

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE
MICROBIOLOGIE ET DE BIOCHIMIE



DOMAINE: SCIENCE DE LA NATURE DE LA VIE
FILIERE: SCIENCES BIOLOGIQUES
OPTION: BIOCHIMIE APPLIQUEE

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master Académique

Présenté

Par

Bennouna Fawzia

Dehimi Souhir

Intitulé

**Activité antioxydante de l'extrait méthanolique
d'une plante médicinale
"Phlomis crinita"**

Soutenu devant le jury composé de :

BOUDJELAL Amel

Pr

Encadreur

BENKHALED Abderrahim

MCA

Examineur

REGGAMI Yassine

MCA

Examineur

Année universitaire: 2020 /2021

Remerciements

Au début, nous remercions Allah Tout-Puissant qui nous a aidé et nous a donné la force et la patience de faire ce travail.

*Nous remercions également nos parents pour leur soutien et leur patience. Nous adressons nos sincères remerciements au professeur **Boudjelal Amal** pour la supervision de notre mémoire et pour nous avoir donné l'opportunité d'avoir un travail pratique.*

*Nos remerciements vont aussi à **Sarra Chabane** et **Faiza Baali** pour leurs présences et aide.*

Notre gratitude va aux membres du jury d'avoir accepté d'examiner notre modeste travail, ainsi qu'aux enseignants du Département de Biochimie et Microbiologie sans oublier tous les ingénieurs de laboratoire.

Bennouna fauzia & Dehimi souhir

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à

*Mes parent "Aldjia" et "Djamal", votre affection, vos
prières et votre de joie de vivre sont mon courge tout au
long de mes études*

*A tout mes ami(e) de promotion et de la cité universitaire
et toutes mes connaissances*

*Mon cher binôme Souhir et l'autre binôme Inas et
Nadjma pour les bons moments avec vous, et sans oublier
leurs familles*

Bennouna fauzia



Dédicace

*Je dédie ce travail À ceux qui m'ont pris la main et
m'ont fourni un moyen d'apprendre, et ils m'ont aidé,*

Mes chers parents

Mon père : « Belkacem » et ma mère: « salima »

*Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien
tout le long de mes études.*

A mes Sœurs et mes Frères, À mes Amis

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour

*A Mon cher binôme fauzia avec qui j'ai partagé mes
bons moments, sans oublier sa famille.*

Dehimi Souhir



RÉSUMÉ

Notre étude est basée sur l'étude de la composition et l'évaluation de l'activité anti oxydante de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Phlomis crinita*, une plante médicinale de la pharmacopée traditionnelle de la région Hodna (M'sila). Les tests phytochimiques et la chromatographie sur couche mince ont révélé la présence de principes actifs, en particulier les polyphénols et les flavonoïdes. Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes est réalisé par la méthode de Folin Ciocalteu et les chlorures d'aluminium $AlCl_3$ respectivement. Les résultats obtenus indiquent une teneur de 135.54 ± 0.78 µg équivalent d'acide gallique/ mg d'extrait sec et 43.88 ± 1.02 µg équivalent quercétine/ mg d'extrait sec. L'extrait méthanolique a montré une forte activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical libre DPPH avec une IC_{50} de 22.90 ± 0.15 µg/mg, comparable à celle du standard BHT DE 18.80 ± 0.31 µg/ml.

ABSTRACT

Our study is based on the study of the composition and the evaluation of the antioxidant activity of the methanolic extract of the aerial part of *Phlomis crinita*, a medicinal plant from the traditional pharmacopoeia of the Hodna region (M'sila). Phytochemical tests and thin layer chromatography revealed the presence of active ingredients, in particular polyphenols and flavonoids. The determination of total polyphenols and flavonoids is carried out by the method of Folin Ciocalteu and aluminum chlorides $AlCl_3$ respectively. The results obtained indicate a content of 135.54 ± 0.78 µg equivalent of gallic acid / mg of dry extract and 43.88 ± 1.02 µg equivalent of quercetin / mg of dry extract. The methanolic extract showed strong / mg, comparable to that of the BHT standard DE 18.80 ± 0.31 µg / ml.

ملخص:

تتعمد دراستنا على دراسة التركيب وتقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الميثانولي للجزء الجوي من *Phlomis crinita*، وهو نبات طبي من دستور الأدوية التقليدي في منطقة الحضنة (المسيلة). (كشفت الاختبارات الكيميائية النباتية وكروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة عن وجود مكونات نشطة، خاصة البوليفينول و الفلافونويد. يتم تحديد مجموع البوليفينول و الفلافونيدات بطريقة Folin Ciocalteu و كلوريد الألومنيوم $AlCl_3$ على التوالي. النتائج التي تم الحصول عليها تشير إلى محتوى 135.54 ± 0.78 ميكروغرام من حمض الجاليك / ملغ من المستخلص الجاف و 43.88 ± 1.02 ميكروغرام ما يعادل كيرسيتين / ملغ من المستخلص الجاف. أظهر المستخلص الميثانولي نشاطاً قوياً مضاداً للجذور الحرة ضد الجذور الحرة DPPH مع IC_{50} من 22.90 ± 0.15 µg / mg، مقارنةً بمعيار BHT DE 18.80 ± 0.31 µg / ml

Sommaire

Listes des abréviations	8
Liste des tableaux.....	9
Liste des figures	10
Introduction.....	1
Chapitre I. <i>Phlomis crinita</i>	2
I.1. Description botanique.....	2
I.2. Position systématique	2
I.3. Utilisations traditionnelles	3
I.4. Composition chimique.....	3
Chapitre II. Stress oxydant et radicaux libres	4
II.1. Stress oxydant	4
II.2. Les radicaux libres	4
II.2.1. Les espèces oxygénées actives (EOA)	4
II.2.2. Les espèces azotées actives (EAA)	4
II.3. Les sources des radicaux libres	5
II.3.1. Les sources exogènes	5
II.3.2. Les sources endogènes	5
II.4. Les antioxydants.....	5
II.4.1. Les antioxydants enzymatiques.....	5
II.4.2. Les antioxydants non enzymatique	5
Chapitre III. Matériel et méthodes	6
III.1. Matériel végétal	6
III.2. Les méthodes	6
III.2.1. Préparation des extraits	6
III.2.1.1. Préparation de l'infusé	6
III.2.1.2. Préparation de l'extrait méthanolique	6
III.2.2. Rendement de l'extraction.....	6
III.2.3. Études phytochimiques	6

