

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biologie Physico-chimique**  
**Filière : Sciences Biologiques**  
**Option : Pharmacologie moléculaire**



**Réf :.....**

**Mémoire de Fin de Cycle**  
**En vue de l'obtention du diplôme**

## **MASTER**

### *Thème*

**Etude phytochimique d'*Urospermum dalechampii* et leur activité enzymatique et antioxydante.**

Présenté par :

**TACHAOUFT Nawal & TAIBI Lydia**

Soutenu le : **22 Juin 2017**

Devant le jury composé de :

M <sup>r</sup> TACHERFIOUT M.	M.A.A	Président
M <sup>me</sup> ABDERRAHIM S.	M.A.A	promotrice
M <sup>elle</sup> CHAHER N.	M.C.B	Examinatrice
M <sup>elle</sup> MEZAHM T.	M.A.B	Invitée

**Année universitaire : 2016 / 2017**



## *Remerciements*

*Au terme de notre travail, en premier lieu, nous tenons à remercier le bon Dieu, le tout puissant de nous avoir donné la volonté, la patience et le courage pour réaliser ce travail ;*

*Nos profonds remerciements s'adressent à notre promotrice, M<sup>me</sup> ABDERRAHIM. S, qui a accepté de nous encadrer, pour sa collaboration et son aide nécessaire à la réalisation de ce travail.*

*Nous remercions également notre Co-promotrice, M<sup>elle</sup> MEZAHAM.T, pour sa disponibilité, son orientation et son aide précieuse tout au long de ce travail ;*

*Nous remercions également :*

*A M<sup>elle</sup> CHAHER. N de nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail ;*

*A M<sup>r</sup> TACHERFIOUT. M, de nous avoir consacré de son temps en nous faisant l'honneur de présider le jury et d'évaluer notre travail ;*

*Enfin, nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*



## *Dédicace*

*J'ai le plaisir de dédier ce travail :*

*A mes chers parents, qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur*

*soutient tout au long de mes études*

*A ma petite adorable sœur Wenza*

*A ma chère sœur Kahina, son mari et sa fille Imane, a qui je souhaite*

*tout le bonheur de monde*

*A ma chère sœur Fouzia et son mari*

*A mes deux frères Lamine et Farid*

*J'adresse aussi mes dédicaces à mes amis avec les quelles j'ai passé*

*des moments agréables*

*A tous mes cousins et cousines*

*A ma chère binôme Lydia.*

**NAWAL**



## *Dédicace*

*J'ai le plaisir de dédier ce travail :*

*A mes chers parents, qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur  
soutien tout au long de mes études*

*A ma chère sœur Kahina, son mari et sa fille Ikram, à qui je souhaite  
tout le bonheur de monde*

*A ma sœur Nadjat*

*A mes deux frères Idir et Yanis*

*J'adresse aussi mes dédicaces à mes amis avec les quelles j'ai passé  
des moments agréables*

*A tous mes cousins et cousines*

*A ma binôme Nawal.*

LYDIA

**AlCl<sub>3</sub>** : Chlorure d'aluminium.

**BHA** : Butyl-Hydroxy-Anisol.

**CAT** : Activité antioxydante totale.

**DOPA** : 3,4-dihydroxyphénylalanine.

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

**EAG** : Equivalent en acide gallique.

**EAA** : Equivalent en acide ascorbique.

**EAT** : Equivalent en acide tannique.

**EQ** : Equivalent en quercétine.

**ERO** : Espèce réactive de l'oxygène.

**Fe<sup>2+</sup>** : Fer ferreux.

**Fe<sup>3+</sup>** : Fer ferrique.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène.

**IC<sub>50</sub>** : Concentration Inhibitrice à 50%.

**K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub>** : Ferricyanure de potassium.

**Mo** : Molybdène.

**MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>** : Ions molybdate.

**Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>** : Carbonate de Sodium.

**NO** : Monoxyde d'azote.

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Radicale superoxyde.

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** : Oxygène singulet.

**OH<sup>-</sup>** : Radicale hydroxyle.

**PPO** : Polyphénols oxydase.

**SOD** : Superoxyde dismutase.

**TCA** : Acide trichloracétique.



Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> <i>Urospermum dalechampii</i> .....	3
<b>Figure 2 :</b> Photographie d' <i>Urospermum dalechampii</i> . Dans son site de récolte.....	3
<b>Figure 3 :</b> Répartition géographique d' <i>Urospermum dalechampii</i> .....	4
<b>Figure 4 :</b> Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydante .....	10
<b>Figure 5 :</b> Le schéma réactionnel de l'activité de la tyrosinase .....	12
<b>Figure 6 :</b> Le processus réactionnel de la synthèse de la mélanine.....	13
<b>Figure 7 :</b> Structure de la tyrosinase.....	14
<b>Figure 8 :</b> Cycles catalytiques de l'hydroxylation du monophénol et oxydation de l'o-diphénol à l'o-quinone par la tyrosinase .....	15
<b>Figure 9 :</b> Localisation géographique de la station de récolte d' <i>Urospermum dalechampii</i> ..	17
<b>Figure 10 :</b> Réduction du radical DPPH.....	21
<b>Figure 11 :</b> Champignon de paris <i>Agaricus bisporus</i> .....	22
<b>Figure 12 :</b> Rendements des extraits bruts d' <i>Urospermum dalechampii</i> .....	26
<b>Figure 13 :</b> Teneur en polyphénols totaux dans les différents extraits bruts des racines, des feuilles, des tiges et des fleurs d' <i>U. dalechampii</i> .....	27
<b>Figure 14 :</b> Teneur en flavonoïdes totaux contenant dans les différentes parties d' <i>U. dalechampii</i> .....	29
<b>Figure 15 :</b> Teneurs en tannins condensés des extraits bruts d' <i>U. dalechampii</i> .....	30
<b>Figure 16 :</b> Capacité antioxydante totale, exprimée en mg EAA/g MS, des extraits bruts des différentes parties d' <i>U. dalechampii</i> .....	31
<b>Figure 17 :</b> Pouvoir réducteur du fer des extraits bruts.....	32
<b>Figure 18 :</b> Valeurs des IC50 du DPPH obtenues avec les extraits bruts d' <i>U. dalechampii</i> ...	33
<b>Figure 19 :</b> Relation entre la capacité antioxydante totale et les teneurs en phénols totaux (A) flavonoïdes (B) et les tannins (C) d' <i>U.dalechampii</i> .....	35
<b>Figure 20 :</b> Relation entre la capacité antioxydante anti- radical DPPH et les teneurs en phénols totaux (A) flavonoïdes (B) et les tannins (C) d' <i>U.dalechampii</i> .....	36

<b>Figure 21</b> : Relation entre la capacité antioxydante de la réduction de fer et les teneurs en phénols totaux (A) flavonoïdes (B) et les tannins condensés d' <i>U.dalechampii</i> .....	37
<b>Figure 22</b> : Variation l'absorbance à 475 nm en fonction du temps de l'activité enzymatique de la tyrosinase durant la réaction d'oxydation de L- tyrosine (3 mM) par 100µl/ml d'extrait brut de champignon de Paris à pH 7 en présence de tampon phosphate, éthanol, méthanol et acétone.....	38
<b>Figure 23</b> : Evaluation de l'activité enzymatique de la tyrosinase par les différents extraits des différentes parties d' <i>U. dalechampii</i> a la concentration 1mg/ml en fonction du temps avec le L- tyrosine (3 mM) par 100µl/ml d'extrait enzymatique du champignon de Paris à pH 7 en présence de tampon phosphate (0.05mM) (A) : Fleur; (B) : Feuille ; (C) : Tige ; (D) : Racine .....	41
<b>Figure 24</b> : Représentation des IC50 de l'activité inhibitrice de la tyrosinase par les extraits par les extraits aqueux de feuille, fleur et tige et méthanolique de tige d' <i>Urospermum dalechampii</i> .....	42
<b>Figure 25</b> : Les corrélations entre les composées phénoliques (A : polyphénole ; B : flavonoïdes ; C : tannins et les IC50 de l'activité inhibitrice de la tyrosinase par les extraits d' <i>Urospermum dalechampii</i> .....	43
<b>Figure 26</b> : Corrélation entre l'activité inhibitrice de la tyrosinase (AIT) et l'activité antioxydant d' <i>Urospermum dalechampii</i> .....	44
<b>Figure 27</b> : Principaux éléments de l'activité antioxydant et antityrosinase des flavonoïdes	45



*Liste des tableaux*

<b>Tableau I</b> : Principales classes de composés phénoliques .....	7
<b>Tableau II</b> : Les principales sources des radicaux libres .....	8
<b>Tableau III</b> : Les principales classes d'antioxydants.....	11
<b>Tableau IV</b> : Les principaux effecteurs de la tyrosinase.....	16
<b>Tableau V</b> : Rendements des extraits bruts d' <i>Urospermum dalechampii</i> .....	25
<b>Tableau VI</b> : Effet des extraits bruts des différentes parties d' <i>U.dalechampii</i> sur l'activité tyrosinase de champignon de Paris .....	40

# Sommaire

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction** ..... 1

## **Chapitre I : Synthèse bibliographique**

I.1. Etymologie ..... 3

I.2. Description botanique ..... 3

I.3. Répartition géographique ..... 4

I.4. Classification systématique ..... 4

I.5. Composition chimique ..... 5

I.6. Effets thérapeutiques ..... 5

I.2. Polyphénols ..... 5

I.2.1. Biosynthèse des polyphénols ..... 6

I.2.1.1. La voie des phénylpropanoïdes ..... 6

I.2.1.2. La voie de biosynthèse des flavonoïdes ..... 6

I.2.1.3. La voie de Shikimate ..... 6

I.2.2. Classes des polyphénols ..... 6

I.2.3. Rôles biologiques des polyphénols ..... 7

I.3. Stress oxydatif ..... 8

I.3.1. Radicaux libres ..... 8

I.3.2. Sources des radicaux libres ..... 8

I.3.3. Espèces réactives de l'oxygène ..... 8

I.3.4. Conséquences du stress oxydant ..... 9

I.3.5. Les antioxydants ..... 9

I.3.6. Classification des antioxydants .....	10
I.4. Tyrosinase .....	11
I.4.1. Généralités sur la tyrosinase .....	11
I.4.2. Classification et nomenclature .....	12
I.4.3. Rôles de la tyrosinase.....	12
I.4.4. Structure moléculaire et site actif de la tyrosinase.....	13
I.4.5. Mécanisme réactionnel de la tyrosinase.....	14
I.4.6. Les effecteurs de la tyrosinase .....	15

## **Chapitre II : Matériel et méthodes**

II. Matériel et méthodes .....	17
II.1. Récolte du matériel végétal .....	17
II.2. Extraction et dosage des composés phénoliques .....	17
II.2.1. Dosage des phénols totaux .....	18
II.2.2. Dosage des flavonoïdes .....	19
II.2.3. Dosage des tannins condensés .....	19
II.3. Evaluation des activités biologiques des extraits d' <i>Urospermum dalechampii</i> .....	20
II.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante .....	20
II.3.1.1. Activité réductrice du molybdate .....	20
II.3.1.2. Pouvoir réducteur du fer .....	20
II.3.1.3. Activité « scavenger » du radical DPPH .....	21
II.3.2. Evaluation de l'activité de la tyrosinase vis-à-vis des extraits d' <i>U. dalechampii</i> .....	22
II.3.2.1. Matériel végétal .....	22
II.3.2.2. Préparation de l'extrait enzymatique brut.....	22
II.3.2.3. Mesure de l'activité de la tyrosinase .....	23
II.4. Etude statistique.....	24

## **Chapitre III : Résultats et discussion**

III. Résultats et discussion.....	25
III.1. Taux d'extraction .....	25
III.2. Détermination de la teneur en composés phénoliques .....	26
III.2.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux.....	26
III.2.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux.....	28
III.2.3. Détermination de la teneur en tannins condensés .....	29
III.3. Etude des activités biologiques d' <i>Urospermum dalechampii</i> .....	31
III.3.1. Evaluation du potentiel antioxydant des extraits.....	31
III.3.1.1. Activité réductrice du molybdate .....	31
III.3.1.2. Réduction de fer .....	32
III.3.1.3. Activité « scavenger » du radical DPPH.....	33
III.3.2. Analyse de corrélations entre les polyphénols et les activités antioxydantes .....	34
III.3.2.1. Corrélations entre les teneurs en polyphénols et l'activité antioxydante totale .....	34
III.3.2.2. Corrélations entre les teneurs en polyphénols et l'activité scavenger du radical DPPH.....	35
III.3.2.3. Corrélations entre les teneurs en polyphénols et l'activité réductrice du fer .....	36
III.4. Activité antityrosinase.....	38
III.4.1. Activité tyrosinase du champignon de Paris .....	38
III.4.2. Effet des extraits bruts sur l'activité de la tyrosinase.....	39
III.4.3. Efficacité inhibitrice de la tyrosinase par les extraits d' <i>Urospermum dalechampii</i> .....	41
III.4.4. Analyse de corrélation entre les teneurs en polyphénols et l'activité antityrosinase ...	43
III.4.5. Analyse de corrélation entre l'activité antityrosinase et l'activité antioxydante d' <i>Urospermum dalechampii</i> .....	44
<b>Conclusion</b> .....	<b>46</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>48</b>

**Annexes**

**Glossaire**

# *Introduction*

*Urospermum dalechampii* est une plante méditerranéenne largement utilisée en médecine traditionnelle pour ses propriétés biologiques attribuées essentiellement aux polyphénols.

L'organisme produit quotidiennement des radicaux libres, composés très réactifs comportant un électron célibataire et nécessaire à des mécanismes vitaux. La surproduction des radicaux libres peut être néfaste pour l'organisme (**Hadi, 2004**), cette dernière est la principale cause de plusieurs maladies : cancer, diabète, maladies cardiovasculaires, maladies d'Alzheimer et vieillissement accéléré (**Favier, 2003**).

Pour échapper aux conséquences du stress oxydatif, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant /antioxydant, afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme. Les antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études, car en plus d'un intérêt certain dans la conservation de denrées comestibles, ils pourraient s'avérer utiles dans le traitement des maladies dans les quels le stress oxydant est incriminé (**Kumar et., 2012**).

La tyrosinase est une enzyme qui catalyse l'oxydation des phénols en o-quinones, elle est très répandue parmi les plantes, les animaux et les mycètes. L'hyperactivité de la tyrosinase conduit chez l'Homme à une hyperpigmentation qui cause des problèmes esthétiques, telles que l'éphélide ou taches de rousseur, les lentigos, mélasma et le choasma (**Breime, 2005**). Inversement l'inactivation de cette enzyme conduit à la maladie d'albinisme (**Manyatja, 2012**). Chez les végétaux, l'activité de la tyrosinase associée à un brunissement enzymatique indésirable conduit à des conséquences préjudiciables à la qualité organoleptique de l'aliment en entraînant des modifications de l'apparence, de la flaveur, la texture et de la qualité nutritionnelle.

Le contrôle de l'activité de cette enzyme est donc important ; chez l'Homme, pour le traitement des hypo pigmentations et hyperpigmentations. Alors que chez les végétaux, il est important pour éviter le brunissement enzymatique des légumes et des fruits. Pour cela, des inhibiteurs et des activateurs de synthèse de cette enzyme, ont été employés dans ce sens, soit comme agents de dépigmentations ou pigmentation pour le traitement ou la prévention des désordres de pigmentation (**Oualid, 2011**) ou bien comme agents conservateurs des aliments et des boissons d'origine végétale, (**Issa, 2009**).

Les inhibiteurs de la tyrosinase sont donc une préoccupation majeure aussi dans les industries alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques. Le fait que les inhibiteurs et les

activateurs de synthèse présentent des effets néfastes aussi bien sur la qualité nutritionnelle des produits alimentaires que sur la santé humaine, des travaux scientifiques se sont tournés vers la recherche de nouvelles molécules inhibitrices ou activatrices de l'activité tyrosinase, n'ayant pas d'effets indésirables et de préférence d'origine naturelle.

C'est dans cet axe que s'insère l'objectif de la thématique de recherche développée au sein du laboratoire qui consiste à rechercher à partir des plantes connues comme source importante de molécules bioactives souvent exemptes d'effets secondaires (**Akombi, 2005**), de nouvelles molécules à effet inhibiteur ou activateur de l'activité tyrosinase. Le travail présenté ici est l'aspect préliminaire de cette thématique. Il consiste à tester l'activité tyrosinase et antioxydante des différentes parties de la plante *Urospermum dalechampii* cultivée dans la région de Bejaia.

Pour répondre à l'objectif du travail ci-présent, la méthodologie suivie et réalisée a consisté en :

- ✓ Une extraction à différents solvants organiques à partir des différents organes de l'espèce végétale sélectionnée suivie par une quantification des polyphénols (phénols totaux, flavonoïdes et tannins) dans ces extraits ;
- ✓ L'évaluation de l'activité antioxydante et tyrosinase de ces extraits ;
- ✓ Une analyse corrélative entre l'activité antioxydante et les taux en polyphénols.



*Synthèse*  
*bibliographique*

## I.1. Etymologie

Le nom *Urospermum dalechampii* provient du mot grec « ouro » qui signifie une queue et « sperma » la semence, une graine. Dalchampii vient du nom d'un botaniste français, Jacques d'Alchamps (**Beloued, 1998**). En Méditerranée, le genre *Urospermum* est représenté uniquement par deux espèces : *Urospermum dalechampii* et *Urospermum picroides*.

Selon (**Mauric, 2000**) les noms vernaculaires d'*Urospermum dalechampii* sont :

**Français** : *Urosperme de Daléchamps*, chicorée amère.

**Anglais** : Golden-fleece.

**Arabe** : Belrhem, Ras el hanach.

## I.2. Description botanique

*Urospermum dalechampii* est une plante vivace, dressée de 40cm de hauteur, velue à tige isolée. Les feuilles basales, disposées autour de la tige, sont découpées, tandis que les supérieures sont entières. Ses fleurs sont de couleur jaune pâle à sommet finement denté et à contour pourpré. Les fruits (akènes) sont noirs, spatulés à bec, surmontés d'une aigrette de soies pulmeuses d'un blanc rougeâtre. Floraison abondante pendant tout le printemps (**Bayer et al., 1990**).



**Figure 1** : *Urospermum dalechampii* (Aeschmann et al., 2004).



**Figure 2** : Photographie d'*U. dalechampii* dans son site de récolte.

### I.3. Répartition géographique

*Urospermum dalechampii* a une distribution Méditerranéenne, de l'Espagne à la Croatie, et en Afrique de nord. En Algérie, elle est commune dans le Tell. Elle pousse sur le bord des chemins, les prairies sèches et les terres incultes (Aeschimann et al., 2004).



Figure 3 : Répartition géographique d'*Urospermum dalechampii* (Aeschimann et al., 2004).

### I.4. Classification systématique

Selon (Bayer et al., 1990) la classification d'*Urospermum dalechampii* est la suivante

**Règne :** *plantae*.

**Sous règne :** *Tracheobionta*.

**Division :** *Magnoliophyta*.

**Classe :** *Magnoliopsida*.

**Sous classe :** *Asteridae*.

**Ordre :** *Asterales*.

**Famille :** *Asteracea*.

**Genre :** *Urospermum*.

**Espèce :** *Urospermum dalechampii*.

## I.5. Composition chimique

Selon (Giner et al., 1993), la plante *urospermum dalechampii* montre sa richesse en :

- ✓ Composés phénoliques (Acide chlorogénique, Acide isochlorogénique, Acide dicafféoylquinique, Acide isoferulique).
- ✓ Flavonoïdes (flavonoïdes naringénine, aromadendrine et dihydroflavonol 3-O-méthyltaxifolin et La quercétine aglycone, quercétin-3-O-glucoside, quercétin-3-O-galactoside).
- ✓ Alcaloïdes indoliques.
- ✓ Mucilage.
- ✓ Les huiles essentielles (Urospermal A, 11 $\beta$ , 13-dihydrourospermal A, Urospermal A 15-O-glucoside 6'-p-dihydroxyphenylacetate).

