alors que les acides lauriques (C12 :0), myristiques (C14 :0) et arachidiques (C20 :0) ne sont rencontrés généralement qu'à l'état de trace.
- En série moninsaturée, l'acide oléique (C18 :1) est l'acide gras le plus répandu dans la nature ; on le trouve dans tous les lipides végétaux.
- En série polyinsaturée, il faut citer l'acide linoléique (C18 :2), l'acide arachidonique (C20 :1), et l'acide linoléique (C18 :3).

L'acide linoléique et l'acide oléique sont les constituants les plus rencontrés dans les huiles végétales. Les AG poly-insaturés sont intéressants sur le plan nutritionnel. Certains d'entre eux jouent un rôle vital dans la cellule, d'où leur dénomination d'acides gras essentiels (AGE) : il s'agit des acides: linoléique (série n-6) et  $\alpha$ -linoléique (série n-3) et arachidonique et de leurs dérivés supérieurs. Ces AGE doivent être apportés par l'alimentation car ils ne sont pas synthétisés par l'organisme humain, jouant un rôle fondamental dans la biosynthèse des

prostaglandines ; un manque de ces acides gras essentiels chez les jeunes entraîne un retard de croissance et des troubles cutanés. L'acide linoléique est le précurseur des thromboxanes, des prostacyclines, des leucotriènes et des prostaglandines qui ont un rôle préventif vis-à-vis des troubles du métabolisme et des maladies cardiovasculaires, ainsi qu'une action sur la structure des membranes biologiques et de certaines de leurs fonctions (*J P Helme et al, 1984*). Ceci explique l'intérêt croissant des AGE en cosmétologie et en agroalimentaire.

➤ **Analyse des acides gras**

Les acides gras étant les constituants essentiels des triglycérides, c'est par leur connaissance que l'analyste peut déterminer les caractéristiques de l'identité des corps gras selon :

- ❖ la présence ou non de certains acides gras.
- ❖ les proportions des acides gras entre eux.

Les acides gras peuvent être analysés sous forme libre, mais généralement ils sont analysés qu'après leurs transformations en leurs esters méthyliques (EMAG), qui sont plus volatils (*S Cocallemen et al, 1988*).

Les méthodes d'estérification sont nombreuses. Le choix s'effectuera en fonction des acides gras à analyser : présence d'acides gras libres, d'acides gras à chaîne courte et acides gras à fonction alcools ou acides.

La plupart des méthodes d'estérification se réalisent en présence d'un excès d'alcool. Il est possible d'utiliser l'alcool méthylique, éthylique, propylique ou isopropylique (l'alcool le plus généralement utilisé étant le méthanol, on parle des esters méthyliques d'acides gras (EMAG)).

➤ **Préparation des esters méthyliques**

Les techniques de préparation des esters méthyliques sont relativement nombreuses (*M Olle, 1996*).

- Méthode au triméthyl hydroxy sulfonium TMSH S (CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup><sub>3</sub>OH<sup>-</sup>

En présence de TMSH, les triglycérides sont estérifiés au moment où ils pénètrent dans l'injecteur du système chromatographique (250°C).

- Méthode générale au tri fluorure de bore  $\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$

Le corps gras en premier temps est saponifié en présence de potasse alcoolique, l'estérification et ensuite réalisée en présence de  $\text{BF}_3$  méthanolique (A *Kuksis, 1978 et C Paquot et al, 1987*). Après l'addition de l'eau, les esters sont récupérés à l'aide d'un solvant organique comme l'hexane ou le chloroforme.

- Estérification en milieu acide

Il est possible d'obtenir des esters en milieu  $\text{H}_2\text{SO}_4$ /alcool, en ampoule scellée à chaud (bain marie).

- Méthode applicable aux corps gras neutres (ou ayant une faible acidité)

La réaction s'effectue à chaud en présence de potasse méthanolique environ 1N les esters étant récupérés par un solvant (pentane, hexane) après addition de l'eau.

- Méthode à froid (corps gras à chaîne courte)

Dans le cas des corps gras possédant des chaînes courtes (acide butyrique), il est nécessaire de l'opérer à froid, dans un tube ou ampoule fermée. On solubilise les triglycérides dans le pentane puis on les estérifie par la potasse méthanolique environ 2N par agitation.

### II-2-1-2- Triglycérides

Les triglycérides (TG), appelés aussi "graisses neutres", sont les constituants les plus abondants d'une huile végétale. Ce sont des triesters du glycérol avec trois molécules d'acide gras. Selon l'identité des trois acides gras qui estérifient le glycérol, on obtient différents types de TG :

- les triglycérides simples, où les fonctions alcools du glycérol sont estérifiées par des AG identiques.
- les triglycérides mixtes, où les fonctions alcools du glycérol sont estérifiées par deux ou trois AG différents.

Les multiples combinaisons avec les molécules de glycérol font que les corps gras sont des mélanges très complexes. La manière dont les acides gras sont associés pour former les diverses molécules de triglycérides joue un grand rôle quant aux propriétés physiques, à la réactivité chimique et aux comportements physiologiques des corps gras.

La détermination de la structure glycéridique d'un corps gras, en prenant en compte la nature et les proportions de chacun des isomères, nécessite l'identification et la qualification des différents types de glycérides présents. L'isolement de ces derniers les uns des autres permet de préciser la nature et la proportion de chacun des acides gras occupant chacune des trois positions du glycérol et d'en déduire quels isomères sont présents et quelle est la proportion de chacun eux.

### ➤ Méthodes d'analyse des triglycérides

En pratique, il n'existe pas une méthode parfaite pour déterminer la composition glycéridique exacte d'une matière grasse, cela peut être réalisé tout en combinant plusieurs méthodes d'analyse.

La majorité des méthodes utilisées pour identifier les TG sont des techniques chromatographiques :

- la chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur colonne capillaire: dans ce cas, la séparation se fait en fonction du nombre total d'atomes de carbone (*A Monseigny et al, 1979*).
- la chromatographie sur couche mince (CCM) de silice imprégnée d'une solution de nitrate d'argent : le fractionnement se fait en fonction du degré d'insaturation des différents TAG (*R Hamilton et al, 1986*), des TG, ayant le même nombre d'insaturation mais des différentes condensations en carbone, ont le même facteur de rétention  $R_f$ .
- la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) utilisant une colonne en phase inverse de type RP18 : la séparation a lieu en fonction du nombre d'atomes de carbone et du nombre d'insaturation (*J Goiffon et al, 1981*).

## II-2-2- Constituants mineurs

Ce sont des composés importants par le rôle qu'ils jouent dans le métabolisme et la structure cellulaire. Ils sont très répandus dans le règne animal.

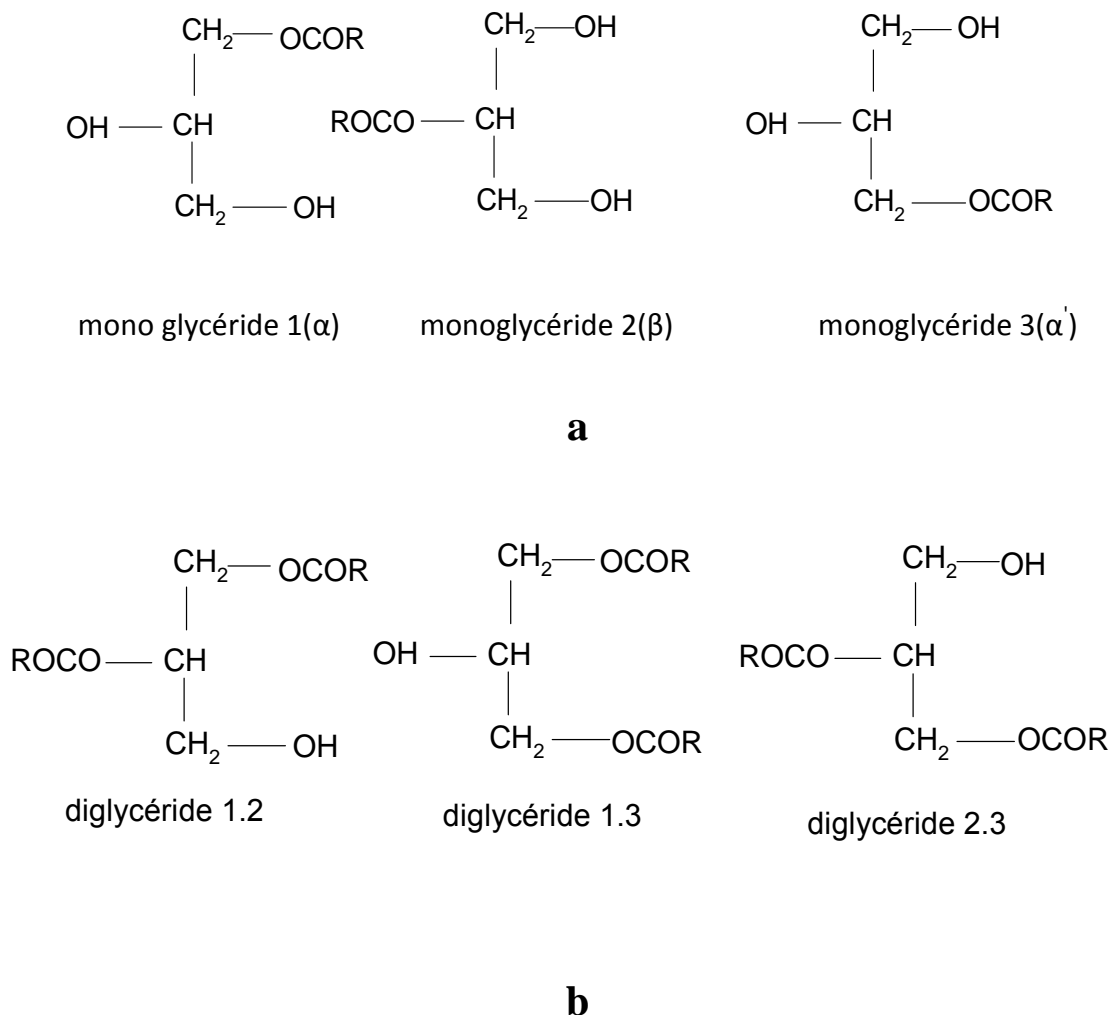
### II-2-2-1- Phospholipides

Ce sont des esters de glycérol dont une fonction alcool est naturellement estérifiée par une molécule d'acide phosphorique, elle-même associée à une amine ou un sucre (inositol).

On parle ainsi de phosphatidylsérine (acide phosphorique + sérine), phosphatidylcholine ou lécithine (acide phosphorique + choline), phosphatidylinositol (acide phosphorique + inositol) et phosphatidyléthanolamine (acide phosphorique + éthanolamine). Ces molécules sont dites amphiphiles car elles possèdent un pôle hydrophile et un pôle lipophile. Elles ont donc des propriétés émulsifiantes (A Karleskind, 1992).

### II-2-2-2- Monoglycérides et diglycérides ou glycérides partiels

Ces molécules sont des mono ou diesters de glycérol et d'acides gras provenant de l'hydrolyse partielle des triglycérides; leur(s) fonction(s) alcool libre(s) leur confère(nt) une certaine hydrophilie et des propriétés émulsifiantes (A Karleskind, 1992).



**Figure II.1:** Structure des: a- Monoglycérides, b- Diglycérides.

### II-2-2-3- Insaponifiables

L'insaponifiable est constitué de composés qui après action d'un hydroxyde alcalin (saponification), sont solubles dans des solvants traditionnels des corps gras (cyclohexane, éther éthylique, acétone...). Contrairement aux graisses animales, le taux de l'insaponifiable des huiles végétales est relativement faible (0,2 à 4,0 % m/m) (*E Ucciani, 1995 et A Karleskind, 1992*), à l'exception du beurre de karité qui présente une teneur en insaponifiable d'environ 10 % (*A Karleskind, 1992*).

- **Stérols**

Les stérols sont universellement répandus chez les êtres vivants, aussi bien dans le règne animal que dans le règne végétal. On les trouve également chez les micro-organismes.

La plupart des organismes ont besoin de stérols, qui ont un rôle architectural et interviennent comme une partie intégrante des membranes cellulaires.

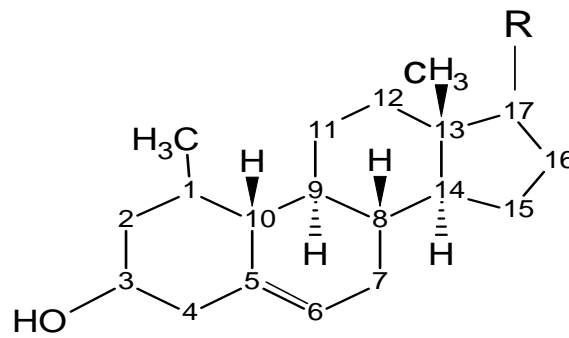
Les animaux sont capables de synthétiser certains stérols (le cholestérol étant l'exemple le plus répandu). D'autres peuvent être contenu dans l'alimentation. En effet, chez les végétaux, les structures stéroliques sont beaucoup plus nombreuses, certaines semblent d'ailleurs les caractéristiques d'une famille. Ainsi, les stérols ont un rôle chimiotaxonomique beaucoup plus fin que d'autres composés lipidiques comme les acides gras.

Les phytostérols sont présents dans la fraction lipidique. Dans les huiles de graines ou de fruits, ils sont généralement présents en faibles teneurs. Ils peuvent être rencontrés sous forme libre ou combinée, dont la principale est l'estérification par un corps gras.

Les stérols sont des alcools polycycliques à point de fusion élevés. Ils sont stables, sans odeur et sans goût (*A.J.C, 1962*). Ils sont relativement inertes et contribuent peu aux propriétés des huiles bien qu'ils les caractérisent mieux que ne le font les acides gras.

Les stérols sont des composés tétracycliques. Ils comportent le plus souvent 27, 28 ou 29 atomes de carbone. Le squelette de base est le noyau cyclopentanophénanthrène représenté sur la Figure II.2.



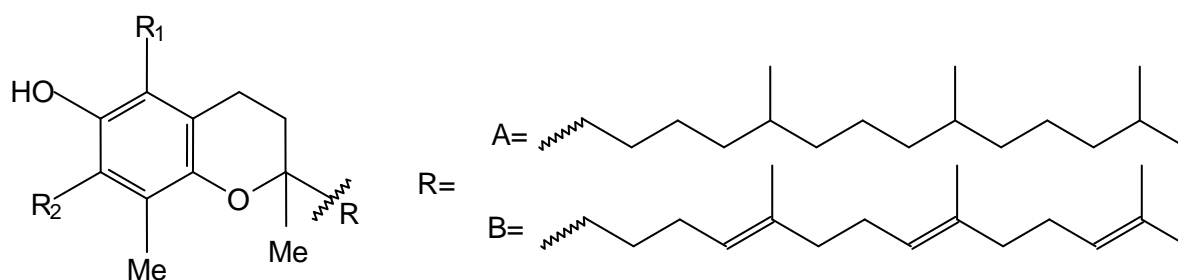


**Figure II.2:** Structure de base des stérols

Le stérol le plus abondant dans le règne végétal est sans conteste le sitostérol suivi du campestérol, puis du stigmastérol et enfin le  $\Delta_5$ -avénastérol. Le brassicastérol est présent uniquement chez les *Brassicaceae*. On rencontre certaines familles chez les  $\Delta_7$ -stérols où ceux-ci sont prépondérants. C'est le cas entre autres des familles botaniques des *Sapotacea* (*M Farines et al, 1984*). Le cholestérol, longtemps considéré comme exclusivement animal, a été mis en évidence chez de nombreux végétaux (*MF Hugel et al, 1964; M Noda et al, 1988*), cependant en petite quantité par rapport aux autres stérols. Le 22-déhydrocholestérol, le démostérol, le 24-méthylène cholestérol et notamment le fucostérol sont caractéristiques des algues marines. Le  $\Delta_7$ -chlostérol, le zymostérol, le fécostérol et l'ergostérol sont plus fréquemment rencontrés chez les champignons (*D Kritchevsky, 1963*).

- **Tocophérols**

Les tocophérols constituent une fraction mineure de l'insaponifiable des corps gras. Ce sont des composés phénoliques possédant un noyau chromane portant en carbone 2 une chaîne latérale tri-isopropénique saturée dans le cas des tocophérols et tri-insaturée dans le cas des tocotriénols. La substitution du noyau aromatique par des groupements méthyles conduit aux huit combinaisons naturelles données dans la Figure II.3.



		Composés	
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	A	B
Me	Me	α-tocophérol	α-tocotriénol
H	Me	β-tocophérol	β- tocotriénol
Me	H	γ-tocophérol	γ- tocotriénol
H	H	δ-tocophérol	δ- tocotriénol

**Figure II.3:** Structure des différents tocophérols et tocotriénols

Les tocophérols sont généralement des constituants mineurs des corps gras végétaux ; leur présence a été déterminée pour la première fois par EVANS dans l'huile de germe de blé. Ils possèdent un pouvoir vitaminique (vitamine E) lié aux propriétés antioxydantes. Ils existent principalement sous forme monomère (*F Mordret, 1992*). Ces composés sont classés dans le groupe des vitamines liposolubles (vitamine E de fertilité). Bien que leurs structures diffèrent peu, leurs effets sont très variables (*S Veillet, 2010*).

En effet, la forme α présente l'activité vitaminique la plus importante, tandis que l'isomère γ est plus efficace comme antioxydant. Cet isomère γ économise l'oxygène de la respiration cellulaire, protège les substances oxydables. De plus, il intervient dans le métabolisme des graisses en empêchant la dégradation des acides gras (*F Mordret, 1992; P Capella, 1960*).

La recherche médicale a démontré les effets bénéfiques de la vitamine E, entre autres dans le retard de l'évolution de l'infection par le virus HIV en SIDA clinique et dans la réduction des symptômes qui y sont associés. Des études cliniques sont requises pour illustrer les effets bénéfiques potentiels de ces nutriments dans la prolongation de la période asymptomatique de

l'infection par le virus en HIV en combinaison avec un traitement par un médicament antiviral chez les patients souffrants du SIDA (*H Veris, 1995*).

## Partie expérimentale et résultats

### II-1- Extraction des lipides

Les fleurs de *Rhanterium adpressum* sont avant tout séchées pendant 72 heures puis broyées en poudre. Les lipides sont obtenus par macération à température ambiante par l'hexane pendant 24 heures. Après filtration et séchage par du sulfate de sodium anhydre et évaporation du solvant sous pression réduite à 40°C, nous obtenons un extrait lipidique brute (huile). Nous avons déterminé la teneur en lipides ainsi le pourcentage en matière insaponifiable.

Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau II.1.

**Tableau II.1:** Rendement en lipides et pourcentage en insaponifiable des fleurs de *Rhanterium adpressum*

	Lipides %	insaponifiable % de la fraction lipidique
<b>Mars</b>	0.70	58.40
<b>Mai</b>	2.16	50.65

D'après les résultats consignés ci-dessus, il est clair que les fleurs de l'astéracées *Rhanterium adpressum* ne présentent une source en lipides qui est exprimée par les valeurs : 0.70% pour le mois de mars contre 2.16% pour celui de mai, Par contre, l'augmentation de ce rendement pourrait être expliquée par le changement climatique et la hausse du mercure pour cette zone qui se caractérise par un climat aride.

Les valeurs du pourcentage en fraction insaponifiable dans les extraits lipidiques sont de 58.40% pour les fleurs collectées dans le mois de mars et 50.65% pour celle du mois de mai correspondant à un lipide riche en insaponifiables et qui lui confèrent des propriétés d'un lipide de type non alimentaire en admettant que ce pourcentage ne dépasse pas la valeur de 4% dans les huiles alimentaires du règne végétal (*E Ucciani, 1995; A Karleskind, 1992*) à

titre d'exemple: l'huile d'olive avec un pourcentage en insaponifiable de 0,4 à 0,8%, l'huile de tournesol de 0,5 à 1,5% (A *Karleskind, 1992*) et l'huile de fruits d'argan avec 1.17% (*M Yousfi et al, 2009*).

Comme la fraction insaponifiable dans les lipides renferme des molécules bioactives comme les tocophérols, les carotènes, les phytostéroïdes (antioxydants) et autres, on peut donc dire que l'extrait lipidique des fleurs du *Rhanterium adpressum* peut être utilisé à des usages thérapeutiques.

Selon la littérature, aucun travail n'a été entrepris sur les lipides des fleurs de *Rhanterium adpressum* ce qui ne nous a pas permis de faire une comparaison à tous nos résultats.

## II-2- Analyse des acides gras

### II-2-1- Préparation des esters méthyliques d'acides gras (EMAG) des lipides des fleurs de *Rhanterium adpressum*

La détermination de la composition en acides gras selon la méthode générale au trifluorure de bore méthanolique  $\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ , consiste dans un premier temps à saponifier la matière grasse en présence de potasse éthanolique. L'estérification est ensuite réalisée en présence de  $\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ . Après addition d'eau, les esters sont récupérés à l'aide d'un solvant comme de l'hexane ou du chloroforme.

#### II-2-1-1- Mode opératoire

##### ▪ La saponification

Dans un ballon, on introduit 0.5g d'extrait lipidique, on ajoute 10ml de solution éthanolique de potasse (0.5M), celui-ci est adapté au réfrigérant, et porté à reflux pendant 15 à 20 minutes.

##### ▪ L'estérification

L'estérification est réalisée en ajoutant 5ml d'une solution méthanolique à 10% de  $\text{BF}_3$ . Le mélange est maintenu encore à reflux pendant 10 minutes. Après refroidissement, on ajoute 20ml d'eau distillée. Les esters éthyliques sont récupérés par une extraction liquide-liquide en

utilisant l'hexane. La phase organique est lavée plusieurs fois par de l'eau jusqu'à la neutralisation. Après séchage sur sulfate de sodium anhydre, le solvant est filtré puis évaporé sous pression réduite. Les EMAG ainsi obtenus sont repris dans quelques gouttes d'éthyle éther, après évaporation de ce dernier ils sont conservés au frais jusqu'à leur analyse.

## **II-2-2- Analyse des esters méthyliques d'acides gras**

### **II-2-2-1- Conditions d'analyses**

Les EMAG des échantillons du mois de mars et celui de mai sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG), puis par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM).

#### **a- Analyses chromatographiques CPG**

Appareil: CP- Chrompack 9002

Colonne :DB-23

- Longueur de la colonne : 30 m
- Diamètre intérieur de la colonne : 0,32 mm
- Épaisseur de la phase : 0,25  $\mu\text{m}$

Programmation de température : 150°C (4°C/min), puis à 220°C (15 min)

Gaz vecteur : Hélium (He)

Débit du gaz vecteur : 1 mL/min

Détecteur: Ionisation à flamme (FID)

Température de l'injecteur : 250°C

Température du détecteur : 250°C

Volume injecté : 0,2  $\mu\text{L}$  avec un rapport de dilution de 1:20 v/v dans le dichlorométhane.

**b- Analyses spectrales CG-SM**

Appareil: chromatographe AGILENT 6890 GC couplé avec un spectromètre de masse CMSD

Colonne : HP5MS

– Longueur de la colonne : 60 m

– Diamètre intérieur de la colonne : 0,25 mm

– Épaisseur de la phase : 0,2 µm

Programation de température : Isotherme à 120°C (2 min) puis de 120 à 160°C (3°C/min), isotherme pendant 20 min et finalement de 160 à 180°C (1°C/min), isotherme pendant 1 min.

Gaz vecteur : Hélium (He)

Débit du gaz vecteur : 1 mL/min

Détecteur: Impact électronique Electron Ionisation (EI)

Voltage EI : 70 eV

Température de l'injecteur : 250°C

Température du détecteur SM : 220°C

Volume injecté : 0.2 µL avec un rapport de dilution de 1:20 v/v dans le dichloroéthane.

**II-2-2-2- Résultats**

A partir des deux chromatogrammes des EMAG (**annexe**), nous avons dressé le Tableau II.2 qui indique les proportions relatives aux deux esters méthyliques d'acide gras.

**Tableau II.2:** Composition relative en acide gras des lipides des fleurs de *Rhanterium adpressum*

Acides gras		Huile (mars)	Huile (mai)
Caproïque	C6:0	0.05	0.19
Caprylique	C8:0	0.07	0.4
Caprique	C10:0	0.09	0.36
Undécylique	C11:0	0.2	1.21
Laurique	C12:0	0.75	1.74
Tridécanoïque	C13:0	-	0.48
Myristique	C14:0	5.17	3.58
Pentadécanoïque	C15:0	0.35	0.68
Palmétique	C16:0	25.5	51.22
Palmétiolique	C16:1	1.72	0.3
Margarique	C17:0	0.67	1.48
Margaroléique	C17:1	0.13	0.44
Stéarique	C18:0	5.26	11.69
Oléique	C18:1	17.5	12.69
Linoléique	C18:2	35.01	1.22
Linoléinique	C18:3	3.25	0.18
Arachidiques	C20:0	1.02	3.74
Gadoléique	C20:1	0.5	1.2
Arachidonique	C20:2	0.53	0.24
Béhenique	C22:0	1.46	4.36
Erucique	C22:1	-	0.22
Tricosanoïque	C23:0	0.33	0.64
Lignocérique	C24:0	0.82	1.74
<b>Total AGS (%)</b>		<b>41.36</b>	<b>83.51</b>
<b>Total AGMI (%)</b>		<b>19.85</b>	<b>14.85</b>
<b>Total AGPI (%)</b>		<b>38.79</b>	<b>1.64</b>
<b>Total AGI (%)</b>		<b>58.64</b>	<b>16.49</b>

A la lumière des résultats consignés dans le tableau ci-dessus, nous observons que les lipides des fleurs de *Rhanterium adpressum* du mois de mars et de mai contiennent des acides gras habituellement rencontrés dans les huiles végétales mais avec des proportions très variables.



Celle de mars est essentiellement constituée d'acides gras en C14, C16 et C18 saturés avec les pourcentages de 5,17%, 25,5% et 5,26% respectivement et en C18 mono et di-insaturés présentés par 17,5% pour l'acide oléique et 35,01% pour linoléique. Les acides gras insaturés représentent 58,64% des acides gras totaux. En revanche, la composition du lipide du mois de mai en acides gras se distingue de celle du mois de mars seulement par l'abondance relative aux différents acides gras, car on remarque une augmentation des proportions des acides gras palmitiques et stéariques (51,22% et 11,69%), et une diminution des pourcentages des acides gras oléiques et linoléiques (12,69% et 1,22%), ce qui est traduit par la forte teneur de ce lipide en acides gras saturés exprimé par 83,51% et parallèlement moins d'acides gras insaturés. Ces résultats présentent un avantage technologique à ce lipide qui devient peu susceptible de s'oxyder ou de se polymériser pendant la conservation, l'utilisation ou la transformation éventuelle.

Ces résultats nous ont permis de dire que le changement du mois de la récolte ou bien l'augmentation de la température fait diminuer la proportion des acides gras insaturés dans les lipides des fleurs du *Rhanterium adpressum* et augmenter celle des acides gras saturés.

## II-3- Etude des composés mineurs

### II-3-1- Dosage des tocophérols totaux

#### II-3-1-1- Principe

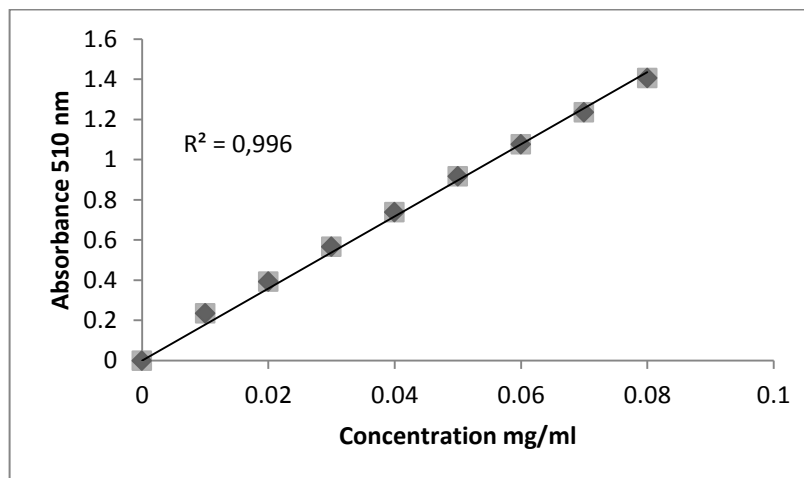
Nous avons adopté la méthode de dosage colorimétrique d'Emmerie-Engel (*A Emmerie et C Engel, 1939*) pour déterminer la quantité des tocophérols totaux dans les lipides des fleurs du *Rhanterium adpressum*. Cette méthode se base sur la réaction d'oxydoréduction entre les tocophérols (réducteurs) et le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) qui est réduit en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Ce dernier, en présence de réactifs spécifiques comme 1,10-orthophénantroline, forme un complexe rouge-orangé stable dont le coefficient d'extinction molaire à 510 nm est très élevé.

Ce dosage peut être réalisé soit à partir de l'insaponifiable (*C Paquot et al, 1962*) soit à partir de l'extrait brut (*M Flanzky et al, 1964*). Chacun de ces dosages a ses avantages et ses inconvénients. Lorsque l'on effectue l'analyse à partir de l'extrait brut on ne tient pas compte des composés tocophérols engagés dans des combinaisons de type esters. En effet, la réaction d'oxydo-réduction, conduisant à des composés de type quinonique, ne peut avoir

lieu. L'analyse effectuée ne tient compte que des tocophérols libres. Dans le cas du dosage à partir de l'insaponifiable, on dose les tocophérols totaux, initialement libres et estérifiés. Lors des différentes manipulations nécessaires, une dégradation partielle de ces composés peut avoir lieu, sauf cas particulier des huiles végétales pauvres en esters tocophéroliques.

### II-3-1-2- Courbe d'étalonnage

Une droite d'étalonnage est tracée à partir d' $\alpha$ -tocophérol commercial (vitamine E), permet de relier la densité optique et la concentration de tocophérol exprimée en mg/ml (Figure II.4). A partir d'une solution commerciale de la vitamine E, nous avons préparé dans l'éthanol des solutions ayant des concentrations bien déterminées, 1ml de chaque solution diluée plus 1ml de réactif (phénantroline) et 0,5ml FeCl<sub>3</sub> (solution étalonique). Après 3min, on mesure l'absorbance dans un spectrophotomètre UV Visible de type Shimadzu 1601 à 510 nm contre un blanc.



**Figure II.4:** Courbe d'étalonnage de la vitamine E

Nous avons effectué le dosage des tocophérols totaux à partir des extraits lipidiques des deux échantillons. Les échantillons sont traités de la même façon. Les résultats de ce dosage sont consignés ci-dessous (Tableau II.3) (Le test est effectué trois fois).

La concentration des tocophérols dans chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la vitamine E et exprimée en microgrammes équivalents de la vitamine E par gramme de matière sèche. ( $\mu\text{g/g MS}$ ).

**II-3-1-3- Résultats**

La teneur en tocophérols totaux varie d'un extrait à l'autre, elle présente une valeur de 0,54  $\mu\text{g/g}$  de matière sèche pour le mois de mai contre 0,14  $\mu\text{g/g}$  de matière sèche pour celui de mars, ce qui montre que la date de la récolte des fleurs de la plante influe sur la quantité des tocophérols totaux dans les extraits lipidiques des fleurs du *Rhanterium adpressum* et du moment que la teneur du mois de mai est quatre fois plus supérieure que celle présentée dans le mois de mars. Ainsi, ces teneurs peuvent conférer à ces huiles une résistance à l'oxydation et une action vitaminique.

**Tableau II.3:** Concentrations en tocophérols en équivalence de la vitamine E en  $\mu\text{g/g}$

	C ( $\mu\text{g/g}$ lipide)	C ( $\mu\text{g/g}$ MS)
Mars	20,26 $\pm$ 0,167	0,14 $\pm$ 0,001
Mai	25,03 $\pm$ 0,155	0,54 $\pm$ 0,003

**II-3-2- Dosage des stérols****II-3-2-1- Principe**

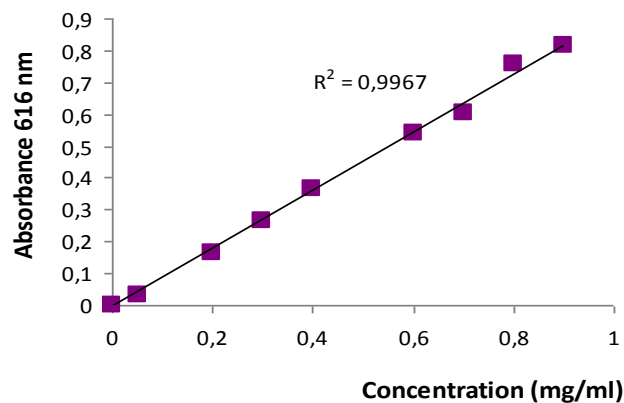
Il s'agit d'une absorption spectrophotométrique suivant le test de Liebermann-Burchard (*N Naudet et al, 1986; M Barreto, 2005*) basée sur une réaction colorée spécifique des 3  $\beta$ -hydroxystéroïdes possédant une double liaison en position 5-6. Les stérols forment un complexe stable avec l'anhydride acétique en milieu acide qui absorbe dans le visible à une longueur d'onde de 550 nm (Le réactif spectral de Liebermann est constitué par 60 ml d'anhydride acétique et 10 ml d'acide sulfurique concentré et 30 ml d'acide acétique).

**II-3-2-2- Courbe d'étalonnage**

A partir d'une solution chloroformique de cholestérol de concentration de 1mg/ml, nous avons préparé une série de gammes de solutions afin de tracer une courbe d'étalonnage liant la densité optique en fonction de la concentration. On prend 1ml de chaque solution à analyser

et on lui ajoute 2 ml du réactif de Liebermann puis on laisse la coloration se développer et se stabiliser pendant 25 minutes à l'obscurité.

La mesure de l'absorbance du milieu réactionnel est faite dans un spectrophotomètre UV Visible de type Shimadzu 1601 à 550 nm contre un blanc. Nous obtenons la courbe de la Figure II.5.



**Figure II.5:** Courbe d'étalonnage du cholestérol

Les échantillons sont traités de la même manière et la teneur en stérols totaux sera déterminée à partir de la courbe d'étalonnage. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le Tableau 4. La concentration des stérols dans chaque extrait est exprimée en microgrammes équivalents de cholestérol par gramme de la matière sèche ( $\mu\text{g/g MS}$ ) (Chaque test est effectué trois fois).

### II-3-2-3- Résultats

Les résultats de cette analyse montrent que les lipides étudiés contiennent des quantités importantes en stérols totaux, exprimés par  $0,69 \mu\text{g/g}$  de la matière sèche pour le mois de mars, contre  $2,34 \mu\text{g/g}$  de la matière sèche pour celui de mai. Il est clair que le mois de mai présente une valeur 3,4 fois supérieure que le mois de mars (Tableau II.4).

**Tableau II.4:** Concentrations en stérols en équivalence du cholestérol en µg/g

	C(µg/g Lipide)	C (µg/g MS)
Mars	98,16 ± 0.803	0,69 ± 0,006
Mai	108,20 ± 0,741	2.34 ± 0,016

#### II-4- Quantification des composés phénoliques

Pour effectuer le dosage des phénols totaux, nous avons adapté la méthode de Singleton et Ross utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu qui s'avère la plus sensible (*W Vermerris et R Nicholson, 2006*).

##### II-4-1- Principe

Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale des groupements hydroxyles présents dans un extrait en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

Le réactif de Folin-Ciocalteu formé d'hétéro-polyacides ; phosphomolybdiques et phosphotungstiques en milieu alcalin oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ces hétéropolyacides, d'où la formation d'un complexe molybdotungstique bleu, absorbant à une longueur d'ondes de 760 nm.

La teneur en composés phénoliques dans nos extraits est exprimée en mg d'équivalent acide gallique (EAG) par gramme de matière sèche.

##### II-4-2- Courbe d'étalonnage

À partir d'une solution mère d'acide gallique (étalon choisi), des solutions de différentes concentrations ont été préparées. 100 µl de chaque solution diluée ont été suivis par l'ajout de 500 µl du réactif de Folin- Ciocalteu dix fois dilué. Après deux minutes, 2 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium à 4% (m/v) sont ajoutés, les solutions ainsi obtenues ont été maintenues à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance de chaque solution préparée est mesurée par un spectrophotomètre UV Visible de type Shimadzu 1601, à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc.

Les teneurs en composés phénoliques totaux des différents extraits de la plante étudiée ont été calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage (Figure II.6) et sont exprimées en mg d'équivalent acide gallique (EAG) /gramme de matière sèche (Tableau II.5). Tous les essais ont été reproduits au moins trois fois.

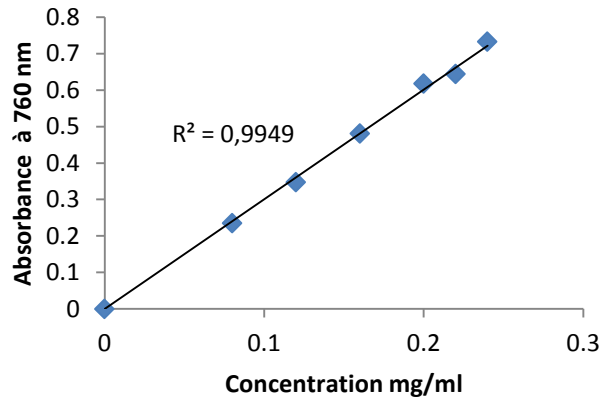


Figure II.6 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

### II-4-3- Résultats

L'ensemble de ces résultats indique clairement que la teneur en phénols totaux de l'extrait lipidiques des fleurs du mois de mai (141,2  $\mu\text{g}$  EAG/g MS) est deux fois plus élevée que celle du mois de mars (79,9  $\mu\text{g}$  EAG /g MS) (Tableau II.5). Cette différence est due probablement aux fortes teneurs en composés tocophéroliques présentent dans l'huile du mois de mai qui est d'une valeur de 0,541  $\mu\text{g}$  en équivalence de la vitamine E /g de la matière sèche contre 0,142  $\mu\text{g}$  en équivalence de la vitamine E /g de la matière sèche pour le mois de mars respectivement.

**Tableau II.5:** La teneur en phénols totaux des extraits lipidiques des fleurs de *Rhanterium adpressum*

	C ( $\mu\text{g EAG/g MS}$ )
Mars	79,9 $\pm$ 0,241
Mai	141,2 $\pm$ 0,30

On remarque que les quantités des phénols totaux sont toujours supérieures à celles des tocophérols totaux, ce qui prouve que les lipides des fleurs de *Rhanterium adpressum* ferment d'autres structures phénoliques montrées par la méthode de *Singleton et Rossi (1965)* utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu qui est une méthode globale comparée à la méthode d'Emmerie-Engel spécifique aux tocophérols.

## II-5- Conclusion

L'étude de la fraction lipidique des fleurs du *Rhanterium adpressum* collectées dans deux mois différents; mars et mai, nous a permis d'identifier les acides gras contenus, de quantifier les tocophérols, les stérols et de doser les phénols totaux dans cette fraction. Les résultats obtenus attirent l'attention et montre que la proportion des acides gras totaux insaturés diminue du mois de mars de 58,64% vers 16,49% pour le mois de mai. Cette diminution est bien observée si on s'intéresse aux acides gras individuels et notamment les acides C18 insaturés:

- La diminution de la proportion de l'acide linoléique de 3,25% en mois de mars à 0.18% en mois de mai.
- La diminution de la proportion de l'acide oléique de 17,5% en mars à 12.70% en mois de mai.
- De même pour l'acide linoléique de 35,01% pour le mois de mars à 1,22% pour le mois de mai.

En revanche, on remarque une augmentation de la proportion des acides gras totaux saturés de 41,36% dans le mois de mars à 83,51% dans le mois de mai. Les deux acides gras saturés concernés sont: l'acide palmitique dont sa proportion accroît de 25,5% en mois de mars à

51,22% pour le mois de mai et l'acide stéarique où son pourcentage augmente de 5,26% en mois de mars à 11,69% pour le mois de mai. Ces résultats nous ont permis de déduire que le pourcentage des acides gras totaux saturés accroît au détriment des acides gras totaux insaturés et que les acides gras totaux insaturés seront majoritaires dans le mois de mars qui est le mois de la floraison de la plante étudiée. Ces résultats obtenus sont en contradiction aux résultats déjà trouvés à travers des études réalisées au niveau de notre laboratoire où les auteurs ont aperçus que la proportion des acides gras totaux insaturés est toujours supérieures à celle des acides gras totaux saturés dans le mois de la maturité qui est le mois où la température est plus élevée dans l'année, à titre d'exemple: dans l'huile des fruits de l'arganier, la proportion des acides gras totaux insaturées est 78,18% contre 21,71% des acides gras saturés (*M Yousfi et al, 2009*), l'huile de fruits de *Tapsia garganica* avec 72,34% pour les acides gras insaturés et 27,65% pour la proportion des acides gras saturés (*H Nebeg, 2010*) et 73% et 27% pour les acides gras saturés et les acides gras insaturés respectivement pour l'huile du Pistachier de l'atlas (*M Yousfi et al,2003*). Nous pensons que la seule explication de cette contradiction est que la biosynthèse des acides gras dans les graines oléagineuses qui sont les ressources des corps gras est totalement différente à celle dans les fleurs des plantes.

D'autre part, les teneurs en tocophérols totaux, en stérols et en phénols totaux, sont plus importantes dans le mois de mai. Les résultats obtenus montrent que les teneurs des composées des métabolites secondaires varient au sens contraire aux proportions des acides gras totaux insaturés et dans le même sens que celles des acides gras totaux saturés ce qui n'est pas en accord avec d'autres études effectuées sur des lipides des graines oléagineuses où la teneur des composés des métabolites secondaires et notamment les tocophérols qui sont des antioxydants croît avec la proportion des acides gras totaux insaturés pour les protéger contre l'oxydation. Une étude plus profonde est nécessaire pour trouver des relations de corrélations entre la composition en acides gras individuels saturés et insaturés et la composition en tocophérols individuels pour une période étalée en quatre mois (mars, avril, mai et juin).