2.3.1. Réactions de mise en évidence	7
III.2.3.1.1. Les tanins	7
III.2.3.1.2. Les saponosides	7
III.2.3.1.3. Les coumarines	7
III.2.3.1.4. Les anthocyanes	7
III.2.3.1.5. Les flavonoïdes	7
III.2.3.1.6. Les polyphénols	7
III.2.3.2. La chromatographie sur couche mince (CCM).....	8
III.2.3.3. Dosage des polyphénols totaux.....	9
III.2.3.4. Dosage des flavonoïdes totaux.....	9
III.2.4. Évaluation de l'activité antioxydante	9
III.2.4.1. Test de piégeage de radical libre DPPH	9
Chapitre IV. Résultats et discussion	11
IV.1 Rendement de l'extraction.....	11
IV.2. Études phytochimiques.....	11
IV.2.1.Réactions de mise en évidence	11
IV.2.2. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	12
IV.2.3. Taux de polyphénols totaux.....	13
IV.2.4. Taux de flavonoïdes totaux.....	14
2.5. Activité antioxydante : test DPPH	15
Conclusion	16
Références bibliographiques.....	17

Listes des abréviations

DPPH : Un radical libre stable.

DPPH : 1.1-Diphényl -2-picrylhydrazyl.

EAO: Espèce oxygénée activée.

EAA: Espèce azotée activée.

ERO: Espèces réactive de l'oxygène.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

Rf : Rapport finale.

EAG : Équivalent en acide gallique.

EB : extrait brut.

EQ : Équivalent en quercétine.

IC50 : Concentration de l'échantillon fournissant 50% d'inhibition.

BHT : Butylated hydrox toluène.

R2 : Coefficient de corrélation.

ES : extrait sèche.

Liste des tableaux

Tableau1: Les systèmes solvants de la chromatographie sur couche minces.....	8
Tableau2: Résultats des tests phytochimique	11
Tableau3 : Les résultats de la chromatographie sur couche mince de l'extrait méthanolique de <i>Phlomis crinita</i>	12
Tableau 4: Résultats de test DPPH des extraits de <i>P.crinita</i>	15

Liste des figures

Figure 1: Image de <i>Phlomis crinita</i>	2
Figure 2: Sch éma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive ...	10
Figure 3: Courbe d' étalonnage de l'acide Gallique	13
Figure 4: Courbe d' étalonnage de la quercétine.	14

Introduction

Introduction

Depuis long temps ,l'homme utilise les plantes comme source de nourriture et de médicaments (**Fuinel, 2002**).Aujourd'hui, les plantes médicinales jouent un rôle très important et possèdent des propriétés pharmacologiques très intéressantes (**Belgaid et al., 2013**). L'intérêt pour ces plantes est du a la présence de métabolites secondaires comme les polyphénols et les flavonoïdes (**Ngene et al., 2015**).Ces métabolites sont principalement doués de propriétés anti oxydantes et leurs capacités a prévenir et inhiber les dommages oxydatifs cellulaires(**Ojeil et al., 2010;Uttara et al., 2009**,).

En Algérie les plantes médicinales sont utilisées depuis longtemps. Cette tradition s'inspire des expériences des populations ainsi que de la médecine arabe classique.

La région de M'sila en particulier est très riche en cette flore médicinal, qui récemment, a attiré l'attention de nombreux chercheurs. Parmi ces plantes, on cite le *phlomis* a joué un rôle déterminant et essentiel dans la découverte de médicaments naturels(**Amor et al. 2009**).

Le genre *Phlomis* est largement utilisé pour soigner les Inflammations et les rhumatismes.(**Kabouche, et al., 2004**).

L'objectif de notre étude est l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Phlomis crinita*.

La démarche poursuivie dans la réalisation de ce travail consiste à faire:

- Une extraction solide-liquide pour obtenir l'extrait méthanolique.
- Un criblage phytochimique de quelques substances bioactives.
- Une chromatographie sur couche mince.
- Un dosage des polyphénols et des flavonoïdes.
- Une évaluation de pouvoir antioxydant de l'extrait méthanolique par d'espèce par le piégeage de radical DPPH.

Chapitre I. *Phlomis crinita*

I.1. Description botanique

Le genre *Phlomis* appartient à la famille des Lamiacées. Il compte plus de 100 espèces dont 4 poussent en (Quezel et Santa, 1963).

Phlomis crinita, (Figure 1) est une plante vivace à feuilles cordiformes basales, à fleurs triangulaires sessiles. Les tiges dressées varient en longueur de 50 à 100 cm et les inflorescences sont lâches (Adjoudj et Latreche, 2017).



Figure 1: Image de *Phlomis crinita* (Source Google).

I.2. Position systématique

La position systématique de *Phlomis crinita* est (Quezel et Santa, 1963):

Règne

Plantae

Sous-r ègne	Tracheobionta
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Magnolipophyta
Sous classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Phlomis</i>
Esp èce	<i>Phlomis Crinita</i>

En Algérie, le nom vernaculaire de la plante diffère d'une région à une autre : Kayat El Adjarah, Faseouan, Tarseouan, Iniji, R'ilef et Azaref (**Zaabat et al., 2010**).

I.3. Utilisations traditionnelles

En Algérie, le genre *Phlomis* est largement utilisé en médecine traditionnelle comme anti-inflammatoire. Il est aussi utilisé pour soigner les rhumatismes (**Kabouche et al., 2004**). *Phlomis crinita* est utilisé en tant que colle, comme cicatrisante pour traiter les brûlures, les lésions et les infections de la peau et les allergies (**Liolios et al., 2007**). Et aussi pour blessures (**Yamina, 2021**).

I.4. Composition chimique

Les extraits de *Phlomis crinita* sont riches en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les phényl éthanoides ou phénylpropanoides, les iridoides et les terpénoïdes (**Dellai et al., 2009**). La plante contient aussi des huiles essentielles riches en sesquiterpènes (**Amor et al., 2009**).

Chapitre II. Stress oxydant et radicaux libres

II.1. Stress oxydant

Le stress oxydant est un déséquilibre de la balance entre la production des espèces radicalaires et la capacité de l'organisme de les neutraliser par les antioxydants (**Durand et al., 2011**).

La production d'espèces réactives de l'oxygène est utile mais peut être néfaste pour l'organisme lors d'une production excessive et en l'absence de mécanismes de défense. Celui-ci peut favoriser la survenue de pathologies (cancers, maladies cardiovasculaires, maladies dégénératives) ainsi qu'un vieillissement prématuré (**Belaïh et al., 2016**).