## I.6. Effets thérapeutiques

De nombreuses études ont montré que les espèces de genre *Urospermum* sont riches en flavonoïdes et plus particulièrement en quercétine aglycone qui leur confère de nombreuses propriétés thérapeutiques (Ramdani et al., 2014). Parmi ces propriétés thérapeutiques : l'activité anti-inflammatoire (quercétine), antiulcérogène (protection de la muqueuse gastrique contre les agents ulcérogènes), anti hypertensive potentielle (Flavonoïdes), anti hépatotoxique (traitement des affections hépatiques), antiallergique (inhibition de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles), antimicrobienne (surtout l'huile essentielle) et antivirale (Ghedira, 2005 ; Kebieche, 2009). L'effet antioxydant et anti radicalaire leur permet de prévenir toutes les maladies associées au stress oxydatif (les maladies cardiovasculaires, cancers, diabète...) (Lacaille-Dubois et al., 1996).

## I.2. Polyphénols

Les polyphénols sont les métabolites secondaires, les plus communs et les plus répandus dans le règne végétal (Garon et al., 2014). Cette appellation regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins d'un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle et al., 2004).

## **I.2.1. Biosynthèse des polyphénols**

### **I.2.1.1. La voie de Shikimate**

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde.

### **I.2.1.2. La voie des phénylpropanoïdes**

La voie de phénylpropanoïde commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose.

### **I.2.1.3. La voie de biosynthèse des flavonoïdes**

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, possèdent le même élément structural de base. L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation, catalysée par la chalcone synthase, d'une unité phényle propanoïde avec trois unités malonyl-CoA. Cette chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la synthèse des divers flavonoïdes (**Bechami et al., 2016**)

## **I.2.2. Classes des polyphénols**

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes (**tableau D**) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C<sub>6</sub> à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxydation, de méthylation...) (**Sarni-Manchado et al., 2006**).

**Tableau I :** Principales classes de composés phénoliques (Sarni-Manchado *et al.*, 2006).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemples)
C <sub>6</sub>	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -hydroxybenzoïque	Épices, fraise
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acide caféique Scopolétine	Pomme de terre, pomme, Citrus
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétine, cyanidine Daidzéine	Fruits, légumes, fleurs soja, pois
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignines		Bois, fruits à noyau
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Tanins condensés		Raisin, kaki

### I.2.3. Rôles biologiques des polyphénols

Des travaux plus anciens (Nitsch et Nitsch, 1961; Alibert *et al.*, 1977) ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation. Les polyphénols sont aussi connus pour leur effet protecteur contre le rayonnement UV, l'effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs et pour ces propriétés antifongique et antibactérienne. Ils interviennent dans la qualité alimentaire des fruits en déterminant la saveur, nous citons : les flavanones sont responsables de l'amertume des *Cistus* et peuvent donner naissance par transformation chimique à des dihydrochalcones à saveur sucrée, les anthocyanes, composés de couleur rouge à violet, participent à la coloration des fruits mûrs et les tannins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs (Belyagoubi-Benhammo, 2011).

La structure spécifique des polyphénols leur confère des propriétés antioxydantes importantes qui permettent de contrer des effets des radicaux libres, de lutter contre les inflammations, les maladies cardiovasculaires et le cancer (Garon *et al.*, 2014).



### I.3. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (Boyd *et al.*, 2003).

#### I.3.1. Radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules ou des atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe. Ce sont des espèces chimiques, capables d'existence indépendante, qui peuvent être formées par la perte ou le gain d'électrons à partir d'un composé non radical. Ils peuvent aussi apparaître au moment de la rupture symétrique d'une liaison covalente après laquelle chaque atome conserve un électron et devient un radical libre. Ce sont des espèces chimiques instables, très réactives, et possèdent un temps de demi-vie extrêmement court (de la nano- à la milliseconde) (Tessier et Marconnet, 1996).

#### I.3.2. Sources des radicaux libres

Les sources des radicaux libres peuvent être d'origine endogène ou exogène, le tableau ci-dessous résume ces dernières :

**Tableau II** : Les principales sources des radicaux libres (Tacchini et Schriener, 2005).

Endogène	Exogène
<ul style="list-style-type: none"><li>• Mitochondries.</li><li>• Phagocytose.</li><li>• Xanthine oxydase.</li><li>• Métaux de transition.</li><li>• Peroxysome.</li><li>• Exercice physique.</li><li>• Inflammation.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cigarette.</li><li>• Radiations ionisantes.</li><li>• Pollutions diverses.</li><li>• Rayonnement UV.</li><li>• Produits chimiques et médicaments.</li><li>• Microorganismes et infections.</li></ul>

#### I.3.3. Espèces réactives de l'oxygène

Espèce réactive de l'oxygène (ERO) est un terme collectif utilisé pour un groupe d'oxydants, qui sont les radicaux libres ou les espèces moléculaires capables de produire des

radicaux libres (**Amit et Priyadarsini , 2011**), inclut les radicaux libres issus de la réduction partielle de l'oxygène (**Brambilla et al., 2008**) : radical superoxyde ( $O_2^-$ ), radical (OH) , ainsi que certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui peut être généré par des réactions enzymatiques et non enzymatiques dans la cellule et dans la membrane cellulaire (**Haliwell et Gutteridge, 1989 ; Chaher, 2006**).

### **I.3.4. Conséquences du stress oxydant**

Des concentrations élevées en ERO peuvent être un important médiateur de dommages des structures cellulaires, des acides nucléiques, des lipides et des protéines (**Afonso et al., 2007**).

Selon (**Favier, 2003**), la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses antioxydants et augmente la production mitochondriale de radicaux.

Le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies comme le cancer, syndrome de détresse respiratoire aigue, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré...etc. (**Gardès, 2003**). Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tel que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Favier, 2003**).

### **I.3.5. Les antioxydants**

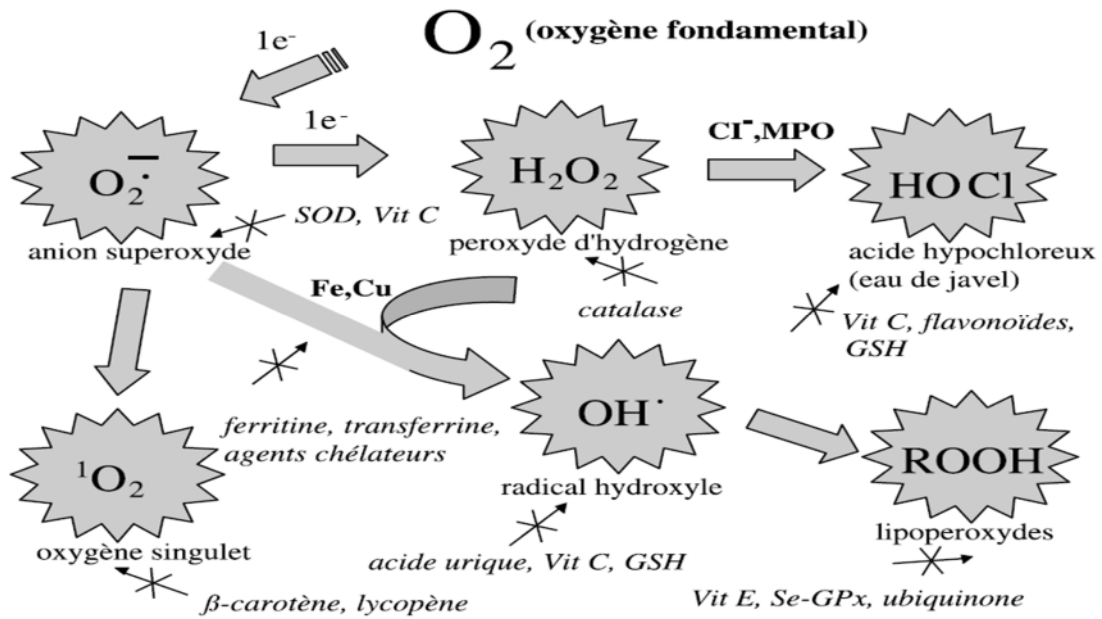
Les antioxydants sont définis par (**kumar et al., 2012**), comme étant des composés pouvant être de nature exogène ou endogène et possédant, l'un comme l'autre la capacité d'empêcher la génération des oxydants toxiques, d'arrêter ceux qui sont déjà produits et de les inactiver et de bloquer de ce fait la réaction en chaînes de propagation produite par ces oxydants .

Selon (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**) on distingue au moins cinq modes d'intervention des antioxydants :

- Interruption de la chaîne de propagation des réactions radicalaires.
- Chélation des métaux de transition.
- Désactivation des espèces oxygénées réactives.
- Inhibition de l'activité des enzymes de peroxydation.
- Abaissement de la pression partielle en oxygène.



La figure 4 illustre la désactivation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes.



**Figure 4** : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes (Pincemil et al., 2008).

### I.3.6. Classification des antioxydants

L'organisme possède des systèmes de défense très efficace, de deux types : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques. Ces antioxydants sont d'autant plus importants que certains peuvent être utilisés en thérapeutique pour tenter de prévenir le stress oxydatif (Goudable et Favier, 1997). Le tableau ci-dessous résume les deux types d'antioxydants.

**Tableau III:** les principales classes d'antioxydants (**Goudable et Favier, 1997 ; Afonso et al., 2007**).

Les antioxydants enzymatiques	Les antioxydants non enzymatiques
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Superoxyde dismutases.</li> <li>▪ Catalase</li> <li>▪ Glutathion peroxydases.</li> <li>▪ Couple thiorédoxine/thiorédoxine réductase</li> <li>▪ Hème oxygénase</li> <li>▪ Peroxyrédoxine</li> <li>▪ Phospholipases</li> <li>▪ ADN endonucléases</li> <li>▪ Ligases</li> <li>▪ Macroxyprotéinases</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Caroténoïdes</li> <li>▪ Vitamines C</li> <li>▪ Vitamine E</li> <li>▪ Glutathion</li> <li>▪ Acide urique</li> <li>▪ Bilirubine</li> <li>▪ Acide lipoïque</li> <li>▪ Ubiquinone</li> <li>▪ Protéines (transferrine, ferritine, céruléoplasmine)</li> <li>▪ Oligoéléments (le cuivre, le zinc, le sélénium...)</li> <li>▪ Flavonoïdes (quercétine, rutine, resvératrol, pycnogénol)</li> </ul>

## I.4. Tyrosinase

### I.4.1. Généralités sur la tyrosinase

La tyrosinase (synonymes : monophénol monooxygénase, catécol oxydase, polyphénol oxydase, phénolase, catécolase) est une enzyme contenant du cuivre très répandue dans la nature qui catalyse la réaction d'oxydation de la tyrosine, une réaction clé dans les voies de biosynthèse de la mélanine et d'autres pigments (**Whitaker, 1995**). Elle a été découverte pour la première fois en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boleyus luciferus*.

La tyrosinase a été extraite pour la première fois simultanément par **Kubwitz (1938)**

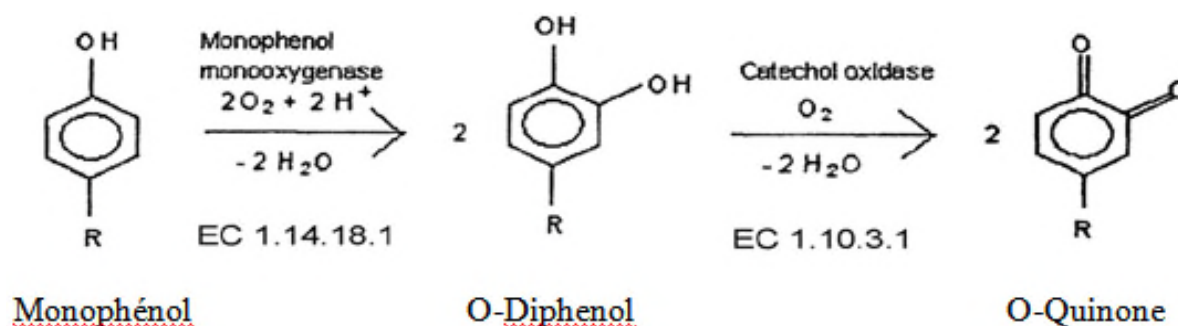


à partir des pomme de terre et par **Keilin et Mann (1938)** à partir d'*Agaricus bisporus*, c'été la première enzyme purifier par chromatographie d'affinité (**Mahendra Kumar et al., 2011**).

La tyrosinase a suscité plus d'attention et plusieurs études sérieuses ont été portées d'une part sur la compréhension de mécanisme réactionnel et d'autre part sur le rôle de l'enzyme dans le brunissement enzymatique. Actuellement, l'enzyme a été largement caractérisé dans les règnes végétal et animal. Les tyrosinases les mieux caractérisées sont celles de *Streptomyces*, *Neurospora crassa* et *Agaricus bisporus* (**Chang, 2009**).

### I.4.2. Classification et nomenclature

La tyrosinase (EC 1.14.18.1), une monophénol oxygénase oxydoréductase appartenant à la famille des polyphénols oxydase (PPO). En présence d'oxygène moléculaire, cette enzyme présente deux activités catalytiques ; une activité monophénolase, crésolase ou hydroxylase où les monophénols sont hydroxylés en o-diphénols et une activité diphénolase, catécholase ou oxydase où les o-diphénols sont oxydés en o-quinones (**Figure 5**).



**Figure 5** : Le schéma réactionnel de l'activité de la tyrosinase (**Cho et Ahn, 1999**).

### I.4.3. Rôles de la tyrosinase

La tyrosinase est largement distribuée dans les bactéries, champignons, plantes, insectes, vertébrés et invertébrés. C'est l'enzyme clé de la mélanogénèse, car elle est responsable de la coloration des cheveux, de la peau et des yeux chez les mammifères, ainsi ; le brunissement enzymatique des fruits et légumes et comme un mécanisme important de défense utilisé par les insectes (**Mendes et al., 2014**). La tyrosinase catalyse les étapes limitant la vitesse de la mélanogénèse, elle catalyse l'hydroxylation de la tyrosine en 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), puis l'oxydation de la DOPA en DOPA quinone, par des voies de synthèse différentes, la dopaquinone, conduit à la formation de l'eumélanine

(pigment de couleur brun-noir) et la phaéomélanine (pigment de couleur jaune-rouge) (**Figure 6**). Le rôle majeur de ces mélanines est de protéger la peau contre les effets néfastes des rayons UV et d'empêcher ainsi le développement de cancers cutanés.

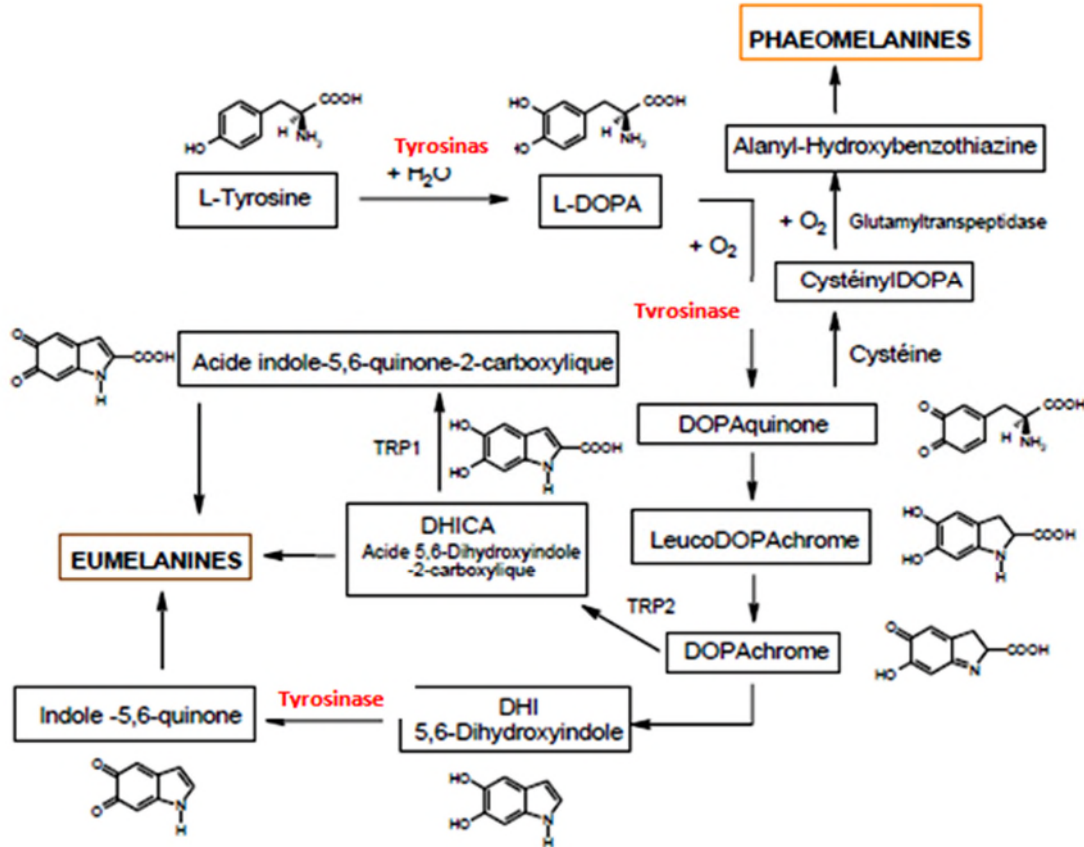


Figure 6 : Le processus réactionnel de la synthèse de la mélanine (Chang, 2009).

