

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université A. Mira de Bejaïa

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de biologie Physico-Chimique

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Option : Biochimie Appliquée

Thème

Etude de l'activité anti-oxydante des
extraits des feuilles et des racines de
Thapsia garganica (la thapsie).

Présenté par



Jury

M^{elle} Idir Nawel

M^{elle} Ouadir Kahina

Présidente : M^{elle} Sebahi S.

Examinatrices : M^{me} Amir H.

: M^{me} Bennai Y.

Promotrice : M^{elle} Adrar S.

Promotion: 2011/2012



Remerciements

Tout d'abord, nous exprimons nos remerciements au bon dieu de nous avoir donné le courage et la force pour terminer notre travail et pour sa bienveillance.

Profonde gratitude va à notre promotrice M^{lle} ADRAR Sabah pour ses précieux conseils, ses orientations, son aide et nous lui souhaitons la réussite dans ses projets.

Nous tenons également à exprimer nos sincères remerciements à la présidente de jury M^{lle} Sebaihi S. pour nous avoir consacré de son temps en nous faisant l'honneur d'accepter de présider le jury.

Nous remercions également les examinatrices, M^{me} Amir H. et M^{me} Bennai Y. pour nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Sans oublier l'ensemble des enseignants ayant contribué à notre formation durant notre cycle d'étude.

Enfin nos remerciements s'adressent plus particulièrement à nos familles et nos amis(es) qui ont su nous soutenir, nous encourager, nous aider et nous supporter tous au long des années.

Dédicaces

Dédicaces

Avec ma gratitude et grand amour, je dédie ce modeste travail

à :

- *La mémoire de ma chère grand mère « Ourida », que Dieu l'accueille dans son vaste paradis.*
- *Mon bien aimé, symbole de courage et de volonté, qui a consacré et sacrifié sa vie pour le bien être de notre famille : « jeddi Abdellah ».*
- *Ma chère grand mère « Khoukha » pour qui je souhaite une longue vie pleine de santé.*
- *La principale cause de ma réussite, prunelles de mes yeux... Qui j'ai tant aimé avec beaucoup d'affection : Mes parents.*
- *Mes très chers oncles qui ont toujours été à mes côtés et ont su m'aider le moment où il le fallait : « Ami Kamel, Ami Rabeih et Ami Hamou ».*
- *Qui je suis très fière de les avoir comme sœurs : Dyhia et Rebiha.*
- *Mes adorables frères : Massinissa et Koceila.*
- *Ma copine et ma binôme : Kahina.*
- *Mes amis (es) depuis mon enfance à ce jour. Un grand merci pour votre compréhension, confiance et fidélité.*
- *A toutes ma famille, sans oublier mes tantes, mes cousins et cousines.*
- *A tous ceux qui me sont chers.*

Nawel





Dédicaces

Je rends grâce, à mon dieu de m'avoir donné la force, la volonté, l'intelligence et la sagesse d'être patiente dans mes études.

Je dédie ce modeste travail :

A Mes parents, symboles de courage et de volonté, qui ont consacré et sacrifié leurs vies pour mon bien être ;

A mon cher mari : Abd-el malek pour sa patience

A Mes chers frères : Larbi et Madani.

A Mes chères sœurs : Nora, Hdjila Maria et Nissa.

A ma belle famille

A Ma meilleure amie : Nawel.

A Ma grande-mère Fatima.

A Mon cher neveu : Saïd.

A Mes nièces : Melissa et Imane.



Sommaire

Introduction.....	1
Synthèse bibliographique	
I -Les radicaux libres.....	2
I-1- Définition des radicaux libres.....	2
I-2- Les radicaux libres en biologie.....	2
I-3- Génération des espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène.....	2
I-4- Le stress oxydant.....	6
I-4-1- Définition.....	6
I-4-2- Les facteurs favorisant la génération du stress oxydant.....	7
I-5- Conséquences du stress oxydant.....	8
I-5-1- Peroxydation lipidiques.....	8
I-5-2- L'oxydation de l'ADN.....	9
I-5-3- L'oxydation des protéines.....	11
I-6-Pathologies liées au stress oxydant.....	12
II-Les antioxydants.....	14
II-1-Définition des antioxydants.....	14
II-2-Classification des antioxydants.....	14
II-2-1-Les antioxydants endogènes.....	14
II-2-1-1- Les antioxydants enzymatiques.....	14
II-2-1-2-Les protéines antioxydantes.....	17
II-2-2- Les antioxydants exogènes.....	17
II-2-2-1-Les oligo-éléments.....	17
II-2-2-2-Les vitamines.....	18
II-2-2-3- Les composés phénoliques.....	22

Partie pratique

I-Matériels et méthodes.....	31
I-1- La plante <i>Thapsia garganica</i>	31
I-1-1-Description	31
I-1-2-Usage médicinal.....	31
I-1-3-Classification classique.....	31
I-2- Cueillette de la plante	32
I-3-Séchage, broyage et tamisage.....	32
I-4-Préparation des extraits.....	32
I-5-Dosage des composés phénoliques.....	33
I-5-1-Dosage des phénols totaux.....	34
I-5-2-Dosage des flavonoïdes.....	34
I-5-3-Dosage des proanthocyanidines	35
I-6-Activités antioxydantes des extraits.....	35
I-6-1-Activité scavenging du radical DPPH.....	35
I-6-2-Pouvoir réducteur.....	36
I-6-3-La chélation du fer	37
I-7-Etude statistique	37
II-Résultats et discussion.....	38
II-1-Extraction.....	38
II-2- Dosage des composés phénoliques.....	39
II-2-1-Dosage des phénols totaux.....	39
II-2-2-Dosage des flavonoïdes.....	41
II-2-3-Dosage des proanthocyanidines.....	42
II-3-Activités antioxydants de <i>Thapsia garganica</i>	43
II-3-1-Activité scavenging du radical DPPH.....	43
II-3-2-Pouvoir réducteur.....	45
II-3-3-Activité chélatrice du fer.....	46
Conclusion et perspectives	48
Références bibliographiques.....	49
Annexes	

Liste des figures

Figure 1 : Schéma montrant l'hydroxylation oxydative de l'hypoxanthine en xanthine et en acide urique.....	4
Figure 2 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliquées en biologie.....	5
Figure 3 : Source cellulaires et interconversions des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN).....	6
Figure 4 : Définition du stress oxydant.....	7
Figure 5 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des Cellules.....	10
Figure 6 : Illustration d'un mode d'action des radicaux hydroxyles (addition sur les doubles liaisons) avec une base de l'ADN, la guanine.....	10
Figure 7 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire.....	11
Figure 8 : Pathologies liées au stress oxydant.....	12
Figure 9 : Hypothèse inflammatoire de l'athérogénèse	13
Figure 10 : Site d'action des nutriments antioxydants et des enzymes antioxydantes.....	14
Figure 11 : Mécanisme d'action de la superoxyde dismutase.....	15
Figure 12 : Formule développée du glutathion	16
Figure 13 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques.....	17
Figure 14 : Effet de synergie entre les vitamines et les oligo- éléments.....	18
Figure 15 : Structure chimique des tocophérols et des tocotriénols	19
Figure 16 : Action antioxydante de la vitamine E ; interruption de la phase de propagation.....	19
Figure 17 : Structure chimique de l'acide ascorbique.....	20
Figure 18 : Les formes variées de l'acide ascorbique et sa réaction avec les radicaux R'	20
Figure 19 : Mécanisme de régénération potentiel entre l' α -tocophérol (α -TOH), l'ascorbate (AscO-) et les flavonoïdes (Fl) dans les systèmes membranaires.....	20
Figure 20 : Structure du β -carotène.....	21

Figure 21 : Production des phényle propanoïdes, stiblenes, lignanes, lignines, subérines, cutines, flavonoïdes et tanins à partir de la phénylalanine (Pal)	22
Figure 22 : les structures chimiques des différents acides phénoliques	23
Figure 23 : Exemple de structure d'un tannin condensé.....	24
Figure 24 : Structure de l'acide gallique (A), d'un exemple de tannins hydrolysables (B) et de l'acide ellagique (C).....	24
Figure 25 : Structure de base des flavonoïdes.....	25
Figure 26 : Effets biologiques des polyphénols. eNOS, NO synthase endothéliale ; iNOS, NO synthase inductible ; NF-kB, facteur nucléaire -kB.....	27
Figure 27 : La complexation de l'ion métallique par les flavonoïdes	30
Figure 28 : Photographie des feuilles de <i>Thapsiagarganica</i>	31
Figure 29 : Photographie des racines de <i>Thapsiagarganica</i>	31
Figure 30 : Schéma d'extraction.....	33
Figure 31 : Mécanisme de la réaction de la vanilline avec les tanins condensés.....	35
Figure 32 : Teneurs en phénols totaux dans les extraits des racines et des feuilles de <i>Thapsia garganica</i>	39
Figure 33 : Teneurs en flavonoïdes dans les extraits des racines et des feuilles de <i>Thapsia garganica</i>	41
Figure 34 : Teneurs en proanthocyanidines dans les extraits des racines et des feuilles de <i>Thapsia garganica</i>	42
Figure 35 : Pourcentages de l'activité scavenging du radical DPPH des extraits des feuilles et des racines de <i>Thapsia garganica</i> et des standards.....	43
Figure 36 : Activité scavenging de radical DPPH des différentes concentrations de l'acide ascorbique et de la BHA.....	44
Figure 37 : Activité scavenging de radical DPPH des différentes concentrations des extraits éthanolique des feuilles de <i>Thapsia garganica</i>	45
Figure 38 : Représentation graphique de l'absorbance de l'ion ferreux (Fe^{2+}) du pouvoir réducteur des extraits des feuilles et des racines de <i>Thapsia garganica</i> et du standard.....	45
Figure 39 : Pourcentages de l'activité chélatrice du fer des extraits des feuilles et des racines de <i>Thapsia garganica</i> et du standard.....	46

Liste des tableaux

Tableau I : Structures chimiques des flavonoïdes et quelques exemples.....	25
Tableau II : Tableau récapitulatif de quelques résultats obtenus dans le monde sur les activités antioxydants des extraits de plantes médicinales.....	28
Tableau III : Les pourcentages d'extraction pour chaque extrait de <i>Thapsia garganica</i>	38

Synthèse bibliographique

Introduction

Introduction

Bien avant la médecine moderne, la guérison par les plantes était utilisée par nos ancêtres depuis plusieurs siècles. Ainsi, l'Homme a remarqué que les préparations à base des racines, d'écorces, des feuilles et des fleurs de certaines espèces végétales (plantes médicinales) pouvaient soulager ses douleurs et ses maux divers. Mais, le développement du domaine chimique a orienté les chercheurs vers la synthèse de principes actifs d'une manière abondante et hâtive. Néanmoins, le traitement avec ces molécules chimiques, a laissé apparaître des effets secondaires au niveau de l'organisme. Par conséquent, les chercheurs se sont retournés vers la médecine naturelle qui consiste en l'exploitation des différentes drogues végétales, la phytothérapie. En effet, les plantes médicinales possèdent des métabolites secondaires dont les composés phénoliques qui sont doués de plusieurs activités biologiques telles que les activités : anti-oxydante (**Skerget et al., 2005 ; Talavera et al., 2004**), anti-microbienne (**Falleh et al., 2008**) et anti-inflammatoire (**Middleton et al., 2000**).

Durant le métabolisme énergétique, en addition à d'autres voies, des espèces dérivées de l'oxygène sont générées, très réactives, assurant habituellement le bon fonctionnement de l'organisme et la santé des mammifères. En outre, ces derniers possèdent des systèmes moléculaires de neutralisation du surplus de production de ces espèces réactives de l'oxygène, grâce à leur pouvoir antioxydant. Toutefois, dans des conditions physiopathologiques, la balance penche en faveur du rehaussement des taux en substances pro oxydantes où leur excès peut être néfaste en s'attaquant à des biomolécules telles que : les protéines, les glucides, les lipides et l'ADN (**Favier, 2003**), engendrant de ce fait diverses pathologies, le cancer, les maladies neurodégénératives (**Albert et al., 2003**), les maladies cardiovasculaires (**Beaudeau et al., 2006**) et le vieillissement...

Par conséquent, l'objet de notre étude se portera sur l'évaluation de l'effet antioxydant des composés phénoliques extraits à partir de la plante médicinale locale *Thapsia garganica* (la thapsie). Néanmoins, avant de procéder aux protocoles expérimentaux, il est nécessaire, du moins de survoler l'essentiel de certaines notions qu'on juge très utiles pour la bonne compréhension et la bonne maîtrise du sujet.

Chapitre-I-
Les radicaux libres

I-1-Définition des radicaux libres

Un radical libre est un atome ou une molécule qui contient un ou plusieurs électrons non appariés, comme conséquence de la perte d'un ou plusieurs électrons de l'orbite externe, aboutissant à la formation d'une demi-liaison qu'il faut satisfaire par un pillage local d'électrons (**Berger, 2006**). Les radicaux libres sont des composés caractérisés par une structure électronique déséquilibrée qui leur confère une grande réactivité sur les constituants organiques et sur les structures cellulaires (**Aurousseau, 2002**).

Les radicaux libres ont une durée de vie très courte (millionième de seconde) mais pendant ce laps de temps ils réagissent avec les molécules environnantes ce qu'on appelle la chaîne oxydative (**Rabelais, 2005**). Ils sont produits quand une liaison covalente est rompue de telle sorte que chaque partie a conservé la moitié des électrons en commun, comme ils peuvent se former quand un atome ou une molécule accepte un seul électron au cours d'une réaction oxydoréduction (**Karp, 2010**).

I-2-Les radicaux libres en biologie

En biologie, les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électrons à partir de l'oxygène (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**). Les espèces pro-oxydantes sont représentées par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives du nitrogène (ERN) (**Groussard, 2006**), qui sont les produits du métabolisme cellulaire normal et à des concentrations faibles à modérées elles sont connues de posséder des rôles physiologiques variés allant de la transduction du signal cellulaire à la défense contre les pathogènes (**Dastmatchi et al., 2007**).

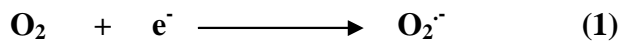
Les radicaux libres les plus courants sont le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) et le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}). D'autres molécules, comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'ion peroxydrite ($ONOO^{\cdot}$) dont leur toxicité est importante, ils ne sont pas des radicaux libres mais ils peuvent en générer par différentes réactions chimiques (**Tamion et al., 2003 ; Ré et al., 2005**).

I-3-Génération des espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène

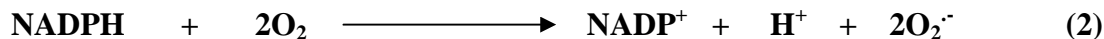
La production des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules de mammifères est essentiellement d'origine enzymatique, la NADPH oxydase membranaire (nicotine-adénine-dinucléotide phosphate) et le complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire en sont les principales sources (**Beaudeau et al., 2006**).

I-3-1-L'anion superoxyde

Un des sites de production du plus simples des radicaux libres oxygénés, l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est la mitochondrie, dans l'organisme au repos (**Arrousseau, 2002**). La formation d'anion superoxyde par la chaîne respiratoire mitochondriale est un événement physiologique correspondant à une fuite d'électrons aux niveau des complexes I et III, qui ne dépasse pas 3 à 5% de la production mitochondriale (**Beaudeux et al., 2006**). Alors que la majorité de l'oxygène consommé par la mitochondrie est converti en eau au niveau du complexe IV (cytochrome C oxydase), l'oxygène peut récupérer les électrons directement à partir de site de l'ubiquinone dans le complexe III et à partir du groupement de la flavine mononucléotide du complexe I pour générer l' $O_2^{\cdot-}$ (**Ballinger, 2005 ; Ré et al., 2005**) :



Les cellules phagocytaires (polynucléaires et/ou macrophages) possèdent une enzyme membranaire : la NADPH oxydase, cette enzyme induit la production d'anion superoxyde, nécessaire à la destruction du matériel phagocyté (**Tamion et al., 2003**), selon la réaction suivante (**Mohazzab et al., 1994**) :

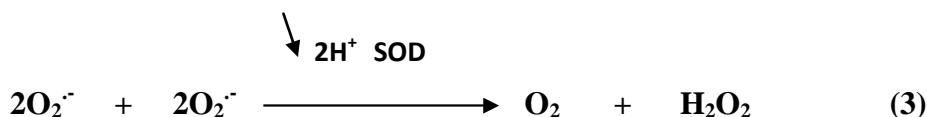


Au sein du Réticulum Endoplasmique et des microsomes se trouve le cytochrome P450. Il s'agit d'une hydrolase qui intervient dans le métabolisme des stéroïdes et des médicaments. Le fer présent à l'intérieur de ce cytochrome est susceptible de réagir avec l'oxygène et de produire l'anion superoxyde (**Borg et Reeber, 2008**).

Les oxydases (xanthine oxydase, NO synthase, et eicosanoïde) constituent également des sources cellulaires de la production de l'anion superoxyde (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

I-3-2-Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est un intermédiaire stable capable de traverser les membranes lipidiques et il est capable de générer ainsi les radicaux hydroxyles (**Pons-Rejraji et al., 2009**). Il se trouve dans les organites cellulaires comme le peroxysome (**Gardès-Albert et al., 2003**). Le $O_2^{\cdot-}$ est peu réactif et rapidement dismuté en H_2O_2 soit spontanément ou sous l'action de la superoxyde dismutase (SOD) (**Afenson et al., 2007 ; Pons-Rejraji et al., 2009**) selon la réaction suivante :



Par ailleurs, la membrane mitochondriale externe renferme une monoamine oxydase capable de catalyser la désamination oxydative de certaines amines avec une production simultanée de H_2O_2 (**Gardès-Albert et al., 2003**). En outre, la xanthine oxydoréductase produit également le H_2O_2 par plusieurs réactions (**Lin et al., 2008**).

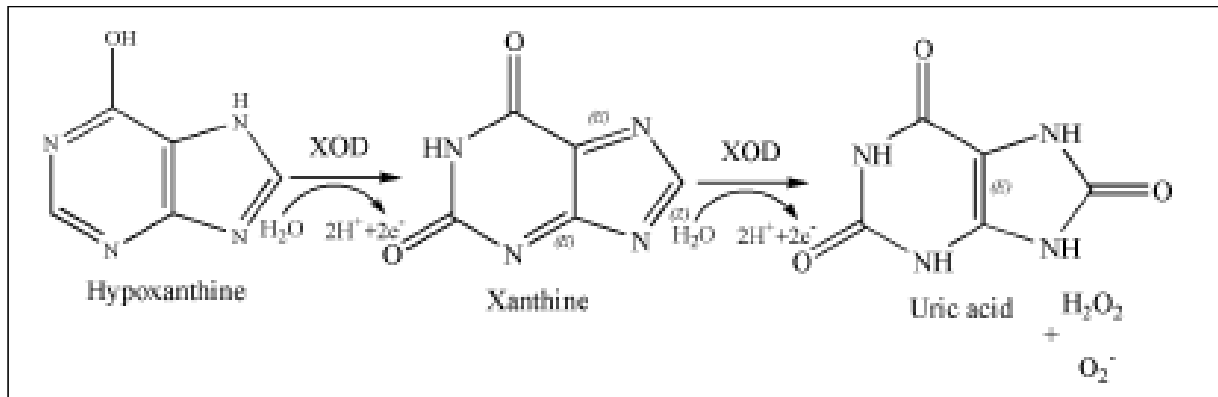
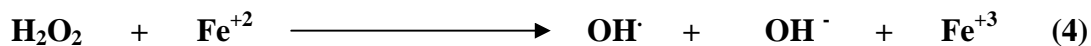


Figure 1 : Schéma montrant l'hydroxylation oxydative de l'hypoxanthine en xanthine et en acide urique (**Kalra et al., 2007**).

I-3-3-Le radical hydroxyle

Une espèce hautement réactive, qui peut être générée durant la réaction de Haber-Weiss/Fenton qui consiste en une étape de réduction du fer par le $\text{O}_2^{\cdot-}$ et une étape de génération de OH^{\cdot} via la réaction de Fenton (**Nunoshiba et al., 1999**).

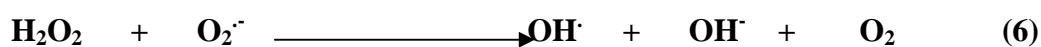
Le H_2O_2 est également peu réactif mais il a la capacité de traverser les membranes cellulaires et, en présence de métaux de transition tel que le Fe^{+2} , de se transformer en un puissant oxydant, le radical hydroxyle, selon la réaction suivante (ou réaction de Fenton) (**Ré et al., 2005**) :



Le radical superoxyde peut réduire le Fe^{+3} et régénérer le Fe^{+2} , selon la réaction :



Le bilan de ces deux dernières réactions (ou réaction d'Haber-Weiss) est donc :



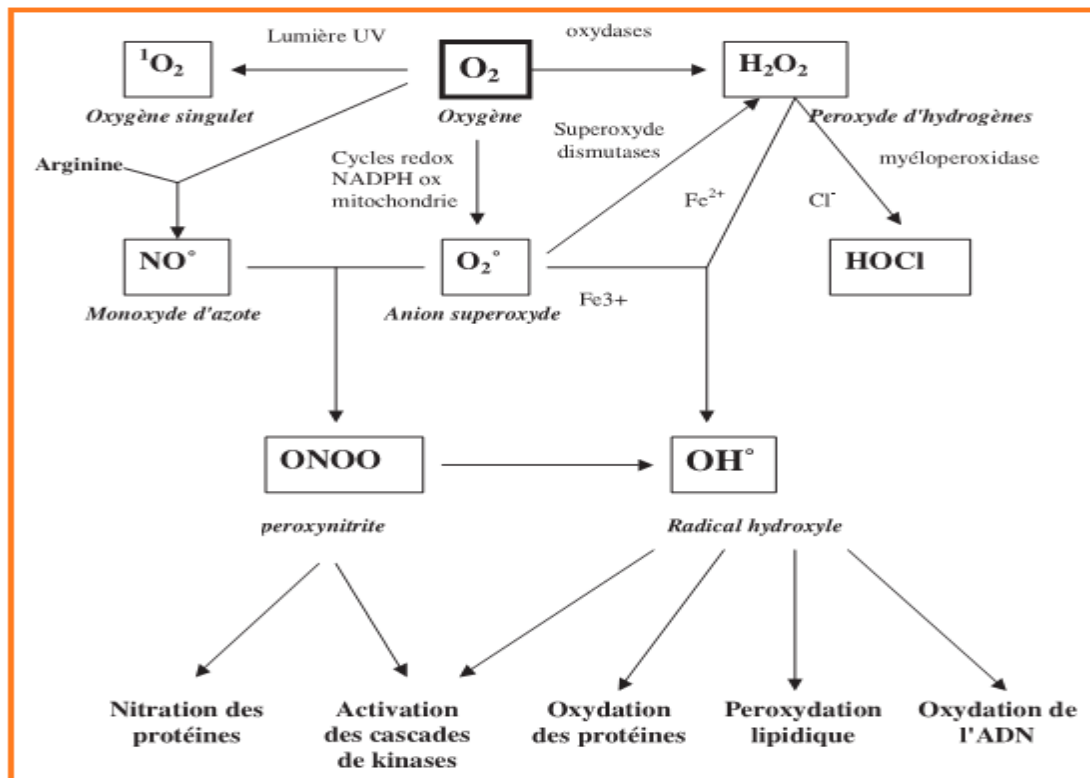


Figure 2 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliquées en biologie (Favier, 2003).

I-3-4-Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) est un radical libre gazeux non chargé dont l'électron est porté par l'azote a une durée de vie très courte, qui diffuse librement au travers des membranes et des fluides biologiques (Cau et Seïte, 1999 ; Tamion et al., 2003). Il s'agit d'un messenger chimique intracellulaire relativement local et très rapide (Beaumont, 2010).

Le NO^{\cdot} est produit par les systèmes enzymatiques qui sont les différentes NO synthases (NOS) (Favier, 2003) lors de l'oxydation de l'arginine en citrulline en présence du NADPH et de l'oxygène. Il existe trois types : une neuronale (nNOS), une endothéliale (eNOS), ces deux formes étant constitutives et activés par le Ca^{+2} et une forme inducible (iNOS), immédiatement actives après sa synthèse et qui est exprimée par les phagocytes activés (Ré et al., 2005).

Le NO^{\cdot} peut avoir des effets cytotoxiques notamment sous la forme d'acide peroxynitriteux ($ONOO^{\cdot}$) qui résulte de la réaction du NO^{\cdot} avec le $O_2^{\cdot-}$ (Tamion et al., 2003). Le $ONOO^{\cdot}$ est un médiateur important de la peroxydation lipidique et de la nitration protéique (Huet et Duranteau, 2008).