## *CHAPITRE -III-*

*Composition des huiles essentielles et  
teneurs des phénols totaux des fleurs  
de *Rhazenterium adpressum**

---

## ***Aperçu bibliographique***

---

### **III-1- Les huiles essentielles**

#### **III-1-1-Définitions et rôle écologique**

Les huiles essentielles appelées aussi huiles volatiles ou essences sont des mélanges complexes de substances odorantes et volatiles secrétées par des parties spécifiques de certains végétaux. Le terme «huile» souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances et le «essentielle» désigne la caractéristique principale de la plante à travers ses exhalaisons, auquel se joint le terme «volatil» qui accentue le sens de caractère odorant et qui oppose en même temps ces huiles aux huiles fixes (exemple: huile d'olive).

La norme AFNOR NF T 75-006 (*AFNOR, 1980*) définit l'huile essentielle comme: un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par procédés physiques.

Parmi les composantes majoritaires des huiles essentielles, nous trouvons les terpénoïdes qui possèdent un rôle écologique lors des interactions végétales, comme agents allélopathiques, c'est-à-dire inhibiteur de la germination, mais aussi lors des interactions végétal-animal, comme agent de protection contre les prédateurs tels que les insectes. Ils interviennent également, par leurs odeurs caractéristiques, dans l'attraction de pollinisateurs (*J H Langenheim, 1969*). Par ailleurs, les plantes aromatiques productrices d'huiles essentielles, ont fait l'objet de diverses recherches en particulier dans le domaine de la parfumerie.

#### **III-1-2- Répartition et localisation des huiles essentielles**

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Parmi les espèces végétales (800 000 à 1 500 000 selon les botanistes) 10 % seulement sont dites «aromatiques», c'est-à-dire qu'elles synthétisent et sécrètent des infimes quantités d'essence aromatique par l'intermédiaire de poils, poches ou canaux sécréteurs. Les genres capables d'élaborer les constituants des huiles essentielles sont répartis dans un nombre de familles

limité ; *Myrtaceae*, *Lauraceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Poaceae*, *Zingiberaceae*, *Piperaceae* ...(*N Gourine, 2010*).

Quantitativement, les teneurs en huiles essentielles sont plutôt faibles, assez souvent inférieures à 10ml/kg. Des teneurs fortes comme celles de Badiane qui peuvent être supérieures à 50 ml/Kg ; du bouton floral de giroflier (150 ml/Kg et plus dans la matière sèche), sont exceptionnelles.

Dans la plante, les huiles essentielles peuvent être stockées dans divers organes : fleurs (origan), feuilles (citronnelle, eucalyptus), écorces (cannelier), bois (bois de rose, santal), racines (vétiver), rhizomes (acore), fruits (badiane) ou graines (carvi). La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles, classées parmi les métabolites secondaires, se font généralement au niveau des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur la surface de la plante (*J Brunechon, 1987*). Par exemple, pour la famille des *Lamiaceae*, elle se situe dans les poils sécréteurs, chez les *Myrtaceae* au niveau des poches sécrétrices ou encore des canaux sécréteurs pour les *Asteraceae*. (*Hernandez-Ochoa, 2005*).

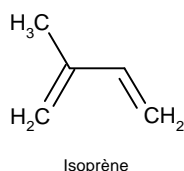
### III-1-3- Caractéristiques traditionnelles

Un certain nombre de plantes médicinales sont encore utilisées de nos jours sous forme de décoctions et infusions mais la plupart d'entre elles ont été délaissées au profit de produits pharmaceutiques de synthèse. Cependant, les connaissances actuelles permettent d'analyser ces plantes et souvent de comprendre l'activité préconisée par nos ancêtres. Une relation entre la structure chimique et l'activité biologique est alors tentante, aussi la production de molécules naturelles pourrait entrer dans la composition de médicaments moins agressifs vis-à-vis de l'organisme, ce qui nous permet d'élargir le champ de valorisation des plantes aromatiques, par l'exploitation des nombreuses et diverses activités biologiques, substantiellement évoquées par la médecine traditionnelle (*C Bourrel, 1993*).

### III-1-4- Composition chimique des huiles essentielles

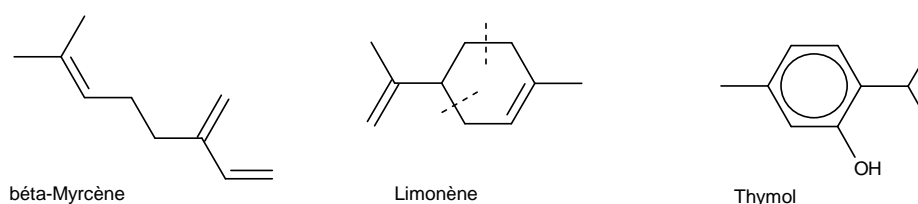
Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des terpènes, prépondérants dans la plupart des essences, et des dérivés du phénylpropane, retrouvé en tant que composé majoritaire dans quelques unes, telles que les essences d'anis, de cannelle, de girofle, etc. Divers autres constituants minoritaires leurs sont associés. De nombreux dérivés porteurs de fonctions diverses sont également considérés comme des composés terpéniques.

Les composés terpéniques sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique. Suivant le nombre entier d'unités pentacarbonés (C<sub>5</sub>)<sub>n</sub> ramifiées, dérivées du 2-méthylbutadiène (isoprène), nous pouvons réaliser la classification suivante :



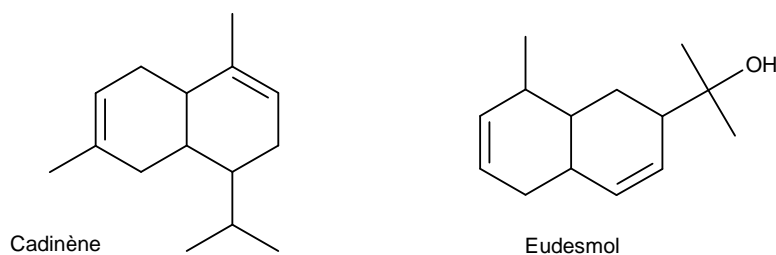
**Figure III.1 :** Structure chimique de l'isoprène.

- **Les monoterpènes (n=2):** Ces terpènes sont des hydrocarbures en C<sub>10</sub> issus du couplage de deux unités isopréniques. Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques (*Hüsni Can Başer and F Fatih Demicri, 2007; F Bakkali et al, 2008*). C'est la classe la plus représentative des huiles essentielles (90%). elle contient une large variété de structures représentant différentes fonctions ( Alcools, Aldéhydes, Cétones, Ethers...) (*J Bruneton, 2009*). Les monoterpènes sont émis par les plantes. Ils forment des aérosols pouvant servir de noyau de condensation des nuages. Ils augmentent la clarté des nuages et refroidissent le climat (*V D Spracklen, 2008*). Ils sont un des principaux vecteurs de la propagation rapide des incendies de forêt.



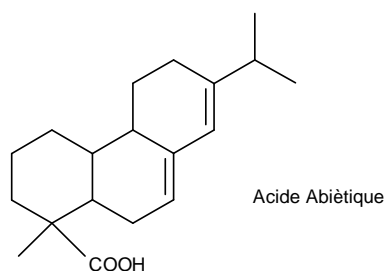
**Figure III.2 :** Exemple des composants monoterpéniques.

- **Les sesquiterpènes (n=3):** Ce sont des hydrocarbures de formule  $C_{15}$  formés de l'assemblage de trois unités isoprènes. Comme les monoterpènes, une molécule de sesquiterpène peut être linéaire, ramifiée et cyclique. Les sesquiterpènes sont présents dans les essences végétales aromatiques ou huiles essentielles, par exemple le farnésol dans l'huile essentielle de citronnelle. Dans les plantes, ils ont le rôle d'agent de défense (*L Ganou, 1993*).



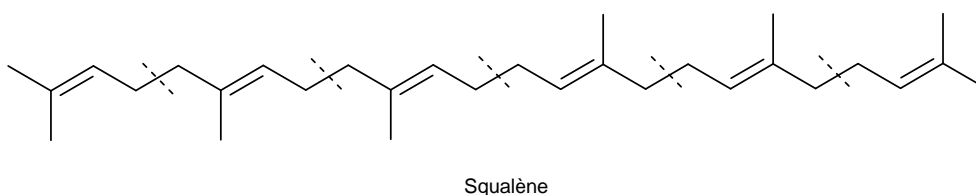
**Figure III.3 :** Exemple des composants sesquiterpéniques.

- **Les diterpènes (n=4):** Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en  $C_{20}$ . Ce type de molécule a comme origine les produits cristallins des résines et des latex, du suint.



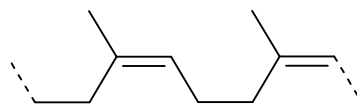
**Figure III.4 :** Exemple des composants diterpéniques.

- **Les sesterpènes (n=5):** Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en  $C_{25}$ .
- **Les triterpènes (n=6):** Ces composés en  $C_{30}$  sont très répandus, notamment dans les résines (*L Ganou, 1993*).



**Figure III.5 :** Exemple des composants triterpéniques.

- **les polyterpènes** en partant de (n = 8): le caoutchouc naturel est un polymère de l'isoprène. Il est produit par la coagulation par la chaleur de la sève de l'hévéa (*L Ganou, 1993*).



**Figure III.6 :** Caoutchouc naturel.

Dans une huile essentielle, nous retrouvons presque exclusivement des mono- et sesquiterpènes. Les dérivés du phénylpropane sont moins abondants que les terpénoïdes, ce sont des arènes issues d'une voie métabolique secondaire dite de l'acide shikimique lui-même intermédiaire de la synthèse de la lignine à partir du phénylpropane (*N Gourine, 2010*).

Ces composés sont néanmoins importants sur le plan qualitatif et quantitatif chez certaines espèces. Par exemple, le trans-anéthole qui est la molécule responsable en grande partie de l'arôme d'anis, constitue environ 80% de l'huile essentielle de fenouil (1-3% d'essence), et d'anis vrai (3% d'essence). Les dérivés phénylpropanoïques et les terpénoïdes sont associés en nombre et en proportions très variables de telle sorte que le produit est hétérogène et complexe sur le plan chimique. Ils sont biosynthétisés au sein des mêmes organes sécréteurs où ils forment l'essence naturelle (*J Q Cu, 1990*).

### III-1-5- Les applications des huiles essentielles

La capacité cytotoxique des huiles essentielles basée sur une activité pro-oxydante peut les faire des agents antiseptiques et antimicrobiens excellents pour l'utilisation personnelle, c'est-à-dire pour purifier l'air, pour l'hygiène personnelle, ou même pour l'utilisation interne via la consommation par voie orale et pour l'utilisation comme insecticides pour la conservation de récolte ou des stockage alimentaires.

Un grand avantage d'huiles essentielles est le fait qu'elles sont d'habitude exemptes de risques génotoxiques à long terme. De plus, certaines d'entre elles montrent une capacité antimutagénique très claire qui pourrait bien être liée avec une activité d'anti-cancérigène (**F Bakkali et al, 2008**).

**Sylvestre et al. (2005, 2006)** ont montré que l'huile essentielle des gales de *Myrica* a une activité anti-cancerogénique sur le poumon et sur le cancer du côlon. **Salim et Fukushima (2003)** ont montré une activité anti-proliférative et une inhibition du 1,2-iméthylhydrazine induite par *Nigella sativa* sur le cancer dans le rat.

**Manosroi et al. (2006)** ont montré une inhibition de la prolifération de leucémie murine et aussi de celle de l'épidémie cellulaire carcinoma de la bouche de l'être humain par les huiles essentielles de : *Ocimum sanctum*, *Citrus citratus*, *Alpinia officinarum*, *Lavandula angustifolia*, *Vetiveria zizanioides*, *Zingiber montanum*, *Piper nigrum*, *Cymbopogon nardus*, *Curcuma longa*, *Ocimum basilicum*, *Citrus hystrix*, *Piper betle*, *Albizia lebbeck*, *Ocimum americanum*, *Mentha spicata* and *Psidium guajava*.

**Yoo et al. (2005)** ont démontré que l'eugénol d'*Eugenia caryophyllata* (= *Syzygium aromaticum*) inhibe la prolifération de cellules cancéreuses. Le géraniol inhibe lui aussi la prolifération des cellules cancéreuses du côlon. **Carnesecchi et al. (2004)** ont aussi démontré que géraniol inhibe la synthèse de l'ADN et réduit le volume des tumeurs.

Beaucoup de cellules de tumeurs sont caractérisées par leurs changements sévères d'énergie de métabolisme, de surproduction de mitochondrie et de stress oxydative permanent (**A M Czarnecka et al, 2006**). Due à leurs capacités d'interférer avec les tâches mitochondriales, les huiles essentielles peuvent ajouter des effets de pro-oxydants et devenir ainsi de véritables agents anti-tumeurs. Beaucoup de radicaux produisant des agents, sont en fait utilisés dans des traitements d'antitumoraux. Dans le cas des huiles essentielles, la production des radicaux pourrait être très bien contrôlée et ciblée sans avoir à présenter par elle-même des effets secondaires toxiques ou mutagéniques sur les tissus saines. Ainsi, les huiles essentielles pourraient faire leur voie du traditionnel vers le domaine médical moderne.

**III-1-6- Méthodes d'extraction des huiles essentielles**

L'huile essentielle représente de 0.1 à 3% du poids sec des plantes aromatiques (*C N Hassiotis, 2010*).

Une grande variété de méthodes d'extraction sont utilisées commercialement pour isoler les huiles essentielles à partir du matériel végétal. Les méthodes traditionnelles et commerciales utilisées pour extraire les huiles essentielles sont:

- L'Hydrodistillation (la distillation par l'eau) lors de laquelle le matériel végétal est immergé dans l'eau, le mélange hétérogène bouilli et l'huile essentielle volatilisée puis condensée. Les principaux composés volatils ne se dissolvent pas dans l'eau et l'huile essentielle peut être séparée par décontation après refroidissement dans un séparateur de phases (*J Bruneton, 1993; H Paris and R R Moise, 1976*).
- L'entraînement par la vapeur d'eau (distillation à la vapeur d'eau) lors de laquelle l'eau est bouillie dans un récipient situé en dessous, et à une certaine distance, du matériel végétal à distiller. A son passage, la vapeur d'eau saturante entraîne l'huile essentielle des plantes vers un condensateur où elle est liquifiée et séparée de l'eau comme lors de l'hydrodistillation (*J Bruneton, 1993; H Paris et R R Moise, 1976*).
- L'Hydrodiffusion (percolation) est une modification du processus de l'entraînement par la vapeur d'eau au cours duquel la vapeur d'eau arrive par le haut d'un conteneur d'herbe, permettant ainsi à celle-ci de percoler à travers la matière végétal par gravité (*P Franchomme et D Pénéol, 1990; H Richard, 1992*). La vapeur d'huile et la vapeur d'eau sont ensuite condensées et séparées comme décrit ci-dessus.
  - L'expression à froid au cours duquel des tissus végétaux très riches en huile essentielle sont compressés pour en extraire l'huile essentielle. Ce procédé est principalement utilisé pour isoler les huiles essentielles à partir des épicarpes (zeste frais) des fruits de *Citrus*. Cette opération peut se faire à la main ou après scarifications mécaniques (*G R Boucard et R W Serth, 1991*).
  - L'extraction directe par des solvants organiques volatils. Les solvants organiques sont ensuite retirés par distillation pour ne laisser que les substances végétales, un mélange alors appelé "concrète" et des essences dites "absolues". Ces extraits sont très utilisés en parfumerie (*G R Boucard et R W Serth, 1991*).



- l'enfleurage qui est préféré sur les organes, ou composés, fragiles. Lors de ce processus, les tissus végétaux sont mis en contact avec un corps gras (axonge) pour le saturer en essences végétales. Le corps gras est ensuite épuisé par l'alcool absolu et ce solvant évaporé sous vide pour ne laisser que les substances végétales (*J Guillemain et A Rousseau 1990*).

Pour obtenir une huile essentielle naturelle et authentique, elle doit être isolée uniquement à partir de plante entière, ou partie de plante, d'origine taxonomique et géographique bien connues par des moyens physiques basés sur la volatilité des huiles essentielles. Les pharmacopées n'admettent que les deux premiers procédés de la liste établie ci-dessus (*J Bruneton, 1993; H Paris et R R Moysse, 1976*). La distillation à la vapeur et l'extraction par solvant sont par contre des méthodes très utilisées pour isoler les huiles essentielles commercialement. Les essences extraites d'une même plante par ces différentes méthodes n'ont pas exactement la même composition. Pendant l'hydrodistillation, l'eau, l'acidité des tissus végétaux et la température peuvent provoquer la formation de produits indésirables, la destruction des produits labiles et des réarrangements chimiques (*B M Lawrence, 1976*). En dépit d'avantages apparents (efficacité d'extraction et pas de contact prolongé de la matière végétale avec l'eau en ébullition), l'entraînement à la vapeur d'eau à pression atmosphérique est une méthode susceptible d'introduire de nombreuses modifications des substances volatiles (*J Bruneton, 1993*) notamment du fait de la surpression qui parfois règne à l'intérieur du système d'extraction (*H Richard et J L Multon, 1992*). Par conséquent, le développement de méthodes d'extraction alternative avec une meilleure sélectivité et efficacité sont fortement souhaitables.

Récemment, d'autres méthodes d'extraction ont été développées, telles que:

- L'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique qui est une technique qui permet d'obtenir, à partir du matériel végétal, des extraits volatils, dépourvus de toutes traces de solvant (*M Benhadou et al, 2008*). Le CO<sub>2</sub> est un gaz inerte, inflammable, strictement atoxique, facile à éliminer, disponible et sélectif (*J Bruneton, 2009*). Plusieurs auteurs mettent le CO<sub>2</sub> supercritique au sommet des solvants utilisables actuellement pour l'extraction des arômes.
- L'extraction par micro-ondes consiste à faire chauffer la matrice végétale par celui-ci dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite d'une manière séquentielle

(*J Bruneton, 2009*). L'utilisation des rayons micro-ondes, sert pour exciter les molécules d'eau présentes dans les tissus de la plante, en causant la rupture des cellules et la libération des huiles essentielles piégées (*M Lahlou, 2004*). Cette technique est appliquée, aussi pour l'extraction des saponines, à partir de quelques plantes médicinales (*M Lahlou, 2004*).

### III-1-7- Les méthodes d'analyse

Plusieurs techniques et critères sont utilisés pour l'évaluation de qualité des huiles essentielles:

- Evaluation sensorielle;
- Tests physico-chimiques;
- Techniques instrumentales.

L'évaluation sensorielle se fait par les organes de sens et, plus spécialement, par le nez. C'est un test primordial pour l'acceptation d'une huile essentielle dans les maisons de parfumerie. Toutefois, l'estimation doit être vérifiée par des preuves expérimentales (*Hüsni Can Başer and F Fatih Demicri, 2007*).

Les tests physico-chimiques sont nécessaires dans les monographies d'huiles essentielles publiées dans les Normes, les Pharmacopées et les Codex.

Les techniques instrumentales sont utilisées pour évaluer la qualité des huiles essentielles et la meilleure carte d'identité quantitative et qualitative de celle-ci reste cependant le profil chromatographique en phase gazeuse. Il permet de connaître très exactement la composition chimique et de rechercher d'éventuelles traces de produits indésirables tels des pesticides ou des produits chimiques ajoutés (*N Gourine, 2010*).

## Partie expérimentale et résultats

### III-1- Conservation

Les échantillons fraîchement collectés ont été séchés à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité, dans un endroit sec et aéré. Les échantillons sont retournés, chaque jour, surtout au début du séchage, afin d'éviter les moisissures, puis stockés soigneusement dans des sacs en carton propres. Nous allons consacrer notre étude à la partie fleur de la plante.

### III-2- Méthodes expérimentales

L'ensemble du travail que nous avons mené dans ce chapitre est résumé par l'organigramme suivant:

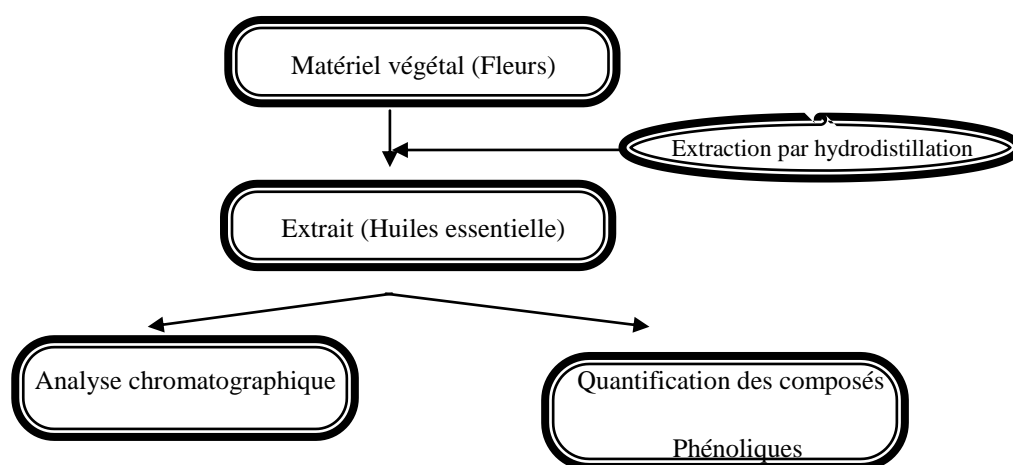


Figure III.7: Récapitulatif des différentes méthodes de notre étude

#### III-2-1- Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont extraites par hydrodistillation des fleurs bien broyées en utilisant un montage Clevenger. Les huiles obtenues sont traitées par sulfate de sodium  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  afin d'éliminer les traces d'eau qui peuvent exister sous formes de suspensions entraînées par la

séparation physique des phases. Enfin, les huiles essentielles sont conservées à une température de +4°C jusqu'à leur analyse.

### III-2-2- Teneur en huiles essentielles

Les teneurs en huiles essentielles ont été calculées par rapport à la masse des parties aériennes de la plante (fleurs) et les valeurs sont regroupées dans le Tableau III.1.

**Tableau III.1:** Teneurs des huiles essentielles des fleurs de *Rantherium adpressum*.

	Organes	Teneurs en % (m/m)	Teneurs (ml/kg)
<b>Echantillon</b>	Fleurs (F1)	0,288	3
<b>Echantillon</b>	Fleurs (F2)	0,333	4

Les huiles essentielles extraites ont des couleurs jaunes avec une forte odeur aromatique agréable.

A partir des résultats regroupés dans le tableau 1, on pourra observer que les teneurs en huiles essentielles des fleurs dans les deux échantillons sont proches: 0,29% (3ml/kg) et 0.33% (4ml/kg).

En comparant les teneurs de notre plante en huiles essentielles avec celle d'autres espèces végétales de la même famille, nous pouvons dire que les fleurs de *Rhanterium adpressum* sont moyennement riches en huiles essentielles (Tableau III.2).

**Tableau III.2:** Teneurs en huiles essentielles de quelques plantes.

Nom de la plante	Lieu de collecte	Teneur % (m/m)	Références
<i>Rhanterium adpressum</i> Coss. & Durieu	Ghardaia (Algérie)	0,25	(Kala et al, 2009)
<i>Rhanterium adpressum epapposum</i>	Iran	0.25	Ygahmai et Kolbadipour (1987)
<i>Ageratum conyzoides</i>	Kamboisé (Burkina Faso)	0.75	(Nébié et al, 2004)
<i>Artemisia compestris</i> L.	Laghouat (Algérie)	0.76	(H Aouissi 2010)

**III-2-3- Analyse et composition chimique des huiles essentielles**

La composition chimique des huiles essentielles des fleurs du *Rhanterium adpressum* a été déterminée à l'aide de deux techniques d'analyses: la chromatographie en phase gazeuse CPG, et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CG-SM.

**❖ Conditions d'analyses****▪ Analyses chromatographiques CPG**

Appareil: CP-Varian 3800

Colonne : UB-Wax (polaire)

- Longueur de la colonne : 60 m
- Diamètre intérieur de la colonne : 0,32 mm
- Épaisseur de la phase : 0,25  $\mu\text{m}$

Programmation de température : 50 à 250°C (3°C/min), puis isotherme à 250°C (10 min)

Gaz vecteur : Hélium (He)

Débit du gaz vecteur : 1 mL/min

Détecteur: Ionisation à flamme (FID)

Température de l'injecteur : 250°C

Température du détecteur : 260°C

Volume injecté : 0,1  $\mu\text{L}$

**▪ Analyses spectrales CG-SM**

Appareil: chromatographe AGILENT 6890 GC couplé avec un spectromètre de masse CMSD 5973

Colonne : HP5MS

- Longueur de la colonne : 30 m
- Diamètre intérieur de la colonne : 0,25 mm
- Épaisseur de la phase : 0,25  $\mu\text{m}$

Programmation de température : Isotherme à 60°C (2 min) puis de 60 à 125°C (3°C/min), isotherme pendant 2 min et finalement de 125 à 250°C (5°C/min), isotherme pendant 2 min.

Gaz vecteur : Hélium (He)

Débit du gaz vecteur : 1 mL/min

Détecteur: Impact électronique Electron Ionisation (EI)

Voltage EI : 70 EV

Température de l'injecteur : 250°C

Température du détecteur SM : 220°C

Volume injecté : 1 µL avec un rapport de dilution de 1:100 v/v dans l'éthanol.

Les résultats d'analyse de la composition chimique des deux échantillons sont consignés dans le Tableau III.3.

Un total de vingt-six constituants chimiques a été identifié. Les échantillons d'huiles essentielles des fleurs sont qualitativement proches l'un à l'autre, dans la mesure où ils sont tous caractérisés par les mêmes composés dominants. Les constituants présents en pourcentages majoritaires sont:  $\alpha$ -pinène (17.39-24.35%), le camphène (17.79-21.81%), le myrcène (18.58- 19.28%), le limonène (5.73-5.84%) et le  $\beta$ -pinène (4.11-4.47%).

D'autres constituants présents en quantités moins importantes, à savoir le sabinène (1.33-2.3%), le linalool (2.48-3.09%), l'acétate de bornyle (2.26-1.81%) et le terpinène-4-ol (2.66-4.38%).

**Tableau III.3:** Composition chimique des huiles essentielles des fleurs du *Rhanterium adpressum*.

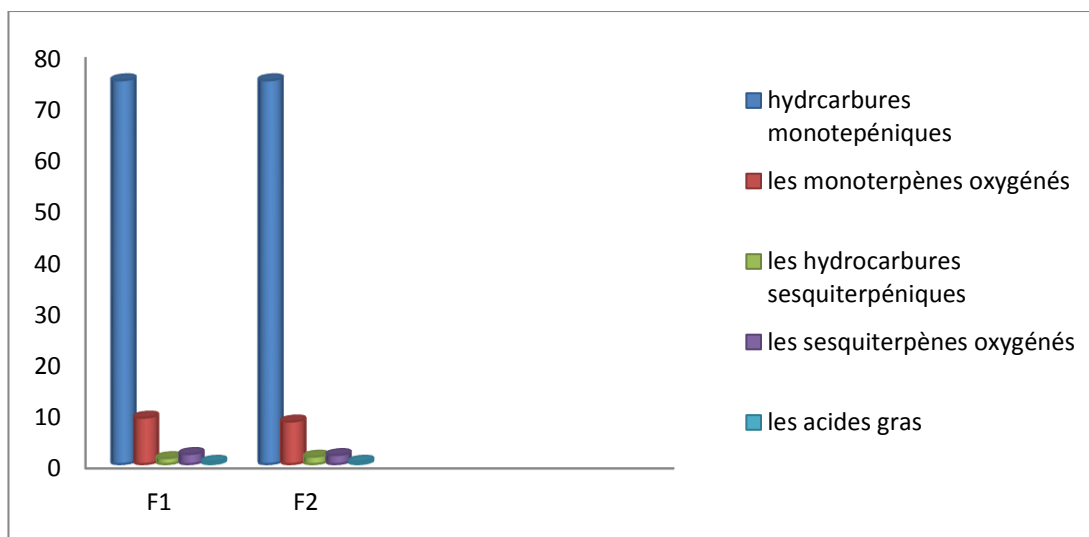
N°	Compounds	Aire du pic CPG (%) <sup>a</sup>		IRL	Identification
		F1	F2		
1	<b><math>\alpha</math>-pinène</b>	<b>17.39</b>	<b>24.35</b>	1019	MS, RI
2	<b>Camphène</b>	<b>21.81</b>	<b>17.79</b>	1060	MS, RI
3	<b><math>\beta</math>-pinène</b>	<b>4.47</b>	<b>4.11</b>	1099	MS, RI
4	Sabinene	2.3	1.33	1111	MS, RI
5	<b>Mycènes</b>	<b>19.28</b>	<b>18.6</b>	1159	MS, RI, AS
6	$\alpha$ -terpinène	0.73	0.5	1179	MS, RI
7	<b>Limonène</b>	<b>5.84</b>	<b>5.73</b>	1203	MS, RI, AS
8	$\beta$ -phellandrène	0.23	0.19	1211	MS, RI
9	$\gamma$ -terpinène	1.28	0.89	1245	MS, RI, AS
10	$\rho$ -cymène	0.64	0.74	1272	MS, RI
11	$\alpha$ -terpinolène	0.84	0.58	1282	MS, RI
12	$\beta$ -Thujone	0.13	0.13	1445	MS, RI
13	Linalool	2.48	3.09	1549	MS, RI, AS
14	Bornyl-acetate	1.81	2.26	1586	MS, RI, AS
15	Camphene hydrate	0.4	0.31	1596	MS, RI
16	<b>Terpinene-4-ol</b>	<b>4.38</b>	2.66	1609	MS, RI, AS
17	Aromadendrène	0.65	0.92	1626	MS, RI, AS
18	$\alpha$ -terpineol	1.71	1.5	1705	MS, RI, AS
19	Germacrene B	0.5	0.51	1847	MS, RI
20	Ledol	0.47	0.37	2084	MS, RI, AS
21	Spathulenol	0.32	0.35	2177	MS, RI
22	$\beta$ -eudesmol	0.33	0.48	2194	MS, RI
23	Isospathulenol	0.84	0.55	2264	MS, RI
24	Acide Myristique	0.12	0.19	2696	MS, RI
25	Acide Palmitique	0.31	0.25	2900	MS, RI
Total identifié %		89.26	88.36	<b>88,36</b>	

<sup>a</sup> Pourcentages obtenus par normalisation des aires des pics FID. <sup>b</sup> Indices de rétentions linéaires relative à la série homologue de n-alcanes obtenus sur colonne UB-Wax. RI: Indices de rétentions. MS: Spectroscopie de masse. AS: Relative à des indices de rétentions de constituants pures.

Tableau III.3: suite

<b>Hydrocarbures monoterpéniques</b>	74.81	74.81
<b>Monoterpènes oxygénés</b>	9.07	8.32
<b>Hydrocarbures sesquiterpéniques</b>	1.15	1.43
<b>sesquiterpènes oxygénés</b>	1.96	1.75
<b>Acides gras</b>	0.41	0.44
<b>Autres</b>	1.86	1.61

L'histogramme (Figure III.8) montre que ces huiles essentielles sont riches en hydrocarbure monoterpéniques et contiennent le même pourcentage (74.81%). Les pourcentages des monoterpènes oxygénés sont relativement moins importants (8.32-9.07%) par rapport aux hydrocarbures monoterpéniques. Cependant, les hydrocarbures sesquiterpéniques (1.15-1.43%), les sesquiterpènes oxygénés (1.75-1.96%) et les acides gras (0.43-0.44%) sont les classes les plus faibles en pourcentage. L'ensemble de ces composés donne à ces huiles une odeur agréable.



**Figure III.8:** Variation des teneurs des différentes classes chimiques des huiles essentielles des fleurs de *Rhanterium adpressum*.



Nous avons voulu faire une comparaison de nos résultats avec d'autres travaux menés sur différentes espèces du *Rhanterium* et nous avons trouvé que la composition varie au sein de ce genre.

Une étude menée par *Yaghmai et Kolbadipour (1987)* sur l'huile essentielle du *Rhanterium eppapossum Oliv.* collectée dans le nord-est de l'Iran a montré que l'analyse chromatographique a révélé 107 composants dont 92% sont des terpénoïdes, les principaux constituants sont: l' $\alpha$ -Phellandrene, le Linalool, le Géraniol, le Bulnesol et le  $\beta$ - Phellandrene.

Une autre étude par *Kala et al, (2009)* sur l'huile essentielle des parties aériennes du *Rhanterium adpressum Coss. et Durieu* collectée à Ghardaïa (nord du Sahara Algérien) et analysée par CG-SM qui caractérise la dominance des sesquiterpènes avec un pourcentage de 83.33% dont les principaux composant sont: le Spathulenol (19.57%), le  $\beta$ -udesmol (15.13%), Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-méthyl-9-méthylène (12.94%) et le  $\beta$ -Cadinol (11.34%). Les monoterpènes ont montré le pourcentage global le plus faible avec 5.11 %.

*Bouhroum et al, (2007)* ont pu isolé six composés à partir de l'huile essentielles du *Rhanterium adpressum* collectés à Ouargla (sud-est de l'Algérie) à savoir : le 16  $\beta$ -hydroxy lupeolyl-3-hexadecanoate, le  $\beta$ -Eudesmol , le Spathulénol, le  $\beta$ -sistostérol et Sigmastérol.

La variation de la composition chimique des huiles essentielles pourrait être due à plusieurs facteurs; citons à titre d'exemple: les conditions climatiques de la saison de collecte des échantillons, l'approvisionnement en eau, la nature et les composant du sol ainsi que les attaques des insectes qui peuvent aussi avoir une influence sur la composition chimique des huiles essentielles (*Hüsnü Can Baser et G Buchbauer, 2010*).

### **III-2-4- Quantification des phénols totaux dans les huiles essentielles**

#### **III-2-4-1- Dosage des phénols totaux**

Les composés phénoliques se caractérisent par diverses activités microbiologiques et antioxydantes (*F Bakkali et al, 2008; M M Cowan, 1999*).

Le dosage des phénols totaux peut être effectué par la méthode du Folin-Siocalteu (VL Singleton et JA Ross, 1965) ou bien celle de l' $\alpha$ -phénantroline (A Emmerie, C Engel, 1939). Pour réaliser ce dosage, nous avons utilisé la première méthode.

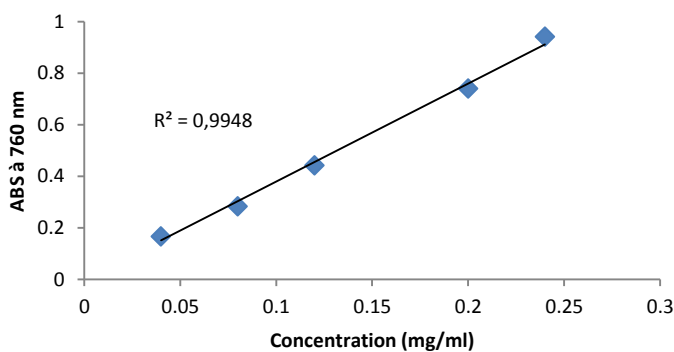
### III-2-4-2- Principe

Il s'agit du principe décrit précédemment dans le chapitre II. Nous avons établi une courbe d'étalonnage avec différentes concentrations d'une solution mère de l'acide gallique.

### III-2-4-3- Le mode opératoire

100  $\mu$ L de chaque solution diluée de l'huile essentielle ont été suivis par l'ajout de 500  $\mu$ L du réactif de Folin- Ciocalteu dix fois dilué. Après deux minutes, 2 mL d'une solution aqueuse de carbonate de sodium à 4% (m/v) sont ajoutés, les solutions ainsi obtenues ont été maintenues à l'obscurité pendant 30 min.

L'absorbance de chaque solution préparée est mesurée par un spectrophotomètre UV Visible de type Shimadzu 1601, à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc.



**Figure III.9:** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

### III-2-4-4- Teneur des huiles essentielles en phénols totaux

Les teneurs en phénols totaux des deux extraits étudiés ont été calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage (Figure III.9) et exprimées en  $\mu$ g d'équivalent en acide gallique (EAG)/mg de matière sèche (MS) (Tableau III.4). Tous les essais ont été reproduits au moins trois fois.

**Tableau III.4:** Teneur des huiles essentielles des fleurs de *Rhanterium adpressum* en phénols totaux

	F1	F2
Teneurs en phénols totaux $\mu\text{g(EAG)/mg (MS)}$	<b>22.8±0.05</b>	<b>13.9±0.03</b>

Les teneurs des phénols totaux des huiles essentielles des fleurs F1 et F2 de *Rhanterium adpressum* sont de 22.8 et 13.9  $\mu\text{g (EAG)/mg (MS)}$  respectivement. Ces valeurs indiquent clairement la possibilité de présence de composés phénoliques naturels dans les huiles essentielles.

Selon la littérature, il existe très peu d'études consacrées au dosage des phénols totaux dans les huiles essentielles. Dans l'étude réalisée par *Oke et al (2009)*, les résultats révèlent une valeur très importante de cette teneur pour l'huile essentielle de *Satureja cuneifolia* Ten. (185.5  $\mu\text{g/mg}$ ) et ceci en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu, par contre, ceux de la méthode de  $\alpha$ -phénantroline utilisée par *H Aouissi (2010)* sur l'huile essentielle de *Artemisia campestris* L. de deux régions différentes à savoir Laghouat et Djelfa (Algérie), sont de 4.33 et 6.01  $\mu\text{g/mg}$  respectivement. En comparant nos résultats avec ceux de la littérature, on peut déduire que les huiles essentielles de *Rhanterium adpressum* sont en faibles possessions de phénols totaux.

## *CHAPITRE -IV-*

*Extractions et dosages des composés  
phénoliques des fleurs de *Rhanterium*  
adpressum*

---

## Aperçu bibliographique

---

### IV-1- Les composés phénoliques

Les composés phénoliques, sont des métabolites secondaires exclusivement d'origine végétale (*P M Dewick, 2002; M Edeas, 2007*). Ils regroupent un ensemble de plus de huit mille molécules, divisées en plusieurs classes chimiques, qui présentent tout un point commun: la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à six carbones, lui-même porteur du nombre de fonctions hydroxyles. ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés, de plus de trente mille Dalton, comme les tannins (*K Chira et al, 2008*).

Les composés phénoliques, participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales. C'est pourquoi 80% de ces composés vont être dans les tissus épidermiques des fruits (*L J Cseke et al, 2006*). Ils sont très réactifs et possèdent une diversité structurale extraordinaire qui leur confèrent des propriétés pharmacobiologiques très diverses.

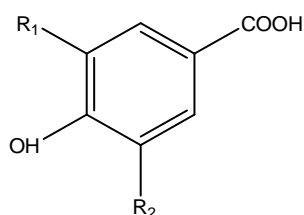
De nombreuses études ont montré que les polyphénols renforcent nos défenses naturelles en protégeant les constituants tissulaires (lipides et autres macromolécules) contre le stress oxydant et préviendraient ainsi les divers maladies chroniques associées, telles que la cancer, les maladies cardio-vasculaires ou la ostéoporose (*MJ McCann, 2007*) Les polyphénols sont en effet capables d'abaisser la pression artérielle (*Iveta Bernatova et al, 2007*), d'empêcher l'oxydation des LDL (*S Baba et al, 2007*), d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (*Lin Nie et al, 2006*), d'empêcher l'agrégation plaquettaire (*Giuseppe Danilo Norata et al, 2007*) et de stabiliser les cellules immunitaires (*Hsu SD et al, 2007*). Ils ont ainsi été décrits comme étant des antioxydants, des anti-inflammatoires, des anti-allergènes, des anti-thrombotiques et des anti-tumoraux (*Elvira González de Mejía, 2006*).

Les polyphénols sont principalement classés en deux grandes familles : les acides phénoliques et les flavonoïdes. Ils sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature et de ce fait sont des éléments faisant partie de l'alimentation animale. A titre

d'exemple, l'homme consomme jusqu'à 10g de ces composés par jour (*Yinrong Lu et L Yeap Foo, 2002*).

#### IV-1-1- Les acides phénoliques

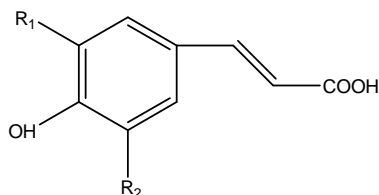
On distingue les dérivées de l'acide benzoïque, composé d'un squelette de sept atomes de carbone (Figure IV.1).



Acides hydroxybenzoïques	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Acide hydroxybenzoïque	H	H
Acide protocatechique	OH	H
Acide vanillique	OCH <sub>3</sub>	H
Acide gallique	OH	OH
Acide syringique	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

**Figure IV.1 :** Les dérivés de l'acide p-hydroxybenzoïque

D'autres composés phénoliques sont également présents, comme les dérivés d'esters hydroxycinnamiques possédant une structure de type C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (Figure IV.2) et qui sont très répandus dans les plantes supérieures, l'acide p-couramique étant le plus important (*P Riberau Gayon, 1986*).