II.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques contenant un électron non apparié dans son orbitale externe, conférant une instabilité avec un pouvoir oxydant ou réducteur élevé les faisant réagir avec d'autres molécules pour atteindre la stabilité chimique (**Gutiérrez-Salinas et al., 2014**). Les principales catégories de radicaux libres sont (**Si Merabet et al., 2017**):

- Les espèces oxygénées actives (EOA)
- Les espèces azotées actives (EAA)

II.2.1. Les espèces oxygénées actives (EOA)

Les espèces oxygénées actives comprennent l'oxygène singulet (O_2), l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'ozone (O_3) (**Halliwell et Gutteridge, 2015**).

II.2.2. Les espèces azotées actives (EAA)

Les espèces azotées actives incluent le peroxy-nitrite ($ONOOH$), formé par la réaction entre $O_2^{\cdot-}$ et NO^{\cdot} , de la forme ($ONOOH$) agent oxydant causant des dommages avec le HO^{\cdot} (**Barus, 2008**), et le monoxyde d'azote (NO), formé par la NO synthétase par oxydation des azotes terminaux de l'acide aminé L-Arginine. NO^{\cdot} peut réagir avec des radicaux libres, comme la réaction avec H_2O_2 , à la formation de nitrite (NO_2^-) ou de nitrate (NO_3^-) (**Jour d'heuil et al., 1997**).

II.3. Les sources des radicaux libres

II.3.1. Les sources exogènes

Les sources de radicaux libres exogènes sont multiples et peuvent être représentées par l'exposition aux ultra violet, aux ultrasons, à des champs magnétiques, aux métaux lourds, aux agents cancérogènes, au stress, à la pollution, ainsi qu'à la consommation d'alcool, à la prise de médicaments, au tabagisme ... (Favier, 2003 ; Richard, 2013)

II.3.2. Les sources endogènes

La production des ERO dans les cellules des mammifères découle de plusieurs réactions engagées dans les mécanismes physiologiques (respiration mitochondriale), dans les mécanismes pathologiques (inflammation, infection) et les allergies (Krishnaa *et al.*, 2010).

Les sites de génération de radicaux libres englobent principalement la mitochondrie, Le Peroxysome, la xanthine oxydase et la NADPH oxydase (Ahmed et Ahmed, 2012 ; Maghzal *et al.*, 2012 ; Ihoul *et al.*, 2018).

Pour neutraliser ces espèces oxygénées actives, l'organisme fait appel à des antioxydants.

II.4. Les antioxydants

Les antioxydants sont des substances capables d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats par les espèces réactives, les antioxydants peuvent être soit enzymatique soit non enzymatique (Amrouche et Taleb, 2017).

II.4.1. Les antioxydants enzymatiques

Ce sont des enzymes telles que superoxydes dismutase, glutathion peroxydase et catalase, ou des protéines comme la ferritine, transferrine, céruloplasmine et albumine. Ces molécules sont élaborées par l'organisme avec l'aide de certains minéraux. A cela s'ajoutent aussi quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (Mika *et al.*, 2004).

II.4.2. Les antioxydants non enzymatique

Ce sont des molécules exogènes, largement rencontrées dans les aliments telles que les fruits et légumes, pour prévenir les oxydations. Ces aliments sont riches en vitamines C et E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque (Wang *et al.*, 2003).

Chapitre III. Matériel et méthodes

III.1. Matériel végétal

La partie aérienne de la plante *Phlomis crinita* a été récoltée de la région de Boussaâda wilaya de M'sila, Le matériel végétal a été séché à l'ombre dans un endroit sec et a été puis broyé et conservé à l'abri de la lumière et de la chaleur jusqu'à son utilisation.

III.2. Les méthodes

III.2.1. Préparation des extraits

III.2.1.1. Préparation de l'infusé

Une infusion de 10 g de la poudre de *Phlomis Crinita* dans 100 ml d'eau bouillante est réalisée pendant 15 min. Après refroidissement et filtration, le filtrat obtenu est totalement séché

III.2.1.2. Préparation de l'extrait méthanolique

Introduire 30 g de poudre de plante dans une cartouche poreuse du dispositif soxhlet, puis introduire 500 ml du méthanol pure dans un ballon. Le ballon est chauffé à 45 °C, l'extraction se poursuit durant 06 heures (Bimakr et al., 2011). L'extrait méthanolique obtenu est récupéré à la fin de l'extraction, filtré à l'aide de papier Whatman. Le solvant d'extraction est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif (BÜCHI-R-120). L'extrait sec récupéré est stocké à 4 °C jusqu'à son utilisation (Othman et al., 2017).

III.2.2. Rendement de l'extraction

Le rendement de l'extraction a été calculé en pourcentage par rapport à la masse sec du plante selon la formule suivante (Muniyandi et al., 2019) :

$$\text{Rendement \%} = (\text{Mext}/\text{Mech}) \times 100$$

Ou :

- **Mext:** Masse de l'extrait sec en g.
- **Mech:** Masse de la plante en g.

III.2.3. Études phytochimiques

Les grandes familles de métabolites secondaires ont été recherchées dans l'extrait de la plante suivant les méthodes classiques de caractérisation. Les groupes chimiques ont été caractérisés par des réactions colorées et de précipitations en tube et par la chromatographie en couche mince ainsi que le dosage des polyphénols et des flavonoïdes.

2.3.1. Réactions de mise en évidence

III.2.3.1.1. Les tanins

La présence des tanins est mise en évidence en mélangeant 5 ml de l'infusé de la plante à 1 ml d'une solution aqueuse de FeCl₃ à 1 %. L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleu-verte indique la présence des tanins (**Edeoga et al., 2005**).

III.2.3.1.2. Les saponosides

5 ml de l'infusé de la plante sont bien mélangés avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 min. La formation d'une mousse persistante après 15 mn confirme la présence des saponosides (**Karumi, 2004**).

III.2.3.1.3. Les coumarines

1 g de la poudre de plante est mis dans un tube à essais qui est recouvert avec un papier imbibé d'une solution de NaOH. Le tube est placé dans un bain-marie pendant quelques minutes, puis on ajoute 0,5 ml de NH₄OH (10%), on met deux taches sur un papier filtre et on examine sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines (**Rizk et al., 1982**).