#### I.4.4. Structure moléculaire et site actif de la tyrosinase

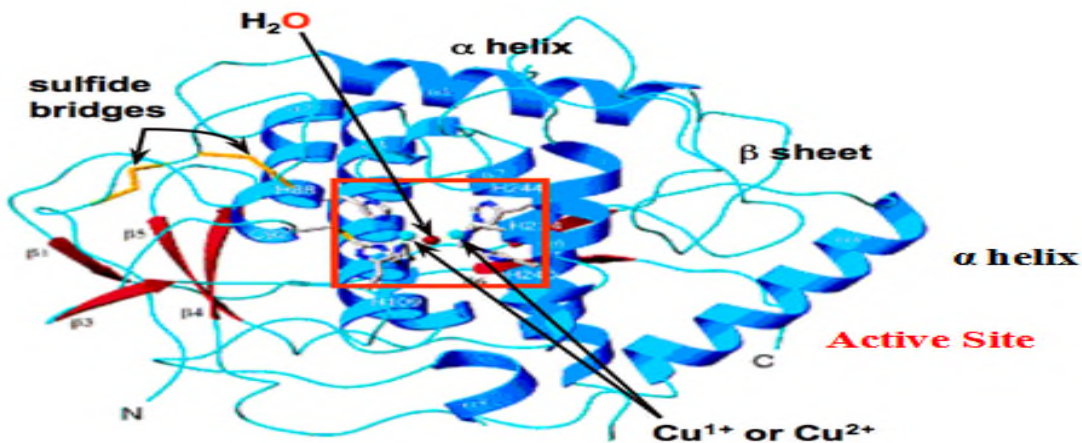
La tyrosinase humaine comme celle de mammifère appartient à la famille des protéines transmembranaires de type I. C'est une métalloprotéine possédant deux atomes de cuivre au niveau de son site actif qui sont nécessaires à sa fonction catalytique. Le domaine de liaison des atomes de cuivre est situé dans la lumière du mélanosome. La structure primaire de la sous unité principale des tyrosinases, dite catalytique, (Van Gelder et al., 1997; Fan et Flurkey, 2004) est typiquement organisée en trois domaines (**Figure 7 (a)**) : le domaine N-terminal responsable de la maturation de la protéine enzymatique et de son adressage ; le domaine C-terminal qui couvre le site enzymatique et permet de garder l'enzyme sous forme inactive sur chemin sécrétoire ; le domaine central catalytique qui est le plus conservé chez

toutes les espèces. L'activation de la tyrosinase est effectuée par élimination des deux domaines N et C-terminal chez les végétaux et les animaux, ou par la libération de la protéine de caddie pour les bactéries, les deux régions occupées par les ions de cuivre de la tyrosinase sont appelées CuA et CuB, elles interviennent dans la constitution de son site actif. Chacune de ces régions contient trois résidus d'histidine conservés. Cette paire de cuivre est le site d'interaction de la tyrosinase avec l'oxygène moléculaire et ses substrats (Figure 7) (Okombi, 2005).

a)



b)

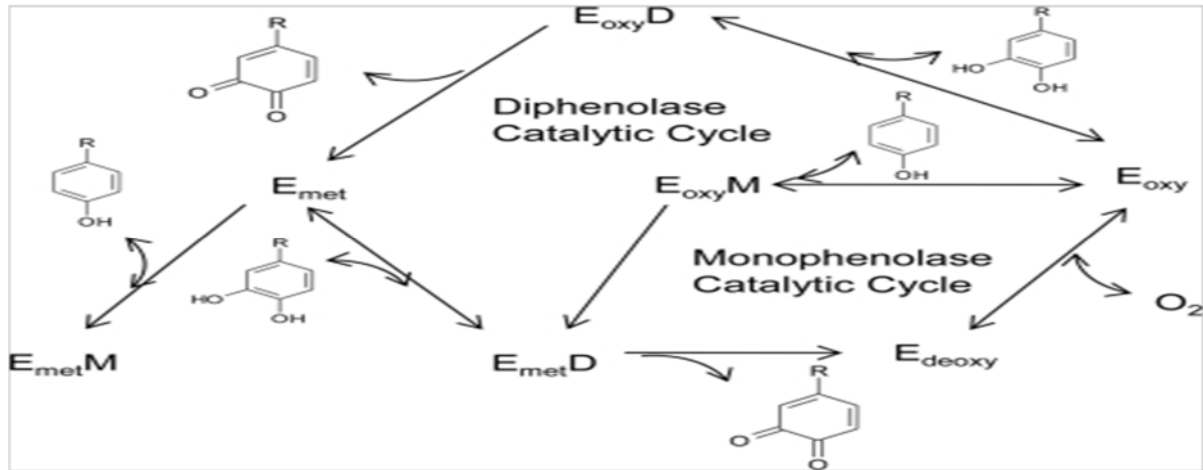


**Figure 7 : Structure de la tyrosinase :** a) organisation en domaine de la chaîne polypeptidique de la tyrosinase (Chiara, 2012). b) la structure monomérique de la tyrosinase de la patate douce *Ipomoea batatas* (Klabunde et al., 1998).

#### I.4.5. Mécanisme réactionnel de la tyrosinase

La tyrosinase peut catalyser à la fois l'oxydation d'un phénol en catéchol (activité monophénolase) et d'un catéchol en *ortho*-quinone (activité diphénolase) (Okombi, 2005). Dans le cycle de la monophénolase, le monophénol ne peut réagir qu'avec la forme oxy et être oxydé en *o*-quinone, ce qui donne une forme désoxy prête pour une autre liaison au dioxygène. L'oxytyrosinase est ensuite régénérée après la liaison de l'oxygène moléculaire à la désoxytyrosinase. Si seul le *o*-diphénol est présent (le cycle de la diphénolase), les deux formes oxy et met réagissent avec le *o*-diphénol, l'oxydant à l'*o*-quinone. Le *o*-diphénol se lie à la forme oxy et est oxydé en *o*-quinone, ce qui donne la forme met de l'enzyme. Cette

dernière forme transforme une autre molécule d'o-diphénol en o-quinone et est réduite à la forme désoxy (**Figure 8**). Dans la plupart des cas, un diphénool est nécessaire en tant qu'agent réducteur pour obtenir la forme désoxy, la seule capable de réagir avec l'oxygène moléculaire et de se poursuivre dans l'action catalytique. Pour cette raison, l'activité de la monophénolase présente un temps de latence caractéristique qui existe jusqu'à ce qu'une quantité suffisante de catéchol (nécessaire pour réduire la forme met en désoxy) soit produite par la petite quantité de la forme oxy présente généralement dans les préparations enzymatiques de repos (**Chang, 2009 ; Kim et Uyama, 2005 ; Mahendra Kumar et al., 2010**).



**Figure 8** : Cycles catalytiques de l'hydroxylation du monophénol et oxydation de l'o-diphénol à l'o-quinone par la tyrosinase (**Chang, 2009**). Eoxy, Emet et Edeoxy sont les trois types de tyrosinase, respectivement. EoxyD, EoxyM et EmetM sont des complexes Eoxy-Diphénol, Eoxy-Monophénol et Emet-Monophénol, respectivement.

#### I.4.6. Les effecteurs de la tyrosinase

Le contrôle de l'activité de la tyrosinase, est important pour le traitement ou la prévention des désordres de pigmentation (hyperpigmentation ou hypopigmentation), ainsi que le brunissement enzymatique des champignons et d'autres végétaux et fruits, pour cela des effecteurs de la tyrosinase (activateurs et inhibiteurs) sont donc employés en tant qu'agents de pigmentation ou de dépigmentation.

**Tableau IV** : les principaux effecteurs de la tyrosinase (Janovitz-Klapp et al., 1990 ; Khan, 2005 ; Kim et Uyama, 2005 ; Mendes et al., 2014).

Les activateurs de la tyrosinase	Les inhibiteurs de la tyrosinase	
	Inhibiteurs synthétiques	Inhibiteurs naturels
<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'urée</li> <li>• Les alcools</li> <li>• Les protéases</li> <li>• Les acides gras</li> <li>• L'addition des ions <math>\text{Cu}^{2+}</math></li> <li>• Les détergents anioniques (SDS)</li> <li>• Un choc de PH acide et alcalin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'hydroquinone</li> <li>• L'acide kojique</li> <li>• Les dérivés mercuriels</li> <li>• Les polyphénols</li> <li>✓ Les flavonoïdes</li> <li>✓ Les chalcones</li> <li>✓ Les stilbènes</li> <li>✓ Les coumarines</li> <li>• Les lipides et les stéroïdes à longue chaîne</li> <li>• Les acides aminés, peptides et protéines</li> <li>• Les dérivés d'aldéhyde benzoïque et de benzoate</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'acide cinnamique et ses dérivés</li> <li>• Les azotures</li> <li>• L'oxadiazole</li> <li>• Les cyanures</li> <li>• Le monoxyde de carbone</li> <li>• Les halogénures</li> <li>• N-phénylthiourée</li> <li>• Le peroxyde d'hydrogène (<math>\text{H}_2\text{O}_2</math>)</li> <li>• Le 4-Hexylresorcinol</li> <li>• Le methimazole</li> <li>• Le Captopril</li> <li>• Penicillamine</li> <li>• Le Tropolone</li> </ul>



*Matériel*  
*et*  
*méthodes*

## II. Matériel et méthodes

### II.1. Récolte du matériel végétal

Le matériel végétal sélectionné pour évaluer l'activité antioxydante et enzymatique est constituée de la racine, tige, feuille et fleur de la plante *Urospermum dalechampii*. La sélection de cette plante est basée sur une enquête ethnopharmacologique auprès de la population ayant connaissance de son usage en médecine traditionnelle. Les différentes parties d'*Urospermum dalechampii* ont été récoltées au mois de mars 2017 dans la région d'Ighzer Amokrane de la wilaya de Bejaia (**Figure 9**). L'identification botanique de l'espèce a été réalisée au niveau du laboratoire biologie végétale de FSNV de l'université de Bejaia.



**Figure 9 :** Localisation géographique de la station de récolte d'*Urospermum dalechampii*.

Les différentes parties de la plante récoltée ont été nettoyées de tous les contaminants à l'eau courante, puis séchées à l'étuve à 40°C pendant une semaine jusqu'à la stabilité de leurs poids. La matière sèche obtenue a été ensuite réduite en poudre à l'aide d'un broyeur électrique et tamisée jusqu'à l'obtention d'une poudre fine d'un diamètre  $\leq 125 \mu\text{m}$ . Les poudres obtenues ont été conservées dans des bocaux en verre à l'abri de la lumière.

### II.2. Extraction et dosage des composés phénoliques

L'extraction des polyphénols a été réalisée par la technique d'extraction solide /liquide (par épuisement) avec différents solvants organiques (méthanol, éthanol, acétone, eau

distillée, méthanol 70%, éthanol 70% et acétone 70%) à un rapport de 3/10 (P/V). Les différentes solutions d'extraction obtenues ont été filtrées sur papier wattman. Après évaporation les extraits obtenus ont été ensuite complètement séché et conservés à 4 °C jusqu'à utilisation (**Romani et al., 2002**).

➤ **Calcul du taux d'extraction**

Le taux d'extraction exprimé en (%) a été déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = [P1 / P0] * 100$$

**P1** : poids de l'extrait sec exprimé en gramme.

**P0** : poids initial de poudre végétale exprimé en gramme.

### **II.2.1. Dosage des phénols totaux**

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits a été réalisé par la méthode de **Singleton et Ross (1965)** utilisant le réactif de Folin–Ciocalteu.

- **Principe**

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et phosphomolibdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleues de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ) (**Ribéreau-Gayon et al., 1972**). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu, donne un maximum d'absorption à 760 nm.

- **Mode opératoire**

Un volume de 0,2 ml de chaque extrait est introduits dans des tubes à essais, auquel il a été ajouté 1 ml de Folin Ciocalteu et 0,8 ml de carbonate de sodium à 7,5 % Par la suite, les tubes sont agités et conservés durant 2h à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 765 nm en utilisant le spectrophotomètre. Il est à noter qu'un blanc a été préparé de la même manière en substituant l'extrait par le méthanol.

Les teneurs en phénols totaux des extraits ont été déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage (**Annexe 02**). Les résultats ont été exprimés en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/ g MS).

## II.2.2. Dosage des flavonoïdes

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits d'*Urospermum dalechampii* a été réalisée par la méthode de **Bahorun et al., (1996)**.

- **Principe**

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (**Ribéreau-Gayon et al., 1972**).

- **Mode opératoire**

1 ml de chaque extrait d'*U. dalechampii* a été mis dans un tube à essai, auquel il a été ajouté 1ml de la solution méthanolique de chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub> à 2%). Après incubation pendant 15 mn à température ambiante, la mesure de l'absorbance a été effectuée à 430 nm. Lors de la préparation du blanc, l'extrait a été remplacé par le méthanol.

Les résultats ont été exprimés en gramme équivalent de quercétine par gramme de matière sèche à partir de la courbe d'étalonnage (**Annexe 02**).

## II.2.3. Dosage des tannins condensés

- **Principe**

Le dosage des tannins condensés est basé sur la condensation des composés polyphénoliques (flavanes -3-ols) avec la vanilline en milieu acide (**Price et al., 1978**).

- **Mode opératoire**

La méthode d'estimation de la teneur en tannins condensés a été proposée par **Swain et Hillis (1959)**, 2 ml du réactif de la vanilline ont été mélangés avec 1 ml d'extrait. Après incubation à 50°C pendant 20 min, l'absorbance est mesurée à 500nm. Les résultats sont exprimés en gramme équivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche à partir de la courbe d'étalonnage (**Annexe 02**).

## II.3. Evaluation des activités biologiques des extraits d'*Urospermum dalechampii*

### II.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante

La présente étude a été effectuée *in vitro* dans le but de déterminer l'activité antioxydante des extraits méthanolique, éthanolique, acétonique, aqueux, méthanolique à 70%, éthanolique à 70% et acétonique à 70%) d'*U. dalechampii*.

#### II.3.1.1. Activité réductrice du molybdate

- *Principe*

Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate  $\text{MoO}_4^{2-}$  à molybdène Mo (V) sous la forme  $\text{MoO}_2^+$  en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide (Prieto *et al.*, 1999).

- *Mode opératoire*

La capacité antioxydante totale (TAC) des extraits est évaluée par la méthode de Phosphomolybdène de Prieto *et al.*, (1999).

Un volume de 0,3 ml de chaque extrait a été mélangé avec 3 ml d'une solution préparée en mélangeant 0,6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium. Les tubes ont été incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions a été mesurée à 695 nm. Un blanc a été préparé dans les mêmes conditions que l'échantillon qui a été remplacé par le méthanol. La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS) à partir d'une courbe d'étalonnage (Annexe 02).

#### II.3.1.2. Pouvoir réducteur du fer

- *Principe*

L'analyse du pouvoir réducteur est basée sur la réduction du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) du complexe ferricyanure- $\text{Fe}^{3+}$  en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), en présence des antioxydants réducteurs (Bijoy *et al.*, 2008). La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (Gulçin *et al.*, 2004).

- **Mode opératoire**

Le pouvoir réducteur a été estimé par la méthode de d'Oyaizu (1986). 1ml de chaque extrait a été mélangé avec 2,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] (1%). Les mélanges ont été incubés à 50°C pendant 20 min. 2,5 ml d'acide trichloracétique (10%) ont été ajoutés au mélange. Après centrifugation à 3000 tours pendant 10 min, 2,5 ml du surnageant ont été mélangés avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de chlorure ferrique (0,1%). L'absorbance a été mesurée à 700nm. L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer.

La concentration IC<sub>50</sub> qui est définie comme la concentration des antioxydants nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale du thiocyanate ferrique est un indice utilisé pour comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des substances bioactive.

### II.3.1.3. Activité « scavenger » du radical DPPH

- **Principe**

Un antioxydant a la capacité de donner un hydrogène au radical synthétique DPPH· (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl) de coloration violette (forme oxydée) pour le réduire en DPPH-H (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazine) (Figure 10), de coloration jaune-verte (Hadbaoui, 2012).

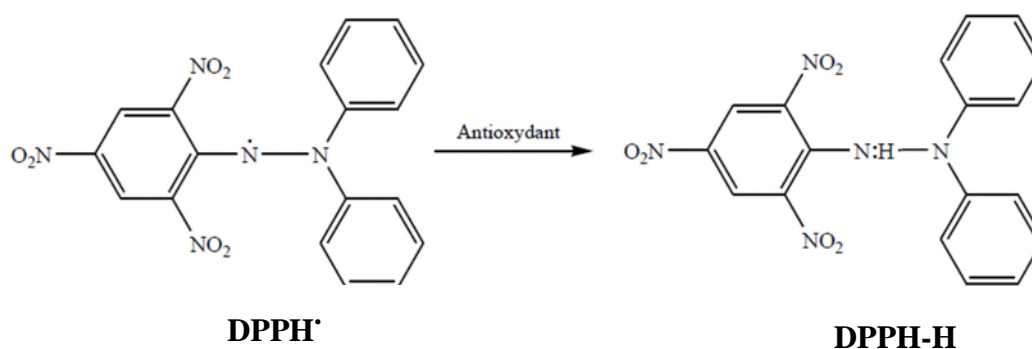


Figure 10 : Réduction du radical DPPH·

- **Mode opératoire**

Le protocole de l'activité scavenger du radical DPPH suivi est celui de Hemalatha et al., (2010).

Une solution de DPPH (0,1 mM) a été préparée dans du méthanol, 0,5 ml de cette solution a été ajouté à 1,5 ml de d'extrait à différentes concentrations (30, 50, 100, 150 µg/ml). Après une incubation pendant 30 mn à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 517 nm.

Un blanc pour chaque extrait a été préparé en mélangeant 0,5 ml du méthanol avec 1,5 ml d'extrait.

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH· est exprimé par la formule suivante :

$$\% = [(A_{\text{témoin}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{témoin}}] \times 100$$

$A_{\text{témoin}}$  : Absorbance du témoin.

$A_{\text{échantillon}}$  : Absorbance de l'extrait.

### **II.3.2. Evaluation de l'activité de la tyrosinase vis-à-vis des extraits d'*U. dalchampi***

#### **II.3.2.1. Matériel végétal**

Le champignon de couche *Agaricus bisporus* ou champignon de Paris a été utilisé comme source de la tyrosinase. Le champignon doit être blanc, frais, jeune et petit si possible (Figure 11).



**Figure 11** : Champignon de paris *Agaricus bisporus*.

### II.3.2.2. Préparation de l'extrait enzymatique brut

L'extrait tyrosinase du champignon de Paris « *Agaricus bisporus* » a été obtenu selon le protocole décrit par **Janovitz- Klapp et al., (1989)**.

100 g de champignon sont lavés abondamment à l'eau distillée afin d'éliminer tous les contaminants, ils ont été découpés et broyés à l'aide d'un mixeur électrique dans 100 ml de tampon phosphate (0,05 M, PH 7,0) préalablement refroidi à 4 °C, la suspension a été centrifugée à 15000 tours à 4°C pendant 30 min. Le surnageant obtenu a été filtré sur papier wattman N°1 afin d'éliminer toutes particules solides restantes, ce filtrat a été homogénéisé et conservé dans le congélateur dans des aliquotes de 2 ml.

### II.3.2.3. Mesure de l'activité de la tyrosinase

L'activité tyrosinase a été déterminée par spectrophotométrie en utilisant la L-tyrosine comme substrat. En présence de l'enzyme, la L-tyrosine est oxydée en o-quinone, un composé qui présente une absorbance maximale à 475 nm (**Espin et al., 1995**).

L'activité tyrosinase a été mesurée en absence et en présence d'extrait végétal selon le protocole de **Vanni et al (1990)** in **Zong-Ping et al (2008)**.

Dans des conditions de température ambiante, 1ml de L-tyrosine (3mM) a été mélangé avec 100µl de tampon phosphate (0,05 M, pH7) et 100µl d'extrait enzymatique d'*Agaricus bisporus*. La variation de l'absorbance a été suivie pendant 20min à 475 nm.

**NB :**

- Pour l'activité antityrosinase, le tampon phosphate (0,05 M, pH 7) a été remplacé par les extraits de plante dilués dans le même tampon.
- La solution de L-tyrosine a été préparée dans un tampon phosphate 0,05 M à pH 7.

- **Expression des résultats**

L'activité enzymatique de la tyrosinase est le résultat de la variation de l'absorbance pendant un laps de temps :  $(\Delta DO \text{ (nm)} / \Delta \text{ temps (min)})$ .

Le pourcentage d'inhibition par l'extrait phénolique a été calculé selon la formule donnée par **Zheng et al., (2008)**.



$$\% \text{ d'inhibition (\%)} = \frac{\text{Abs}_{475} \text{ A} - \text{Abs}_{475} \text{ B}}{\text{Abs}_{475} \text{ A}} \times 100$$

A = Activité tyrosinase en DO<sub>475nm</sub>/ min mesurée en absence d'extrait végétal ;

B = Activité tyrosinase en DO<sub>475nm</sub>/ min mesurée en présence d'extrait végétal.

La concentration inhibitrice à 50% (IC<sub>50</sub>) qui correspond à la concentration d'extrait végétal nécessaire pour réduire 50% de l'activité enzymatique de la tyrosinase a été déterminée graphiquement à partir de la variation du taux d'inhibition de la tyrosinase en fonction de la concentration de l'extrait végétal.

#### **II.4. Etude statistique**

L'analyse statistique des résultats a été effectuée avec l'application ANOVA (SATISTICA 5.5) et la comparaison des résultats est prise à la probabilité p<0,05. Toutes les données représentent la moyenne de trois essais ± ecartype. Les valeurs des IC50 ont été calculées en utilisant le logiciel Origin 9.