Acides hydroxycinnamiques	R1	R2
Acide p-couramique	H	H
Acide caféique	OH	H
Acide férulique	OCH <sub>3</sub>	H
Acide sinnamique	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

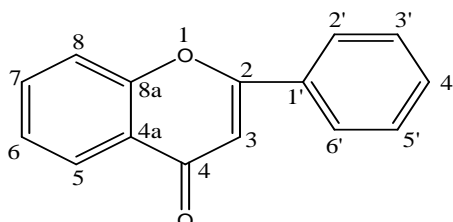
**Figure IV.2 :** Les acides hydroxycinnamiques

Parmi les acides hydroxycinnamiques estérifiés, l'acide chlorogénique, ester quinique de l'acide caféique, est très répandu dans les fruits. Ce composé est impliqué dans les mécanismes de brunissement enzymatique. Sa quinone est très réactive et susceptible de

réagir par voie d'oxydation couplée (*FC Forget Richard, 1992; F Kader et al, 1997*). Les acides hydroxybenzoïque (squelette (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) (Figure 1) sont rarement trouvés dans les fruits mais peuvent être détectés après dégradation des flavonoïdes, et notamment après déglycosylation. Ces composés sont fréquemment présents sous forme liée et peuvent entrer dans la constitution de structures complexes, telles que les tanins hydrolysables. Les esters de l'acide gallique sont retrouvés dans certains fruits notamment le galate d'épicatéchine qui entre dans la composition des tanins condensés du raisin (*J J Macheix et al, 1990*).

#### IV-1-2- Les flavonoïdes

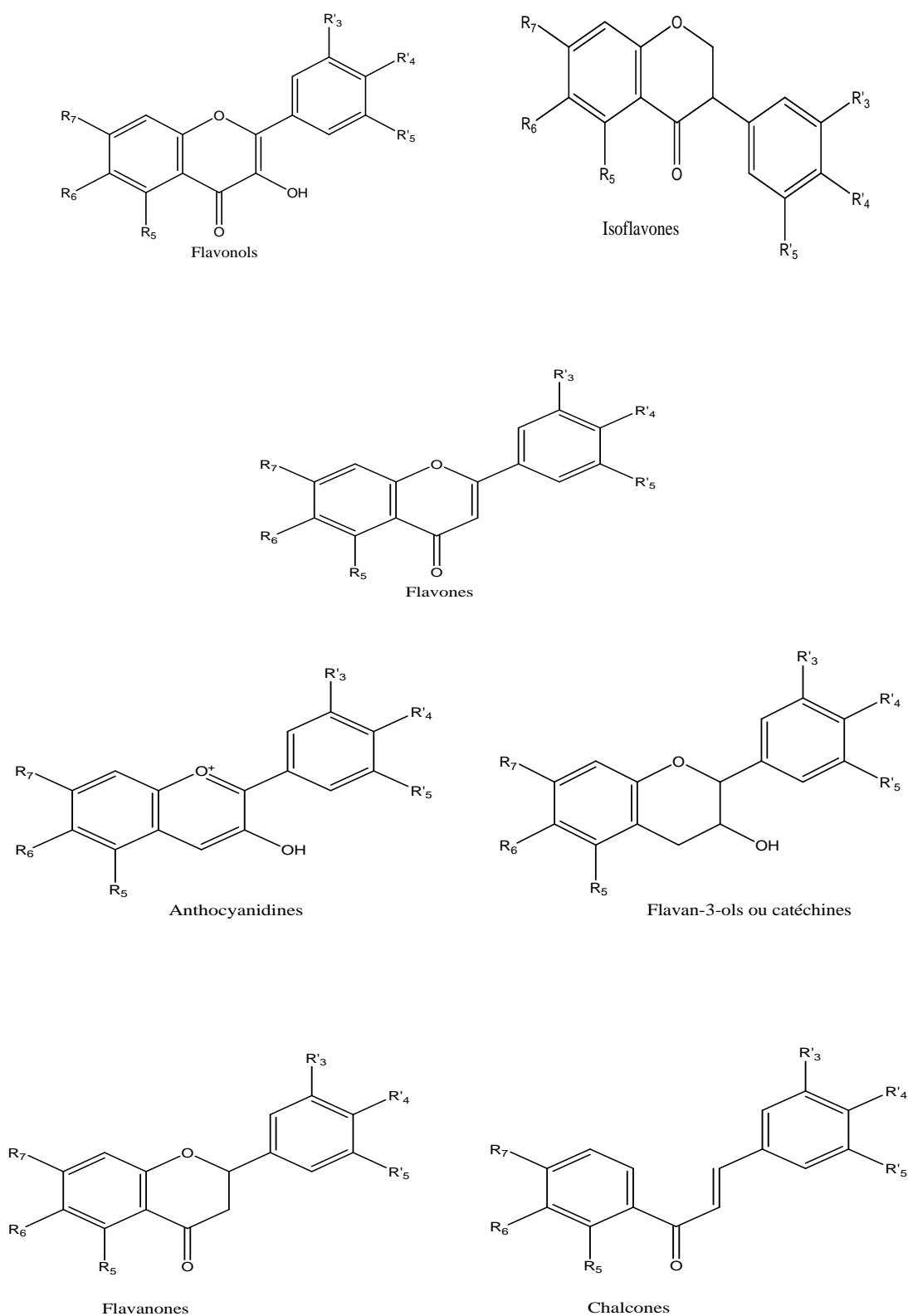
Les flavonoïdes sont caractérisés par un squelette de base constitué de quinze atomes de carbone (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) comportant deux cycles benzénique A et B reliés entre eux par une chaîne à trois atomes de carbone qui correspond à la phényl-2 benzopyrone (Figure IV.3), la numérotation notée sera appliquée pour les différentes sous-classes de flavonoïdes. Ces dernières sont différenciées par le niveau d'oxydation du cycle pyrane: on peut aussi distinguer les anthocyanes, les flavonols, les flavanols et d'autres classes, telles que les flavones, les flavanones et dihydrochalcones.



**Figure IV.3 :** Structure de base des flavonoïdes : la phényl-2 benzopyrone

Le terme 'flavonoïde', utilisé pour la première fois par Geissman et Hinreiner (*J B Harborne, 1975*), regroupe tous les composés dont la structure est basée sur celle de la flavone, phényl-2 benzopyrone (Figure 3). Leur biosynthèse se fait à partir d'un précurseur commun, la 4, 2, 4', 6' – tétrahydroxychalcone (Figure 3) (*W Heller et H Geiger, 1988*). Par action enzymatique, cette chalcone se métabolise en différentes classes de flavonoïdes (*T Swain, 1976; J B Harborne, 1988*) dont la structure varie selon le degré d'oxydation du squelette de base et la position des substituants sur le noyau central (*P Riberau Gayon, 1986*). Les plus importantes sont les flavones et flavonols, pigments jaunes, les anthocyanidines, pigments bleus et rouges

des fleurs et des fruits, les catéchines, les flavanones, les flavanols, chalcones, isoflavones etc (Figure IV.4).



**Figure IV.4 :** Structures des différentes classes des flavonoïdes



#### **IV-1-2-1- Propriétés des flavonoïdes**

Les flavonoïdes possèdent un ensemble de propriétés importantes et sont de plus en plus étudiés dans de nombreux domaines, tels que la physiologie, la biologie, la botanique, la chimie, la pharmacie et la technologie alimentaire.

Les flavonoïdes semblent exister dans la nature depuis plus d'un million d'années et ont suivi l'évolution des organismes au cours du temps (*T Swain, 1975*). Cette très longue association entre les flavonoïdes et différentes espèces à travers l'évolution rend compte de l'extraordinaire gamme d'activités biochimiques et pharmacologiques de ces substances dans les organismes vivants. Plus de 6000 flavonoïdes ont été identifiés dans les plantes (*Rlund EI, 2004*). Premièrement reconnus comme les pigments responsables des teintes automnales et des nombreuses nuances de jaunes, oranges et rouges des fleurs, les flavonoïdes sont également présents dans les fruits, les légumes, les graines et les tiges. Comme exemple, le thé est une source très riche en flavonoïdes. Une alimentation journalière équilibrée en contient 1 gramme de flavonoïde (*J Kühnan, 1976*). Pharmacologiquement, cette quantité peut fournir des concentrations significatives dans les fluides et les tissus corporels (*J Kühnan, 1976*).

##### **IV-1-2-1-1- Activité biologique des flavonoïdes dans les règnes végétal et animal**

Les flavonoïdes jouent un rôle important dans la biochimie et la physiologie des plantes. Ils agissent comme antioxydants, inhibiteurs d'enzymes et précurseurs de substances toxiques (*J B Harborne, 1988*).

En 1938, Szent-Gyogyi montra le rôle important joué par les flavonoïdes dans la respiration des végétaux qui les synthétisent (*A Swent Gyargyi, 1938*). On suppose désormais qu'ils exercent cette action en tant que catalyseurs du transport d'électrons au cours de la photosynthèse ou en tant que régulateurs de la phosphorylation des canaux ioniques (*L C Cantley et G G Hammes, 1976; Y Mukohata et al, 1978*). De plus, ces composés sont impliqués dans la photosensibilisation et le transfert d'énergie, dans l'action des hormones et des régulateurs de croissance des plantes, dans la morphogenèse et dans les défenses contre l'infection (*D A Smith, et S W Banks, 1986*).

Des études ont montré que les flavonoïdes activent la modulation des gènes des bactéries impliquées dans le contrôle de la fixation de l'azote, ce qui suggère que les flavonoïdes sont en relation étroite avec l'activation et l'expression des gènes (*M A Djordjevic et al, 1987; S A J Zaat et al, 1987*).

Les flavonoïdes sont responsables de la majorité des couleurs des fleurs présentes dans la nature et suscitent ainsi l'attraction des insectes pour la pollinisation. Chaque classe de pollinisateurs préfère une couleur particulière: les abeilles sont attirées par les fleurs bleues alors que les papillons préfèrent les fleurs roses ou mauves. Les flavonoïdes glycosylés jouent un rôle important dans la stimulation alimentaire et sont utilisés particulièrement par les insectes phytopages pour reconnaître leurs plantes nourricières. Leur activité alimentaire semble provenir de la structure glycosyle plutôt que des structures de l'aglycone. La nature du sucre est essentielle dans cette activité alimentaire puisqu'une même aglycone substituée par des sucres différents peut devenir inactive pour l'insecte. Par exemple, pour le bombyx mori, l'isoquercétine est un stimulant alimentaire, alors que la rutine n'a aucun effet et que la quercétine-3-O-rhamnoside le repousse (*Y Hamanura et al, 1962*).

Dans le règne animal, l'alimentation constitue un apport en flavonoïdes pouvant avoir un rôle biologique important compte tenu de leurs nombreuses propriétés. Par exemple, une accumulation de flavones et de leurs glucosides dans les ailes des papillons contribuent à les colorer. Dans ce cas, les flavones proviennent des feuilles dont se sont nourries les chenilles (*M Barbier, 1980*). La propolis des abeilles renferme des flavonoïdes, en particulier de la pinocembrine, de la quercétine, de la chrysin et de la galangine. Ces insectes les fabriquent à partir des sécrétions des bourgeons de certains arbres qu'ils modifient par leurs enzymes salivaires. Ils mettent instinctivement à profit ses propriétés antifongiques et antibactériennes pour aseptiser leurs ruches et en boucher les fentes (*B Lejeune et al, 1984*). Longtemps, les propriétés cicatrisantes et anti-infectieuses de ces substances ont été utilisées par les Egyptiens, les Grecs, les Romains et les Incas et dernièrement des auteurs ont préconisé leur utilisation en dermatologie et cosmétologie (*B Lejeune et al, 1984*).

Certains flavonoïdes inhibent la croissance et le développement de certains insectes. Les glycosides ont une activité du même ordre que les aglycones correspondants. Les quantités d'insecticides synthétiques utilisées pour prévenir la dévastation des cultures par les insectes phytopages sont très coûteuses et causent des problèmes environnementaux, tels que la

toxicité résiduelle des cultures et des sols. De plus, des problèmes de résistance des insectes à ces pesticides apparaissent. Les mécanismes par lesquels les insectes interagissent avec les produits chimiques des plantes, tels que les flavonoïdes, sont divers. Ces composés peuvent être toxiques pour les insectes, les attirent ou les repoussent. Le fait de connaître certaines substances des plantes, qui perturbent le chemin métabolique ou le système enzymatique d'insectes nuisibles, sans affecter celui des mammifères ou des insectes utiles, peut conduire à des nouvelles méthodes d'obtention de pesticides biodégradables plus sélectif et moins toxiques pour les espèces inoffensives (*J B Harborne, 1988*).

#### **IV-1-2-1-2- Propriétés biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont depuis longtemps reconnus comme des molécules possédant un nombre remarquables d'actions biochimiques et pharmacologiques. Suggérant que ces composés peuvent affecter significativement les fonctions de multiples systèmes cellulaires. Certains d'entre eux (essentiellement dans des préparations à base de rutine, de rutoside et de quercétine) sont depuis longtemps employés empiriquement dans la pathologie circulatoire en tant que veinotonique et vasculoprotecteur (*G Arthurson et C E Jonson, 1975*).

D'importance historique, on note l'observation d'un mélange de deux flavonoïdes appelés citrine et possédant une activité semblable à celle de la vitamine C (*R E Hughes et H K Wilson, 1977; J Kühnan, 1976* ). Le terme de vitamine P a alors été introduit pour indiquer que ce produit diminuait la perméabilité et la fragilité capillaire ainsi que les signes d'hypovitaminose C chez les animaux d'expérimentation. Bien qu'appelée vitamine P, cette substance ne répondait pas à la définition d'une vitamine. Cependant, il a été démontré que les flavonoïdes prévenaient l'oxydation de l'acide ascorbique et ainsi en augmentait l'activité biologique.

Les principales propriétés biologiques des flavonoïdes sont :

- Une action antioxydante s'effectuant par «piégeage» des radicaux libres (*AK Calgarotto et al, 2007 ; Nuchanart Rangkadilok et al, 2007 ; Pitchaon Maisuthisakul et al, 2007*). Certains flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires (*MM Tanae et al, 2007*).

- Une activité anti-inflammatoire, analgésique et anti-allergique résultant de leur capacité à inhiber la formation et la libération de prostaglandines (médiateur intercellulaire de l'inflammation) et de leucotriènes (médiateur intercellulaire de l'inflammation et de l'allergie) (*W C Hope et al, 1981; A Dembinska Kiec et al, 1984*). Certains flavonoïdes agissent en augmentant la perméabilité capillaire (*D Pathak et al, 1991*) et d'autres, en inhibant la libération d'histamine (*B Havsteen et Z Lebesm, 1980; C.M.S Fewtrell et B D Gompert, 1977*)
- Certaines propriétés antivirales. La quercétine par exemple réduit l'infection due à la présence de certains virus elle en diminue la réplication (*T N Kaul, et al, 1985*).
- Une activité anti-sécrétoire gastrique aussi efficace que la cimetidine utile dans le traitement de l'ulcère de l'estomac (*N S Parmar et G Hennings, 1984*).
- Un pouvoir inhibiteur de l'aldose réductase (*Wirasathien L et al, 2007*), de la phospholipase A2 (*Wang S et al, 2006*) et des enzymes de l'inflammation : la cyclooxygénase (*Kuan-Hung Chen et al, 2007 ; Victoria García-Mediavilla et al, 2007*) et la lipooxygénase (*HG Mahesha et al, 2007*). Les flavonoïdes préviennent la cataracte diabétique par inhibition de l'aldose réductase du cristallin (*Huang R et al, 2007*). Egalement, ils présentent des effets hypoglycémisants et hypotriglycéridémisants chez les animaux diabétiques (*M Tomaru et al, 2007*).
- La capacité d'inhiber la protéine kinase, enzyme impliquée dans un grand nombre d'activités cellulaires et responsable entre autre de la prolifération des tumeurs (*Y Nishizuka, 1986*). Ainsi, la quercétine empêche la croissance de nombreuses tumeurs malignes (*M Gschwendt et al, 1983*). Une étude consacrée à l'activité anti-tumorale des flavonoïdes et plus particulièrement aux relations entre la prolifération des cellules tumorales et la structure chimique des flavonoïdes a montré que les flavones substituées par un glucose inhibent la croissance des tumeurs, alors que les mêmes composés substitués par un rhamnose ou un lutinose en une position identique sont inactifs. L'isoquercétine est le composé le plus actif (*H Kamei et al, 1996*).
- Des propriétés antibactériennes et antivirales des flavonoïdes vis-à-vis de différentes souches bactériennes ont également été mises en évidence (*Zdzisława Nowakowska, 2007*). Les flavonoïdes atténuent le pouvoir infectieux ou affectent la réplication intracellulaire d'autres virus tels que le virus respiratoire syncytial (VRS), l'herpès simplex virus (HSV) et les adénovirus.

Les flavonoïdes possèdent donc un très large éventail d'actions biologiques. A ce jour de nombreux travaux de recherches concernant les propriétés des molécules ne cessent d'être publiés. D'importants progrès ont été faits pour tenter de comprendre leur mécanisme d'action et essayer d'établir des relations entre la structure et l'activité de ces composés.

#### **IV-1-3- Les tanins**

Les tanins sont connus depuis plusieurs millénaires, essentiellement pour leurs propriétés tannantes (propriétés qu'ils ont de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible). C'est le cas du tanin de châtaignier (*castanea Sp*), de chêne (*quercus Sp*). Aujourd'hui encore, ils sont recherchés pour le traitement de cuirs (*J Bruneton, 1993*).

Historiquement, les premières caractéristiques structurales des tanins sont ceux des tanins galliques. La seconde classe de tanins hydrolysables, les ellagitanins, n'a connu son essor que vers les années 1950 avec les travaux d'élucidation de Schmidt et Meyer. Cependant, il ne s'agissait là que d'une toute petite partie lorsque l'on considère les connaissances actuelles les concernant. La découverte récente d'activités anticancéreuses et antivirales a engendré un renouveau de l'intérêt porté à cette classe de produits naturels (*A J Vlietinck et al, 1997; K C S Chen Lui et al, 1999*).

##### **IV-1-3-1-Types des tanins**

Ces composés sont par définition des composés phénoliques hydrolysables, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présentent, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (*J Bruneton, 1993*).

On distingue chez les végétaux supérieurs deux groupes de tanins différents aussi bien par leur structure que par leur origine biogénétique: les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

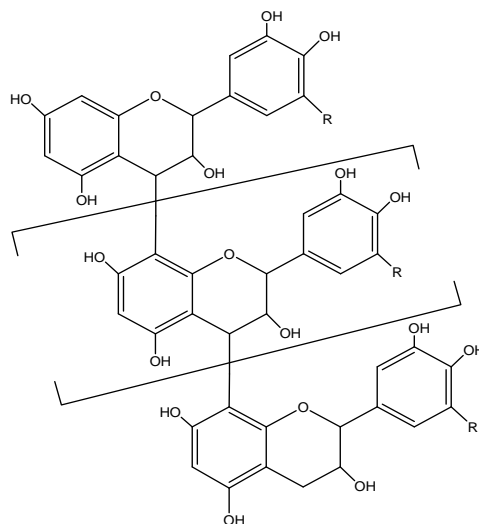
##### **a- Les tanins hydrolysables**

Les tanins hydrolysables sont des esters d'un sucre et d'un nombre variable de molécules d'acide phénolique. Le sucre est très généralement le glucose. L'acide phénolique est soit

l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, soit l'acide hexa-hydroxy-diphenylique (HHDP) et ses dérivées d'oxydation déhydro-hexa-hydroxydi-phenilyde (DHHDP), acide chébulique) dans le cas des tanins ellagiques. Comme leur nom l'indique, les tanins hydrolysables subissent facilement une hydrolyse acide et basique; ils s'hydrolysent sous l'action enzymatique et de l'eau chaude (*A E Hagerman et L G Butler, 1989*).

### b- Les tanins condensés

Les tanins considérés ou proanthocyanidols sont des polymères flavoniques. Ils sont constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone, le plus souvent 4→8 ou 4→6. L'unité de base peut être le catéchol ou l'épicatéchol. Les tanins condensés à la différence des galliques et ellagiques ne s'hydrolysent pas, mais forment à ébullition des composés insolubles appelés phlobaphènes ou rouge de tanin (*J L Guignard, 1996*). Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, gymnospermes et fougères compris (Figure IV.5).



**Figure IV.5:** Structure des tannins condensés

#### IV-1-3-2-Activité biologique des tanins

La plupart des propriétés biologiques des tanins sont liées au pouvoir qu'ils ont de former des complexes avec des macromolécules en particulier avec les protéines. Cette propriété semble

être essentielle dans leurs activités à l'encontre des virus. Ainsi, leur association avec les protéines de surface des virus ou des cellules hôtes serait à l'origine de la diminution de la charge virale.

De telles activités ont été trouvées à l'encontre de l'herpès (*M Takechi et al, 1985*) et en particulier contre le HIV ou SIDA (*A J Vlietinck et al, 1997*). L'acide chébulagique extrait de *terminalia chebula*, par exemple, utilise ce mode d'action contre le HIV. Egalement, il apparaît que les tanins agissent en inhibant des enzymes essentielles à la réplication du virus, comme l'acide ellagique inhibiteur de la 'VHI transcriptase reverse' ou l'acide chébulagique et la corilagine, extraits de deux espèces de *phyllantus*, inhibiteurs de la ADN polymérase du virus Epstein-Barr (*K C S Chen Lui et al, 1999*).

L'acide chébulagique possède également la propriété, qu'ont de nombreux autres tanins ellagiques, d'être cytotoxique à l'encontre de lignées cellulaires cancéreuses (*S Quideau, et K S Feldman, 1996*).

L'acide ellagique est l'un des composés actifs (*L Veroffa et al, 2001*). Plusieurs drogues à tanins existent mais leurs applications restent restreintes. Elles sont utilisées par voie interne pour leur effet anti-diarrhéique et par voie externe pour imperméabiliser les couches les plus externes de la peau et des muqueuses, protégeant ainsi les couches sous-jacentes. Elles ont également un effet vasoconstructeur sur les petits vaisseaux superficiels. En limitant la perte en fluides et en empêchant les agressions extérieures, les tanins favorisent la régénération des tissus en cas de blessure superficielle ou de brûlure. Quelle que soit la voie d'administration, l'effet antiseptique (antibactérien et antifongique) clairement démontré de ces molécules est intéressant (diarrhées infectieuses, dermatos, etc) (*J Bruneton, 1993*).

Enfin, les potentialités des tannins dans l'inhibition de la peroxydation des lipides ont mis en évidence leurs propriétés de piègeurs de radicaux libres et d'inhibiteurs de la formation de l'ion super oxyde (inhibiteurs de la xanthine oxydase).

---

## ***Partie expérimentale et résultats***

---

### **IV-1- Préparation du matériel végétal**

La partie aérienne de la plante est séchée à l'ombre, en suite les fleurs de celle-ci sont finement broyées, la poudre ainsi obtenue est stockée et conservée dans un endroit sec jusqu'à leur utilisation.

### **IV-2- Extraction des composés phénoliques**

Pour extraire les composés phénoliques, nous avons utilisé deux systèmes de solvants ; (méthanol/eau) et (acétone/eau) de polarité croissante allant de (9-1 jusqu'à 5/5 : v/v).

Une quantité de 10 g de poudre de plante est macérée dans un mélange hydro alcoolique deux fois pendant 48 heures, à température ambiante et à l'obscurité.

L'extrait brut obtenu à partir de chaque fraction, est filtré et soumis à une évaporation sous vide, à la température de 40°C. La phase aqueuse restante est lavée plusieurs fois avec de l'hexane jusqu'à épuisement des pigments.

La phase dépigmentée, est lavée plusieurs fois par un même volume d'acétate d'éthyle. Ensuite, un second lavage avec le 1-butanol a été effectué sur cette même phase jusqu'à épuisement de la couleur.

Les fractions organiques ainsi obtenues « d'acétate d'éthyle et de butanol » sont séchées avec du sulfate de sodium anhydre, puis évaporées à sec sous pression réduite à 40°C. Les résidus obtenus sont récupérés dans 10 mL de méthanol absolu (98%) et conservés à 4°C.

Les teneurs en composés phénoliques extraits par les deux systèmes de solvants (méthanol/eau) et (acétone/eau), suivant une polarité croissante, sont consignés dans les Tableau IV.1 et Tableau IV.2, avec l'aspect et la couleur de chaque extrait.



**Tableau IV.1** : La teneur, l'aspect et la couleur des extraits obtenus à partir d'une extraction (acétone/eau) de polarité croissante.

Ordre de polarité	Fraction organique	Couleur et aspects	Masse en « g »	Teneur en « % »
9/1	Ac.Et	Vert olive visqueux	0,31	3,1
	BuOH	Marron poudreux	0,29	2,9
8/2	Ac.Et	Vert olive visqueux	0,32	3,2
	BuOH	Marron poudreux	0,26	2,6
7/3	Ac.Et	Vert olive visqueux	0,45	4,5
	BuOH	Marron poudreux	0,44	4,4
6/4	Ac.Et	Vert olive visqueux	0,4	4
	BuOH	Marron clair poudreux	0,52	5,2
5/5	Ac.Et	Vert olive visqueux	0,31	3,1
	BuOH	Marron clair poudreux	0,42	4,2

Ac.Et : extrait d'acétate d'éthyle ; BuOH : extrait butanolique

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que les teneurs des extraits d'acétate d'éthyle varient de 3,1 à 4,5% et de 2,6 à 5,2% pour les extraits butanoliques, des différentes fractions. Donc, les valeurs les plus élevées se sont retrouvées dans les fractions butanoliques par rapport à celles de l'acétate d'éthyle. Ceci, pourrait être expliqué par la nature des composés phénoliques de notre matière végétale.

En changeant de polarité, la teneur en composés phénoliques de chaque fraction, varie selon leurs natures chimiques, leurs solubilités et leurs degrés de liaison avec d'autres constituants végétaux (*J J Madheix et al, 2005; S D Sarker et al, 2007*).

Les teneurs des extraits d'acétate d'éthyle et de butanol, issus de la macération avec le mélange hydro alcoolique (méthanol/eau) de polarité croissante, varient de 1,9 à 2,9% et de 3,1 et 4% respectivement (Tableau 2). Ce qui signifie, que les rendements les plus importants ont été obtenus avec de l'acétone qui paraît le solvant le plus adéquat pour l'extraction des composés phénoliques totaux (*N S Ncube et al, 2008*). Ce solvant, est le plus communément

utilisé pour l'extraction à la fois des composés de faible poids moléculaires et ceux complexes de haut poids moléculaires (*Ø M Andersen et K R Markham, 2005*).

**Tableau IV.2 :** La teneur, l'aspect et la couleur des extraits obtenus à partir d'une extraction (méthanol/eau) de polarité croissante.

Ordre de polarité	Fraction organique	Couleur et aspects	Masse en « g »	Teneur en « % »
9/1	Ac.Et	Vert olive visqueux	0,29	2,9
	BuOH	Jaune poudreux	0,35	3,5
8/2	Ac.Et	Vert olive visqueux	0,28	2,8
	BuOH	Jaune poudreux	0,38	3,8
7/3	Ac.Et	Vert olive visqueux	0,27	2,7
	BuOH	Jaune poudreux	0,4	4
6/4	Ac.Et	Vert olive visqueux	0,24	2,4
	BuOH	Jaune poudreux	0,37	3,7
5/5	Ac.Et	Vert olive visqueux	0,19	1,9
	BuOH	Jaune poudreux	0,31	3,1

Ac.Et : extrait d'acétate d'éthyle ; BuOH : extrait butanolique

### IV-3- Quantification des composés phénoliques

#### IV-3-1- Dosage des phénols totaux

Pour effectuer le dosage des phénols totaux, nous avons adapté la méthode de Singleton et Ross utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu ( Principe mentionné dans le chapitre II et III ) .

## IV-3-2- Résultats

L'absorbance de chaque solution préparée est mesurée par un spectrophotomètre UV Visible de type Shimadzu 1601, à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc.

Les teneurs en composés phénoliques totaux des différents extraits de la plante étudiée ont été calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage et exprimées en mg d'équivalent acide gallique (EAG)/gramme de matière sèche (Tableau IV.3). Tous les essais ont été reproduits au moins trois fois.

**Tableau IV.3:** La teneur en phénols totaux des extraits issus de l'extraction (acétone/eau) et (méthanol/eau).

Ordre de polarité	Fraction	C en « mg/MS » (acétone/eau)	C en « mg/MS » (méthanol/eau)
9/1	Ac.Et	9,75 ± 0,52	8,76 ± 0,05
	BuOH	3,19 ± 0,03	4,80 ± 0,02
8/2	Ac.Et	10,81 ± 0,09	8,91 ± 0,03
	BuOH	5,88 ± 0,02	7,06 ± 0,02
7/3	Ac.Et	12,66 ± 0,10	6,37 ± 0,04
	BuOH	6,21 ± 0,04	4,76 ± 0,03
6/4	Ac.Et	12,16 ± 0,10	7,44 ± 0,05
	BuOH	9,00 ± 0,08	7,08 ± 0,04
5/5	Ac.Et	9,72 ± 0,04	6,81 ± 0,03
	BuOH	8,07 ± 0,06	5,42 ± 0,02

Ac.Et : extrait d'acétate d'éthyle ; BuOH : extrait butanolique

Selon les valeurs mentionnées dans le (Tableau IV.3), nous remarquons que la quantité en phénols totaux varie d'une fraction à une autre suivant leur polarité, avec un optimum de 12,66 mg/g obtenu dans l'extrait d'acétate d'éthyle issu d'une extraction (acétone/eau ; 7/3). À partir de ce résultat, nous pouvons conclure que les fleurs de *Rhanterium adpressum* sont relativement riches en composés phénoliques et cela, en comparaison avec les teneurs obtenues dans les travaux de **Djéridane et al (2006)**. (Tableau IV.4).

**Tableau IV.4 :** Comparaison de la teneur en phénols totaux des fleurs de *Rhanterium adpressum* avec quelques plantes médicinales de la famille des Astéracées.

La plante	Teneur en phénols totaux en « EAG/g »
<i>Rhanterium adpressum</i>	12,66
<i>Anthemis arvensis</i>	32,32
<i>Artemisia arborescens</i>	3,42
<i>Artemisia campestris</i>	20,38
<i>Artemisia herba halba</i>	13,06

« GAE/g » : équivalent acide gallique/gramme de matière sèche

En générale, les extraits organiques d'acétate d'éthyle comportent des taux importants en phénols totaux par rapport aux extraits butanoliques. Ceci, pourrait être dû à la nature des composés phénoliques extraits par l'acétate d'éthyle ; possédant ainsi une polarité intermédiaire qui permettra se solubiliser la plupart des phénols comme les flavonoïdes aglycones et les acides phénoliques. Les composés phénoliques de nature polaires, tels que les tanins et les saponines (*W C Evans, 2006*), sont généralement plus extractibles par le butanol. Pour cette raison, nous remarquons que dans les extraits butanoliques les teneurs en composés phénoliques augmentent avec l'augmentation de la polarité de chaque fraction, et atteignent une valeur maximale de 9,00 mg/g.

En examinant les teneurs en composés phénoliques des extraits obtenus par une extraction (méthanol/eau) de polarité croissante (Tableau IV.3 ), nous pouvons conclure que ces valeurs sont inférieures par rapport à celles obtenues par une extraction au système (acétone/eau). Ce résultat, confirme que l'acétone dans ce cas nous a permis d'avoir le rendement le plus important.

Il faut noter que, les teneurs d'extraits bruts des différentes fractions obtenues par les deux méthodes d'extraction (acétone/eau) et (méthanol/eau), et les teneurs en composés phénoliques totaux varient dans le même sens. Donc, pour des teneurs élevées en extraits bruts, on remarque aussi des quantités importantes en phénols totaux. Ces valeurs, restent faibles par rapport aux rendements d'extraits bruts ce qui peut être expliqué par la présence de composés non phénoliques extractibles avec les solvants utilisés. D'autres part, la méthode que nous avons utilisé pour le dosage ou « test de Folin » ; est un test sensible et global,

mais il n'existe aucune méthode permettant de doser de manière satisfaisante et simultanée l'ensemble des composés phénoliques présents dans un extrait végétal non purifié (**J J Madheix et al, 2005**). De ce fait, d'autres techniques de séparation et de quantification peuvent être utilisées pour confirmer ces résultats tels que la chromatographie liquide à haute performance (**M Naczka et al, 2011**).

#### **IV-3-2- Dosage des flavonoïdes**

Dans cette étape, nous avons utilisé la méthode adaptée par Lamaison et Carnat utilisant le réactif de tri chlorure d'aluminium (**Djéridane et al, 2007**).

##### **IV-3-2-1- Principe**

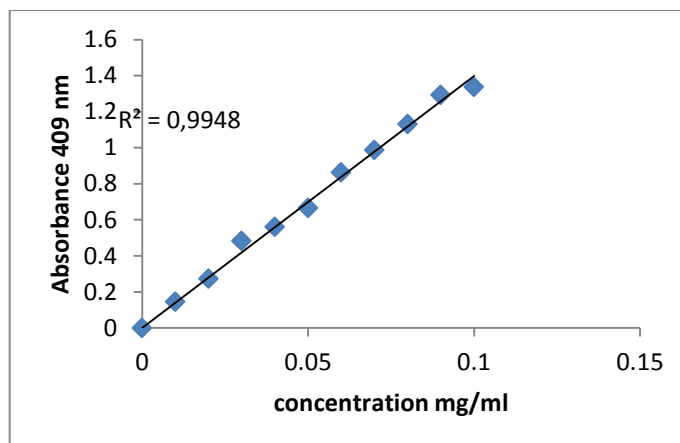
Le tri chlorure d'aluminium forme un complexe acide stable avec les groupements hydroxyles des flavonoïdes. Ce complexe de coloration jaune, absorbe à une longueur d'onde de 409 nm.

Afin de quantifier les teneurs en flavonoïdes dans nos extraits, nous avons choisi la rutine comme standards, pour établir une courbe d'étalonnage.

##### **IV-3-2-2- Courbe d'étalonnage**

À partir d'une solution méthanolique de la rutine, des solutions diluées ont été préparées. 1 mL de chaque solution diluée est mélangé avec 1 mL de tri chlorure d'aluminium à 2%. Par la suite, les solutions ont été maintenues à l'obscurité pendant 20 min. L'absorbance de chaque solution préparée est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV Visible de type Shimadzu 1601, à une longueur d'onde de 409 nm contre un blanc.

Les valeurs ainsi obtenues, nous ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de la rutine.



**Figure IV.6 :** Courbe d'étalonnage de la rutine.

### IV-3-2-3- Résultats

Les teneurs en flavonoïdes des différents extraits de la plante étudiée ont été calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de la rutine (Figure IV.6) et exprimées en équivalents de mg de la rutine (RE) / g de matière végétale sèche (Tableau IV.5). Tous les essais ont été reproduits au moins trois fois.

**Tableau IV.5:** La teneur en flavonoïdes des extraits issus de l'extraction (acétone/eau) et (méthanol/eau).

Ordre de polarité	Fraction	C en « mg/MS » (acétone/eau)	C en « mg/MS » (méthanol/eau)
9/1	Ac.Et	6,17 ± 0,03	4,71 ± 0,01
	BuOH	2,57 ± 0,01	2,06 ± 0,02
8/2	Ac.Et	5,52 ± 0,02	5,64 ± 0,01
	BuOH	5,25 ± 0,03	4,95 ± 0,05
7/3	Ac.Et	7,65 ± 0,06	3,63 ± 0,02
	BuOH	5,80 ± 0,03	3,27 ± 0,02
6/4	Ac.Et	6,84 ± 0,08	5,07 ± 0,04
	BuOH	6,43 ± 0,03	4,10 ± 0,05
5/5	Ac.Et	5,53 ± 0,01	3,87 ± 0,03
	BuOH	6,23 ± 0,01	3,16 ± 0,02

Ac.Et : extrait d'acétate d'éthyle ; BuOH : extrait butanolique

Les teneurs en flavonoïdes des extraits d'acétate d'éthyle et de butanol des différentes fractions (Tableau 5), varient entre 3,63 à 7,65 ; et de 2,06 à 6,84 mg en équivalents de rutine/g de matière sèche respectivement.

Sur la base de ces résultats, nous pouvons constater que nos extraits d'acétate d'éthyle sont plus riches en flavonoïdes par rapport aux extraits butanoliques. Ceci, est peut être expliqué par la nature des composés flavonoïdiques (le cas des isoflavones, flavanones et flavonols) qui sont extraits préférentiellement par l'acétate d'éthyle (*Ø M Andersen et K R Markham, 2005*). D'autres part, le dosage du contenu en flavonoïdes dans nos extraits a été effectué par la méthode spectrophotométrique du tri chlorure d'aluminium qui sert plus spécifiquement à la quantification des flavones et flavonols (*A S Nadeem et al, 2010*), ce qui confirme la faible polarité des flavonoïdes contenus dans nos extraits d'acétate d'éthyle.

Il est clair, que les teneurs en flavonoïdes dans nos extraits, sont inférieures aux teneurs en phénols totaux, ce qui nous indique la richesse de nos extraits par d'autres composés non flavonoïdiques.

#### **IV-3-3- Dosage des tanins condensés**

Pour le dosage des tanins condensés, nous avons utilisé la méthode de la vanilline décrite par *Hagerman (2002)*.

##### **IV-3-3-1- Principe**

La vanilline réagit avec les flavan 3-ols libres et les unités terminales des proanthocyanidines (tanins condensés) donnant un complexe de coloration rouge dont l'intensité est proportionnelle aux taux de flavanols présents dans le milieu et qui présente un maximum d'absorption à 500 nm.

##### **IV-3-3-2- Courbe d'étalonnage**

À partir d'une solution étalon de la catéchine, des solutions diluées de différentes concentrations ont été préparées en milieu aqueux. À partir de 2 ml d'une solution de la vanilline préparée en milieu acide (70% acide sulfurique) nous avons ajouté 1 ml de chaque solution diluée de la catéchine, le mélange est ensuite incubé à bain marie à 20°C pendant 15 min. la lecture de l'absorbance est effectuée dans un spectrophotomètre UV Visible de type

Shimadzu 1601, à une longueur d'onde de 500 nm contre un blanc, les extraits de plantes ont été traités de la même manière.

#### IV-3-3-3- Résultats

Les teneurs en tanins condensés, des différents extraits de la plante étudiée ont été calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de la catéchine (Figure IV.7) et exprimées en équivalents de mg de la catéchine (CE) / g de matière végétale sèche (Tableau IV.6). Tous les essais ont été reproduits au moins trois fois.

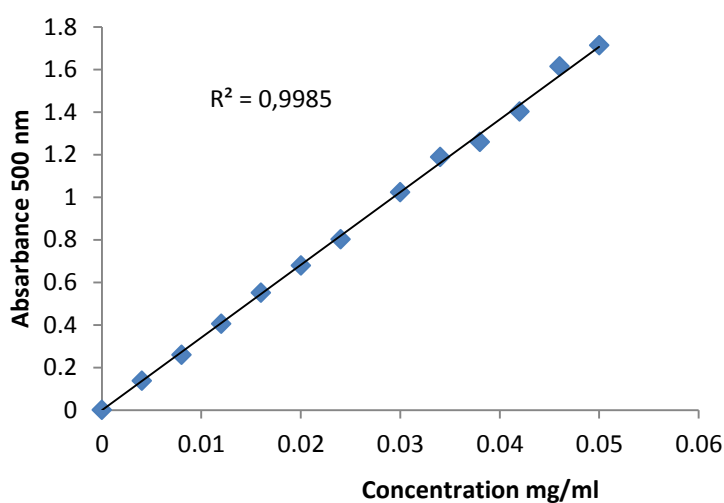


Figure IV.7 : Courbe d'étalonnage de la catéchine.