III.2.3.1.4. Les anthocyanes

Quelques gouttes d'ammoniaque dilué au un demi sont ajoutés à 5 ml de l'infusé. La réaction donne une coloration bleue en présence d'anthocyane (**Rizk et al., 1982**).

III.2.3.1.5. Les flavonoïdes

5 ml de l'infusé sont mélangés avec quelques gouttes d'HCl concentré, puis on ajoute quelques milligrammes de magnésium. La présence flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge ou orange (**Karumi, 2004**).

III.2.3.1.6. Les polyphénols

La détection des polyphénols est réalisée en mélangeant quelques gouttes de chlorhydrique à 5ml de l'infusé, l'apparition d'une coloration rouge confirme la présence des polyphénols (**Rizk et al., 1982**).

III.2.3.2. La chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une méthode de séparation physico-chimique, elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption basée sur les différences d'affinité des substances à analyser à l'égard de deux phases, la phase stationnaire et la phase mobile. La séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur adsorption et leur désorption sur la phase stationnaire, soit de leur différente solubilité dans chaque phase (**Konate, 2011**).

Les plaques utilisées sont des plaques en gel de silice, de 0.25 mm d'épaisseur. La phase mobile est constitué par un mélange de solvants organiques. 05 systèmes solvants ont été testés pour les meilleures séparations des extraits de *Phlomis crinita* selon le tableau suivant :

Tableau1: Les systèmes solvants de la chromatographie sur couche minces.

	Système solvant	Proportion (v/v)
Système 01	Chloroform /Méthanol	10 /2
Système 02	Acétate d'éthyl /Ac formique / Eau	8/1/1
Système 03	Acétate d'éthyl /Ac acétique/Eau	8/1/1
Système 04	Acétate d'éthyl /Méthanol /Eau	7/1.5/1.5
Système 05	Acétate d'éthyl /Méthanol /Eau	100/13/10

Le rapport frontal(Rf) est calculé selon l'équation suivant (**Togola et al., 2019**):

$$R_f = h/H$$

Ou :

- **H:** hauteur de plaque CCM (distance totale).
- **h:** hauteur de tache (distance parcourue).

III.2.3.3. Dosage des polyphénols totaux

Les teneurs totales en composés phénoliques de l'extrait méthanolique ont été évaluées en utilisant le réactif de Folin Ciocalteu (Hamadou et al., 2018). Pour cela, 200 µl de l'extrait méthanolique *Phlomis crinita* sont mélangés avec 1 ml de Folin Ciocalteu (10 fois dilué) et agités. Après incubation à température ambiante et dans l'obscurité, 800 µl de carbonate de sodium Na₂CO₃ (75 g/l H₂O distillé) sont ajoutés. Après agitation et incubation pendant 2 heures, l'absorbance est mesurée à 765 nm (Li et al., 2007). Les résultats sont exprimés en milligramme Équivalent Acide Gallique par gramme d'extrait brut (mgEAG/gEB). L'acide gallique est utilisé comme standard. Les essais sont réalisés en triplicata.

III.2.3.4. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes dans l'extrait a été déterminée en utilisant la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl₃). Cette méthode basée sur la fixation des ions Al³⁺ sur les atomes d'oxygène, présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes qui donne des complexes de couleur jaune (Bahorun et al., 1996).

1 ml d'extrait est mélangé à 1 ml d'AlCl₃ à 2%; le mélange est vigoureusement agité. L'ensemble est incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 10 minutes, l'absorbance est lue à 430 nm. La quercétine est utilisée comme standard et les résultats sont exprimés en milligramme d'Équivalent de Quercétine par gramme d'Extrait (Mg EQ/g E). Les essais sont réalisés en triplicata (Yaici et al., 2019).

III.2.4. Évaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont disponibles pour évaluer, *in vitro*, l'activité antioxydante des extraits de plantes. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans un milieu réactionnel. Le potentiel antioxydant de l'extrait méthanolique de *Phlomis crinita* a été évalué par le test de piégeage au DPPH.

III.2.4.1. Test de piégeage de radical libre DPPH

Le test DPPH est largement employé pour évaluer l'activité anti-oxydante. Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl est un radical libre, stable et caractérisé par une couleur violette dont l'intensité est mesurée à 515 nm. La substance antioxydante agit en transférant un électron ou un atome d'hydrogène ce qui conduit à la réduction du DPPH au cours de la réaction et à un changement de coloration jaune pâle. Ce passage, de la première forme à la deuxième, est accompagné d'une diminution de l'absorbance qui peut exprimer le pourcentage de réduction de DPPH selon la figure 2 (Addab et al., 2020).