L'analyse des données des régressions linéaires et des régressions non linéaires a été effectuée en utilisant les programmes suivants : Microsoft Excel 2007 et Sigma Plot 2012.

*Résultats*  
*et*  
*Discussion*

### III. Résultats et discussion

#### III.1. Taux d'extraction

Les rendements d'extraction des différents extraits bruts d'*Urospermum dalechampii* sont reportés dans le **tableau V** et représentés dans la **figure 12**.

**Tableau V** : Taux des extraits bruts d'*Urospermum dalechampii*.

Parties de la plantes	Solvants d'extraction	Rendement %	Parties de la plantes	Solvants d'extraction	Rendement %
<b>Racines</b>	Méthanol 100%	9,86	<b>Feuilles</b>	Méthanol 100%	11,57
	Ethanol 100%	10,43		Ethanol 100%	24,86
	Acétone 100%	2,28		Acétone 100%	1,57
	Eau distillée 100%	32,71		Eau distillée 100%	18,71
	Méthanol 70%	15,28		Méthanol 70%	15,28
	Ethanol 70%	14,28		Ethanol 70%	17,57
	Acétone 70%	11		Acétone 70%	12,57
<b>Tiges</b>	Méthanol 100%	16,43	<b>Flours</b>	Méthanol 100%	31
	Ethanol 100%	24		Ethanol 100%	20
	Acétone 100%	4,28		Acétone 100%	12,6
	Eau distillée 100%	30		Eau distillée 100%	40,8
	Méthanol 70%	28,43		Méthanol 70%	29,6
	Ethanol 70%	29,86		Ethanol 70%	28,2
	Acétone 70%	19,14		Acétone 70%	26,2

Les rendements représentés dans la **figure 12** dépendent à la fois de l'organe de la plante, du solvant d'extraction et aussi de la concentration. Il a été constaté que quelque soit l'organe utilisé, le rendement d'extraction obtenu avec l'eau distillée est toujours le plus élevé, à l'exception de l'extrait éthanolique (100%) qui s'est révélé le meilleur solvant

d'extraction des feuilles d'*Urospermum dalechampii*. Le plus faible rendement d'extraction a été obtenu avec l'acétone 100% et cela pour les quatre parties de la plante étudiée.

Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Beddou, (2015) sur *Rumex vesicarius* L. (polygonaca) et *Anvillea radiata* Coss et *Dur* (asteraceae), qui a rapporté que l'eau distillée est le solvant qui a donné le rendement le plus élevé en substances actives.

L'extraction des composés est plus importante en utilisant l'eau comme solvant d'extraction, cela pourrait s'expliquer par la forte polarité de l'eau, ce qui lui a permis d'extraire une large gamme de substances (Bonnaillie *et al.*, 2012).

Par ailleurs, le taux d'extraction obtenu avec les fleurs (26,91%) est supérieur par rapport aux autres organes, suivi par la tige (21,73%), alors que les feuilles et les racines ont enregistré les plus faibles rendements (14,59% et 13,69% respectivement).

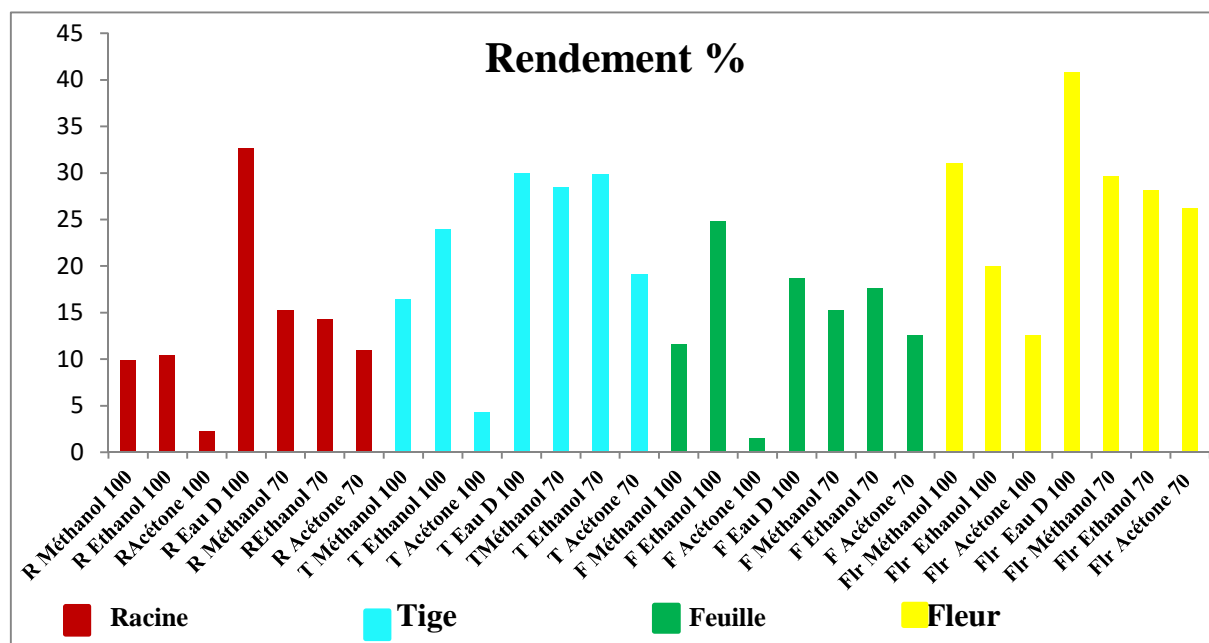


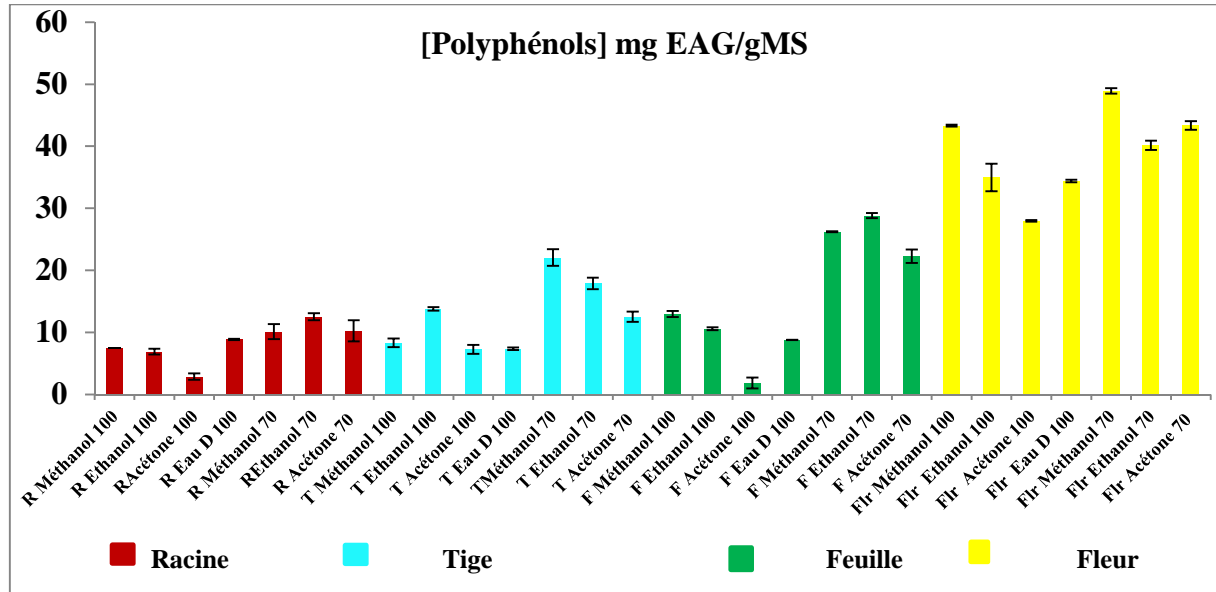
Figure 12 : Rendements des extraits bruts d'*Urospermum dalechampii*.

## III.2. Détermination de la teneur en composés phénoliques

### III.2.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux

Les résultats du dosage des composés phénoliques totaux sont représentés sur la **figure 13**.

Les résultats obtenus ont montré qu'il existe une différence significative entre les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits de la plante ( $P < 0,05$ ).



**Figure 13 :** Teneur en polyphénols totaux dans les différents extraits bruts des racines, des feuilles, des tiges et des fleurs d'*U. dalechampii*.

Les teneurs les plus élevées ont été obtenues avec l'extrait méthanolique à 70%, avec des valeurs allant de 10,11 mg EAG/g jusqu'à 48,93 mg EAG/g de matière végétale sèche.

L'analyse statistique n'a montré aucune différence significative ( $P < 0,05$ ) entre les extraits éthanoliques de racine et les extraits : acétoniques (100%) de la tige, aqueux de la tige, méthanoliques (100%) de la tige et de la racine et aqueux des feuilles et entre les extraits : acétoniques (100%) de la tige, aqueux de la tige, méthanoliques (100%) de la racine, méthanoliques (100%) de la tige, aqueux des feuilles et aqueux des racines. Aucune différence significative n'a été constaté aussi entre les extraits : méthanoliques (100%) de la tige, aqueux des feuilles, aqueux des racines, méthanoliques (70%) des racines ; et entre les extraits : aqueux des feuilles, aqueux des racines, méthanoliques (70%) des racines, acétoniques (100%) des racines et éthanoliques (100%) des feuilles.

La variation de la teneur en composés phénoliques en fonction de la partie de la plante est significative ( $P < 0,05$ ). Les fleurs ont donné les teneurs les plus importantes en polyphénols (39,02 mg EAG/g MS en moyenne). Aucune différence significative ( $P < 0,05$ ), n'a été constaté entre les tiges et les feuilles avec les teneurs de 12,75 mg EAG/g MS et 15,93 mg EAG/g MS, respectivement. Les teneurs les plus faibles en polyphénols totaux ont été obtenues par les racines soit 8,42 mg EAG/g MS.

La répartition inégale des polyphénols dans les différents organes d'une même plante a été rapportée par plusieurs auteurs (Falleh *et al.*, 2007 ; N'Guessan *et al.*, 2011 ; El-Haci *et al.*, 2012).

Les solvants d'extraction ont permis de récupérer des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants (Djeridane *et al.*, 2006 ). Le dosage par le réactif de Folin-Ciocalteu donne donc une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. (Tawaha *et al.*, 2007).

#### III.2.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits bruts d'*U. dalechampii* a été déterminée selon la méthode au trichlorure d'aluminium. Les résultats sont exprimés en termes d'équivalents de quercétine à l'aide d'une courbe d'étalonnage (Annexe 02).

Il existe une différence significative entre les teneurs en flavonoïdes totaux et les différents organes. Les fleurs d'*U. dalechampii* ont enregistré un maximum de flavonoïdes (44,58 mg EQ/g MS) suivies par les feuilles (17,20 mg EQ/g MS), tandis que les tiges et les racines n'ont montré aucune différence significative, renfermant des teneurs de 5,59 et 9,36 fois plus faibles (7,98 et 4,76 mg EQ/g MS en moyenne respectivement) par comparaison aux fleurs.

L'étude statistique a montré une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre les teneurs en flavonoïdes en fonction de l'extrait de la plante. Elle ne présente aucune différence significative entre les extraits : acétoniques (100%) des racines, aqueux des racines, aqueux des tiges, acétoniques (70% des racines, méthanoliques (100%) des racines ; et entre les extraits : aqueux des tiges, acétoniques (100%) des racines, méthanoliques (100%) des racines, éthanoliques (100%) des racines. Aucune différence significative n'a été aussi enregistré avec les extraits : éthanoliques (70%) des racines, méthanoliques (100%) des tiges, aqueux des feuilles, acétoniques (70%) des tiges, éthanoliques (70%) des tiges.

Il a été constaté que l'extrait éthanolique a été le meilleur solvant d'extraction des flavonoïdes contenant dans l'espèce *U. dalechampii*, soit en moyenne de 28,54 mg EQ/g MS par comparaison au méthanol et au méthanol aqueux qui ont exhibé des teneurs de l'ordre de 26,6 mg EQ/g MS et 20,08 mg EQ/g MS, respectivement. L'éthanol, l'acétone et l'acétone aqueux ont montré des teneurs considérables en flavonoïdes à savoir en moyenne 15,59, 15,20 et 14,10 mg EQ/g MS respectivement. La teneur la plus faible par contre a été obtenue avec l'eau distillée, qui est de 10,31 mg EQ/g MS en moyenne.

Ces résultats rejoignent ceux trouvés par Djeridane et *al.*, (2006) et (2007) sur *Artemisia campestris* (asteraceae), qui ont rapporté que l'éthanol aqueux est le meilleur solvant d'extraction des flavonoïdes.

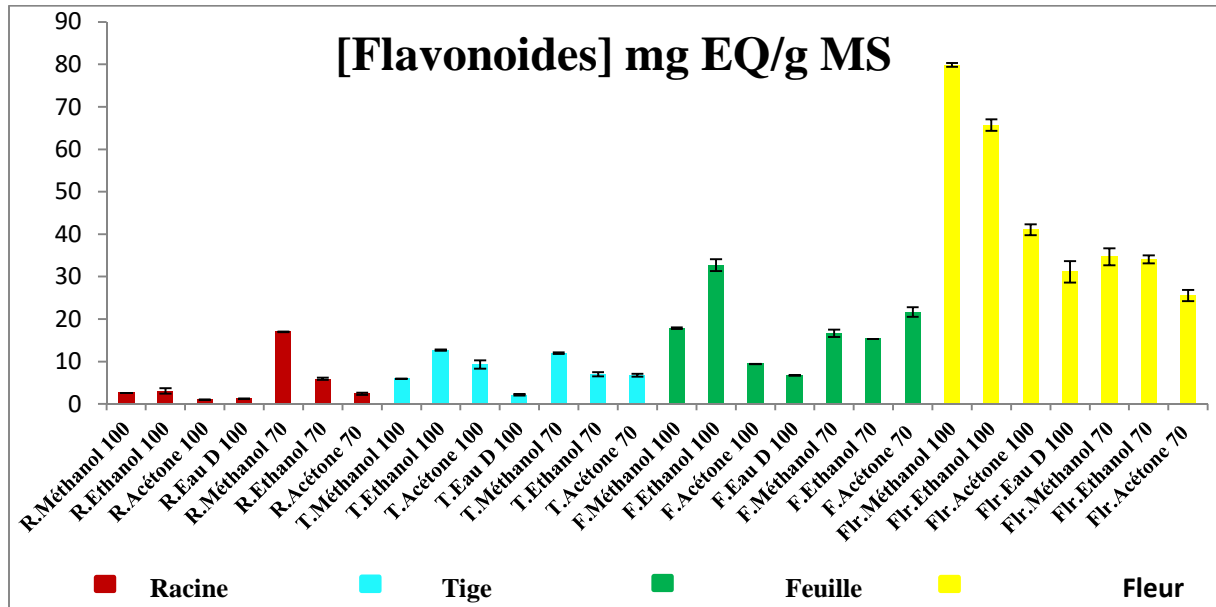


Figure 14 : Teneur en flavonoïdes totaux contenant dans les différentes parties d'*U. dalechampii*.

### III.2.3. Détermination de la teneur en tannins condensés

L'analyse des résultats de la teneur en tannins condensés consignés dans la **figure 15** révèle qu'il y a une différence significative entre les différents extraits de la plante ( $P < 0,05$ ).

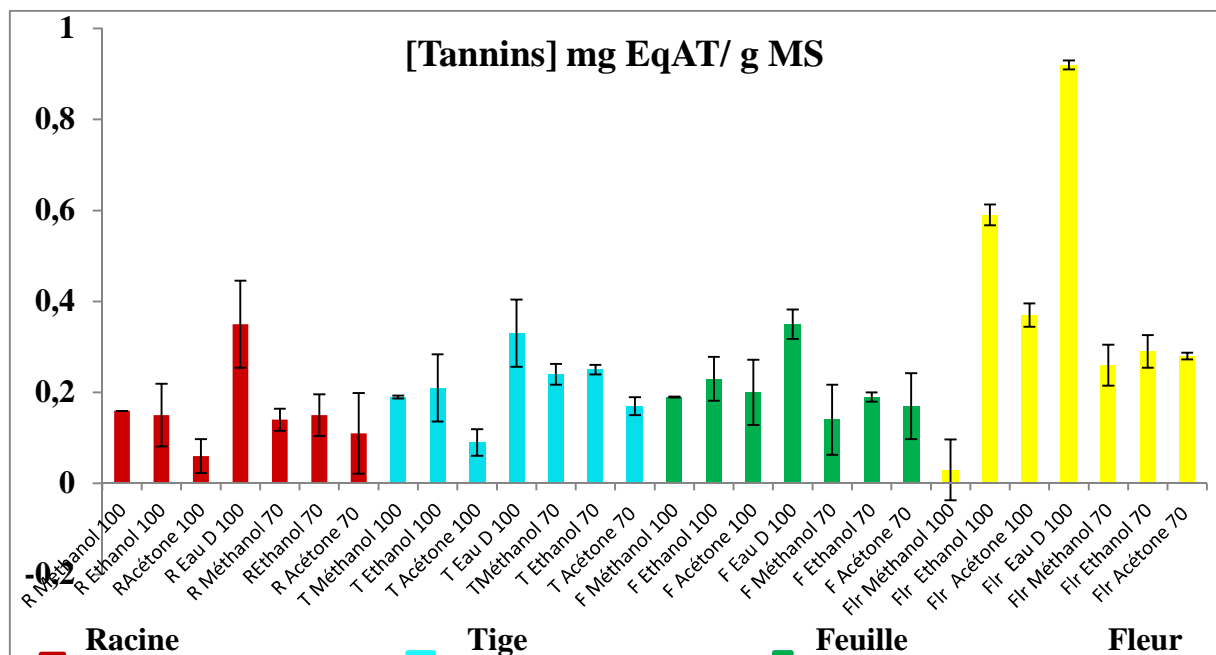


Figure 15 : Teneurs en tannins condensés des extraits bruts d'*U. dalechampii*.

Aucune différence significative n'a été présentée entre les extraits éthanoliques (70%) des tiges, méthanoliques (100%) des fruits, méthanoliques (100%) des tiges.

Il a été constaté que, l'extrait éthanolique (100%) est le meilleur solvant d'extraction des tannins condensés qui a donné une teneur de 0,54 mg EAT/g MS en moyenne, tandis que la plus faible teneur en tannins a été enregistrée avec l'extrait acétonique (100%) avec une valeur de 0,18 mg EAT/g MS.

Au regard de ces résultats, *U. dalechampii* s'est avérée pauvre en tannins condensés présentant ainsi des valeurs allant de 0,058 à 1,23 mg EAT/g MS.

Il est à signalé qu'aucune différence significative n'a été révélée entre les teneurs en tannins condensés entre les différents organes de la plante, à l'exception des racines qui ont donné une valeur 3 fois inférieure à celle évaluée pour la fleur (0,16 mg EAT/g MS, en moyenne) (**Figure 15**). Les tannins condensés sont essentiellement localisés dans les fleurs d'*U. dalechampii* (0,53 mg EAT/g MS, en moyenne).

Au vu des résultats obtenus, il ressort que, l'extraction des composés phénoliques est une étape cruciale pour la valorisation des principes actifs. Elle dépend à la fois du solvant d'extraction et de la nature de l'organe étudié. Pour cela, la sélection d'un système de solvant approprié reste l'une des étapes les plus importantes dans l'optimisation d'extraction des polyphénols, des flavonoïdes et d'autres composés antioxydants (**Zhao et al., 2006**).

Une étude menée par El-Amier et al., (2016) sur une espèce du même genre *Urospermum picroides* a montré que la teneur en phénols totaux, en flavonoïdes et en tannins de la partie aérienne, est de 19,34 mg/g, 8,28 mg/g et 17,11 mg/g respectivement. Ces valeurs sont nettement inférieures à celles trouvées avec la partie aérienne d'*U. dalechampii* étudiée.