**Tableau IV.6 :** La teneur en tanins condensés des extraits issus de l'extraction (acétone/eau) et (méthanol/eau).

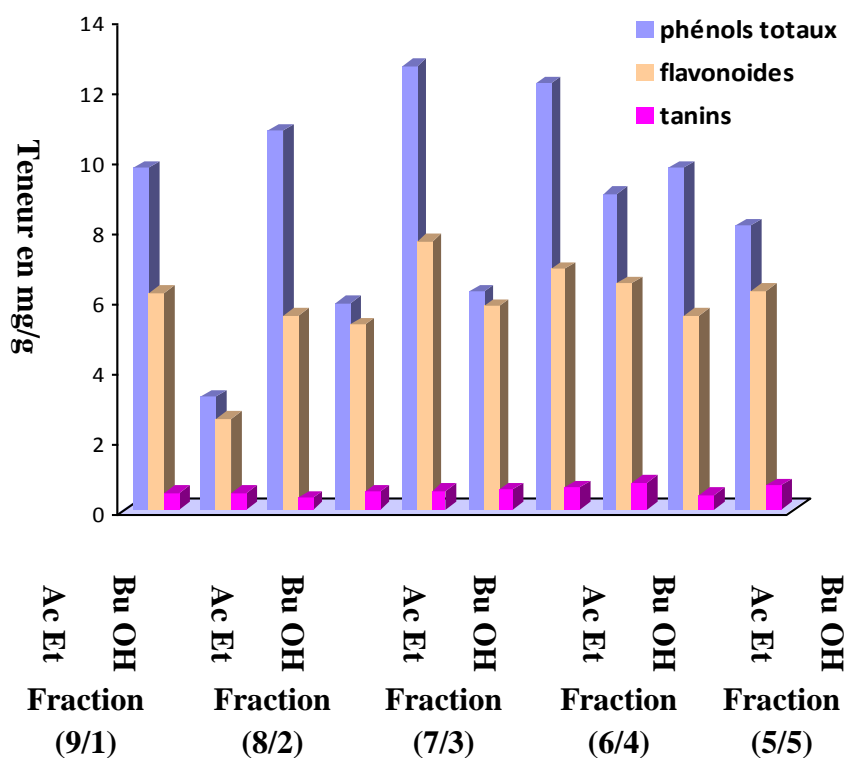
Ordre de polarité	Fraction	C en « mg/MS » (acétone/eau)	C en « mg/MS » (méthanol/eau)
9/1	Ac.Et	0,48 ± 0,03	0,42 ± 0,04
	BuOH	0,46 ± 0,08	0,42 ± 0,01
8/2	Ac.Et	0,32 ± 0,01	0,35 ± 0,01
	BuOH	0,51 ± 0,08	<u>0,81</u> ± 0,06
7/3	Ac.Et	0,53 ± 0,06	0,34 ± 0,02
	BuOH	0,56 ± 0,07	0,44 ± 0,06
6/4	Ac.Et	0,61 ± 0,05	0,36 ± 0,03
	BuOH	0,75 ± 0,10	0,58 ± 0,07
5/5	Ac.Et	0,40 ± 0,08	0,29 ± 0,01
	BuOH	0,66 ± 0,05	0,47 ± 0,02

Ac.Et : extrait d'acétate d'éthyle ; BuOH : extrait butanolique

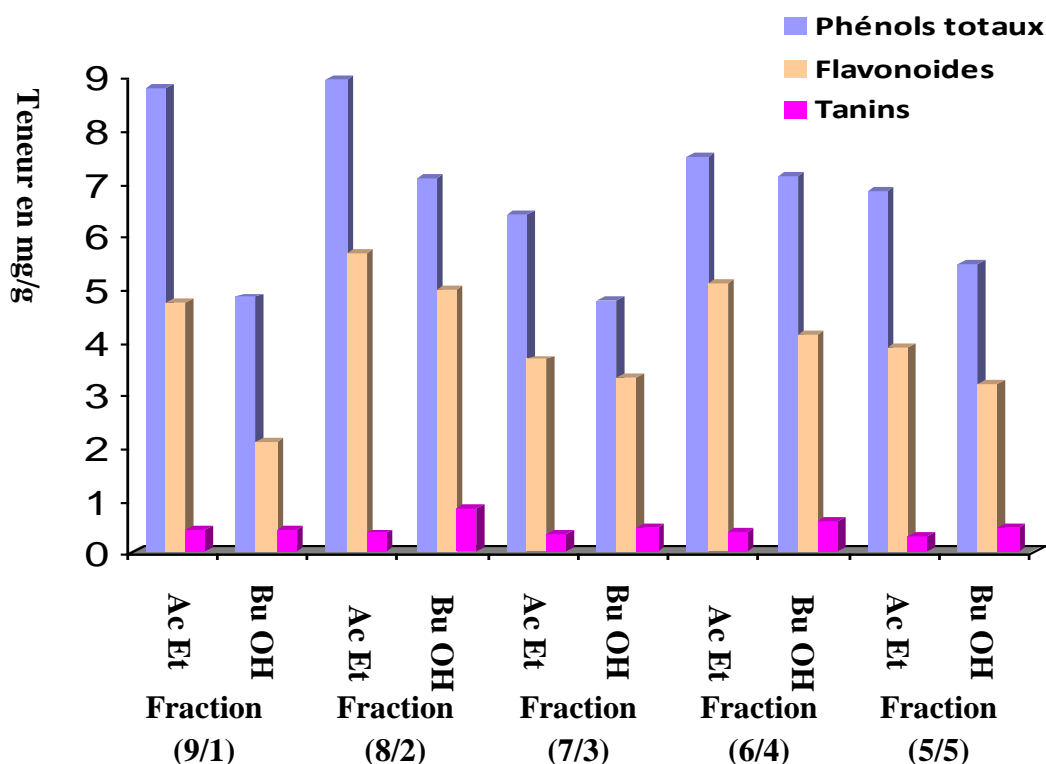
La détermination quantitative des tanins condensés par la méthode de la vanilline (Tableau IV.6), révèle que les extraits butanoliques des fleurs de *Rhanterium adpressum* sont plus riches en tanins par rapport aux extraits d'acétate d'éthyle avec des teneurs allant de (0,42 à 0,81 mg équivalent en catéchine/g matière sèche) et (0,32 à 0,61 mg équivalent en catéchine/g matière sèche) respectivement. Ce qui pourrait être dû à la polarité du butanol qui permettrait de solubiliser les tanins; qui sont des molécules polaires de hauts poids moléculaires relativement aux autres composés phénoliques (*E Barrajon-Catalán et al, 2010*). La teneur la plus élevée, a été observée dans la fraction butanolique extraite par le système de solvant (méthanol/eau : 8/2 v/v), donc nous pouvons déduire que le méthanol dans ce cas, est efficace pour l'extraction des tanins.

Afin de comparer le contenu de notre plante en composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes et tanins), nous avons présenté nos résultats dans les histogrammes ci-dessous (Figure IV.8 et Figure IV.9). D'après ces résultats, nous pouvons conclure que nos extraits sont relativement riches en tannins condensés par rapport à d'autres plantes médicinales de la

même famille (A Ben Sassi et al, 2008; H Falleh et al, 2008). Ce résultat nous laisse à envisager que nos extraits des fleurs de *Rhanterium adpressum* possèdent des potentialités bioactives importantes. En effet, les molécules de tanins tirent leurs activités biologiques à partir de leurs propriétés physicochimiques comme inhibiteurs d'enzymes, antioxydants, préventif à l'égard des maladies cardiovasculaires et possédant ainsi des activités antimicrobiennes et même antiparasitaires (J Živković et al, 2009; A H Smith et al, 2005; P Vandiest et al, 2007; G F Ferrazzano et al, 2011).



**Figure IV.8 :** Comparaison entre les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins des différentes fractions issues de l'extraction (acétone/eau).

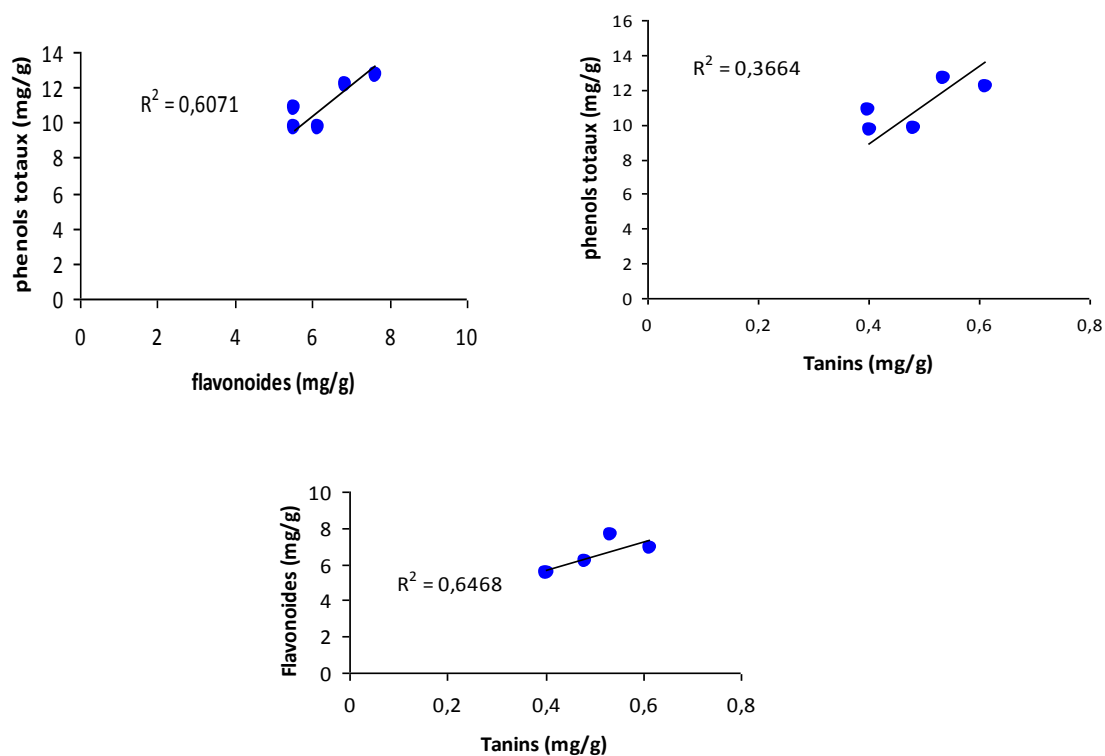


**Figure IV.9:** Comparaison entre les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins des différentes fractions issues de l'extraction (méthanol/eau).

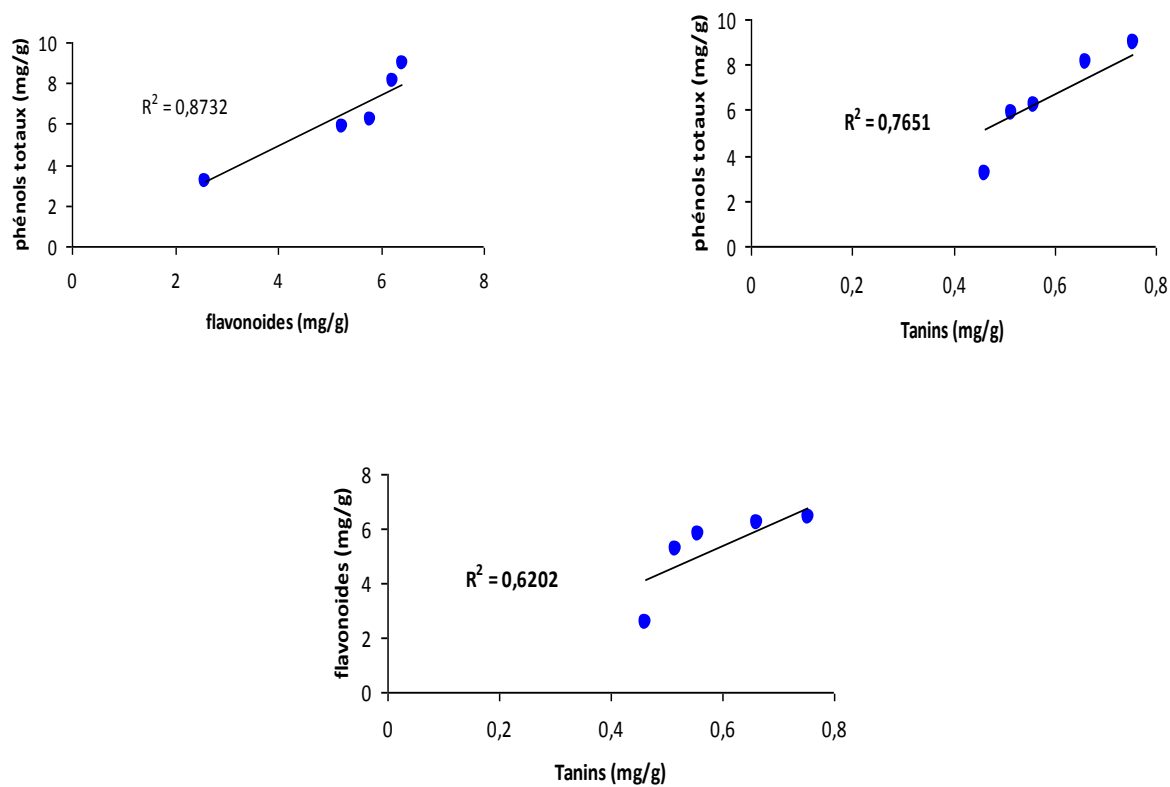
Afin de chercher la présence d'une corrélation linéaire entre les différents extraits. Nous avons essayé de tracer des courbes représentant la variation des quantités des phénols totaux en fonction des teneurs en flavonoïdes et en tanins (Figure IV.10, IV.11, IV.12 et IV.13).

D'après les graphes représentés dans les figures ci-dessous, il convient de noter l'existence d'une bonne corrélation entre les quantités en phénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés, à l'exception des teneurs en flavonoïdes et tanins des extraits d'acétate d'éthyle issues de l'extraction par (acétone/eau), qui ont présenté une faible régression linéaire avec un coefficient de corrélation minimum de 0,3664.

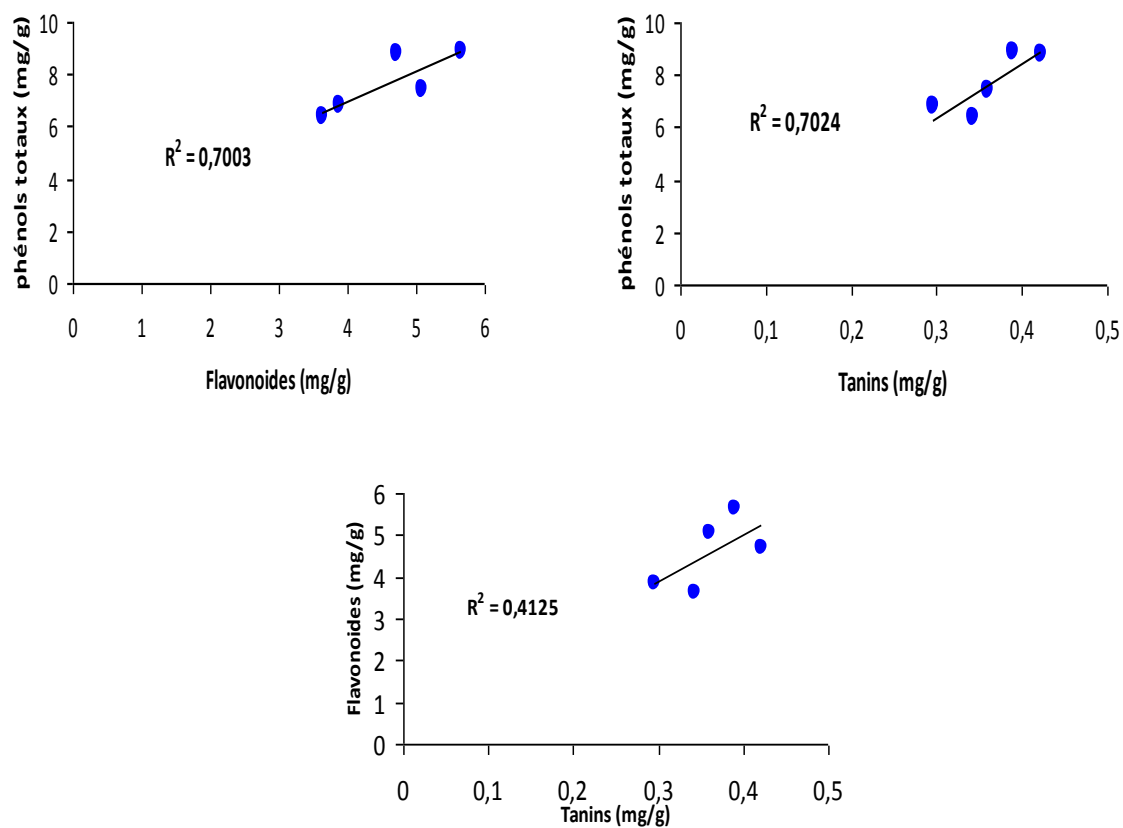
À la lumière de ces résultats, nous remarquons une bonne corrélation positive entre les quantités des phénols totaux et le contenu flavonoïdique des différents extraits avec un coefficient de corrélation (R) qui varie de 0,6 à 0,87, ce qui peut être traduit par la richesse de nos extraits en flavonoïdes qui constituent une importante proportion du contenu phénoliques.



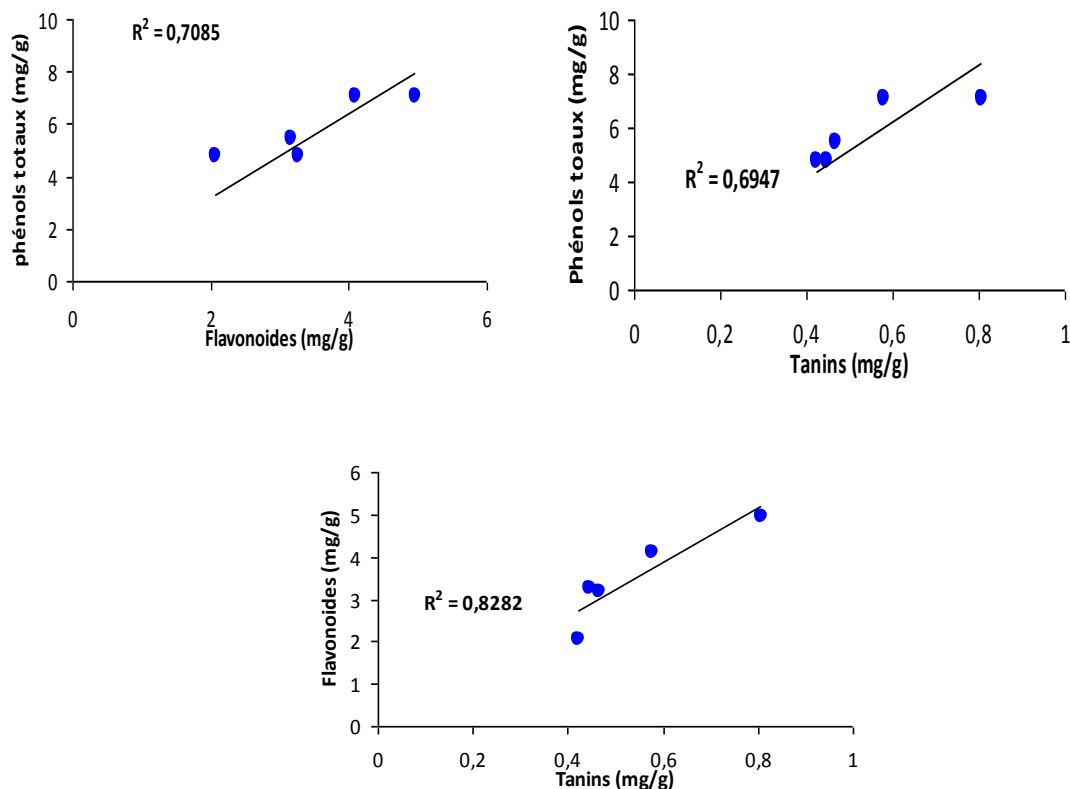
**Figure IV.10:** Variation de la concentration en phénols totaux en fonction de la teneur en flavonoïdes et en tanins des différentes fractions d'acétate d'éthyle issues d'une extraction (acétone/eau).



**Figure IV.11:** Variation de la concentration en phénols totaux en fonction de la teneur en flavonoïdes et en tanins des différentes fractions butanoliques issues d'une extraction (acétone/eau).



**Figure IV.12:** Variation de la concentration en phénols totaux en fonction de la teneur en flavonoïdes et en tanins des différentes fractions d'acétate d'éthyle issues d'une extraction (méthanol/eau).



**Figure IV.13:** Variation de la concentration en phénols totaux en fonction de la teneur en flavonoïdes et en tanins des différentes fractions butanoliques issues d'une extraction (méthanol/eau).

#### IV-4- Analyse des phénols totaux

Nous avons analysés les extraits phénoliques des fleurs de *Rantherium adpressum* par CLHP, notre choix est tombé sur les extraits butanol et acétate d'éthyle issus d'une extraction (méthanol/eau). Cette analyse nous permet d'identifier les composés phénoliques individuels contenus dans les extraits. L'analyse est réalisée par un appareil Agilent 1100 en utilisant une colonne RP18 et une détection par spectrophotomètre UV-Visible à barrette d'iode. Le solvant

utilisé est un mélange d'eau acidifiée par l'acide formique . Le programme de l'élution est le suivant:

**Tableau IV.7:** Le programme de l'élution.

t (min)	MeoH	Eau acidifiée par l'acide formique
0	20	80
50	80	20
55	20	80
60	20	80

Le débit de la phase mobile est de 1ml/min, la quantité injectée est de 20 µl. l'enregistrement des chromatogrammes est réalisé à une longueur d'ondes de  $\lambda=240\text{nm}$  , caractéristiques des composés phénoliques. Les chromatogrammes ainsi obtenus sont montrés dans l'annexe.

Il est claire que les deux extraits contiennent des composés majoritaires. Les résultats de la classification des composés phénoliques sur la base de leurs spectres UV et par le détecteur à barrette d'iode sont regroupés dans les tableaux suivants:

**Tableau IV.8:** Les classes des composés phénoliques de l'extrait butanol.

Temps de rétention	Longueur d'onde (nm)	Classe des composés phénoliques
9.30	240, 325	Flavonoïde
14.20	240, 325	Flavonoïde
16.00	240, 325	Flavonoïde
21.10	240, 330	Flavonoïde
22.00	240, 330	Flavonoïde
22.50	270, 350	Flavonoïde
23.50	270, 350	Flavonoïde
26.20	260, 340	Flavonoïde
27.00	250, 350	Flavonoïde



**Tableau IV.9:** Les classes des composés phénoliques de l'extrait acétate d'éthyle.

Temps de rétention	Longueur d'onde (nm)	Classe des composés phénoliques
9.30	320	Benzoïque
14.20	320	Cinnamique, tannin
16.00	320	Cinnamique, tannin
21.10	320	Cinnamique, tannin
22.00	240, 340	Flavonoïde
22.50	240, 340	Flavonoïde
23.50	250, 350	Flavonoïde
25.00	240, 330	Flavonoïde
25.20	240, 330	Flavonoïde
28.10	240, 330	Flavonoïde
29.00	240, 330	Flavonoïde
31.00	330	Flavonoïde
33.10	330	Flavonoïde

Il est clair que la majorité des composés phénoliques des extraits butanol et acétate d'éthyle sont de types flavonoïdes car la majorité des composés absorbent entre 240 et 350nm (Deux bandes caractéristiques d'un squelette flavonide) (*L Jurd, and R Horowitz, 1962*).

Le maximum d'absorption d'une telle ou telle bande dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles, méthoxyles ou glycosylés sur le squelette flavonique.

L'augmentation du nombre de groupements hydroxyles fait déplacer le maximum d'absorption vers des longueurs d'onde plus élevées, par contre la substitution des groupements hydroxyles par des groupements méthoxyles ou glycosylés fait déplacer ce maximum vers des longueurs d'onde plus faibles (*K R Markham, and T J Mabry, 1968*).

## CHAPITRE -V-

*Evaluation du Pouvoir antioxydant  
des extraits: lipides, huiles essentielles  
et composés phénoliques de  
Rhanterium adpressum*

## ***Aperçu bibliographique***

---

### **V-1- Introduction**

Notre organisme produit en permanence des molécules oxydantes qui sont des formes hautement réactives dérivées de l'oxygène (ERO). Ces dernières molécules dont font partie les radicaux libres, sont très nocives pour l'organisme ; elles attaquent nos cellules pour leur arracher un électron et se stabiliser. Ainsi, le mécanisme naturel de la respiration est à l'origine de ces molécules d'oxygène instables qui vont "oxyder" les autres cellules, d'où la qualification de "réaction d'oxydation" (*A Favier, 2003*).

Les radicaux libres sont produits en permanence, en faibles quantités comme des médiateurs tissulaires et des produits de dégradation énergétique. Dans les conditions normales, cette production est parfaitement maîtrisée par notre système de défense. En effet, sous l'action des rayons ultra violet, les radiations ionisantes, la déficience en antioxydants, les polluants tels que les métaux lourds et la cigarette ; la balance (antioxydants/pro-oxydants) est déséquilibrée, donc nous aurons une surproduction énorme des radicaux libres qui entraîne ce qu'on appelle « le stress oxydant » (*I P Lysette Bossokpi, 2003*).

Les recherches de ces deux dernières décennies ont montré que de nombreuses pathologies humaines sont favorisées par le stress oxydant, ainsi que le rôle des antioxydants d'origine naturelle dans la lutte contre certaines maladies tels que; cancer, maladies cardiovasculaires, diabète....et dans le vieillissement (*M M Berger, 2006*).

### **V-2- Les radicaux libres**

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules présentant un ou plusieurs électrons célibataires. Ces électrons célibataires sont les facteurs d'instabilité et de réactivité puisque l'espèce radicalaire a tendance à les apparier en captant d'une autre molécule ou à les céder (*C Delbart, 2000*).

L'exercice vigoureux accélère la formation de radicaux libres, tout comme l'inflammation, l'exposition à certains produits chimiques, la fumée de cigarette, l'alcool, les situations pathologiques, la pollution ambiante et les diètes riches en matières grasses.

Les ERO sont nombreux, parmi les plus connus sont ; l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) et le radical hydroxyle  $OH^\cdot$ , les hydroperoxy produit lors de la peroxydation lipidique et le monoxyde d'azote (*C Houée Levin et al, 2005*) Lorsqu'un radical libre interagit avec une autre molécule, lui dérobant de ce fait certaines de ces particules constituantes, un nouveau radical libre est créé. Ces réactions ont souvent lieu à l'intérieur de la membrane cellulaire ou dans les régions avoisinantes et peuvent endommager les parois intérieures des cellules. Certains radicaux libres ciblent les mitochondries à l'intérieur des cellules et entravent leur capacité à produire de l'énergie, d'autres radicaux libres ciblent plutôt l'ADN et provoquent des mutations qui agissent sur l'expression génique (*C Houée Levin et al, 2005; K Pelli et M Lyly, 2003*).

### **V-3- Le stress oxydant**

Le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre les oxydants (augmentation) et les anti-oxydants (diminution), responsables de l'altération de biomolécules (ADN, glucides, protéines, lipides), et de la perte de contrôle des voies de signalisation intracellulaires redox. Le stress oxydant se traduit au niveau des mitochondries par une peroxydation lipidiques, oxydation des protéines et des mutations dans l'ADN qui peuvent être à l'origine de la survenue de certains cancers (*M Edeas, 2009; A Benseguni, 2007*).

Les recherches, ont identifié le stress oxydant comme cause première de plus de 130 maladies chroniques telles que le cancer, le diabète et d'autres encore (Parkinson, obésité, vieillissement cutané) (*M Edeas, 2009*).

Plusieurs de ces maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer ou les maladies neuro dégénératives, résultent d'un affaiblissement des systèmes antioxydants des cellules du corps humain (*S Fiorucci., 2006*). On porte alors un grand intérêt au rôle des antioxydants d'origine naturelle dans la prévention du stress oxydatif.

## V-4- Antioxydants

Notre organisme est équipé de tout un système complexe de défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques, localisé dans les compartiments intra- et extracellulaires. Un antioxydant (AOX) est une substance qui inhibe ou retarde significativement l'oxydation d'un substrat, alors qu'elle présente une concentration très faible dans le milieu où elle intervient (*Halliwel et Gutteridge, 1990*).

D'après *Halliwel (1994)*, les mécanismes de l'action d'un antioxydant peuvent comprendre :

- Le piégeage direct des ERO.
- L'inhibition des enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production d'ERO.
- La protection des systèmes de défense antioxydants.

Il existe deux types d'antioxydants :

- Les antioxydants primaires ou radicalaires ou vrais, qui permettent l'interruption de la chaîne autocatalytique :  $AH + R\bullet \rightarrow A\bullet + RH$ . La molécule AH est antioxydante si le radical formé  $A\bullet$  est plus stable.
- Les antioxydants secondaires ou préventifs qui assurent l'inhibition de la production des radicaux libres.

### Les antioxydants synthétiques et naturels

La plupart des antioxydants utilisés en alimentation comme le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT) et le tributylhydroquinone (TBHQ) ; de nature chimique présentent des effets négatifs sur l'organisme contribuant à l'apparition de certaines maladies (*N Balasundram, K Sundram et Samir Samman, 2006*).

Ces dernières années, une importance particulière a été accordée aux propriétés antioxydantes des molécules issues de plantes, qui sont des composantes essentielles des aliments (fruits et

légumes) et assurent le bien-être des Hommes (*K Bhooshan Pandey et S Ibrahim Rizvi, 2009*).

Les antioxydants présents dans les plantes médicinales et plus spécifiquement les composés phénoliques, sont bénéfiques à la santé humaine en neutralisant les dommages cellulaires causés par les radicaux libres et les molécules de dioxygène ou de peroxyde (*Y Rolland, 2004; C Louis Léger, 2006; C Sanchez-Moreno et al, 1998*).

### **V-5- Les principaux tests d'activité antioxydante**

Il y a une augmentation parallèle de l'intérêt des antioxydants et de l'application des méthodes pour estimer l'efficacité de ces substances (*M Eleni et al, 2007 ; Lucio Zennaro et al, 2007*). De nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante de différents métabolites. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel.

Les propriétés anti-oxydantes des extraits *in vitro* peuvent être évaluées grâce à plusieurs méthodes telles qu'ORAC (Oxygen Radical absorbance capacity) qui sert à évaluer la capacité antioxydante d'un aliment, ABTS (le balayage du radical cation 2,2- azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) mesure la capacité réductrice de ce radical stable en présence d'antioxydants.

Récemment, les mesures de l'activité anti-oxydante peuvent être aussi effectuées grâce aux modèles basés sur les cultures cellulaires (*P Tri Vuong, 2009; D. Krishnaiah et al, 2010; Z Liu, 2010*).

## ***Partie expérimentale et résultats***

---

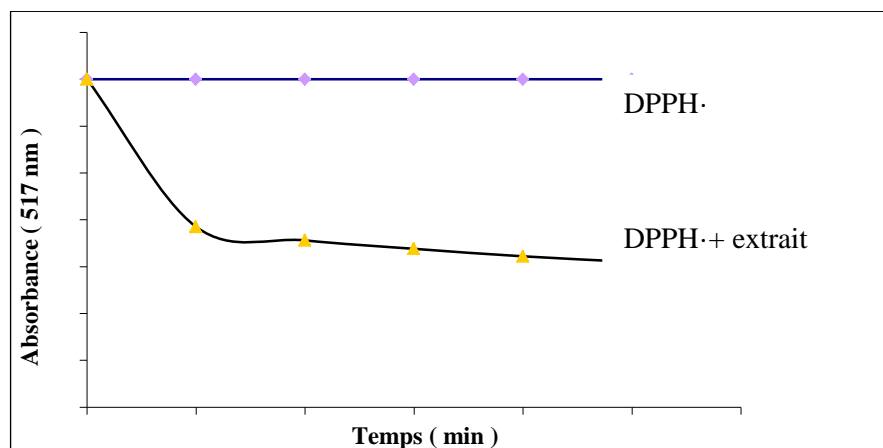
### **V- 1- Etude du pouvoir antioxydant des extraits de *Rhanterium adpressum***

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits des huiles essentielles a été réalisée par trois tests chimiques *in vitro*. Dans un premier temps, on s'intéresse à mesurer l'activité de balayage du radical libre par les fractions antioxydantes en employant le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) comme radical stable, dans un second temps, le test de FRAP qui mesure la capacité d'antioxydants à réduire le complexe ferrique  $[\text{Fe}^{3+} - (\text{TPTZ})_2]^{3+}$  à un complexe ferreux  $[\text{Fe}_2 - (\text{TPTZ})_2]^{2+}$  et enfin le test de phosphomolybdate qui se base sur la réduction de molybdate Mo(VI) en Mo(V) en présence d'un antioxydant, pour former un complexe de Phosphate-Mo(V). En revanche, l'activité antioxydante des extraits lipidiques a été évaluée selon le test DPPH et le test de phosphomolybdate. Tandis que pour nos extraits phénoliques, nous avons décidé d'évaluer leurs activités antioxydantes en utilisant les deux tests utilisés auparavant pour les extraits lipidiques et huiles essentielles plus un troisième à savoir le test ABTS basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique  $\text{ABTS}^+$  par piégeage d'un proton par l'antioxydant.

#### **V-1-1- Test du DPPH**

##### **V-1-1-1- Principe**

Le 2,2'-di (4-*tert*-octylphényl)-1-picrylhydrazyl (DPPH•) est un radical stable qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 517 nm (*P Molyneux et al, 2004*). La réduction du radical libre DPPH• par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance provoquée par la présence des extraits (Figure V.1).

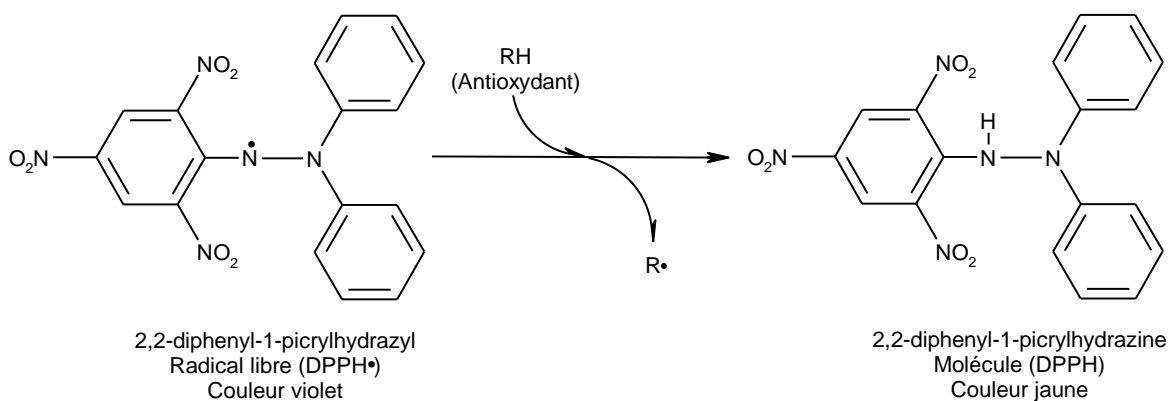


**Figure V.1:** Courbes cinétiques représentant la variation de la densité optique en fonction du temps dans le test du DPPH.

Le radical DPPH· est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie (**Figure V.2**).

Cette décoloration est représentative de la capacité des extraits à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques.

Ce test permet alors, d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances de nos extraits. Il est donc prévu à fournir un lien avec les réactions ayant lieu dans un système d'oxydation, tel que l'autoxydation d'un lipide ou de toute autre substance insaturée.



**Figure V.2 :** Réduction du radical libre DPPH.



### V-1-1-2- Protocole expérimental

1 ml de chaque extrait dilué est additionné à 1ml d'une solution de DPPH (250µM) préparée dans l'éthanol pour les extraits lipidiques et huiles essentielles et dans le méthanol pour les extraits phénoliques. Le mélange réactionnel a été secoué immédiatement, puis il est maintenu à l'obscurité pendant 30 minutes à la température ambiante pour que la réaction s'accomplisse. L'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 517 nm contre un blanc. Les mesures de densités optiques en présence de chaque solution d'extrait à différentes dilutions nous ont permis de calculer le paramètre IC<sub>50</sub> qui représente la concentration d'inhibiteur (antioxydant) nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres. Il faut rappeler que plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est petite plus la capacité antioxydante des extraits est importante (*D Kone, 2009; C S Moreno et al, 1998*). Nous avons également, testé quelques antioxydants commerciaux pris comme antioxydants de référence.

Pour caractériser l'activité antioxydante, l'approche la plus simple dans l'interprétation des données, est de tracer le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'antioxydant, développant une gamme de concentrations qui donne des taux d'inhibition compris entre 20 et 80 % (*W. Brand Williams et al, 1994*). Le pouvoir d'inhibition est exprimé en %, et déterminé en appliquant la relation suivante :

$$I\% = \left( 1 - \left[ \frac{A_{\text{extrait}}}{A_{\text{témoin}}} \right] \right) \times 100$$

Où

A<sub>témoin</sub> : désigne l'absorbance de la solution de DPPH<sup>•</sup> seul à 517 nm ;

A<sub>extrait</sub> : désigne l'absorbance du DPPH<sup>•</sup> en présence de l'extrait testé à 517 nm.

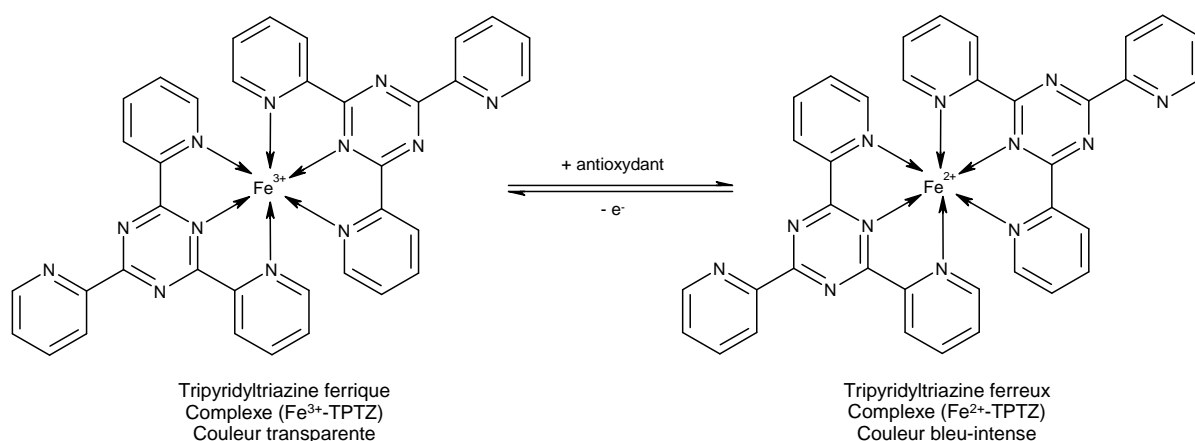
## V-1-2- Test de FRAP

### V-1-2-1- Principe

Le test FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma, ou Ferric Reducing Antioxidant Power) est une technique qui vise la détermination du pouvoir antioxydant total qui sera interprété et exprimé au moyen de la capacité réductrice des antioxydants.

Le mécanisme associé à cette méthode est représenté dans la Figure V.3. Quand le complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ est réduit à la forme  $\text{Fe}^{2+}$  par un antioxydant dans un milieu acide, une couleur bleue intense avec un maximum d'absorption va être développée à 593 nm. Par conséquent, l'effet antioxydant (pouvoir réducteur) peut être évalué en suivant la formation du complexe  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ en employant un spectrophotomètre (*J K Moon et T I Shibamoto, 2009*).

Le test de FRAP est un test qui a été proposé pour la première fois par *Benzie et Strain (1999)*. Récemment, ce test a été utilisé par *Lim et Murtijaya (2007)*, *Netzel et al, (2007)* et *Soobrattee et al, (2008)* pour déterminer l'activité antioxydante pour différentes espèces de plantes.



**Figure V.3:** Mécanisme réactionnel général associé à la méthode du test FRAP.

*Pulido et al, (2000)*, ont mesuré la valeur du FRAP pour plusieurs composés polyphénoliques dans l'eau et dans le méthanol. Toutefois, l'absorption ( $A_{593}$ ) ne s'est pas arrêté après 4 min ; au lieu de cela, elle a augmenté lentement même après plusieurs heures.

Les polyphénols avec de tel comportement, comportent: l'acide caféique, l'acide tannique, l'acide férulique, l'acide ascorbique, et la quercétine. Les valeurs de FRAP pour ces composées ne peuvent pas être précises si le temps adopté de fin de réaction est de 4 min (*Huang et al, 2005*).

#### V-1-2-2- Protocole expérimentale

Une quantité de 1 ml de la solution de FRAP est additionnée aux différents volume des extraits dilués. L'analyse de FRAP est réalisée en suivant le protocole décrit comme suit :

- Une solution tampon de 300 mM d'acétate, pH = 3.6 [ 3.1g d'acétate du sodium tri hydraté , plus 16 ml d'acide acétique glacial, dissoutes dans 1 litre d'eau distillée ].
- Une deuxième solution, est préparé de 10 mM (3.123g) TPTZ (2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine) et de 40 mM (3.269 ml) HCl.
- Une solution aqueuse de 20mM (5.406 g) de  $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ .

Les trois solutions sont mélangées dans le rapport de (10 :1 :1).

L'évaluation de l'activité antioxydante de nos extraits est faite par rapport à l'acide ascorbique phénol utilisé comme antioxydant dans l'industrie agroalimentaire. Il est nécessaire de mettre en évidence l'efficacité de cet antioxydant de référence à ce test, et cela en traçant une courbe d'étalonnage.

A partir de la valeur de l'absorbance du milieu mesurée en présence de l'extrait antioxydant , de la pente de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique obtenues à 593 nm effectuées dans un spectrophotomètre UV-Visible de type Shimadzu 1601, nous avons déterminé les coefficients de l'activité antioxydante des extraits étudiés exprimée en valeur d'AEAC (Ascorbic acid Equivalent Antioxidant Capacity)

### V-1-3- Test de Phosphomolybdate (PPM)

#### V-1-3-1- Principe

Au cours de ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé réducteur (extrait antioxydant) vers le complexe oxydant phosphomolybdate (PPM). Ce transfert dépend du potentiel redox, du pH du milieu et de la structure du composé antioxydant. En effet, le test du (PPM) est basé sur la réduction du molybdène du degré d'oxydation (VI) au degré d'oxydation (V) en présence de l'antioxydant. Cette réduction, se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/ Mo (V)) à un pH acide. La diminution de la coloration du complexe molybdène (VI) est mesurée par spectrométrie UV- Visible à une longueur d'onde de 695 nm (*S Albayrak et al, 2010*).

En fait, cette méthode permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des extraits mais aussi d'autres composés antioxydants tels que les vitamines (C, E...) (*F. N. Muanda, 2010*).

#### V-1-3-2- Protocole expérimentale

Ce test consiste à mélanger 200 µL de chaque dilution méthanolique de l'extrait avec 2 mL d'un réactif d'une solution aqueuse composé de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,6 M), de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Le mélange est ensuite incubé à bain marie à 70°C pendant 90 min. la mesure de l'absorbance est effectuée dans un spectrophotomètre UV Visible de type Shimadzu 1601 à 695 nm contre un blanc. Le standard choisi a été traité dans les mêmes conditions. Le pouvoir antioxydant est déterminé par le rapport des pentes de la courbe d'étalonnage est ceux des extraits.