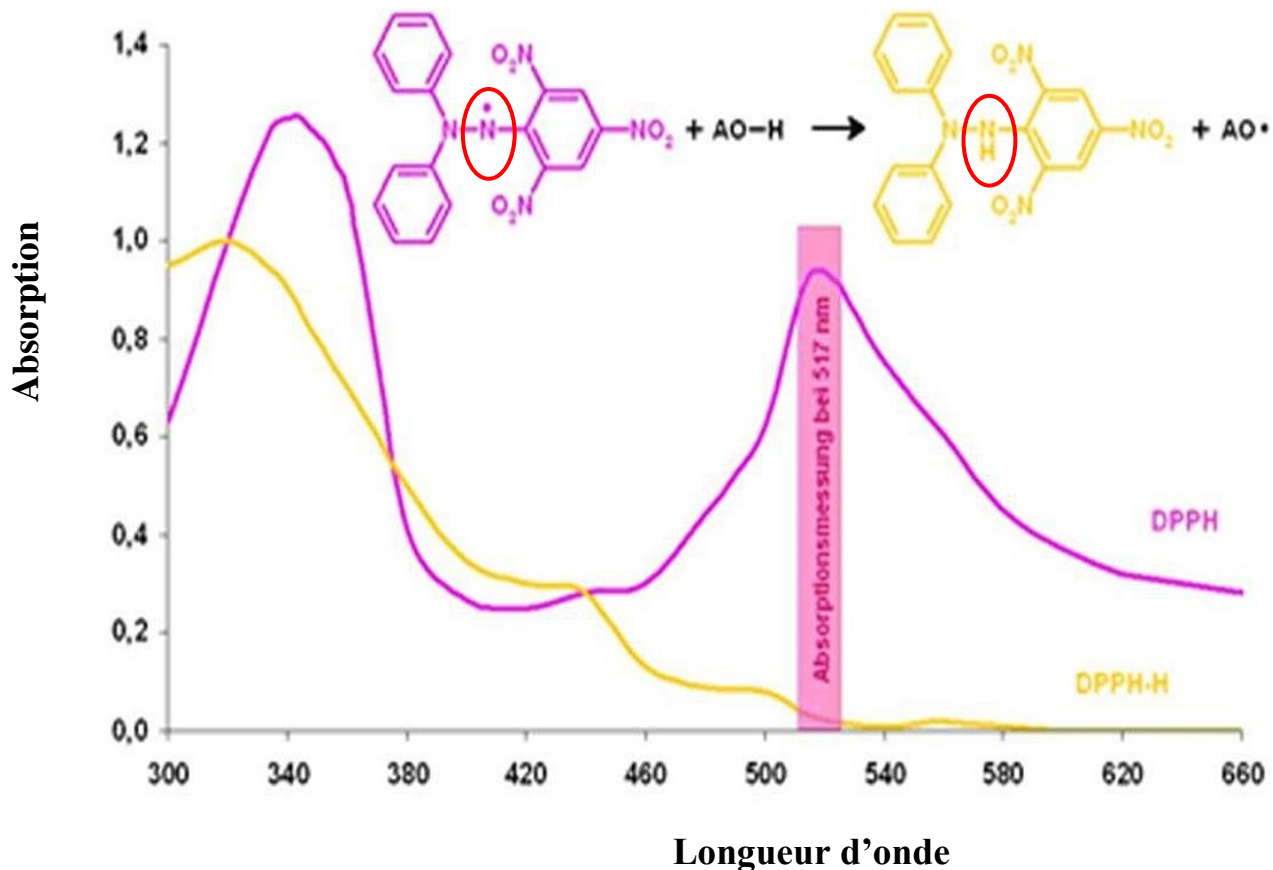


Figure 2: Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive
(Matkowski *et al.*, 2008).

Ce test est réalisé selon le protocole décrit par Li, Hao *et al.* (2009). Un volume de 1.5 ml de l'extrait méthanolique à différentes concentrations a été mélangé avec 0.5 ml de DPPH (0.1 mM). Le mélange est laissé à température ambiante dans l'obscurité pendant 30 min et l'absorbance est lue à 517 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (I %) estimée selon l'équation suivante :

$$(I\%) = [(Ac - As) / Ac] \times 100$$

Où :

- **Ac** : l'absorbance de contrôle négatif.
- **As** : l'absorbance de l'échantillon avec le DPPH.

L'IC₅₀ (la concentration qui correspond à 50% d'inhibition) est calculée en traçant des pourcentages d'inhibition par rapport aux concentrations de l'échantillon. Le butyle

hydroxytoluène (BHT) est utilisé comme standard. Toutes les mesures ont été effectuées en triple.

Chapitre IV. Résultats et discussion

IV.1 Rendement de l'extraction

L'extraction en continue a été réalisée en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction qui permet d'obtenir un extrait brut. Cette extraction a donné un rendement de 16% en matière sèche. Le résultat obtenu est proche de celui obtenu par Boudehane, Bouchefifa *et al.* (2019) de 15,35 %, cette légère différence peut être due à la méthode d'extraction et la masse de plante sèche.

IV.2. Études phytochimiques

IV.2.1. Réactions de mise en évidence

Les tests de caractérisation basés sur des réactions de précipitation et de coloration ont permis d'identifier qualitativement les principaux groupes de composés actifs. Ces tests colorimétriques sont basés sur l'interaction de certaines fonctions avec les réactifs utilisés. La lecture des résultats se fait selon l'intensité de la coloration :

- Une réaction fortement positive est représentée par : +++
- Une réaction moyennement positive est représentée par : ++
- Une réaction faiblement positive est représentée par : +
- Une réaction négative est représentée par : –

Les résultats des réactions de mise en évidence réalisés sur l'infusé ou la poudre de plante sont présentés dans le tableau suivant:

Tableau2: Résultats des tests phytochimique

Constituants chimiques	Poudre/Infusé
Tanins	+++
Saponosides	-
Coumarines	-
Anthocyanes	-
Flavonoïdes	+++
Polyphénols	+

absence- : présence+

Les résultats des tests préliminaires indiquent la présence de plusieurs composés actifs tels que flavonoïdes, tannins et polyphénols avec absence des coumarines, anthocyanines et saponosides. L'intensité de la couleur observée indique la richesse de l'extrait aqueux en flavonoïdes et tannins. Ces résultats sont comparables avec ceux de Boudehane, *et al.* (2019) qui indiquent la richesse de l'extrait en flavonoïdes et tannins.

IV.2.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La Chromatographie sur Couche Mince est une méthode de séparation très rapide et efficace. L'extrait a subi une séparation selon un système de solvant spécifique. Les chromatogrammes résultants comportent une série de spots. L'identification des composés est basée sur la comparaison des Rf avec les taches des étalons Acide Gallique et Quercetine testés dans les mêmes conditions expérimentales. Les résultats de cette analyse sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3: Les résultats de la chromatographie sur couche mince de l'extrait méthanolique de *Phlomis crinita*

Les systems	Nombre des taches	Rf
Système solvant 01	01 tache	0.96
		0.20
Système solvant 02	04 taches	0.54
		0.73
		0.78
		0.47
Système solvant 03	05 taches	0.52
		0.61
		0.92
		1.00
		0.16
Système solvant 04	05 taches	0.32
		0.37
		0.42
		0.85
		0.15
Système solvant 05	06 taches	0.22
		0.42
		0.59
		0.77
		0.90

L'observation des plaques CCM indique la présence de taches qui peuvent correspondre à plusieurs classes de métabolites secondaires.

Par le biais du système Acétate d'éthyl /Méthanol /Eau (100/13/10), l'extrait méthanolique analysé montre la présence de 06 taches ou 06 composés de différent Rf. En comparaison avec les Rf des standards, deux taches correspondent à l'acide gallique et la quercétine.

Il est préférable d'employer des mélanges de solvants organiques approprié avec l'eau, sachant que la majorité des polyphénols ne sont pas hydrosolubles. L'eau augmente la solubilité des flavonoïdes, et elle dépend du nombre de groupement du poids moléculaire et de la longueur de la chaîne carbonée du squelette de base (Oufaida et al., 2019).