### III.3. Etude des activités biologiques d'*Urospermum dalechampii*

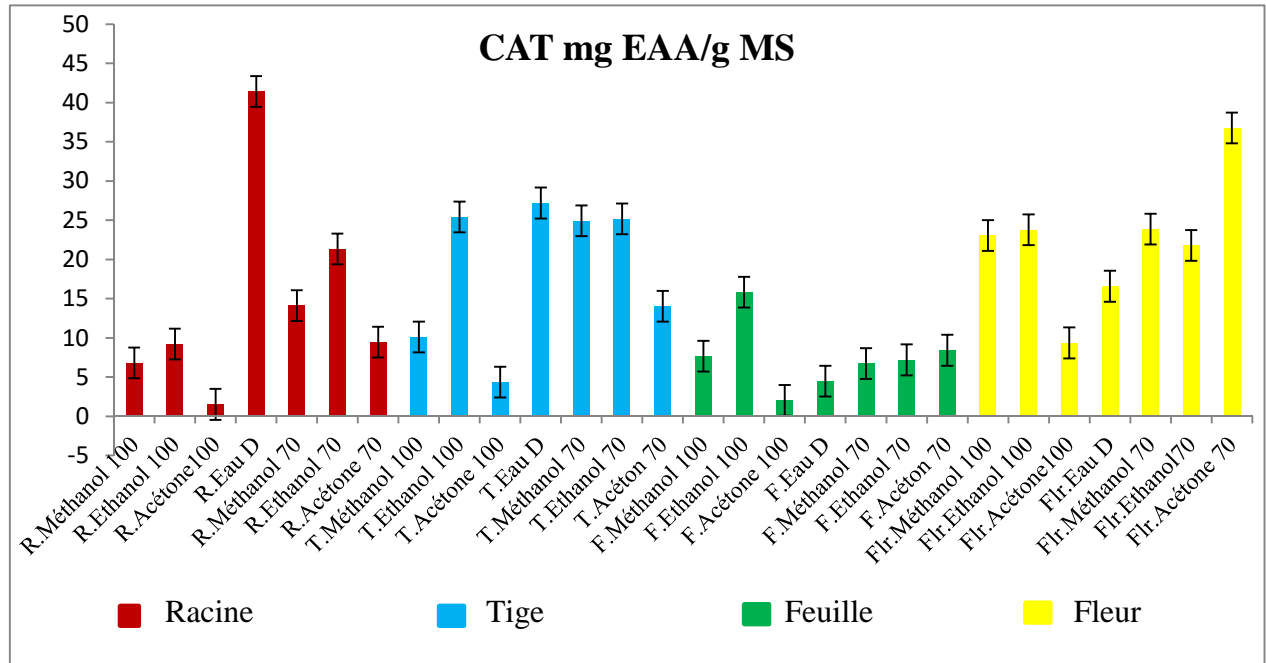
#### III.3.1. Evaluation du potentiel antioxydant des extraits

Dans la présente étude l'activité antioxydante des extraits phénoliques de *U. dalechampii*, a été déterminée en utilisant trois tests différents à savoir ; l'activité réductrice du molybdate, le pouvoir réducteur du fer et l'activité « scavenger » du radical DPPH.

##### III.3.1.1. Activité réductrice du molybdate



Les résultats du pouvoir réducteur du molybdate des extraits phénoliques d'*U. dalechampii* présentent des différences significatives qui varient en fonction de la concentration étudiée et du solvant d'extraction utilisé ( $P < 0,05$ ) (**Figure 16**).



**Figure 16** : Capacité antioxydante totale, exprimée en mg EAA/g MS, des extraits bruts des différentes parties d'*U. dalechampii*.

Il a été constaté que, l'extrait aqueux d'*U. dalechampii* a exhibé la meilleure capacité antioxydante totale de l'ordre de 22,43 mg EAA/g MS en moyenne, par rapport aux autres solvants utilisés, alors que la plus faible capacité antioxydante a été enregistrée par l'extrait acétonique (100%), soit 4,32 mg EAA/g de matière végétale sèche.

L'analyse statistique a montré une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre les capacités antioxydantes totales de toutes les parties de la plante. Cependant, aucune différence significative n'a été révélée entre la racine et la tige, et entre la tige et la fleur.

La fleur a exhibé la meilleure capacité antioxydante totale qui est de 22,18 mg EAA/g MS, suivie par la tige et les racines qui ont montré des valeurs de l'ordre de 18,75 et 14,84 mg EAA/g MS, respectivement, alors que la plus faible capacité antioxydante totale a été enregistrée avec les feuilles d'*U. dalechampii* avec une valeur de 7,48 mg EAA/g MS en moyenne.

Selon une étude rapportée par Beddou, (2015), l'extrait aqueux a donné la meilleure capacité antioxydante totale par rapport aux autres extraits de la plante, ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans la présente étude.

### III.3.1.2. Réduction de fer

Les résultats de l'étude de la capacité des extraits d'*Urospermum dalechampii* à réduire le fer a montré une différence significative selon la concentration testée et le solvant d'extraction utilisé ( $p < 0,05$ ) (Figure 17).

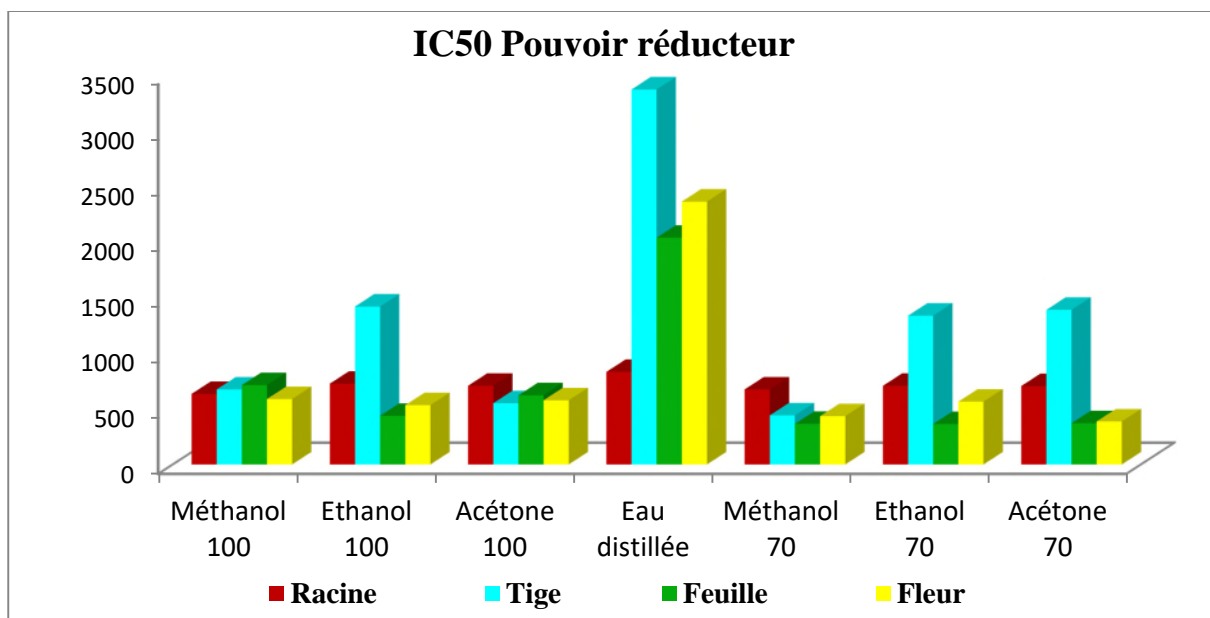


Figure 17 : Pouvoir réducteur du fer des extraits bruts.

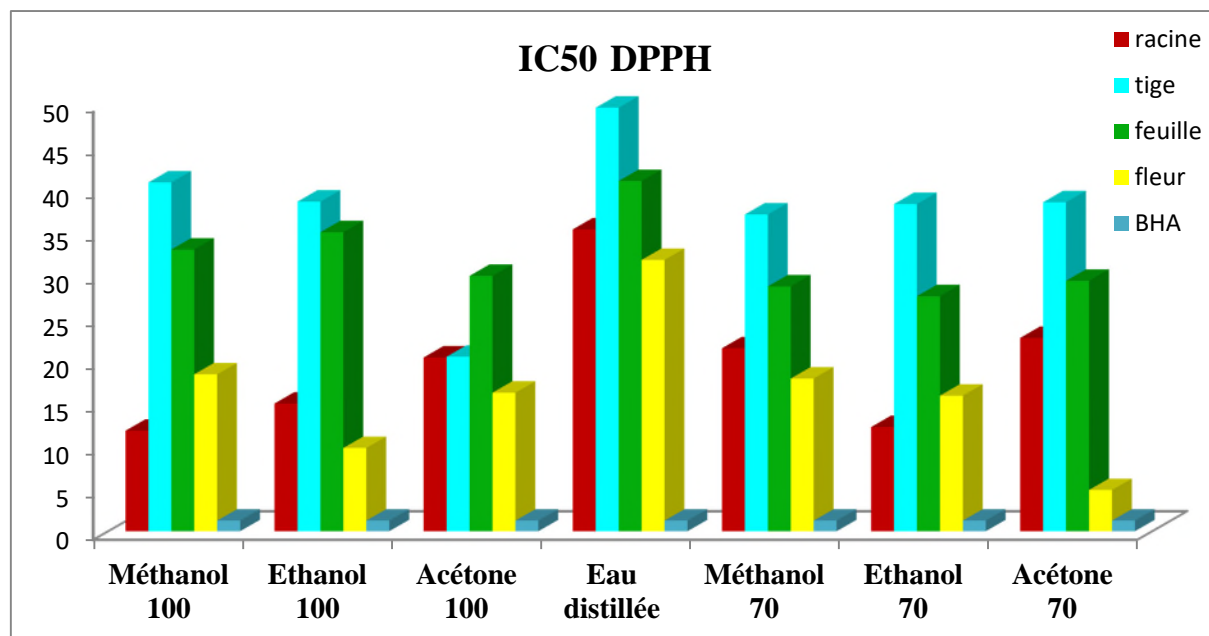
L'étude statistique des résultats indique que le plus fort pouvoir réducteur du fer a été obtenu en utilisant l'extrait méthanolique (70%), comme solvant d'extraction, avec la plus faible valeur en  $IC_{50}$  (482,07  $\mu\text{g/ml}$ ) par rapport aux autres extraits.

Alors que l' $IC_{50}$  la plus élevée a été enregistrée par l'extrait aqueux (2153,06  $\mu\text{g/ml}$ ) pour les quatre organes de la plante), ce qui signifie la plus faible activité réductrice du fer.

L'analyse des résultats de cette activité a montré que le plus fort pouvoir réducteur du fer a été trouvé avec les feuilles, les racines et les fleurs d'*U.dalechampii* ( $IC_{50} = 704,54 \mu\text{g/ml}$ ,  $IC_{50} = 716,98 \mu\text{g/ml}$  et  $IC_{50} = 781,35 \mu\text{g/ml}$ , respectivement), alors que les extraits des tiges ayant une  $IC_{50}$  de 1315,13  $\mu\text{g/ml}$ , ont présenté le pouvoir réducteur le plus faible.

### III.3.1.3. Activité « scavenger » du radical DPPH

Les résultats de la capacité des extraits d'*Urospermum dalechampii* à piéger le radical DPPH en fonction de la concentration et du solvant d'extraction sont présentés sur la **figure 18**.



**Figure 18 :** Valeurs des IC<sub>50</sub> du DPPH obtenues avec les extraits bruts d'*U. dalechampii*.

A des fins comparatives, un antioxydant standard est utilisé, la BHA. Il a montré une activité antiradicalaire très puissante avec un IC<sub>50</sub> de l'ordre de 1,25 µg/ml.

L'analyse statistique des concentrations inhibitrices à 50% (IC<sub>50</sub>) des extraits bruts des différentes parties de la plante étudiée contre le DPPH, a montré une différence significativement importante ( $P < 0,05$ ) entre les différents extraits à l'exception des extraits : acétoniques (100%) des racines, acétoniques (100%) des tiges ; et entre les extraits : acétoniques (70 %) des feuilles et acétoniques (100%) des feuilles ; entre les extraits : acétoniques (70% des tiges et éthanoliques (100 % des tiges) ; et enfin entre les extraits aqueux des feuilles et méthanoliques (100%) des tiges, où aucune différence significative n'a été révélée.

L'extrait acétonique a montré un pouvoir réducteur plus important par rapport aux autres extraits de la plante (IC<sub>50</sub> = 21,73 µg/ml, en moyenne) tandis que l'extrait aqueux présente l'IC<sub>50</sub> le plus élevé, ce qui signifie les plus faibles activités antiradicalaires.

L'analyse des résultats a montré que l'IC<sub>50</sub> du DPPH est dépendante de la nature de l'organe étudié chez *U. dalechampii*, les extraits des fleurs présentent les pourcentages

significativement plus importants ( $IC_{50} = 16,40 \mu\text{g/ml}$ ), suivies par les racines et les feuilles ( $IC_{50} = 19,82 \mu\text{g/ml}$  et  $IC_{50} = 32,02 \mu\text{g/ml}$ , respectivement). Par contre, les valeurs d' $IC_{50}$  les plus élevées ont été obtenues avec les extraits des tiges, ce qui signifie que cet organe a exprimé les plus faibles activités antiradicalaires contre le radical DPPH. Le standard a marqué l'effet antioxydant le plus puissant.

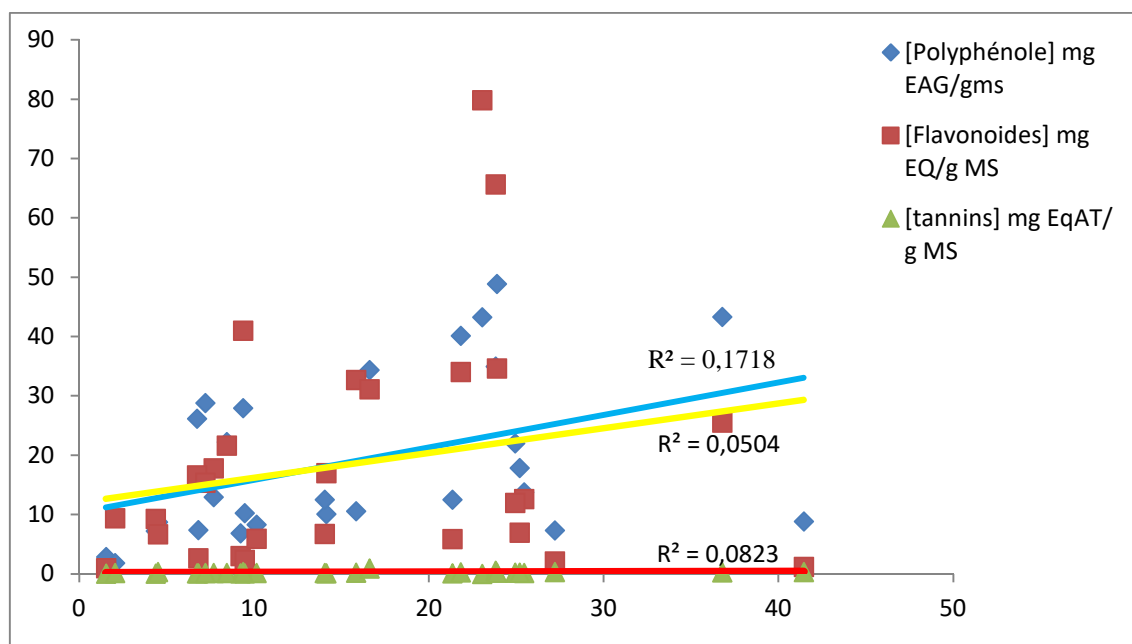
Il est à noter que, les extraits les plus riches en composés phénoliques se sont révélés, les extraits les plus actifs.

Une étude menée par El-Amier et *al.*, (2016) sur une espèce d'*Urospermum picroides* a montré une  $IC_{50}$  de la partie aérienne, de l'extrait méthanolique qui est de  $2780 \mu\text{g/ml}$ . Cette valeur est nettement supérieure à celle trouvée avec l'extrait méthanolique d'*U. dalechampii* ( $IC_{50}$  de  $30,69 \mu\text{g/ml}$ ).

### **III.3.2. Analyse de corrélations entre les polyphénols et les activités antioxydantes**

#### **III.3.2.1. Corrélations entre les teneurs en polyphénols et l'activité antioxydante totale**

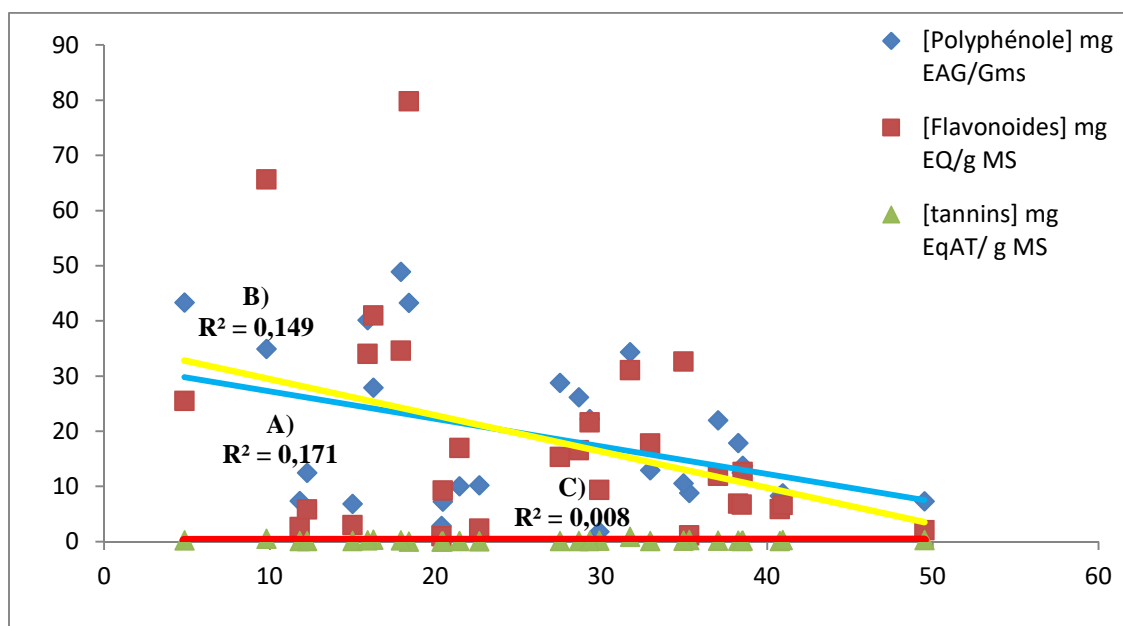
En établissant la relation entre les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tannins et la capacité antioxydante totale des différents extraits de la plante étudiée, la figure 19 montre qu'il n'y a pas de corrélation entre les teneurs en tannins et la capacité antioxydante totale ( $R^2 = 0,0823$ ), mais concernant les phénols totaux, cette relation est moyenne  $R^2 = 0,509$ . Par contre, l'activité réductrice est fortement liée à la teneur en flavonoïdes avec  $R^2 = 0,718$ .



**Figure 19** : Relation entre la capacité antioxydante totale et les teneurs en phénols totaux (A) flavonoïdes (B) et les tannins (C) d'*U.dalechampii*.