### V-1-4- Le test du radical cation ABTS<sup>•+</sup>

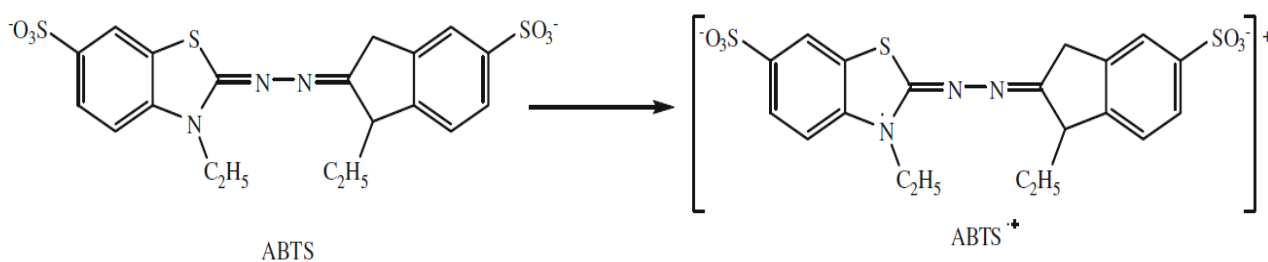
#### V-1-4-1- Principe

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS<sup>•+</sup> de coloration vert- bleu en le transformant en ABTS incolore, en présence de l'antioxydant (extraits phénoliques ou autres).

Le radical préformé [2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] ou  $ABTS^{++}$  est généré en présence de la peroxydase ; préparée dans une solution tampon pH= 5, la réaction est initiée avec l'ajout de la solution de peroxyde d'hydrogène.



En présence d'un antioxydant (extraits phénoliques ou autres), le passage du radical  $ABTS^{++}$  à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de la coloration vert-bleu intense qui peut être suivie par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 415 nm (*I. Chen et al, 2004*).



**Figure V.4:** Forme réduite ABTS, forme radical cation  $ABTS^{++}$

#### V-1-4-2- Protocole expérimental

Pour pouvoir générer le radical cationique  $ABTS^{++}$ , nous avons préparé trois solutions différentes constituées ; d'une solution aqueuse d'ABTS (20mM) ; une solution aqueuse de  $H_2O_2$  (1mM) et une solution de la peroxydase (préparée dans un tampon phosphate pH=5) de concentration massique (0,2 mg/mL).

Le mélange des trois solutions présente une coloration bleu-vert correspondant à la formation du radical cationique  $ABTS^{++}$ .

1 mL de la solution verdâtre d' $ABTS^{++}$  est ajouté à 100  $\mu$ L de chaque dilution de l'extrait, le mélange est en suite agité puis incubé pendant 5 min à l'obscurité. La mesure de l'absorbance

du milieu réactionnel est faite dans un spectrophotomètre UV Visible de type Shimadzu 1601 à 415 nm contre un blanc.

Le pourcentage d'inhibition de l'ABTS<sup>•+</sup> pour chaque extrait a été calculé selon la formule ci-dessous :

$$I\% = 100 \times (A_0 - A_C) / A_0$$

Où

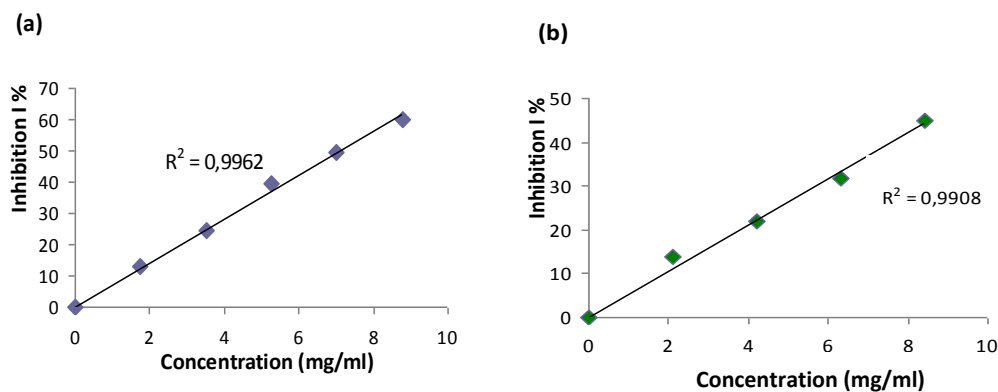
A<sub>0</sub> : est l'absorbance initiale en absence de composé à tester.

A<sub>C</sub> : est l'absorbance mesurée après 5 min de mise en présence avec l'extrait.

## **V-2- Activité antioxydante des lipides des fleurs de *Rhanterium adpressum***

### **V-2-1- Activité antioxydante des lipides en utilisant le test DPPH**

La mesure du pourcentage d'inhibition du DPPH<sup>•</sup> provoquée par la présence des extraits après 30 minutes ont permis de déterminer graphiquement les valeurs de IC<sub>50</sub> à partir des droites présentées ci-dessous (Figure V.5) des extraits et les antioxydants synthétiques. Pour les régressions linéaires trouvées, elles sont obtenues avec d'excellents coefficients de corrélations R<sup>2</sup> qui confirme l'effet de la variation proportionnelle directe des variables des ordonnées en fonction des abscisses dans l'intervalle de concentration adopté. Les résultats sont consignés dans le Tableau V.1.



**Figure V.5:** Courbes représentant l'activité antioxydante des deux extraits lipidiques du test DPPH (a) : lipides mai, (b) : lipides mars

Nous avons choisi la vitamine C et la vitamine E comme antioxydants synthétiques pour d'éventuelles comparaisons avec nos extraits.

L'activité antioxydante la plus élevée a été enregistrée pour l'extrait lipidique du mois de mai avec 7.121 mg/ml contre 9.842 mg/ml (Tableau V.1) pour celui du mois mars. Cette activité est due possiblement à l'existence des composés phénoliques dans l'extrait lipidique y compris les tocophérols, ou bien à une structure majoritaire présente dans cette fraction lipidique.

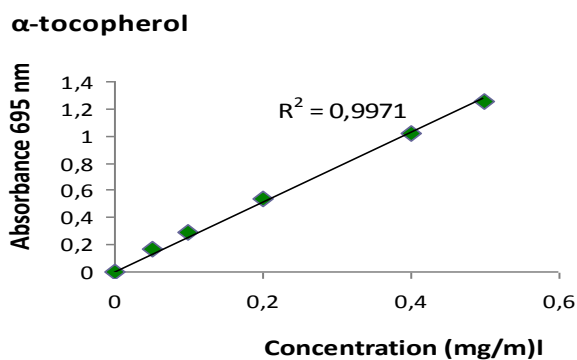
La capacité antioxydante des lipides testés se trouve faible en les comparants avec des antioxydants synthétiques choisis (la vitamine C et la vitamine E). En effet, les lipides du mois de mai et du mois de mars sont respectivement 395 et 546 fois moins actifs que la vitamine C, alors que pour la vitamine E, ils sont 285 et 395 moins actifs.

**Tableau V.1:** Les valeurs d' IC<sub>50</sub> des extraits lipidiques et des antioxydants standards.

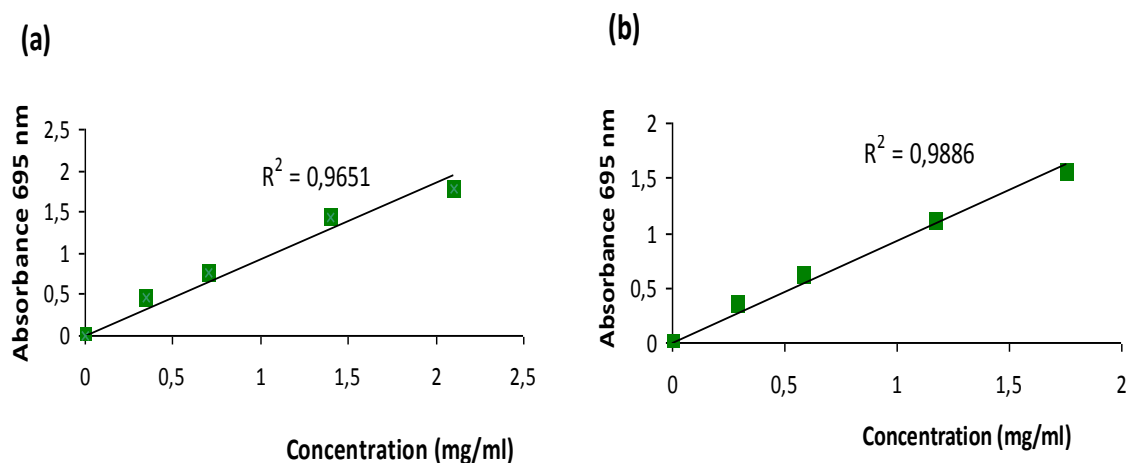
Lipides	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
Mars	9,842 ± 0,192
Mai	7,121 ± 0,194
Vitamine C	0,018 ± 0,001
Vitamine E	0,025 ± 0,002

### V-2-2- Activité antioxydante des lipides en utilisant le test Phosphomolybdate

Nous avons choisi la vitamine E comme antioxydant de référence, en traçant une courbe d'étalonnage pour pouvoir calculer l'activité antioxydante des extraits lipidiques exprimée en VEEAC (Vitamine E Equivalent Antioxydant Capacity) (Figure V.6).

**Figure V.6:** Courbe d'étalonnage de la vitamine E





**Figure V.7:** Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration des extraits (a) : lipides mars, (b) : lipides mai.

Nous avons aussi tracé les courbes représentant la variation de l'absorbance des extraits lipidiques en fonction de leurs concentrations (Figure V.7).

Les résultats de ce test sont illustrés dans le tableau suivant:

**Tableau V.2:** l'activité antioxydante des huiles essentielles de fleurs de *Rhanterium adpressum* et de l'antioxydant de référence Vitamine C (Test Phosphomolybdate)

Lipides	Test Phosphomolybdate VEEAC(mg/ml)
Mars	$0,361 \pm 0,023$
Mai	$0,4 \pm 0,077$
Vitamine C	$4.9 \pm 0.03$

Il est clair que les valeurs de VEEAC des extraits lipidiques des fleurs de *Rhanterium adpressum* sont assez proches avec 0.361 mg/ml et 0.4 mg/ml pour le mois de mars et le mois de mai respectivement (Tableau V.2). En revanche, l'antioxydant utilisé comme référence (la vitamine C) dévoile une activité antioxydante 12 fois plus élevée que l'extrait lipidique le plus fort en pouvoir antioxydant.

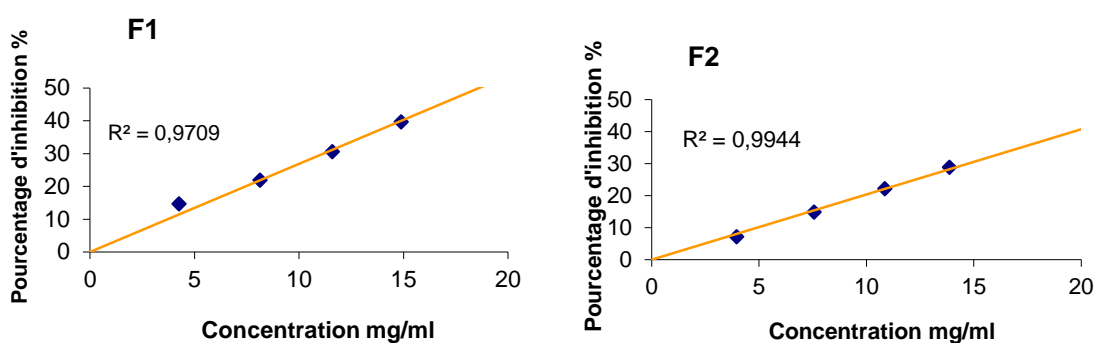
### V-2-3- Conclusion

L'examen des résultats de ces deux tests montre que le pouvoir antioxydant des extraits lipidiques varie dans le même sens mais avec des teneurs différentes dû aux différents antioxydants qu'il contiennent vis-à-vis des tests utilisés, par donation de protons en piégeant le radical libre DPPH ou la réduction des radicaux par transfert d'électrons dans la méthode de phosphomolybdate.

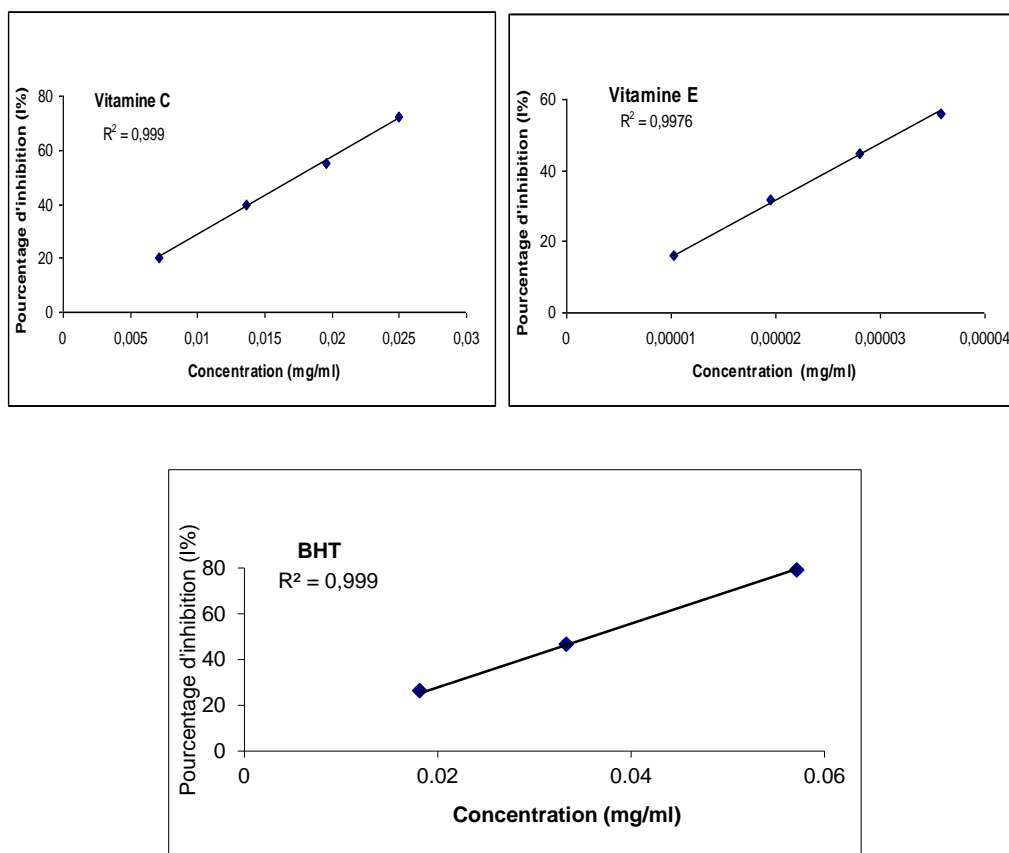
### V-3- Activité antioxydante des huiles essentielles de fleurs de *Rhanterium adpressum*

#### V-3-1- Activité antioxydante des huiles essentielles en utilisant le test DPPH

Les résultats des tests DPPH montre qu'il existe une proportionnalité linéaire entre la concentration des huiles essentielles et le pourcentage d'inhibition dans l'intervalle pris en compte, avec des facteurs de corrélation  $R^2$  dépassant 0,994. En utilisant ces relations de linéarités, la concentration de l'huile essentielle permettant d'inhiber 50% des radicaux libres DPPH a été déterminée. La vitamine C, la vitamine E et le BHT sont les antioxydants de références utilisés pour d'éventuels motifs de comparaisons. Les résultats du pouvoir antioxydant des huiles essentielles ainsi que celui des antioxydants de références sont représentés dans les Figures V.8 et V.9; la moyenne des pourcentages d'inhibition de trois essais est exprimée en fonction des concentrations pour tous les échantillons.



**Figure V.8:** Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des huiles essentielles des fleurs de *Rhanterium adpressum*



**Figure V.9:** Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des antioxydants de références.

Les valeurs obtenues d' $IC_{50}$  des échantillons F1 et F2 sont 18.5 et 24.1 mg/ml respectivement (Tableau V.3). D'après ces résultats, la capacité antiradicalaire la plus élevée est attribuée à l'échantillon F1.

En comparant les valeurs  $IC_{50}$ , des différents standards entre eux, nous constatons que la vitamine C est dotée de l'activité antioxydante la plus importante avec une valeur d' $IC_{50}$  égale à 0.018 mg/ml et qui est 1027 fois plus active que l'huile essentielle la plus active. L' $IC_{50}$  de la vitamine E atteint la valeur de 0.025 mg/ml, celui du BHT est égale à 0.036 mg/ml qui montre ainsi la plus faible activité antioxydante.

**Tableau V.3:** l'activité antioxydante des huiles essentielles de fleurs de *Rhanterium adpressum* (Test DPPH)

	Test DPPH IC <sub>50</sub> (mg/ml)
<b>F1</b>	18,5±0.04
<b>F2</b>	24.1±0.05
<b>Vitamine C</b>	0.018±0.001
<b>Vitamine E</b>	0.025±0.002
<b>BHT</b>	0.036±0.001

D'après ces résultats, il est clair que nos échantillons présentent une activité antioxydante très faible vis-à-vis des antioxydants de références.

Dans une étude faite par *H Aouissi (2011)* sur des plantes du genre *Artemisia* de l'Algérie à savoir: *A.herba alba*, *A.campestris* et *A. absinthium*, montre des valeurs d' IC<sub>50</sub> qui varient entre 5.45 et 28.52 mg/ml d'où l'activité antioxydante la plus élevée est attribuée à l'huile essentielle d' *A. absinthium*.

*Akrout et al, (2011)* ont étudié l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*A. campestris* de Tunisie par la méthode du DPPH. Le résultat révèle un IC<sub>50</sub> de 94.4 mg/ml. Cette activité est largement plus faible que celle des huiles essentielles de notre étude cette différence pourrait être attribuée à la diversité de la composition chimique de ces huiles d'origines différentes.

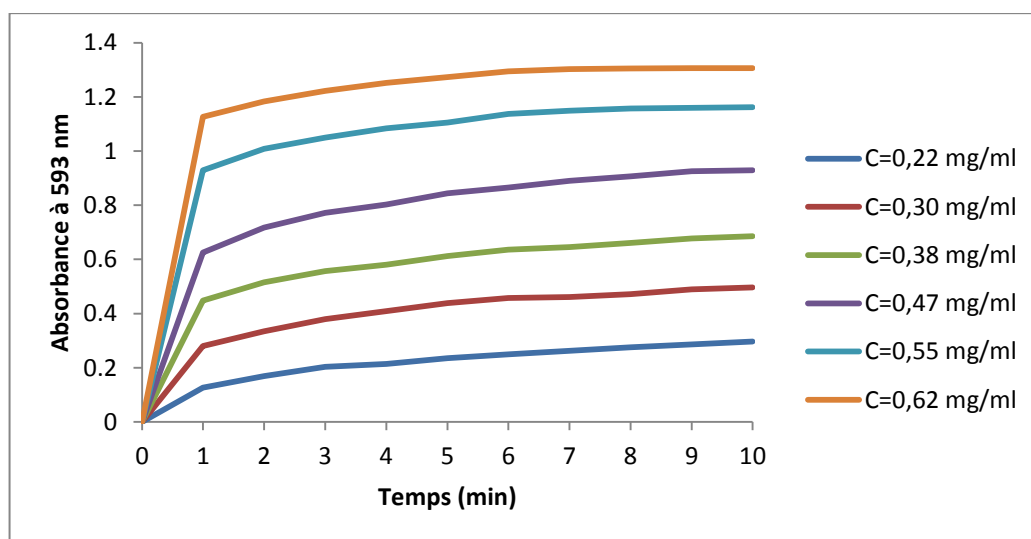
*Mighiri et al,(2010)* ont expliqué la présence de la faible activité antioxydante des huiles essentielles de plusieurs chémotypes d'*A. herba alba* en Tunisie, par la dominance des composés non phénoliques dans ces huiles, sachant que les composés phénoliques sont dotés d'une activité antioxydante importante. La faible activité de ces huiles apportées par ces auteurs est en accord avec nos résultats.

Toutefois, d'après tous ces résultats, nous pouvons déduire que le pouvoir antioxydant des huiles essentielles des fleurs du *Rhanterium adpressum* est inférieur à celui des espèces citées

auparavant; ce qui montre que nos huiles essentielles sont dotées d'une faible activité antiradicalaire dû possiblement à la dominance des composés monoterpéniques hydrocarbures ( non oxygénés) (G Ruberto et M T Baratta, 2000; B Tepe et al, 2007) à titre d'exemple: le camphène, le  $\beta$ -pinène, le myrcène et le limonène.

### V-3-2- Activité antioxydante des huiles essentielles en utilisant le test FRAP

En se basant sur l'article de référence du test FRAP (voir aperçu bibliographique), le temps de fin de réaction adopté est de 6 min, temps jugé pratiquement suffisant pour atteindre la fin de l'évolution de la réaction réductrice. Afin de déterminer expérimentalement le temps de fin de cette réaction, nous avons préparé une série de concentrations d'huiles essentielles dans des solutions FRAP, l'évolution de l'absorbance a été suivie en fonction du temps (Figure V.10). Cette expérience confirme l'hypothèse qu'un temps de 6 min est assez adéquat pour donner pratiquement des résultats satisfaisants. Néanmoins, dans cette étude on a opté pour un seul temps de fins de réactions : 10 min.



**Figure V.10:** Test FRAP : L'évolution de l'absorbance à 593 nm en fonction du temps de la réaction pour différentes concentrations de l'échantillon d'huile essentielle de fleurs F1 de *Rhanterium adpressum*.

Les résultats sont exprimés en AEAC (Ascorbic acid Equivalent Antioxydant Capacity). Plus la valeur de AEAC est importante, plus le pouvoir antioxydant des extraits est important (M R Saha et al, 2008). Ce paramètre est défini comme étant la concentration de la solution

standard de la vitamine C possédant la capacité antioxydante équivalente à une solution de 1 mM de la substance étudiée (extrait).

Les valeurs trouvées de l'AEAC des extraits huiles essentielles de fleurs de *Rhanterium adpressum* sont assez proche avec: 0.46 et 0.5 mg/ml pour les échantillons F1 et F2 respectivement (Tableau V.4). Pour les valeurs obtenus ci-dessus, on rappelle que le temps de fin de réaction est pris égal à 10 minutes.

**Tableau V.4:** L'activité antioxydante des huiles essentielles de fleurs de *Rhanterium adpressum* et de quelques antioxydants de référence synthétiques (Test FRAP)

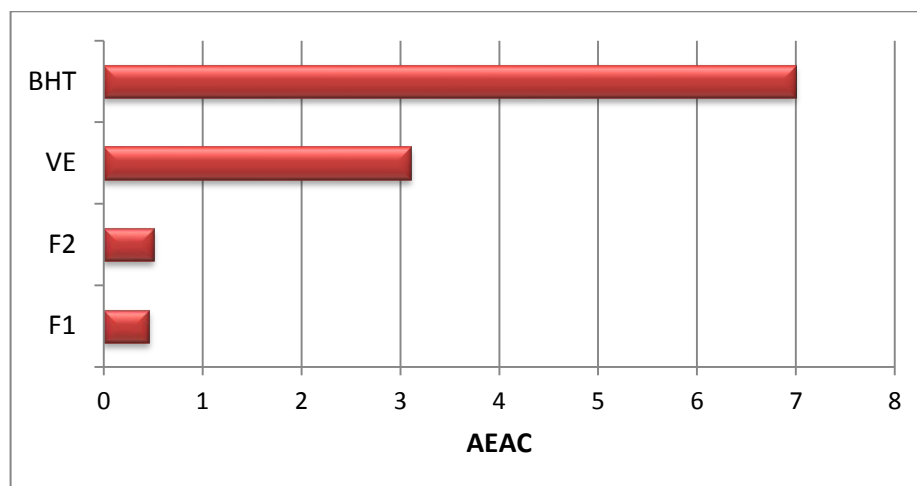
	<b>Test FRAP</b> <b>AEAC(mg/ml)</b>
<b>F1</b>	0.46±0.01
<b>F2</b>	0.5±0.01
<b>Vitamine E</b>	3.1±0.2
<b>BHT</b>	7.0±0.2

Les valeurs des activités des huiles essentielles ont été comparées avec celles des antioxydants de référence: le BHT et la vitamine E (Figure V.11).

Ces résultats illustrent que plus la valeur d' AEAC est élevée, plus le pouvoir réducteur est important. Ainsi, la capacité antioxydante totale des huiles essentielles et des antioxydants de référence est classée dans l'ordre décroissant suivant:

$$\text{BHT} > \text{VE} > \text{F2} > \text{F1}$$

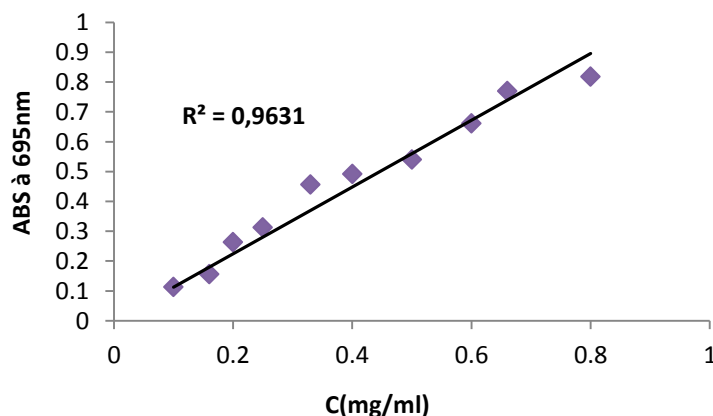
Il est clair que les huiles essentielles sont beaucoup moins actives que le BHT et la vitamine E, et que le BHT est doublement plus actif que la vitamine E.



**Figure V.11:** Histogramme montrant l'évolution du pouvoir réducteur (AEAC) des huiles essentielles de fleurs de *Rhanterium adpressum* ainsi que les antioxydants de références (test: FRAP).

### V-3-3- Activité antioxydante des huiles essentielles en utilisant le test phosphomolybdate

L'évaluation de l'activité antioxydante de nos extraits est faite par rapport à la vitamine E utilisée comme antioxydant dans l'industrie agroalimentaire. Il est nécessaire de mettre en évidence l'efficacité de cet antioxydant de référence à ce test, et cela en traçant une courbe d'étalonnage (Figure V.12). L'activité antioxydante a été exprimée en valeur VEEAC (Vitamine E Equivalent Antioxydant Capacity).



**Figure V.12:** Courbe d'étalonnage de la vitamine E

A la lumière des résultats, les deux extraits d'huiles essentielles ont exhibé des activités très proches avec des valeurs de VEEAC égales à 0.2 et 0.15 mg/ml pour l'échantillon F1 et F2 respectivement (Tableau V.5). D'autre part l'antioxydant utilisé comme référence (la vitamine C) représente un pouvoir 24 fois plus élevé que les extraits d'huiles essentielles F2.

**Tableau V.5:** l'activité antioxydante des huiles essentielles de fleurs de *Rhanterium adpressum* et de l'antioxydant de référence Vitamine C (Test Phosphomolybdate)

	<b>Test Phosphomolybdate</b>
	<b>VEEAC(mg/ml)</b>
<b>F1</b>	0.15±0.01
<b>F2</b>	0.2±0.01
<b>Vitamine C</b>	4.9±0.03

#### V-3-4- Conclusion

Les trois tests employés *in vitro* DPPH, FRAP et phosphomolybdate sont des tests complémentaires d'activité antioxydante, le test DPPH mesure la capacité de piégeage des radicaux libres présents dans un milieu organique peu polaire, tandis que le test FRAP et phosphomolybdate mesurent le pouvoir réducteur de la substance étudiée à réduire les ions métalliques présents dans un milieu aqueux acide.

L'examen des résultats de ces tests montre clairement que l'activité antioxydante ne varie pas dans le même sens, donc, il nous a paru difficile de comparer entre les activités obtenues par ces trois tests différents. Des explications peuvent être données pour justifier cette incohérence: milieux réactionnels différents (solvants, pH, substrats), différents modes d'action entre les antioxydants et les substrats (donation de protons en piégeant des radicaux libres DPPH et réduction des radicaux par transfert d'électrons dans la méthode de FRAP et de phosphomolybdate), et différentes manières d'exprimer les résultats de ces derniers.

Notons aussi que l'ordre de la capacité antioxydante des extraits huiles essentielles F1 et F2 est relativement différent avec leur contenu en composés *phénoliques* (revoir Chapitre III ),



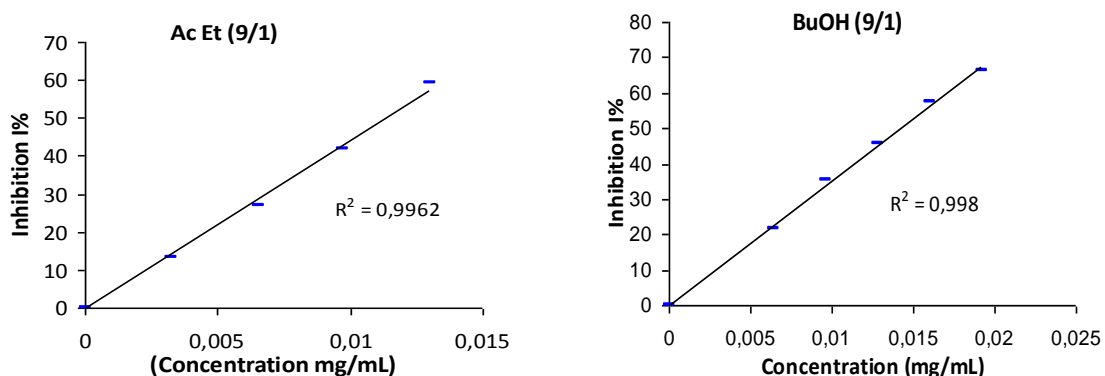
ainsi nous joignons la conclusion de **Hossain et Shah (2011)**, qui révèle que l'activité antioxydante d'un extrait ne pourrait pas être expliquée sur la seule base de la teneur en composés phénoliques; mais en plus de prendre en considération le type de ces molécules.

De ce fait on conclue que l'activité antioxydante des huiles essentielles dépend de la structure des antioxydants renfermés dans leurs extraits.

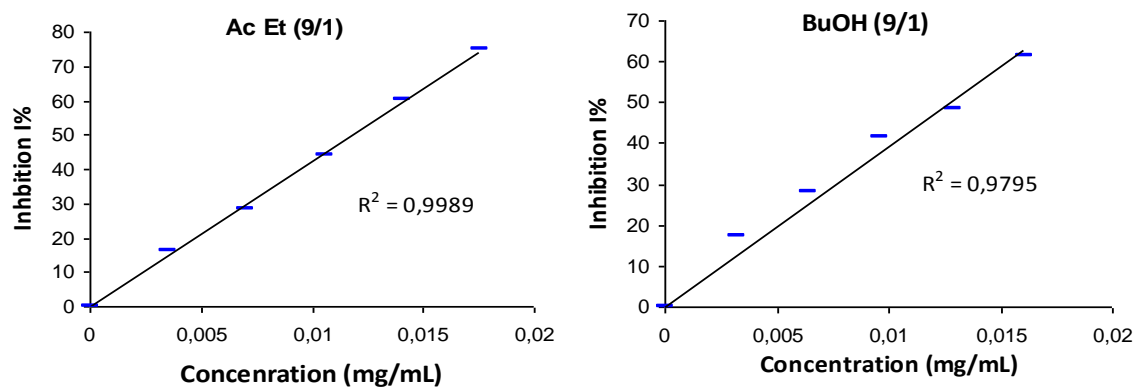
#### **V-4- Activité antioxydante des extraits phénoliques des fleurs de *Rhanterium adpressum***

##### **V-4-1- Activité antioxydante des extraits phénoliques en utilisant le test DPPH**

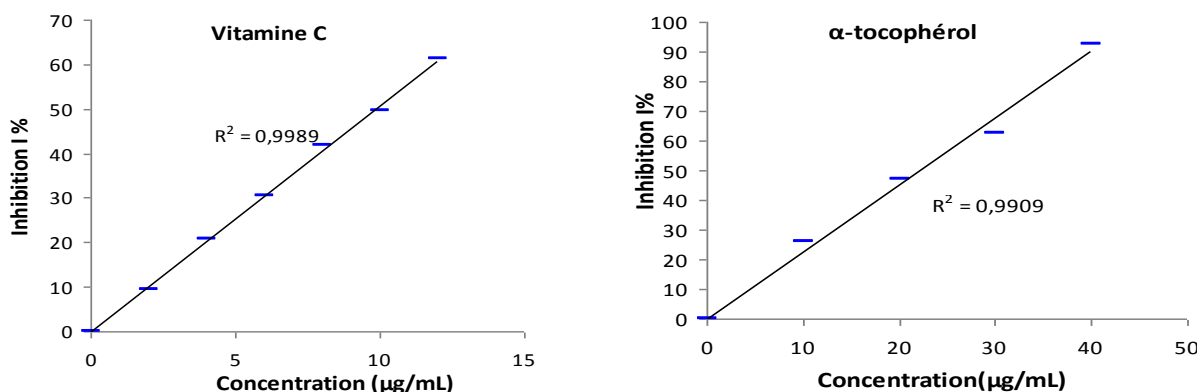
Les valeurs obtenues des taux d'inhibition (I% de chaque extrait), nous ont permis de tracer les graphes illustrant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en composés phénoliques issus d'une extraction (acétone/eau) et (méthanol/eau) de différentes polarités (Figure V.13 et Figure V.14). Afin de comparer les activités antioxydantes de nos extraits, nous avons tracé les deux courbes (Figures V.15) qui représentent la variation des pourcentages d'inhibition (I%) en fonction des concentrations en  $\mu\text{g/ml}$  des deux antioxydants standards choisis pour cette étude à savoir, la vitamine C et l' $\alpha$ -tocophérol.



**Figure V.13:** Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration en phénols des extraits d'acétate d'éthyle et de butanol issus d'une extraction (acétone/eau).



**Figure V.14:** Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration en phénols des extraits d'acétate d'éthyle et de butanol issus d'une extraction (méthanol/eau).



**Figure V.15:** Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration en antioxydants standards.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage de réduction de DPPH $\cdot$  (I%), pour une concentration en antioxydant (extrait phénolique) donnée. Le paramètre « IC<sub>50</sub> » (concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale en DPPH $\cdot$ ) a été calculée pour chaque extrait (Tableau V.6). De même, nous avons calculé les IC<sub>50</sub> de la vitamine C et de l'α-tocophérol choisis comme antioxydants standard dans ce test.

**Tableau V.6:** Les valeurs d'IC<sub>50</sub> en (µg/ml) des différents extraits issus de l'extraction (acétone/eau) et (méthanol/eau).

Ordre de polarité (V/V)	Fraction	IC <sub>50</sub> « µg/ml » (acétone/eau)	IC <sub>50</sub> « µg/ml » (méthanol/eau)
9/1	Ac.Et	11,36 ± 0,4	11,75 ± 0,72
	BuOH	12,72 ± 0,31	12,65 ± 0,29
8/2	Ac.Et	12,31 ± 0,5	11,81 ± 0,49
	BuOH	11,90 ± 0,05	10,94 ± 0,02
7/3	Ac.Et	12,73 ± 0,07	11,14 ± 0,08
	BuOH	11,43 ± 0,06	10,51 ± 0,36
6/4	Ac.Et	12,98 ± 0,02	10,35 ± 0,26
	BuOH	12,91 ± 0,12	10 ± 0,42
5/5	Ac.Et	12,19 ± 0,38	10,57 ± 0,26
	BuOH	12,5 ± 0,17	10,48 ± 0,10
<b>Antioxydants standards</b>			
Vitamine C		9,85	
α-tocophérol		22.13	

Ac.Et : extrait d'acétate d'éthyle ; BuOH : extrait butanolique

En analysant l'ensemble des résultats obtenus dans le Tableau V.6 et sachant que le paramètre IC<sub>50</sub> est inversement proportionnel à l'activité antioxydante, nos résultats montrent clairement que les extraits phénoliques des fleurs de *Rhanterium adpressum* possèdent un potentiel antioxydant important comparable avec celui des antioxydants de références utilisés dans ce test et même supérieur à celui de la vitamine E.

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> des extraits obtenus par les deux méthodes d'extraction (acétone/eau) et (méthanol/eau) varient globalement entre 10,36 et 12,91 µg/ml.

L'IC<sub>50</sub> des extraits d'acétate d'éthyle varie entre 10,35 et 12,98 µg/ml et entre 10 et 12,91 µg/ml pour les extraits butanoliques. Donc, nous remarquons que les valeurs d'IC<sub>50</sub> les plus faibles ont été obtenues dans les extraits butanoliques issus d'une extraction (méthanol/eau), ce qui peut être expliqué par leurs richesse en tanins et en flavonoïdes dont l'activité antiradicalaire a été largement documentée (*E. Grotewold, 2006; S Ivancheva et al 2006; R Amarowicza et al 2000*).

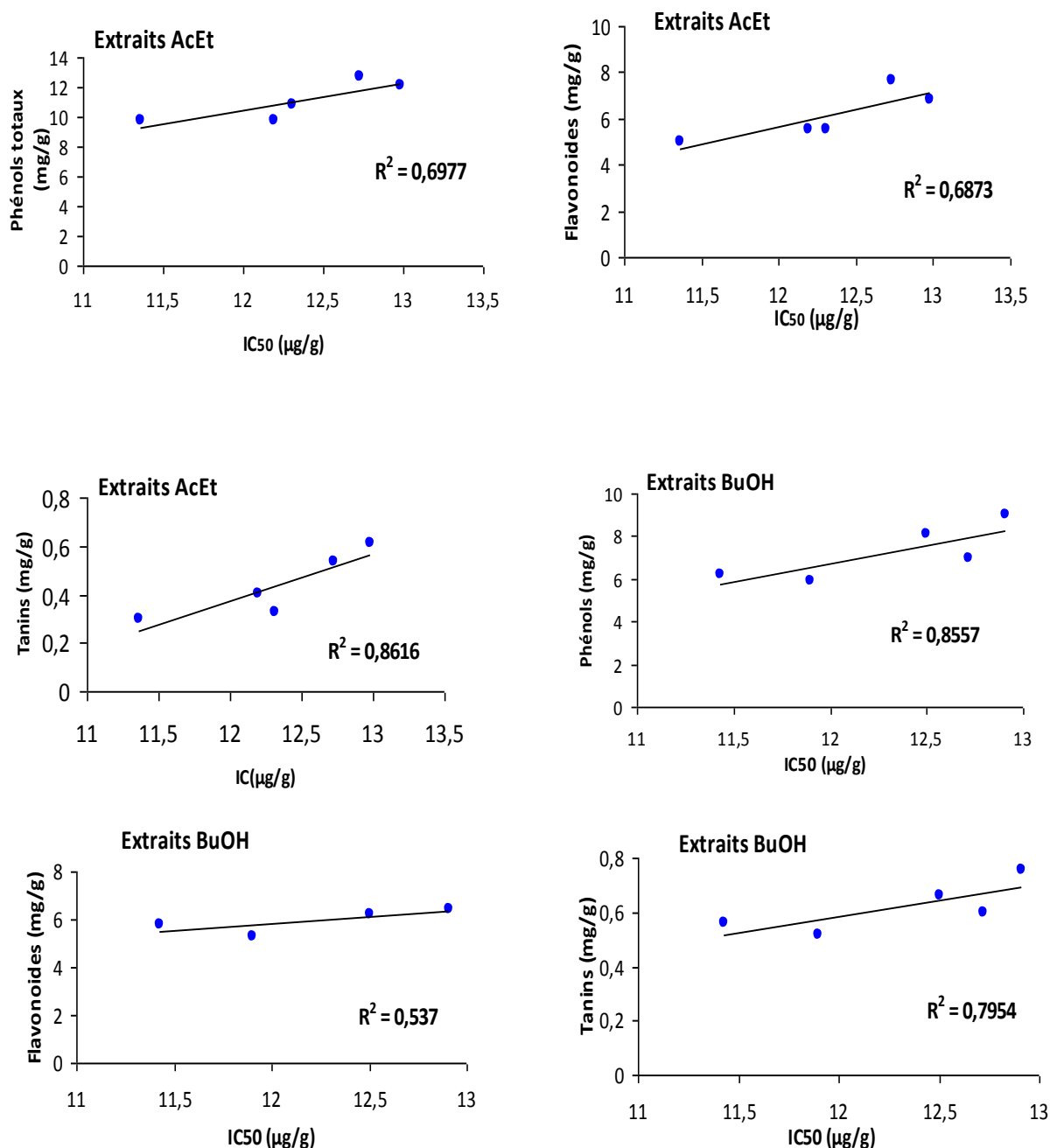
En changeant de polarité, nous remarquons aussi que tous les extraits d'acétate d'éthyle et les extraits butanoliques possèdent presque les mêmes valeurs d'IC<sub>50</sub>; une faible variation entre les extraits d'acétate d'éthyle et les extraits butanoliques issus d'une extraction par les deux systèmes de solvant (acétone/eau) et (méthanol/eau) de différente polarité. Ce qui peut être expliqué par le fait que ces différentes fractions d'acétate d'éthyle et butanolique issus de différentes macérations renferment les mêmes structures de composés phénoliques. Cette même constatation, a été aussi observée par *Spigno et al. (2007)* qui ont essayé d'étudier l'effet de la polarité sur l'activité antioxydante.

Le test du radical libre DPPH<sup>•</sup> est largement utilisé dans l'étude des composés phénoliques en raison de leur facilité de mise en œuvre et de sa rapidité ; temps d'incubation 30 min. De plus, les conditions utilisées (solvants organiques et faible température) permettent d'éviter l'auto oxydation des molécules testées et aussi de comparer un grand nombre de composés (*N Belkheiri, 2010*).