IV.2.3. Taux de polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux, en Équivalent d'Acide Gallique, de l'extrait méthanolique est déterminé par la méthode de Folin-Ciocalteu. Une courbe d'étalonnage est tracée avec un extrait d'Acide Gallique à différentes concentrations; des mesures de la densité optique pour chaque extrait est réalisé à 765 nm. (Figure 3).

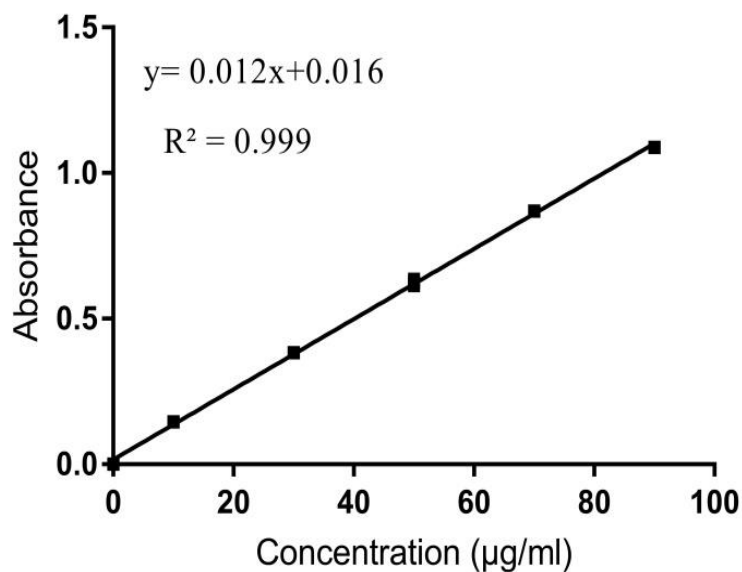


Figure 3: Courbe d'étalonnage de l'acide Gallique

La teneur en phénols totaux de l'extrait méthanolique de *Phlomis crinita* obtenue était de 135.54 ± 0.78 µg EAG /mg ES.

En Algérie Merouane, Saadi et al. (2019) ont rapporté une teneur totale en composés phénoliques de l'extrait méthanolique des feuilles et des fleurs de 153.46 ± 1.36 µg EAG/mg ES et 81.33 ± 2.29 µg EAG/mg ES. Ces résultats sont différents et sont en relation avec la composition de la plante en polyphénols. Cette différence peut être due à l'origine de la plante ainsi que les

conditions climatiques qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols (Cheynier *et al.*, 2013).

IV.2.4. Taux de flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes a été quantifiée par le dosage direct grâce au trichlorure d'aluminium en utilisant la quercétine comme standard (Figure 4). Elle est exprimée en mg EQ/g d'extrait sec.

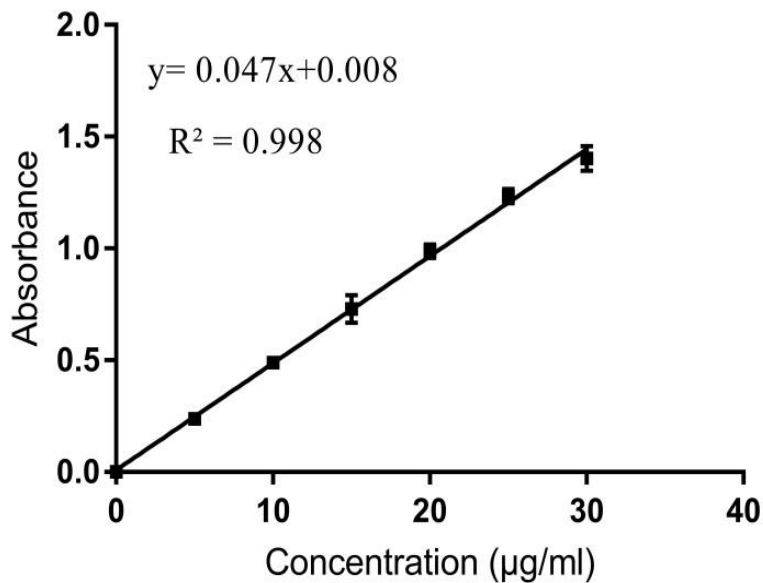


Figure 4: Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Les résultats de ce dosage ont montré que l'extrait méthanolique de la partie aérienne de la plante renferme des teneurs intéressantes en flavonoïdes de 43.88 ± 1.02 µg EQ /mg ES. Selon les données de la littérature, la teneur en flavonoïdes totaux varie pour la même plante en fonction du solvant d'extraction et de la région de provenance. Merouane, Saadi *et al.* (2019) ont rapporté des teneurs variables en flavonoïdes allant de 53.84 ± 0.24 µg QE/mg (feuilles) à 14.86 ± 0.21 µg E/mg (fleurs).

Plusieurs études ont rapportées la richesse du genre *Phlomis* en flavonoïdes. (Amor *et al.*, 2009; Kabouche *et al.*, 2005).

2.5. Activité antioxydante : test DPPH

Le test DPPH est l'un des tests les plus utilisés à cause de sa simplicité et sa reproductibilité. Une faible valeur d'IC₅₀ indique une forte activité antioxydante (Baali et al., 2019). Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 4.

Tableau 4: Résultats de test DPPH des extraits de *P. crinita*

Extrait/Standard	IC ₅₀ (µg/ml)
Extrait méthanolique	22.90±0.15
BHT	18.80±0.31

Chaque valeur représente la moyenne ±SD (n=3)

L'extrait méthanolique de *Phlomis crinita* a présenté une capacité de piégeage des radicaux libres avec une IC₅₀ comparable à celle du standard BHT (22.90±0.15 µg/ml et 18.80±0.31 µg/ml respectivement).

Nos résultats sont bien meilleurs que ceux obtenus par (Merouane et al., 2019) ayant trouvé une activité antiradicalaire de la même plante avec des IC₅₀ qui varient de 47.78 ± 1.12 µg/mL, (feuilles) à 90.85 ± 1.04 µg/mL (fleurs).

La neutralisation des radicaux libres est l'un des principaux mécanismes par lesquels les polyphénols exercent leur activité antioxydante (Belščak-Cvitanović et al., 2018). Cette activité dépend du nombre et de la position des groupes hydroxyle dans le composé testé. Le piégeage d'un radical libre est réalisé par un don d'atomes d'hydrogène ou le transfert d'un électron (Shahidie et al., 2015).