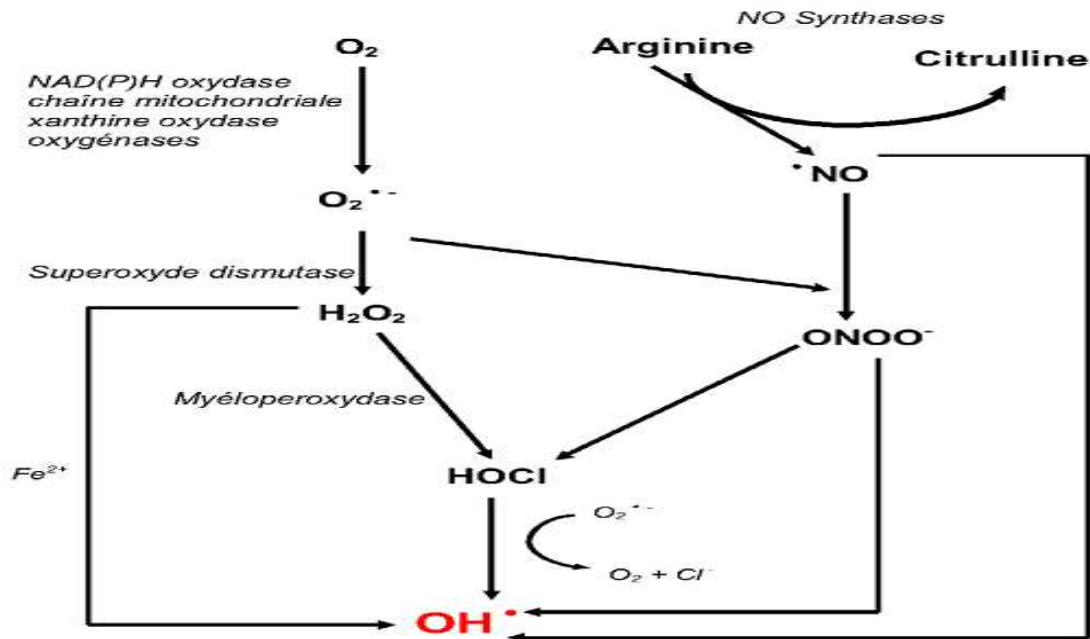


Figure 3 : Sources cellulaires et interconversions des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) (Beaudeau *et al.*, 2006).

I-4-Le stress oxydant

I-4-1-Définition

Des radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme les médiateurs tissulaires ou les résidus des réactions énergétiques ou de défense (Favier, 2003). En situation physiologique, il y a un équilibre parfait entre la production d'ERO et des antioxydants (Pincemil *et al.*, 2002) qui représentent un système de protection cellulaire face à la réactivité des espèces oxygénées (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

La perturbation de l'équilibre endogène entre radicaux libres et antioxydants, provoque des effets délétères dûs, soit à une défense antioxydante défailante, soit à un état pro-oxydatif accru, nommé « stress oxydant » (Berger, 2006).



Figure 4 : Définition du stress oxydant (Morena *et al.*, 2002).

I-4-2-Facteurs favorisant la génération du stress oxydant

Le stress oxydant peut résulter d'un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale (ischémie-reperfusion, vieillissement), d'une activation de systèmes enzymatiques, d'une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices (ferritine) ou d'une oxydation de certaines molécules (glucose, hémoglobine, catécholamines,...) (**Pincemail et al., 2002**).

D'autre part, des facteurs tels que le tabac, l'alcool, une mauvaise ou une suralimentation, la pollution, rayon UV, traitements chimio-/radio- thérapeutiques, ou encore l'âge induisent une production accrue des ERO (**Pons Rejraji et al., 2009**). Ainsi, la fumée de cigarette contient plusieurs millions des ERO altérant directement le premier organe à leur contact, les poumons (**Koehler-Ramonatxo, 2006**). En effet, chaque gramme de goudron provenant d'une cigarette contient 1017 radicaux libres, plus de 3 000 composés aromatiques et de nombreux produits générateurs d'oxydants. La phase gazeuse de la fumée contient 1015 radicaux par bouffée ainsi que de nombreux oxydes d'azote (**Ouellet et al., 2007**).

Par ailleurs, l'alcool est d'abord transformé en acétaldéhyde grâce à trois enzymes présentes dans des compartiments cellulaires différents. L'alcool déshydrogénase (ADH), est la plus puissante. La toxicité de l'acétaldéhyde s'exerce particulièrement sur les mitochondries où il facilite l'oxydation des lipides membranaires et où il diminue les taux de glutathion réduit, l'un des piègeurs naturels des radicaux libres oxygénés (**Ollat, 2004**).

I-5-Conséquences du stress oxydant

L'excès de radicaux libres non neutralisés par les défenses anti-oxydantes est très dommageable pour les macromolécules essentielles de nos cellules, entraînant anomalies d'expression des gènes et des récepteurs membranaires, prolifération ou mort cellulaire, troubles immunitaires, mutagenèse, dépôts de protéines ou de lipofuschine dans les tissus (**Favier, 2007**).

I-5-1-Peroxydation lipidiques

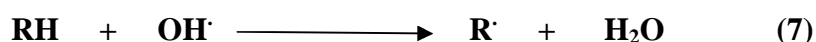
La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit en présence d'oxygène. Tous les lipides contenant des acides gras insaturés quelque soit leur origine (huiles végétales, huiles de poissons, graisses animales, membranes cellulaires, lipoprotéines) sont concernés.

L'étude des mécanismes de la peroxydation lipidique et des moyens de la prévenir par les antioxydants connaît depuis les dernières décennies un regain d'intérêt dû aux implications de ces phénomènes dans les domaines de la nutrition et de la santé.

La caractéristique de l'autoxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) par l'oxygène à l'état fondamental ($^3\text{O}_2$) est d'être une réaction en chaîne radicalaire qui se déroule en trois étapes: initiation, propagation et terminaison (**Cillard et Cillard, 2006**).

❖ Initiation

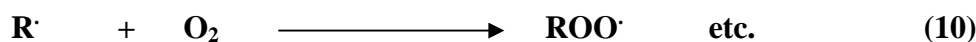
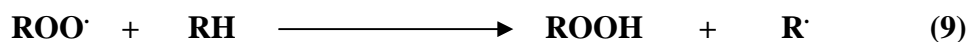
L'initiation consiste en l'abstraction par un radical libre d'un atome d'hydrogène d'un groupement méthylène ($-\text{CH}_2-$) surtout s'il est adjacent à une double liaison. Le radical formé se stabilise, sous forme de diène conjugué, par résonance (**Levasseur-Acker et al., 1995 ; Baudin, 2006**).



❖ Propagation

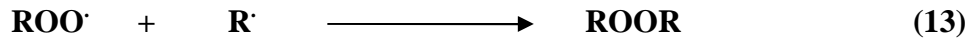
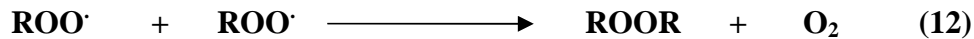
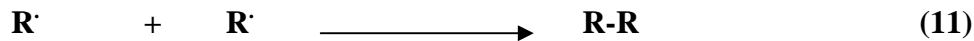
Le radical alkyle formé dans l'étape d'initiation réagit très rapidement avec le $^3\text{O}_2$ pour donner un radical peroxyde. Cette étape est très rapide comparée à la réaction suivante où il y a transfert d'un atome d'hydrogène d'une molécule d'acide gras voisine pour former un hydroperoxyde. C'est l'étape de propagation de la peroxydation car l'acide gras qui vient de donner son hydrogène est transformé en radical alkyle qui retourne dans le cycle pour réagir avec le $^3\text{O}_2$ et donner un radical peroxyde.

Il a été calculé que lorsqu'un radical initie la peroxydation, environ 25 molécules d'acides gras sont oxydées dans la phase de propagation. Il est à noter que l'oxydabilité des acides gras augmente avec le nombre de double liaison (**Levasseur-Acker et al., 1995 ; Cillard et Cillard, 2006**).



❖ Terminaison

Cette étape correspond à la disparition des peroxydes, à l'accumulation des composés secondaires d'oxydation, c.à.d. à l'oxydation complète du substrat (**Judde, 2004 ; Rahmani, 2007**).



Il existe de nombreux marqueurs de la peroxydation lipidique, dont le malondialdéhyde (MDA). Il résulte de la dégradation des hydroperoxydes formés au cours de la peroxydation des AGPI (figure 5) (Guichardant *et al.*, 2006).

I-5-2-Oxydation de l'ADN

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène (Favier, 2003). Les ERO peuvent provoquer des lésions des acides nucléiques susceptibles d'entraîner des mutations ou d'altérer l'expression des gènes (Ré *et al.*, 2005).

Le radical $\text{OH}\cdot$ est le plus réactif envers les bases azotées et les sucres des acides nucléiques (Baudin, 2006). Cinq classes principales de dommages oxydatifs médiées par le $\text{OH}\cdot$ peuvent être générées, Parmi elles : les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaires, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (figure 6) (Favier, 2003).

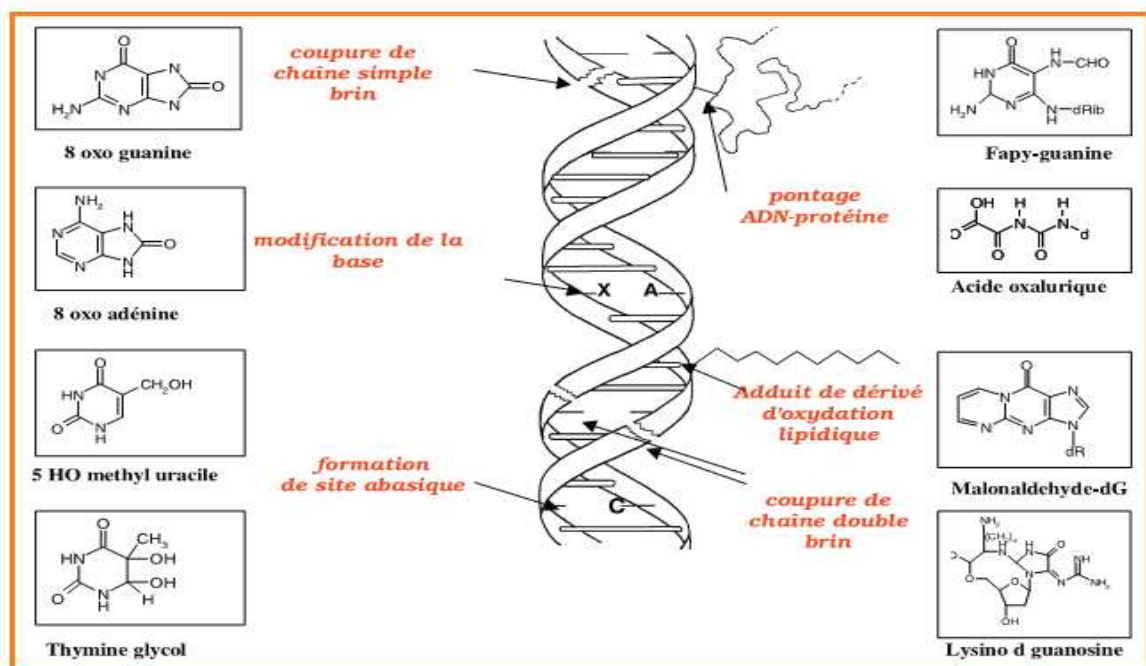


Figure 5 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003).

Par exemple, la guanine peut être oxydée en 8-hydroxy-guanine ; les atomes 4 et 5 peuvent aussi être touchés et des attaques semblables ont été retrouvées sur les mêmes atomes de l'adénine ainsi que sur les carbones du noyau ou du groupement méthyle de la thymine, par exemple pour former du thymidine-glycol. Le ribose et le désoxyribose peuvent être oxydés en dérivés mono-ou dicarbonylés (**Baudin, 2006**).

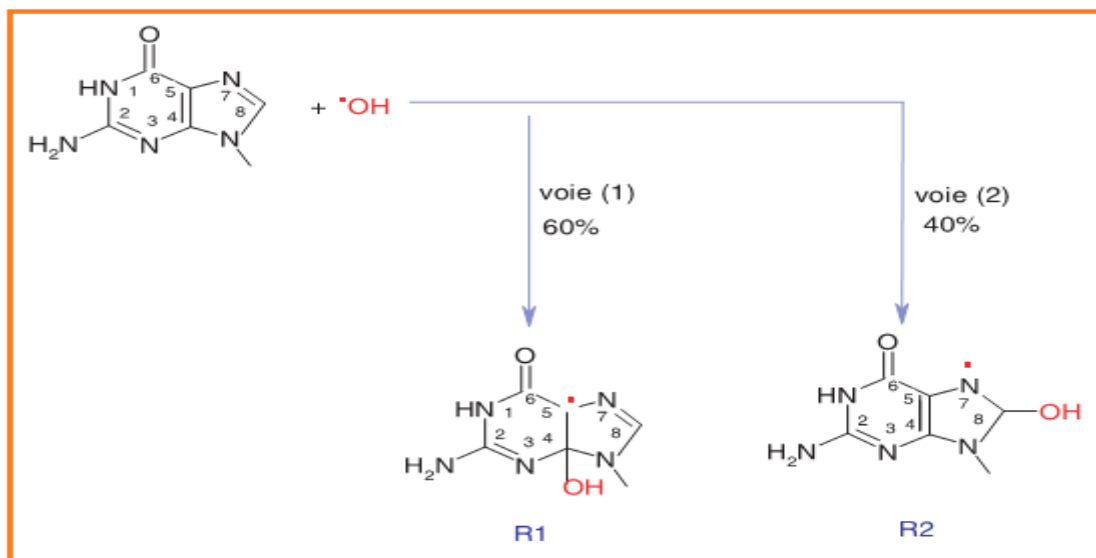


Figure 6 : Illustration d'un mode d'action des radicaux hydroxyyles (addition sur les doubles liaisons) avec une base de l'ADN, la guanine (**Gardès-Albert et al., 2003**).

Remarque :

A partir de la figure, deux radicaux libres sont formés : R1 (centré sur l'atome de carbone 5) et R2 (centré sur l'atome d'azote 7). (R2) donne naissance à la 8-oxo-guanine, un des principaux marqueurs du stress oxydant dans l'ADN (**Gardès-Albert et al., 2003**).

1-5-3-Oxydation des protéines

Les effets des ERO sur les protéines sont complexes, allant de l'oxydation du squelette protéique, c.à.d. de la chaîne polypeptidique conduisant à son clivage, à celle des chaînes latérales de différents acides aminés (**Ré et al., 2005**). Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, anti-enzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome (**Favier, 2003**).

D'autre part, les protéines oxydées deviennent très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules. Ces amas, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuschines caractéristiques des tissus des sujets âgés (**Favier, 2003**).

Les acides aminés constitutifs des protéines sont très sensibles à l'attaque des radicaux hydroxyles, en particulier les soufrés (la cystéine s'oxyde en cystine ou en acide cystéique et la méthionine en sulfoxyde ou sulfone), les basiques (histidine, lysine, arginine) en dérivés carbonylés ou hydroxylés semi-aldéhydes, et les aromatiques (la phénylalanine en ortho-tyrosine, le tryptophane en cynurénine, ou encore nitration par les peroxy-nitrites) (**Gardès-Albert et al, 2003**).

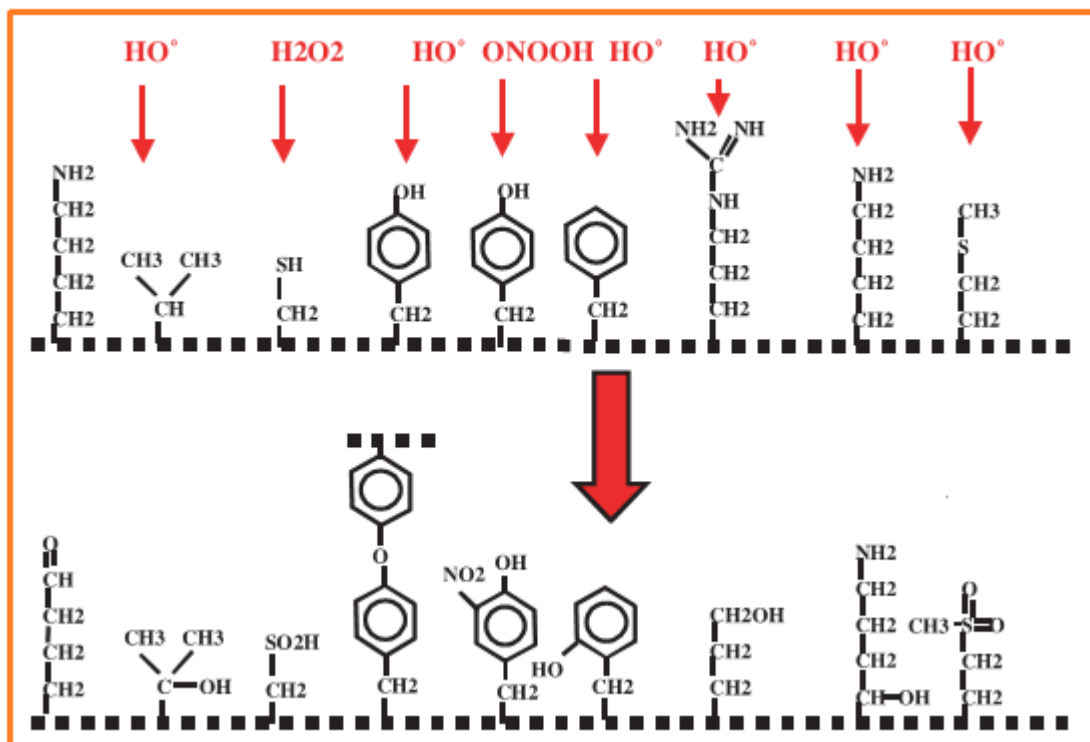
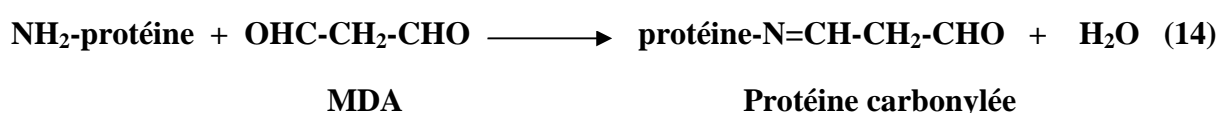


Figure 7 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (**Favier, 2003**).

Des attaques spécifiques comme la lipoxydation par les produits de la peroxydation lipidique peuvent s'ajouter à l'oxydation des chaînes latérales des acides aminés des protéines ; c'est le cas avec le malonate-dialdéhyde (MDA) se liant sur l'extrémité N-terminale des protéines par réaction de Schiff (**Baudin, 2006**) :



I-6-Pathologies liées au stress oxydant

Actuellement, il est bien admis que le stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il constitue cependant un terrain au développement de diverses pathologies (Khelil et al., 2010). La plupart de ces dernières apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux libres (Favier, 2003).

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies (Favier, 2003). L'essentiel des pathologies liées au stress oxydant se résume dans la figure (9) suivante:

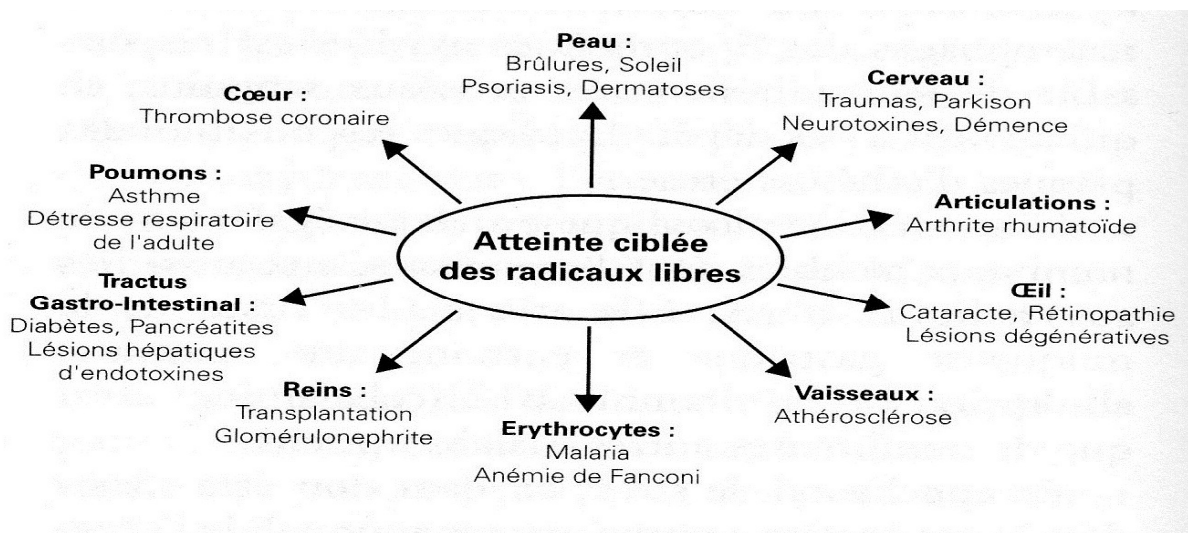


Figure 8 : Pathologies liées au stress oxydant (1)

- **Exemple illustratif d'une pathologie liée au stress oxydant : l'athérosclérose**

L'athérosclérose est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme « une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et de moyen calibre consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires » (Cottart et al., 2009).

L'athérosclérose est une maladie multifactorielle dont les principales hypothèses mécaniques reposent sur deux théories : la théorie oxydative et la théorie inflammatoire (**Bonnefont-Rousselôt et al., 2002**).

L'extravasation des lipoprotéines de basse densité (LDL) et leur oxydation dans l'espace sous endothélial représente la première étape de l'athérogénèse (**Caligiuri, 2004**). En effet, l'infiltration monocytaire, les dépôts lipidiques et la prolifération des cellules musculaires lisses pourraient être stimulés par les LDL oxydées (**Bonnefont-Rousselôt et al., 2002**).

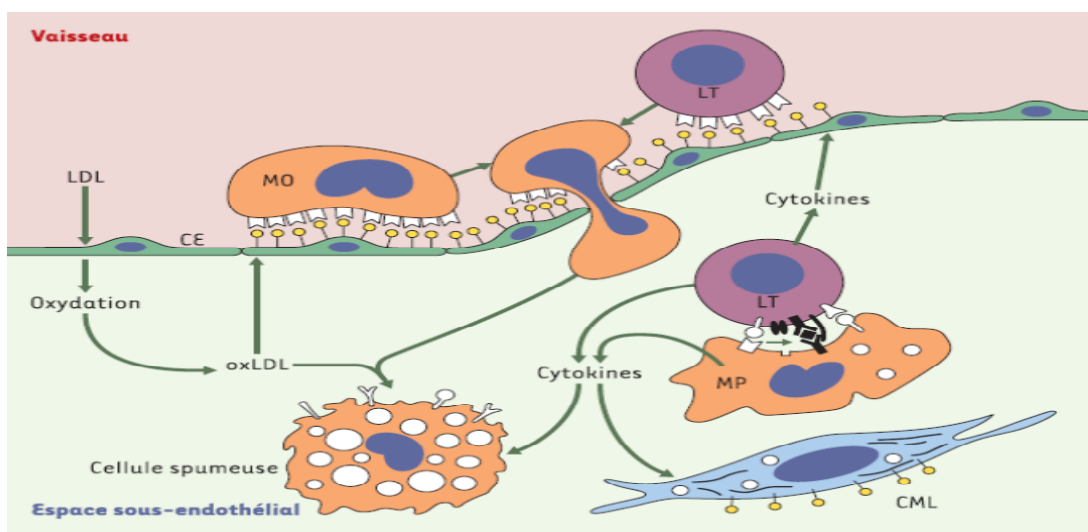


Figure 9 : Hypothèse inflammatoire de l'athérogénèse (**Caligiuri, 2004**).

Les LDL oxydées induisent l'expression de molécules d'adhérence et de récepteurs de chimiokines à la surface des cellules endothéliales (figure 9). La quantité des LDL oxydées accumulée à l'intérieur des macrophages dépasse la capacité de ces derniers à les dégrader. Ces macrophages se transforment alors en cellules spumeuses, qui demeurent dans l'intima et constituent les premières lésions d'athérome (**Caligiuri, 2004**).

Une accumulation des macrophages spumeux, en petit amas forme des lésions visibles macroscopiques : les stries lipidiques. En plus des macrophages, certaines cellules musculaires lisses contiennent aussi des dépôts lipidiques (**Bonnet, 2005**).

La plaque d'athérome formée fait saillie à l'intérieur de l'artère, engendrant des turbulences et un obstacle au flux sanguin, ce qui va encore favoriser son développement (**Leclerc, 2007**).

Chapitre-II-
Les antioxydants

II-1-Définition des antioxydants

Un antioxydant peut être défini comme: « toutes substances qui, lorsqu'elle est présente à de faibles concentrations par rapport à celle d'un substrat oxydable, ralentie ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat » (**Young et Woodside, 2001**). Les systèmes antioxydants sont soit des molécules qui captent rapidement les ERO (antioxydants proprement dits), soit des systèmes enzymatiques qui catalysent la conversion des molécules pro-oxydantes (**Negres –Salvayre et Salvayre, 2005**).

II-2-Classification des antioxydants

Notre organisme est équipé de tout un système complexe de défense antioxydant enzymatiques et non enzymatiques, localisé dans les compartiments intra- et extracellulaire (**Berger, 2006**). Les antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (**Young et Woodside, 2001**).