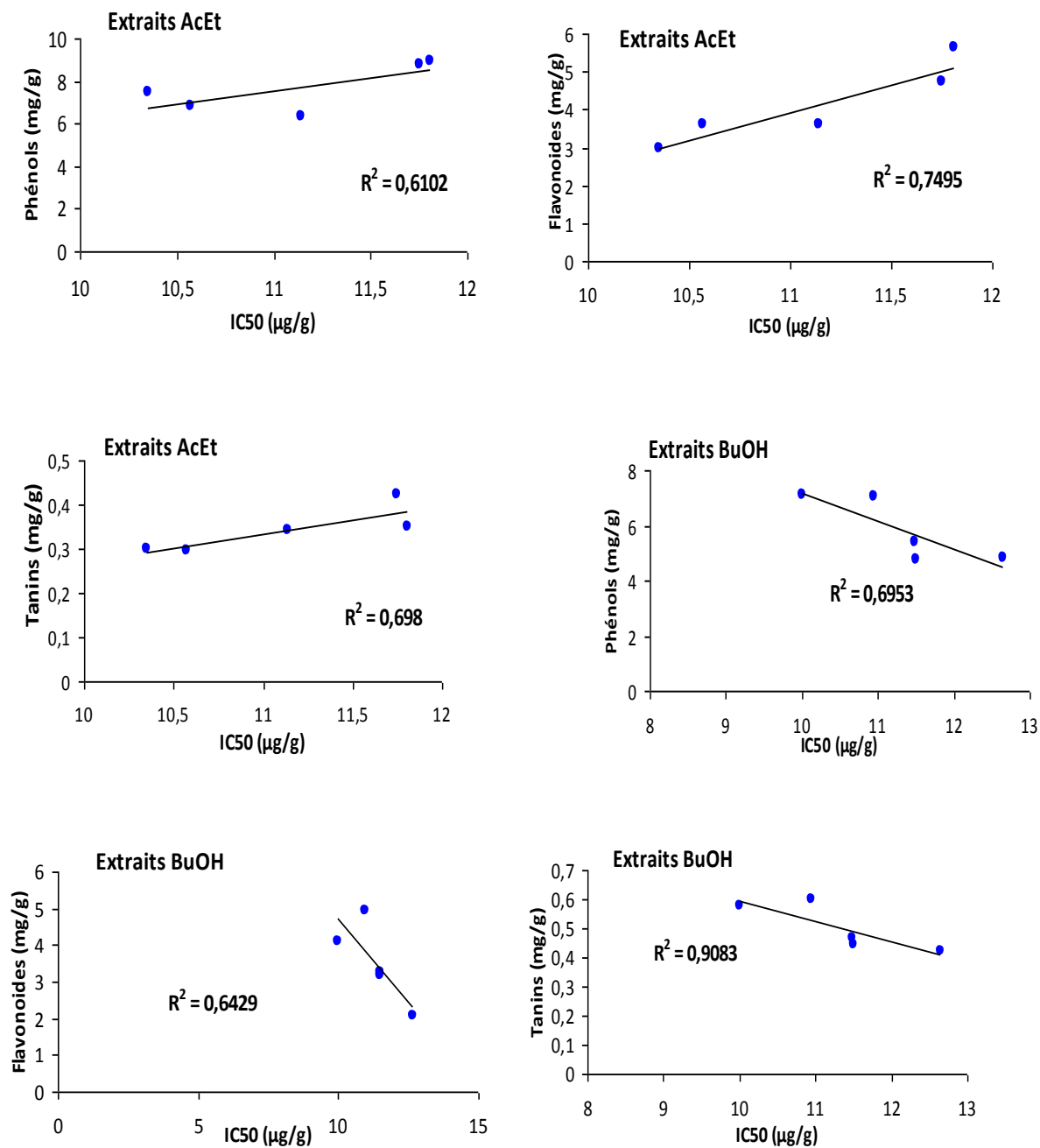
En revanche, le radical DPPH<sup>•</sup> pose le problème de son instabilité à la lumière vu que son absorbance à 517 nm décroît sans l'intervention de quelconque antioxydant (*E Portes, 2008*). C'est pourquoi les tests réalisés avec le DPPH<sup>•</sup> doivent impérativement se faire à l'obscurité. Ce même inconvénient, peut expliquer la légère variation entre les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues à partir des différents extraits d'acétate d'éthyle et des extraits butanoliques.

Nos extraits d'acétate d'éthyle et ceux butanolique ont prouvé leur fort pouvoir antioxydant par le test du DPPH ce qui est le cas pour la majorité des plantes appartenant aux Astéracées, famille riche en composés phénoliques très divers (*M Neacsu, 2007; P CH Hollman1 et I*

CW Arts, 2000). D'après les résultats obtenus dans le chapitre IV, nous avons pu constater que nos extraits phénoliques sont riches en flavonoïdes et en tanins. Pour cette raison, nous avons voulu étudier l'existence d'une corrélation entre les valeurs d'IC<sub>50</sub> et les teneurs en phénols totaux, et celles des flavonoïdes et de même pour les tanins (Figure V.16 et V.17).



**Figure V.16:** Variation des valeurs d'IC<sub>50</sub> en fonction des teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins des extraits issus d'une extraction (acétone/eau).



**Figure V.17:** Variation des valeurs d'EC<sub>50</sub> en fonction des teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins des extraits issus d'une extraction (méthanol/eau).

À travers les graphes des (Figure V.16 et V.17), une corrélation linéaire positive et significative a été mise en évidence entre la capacité antioxydante et la teneur en phénols

totaux. Notons en outre, des corrélations positives entre le pouvoir antiradicalaire et les teneurs en flavonoïdes et les teneurs en proanthocyanidines.

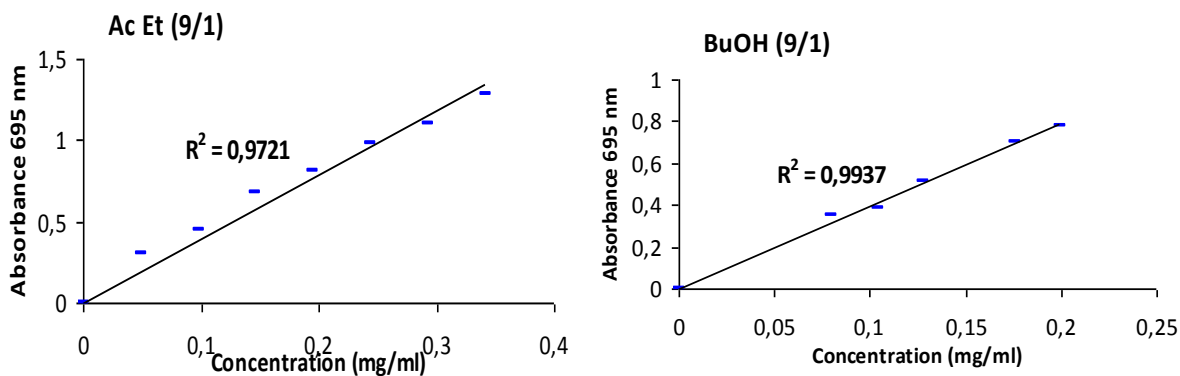
Par conséquent, nous pouvons conclure, dans ce cas que, la capacité antioxydante de nos extraits est fortement dépendante à la présence des composés phénoliques.

L'existence d'une bonne corrélation entre la capacité antioxydante et les teneurs en tanins a été observée pour tous les extraits d'acétate d'éthyle et les extraits butanoliques avec un coefficient de corrélation maximum de 0,9083. Ce qui nous montre, que l'essentiel de l'activité antioxydante est due à la présence des tanins dans nos extraits sans nier le rôle des flavonoïdes par leurs contributions aux propriétés antioxydantes.

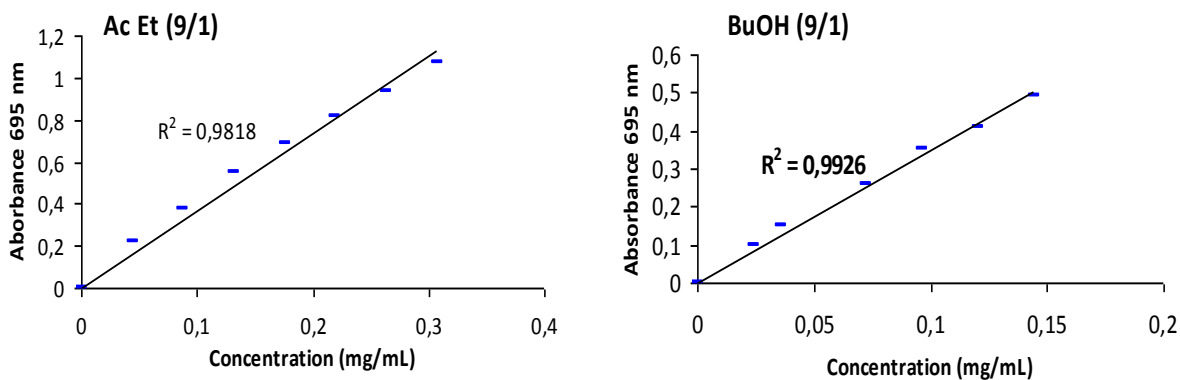
#### **V-4-2- Activité antioxydant des extraits phénoliques en utilisant le test du phosphomolybdate**

Les courbes exprimant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en composés phénoliques issus d'une extraction (acétone/eau) et (méthanol/eau) de différentes polarités sont présentées dans les Figures V.18 et V.19. De plus, nous avons tracé les courbes des deux antioxydants de synthèse (vitamine C et E) (Figure V.20) afin de référer le pouvoir antioxydant de nos extraits à celui de la vitamine C.

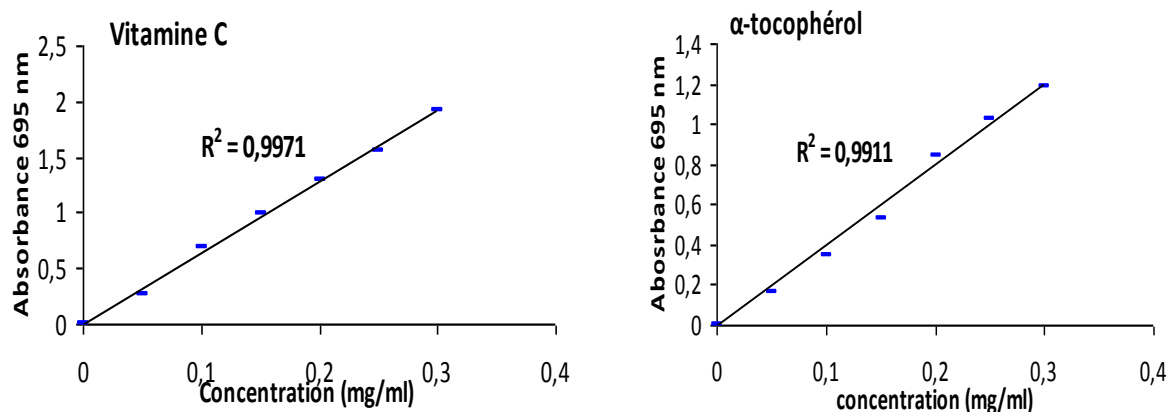




**Figure V.18:** Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction (acétone/eau).



**Figure V.19:** Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction (méthanol/eau).



**Figure V.20:** Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en antioxydants de référence.

L'activité antioxydante de nos extraits a été référée à celle de la vitamine C en termes d'équivalence. Donc, à partir des pentes tirées des graphes ci-dessus, nous avons calculé le paramètre AEAC (Ascorbic Acid Antioxydant Capacity) pour chaque extrait (Tableau V.7).

**Tableau V.7:** Les AEAC des différents extraits issus de l'extraction (acétone/eau) et (méthanol/eau) et de l'  $\alpha$ -tocophérol

Ordre de polarité	Fraction	« AEAC »	« AEAC »
		(acétone/eau)	(méthanol/eau)
9/1	Ac.Et	1,08 $\pm$ 0,4	1,03 $\pm$ 0,02
	BuOH	1,10 $\pm$ 0,14	1,01 $\pm$ 0,12
8/2	Ac.Et	1,08 $\pm$ 0,14	1,08 $\pm$ 0,29
	BuOH	1,08 $\pm$ 0,03	1,20 $\pm$ 0,27
7/3	Ac.Et	1,08 $\pm$ 0,36	1,06 $\pm$ 0,24
	BuOH	1,10 $\pm$ 0,15	1,16 $\pm$ 0,25
6/4	Ac.Et	1,06 $\pm$ 0,14	0,98 $\pm$ 0,02
	BuOH	1,14 $\pm$ 0,42	1,13 $\pm$ 0,08
5/5	Ac.Et	0,99 $\pm$ 0,31	0,94 $\pm$ 0,19
	BuOH	1,10 $\pm$ 0,15	1,05 $\pm$ 0,25
<b>Antioxydant standard</b>		<b>« AEAC »</b>	
$\alpha$ -tocophérol		0,83 $\pm$ 0,08	

Ac.Et : extrait d'acétate d'éthyle ; BuOH : extrait butanolique

Comme mentionné précédemment, les graphes tracés ci-dessus nous ont servis à déterminer le paramètre AEAC pour les différents extraits. Ainsi, toutes les valeurs supérieures à un (1) indiquent une grande capacité antioxydante de nos composés phénoliques.

D'après les résultats obtenus (Tableau V.7), nous remarquons que l'ensemble des extraits d'acétate d'éthyle et des extraits butanoliques montrent des activités antioxydantes importantes et dont les AEAC varient globalement entre 0,94 à 1,08 et de 1,01 à 1,10 respectivement.

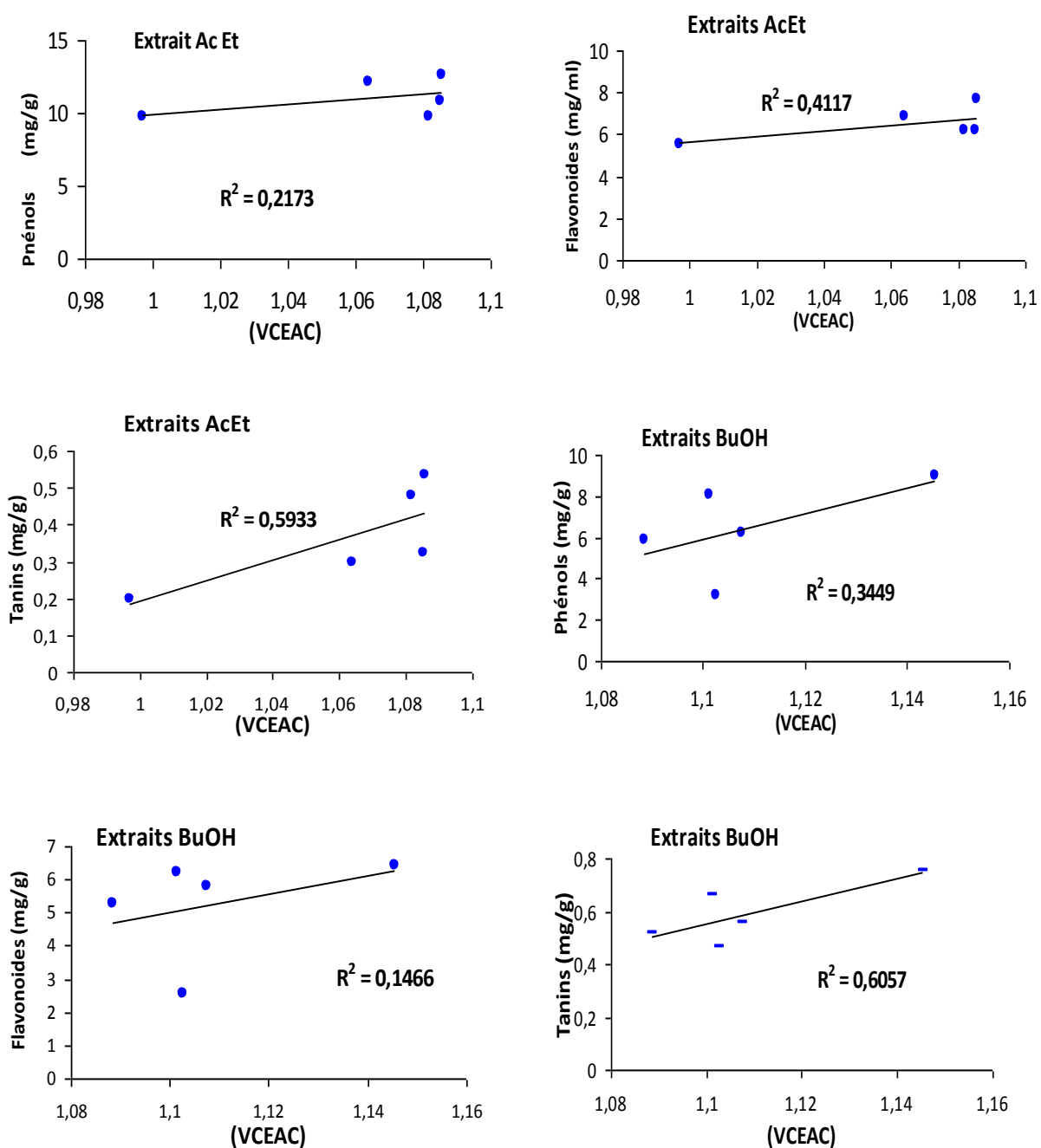
D'une façon générale, nos extraits phénoliques montrent des propriétés antioxydantes intéressantes qui se manifestent par des valeurs supérieures à un. Ces activités antioxydantes proviennent de la richesse de nos extraits aux flavonoïdes, aux tanins et autres (*A Chehema, 2005*). Ainsi, selon les études menées par *Bouheroum (2007)* qui ont concerné l'analyse chromatographique et RMN-H<sup>1</sup> de la fraction butanolique de l'espèce *Rhanterium adpressum*. Cet auteur a constaté la présence de composés de type flavonoïdiques tels que le tétrahydroxyflavonol ou (Kaempferol), connu par son effet antioxydant.

La comparaison du pouvoir antioxydant des extraits d'acétate d'éthyle de *Rhanterium adpressum* avec les extraits équivalents (Ac-Et) préparés à partir de plantes médicinales de la famille des Astéracées (*A M Daleffi Zocoler et al, 2009; S Albayrak et al, 2010*), nous a permis de souligner le fort potentiel antioxydant de cette espèce Saharienne.

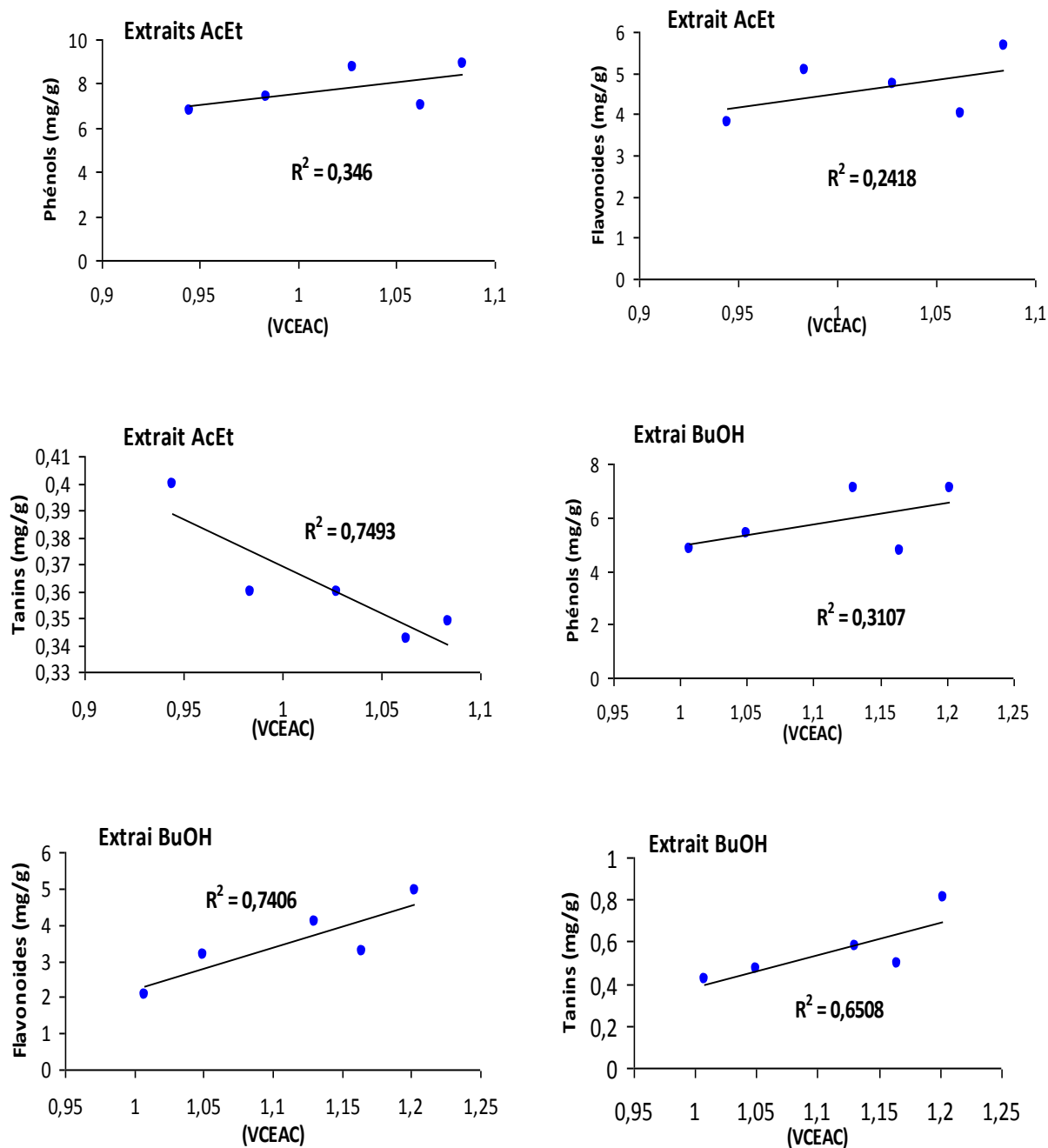
Le test du phosphomolybdate utilisé dans notre étude nous a permis de déterminer la capacité réductrice ou l'activité totale de nos extraits. D'ailleurs, ce test est souvent utilisé pour l'étude de l'activité antioxydante des extraits de plantes et des composés isolés et cela, en raison de sa disponibilité (réactif à faible coût) et aussi de sa reproductibilité (*E Biskup et E Lojkowska, 2009*). En outre, à la différence des autres tests, le test du phosphomolybdate permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des composés phénoliques mais aussi d'autres composés antioxydants tel que les vitamines (C, E...) (*F N Muanda, 2010*).

Par conséquent, l'utilisation du test du phosphomolybdate pour l'étude de l'activité antioxydante des extraits de plantes, nous renseigne d'une façon générale sur tous les composés présentant des capacités réductrices et pouvant exister dans nos extraits.

Dans le but de relier les activités antioxydantes qui ont été mises en évidence par le test du phosphomolybdate à la présence des composés phénoliques, flavonoïdes et tanins dans nos extraits, nous avons essayé d'étudier les différentes corrélations possibles de nos extraits d'acétate d'éthyle et des extraits butanoliques avec les différentes valeurs de AEAC obtenues (Figures V.21 et V.22).



**Figure V.21:** Corrélation entre les valeurs de AEAC et des teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins des extraits issus d'une extraction (acétone/eau).



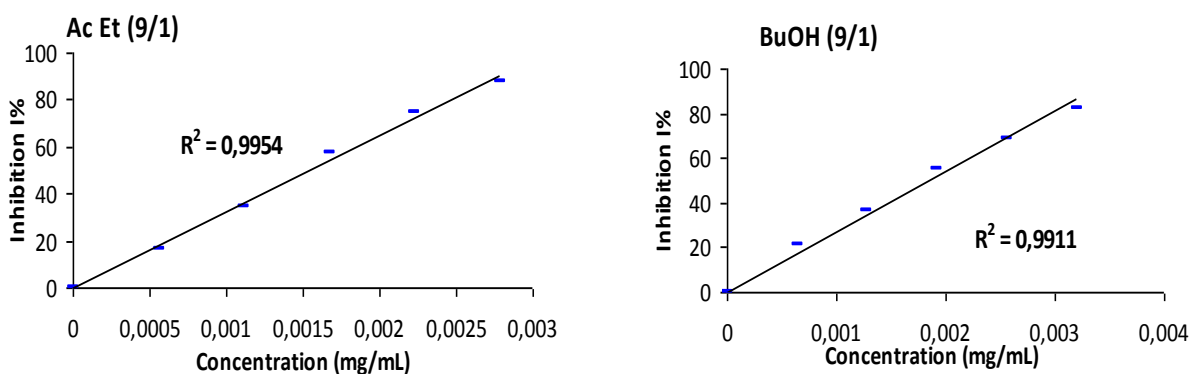
**Figure V.22:** Corrélation entre les valeurs de AEAC et des teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins des extraits issus d'une extraction (méthanol/eau).

Dans l'ensemble, ces résultats révèlent des faibles corrélations entre le pouvoir antioxydant et la quantité en phénols totaux et en flavonoïdes (Figures V.21 et V.22), à l'exception des tanins qui ont montré de bonnes corrélations ( $R=0,75$ ).

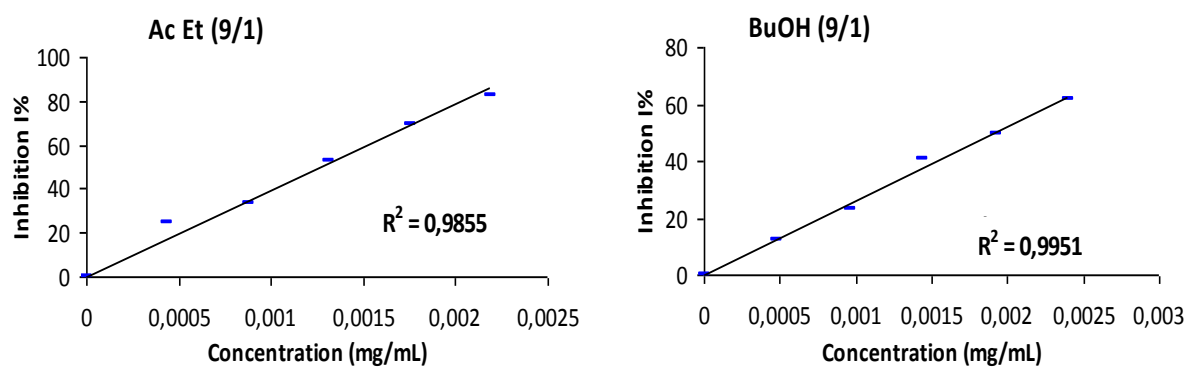
Les bonnes corrélations linéaires observées entre les quantités en proanthocyanidines et l'activité antioxydante, montrent que l'essentiel de cette activité est due majoritairement à la présence de ceux-ci qui contribuent essentiellement à l'activité antioxydante.

#### V-4-3- Activité antioxydante des extraits phénoliques en utilisant le test ABTS

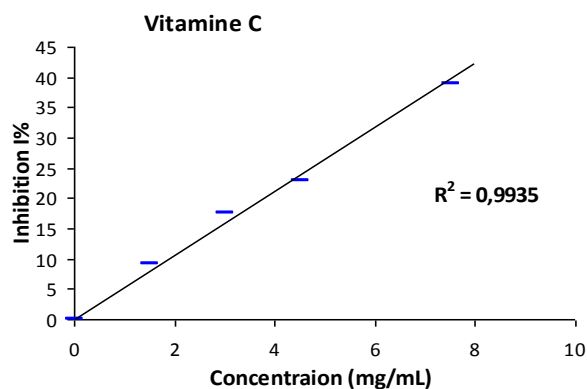
En faisant varier la concentration des extraits et en calculant pour chaque concentration le PI% (pourcentage d'inhibition) correspondant à celle-ci, nous avons établi une régression linéaire entre les différentes valeurs de PI% et les concentrations en phénols totaux de tous les extraits issus des deux méthodes d'extraction (acétone/eau) et (méthanol/eau) de différente polarité, les graphes sont représentés dans les Figures V.23 et V.24 ainsi que la Figure V.25 qui représente la variation du pourcentage d'inhibition PI% en fonction des concentrations de l'antioxydant de référence (Vitamine C) choisi dans cette étude.



**Figure V.23:** Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition PI% en fonction de la concentration en phénols des extraits d'acétate d'éthyle et de butanol issus d'une extraction (acétone/eau).



**Figure V.24:** Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition PI% en fonction de la concentration en phénols des extraits d'acétate d'éthyle et de butanol issus d'une extraction (méthanol/eau).



**Figure V.25:** Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition PI% en fonction de la concentration en antioxydant standards.



Les résultats de l'activité antiradicalaire déterminée à l'aide du test de l'ABTS sont résumés dans le Tableau V.8. Le paramètre « IC<sub>50</sub> » en µg/ml (concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale en ABTS<sup>•+</sup>) a été calculé pour chaque extrait. Plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est petite plus la capacité antioxydante de nos extraits est importante (*F Pellati et al, 2004*).

**Tableau V.8:** Les valeurs d'IC<sub>50</sub> en (µg/ml) des différents extraits issus de l'extraction (acétone/eau) et (méthanol/eau).

Ordre de polarité	Fraction	IC <sub>50</sub> « µg/ml »	IC <sub>50</sub> « µg/ml »
		(acétone/eau)	(méthanol/eau)
9/1	Ac.Et	1,54 ± 0,10	1,28 ± 0,45
	BuOH	1,85 ± 0,07	1,92 ± 0,70
8/2	Ac.Et	1,49 ± 0,41	1,23 ± 0,02
	BuOH	1,56 ± 0,08	1,61 ± 0,42
7/3	Ac.Et	1,77 ± 0,03	1,25 ± 0,13
	BuOH	1,48 ± 0,10	1,53 ± 0,56
6/4	Ac.Et	1,63 ± 0,04	1,42 ± 0,04
	BuOH	1,86 ± 0,47	1,79 ± 0,07
5/5	Ac.Et	1,78 ± 0,02	1,28 ± 0,25
	BuOH	1,88 ± 0,05	1,92 ± 0,45
<b>Antioxydant standard</b>		<b>IC<sub>50</sub> « µg/ml »</b>	
Vitamine C		0,95 ± 0,08	

Ac.Et : extrait d'acétate d'éthyle ; BuOH : extrait butanolique

Pour l'ensemble des extraits, nous observons une importante activité antiradicalaire qui se traduit par de faibles valeurs en IC<sub>50</sub> celles-ci ; qui varient entre 1,28 à 1,78 et de 1,48 à 1,93 µg/ml pour les extraits d'acétate d'éthyle et les extraits butanoliques respectivement.

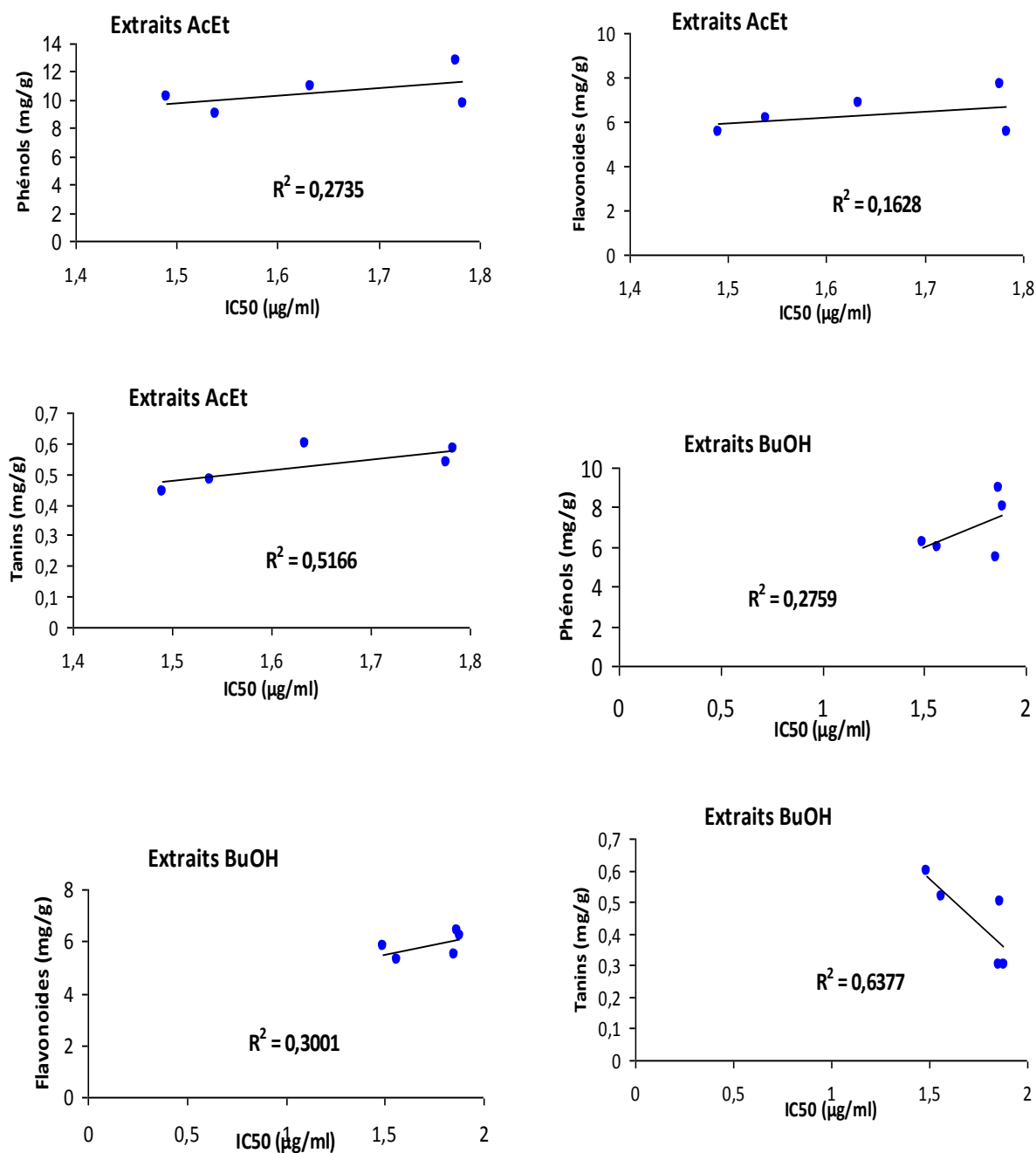
Les valeurs d'IC<sub>50</sub> déterminées pour les différents extraits sont beaucoup plus faibles en comparaison avec celles obtenues lors du test au DPPH<sup>·</sup>, ce qui confirme la grande sensibilité du test à l'ABTS (*H Gao et al, 2008*). De cet effet, ce test chimique qui sert à évaluer le pouvoir antioxydant vis-à-vis du radical cationique 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS<sup>·+</sup>), et qui a été mis au point au début des années 1990 par Miller et al (*S S Ali et al, 2008; D Krishnaiah et al, 2010*) reste d'actualité.

À la différence des deux autres tests utilisés dans cette étude, l'ABTS présente l'avantage de sa solubilité dans les milieux organiques et aqueux ce qui permet donc l'étude de tous les composés phénoliques de propriétés hydrophiles et lipophiles (*N Belkheiri, 2010*). De ce fait, nous pouvons expliquer alors l'importante activité antioxydante estimée dans l'étude de nos extraits.

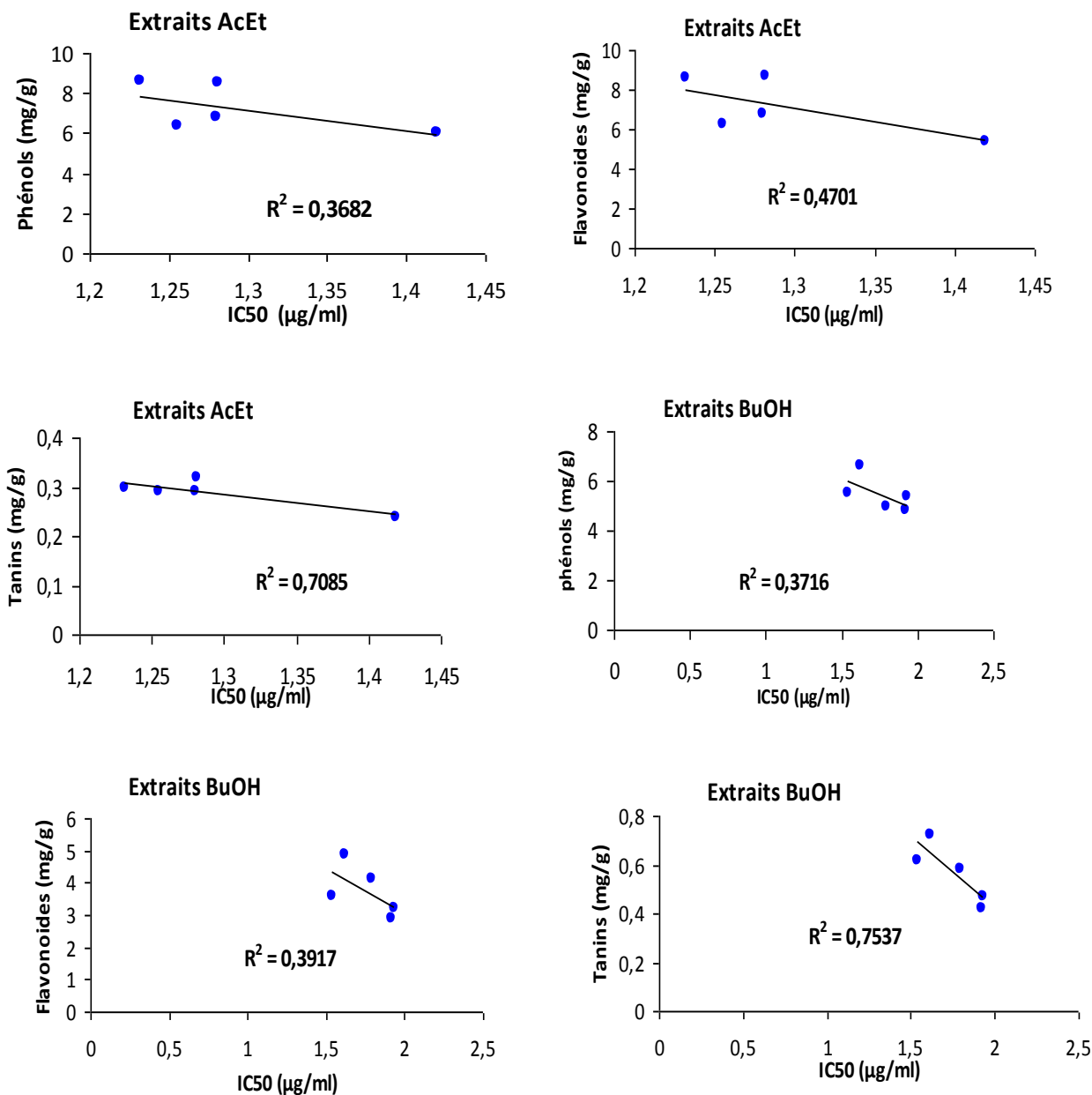
Les extraits d'acétate d'éthyles obtenus à partir des différentes fractions affichent les plus grandes activités antioxydantes par rapport aux fractions butanoliques. Ceci, semble être dû à la nature des composés phénoliques qui existent au niveau de ces fractions à savoir ; les flavonoïdes et les tanins qui peuvent participer à rehausser les valeurs de leur pouvoir antioxydant.

Dans les travaux de *Bouaziz et al (2009)*, qui ont concerné l'étude de l'activité antioxydante des composés phénoliques de l'espèce *Rhanterium suaveolens* ; espèce voisine de *Rhanterium adpressum*. Ces études ont montré des effets antioxydants des extraits d'acétate d'éthyle de cette espèce et cela en utilisant toujours le test d'ABTS. Ceci explique la richesse de ces espèces appartenant à la famille des Astéracées en termes de composés phénoliques.

Seuls les tanins, ont présenté de bonnes corrélations avec l'activité antioxydante qui a été faite par le test de l'ABTS (Figures V.26 et V.27). Dans le cas des phénols totaux et des flavonoïdes, les corrélations sont plus faibles et dont le coefficient de corrélation le plus faible est de (R= 0,1628). Ainsi, les effets pharmacologiques attribués aux tanins s'expliquent en partie par leur capacité à capturer les radicaux libres (*F Tian et al, 2009*) et de chélater les métaux (*L L Zhang et al, 2010*).



**Figure V.26:** Variation des valeurs d'IC<sub>50</sub> en fonction des teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins des extraits issus d'une extraction (acétone/eau).



**Figure V.27:** Variation des valeurs d'IC<sub>50</sub> en fonction des teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins des extraits issus d'une extraction (méthanol/eau).

En fin, nous avons essayé d'étudier les différentes corrélations possibles entre les activités antioxydantes qui ont été déterminées à l'aide des trois tests. Notant ainsi l'absence de toute corrélation entre celles-ci ( $R=0.08$ ) ce qui peut être expliqué par le fait :

- Que l'étude de l'activité antioxydante par ces différents tests dépende de plusieurs facteurs ; la sensibilité de chaque test, les mécanismes d'action mis en jeu par exemple (transfert électronique, donneur de H<sup>+</sup>) et la spécificité du test (*C Popovici et al, 2009; P Siddhuraju et S Manian, 2007*).

- Que les différentes fractions renferment soit un composé majoritaire ; soit des composés phénoliques de structures chimiques similaires.

#### **V-4-3- Conclusion**

À travers notre étude de l'activité antioxydante *in vitro* sur les fleurs de l'espèce *Rhanterium adpressum*, il nous a paru clairement, qu'une seule méthode ne peut pas suffire pour caractériser les propensions antioxydantes, et même ne peut pas donner une prévision complète de l'efficacité antioxydante d'un extrait. Donc, l'utilisation de plus d'une méthode a été nécessaire pour permettre de mieux généraliser nos résultats.