Conclusion

Un grand nombre de plantes médicinales possède des propriétés biologiques et pharmacologiques très intéressantes. Ces plantes trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient du fait que ces plantes médicinales sont très riches en métabolites secondaires. Ces derniers sont une source non négligeable d'antioxydants naturels. Les antioxydants ont un rôle important dans la prévention des plusieurs pathologies.

La présente étude a permis de mettre en évidence la présence dans l'extrait méthanolique de *Phlomis crinita*, certains métabolites secondaires tels que les tanins, les flavonoïdes et les polyphénols et l'absence de coumarines, anthocyanes et saponosides.

La présence de certains polyphénols et flavonoïdes a été confirmée par la chromatographie sur couche mince. La comparaison des R_f des spots de l'extrait méthanolique avec les R_f des standards a indiqué la présence de l'acide gallique (acide phénolique) et de la quercétine (flavonoïde).

Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux a montré l'extrait méthanolique de la partie aérienne de la plante renferme des teneurs intéressantes en flavonoïdes de $43.88 \pm 1.02 \mu\text{g EQ/mg ES}$.

L'extrait méthanolique de *Phlomis crinita* a présenté une capacité de piégeage des radicaux libres avec une IC₅₀ comparable à celle du standard BHT. Cette activité antioxydante similaire à l'antioxydant standard est due à la richesse de la plante en flavonoïdes.

Bien que cette étude soit préliminaire, des investigations supplémentaires sont nécessaires pour connaître la composition qualitative et quantitative des métabolites secondaires de la plante. Différents tests d'activités antioxydantes peuvent être utilisés pour corréler la richesse de la plante avec son potentiel antioxydant.

Références bibliographiques

1. Addab, Y., M. K. Kini, B. Courtois, A. Savan, A. Ludwig, N. Bozzolo, C. Scheu, G. Dehm and D. Chatain (2020). "Microstructure evolution and thermal stability of equiatomic CoCrFeNi films on (0001) α -Al₂O₃." Acta Materialia**200**: 908-921.
2. Adjoudj, A. and A. Latreche (2017). "Autecology, Soil Characteristics and Floristic Study of *Phlomis crinita* Cav. Habitat: A Rare Phytotaxon of the Mounts of Tessala (Western Algeria)." South Asian Journal of Experimental Biology**7**(6): 248-254.
3. Ahmed, B. and R. Ahmed (2012). "Modeling urban land cover growth dynamics using multi-temporal satellite images: a case study of Dhaka, Bangladesh." ISPRS International Journal of Geo-Information**1**(1): 3-31.
4. Amor, I. L.-B., J. Boubaker, M. B. Sgaier, I. Skandrani, W. Bhourri, A. Neffati, S. Kilani, I. Bouhleb, K. Ghedira and L. Chekir-Ghedira (2009). "Phytochemistry and biological activities of *Phlomis* species." Journal of ethnopharmacology**125**(2): 183-202.
5. Amrouche, F. and S. Taleb (2017). Activité antioxydante et anti-Inflammatoire des extraits bruts de deux plantes: *Phlomis bovei* et *Verbascum sinuatum*, Université Mouloud Mammeri.
6. Baali, F., Boumerfeg, S., Napoli, E., Boudjelal, A., Righi, N., Deghima, A., . . . Roberto, G. (2019). "Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils from Two Wild Algerian Medicinal Plants: *Mentha pulegium* L. and *Lavandula stoechas* L". Journal of Essential Oil Bearing Plants**22**(3): 821-837.
7. Bahorun, T., B. Gressier, F. Trotin, C. Brunet, T. Dine, M. Luyckx, J. Vasseur, M. Cazin, J. Cazin and M. Pinkas (1996). "Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations." Arzneimittelforschung**46**(11): 1086-1089.
8. Barus, C. (2008). "Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieux homogène et biphasique-Application aux produits dermocosmétiques". thèse de doctorat en génie des procédés et environnement. Université Toulouse III-Paul Sabatier: 235.
9. Belaïch, R. and S. Boujraf (2016). "Facteurs inflammatoires et stress oxydant chez les hémodialysés: effets et stratégies thérapeutiques." Médecine des maladies Métaboliques**10**(1): 38-42.
10. Belgaid, S. and L. Chikhoun (2013). Etude de l'activité microbienne et antifongique des extraits du *phlomis bovei* de noé-préparation d'une forme pharmaceutique, UMMTO.
11. Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., & Komes, D. (2018). "Overview of polyphenols and their properties *Polyphenols: Properties, recovery, and applications*". Elsevier: 3-44.

12. Bimakr M, Abdul Rahman R, Taip F, Ganjloo A, Salleh L, Selamat J, Hamid A, Zaidu I. (2011) Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata L.*) leaves. Food and Bioproducts processing : 67–72.
13. Boudehane, E., F. Bouchefifa, N. Desdous and H. E. Boutennoun (2019). Screening phytochimique et activité antioxydante de quelques plantes médicinales, Université de Jijel.
14. Cheynier, V., G. Comte, K. M. Davies, V. Lattanzio and S. Martens (2013). "Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology." Plant physiology and biochemistry **72**: 1-20.
15. Dellai, A., H. B. Mansour, I. Limem, I. Bouhleb, M. B. Sghaier, J. Boubaker, K. Ghedira and L. Chekir-Ghedira (2009). "Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in different extracts from the flowers of *Phlomis crinita Cav. ssp mauritanica* from the center of Tunisia." Drug and chemical toxicology **32**(3): 283-292.
16. Durand, G. and J.-L. Beaudeux (2011). Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives, Lavoisier.
17. Edeoga, H. O., D. Okwu and B. Mbaebie (2005). "Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants." African journal of biotechnology **4**(7): 685-688.
18. Favier, A. (2003). "Le stress oxydant." L'actualité chimique **108**(10): 863-832.
19. Fuinel, G. (2002). Arbres et plantes médicinales du jardin, Fernand Lanore:162.
20. Gutiérrez-Salinas, J., P. Mondragón-Terán, L. García-Ortiz, S. Hernández-Rodríguez, S. Ramírez-García and N. R. Núñez-Ramos (2014). "Breve descripción de los mecanismos moleculares de daño celular provocado por los radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno." Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas **19**(4): 446-454.
21. Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (2015). Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, USA.
22. HAMADOU, H. H., M. S. KALLO, L. M. MANZO, I. MOUSSA, R. ADAMOU and K. IKHIRI (2018). "Criblage phytochimique et dosage des polyphénols du *Detarium microcarpum Guill. et Perr.* utilisés dans le traitement des maladies parasitaires au Niger." Afrique science **14**(5): 390-399.
23. Ihoualép Fethi, S. and N. Abidli (2018). Effet d'extrait méthanolique de la plante médicinale *Phlomis samia* (الخياطة) sur l'apoptose des cellules cancéreuses HepG2 et MDA MB 468 et sur la cardiotoxicité induite par la Doxorubicine, جامعة الإخوة منتوري قسنطينة.
24. Jourdeuil, D., D. Kang and M. B. Grisham (1997). "Interactions between superoxide and nitric oxide: implications in DNA damage and mutagenesis." Front Biosci **2**: 189-196