### III.3.2.2. Corrélations entre les teneurs en polyphénols et l'activité scavenger du radical DPPH•

Une corrélation a été établie entre l'efficacité antiradicalaire du radical DPPH et les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tannins des différents extraits de la plante. Les résultats obtenus ont montré, la présence d'une faible corrélation entre le pouvoir antiradicalaire contre le radical DPPH et la teneur en phénols totaux ( $R_2 = 0,171$ ) (**Figure 20**). En ce qui concerne, les flavonoïdes et les tannins, les corrélations de ces composés à piéger le radical DPPH ne représentent que 14,9% et 0,8 % où les coefficients de corrélation égalent à 0,149 et 0.008.



**Figure 20** : Relation entre la capacité antioxydante anti- radical DPPH et les teneurs en phénols totaux (A) flavonoïdes (B) et les tannins (C) d' *U.dalechampii*.

### III.3.2.3. Corrélations entre les teneurs en polyphénols et l'activité réductrice du fer

Il a été remarqué, qu'il y a une faible corrélation entre les teneurs en phénols totaux de la plante et l'activité réductrice de fer avec un  $R^2 = 0,483$  (**Figure 21**), ceci représente 48.3 % de l'activité antioxydante des composés phénoliques.

D'autre part, il a été constaté, qu'il y a une moyenne corrélation entre la capacité à réduire le fer et la teneur en flavonoïdes avec un  $R^2 = 0,561$ , alors que les tannins, ont obtenu une très faible corrélation avec  $R^2 = 0,207$ , ce qui laisse à suggérer, que la capacité réductrice du fer est due à la participation de 56,1% des flavonoïdes et 20,7% des tannins.

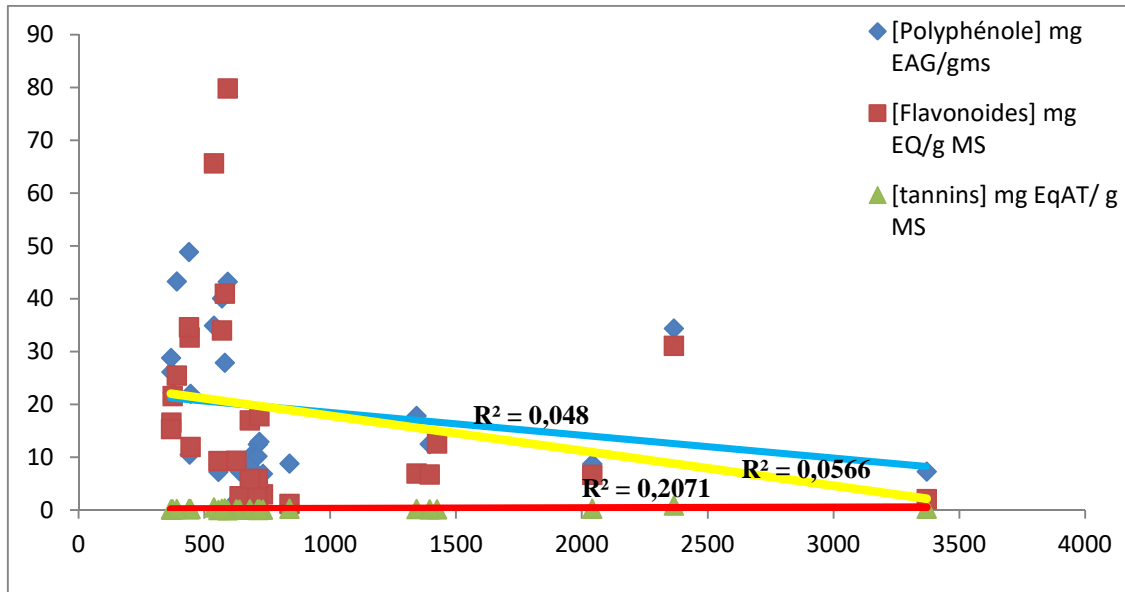


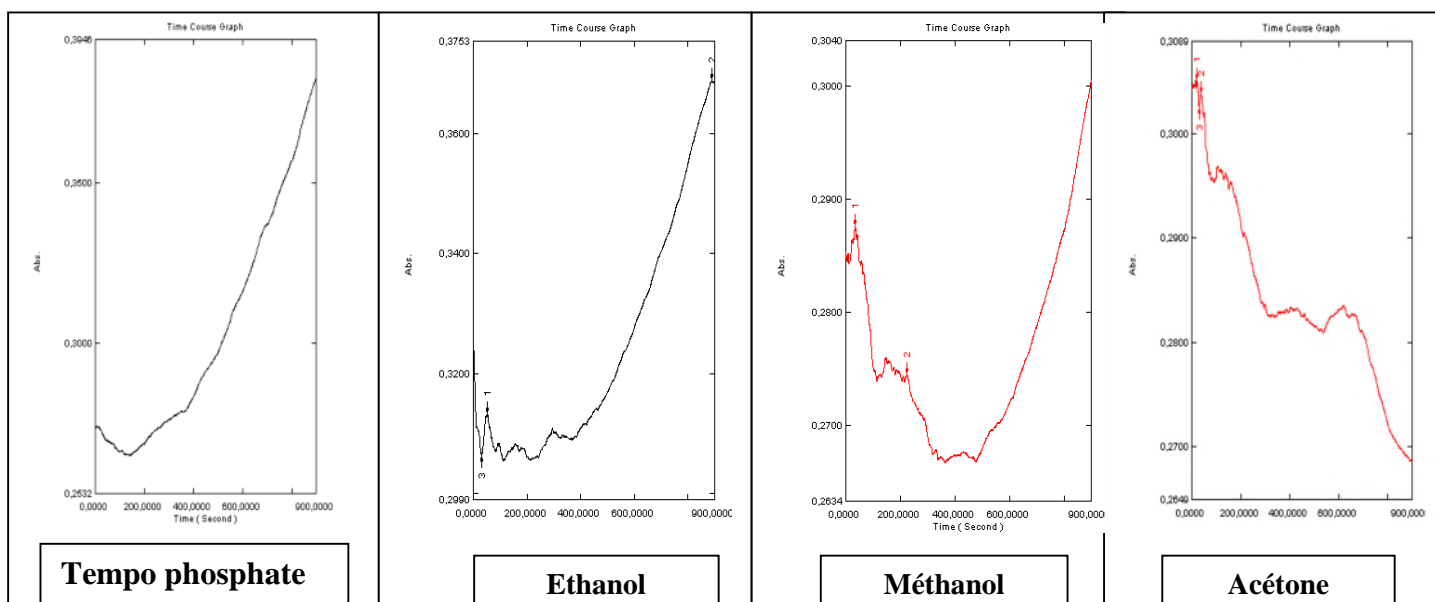
Figure 21 : Relation entre la capacité antioxydante de la réduction de fer et les teneurs en phénols totaux (A) flavonoïdes (B) et les tannins (C) d'*U.dalechampii*.

### III.4. Activité antityrosinase

#### III.4.1. Activité tyrosinase du champignon de Paris

Pour déterminer l'effet antityrosinase des extraits bruts des différentes parties d'*U. dalechampii*, nous avons opté pour la tyrosinase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) car il présente une source importante de tyrosinase (Chiara, 2012). Les conditions optimales du milieu réactionnel pour mesurer l'activité de cette enzyme dans l'extrait brut du champignon ont été préalablement mises au point. D'autres parts, pour avoir la gamme la plus large possible de concentrations d'extrait végétal à tester lors des essais de la cinétique enzymatique, l'activité de ce dernier a été mesurée en présence d'éthanol, méthanol, acétone et du tampon phosphate, car une faible solubilité aqueuse des extraits a été révélée.

Les résultats obtenus (Figure 22) ont montré que la meilleure activité de l'extrait tyrosinasique du champignon de Paris est observée dans des conditions de tampon phosphate 0.05mM, à pH 7, en présence d'une concentration de tyrosine de 3 mM. Dans ces conditions, l'activité tyrosinasique est de l'ordre de 0.020 nm /min.ml. Ces résultats sont proportionnelles à celles obtenus par Solomon *et al.*, (1996) in kim et hyama, (2005) et celles de Schurink *et al.*, (2007) et Guozi, (2011). Comme, il a été démontré expérimentalement que l'éthanol, méthanol et l'acétone exercent eux même un effet inhibiteur sur la tyrosinase.



**Figure 22 :** Variation de l'absorbance à 475 nm en fonction du temps de l'activité enzymatique de la tyrosinase durant la réaction d'oxydation de L- tyrosine (3 mM) par 100µl/ml d'extrait brut du champignon de Paris à pH 7 en présence du tampon phosphate, éthanol, méthanol et acétone.



Lors de mesure de l'activité tyrosinase à température ambiante, on a observé que la variation d'absorbance à 475nm en fonction du temps suit un profil de cinétique atypique avec une phase de latence d'environ 5 min (**Figure 22**). Ce profil enzymatique est typique des tyrosinases. En effet, la phase de latence de quelques minutes avant d'atteindre l'état stationnaire est le résultat d'une inhibition temporaire de la forme *met* de la tyrosinase par un excès de substrat monophénolique (**Nufiez-Delicado et al., 1996**).

#### III.4.2. Effet des extraits bruts sur l'activité de la tyrosinase

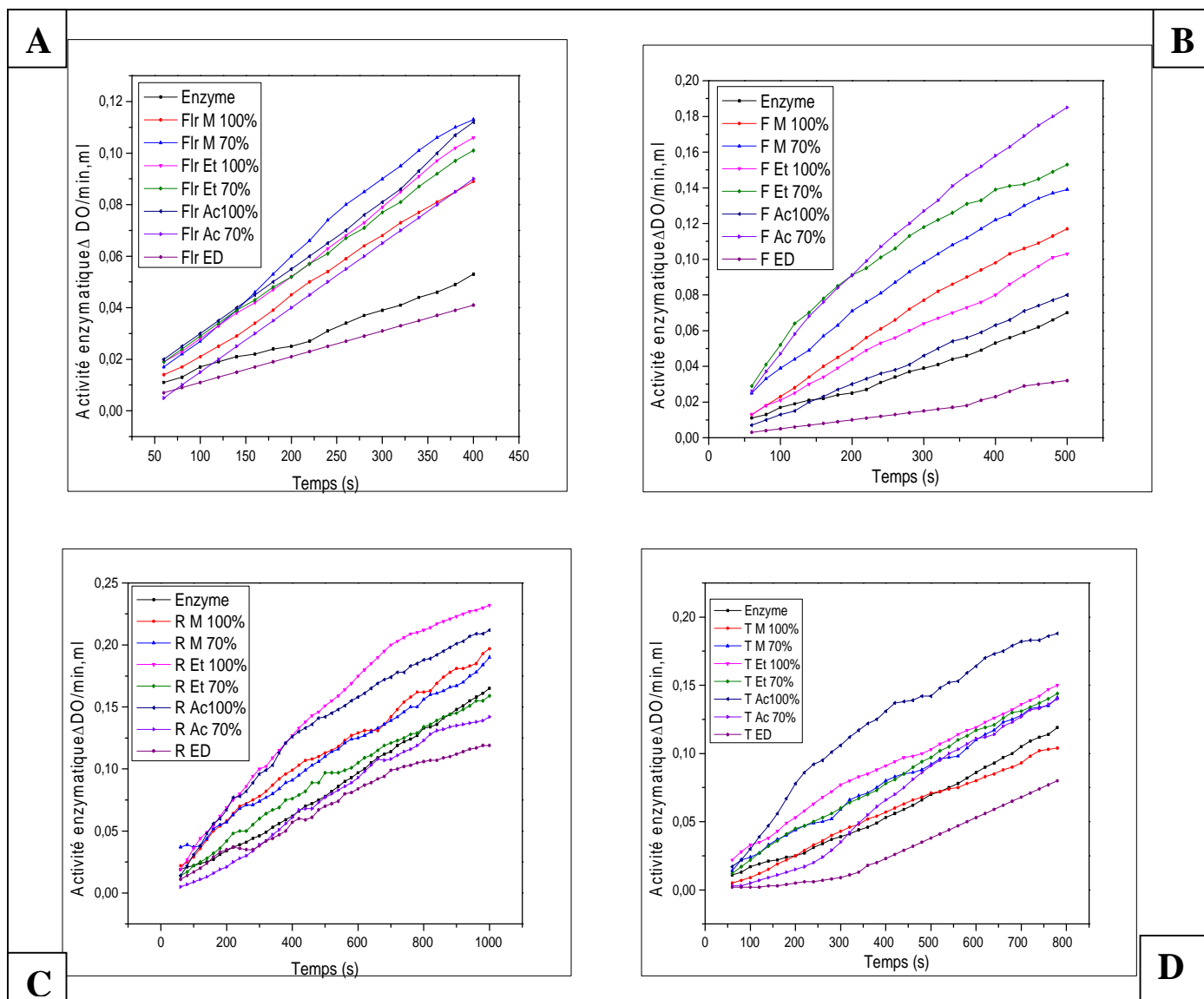
Pour évaluer l'effet des différents extraits des différentes parties d'*U.dalechampii* sur l'activité de la tyrosinase du champignon de Paris *Agaricus bisporus*, les extraits secs de cette plante ont été solubilisés dans le tampon phosphate 0.05mM, à pH 7; En effet, une faible solubilité aqueuse se révèle, souvent être un handicap pour des évaluations biologiques *in vitro* et *in vivo* (**Okombi, 2005**) et le choix du tampon phosphate comme un solvant de solubilisation de nos extraits phénoliques de la plante est optimisé expérimentalement comme un meilleur solvant pour solubiliser les extraits de la plante et/ou même sans inhibition de l'activité enzymatique, car les solvants d'extraction utilisés et d'autres solvants organiques possèdent une limite de solubilité de ces extraits avec une forte inhibition enzymatique, même à des faibles concentrations (**Bnao, 1999**). Un test préliminaire à une concentration de l'ordre de 1mg/ ml a été réalisé, les vitesses initiales en présence et en absence d'extraits de plante ont été déterminées à partir de la partie linéaire de la courbe d'absorbance en fonction du temps de la phase stationnaire. Les résultats de ce test (1mg/ml) sont résumés dans le **Tableau VI** et sont représentés sur la **Figure 23**.

A l'issu des résultats obtenus de l'activité de la tyrosinase du champignon *Agaricus bisporus* par les extraits des différentes partie d'*U. dalechampii* à la concentration de 1 mg/ml (**Tableau VI**), deux séries d'extraits ont été constatées, dont la première regroupe les extraits qui exercent un effet inhibiteur sur la cinétique enzymatique de la tyrosinase avec des pourcentages d'inhibition variables (l'extrait méthanolique et aqueux de la tige, les extraits aqueux de la feuille et de la fleur) et dans la deuxièmes série, on a constaté un effet activateur de la tyrosinase par les extraits organiques et aqueux de la racine, et les extraits organiques de tige, feuille et de la fleur.

**Tableau VI:** Effet des extraits bruts des différentes parties d'*U.dalechampii* sur l'activité tyrosinase de champignon de Paris.

Parties de plante	Solvant d'extraction	Effet sur la tyrosinase	(%) d'inhibition 1mg/ml d'extrait	Parties de plante	Solvant d'extraction	Effet sur la tyrosinase	(%) d'inhibition 1mg/ml d'extrait
<b>Racine</b>	Méthanol 100%	Activation	//	<b>Feuille</b>	Méthanol 100%	Activation	//
	Ethanol 100%	Activation	//		Ethanol 100%	Activation	//
	Acétone 100%	Activation	//		Acétone 100%	Activation	//
	Eau D 100%	Activation	//		Eau D 100%	<b>Inhibition</b>	<b>46,39</b>
	Méthanol 70%	Activation	//		Méthanol 70%	Activation	//
	Ethanol 70%	Activation	//		Ethanol 70%	Activation	//
	Acétone 70%	Activation	//		Acétone 70%	Activation	//
<b>Tige</b>	Méthanol 100%	<b>Inhibition</b>	<b>22,78</b>	<b>Fleurs</b>	Méthanol 100%	Activation	//
	Ethanol 100%	Activation	//		Ethanol 100%	Activation	//
	Acétone 100%	Activation	//		Acétone 100%	Activation	//
	Eau D 100%	<b>Inhibition</b>	<b>36,71</b>		Eau D 100%	<b>Inhibition</b>	<b>84,43</b>
	Méthanol 70%	Activation	//		Méthanol 70%	Activation	//
	Ethanol 70%	Activation	//		Ethanol 70%	Activation	//
	Acétone 70%	Activation	//		Acétone 70%	Activation	//

Ces résultats montrent également que la meilleure inhibition est représentée par l'extrait aqueux de la fleur d'*U. dalechampii* avec un rapport de 84,43 %, suivi par les extraits aqueux de la feuille et de la tige soit 46,39% et 36,71% respectivement. Ce rapport reste toutefois plus faible chez l'extrait méthanolique de la tige par rapport aux autres extraits de la plante avec un pourcentage de 22,78%.



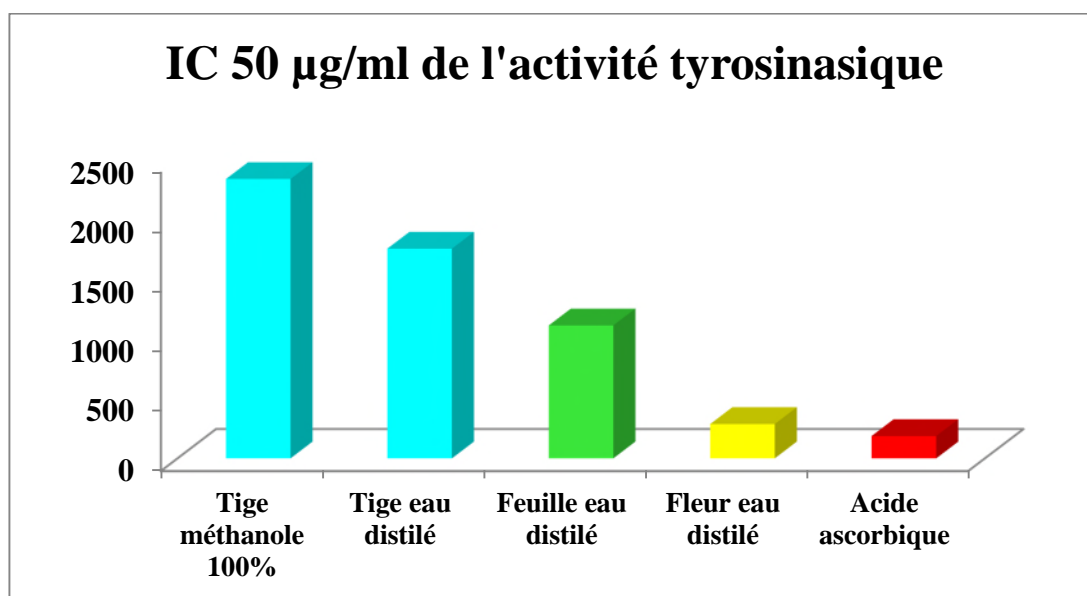
**Figure 23 :** Evaluation de l'activité enzymatique de la tyrosinase par les différents extraits des différentes parties d'*U. dalechampii* a la concentration 1mg/ml en fonction du temps avec le L- tyrosine (3 mM) par 100µl/ml d'extrait enzymatique du champignon de Paris à pH 7 en présence de tampon phosphate (0.05mM) (A) : Fleur; (B) : Feuille ; (C) : Racine ; (D) : Tige.

La forte activité inhibitrice de la tyrosinase par l'extrait aqueux de la fleur d'*Urospermum dalechampii*, peut être expliquée par la richesse de cette dernière en substances actives (composés phénoliques) inhibant l'activité de la tyrosinase. On constate que les organes de la plante les plus riches en composés phénoliques sont les organes les plus actifs.