Au regard de ces résultats obtenus par les trois tests d'activités antioxydantes, il nous paraît nettement que ceux-ci sont intéressants et intrigants.

Cette espèce Saharienne pourrait être considérée donc comme une source importante d'antioxydants naturels qui peuvent être utilisés pour des fins médicinales.

## *Conclusion générale*

A l'heure actuelle, les plantes médicinales restent la plus riche source de médicaments parce qu'elles produisent une foule de molécules bioactives, dont la plupart présentent l'avantage d'une très grande diversité structurale et possèdent aussi un large éventail d'activités biologiques. C'est pour cette raison que le patrimoine végétal doit être absolument préservé dans sa diversité et dans son étendue.

Nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude des différents métabolites (Lipides, Huiles essentielles et composés phénoliques) des fleurs de *Rhanterium adpressum*, arbustes appartenant à la famille des astéracées, collectés dans la zone de Zelfana de Ghardaïa (Algérie) située dans la wilaya. Notre choix pour cette espèce est justifié par son endémisme et le peu d'étude consacré à celle-ci.

L'étude de la fraction lipidique de la partie fleurs de cette espèce collectée dans le mois de mars et mai s'étend dans un premier temps sur l'extraction hexanique de celle-ci. Les résultats de cette extraction montrent que cette plante contient une faible teneur en lipides exprimées par les valeurs : 0.70% pour le mois de mars contre 2.16% pour celui de mai. L'augmentation de ce rendement entre les deux mois pourrait être expliquée par le changement climatique pour cette zone qui se caractérise par un climat aride.

Les valeurs du pourcentage en fraction insaponifiable dans les extraits lipidiques sont de 58.40% pour les fleurs collectées dans le mois de mars et 50.65% pour celle du mois de mai correspondent à un lipide riche en insaponifiables et qui lui confèrent des propriétés d'un lipide de type non alimentaire.

Dans un second, l'analyse des esters méthyliques par CG/SM indique que les lipides des fleurs de *Rhanterium adpressum* du mois de mars et de mai contiennent des acides gras habituellement rencontrés dans les huiles végétales mais avec des proportions très variables. Celle de mars est constituée de 58,64% des acides gras insaturés. En revanche, la composition du lipide du mois de mai est traduite par la forte contenance de celui-ci en acides gras saturés exprimée par 83,51% et parallèlement moins d'acides gras insaturés. Ces résultats présentent un avantage technologique à ce lipide qui devient peu susceptible de s'oxyder ou de se polymériser pendant la conservation, l'utilisation ou une transformation éventuelle. Ces résultats nous ont permis de constater que le changement du mois de la récolte ou bien l'augmentation de la température fait diminuer la proportion des acides gras insaturés dans les lipides des fleurs de *Rantherium adpressium* et augmenter celle des acides gras saturés.

Dans un dernier temps, l'étude de la fraction mineure des lipides (tocophérols et stérols) nous a permis d'enregistrer un taux en tocophérols totaux du mois de mai égale à 0,54  $\mu\text{g/g MS}$  qui est quatre fois plus supérieure que celui de mars (0,14  $\mu\text{g/g MS}$ ). Ainsi, ces teneurs peuvent conférer à ces huiles une résistance à l'oxydation et une action vitaminique. Les résultats de l'analyse des stérols montrent que les lipides étudiés contiennent des quantités importantes en stérols totaux, exprimés par 0,69  $\mu\text{g/g MS}$  pour le mois de mars, contre 2,34  $\mu\text{g/g MS}$  pour celui de mai. Le dosage des phénols totaux, adapté par la méthode de Singleton et Ross indique clairement que la teneur en phénols totaux de l'extrait lipidiques des fleurs du mois de mai (141,2  $\mu\text{g EAG/g MS}$ ) est deux fois plus élevée que celle du mois de mars (79,9  $\mu\text{g EAG/g MS}$ ). Cette différence est due probablement aux fortes teneurs en composés tocophérols présentés dans chaque huile.

Les huiles essentielles des fleurs obtenues par hydrodistillation dans les deux échantillons F1 et F2 collectés dans le mois de mai sont proches 0,29% (3ml/kg) et 0,33% (4ml/kg). En comparant ces teneurs avec celle d'autres espèces végétales de la même famille, nous pouvons déduire que les fleurs de *Rhanterium adpressum* sont moyennement riches en huiles essentielles.

L'identification des constituants chimiques des huiles essentielles a été faite par CG et CG-SM. Un nombre total de 26 constituants chimiques a été identifié. Les constituants présents en pourcentage majoritaire sont:  $\alpha$ -pinène (17.39-24.35%), le camphène (17.79-21.81%), le myrcène (18.58- 19.28%), le limonène (5.73-5.84%) et le  $\beta$ -pinène (4.11-4.47). Ces huiles essentielles sont riches en hydrocarbures monoterpéniques et contiennent le même pourcentage (74.81%). Les pourcentages des monoterpènes oxygénés sont relativement moins importants (8.32-9.07%) par rapport aux hydrocarbures monoterpéniques, cependant; les hydrocarbures sesquiterpéniques (1.15-1.43%), les sesquiterpènes oxygénés (1.75-1.96%) et les acides gras (0.43-0.44%) sont les classes les plus faibles en pourcentages.

Les teneurs des phénols totaux des huiles essentielles des fleurs F1 et F2 de *Rantherium adpressum* sont respectivement 22.8 et 13.9  $\mu\text{g (EAG)/mg (MS)}$ . La comparaison de ces résultats avec ceux de la littérature illustre que les huiles essentielles de *Rantherium adpressum* sont en faibles possessions de phénols totaux.

Différentes étapes d'extraction et de fractionnement (de différente polarité) impliquant divers procédés ont été réalisées pour l'obtention de fractions phénoliques à partir des fleurs de



*Rhanterium adpressum*. Après extraction, nous avons essayé de quantifier la matière en phénols totaux, en flavonoïdes et en proanthocyanidines existant dans nos extraits. Les résultats montrent que notre plante est relativement riche en ces composés ; avec des teneurs qui varient de (3,19 à 12,66 mg en GAE/ gramme de la matière sèche, de 2,06 à 7,65 mg en RE / gramme de la matière sèche et de 0,32 à 0,81 mg en CE/ gramme de la matière sèche) pour les phénols totaux, les flavonoïdes et les tanins condensés respectivement.

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits: lipidiques, huiles essentielles et composés phénoliques a été réalisée par différents tests chimiques *in vitro*.

L'examen des résultats du pouvoir antioxydant des extraits lipidiques varie dans le même sens mais avec des teneurs différentes dû aux différents antioxydants qu'il contiennent vis-à-vis des tests utilisés, par donation de protons en piégeant le radicale libre DPPH ou la réduction des radicaux par transfert d'électrons dans la méthode de phosphomolybdate. En revanche, l'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles par trois tests chimiques à savoir: le test DPPH, FRAP et le test phosphomolybdate montre qu'elle ne varie pas dans le même sens. La fraction phénolique révèle que l'activité antioxydante vis-à-vis des radicaux DPPH est dépendante du contenu phénolique, flavonoïdique et même en tanins d'où une relation linéaire a été établie. Par contre, une forte activité antioxydante a été constatée par les deux autres tests (ABTS et phosphomolybdate). Dans ces deux cas, l'activité antioxydante est fortement dépendante du contenu en tanins condensés, donc, des corrélations positives entre l'activité antioxydante et la teneur en tanins condensés ont été établies dans ces deux tests.

L'ensemble de ce travail contribue à une meilleure connaissance des ressources de la flore locale en substances d'intérêt biologique néanmoins des perspectives sont à envisager.

Tout d'abord une étude plus profonde est nécessaire pour:

- Isoler et caractériser des molécules bioactives.
- Rechercher une relation structure-activité antioxydante des composés caractérisés.
- Etudier l'influence de la saison de récolte sur la composition: en acides gras, en huiles essentielles et en tocophérols.

En plus prévoir une étude phytochimique et activité antioxydante des deux parties de la plante à savoir: tiges et feuilles.

## *Références bibliographiques*

A Dembinska Kiec, T Simmet, et B A Peskar, 1984. Release and vasoconstrictor effect of leukotriene C-like immunoreactive material in the anaphylactic guinea-pig mesenteric vascular bed, *Eur. J. Pharmacol.*, 101, 259-262.

A E Hagerman and L G Butler, 1989. Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin, *Journal of Chemical Ecology*, 6 pp.

A Akrouf, L A Gonzalez, H El Jani, P CamparaMadrid, 2011. Antioxydant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 342-347.

A Chehama, 2005. Etude floristique et nutritive des parcours camelins du Sahara septentrional algérien ces des régions de Ouargla et Ghardaïa, *Thèse ; Univ Badji Mokhtar Annaba* ; 198.

A Chehama., 2006. Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional Algérien, *Ed : Dar El Houda*, 140.

A Emmerie, C Engel, 1939. Colorimetric détermination of tocopherol (vitamin E). II. Adsorption experiments. *Rec. Trav. Chim*, 58, 283-289.

A Favier, 2003. Le stress oxydant « Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique », *Actualité chimique*, 108-115.

A J Vlietinck, T De Bruyne, S Apers, et L A Pieters, 1997. Plant Derived Leading Aompounds for Chemoterapy of Human Immunodeficiency Virus (Hiv) Infection, *Planta. Medica.*, 64, 79-109.

A K Calgarotto, S Miotto, M Honório, A.B.F Da Silva, S Marangoni, J.L Silva, Jr.M Comar., K.M.T Oliveira and S.L Da Silva, 2007. A multivariate study on flavonoid compounds scavenging the peroxy nitrite free radical. *Journal of Molecular Structure: Theochem*, 808 (1-3), 25-33.

A Kala, N Gherraf, D Belkacemi, S Ladjel, A Zellagui, S Hameurelain, B Chihi Labeled, 2009. Composition of the essential oil of *Rhanterium adpressum* Coss. and Durieu from Algeria. *Archives of Applied Science Research*, 1, 115-118.

A Kuksis, 1978. Hand Book of Lipid Research: Fatty Acids and Glycerides, Ed. Plénum Press, New York and London, 1, 1.

A M Daleffi Zocoler, A C Conegero Sanches, I Albrecht **and** J C.Palazzo de Mello, 2009. Antioxidant capacity of extracts and isolated compounds from *Stryphnodendron obovatum* Benth, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 443-453.

A M Czarnecka, P Golik, E Bartnik, Mitochondrial DNA mutations in human neoplasia. *J. Appl. Genet.* 2006, 47, 67–78.

A Swent Gyargyi, 1938. *Hoppe Seylers – Z – Physiol. Chem.*, 225, 126.

A Yvon, Carpentier. 1996. Actions Immunomodulatrices Des Lipides. *Nutr. Clin. Metabol*, 10, 97-105

A. Ben Sassi, F. Harzallah-Skhiri., N. Bourgougnon and M. Aouni., 2008. Antimicrobial activities of four Tunisian *Chrysanthemum* species, *Indian J Med Res* ; 183-192.

A. Benseguni, 2007. Etude théorique des métabolites secondaires des végétaux et des composés de synthèse sur le plan de l'activité biologique : simulation par docking (arrimage) moléculaire sur la lipoxygénase et la cyclooxygénase, *Thèse ; Univ de Mentouri Constantine*, 91.

A. Djeridane., M. Yousfi., B. Nadjemi., D. Boutassouna., P. Stocker and N. Vidal., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds, *Food chemistry*, 654-660.

A. H. Smith., E. Zoetendal and R. I. Mackie., 2005. Bacterial Mechanisms to Overcome Inhibitory Effects of Dietary Tannins, *Microbial Ecology*, 197-205.

A. S. Nadeem., M.Mohd., K. N.Abdul et A.Mohd., 2010. Evaluation of antioxidant activity, quantitative estimation of phenols and flavonoids in different parts of *Aeglemarmelos*. *African Journal of Plant Science*, 1 – 5.

A.J.C. 1962. Refining of Oils and Fats of Edible Purpose, Ed. P.W. William Pergamon Press, Oxford.

AFNOR, Huile essentielle, recueil des normes françaises. AFNOR NF T 75-006. 1980, Paris: AFNOR.

B Halliwell, 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence, *Lancet*, 344 (8924), 721–724.

B Havsteen , Z. Lebesm, 1980. Unters. Forsch., Spontaneous spatio-temporal organization in yeast cell suspension, *Journal of Cell Science* 43, 367-377.

B Lejeune, B Vernat, F Regerat, D Gardelle, D Foucher et A Pourrat, 1984. Propolis: extracts and uses in shampoos and lotions, *Parfums Cosmétiques Arômes*, 56, 6568.

B M Lawrence, 1992. *Chemical components of Labiatae oil and their exploitation*. In: Harley R M, Reynolds T. (Eds.) *Advences in Labiate Science*. Royal Botanic Gardens, Kew, 339-436.

B Tepe, A Sihoghu-Tepe, D Daferera, M Polission, A Sokmen, **2007**. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Clinopodium vulgare* L. *Food Chemistry*, 103, 766–770.

C Delbart, 2000. Les mitochondries « biologie et incidence physiopathologique », *Ed ; Tec et Doc*, 169.

C Popovici, I Saykova and B Tylkowski, 2009. Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, *Revue de génie industriel* ; 25-39.

C B Yoo, K T Han, K S Cho, J Ha, H J Park, J H Nam, U H Kil, , K T Lee. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett.*, 2005, 225, 41–52.

C Bourrel. Analyse chimique, activités biostatiques et antioxydantes d'extraits de plantes aromatiques sélectionnées, 1993. Thèse de l'Institut National Polytechnique de toulouse. Toulouse, France.

C Brigitte, F Hamon-Lorleac'h, H Alain, R Lionel, C Serge, 2008. Biochimie. In Guide du préparateur en pharmacie. Ed: Masson, Paris, 153-234.

C N Hassiotis, 2010. Chemical compounds and essential oil release through decomposition process from *Lavendula steachas* Mediterranean region. *Biochem. Syst. Ecol.* 38, 495-501.

C Paquot, A Hautfenne, 1987. Standards Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, International Union of Pure and Applied Chemistry, 7th Revised and Enlarged Edition, Ed. Black Well Scientific Publication, Oxford, 123

C Paquot, J Mercier, A Mathieu, D Lefort, R Perron, 1962. Méthodes Analytiques des Lipides Naturels, Ed. CNRS, paris.

C. Houée Levin., C. Sicard Roselli et J. Bergès., 2005. Chimie et biochimie radicalaires, *Ed ; Belin*, 160.

C. Louis Léger., 2006. Anti-oxydants d'origine alimentaire : diversité, modes d'action anti-oxydante, interactions, *OCL*, 59-69.

C. Sanchez-Moreno,, J. A Larrauri and F. Saura-Calixto., 1998. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols, *J Sci food Agric*, 270-276.

C.M.S Fewtrell et B D Gompert, 1977. Effect of flavone inhibitors of transport ATPases on histamine secretion from rat mast cells, *Nature*, 265, 635-636.

C.S. Moreno, J. A. Larrauri and F. Saura-Calix., 1998. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols, *J Sci Food Agric*; 270- 276.

D Chos , D. Riche. 2005. Apports de sécurité en lipides chez le sportif a haut niveau d'entraînement. *Science & sports*; 20, 74–82.

D A Smith, et S W Banks, 1986. *Plant Flavonoids in Biology and Medecine: Biochemical, Pharmalogical and Structure Activity Relationships*, Cody, Middleton, E., Harborne, J.B. (Eds), Liss A.R., New York, 113-124.

D Huang, B OU, R L Prior, 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1841-1856.

D Krishnaiah, R Sarbatly and R Nithyanandam, 2010. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species, *Food and Bioproducts Processing*; 89 (3), 217-233.

D Kritchevsky, 1963. *Streols, Bile Acids and Steroids - Comprehensive Biochemistry*, Ed. M. Flarkin et E.H. Stotz, Elsevier Publishing Company, New York, 10, 1.

D Pathak, K Pathak et A.K Singla, 1991. Flavonoids as medicinal agents - recent advances, *Fitoterapia*, XII, n°5, 371-389.

D. Kone., 2009. Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales Maliennes- extraction, identification d'alcaloïdes- caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante, Thèse ; *Univ de Bamako* ; 188.

E Portes, 2008. Synthèse et Etudes de Tétrahydrocurcuminoïdes : Propriétés Photochimiques et Antioxydantes, Applications à la Préservation de Matériaux d'Origine Naturelle, *Univ ; Bordeaux I*, 244.

E Biskup and E Lojkowska, 2009. Evaluation of biological activities of *Rhaponticum carthamoides* extracts, *Journal of Medicinal Plants Research*. 1092 -1098.

E I Salim, S Fukushima. Chemopreventive potential of volatile oil from black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds against rat colon carcinogenesis. *Nutr. Cancer*, 2003, 45, 195–202.

E Ucciani, 1995. Nouveau Dictionnaire des Huiles Végétales. Composition en Acides Gras., Tec et Doc, Lavoisier. Paris, 125-128.

E Barrajon-Catalan., S Fernandez-Arroyo., D Saura., E Guillen., A Fernandez-Gutierrez., A Segura-Carretero and Vicente Micol., 2010. Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells, *Food and Chemical Toxicology*, 2273-2282.

E Grotewold, 2006. The science of flavonoids, *Library of Congress*; 274.

EI Rlund, 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutr Res.*, 24 (10), 851-874.

Elvira Gonzalez de Mejia, Sonia Chandra, Marco Vinicio Ramirez-Mares and Wenyi Wang, 2006 . Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase by phenolic compounds in *Ardisia compressa* extracts and their effect on human colon cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 44 (8), 1191-1203.

F Bakkali, S Averbeck, D Averbeck, M Idaomar, 2008. Biological effects of essential oils, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.

F Kader, B Rovel, M Girardin et M Metche, 1997. Mechanism of Browning in Fresh High Bush Blue Berry Fruit (*Vaccinium Corymbosum* L), Role of Blue Berry Polyphenol Oxidase, Chlorogenic Acid and Anthocyanins”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 31-34.

F Mordret, 1971. Thèse d'Université, Etude de l'Insaponifiable de l'Huile de Tournesol, Paris.

F N Muanda, 2010. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques, *Thèse ; l'Université Paul Verlaine-Metz*, France, 294.



- F Oke, B Aslim, S Ozturk, S Altundag, 2009. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry*, 112, 874-879.
- F Pellati, S Benvenuti, L Magro, M Melegari et F Soragni, 2004. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 289–301.
- F Tian, Bo Li, B Ji, J Yang, G Zhang, YChen and Y Luo, 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities, *Food Chemistry* ; 173–179.
- F. N. Muanda, 2010. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologique, Thèse ; *univ de Paul Verlaine-Metz*, 238.
- Forget Richard, M A Rouet Mayer, P M Goupy, J Philippon et J Nicolas, 1992. Oxidation of Chlorogenic Acid, Catechins and 4-Methylcatechol in Model Solution by Apple Polyphenol Oxidase, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 2114-2122.
- Frère Marie-Victorin, 1885-1944, *Flore Laurentienne*, 547.
- G Arthurson et C E Jonson, 1975. Prostaglandins and Thromboxanes, 10, 941.
- G R Boucard and R W Serth, 1991. A Continuous steam Stripping Process For the Distillation of Essential Oils. *Perfum. Flavor*. 16, 1-8.
- G Ruberto, MT Baratta, 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, 69, 167–174.
- G Spigno, L Tramelli and D M De Faveri , 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics, *Journal of Food Engineering* ; 200–208.
- G. F. Ferrazzano., I Amato., A Ingenito., A Zarrelli., G Pinto and A Pollio., 2011. Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties: A Review, *Molecules*; 1486-1507 .

Giuseppe Danilo Norata, Patrizia Marchesi, Silvia Passamonti, Angela Pirillo, Francesco Violi and Alberico Luigi Catapano, 2007. Anti-inflammatory and anti-atherogenic effects of catechin, caffeic acid and transresveratrol in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis*, 191 (2), 265-271.

H Aouissi, 2010. Composition chimique et activité biologique et antioxydante des huiles essentielles de *Rhanterium adpressum*. *mémoire de magister* de l'Université de Laghouat.

H C Nébié Roger, T Yaméogo Rigobert, A Bélanger, S Sib Faustin, 2004. Composition chimique des huiles essentielles d'*Ageratum conyzoides* du Burkina Faso. *C. R. Chimie*. 7, 1019-1022.

H G Mahesha, SA Singh, AG Rao, 2007. Inhibition of lipoxygenase by soy isoflavones: evidence of isoflavones as redox inhibitors. *Arch Biochem Biophys.*, 461(2), 176-185.

H Gao<sup>1</sup>, T F Shupe<sup>1</sup>, C Y Hse and T L Eberhardt, 2008. Antioxidant activity of extracts from the bark of *Chamaecyparis lawsoniana* (A. Murray) Parl, *Holzforchung*; 459–462.

H Gaussen et F Leroy, *Précis de botanique (Végétaux supérieurs)*, 1982, 2<sup>ème</sup> édition,

H Kamei, T Kojima, T Koide, M Hasegawa, T Umeda, K Teraba, et Y Hashimots, 1996. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 11, n° 4, 247.

H Mighir, H hadjlaoui, A akrouf, H Najjaa, H Neffati, 2010. Antimicrobial and antioxydant activities of *Artemisia herba alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone. *Comptes Rendus Chimie*, 13, 380-386.

H Nbeg, 2010. Contribution à l'étude de la fraction lipidique des fruits de *Tapsia garganica*, mémoire de magister UNIV. Amar Telidji Laghouat, Algérie.

H Paris and R R Moyse, 1976. *Précis de matière médicale*, 2<sup>ème</sup> édition (tome 1), Masson Cie., Paris.

H Richard et J L Multon, 1992. *les arômes alimentaires*. Thenologie et Documentation Lavoisier Paris. 439 p.

H Veris, 1995. Effet Bénéfique Potentiel des anti-oxydants dans l'infection par le virus Hiv et le Sida, Vitamin E Research Summary, Düsseldorf, Août.

H. Falleh., R Ksouri., K Chaieb., N Karray-Bouraoui., N Trabelsi., M Boulaaba and C Abdelly., 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities, C. R. Biologies; 372–379.

Hsu SD, Dickinson DP, Qin H, Borke J, Ogbureke KU, Winger JN, Camba AM, Bollag WB, Stoppler HJ, Sharawy MM, Schuster GS, 2007. Green tea polyphenols reduce autoimmune symptoms in a murine model for human Sjogren's syndrome and protect human salivary acinar cells from TNF-alpha-induced cytotoxicity. *Autoimmunity*. 40 (2),138-147.

Hüsnü Can Baser et G Buchbauer, 2010. Handbook of essential oils science, technology and applications. *CRC Press*, 994 p.

I F F Benzie, J J Strain, 1999. Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15–27.

I P Lysette Bossokpi, 2003. Etude des activités biologiques de fagara zanthoxyloides Lam (Rutaceae), *Thèse Univ de Bamako*, 128.

I. Chen, H. Chang, H. Yang and G. Chen, 2004. Evaluation of total activity of several popular vegetables and Chinese herbs: a fast approach with ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP system in micro plates, *Journal of food and drug analysis*, 29-33.

Iveta Bernatova, Angelika Puzserova and Ramaroson Andriantsitohaina, 2007. Effect of red wine polyphenols on blood pressure and vasorelaxation of Wistar-Kyoto rats exposed to chronic stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 42 (6), S127.

J K Moon, T I Shibamoto, 2009. Antioxidant Assays for Plant and Food Components, *J. Agric. Food Chem.*, 57, 1655–1666.

J B Harborne, 1975. "The Flavonoids", Mabry, T.M., Mabry H. (Eds), Chapman and Hall, London.

J B Harborne, 1988. The Flavonoids Advances in Research Since 1980, Harborne, J.B.(Eds), Chapman and Hall, London.

J Brunechon, 1987. Pharmacognosie, Ecole technique de documentation, Ed. Ravoilie.

J Bruneton, 1993. Pharmacognosie, Photochimie, Plantes Médicinales, Tec et Doc , Lavoisier (Ed), Paris, 915.

J Bruneton, 2009. *Pharmaconoisie -Phytochimie, Plantes médicinales*. 4<sup>ème</sup> Edition. Lavoisier, Tec. et Doc., Paris, 1292.

J Guillemain, a Rousseau, 1989. Neurodepressive effects of the essential oil of *Lavendula angustifolia* Mill. *Ann. pharm. Fra.* 47, 337-343.

J H Langenheim. Amber: a botanical inquiry. *Science*. 1969, 163, 1157-1169.

J J Macheix, A Fleuriet et J Billot, 1990. Fruits Phenolics –I-, CRS Press, Boca, 378.

J J Macheix., A. Fleuriet et C. J. Allemand., 2005. Les composés phénoliques des végétaux « un exemple de métabolites secondaires d'importance économique ». *Ed ; Presse polytechniques et universitaires romandes*, 192.

J Kühnan, Berry Fruit: Value-Added Products for Health Promotion. *World Rev. Nutr. Diet.*, 24, 117.

J L Guignard, 1996. Biochimie Végétale , Edition Masson, Paris, 255.

J L Guingnard, 1985. Abrégé de Phytochimie, Edition Masson, Paris, 25-29.

J Manosroi, P Dhumtanom, A Manosroi, 2006. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Lett.*,235, 114–120.

J P Goiffon, Reminiac, Claude; M Olle, 1981. High performance liquid chromatography application for fat triglycéride analysis. I. Search for the best operating conditions for soybean oil, *Revue Française des Corps Gras*, 28(4), 167-170.

J P Helme, J Chirouze, 1984. Les Acides Gras Polyinsaturés a Longue chaîne, Application en Cosmétologie, Association Française de Cosmétologie, Symposium Bordeaux, 107.

J Q Cu. Extraction de compositions odorants végétales par divers solvants organiques. 1990.

J. L Guignard, *Abrégé botanique*, 1994, 9ème édition, Edition Masson, 203-204

J. Živković, I. Mujić, Z. Zeković, G. Nikolić, S. Vidović and A. Mujić., 2009. Extraction and analysis of condensed tannins in *Castanea sativa* MILL, *Central European Agriculture*, 283-288.

K C S Chen Lui, SS Lee, J F Chiou, S Ren , et E J Lien, 1999. Antiviral Tanins from Two *Phyllanthus* Species, *Planta. Medica.*, 65, 43-46.

K Chira, J-H Suh, C Saucier, P-L Teissèdre, 2008. Les poly phénols du raisin, *Phytothérapie*, 75-82 pp.

K Hüsnü Can Başer and F Fatih Demicri, 2007. Chemistry of Essential oils. In *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. RALF G. BERGER- Springer-, 43-86.

K R Markham, and T J Mabry, 1968. Phytochemical Dictionary of the Leguminosae. *Phytochemistry.*, 7, 1197.

K. Bhooshan Pandey and S. Ibrahim Rizvi., 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 270-278.

K. Pelli et M. Lyly., 2003. Les antioxydants dans l'alimentation, *VTT Biotechnology Finlande*, 28.

- Karleskind, 1992. Manuel des corps gras Edition Technique et Documentation Lavoisier, Paris.
- Kuan-Hung Chen, Meng-Shih Weng and Jen-Kun Lin , 2007. Tangeretin suppresses IL-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase (COX)-2 expression through inhibition of p38 MAPK, JNK, and AKT activation in human lung carcinoma cells, *Biochemical pharmacology* 73(2) 215-27.
- L C Cantley et G G Hammes, 1976. Characterization of sulfhydryl groups on chloroplast coupling factor 1 exposed by heat activation, *Biochemistry*, 15, 9-14.
- L Ganou, 1993. Contribution a l'étude des mécanismes fondamentaux de l'hydrodistillation des huiles essentielles. Thèse de l'INP Toulouse, France.
- L J Cseke, A Kirakosyan, P B Kaufman, S L Warber, J A Duke and H L Brielman, 2006. Natural products from plants, 2<sup>ème</sup> Ed; *Taylor and Francis Group*, 551 pp.
- L Jurd, and R Horowitz, 1962. Spectral properties of flavonoid compounds, pergamon press, Oxford, 107-2055.
- L L Zhang, Yi-M Lin, Hai-C Zhou, Shu-D Wei and Jia-H Chen., 2010. Condensed Tannins from Mangrove Species *Kandelia candel* and *Rhizophora mangle* and Their Antioxidant Activity, *Molecules*; 420-431.
- L R Hernandez-Ochoa, 2005. Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combiné « solvant/actif » d'origine végétale. Thèse de Doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, France.
- L Veroffa, M Dell'agli , A Giolito, M Guerini, P Cabalion, et E Basisio, 2001. In Vitro Antiplasmodial Activity of Tristrianopsis Species And Identification of the Active Constituents: Ellagic Acid and 3, 4, 5-Trimethoxyphenyl-(6-O-Galloyl)-O-B-D-Glucopyranoside, *Journal of Natural Product*, 64, 603-607.

L Wirasathien, T Pengsuparp, R Suttisri, H Ueda, M Moriyasu and K Kawanishi, 2007. Inhibitors of aldose reductase and advanced glycation end-products formation from the leaves of *Stelechocarpus cauliflorus* R.E. Fr. *Phytomedicine*, 14 (7-8), 546-550. London.

Lucio Zennaro, Monica Rossetto, Paola Vanzani, Veronica De Marco, Marina Scarpa, Leontino Battistin and Adelio Rigo, 2007. A method to evaluate capacity and efficiency of water soluble antioxidants as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 462 (1), 38-46.

M Bouheroum, 2007. Etude phytochimique de plantes médicinales algériennes: *Rhanterium adpressum* et *Ononis angustissima*, Thèse ; *Univ Mentouri de Constantine*, 175.

M Bouheroum, 2007. Etude phytochimique des plantes médicinales Algériennes : *Rhanterium adpressum* et *Ononis angustissima*, Thèse ; *Univ de Mentouri Constantine*, 159.

M Neacsu, P C Eklund, R E Sjöholm, S P Pietarinen, M O Ahotupa, B R Holmbom and S M Willfor, 2007. Antioxidant flavonoids from knotwood of Jack pine and European aspen, *Springer*, 65, 1-6.

M A Djordjevic, J W Redmond, M Batley et B.G Rolfe, 1987. Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or depress nod gene expression in *Rhizobium trifolii*, *EMBO J.*, 5, 1173.

M A Hossain, M D Shah, 2011. A study on the total phenols content and antioxidant activity of endemic plant *Merremia borneensis*. *Arabian Journal of Chemistry*, doi: 10.1016/j.arabjoc.2011.01.007. (In press).

M A Soobrattee, T Bahorun, V S Neergheen, K Googoolye, and O I Aruoma, 2008. Assessment of the content of phenolics and antioxidant actions of the Rubiaceae, Ebanaceae, Celastraceae, Erythroxylaceae and Sterculaceae families of Mauritian endemic plants. *Toxicology in Vitro.*, 22, 45-56.

M Barbier, 1980. *Encyclopedia Universalis: Pigments et Pigmentations*, 13, 66.

M Barreto Carma, 2005. Lipid extraction and cholesterol quantification, *J. Chem. Educ.* 82, 103-104

M Bendahou, A Muselli, M Grignon- Dubois, M Benyoucef, J-M Desjobert, A F Bernardinni and J Costa, 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*, 106, 132-139.

M Bouaziz, A Dhouib, S Loukil, M Boukhris and S Sayadi, 2009. Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of some wild plants collected from the south of Tunisia, *African Journal of Biotechnology*; 7017-7027.

M Bouheroum, S Benayache, F Benayache, L Zaiter, JM Barrera, L Francisco, 2007. Terpenoids and triynepoxide from the aerial part of *Rhantherium adpressum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 43, 110–111.

M Edeas, 2007. Les polyphénols et les polyphénols du thé. *Phytothérapie*, 264-270 pp.

M Eleni. Gioti, C Yiannis. Fiamegos, C Dimitris. Skalkos and D Constantine, 2007. Stalikas Improved method for the in vitro assessment of antioxidant activity of plant extracts by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–electron capture detection *Journal of Chromatography A*, 1152 (1-2), 150-155.

M F Hugel, W Vetter, H Audier, M Barbier et E Lederer, 1964. Analysis of Pollen Stérols by Mass Spectrometry, *Phytochemistry*, 3, 7.

M Farine, M Charrouf, J Soulier et A Cave, 1984. Etude de l'huile des graines d'argania spinosa (L) Sapotaceae. II Stérols, alcooltriterpéniques et métyylstérols de l'huile d'argan, *Rev ; Franc. Corps Gras*, 31, 443-448

M Flanzky, P Dubois, 1964. The détermination of total tocopherols. Application to grape seed oil, *Technol. Agric.*, 13, 67.



M Gschwendt, F Horn, W Kittstein et F Mark, 1983. Inhibition of the calcium- and phospholipid-dependent protein kinase activity from mouse brain cytosol by quercetin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 117, 444-447.

M Lagarde, 2003. Colloque sur les lipides de la peau métabolisme des lipides bio-actifs. *Pathologie biologique*, 51, 241–243

M Lahlou, 2004. Methods to study the phytochemistry and Bioactivity of Essential oils. *Phytother. Res.* 18, 435-448.

M M Berger, 2006. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances, *Nutrition clinique et métabolisme*, 48-53.

M M Cowan, 1999. Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology reviews*, 12, 564-582.

M M Tanae, M.T.R Lima-Landman, T.C.M De Lima, C Souccar. and A.J Lapa, 2007. Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiacid secretion and antidepressant-like activities. *Phytomedicine*, 14 (5), 309-313.

M Netzel , G Netzel, Q Tian, S Schwartz, and I Konczak, 2007. Native Australian fruits - A novel source of antioxidants for food. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 339–346.

M Noda, M Tanaka, Y Seto, T Aiba, C Oku, 1988. Occurrence of Cholestérol as Major Sterol Component in Leaf Surface Lipid, *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 23, 439.

M Olle, 1996. Analyse des corps gras. *Technique de l'Ingénieur*, P5, P 3325 décembre paris.

M R Saha, Md A Alam, R Akter and Rumana Jahangir, 2008. In-vitro free radical scavenging activity of *Ixora coccinea* L, *Bangladesh J Pharmacol*; 90-96.

M S Yaghmai et S. Kolbadipour., 1987. Volatile Component of *Rhanterium epapposum* Oliv, *Flavour and fragrance journal*, 29-32 .

M Sylvestre, A Pichette, A Longtin, F Nagau, J Legault, 2006. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *J. Ethnopharmacol*, 103, 99–102.

M Sylvestre, J Legault, D Dufour, A Pichette, 2005. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. *Phytomedicine*, 12, 299–304.

M Takechi, Y Tanaka, M Takehara, G.I Nonaka, et I Nishioka, 1985. Structure and Antiherpetic Activity Among the Tanins, *Phytochemistry*, 24, n° 10, 2245-2250.

M Tomaru, H Takano, N Osakabe, A Yasuda, K Inoue, R Yanagisawa, T Ohwatari, H Uematsu, 2007. Diet supplementation with cacao liquor proanthocyanidins presents elevation of blood glucose levels in diabetic obese mice. *Nutrition*, 23 (4), 351-355.

M Yousfi, B Nedjemi, R Belal, D Ben Bertal, 2003. Étude des acides gras de l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas algérien. *Oleag. Corp. Gras, Lip. OCL.*, 10, 425–427.

M Yousfi, I Bambarde, C Hamia, P Stocker, E Gaydou, 2009. Fatty acid, triglyceride and tocopherol composition of Algerian Argan (*Argania spinosa*) fruit seed lipids, *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 2, 197–203.

M. Edeas., 2009. Anti-oxydants, controverses et perspectives : comment expliquer l'échec des études cliniques utilisant des anti-oxydants, *Journal de la société de biologie*, 271-280.

M. Naczka., R. B. Pegg and R. Amarowicz., 2011. Protein-precipitating capacity of bearberry-leaf (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Sprengel) polyphenolics, *Food Chemistry*, 1507-1513.

McCann M.J., Gill C.I.R., O' Brien G., J.R. Rao, W.C. McRoberts, P. Hughes, R. McEntee and I.R. Rowland, 2007. Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis in vitro *Food and Chemical Toxicology*, 45 (7), 1224-1230.

- N Belkheiri, 2010. Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes, *Thèse ; Univ Toulouse III - Paul Sabatier*, France, 244.
- N Gourine, 2010. Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle du Pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf). *Thèse de doctorat, ENS Kouba*, 23.
- N Naudet et A Hautfenne, 1986. Méthode Normalisée pour la Détermination des Stérols Totaux dans les Huiles Et Graisses, *Rev. Fr. Corps Gras*, 33, 167.
- N. Balasundram., K. Sundram et Samir Samman., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry*, 191–203.
- N.S Parmar et G Hennings, 1984 . The gastric antisecretory activity of 3-methoxy-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavan (ME) - a specific histidine decarboxylase inhibitor in rats, *Agents Actions*, 15, 143-145.
- Nuchanart Rangkadilok, Somkid Sitthimonchai, Luksamee Worasuttayangkurn, Chulabhorn Mahidol, Mathuros. Ruchirawat and Jutamaad Satayavivad, 2007. Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract. *Food and Chemical Toxicology*, 45 (2), 328-336.
- O Benaissa, 2011. Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. *Activité Biologique*. Thèse, Université Mentouri Constantine, Algérie.
- Ø.M. Andersen., K.R. Markham., 2005. FLAVONOIDS; Chemistry, Biochemistry and Applications, *Taylor & Francis Group*, 1197.
- P Siddhuraju and S Manian, 2007. The antioxidant activity and free radical scavenging capacity of dietary phenolic extracts from horse gram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) seeds, *Food Chemistry*; 950–958.

P Capella, G Dezotti, G S Ricca, A F Valentini, G Jacini, 1960. Chromatography on silicic acid of the unsaponifiable matter of fats, *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 37, 564-567.

P CH Hollman<sup>1</sup> and I CW Arts, 2000. Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden, *J Sci Food Agric*; 1081-1093.

P Franchomme et D Penoël, 1990. *L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles*. Roger Jallois éditeur. Limoges. 445p.

P M Dewick, 2002. *Medicinal Natural Products « A Biosynthetic Approach », 2<sup>ème</sup> Ed: John Wiley and Sons Ltd, 507 pp.*

P Molyneux, 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26 (2), 211–219.

P Ozenda, 1983, *Flore du Sahara*, 2nd édition, C.N.R.S, Paris, 432

P Quezl et S. Santa., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, *Ed : centre national de la recherche scientifique*, Paris, 1170.

P Riberau Gayon, 1986. “Les Composes Phénoliques des Végétaux” , Dunod, Paris, 254.

P Vincent, 2008, *Saudi Arabia: An Environmental Overview*, Taylor and Francis, 65-277.

P. Tri Vuong., 2009. Activités antidiabétiques et neuroprotectrices du jus de bleuet bio-transformé, Thèse ; *Univ de Montréal*, 190.

P. Vandiest., B. Bolkaert., M. Raes., C. Baricalla., V. Leonard., C. Delmotte et N. Kirschvink., 2007. Les tannins condensés pour lutter contre le parasitisme gastro-intestinal des agneaux, *filière ovine et caprine*, *Renc. Rech. Ruminants*, 14, 218.

Pitchaon Maisuthisakul, Maitree Suttajit and Rungnaphar Pongsawatmanit, 2007 . Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*, 100 (4), 1409-1418.

R Amarowicza, M Naczka and F Shahidib, 2000. Antioxidant Activity of Crude Tannins of Canola and Rapeseed Hulls, *JAACS*; 957- 961.

R E Hughes et H K Wilson, 1977. Flavonoids: some physiological and nutritional considerations, *Prog. Med. Chem.*,14, 285

R J Hamilton, J B Rossel, 1986. *Analysis of Oils and Fats*, Ed. Elsevier Applied Science Publisher, Londres, A, 155.

R Pulido, L Bravo, and F Saura-Calixo, 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3396-3402.

S A J Zaat, C A Wijffelman, H P Spaink, A A N Van Brussel, R J H Okker et B J J Lugtenberg, 1987. Accumulation of a nod gene inducer, the flavonoid naringenin, in the cytoplasmic membrane of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* is caused by the pH-dependent hydrophobicity of naringenin. *Journal of Bacteriology* ,169, 198.

S Albayrak, A Aksoy, O Sagdic and Ergin Hamzaoglu, 2010. Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey, *Food Chemistry*, 114- 122.

S Baba, N Osakabe, Y Kato, M Natsume, A Yasuda, T Kido, K Fukuda, Y Muto, K Kondo, 2007. Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans. *Am J Clin Nutr.*, 85 (3), 709-717.

- S Carnesecchi, R Bras-Gonçalves, A Bradaia, M Zeisel, F Gossé, M F Poupon, F Raul, 2004. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. *Cancer Lett.*, 215, 53–59.
- S Cocallemen, M Farines; H Faill, J Soulier, O Morin, 1988. Study of the seed oil of eggplant, *Solanum melongena* (L), Solanaceae", *Revue Française des Corps Gras*, 35(3), 105-10.
- S Ivancheva, M. Nikolova and R Tsvetkova, 2006. Pharmacological activities and biologically active compounds of Bulgarian medicinal plants, *Phytochemistry: Advances in Research*; 87-103.
- S Quideau, et K.S Feldman, 1996. Ellagitanin Chemistry, *Chemical Reviews*, 96, n°1, 475-503.
- S S Ali, N Kasoju, A Luthra, A Singh, H Sharanabasava, A Sahu and U Bora, 2008. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants, *Food Research International*; 1–15.
- S Veillet , 2010. Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive : entre tradition et innovation. thèse présentée pour l'obtention du diplôme de doctorat d'état en chimie. Université D'avignon Et Des Pays De Vaucluse, Marseille. France.
- S Wang, S.K Noh, S.I Koo, 2006. Green tea catechins inhibit pancreatic phospholipase A(2) and intestinal absorption of lipids in ovariectomized rats. *J Nutr Biochem.*, 17 (7), 492-498.
- S. Albayrak, A. Aksoy,, O. Sagdic and E. Hamzaoglu, 2010. Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey, *Food Chemistry*, 114–122.
- S. D. Sarker., Z. Latif and A. I. Gray., 2006. *Natural Products Isolation*, 2<sup>ème</sup> Ed; *Humana press*, 515.
- S. Fiorucci., 2006. Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire, *Thèse ; Univ de Nice-Sophia Antipolis*, France, 211.