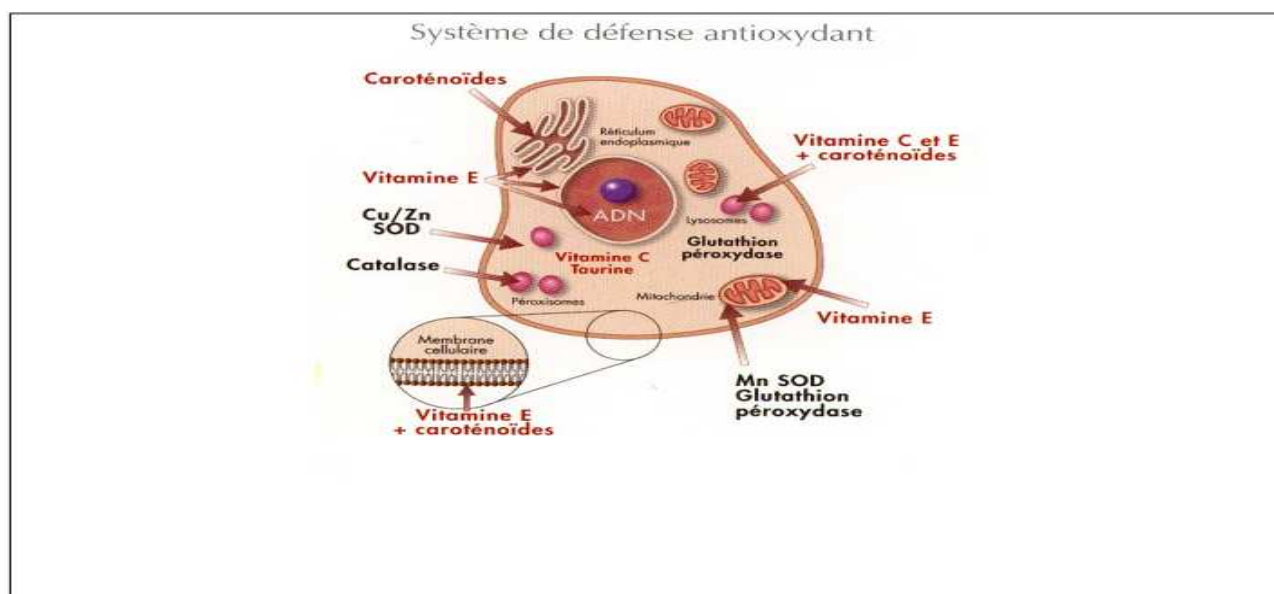


Figure 10 : site d'action des nutriments antioxydants et des enzymes antioxydantes (**Pastre, 2005**).

Selon l'origine, la classification des antioxydants est la suivante :

II-2-1-Les antioxydants endogènes

II-2-1-1- Les antioxydants enzymatiques

L'organisme possède des enzymes qui peuvent métaboliser les ERO. Les plus connues sont (**Morena et al., 2002**) :

II-2-1-1-1- La superoxyde dismutase (SOD)

Cette enzyme est impliquée dans la neutralisation de l' $O_2^{\cdot -}$ en le transformant en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), évitant ainsi la formation de dérivés plus toxiques comme le peroxynitrite ($ONOO^-$) ou le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), selon la réaction (15): (**Pincemail et al., 2002 ; Afenso et al., 2007**) :



Chez l'homme, trois isoformes compartimentées de l'enzyme SOD ont été caractérisées de façon biochimique et moléculaire (**Afenso et al., 2007**) :

- La Cu/Zn-SOD cytosolique : codée par le gène SOD-1, est ubiquitaire et dimérique (32 kDa) (**Baudin, 2006**).
- Cu/Zn-SOD extracellulaire (EC-SOD) : il s'agit d'une glycoprotéine tétramérique de masse moléculaire 135000Da chaque sous-unité comporte un atome de cuivre et un atome de zinc elle existe sous plusieurs formes (A, B et C), B et C se lient à l'héparine (**Delattre et al., 2003**).
- Une troisième forme est mitochondriale : dans son site actif on trouve du manganèse (Mn-SOD) ; c'est une protéine importée du noyau (gène SOD-2), on ne la trouve donc pas dans les hématies (**Baudin, 2006**).

* Mécanisme d'action de la superoxyde dismutase

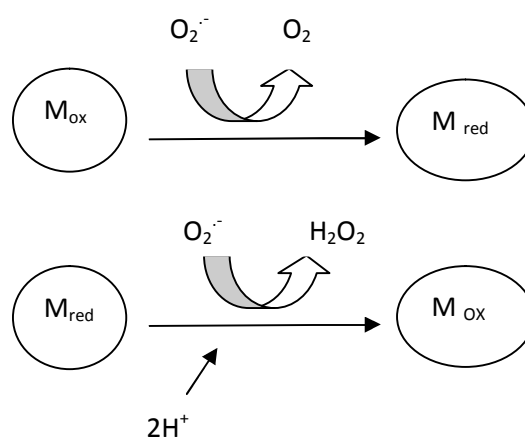


Figure 11 : Mécanisme d'action de la superoxyde dismutase (**Berg et al., 2007**)

La forme oxydée de la superoxyde dismutase réagit avec un ion superoxyde pour former l'O₂ ce qui génère la forme réduite de l'enzyme. La forme réduite réagit alors avec un second superoxyde et deux protons pour former du peroxyde d'hydrogène et régénérer la forme oxydée de l'enzyme (Delattre et al., 2003).

II-2-1-1-2- les glutathions peroxydases et réductase

La glutathion peroxydase (GPx) fait partie d'un système complet qui joue un rôle central dans le mécanisme d'élimination du H₂O₂. Ce système prend aussi en charge des lipides peroxydés. La GPx est l'enzyme clé du système et nécessite la présence de glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électrons (Sevrais, 2004). Le glutathion se conduit également comme un scavenger direct de radicaux libres (Zhao, 2001 ; Valko et al., 2006) :

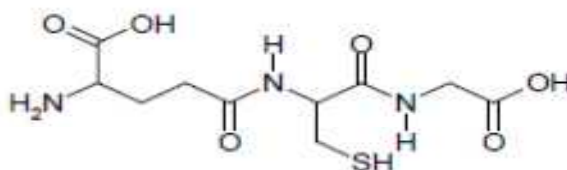
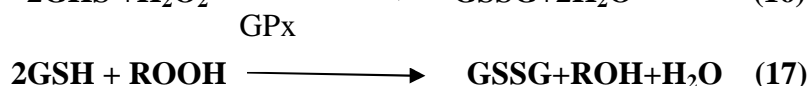
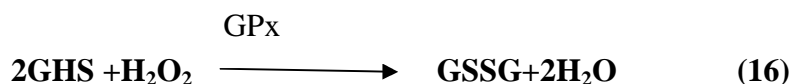
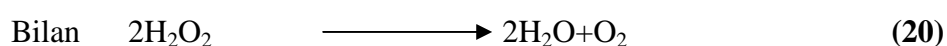
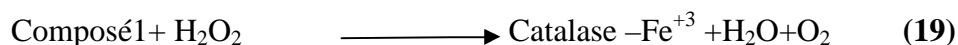
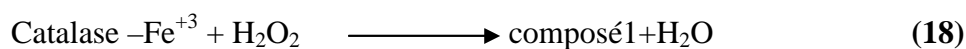


Figure 12 : Formule développée du glutathion (Barus, 2008).

II-2-1-1-3- La catalase

La catalase dégrade spécifiquement le H₂O₂ en H₂O et O₂. Dans les tissus de mammifères, la catalase serait localisée dans les peroxysomes (Negres-Salvayre et Salvayre, 2005).

La catalase comporte quatre sous unités protéiques chacune contenant un groupement hémique avec le Fe⁺³ attachée au site actif. Chaque molécule a habituellement une molécule de NADPH qui lui est attachée (Delattre et al., 2003). Il est à noter que la catalase est surtout active lorsque le stress oxydant est élevé (Badeau, 2006 ; Borg et Reeber, 2008).



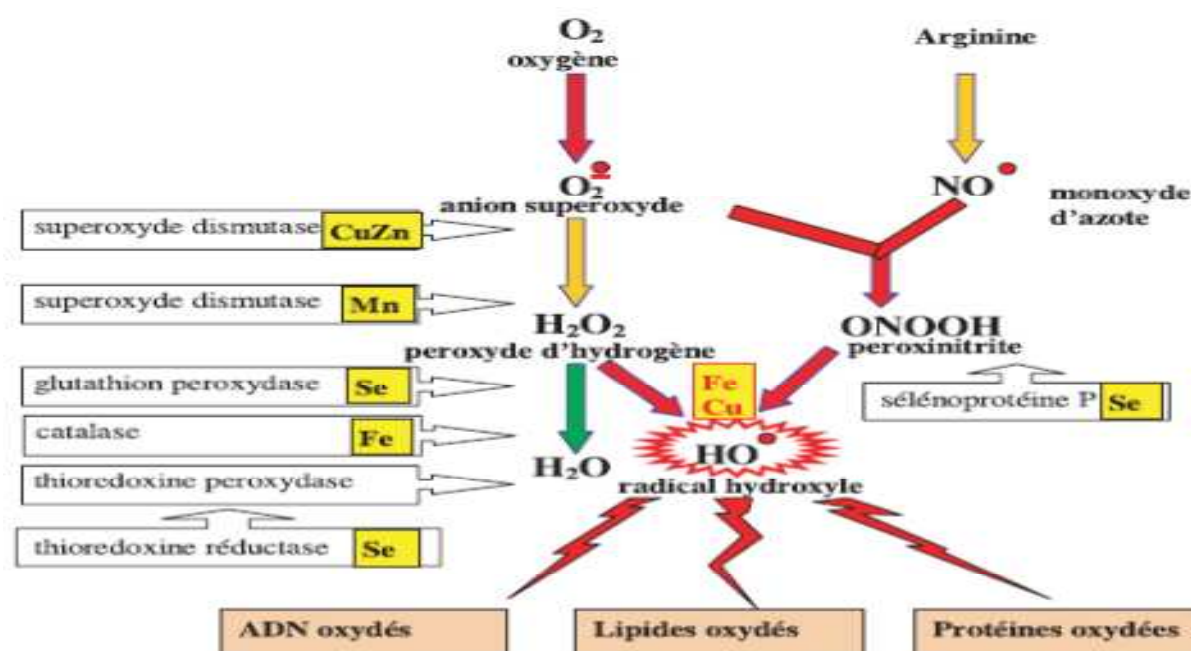


Figure 13 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003)

II-2-1-2-Les protéines antioxydantes

La transferrine, la ferritine et la céruléoplasmine jouent un rôle antioxydant par chélation des ions (Curtay et Robin, 2000; Pincemail et al., 2002). Ces chélateurs forment des complexes ou des composés de coordination avec les métaux. Ils inhibent ainsi le cycle redox du métal ou construisent des complexes métalliques insolubles (Cillard et Cillard., 2006).

II-2-2- Les antioxydants exogènes

II-2-2-1- Les oligo-éléments

Les oligo-éléments interviennent comme co-facteurs d'enzymes indispensables dans la lutte contre les radicaux libres. Parmi ces oligo-éléments on cite ; le zinc, le sélénium et le manganèse (Pastre, 2005).

- ❖ Le sélénium joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire. Cette fonction est due à sa présence dans le site actif des glutathions peroxydases séléno-dépendantes et à l'activité biologique anti-radicalaire des sélénoprotéines (Roussel et Ferry, 2002).

- ❖ Le zinc remplit de multiples rôles de protection au cours du vieillissement par la lutte contre les radicaux libres (**Roussel et Ferry, 2002**). En effet, il participe à la structure et à la fonction de la superoxyde dismutase extracellulaire, et au maintien de la concentration tissulaire en métallothionine, molécule potentiellement capable de piéger les radicaux libres (**Pastre, 2005**). En outre, Il existe un fameux effet de synergie entre la plupart les vitamines antioxydants et les oligo-éléments (**Pincemail et al., 2002**).

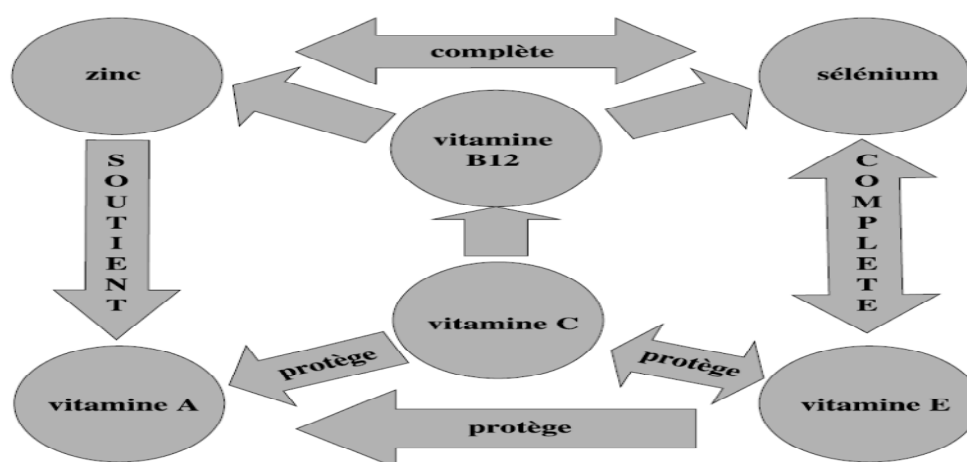


Figure 14 : Effet de synergie entre les vitamines et les oligo- éléments (**Pincemail et al., 2002**).

II-2-2-2-Les vitamines

Les vitamines sont des molécules organiques requises en faible quantité indispensable pour le fonctionnement des voies métaboliques des êtres vivants. Elles réagissent sous forme de coenzyme (**Barati Elbaz et Le Marechal, 2008**).

Parmi les défenses antioxydantes, les vitamines jouent un rôle essentiel au cours du vieillissement. Elles interviennent dans l'immunité, les fonctions cognitives, la protection contre les maladies cardiovasculaires, les cancers et les cataractes (**Roussel et Ferry, 2002**).

II-2-2-2-1-La vitamine E

La vitamine E désigne un groupe de nombreux composants présents dans la nature: les α -, β -, γ - et δ -tocophérols et tocotriénols (**Salle et al., 2005**). Ce groupe comprend des dérivés hautement lipophiles, capables de se concentrer dans les membranes biologiques et les lipoprotéines (**Nève, 2002**).

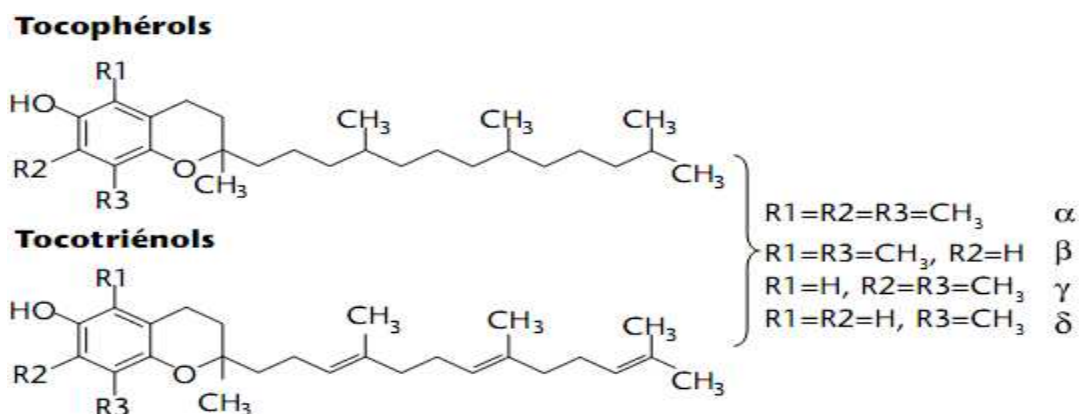


Figure 15 : Structure chimique des tocophérols et des tocotriénols (Laguerre et al., 2007).

La vitamine E possède des propriétés antioxydantes. L' α -tocophérol qui est un antioxydant liposoluble en raison de sa longue chaîne aliphatique comportant 16 atomes de carbones étant l'antioxydant le plus efficace, notamment dans la détoxification des radicaux peroxydes et alkoxydes et donc dans la prévention des réactions en chaîne de la peroxydation lipidique.

Le radical tocophéroxyde formé doit être réduit pour régénérer le tocophérol et cette réduction est réalisée par d'autres antioxydants, dont la vitamine C et le GSH (Ré et al., 2005). Le γ -tocophérol est capable de piéger les péroxynitrites, particulièrement dangereux pour les neurones, ce que ne peut effectuer l' α -tocophérol (Curtay et Robin, 2000).

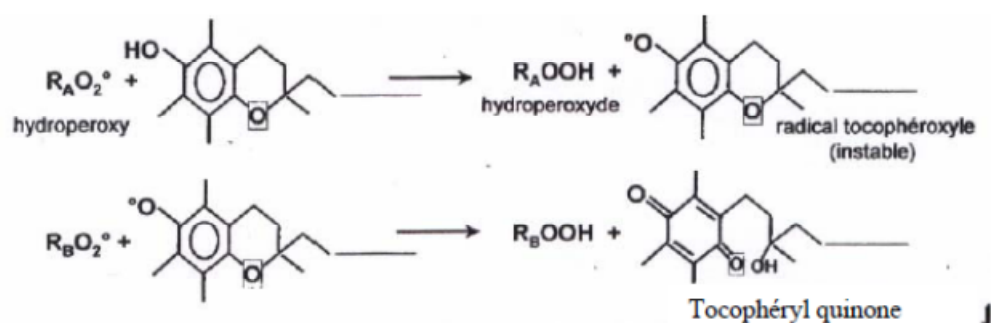


Figure 16 : Action antioxydante de la vitamine E ; interruption de la phase de propagation

(Pastre, 2005).

II-2-2-2-2- La vitamine C

La vitamine C, ou acide ascorbique, peut être considérée comme un dérivé cyclique des hexoses. Sa caractéristique essentielle est d'exister sous trois degrés d'oxydoréduction différents : la forme réduite ou acide ascorbique, la forme semi-réduite ou mono-oxydée, appelée acide mono-déhydro-ascorbique et la forme oxydée ou acide déhydro-ascorbique (Allain, 2008).

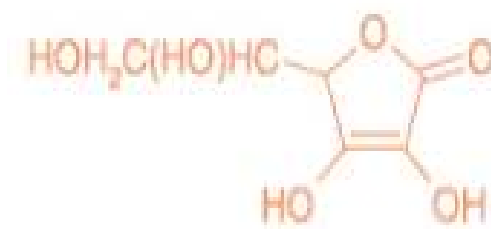


Figure 17 : Structure chimique de l'acide ascorbique (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

La vitamine C est caractérisée par un très fort potentiel antioxydant (Birlouez-Aragon, 2001). En effet L'acide ascorbique est un désactivateur de l'oxygène singulet, il élimine l'oxygène moléculaire, il est aussi un donneur d'hydrogène aux radicaux lipidiques (Cillard et Cillard, 2006).

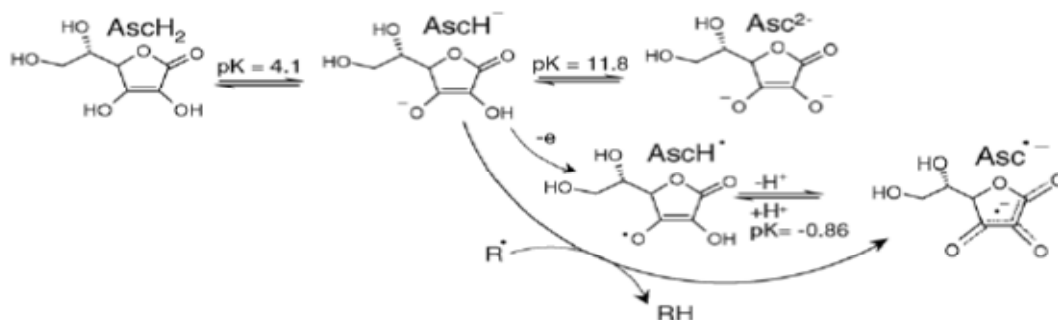


Figure 18 : Les formes variées de l'acide ascorbique et sa réaction avec les radicaux R[•] (Valko *et al.*, 2006).

La vitamine C permet la régénération de la vitamine E et du glutathion nécessaire à la glutathion-peroxydase (Curtay et Robin, 2000). La réduction du radical α -tocophéroxyl par l'ascorbate est rendue possible par le faible potentiel réducteur du couple redox associant l'acide ascorbique et sa forme oxydée ($E_0 \sim 0.28$ V) par rapport à celui de l' α -tocophérol et du radical tocophéroxyl ($E_0 \sim 0.5$ V) (Laguerre *et al.*, 2007).

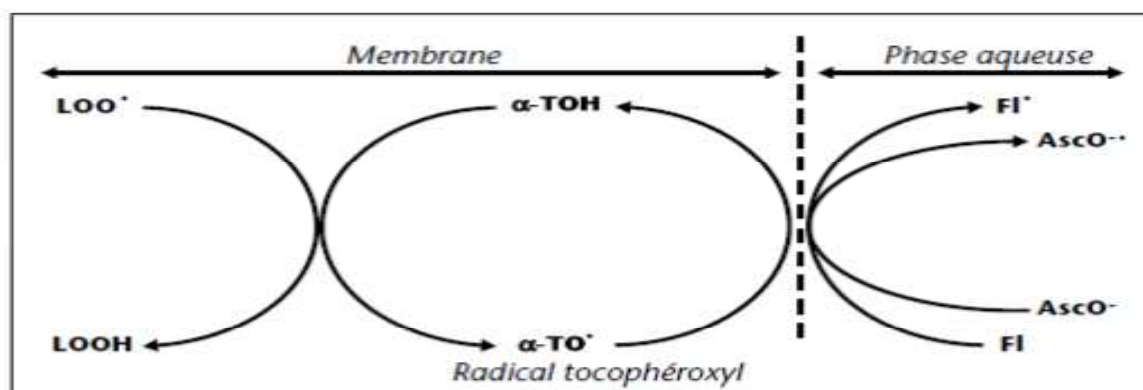


Figure 19 : Mécanisme de régénération potentiel entre l' α -tocophérol (α -TOH), l'ascorbate (AscO^-) et les flavonoïdes (Fl) dans les systèmes membranaires (Laguerre *et al.*, 2007).

II-2-2-2-3- Le β -carotène

Le β -carotène est une molécule de la famille des caroténoïdes (**Desmettre et Lecerf, 2005**). Les caroténoïdes peuvent être des hydrocarbures purs appelés carotènes (lycopène, β -carotène...) ou posséder un groupement fonctionnel oxygéné et dans ce cas, s'appeler xanthophylles (astaxanthine, lutéine...) (**Laguerre et al., 2007**).

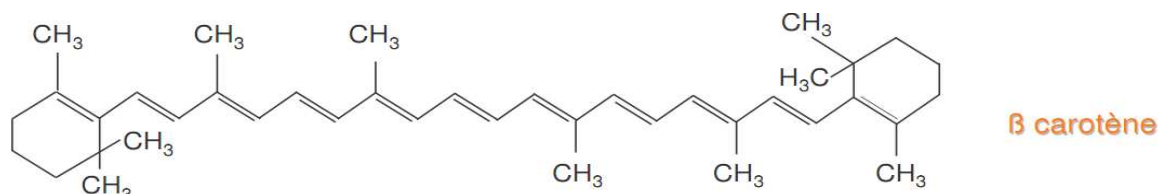
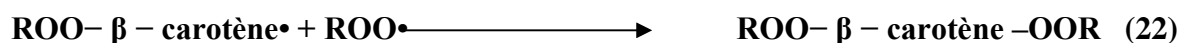
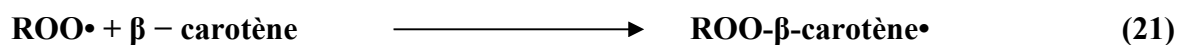


Figure20 : Structure du β -carotène (**Gervaise, 2004**).

Le β -carotène un antioxydant liposoluble (**Nève, 2002**) qui est capable de piéger l'oxygène sous sa forme singulet, et peut donc intervenir dans le cas d'une oxydation photosensibilité (**Judde, 2004**).

Les mécanismes par lesquels les caroténoïdes protègent les systèmes biologiques des dommages dûs à l'oxygène singulet consistent en un ensemble de réactions physiques et chimiques entre les caroténoïdes et la molécule d'oxygène excitée : L'énergie d'excitation de l'oxygène singulet est transférée vers le pigment, elle est ensuite dissipée au niveau des doubles liaisons conjuguées, les caroténoïdes peuvent également neutraliser des radicaux libres (**Rock, 2003**).

L'hypothèse selon laquelle le β -carotène exercerait son activité antioxydante *via* un mécanisme d'addition est la suivante (**Laguerre et al., 2007**) :



II-2-2-3- Les composés phénoliques

II-2-2-3-1- Définition

Les polyphénols constituent le groupe de métabolites le plus large et le plus répandu du règne végétal et font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzoïque au quel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (**Bruneto, 2008**).