### III.4.3. Efficacité inhibitrice de la tyrosinase par les extraits d'*Urospermum dalechampii*

Afin de se renseigner sur la puissance d'inhibition de nos extraits des différentes parties d'*Urospermum dalechampii* sur l'activité de la tyrosinase de champignon *Agaricus*

*bisporus*, nous avons testé une gamme de concentrations (250µg/ml à 5mg/ml), correspondant à chaque partie qui est déjà pourvue de l'activité antityrosinase à la concentration de 1 mg/ml. On a remarqué expérimentalement, lorsqu'on additionne un volume défini de l'extrait phénolique aux milieux réactionnels contenant de la tyrosinase et la tyrosine comme substrat, la cinétique enzymatique diminue en fonction du temps, ainsi la solution change de couleur jaune pâle au noir sombre en fonction des concentrations, suivi par une augmentation dans le pourcentage d'inhibition. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont calculées pour les différents extraits et les résultats obtenus sont illustrés dans la **Figure 24**.



**Figure 24** : Représentation des IC<sub>50</sub> de l'activité inhibitrice de la tyrosinase par les extraits par les extraits aqueux de feuille, fleur et tige et méthanolique de tige d'*Urospermum dalechampii*

Les IC<sub>50</sub> de l'activité antityrosinase des différents extraits de la plante varient entre 0,2 mg/ml à 2,5mg/ml. La **Figure 24** montre que les concentrations inhibitrices de tous nos extraits sont plus faibles que l'acide ascorbique (IC<sub>50</sub> = 0.183 mg/ml), un métabolite connu pour être un puissant inhibiteur des tyrosinases (**Jo et ses collaborateurs, 2011**). D'autre part, il est à noter que l'extrait inhibiteur le plus efficace est celui de fleur eau distillée qui présente une IC<sub>50</sub> proche à celle d'acide ascorbique et le plus faible est celui de tige méthanol 100%.

L'analyse statistique des concentrations inhibitrices de l'activité enzymatique de la tyrosinase de champignon *Agaricus bisporus* à 50 % (IC<sub>50</sub>) montre des différences hautement significatives entre les différents extraits (p <0.05) avec une forte activité enregistrée par la fleur eau distillée, suivie par la feuille eau distillée puis la tige eau distillé et tige méthanol 100%.

La forte activité inhibitrice de la tyrosinase par les extraits aqueux, peut être expliquée par la richesse de ces derniers en substances actives inhibant l'activité de la tyrosinase. Qui se caractérisent par une forte polarité car une étude qualitative des substances actives de la plante *Urospermum dalechampii* réalisée par (Giner et al., 1993) montre la richesse de cette espèce en quercétine et ses dérivées surtout glycosylées, en acides myristiques, luteoline, acide gallique, le kaempferol. Ces substances sont connues par leur forte activité inhibitrice de la tyrosinase, sachant que l'acide gallique et le kaempferol sont utilisés comme des molécules de référence de l'inhibition enzymatique de la tyrosinase par certains auteurs (Hatamnia et al., 2013).

Les composés actifs constituant l'*Urospermum dalechampii*, tels que la quercétine et le kaempferol (Giner et al., 1993) ont été identifiés comme étant de bons chélateurs de cuivre, ce qui explique l'effet inhibiteur de la tyrosinase exercé par cette plante (Hung et al., 2012). Comme on peut constater que les substances les plus polaires sont les plus puissantes dans l'inhibition de la tyrosinase car les meilleures inhibitions ont été enregistrées dans les extraits aqueux.

#### III.4.4. Analyse de corrélation entre les teneurs en polyphénols et l'activité antityrosinase

Dans le but d'établir la relation entre l'IC<sub>50</sub> de l'activité antityrosinase et les teneurs en polyphénols (phénols totaux, flavonoïdes et tannins), la Figure 25 illustre la variation d'IC<sub>50</sub> en fonction des teneurs de ces substances.

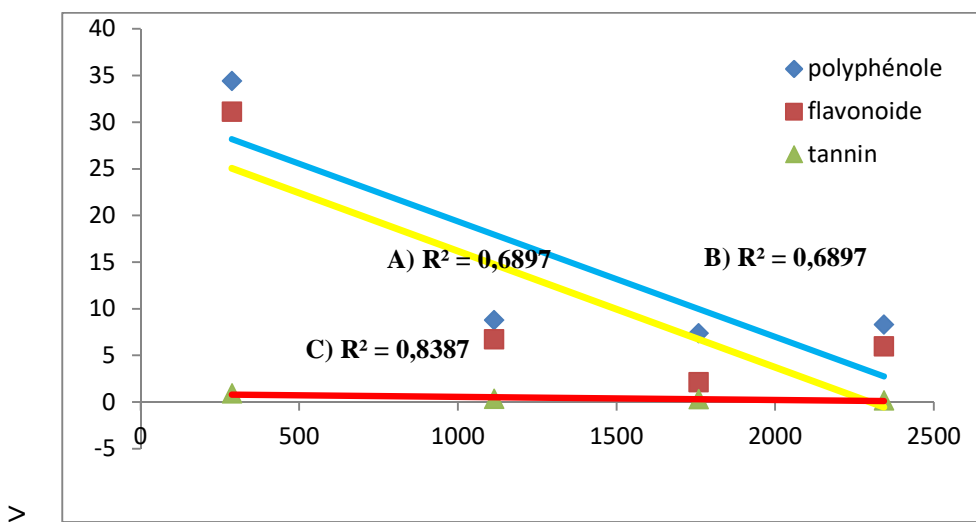
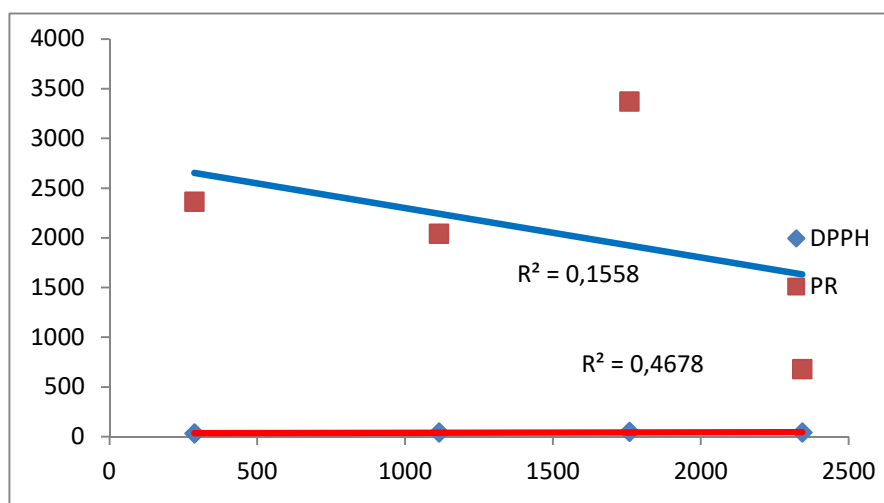


Figure 25 : Les corrélations entre les composés phénoliques (A : polyphénols ; B : flavonoïdes ; C : tannins) et les IC<sub>50</sub> de l'activité inhibitrice de la tyrosinase par les extraits d'*Urospermum dalechampii*.

Les résultats de corrélation entre les  $IC_{50}$  de l'activité de la tyrosinase et les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes montre une même et une moyenne corrélation entre l'activité antityrosinase et les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes ( $R^2 = 0.689$ ) et une très bonne corrélation avec les tannins ( $R^2 = 0.838$ ). Il semble aussi que les capacités antityrosinases des différentes parties étudiées d'*Urospermum dalechampii* soient liées à la concentration des polyphénols, ce qui confirme les données bibliographiques où la majorité des antityrosinases sont des flavonoïdes.

### III.4.5. Analyse de corrélation entre l'activité antityrosinase et l'activité antioxydante d'*Urospermum dalechampii*

La corrélation entre les  $IC_{50}$  de l'activité inhibitrice de la tyrosinase et les valeurs  $IC_{50}$  de l'activité antiradicalaire ainsi que les pourcentages de réduction du fer de l'activité antioxydante de la plante étudiée, a pour but de montrer la relation de ces deux activités avec les composés phénoliques qui réagissent soit comme antioxydants et/ou antityrosinases dans le milieu réactionnel de chaque activité (**Figure 26**).



**Figure 26** : Corrélation entre l'activité inhibitrice de la tyrosinase (AIT) et l'activité antioxydante d'*Urospermum dalechampii*.

Les résultats d'étude des corrélations entre les  $IC_{50}$  DPPH et  $IC_{50}$  pouvoir réducteur de l'activité antioxydante et  $IC_{50}$  de l'activité antityrosinase, nous permettent de déduire une forte corrélation  $IC_{50}$  DPPH et  $IC_{50}$  antityrosinase ( $R^2 = 0.767$ ) et une faible corrélation avec  $IC_{50}$  du pouvoir réducteur ( $R^2 = 0.155$ ), ce qui nous permet de suggérer la relation entre les deux activités, car le balayage du radical DPPH est réalisé par des protons ( $H^+$ ), comme on trouve le même mécanisme d'inhibition de la tyrosinase par la chélation du site actif par la formation

des complexes entre le cuivre du site actif d'enzyme et les groupements hydroxyles des polyphénols (Hung et al., 2012).

Les corrélations positives entre l'activité antioxydante et l'activité antityrosinase avec les teneurs en composés phénoliques peuvent être dues à la présence des flavonoïdes, ces derniers possèdent des propriétés antioxydantes et antityrosinases puissantes, ainsi le nombre et/ ou la position des groupes hydroxyles sur les noyaux de ces molécules, les substitutions sur les cycles B et A avec la présence de la double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C renforcent l'activité antioxydante et antityrosinase par les flavonoïdes (Cai et al., 2006).

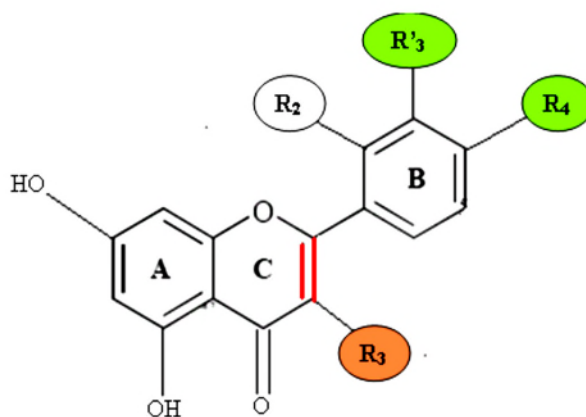


Figure 27 : Principaux éléments de l'activité antioxydant et antityrosinase des flavonoïdes (Belyagoubi, 2011).

# *Conclusion*



## Conclusion et perspectives

La présente étude avait pour objectif principal l'évaluation de l'activité antioxydante et l'activité tyrosinase des extraits des différentes parties d'*Urospermum dalechampii*. En effet, cette étude n'est qu'une approche sur la cinétique d'oxydation de phénols en quinones par la tyrosinase et éventuellement une estimation des antioxydants qui pourraient agir comme des anti-hypopigmentants.

L'analyse quantitative des différents extraits d'*Urospermum dalechampii* a révélé que cette plante est riche en polyphénols et en flavonoïdes mais pauvre en tannins.

L'étude statistique des résultats a révélé que les teneurs en composés phénoliques totaux, flavonoïdes et en tannins condensés présentaient des différences significatives qui varient en fonction des solvants d'extraction utilisés et des concentrations considérées  $P < 0,05$ . Il a été constaté que quel que soit l'organe utilisé, le rendement d'extraction obtenu avec l'eau distillée est toujours le plus élevé, à l'exception de l'extrait éthanolique (100%) qui s'est révélé le meilleur solvant d'extraction des feuilles d'*Urospermum dalechampii*. Le plus faible rendement d'extraction a été obtenu avec l'acétone 100% et cela pour les quatre parties de la plante étudiée.

Les résultats de la présente étude, ont montré que les extraits d'*Urospermum dalechampii* L ont une activité antioxydante qui varie toujours en fonction du solvant d'extraction et de la concentration ( $P < 0,05$ ).

Les extraits d'*Urospermum dalechampii* ont exercé une activité réductrice du molybdate et du fer et une activité anti radicalaire vis-à-vis du radical DPPH.

Les activités antioxydantes exercées par les extraits d'*Urospermum dalechampii* peuvent être expliquées par la richesse de cette plante en molécules antioxydantes comme les polyphénols qui sont à l'origine des bienfaits de la plante.

L'analyse statistique a montré qu'il n'y a pas de corrélation entre les teneurs en tannins et la capacité antioxydante totale ( $R^2 = 0.0823$ ) mais cette relation est moyenne avec les phénols totaux avec  $R^2 = 0.509$ . Une faible corrélation a été observée entre le pouvoir antiradicalaire contre le radical DPPH et la teneur en phénols totaux ( $R_2 = 0,171$ ). Les résultats de la corrélation ont montré que, l'activité réductrice est fortement liée à la teneur en flavonoïdes avec  $R^2 = 0.718$ .

La meilleure inhibition de la tyrosinase a été obtenue avec l'extrait aqueux des fleurs d'*U. dalechampii* avec un rapport de 84,43 %, suivis par les extraits aqueux des feuilles et des tiges soit 46,39% et 36,71% respectivement. La forte activité inhibitrice de la tyrosinase par l'extrait aqueux de la fleur d'*Urospermum dalechampii*, peut être expliquée par la richesse de cette espèce en substances actives (composés phénoliques) inhibant l'activité de la tyrosinase.

L'évaluation des activités biologiques de ces extraits notamment les activités antioxydante et tyrosinasiq, a montré une interaction entre les extraits avec les radicaux libres (DPPH) et la tyrosinase, cette interaction a eu pour conséquence, une activité anti radicalaire, et une activité antityrosinase des extraits de la plante *U. dalechampii*.

De cette étude il semblerait que la plante *U. dalechampii* constitue une bonne source de molécules bioactives à effet antioxydant et inhibiteur de la synthèse des mélanines. Il est donc intéressant de valoriser cette source végétale par l'application de ses métabolites dans les domaines cosmétiques, comme agents de dépigmentation et de pigmentation, dans les domaines agro-alimentaires, comme conservateurs de fruits et légumes, et pourquoi pas en application pharmacologique pour traiter, prévenir ou atténuer les symptômes des pathologies liées au stress oxydatif et au vieillissement cellulaire.

Pour valoriser ce travail, d'autres études plus poussées seraient nécessaires pour permettre la caractérisation qualitative, des extraits d'*U. Dalechampii*, principalement en polyphénols et en flavonoïdes. Puis identifier et isoler ces principes actifs responsables des effets antioxydants et anti-enzymatiques.

*Références  
bibliographiques*

## A

**Aeschimann D., Konrad L., Moser D.M., Theuriellat J.P. (2004).** Flora alpina. Paris: Belin :p 624.

**Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A. (2007).** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydesdismutases : rôle dans les maladies rhumatismales Reactive oxygen species and superoxidedismutases: rôle in joint diseases. *Revue du Rhumatisme*, **74**: 636–643.

**Alibert G., Ranjeva R., Boudet M.A. (1977).** Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques. *Physiol. Veg*, **15** : 279-301.

**Amit Kunwar K.I ., Priyadarsini. (2011).** Free radicals, oxidative stress and importance of antioxydants in human health, **1** (2): 53-60.

## B

**Bayer E., Buttler K., Finkenzeller X., Grau J. (1990).** Guide de la flore méditerranéenne. Paris : Delachaux et Niestlé, p236.

**Bechami S. (2016).** Les polyphénols de *Teucrium fruticans* et leurs activités antioxydantes et antimicrobienne. Thèse de Magister de biochimie et biotechnologie. *Université A/MIRA de Bejaia*. Faculté des sciences de la nature et de la vie, p13.

**Bijoy M., Jayati S., Prabir K.S. (2008).** Antioxydant activities of soybean as affected by Bacillus-fermentation to Kinema. *Food Res. Int*, **1**: 586-593.

**Beddou F. (2015).** Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius L.* et *Anvillea radiata Coss.* et *Dur.* Thèse de Doctorat en biologie cellulaire et biochimie. *Université Abou Beker Belkaid*. Faculté des sciences de la nature et de la vie et science de la terre et de l'univers.

**Beloued A. (1998).** Etymologie des noms de plantes de bassin méditerranéen. Alger :Office des publications universitaire, p87.

**Belyagoubi B.N. (2011).** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de Doctorat en biologie. *Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen*. Faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers.

**Bonnaillie C., Salacs M., Vassilova E., Saykova I. (2012).** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea L.*). *Revue de génie industriel*, **7** : 35-45.

**Brambilla D., Mancuso C., Scudril M.R., Bosco P., Cantarella G., Lempereur L., Benedetto G.D., Pezzino S et Bernardini R. (2008).** The Role of Antioxidant Supplement in Immune System, Neoplastic and Neurodegenerative Disorders: a point of view for an Assessment of the risk/benefit Profile. *Nutrition Journal*, **7(29)**: 1-6.

## C

**Chaher N. (2006).** Activités antioxydantes et antiradicalaires des extraits de deux plantes médicinales \**Pistacia lentiscus* et *Fraxinus angustifolia*\*. Thèse de magistère de biochimie et biophysique moléculaire. *Université A/MIRA de Bejaia*. Faculté des sciences de la nature et de la vie, p103.

**Chang M.S., Teo S.S. (2016).** Evaluation of heavy metal, antioxidant and anti-tyrosinase activities of red seaweed (*Eucheuma cottonii*). *International Food Research Journal*, **23(6)**: 2370-2373.

**Chang T.S. (2009).** An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, **10**: 2440-2475.

**Chiara G. (2012).** Biochemical and structural characterization of the copper containing oxidoreductases catechol oxidase, tyrosinase, and laccase from ascomycete fungi. *VTT Science*, **16**: 124.

**Cho Y.K., Ahn H.K. (1999).** Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. Purification and properties. *Journal of Food Biochemistry*, **23**: 577-592.

## D

**Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. (2006).** Antioxydant activity of some plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*, **97**(4): 654-660.

## E

**El-Amier Y.A., Al-hadithy O.N., Abdullah T.J. (2016).** Antioxydant and antimicrobial activity of different extracts obtained from aerial parts of *Urospermum picroides* (L.) F.W. from Egypt. *Journal of Advanced Chemical Sciences*, **2**(3): 299-301.

**El-Haci I.A., Bekhechi C., Atik-Bekkara F., Mazari W., Gherib M., Bighelli A., Casanova J., Tomi F. (2014).** Antimicrobial activity of *Ammodaucus leucotrichus* fruit oil from Algerian Sahara. *Natural Product Communication*, **9**(5): 711-712.

## F

**Falleh H., Ksouri R., Abdely C. (2007).** Activité antioxydante et contenu on polyphénols dans les différents organes de l'artichaut sauvage, *Cynara cardunculus*. *Revue des Régions Arides*, **1**: 341-344.

**Fan Y., Flurkey W.H. (2004).** Purification and characterization of tyrosinase from guI tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry*, **65**: 671-678.

**Favier A. (2003).** Le stress oxidant. Intérêt conceptuel et experimental dans la comprehension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.

## G

**Gardès A.M ., Bonnefont D.R ., Abedinzadeh Z., Jore D. (2003).** Espèce réactive de l'oxygène : comment l'oxygène peut –il devenir toxique .*L'actualité chimique*, 91-95.

**Garon D.,Jean-christophe G. (2014).**Biodiversité et évolution du monde végétal.France :edp science, p182.

**Ghedira K. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Pharmacognosie*, **4**: 162-169.

**Giner R.M., Recio M., Cuellar M.J., Manez S., Peris J.B., Stubing G., Mateu I., Rios J.L. (1993).** A Taxonomical study of the subtribe *leontodontinae* based on the distribution of phenolic compounds. *Biochem.Syst. Ecol*, **21**: 613–616.

**Goudable J., Favier A. (1997).** Radicaux libre oxygène et antioxydants. Nutrition clinique et métabolisme, **11**(2) :115-120.

**Gouzi. M. H. (2011).** Etude des propriétés du polyphénol oxydase (EC 1. 14. 18. 1) du champignon de Paris (*Agaricus bisporus* J.E Lange Imbach). Thèse de doctorat. *Université Abou BekrBelkaïd-Tlemcen*, p79.