25. Kabouche, A., Z. Kabouche, E. Seguin, F. Tillequin and C. Bruneau (2004). "Comparative Phytochemical Study of the Butanolic Extracts of Two Algerian *Phlomis* Species." Chemistry of Natural Compounds**40**(2): 188-189.
26. Karumi, Y. (2004). "Identification of Active Principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) Leaf Extract Y. Karumi," PA. Onyeyili and "VO Ogugbuaja." Journal of Medical Sciences**4**(3): 179-182.
27. Konate, D. T. (2011). "Monsieur Ousmane Issa SIDIBE."
28. Krishnaa, A. B., M. V. N. Reddya, G. C. S. Reddya, B. Krishnaa, S. Nayakb and C. S. Reddy (2010). "Synthesis, anti-oxidant and antibacterial properties of diethyl (4-flouro-3-nitro phenylamino)(substituted phenyl) methyl phosphonates." The International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**1**(3): 873-882.
29. Li, H.-B., K.-W. Cheng, C.-C. Wong, K.-W. Fan, F. Chen and Y. Jiang (2007). "Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae." Food chemistry**102**(3): 771-776.
30. Li, H.-y., Z.-b. Hao, X.-l. Wang, L. Huang and J.-p. Li (2009). "Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance." Bioresource technology**100**(2): 970-974.
31. Liolios, C., H. Laouer, N. Boulaacheb, O. Gortzi and I. Chinou (2007). "Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Algerian *Phlomis bovei* De No *ésubsp. bovei*." Molecules**12**(4): 772-781.
32. Maghzal, G. J., K.-H. Krause, R. Stocker and V. Jaquet (2012). "Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases." Free Radical Biology and Medicine**53**(10): 1903-1918.
33. Matkowski, A., P. Tasarz and E. Szypuła (2008). "Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, *subfamily Lamioideae*." Journal of Medicinal Plants Research**2**(11): 321-330.
34. Merouane, A., A. Saadi, A. Noui and A. Bader (2019). "Evaluation of phenolic contents and antioxidant properties of the leaves and flowers of *Phlomis biloba* Desf." International Food Research Journal**26**(1): 167-173.
35. Mika, A., F. Minibayeva, R. Beckett and S. Lütjhe (2004). "Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species." Phytochemistry Reviews**3**(1): 173-193.
36. Muniyandi, K., E. George, S. Sathyanarayanan, B. P. George, H. Abrahamse, S. Thamburaj and P. Thangaraj (2019). "Phenolics, tannins, flavonoids and anthocyanins contents influenced antioxidant and anticancer activities of *Rubus* fruits from Western Ghats, India." Food Science and Human Wellness**8**(1): 73-81.
37. Ngene, J., C. Ngoule, C. P. Kidik, P. M. Ottou, S. Dibong and E. M. Mpondo (2015). "Importance dans la pharmacopée traditionnelle des plantes à flavonoïdes vendues dans

- les marchés de Douala est (Cameroun)." Journal of Applied Biosciences**88**: 8194–8210-8194–8210.
38. Ojeil, A., N. El Darra, Y. El Hajj, P. B. Mouncef, T. J. Rizk and R. G. Maroun (2010). "Identification et caractérisation de composés phénoliques extraits du raisin chateau KSARA." Lebanese Science Journal**11**(2): 117-131.
 39. Othman, M. B., K. B. H. Salah-Fatnassi, S. Ncibi, A. Elaïssi and L. Zourgui (2017). "Antimicrobial activity of essential oil and aqueous and ethanol extracts of *Teucrium polium L. subsp. gabesianum* (LH) from Tunisia." Physiology and Molecular Biology of Plants**23**(3): 723-729.
 40. Quezel, P. and S. Santa (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.
 41. Richard, W. (2013). Nouvelle stratégie de fonctionnalisation de surfaces d'électrodes à base de sels de diazonium: application aux capteurs à antioxydants, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
 42. Rizk, A., R. AM, S. Al Nagdy and M. El Missiry (1982). "Constituents of plant growing in Qatar."
 43. Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). "Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review". Journal of functional foods, *18*: 820-897.
 44. Si Merabet Hadj, S. Evaluation de la corrélation du stress oxydatif et le syndrome du surentraînement et leur impact sur les indices de la performance physique chez les jeunes athlètes, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis.
 45. Togola, I., M. A. Konaré M. Diakité N. Diarra, F. Tounkara, R. Sanogo and D. Dembélé (2019). "Evaluation de la teneur en alcaloïdes totaux à différents stades de développement de *Datura innoxia* Mill., une plante utilisée dans la médecine traditionnelle au Mali."
 46. Uttara, B., A. V. Singh, P. Zamboni and R. Mahajan (2009). "Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options." Current neuropharmacology**7**(1): 65-74.
 47. Wang, L., J.-H. Yen, H.-L. Liang and M.-J. Wu (2003). "Antioxidant effect of methanol extracts from lotus plumule and blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn.)." Journal of food and drug Analysis**11**(1): 3.
 48. Yaïci, K., S. Dahamna, I. Moualek, H. Belhadj and K. Houali (2019). "Évaluation de la teneur des composés phénoliques, des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes de l'espèce *Erica arborea L.(Ericaceae)* dans la médecine traditionnelle du Tell sétifien dans l'Est Algérien." Phytothérapie.
 49. Yamina, M. S. (2021). "étude ethnobotanique dans le sud-est de chlef (algerie occidentale)." agrobiologia**10**(3): 2044-2061.

50. Zaabat, N., N. Darbour, C. Bayet, S. Michalet, A. Doléans-Jordhem, L. Chelr-Ghedra, S. Akkal and M.-G. Dijoux-Franca (2010). "Étude préliminaire de *Marrubium deserti* de Noé une *Lamiaceae* endémique algérienne." Phytothérapie8(6): 353-358.