II-2-2-3-2- Biosynthèse des composés phénoliques

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes. Ils sont synthétisés à partir de deux voies biosynthétiques :

- Celle de l'acide shikimique, qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).
- L'autre voie par de l'acétate, qui conduit à des poly β -cetoesters (polyacétates) qui engendrent par cyclisation des composés souvent polycycliques : chromones, isocoumarines, xanthones, quinones etc. (**Bruneto, 2008**).
- De plus, la diversité structurale des composés phénoliques, due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

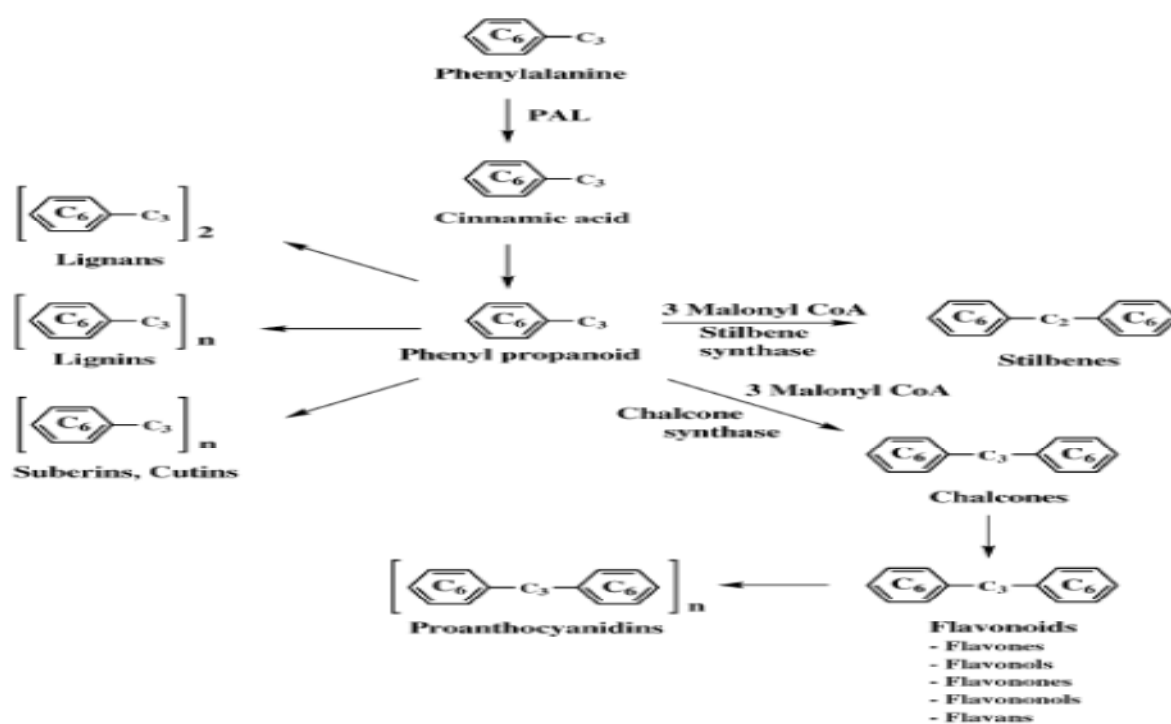


Figure 21 : Production des phényle propanoïdes, stilbènes, lignanes, lignines, subérines, cutines, flavonoïdes et tanins à partir de la phénylalanine (Pal) (**Naczka et Shahidi, 2004**).

II-2-2-3-3- Principales classes

II-2-2-3-3-1- Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont constitués de deux sous-groupes : Les acides hydroxybenzoïques, qui ont en commun la structure en C6-C1 et les acides hydroxycinnamiques, des composés aromatiques avec une chaîne latérale à trois carbones (C6-C3) (**Balasundram et al., 2006**).

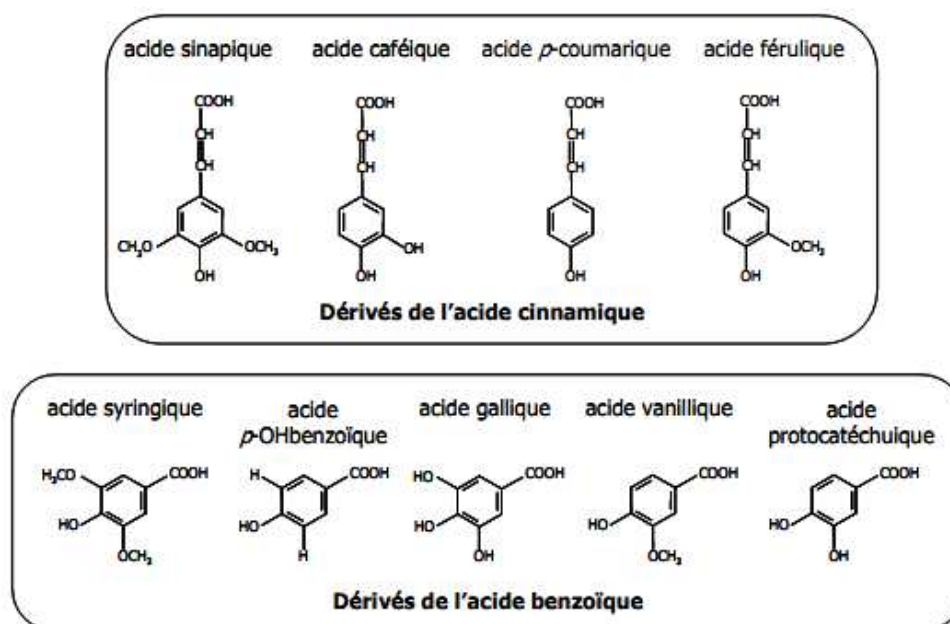


Figure 22 : Les structures chimiques des différents acides phénoliques (**Anne-Laure, 2007**).

II-2-2-3-3-2- Les tanins

Les tanins sont des composés phénoliques de poids moléculaire élevé produit par le métabolisme secondaire des plantes (**Bossu et al., 2006**). Les tanins sont divisés en tanins condensés et tanins hydrolysables (**Cai et al., 2006**).

II-2-2-3-3- 2-1-Tannins condensés

Les tanins condensés sont des polymères d'unités flavaniques, le plus souvent liées entre elles par des liaisons C4-C8. Les précurseurs sont des flavan-3-ols (catéchine et épicatechine) et des flavan-3,4diols (**Zimmer et Cordesse, 1996**).

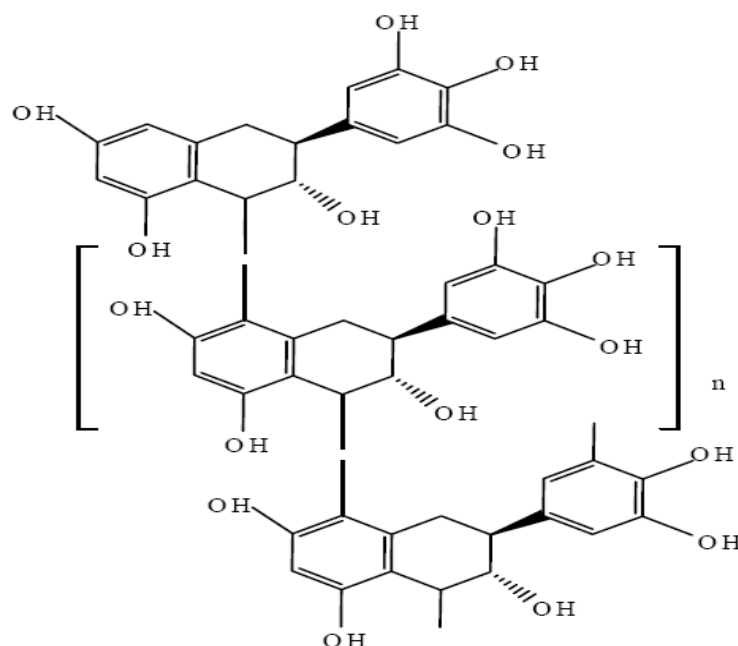


Figure 23 : Exemple de structure d'un tannin condensé (Macheix et al., 2006).

II-2-2-3-3-2-2- Les tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables sont des esters d'un sucre simple (glucose ou xylose principalement) et d'acides phénoliques. Ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (acide ou alcaline) ou enzymatique. Les acides phénoliques libérés sont l'acide gallique dans le cas des gallotannins et l'acide ellagique dans le cas des ellagitannins (figure 24) (Zimmer et Cordesse, 1996 ; Derbel et Ghedira, 2005).

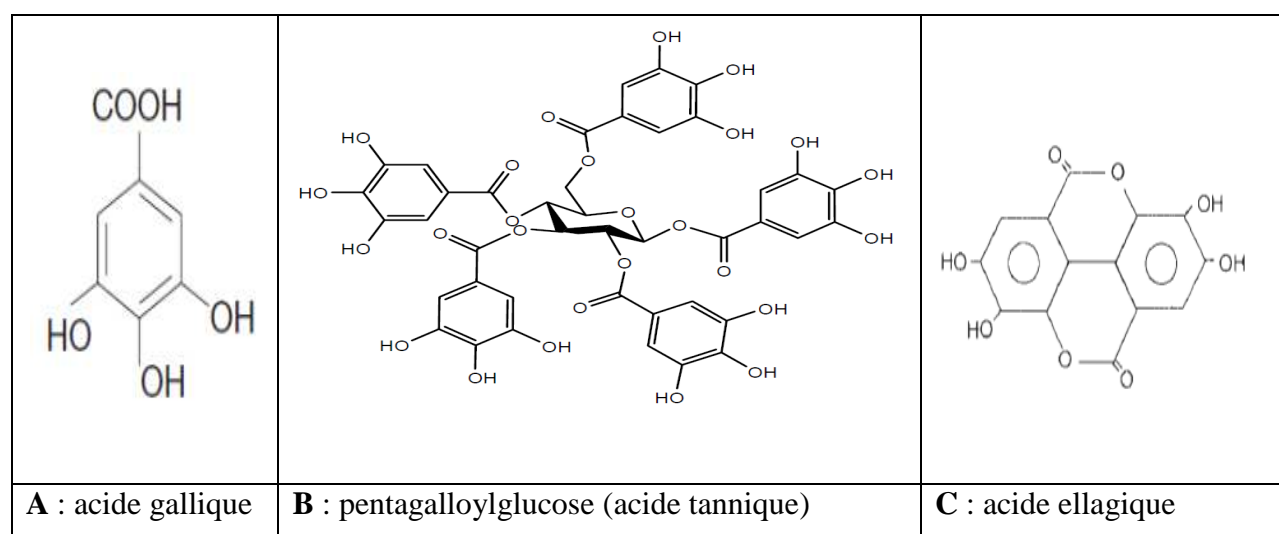


Figure 24 : structure de l'acide gallique (A), d'un exemple de tannins hydrolysables (B) et de l'acide ellagique (C) (Derbel et Ghedira, 2005 ; Nicholson et Vermerris, 2006).

II-2-2-3-3-3- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus large des phénols végétaux, représentant plus de la moitié des huit milles composés phénoliques naturels. Les flavonoïdes sont des composés de faible poids moléculaire qui consistent en 15 atomes carboniques, disposés sous la configuration : C₆-C₃-C₆ (**Balasundram et al., 2006**). Les flavonoïdes sont composés généralement de deux cycles benzéniques (cycles A et B) liés par un hétérocycle contenant un oxygène (cycle C) (figure 25) (**Tsao et Deng, 2004**).

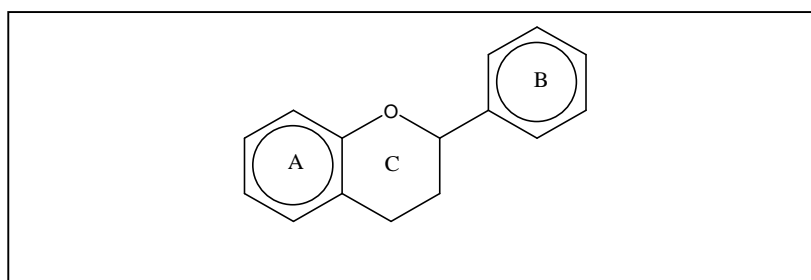


Figure 25: Structure de base des flavonoïdes (**Saraf et al., 2007**).

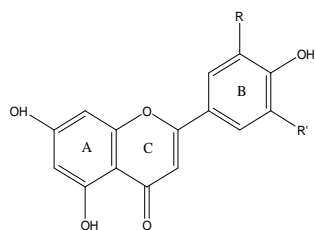
Des variations dans des modèles de substitution dans le cycle C a pour résultat les principales classes de flavonoides, c.à.d. les flavones, les flavonols, les flavanes, les flavanones, et les anthocyanidines, dans lesquelles : les flavones et les flavonols sont les plus répandues et structurellement diverses (tableau I).

Des substituants des cycles A et B donnent naissance à des composés différents à l'intérieur de chaque classe de flavonoides. Ces substitutions peuvent impliquer l'oxygénation, l'alkylation, la glycosylation, l'acylation et la sulfatation (**Balasundram et al., 2006**).

Tableau I : Structures chimiques des flavonoides et quelques exemples (**Aruoma et al., 2003**).

Classe	formule structurale	Exemples
Flavanones		<p>$R=R^1=H, R^{11}=R^{111}=OH$; Naringénine</p> <p>$R=OH, R^1=H, R^{11}=R^{111}=OH$; Eriodyctiol</p>

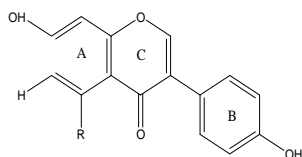
Flavones



$R=R^1=H$; Apigénine

$R=OH, R^1=H$; Lutéoline

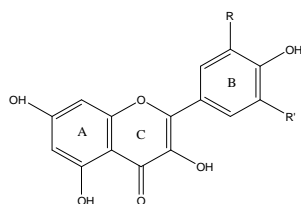
Isoflavones



$R=OH$; Genesteine

$R=H$; Daidzeine

Flavonols

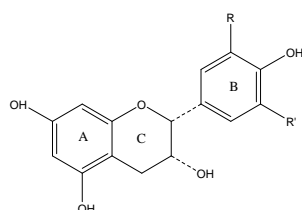


$R=R^1=H$; Kaempferol

$R=OH, R^1=H$; Quercétine

$R=R^1=OH$; Myricétine

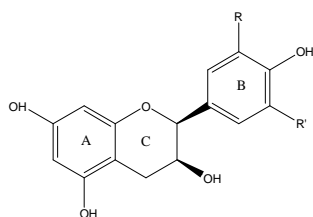
Flavanols



$R=OH, R^1=H$; (-)-Epicatechine

$R=R^1=OH$; (-) Epigallocatechine

$R=OH, R^1=H$; (+)-Catechine

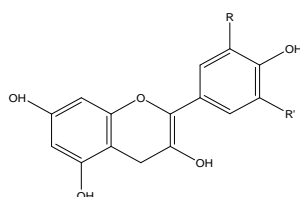


$R=OH, R^1=H$; (+)-Epicatechine

$R=R^1=OH$; (+)Epigallocatechine

$R=OH, R^1=H$; (-)-Catéchine

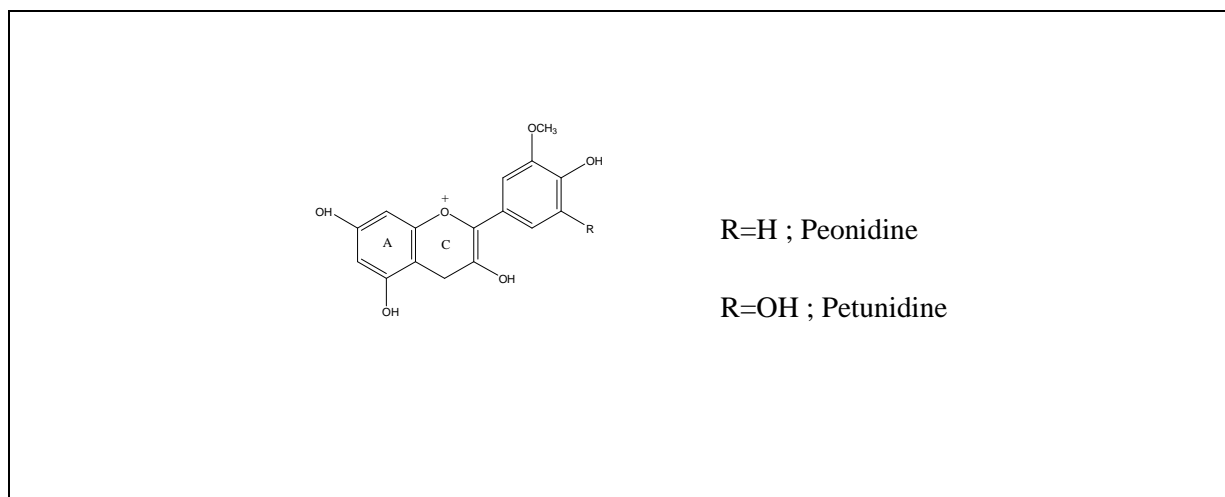
Anthocyanidines



$R=OH, R^1=H$; Cyanidine

$R=R^1=OH$; Deiphinidine

$R=R^1=OCH_3$; Malvidine



II-2-2-3-4- Les activités biologiques des polyphénols

La consommation d'aliments riches en polyphénols réduit le développement de nombreuses pathologies, telles que le cancer, l'ischémie cardiaque, l'athérosclérose et l'hypertension. Cela peut être expliqué par le fait que ces composés ont la capacité de modifier de nombreux facteurs impliqués dans la genèse de ces maladies (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

Les composés phénoliques possèdent plusieurs propriétés physiologiques telles que : anti-inflammatoire (Middleton et al., 2000), anti-cancérigène (Talvera et al., 2004), antispasmodique (Seyoum, 2006), antivirale (Middleton et al., 2000 ; Seyoum, 2006), diurétique (Hennebelle, 2004) et antioxydante (Talvera et al., 2004 ; Skerget et al., 2005).

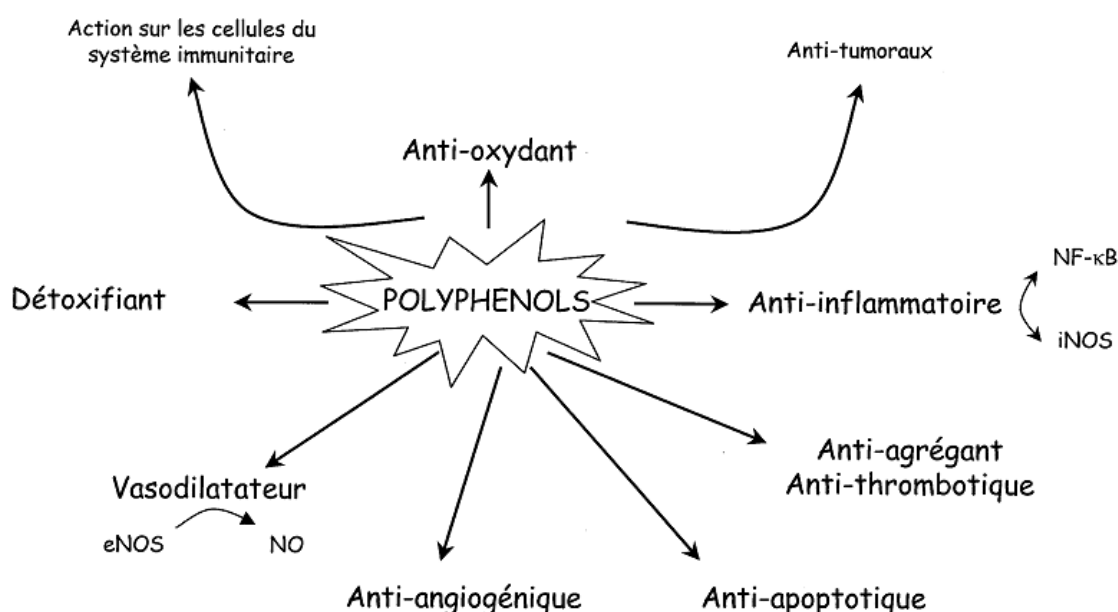


Figure 26 : Effets biologiques des polyphénols. eNOS, NO synthase endothéliale ; iNOS, NO synthase inductible ; NF-κB, facteur nucléaire -κB (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

Les effets bénéfiques dérivant des composés phénoliques ont été attribués à leur activité antioxydante. En effet, les polyphénols peuvent être le déterminant majeur des potentiels antioxydants des aliments, et peuvent être par conséquent une source naturelle d'antioxydants (**Balasundram et al., 2005**). Voici quelques exemples de résultats de quelques d'études faites sur une variété de plantes dont chacune a montré des effets antioxydants considérables (Tableau II).

Tableau II : Tableau récapitulatif de quelques résultats obtenus dans le monde sur les activités antioxydantes des extraits de plantes médicinales.

La plante	L'extrait	activité antioxydante	Références
<u>Alpinia oxyphylla</u>	Extrait aqueux	Pouvoir réducteur du Fe^{3+} : $21,0 \pm 0,4 \mu\text{mol } Fe^{2+}/g$.	Wong et al., 2006.
<u>Coleus aromaticus</u>	Extrait aqueux	Inhibition de la peroxydation lipidique de l'acide linoléique : $53,2 \pm 1,04\%$.	Kumaran et Joel Karunakaran, 2006.
<u>Parsley</u>	Extrait méthanolique des feuilles	Pouvoir réducteur du Fe^{3+} : $25,9 \pm 4,3\%$.	Wong et Kitts, 2006.
<u>Hypericum androsaemum</u>	Infusion des feuilles	Activité de scavenging du radical OH. : $4,1\%$.	Valentao et al., 2002

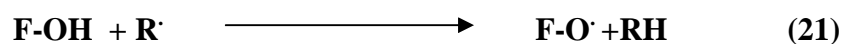
II-2-2-3-5- Les mécanismes antioxydants des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des chélateurs de métaux, des piègeurs d'anions superoxyde et des donneurs d'hydrogène (**Cillard et Cillard, 2006**).

II-2-2-3-5-1-Piégeage des radicaux libres

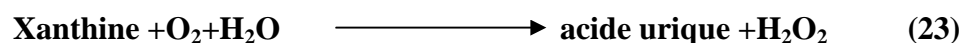
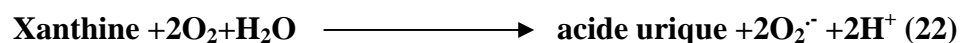
A cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle

par transfert d'hydrogène comme indiqué dans la réaction (21). Ainsi, La capacité de piégeage des radicaux libres est principalement attribuable à des réactivité élevées des groupements hydroxyyles qui participent à la réaction suivante (**Heim et al., 2002 ; Marfak, 2003**) :



II-2-2-3-5-2- Inhibition enzymatique

Les composés phénoliques sont connus pour être des inhibiteurs efficaces de plusieurs enzymes, comme la xanthine oxydase, la cyclooxygénase, la lipooxygénase et la phosphoinositide 3-kinase (**Lin et al., 2002**). La xanthine oxydase catalyse l'oxydation de hypoxanthine et de la xanthine en l'acide urique. La xanthine oxydase utilise l'oxygène moléculaire comme accepteur final d'électrons, produisant ainsi le radical superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. Ces réactions peuvent être écrites comme suit (**Sahgral et al., 2009**) :



La famille des flavonoïdes a montré une inhibition élevée de la XO (**Hoorn et al., 2002**). L'étude de la relation structure-activité a révélé plusieurs facteurs importants pour la liaison des flavonoïdes dans le site actif de la XO. Parmi ceux-ci, on cite :

(1)-les oléfines en C₂ et C₃ qui maintiennent une structure plane des flavonoïdes sont essentielles pour une puissante activité inhibitrice de la XO. Les flavonoïdes non plans tels que la naringénine, n'ont exhibé aucune activité inhibitrice de la XO (**Lin et al., 2002**).

(2)-Puisque l'apigénine a été le plus puissant inhibiteur parmi les flavonoïdes testés, la modélisation moléculaire a révélé que les groupements hydroxyyles en C₇ et C₅ et le groupement carbonyle en C₄ fournissent des liaisons hydrogènes favorables et des interactions électrostatiques entre les inhibiteurs et le site actif (**Lin et al., 2002**).

II-2-2-3-5-3- Chélation des métaux de transition

Les Chélateurs de métaux de transition tels que le cuivre et le fer peuvent prévenir l'oxydation en formant des complexes ou des composés de coordination avec les métaux. Ils inhibent ainsi le cycle redox du métal ou forment des complexes métalliques insolubles (**Cillard et Cillard, 2006**).