## H

**Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul A.F. (2004).** Polyphénols des végétaux, source, utilisation et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif .*phytothérapie*, 3-9.

**Haliwell B., Gutteridge J.M.C. (1989).** Biology and Medicine. Oxford: Free Radicals in Claenton, p543.

## J

**Janovitz-Klapp A.H., Richard F.C., Nicolas J. (1989).** Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistr*, **28**: 2903-2907.

**Janovitz-Klapp A.H., Richard F.C., Goupy P.M., Nicolas J.J. (1990).** Inhibition studies on apple polypheno Oxidase. *J. Agric. Food Chemistry*, **38**: 926-931.

## K

**Kebieche M. (2009).** Activité biochimique des extraits flavonoidiques de la plante *Ranunculus repens L* : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. Thèse de Doctorat en biochimie. *Université Mentouri Constantine*. Faculté des sciences de la nature et de la vie.

**Kim Y.J., Uyama H. (2005).** Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell. Mol. Life Sci*, **62**: 1707-1723.

**Kumar S.V., Saritha G., Fareedullah M.d. (2012).** Role of antioxidants and oxidative stress in cardiovascular diseases Fareedullah. *Annals of Biological Research*, **1** (3): 158-173.

## L

**Lacaille-Dubois M.A et Wagner H. (1996).** Importance pharmacologique des dérivés polyphénoliques. *Acta Botanica Gallica*, **143** : 1432-1454.

## M

**Mahendra Kumar C., Sathscha U.V., Dharmech S., Appu Rao A.G., Singh S.A. (2011).** Interaction of seamol (3, 4-methylenedioxyphenol) with tyrosinase and its effect on melanin synthesis. *Biochimie*, **93**: 562-569.

**Mauric N. (2000).** Jardin Encyclopidie. [www.plantencyclo.com](http://www.plantencyclo.com).

**Mendes E., Perry M.J., Francisco A.P. (2014).** Design and discovery of mushroom tyrosinase inhibitors and their therapeutic applicatons. *Expert Opin. Drug Discov*, **9**(5): 533-554.

## N

**N'Guessan A.H.O., Dago Déliko C.E., Mamyrbékova-Békro Y.A. (2011).** Teneurs en composes phénoliques de dix plantes médicinales employées dans la tradithérapie de l'hypertension artérielle, une pathologie émergente en Cote d'Ivoire. *Revue de génie industriel*, **6** : 55-61.

**Nufiez-Deicado. E, Bru. R, Sénchez-Ferrer. A, Garcia-Carmona. F. (1996).** Triton X-114-aided purification of latent tyrosinase. *Journal of Chromatography*, **680**: 105-112.

**Nitsch J.P., Nitsch C. (1961).** Synergistes naturels des auxinex et des giberellines. *Bull. Soc. Fr*, **26**: 2237-2240.



## O

**Okombi S. (2005).** Recherche et étude de molécules à activité antityrosinase et leur utilisation comme agents dépigmentants en dermocosmétique. Thèse de Doctorat, *Université Joseph Fourier, Grenoble*.

## P

**Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O. (2008).** Mseur et utilisation des antioxydants en médecine humaine. *Medi Spher*, **73** :1-4.

**Price M.L., Vanscoyoc S., Butler G. (1978).** Article evaluation of vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. I-Agric. *Food Chemistry*, **26**: 1210-1218.

## R

**Ramdani M., Lograda T., Chalad P., Figuredo G., Laidoudi H., Ounoughi A. (2014).**Chemical composition, Antimicrobial activity and chromosome number of *Urospermum dalechampii* from Algeria. *Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP)*, **3**(6): 477-482.

## S

**Sarni-Manchado P., Chaynier V. (2006)** .Les polyphénols en agroalimentaire .Ed. Tec & Doc Paris, p2-10.

**Schurinka. M, Willem. J. H, Berkel. V, Wichers. V.J,Boeriu. C.G. (2007).** Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity, peptides, **28**: 485–495.

**Solomon. E.I,Sundaram. U.M, Machonkin. T. E. (1996).** Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Reu*, **96**: 2563-2605.

**Swain T., Hills W.E. (1959).** The phenolics constituents of *prunusdomestica*. I. The quantitative analysis of phenolics constituents. *J. Sci. Food Agr*, **10** : 63-68.

## T

**Tacchini P., Schriener N. (2005).** Le stress oxydatif et les antioxydants. Flaire Flow Europe. N°ISBN : 2 :7380-1069.

**Tessier F., Marconnet P. (1996).** Radicaux libre système antioxydants et exercices. *Sci sport*, **10** : 1-3.

## V

**Van Gelder.,C.W.G., Flurkey W-H.,Whichers H-J. (1997).** Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinase. *Phytochemistry*, **45**: 1309-1323.

## W

**Whitaker J.R. (1995).** Polyphenol oxidase. In: WONG, D.W.S. (Ed) *Food enzymes: Structure and Mechanism*. New York: Chapman and Hall, 271-307.

## Z

**Zhao G.R., Xiang Z.J., Ye T.X., Yaun Y.J., Guo Z.X. (2006).** Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. *Food chemistry*, **99**(4): 767-774.

**Zheng Z.P., Cheng K.W., Chao J., Wu J, Wang M. (2008).** Tyrosinase inhibitors from paper mulberry (*Broussonetiapapyrifera*). *Food Chemistry*, **106**: 529–535.



# *Glossaire*

*Termes botaniques*

- ❖ **Akène** : Fruit sec qui ne s'ouvre pas à maturité. Ce type de fruit contient le plus souvent une seule graine.
- ❖ **Graine** : Structure provenant de la maturation de l'ovule fécondé chez les spermatophytes.
- ❖ **Vivace** : Est une plante pouvant vivre plusieurs années. Elle subsiste l'hiver sous forme d'organes spécialisés souterrains protégés du froid et chargés en réserve (racines, bulbes, rhizomes).
- ❖ **Dressé** : Qualifie un élément plus ou moins perpendiculaire au sol.
- ❖ **Velue** : Couvert de poils longs, mous et rapprochés.
- ❖ **L'inflorescence** : Est la disposition des fleurs sur la tige d'une plante à fleur.
- ❖ **Floraison** : Est le processus biologique de développement des fleurs. Elle est contrôlée par l'environnement (lumière, humidité, température) et les phytohormones. Dans la nature, la floraison est contrôlée par le phénomène d'induction florale.

# *Annexes*

## **Annexe I : matériels et réactifs utilisés.**

### **Matériels**

- Bain-marie (MEMMERT).
- Balance de précision
- Etuve (BINDER, BD 53).
- Plaque chauffante agitatrice (VELP Scientifica).
- Spectrophotomètre UV-visible VIS-723 G.
- Tamiseur électrique.
- Vortex.
- Agitateur magnétique (RAYPA AG5).
- Broyeur électrique.
- Papier filtre.
- PH mètre (HANNA, PH210).
- Réfrigérateur (Condor).

### **Solvants**

- Méthanol 100 %, Ethanol 100%, Acétone 100%, Eau distillée 100%, Méthanol 70%, Ethanol 70%, Acétone 70%.

### **Réactifs**

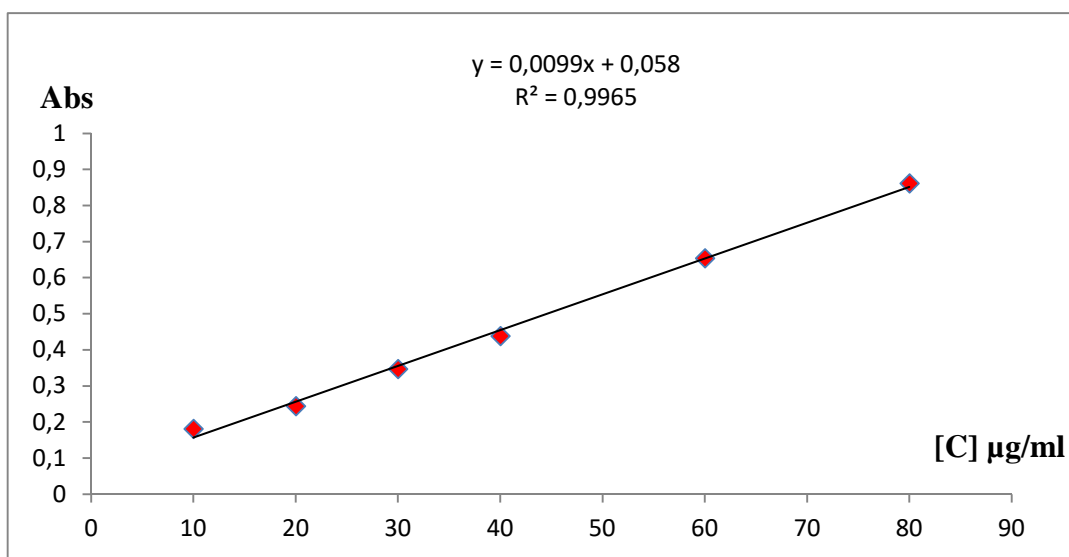
Les réactifs chimiques utilisés dans cette étude sont :

- Réactif de Folin-Ciocaltu.
- DPPH.
- Quercétine.
- Carbonate de sodium à 7.5 %.
- Acide gallique.
- Chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$  à 2%).
- La vanilline.
- Acide tannique.
- Acide sulfurique (0,6 M).
- Phosphate de sodium (28Mm).
- Molybdate d'ammonium (4mM).
- Acide ascorbique.
- Ferricyanure de potassium [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] (1%).
- L'acide trichloracétique (10%).
- $\text{FeCl}_3$ .

- L-tyrosine (3mM).

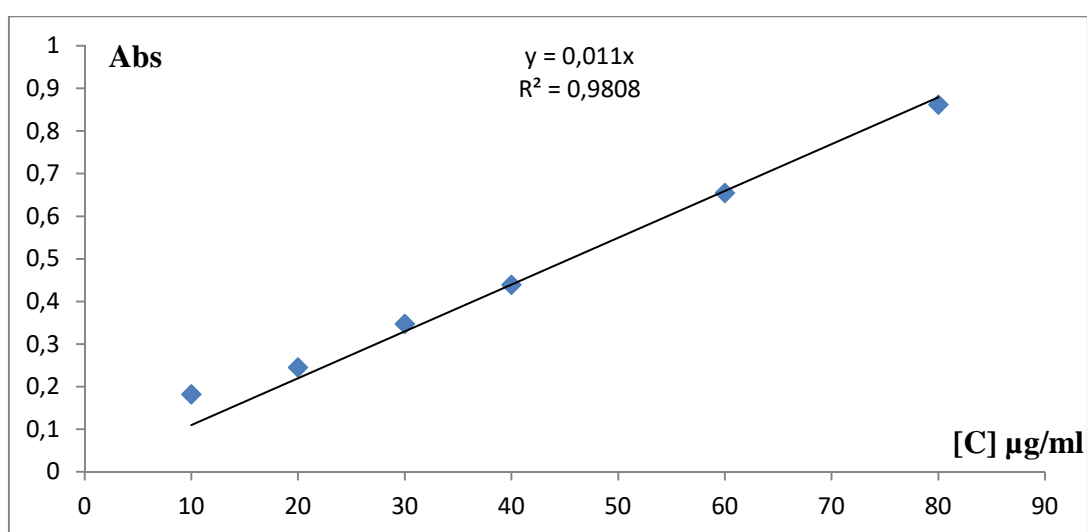
## Annexe II : Courbes d'étalonnages.

- Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux (référence l'acide gallique).



**Figure 1 :** Variation de l'absorbance à 760 nm en fonction de la concentration de l'acide gallique.

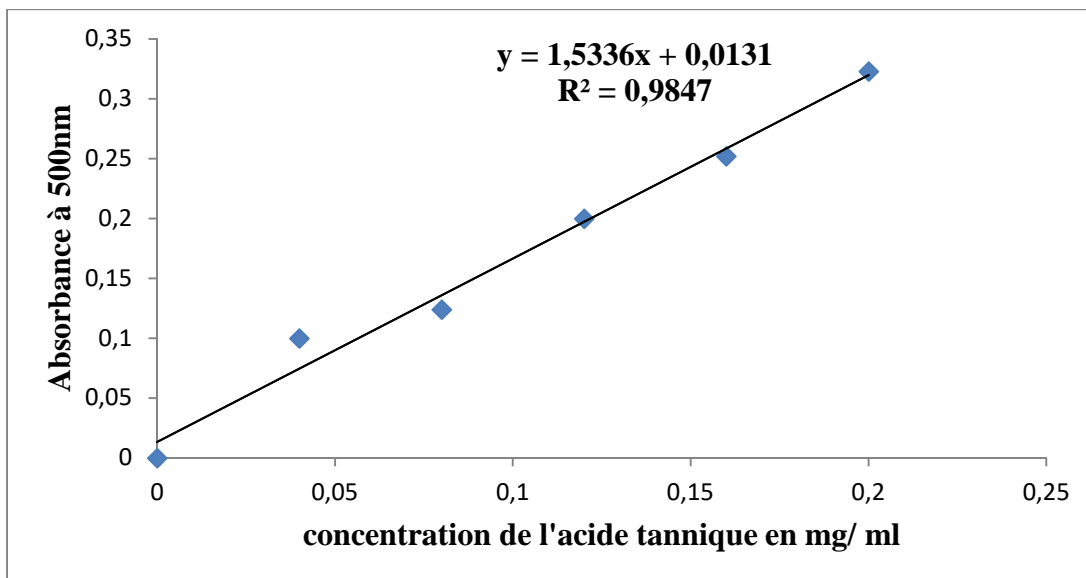
- Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes (référence quercétine).



**Figure 2 :** Variation de l'absorbance à 430 nm en fonction de la concentration de la quercétine.

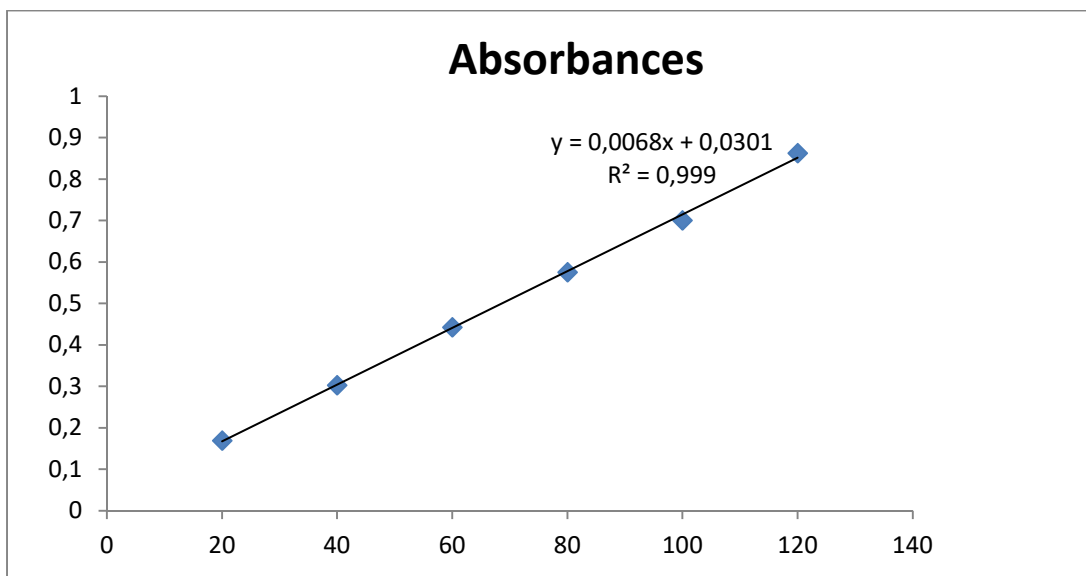


- Courbe d'étalonnage pour le dosage des tannins condensés (référence l'acide tannique).



**Figure 3 :** Variation de l'absorbance à 500 nm en fonction de la concentration de l'acide tannique.

- Courbe d'étalonnage pour l'évaluation de l'activité antioxydante totale (référence l'acide ascorbique).



**Figure 4 :** Variation de l'absorbance à 695 nm en fonction de la concentration de l'acide ascorbique.



## Résumé

Les plantes médicinales possèdent une grande importance pour la santé des individus et des communautés en général. Le présent travail porte sur une étude de la teneur des différents antioxydants (polyphénols, flavonoïdes, tannins condensés), et l'activité antioxydante et enzymatique des différents extraits d'*Urospermum dalechampii*.

Dans cette recherche, sept solvants (méthanol 100%, éthanol 100%, acétone 100%, eau distillée, méthanol 70%, éthanol 70%, acétone 70%) ont été utilisés pour l'extraction des composés phénoliques par épuisement. Le meilleur rendement a été obtenu avec l'extrait aqueux de la fleur. L'analyse phytochimique a montré que l'extrait hydrométhanolique est le meilleur extracteur des phénols totaux, tandis que l'extrait éthanolique possède la capacité d'extraire plus de tannins et de flavonoïdes. La fleur d'*U. dalechampii* a montré les teneurs les plus élevées en ces composés.

L'évaluation, *in vitro*, de l'activité antioxydante des différents extraits bruts d'*U. dalechampii* a été réalisée par trois méthodes, à savoir : la capacité antioxydante totale (CAT), le pouvoir réducteur de fer, le piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH $\cdot$ ). Ces extraits ont présenté des activités anti radicalaires et anti oxydantes intéressantes, dépendantes du contenu en polyphénols totaux et en flavonoïdes. Pour la capacité antioxydante totale, le meilleur résultat a été enregistré par l'extrait aqueux d'*U. dalechampii*, alors que l'activité scavenger du radical DPPH et la capacité réductrice du fer ont enregistré la valeur la plus élevée dans l'extrait acétonique et l'extrait hydrométhanolique respectivement.

Les extraits des différentes parties de la plante *U. dalechampii* ont présenté des activités inhibitrices, la plus efficace est marquée par l'extrait aqueux de la fleur, et des activités activatrices de la tyrosinase de champignon *Agaricus bisporus*.

**Mots clés :** *Urospermum dalechampii*, composés phénoliques, activité antioxydante, tyrosinase, activité enzymatique.

## Abstract

Medicinal plants have great importance for the health of individuals and communities in general. The present work deals with a study of the content of the various antioxidants (polyphenols, flavonoids, condensed tannins), and the antioxidant and enzymatic activity of the various extracts of *Urospermum dalechampii*.

In this research, seven solvents (100% methanol, 100% ethanol, 100% acetone, distilled water, 70% methanol, 70% ethanol, 70% acetone) were used for the extraction of the phenolic compounds by exhaustion. The best yield was obtained with the aqueous extract of the flower. Phytochemical analysis showed that the hydromethanol extract is the best extractor of total phenols, whereas the ethanolic extract has the capacity to extract more tannins and flavonoids. The flower of *U. Dalechampii* showed the highest levels of these compounds.

Evaluation, *in vitro*, of the antioxidant activity of the various crude extracts of *U. Dalechampii* was carried out by three methods, namely: total antioxidant capacity (CAT), iron reducing power, trapping of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH $\cdot$ ). These extracts exhibited interesting anti-radical and antioxidant activities, dependent on the content of total polyphenols and flavonoids. For the total antioxidant capacity, the best result was recorded by the aqueous extract of *U. Dalechampii*, whereas the scavenger activity of the DPPH radical and the reducing capacity of iron recorded the highest value in the acetone extract and the hydromethanol extract respectively.

The extracts of the different parts of the *U. dalechampii* plant showed inhibitory activities, the most effective of which was marked by the aqueous extract of the flower and the activating activities of the fungus tyrosinase *Agaricus bisporus*.

**Key words:** *Urospermum dalechampii*, phenolic compounds, antioxidant activity, tyrosinase, enzymatic activity.