T N Kaul, E Middleton et P.L Ogra, 1985. Antiviral effect of flavonoids on human viruses, *J. Med. Virol.*, 15, 71-79.

T Swain, 1975. *The Flavonoids*, Harborne, J.B., Mabry, T.M., Mabry H. (Eds), Chapman and Hall, London. 1096-1129.

T Swain, 1976. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Goodwin, T.W. (Ed), 2<sup>ème</sup> Edition, Academic Press, London, 1, 425.

V D Spracklen, B Bonn and W Kenneths Carsla, 2008. Boreal forest, aerosols and the impacts on clouds and climates. *Phil. Trans-R. Sos.A.* doi: 10.1098/ rsta, 201.

V L Singleton et J A Ross, 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphotungstic acid reagent, *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.

Victoria García-Mediavilla, Irene Crespo, S Pilar. Collado, Alejandro Esteller, Sonia Sánchez-Campos, María J. Tuñón and Javier González-Gallego, 2007. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and downregulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *European Journal of Pharmacology*, 557 (2-3), 221-229.

W G Horpkins, 2003. *L'organisation des plantes et des cellules végétales. physiologie végétale.* Ed: Boeck et lacier, Bruxelles, 1-10.

W Heller et H Geiger, 1988. *The Flavonoids Advances in Research Since 1980*, Harborne, J.B.(Eds), Chapman and Hall, London, 399.

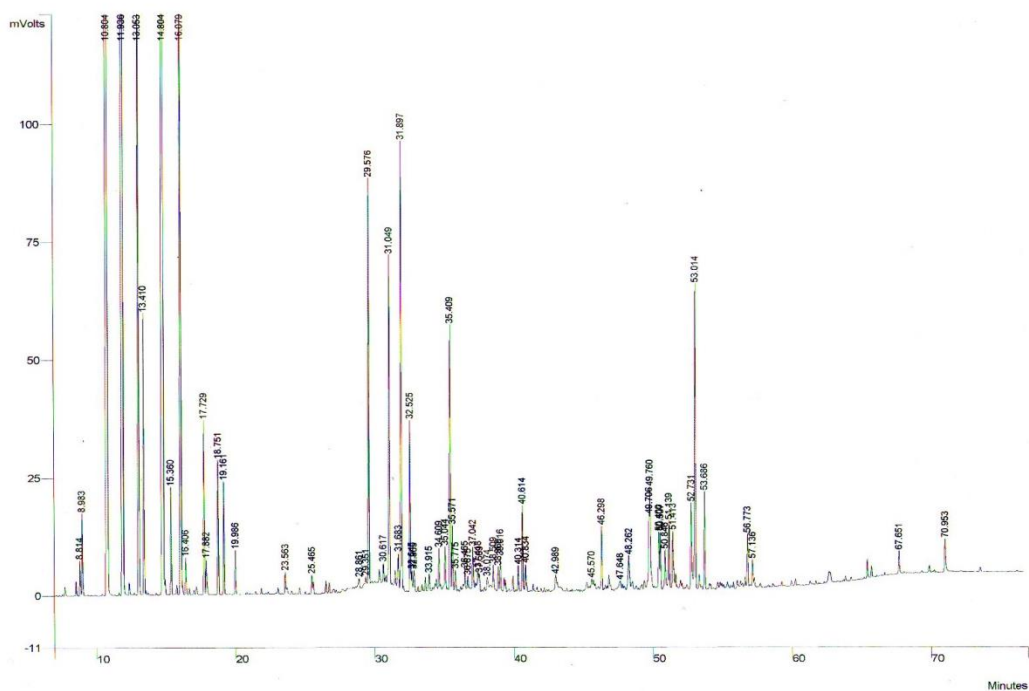
W Vermerris and R Nicholson, 2006. Phenolic compounds biochemistry, *Library of Congress*, 276 .

W. Brand Williams., M. E. Cuvelier and C. Berset., 1994. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *lebensm-wiss-techno*, 25-30.

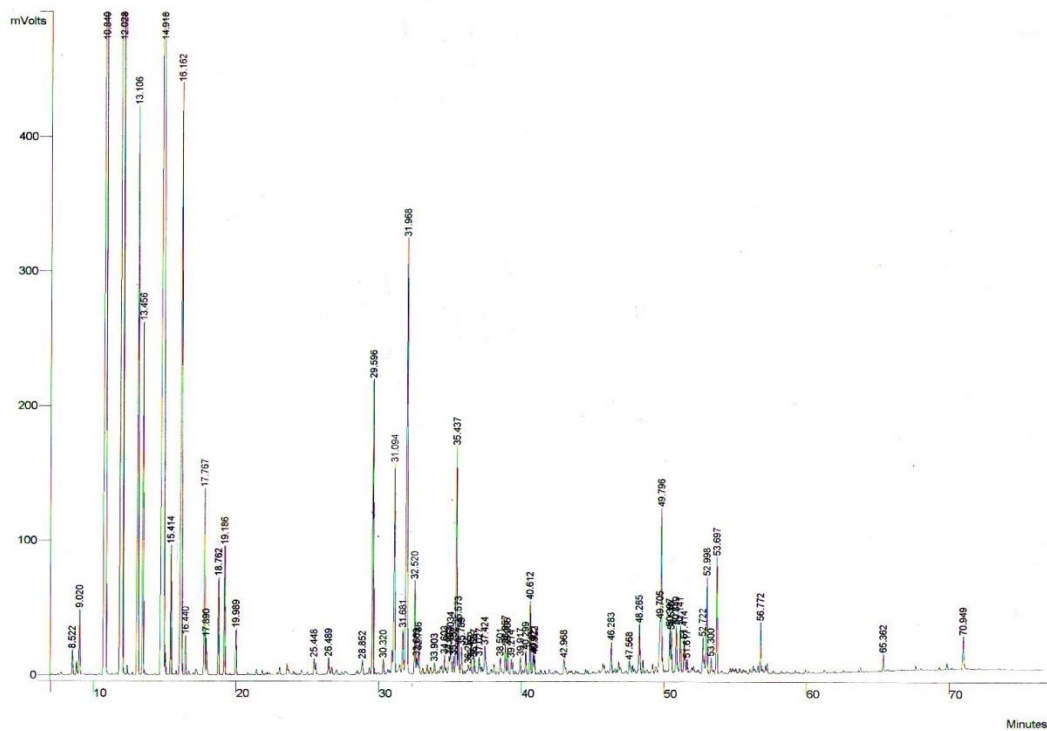
- W.C Hope, A.F Welton, C.F Nagy et J.W Coffrey, 1981. ANNUAL REPORTS IN MED CHEMISTRY V19 PPR Fed. Proc., 40, 4488.
- W.C. Evans., 2006. Pharmacognosy, V.C Saunders, 585.
- Y Nishizuka, 1986. Studies and perspectives of protein kinase C, Science, V.233, 305-312.
- Y Hamanura, K Hayashiya, , K I Naito, K Matsuura et J Nishida, 1962. Nature, 194, 754.
- Y Mukohata, S Nakadayashi et M Higashida, 1978. Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation, FEBS Lett., 85, 215-218.
- Y Y Lim, and J Murtijaya, 2007. Antioxidant properties of Phyllanthus amarus extracts as affected by different drying methods. *Food Science and Technology*, 40, 1664–1669.
- Y. Rolland., 2004. Antioxydants naturels végétaux, *OCL*, 419- 425.
- Yinrong Lu and L. Yeap Foo, 2002 . Polyphenolics of Salvia—a review. *Phytochemistry*, 59 (2), 117-140.
- Z. Liu., 2010. Chemical Methods to Evaluate Antioxidant Ability, *Chem. Rev.* 5675–5691.
- Zdzisława Nowakowska, 2007. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42 (2), 125-137.



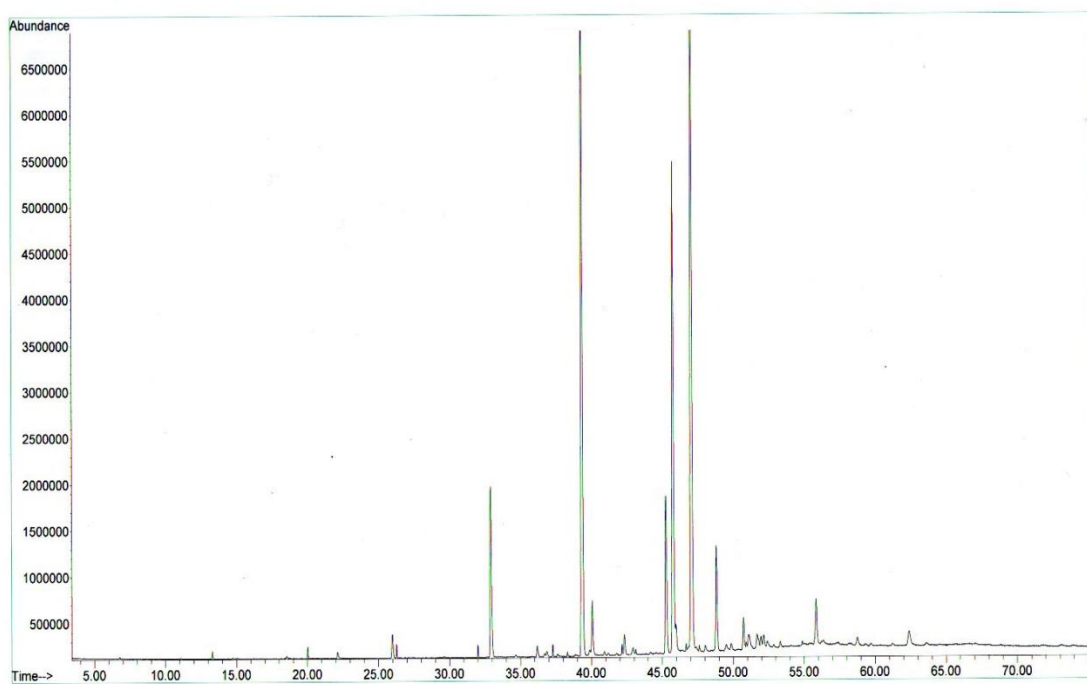
# *Annexes*



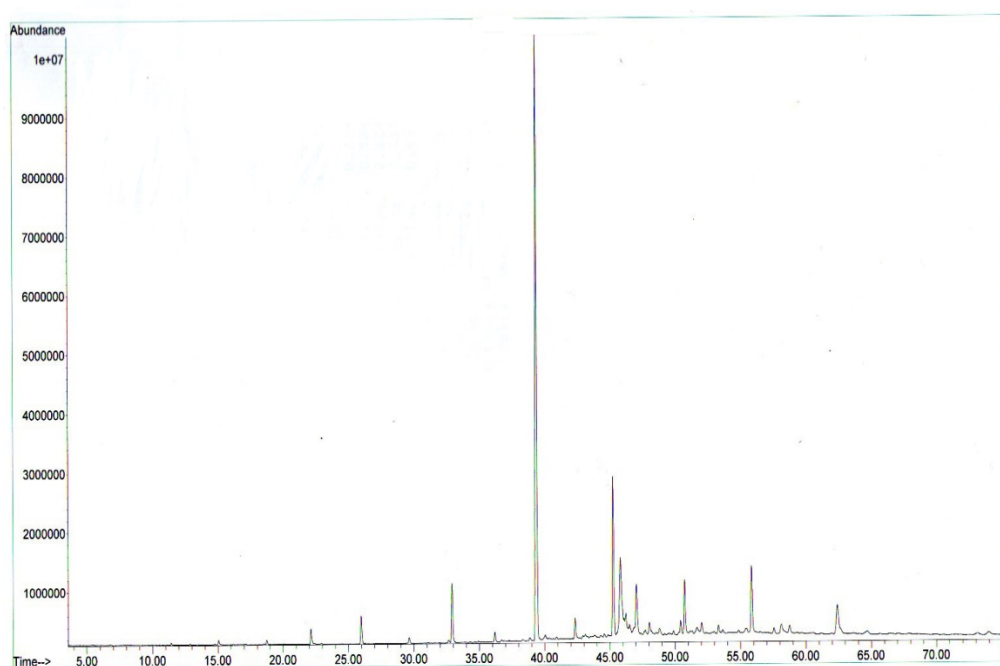
Chromatogramme typique de l'huile essentielle des fleurs (F2) de *Rhanterium adpressum*



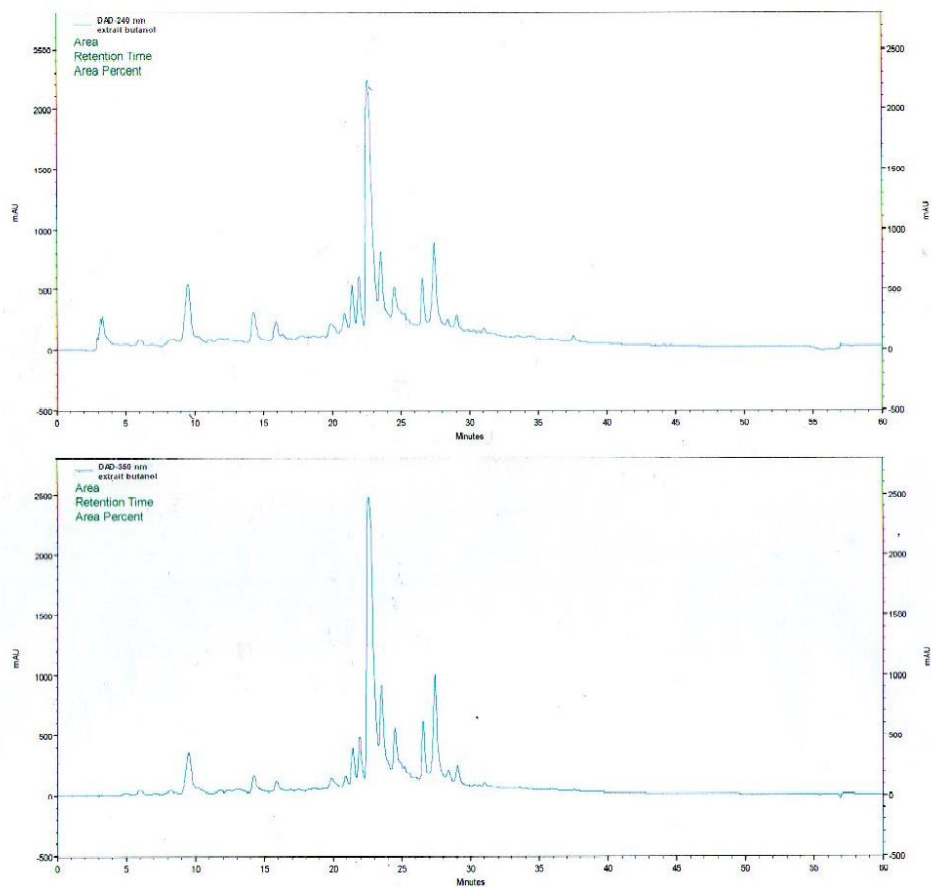
Chromatogramme typique de l'huile essentielle des fleurs (F1) de *Rhanterium adpressum*



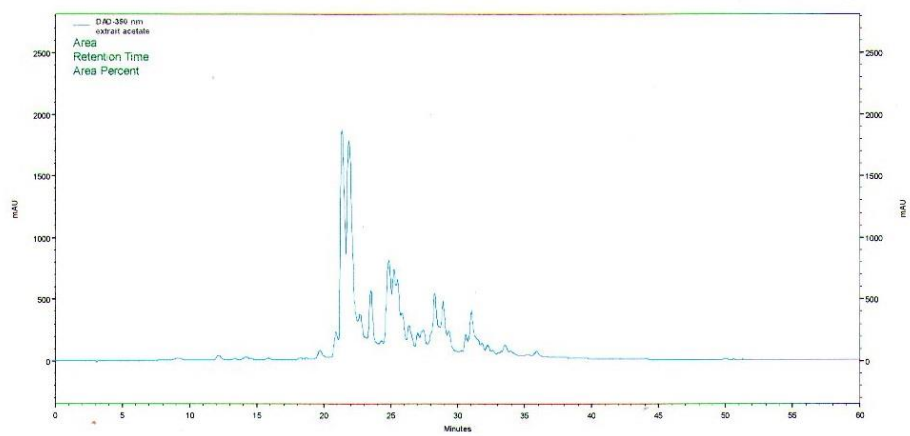
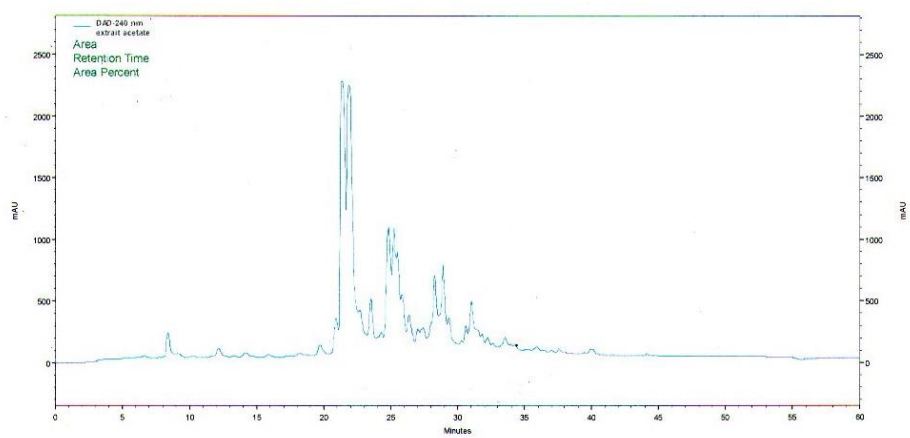
**Chromatogramme des EMAG (mois de mars)**



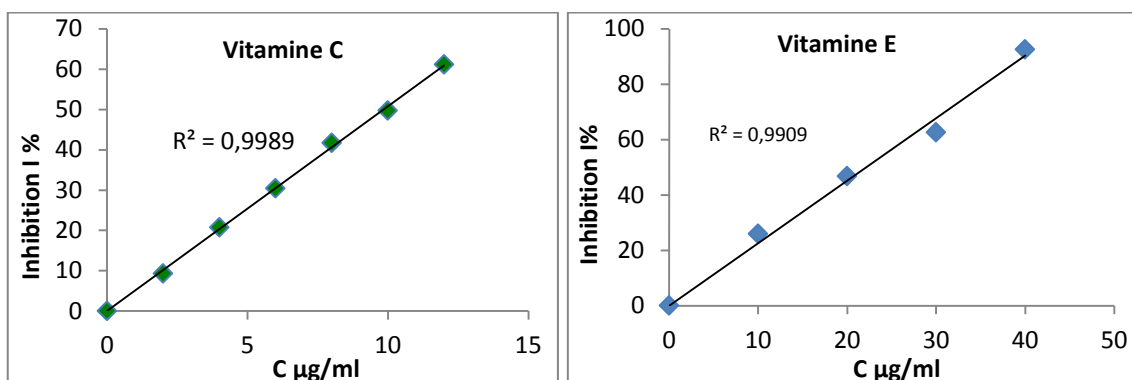
**Chromatogramme des EMAG (mois de mai)**



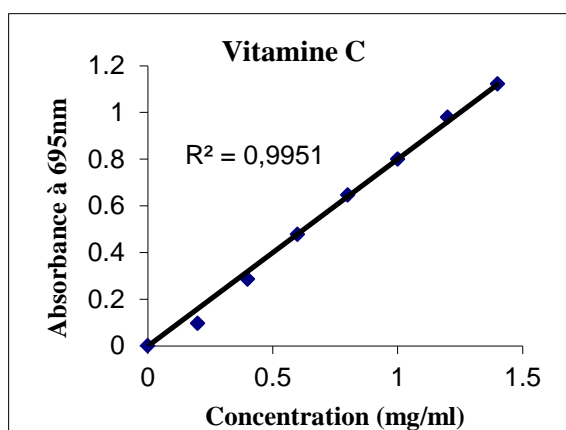
**Chromatogramme de l'extrait Butanol montrant la détection à 240nm et 350 nm**



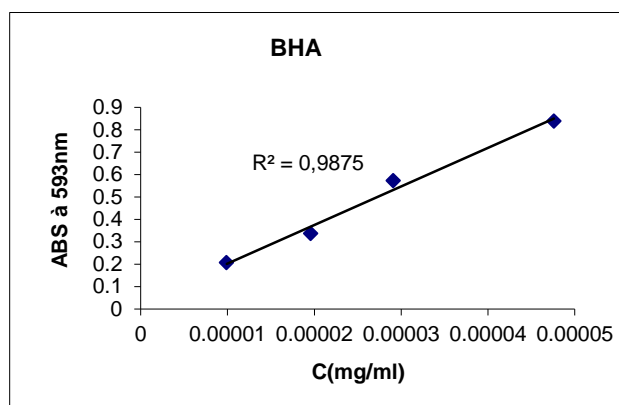
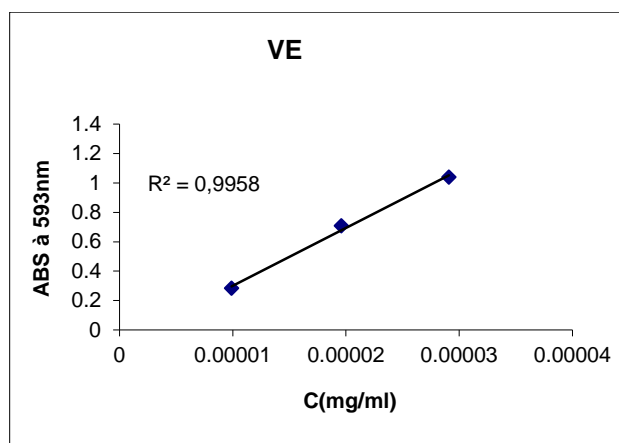
**Chromatogramme de l'extrait Acétate d'éthyle montrant la détection à 240nm et 350 nm**

**Activité antioxydante des lipides****Test DPPH**

**Test DPPH: la vitamine C et la vitamine E antioxydants synthétiques (Standards)**

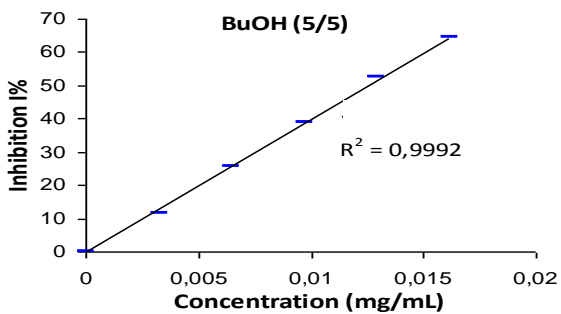
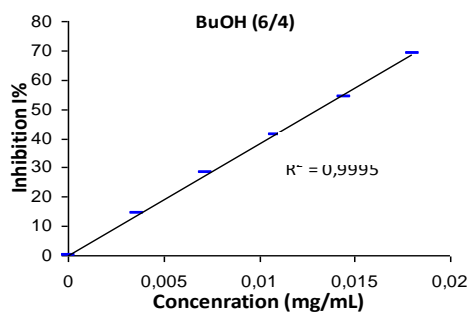
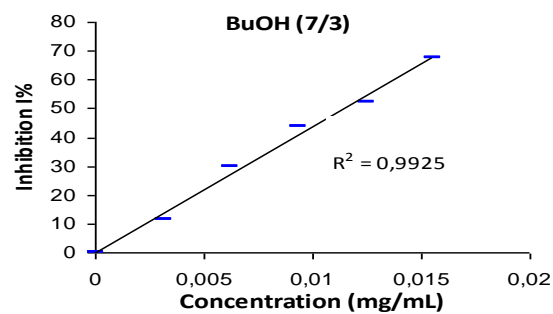
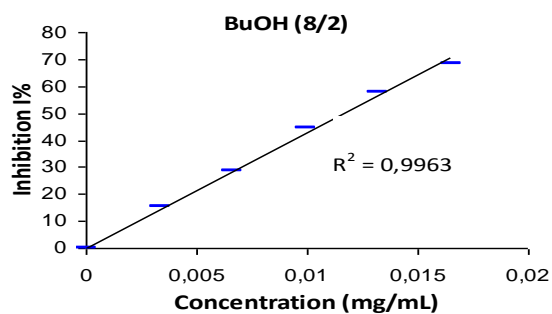
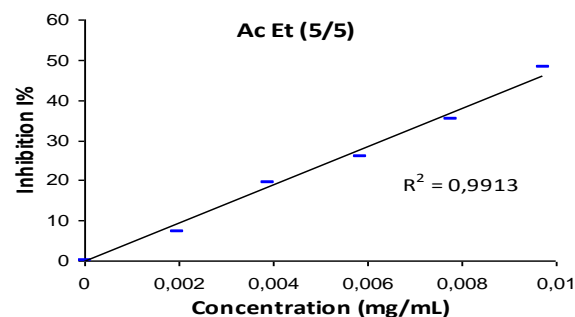
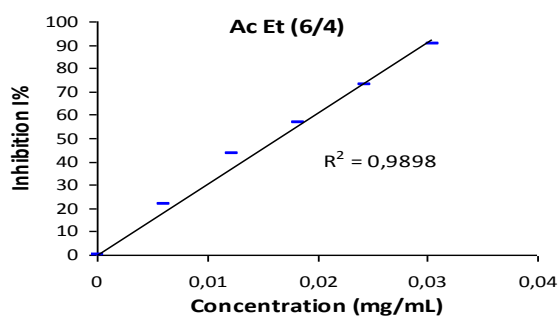
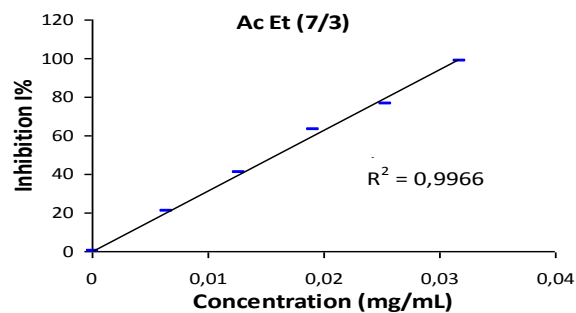
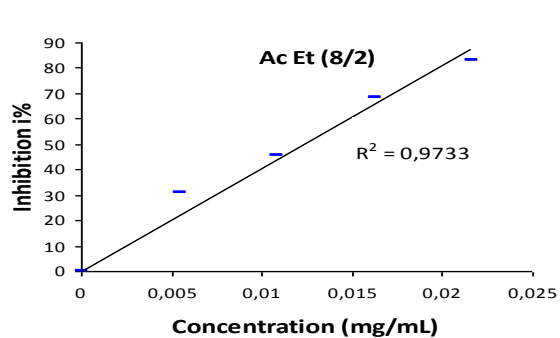
**Test FRAP**

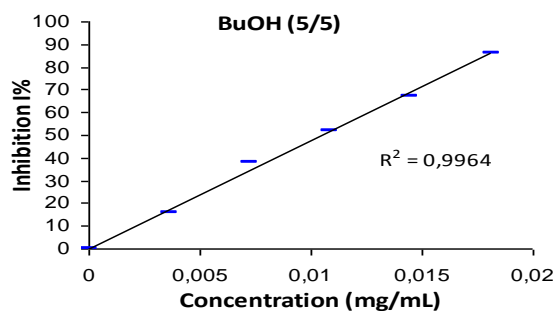
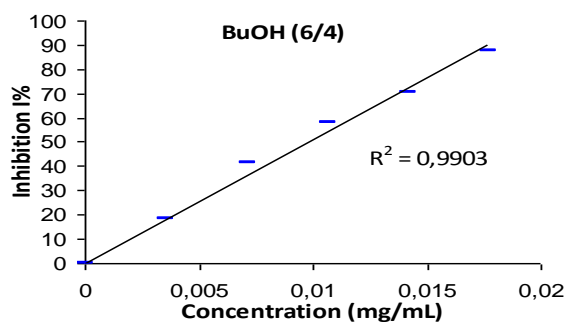
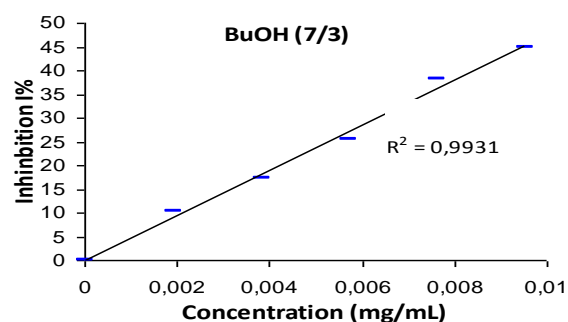
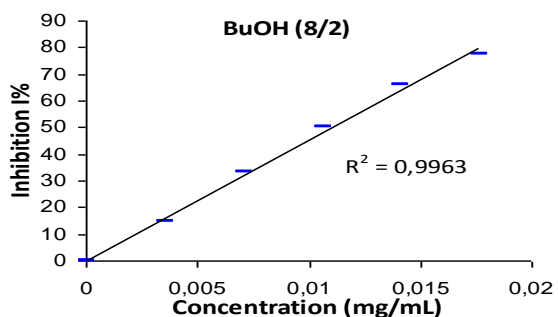
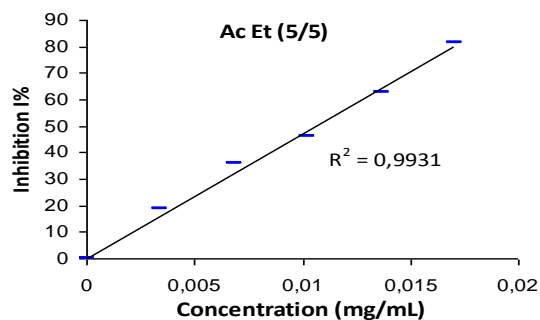
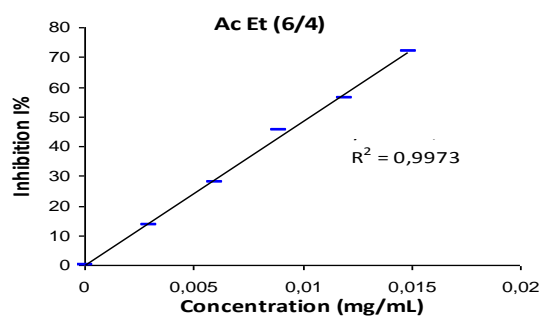
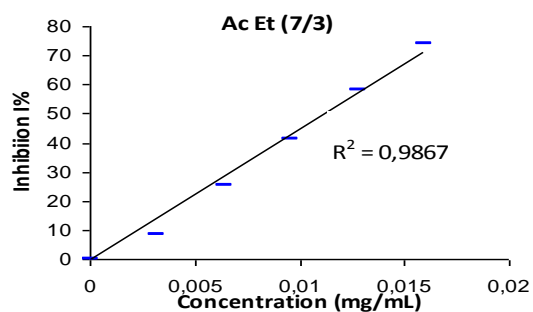
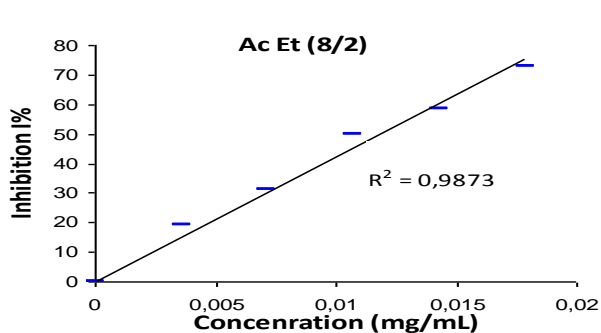
**Test FRAP: Vitamine C (antioxydant de référence)**

**Activité antioxydante des huiles essentielles****Test FRAP****Test FRAP: Le BHA (antioxydant de référence)****Test FRAP: La vitamine E (antioxydant de référence)**

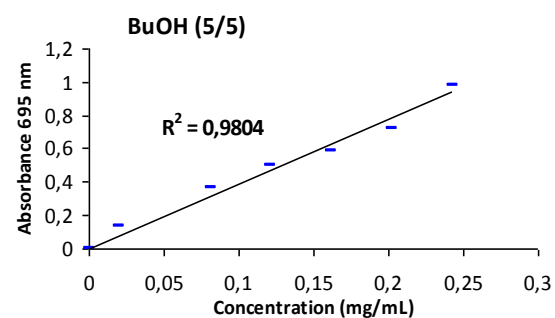
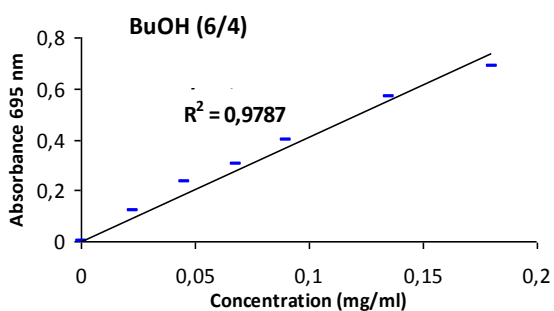
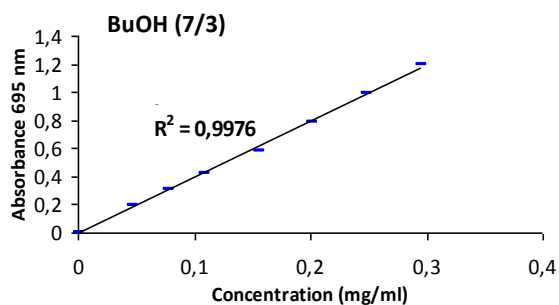
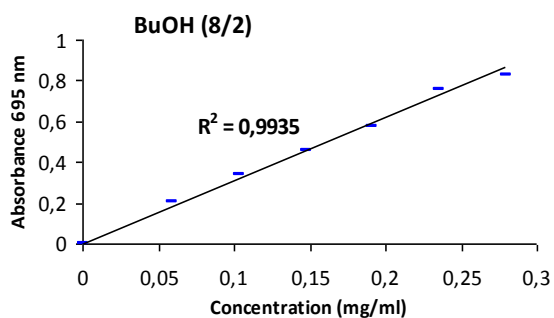
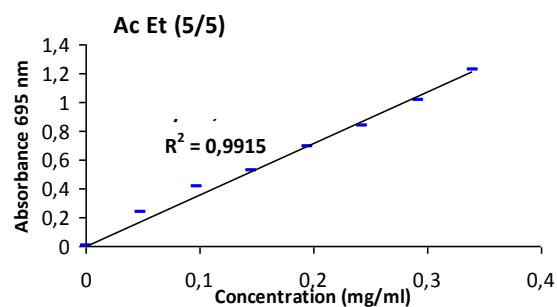
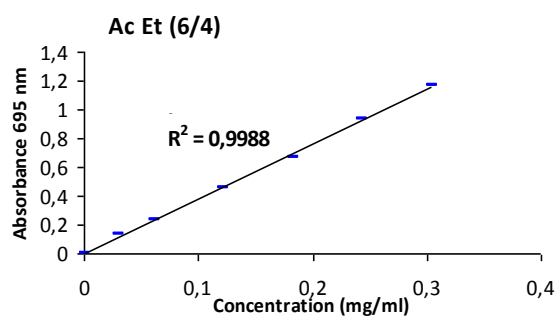
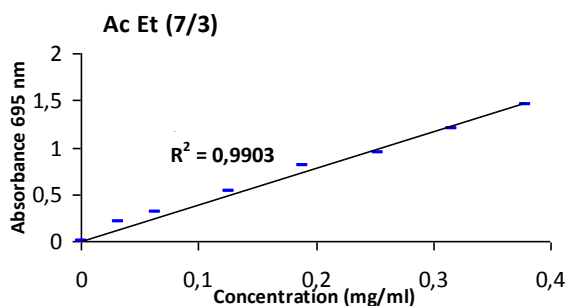
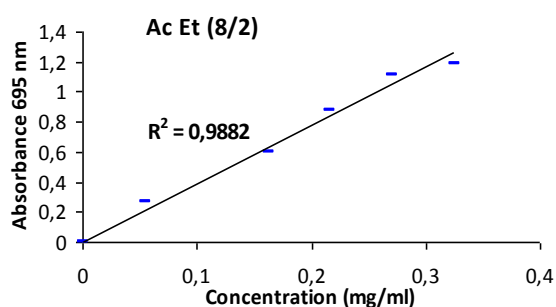


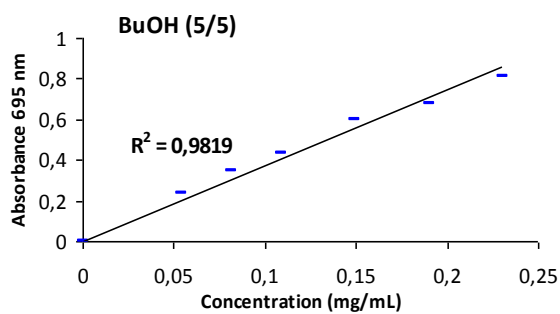
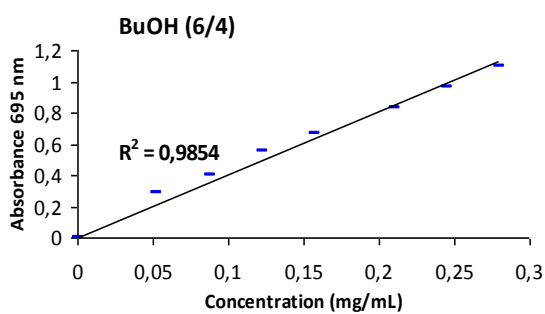
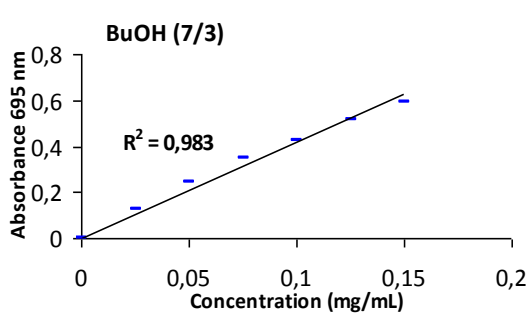
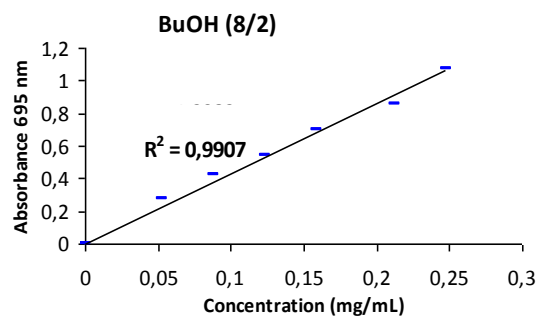
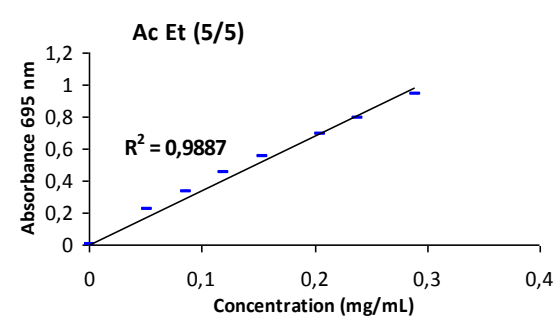
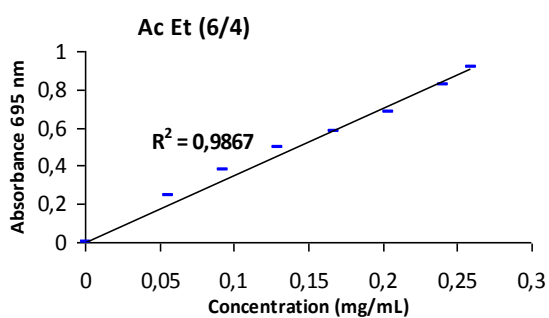
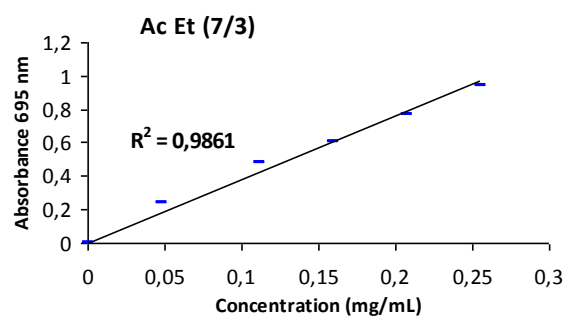
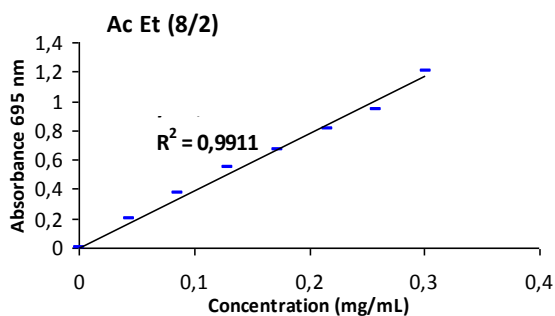
Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration en phénols des extraits d'acétate d'éthyle et de butanol issus d'une extraction (acétone/eau) et (méthanol/eau) (Test du DPPH)





Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction (acétone/eau) et (méthanol/eau) (**Test du phosphomolybdate**)





Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition PI% en fonction de la concentration en phénols des extraits d'acétate d'éthyle et de butanol issus d'une extraction (acétone/eau) et (méthanol/eau) (Test d'ABTS)