Les flavonoïdes sont également connus pour leurs capacités de chélation des métaux de transitions. La figure (27) montre les groupement chélateurs intervenants (**Laguerre et al., 2007**) :

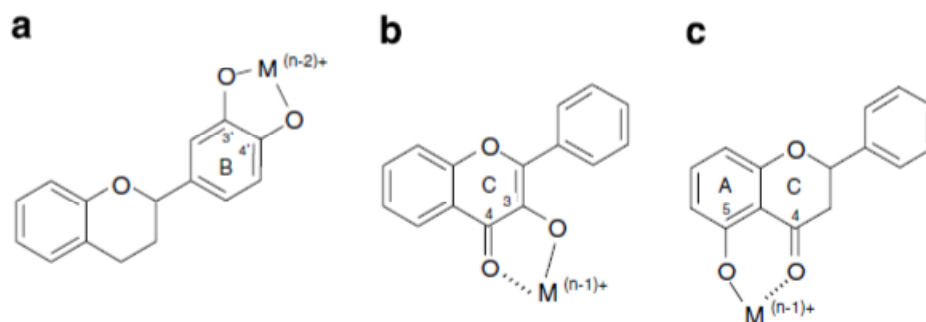


Figure 27 : Complexation de l'ion métallique par les flavonoïdes via le groupement 3`-4`-O- diphenolique dans le cycle B(a) et les structures céto 4-céto, 3-hydroxy dans le cycle C(b) ou bien 4-céto et 5 - hydroxy dans l'anneau le cycle C et A (c) (**Laguerre et al., 2007**).

Partie Pratique

Matériels et méthodes

I-Matériel et méthodes

I-1- La plante *Thapsia garganica*

I-1-1-Description

La racine de *Thapsia garganica* (figure 29) est épaisse, allongée, grisâtre, remplie d'un suc laiteux, très canstique. Sa tige est forte, droite, légèrement striée, fistuleuse, haute d'un pied et plus ; elle se divise en rameaux lâches, étalés, garnis de feuilles pétiolées (figure 28), deux ou trois fois ailées, glabres, à folioles lancéolées, aiguës, d'un vert luisant en dessus, plus pâles, nerveuses et ridées en dessous ; les pétioles s'élargissent à leur base en une gaine ample et membraneuse. Les fleurs, d'un jaune pâle, forment plusieurs ombelles composées de huit à douze rayons (**Roques, 1835**).

I-1-2-Usage médicinal

La racine est diurétique, émétique et purgative. La plante a été considérée comme spécifique dans le traitement de la douleur, mais la prudence est recommandée car elle est toxique pour certains mammifères. La plante est également fortement rubéfiante, produisant des cloques et des démangeaisons intenses (2).

I-1-3-Classification classique

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Apiales

Famille : Apiaceae

Genre: *Thapsia*

Espèce : *Thapsia garganica* (3)



Figure 28: Photographie des feuilles de *Thapsia garganica* (4).



Figure 29: Photographie des racines de *Thapsia garganica*.

I-2- Cueillette de la plante

Les racines et les feuilles de *Thapsia garganica* ont été récoltés en Mars 2012 dans un endroit naturel loin de la pollution situé dans le village de Mozaia de la commune de Boukhelifa .

I-3-Séchage, broyage et tamisage

Les racines et les feuilles de *Thapsia garganica* ont été séchées à l'air libre ; il est à noter que la plante a été séchée juste après sa cueillette. Les racines ont été d'abord coupées en petits morceaux dans le but d'accélérer le séchage. Puis les deux parties de la plante ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à obtention d'une poudre fine qui sera tamisée pour avoir à la fin celle d'un diamètre inférieur à 63 μ m.

I-4-Préparation des extraits

Le protocole d'extraction suivi est celui de Chiang *et al.*, (1994) ayant subi quelques modifications. Il s'agit d'une extraction liquide-solide qui consiste en une extraction sélective en utilisant trois solvants différents permettant de séparer les composés phénoliques des feuilles et des racines de *Thapsia garganica* en composés de polarité distincte. Les étapes d'extraction qui suivront ont été réalisées à température ambiante.

La première étape consiste à mélanger la poudre de la plante (feuilles et racines) avec de l'éthanol absolu avec un rapport de ¼ (100g de poudre dans 400ml d'éthanol absolu) et de les laisser macérer sous agitation magnétique pendant 24heures. Après décantation pendant 24heures, une quantité d'extrait éthanolique humide est prélevée dans une boîte de pétri qui sera utilisée pour les différents tests et l'autre partie, versée dans un bécher, subira une deuxième étape d'extraction. Les deux quantités ont été utilisées après avoir été séchées à l'étuve à 30°C jusqu'à atteindre un poids constant d'extrait sec.

La deuxième étape consiste à dissoudre l'extrait sec d'éthanol de chaque partie de la plante dans un mélange de solvants : l'hexane et l'eau (3/1, v/v). Après agitation et décantation pendant 24heures, deux phases (aqueuse et organique) ont été obtenues puis récupérées et séchées.

Le taux d'extraction de chaque étape a été calculé suivant la formule ci-dessous :

$$\text{Taux d'extraction} = [(p_1 - p_0) / \text{poids de la poudre ou de l'extrait précédent}] \times 100$$

Avec : P_0 : Poids vide de la boîte de pétri ou du bécher ;
 P_1 : Poids après l'évaporation du solvant.

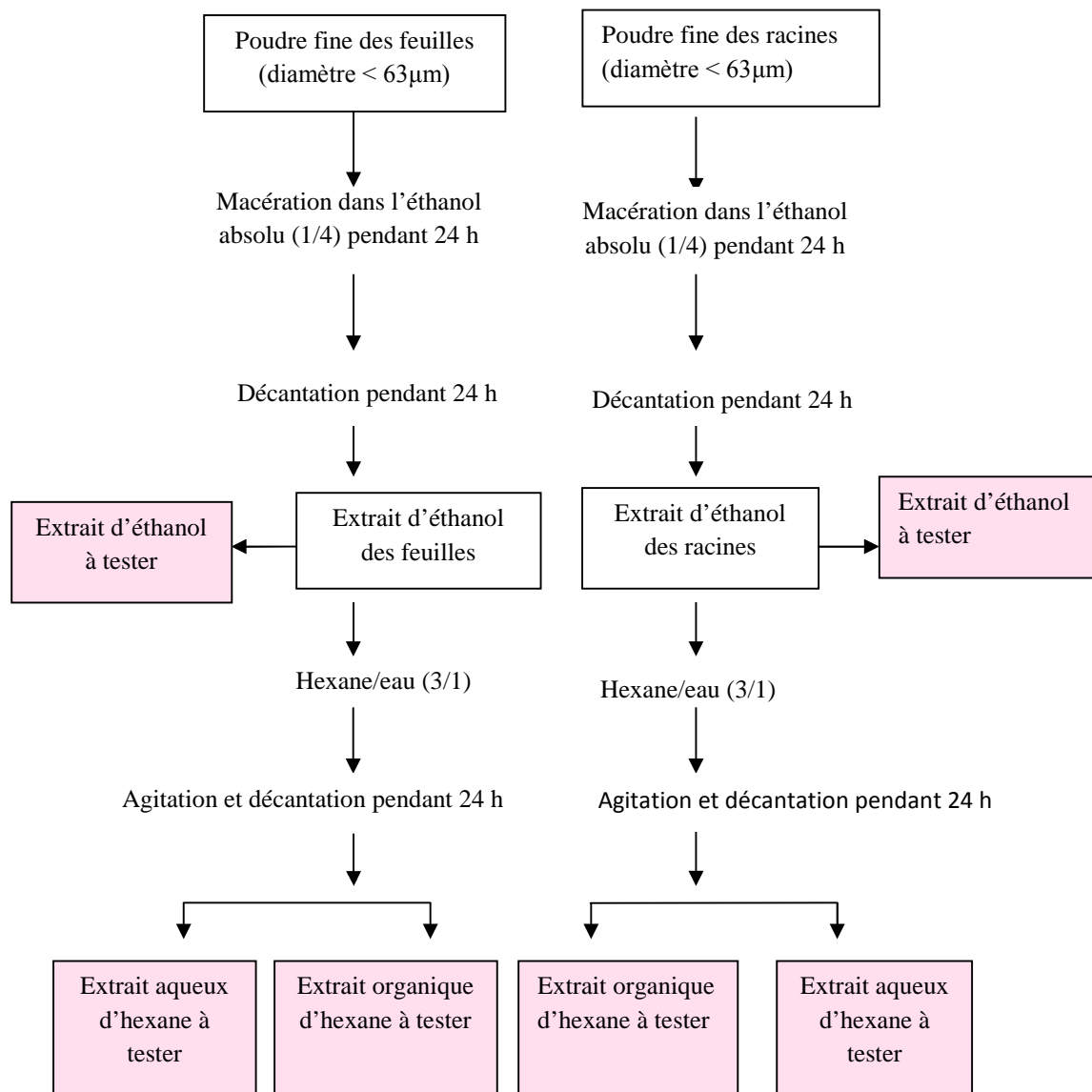


Figure 30: Schéma d'extraction (Chiang et al., 1994).

I-5-Dosage des composés phénoliques

Dans le but d'évaluer qualitativement et quantitativement le contenu en composés phénoliques des extraits des racines et des feuilles de *Thapsia garganica*, trois protocoles ont été suivis afin de doser les taux en phénols totaux, en flavonoïdes et en proanthocyanidines.

I-5-1-Dosage des phénols totaux

Le contenu en phénols totaux des extraits a été déterminé en utilisant le protocole de *Yap et al.*, (2009) avec quelques modifications. La réaction est basée sur la réduction de l'acide phosphotungstène du réactif de Folin-Ciocalteu vers un complexe de couleur bleue, dans une solution alcaline en présence des composés phénoliques.

Pour cela, 0,3 ml de solution d'extrait (1mg/ml) ont été mélangés avec 1,5ml du réactif de Folin-Ciocalteu (10%, v/v), suivis de 0,2 ml de solution de carbonate de sodium (7,5%, w/v). Après avoir bien agité, les tubes à essai ont été incubés pendant 30 mn à température ambiante et à l'obscurité ; puis l'absorbance a été mesurée à 765 nm.

Il est à noter qu'un blanc a été préparé en mélangeant 0,3ml de méthanol avec 1,5ml du réactif de Folin-Ciocalteu et 0,2ml de solution de carbonate de sodium.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant l'acide gallique comme standard afin de déterminer la concentration en phénols totaux des extraits exprimée en mg équivalent acide gallique /g d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

I-5-2-Dosage des flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes des extraits ont été mesurées en suivant la méthode de Mimica-Dukic, (1992) in Abdou Bouba et *al.*, (2010), ayant subi quelques modifications.

Le principe est le suivant : les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium), car ils contiennent des groupements hydroxyles libres (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

2 ml de solution d'extrait (1mg/ml) ont été mélangés avec 1 ml d'une solution d'acétate de sodium et de chlorure d'aluminium (133 mg d' AlCl_3 et 400 mg d'acétate de sodium dans 100 ml d'eau distillée). Après incubation pendant 10 mn à température ambiante, la mesure de l'absorbance a été effectuée à 430 nm. Un blanc a été préparé en mélangeant 2 ml de solution d'extrait avec 1 ml d'eau distillée.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant la quercétine comme standard et la concentration a été exprimée en mg équivalent quercétine /g d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

I-5-3-Dosage des proanthocyanidines

La teneur en tanins condensés des extraits a été mesurée en suivant le protocole de Sun et *al.*, (1998) in Adedapo et *al.*, (2009).

Le principe est basé sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré. La réactivité de la vanilline avec les tanins n'implique que la première unité du polymère (Ba et *al.*, 2010).

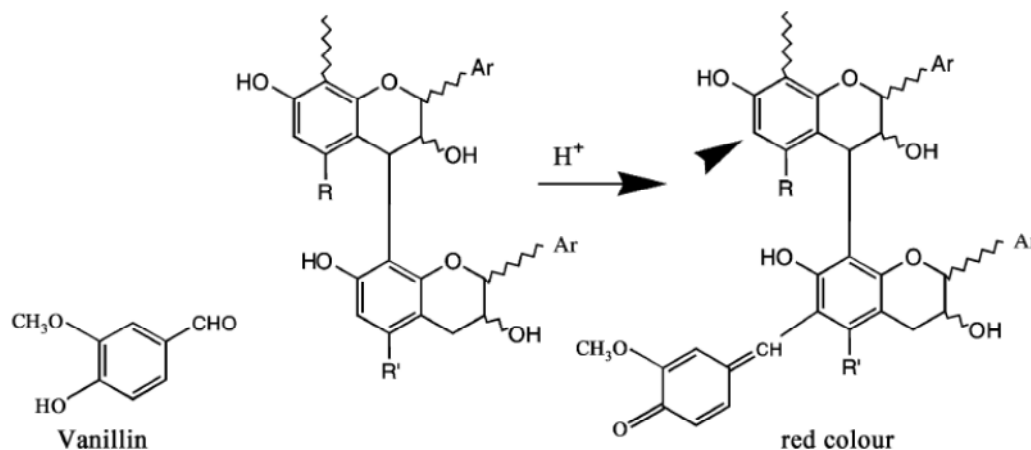


Figure 31 : Mécanisme de la réaction de la vanilline avec les tanins condensés (Schofield et *al.*, 2001).

Un volume de 0,5ml de solution d'extrait a été mélangé avec 3ml de vanilline (4%, w/v) et 1,5ml d'HCl. Après agitation et incubation pendant 15mn à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 500nm.

Un blanc pour chaque extrait a été préparé, contenant 0,5ml de solution d'extrait, 3ml de méthanol et 1,5ml d'HCl. Le contenu en tanins condensés a été calculé par rapport à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions en utilisant la catéchine comme standard et les concentrations ont été exprimées en mg équivalent catéchine/ g d'extrait (mg EC/g d'extrait).

I-6-Activités antioxydantes des extraits

Afin de mettre en évidence l'activité antioxydant des extraits de *Thapsia garganica*, trois tests ont été réalisés qui sont les suivants :

I-6-1-Activité scavenging du radical DPPH

Le protocole de l'activité scavenging du radical DPPH suivi est celui de Hemalatha et *al.*, (2010). Le DPPH (le 1,1-Diphényl-2-picryl-hydrazyl) est un radical libre stable centré sur l'azote dont la couleur change du violet au jaune après réduction par le processus de donation, soit d'hydrogène ou bien d'électron (Hinneburg et *al.*, 2006).

Une solution de DPPH (0,1 mM) a été préparée dans du méthanol et 1ml de cette solution a été ajouté à 3 ml de solution d'extrait à différentes concentrations allant de 5 µg/ml jusqu' à 50µg/ml. Après une incubation de 30 mn à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Un blanc pour chaque extrait a été préparé en mélangeant 1ml du méthanol avec 3 ml de solution d'extrait et le contrôle a été préparé en remplaçant l'extrait par du méthanol. La BHA et l'acide ascorbique ont été utilisés comme standards et à différentes concentrations (0,5µg/ml-5µg/ml).

Le pourcentage de l'activité scavenging du radical DPPH a été calculé par la relation ci-dessous :

$$\% \text{ de l'activité scavenging du radical DPPH} = [(Ac - (At - Ae)) / Ac] \times 100$$

Où :

Ac : absorbance du contrôle ; c'est l'absorbance du blanc contenant seulement le DPPH ;

Ae : absorbance de l'extrait ; c'est l'absorbance de la solution d'extrait sans le DPPH ;

At : absorbance du test ; c'est l'absorbance de la solution de DPPH contenant l'extrait de plante.

I-6-2-Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica* a été évalué en suivant le protocole de Oyaizu, (1986) in Ogunlana et Ogunlana, (2008) ayant subi quelques modifications.

La méthode se base sur le principe suivant : les extraits ayant un potentiel redox réagissent avec le ferricyanure de potassium (Fe^{+3}) pour former le ferrocyanure de potassium (Fe^{+2}). Ce dernier réagit de nouveau avec le $FeCl_3$ pour donner un complexe ferreux ferrique qui a un maximum d'absorption à 700nm (**Jayanthi et Lalitha, 2011**).

A 1ml de solution d'extrait (100µg/ml) ont été ajoutés 2,5ml de tampon phosphate (0,2M, pH = 6,6) suivis de 2,5ml de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ (1%). Après incubation à 50°C pendant 20mn, 2,5ml d'acide trichloroacétique TCA (10%) ont été ajoutés et le mélange a été centrifugé à 3000rpm pendant 10mn. Pour chaque tube à essai, 2,5ml de surnageant ont été récupérés et mélangés avec 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml de $FeCl_3$ (0,1%). L'absorbance a été mesurée à 700nm.

Il est à noter qu'un blanc a été préparé en remplaçant 1ml de solution d'extrait par 1ml de méthanol, et la BHA a été utilisée comme standard. L'augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel indique l'augmentation du pouvoir réducteur (**Jayanthi et Lalitha, 2011**).

I-6-3-Chélation du fer

L'activité chélatrice des extraits pour les ions ferreux Fe^{2+} a été mesurée par la méthode de Dinis et *al.*, (1994) in...avec quelques modifications

La ferrozine produit un complexe violet avec le Fe^{2+} . En présence d'un agent chélatant, la formation du complexe est interrompue, et par conséquent, la couleur violette du complexe diminue (**Hazra et *al.*, 2008**).

Un volume de 100 μl d'extrait ou de standard (EDTA) (100 $\mu\text{g/ml}$) a été mélangé avec 200 μl de FeCl_2 (0,2mM) et 500 μl d'eau distillée. Après agitation, 200 μl de ferrozine (5mM) ont été ajoutés, suivis d'une agitation et incubation pendant 10mn. La mesure de l'absorbance a été réalisée à 562nm.

Il est à noter qu'un blanc général a été préparé, en remplaçant l'extrait par le méthanol et un blanc pour chaque extrait, en ajoutant à ce dernier de l'eau distillée.

L'activité chélatrice du fer des extraits a été calculée par la relation suivante :

$$\% \text{ de chélation} = [(\text{Ac} - (\text{At} - \text{Ae})) / \text{Ac}] \times 100$$

Où :

Ac : est l'absorbance du contrôle (blanc, sans extrait) ;

Ae : est l'absorbance du blanc de l'extrait (extrait + eau distillée) ;

At : est l'absorbance du test.

I-7-Etude statistique

Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon analysé et les résultats ont été exprimés sous la forme : moyenne \pm écartype. Des comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel Anova. Les différentes ont été considérées d'être significatives à $\alpha = 0,05$. Les valeurs des IC_{50} ont été calculées en utilisant le logiciel Origin 8.

Résultats et discussion

II-1-Extraction

Le taux d'extraction des composés phénoliques dépend de la méthode, la nature de solvant, la température et de la taille des particules constituant la poudre de la plante (**Chavan et al., 2001 ; Goli et al., 2004 ; Mukhopadhyay et al., 2005**).

Dans notre travail, afin d'obtenir des combinaisons phénoliques distinctes, une extraction liquide-solide sélective a été réalisée en utilisant trois solvants de différentes polarités, à savoir, deux solvants polaires: l'éthanol et l'eau et un solvant apolaire : l'hexane. Commencer l'extraction par l'éthanol est intéressant car ce dernier représente un solvant permettant la dissolution de la majorité des composés phénoliques (**Cowan, 1999**).

En outre, dans le but d'augmenter le rendement d'extraction, la poudre très fine (diamètre < 63µm) a été utilisée afin d'élargir la surface d'échange entre la plante et le solvant d'extraction.

Une fois les extraits secs, le calcul du taux d'extraction pour chaque extrait a donné les résultats suivants :

Tableau III : Les pourcentages d'extraction pour chaque extrait de *Thapsia garganica*.

extrait	taux d'extraction
Extrait éthanolique des feuilles.	3,96%
Extrait d' hexane des feuilles	33,33%
Extrait aqueux d'hexane des feuilles	30,52%
Extrait éthanolique des racines	6,88%
Extrait d' hexane des racines	12,85%
Extrait aqueux d'hexane des feuilles	25,89%

Bien que les feuilles soient plus riches en composés phénoliques que les racines (Figure 32), nous remarquons que l'extrait éthanolique des racines a donné un taux d'extraction supérieur à celui de l'extrait éthanolique des feuilles, cela suggérerait la richesse des racines en composés phytochimiques autres que les composés phénoliques (lipides, gommages...). Effectivement, lors de la deuxième étape d'extraction des racines (hexane et eau), des lipides et des gommages ont été récupérés dans l'interphase.

II-2- Dosage des composés phénoliques

II-2-1-Dosage des phénols totaux

Les teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica*, exprimées en mg équivalent acide gallique /g d'extrait, sont représentées dans la figure ci-dessous :

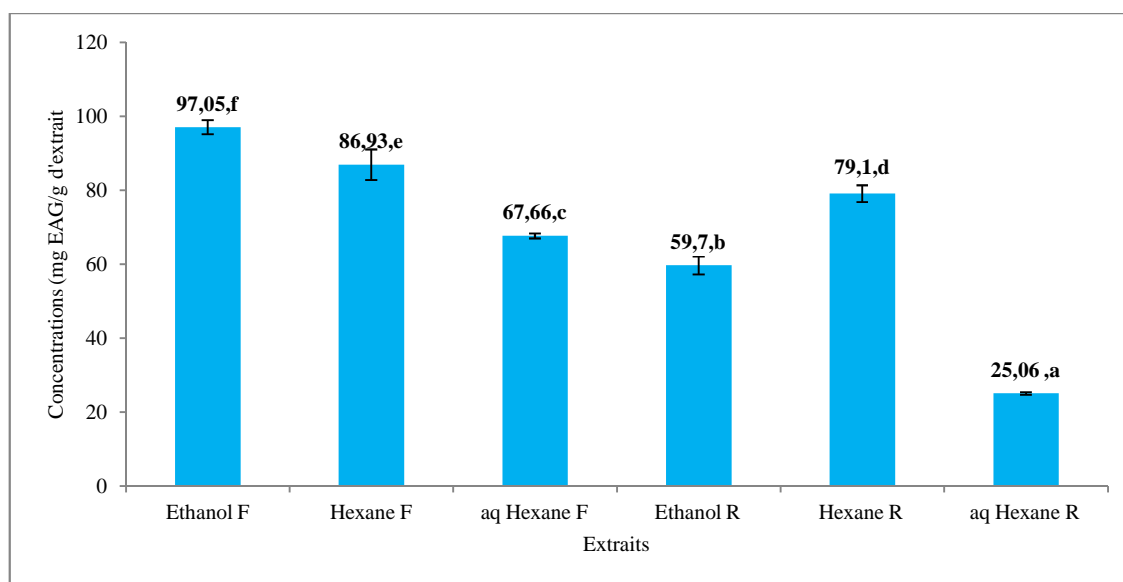


Figure 32: Teneurs en phénols totaux dans les extraits des racines et des feuilles de *Thapsia garganica*.

Une vue d'ensemble de la représentation graphique nous laisse remarquer que les teneurs en phénols totaux de *Thapsia garganica* sont comprises entre 25.06 ± 0.35 mg équivalent acide gallique /g d'extrait (extrait aqueux d'hexane des racines) et 97.05 ± 1.90 mg équivalent acide gallique /g d'extrait (extrait éthanolique des feuilles). Une étude réalisée par le chercheur Rached et ses collaborateurs, (2010), a montré qu'un extrait des feuilles d'une *Thapsia garganica L* : d'origine algérienne a laissé apparaître une teneur en phénols totaux de 47.64 ± 1.43 mg équivalent acide gallique/g d'extrait qui est voisine de celle de notre extrait aqueux d'hexane des feuilles qui est de 67.66 ± 0.68 mg équivalent acide gallique /g d'extrait .

En outre, une étude réalisée par Kähkönen et al., (1999), a montré que la quantité en phénols totaux variait beaucoup dans les plantes et que ces dernières pouvaient être regroupées en plusieurs classes qui sont les suivantes :

- Une classe à faible quantité : 0,2 à 1,3 mg EAG/g de poudre de plante.
- Une classe à quantité modérée : 9,1 à 23,1 mg EAG /g de poudre de plante.
- Une classe à quantité élevée : 12,4 à 50,8 mg EAG/g de poudre de plante.
- Une classe à quantité très élevée : 17, 5 à 155,3 mg EAG/g de poudre de plante.

Par conséquent, *Thapsia garganica* fait partie de la classe à quantité très élevée en phénols totaux. Il est à souligner que le dosage des phénols totaux des feuilles de *Thapsia garganica* a donné la valeur la plus élevée pour l'extrait éthanolique (97.05±1.90 mg équivalent acide gallique /g d'extrait) ; ceci serait évident étant donné que c'est l'extrait brut et de ce fait il constitue la source initiale du reste des extraits des feuilles.

Par contre, la haute teneur en phénols totaux des racines a été marquée par l'extrait d'hexane (79.1+2.26 mg équivalent acide gallique/g d'extrait) qui est supérieure à celle de l'extrait éthanolique (59.7+2.42 mg équivalent acide gallique/g d'extrait). En réalité bien que l'extrait éthanolique contienne la totalité des composés phénoliques le réactif révélateur, le Folin-ciocalteu, n'aurait pas pu les détecter entièrement. On suppose que cela serait dû au fait que les groupements réagissant avec ce réactif ne soient pas disponibles dans l'extrait brut des racines à cause de l'encombrement stérique qui résulterait de l'accumulation d'un très grand nombre de composés phytochimiques. Cependant, au fur et à mesure que l'on avance dans l'extraction sélective, les composés phénoliques se séparent ou bien se dispersent l'un par rapport à l'autre dans les phases organiques et aqueuses, fournissant ainsi une meilleure attraction (affinité) des phénols totaux vis-à-vis du réactif de Folin-Ciocalteu, d'où l'augmentation de l'absorbance à 765nm et donc l'augmentation des concentrations en phénols totaux.

Il est à noter également que bien que les extraits aqueux des deux parties de la plante soient plus riches en flavonoïdes (figure 33) et en tannins condensés (figure 34) par rapport aux extraits organiques, ce sont ces derniers qui ont exhibé les concentrations en phénols totaux les plus élevées ; cette contradiction s'expliquerait par le fait que les extraits organiques seraient riches en tannins hydrolysables qui constituent des polymères de nature polycyclique qui seraient donc légèrement hydrophobes se solubiliseraient ainsi dans les solvants organiques apolaires (hexane).

Finalement, nous constatons que les feuilles de *Thapsia garganica* sont plus riches en composés phénoliques que les racines ; cela semblerait évident vu que c'est la partie aérienne de la plante qui est la plus exposée aux rayonnements UV et aux attaques des insectes.

II-2-2-Dosage des flavonoïdes

Le contenu en flavonoïdes des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica* exprimé en mg équivalent quercétine /g d'extrait est représenté dans la figure qui suit :

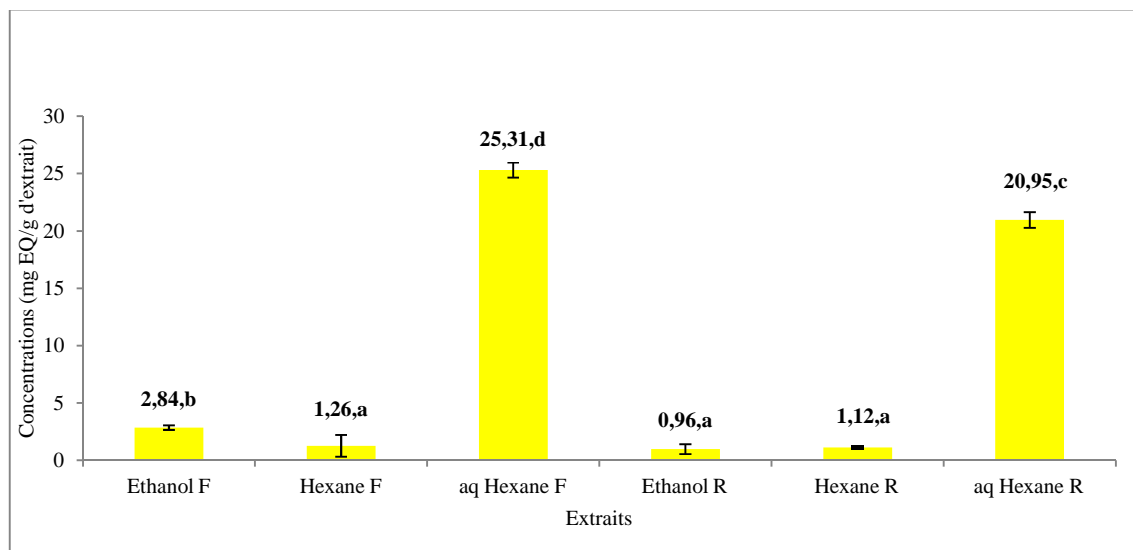


Figure 33 : Teneurs en flavonoïdes dans les extraits des racines et des feuilles de *Thapsia garganica*.

D'après cette représentation graphique nous constatons que *Thapsia garganica* contient une quantité modérée en flavonoïdes comprise entre $0,96 \pm 0,42$ mg équivalent quercétine /g d'extrait correspondant à l'extrait éthanolique des racines et $25,31 \pm 0,65$ mg équivalent quercétine /g d'extrait correspondant à l'extrait aqueux d'hexane des feuilles. Les chercheurs Djeridane et ses collaborateurs en (2010), ont trouvé une teneur en flavonoïdes de $4,04 \pm 0,42$ mg équivalent rutine /g d'extrait pour l'extrait éthanolique d'une *Thapsia garganica* d'origine algérienne qui est proche de celle de l'extrait éthanolique des feuilles de notre plante qui est de $2,84 \pm 0,2$ mg équivalent quercétine /g d'extrait.

En outre, une autre étude réalisée par les chercheurs Rached et ses collaborateurs, (2010), a montré qu'un extrait des feuilles d'une *Thapsia garganica* L d'origine algérienne a laissé apparaître une teneur en flavonoïdes de $18,13 \pm 0,47$ mg équivalent catéchine /g d'extrait qui est voisine de celle de l'extrait aqueux d'hexane des feuilles ($25,31 \pm 0,65$ mg équivalent quercétine /g d'extrait) et une autre valeur d'un extrait des racines, $23,98 \pm 7,65$ mg équivalents catéchine /g d'extrait qui se rapproche de celle de l'extrait aqueux d'hexane des racines ($20,95 \pm 0,67$ mg équivalent quercétine /g d'extrait).

D'autre part, les extraits éthanoliques des feuilles et des racines ont présenté de faibles concentrations par rapport au reste des extraits qui sont égales à 2.84 ± 0.2 mg équivalent quercétine /g d'extrait et 0.96 ± 0.42 mg équivalent quercétine /g d'extrait, respectivement. Cela serait peut être dû au fait qu'ils soient les extraits bruts donc ils contiendraient la totalité des composés phénoliques qui engendreraient un encombrement stérique et empêcheraient ainsi la formation du complexe entre les groupements hydroxyles des flavonoïdes et le Al^{+3} du chlorure d'aluminium d'où la diminution de l'absorbance à 430 nm.

Il est également à noter la richesse des extraits aqueux par rapport aux extraits organiques étant donné que les flavonoïdes sont de petites molécules hydrosolubles dont les groupements hydroxyles facilitent leur solubilisation dans les solvants polaires (Curty et Robin, 2000).

Nous remarquons aussi que les extraits des feuilles ont montré des teneurs en flavonoïdes supérieures à celles des extraits des racines, ce qui nous démontre que les feuilles de *Thapsia garganica* sont plus riches en flavonoïdes ; cela est dû au fait que ce groupe de composés phénoliques intervient dans la coloration des feuilles et des pétales des fleurs (Havsteen, 2002 ; Gervaise, 2004).

II-2-3-Dosage des proanthocyanidines

Le contenu en tanins condensés des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica* exprimé en mg équivalent catéchine /g d'extrait est représenté dans l'histogramme suivant :

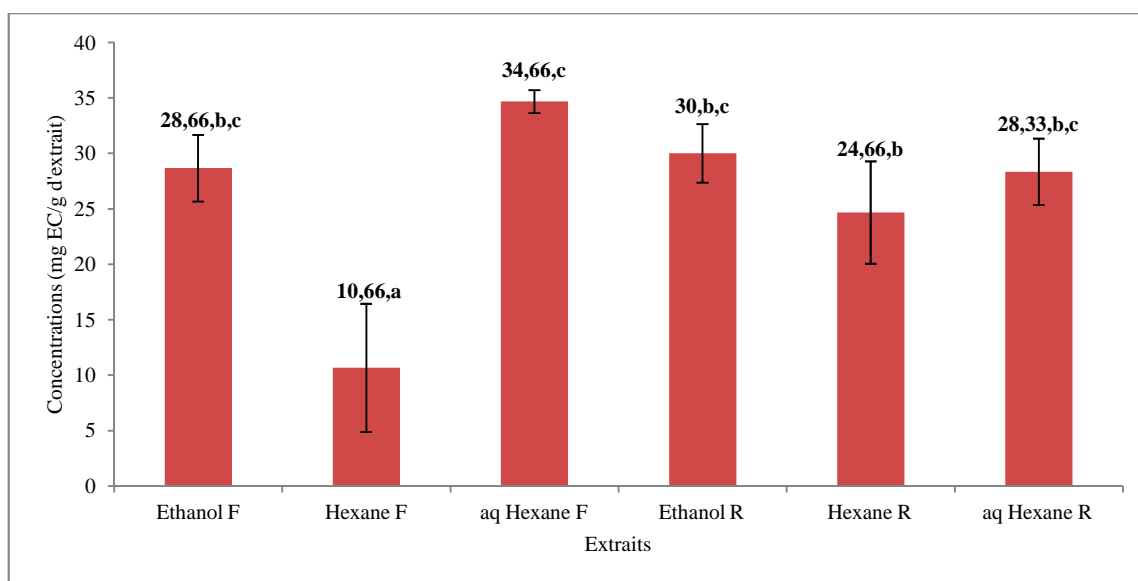


Figure 34 : Teneurs en proanthocyanidines dans les extraits des racines et des feuilles de *Thapsia garganica*.

Cette figure nous a montré que les extraits de *Thapsia garganica* ont présenté des teneurs appréciables en proanthocyanidines, allant de $(10.66 \pm 5.77$ à $34.66 \pm 1.04)$ mg équivalent catéchine /g d'extrait. Nous faisons remarquer également que ce sont les extraits aqueux de *Thapsia garganica* qui ont donné les quantités les plus élevées par rapport aux extraits organiques ; cela pourrait être dû à la nature biochimique des tanins condensés qui sont des polymères riches en groupements hydroxyles solubles ainsi dans les solvants polaires.

En outre, l'extrait éthanolique de la partie aérienne a montré une concentration légèrement inférieure à celle de l'extrait aqueux, étant donné que le réactif révélateur (la vanilline) réagit uniquement avec la première unité du polymère de proanthocyanidines (Ba et al., 2010) et peut être aussi à cause de l'encombrement stérique engendré et de la possibilité d'interaction des polymères des proanthocyanidines entre eux .

II-3-Activités antioxydantes de *Thapsia garganica*

II-3-1-Activité scavenging du radical DPPH

Les résultats de l'activité scavenging du radical DPPH des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica* sont représentés dans la figure ci-dessous :

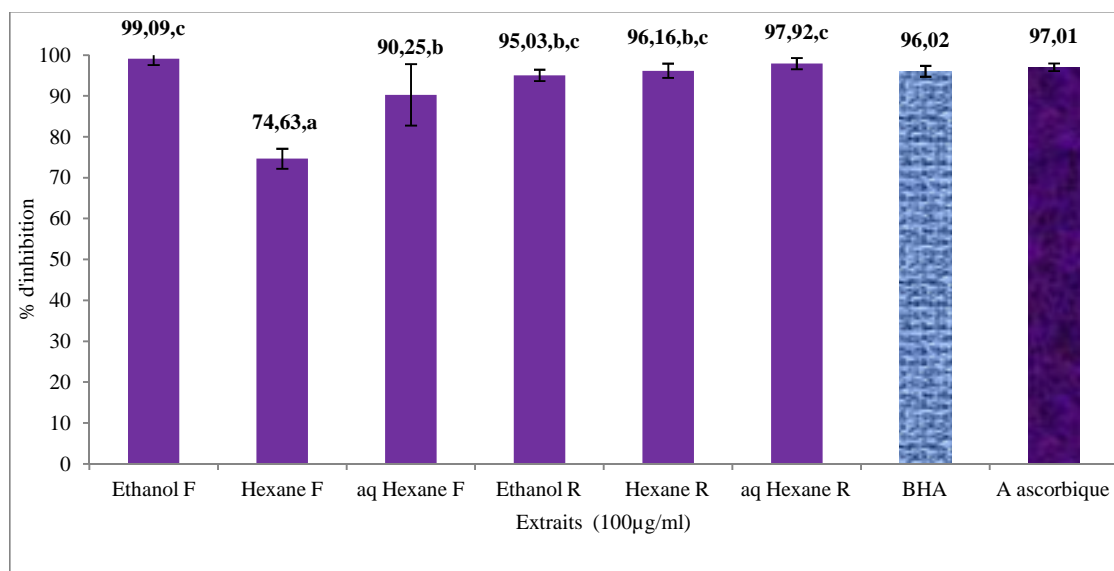


Figure 35 : Pourcentages de l'activité scavenging du radical DPPH des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica* et des standards.

A partir de cette figure, nous constatons que tous les extraits de *Thapsia garganica* ont exhibé une très forte activité scavenging du radical DPPH comparativement aux pourcentages d'inhibition montrés par les standards utilisés : la BHA et l'acide ascorbique qui ont donné des inhibitions de $96.02\% \pm 1.33\%$ et $97.01\% \pm 0.95\%$, respectivement (à $100\mu\text{g/ml}$).

En effet, une étude réalisée par les chercheurs Rached et ses collaborateurs, (2010) a montré que les extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica* ont exhibé une inhibition positive du radical DPPH.

L'acide ascorbique a exhibé une activité scavenging du radical DPPH avec une $IC_{50} = 1.61 \mu\text{g/ml}$ (figure 36) qui est proche à celle retrouvée par les chercheurs Rached et ses collaborateurs, (2010), qui est de $2.66 \mu\text{g/ml}$.

Aussi nous déduisons que c'est l'extrait éthanolique des feuilles qui a donné le pourcentage le plus élevé parce que c'est l'extrait brut, il a montré la plus grande teneur en phénols totaux ($97.05 \pm 1.9 \text{ mg}$ équivalent acide gallique /g d'extrait).

Nous constatons également que ce sont les extraits aqueux qui ont manifesté une activité scavenging du radical DPPH la plus importante par rapport aux extraits organiques proportionnellement à leurs concentrations en flavonoïdes qui constituent de puissants agents antioxydants (Harvsteen, 2002). Par ailleurs, il existe une corrélation positive entre les teneurs en tanins condensés et les pourcentages scavenging du radical DPPH ($R=0.77$) vue leur abondance en groupements hydroxyles donneurs d'électrons et d'hydrogène.

Il est important de noter que l'activité scavenging du radical DPPH dépend de la concentration des extraits, plus la concentration est élevée plus le pourcentage d'inhibition augmente et l' IC_{50} de l'extrait éthanolique des feuilles a été de $9.24 \mu\text{g/ml}$ (figure 37) légèrement supérieure à celles des standards utilisés : la BHA et l'acide ascorbique qui sont respectivement de $IC_{50} = 0.98 \mu\text{g/ml}$ et $IC_{50} = 1,61 \mu\text{g/ml}$ (figure 36).

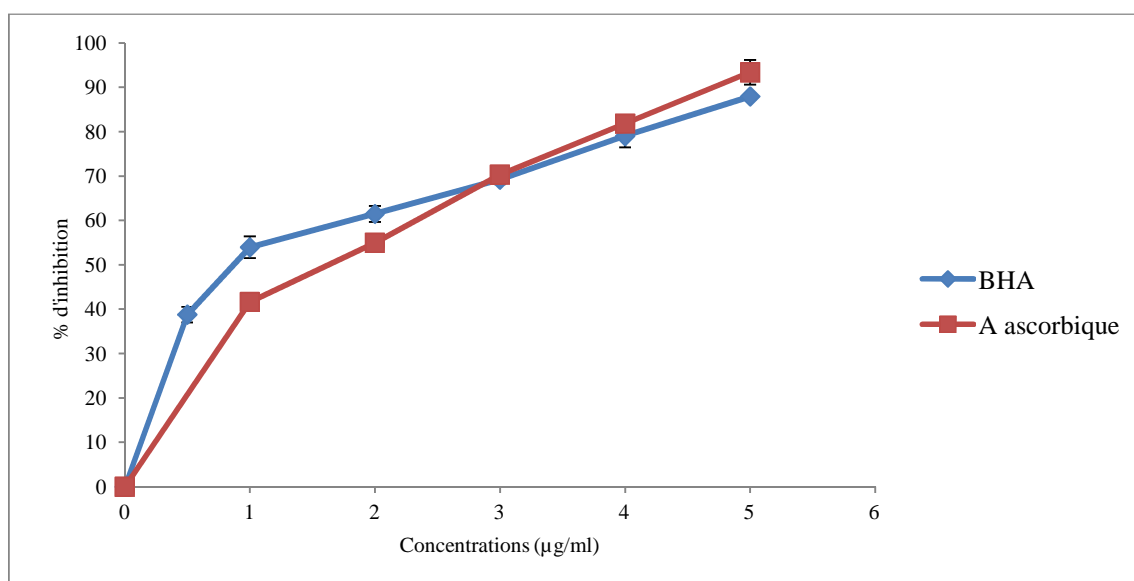


Figure 36 : Activité scavenging de radical DPPH des différentes concentrations de l'acide ascorbique et de la BHA.

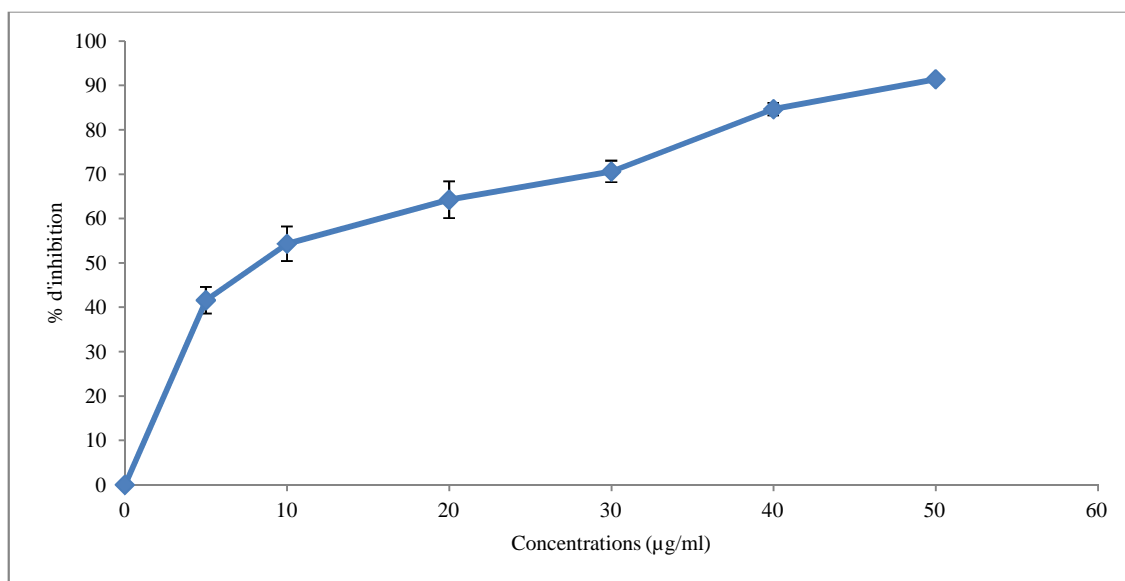


Figure 37 : Activité scavenging du radical DPPH des différentes concentrations de l'extraits éthanolique des feuilles de *Thapsia garganica*.

II-3-2-Pouvoir réducteur

Les valeurs du pouvoir réducteur des extraits de *Thapsia garganica* sont représentées dans la figure suivante:

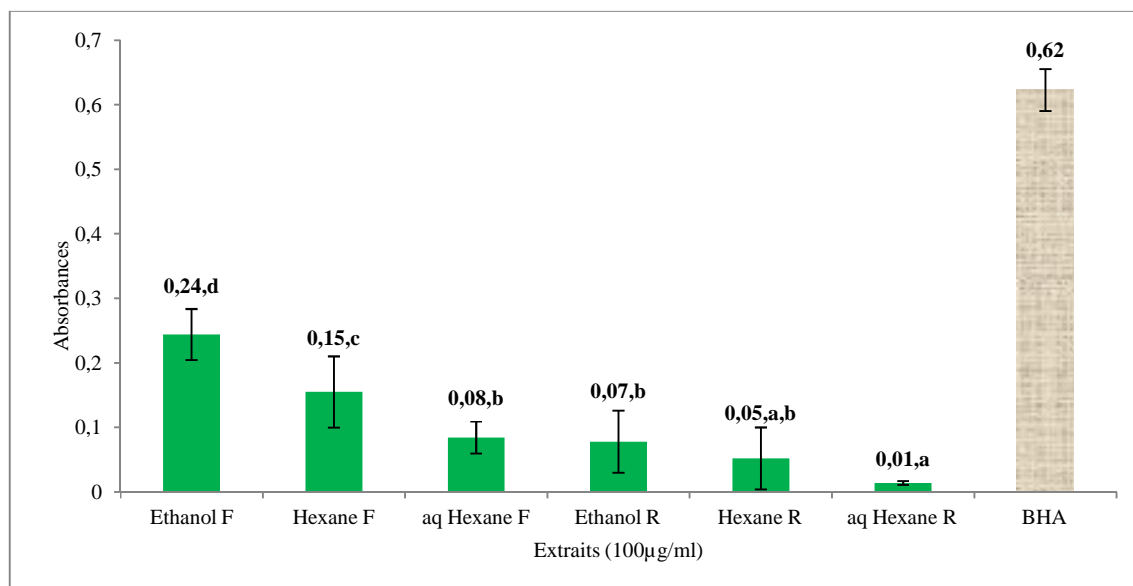


Figure 38 : Représentation graphique de l'absorbance de l'ion ferreux (Fe^{2+}) du pouvoir réducteur des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica* et du standard.

Des valeurs allant de $0,01\pm 0,00$ à $0,24\pm 0,03$ de l'activité réductrice des extraits de *Thapsia garganica* ont été enregistrées. Nous déduisons que ces valeurs ont été faibles par rapport à celle du standard, la BHA qui a montré un pouvoir réducteur de $0,62\pm 0,03$.

Nous faisons remarquer que l'extrait éthanolique des feuilles est au sommet avec une absorbance de $0,24\pm 0,03$ étant donné qu'il possède la teneur la plus élevée en phénols totaux qui sont riches en groupements hydroxyles donneurs d'électrons; cela justifie également la bonne corrélation positive existante entre le pouvoir réducteur et les teneurs en phénols totaux des extraits ($R= 0,81$).

Finalement, nous constatons que les extraits des feuilles ont montré un pouvoir réducteur plus élevé que celui des extraits des racines, une conséquence de la richesse des feuilles en composés phénoliques.

II-3-3-L'activité chélatrice du fer

Les pourcentages de l'activité chélatrice du fer des extraits de *Thapsia garganica* sont figurés ci-dessous :

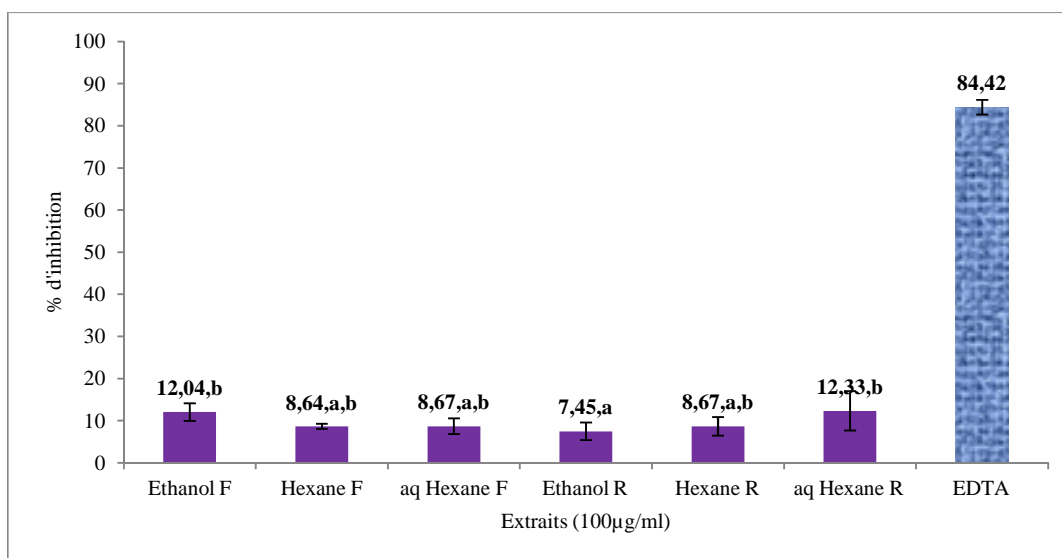


Figure 39 : Pourcentages de l'activité chélatrice du fer des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica* et du standard.

Une vue générale de la représentation graphique, nous permet de constater que les extraits de *Thapsia garganica* ont une très faible activité chélatrice du fer ($7,45\%\pm 2,11\%$ à $12,33\%\pm 4,65\%$) comparativement au standard utilisé, l'EDTA qui est connu pour sa forte activité chélatrice du fer, avec un pourcentage d'inhibition de $84,42\%\pm 1,74\%$.

C'est l'extrait éthanolique parmi les extraits des feuilles qui a donné une valeur maximale ($12,04\% \pm 2,07\%$) résultant de sa forte teneur en phénols totaux ($97,05 \pm 1,90$ mg équivalent acide gallique /g d'extrait).

Les extraits aqueux ont chélaté le fer avec des pourcentages supérieurs à ceux des extraits organiques car ils sont riches en flavonoïdes qui sont de bons chélateurs du fer (**Cillard et Cillard, 2006**) et en tannins condensés (grâce à leur abondance en groupements hydroxyles chélateurs du fer).

Concernant les racines, l'extrait aqueux d'hexane chélate le fer avec un taux de $12,33\% \pm 2,11\%$ légèrement supérieur à celui de l'extrait éthanolique ($7,45\% \pm 2,11\%$) ; cela serait en relation avec le contenu en flavonoïdes, car bien que l'extrait éthanolique contienne la totalité des flavonoïdes, ces derniers ne seraient pas purifiés au niveau de cet extrait contrairement à l'extrait aqueux d'hexane (concentration de l'extrait aqueux d'hexane est supérieur à celle de l'extrait éthanolique), et de ce fait, ils ne seraient pas très susceptibles à la chélation du fer.

Il est à souligner que l'activité chélatrice du fer de nos extraits ne varie pas en fonction de la concentration, c'est pourquoi les IC_{50} de nos extraits n'ont pas été déterminées.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Thapsia garganica a été considérée comme spécifique dans le traitement de la douleur, a un effet purgatif et les racines possèdent une activité diurétique et émétique.

Notre étude réalisée sur les feuilles et les racines de *Thapsia garganica* nous a permis d'aboutir aux résultats suivants :

- Les teneurs en phénols totaux de la plante ont été élevées et ce sont les feuilles qui ont exhibé les teneurs les plus dominantes.
- *Thapsia garganica* contiendrait des quantités modérées en flavonoïdes, et ce sont les extraits aqueux qui ont présenté les concentrations les plus importantes. D'autre part, les feuilles ont été plus riches que les racines.
- Les extraits de *Thapsia garganica* ont dévoilé des taux appréciables en tanins condensés.
- Les extraits des feuilles et des racines ont exhibé une très forte activité scavenging du radical DPPH. De plus, les extraits aqueux ont exprimé des pourcentages d'inhibition plus élevés que les extraits organiques ; cela a été en bonne corrélation avec le contenu en tanins condensés.
- Les extraits de *Thapsia garganica* n'ont pas été de bons chélateurs du fer.
- *Thapsia garganica* posséderait un faible pouvoir réducteur, ces résultats sont en corrélation positive avec les teneurs en phénols totaux.
- En fin, vue les corrélations existantes entre les activités anti-oxydantes testées et les composés phénoliques, cela suggérerait que les composés phénoliques seraient probablement responsables de ces activités.

Ce travail nous a permis d'avoir un aperçu général sur l'activité anti-oxydante des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica*. Ainsi, nous souhaitons aller au-delà des tests des extraits bruts, et de tenter d'isoler, de purifier et d'identifier les constituants biochimiques responsables de ces différentes activités.

En outre, les tests antioxydants réalisés : l'activité scavenging du radical DPPH, le pouvoir réducteur et la chélation du fer sont très importants pour la sante humaine, il serait très intéressant d'aller plus loin en essayant de réaliser ces tests *in vivo* afin de s'assurer de l'efficacité et de la non toxicité des extraits ou des constituants biochimiques isolés.

***Références
bibliographiques***

Références bibliographiques

- Abdou Bouba A., Njintang Y. N., Scher J. and Mbofung C. M.F. (2010). Phenolic compounds and radical scavenging potential of twenty cameroon spices. *Agriculture and biology journal of north America*, **1** (13): 213-224.
- Adedapo A. A., Jimoh F. O., Afolayan A. J. and Masika P. J. (2009). Antioxidant Properties of the Methanol Extracts of the Leaves and Stems of *Celtis Africana*. *Records of natural products*, **3**(1): 23-31.
- Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P. et Lomri A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*, **74**: 636–643.
- Allain P. (2008). L'acide ascorbique ou vitamine C. *Pharmacorama*. Extrait de « les médicament » 3^{ème} édition.
- Anne-Laure B., Vessela A-P., Jacques G., Barreau C. et Forget-Richard F. (2007). Analyse de facteurs biochimiques interagissant dans le processus de biosynthèse des TCTB. *Colloque Fusariotoxines des Céréales-Arcachon*.
- Aruoma O. I., Bahorun T. and Jen L.-S. (2003). Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Mutation Research*, **544**: 203-215.
- Aurousseau B. (2002). Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Productions Animales*, **15** (1) : 67-82.
- Ba K., Tine E., Destin J., Cissé N., Thonart P. (2010). Etude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **14** (1): 131-139.
- Badeau M. (2006). Effets d'un antioxydant, le tempol, sur les actions métaboliques et vasculaires de l'insuline chez le rat insulino-résistant avec un surplus de poids. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.). Faculté de médecine université laval, Québec. p.50.

- Balasundram N., Sundram K. and Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, **99**: 191-203.
- Ballinger S. W. (2005). Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radical Biology & Medicine*, **38** : 1278-1295.
- Barati Elbaz C. et Le Marechal P. (2008). Biochimie en 23 fichiers. *Dunod, Paris*: 62 et 135.
- Barus C. (2008). Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieux homogènes et biphasique-Application aux produits cosmétiques. Thèse du Doctorat, Génie des procédés et environnement, l'Université Toulouse III - Paul Sabatier, p203.
- Baudin B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Mt Cardio*, **2** (1) : 43-52.
- Beaudeau J-L., Delattre J., Therond P., Bonnefont-Rousselot D., Legrand A. and Peynet J. (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, **21** : 144-150.
- Beaumont S. (2010). Biochimie 1^{ère} année santé. In : les vitamines apparentées aux lipides. ISBN :978-2-10-0547/2-8 : 150-200.
- Berg J.M., Tymoczko J.L. et Stryer L. (2007). Biochimie. In : la phosphorylation oxydative. Edition Flammarion Médecine-Science. Paris : 518-519.
- Berger M. M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **20** : 48-53.
- Birlouez-Aragon I. (2001). Vitamines antioxydantes et pathologies degeneratives. Le cas de la vitamine C. INA-PG, Paris.
- Bonnefont-Rousselot D., Peyet J., Beaudeau J-L., Therond P., Legrand A. et Dellatre J. (2002). Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nutrition clinique et métabolisme*, **16** : 260-267.
- Bonnet J. (2005). Athérosclérose. *EMC-Cardiologie Angiologie*, **2**: 436-458.
- Borg J. et Reeber A. (2008). Biochimie métabolique. *Ellipses Edition Marketing S.A.* Paris.
- Bossu C. M., Ferreira E. C., Chaves F. S., Menezes E. A. and Nogueira A. R. A. (2006). Flow injection system for hydrolysable tannin determination. *Microchemical Journal*, **84**: 88-92.
- Bruneto J. (2008). Pharmacognosie : composés phénoliques, shikimates, acétates. 3^{ème} édition. *Editions TEC et DOC*: 233-447.

- Cai Y.-Z., Sun M., Xing J., Luo Q. and Corke H. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, **78**: 2872-2888.
- Caligiuri Giuseppina. (2004). Rôle de l'immunité dans l'athérosclérose et dans les syndromes coronariens aigus. *Médecine/Science*, **20** :175-81.
- Cau P. et Seïte R. (1999). Cours de biologie cellulaire. In : communication intracellulaire. *Ellipses Edition Marketing S. A.* : 488.
- Chavan U. D., Shahidi F. and Naczki M. (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus L.*) as affected by different solvents. *Food Chemistry*, **75**: 509-512.
- Chiang H.-C., Lo, Y.-J. and Lu F.-J. (1994). Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophila spinulosa* (Hook) Tryon. *Enzyme Inhibition*, **8** (1): 61-71.
- Cillard J. and Cillard P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, **13** (1) : 24-29.
- Curtay J.-P. et Robin J.-M. (2000). Intérêt des complexes antioxydants. *Nutrithérapie Info*.
- Cottart C.-H., Laguillier C., Nivet Antoine V., Klimczak C., Beaudoux J.-L. (2009). Biologie du vieillissement artériel et artériosclérose. *C.R. Biologie*, **33**: 433-447.
- Cowan M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* : 564-582
- Dastmalchi K., Dorman H. J. D., Oinonen P. P., Darwis Y., Laakso I. and Hiltunen R. (2007). Chemical composition and *in vitro* antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis L.*) extract. *Food Science and Technology*, **41** : 391-400.
- Delattre J., Durand G. et Jardillier J.-C. (2003). Biochimie pathologique :Aspect moléculaire et cellulaire. In :Radicaux libres et antioxydants : *Flammarion Médecine –Science* : 59-81.
- Derbel S. et Ghedira K. (2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie et Nutrition*, **1**: 28-34.
- Desmettre T. et Lecerf J.-M. (2005). Nutrition et dégénérescences maculaires liées à l'âge. *EMC-Ophtalmologie*, **2**: 202–217.

- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. and Abdelly C. (2008). Phenolic composition of cynara cardunculus L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, **331** (5): 372-379.
- Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*: 108-115.
- Favier A. (2007). Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales pharmaceutiques Françaises*, **64** (6) : 390-396.
- Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. and Jore D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *L'actualité chimique*: 91-96.
- Gervaise Y. (2004). Analyse des antioxydants naturels dans les matières premières et les produits. *Polyphénols-Euroforum*.
- Goli A. H., Barzegar M and Sahari M. A. (2004). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, **92**: 521-525.
- Groussard C. (2006). Stress oxydatif et exercice anaérobie. *Science & Sport*, **21** : 62-67.
- Guichardant M., Bacot S., Molière P. and Lagarde M. (2006). Les biomarqueurs de la peroxydation lipidique. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, **13** (1) : 31-34.
- Havsteen B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, **96** : 67– 202
- Hazra B., Biswas S. and Mandal N. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **8** : 63.
- Heim K. E., Anthony R. Tagliaferro, Dennis J. Bobilya. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**: 572–584.
- Hemalatha S., Lalitha P. and Arulpriya P. (2010). Antioxydant activities of the extracts of the aerial roots of *Pothos aurea* (Linden ex Andre). *Der Pharma Chemica*, **2** (6): 84-89.
- Hennebelle T., Sarpaz S., Bailleul F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*. **1**: 3-6.
- Hinneburg I., Damien Dorman H. J., Raimo Hiltunen. (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and epices. *Food chemistry*, **97**: 122-129.

- Hoorn D. E. C. V., Nijveldt R. J., Leeuwen P. A. M. V., Hofman Z., M'Rabet L., De Bont D. B. A. and Norren K. V. (2002). Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *European Journal of Pharmacology*, **451**: 111-118.
- Huet O. et Duramteau J. (2008). Dysfonction endothéliale : Rôles des radicaux libres. *Réanimation*, **17** : 378-392.
- Jayanthi P. et Lalitha P. (2011). Reducing power of the solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (mart.) solms. *International Journal of Pharmaceutical Science*, **3**: 126-128.
- Judde A. (2004). Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique: mécanisme, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications? *Oléagineux Corps Gras Lipides*, **11** (6): 414-418.
- Kalra S., Jena G., Tikoo K. and Mukhopadhyay A. K. (2007). Preferential inhibition of xanthine oxidase by 2-amino-6-hydroxy-8-mercaptapurine and 2-amino-6-purine thiol. *BMC Biochemistry*, **8** (8): 1-11.
- Karp G. (2010). Biologie cellulaire et moléculaire. In : les bases chimiques de la vie. *Edition De Boeck*. Bruxelles : 35.
- Khellil S., Ferchichi S., Gammoudi I., Jaidance Z., Chahed H., Dandana A., Noichri Y., Chalghoum A., Ernez S., Jeridi G., Miled A. (2010). Hyperhomocysteinémie et stress oxydant chez les insuffisants cardiaques. *Immuno –analyse et biologie spécialisée*. **25**: 191-196.
- Koechlin-Ramonatxo C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **20**: 165-177.
- Kontoghiorghes G. J. et Weinberg E. D. (1995). Iron: Mammalian defense systems, mechanisms of diseases, and chelation therapy approaches. *Blood Reviews*, **9** (1): 33-45.
- Kumaran A. et Joel Karunakaran R. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*, **97**:109-114.
- Laguerre M, López-Giraldo L. J., Lecomte J., Pina M. and Villeneuve P. (2007). Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, **14** (5) : 278-292.
- Leclerc M.-J. (2007). Angine de poitrine. Nucleus Medical Art.

- Levasseur-Acker G., Zalma R., Copin E., Fournier I., Pezerat H. and Jankowski R. (1995). Peroxydation de l'acide linoléique en présence des fibres d'amiante ou de némalite. Résultats préliminaires avec des cellules épithéliales. *Canadian Journal of Chemistry*, **73**: 453-459.
- Lin C.-M., Chen C.-S., Chen C.-T. et Liang Y.-C. and Lina J.-K. (2002). Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **294**: 167–172.
- Lin H.-C., Tsai S.-H., Chen C.-S., Chang Y.-C., Lee C.-M., Lai Z.-Y. and Lin C.-M. (2008). Structure activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Biochemical Pharmacology*, **75** : 1416-1425.
- Macheix J.J., Fleuriet A et Sarni-Manchado P. (2006). Composés phénoliques dans la plante, structure, biosynthèse, répartition et rôle. In : Les polyphénols en agroalimentaire. Edition *Technologie et document*. Paris, 380-398.
- Marfak A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de Depsides. Thèse doctorale. Université de Limoges. Ecole doctorale Science Biologie Santé. Faculté de pharmacie : 1-220.
- Martin S. et Andriantsitohaina R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, **51**: 304-315.
- Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C.I. (2000). The effects of plant flavonoïdes on mammalian cells Implication for Inflammation, heart disease, and cancer (compte rendu du premier colloque sur les applications des polyphénols). *Pharmacological Review*. **52** : 673-751.
- Mohazzab K. M., Kaminski P. M. and Wolin M. S. (1994). NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *American Physiological AJP-Heart and Circulatory Physiology*, **266**: 2568-2572.
- Morena M., Martin-Mateo M., Cristol J.-P. et Canaud B. (2002.). Stress oxydant, hémoincompatibilité et complications de la dialyse au long cours. *Néphrologie*, **23** (5) : 201-208.
- Mukhopadhyay S., Luthria D. L. and Robbins R. (2005). Optimisation of extraction process for phenolic acids from black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86** (1): 156-162.
- Naczki M., et Shahidi F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*, **1054**: 95–111.

- Negres –Salvayre A. et Salvayre R. (2005). Effet protecteurs des acides gras contre le stress oxydatif : implication en physiopathologie vasculaire. *OCL*, **12** : (5-6)
- Nève J. (2002). Modulation de l’apport alimentaire en antioxydant. *Nutrition clinique et métabolisme*, **16**: 292-30.
- Nicholson R. et Vermeris W. (2006). Phenolic compound biochemistry. *Edition: Springer. New York*. 01-48.
- Nunoshiba T., Obata F., Boss A. C., Oikawa S., Mori T., Kawanishi S. and Yamamoto K. (1999). Role of Iron and superoxide for generation of hydroxyl radical, oxidative DNA lesions, and mutagenesis in Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, **274** (49): 34832-34837.
- Ollat H. (2004). La neurotoxicité de l’alcool-Neuropsychiatrie. *Tendance et débat*, **24** : 25-29.
- Ogunlana O. E. and Ogunlana O. O. (2008). In vitro assessment of antioxidant activity of *Newbouldia laevis*. *Journal of Medicinal Plants Research*, **2** (8): 176-179.
- Ouellet C., Bilodeau A. et Cautin M. (2007). Stress oxydatif, tabagisme et CFTR. *Nouvelle magazine M/S*, **23** (1).
- Pastre J. (2005). *Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l’alimentation des carnivores domestiques*. L’Université Paul-Sabatier de Toulouse. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. p.27
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K. et Defraigne J-O. (2002). Nutrition et stress oxydant-mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, **16**: 233-239.
- Pons Rejraji H., Sinon B., Saez F., Brugnion F., Janny L. et Grizard G. (2009). Rôles des dérivés actifs de l’oxygène (DAO) sur les spermatozoïdes humains et infertilité masculine. *gynécologue obstétrique et fertilité*, **37**: 529-535.
- Rabelais F. (2005). Le stress oxydant. *Micronutrition-Mise au point en Médecine Générale*.
- Rahmani M. (2007). Méthodes d’évaluation de la stabilité oxydative des lipides. *Les Technologies de Laboratoire*, **2**: 18-21.
- Ré D. B., Nafia I., Nieoullon A., Le Goff L. K. and Had-Aissouni L. (2005). Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale. *Annales Françaises d’Anesthésie et de Réanimation*, **24** : 502-509.
- Ribéreau- Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris.

- Rock E. (2003). Stress oxydant, micronutriments et santé. *Université d'été de Nutrition* : 37-42.
- Roques J. (1835). *Phytographie médicale, histoire des substances héroïques et des poisons tirés du règne végétal*. Paris. Imprimerie de casimir, Rue de la vieille-Monnaie, N°12.
- Roussel A.-M. et Ferry M. (2002). Stress oxydant et vieillissement. *Nutrition clinique et métabolisme*, **16**: 285-291.
- Sahgal G., Ramanatha S., Sasidharan S., Mordi M. N., Ismail S. and Mansor S. M. (2009). In Vitro Antioxidant and Xanthine Oxidase Inhibitory Activities of Methanolic Swietenia mahagoni Seed Extracts. *Molecules*, **14**: 4476-4485.
- Salle B.-L., Delvin E. et Claris O. (2005). Vitamines liposolubles chez le nourrisson. *Archives de pédiatrie*, **12** : 1174–1179.
- Saraf S., Ashawat S. M. and Saraf S. (2007). Flavonoids: A nutritional protection against oxidative and UV induced cellular damages. *Pharmacognosy Reviews*, **1** (1).
- Schofield P., Mbugua D. M., Pell A. N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, **91**: 21-40.
- Sevrain S. (2004). Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : effets de l'âge et d'une supplémentation en omega-3. Université Claude Bernard. Lyon 1 pour l'obtention du diplôme de doctorat : 1-163.
- Seyoum A., Asres K., Kandeel F. (2006). Structure radical scavenging activity relationship of flavonoids. *Phytochemistry*, **67** : 2058-2070.
- Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hras A., R., Simonic M., Kenz Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Journal of Food Chemistry*. **89** : 191–198
- Talvera S., Felgines C., Terrier O., Besson C., Lamaison J. L., Remesy C. (2004). Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *Journal of Nutrition*, **134** : 2275-2279.
- Tamion F., Clabault K. et Bonmarchand G. (2003). Ischémie-perfusion mésentérique lors des états de choc: Principaux aspects physiopathologiques. **12** (6) : 441-448.
- Tsao R. and Deng Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*, **812**: 85-99.
- Valentao P., Fernandes E., Carvalilo P., Andrade P.B.H., Seabra R.M. et Bastos M.D.L. (2002). Antioxidant activity of hypericum androsaemum infusion : Scavenging activity against superoxyde radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid, **25** (10): 1320-1323.

- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M. et Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, **160**: 1-40.
- Wong C.-C., Li H.-B., Cheng K.-W. et Cheng F. (2006). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, **97**: 705-711.
- Wong P. Y. et Kitts D.D. (2006). Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of Parsley (*Petroselinum crispum*) and Cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chemistry*, **97**: 505-515.
- Yap C. F., Ho C.W., Wan Aida W. M., Chan S. W., Lee C. Y. and Leong Y. S. (2009). Optimization of extraction conditions of total phenolic compounds from star fruit (*Averrhoa carambola* L.) Residues. *Sains Malaysiana*, **38** (4): 511-520.
- Young I. S. and Woodside J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, **54**: 176-186.
- Zhao L. (2001). Gluthathione, ubiquitous thiol. Free radical and radiation biology graduate program : Department of radiology. B-180 ML. The University of Iowa. Iowa city, IA 52242 -1181 : 1-6.
- Zimmer N. et Cordesse R. (1996). Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA productions animales*, **9** (3): 167-179.

Sites web:

(1): <http://4.bp.blogspot.com>

(2): <http://www.naturelmedicinalherbs.net/herbs/t/thapsia-garganica=drias-plant.php>

(3): <http://www.gardenbreizh.org/photos/parochetus/photo-59209.html>.

(4): <http://gardenbreizh.org/photos/karlostachys/photo-355539.html>.

Annexes

Annexes

Annexes N° 1 : Courbes d'étalonnage utilisées pour le calcul des teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés .

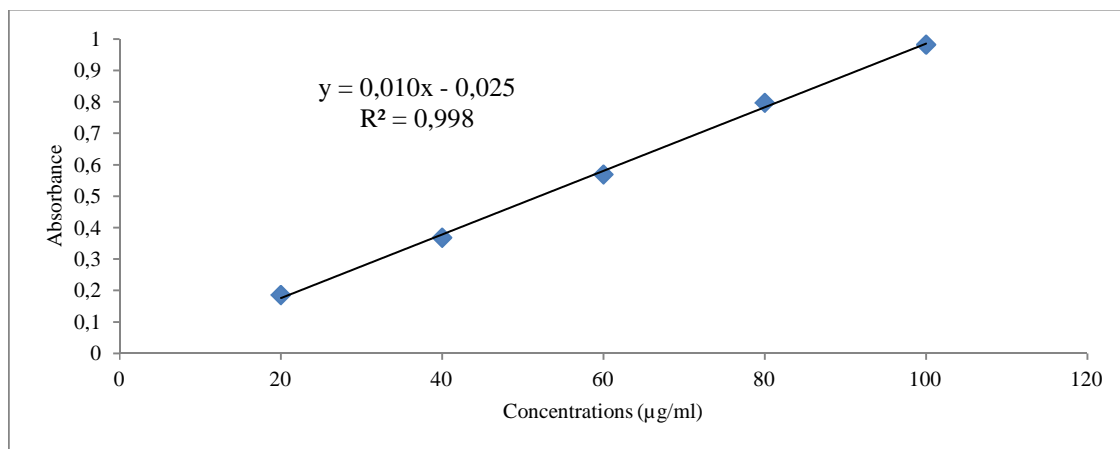


Figure 01 : Courbe d'étalonnage avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux ($\lambda = 765\text{nm}$).

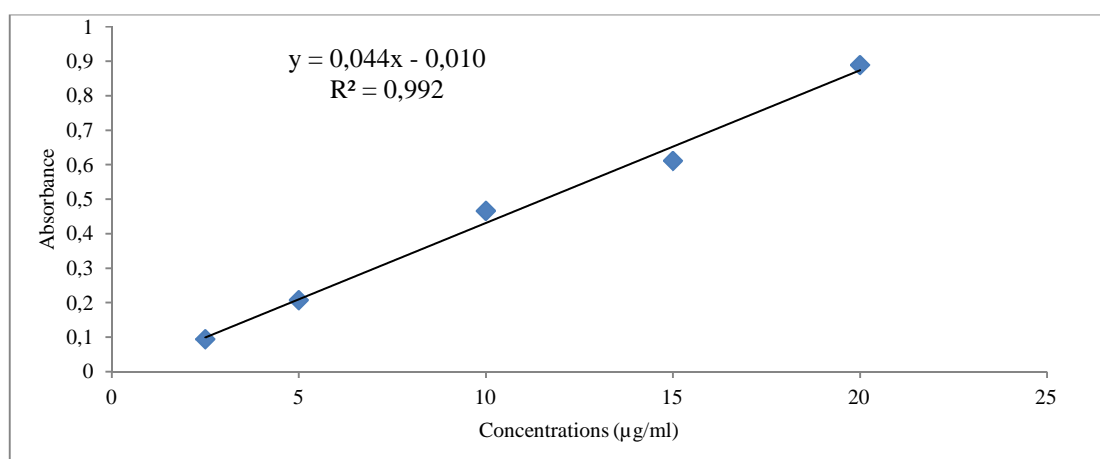


Figure 02 : Courbe d'étalonnage avec la quercitine pour le dosage des flavonoïdes ($\lambda = 430\text{ nm}$).

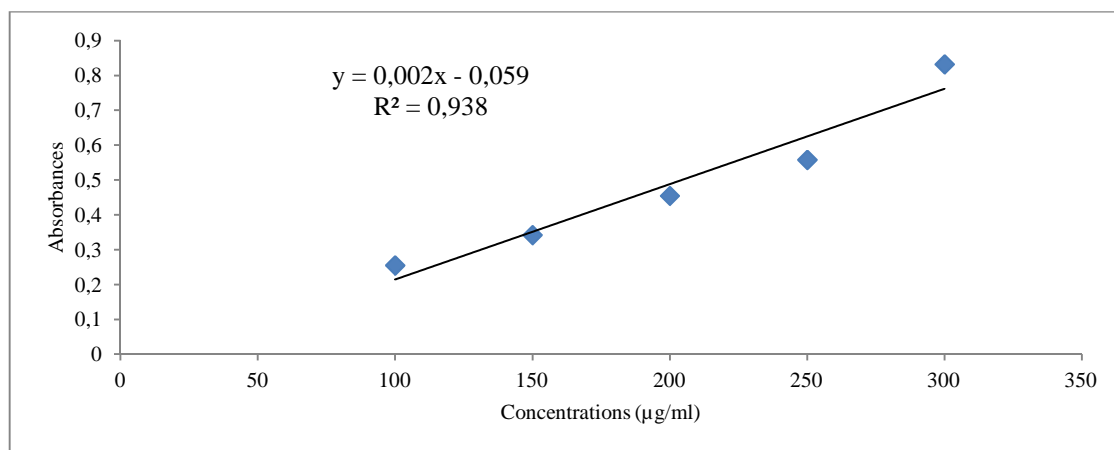


Figure 03 : Courbe d'étalonnage avec la catéchine pour les proanthocyanidines ($\lambda = 500\text{ nm}$).

Annexes N°2 : Courbes de calcul de l'IC50 dans l'activité scavenging du radical DPPH

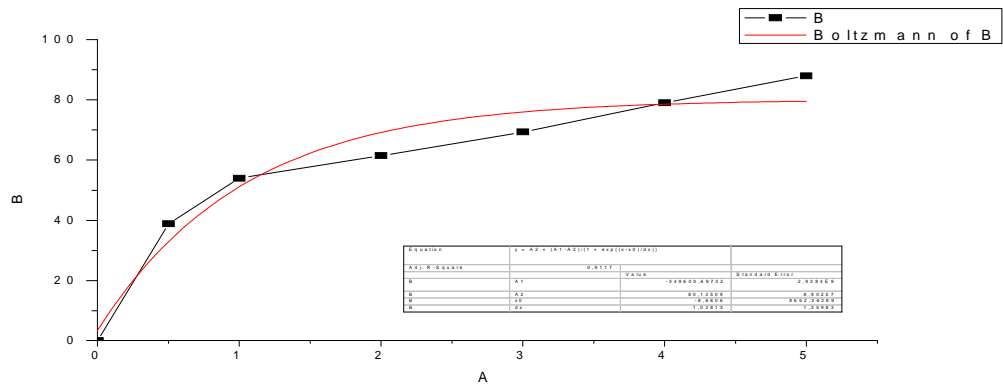


Figure 04: courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de la BHA.

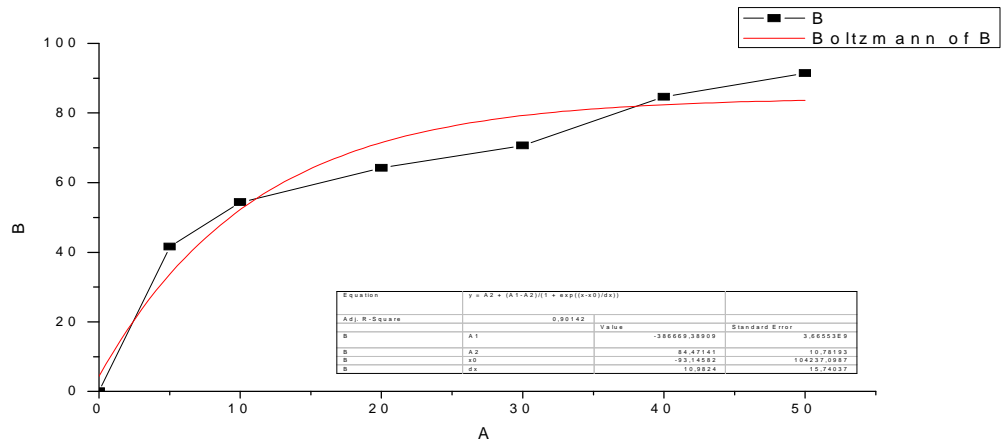


Figure 05 : courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'extrait éthanolique des feuilles de Thapsia garganica.

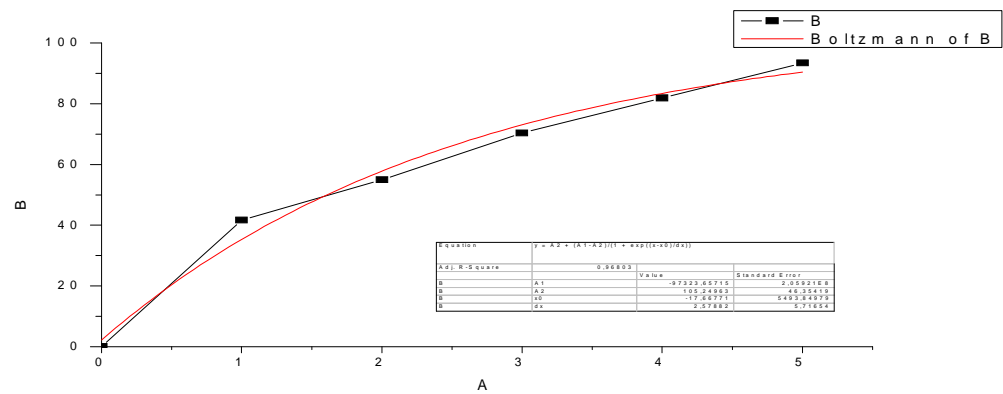


Figure 06 : courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'acide ascorbique dans l'activité scavenging du DPPH.

Annexes N°3 : Courbes de corrélation de l'activité antioxydant avec les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés :

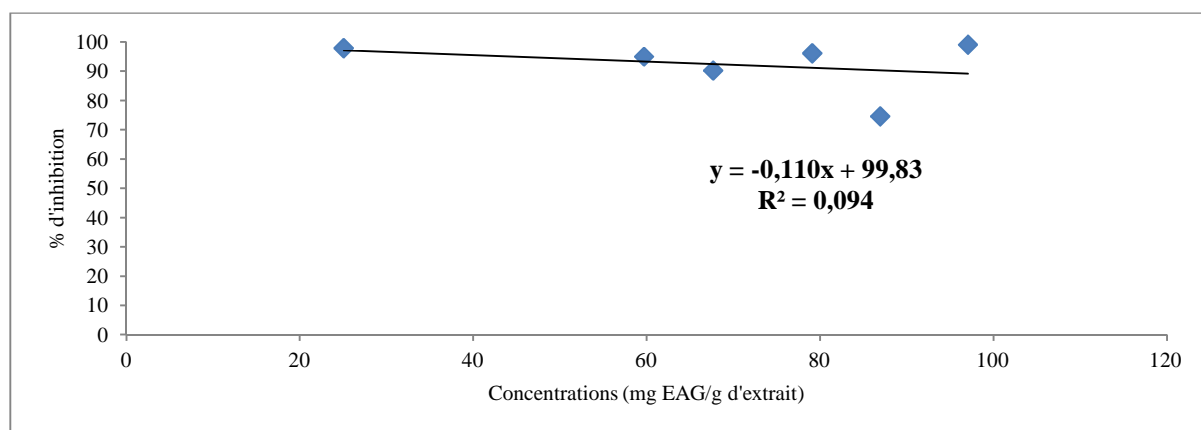


Figure 07: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en phénols totaux des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica*.

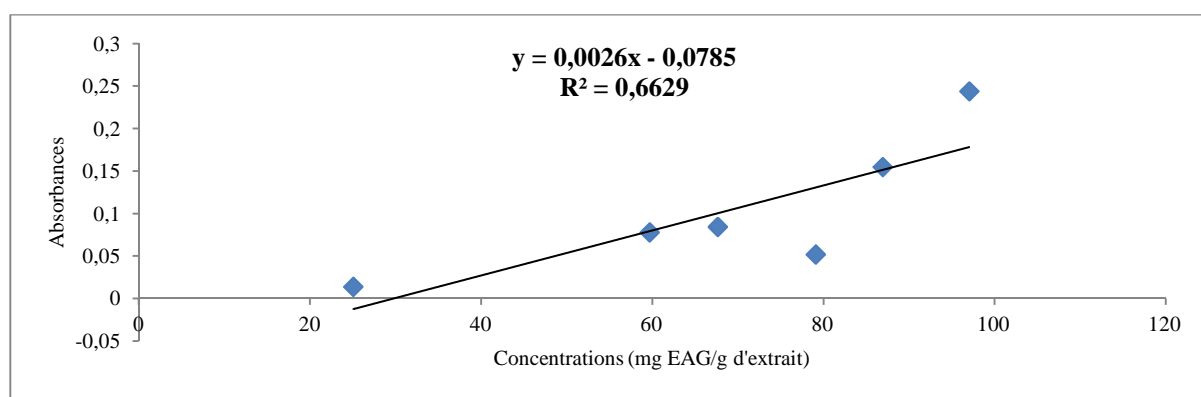


Figure 08: Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en phénols totaux des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica*.

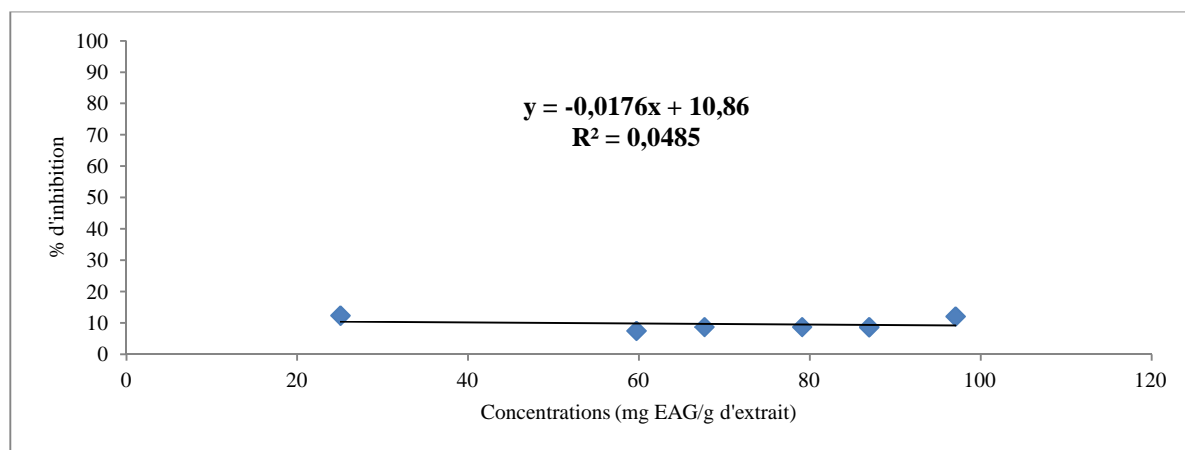


Figure 09: Courbe de corrélation entre la chélation du fer et la teneur en phénols totaux des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica*.

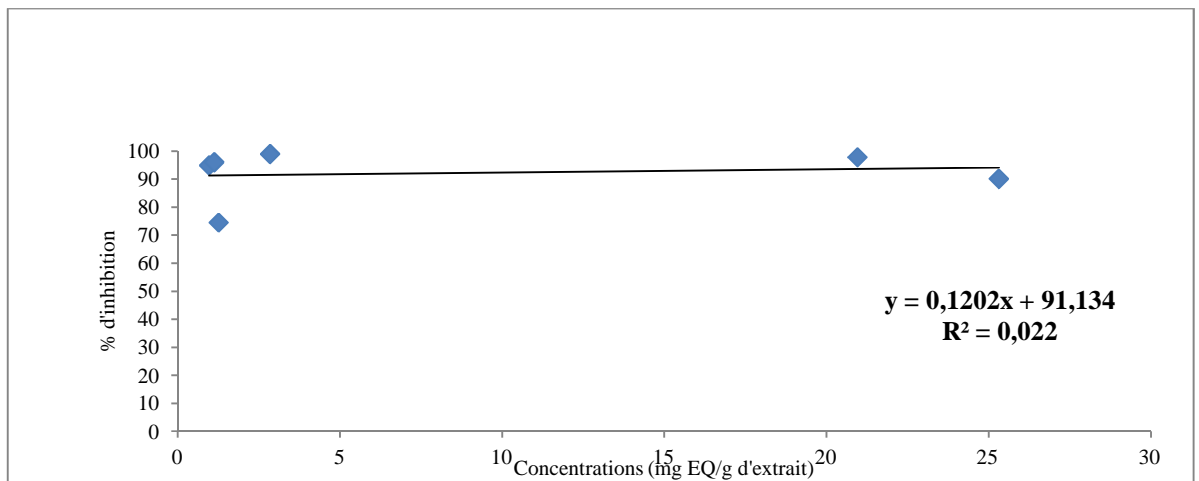


Figure10: courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en flavonoïdes des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica*.

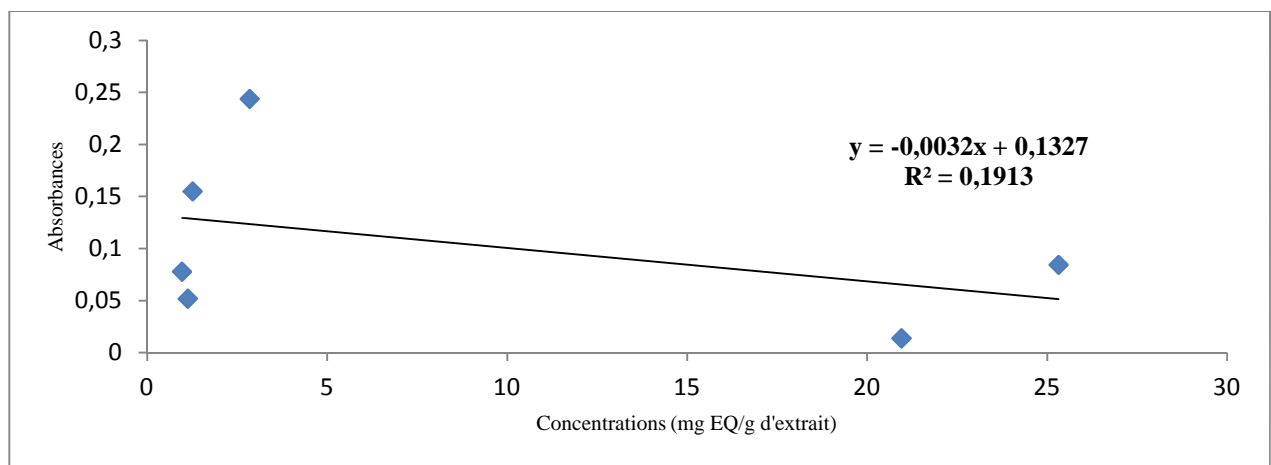


Figure 11: Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en flavonoïdes des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica*.

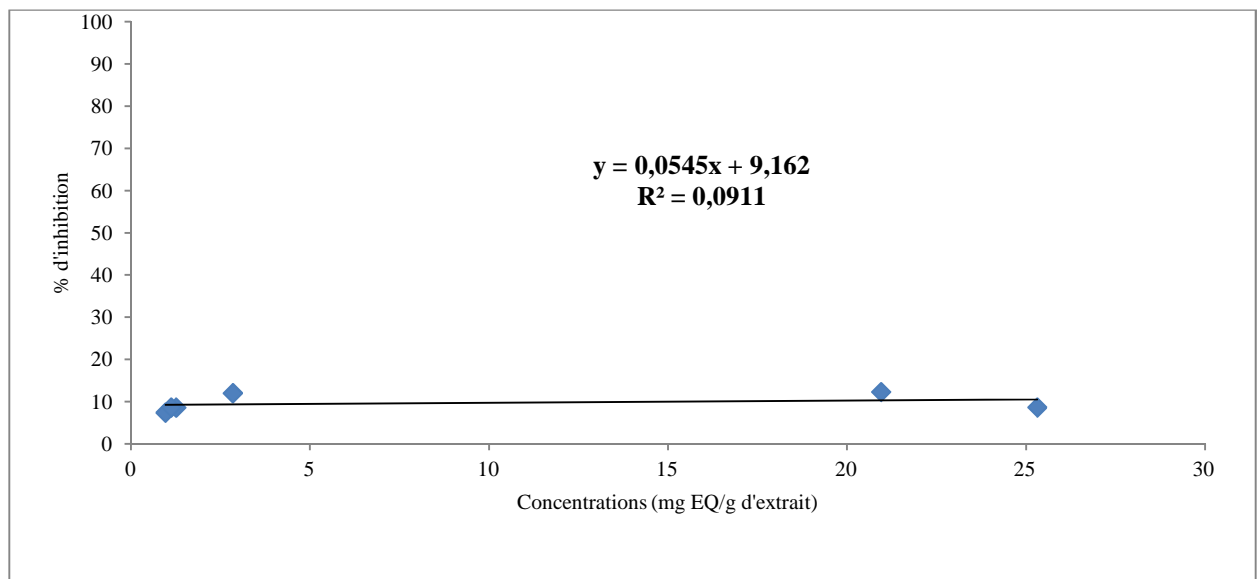


Figure 12: Courbe de corrélation entre la chélation du fer et la teneur en phénols totaux des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica*.

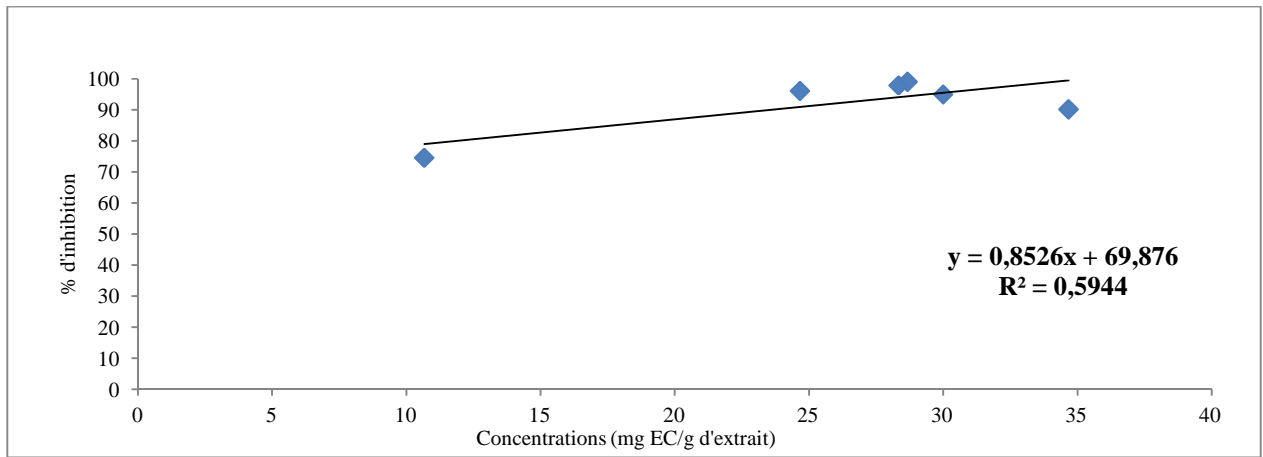


Figure 13: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en proanthocyanidines des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica*.

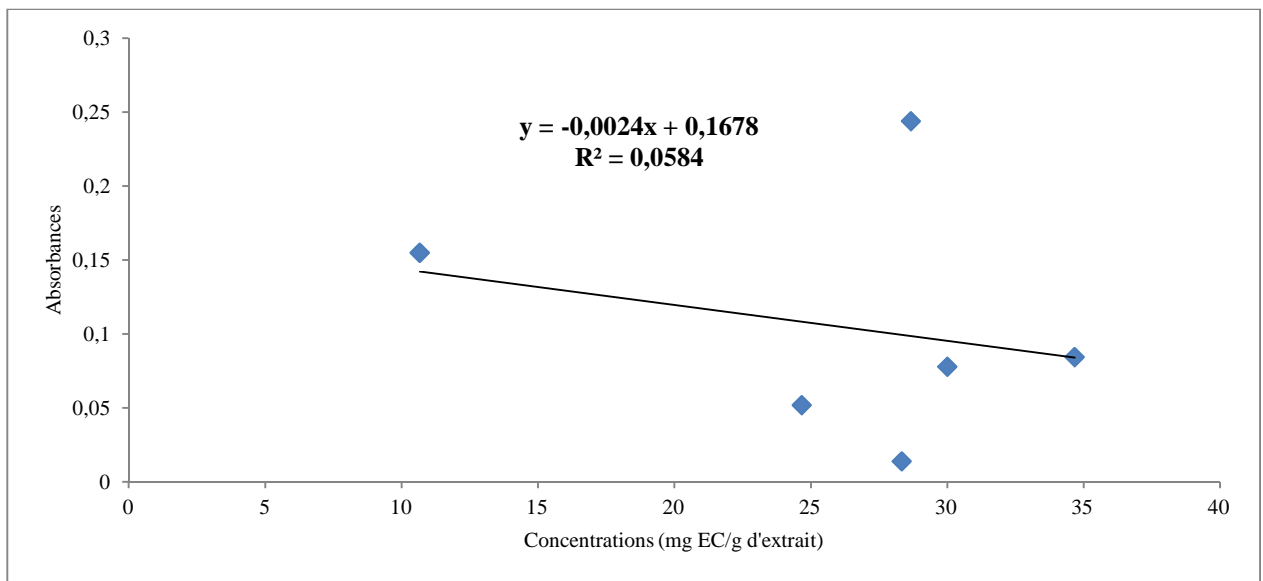


Figure 14: Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en proanthocyanidines des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica*.

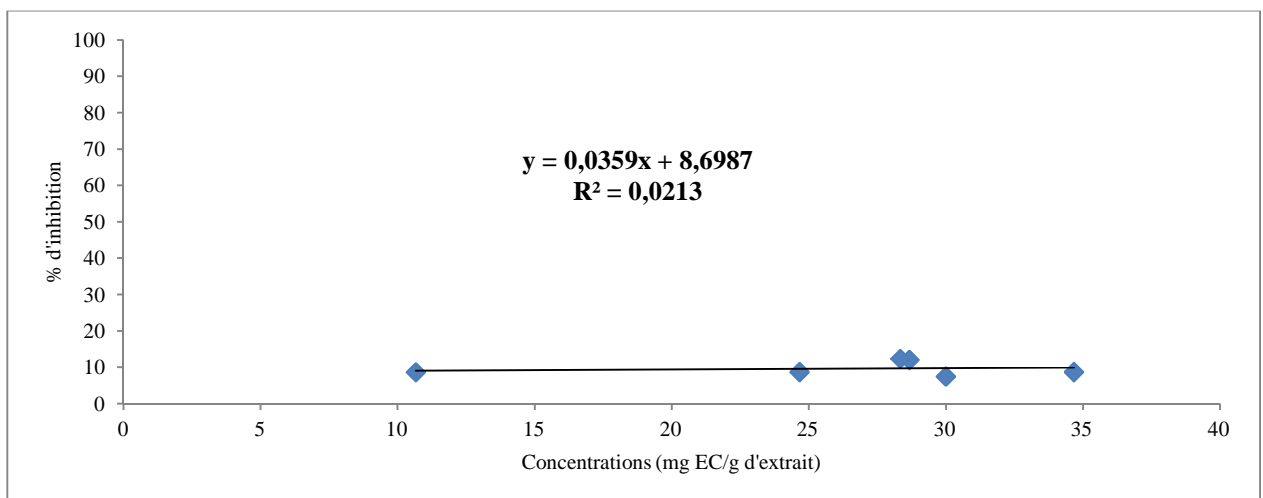


Figure 15: Courbe de corrélation entre la chélation du fer et la teneur en proanthocyanidines des extraits des feuilles et des racines de *Thapsia garganica*.

Résumé

Les antioxydants jouent un rôle fondamental dans l'élimination de l'excès toxique en espèces réactives de l'oxygène à l'origine de diverses maladies dégénératives. Ainsi, l'exploitation des molécules végétales naturelles serait très bénéfique pour la santé humaine. Par conséquent, on s'est intéressé à l'évaluation de l'activité anti-oxydante des composés phénoliques extraits à partir d'une plante médicinale locale, *Thapsia garganica*, et cela en faisant deux types de manipulations, après, bien évidemment, avoir obtenu les différents extraits des feuilles et des racines de notre plante. D'abord, on a effectué le dosage des composés phénoliques (phénol totaux, flavonoïdes, et tanins condensés) pour pouvoir faire une appréciation qualitative et quantitative ; puis, on est passé à la mesure de l'activité anti-oxydante des extraits en réalisant trois tests : l'activité scavenging du radical DPPH, le pouvoir réducteur et l'activité chélatrice du fer. Les résultats expérimentaux ont révélé que les extraits de *Thapsia garganica* ont été riches en phénols totaux, ont montré des concentrations modérée en flavonoïdes et ils ont exhibé des teneurs appréciables en tanins condensés. Quant aux activités antioxydantes de la plante, les extraits ont été de très bons scavengers du radical DPPH (l'IC₅₀ de l'extrait éthanolique des feuilles a été de 9.24µg/ml). En revanche, l'activité chélatrice du fer et le pouvoir réducteur ont été faibles. Ces constatations nous laissent imaginer des études plus poussées sur des extraits d'une panoplie de plantes médicinales afin d'en bénéficier d'avantage.

Abstract

The antioxidants play a basic role in the elimination of the toxic reactive oxygen species excess. Thus, the exploitation of natural plant molecules will be very beneficial for the human health. Therefore, we were interested by the evaluation of the anti-oxidant activity of the phenolic compounds extracted from our local medicinal plant, *Thapsia garganica*, and that by doing two types of manipulations, of course, after getting the different plant leaves and roots extracts. First, we quantified the phenolic compounds amounts (total phenolics, flavonoids, and condensed tannins), in order to make a qualitative and a quantitative assessment. Then, we realized the anti-oxidant activity assays such as: the DPPH radical scavenging activity, the reducing power and the iron chelating activity. The experimental results revealed that *Thapsia garganica* extracts were rich in total phenolics, showed moderate levels of flavonoids and they exhibited significant levels of condensed tannins. As for the antioxidant activities of the plant, the extracts were very good scavengers of radical DPPH (the IC₅₀ of the leaves ethanolic extract was 9.24µg/ml). Whereas, the iron chelating activity and the reducing power were low. These observations lead us toward more studies in this field, so that we get more benefits from our local medicinal plants.